



**Università  
degli Studi  
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE CHIMICHE**

CICLO XXXI

COORDINATORE  
Prof. Cavazzini Alberto

**Caratterizzazione chimica di zucca e  
radicchio a tutela di prodotti tipici  
del Delta del Po**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/10

**Dottoranda**

Dott.ssa Bergantin Caterina

*Caterina Bergantin*

**Tutore**

Dott.ssa Maietti Annalisa

*Annalisa Maietti*

**Co-Tutore**

Prof. Marchetti Nicola

*Nicola Marchetti*



# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1	Il territorio di Massenzatica . . . . .	1
1.2	Zucca . . . . .	1
1.2.1	Descrizione botanica . . . . .	1
1.2.2	Coltivazione . . . . .	3
1.2.3	Composizione . . . . .	4
1.2.4	Proprietà nutrizionali . . . . .	5
1.3	Radicchio . . . . .	6
1.3.1	Descrizione botanica . . . . .	6
1.3.2	Coltivazione . . . . .	7
1.3.3	Composizione . . . . .	8
1.3.4	Proprietà nutrizionali . . . . .	9
1.4	Normativa IGP e DOP . . . . .	10
1.5	Metaboliti secondari di interesse nutraceutico . . . . .	12
1.5.1	Carotenoidi . . . . .	12
1.5.2	Composti fenolici . . . . .	19
1.6	Bioaccessibilità, biodisponibilità e bioattività . . . . .	27
<b>2</b>	<b>Scopo</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>Risultati e discussione zucca</b>	<b>33</b>
3.1	Campionamento . . . . .	33
3.2	Analisi bromatologiche . . . . .	35
3.2.1	Analisi statistica dei dati derivanti dalle analisi chimico-bromatologiche . . . . .	39
3.3	Valutazione delle caratteristiche organolettiche . . . . .	39
3.3.1	Determinazione del grado Brix, del pH e dell'acidità . . . . .	41
3.3.2	Determinazione e quantificazione degli acidi organici . . . . .	41
3.4	Identificazione dei carotenoidi mediante HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS . . . . .	42
3.5	Quantificazione dei carotenoidi nei campioni di zucca cruda e cotta . . . . .	45
3.6	Bioaccessibilità dei carotenoidi . . . . .	48
3.7	Confronto del contenuto in carotenoidi tra le zucche coltivate a Massenzatica e Sermide . . . . .	50
<b>4</b>	<b>Risultati e discussione radicchio</b>	<b>53</b>
4.1	Campionamento . . . . .	53
4.2	Analisi bromatologiche . . . . .	53
4.3	Analisi della componente antiossidante . . . . .	56
4.4	HPLC-MS/MS . . . . .	56
4.4.1	Determinazione qualitativa del profilo fenolico . . . . .	56

4.4.2	Quantificazione di 7 composti target . . . . .	60
4.4.3	Bioaccessibilità dei polifenoli . . . . .	61
4.4.4	Capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati . . . . .	64
4.4.5	Studio dell'andamento temporale degli acidi fenolici . . . . .	65
4.5	Confronto tra radicchio di Massenzatica e competitors commerciali . . . . .	65
4.5.1	Stesso seme, terreni diversi . . . . .	65
4.5.2	Diverso seme, terreni diversi . . . . .	68
4.5.3	Analisi statistica dei dati derivanti dalle analisi chimico-bromatologiche . . . . .	71
4.5.4	Confronto mediante analisi biomolecolari . . . . .	73
<b>5</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>81</b>
5.1	Analisi bromatologiche . . . . .	81
5.1.1	Determinazione del contenuto di umidità e sostanza secca . . . . .	81
5.1.2	Determinazione del contenuto proteico totale . . . . .	81
5.1.3	Determinazione del contenuto minerale totale . . . . .	81
5.1.4	Determinazione del contenuto minerale specifico . . . . .	81
5.1.5	Determinazione della frazione lipidica . . . . .	82
5.1.6	Determinazione del profilo degli acidi grassi mediante GC-MS . . . . .	82
5.1.7	Determinazione della fibra alimentare solubile ed insolubile . . . . .	83
5.2	Valutazione delle caratteristiche organolettiche . . . . .	84
5.2.1	Determinazione del grado Brix della polpa di zucca . . . . .	84
5.2.2	Determinazione di pH e acidità della zucca . . . . .	84
5.2.3	Determinazione e quantificazione degli acidi organici nella zucca . . . . .	84
5.3	Analisi della componente antiossidante e dei composti funzionali nel radicchio . . . . .	85
5.3.1	Estrazione chimica della frazione ad attività antiossidante . . . . .	85
5.3.2	Determinazione del contenuto totale di polifenoli: metodo di Folin-Ciocalteu . . . . .	85
5.3.3	Determinazione della capacità antiossidante totale: metodo DPPH . . . . .	86
5.3.4	Determinazione della quantità di antociani . . . . .	87
5.4	Determinazione e quantificazione dei composti fenolici contenuti nel radicchio mediante analisi LC-MS/MS . . . . .	87
5.4.1	Estrazione chimica . . . . .	87
5.4.2	Estrazione enzimatica . . . . .	88
5.4.3	Analisi HPLC-MS/MS . . . . .	88
5.5	Determinazione e quantificazione dei carotenoidi . . . . .	88
5.5.1	Estrazione chimica dei carotenoidi . . . . .	88
5.5.2	Metodi di cottura . . . . .	89
5.5.3	Analisi HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS . . . . .	89
5.6	Studi di bioaccessibilità . . . . .	90
5.6.1	Estrazione dei carotenoidi dai fluidi gastrointestinali simulati . . . . .	91
5.6.2	Determinazione della capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati del radicchio nei confronti del radicale anione superossido -metodo della fotochemiluminescenza - Photochem® . . . . .	91
5.7	Analisi biomolecolari . . . . .	92
5.7.1	Estrazione del DNA . . . . .	92
5.7.2	Corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% p/v . . . . .	92
5.7.3	Lettura spettrofotometrica UV-Vis del DNA estratto . . . . .	92
5.7.4	Protocollo di amplificazione RAPD . . . . .	93
<b>6</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>95</b>

**Bibliografia**

**99**

**Appendice**

**109**

# 1 | Introduzione

## 1.1 Il territorio di Massenzatica

Il CUM (Consorzio Uomini di Massenzatica), proprietà collettiva di 353 ettari a Massenzatica (Ferrara), ha origini che risalgono al Medioevo quando l'Abate di Pomposa concesse alla popolazione locale il diritto al pascolo di queste terre marginali poco adatte alla coltivazione. Da allora queste terre furono lavorate e gradualmente bonificate. Dal 1951 ad oggi, i terreni hanno subito una radicale trasformazione agraria per la quasi totalità ed attualmente sono adatti a qualsiasi coltivazione; essi sono stati dati in affitto ai Consorziati e non Consorziati con l'obbligo di condurli secondo i migliori metodi agrari. Il consorzio coltiva direttamente 70 ettari di terreno mentre i rimanenti sono dati in gestione, attraverso contratti con canone agevolato, a coltivatori diretti o imprenditori agricoli professionali locali. Ogni contratto di affitto assegna appezzamenti di circa 5/8 ettari ciascuno, di cui possono essere beneficiari anche soggetti che siano già proprietari, per conto proprio, di altri fondi. Questa particolare forma giuridica di proprietà ha consentito un approccio di tipo imprenditoriale che ha permesso una notevole crescita in termini economici ed occupazionali. Questi terreni sono inoltre contornati dalle Dune Fossili di Massenzatica, che sono testimonianza di una antica linea di costa di circa 3.000 anni fa. Attualmente, una parte dei terreni è coltivata a mais e soia, un'altra a pomodoro, patata da industria e da mercato (coltivata di anno in anno per colture variabili con l'intento di massimizzare il reddito e l'occupazione locale), un'altra è occupata da un impianto fisso di asparago verde. Nel piano colturale del CUM una parte dei terreni è inoltre destinata alla coltivazione di due varietà di zucca, Delica e Violina, mentre sia per superficie che per produzione il radicchio, nelle tipologie rosso tondo e rosso lungo, rappresenta la principale orticola grazie alla quale si genera un consistente valore economico e sociale.

## 1.2 Zucca

### 1.2.1 Descrizione botanica

La zucca appartiene alla famiglia delle Cucurbitaceae, di cui fanno parte anche la zuccina (*Cucurbita pepo*), il cetriolo (*Cucumis sativus*), il cocomero (*Citrullus lanata*) e il melone (*Cucurbita melo*). *Cucurbita* è il nome popolare della famiglia delle Cucurbitaceae, che comprende circa 110 generi e da 560 a 850 specie, tra queste il genere *Cucurbita* comprende circa 14 specie. Con il termine zucca vengono identificati i frutti di diverse piante appartenenti sia al genere *Cucurbita* (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*) sia ad altri generi come ad esempio *Lagenaria vulgaris*.

L'origine della famiglia delle zucche non è del tutto nota: si hanno testimonianze di coltivazione, seppur di varietà diverse, da parte di Egiziani, Romani, Indiani d'Oriente, Arabi, Africani del Niger. Le testimonianze più antiche sono relative a ritrovamenti di semi risalenti al 7000-

6000 a.C. in Messico. La zucca era un alimento base della dieta degli indiani del Nord America; i primi coloni impararono a coltivarla e successivamente fu importata dagli spagnoli in Europa, dove la coltivazione si diffuse però all'inizio del XVI secolo. Al giorno d'oggi, la zucca è coltivata in tutte le zone temperate di entrambi gli emisferi [1].

Le cucurbitacee sono per lo più piante erbacee annuali, con un ciclo vegetativo che si compie nel corso di dodici mesi. Queste sono piante rampicanti o striscianti, dal fusto ruvido e dalle foglie particolarmente grandi, peduncolate, cuoriformi e costituite da 5 lobi. La cucurbita è specie monoica, presenta quindi sulla stessa pianta fiori maschili e femminili, entrambi di colore giallo arancio e gamopetali (petali uniti tra loro), le cui corolle sono a forma di stella. I frutti, detti peponidi, presentano forma e colore variabili a seconda delle numerose varietà esistenti e selezionate dall'uomo e hanno polpa più o meno gialla con semi appiattiti. Il pericarpo o buccia è più o meno duro, si differenzia molto in base alle varietà e può presentare delle macchie, striature, colori diversi, può essere liscio ma anche grinzoso. Il mesocarpo contiene la polpa carnosa che può essere dolce in base al grado di maturazione, si presenta a volte fibrosa o succosa e a seconda della varietà presenta colori che vanno dal verde o grigio, giallo, arancione o rosso; i semi appiattiti si trovano all'interno della polpa. In questo ortaggio fiori, frutti e semi sono commestibili. Si tratta di uno dei frutti tipici dell'autunno: nelle regioni italiane le zucche mature e pronte al consumo vengono raccolte da fine settembre a fine di novembre.

Le varietà di zucca esistenti e coltivate sono numerose ed alla varietà di colorazioni e conformazioni che caratterizza le diverse tipologie, corrisponde anche una estrema diversità in fatto di consistenza e sapore. Pezzatura uniforme, colore intenso, grado zuccherino minimo e consistenza della polpa sono parametri comuni che definiscono la qualità richiesta alle diverse varietà in relazione alle esigenze del mercato ortofrutticolo. Si deve inoltre considerare l'aspetto culinario, poiché ogni preparazione prevede uno specifico tipo di zucca. Nel Mantovano, ad esempio, regna la zucca detta Cappello del prete (*C. maxima*), tipica del territorio dell'Oltrepò mantovano e di alcuni comuni a nord del Po. Il nome popolare di questa zucca deriva dalla sua forma a turbante poiché si presenta con due falde, dove quella superiore è più sviluppata; la buccia è di colore grigio-verde, le dimensioni ed il peso sono variabili (da 1 a 5 kg), la polpa, di colore giallo-arancio, è di consistenza soda e poco fibrosa, mentre il sapore è dolce. Tali caratteristiche la rendono ideale per la preparazione di piatti tradizionali come i tortelli, gli gnocchi e il risotto. Un'altra varietà sempre più diffusa e coltivata è la zucca Delica, ibrido precoce e dal peso più contenuto. In Emilia Romagna, invece, è molto richiesta la zucca Violina che, come indicato nel disciplinare di produzione dei *Cappellacci di zucca ferraresi IGP*, viene utilizzata per il ripieno di questo piatto tipico.

Di seguito sono riportate alcune tra le varietà più conosciute e coltivate in Italia (figura 1.1).

- Zucca Marina di Chioggia (*Cucurbita maxima*): è una varietà tipica del Veneto, con pianta produttiva, rustica e vigorosa, peso medio 2,5-3,5 Kg, buccia molto rugosa, leggermente solcata, di colore grigio-verde scuro e polpa di colore giallo-arancione;
- Zucca Beretta Piacentina (*Cucurbita maxima*): varietà tipica del nord Italia, con pianta molto produttiva e che si espande molto sul terreno, peso medio 2,5-5 Kg, buccia grigia e semi rugosa e polpa arancione
- Zucca Delica (*Cucurbita maxima*): è una varietà ibrida che presenta pianta rustica la cui coltura è poco impegnativa, frutti con polpa dolce di color giallo intenso e peso medio 1,5-2,0 Kg, adatta anche a produzioni estive
- Zucca Cappello del Prete (*Cucurbita maxima*): storica varietà lombarda con buccia grigia, dalla forma molto caratteristica e conosciuta per le ottime qualità organolettiche, presen-



**Figura 1.1:** Varietà di zucche.

ta polpa giallo - arancio particolarmente soda e consistente, peso medio 1,5-3,0 Kg ed è destinata al mercato fresco di alta qualità;

- Zucca Moscata di Provenza (*Cucurbita moschata*): coltivata in origine nel Sud della Francia, è una varietà molto produttiva con piante che si espandono molto sul terreno, presenta frutti semisferici, di grandi dimensioni (7,0-9,0 Kg) e dalla costolatura marcata, con polpa rosso-arancio;
- Zucca Butternut Rugosa (*Cucurbita moschata*): è una delle varietà più apprezzate nel Nord Italia, nota anche come "Violina", presenta una pianta di buona produttività con frutti che pesano 1,5-3,0 Kg e forma a campana, con buccia arancione e rugosa, polpa giallo-arancio, dolce e soda.

## 1.2.2 Coltivazione

Le Cucurbitaceae rappresentano un'importante coltura nel panorama agricolo italiano e vengono coltivate su circa 45000 ettari in Italia, principalmente in Sicilia, Puglia, Campania, Toscana, Emilia Romagna, Lombardia, Lazio e Veneto. Le superfici coltivate per la produzione di zucche, a dimostrazione della notevole crescita di questo settore, sono aumentate negli ultimi anni del 58% e le due regioni leader sono Lombardia ed Emilia Romagna. Da un'indagine Coldiretti svolta nel 2017, emerge come le zucche "Made in Italy" abbiano fatto registrare un aumento del 16%. La regione Lombardia ha più che raddoppiato le superfici destinate alla zucca negli ultimi dieci anni: da meno di 260 ettari nel 2006 agli oltre 700 ettari del 2017, dove la classifica delle province lombarde è guidata da Mantova, seguita da Cremona. Indagini sottolineano anche come in Emilia Romagna siano circa 500 gli ettari coltivati, con una produzione che sfiora gli 80mila quintali. La coltivazione, realizzata quasi esclusivamente in pieno campo, è in grado di valorizzare anche appezzamenti di terreno marginale delle singole aziende agricole.

Un ruolo fondamentale per la corretta coltivazione di questo ortaggio è naturalmente svolto dal terreno: sono preferibili quelli a medio impasto (argilla 8-15%, limo 25-35%, sabbia 45-55%), ben drenanti, ricchi in sostanze organiche e con un pH compreso tra 6 e 7. Si predilige

la tecnica di semina diretta, effettuata tra la seconda metà di aprile ed i primi giorni del mese di giugno. Nella coltivazione della zucca un'acortezza fondamentale è quella di mantenere il giusto sesto d'impianto (la disposizione geometrica delle varie piante, intervallate, con le giuste distanze le une dalle altre). Questo perché le piante hanno un fortissimo sviluppo vegetativo e con il loro andamento strisciante riescono a estendersi per diversi metri. La temperatura ideale per la produzione, essendo la zucca originaria delle aree tropicali e subtropicali dell'America, è mite e di circa 20 °C; temperature inferiori a 10 °C, gelate e temperature oltre i 30 °C, minano la crescita e la maturazione dell'ortaggio. Sono quindi da evitare le zone esposte a venti freddi, ma anche i luoghi dove il caldo in estate diventa notevole ed il tasso di umidità elevato: l'ideale sarà dunque una zona semi ombreggiata, ma allo stesso tempo mite e arieggiata. Per questo motivo la zucca viene coltivata durante la primavera e l'estate, con raccolta tra la fine dell'estate e l'inizio dell'autunno. Può essere conservata per mesi senza che il sapore della polpa venga compromesso. Nelle zone più fredde e umide della Penisola, le zucche si raccolgono tra settembre e ottobre mentre nelle regioni a clima mite, dove non sussistono rischi di gelate, la raccolta può avvenire anche a novembre inoltrato. La raccolta inizia quando la vegetazione della pianta, compreso il peduncolo del frutto, disseca completamente e il frutto ha raggiunto le caratteristiche morfologiche tipiche della varietà d'appartenenza. Il colore del frutto e la consistenza del picciolo sono due parametri che, in funzione delle caratteristiche note di ogni varietà, consentono di valutare il grado di maturazione della zucca al momento della raccolta. Dopo la raccolta, bisogna asciugare le zucche per preservare il sapore, la consistenza della polpa e prolungare la shelf-life. Le zucche andrebbero lasciate asciugare per un massimo di 3 settimane e dopo questo periodo, trasferite in un ambiente non umido, in cui le temperature si aggirino intorno ai 15-18 °C. Non è quindi necessaria una cella frigorifera ma un semplice locale in cui le temperature non siano inferiori ai 10 °C poiché la polpa potrebbe cristallizzare e degradare facilmente. Il locale individuato deve essere poco umido e con ricircolo d'aria.

### 1.2.3 Composizione

Secondo la tabella di composizione degli alimenti del CREA - Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, fino al 2013 denominato INRAN, Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione - (tabella 1.1) la specie *Cucurbita maxima* è un ortaggio poco calorico: una porzione da 100 g apporta solo 18 kcal e la polpa è ricca soprattutto in acqua e ne contiene infatti il 94,6%; è inoltre presente il 2,5% di zuccheri solubili, l'1,1% di proteine, lo 0,8% di ceneri e lo 0,1% di grassi [2].

La zucca è considerata un alimento che contribuisce al benessere ed alla salute poiché contiene numerosi componenti biologicamente attivi. Nella polpa sono presenti molti composti con un'elevata importanza nutrizionale come polisaccaridi, proteine, carotenoidi, tocoferoli, provitamina A, C, flavonoidi, amminoacidi e acidi grassi essenziali. Inoltre è una buona fonte di minerali come calcio, magnesio, sodio e cromo [3]. Nonostante il contenuto di proteine nella polpa sia ridotto, si individuano tuttavia amminoacidi essenziali quali lisina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina e treonina. Nei semi di zucca è presente, in quantità variabile in relazione alla varietà, la cucurbitina. Questo amminoacido pirrolidinico, scoperto negli anni '60, presenta proprietà vermifughe, favorisce il distacco dei parassiti dalle pareti intestinali e sembra avere un interessante effetto preventivo nei confronti delle malattie della prostata [4]. Nei semi di zucca è importante anche il contenuto in amminoacidi essenziali, in acidi grassi (in particolare acido oleico, palmitico e linolenico) e la presenza di importanti elementi come K, Cr, Na, Mg e Zn [5].

Composizione chimica	Valore / 100 g
Parte edibile (%)	81,0
Acqua (g)	94,0
Proteine (g)	1,10
Lipidi (g)	0,10
Colesterolo (mg)	0,00
Carboidrati disponibili (g)	3,50
Amido (g)	0,90
Zuccheri solubili (g)	2,50
Alcol (g)	0,00
Energia (kcal)	18,0
Energia (kJ)	77,0
Ferro (mg)	0,90
Calcio (mg)	20,0
Fosforo (mg)	40,0
Tiamina (mg)	0,03
Riboflavina (mg)	0,02
Niacina (mg)	0,50
Vitamina A retinolo eq. ( $\mu$ g)	599
Vitamina C	9,00

Tabella 1.1: Composizione chimica e valore energetico per 100 g di parte edibile di zucca gialla (fonte: CREA).

### 1.2.4 Proprietà nutrizionali

Il consumo di zucca è stato recentemente rivalutato ed incentivato non solo per il basso contenuto calorico ma anche per la presenza di principi nutritivi che proteggono e riparano le cellule dell'organismo come vitamine, sali minerali, enzimi e fattori antiossidanti tra cui primeggiano i carotenoidi. La letteratura scientifica ha individuato ed indagato diversi effetti benefici correlabili all'assunzione di zucca (figura 1.2).

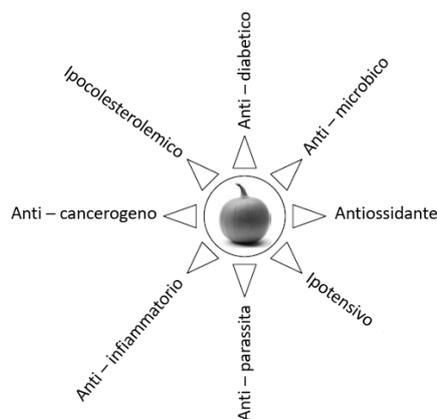


Figura 1.2: Principali azioni benefiche della zucca.

- *Antiossidante*. I carotenoidi contenuti nella polpa ed i tocoferoli, la vitamina E, contenuti nei semi, unitamente ad altri composti, contrastano i radicali liberi e rallentano l'invecchiamento delle cellule. Uno studio pubblicato ha sottolineato come l'utilizzo dell'estratto di zucca aumenti significativamente le attività seriche ed epatiche di superossido dismutasi e glutadione perossidasi nei topi, riducendo la concentrazione di malonaldeide, marker dello stress ossidativo [6]. In letteratura sono presenti numerose pubblicazioni che hanno indagato le sostanze coinvolte ed i meccanismi di azione.

- *Ipocolesterolemico*. Gli acidi grassi oleico e linoleico, di cui i semi di zucca sono ricchi, espletano la loro attività terapeutica in sinergia con carotenoidi e protoclorofille, riducendo questo problema. È stato inoltre dimostrato che la polvere di zucca porta a una riduzione del colesterolo totale e dei trigliceridi nei ratti e che i polisaccaridi, di cui la zucca è ricca, hanno un effetto ipolipidico.
- *Antinfiammatorio*. Questo frutto è considerato una buona fonte di sostanze antinfiammatorie che potrebbero coadiuvare alcune patologie di origine antinfiammatoria, come riportato anche in uno studio svolto su ratti, in cui l'olio di semi di zucca è stato usato come supplemento dietetico in combinazione con farmaci FANS [7].
- *Anti-cancerogeno*. Il  $\beta$ -carotene, di cui questo frutto è ricco, protegge il sistema circolatorio ed è un buon antinfiammatorio. Secondo diversi studi tale composto svolgerebbe inoltre un ruolo importante nella prevenzione di tumori, specialmente alla prostata ed al polmone [8].
- *Ipotensivo*. Alcuni studi hanno dimostrato l'effetto ipotensivo dell'olio ricavato dai semi di zucca. Questo è infatti in grado di potenziare l'effetto di due importanti farmaci ipotensivi come il captopril e la fenlodipina. La polvere di zucca ha dimostrato effetto anche in un trial clinico svolto su persone diabetiche [9].

## 1.3 Radicchio

### 1.3.1 Descrizione botanica

Con il termine Radicchio si fa riferimento all'insieme di piante appartenenti alla famiglia delle *Asteraceae*, sottofamiglia *Cichorioidea*, genere *Cichorium*, specie *intybus*. La parola "Radicchio" deriva dal latino *radicŭla*, diminutivo di *radix-icis*, che significa radice e che indica varie insalate amare. La specie *Cichorium intybus* è una cicoria selvatica e spontanea, originaria di una vasta area euroasiatica e conosciuta già da Greci e Romani, che erano soliti consumarla cruda, attribuendole proprietà terapeutiche, depurative e calmanti. Si ipotizza anche che le cultivar di radicchio derivino da fenotipi a foglie rosse spontanei, originariamente coltivati in Oriente e successivamente introdotti in Europa [10]. Le prime informazioni riguardo la sua coltivazione in Veneto risalgono al XVI secolo, anche se la tecnica di produzione si è affinata nel XIX secolo. Le tipologie di radicchio, oltre che dal colore delle foglie (rosso, variegato, verde, rosa, bianco) fanno spesso riferimento alla località di origine e coltivazione (Treviso, Verona, Chioggia, Lusia).

Il radicchio è un ortaggio tipicamente autunnale ed invernale, caratterizzato da un sapore più o meno amaro a seconda della tipologia e della coltivazione. Esistono numerosi ecotipi "storici" anche se la crescente richiesta da parte del mercato ortofrutticolo, ha suscitato forte interesse da parte delle ditte sementiere che hanno avviato una intensa attività di miglioramento genetico, portando alla diffusione di tipologie ibride. Si riportano di seguito alcune tra le tipologie maggiormente diffuse e note (figura 1.3).

- Radicchio di Treviso precoce: le foglie sono caratterizzate da una nervatura principale molto accentuata di color bianco che si dirama in molte piccole penninervie nel rosso intenso del lembo fogliare notevolmente sviluppato. Il cespo è voluminoso, allungato e ben chiuso, corredato da modeste porzioni di radice. La raccolta comincia il primo di settembre, la sua maturazione si raggiunge in pieno campo dopo che i cespi vengono legati, in pieno campo, al fine di inibire il normale processo di fotosintesi, per il tempo

necessario al raggiungimento del giusto grado di maturazione. Successivamente alla raccolta, i cespi liberati dalla legatura vengono mondati dalle foglie esterne non rispondenti ai requisiti minimi e quindi si effettua la tolettatura del colletto e del fittone. Le foglie hanno sapore leggermente amarognolo e consistenza mediamente croccante.

- Radicchio di Treviso tardivo: questo radicchio si ottiene secondo la tradizionale tecnica di forzatura ed imbianchimento durante la quale i mazzi, dopo la raccolta -che avviene normalmente a partire dai primi di novembre- vengono posti in vasche riempite con acqua corrente di risorgiva. Dopo circa quindici giorni, cioè una volta ottenuti i nuovi germogli, si procede con la fase di tolettatura, lavaggio e confezionamento. Una volta pronto, all'aspetto, si presenta nella tipica forma lanceolata, con germogli regolari e compatti che tendono a chiudersi all'apice. Il lembo fogliare si presenta di colore rosso intenso con una nervatura principale di colore bianco. La forma è quindi inconfondibile, il sapore gradevolmente amarognolo e la consistenza croccante.
- Radicchio variegato di Castelfranco: la sua caratteristica principale risiede nelle foglie espanse con nervature poco accentuate, bordo frastagliato e lembo leggermente ondulato, che presentano una colorazione bianco crema con variegature distribuite in modo equilibrato su tutta la pagina fogliare di tinte diverse dal viola chiaro al rosso violaceo, e rosso vivo. La sua origine è dovuta dall'incrocio tra il radicchio di Treviso e la scarola. Il sapore va dal dolce al gradevole amarognolo molto delicato. La raccolta inizia il primo di ottobre, seguono poi i processi per l'imbianchimento.
- Radicchio rosso di Verona: il germoglio è compatto, serrato nella parte apicale, leggermente ellittico, con nervature della lamina fogliare ben evidenti ed aperte. Le foglie sono di colore rosso scuro e intenso, il lembo fogliare appare rosso brillante senza variegature, la nervatura principale è completamente bianca. Il gusto tipico è caratterizzato dall'amarognolo della foglia che si contrappone alla dolcezza sprigionata dalle nervature bianche, il precoce ha carattere più deciso mentre il tardivo più dolce.
- Radicchio rosso di Chioggia: ha il cespo tondeggiant e compatto, con foglie di colore rosso più o meno intenso con nervature centrali e secondarie bianche, sapore gradevolmente amarognolo e consistenza croccante. Si distinguono due tipologie in relazione al periodo di raccolta: precoce dal 1 Aprile al 15 Luglio, tardivo dal 1 Settembre al 31 Marzo.
- Radicchio variegato di Chioggia: il cespo ha forma tondeggiant e semi-aperta con foglie spesse e carnose di colore rosso variegato uniformemente da tonalità bianco-verde.

### 1.3.2 Coltivazione

Il radicchio è coltivato in Italia su circa 16.000 ettari con una produzione di circa 250.000 tonnellate. La produzione è concentrata per circa il 54% in Veneto, regione che vanta 4 prodotti IGP, seguito da Puglia, Abruzzo, Emilia Romagna, Lazio, Marche, Campania e Lombardia. Il radicchio è una pianta tipicamente autunnale ed invernale che si adatta tuttavia a condizioni climatiche diverse: presenta un'elevata resistenza al gelo (anche se variabile in relazione alla tipologia) ed alla siccità. Le cultivar precoci del Rosso di Chioggia e Variegato di Castelfranco possono subire danni quando la temperatura è di poco inferiore a 0 °C, mentre il Rosso di Treviso resiste bene a temperature di - 5 °C, tanto che il disciplinare di produzione specifica come la raccolta debba avvenire dopo almeno due brinate, per favorire la colorazione rosso intenso delle foglie. Gli abbassamenti termici durante la prima parte del ciclo devono comunque essere evitati perché inducono prefioritura e conseguenti perdite produttive. Per quanto riguarda

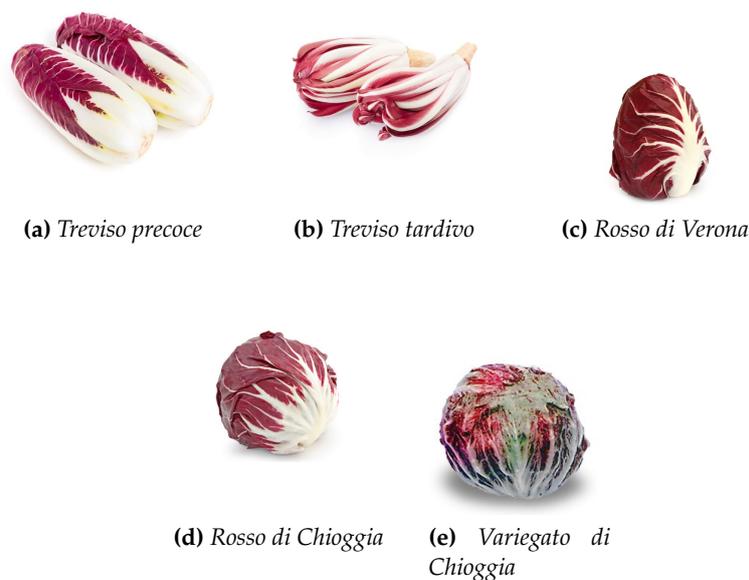


Figura 1.3: Varietà di radicchio.

il tipo di terreno, si preferiscono terreni freschi, profondi e senza ristagni idrici, con composizione tendenzialmente sabbiosa e pH compreso tra 6,0 e 6,8. In particolare, per il Rosso e Variegato di Chioggia sono consigliati terreni sabbiosi; per il Variegato di Castelfranco terreni di medio impasto; per il Rosso di Verona e di Treviso terreni da sabbiosi ad argillosi.

La semina avviene in periodo caldo per poi ottenere il prodotto durante il periodo freddo, quindi si può indicare come periodo generale i mesi che intercorrono tra marzo e luglio, anche se ogni tipologia richiede un periodo di semina, e conseguentemente di raccolta, diverso. Prima di procedere con la semina, il terreno deve essere fertilizzato e preferibilmente arieggiato, così da risultare più morbido e meno compatto. La semina può avvenire direttamente in campo o nel semenzaio. Nel primo caso, si esegue tra il mese di giugno e quello di luglio, all'interno di buche non troppo profonde e distanti tra loro circa 25 cm, ponendovi 5-8 semi e coprendoli con un leggero strato di terreno. L'operazione di diradamento va effettuata alla comparsa della quarta foglia di radicchio, eliminando gli ortaggi meno sviluppati e mantenendo invece quelli più robusti. Nel secondo caso, deve essere effettuata la pratica di trapianto in campo quando le piantine risultano idonee e tale passaggio richiede attenzione ed esperienza in modo tale da non danneggiare le radici in modo irreversibile. Il terreno deve rimanere costantemente umido (fino a 10 cm di profondità) e si devono evitare irrigazioni troppo abbondanti o ristagni idrici. La raccolta avviene nei mesi di ottobre e novembre per le varietà precoci, da dicembre a febbraio per le varietà tardive.

### 1.3.3 Composizione

Secondo la tabella di composizione degli alimenti del CREA (tabella 1.2), una porzione di radicchio (100 g) apporta solo 13 kcal, delineandolo quindi come un ortaggio poco calorico. L'elevato contenuto di acqua unitamente alla fibra presente favorisce la funzionalità intestinale, mentre la presenza di inulina favorisce il corretto funzionamento del colon, promuovendo la crescita della flora intestinale e inibendo la proliferazione di batteri che sono nocivi al nostro organismo. Il sapore amaro, stimola inoltre la produzione di bile favorendo la digestione, in particolare quella dei grassi, e sostenendo la funzionalità del fegato. Il sapore amaro è dovuto

alla presenza di sesquiterpeni lattonici, in particolare lattucina e lattucopicrina, nelle foglie e nelle radici [11]. Il radicchio è consigliato anche della dieta di persone affette da diabete di tipo II, sia perché l'inulina aiuta a regolare la glicemia, sia perché la fibra presente trattiene gli zuccheri introdotti con la dieta, riducendone così l'assorbimento. La fibra riduce anche l'assorbimento di colesterolo e grazie alla contemporanea presenza di fitosteroli con attività ipocolesterolemizzante rende questo ortaggio ottimo anche in chi soffre di ipercolesterolemia. La fibra inoltre contribuisce al senso di sazietà durante i pasti aiutando a limitare il consumo di alimenti ad elevata densità energetica. Il radicchio è ricco di sali minerali tra cui potassio, fosforo, sodio, ferro, magnesio e calcio che lo rendono un alimento ideale in caso di demineralizzazione dell'organismo. È interessante la presenza di potassio, il cui ruolo è fondamentale per il corretto funzionamento dei muscoli e del cuore, per la trasmissione degli impulsi nervosi e per il controllo della pressione arteriosa e di calcio, che favorisce il metabolismo delle ossa.

Composizione chimica	Valore / 100 g
Parte edibile (%)	72,0
Acqua (g)	94,0
Proteine (g)	1,40
Lipidi (g)	0,10
Colesterolo (mg)	0,00
Carboidrati disponibili (g)	1,60
Amido (g)	0,00
Zuccheri solubili (g)	1,60
Fibra totale (g)	3,00
Fibra solubile (g)	0,59
Fibra insolubile (g)	2,37
Alcol (g)	0,00
Energia (kcal)	13,0
Energia (kJ)	52,0
Sodio (mg)	10,0
Potassio (mg)	240
Ferro (mg)	0,30
Calcio (mg)	36,0
Fosforo (mg)	30,0
Tiamina (mg)	0,07
Riboflavina (mg)	0,05
Niacina (mg)	0,30
Vitamina A retinolo eq. ( $\mu$ g)	tr
Vitamina C	10,0

Tabella 1.2: Composizione chimica e valore energetico per 100 g di radicchio rosso (Fonte: CREA).

### 1.3.4 Proprietà nutrizionali

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, una dieta sana ed equilibrata è in grado di offrire molti benefici: ciò che mangiamo e beviamo può influenzare la risposta immunitaria del nostro organismo, prevenire l'insorgere di malattie cardiovascolari, degenerative, diabete e diversi tipi di cancro. In quest'ottica, il consumo di frutta e verdura diventa pilastro portante e fondamentale poiché si stima che con 600 grammi di frutta e verdura al giorno si eviterebbero oltre 135 mila decessi, un terzo delle malattie coronariche e l'undici per cento degli ictus. Per un'alimentazione corretta, si dovrebbe seguire la regola delle 5 porzioni al giorno, tre di frutta e due di verdura, e variarne il colore poiché ad ogni tonalità corrispondono determinate proprietà nutritive. Esistono numerosi studi che sottolineano come nel radicchio siano presenti numerosi composti antiossidanti e di interesse nutraceutico.

Rispetto alle altre varietà di cicoria, il radicchio è caratterizzato da un elevato contenuto di an-

tocianine, come testimonia la colorazione rosso-violacea [12]. Questi composti sono in grado di inibire l'azione di alcuni enzimi coinvolti nella demolizione delle fibre di elastina e collagene che compongono la parete dei vasi sanguigni, e permettono il mantenimento di una buona circolazione aumentando il tono delle pareti venose, migliorando la resistenza dei vasi e riducendo la fragilità capillare. Proprio per questo motivo, l'assunzione di antocianine viene sempre più spesso consigliata per problemi di permeabilità e fragilità capillare dell'occhio. Le antocianine appartengono alla classe dei flavonoidi, composti fenolici di notevole interesse nutraceutico. In letteratura sono presenti numerosi studi che evidenziano la presenza di questi composti fitochimici nel radicchio, ponendo l'attenzione sui loro molteplici effetti benefici.

## 1.4 Normativa IGP e DOP

L'Italia si distingue per un patrimonio agroalimentare unico in termini di ricchezza, varietà e pregio. La presenza di numerose produzioni tipiche è legata alla particolarità del territorio e della storia italiana, che ha permesso la creazione ed il mantenimento nel tempo di tradizioni produttive, gastronomiche e culturali molto diversificate. Questo patrimonio agroalimentare crea valore dal punto di vista culturale, sociale ed economico e a ciò si va ad aggiungere anche l'effetto generato dal connubio ormai inscindibile turismo–enogastronomia, che contribuisce a potenziare la conoscenza e il favore dei prodotti italiani all'estero nonché a preservare determinate aree e a sviluppare sistemi locali. Tenuto conto dell'importanza e del pregio che queste produzioni rivestono, la Commissione Europea ha istituito specifici strumenti per la loro tutela e valorizzazione valevoli su tutto il territorio comunitario: tali strumenti sono i marchi DOP-IGP-STG (figura 1.4). I prodotti a denominazione di origine rispondono a una precisa domanda dei consumatori legati a un'idea di cibo nel quale si ricercano tracciabilità, sicurezza, trasparenza, espressi nella qualità caratterizzata dal legame a un territorio. L'appartenenza a tali marchi incoraggia la produzione agricola diversificata, al fine di proteggere i nomi dei prodotti da abusi, imitazioni ed aiuta inoltre i consumatori fornendo loro informazioni specifiche sul prodotto. Le denominazioni di origine oltre a rappresentare quindi una tutela per i consumatori, per i prodotti e per l'economia di un territorio, rappresentano una tutela anche per l'ambiente poiché contribuiscono alla salvaguardia degli ecosistemi, ad una maggiore attenzione alle politiche attuate ed alla promozione di uno sviluppo sostenibile. Un prodotto agroalimentare certificato è l'esito di un processo storico collettivo e localizzato di conoscenza che si fonda sulla combinazione di risorse territoriali e che origina un legame forte ed unico con il territorio, unendo produzione e consumo.

- La Denominazione di Origine Protetta (DOP) identifica il nome di una regione, di un luogo determinato o, in casi eccezionali, di un paese, che serve a designare un prodotto alimentare: (i) originario di tale regione, di tale luogo determinato o di tale paese; (ii) la cui qualità o le cui caratteristiche sono dovute essenzialmente o esclusivamente all'ambiente geografico, inclusivo dei fattori naturali e umani; (iii) la cui produzione, trasformazione e elaborazione avvengono all'interno dell'area geografica determinata.
- L'Indicazione Geografica Protetta (IGP) identifica il nome di una regione, di un luogo determinato o, in casi eccezionali, di un paese, che serve a designare un prodotto agricolo o alimentare: (i) originario di tale regione, di tale luogo determinato o di tale paese; (ii) del quale una qualità determinata, la reputazione o altre caratteristiche possono essere attribuite all'origine geografica; (iii) la cui produzione e/o trasformazione e/o elaborazione hanno luogo nell'area geografica determinata.

- La Specialità Tradizionale Garantita, a differenza dei prodotti DOP e IGP, non certifica il legame del prodotto alimentare con una specifica area geografica, ma mira a valorizzare la componente tradizionale del prodotto. Il marchio STG garantisce quindi la sola ricetta tipica o il metodo di produzione tradizionale, che deve esistere da almeno 30 anni.

I riconoscimenti DOP, IGP e STG vengono rilasciati a seguito di una rigorosa istruttoria sulle caratteristiche del prodotto, il metodo di produzione e l'origine storica del territorio in cui viene coltivato. Questa valutazione vede coinvolti, a livello nazionale, il Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali e le Regioni dei territori interessati dalla produzione e, a livello comunitario, la Commissione Agricoltura. Le denominazioni riconosciute vengono iscritte nella Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee e rese pubbliche.



Figura 1.4: Loghi comunitari DOP, IGP e STG.

L'Italia, con la sua straordinaria ricchezza di prodotti tipici di specifiche aree geografiche, può trarre da tali riconoscimenti importanti vantaggi commerciali, sui mercati interni ed esteri, e il consumatore, ove correttamente informato, può scegliere il meglio del patrimonio agroalimentare del nostro Paese. Ad oggi, i riconoscimenti DOP, IGP e STG conseguiti dall'Italia sono complessivamente 299; Emilia Romagna e Veneto sono le regioni italiane con più DOP e IGP, con rispettivamente 46 e 38 prodotti.

Per quanto riguarda il radicchio, il rosso di Treviso, il rosso di Verona, il variegato di Castelfranco ed il rosso di Chioggia hanno ottenuto tutti la certificazione europea IGP e come tale la loro produzione è soggetta a una severa regolamentazione. Il radicchio rosso di Treviso IGP ha ricevuto la certificazione nel 1996, ha zona di produzione, trasformazione e confezionamento nell'ambito delle province di Treviso, Padova e Venezia [13]. Il radicchio variegato di Castelfranco IGP ha ricevuto la certificazione nel 1996 e interessa come zona di produzione 25 comuni della provincia di Treviso, 19 comuni della provincia di Padova e sette comuni della provincia di Venezia [14]. Il radicchio rosso di Chioggia IGP ha ricevuto la certificazione nel 2008, ha zona di produzione nell'intero territorio dei comuni di Chioggia, in provincia di Venezia, e Rosolina, in provincia di Rovigo, per la tipologia precoce; i comuni di Chioggia, Cona e Cavarzere, in provincia di Venezia, di Codevigo e Correzzola, in provincia di Padova, e di Rosolina, Ariano Polesine, Taglio di Po, Porto Viro e Loreo in provincia di Rovigo, per la tipologia tardiva [15]. Il radicchio rosso di Verona IGP ha ottenuto la certificazione nel 2009, con zona di produzione nel territorio di 10 comuni delle tre province di Verona, Vicenza e Padova, usando esclusivamente semi autoctoni tramandati e custoditi dalle famiglie degli ortolani locali [16].

Nonostante la zucca sia un alimento presente nelle tradizioni di numerose regioni italiane (specialmente Emilia Romagna, Lombardia, Piemonte e Veneto) grazie al suo sapore, al colore ed alla versatilità, non esistono al momento certificazioni IGP per alcuna tipologia di zucca. Nei *Cappellacci di Zucca Ferraresi IGP*, piatto caratteristico della tradizione ferrarese, viene tut-

tavia utilizzata la sola zucca Violina (*Cucurbita moschata*), come specificato nel disciplinare di produzione, che conferisce un gusto unico ed inconfondibile a questa pasta ripiena [17].

## 1.5 Metaboliti secondari di interesse nutraceutico

Negli ultimi decenni, è stata posta particolare attenzione alla relazione tra le condizioni di salute ed una dieta equilibrata e ricca di frutta e verdura. Come anticipato anche nelle sezioni 1.2.4 e 1.3.4, studi epidemiologici hanno sottolineato il ruolo cruciale che la dieta svolge nella prevenzione di malattie croniche, riducendo il rischio di malattie cardiovascolari, cancro, diabete, Alzheimer, osteoporosi e disturbi della vista [18] [19]. Frutta e verdura, oltre ad essere ricche in vitamine, minerali e fibre, sono alimenti che contengono composti fitochimici, che non sono considerati nutrienti primari poiché non hanno funzioni fisiologiche definite. I composti fitochimici possono svolgere funzioni protettive dello stato di salute in base a diversi meccanismi: azione antiossidante (polifenoli, carotenoidi, composti allilsolforati), azione ormonale (isoflavoni), stimolazione o inibizione di enzimi, interferenza con la duplicazione del DNA, effetto antibatterico, interferenza con assorbimento e sintesi del colesterolo (steroli vegetali). I fitochimici derivano dal metabolismo secondario delle piante e sono componenti minoritari degli alimenti [20].

I composti fitochimici rientrano nei nutraceutici, termine con il quale si possono definire quelle sostanze chimiche di derivazione naturale, presenti all'interno di alimenti, di cui è stata dimostrata l'attività benefica in termini di prevenzione o trattamento nei confronti di una o più patologie oppure di un più generale miglioramento dello stato di salute dell'individuo [21].

### 1.5.1 Carotenoidi

#### Struttura e nomenclatura

I carotenoidi sono una classe di pigmenti organici molto abbondanti in natura, privi di azoto, che possono essere rinvenuti in animali, piante o in altri organismi fotosintetici come alghe, funghi ed alcune specie di batteri. L'etimologia del termine è collegata alla scoperta nel 1831 da parte dello scienziato Wackenroder, del carotene nella radice della comune carota. I carotenoidi sono tetraterpenoidi  $C_{40}$  formati da 8 unità isopreniche  $C_5H_8$  (2 unità  $C_{20}$  geranyl-geranyl difosfato), unite con legame testa-coda con eccezione della sequenza centrale dove il legame è del tipo coda-coda e conferisce quindi alla catena una struttura simmetrica [22] [23].

In questo modo si ottiene lo scheletro carbonioso di base che può essere modificato da:

- ciclizzazioni ad una o ad entrambe le estremità, che portano alla differenziazione in 7 diversi gruppi (i due gruppi terminali vengono indicati con la lettera greca corrispondente) che sono mostrati in figura 1.5;
- variazioni nel grado di idrogenazione;
- introduzione di gruppi funzionali contenenti ossigeno;
- riarrangiamenti e/o accorciamento di catena.

In relazione alla struttura i carotenoidi si possono dividere in 2 sottogruppi principali:

- *Caroteni*: molecole non ossigenate a struttura idrocarburica diene come ad esempio  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, licopene. A loro volta i caroteni possono essere classificati in aciclici (es. licopene), monociclici (es.  $\gamma$ -carotene) e biciclici (es.  $\alpha$  e  $\beta$ -carotene).

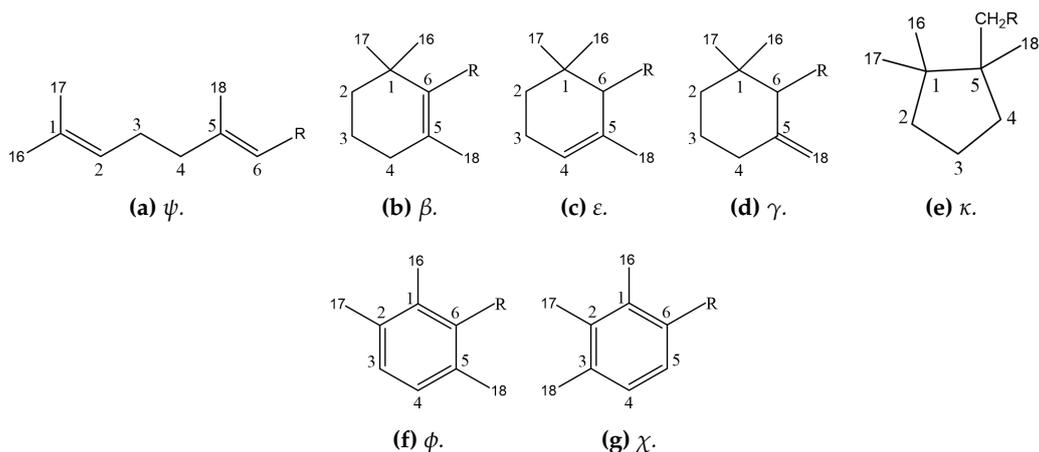


Figura 1.5: Possibili ciclizzazioni o sostituzioni alle estremità della catena tetraterpenoide dei carotenoidi.

- *Xantofille*: derivati ossigenati dei caroteni come ad esempio luteina, zeaxantina, astaxantina,  $\beta$ -criptoxantina. I gruppi funzionali più comuni sono quello idrossile, chetonico, aldeidico ed epossidico; nei vegetali le xantofille possono trovarsi in forma libera o esterificate con acidi grassi.

La peculiarità di questa classe di composti si manifesta nel sistema coniugato di doppi legami che interessa la parte centrale della molecola, grazie al quale gli elettroni  $\pi$  risultano delocalizzati su tutta la lunghezza della catena. Tale caratteristica è responsabile della forma molecolare, della reattività chimica, delle proprietà di assorbimento della luce e quindi del colore dei carotenoidi. Generalmente l'assorbimento di luce nelle molecole organiche produce uno stato eccitato ad alta energia: per i carotenoidi, la transizione interessata è del tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ , dove uno degli elettroni di tipo  $\pi$  del sistema di doppi legami coniugati è promosso in un orbitale vuoto di tipo  $\pi^*$ . Gli elettroni  $\pi$  sono tuttavia delocalizzati sull'intera molecola e lo stato eccitato che si origina è pertanto ad un livello energetico minore rispetto a situazioni in cui non esiste tale sistema coniugato; la transizione richiede quindi una bassa energia, che corrisponde a lunghezze d'onda nella regione del visibile (400-500 nm). I carotenoidi presentano infatti intense colorazioni giallo-arancio-rosso.

Per ogni doppio legame possono esistere due configurazioni geometriche (isomero *cis* o *trans*) in relazione alla disposizione dei gruppi sostituenti rispetto al doppio legame. La configurazione di tipo *cis* crea tuttavia un notevole ingombro sterico rendendo quindi questa forma isomerica meno stabile rispetto a quella *trans* [22]. La maggior parte dei carotenoidi si trova quindi in natura nella forma *all-trans*, che è tuttavia soggetta frequentemente ad isomerizzazione provocando variazioni delle proprietà fisiche e biochimiche della molecola stessa [24]. I carotenoidi sono molecole lipofile con solubilità in acqua nulla o estremamente ridotta. La presenza di gruppi idrossilici o chetonici conferisce alla molecola una maggiore polarità che è tuttavia limitata.

## Biosintesi

I carotenoidi sono sintetizzati a partire dalla via biosintetica degli isoprenoidi. Il punto di partenza della biosintesi di questa classe di composti implica la condensazione di due molecole di geranilgeranil-pirofosfato (GGPP,  $C_{20}$ ) catalizzata dall'enzima fitoene sintasi (PSY) che porta alla formazione del fitoene. Successivamente, una serie di quattro reazioni di desaturazione (PSD) porta alla formazione dei doppi legami coniugati convertendo il fitoene (incolore), in

fitofluene (incolore), in  $\zeta$ -carotene (giallo), in neurosporene (arancio) e licopene (rosso) (figura 1.6). Il licopene viene convertito in  $\beta$ -carotene attraverso due reazioni di ciclizzazione ad opera della licopene- $\beta$ -ciclastasi (LCY-b) o in  $\alpha$ -carotene dalla licopene- $\epsilon$ -ciclastasi. In seguito  $\alpha$ -carotene e  $\beta$ -carotene possono subire reazioni di idrossilazione, epossidazione o isomerizzazione per dare origine ad un'ampia varietà di strutture. Dall'idrossilazione dell' $\alpha$ -carotene si genera la luteina, da quella del  $\beta$ -carotene la zeaxantina; l'eossidazione (posizione C5,6 e C5',6') dell'anello  $\beta$  della zeaxantina porta alla formazione della violaxantina, che a sua volta viene convertita in neoxantina. Le xantofille sono quindi idrossiderivati che si formano negli ultimi stadi della via biosintetica dei carotenoidi [25].

In generale, il contenuto di carotenoidi è variabile non solo tra specie vegetali diverse, ma anche tra i diversi organi di una stessa pianta. La loro biosintesi è infatti regolata sia in relazione a stimoli endogeni di tipo fisiologico sia di tipo ambientale, con variazioni sostanziali durante la germinazione, fotosintesi, maturazione di fiori e frutti ed in relazione a diversi tipi di stress. La presenza di carotenoidi quantificabile in una pianta è data dalla sommatoria tra la loro biosintesi e la loro degradazione, che spesso prevale nel determinarne il contenuto finale, come ad esempio per quei tessuti vegetali che presentano carotenoidi in tracce, nonostante esprimano la via biosintetica [26].

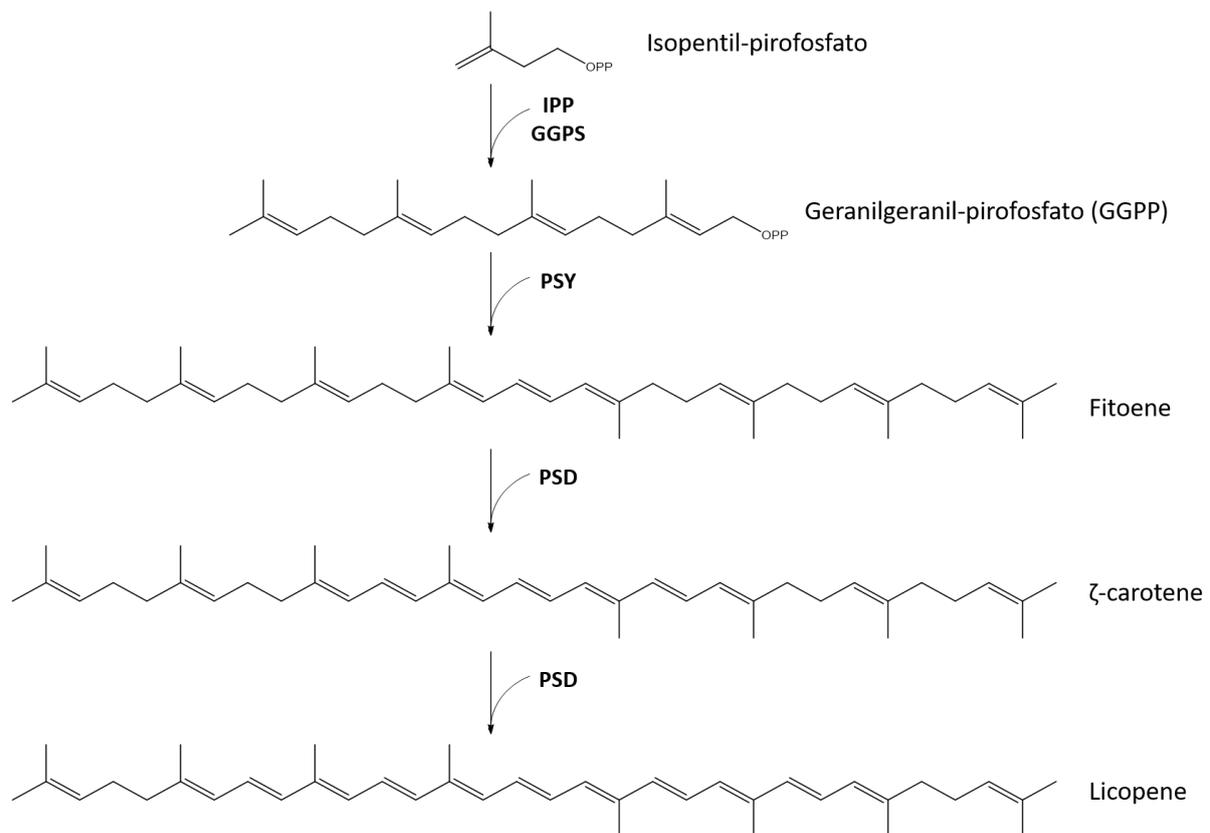


Figura 1.6: Schematizzazione della biosintesi dei carotenoidi nelle piante.

### Assorbimento e diffusione dei carotenoidi

Nelle piante, i carotenoidi svolgono un ruolo essenziale nella fotosintesi non solo nella cattura della luce e nel convogliarla verso i centri di reazione, ma anche perché sono in grado di proteggere questi ultimi dissipando l'eventuale eccesso di energia. Svolgono inoltre un ruolo fondamentale nella protezione delle piante stesse, in seguito alla grande produzione di radi-

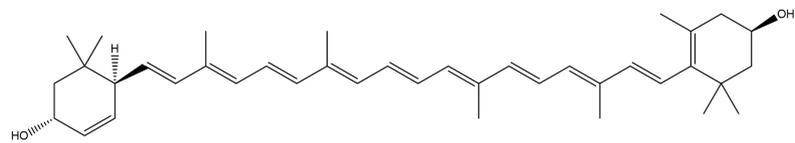
cali liberi che si verifica durante il processo fotosintetico. Nei frutti acerbi, i carotenoidi non sono direttamente visibili dal momento che si formano durante il processo di maturazione in presenza di ossigeno, fornendo le caratteristiche colorazioni, mentre nei vegetali a foglia verde si trovano nei cloroplasti, generalmente complessati con proteine e grassi. I carotenoidi, oltre al colore, sono responsabili anche della produzione di profumi e sapori e vengono infatti utilizzati nell'industria dei profumi.

Le principali fonti di carotenoidi alimentari sono i frutti e le verdure intensamente colorati, dove i prodotti giallo-arancio forniscono prevalentemente  $\alpha$  e  $\beta$ -carotene, quelli arancio  $\beta$ -criptoxantina, i vegetali a foglia verde forniscono luteina e zeaxantina ed i prodotti rossi licopene. Il contenuto di carotenoidi nei vegetali non è costante: esistono differenze qualitative e quantitative, a seconda delle condizioni di coltivazione, dei fattori genetici, della varietà, del periodo di maturazione, del terreno e delle caratteristiche climatiche immediatamente precedenti la raccolta; è noto, inoltre, che parti diverse dello stesso prodotto possano presentare differente contenuto di carotenoidi.

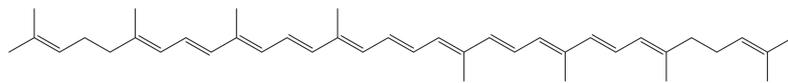
Tra i 750 carotenoidi isolati ed identificati in natura (escludendo le forme isomeriche), solo 40 sono presenti nella dieta umana (generalmente in forma *trans*) e 20 di questi sono stati determinati nel sangue e nei tessuti. In letteratura esistono database che riportano i carotenoidi contenuti in frutta e verdura ed i più comuni sono  $\alpha$  e  $\beta$ -carotene, licopene, luteina, zeaxantina e criptoxantina [27]. In figura 1.7 sono riportate le strutture di alcuni tra i carotenoidi più frequentemente determinati negli alimenti e per tale motivo molto studiati.

La presenza di tali composti all'interno degli alimenti ingeriti con la dieta non è tuttavia sufficiente poiché devono sempre essere considerati i meccanismi di assorbimento e diffusione. Esistono almeno 9 fattori che influenzano la biodisponibilità dei carotenoidi: classe di appartenenza del composto, tipologia di legami, quantità consumata in un pasto, matrice in cui è incorporato il carotenoide, eventuale bioconversione, stato nutrizionale dell'individuo, interazioni tra molecole, fattori genetici o correlati all'individuo. In generale, l'assorbimento dei carotenoidi nell'uomo avviene per diffusione passiva ed è influenzato dalla quantità di lipidi presenti nella dieta, data la natura lipofila di questi composti. In condizioni normali, la quantità di carotenoidi assorbiti può variare dal 5% al 50% rispetto alla quantità ingerita. Una frazione dei carotenoidi assorbiti viene trasformata negli enterociti in retinaldeide, che viene successivamente ridotta a retinolo. Negli enterociti, ed in tutte le cellule in grado di metabolizzare il retinolo, sono presenti specifiche proteine (CRBP) che legano il retinolo ed i suoi metaboliti [28]. Il retinolo viene così esterificato con palmitato, stearato e oleato dagli enzimi acil-CoA-retinolo aciltransferasi (ARAT) e lecitina-retinolo aciltransferasi (LRAT). I carotenoidi ed i retinil-esteri attraversano il sistema linfatico e raggiungono la circolazione sanguigna come componenti dei chilomicroni, che attraverso un meccanismo di endocitosi mediato da recettori, entrano nelle cellule epatiche dove vengono metabolizzati (figura 1.8) [29].

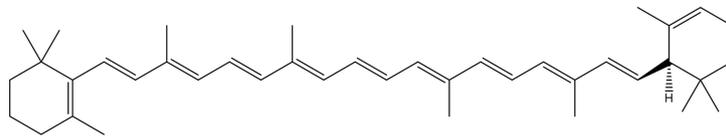
I carotenoidi presenti nei chilomicroni possono essere convertiti in retinoidi o secreti dalle cellule come componenti delle VLDL (Very Low Density Lipoprotein). Il retinolo viene trasferito al reticolo endoplasmatico dove si lega ad una specifica proteina (Retinol Binding Protein, RBP) formando il complesso retinolo-RBP, che viene utilizzato per l'esterificazione ed immagazzinato nel fegato. Su richiesta, i retinil-esteri immagazzinati nel fegato vengono idrolizzati e il retinolo è rilasciato nel circolo ematico legato alla proteina RBP dove si associa ad una prealbumina, la transtiretina. La concentrazione plasmatica viene mantenuta costante attraverso uno scambio omeostaticamente controllato tra plasma, fegato e tessuti extraepatici. I carotenoidi residui non sono accumulati nelle cellule epatiche: essi sono rilasciati nel circolo come componenti delle VLDL e successivamente delle LDL (Low Density Lipoprotein).



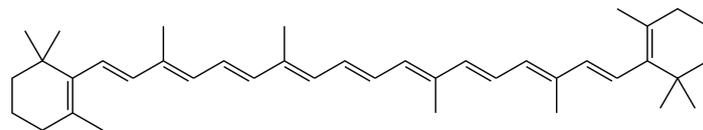
**(a)** Luteina ( $\beta$ - $\epsilon$ -carotene-3,3'-diolo).



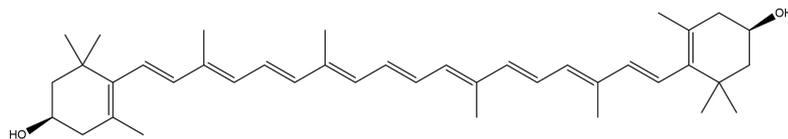
**(b)** Licopene ( $\psi$ - $\psi$ -carotene).



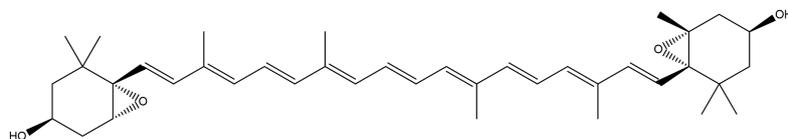
**(c)**  $\alpha$ -carotene ( $\beta$ - $\epsilon$ -carotene).



**(d)**  $\beta$ -carotene ( $\beta$ - $\beta$ -carotene).



**(e)** Zeaxantina ( $\beta$ - $\beta$ -carotene-3,3'-diolo).



**(f)** Violaxantina (5,6:5',6'-diepoxi-5,5',6,6'-tetraidro- $\beta$ - $\beta$ -carotene-3,3'-diolo).

**Figura 1.7:** Strutture di alcuni tra i carotenoidi più comunemente presenti negli alimenti.

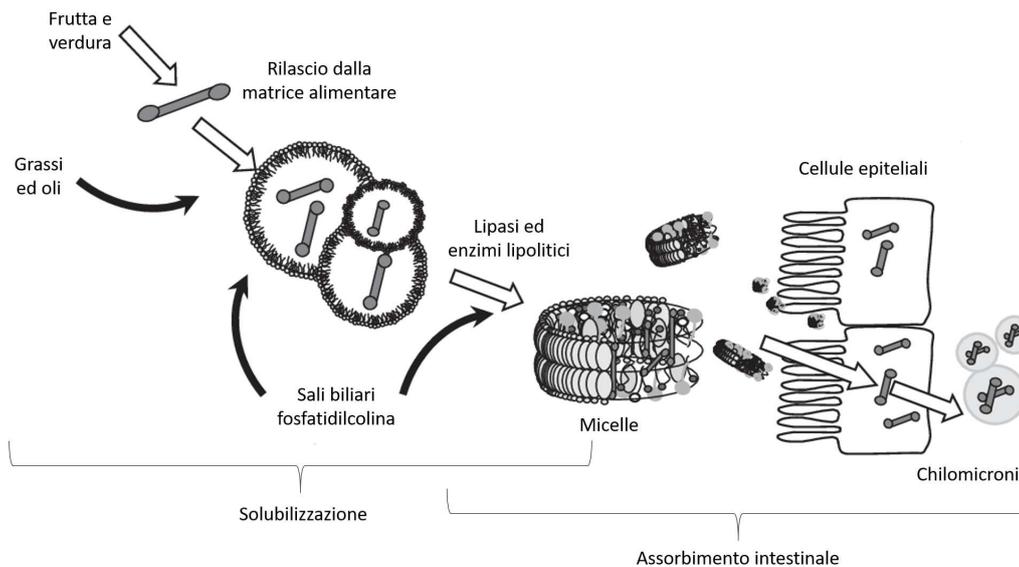


Figura 1.8: Meccanismo generale del processo di assorbimento dei carotenoidi introdotti con la dieta [29].

### Effetti del trattamento termico e della conservazione

All'interno degli alimenti, i carotenoidi hanno una struttura relativamente stabile che può essere alterata in seguito all'esposizione al calore, alla luce, all'ossigeno, ai perossidi ed ai metalli di transizione, provocando una perdita delle loro funzioni biologiche. Molti alimenti contenenti carotenoidi sono stagionali e la loro lavorazione in seguito alla raccolta è necessaria per aumentare la shelf-life e consentire il trasporto a luoghi diversi dal sito di produzione. Lavorazione e conservazione degli alimenti dovrebbero quindi essere ottimizzate per prevenire o ridurre la degradazione dei composti bioattivi contenuti. L'alterazione e/o la perdita dei carotenoidi in questi passaggi e durante la conservazione dei cibi avviene attraverso peeling, isomerizzazione geometrica (*trans*-carotenoidi in *cis*-carotenoidi), ossidazione enzimatica o non enzimatica [23].

Studi pubblicati hanno indagato come la biosintesi dei carotenoidi possa continuare, aumentandone quindi le concentrazioni, in frutta e verdura anche dopo la raccolta se il frutto viene mantenuto intatto. Il degrado post-raccolta di questi composti può invece avvenire in seguito all'esposizione ad alte temperature e/o tagli e danni al frutto, che permettono l'esposizione all'ossigeno e quindi l'ossidazione dei carotenoidi stessi [30]. La stabilità dei carotenoidi varia in relazione all'alimento considerato e quindi le condizioni ottimali di stoccaggio e conservazione devono essere valutate in modo attento e preciso. Anche la fase di essiccazione può essere problematica ed al metodo di essiccazione solare tradizionale è preferibile quello in essiccatore che, evitando la luce solare diretta, riduce sensibilmente le perdite [31].

### Attività biologica

Gli animali, compreso quindi l'uomo, non sono in grado di sintetizzare i carotenoidi e li assumono attraverso la dieta dal mondo vegetale. Il loro consumo è stato associato a diversi benefici per la salute, come ad esempio la prevenzione di malattie cardiovascolari, tumori e patologie della vista. In particolare i ruoli fondamentali sono collegati alla caratteristica, da parte di alcuni carotenoidi, di essere precursori della vitamina A e di esplicare la funzione di antiossidanti. Infatti, come già detto in precedenza, i carotenoidi presentano un sistema coniu-

gato di doppi legami che conferisce stabilità: quando si forma un radicale, l'elettrone spaiato viene delocalizzato sull'intera molecola e la reazione può avvenire in più regioni. I benefici connessi alla presenza di carotenoidi sono riconducibili alle seguenti attività biologiche.

- *Attività pro-vitamina A.* La vitamina A svolge un ruolo di primo piano nei processi biosintetici di molte glicoproteine, regolando la differenziazione cellulare e l'espressione dei geni, ed è fondamentale per il processo fisiologico della visione. Con il termine vitamina A vengono definiti tutti i retinoidi che possiedono l'attività biologica del retinolo. La deficienza di vitamina A (VAD) è un grave problema nutrizionale a livello mondiale ed anche nei paesi industrializzati tale vitamina è il nutriente, insieme al ferro, i cui apporti hanno la maggior probabilità di essere inadeguati. La VAD ostacola il corretto funzionamento del sistema immunitario aumentando il tasso di mortalità dovuto a malattie infettive, impedisce la normale rigenerazione delle mucose, rallenta la crescita e può portare alla cecità; si manifesta soprattutto nei tessuti che presentano un rapido ricambio e che tendono ad ipercheratinizzarsi [32]. Alcuni carotenoidi,  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteni in particolare, sono precursori della vitamina A poiché possono subire tale trasformazione a livello della mucosa intestinale. Tra questi carotenoidi ad attività pro-vitaminica, il  $\beta$ -carotene è da sempre considerato quello biologicamente più attivo, grazie alla presenza dell'anello  $\beta$ -iononico non sostituito che può essere scisso formando retinale (ha ruolo attivo nel meccanismo della visione) e/o acido retinoico (ligando dei fattori di trascrizione), forme fisiologiche della vitamina A [33]. Oltre al  $\beta$ -carotene, l' $\alpha$ -carotene e la  $\beta$ -criptoxantina, sono i soli carotenoidi ad avere attività pro-vitamina A. I frutti ed i vegetali di colore arancio, come carote, albicocche, zucche, meloni, pesche e mango, sono generalmente i più ricchi di carotenoidi pro-vitaminici e la loro quantità è direttamente correlata all'intensità della colorazione. Studi presenti in letteratura evidenziano la presenza di  $\beta$ -carotene anche in vegetali a foglia verde quali ad esempio spinaci, biette, lattuga e broccoli [34]. Negli ultimi anni è stato dimostrato che una dieta supplementata con  $\beta$ -carotene e carotenoidi pro-vitaminici porta benefici alle popolazioni che soffrono di VAD [35].
- *Percezione visiva e salute degli occhi.* Il retinale, presente nella retina dell'occhio, è un cromoforo polienico che costituisce la base chimica della vista: il meccanismo fondamentale è infatti un'isomerizzazione 11-*cis*-retinale  $\rightarrow$  retinale *tutto-trans* e viceversa. Una carenza di vitamina A può portare a xeroftalmia, a malattie di degenerazione maculare correlate all'età (AMD) e alla cataratta. Nel primo caso, si ha cheratinizzazione dell'epitelio congiuntivale, con desquamazione di cellule ed occlusione dei dotti delle ghiandole lacrimali, che può portare nelle fasi avanzate a ridotto adattamento degli occhi all'oscurità [36]. L'AMD è una patologia che colpisce la zona centrale della retina e che progressivamente può portare alla perdita della visione nella zona centrale; la cataratta invece si presenta come una progressiva perdita di trasparenza del cristallino nell'occhio che comporta una diminuzione della vista. In tutti i casi, esiste una riduzione del rischio in relazione alla presenza di quantità crescenti di carotenoidi. In particolare, luteina e zeaxantina (pigmenti gialli che si trovano anche in alcuni vegetali a foglia verde, in mais e grano e nel cacao), sono associate alla qualità della vista poiché sono in grado di assorbire l'energia in eccesso e limitare lo stress ossidativo.
- *Patologie cardiovascolari.* Numerosi studi testimoniano come i carotenoidi, specialmente il  $\beta$ -carotene, limitino l'ossidazione delle LDL e lo stress ossidativo, portando come conseguenza ad una riduzione della formazione delle placche aterosclerotiche. L'effetto benefico si registra quando sono presenti più carotenoidi ed è fondamentale valutare la

loro sinergia, anche in relazione ad altre classi di composti, come ad esempio gli oli che ne aumentano l'assorbimento o altri antiossidanti introdotti con la dieta [37].

- *Prevenzione del cancro.* Esperimenti su colture cellulari *in vitro* hanno dimostrato che i carotenoidi inibiscono la proliferazione cellulare, la trasformazione e la formazione di micronuclei, nonché la modulazione dell'espressione di alcuni geni. I singoli meccanismi di azione non sono ancora del tutto chiari ma sono coerenti con un effetto protettivo contro la carcinogenesi cellulare. Il consumo di frutta e vegetali contenenti carotenoidi è stato associato ad un ridotto rischio di sviluppo di tumori alla prostata, al polmone ed al colon-retto [38] [25].
- *Protezione della pelle.* L'esposizione prolungata alla luce solare, nello specifico alla radiazione ultravioletta, incrementa la produzione di radicali liberi e di forme reattive ed instabili dell'ossigeno che intervengono in numerose reazioni biochimiche e processi metabolici, portando nel tempo all'alterazione ed all'invecchiamento precoce dell'epitelio non protetto. I radicali liberi sono infatti coinvolti sia nel danno acuto da raggi UV (scottature solari, eritema) sia nella fotocarcinogenesi e nel foto invecchiamento cellulare. Numerosi studi hanno indagato gli effetti dei carotenoidi (principalmente  $\beta$ -carotene, luteina e licopene, anche in associazione con la vitamina E), evidenziando una riduzione della perossidazione lipidica delle cellule epiteliali e sottolineando come le proprietà antiossidanti siano collegate alla durata dell'assunzione di tali composti rispetto al dosaggio [39].

## 1.5.2 Composti fenolici

### Struttura e nomenclatura

I composti fenolici, o polifenoli, sono prodotti secondari del metabolismo delle piante e sono generalmente coinvolti in meccanismi di difesa contro le radiazioni ultraviolette e contro l'aggressione di patogeni. Negli alimenti, i polifenoli contribuiscono al colore, all'aroma ed all'odore [40]. Complessivamente più di 8000 composti fenolici sono stati identificati in diverse specie vegetali e la loro classificazione avviene in relazione al numero di anelli fenolici contenuti e degli elementi strutturali che legano gli anelli tra loro. In genere i composti fenolici più comuni in natura, si presentano coniugati con mono e polisaccaridi legati ad uno o più dei gruppi fenolici, e possono anche mostrare derivati funzionali, come esteri e metil-esteri; essi derivano tutti da un intermedio comune, la fenilalanina, che metabolicamente si forma dalla via dell'acido shikimico. I polifenoli si possono globalmente suddividere in quattro gruppi: acidi fenolici, flavonoidi, tannini, stilbeni e lignani.

### Acidi fenolici

Gli acidi fenolici sono ampiamente diffusi in natura e possono essere divisi in due classi: i derivati dell'acido benzoico e i derivati dell'acido cinnamico (figura 1.9).

Generalmente il contenuto di acido idrossibenzoico delle piante commestibili è basso, ad eccezione di alcuni frutti rossi, del ravanella nero e di alcuni tipi di cipolla; appartengono a questa classe composti come l'acido gallico, l'acido *p*-idrossibenzoico, l'acido vanillico e l'acido siringico (figura 1.10) [41]. Gli acidi idrossibenzoici sono inoltre componenti di strutture complesse come i tannini idrolizzabili, in forma libera ed esterificata [42]. Gli acidi idrossicinnamici sono invece più comuni e sono rappresentati principalmente dall'acido *p*-cumarico, caffeico, ferulico e sinapico. Tutti questi composti si trovano raramente in forma libera ad eccezione degli alimenti trasformati, sottoposti quindi a congelamento, sterilizzazione o fermentazione. Le forme legate sono i derivati glicosilati o esteri degli acidi chinico, shikimico e tartarico; l'acido

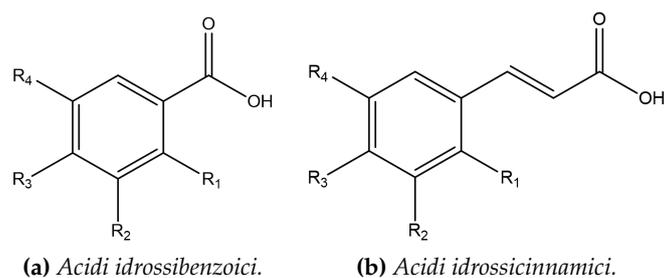


Figura 1.9: Tipologie di acidi fenolici.

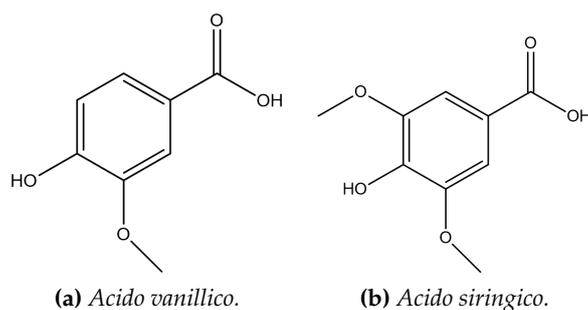


Figura 1.10: Acidi idrossibenzoici comuni negli alimenti.

caffeoico e l'acido chinico si possono combinare per formare acido clorogenico. Questi composti, insieme all'acido *p*-cumarilico, sono presenti in molti tipi di frutta e verdura (figura 1.11). Esistono studi che sottolineano come le concentrazioni degli acidi idrossicinnamici diminuiscano generalmente durante la maturazione [43].

## Flavonoidi

I flavonoidi rappresentano il gruppo di polifenoli più vasto ed ampiamente studiato. Presentano una struttura base comune con configurazione C6-C3-C6, costituita da due anelli aromatici (A e B) legati insieme da tre atomi di carbonio nella forma di un eterociclo ossigenato (C) (figura 1.12). L'anello aromatico A deriva dalla via acetato/malonato, mentre l'anello B dalla fenilalanina attraverso la via shikimica. L'anello C può presentare diverse sostituzioni o variazioni che corrispondono a differenti classi di flavonoidi: flavonoli, flavoni, flavanoni, isoflavoni, flavanoli o catechine, antocianine (figura 1.13).

Le sostituzioni agli anelli A e B corrispondono invece a ulteriori sottoclassi all'interno di ciascuna classe considerata; tali sostituzioni includono l'ossigenazione, l'alchilazione, la glicosilazione, l'alcilazione o la solfatazione [44].

I flavonoli sono la classe più comune, presentano come struttura base il 3-idrossiflavone ed

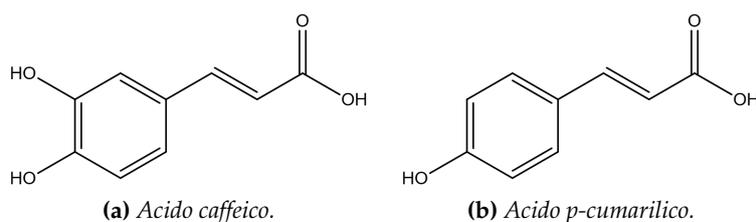


Figura 1.11: Acidi idrossicinnamici comuni negli alimenti.

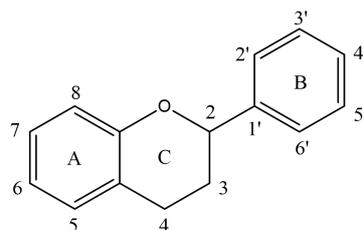


Figura 1.12: Struttura base dei flavonoidi.

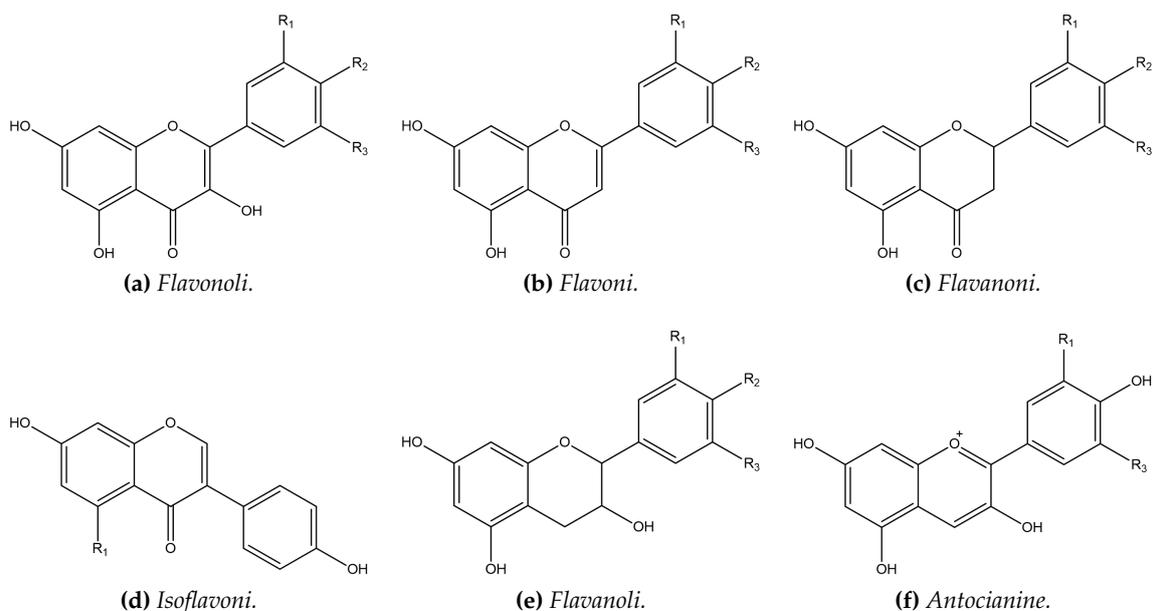


Figura 1.13: Principali classi di flavonoidi.

il 90% di essi è caratterizzato da gruppi idrossili anche nelle posizioni 5 e 7; i composti principali appartenenti a questa classe sono la quercetina ed il kaempferolo (figura 1.14). Questi fenoli si trovano principalmente in forma di glicosidi, in cui l'aglicone è legato ad uno zucchero attraverso un legame O-glicosidico (il più ricorrente è il D-glucosio, ma sono frequenti anche galattosio, xilosio, ramnosio ed arabinosio) [45]. La forma glicosidica risulta più polare e quindi maggiormente idrosolubile. In generale, il loro contenuto è fortemente influenzato dal clima, dalle condizioni di crescita della pianta, dalla raccolta, dall'immagazzinamento e dalle eventuali condizioni di cottura [46]. Sono contenuti in concentrazioni rilevanti nell'uva rossa, nelle cipolle, nella verza, nei broccoli e nei mirtilli.

I flavoni sono meno comuni rispetto ai flavonoli, dai quali differiscono per il gruppo ossidrilico, in questo caso mancante, in posizione 3 dell'anello C. Si trovano spesso in forma 7-O-glicosidica o C-glicosidica, dove il legame carbonio-carbonio si instaura tra il carbonio anomerico di una molecola di zucchero ed il C6 o C8 del flavone. Questi glicosidi, a differenza di quelli nella forma O, non vengono scissi da idrolisi acida. I principali rappresentanti di questa sottoclasse sono la luteolina e l'apigenina (figura 1.15), che sono stati identificati ad esempio nel prezzemolo, nei cereali e nel sedano.

I flavanoni derivano strutturalmente dai flavoni dopo riduzione del doppio legame C2-C3 nell'anello C, che determina quindi una catena saturata a 3 atomi di carbonio, e si trovano in forma glicosilata con un disaccaride al C7 (anello A). Tra gli agliconi, i più conosciuti sono la l'esperetina e la naringenina (figura 1.16), che si trovano soprattutto negli agrumi (pompelmo,

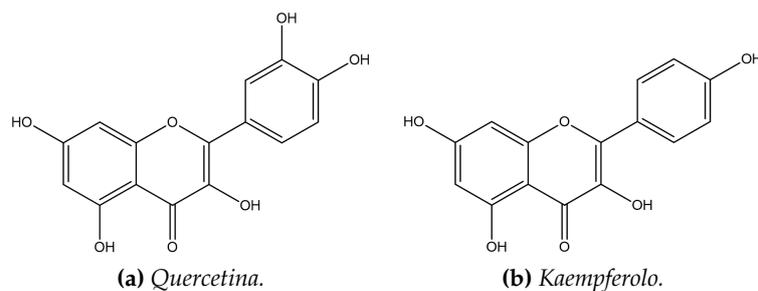


Figura 1.14: Struttura chimica di due flavonoli.

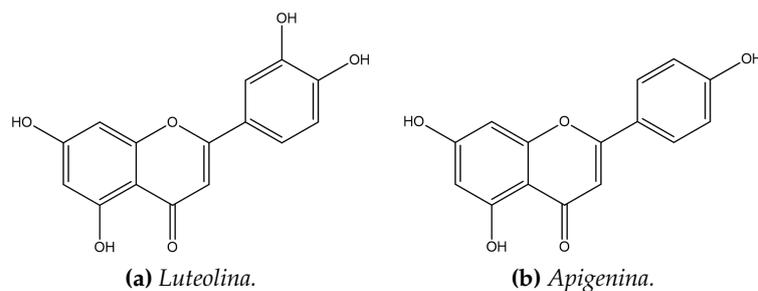


Figura 1.15: Struttura chimica di due flavoni.

arance) ed in alcune piante aromatiche.

Gli isoflavoni presentano una struttura diversa dai flavonoidi fino ad ora elencati poiché l'anello B è attaccato al C3 e non al C2. La struttura base presenta una somiglianza strutturale con gli estrogeni (ad esempio i gruppi idrossile in C4 e C7 sono simili alla molecola di estradiolo) e conferisce a questi composti proprietà pseudo-ormonali e la capacità di legarsi ai medesimi recettori [47]. Gli isoflavoni vengono pertanto classificati come fitoestrogeni e sono presenti quasi esclusivamente nelle piante delle leguminose. Negli ultimi anni l'interesse nei confronti di questa classe di composti è cresciuto anche in relazione al notevole consumo di soia, che contiene genisteina, daidzeina e glicetina (figura 1.17), ed al loro ruolo nel prevenire o attenuare disturbi tipici della menopausa femminile, nonché ad alcune controindicazioni per donne che hanno avuto un tumore al seno e che sono quindi sensibili al loro consumo [48].

La struttura dei flavanoli, simile nell'anello C a quella dei flavanoni, è caratterizzata dalla perdita del doppio legame carbonio ossigeno in posizione C4; a differenza dei composti considerati sino ad ora, non sono glicosilati nei cibi. I flavanoli presentano quindi due centri chirali sulla molecola (C2 e C3) e quattro possibili diastereoisomeri [49]. Di questa sottoclasse di composti, esiste sia la forma monomerica (catechine), sia la forma polimerica (proantocianidine). Le catechine e le epicatechine sono ampiamente presenti nella frutta (figura 1.18), le galloca-

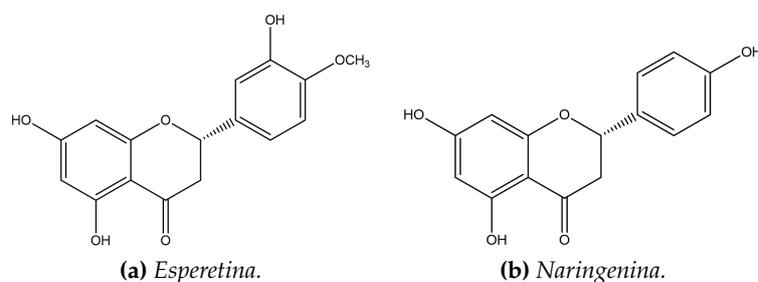


Figura 1.16: Struttura chimica di due flavanoni.

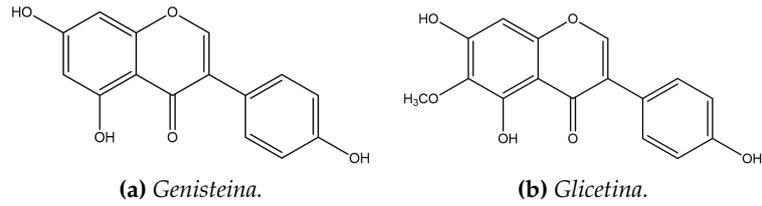


Figura 1.17: Struttura chimica di due isoflavoni.

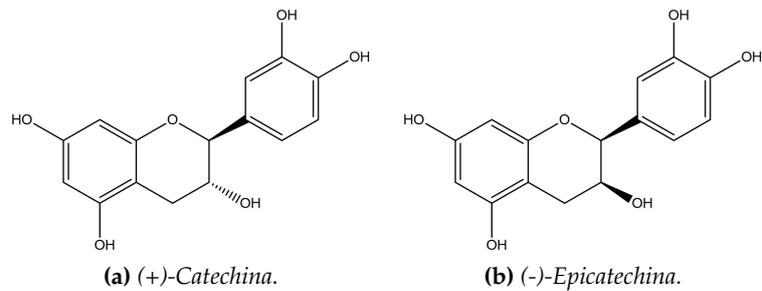


Figura 1.18: Struttura chimica di due flavanoli.

techine e le epigallocatechine sono state determinate in concentrazioni rilevanti in alcuni semi delle piante di leguminose, nell'uva, nelle fave di cacao e nel the. Le proantocianidine (tan-nini condensati) sono invece dimeri, oligomeri e polimeri delle catechine e sono responsabili del carattere astringente della frutta (uva, pesche, cachi, mele, pere, etc), delle bevande (vino, sidro, tè, birra, etc) e del sapore amaro del cioccolato, grazie alla capacità di formare complessi con le proteine salivari [50].

Le antocianidine sono gli agliconi degli antociani e la struttura base è il catione flavilio, che presenta quindi l'ossigeno  $O^+$  nell'anello C. Le antocianidine sono i componenti principali dei pigmenti rossi, blu e viola della maggior parte dei petali di fiori, frutta e verdura e di alcune varietà di cereali, ad esempio il riso nero. Questi composti sono altamente instabili, molto sensibili alla degradazione e la loro stabilità dipende da numerosi fattori come ad esempio il pH (gli antociani sono stabili a pH acido), la temperatura, la struttura chimica, la presenza di enzimi, altri flavonoidi, proteine e ioni metallici. Gli zuccheri che più frequentemente si legano alle antocianidine sono glucosio, galattosio, arabinosio e ramnosio o eventuali forme di o tri-saccaridiche di questi zuccheri [49]. Tra i composti più comuni si elencano la cianidina, la pelargonidina, la malvidina e la delphinidina (figura 1.19), che sono presenti nel vino rosso, in diverse verdure (melanzane, radicchio, cavoli, fagioli, cipolle), in alcune varietà di cereali e nella frutta.

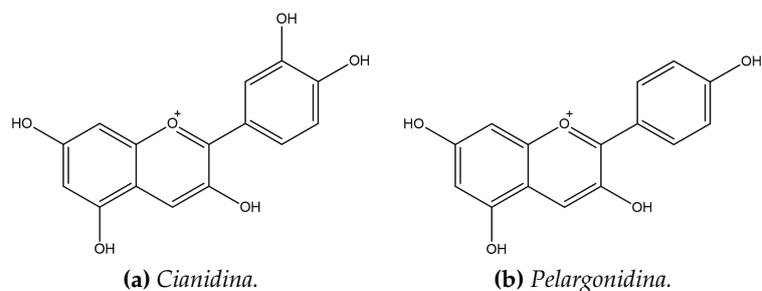


Figura 1.19: Struttura chimica di due antocianidine.

## Tannini

A differenza delle classi precedentemente descritte, i tannini sono composti con peso molecolare medio-alto e si possono suddividere in due gruppi: (I) idrolizzabili, (II) condensati. I primi sono esteri dell'acido gallico e, come suggerisce il loro nome, sono facilmente idrolizzati con acido, alcoli, acqua calda e per azione enzimatica producono alcol fenilcarbossilico. I tannini condensati sono polimeri che presentano come monomero un flavan-3-olo e tra i più studiati si ricordano quelli che derivano dalla catechina e dall'epicatechina [51].

## Stilbeni e lignani

Gli stilbeni contengono due frazioni fenoliche collegate da un ponte di metilene a due carboni attivi. La presenza di stilbeni nella dieta umana è piuttosto bassa ed il composto più studiato è il resveratrolo, che si trova in gran parte nell'uva e quindi nel vino rosso [52].

I lignani sono invece composti prodotti tramite dimerizzazione ossidativa di due unità di fenilpropano. In natura si trovano principalmente nella forma libera e sono presenti nei semi oleosi e, in quantità minori, in alghe, piante leguminose, cereali, aglio, carote, pere e prugne. L'enterodiolo è l'esponente principale dei lignani.

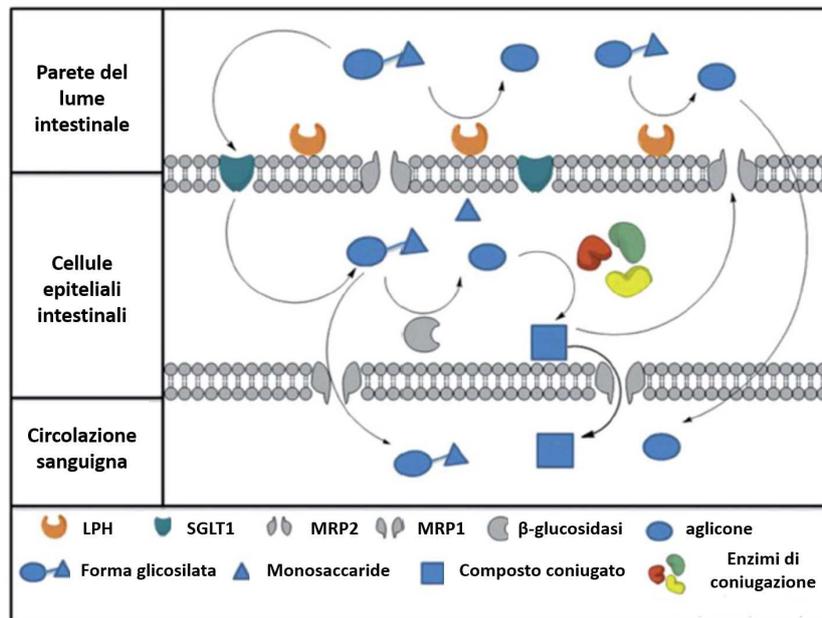
## Distribuzione ed assorbimento dei polifenoli

La distribuzione dei composti fenolici nelle piante a livello tissutale, cellulare e sub-cellulare non è uniforme. I fenoli in forma libera sono raramente presenti nelle piante perché generalmente si trovano in forma esterificata e glicosilata (fenoli solubili) o legata (fenoli insolubili). I primi sono all'interno dei vacuoli cellulari, i secondi sono legati in modo covalente ai componenti strutturali delle pareti cellulari (cellulosa, lignina, pectina) o delle proteine strutturali e contribuiscono per circa il 25% sul totale [53]. Nella maggior parte dei casi gli alimenti contengono quindi miscele complesse di polifenoli, che tendono a concentrarsi nelle porzioni più esterne e che sono influenzati da fattori ambientali, dall'eventuale trasformazione del prodotto e dalla sua conservazione. Una corretta valutazione degli effetti benefici di tali composti introdotto con la dieta parte da considerazioni riguardo alla loro bioaccessibilità ed al loro assorbimento all'interno dell'organismo.

Per essere disponibile per l'assorbimento nel tratto gastrointestinale, un non-nutriente deve essere rilasciato dalla matrice alimentare e deve essere in grado di attraversare la barriera intestinale. Gli studi di bioaccessibilità e biodisponibilità effettuati negli ultimi anni, hanno contribuito alla comprensione di quali polifenoli siano effettivamente rilasciati dalle diverse matrici alimentari e quale frazione venga assorbita dall'intestino [54]. Sono stati indagati anche i meccanismi di assorbimento, evidenziando come alcuni composti necessitino di una trasformazione perché vengono assorbiti solo in forma di metaboliti attivi. Inizialmente si ipotizzava che le forme glicosilate non fossero in grado di attraversare le membrane degli enterociti a causa della loro natura idrofila ma recenti pubblicazioni hanno individuato la presenza di trasportatori specifici che ne facilitano lo spostamento [55]. Il meccanismo è strettamente correlato non solo alla struttura chimica del composto, ma anche a variabili di tipo anatomico, fisiologico e biochimico dell'individuo, nonché alla matrice alimentare considerata ed agli alimenti consumati durante il pasto. In generale si può affermare che l'assorbimento è ridotto nel tratto gastrointestinale dove tuttavia avviene il rilascio parziale dei fenoli legati [56].

La masticazione è il primo step nell'assimilazione di nutrienti e composti nutraceutici contenuti negli alimenti ed infatti esistono studi che documentano come il contatto con la saliva contribuisca alla bioaccessibilità di alcuni polifenoli. Il bolo alimentare formatosi in bocca viene successivamente trasportato nello stomaco, dove rimane per un periodo di tempo variabile

in relazione al suo volume ed alla sua composizione. Dati *in vitro* hanno dimostrato l'importanza del pH acido dello stomaco sul rilascio di alcune classi di composti fenolici da differenti matrici alimentari in seguito ad idrolisi di oligomeri o scissione degli zuccheri legati [57] [58]. Gli acidi fenolici, dato il loro ridotto peso molecolare e le loro dimensioni inferiori ai fenoli glicosilati, sono disponibili per l'assorbimento già nello stomaco. Il duodeno ed il digiuno sono i principali siti di assorbimento e trasformazione dei polifenoli, che risultano instabili a pH alcalino. In generale, per l'assorbimento dei glicosidi sono stati proposti due meccanismi (figura 1.20): (I) le frazioni glicosidiche vengono scisse dalla lattasi-florizina idrolasi (LPH) ed i prodotti possono così attraversare la membrana cellulare per diffusione passiva grazie alla loro natura lipofila, (II) il trasporto dei glicosidi attraverso la membrana è mediato da un trasportatore di glucosio attivo sodio-dipendente ed una volta all'interno degli enterociti, sono sottoposti ad idrolisi da parte della  $\beta$ -glucosidasi citosolica (CBG). Gli agliconi sono quindi trasferiti al flusso sanguigno tramite diffusione passiva o per trasformazione in metaboliti di fase II. [59] [60]. Una notevole frazione dei polifenoli ingeriti non viene tuttavia assorbita nell'intestino tenue e viene indirizzata al colon, dove interagisce con la microflora. Data la loro attività antimicrobica, i polifenoli sono in grado di modulare la diversità microbiota. Gli enzimi batterici del colon sono in grado di catalizzare la de-coniugazione, la de-idrossilazione e la fissione ad anello per convertire i composti fenolici in una complessa miscela di acidi fenolici semplici [61]. La bioconversione colonica tuttavia è sempre variabile in relazione ad una grande differenza inter-individuale della microflora batterica, dei composti fenolici presenti nella matrice alimentare e dei cibi consumati contemporaneamente. Recenti studi stanno focalizzando l'attenzione sui polifenoli persistenti al colon e sui loro cataboliti poiché sembrano esercitare azione prebiotica [62].



**Figura 1.20:** Meccanismo generale del processo di rilascio intestinale e di assorbimento dei composti fenolici. LPH, lattasi-florizina idrolasi; SGLT, trasportatore di glucosio sodio-dipendente; MRP, proteina associata a multi resistenza.

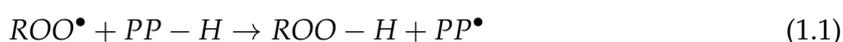
## Effetti del trattamento termico e della conservazione

In letteratura sono presenti studi cinetici che descrivono la stabilità di varie classi di polifenoli negli alimenti in relazione alle modalità di stoccaggio e conservazione, alle temperature impiegate ed alla concentrazione di ossigeno [63]. I composti fenolici sono termicamente sensibili ed infatti se vengono conservati in ambienti riscaldati o con temperature di essiccazione superiori a quella ambiente, si possono verificare parziali degradazioni con conseguente perdita dell'attività biologica. Dati pubblicati riguardo a studi sui polifenoli contenuti nelle mele evidenziano che i glicosidi di quercetina ed epicatechina sono i più sensibili al trattamento termico, mentre l'acido clorogenico risulta più stabile. Questo studio sottolinea come la conservazione tra 4 °C e 20 °C, per periodi di tempo anche superiori ad un mese, non alteri le proprietà antiossidanti degli alimenti [64]. Globalmente, data la diversità strutturale di ciascuna classe di polifenoli e l'elevato numero di variabili che intercorrono (temperatura, matrice alimentare, periodo della raccolta, durata dello stoccaggio, essiccazione), è sempre consigliato considerare le condizioni limitatamente all'alimento in analisi [65].

## Attività biologica

Studi epidemiologici hanno ripetutamente dimostrato un'associazione inversa tra il rischio di malattie umane croniche ed il consumo di una dieta ricca in polifenoli.

- *Azione antiossidante e radical scavenging diretta.* I polifenoli possono agire come antiossidanti attraverso una serie di potenziali vie. Il più importante è probabilmente da scavenging dei radicali liberi, in cui il composto considerato può rompere la reazione radicalica a catena. I polifenoli, grazie al loro elevato potenziale redox, sono in grado di partecipare a reazioni di ossidazione, eliminando quindi radicali perossilici, idrossilici e alchi-perossilici, il radicale superossido e l'ossido nitrico. Questa attività è dovuta alla capacità di donare l'atomo di idrogeno, appartenente ad uno dei gruppi ossidrilici legati all'anello aromatico, ad un radicale e l'elettrone spaiato verrà delocalizzato sull'intera struttura aromatica [66]. Gli acidi fenolici ed i flavonoidi (PP) possono inoltre agire come terminatori di reazioni a catena come segue:



I composti appena citati possono infine agire come agenti chelanti, complessando i metalli di transizione che spesso sono responsabili dell'innesco di processi perossidativi [67].

- *Modulazione dell'attività di alcuni enzimi.* Diversi studi confermano la capacità di alcuni fenoli di modulare l'attività enzimatica di alcune idrolasi, transferasi, chinasi, ossidasi, RNA polimerasi, ossido nitrico sintasi, ribonucleasi e adenilato ciclasi [68].
- *Attività anticarcinogenica.* L'effetto antiossidante, la modulazione di enzimi specifici e l'induzione di apoptosi sono alla radice del meccanismo antitumorale, essendo la carcinogenesi un processo multifase di cambiamento genetico in cui l'equilibrio tra proliferazione e morte cellulare viene alterato. Particolare attenzione è stata quindi posta nei confronti dei composti in grado di interagire con i ROS, specie reattive dell'ossigeno e potenziali agenti cancerogeni [69].
- *Effetto antidiabetico.* Esistono numerose testimonianze che riportano gli effetti antidiabetici dei polifenoli. Gli effetti ipoglicemici dei polifenoli sono attribuiti principalmente

alla capacità di ridurre l'assorbimento intestinale dei carboidrati, modulando gli enzimi coinvolti nel metabolismo del glucosio e nell'assorbimento da parte dei tessuti periferici, e stimolando la produzione di insulina. Flavonoidi, acidi fenolici e tannini sono infatti in grado di inibire l' $\alpha$ -glucosidasi e l' $\alpha$ -amilasi, enzimi chiave responsabili della digestione dei carboidrati introdotti con la dieta [70].

- *Prevenzione di malattie cardiovascolari.* Studi epidemiologici suggeriscono che l'assunzione di polifenoli può essere associata ad un minor rischio di malattie cardiovascolari anche se i meccanismi non sono ancora del tutto chiari. Dati presenti in letteratura mostrano come i flavonoidi siano in grado di prevenire la disfunzione endoteliale, che contribuisce alla patogenesi e all'espressione clinica dell'arteria coronarica, e di inibire l'aggregazione piastrinica, meccanismo centrale nelle sindromi coronariche acute [71].
- *Attività antinfiammatoria.* La capacità dei polifenoli di ridurre l'infiammazione è strettamente correlata alle seguenti funzioni: (I) azione antiossidante diretta, (II) interferenza con la segnalazione dello stress ossidativo, (III) azione diretta sulle vie di segnalazione cellulare ed attivazione agonistica [72].
- *Effetti neuroprotettivi.* I danni ossidativi alle cellule nervose ed alle sinapsi, l'accumulo di ferro in specifiche aree cerebrali ed i processi infiammatori con proliferazione di microglia (cellule che si occupano della difesa immunitaria nel sistema nervoso centrale), sono considerati i principali aspetti patologici dei processi di invecchiamento e dei disturbi neurodegenerativi come il morbo di Parkinson e l'Alzheimer. Nuove strategie terapeutiche neuroprotettive propongono formulazioni contenenti chelatori dei metalli di transizione, farmaci antinfiammatori non steroidei, farmaci antiapoptotici, farmaci bioenergetici e antiossidanti attivi anche nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno. Proprio in quest'ottica sono in corso studi per l'utilizzo dei polifenoli anche in tale ambito [73].

## 1.6 Bioaccessibilità, biodisponibilità e bioattività

Il tratto gastrointestinale rappresenta la più estesa interfaccia tra il corpo umano e l'ambiente ed è deputato all'assorbimento dei nutrienti, fornendo protezione dagli agenti dannosi. L'apparato digerente è quindi l'insieme degli organi e delle strutture deputate all'assunzione, all'elaborazione ed all'assorbimento del cibo, oltre che all'eliminazione delle porzioni non digerite o residue. Il tratto superiore comprende cavità orale, esofago, stomaco, duodeno, digiuno ed ileo, mentre il tratto inferiore comprende cieco, colon, retto e canale anale (si veda figura 1.21). Ogni parte del tratto gastrointestinale svolge una funzione durante la digestione. La bocca è responsabile del masticamento e del mescolamento del cibo con la saliva, che contiene diversi componenti tra cui l'amilasi, enzima che catalizza l'idrolisi dell'amido in zuccheri; nello stomaco sono presenti diversi enzimi, come ad esempio proteasi e lipasi in grado di scindere le proteine ed i lipidi e di abbassare il pH con l'acido prodotto. Nel duodeno la secrezione di bicarbonato ed enzimi digestivi (tripsina, chimotripsina) provenienti dal pancreas neutralizza il pH acido del chimo e demolisce ulteriormente proteine, lipidi e carboidrati, mentre con l'introduzione degli acidi biliari dalla cistifellea vengono emulsionati i lipidi e si ha la formazione di micelle [74]. Lo stadio finale della digestione avviene sulla superficie degli enterociti dell'intestino tenue, sulla cui membrana si trovano enzimi come maltasi, saccarosio-isomaltasi, lattasi e peptidasi. I nutrienti prodotti dalla digestione sono principalmente assorbiti dagli enterociti del digiuno e in minore quantità da quelli dell'ileo. Oltre alla principale funzione di assorbimento dell'acqua, l'intestino crasso contiene un'importante popolazione microbica che

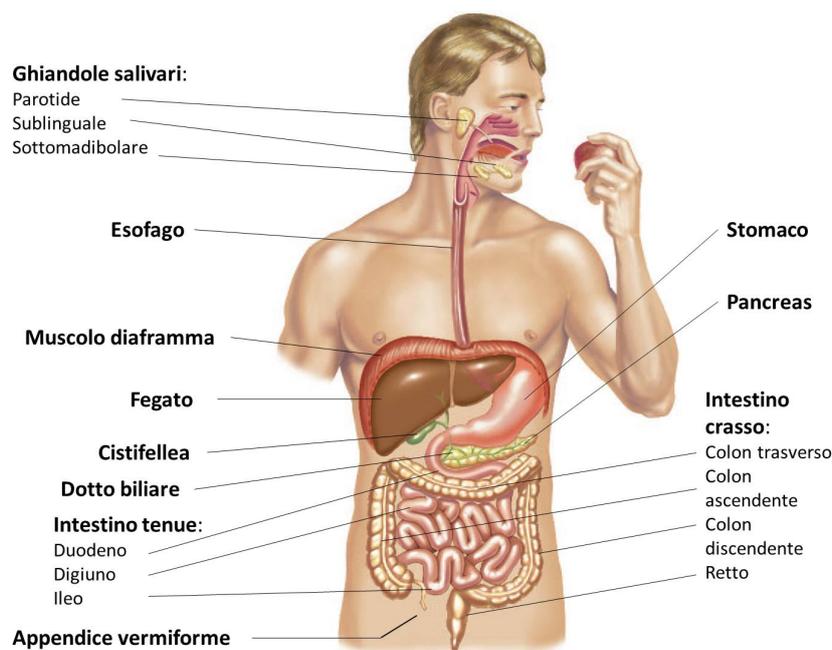


Figura 1.21: Apparato gastrointestinale umano.

contribuisce alla digestione dei componenti alimentari non digeriti. Uno dei compiti di questi microorganismi è, ad esempio, la fermentazione di carboidrati e proteine complesse per produrre acidi grassi a catena corta ed altri metaboliti [75]. Dopo l'assorbimento da parte degli enterociti, i composti possono essere ulteriormente degradati da enzimi intracellulari prima di essere immessi nella circolazione sistemica. I nutrienti idrosolubili sono prevalentemente rilasciati nel flusso sanguigno e finiscono al fegato tramite la vena porta, mentre i nutrienti liposolubili vengono assemblati in chilomicroni e trasportati nella linfa, dalla quale passeranno nel sangue dopo essere stati riprocessati.

Molte classi di composti presenti in alimenti naturali o elaborati hanno effetti potenzialmente nutraceutici, tuttavia gli effetti benefici potenziali possono essere limitati dalla scarsa e variabile biodisponibilità [76]. La biodisponibilità può essere definita come la frazione di una molecola ingerita disponibile al sito di azione per l'utilizzo nelle normali funzioni fisiologiche, per cui corrisponde alla porzione digerita, assorbita ed utilizzata in una condizione metabolica normale. Essa è il risultato di tre processi fondamentali: digeribilità e solubilità della sostanza nel tratto gastrointestinale; assorbimento da parte delle cellule intestinali e passaggio nella circolazione sistemica; passaggio dalla circolazione al suo target o entità funzionale dove interagisce con biomolecole e genera risposte fisiologiche [77]. La biodisponibilità è strettamente correlata ad altri due concetti: (I) la bioaccessibilità, frazione di un composto che viene rilasciata dalla matrice alimentare nel tratto gastrointestinale e che diventa disponibile per l'assorbimento intestinale, considerando quindi tutti gli eventi che hanno luogo durante la digestione ma escludendo il trasporto attraverso il tessuto epiteliale ed il metabolismo presistemico; (II) la bioattività, relativa a come un nutriente viene trasportato e raggiunge il tessuto bersaglio, come interagisce con le biomolecole, il metabolismo o biotrasformazione che può subire e la generazione di risposte fisiologiche indotte. La valutazione di questi aspetti diviene quindi fondamentale per lo studio del potenziale effetto benefico di composti presenti negli alimenti ed introdotti con la dieta, ponendo particolare attenzione ai meccanismi fisico-chimico-fisiologici che intervengono durante il rilascio dalla matrice, alla solubilità nei fluidi

gastrointestinali, all'interazione con molecole, alla degradazione chimica o metabolica ed alla permeabilità alle cellule epiteliali [78].

Gli studi *in vivo* sono considerati come riferimento per gli studi di biodisponibilità, poiché considerando tutte le variabili fisiologiche che si possono avere nell'organismo, consentono di valutare l'assorbimento, la cinetica di trasporto e la competizione del nutriente al sito di assorbimento. Essi hanno diversi svantaggi, come ad esempio la difficoltà di interpretazione dei dati, costi elevati, problemi etici, variazioni individuali dei valori e mancanza di standard certificati per comparare i dati ottenuti. Per tale motivo negli ultimi anni sono stati sviluppati e proposti diversi metodi *in vitro* per valutare in maniera preliminare la bioaccessibilità di ciascun nutriente e più in generale di una qualsiasi molecola che viene ingerita attraverso l'alimentazione (contaminanti e sostanze potenzialmente pericolose); questi metodi sono meno costosi, veloci e permettono un maggior controllo delle variabili sperimentali rispetto agli studi *in vivo* (figura 1.22). I metodi *in vitro* consentono inoltre lo studio della bioaccessibilità in relazione alle possibili interazioni tra diverse componenti delle matrici alimentari, le tecniche di preparazione ed elaborazione degli alimenti [79] [80].

Negli ultimi anni numerosi modelli *in vitro* statici e dinamici sono stati messi a punto ed applicati per la valutazione della bioaccessibilità e della biodisponibilità di molecole potenzialmente bioattive presenti in matrici alimentari. Alcuni studi hanno fatto emergere, ad esempio, la scarsa biodisponibilità delle molecole a proprietà antiossidanti e dei carotenoidi assunti attraverso il consumo di frutta e verdura, a causa di interazioni fisiche e chimiche di queste molecole con la frazione polisaccaridica insolubile (fibra dietetica) [54] [81]. Questo risultato, apparentemente in contrasto con le evidenze epidemiologiche sugli effetti salutistici benefici di queste molecole, ha aperto il dibattito e stimolato un più approfondito studio sul percorso seguito da queste molecole in seguito all'assunzione con la dieta e sull'azione che questi metaboliti secondari esercitano a livello dell'apparato gastrointestinale.

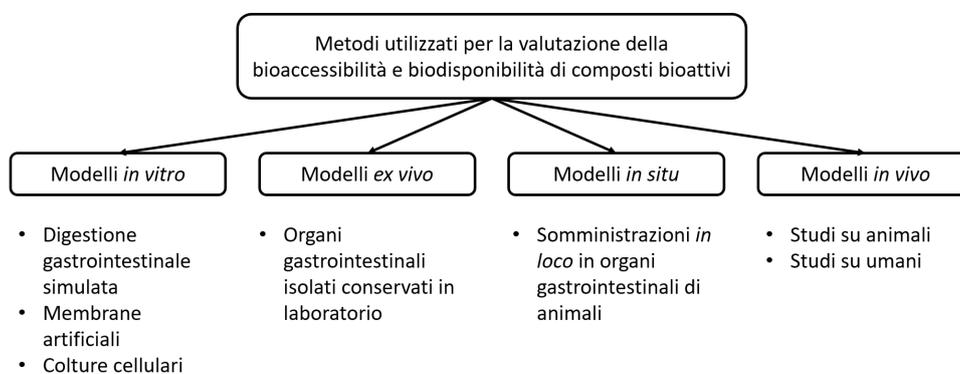


Figura 1.22: Metodologie utilizzate nella valutazione della bioaccessibilità e biodisponibilità dei composti bioattivi.

Tra i componenti bioattivi di maggior interesse e per questo fortemente indagati negli ultimi decenni, vi sono i carotenoidi ed i polifenoli. Queste due classi di molecole presentano caratteristiche chimico-fisiche differenti, che comportano un diverso comportamento dal rilascio della matrice di partenza, al trasporto ed assorbimento all'interno dell'organismo umano.

I carotenoidi, come anticipato nella sezione 1.5.1, sono molecole lipofile ed è quindi importante prestare attenzione alla formazione di micelle (aggregati molecolari in grado di trasportare materiale liposolubile rendendolo potenzialmente accessibile dall'epitelio intestinale), al trasporto all'interno del sistema linfatico ed all'incorporazione all'interno dei chilomicroni. La biodisponibilità dei carotenoidi contenuti negli alimenti varia in modo rilevante in relazione

a fattori endogeni (correlati al prodotto) ed esogeni (correlati al processo) [82]. Il processo di trasformazione degli alimenti, l'applicazione di un trattamento termico e/o l'aggiunta di grasso durante la fase di lavorazione degli alimenti, possono essere significativi per la formazione delle micelle in quanto in grado di massimizzare la quantità rilasciata dalla matrice [83]. Studi relativi alla bioaccessibilità sottolineano come esistano notevoli differenze tra i vari composti fenolici e come quelli introdotti in quantità maggiori con la dieta non siano spesso tra i più bioaccessibili. Le dimensioni molecolari e la struttura, la solubilità ed il tipo di glicosilazione possono essere considerati fattori chiave. Gli acidi fenolici a basso peso molecolare sono facilmente assorbiti attraverso il tratto intestinale mentre polifenoli di dimensioni maggiori (ad esempio le proantocianidine), vengono degradati in unità monomeriche o in dimeri [84] [85]. Nei vegetali, la maggior parte dei composti fenolici si trova in forma glicosilata o come esteri, che devono essere idrolizzati dagli enzimi intestinali o dalla microflora in modo tale che gli agliconi possano essere assorbiti.

## 2 | Scopo

L'Italia possiede un grande patrimonio di produzioni agricole di qualità che hanno uno stretto legame con il territorio, la sua storia e la sua identità. Proprio l'agricoltura di qualità può diventare un fattore di successo imprenditoriale ed un volano culturale importante, oltreché uno strumento di sviluppo sostenibile, di difesa del territorio, di tutela della biodiversità e di valorizzazione delle attività turistiche. Il settore agroalimentare è stato negli ultimi anni caratterizzato dall'affermarsi di un modello di produzione e consumo sempre più orientato verso i prodotti tradizionali e tipici, che presentano caratteristiche di qualità uniche ed irriproducibili in altri luoghi perché al di fuori di un determinato contesto ambientale, economico, sociale e culturale. L'origine territoriale, sempre più frequentemente segnalata ed enfatizzata in etichetta, diviene quindi un indicatore di identità propria ed assume un'importanza crescente per il consumatore, in quanto racchiude un insieme di informazioni relative alla specificità delle risorse e dei processi di produzione impiegati nell'area di produzione, oltre che agli attributi caratteristici del prodotto stesso. Il legame con il territorio è quindi manifestazione dell'ambiente nel quale viene realizzata la produzione, della tipologia dei terreni e delle caratteristiche pedoclimatiche di una determinata area.

Il Consorzio Uomini di Massenzatica (CUM) è una proprietà collettiva di 353 ettari che si trova a Massenzatica, nell'area Sud del Delta del Po, in provincia di Ferrara, le cui origini risalgono al Medioevo. Il paesaggio del basso Ferrarese e del Delta del Po, può essere definito un "paesaggio in transizione" perché caratterizzato dalla mutevolezza dei confini tra terre emerse e sommerse, che sono state nel tempo lavorate e gradualmente bonificate dalla comunità di Massenzatica, insediata nelle poche aree emerse, lungo cordoni dunosi (Dune Fossili di Massenzatica). Proprio la comunità, attraverso un lavoro metodico e continuo, ha stabilizzato la rete fluviale, innalzato argini, bonificato le paludi di acqua salmastra, rendendo possibile la coltivazione nei terreni che erano stati ad essa affidati e tramandando nei secoli i propri valori. L'organizzazione territoriale di Massenzatica, unitamente alla volontà di rigenerare il paesaggio in termini collettivi, assicurando la tutela e la valorizzazione del patrimonio non solo in termini di coltivazione ma anche di tradizioni rurali e culturali locali si presenta come una realtà unica. A riconoscimento di ciò, il CUM è risultato vincitore del Premio Nazionale del Paesaggio 2018/2019 e candidato per l'Italia alla VI edizione del Premio del Paesaggio del Consiglio d'Europa con il progetto "Tra terra e acqua, un altro modo di possedere. Agricoltura, impresa sociale, paesaggio e sostenibilità per uno spazio identitario in continuo divenire: l'esperienza del Consorzio Uomini di Massenzatica". La volontà, da parte del Consorzio, di porre particolare attenzione ai propri prodotti in termini di unicità e valorizzazione, cercando al tempo stesso di conformarsi alle attuali richieste di mercato, è confermata dalla recente istituzione (Maggio 2019) del marchio "Terre Pomposiane-Coltiviamo una bella storia". Un marchio identitario che consenta non solo di tutelare e promuovere le produzioni agricole tipiche, in particolare radicchio e zucca, ma anche di qualificare questa parte di territorio, attraverso altri futuri interventi

di filiera per la trasformazione dei prodotti nonché per il turismo. Si presenta quindi come un modello sociale ed economico innovativo, abbinato a ricerca, formazione e marketing in grado di comunicare una precisa identità territoriale.

Tra i prodotti coltivati nel territorio di Massenzatica, particolare importanza assume la zucca, frutto che presenta un forte legame con la tradizione ferrarese, e la cui lavorazione con passione, fantasia e dedizione ha portato alla creazione di un prodotto alimentare, i *Cappellacci di Zucca Ferraresi IGP*, che hanno ricevuto nel 2016 il riconoscimento europeo di Indicazione Geografica Protetta.

Nel piano colturale dei terreni del CUM, il radicchio rappresenta invece, sia per superficie che per produzione, la principale orticola grazie alla quale si genera un consistente valore economico e sociale. L'utilizzo del radicchio nella gastronomia locale è riportato in alcuni testi del XVI secolo e già nel secolo scorso sono rinvenibili bolle che ne testimoniano la commercializzazione. Nel Delta ferrarese la coltivazione del radicchio è sempre avvenuta mediante autoproduzione del seme che viene realizzata dai singoli orticoltori. Questa tecnica consiste nel selezionare in coltura le piante con le migliori caratteristiche morfologiche, che verranno quindi lasciate andare a seme, il quale sarà utilizzato per la produzione dei trapianti dell'anno successivo. Tale pratica è volta a mantenere invariate le caratteristiche distintive ed a migliorare quelle agronomiche e commerciali. Questa pianta presenta un elevato polimorfismo genetico ed un altrettanto elevato livello di adattamento alle condizioni naturali ed antropologiche degli ambienti in cui è coltivato ed in virtù di queste considerazioni, è ragionevole pensare che il radicchio autoprodotta nei terreni del CUM abbia, nel corso degli anni, assunto caratteristiche chimiche e genetiche proprie.

In tale contesto si inserisce il progetto oggetto di questo dottorato e nato da una collaborazione tra l'Università degli Studi di Ferrara ed il CUM. Con tale progetto ci si pone l'obiettivo di affermare la qualità, il valore nutritivo e la composizione del radicchio e della zucca, prodotti di valore identitario per il territorio di Massenzatica.

La ricerca ha ricoperto un arco temporale di tre anni, durante i quali sono stati predisposti opportuni campi sperimentali e raccolte programmate, in modo tale da poter valutare i risultati ottenuti indipendentemente dalle variabili atmosferiche e riuscire ad effettuare un confronto accurato tra i campioni. L'indagine delle caratteristiche bromatologiche ha permesso *in primis* di redigere, per i due prodotti considerati, le etichette nutrizionali, strumento di cui dispone il consumatore per orientare le proprie scelte, informarsi e quindi tutelare la propria salute ed il proprio benessere. In secondo luogo è stato effettuato il confronto con competitors presenti sul mercato per individuare possibili analogie e differenze, in modo tale da valutare se esistano le condizioni per avviare l'*iter* necessario all'ottenimento di un marchio di riconoscimento europeo.

Sia per la zucca che per il radicchio, sono stati infine indagati alcuni aspetti salutistici e nutrizionali, per fornire un quadro completo riguardo alle caratteristiche del prodotto. In particolare l'attenzione è stata focalizzata su due classi di composti bioattivi, carotenoidi nella zucca e polifenoli nel radicchio, rispetto ai quali è stata effettuata un'attenta analisi di tipo quali-quantitativo. L'identificazione di questi metaboliti secondari non è tuttavia sufficiente per valutare l'efficacia nutrizionale del prodotto considerato, poiché intercorrono numerosi e differenti meccanismi che ne possono limitare la biodisponibilità e/o bioattività e proprio per tale motivo sono stati effettuati studi di bioaccessibilità *in vitro* per entrambe le matrici alimentari considerate. Quest'ultimo aspetto, oltre a completare le conoscenze relative alla composizione ed alle proprietà dei prodotti oggetto dello studio, pone le basi per un proseguimento del progetto nell'ottica di una possibile trasformazione che crei valore e limiti le eccedenze.

## 3 Risultati e discussione zucca

### 3.1 Campionamento

La ricerca è stata svolta su due tra le varietà di zucca che rappresentano i maggiori volumi di mercato e che sono correlate alle tradizioni gastronomiche locali dell'Emilia Romagna: zucca Delica (*Cucurbita maxima*) e zucca Violina (*Cucurbita moschata*).

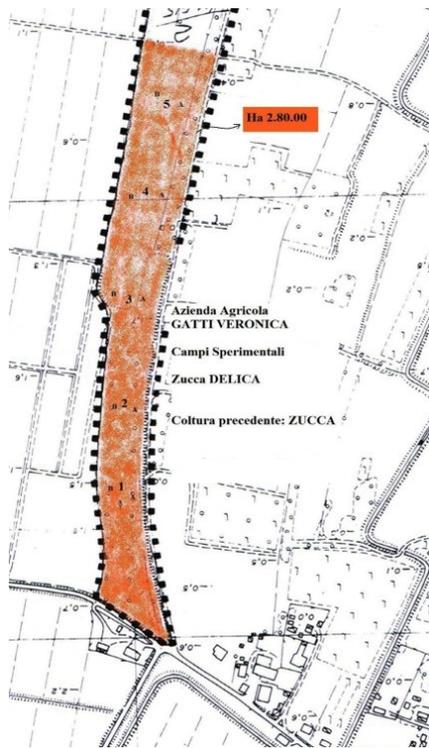
Il Consorzio Uomini di Massenzatica (CUM), nel mese di Novembre 2015, ha fornito 5 zucche mature per ogni varietà, sulle quali sono state svolte analisi atte alla messa a punto ed ottimizzazione delle metodiche sperimentali. Nei due anni successivi il Consorzio ha predisposto specifici campi sperimentali da cui, nei mesi di Novembre 2016 e Novembre 2017, sono state prelevate 10 zucche mature per ogni sito (in figura 3.1 sono mostrati i campi sperimentali di entrambe le varietà).

Al fine di effettuare un confronto dei dati ottenuti per i campioni di Massenzatica con competitors presenti sul mercato, sono state selezionate, per gli anni 2016 e 2017, 3 zucche per ogni varietà coltivate a Sermide (provincia di Mantova), ritenuto uno tra i territori maggiormente vocati alla coltivazione della zucca.

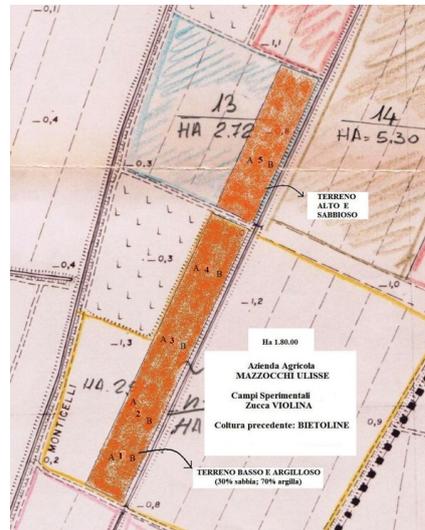
La zucca Delica pesa approssimativamente 2 kg, è di forma sferica e con diametri longitudinali e trasversali rispettivamente di 12-16 cm e 20-25 cm; la zucca Violina presenta invece una forma allungata di circa 55 cm, diametro trasversale di circa 8-12 cm nella porzione cilindrica apicale, 15-20 cm nella parte basale e pesa 3 kg. Per la preparazione del campione, la zucca Delica è stata sezionata in 4 parti uguali, mentre per la zucca Violina sono state ottenute due porzioni per la parte apicale e due per la parte basale (figura 3.2). Ogni zucca è stata privata della buccia e dei semi, i quarti sono stati tagliati a cubetti e mescolati, sigillati e riposti in freezer a -20 °C fino al momento delle analisi.

Campione	Zona coltivazione	Anno raccolta	n° campioni	Sigla
Zucca Delica	Massenzatica (FE)	2016	10	DM
		2017	10	
	Sermide (MN)	2016	3	DS
		2017	3	
Zucca Violina	Massenzatica (FE)	2016	10	VM
		2017	10	
	Sermide (MN)	2016	3	VS
		2017	3	

Tabella 3.1: Elenco dei campioni di zucca analizzati.

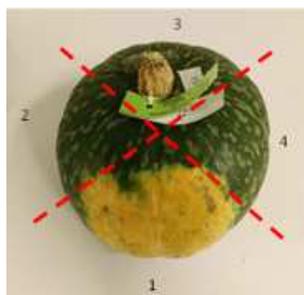


(a) Zucca Delica.

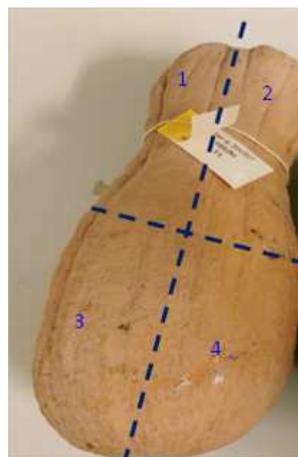


(b) Zucca Violina.

Figura 3.1: Campi sperimentali.



(a) Zucca Delica.



(b) Zucca Violina.

Figura 3.2: Campionamento delle zucche.

## 3.2 Analisi bromatologiche

L'analisi bromatologica è stata effettuata su tutti i campioni di entrambe le varietà di zucca per ogni annata ed ha riguardato la determinazione del contenuto di umidità, del contenuto proteico totale, attraverso il metodo ufficiale Kjeldhal, della frazione minerale totale, del contenuto lipidico e successiva caratterizzazione del profilo degli acidi grassi, della composizione specifica in macroelementi ed oligoelementi. I risultati riportati nelle tabelle seguenti sono espressi come media delle tre annate e derivano da analisi effettuate in triplo per ogni zucca di ogni singola annata. I dati di tutte le analisi sono rielaborati usando il programma IBM SPSS Statistics® mediante ANOVA ad una via per valutare se vi fossero differenze significative ( $p < 0,05$ ) tra i diversi territori di coltivazione, a parità di varietà considerata.

Campione	Umidità (g\100 g di s. fresca)	Proteine	Ceneri	Lipidi (g\100 g di s. secca)	Fibra Totale	Carboidrati
DM	83,07±1,55 <sup>a</sup>	13,20±2,24 <sup>a</sup>	6,00±0,50	2,17±0,36	30,75±11,96	47,91±11,76
DS	86,44±6,85 <sup>a</sup>	12,23±1,05 <sup>a</sup>	7,40±2,17	1,60±0,69	32,44±9,06	46,33±10,98
VM	89,60±0,50 <sup>a</sup>	16,21±2,11 <sup>a</sup>	9,99±0,83 <sup>a</sup>	1,49±0,27 <sup>a</sup>	24,11±3,35 <sup>a</sup>	48,20±5,99 <sup>a</sup>
VS	86,05±3,90 <sup>a</sup>	11,32±2,24 <sup>a</sup>	6,52±0,61 <sup>a</sup>	0,85±0,03 <sup>a</sup>	19,69±2,05 <sup>a</sup>	61,62±4,94 <sup>a</sup>

**Tabella 3.2:** Caratterizzazione bromatologica dei campioni di zucca. I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016 e 2017. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: DM (zucca Delica di Massenzatica), DS (zucca Delica di Sermide), VM (zucca Violina di Massenzatica), VS (zucca Violina di Sermide). I carboidrati totali (g/100 g di sostanza secca) sono calcolati per differenza rispetto ai dati di proteine, ceneri, lipidi e fibra totale. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra i campioni di Massenzatica ed i campioni di Sermide ( $p < 0,05$ ).

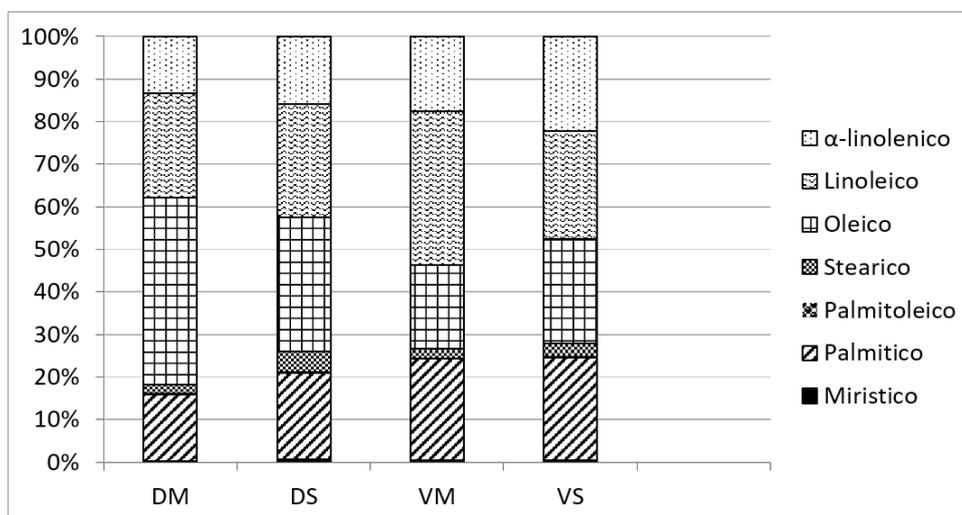
La polpa della zucca Violina risulta generalmente più succosa e ciò è collegato al maggiore contenuto di umidità; per entrambe le varietà considerate, il contenuto in proteine è compreso tra 11,32% e 16,21% mentre il contributo lipidico è estremamente basso (0,85-2,17%) e conferma come la zucca sia un alimento dietetico e a ridotto contenuto di grassi (fare riferimento ai dati presentati in tabella 3.2). Il contenuto di fibra totale è maggiore nella varietà Delica, con valori che superano il 30% su sostanza secca, mentre è compreso tra 19,69% per la Violina di Sermide e 24,11% per la Violina di Massenzatica. I carboidrati, calcolati per differenza rispetto ai parametri appena discussi, sono prossimi ad un valore medio di 50 g/100 g di sostanza secca per tutti i campioni analizzati.

La presenza di differenze statisticamente significative in relazione al territorio di coltivazione viene evidenziata nella tabella 3.2 e nelle tabelle seguenti mediante l'apice a.

Nello specifico, le analisi bromatologiche sopra riportate evidenziano una buona diversificazione tra le zucche Violina di Massenzatica e quelle di Sermide, che presentano infatti l'apice a per tutti i parametri, mentre per la tipologia Delica si rivelano utili i soli dati di umidità e contenuto proteico.

La frazione lipidica, determinata con estrattore automatico Soxhlet, è stata in seguito caratterizzata nel profilo degli acidi grassi mediante gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa. I risultati ottenuti sono riportati in figura 3.3 ed in tabella 3.3: si può notare come siano presenti acidi grassi saturi, privi di doppi legami nella loro catena, e acidi grassi insaturi, che presentano invece una o più insaturazioni.

L'acido palmitico (C16:0) è l'acido grasso saturo maggiormente presente, con valori prossimi al 23% nella varietà Violina. Sono stati individuati inoltre gli acidi grassi saturi miristico (C14:0) e stearico (C18:0), presenti in quantità ridotte. Nell'ottica delle raccomandazioni da parte dei medici di diete a basso contenuto di grassi saturi e ricche in grassi mono e/o polinsaturi, è interessante sottolineare la presenza, nella polpa di entrambe le varietà analizzate, di acido oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolenico. L'acido oleico (C18:1) presenta una singola insaturazione di tipo *cis* ed



**Figura 3.3:** Ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico delle zucche. I risultati sono la media dei dati ottenuti nelle annate 2016 e 2017. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: DM (zucca Delica di Massenzatica), DS (zucca Delica di Sermide), VM (zucca Violina di Massenzatica), VS (zucca Violina di Sermide).

appartiene alla serie omega-9. I valori più alti si registrano nella varietà Delica, con un massimo di 44,02% per quella coltivata a Massenzatica, mentre il valore più basso è pari a 19,68% per la Violina di Massenzatica. Appartenendo al gruppo degli acidi grassi monoinsaturi, l'acido oleico è in grado di diminuire la concentrazione di colesterolo LDL nel sangue, aumentando quella del colesterolo HDL, e limitando problemi circolatori quali infarti e ostruzioni vascolari. L'acido linoleico (C18:2) è un acido carbossilico che presenta invece due insaturazioni *cis* e che appartiene alla serie omega-6; l'acido  $\alpha$ -linolenico (ALA) è un acido grasso n-3 insaturo, con legami tutti di tipo *cis*, della serie omega-3 ( $\omega$ 3 $\alpha$ ) che viene spesso indicato anche come C18:1  $\omega$ 3. Entrambi appartengono alla categoria degli acidi grassi essenziali, non sintetizzabili quindi direttamente dall'organismo umano, la cui introduzione deve avvenire attraverso l'alimentazione. I livelli e l'equilibrio degli acidi grassi delle due serie (il rapporto di  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 assunto dovrebbe essere idealmente 6:1) sono importanti per permettere a questi acidi di espletare la loro funzione: essi sono indispensabili per la produzione di energia, per la formazione delle membrane biologiche, in quanto costituenti dei fosfolipidi, per la sintesi dell'emoglobina, per la produzione degli ormoni e per il mantenimento del corretto equilibrio ormonale, sono i precursori degli eicosanoidi, mediatori chimici a livello cellulare. Gli  $\omega$ -3 abbassano inoltre i livelli plasmatici dei trigliceridi, interferendo con la loro incorporazione a livello epatico nelle VLDL e possiedono un'importante azione antitrombotica e preventiva nei confronti dell'aterosclerosi.

Tra i sette acidi grassi identificati, i valori di acido stearico risultano statisticamente significativi per la differenziazione in relazione al territorio di coltivazione per entrambe le varietà, oltre a miristico, palmitico ed oleico per la zucca Delica e linoleico per la Violina.

Da questi risultati emerge un rapporto acidi grassi insaturi/saturi a favore degli insaturi. Come specificato in tabella 3.4, ad eccezione della varietà Delica coltivata a Massenzatica che presenta un rapporto pari a 4,55, per gli altri campioni il valore è comparabile ed inferiore a 3,00.

Dall'analisi statistica emerge che tali parametri sono statisticamente significativi per l'identificazione delle sole zucche Delica coltivate a Massenzatica rispetto a quelle di Sermide.

I sali minerali rappresentano uno dei fattori fondamentali per il corretto svolgimento delle funzioni biologiche dell'organismo ed il suo accrescimento. Una dieta equilibrata ed una corretta idratazione permettono il mantenimento delle concentrazioni di macro e microelementi. I ma-

Campione	Miristico	Palmitico	Palmitoleico	Stearico	Oleico	Linoleico	$\alpha$ -linolenico
DM	0,20±0,05 <sup>a</sup>	15,74±0,43 <sup>a</sup>	0,15±0,01	2,09±0,03 <sup>a</sup>	44,02±2,43 <sup>a</sup>	24,47±1,32	13,33±0,97
DS	0,69±0,09 <sup>a</sup>	20,23±0,87 <sup>a</sup>	0,19±0,02	4,98±0,32 <sup>a</sup>	31,49±0,85 <sup>a</sup>	26,50±1,92	15,92±1,11
VM	0,50±0,03	23,72±1,86	0,16±0,00	2,32±0,25 <sup>a</sup>	19,68±2,02	36,07±2,50 <sup>a</sup>	17,54±1,27
VS	0,46±0,04	23,99±2,58	0,20±0,01	3,38±0,33 <sup>a</sup>	24,50±2,16	25,18±1,08 <sup>a</sup>	22,30±1,33

**Tabella 3.3:** Contenuto percentuale di acidi grassi nei campioni di zucca. I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016 e 2017. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: DM (zucca Delica di Massenzatica), DS (zucca Delica di Sermide), VM (zucca Violina di Massenzatica), VS (zucca Violina di Sermide). L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra i campioni di Massenzatica ed i campioni di Sermide ( $p < 0,05$ ).

Campione	Ac. Grassi Saturi (%)	Ac. Grassi Insaturi (%)	Rapporto Insaturi/Saturi (%)
DM	18,03 <sup>a</sup>	81,97 <sup>a</sup>	4,55 <sup>a</sup>
DS	25,90 <sup>a</sup>	74,10 <sup>a</sup>	2,88 <sup>a</sup>
VM	26,55	73,45	2,80
VS	27,83	72,17	2,66

**Tabella 3.4:** Ripartizione percentuale degli acidi grassi saturi ed insaturi e loro rapporto. I risultati sono espressi come media dei dati ottenuti nelle annate 2016 e 2017. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: DM (zucca Delica di Massenzatica), DS (zucca Delica di Sermide), VM (zucca Violina di Massenzatica), VS (zucca Violina di Sermide). L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra i campioni di Massenzatica ed i campioni di Sermide ( $p < 0,05$ ).

croelementi sono presenti nell'organismo in discrete quantità ed il loro fabbisogno individuale giornaliero varia da mg a qualche grammo; i microelementi o oligoelementi, sono presenti in quantità più ridotte ed il fabbisogno individuale giornaliero è dell'ordine dei mg o  $\mu\text{g}$ . Si possono generalmente classificare in: (I) essenziali poiché una loro carenza compromette le funzioni fisiologiche importanti e/o fanno parte di strutture organiche preposte a ruoli vitali nell'organismo; (II) probabilmente essenziali; (III) potenzialmente tossici.

Le analisi, effettuate mediante spettroscopia atomica sulla totalità dei campioni, hanno permesso la quantificazione di macroelementi quali calcio, sodio, potassio, magnesio e di microelementi quali ferro, rame, zinco e manganese.

Campione	Calcio (mg/g s.s.)	Sodio ( $\mu\text{g/g}$ s.s.)	Potassio (mg/g s.s.)	Magnesio (mg/g s.s.)
DM	0,96±0,08	22,31±2,34 <sup>a</sup>	27,19±0,15 <sup>a</sup>	1,05±0,23
DS	1,34±0,66	38,37±5,59 <sup>a</sup>	35,00±6,37 <sup>a</sup>	1,29±0,47
VM	1,51±0,35	35,14±3,45	56,65±5,99 <sup>a</sup>	1,27±0,12 <sup>a</sup>
VS	1,21±0,55	24,54±5,73	37,39±6,00 <sup>a</sup>	0,96±0,12 <sup>a</sup>

**Tabella 3.5:** Contenuto di macroelementi (mg/g e  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca) nelle zucche Delica e Violina di Massenzatica e Sermide. I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016 e 2017. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: DM (zucca Delica di Massenzatica), DS (zucca Delica di Sermide), VM (zucca Violina di Massenzatica), VS (zucca Violina di Sermide). L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra i campioni di Massenzatica ed i campioni di Sermide ( $p < 0,05$ ).

I dati riportati in tabella 3.5 sottolineano come il potassio sia il macroelemento presente in concentrazioni maggiori, con un range compreso tra 27 mg/g e 57 mg/g di sostanza secca. Il potassio si trova principalmente nei liquidi intracellulari e regola l'eccitabilità neuro-muscolare, la ritmicità del cuore, la pressione osmotica, l'equilibrio acido base e la ritenzione idrica; questo macroelemento è inoltre importante ai fini organolettici poiché esalta il sapore del frutto. Il calcio è presente in concentrazioni basse e simili tra le diverse varietà, circa 1-1,5 mg/g di sostanza secca; anche per il magnesio non si riscontrano variazioni importanti ed i valori sono tutti inferiori a 1,5 mg/g di sostanza secca. È interessante notare come il sodio sia contenuto in concentrazioni basse in questo alimento, con un range compreso tra 22,31  $\mu\text{g/g}$  per la Delica

di Massenzatica e 38,37  $\mu\text{g/g}$  per la Delica di Sermide. Questo macroelemento, presente per il 40% nei liquidi extracellulari dove è coinvolto nel meccanismo della pompa al sodio, per il 43% nel tessuto osseo, nel connettivo e nella cartilagine, è introdotto giornalmente con la dieta in quantità eccessive. Alimenti a basso contenuto di sodio sono quindi raccomandati, soprattutto nei soggetti che presentano problemi cardiovascolari e di ipertensione.

Campione	Ferro ( $\mu\text{g/g s.s.}$ )	Rame ( $\mu\text{g/g s.s.}$ )	Zinco ( $\mu\text{g/g s.s.}$ )	Manganese ( $\mu\text{g/g s.s.}$ )
DM	29,98 $\pm$ 4,71	6,92 $\pm$ 6,25	12,37 $\pm$ 6,90	9,82 $\pm$ 8,54
DS	41,05 $\pm$ 27,37	10,4 $\pm$ 7,65	14,90 $\pm$ 7,84	7,55 $\pm$ 7,06
VM	32,68 $\pm$ 2,98 <sup>a</sup>	9,56 $\pm$ 1,31	24,49 $\pm$ 1,47 <sup>a</sup>	10,41 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>
VS	26,30 $\pm$ 8,13 <sup>a</sup>	8,32 $\pm$ 1,01	15,83 $\pm$ 3,68 <sup>a</sup>	5,12 $\pm$ 2,04 <sup>a</sup>

**Tabella 3.6:** Contenuto di oligoelementi ( $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca) nelle zucche Delica e Violina di Massenzatica e Sermide. I risultati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016 e 2017. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: DM (zucca Delica di Massenzatica), DS (zucca Delica di Sermide), VM (zucca Violina di Massenzatica), VS (zucca Violina di Sermide). L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra i campioni di Massenzatica ed i campioni di Sermide ( $p < 0,05$ ).

Le concentrazioni dei microelementi analizzati (riportati in tabella 3.6) differiscono sia per varietà che per provenienza. Ferro e zinco risultano i più abbondanti con valori massimi rispettivamente di 41,05  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca nella Delica di Sermide e 24,49  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca nella Violina di Massenzatica. Il ferro è indispensabile nei processi di respirazione cellulare, nella sintesi del collagene e nel metabolismo degli acidi nucleici; lo zinco è invece cofattore di numerosi ed importanti enzimi (protezione dai radicali liberi, vista, olfatto, memoria, respirazione). Rame e manganese sono presenti invece in concentrazioni inferiori, con valori massimi di circa 10  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca. Il primo è cofattore di numerosi enzimi data la sua possibilità di ossidarsi ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e ridursi ( $\text{Cu}^+$ ) in modo reversibile, il secondo è invece costituente di importanti enzimi. I dati riportati in tabella 3.6 presentano deviazioni standard elevate che derivano da valori differenti tra le tre annate. Ciò può essere riconducibile anche alla fertilizzazione, più nello specifico alla concimazione, dei terreni. Con la concimazione si cerca di migliorare le condizioni di abitabilità del terreno, per consentire alle piante di svilupparsi e produrre in modo ottimale: gli elementi nutritivi vengono somministrati (fertilizzanti chimici o organici) al fine di reintegrarne la disponibilità nel terreno per una precoce entrata in produzione della pianta, un equilibrato sviluppo vegeto-produttivo ed una maggiore resistenza ad avversità biotiche ed abiotiche, oltre che migliorare le proprietà fisiche, biologiche, chimiche ed idrologiche del terreno.

Il contenuto in minerali può inoltre essere correlato alla tipologia del territorio di coltivazione ed infatti il confronto tra Massenzatica e Sermide per la varietà Delica, sottolinea come sodio e potassio siano utili la diversificazione, mentre potassio, magnesio, ferro, zinco e manganese lo siano per la varietà Violina.

Il contenuto percentuale di fibra totale, solubile ed insolubile è stato analizzato mediante l'utilizzo di un kit enzimatico, come riportato nella sezione 5.1.7 ed i risultati ottenuti sono elencati in tabella 3.7. La fibra si identifica con la frazione resistente all'idrolisi degli enzimi digestivi e si suddivide in: (I) fibra solubile, costituita da polisaccaridi a basso peso molecolare con costituenti polari; (II) fibra insolubile, costituita da polisaccaridi ad alto peso molecolare. Le fibre hanno un valore nutrizionale modesto (2 kcal/g) ma svolgono un'azione molto importante. Numerosi studi hanno sottolineato come un'alimentazione ricca in fibre costituisce un approccio alimentare utile contro l'insorgenza di alcune patologie cronico-degenerative come obesità, malattie cardio-vascolari, alcuni tipi di neoplasie tra cui il tumore al colon, diverticoli intestinali, dislipidemie e diabete [86]. La fibra solubile in presenza di acqua forma un gel vi-

scoso che comporta un rallentamento dello svuotamento intestinale ed un senso di pienezza. Questa sostanza gelatinosa è in grado di interferire con l'assorbimento di glucidi e lipidi ed esplica quindi una funzione di prevenzione e terapia dell'obesità e di controllo della glicemia e colesterolemia. Favorisce inoltre l'equilibrio della microflora intestinale, esercitando un effetto prebiotico, e contribuisce al mantenimento del corretto pH intestinale. La fibra insolubile è in grado di assorbire consistenti quantità di acqua, regolarizzando le funzioni intestinali. Una maggior assunzione di fibre insolubili può quindi prevenire la stitichezza, proteggere da alcune malattie infiammatorie e ridurre il rischio di cancro al colon.

Il contenuto di fibra totale, espresso come dato percentuale rispetto alla sostanza secca e riportato in tabella 3.7, è maggiore nella varietà Delica, con valori che superano il 30% sia per quella coltivata a Massenzatica sia per quella di Sermide. Questo dato trova conferma nella maggiore consistenza di tale zucca rispetto alla varietà Violina. Analizzando il contenuto in fibra solubile si può notare come i valori siano compresi in un intervallo che va dal 7,44% per la Delica di Massenzatica al 11,67% per quella di Sermide, mentre per la fibra insolubile il valore minore si registra per la Violina di Sermide (10,69%) e quello maggiore per la Delica di Massenzatica (23,31%).

I dati relativi alla quantità di fibra totale, solubile ed insolubile sono particolarmente utili per distinguere i campioni di zucca Violina provenienti da Massenzatica rispetto a quelli provenienti da Sermide, mentre per la zucca Delica risulta statisticamente significativo solo il valore di fibra solubile.

Campione	Fibra Totale (% s.s.)	Fibra Solubile (% s.s.)	Fibra Insolubile (% s.s.)
DM	30,75±11,96	7,44±0,58 <sup>a</sup>	23,31±12,54
DS	32,44±9,06	11,67±3,05 <sup>a</sup>	20,77±6,00
VM	24,11±3,35 <sup>a</sup>	10,70±1,73 <sup>a</sup>	13,41±1,92 <sup>a</sup>
VS	19,69±2,05 <sup>a</sup>	9,00±1,75 <sup>a</sup>	10,69±0,30 <sup>a</sup>

**Tabella 3.7:** Contenuto di fibra (% su sostanza secca) nelle zucche Delica e Violina di Massenzatica e Sermide. I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016 e 2017. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: DM (zucca Delica di Massenzatica), DS (zucca Delica di Sermide), VM (zucca Violina di Massenzatica), VS (zucca Violina di Sermide). L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra i campioni di Massenzatica ed i campioni di Sermide ( $p < 0,05$ ).

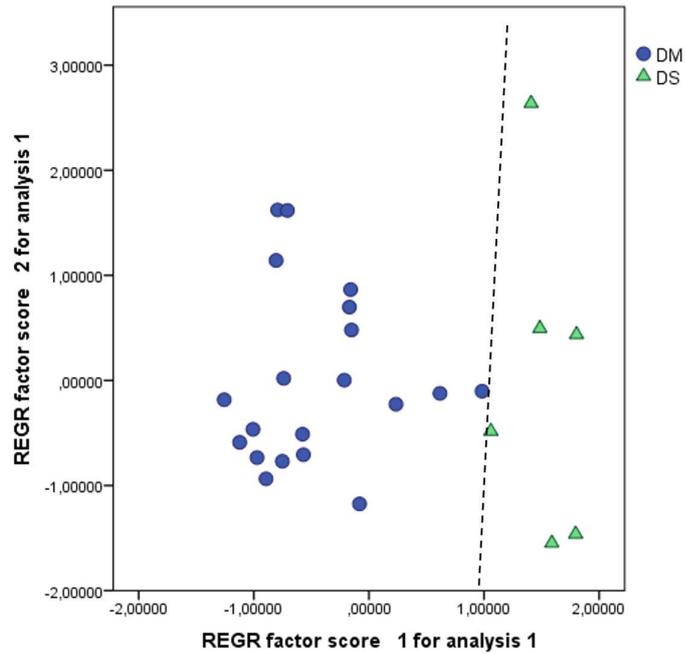
### 3.2.1 Analisi statistica dei dati derivanti dalle analisi chimico-bromatologiche

Analizzando i dati presentati nella sezione precedente ed elaborati mediante test della varianza ad una via, si può affermare che i parametri utili per la differenziazione in relazione alla provenienza e comuni ad entrambe le varietà considerate sono: la percentuale di umidità, il contenuto in proteine, la percentuale di acido stearico, la concentrazione di potassio e la frazione di fibra solubile. È stata inoltre effettuata una valutazione complessiva tramite l'analisi delle componenti principali (PCA) in riferimento alle analisi bromatologiche sia per la varietà Delica che Violina ed i grafici sono riportati rispettivamente in figura 3.4 e 3.5.

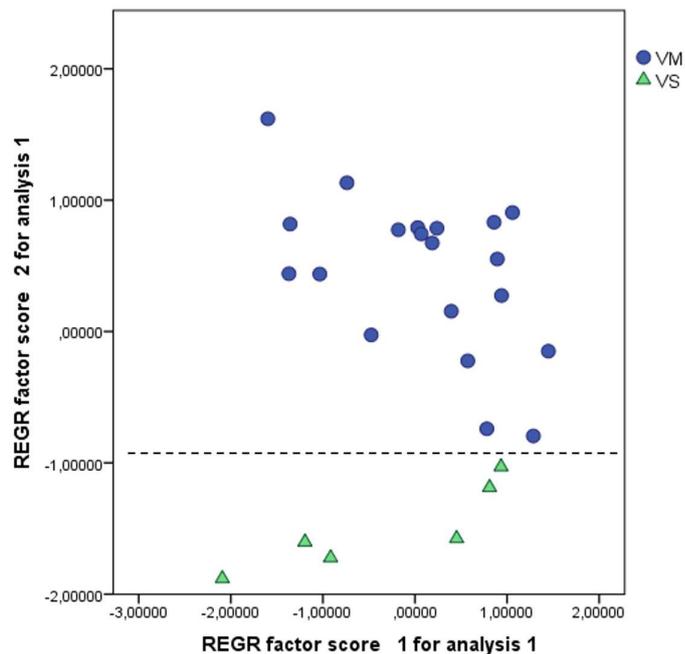
Si può notare come il gruppo di zucche coltivate a Massenzatica si distingue da quelle provenienti da Sermide e tale separazione sia più chiara e netta per la varietà Violina rispetto a quella Delica.

### 3.3 Valutazione delle caratteristiche organolettiche

Dal momento che uno degli scopi di questa tesi di dottorato è lo studio approfondito delle zucche coltivate nel territorio di Massenzatica, al fine di definire specifici marker di qualità che



**Figura 3.4:** PCA relativa alle analisi bromatologiche dei campioni di zucca Delica. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: DM (zucca Delica di Massenzatica) e DS (zucca Delica di Sermide). L'analisi della matrice delle due componenti estratte permette di affermare che le variabili che maggiormente incidono sono, in ordine decrescente di importanza: la percentuale di acidi grassi saturi, la percentuale di acidi grassi insaturi, il contenuto di acido oleico, il contenuto di acido palmitico, il contenuto di acido miristico, la concentrazione del ferro, la concentrazione dello zinco ed il contenuto proteico totale.



**Figura 3.5:** PCA relativa alle analisi bromatologiche dei campioni di zucca Delica. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: VM (zucca Violina di Massenzatica) e VS (zucca Violina di Sermide). L'analisi della matrice delle due componenti estratte permette di affermare che le variabili che maggiormente incidono sono, in ordine decrescente di importanza: la percentuale di acidi grassi saturi, la percentuale di acidi grassi insaturi, il contenuto di acido oleico, il contenuto di acido palmitico, la percentuale di fibra dietetica totale, il contenuto proteico totale, il contenuto di acido  $\alpha$ -linolenico, la concentrazione dello zinco e la concentrazione del potassio.

legghino il prodotto al territorio di provenienza, alcune analisi sono state svolte esclusivamente sui campioni di tale provenienza.

In particolare, la zucca è un alimento che viene utilizzato trasformato in numerosi prodotti tipici della tradizione (cappellacci, risotto, dolci, gnocchi, vellutate) e secondo diversi metodi di cottura. Proprio per tale motivo, è stata posta particolare attenzione ad alcuni parametri che contribuiscono alle proprietà organolettiche. Dalla consultazione di dati di letteratura, emerge come per frutti di tali dimensioni esistano talvolta differenze tra le diverse porzioni in relazione al grado di maturazione, al contatto con il suolo, all'esposizione alla luce solare [87]. Grado Brix, pH, acidità totale e acidi organici sono stati, in una fase preliminare del lavoro, valutati sui singoli quarti per verificare eventuali differenze tra parte apicale e fondo del frutto e solo successivamente sul campione ben omogeneizzato relativo al frutto intero.

### 3.3.1 Determinazione del grado Brix, del pH e dell'acidità

Grado Brix, pH ed acidità totale sono tre parametri molto importanti per determinare la qualità della zucca e le sue caratteristiche organolettiche. Le analisi sono stati effettuate sulla polpa fresca ed omogeneizzata; dai risultati relativi ai singoli quarti è emersa una buona omogeneità dei frutti nonostante le elevate dimensioni. Successivamente sono quindi state analizzate le zucche intere ed i dati sono riportati in tabella 3.8. I valori di grado Brix sono prossimi a 10 per entrambe le varietà, indice di una dolcezza media e in accordo con i dati relativi a tali tipi di zucca. La zucca Violina presenta valori di pH inferiori a 7 e quindi un'acidità maggiore rispetto alla Delica (1,21 per la prima e 0,62 per la seconda).

Campione	Grado Brix	pH	Acidità
DM	10,33±1,02	7,18±0,67	0,62±0,07
VM	9,51±0,99	6,68±0,59	1,21±0,08

**Tabella 3.8:** Risultati delle analisi di grado Brix, pH ed acidità effettuate sui campioni di zucca Delica e Violina di Massenzatica. I valori di acidità sono espressi come g di acido citrico/100g di sostanza fresca. I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016 e 2017. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: DM (zucca Delica di Massenzatica), VM (zucca Violina di Massenzatica).

### 3.3.2 Determinazione e quantificazione degli acidi organici

La natura e la concentrazione degli acidi organici sono fattori importanti che influenzano le caratteristiche organolettiche di frutta e verdura, in particolare il loro sapore. La percezione della dolcezza è collegata alla presenza degli acidi organici ed infatti il rapporto tra il contenuto di acidi organici e zuccheri viene utilizzato come indicatore della maturità di frutta e verdura. Questi composti stimolano inoltre la crescita di microrganismi, coagulano le proteine e svolgono attività antiossidante; acido malico ed acido citrico esercitano un effetto alcalinizzante, inibiscono la crescita di microflora indesiderata e partecipano al decorso dei processi metabolici [88].

Il protocollo di estrazione degli acidi organici è riportato nella sezione 5.2.3 e gli estratti delle sole zucche provenienti da Massenzatica sono stati analizzati mediante elettroforesi capillare P/ACE MDQ, dotata di detector Diode Array, di cui si riporta a titolo esemplificativo un elettroferogramma in figura 3.6 (per il metodo di analisi si veda la sezione 5.2.3).

Nella fase iniziale di messa a punto della metodica e studio della matrice, sono stati analizzati singolarmente i quattro quarti di ogni zucca. I dati ottenuti erano uniformi e confrontabili e per tale motivo si è deciso di analizzare il campione relativo all'intera zucca, dopo opportuna omogeneizzazione. Come si evince dalla tabella 3.9, l'acido più abbondante in entrambe le varietà è l'acido citrico, presente in concentrazioni di 2,93 mg/g di sostanza fresca per la zucca

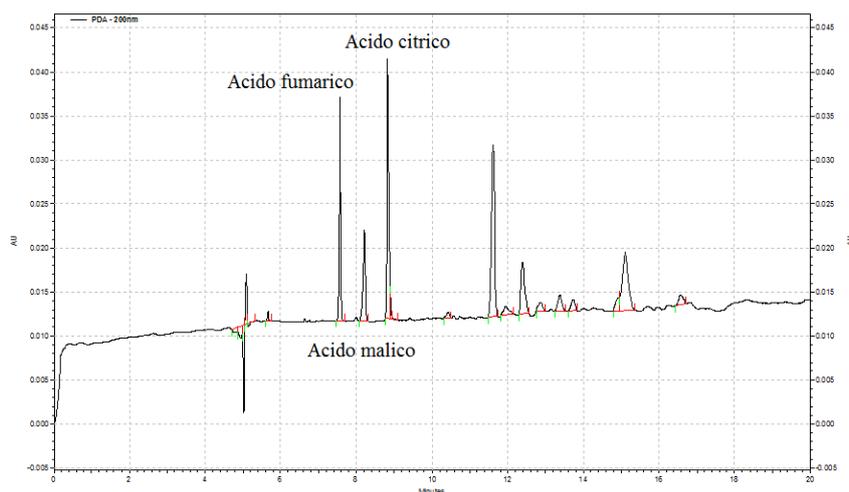


Figura 3.6: Elettroferogramma relativo all'analisi degli acidi organici in una zucca Violina di Massenzatica.

Delica e di 3,23 mg/g per la Violina. L'acido malico è presente invece in concentrazioni di poco superiori ad 1 mg/g di sostanza fresca; le concentrazioni di acido fumarico registrate sono dell'ordine dei  $\mu\text{g/g}$  di sostanza fresca e tale composto risulta quindi il meno abbondante. I 3 acidi identificati sono quelli maggiormente presenti in anche in altre varietà di zucca ed i dati registrati sono in accordo con studi già presenti in letteratura [89].

Campione	Acido Citrico (mg/g s.f.)	Acido Malico (mg/g s.f.)	Acido Fumarico ( $\mu\text{g/g}$ s.f.)
DM	2,93 $\pm$ 0,16	1,15 $\pm$ 0,13	95,91 $\pm$ 11,69
VM	3,23 $\pm$ 0,11	1,19 $\pm$ 0,09	73,93 $\pm$ 16,79

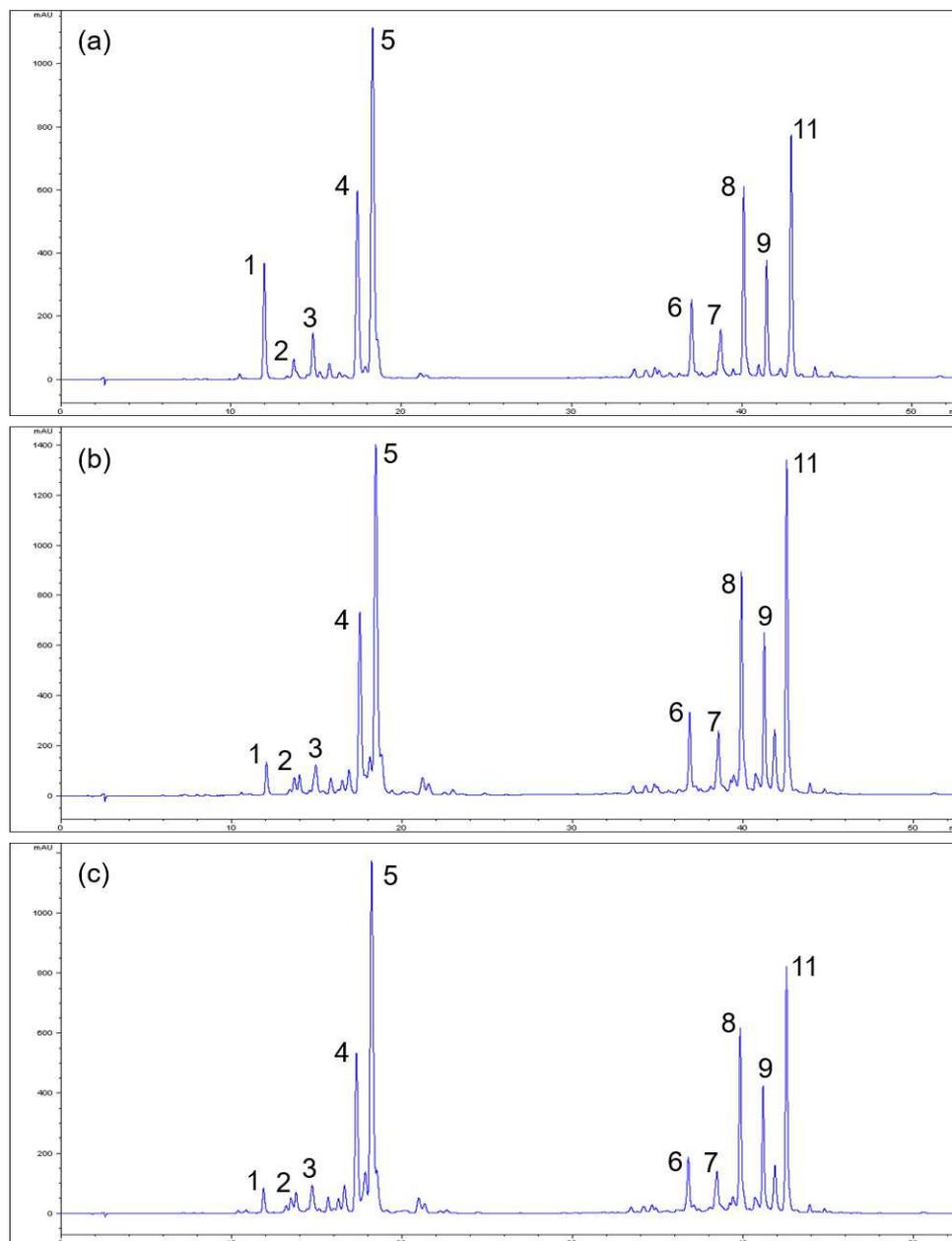
Tabella 3.9: Quantificazione (mg/g e  $\mu\text{g/g}$  di sostanza fresca) degli acidi organici identificati nei campioni di zucca Delica e Violina di Massenzatica. I risultati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016 e 2017. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: DM (zucca Delica di Massenzatica), VM (zucca Violina di Massenzatica).

### 3.4 Identificazione dei carotenoidi mediante HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS

Esistono molti fattori che possono influenzare la biosintesi, il metabolismo e la concentrazione di composti bioattivi in frutta e verdura. Importanti differenze qualitative e quantitative nei carotenoidi possono essere rilevate in relazione alla cultivar, alle condizioni ambientali (temperatura, disponibilità di nutrienti, intensità della luce solare, fase di maturazione, tempo di raccolta) e fattori genetici.

La composizione dei carotenoidi nelle zucche è stata determinata mediante HPLC su fase inversa, utilizzando una colonna C30. La letteratura recente ha infatti dimostrato che questo tipo di colonna è il più adatto per la separazione dei carotenoidi poiché tale fase stazionaria mostra una selettività migliorata nei confronti dei carotenoidi *cis-trans* rispetto ai ligandi C18 [90] [91]. Generalmente le analisi in fase inversa presentano una sequenza di picchi cromatografici che riflette una polarità decrescente: vengono eluite per prime le xantofille più polari, seguite dai caroteni a catena carboniosa più lunga. Per le colonne C30, la lunghezza della catena di poliene si delinea come il parametro essenziale per il tempo di ritenzione registrato e la separazione degli isomeri. La catena carboniosa più lunga aumenta lo spessore della fase stazionaria e permette interazioni più estese, secondarie e di non legame con i carotenoidi eluiti [92]. Picco-

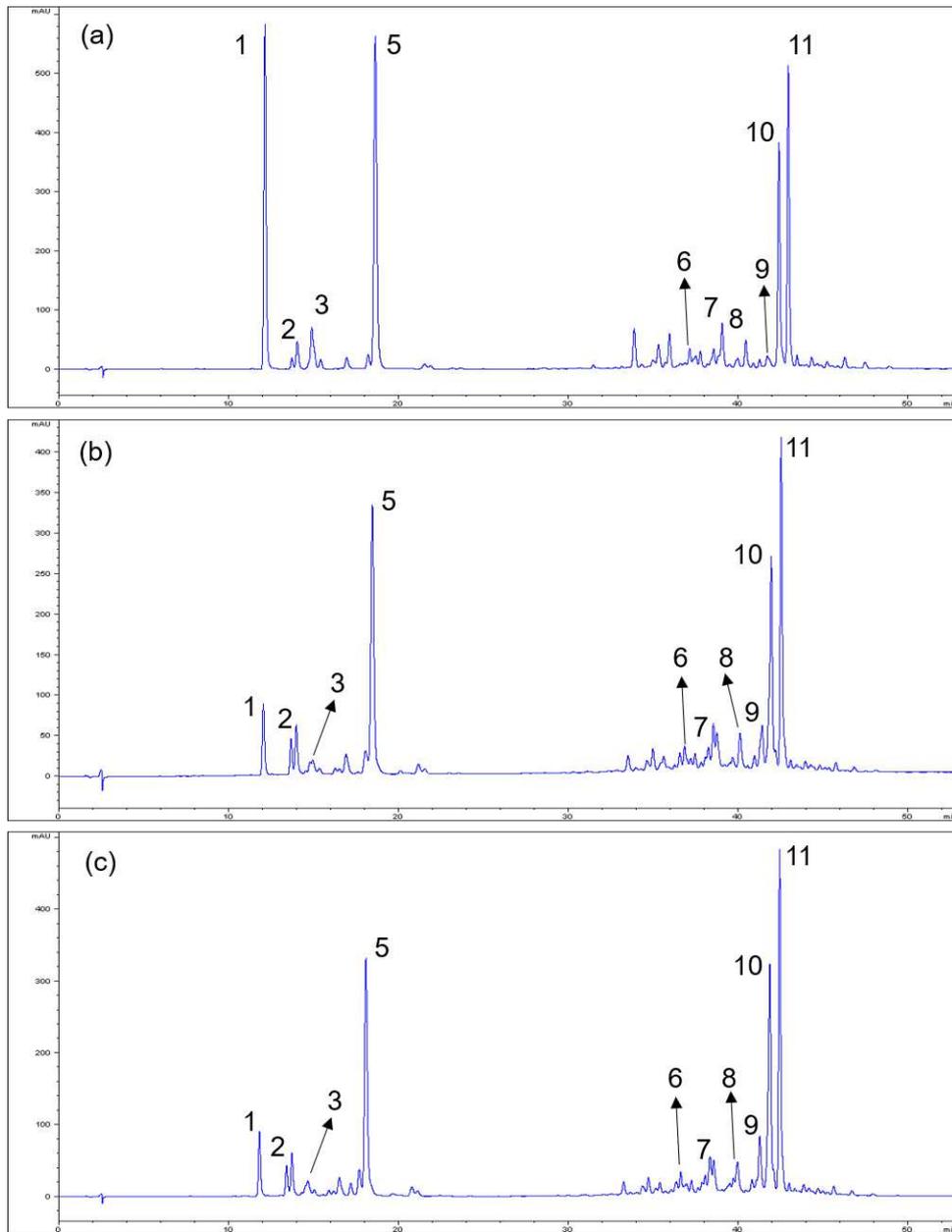
le differenze nella struttura molecolare possono quindi dar luogo a consistenti variazioni dei tempi di ritenzione osservati.



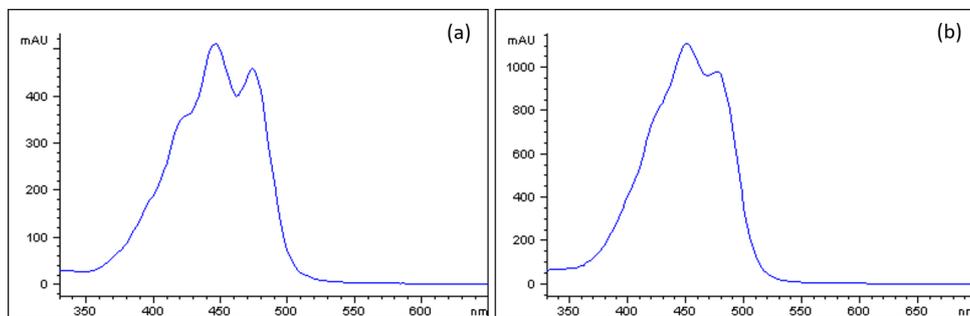
**Figura 3.7:** Cromatogrammi HPLC-UV/Vis relativi agli estratti di zucca Delica di Massenzatica: (a) campione crudo, (b) campione cotto al forno, (c) campione cotto a vapore.

In tabella 3.10 sono riportati i tempi di ritenzione, i parametri UV-Vis ed i dati relativi alle analisi APCI-MS/MS in modalità positiva (ione molecolare protonato e ioni figlio) utilizzati per l'identificazione dei picchi cromatografici. I numeri relativi ad ogni picco si riferiscono ai segnali identificati, per le zucche Delica e Violina, riportati nelle figure 3.7 e 3.8.

Generalmente gli spettri UV-Vis dei carotenoidi presentano tre massimi relativi di assorbimento (si vedano a titolo esemplificativo i due spettri di assorbimento riportati in figura 3.9) e le lunghezze d'onda dei picchi cromatografici registrati sono riportate nella quarta colonna della tabella 3.10. Il parametro % III/II, riportato nella quinta colonna della tabella, corrisponde invece al rapporto tra l'altezza del picco di assorbimento a lunghezza d'onda maggiore (indicato



**Figura 3.8:** Cromatogrammi HPLC-UV/Vis relativi agli estratti di zucca Violina di Massenzatica: (a) campione crudo, (b) campione cotto al forno, (c) campione cotto a vapore.



**Figura 3.9:** Spettro di assorbimento UV/Vis di luteina (a) e  $\beta$ -carotene (b) in un campione di zucca Delica.

con III) e quello del picco di assorbimento a lunghezza d'onda intermedia (indicato con II), prendendo il minimo tra i due picchi come linea di base [93]. Tale parametro è caratteristico di ogni composto ed unitamente alle tre lunghezze d'onda, è utile per l'identificazione dei carotenoidi.

Nei cromatogrammi registrati si identificano chiaramente due diversi gruppi di picchi: al primo gruppo appartengono epossidi ed idrossi-carotenoidi, mentre al secondo i caroteni non polari. L'utilizzo di standard analitici ha permesso l'assegnazione del picco 5 alla luteina e del picco 11 al  $\beta$ -carotene. I parametri UV-Vis e APCI hanno permesso invece l'identificazione provvisoria di altri cinque degli undici picchi cromatografici, mentre per il picco numero 3 l'identificazione proposta si basa sul solo confronto tra i dati spettrofotometrici e riferimenti bibliografici poiché gli spettri MS/MS ottenuti non erano chiari.

Picco	$t_R$	Composto	$\lambda_{max}$	% III/II	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Ioni frammento (m/z)
1	12,08	violaxantina	418, 442, 470	87	601	534, 583, 429
2	13,83	astaxantina	418, 442, 470	82	597	579, 285, 379
3	15,00	anteraxantina	426, 448, 474	27		
4	17,61	zeaxantina	422, 447, 476	53	569	551, 489, 477, 416
5	18,54	luteina	422, 446, 474	53	569	495, 459, 430, 477
6	37,15	licopene	419, 442, 470	72	537	457, 413, 177
7	38,85		420, 442, 470	58		
8	40,20		422, 446, 474	54		
9	41,54		422, 446, 474	53		
10	42,18	$\alpha$ -carotene	422, 446, 474	51	537	457, 413, 177
11	42,85	$\beta$ -carotene	425, 452, 477	18	537	457, 445, 413, 400, 269, 177

**Tabella 3.10:** Parametri cromatografici, spettroscopici e APCI-MS/MS con rispettivi tentativi di identificazione dei carotenoidi, in riferimento ai picchi cromatografici registrati.

Il picco 4 presenta un'intensità estremamente ridotta nel cromatogramma della zucca Violina (*C. moschata*), rendendone quindi impossibile la quantificazione, mentre è più abbondante nella varietà Delica (*C. maxima*); un andamento opposto si verifica invece per il picco 1. Il confronto con dati presenti in letteratura e relativi a studi effettuati su simili varietà di zucca, permette di ipotizzare che il segnale del picco 1 sia attribuibile alla violaxantina ed il picco 4 alla zeaxantina. Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya [94] non identificano la violaxantina nella *C. moschata* Menina Brasileira, mentre Provesi et al. [95] identificano il segnale sia nella *C. moschata* Menina Brasileira che nella *C. maxima* Expositica, anche se la quantificazione è minore nella prima rispetto alla seconda. Il picco 10 è chiaramente presente nel profilo cromatografico della zucca Violina mentre non può essere evidenziato in quello della Delica. Tale evidenza sperimentale è confermata anche da dati di letteratura che mostrano come l' $\alpha$ -carotene sia assente o presente in concentrazioni estremamente basse nella varietà *C. maxima*. Per questo segnale, i parametri  $\lambda_{max}$  e % III/II registrati, sono estremamente simili a valori tabulati e si può quindi ipotizzare che corrisponda all' $\alpha$ -carotene [95] [96].

### 3.5 Quantificazione dei carotenoidi nei campioni di zucca cruda e cotta

I carotenoidi identificati nei campioni di zucca Delica e Violina sono stati quantificati applicando un metodo di calibrazione con standard esterno (luteina e  $\beta$ -carotene), costruendo le opportune rette di calibrazione area vs concentrazione a regressione lineare (i coefficienti di correlazione erano superiori a 0,995 in entrambi i casi). I dati ottenuti non sono in pieno accordo con quelli riportati in studi già pubblicati, che sono però relativi a zucche delle stesse varietà ma di cultivar diverse. In tabella 3.11 sono riportati i dati relativi sia alla quantificazione assoluta, relativa alla retta della luteina per il primo gruppo di picchi cromatografici (picchi

1-5) ed alla retta del  $\beta$ -carotene per il secondo (picchi 6-11), sia alla quantificazione relativa espressa in termini di area percentuale dei picchi.

Picco	Quantificazione assoluta		Quantificazione relativa	
	Delica ( <i>C. maxima</i> )	Violina ( <i>C. moschata</i> )	Delica ( <i>C. maxima</i> )	Violina ( <i>C. moschata</i> )
violaxantina	9,09±0,99	10,53±0,96	7,24±0,42	24,72±1,04
astaxantina	2,54±0,39	1,18±0,06	1,70±0,04	1,73±0,10
anteraxantina	4,34±0,74	1,73±0,14	3,21±0,07	3,08±0,09
zeaxantina	16,99±3,08	nd	13,83±0,21	nd
luteina	37,12±0,08	10,30±1,01	30,74±0,10	24,12±0,65
licopene	19,25±2,69	6,44±0,24	5,08±0,03	2,38±0,09
7	17,79±2,42	7,55±0,30	4,58±0,03	3,49±0,18
8	38,73±6,09	6,89±0,40	11,71±0,06	2,82±0,02
9	23,66±3,28	6,39±0,61	6,59±0,02	2,31±0,29
$\alpha$ -carotene	nd	17,56±2,26	nd	13,40±0,41
$\beta$ -carotene	49,29±3,78	26,22±2,23	15,32±0,058	21,95±1,44

**Tabella 3.11:** Quantificazione dei picchi cromatografici identificati e non nei campioni di zucca Delica e Violina. Per ogni picco è riportata sia la quantificazione assoluta ( $\mu\text{g/g}$  di sostanza fresca), facendo riferimento alla curva di calibrazione con standard esterno rispettivamente di luteina (picchi 1-5) e  $\beta$ -carotene (picchi 6-11), sia la quantificazione relativa in termini di area %. Per i picchi la cui quantificazione non è stata possibile perché non presenti è riportata la sigla nd.

Uno studio di Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya [94] determina concentrazioni di all-*trans*- $\beta$ -carotene pari a  $66,7\pm 9,1 \mu\text{g/g}$  di sostanza fresca in campioni di *C. moschata* Menina Brasileira e pari a  $15,4\pm 4,2 \mu\text{g/g}$  di sostanza fresca per zucche *C. maxima* Expositao. Anche i valori relativi alla luteina erano leggermente più alti per la prima rispetto alla seconda, nello specifico  $17,4\pm 3,5$  vs  $10,7\pm 3,9 \mu\text{g/g}$  di sostanza fresca. Al contrario, esistono altre testimonianze che registrano valori di luteina maggiori nella *C. maxima* Expositao rispetto alla *C. moschata* Menina Brasileira ( $10,43\pm 0,13$  vs  $0,59\pm 0,18 \mu\text{g/g}$  di sostanza fresca), mentre le concentrazioni per all-*trans*- $\beta$ -carotene sono simili tra le due varietà ma inferiori a quelle riportate nel lavoro sopracitato [95]. I dati ottenuti dalle analisi relative alle zucche provenienti da Massenzatica sono in accordo con l'ultimo studio citato per quanto riguarda la concentrazione di luteina, che per la Delica è maggiore e pari a  $37,12\pm 0,08 \mu\text{g/g}$  di sostanza fresca rispetto a  $10,30\pm 1,01$  per la Violina. Per il  $\beta$ -carotene si registrano invece valori più elevati per la varietà Delica rispetto alla Violina ( $49,29\pm 3,78$  vs  $26,22\pm 2,23 \mu\text{g/g}$  di sostanza fresca).

Sono diversi i fattori che possono essere responsabili delle differenti concentrazioni rilevate. Il clima, ad esempio, esercita un'influenza particolarmente significativa sul contenuto in carotenoidi nelle verdure; frutti delle stesse cultivar ma prodotti in diverse regioni possono presentare concentrazioni maggiori o minori in relazione a climi più caldi o più temperati. Ciò è probabilmente riconducibile all'aumento della carotenogenesi quando i frutti sono esposti per più tempo e/o più direttamente alla luce solare, anche se questa in alcuni casi può causare fotodegradazione.

La zucca è un alimento che viene consumato previa cottura ed è stato perciò opportuno valutare la variazione del contenuto in carotenoidi in seguito a due tra le tipologie di cottura più frequentemente utilizzate. Un approccio di questo tipo rende possibile una considerazione sull'effettivo apporto di carotenoidi attraverso la dieta. Come specificato nella sezione 5.5.2, sono state eseguite una cottura al forno ed una cottura al vapore, per entrambe le varietà di zucca considerate: la temperatura è il solo parametro variabile ( $200 \text{ }^\circ\text{C}$  vs  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ), mentre il tempo di cottura è pari a 20 minuti in entrambi i casi. Osservando i cromatogrammi (figure 3.7 e 3.8) si evince che nessuna sostanza viene degradata completamente, alcuni picchi risultano meno intensi, ma vengono mantenuti gli stessi tempi di ritenzione e si identificano gli stessi composti presenti nei campioni di zucca cruda. Le quantificazioni sono state eseguite sui

campioni di sostanza fresca cotta e sono riportate in tabella 3.12.

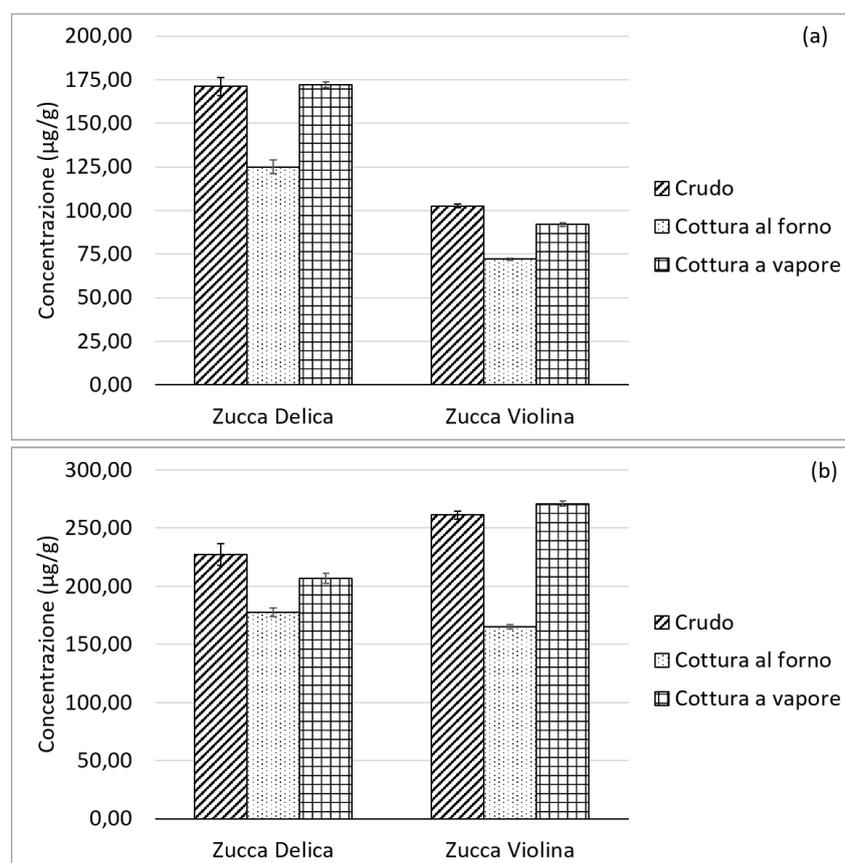
	Zucca Delica		Zucca Violina	
	Luteina	$\beta$ -carotene	Luteina	$\beta$ -carotene
Cottura al forno	41,18±1,39	58,46±1,85	11,22±0,08	25,71±2,36
Cottura a vapore	39,09±0,35	47,00±3,06	10,86±0,23	31,99±0,48

**Tabella 3.12:** Quantificazione di luteina e  $\beta$ -carotene nei campioni di zucca cotti. I dati sono riportati come  $\mu\text{g/g}$  di sostanza fresca e sono espressi come media±deviazione standard.

Le due cotture provocano tuttavia una differente perdita di umidità e, per assicurare un esatto confronto tra i dati ottenuti, è stato effettuato il calcolo sulla sostanza secca sia per i campioni crudi sia per quelli cotti. Per tale motivo, i risultati in tabella 3.13 sono espressi come  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca.

	Zucca Delica		Zucca Violina	
	Luteina	$\beta$ -carotene	Luteina	$\beta$ -carotene
Crudo	171,08±5,23	227,16±9,26	102,55±1,01	261,13±3,55
Cottura al forno	125,04±4,03	177,53±3,63	72,14±0,54	165,33±1,85
Cottura a vapore	172,00±1,54	206,77±4,36	91,97±0,92	271,02±2,10

**Tabella 3.13:** Quantificazione di luteina e  $\beta$ -carotene nei campioni di zucca crudi e cotti. I dati sono riportati come  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca e sono espressi come media±deviazione standard.



**Figura 3.10:** Concentrazione di luteina (a) e  $\beta$ -carotene (b) nei campioni di zucca crudi e cotti. I dati sono riportati come  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca e sono espressi come media±deviazione standard.

Negli istogrammi riportati in figura 3.10 e relativi ai dati della tabella 3.13, si può notare come la perdita percentuale per luteina e  $\beta$ -carotene risulta inferiore al 10% nelle zucche cotte a vapore, mentre è prossima al 30% nelle zucche cotte al forno. La cottura al vapore si delinea quindi come il metodo ottimale per il mantenimento dei livelli dei carotenoidi analizzati e ciò è probabilmente dovuto al minore shock termico subito rispetto alla cottura in forno. Esistono riferimenti in letteratura che evidenziano una parziale degradazione dei carotenoidi durante la cottura, con conseguente diminuzione della concentrazione di tali composti [97]. L'aumento di temperatura dovrebbe tuttavia allentare le fibre leganti i carotenoidi e promuovere meccanismi di migrazione degli stessi all'interno di micelle, aumentandone la biodisponibilità. Si deve quindi sempre valutare il composto considerato in relazione alla matrice analizzata ed al metodo di cottura a cui questa viene sottoposta.

### 3.6 Bioaccessibilità dei carotenoidi

L'assorbimento delle molecole idrofobe è correlato al rilascio efficace dalla matrice alimentare e dalla successiva solubilizzazione da parte degli acidi biliari e degli enzimi digestivi, terminando con la loro incorporazione in micelle miste. Lo studio dei cambiamenti strutturali, delle modificazioni, della digeribilità e del rilascio dei componenti durante la digestione è possibile grazie a modelli di digestione *in vitro* statici o dinamici (si veda la sezione 1.6). La digestione dinamica *in vitro*, simulando la velocità di svuotamento gastrico, i movimenti peristaltici, le variazioni graduali del pH ed il tempo di transito attraverso l'intestino, è sicuramente la tecnica che più si avvicina alle condizioni *in vivo*. Un modello di questo tipo richiede però una strumentazione costosa ed impegnativa dal punto di vista dei software di controllo ed i tempi di analisi sono elevati poiché non è possibile studiare più campioni contemporaneamente. La digestione statica *in vitro* si presenta invece come un modello più flessibile e meno costoso; è particolarmente indicato quando si deve studiare un numero elevato di campioni e/o diverse matrici oppure per valutare le condizioni sperimentali. Questi modelli permettono il campionamento dei fluidi gastrointestinali simulati ad ogni step della digestione (bocca, stomaco, intestino, colon) e possono essere accoppiati a modelli di studio del trasporto transepiteliale (ad esempio: caco-2 cell model).

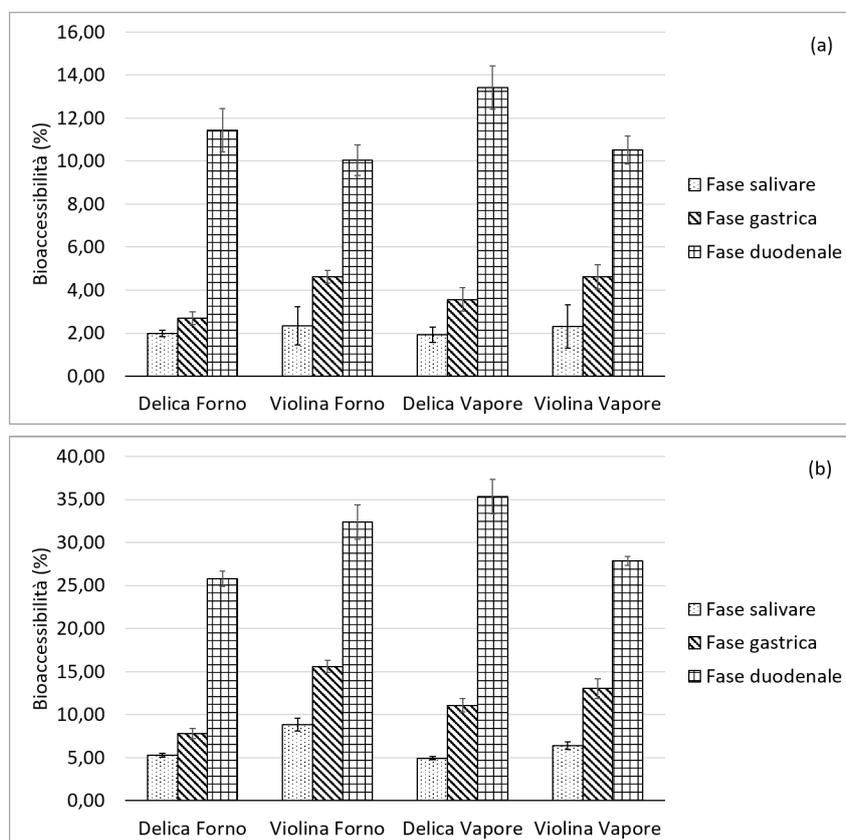
Per entrambi i casi, l'analisi di composti lipofili richiede un passaggio aggiuntivo, necessario per la separazione della frazione micellare prima di procedere con l'indagine: ultracentrifugazione per il modello statico, filtrazione o impiego di una membrana per il modello dinamico. Per una corretta stima della bioaccessibilità è necessaria una determinazione quantitativa dei carotenoidi nella matrice originaria. A tale scopo, la bioaccessibilità viene calcolata come percentuale delle quantità presenti negli estratti esaustivi di campione fresco, per ciascuna varietà di zucca e ciascun metodo di cottura considerati (fare riferimento alle tabelle 3.11, 3.12 e 3.13). I risultati della bioaccessibilità di luteina e  $\beta$ -carotene per i campioni cotti al forno e cotti a vapore e per ciascuna cultivar sono specificati nelle tabelle 3.14 e 3.15 e riportati in figura 3.11. I campioni sono stati sottoposti a digestione simulata attraverso i passaggi salivare, gastrico e duodenale, seguendo le metodiche descritte nelle sezioni 5.6 e 5.6.1.

	Delica Forno	Violina Forno	Delica Vapore	Violina Vapore
<b>Fase salivare</b>	1,99±0,15	2,34±0,90	1,93±0,35	2,31±1,00
<b>Fase gastrica</b>	2,70±0,30	4,63±0,30	3,57±0,55	4,62±0,55
<b>Fase duodenale</b>	11,43±1,00	10,04±0,70	13,42±1,00	10,51±0,65

**Tabella 3.14:** Bioaccessibilità % della luteina nei campioni di zucca cotti. I risultati sono espressi come media±deviazione standard di 5 analisi ripetute.

	Delica Forno	Violina Forno	Delica Vapore	Violina Vapore
<b>Fase salivare</b>	5,29±0,19	8,83±0,75	4,94±0,18	6,40±0,45
<b>Fase gastrica</b>	7,83±0,60	15,6±0,70	11,09±0,75	13,03±1,17
<b>Fase duodenale</b>	25,81±0,88	32,41±2,00	35,32±1,97	27,85±0,50

**Tabella 3.15:** Bioaccessibilità % del  $\beta$ -carotene nei campioni di zucca cotti. I risultati sono espressi come media±deviazione standard di 5 analisi ripetute.



**Figura 3.11:** Bioaccessibilità % di luteina (a) e  $\beta$ -carotene (b) nei campioni di zucca cotti. I risultati sono espressi come media±deviazione standard di 5 analisi ripetute.

La bioaccessibilità di luteina e  $\beta$ -carotene presenta un incremento progressivo dalla fase salivare a quella duodenale per entrambe le varietà di zucca e per entrambi i metodi di cottura eseguiti. Nello specifico, la bioaccessibilità della luteina risulta sempre inferiore a quella del  $\beta$ -carotene e tale evidenza sperimentale non è riconducibile al minor contenuto nella matrice iniziale bensì a fattori che influenzano il rilascio stesso di tale composto dalla matrice. I valori di bioaccessibilità nella fase salivare sono simili per la luteina, con un valore medio del 2,10% (spaziando da un valore minimo di 1,93% ad un massimo di 2,34%), mentre per il  $\beta$ -carotene risultano eterogenei, con valori compresi tra 4,94% e 8,83%. Entrambi i composti, in questa prima fase considerata, risultano meno bioaccessibili per la zucca Delica rispetto alla Violina, indipendentemente dal metodo di cottura. Nella fase gastrica i dati relativi alla luteina sono simili ed inferiori al valore del 5%, con un intervallo compreso tra 2,70% e 4,63%, mentre per il  $\beta$ -carotene non si individua un valore medio poiché i dati sono compresi tra un minimo di 7,83% ed un massimo di 15,60%. Anche questo caso, le concentrazioni sono maggiori per la varietà Violina, sia per la cottura al forno, sia per quella al vapore. Nella fase duodenale, la bioaccessibilità della luteina è compresa tra 10,04% e 13,42%, il  $\beta$ -carotene invece tra 25,81% e

35,32%.

Effettuando il calcolo della differenza tra i valori di bioaccessibilità delle fasi gastrica e salivare, si può notare come il valore sia circa pari a 2 per la luteina e a 6 per il  $\beta$ -carotene (per entrambe le molecole, il dato è inferiore per la zucca Delica cotta al forno). Svolgendo il medesimo calcolo tra le altre due fasi, è interessante notare come la bioaccessibilità nella fase duodenale sia maggiore del doppio rispetto a quella gastrica: il valore più elevato è circa 10 per la luteina e prossimo a 25 per il  $\beta$ -carotene.

	Luteina		$\beta$ -carotene	
	$\Delta$ salivare-gastrica	$\Delta$ gastrica-duodenale	$\Delta$ salivare-gastrica	$\Delta$ gastrica-duodenale
<b>Delica Forno</b>	0,71	8,73	2,54	17,98
<b>Violina Forno</b>	2,29	5,41	6,77	16,81
<b>Delica Vapore</b>	1,64	9,85	6,15	24,23
<b>Violina Vapore</b>	2,31	5,89	6,63	14,82

**Tabella 3.16:** Calcolo della differenza tra i valori delle fasi salivare - gastrica e gastrica - duodenale, per entrambe le varietà di zucca ed i metodi di cottura.

Analizzando complessivamente i risultati ottenuti, si può affermare che il rilascio di luteina e  $\beta$ -carotene è maggiore durante la fase duodenale e che il metodo di cottura seguito non influenza in modo particolarmente significativo il rilascio di carotenoidi dalla matrice originaria.

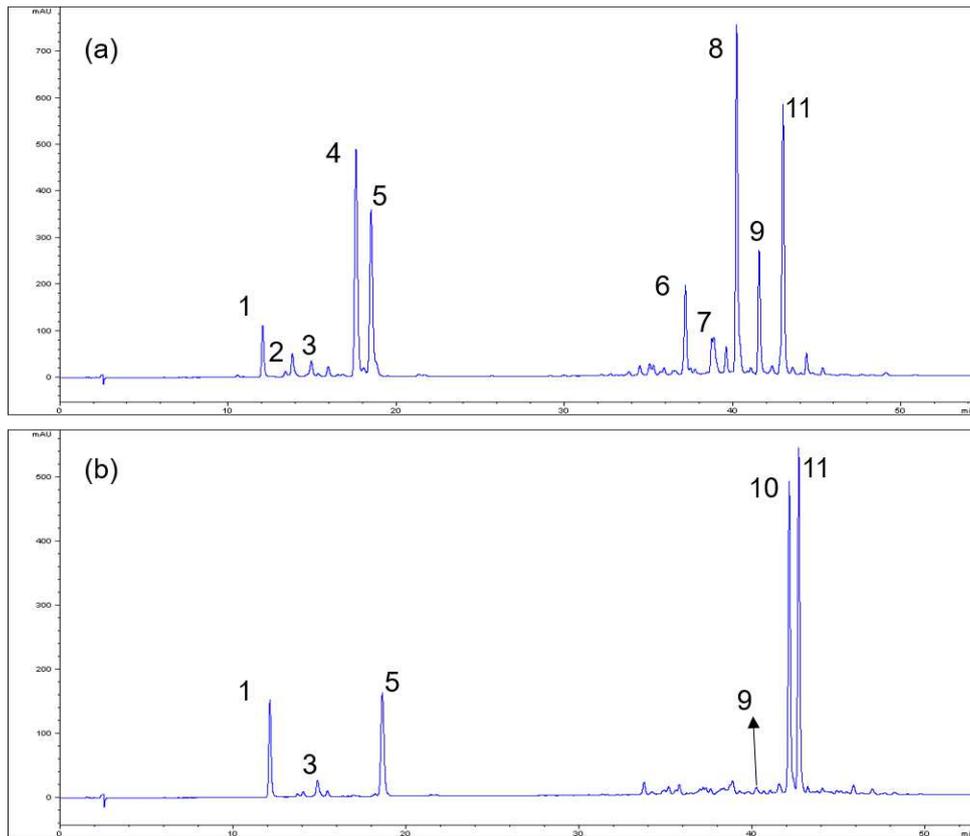
### 3.7 Confronto del contenuto in carotenoidi tra le zucche coltivate a Massenzatica e Sermide

L'identificazione dei picchi cromatografici ha permesso di effettuare un confronto, in modo analogo a quanto fatto per le analisi bromatologiche, tra le zucche di entrambe le varietà coltivate a Massenzatica e Sermide (in figura 3.12 sono riportati i cromatogrammi relativi alle zucche di Sermide, per quelle di Massenzatica si veda la sezione 3.4, figure 3.7 e 3.8).

Per la zucca Delica non si riscontrano differenze qualitative: si identificano gli stessi carotenoidi e si conferma l'assenza dell' $\alpha$ -carotene. L'analisi del profilo cromatografico della Violina di Sermide, mette in evidenza come per il gruppo delle xantofille siano presenti 3 picchi sui 5 identificati e si conferma l'assenza della zeaxantina; per il gruppo dei caroteni sono presenti 3 picchi sui 6 assegnati e si registra quindi l'assenza del licopene, del picco 7 e del picco 8. Nelle tabella 3.17 sono riportate le quantificazioni assolute.

È interessante notare come per la varietà Delica, le concentrazioni dei carotenoidi identificati siano utili, ad eccezione di astaxantina, zeaxantina e licopene, per una differenziazione in relazione al territorio di coltivazione. Si sottolinea inoltre una maggiore concentrazione di luteina e  $\beta$ -carotene nei campioni di zucca Delica provenienti da Massenzatica rispetto a quelli di Sermide ( $37,12 \pm 3,08$  vs  $16,73 \pm 3,19$   $\mu\text{g/g}$  di sostanza fresca e  $49,29 \pm 3,78$  vs  $32,43 \pm 2,38$   $\mu\text{g/g}$  di sostanza fresca, rispettivamente). Per la distinzione delle zucche della varietà Violina di Massenzatica e Sermide, non risultano statisticamente significative le concentrazioni di anteraxantina, luteina e del picco 9. La presenza dell' $\alpha$ -carotene viene confermata come caratteristica di questa varietà rispetto alla Delica e le concentrazioni risultano maggiori nelle zucche di Sermide rispetto a quelle di Massenzatica ( $36,65 \pm 3,37$  vs  $17,56 \pm 2,26$   $\mu\text{g/g}$  di sostanza fresca). Anche il  $\beta$ -carotene è presente in maggiori quantità nelle zucche Violina di Sermide rispetto a quelle di Massenzatica con valori pari a  $39,44 \pm 3,75$  vs  $26,22 \pm 2,23$   $\mu\text{g/g}$  di sostanza fresca.

Analizzando globalmente i risultati relativi ai carotenoidi identificati e quantificati nelle zucche



**Figura 3.12:** Cromatogrammi HPLC-UV/Vis relativi agli estratti di zucca di Sermide: (a) campione Delica, (b) campione Violina.

di diversa provenienza, indipendentemente dalla varietà considerata, violaxantina, il picco 7, il picco 8,  $\alpha$ -carotene e  $\beta$ -carotene, possono essere considerati marker identificativi per questa matrice alimentare e per eventuali prodotti trasformati.

Picco	DM	DS	VM	VS
Violaxantina	9,09±0,99 <sup>a</sup>	2,70±0,40 <sup>a</sup>	10,53±0,96 <sup>a</sup>	4,34±0,52 <sup>a</sup>
Astaxantina	2,54±0,39	2,47±0,56	1,18±0,06 <sup>a</sup>	nd
Anteraxantina	4,34±0,74 <sup>a</sup>	1,91±0,32 <sup>a</sup>	1,73±0,14	1,63±0,41
Zeaxantina	16,99±3,08	23,25±2,58	nd	nd
Luteina	37,12±3,08 <sup>a</sup>	16,73±3,19 <sup>a</sup>	10,30±1,01	7,46±1,15
Licopene	19,25±2,69	15,42±1,96	6,44±0,24 <sup>a</sup>	nd
7	17,79±2,42 <sup>a</sup>	10,33±1,01 <sup>a</sup>	7,55±0,30 <sup>a</sup>	nd
8	38,73±6,09 <sup>a</sup>	43,73±6,30 <sup>a</sup>	6,89±0,40 <sup>a</sup>	nd
9	23,66±3,28 <sup>a</sup>	18,50±1,28 <sup>a</sup>	6,39±0,61	6,06±0,26
$\alpha$ -carotene	nd	nd	17,56±2,26 <sup>a</sup>	36,65±3,37 <sup>a</sup>
$\beta$ -carotene	49,29±3,78 <sup>a</sup>	32,43±2,38 <sup>a</sup>	26,22±2,23 <sup>a</sup>	39,44±3,75 <sup>a</sup>

**Tabella 3.17:** Quantificazione dei picchi cromatografici identificati e non nei campioni di zucca Delica e Violina rispettivamente di Massenzatica e Sermide. Per ogni picco è riportata la quantificazione assoluta ( $\mu\text{g/g}$  di sostanza fresca), facendo riferimento alla curva di calibrazione con standard esterno rispettivamente di luteina (picchi 1-5) e  $\beta$ -carotene (picchi 6-11). Per i picchi la cui quantificazione non è stata possibile perché non presenti è riportata la sigla nd. I risultati sono espressi come media±deviazione standard ottenuti nelle annate 2016 e 2017. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: DM (zucca Delica di Massenzatica), DS (zucca Delica di Sermide), VM (zucca Violina di Massenzatica), VS (zucca Violina di Sermide). L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra i campioni di Massenzatica ed i campioni di Sermide ( $p < 0,05$ ).

## 4 | Risultati e discussione radicchio

### 4.1 Campionamento

La ricerca è stata svolta su due tipologie di radicchio rosso (*Cichorium intybus*) coltivate a Massenzatica: il radicchio rosso lungo e il radicchio rosso tondo. Come per il progetto riguardante la zucca, sono state considerate tre annate successive, in modo tale da monitorare i parametri analizzati in modo continuo nel tempo e poiché il radicchio è una pianta annuale, sono state considerati varie raccolte per ogni annata. Nello specifico i campionamenti per entrambe le varietà, svolti su opportuni campi sperimentali predisposti dal CUM, sono stati eseguiti nelle annate 2015/2016, 2016/2017 e 2017/2018. Nella tabella 4.1 sono specificati i momenti di raccolta per varietà, anno e mese con le relative sigle identificative. La sigla generale nelle lettere "T" e "L" fa riferimento alle tipologie tondo e lungo, mentre nelle successive lettere "MM" alla provenienza del seme (Massenzatica) ed al terreno di coltivazione (Massenzatica).

I campioni sono stati prelevati in campo con modalità random in numero variabile in funzione delle dimensioni del campo. Da ogni lotto (lavorato al massimo entro tre giorni dalla raccolta) si prelevano 15 caspi che, privati delle foglie esterne e della parte del fittone rimasta dopo la raccolta, vengono tagliati in quattro parti (figura 4.1). Vengono quindi preparati due sottocampioni identici tra loro costituiti entrambi da un quarto di ogni singolo caspo; i quarti vengono tagliati a listarelle, mescolati, riposti in un sacchetto e conservati in freezer a -20 °C fino al momento delle analisi.

### 4.2 Analisi bromatologiche

Lo studio delle caratteristiche nutrizionali delle due tipologie di radicchio, autoprodotte a Massenzatica, ha previsto lo svolgimento delle analisi bromatologiche su tutti i campioni di ogni

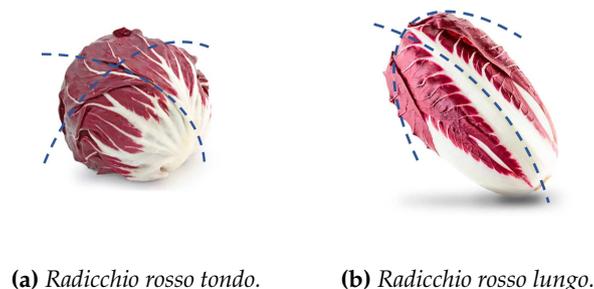


Figura 4.1: Campionamento del radicchio.

Campione	Annata	Mese raccolta	Sigla specifica	Sigla generale
Radicchio Tondo	2015/2016	Novembre	TMM1	TMM
		Dicembre	TMM2	
		Febbraio	TMM3	
	2016/2017	Novembre	TMM4	
		Dicembre	TMM5	
		Febbraio	TMM6	
	2017/2018	Novembre	TMM7	
		Dicembre	TMM8	
		Febbraio	TMM9	
Radicchio Lungo	2015/2016	Novembre	LMM1	LMM
		Dicembre	LMM2	
	2016/2017	Novembre	LMM3	
		Dicembre	LMM4	
		Maggio	LMM5	
	2017/2018	Novembre	LMM6	
		Dicembre	LMM7	

**Tabella 4.1:** Elenco dei campioni di radicchio rosso coltivati a Massenzatica (FE).

annata, in modo tale da poter disporre di dati medi da mettere in relazione con i parametri climatici che hanno influenza sulle produzioni vegetali (radiazione solare, temperatura, umidità, precipitazioni e vento).

Sono stati valutati in primo luogo il contenuto di umidità, il contenuto proteico totale e la frazione minerale totale, che oltre ad essere dati indispensabili per l'etichetta nutrizionale, sono correlati al terreno ed alla pratica agronomica. È stata inoltre determinata la percentuale di lipidi ma non è stata effettuata la caratterizzazione del profilo in acidi grassi dal momento che il contenuto di lipidi è estremamente basso.

Nelle tabelle che vengono di seguito proposte sono quindi riportati i dati medi delle tre annate, per le quali le analisi sono state svolte in triplicato per ogni mese di raccolta.

I dati di tutte le analisi sono rielaborati usando il programma IBM SPSS Statistics® mediante ANOVA ad una via per valutare se vi siano differenze significative ( $p < 0,05$ ) tra le differenti tipologie di radicchio, a parità del territorio di coltivazione.

Campione	Umidità (g\100 g di s. fresca)	Proteine	Ceneri	Lipidi (g\100 g di s. secca)	Fibra Totale	Carboidrati
TMM	92,35±0,26 <sup>a</sup>	15,76±2,05 <sup>a</sup>	10,94±0,74 <sup>a</sup>	1,14±0,06 <sup>a</sup>	32,92±1,92	39,24±3,52 <sup>a</sup>
LMM	93,08±0,08 <sup>a</sup>	21,27±1,75 <sup>a</sup>	13,09±0,80 <sup>a</sup>	0,82±0,10 <sup>a</sup>	34,16±1,63	30,66±0,53 <sup>a</sup>

**Tabella 4.2:** Caratterizzazione bromatologica dei campioni di radicchio tondo e lungo di Massenzatica (TMM e LMM, rispettivamente). I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2015/2016, 2016/2017 e 2017/2018. I carboidrati totali (g/100 g di sostanza secca) sono calcolati per differenza rispetto ai dati di proteine, ceneri, lipidi e fibra totale. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie ( $p < 0,05$ ).

I dati riportati (tabella 4.2) sottolineano come le foglie di radicchio, indifferentemente dalla tipologia considerata, contengano più del 90% di acqua e quantità di grassi trascurabili. Il contenuto proteico è pari al 15,76% per il radicchio tondo e 21,27% per quello lungo, mentre

il contenuto percentuale in ceneri è inferiore al 15% per entrambi gli ecotipi. Il contenuto in fibra dietetica totale è comparabile tra il radicchio tondo e lungo, con un valore medio prossimo al 33% su sostanza secca mentre i carboidrati, calcolati per differenza, sono maggiori nella tipologia a foglia tonda rispetto a quella a foglia lunga ( $39,24 \pm 1,92$  vs  $30,66 \pm 0,53$  g/100 g di sostanza secca).

I dati di queste analisi si rivelano utili, ad eccezione del valore di fibra totale che non riporta infatti l'apice a, per una distinzione dei campioni in relazione alla tipologia poiché risultano statisticamente significativi.

Il consumo di radicchio viene incentivato anche in relazione al suo contenuto in macro ed oligoelementi: i dati ottenuti (tabelle 4.3 e 4.4) confermano come il minerale presente in maggiore concentrazione sia il potassio, con un valore pari a 41,29 e 47,81 mg/g di sostanza secca rispettivamente per il radicchio tondo e lungo, seguito dal calcio con valori compresi tra 3,37 mg/g di sostanza secca per il radicchio tondo e 4,32 mg/g per il radicchio lungo. Questo ortaggio si rivela inoltre povero di sodio, con concentrazioni inferiori a 1,00 mg/g di sostanza secca. Si sottolinea inoltre la concentrazione di ferro compresa tra 38,97 e 51,10  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca nel radicchio tondo e lungo, rispettivamente. Le concentrazioni degli altri tre oligoelementi analizzati sono inferiori ai 25,00  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca e, nello specifico, le concentrazioni maggiori si registrano sempre nel radicchio lungo (14,50  $\mu\text{g/g}$  per il rame, 24,05  $\mu\text{g/g}$  per lo zinco e 20,60  $\mu\text{g/g}$  per il manganese). Dal punto di vista statistico, le concentrazioni di calcio, sodio, magnesio, rame e manganese possono essere utilizzate per distinguere i campioni di radicchio tondo da quelli di radicchio lungo, coltivati nel territorio di Massenzatica.

Campione	Calcio (mg/g s.s.)	Sodio (mg/g s.s.)	Potassio (mg/g s.s.)	Magnesio (mg/g s.s.)
TMM	$3,37 \pm 0,42^a$	$0,55 \pm 0,18^a$	$41,29 \pm 8,23$	$1,44 \pm 0,27^a$
LMM	$4,32 \pm 0,54^a$	$0,99 \pm 0,13^a$	$47,81 \pm 9,14$	$1,75 \pm 0,02^a$

**Tabella 4.3:** Contenuto di macroelementi (mg/g di sostanza secca) nel radicchio tondo e lungo di Massenzatica (TMM e LMM, rispettivamente). I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2015/2016, 2016/2017 e 2017/2018. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie ( $p < 0,05$ ).

Campione	Ferro ( $\mu\text{g/g}$ s.s.)	Rame ( $\mu\text{g/g}$ s.s.)	Zinco ( $\mu\text{g/g}$ s.s.)	Manganese ( $\mu\text{g/g}$ s.s.)
TMM	$38,97 \pm 9,30$	$9,25 \pm 0,32^a$	$18,34 \pm 1,96$	$13,78 \pm 2,93^a$
LMM	$51,10 \pm 8,19$	$14,50 \pm 3,16^a$	$24,05 \pm 2,96$	$20,60 \pm 0,49^a$

**Tabella 4.4:** Contenuto di oligoelementi ( $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca) nel radicchio tondo e lungo di Massenzatica (TMM e LMM, rispettivamente). I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2015/2016, 2016/2017 e 2017/2018. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie ( $p < 0,05$ ).

In tabella 4.5 sono mostrati i dati relativi alle analisi del contenuto di fibra espresso come percentuale su sostanza secca, dove la quantità di fibra totale si ottiene dalla somma della fibra solubile ed insolubile. Si può notare come i dati tra le due tipologie di radicchio siano estremamente omogenei sia nel valore di fibra totale, sia nelle frazioni di fibra solubile ed insolubile e quindi non rilevanti dal punto di vista statistico per la loro identificazione. Per questo ortaggio, il valore di fibra insolubile è maggiore rispetto alla solubile e ciò attribuisce al radicchio la funzione di regolatore intestinale. Dati di letteratura sottolineano come la frazione fibrosa del radicchio sia ricca in inulina, la quale attribuisce a questo vegetale funzionalità prebiotica [98].

Campione	Fibra Totale (% s.s.)	Fibra Solubile (% s.s.)	Fibra Insolubile (% s.s.)
TMM	32,92±1,92	11,63±1,11	21,29±1,49
LMM	34,16±1,63	10,99±2,19	23,17±0,57

**Tabella 4.5:** Contenuto di fibra (% su sostanza secca) nei campioni di radicchio tondo e lungo di Massenzatica (TMM e LMM, rispettivamente). I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2015/2016, 2016/2017 e 2017/2018. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 Analisi della componente antiossidante

Sugli estratti realizzati per valutare l'attività antiossidante dei campioni oggetto di studio, ottenuti come specificato nel paragrafo 5.3.1, è stato determinato il contenuto polifenolico totale (sezione 5.3.2), la capacità antiossidante mediante il saggio DPPH (sezione 5.3.3) ed il contenuto di antociani (sezione 5.3.4).

Riguardo il contenuto polifenolico totale non sono emerse differenze statisticamente significative tra le due tipologie analizzate anche se si registra un valore più alto per il radicchio tondo rispetto al lungo e tale differenza viene mantenuta anche per i valori relativi all'attività antiossidante. La quantificazione degli antociani si rivela invece utile per una differenziazione tra tondo e lungo coltivati a Massenzatica, per i quali sono stati registrati, rispettivamente, valori pari a 303,7 e 142,5  $\mu\text{g/g}$  cianidina-3-glucoside cloridrato su sostanza fresca.

Campione	Folin-Ciocalteu $\mu\text{g/g}$ catechina eq.	DPPH mM/g Trolox eq.	Antocianine $\mu\text{g/g}$ cianidina-3-glucoside cloridrato
TMM	1885±381	6,97±1,05	303,7±31,4 <sup>a</sup>
LMM	1416±232	5,47±0,43	142,5±20,1 <sup>a</sup>

**Tabella 4.6:** Contenuto di polifenoli totali (Folin-Ciocalteu), attività antiossidante (DPPH) e antocianine totali nei campioni di radicchio tondo e lungo di Massenzatica (TMM e LMM, rispettivamente). I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2015/2016, 2016/2017 e 2017/2018 e fanno riferimento ad analisi effettuate sulla matrice fresca. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie ( $p < 0,05$ ).

## 4.4 HPLC-MS/MS

### 4.4.1 Determinazione qualitativa del profilo fenolico

La completa caratterizzazione del profilo dei composti bioattivi negli alimenti e nello specifico dei polifenoli in ortaggi e frutta, è estremamente importante poiché è correlabile sia a deviazioni di tipo ambientale (condizioni pedoclimatiche, tecnica agronomica, maturazione) sia a differenze genetiche. La caratterizzazione delle principali varietà di cicoria e radicchio presenti sul mercato è stata eseguita con successo e queste informazioni bibliografiche rappresentano un valido sfondo per ulteriori confronti ed indagini [99] [100]. Uno degli scopi di questa tesi di dottorato è lo studio qualitativo del profilo polifenolico dei due ecotipi di radicchio, tondo e lungo, coltivati nel territorio di Massenzatica. Queste due tipologie sono simili a due cultivar affermate ed ampiamente presenti sul mercato (radicchio rosso di Chioggia e radicchio di Treviso precoce) ed una loro caratterizzazione può essere utile, unitamente ad altre indagini quali ad esempio lo studio genomico, per stabilire se effettivamente si tratti di singoli ecotipi. Tali informazioni possono rivelarsi utili al fine di intraprendere un *iter* per preservarne l'autenticità.

Lo studio qualitativo del profilo fenolico dei due ecotipi di radicchio è stato effettuato sugli estratti chimici ed enzimatici ottenuti come specificato nella sezioni 5.4.1, 5.4.2 e 5.4.3. Sulla

base dei più recenti riferimenti bibliografici, l'identificazione in massa dei composti bioattivi è stata effettuata mediante modalità ESI positiva e negativa [101] [102]. Le frammentazioni MS/MS già pubblicate e riguardanti le varietà di cicoria commerciali sono state utilizzate come riferimento per lo studio degli ioni figlio e/o per confermare la struttura chimica dei polifenoli nei campioni analizzati.

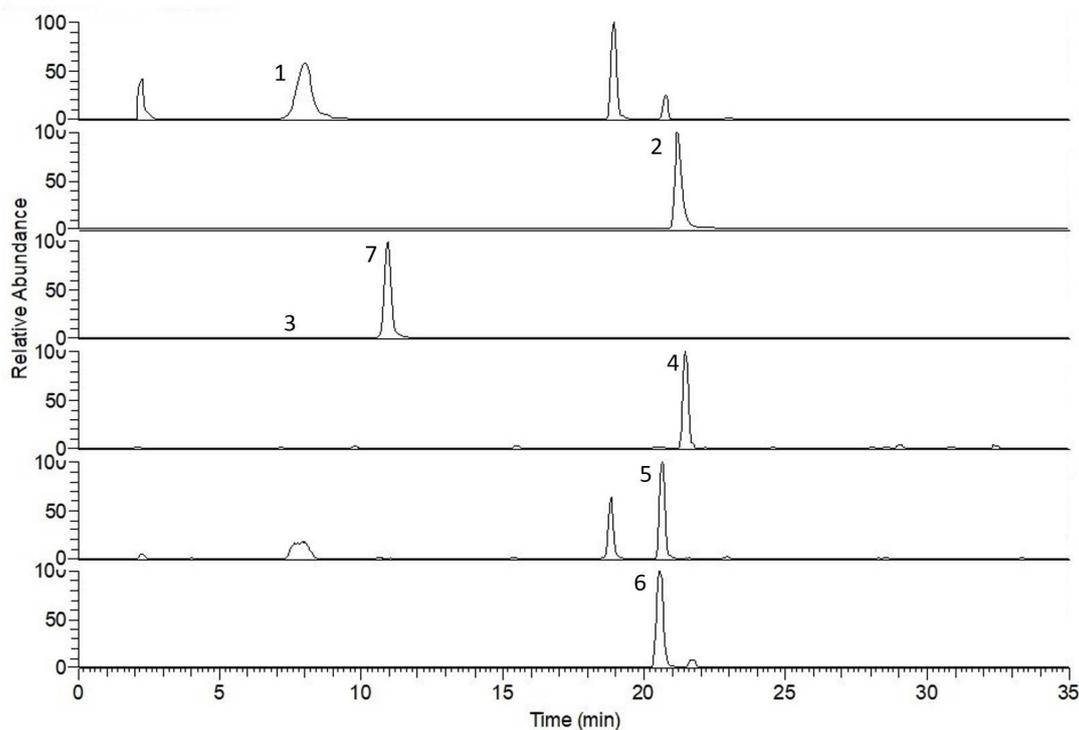
Sono stati identificati in totale 36 composti: 15 in modalità ESI positiva, riportati in tabella 4.7 e 21 in modalità ESI negativa, elencati in tabella 4.8. In entrambe le tabelle sono presentati i composti identificati mediante confronto degli spettri MS/MS e MS<sup>3</sup> degli ioni figlio caratteristici; in alcuni casi attraverso l'analisi degli spettri MS/MS di ulteriori frammenti di ioni precursori selezionati, è stato possibile confermare tentativi di identificazione per taluni composti. Tra gli acidi fenolici più semplici identificati (acido malico, caffeico, chinico e caftarico), tutti si presentano in forma glicosilata o di estere; i derivati acetile e malonile si delineano inoltre come i più diffusi. I derivati glicosilati sono stati riconosciuti dalla transizione MS/MS più intensa che è generalmente determinata dalla caratteristica perdita neutra della frazione glicosidica. Le frammentazioni tipiche dell'unità saccaridica coinvolta e/o la perdita di gruppi malonilici e acetilici, sono associate a picchi MS/MS meno intensi, che non sono tuttavia sempre presenti. In letteratura, la conferma degli agliconi isobarici è effettuata mediante l'analisi degli spettri MS<sup>3</sup>: in questo caso i frammenti MS<sup>3</sup> sono stati utilizzati per l'identificazione del kaempferolo, della cianidina (per entrambi è presente  $[M + H]^+ = 287$  m/z) e per l'isoramnetina ( $[M - H]^- = 315$  m/z) [103] [104]. L'aglicone dell'isoramnetina presenta la caratteristica perdita del gruppo metile sia in modalità ESI positiva che negativa ( $[M - H - CH_3]^+ = 302$  m/z e  $[M - H - CH_3]^- = 300$  m/z); la frammentazione del kaempferolo origina il caratteristico ione <sup>1,3</sup>A (153 m/z) mentre ciò non si verifica per la cianidina. Considerando i dati MS<sup>2</sup> e MS<sup>3</sup> relativi agli ioni figlio caratteristici nelle tabelle 4.7 e 4.8, si possono notare le tipiche perdite neutre di 176 m/z e 162 m/z che si riferiscono ai gruppi glucuronide e glicosile (si vedano le voci 1-6 e 9-11, rispettivamente). La presenza del frammento Y come il più intenso o anche come l'unico rilevato è una conferma della presenza di derivati O-glicosidici. L'assegnazione della posizione di glicosilazione (3 o 7) è stata proposta basandosi sui flavonoidi più diffusi presenti in varietà di radicchio già investigate e per le quali esistono numerosi riferimenti bibliografici [99] [105]. Indagini analoghe si possono svolgere per altri composti, come ad esempio derivati malonile, acetile e cumarile e O-di-glicosile: nelle tabelle 4.7 e 4.8 sono riportati gli ioni figlio MS<sup>2</sup> che rivelano la simultanea perdita delle frazioni malonile, acetile o glicosile come le più intense frammentazioni che provocano una variazione di massa pari a 248 m/z (162 m/z per il gruppo esoso ed 86 m/z per il gruppo malonile) e 204 m/z (162 m/z per il gruppo esoso e 42 m/z per il gruppo acetile). Tali evidenze sperimentali si possono riscontrare per le voci 7-10 in tabella 4.7 e 14, 16 e 18 in tabella 4.8.

In secondo luogo, negli spettri MS/MS possono essere presenti, come ioni frammento meno intensi, anche perdite individuali relative al malonile, glucosile o acetile (circa 5-20%). Per i derivati malonilici, è inoltre possibile rilevare una perdita neutra di CO<sub>2</sub> con variazione della massa pari a 44 m/z, come nel caso del kaempferide-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside per il quale si registra la transizione 549 m/z → 505,2 m/z (voce 8, tabella 4.7). Il derivato cumarilglucoside della quercetina (voce 20, tabella 4.8) è stato identificato grazie alla caratteristica variazione della massa pari a 308 m/z per la frazione del glucosio con passaggio 609 m/z → 301 m/z, e la perdita del cumarile (146 m/z) 609 → 463 m/z.

I composti corrispondenti alle voci 11-15 in tabella 4.7 sono stati identificati come flavonoidi O-di-glicosili e loro derivati malonili. I picchi registrati corrispondono alle perdite neutre di entrambe le unità zuccherine ed alle scissioni del gruppo malonile (ad esempio, per il kaempferolo-7-O-glucosil-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside si registrano le scissioni 697 m/z → 535 m/z, 535 m/z → 449 m/z e 449 m/z → 287 m/z).

Gli acidi fenolici sono stati immediatamente identificati grazie al loro ione negativo pseudo-molecolare (voci 1-, tabella 4.8) e confermati dagli spettri MS<sup>2</sup>. Questi composti presentano inoltre transizioni caratteristiche utili anche in caso di derivati esterificati: acido malico, 133 m/z → 115 m/z, acido caffeico 179 m/z → 135 m/z, acido chinico 191 m/z → 111 m/z ed acido caftarico 311 m/z → 149 m/z e 311 m/z → 179 m/z. Gli esteri dell'acido chinico forniscono frammentazioni specifiche: la perdita di metà gruppo cumarile (146 m/z) per l'acido 5-*p*-cumarilchinico (337 m/z → 191 m/z); la perdita del gruppo caffeil (162 m/z) e la rilevazione dello ione negativo caffeato (179 m/z) per l'acido caffeilchinico (353 m/z → 191 m/z, 337 m/z → 179 m/z); perdita del gruppo ferulico (176 m/z) e acido ferulico (194 m/z) per l'acido 5-O-feruloilchinico (367 m/z → 191 m/z, 367 m/z → 173 m/z).

In figura 4.2 si riporta a titolo di esempio, la separazione cromatografica HPLC-MS/MS di sette composti selezionati. Si può notare come per alcuni dei composti monitorati sia presente più di un segnale nel profilo cromatografico, che potrebbe corrispondere a differenti isomeri posizionali o diversi derivati esosi presenti nell'estratto. Osservando il primo cromatogramma filtrato (C3OG, 449 m/z → 287 m/z) si sottolinea la presenza di due picchi eluiti in seguito a quello identificato ( $t_r=8,0$  min) che potrebbero essere collegati alla cianidina-3-O-glucoside e alla cianidina-3-O-galattoside; in modo analogo nel quinto cromatogramma (K7OG, 447 m/z → 285, 255, 327 m/z), si può notare come il kaempferolo-3-O-glucoside potrebbe essere responsabile del primo picco intenso. In figura 4.3 è infine riportato un ingrandimento del terzo cromatogramma della figura 4.2: si evidenzia come il segnale relativo al composto 3 (acido 5-caffeilchinico o acido neoclorogenico (5CQA)) sia decisamente meno intenso rispetto al picco corrispondente al composto 7 (acido 3-caffeilchinico o acido clorogenico (3CQA)), per i quali viene monitorato il rapporto 353 m/z.



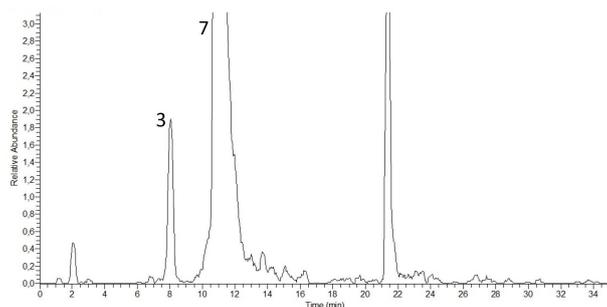
**Figura 4.2:** Cromatogramma LC-MS/MS di un estratto di radicchio rosso di Massenzatica. I picchi indicati sono stati identificati e confermati mediante analisi MS/MS (si vedano nello specifico le tabelle 4.7 e 4.8). I sette composti selezionati sono: (1) cianidina-3-O-glucoside (C3OG), (2) acido dicaffeiltartarico o acido cicorico (DTCA), (3) acido 5-caffeilchinico o acido neoclorogenico (5CQA), (4) apigenina-7-O-glucoside (A7OG), (5) kaempferolo-7-O-glucoside (K7OG), (6) quercetina-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside (Q3OMG) e (7) acido 3-caffeilchinico o acido clorogenico (3CQA).

Voce	Composto identificato	m/z	MS <sup>n</sup> (m/z)
1	Pelargonidina-3-O-monoglucuronide	447	MS <sup>2</sup> [447]: 271,0(100)
2	Cianidina-3-O-glucoside	449	MS <sup>2</sup> [449]: 287,1(100)
3	Cianidina-3-O-galattoside	449	MS <sup>2</sup> [449]: 287,1(100)
4	Kaempferolo-7-O-glucuronide	463	MS <sup>2</sup> [463]: 287,1(100); MS <sup>3</sup> [287]: 152,9(100); 258,1(30)
5	Quercetina-7-O-glucoside	465	MS <sup>2</sup> [465]: 303,0(100)
6	Quercetina-7-O-glucuronide	479	MS <sup>2</sup> [479]: 303,0(100)
7	Cianidina-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside	535	MS <sup>2</sup> [535]: 287,0(100); 449,2(5) MS <sup>3</sup> [287]: 213,0(100); 136,0; 188,0; 231,0; 259,0; 269,0
8	Kaempferide-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside	549	MS <sup>2</sup> [549]: 301,1(100); 505,2(15); 463,1(10)
9	Quercetina-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside	551	MS <sup>2</sup> [551]: 303,0(100)
10	Isoramnetina-7-O-(6''-O-malonil)-glucoside	565	MS <sup>2</sup> [565]: 317,1 (100); 479,0(3) MS <sup>3</sup> [317]: 302,1(100); 285,1(45)
11	Kaempferolo-3-O-glucuronide-7-O-glucoside	625	MS <sup>2</sup> [625]: 449,2(100); 287,1(10)
12	Kaempferolo-7-O-glucosil-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside	697	MS <sup>2</sup> [697]: 535,2(100); 287,1(20); 449,4(10)
13	Delfinidina-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside-5-O-glucoside	713	MS <sup>2</sup> [713]: 303,1(100); 465,1(95); 551,2(60)
14	Quercetina-3-O-glucuronide-7-O-(6''-O-malonil)-glucoside	727	MS <sup>2</sup> [727]: 479,1(100); 303,1(15)
15	Cianidina-3,5-di-O-(6''-O-malonil)-glucoside	783	MS <sup>2</sup> [783]: 535,1(100); 287,0(30)

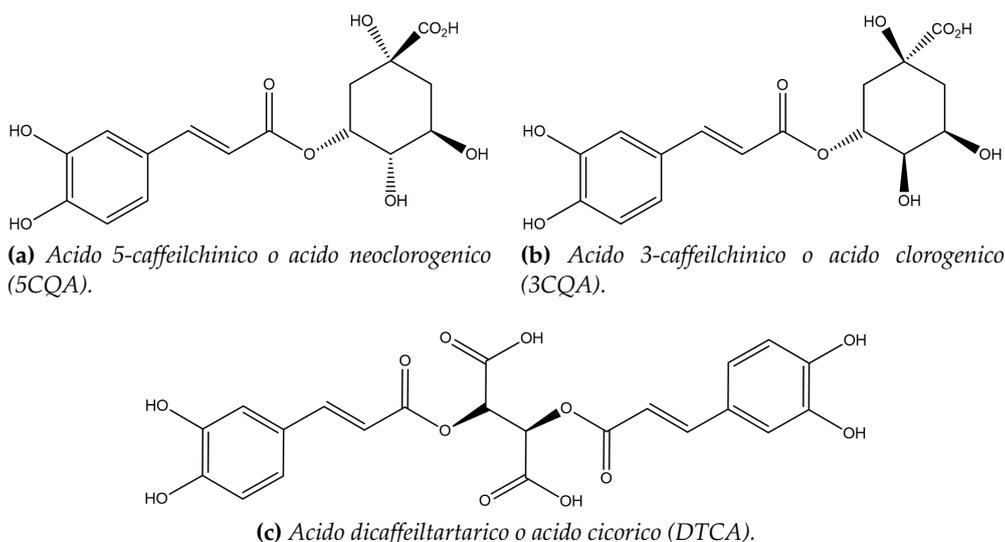
**Tabella 4.7:** Composti fenolici identificati in modalità ESI+ negli estratti chimici di entrambe le tipologie di radichio rosso prodotto e coltivato a Massenzatica. Lo ione genitore è riportato tra parentesi quadre mentre all'interno delle parentesi tonde sono riportate le abbondanze relative per ogni ione figlio.

Voce	Composto identificato	m/z	MS <sup>n</sup> (m/z)
1	Acido malico	133	MS <sup>2</sup> [133]: 114,8(100)
2	Acido caffeico	179	MS <sup>2</sup> [179]: 134,9(100)
3	Acido chinico	191	MS <sup>2</sup> [191]: 110,8(100); 172,9(25)
4	Acido caftarico	311	MS <sup>2</sup> [311]: 148,9(100); 178,9(55); 134,9(5)
5	Acido 5- <i>p</i> -cumarilchinico	337	MS <sup>2</sup> [337]: 190,9(100)
6	Acido 3-caffeilchinico (acido clorogenico)	353	MS <sup>2</sup> [353]: 190,9(100); 178,9(40); 134,9(10)
7	Acido 5-caffeilchinico (acido neoclorogenico)	353	MS <sup>2</sup> [353]: 190,9(100); 178,9(5)
8	Acido 5-O-feruloilchinico	367	MS <sup>2</sup> [367]: 190,1(100); 172,9(5)
9	Apigenina-7-O-glucoside	431	MS <sup>2</sup> [431]: 269,1(100); 268,1(5)
10	Kaempferolo-7-O-glucoside	447	MS <sup>2</sup> [447]: 285,7(100); 284,1(70); 255,1(15); 327(13)
11	Quercetina-7-O-galattoside	463	MS <sup>2</sup> [463]: 301,1(100); 300,1(15)
12	Acido dicaffeiltartarico (acido cicorico)	473	MS <sup>2</sup> [473]: 311,0(100); 293,0(80); 178,9(5); 148,9(3)
13	Kaempferide-glucuronide	475	MS <sup>2</sup> [475]: 299,1(100)
14	Kaempferolo-7-O-(6''-O-acetil)-glucoside	489	MS <sup>2</sup> [697]: 285,1(100); 284,1(18); 299,1(5)
15	Isoramnetina-7-O-glucuronide	491	MS <sup>2</sup> [491]: 315,1(100) MS <sup>3</sup> [315]: 300,1(100)
16	Quercetina-7-O-(6''-O-acetil)-glucoside	505	MS <sup>2</sup> [505]: 301,0(100); 300,0(45); 463,2(20)
17	Acido 3,5-dicaffeilchinico	515	MS <sup>2</sup> [515]: 353,1(100); 335,1(2); 191,0(1) MS <sup>3</sup> [353]: 190,9(100); 179,0(50); 135,9(10); 172,9(5)
18	Isoramnetina-7-O-(6''-O-acetil)-glucoside	519	MS <sup>2</sup> [519]: 315,1(100) MS <sup>3</sup> [315]: 300,1(100)
19	Kaempferolo-7-O-rutinoside	593	MS <sup>2</sup> [593]: 285,1(100)
20	Quercetina-7-O- <i>p</i> -cumaril-glucoside	609	MS <sup>2</sup> [609]: 301,1(100); 300,1(25); 343,1(12); 463,3(3)
21	Isoramnetina-7-O-neoesperoside	623	MS <sup>2</sup> [623]: 315,1(100) MS <sup>3</sup> [315]: 300,1(100)

**Tabella 4.8:** Composti fenolici identificati in modalità ESI- negli estratti chimici di entrambe le tipologie di radichio rosso prodotto e coltivato a Massenzatica. Lo ione genitore è riportato tra parentesi quadre mentre all'interno delle parentesi tonde sono riportate le abbondanze relative per ogni ione figlio.



**Figura 4.3:** Sezione del cromatogramma LC-MS/MS di un estratto di radichio rosso di Massenzatica relativo al rapporto 353 m/z. L'ingrandimento permette di evidenziare il picco 3 (acido 5-caffelchinico o acido neoclorogenico (5CQA)).



**Figura 4.4:** Acidi fenolici quantificati nel radichio rosso.

#### 4.4.2 Quantificazione di 7 composti target

Tra i 36 composti identificati, sono stati selezionati 7 target per i quali è stata effettuata la quantificazione in entrambe le tipologie di radichio rosso prodotto e coltivato a Massenzatica: cianidina-3-O-glucoside (C3OG), acido dicaffeiltartarico o acido cicorico (DTCA), acido 5-caffelchinico o acido neoclorogenico (5CQA), apigenina-7-O-glucoside (A7OG), kaempferolo-7-O-glucoside (K7OG), quercetina-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside (Q3OMG) e acido 3-caffelchinico o acido clorogenico (3CQA). La scelta è stata effettuata cercando di selezionare composti caratteristici delle varie classi di polifenoli presenti in questa matrice [106]. In figura 4.4 sono riportate le strutture dei tre acidi fenolici monitorati mentre per gli agliconi degli altri 4 composti si faccia riferimento alle figure 1.14, 1.15 e 1.19.

Sono state costruite opportune curve di calibrazione utilizzando il metodo di calibrazione con standard esterno. I valori di area *vs* concentrazione sono stati elaborati con regressione lineare per tutti gli standard ad eccezione degli acidi 3-caffelchinico e 5-caffelchinico, per i quali è stato ottenuto un maggiore coefficiente di correlazione attraverso un polinomio quadrato. La validazione del metodo ha prodotto parametri soddisfacenti in termini di ripetibilità (RSD < 5%), precisione (RSD < 10%), accuratezza (RE < 10%) e linearità ( $R^2 \geq 0.995$ ).

I dati relativi alle quantificazioni sono riportati in tabella 4.9 e si può innanzitutto notare come gli ordini di grandezza siano variabili tra i diversi composti: si registrano concentrazioni infe-

riori a 0,5  $\mu\text{g/g}$  di sostanza fresca per A7OG e di 804  $\mu\text{g/g}$  per DTCA. Valori comparabili tra i due ecotipi si hanno per A7OG e K7OG. Per gli altri cinque composti si individuano maggiori concentrazioni nel radicchio tondo, con valori anche pari a quattro volte quello del radicchio lungo per C3OG e 5CQA. I valori riportati derivano dalla somma dell'estrazione chimica e delle due estrazioni enzimatiche. Per i composti C3OG, A7OG e K7OG, si rivela esaustiva la sola estrazione chimica. Nel caso dei composti Q3OMG e 3CQA, il contributo delle due estrazioni enzimatiche è prossimo al 2% sul totale, mentre per DTCA si ottengono valori pari a 7,64% e 4,86%, e per 5CQA pari a 8,39% e 16,40% rispettivamente per il radicchio tondo e lungo. La completa caratterizzazione LC-MS/MS degli estratti enzimatici permette inoltre di affermare che, con gli enzimi selezionati, non vengono estratti composti ulteriori rispetto a quelli già identificati.

Picco	Composto	$t_r$ (min)	TMM ( $\mu\text{g/g}$ )	% step enzimatico	LMM ( $\mu\text{g/g}$ )	% step enzimatico
1	C3OG	8,4	61,0 $\pm$ 5,9	-	14,6 $\pm$ 1,2	-
2	DTCA	21,9	804 $\pm$ 78	7,64	548 $\pm$ 42	4,86
3	5CQA	8	3,920 $\pm$ 0,053	8,39	1,060 $\pm$ 0,082	16,40
4	A7OG	22,2	0,340 $\pm$ 0,031	-	0,410 $\pm$ 0,044	-
5	K7OG	21,3	6,55 $\pm$ 0,61	-	7,00 $\pm$ 0,63	-
6	Q3OMG	21,1	521 $\pm$ 38	1,55	280 $\pm$ 21	1,25
7	3CQA	11,2	638 $\pm$ 18	1,05	206 $\pm$ 14	2,49

**Tabella 4.9:** Quantificazione dei sette composti target nei campioni di radicchio tondo e lungo di Massenzatica (TMM e LMM, rispettivamente). I risultati, espressi in  $\mu\text{g/g}$  di sostanza fresca analizzata, si ottengono dalla somma delle frazioni ottenute dalle estrazioni chimica ed enzimatica e sono riportati come media $\pm$ deviazione standard di cinque estratti. È riportata la percentuale di recupero attraverso le due estrazioni enzimatiche effettuate sul pellet residuo dell'estrazione chimica. I sette composti considerati sono: cianidina-3-O-glucoside (C3OG), acido dicaffeiltartarico o acido cicorico (DTCA), acido 5-caffeilchinico o acido neoclorogenico (5CQA), apigenina-7-O-glucoside (A7OG), kaempferolo-7-O-glucoside (K7OG), quercetina-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside (Q3OMG) e acido 3-caffeilchinico o acido clorogenico (3CQA)

#### 4.4.3 Bioaccessibilità dei polifenoli

L'identificazione e la quantificazione dei composti bioattivi non è sufficiente per avere un quadro preciso dell'efficacia nutrizionale di un prodotto alimentare. Questo perché diverse classi di composti, tra cui polifenoli e carotenoidi, presenti in alimenti naturali o elaborati hanno effetti potenzialmente benefici e nutraceutici che possono essere tuttavia limitati dalla loro scarsa e variabile biodisponibilità (si veda la sezione 1.6). La complessità molecolare e/o le proprietà chimiche intrinseche di tali composti bioattivi possono infatti influenzare in modo importante il processo di assorbimento, limitandolo e portando a livelli estremamente bassi di concentrazione nel sangue e nelle cellule [107]. Esistono inoltre altre variabili che possono influenzare in modo negativo la quantità di polifenoli disponibili per l'assorbimento nell'intestino durante e dopo la digestione, come ad esempio gli effetti anti-sinergici e competitivi con altre componenti alimentari o le proprietà fisiche e chimiche della matrice alimentare stessa.

Come anticipato in altre sezioni di questa tesi, il concetto di bioaccessibilità definisce la frazione di una molecola che viene rilasciata dalla matrice alimentare nel tratto gastrointestinale, si solubilizza e diventa disponibile per l'assorbimento: include quindi la trasformazione del cibo durante le fasi di digestione, ma esclude l'assorbimento epiteliale intestinale ed il metabolismo pre-sistemico [108]. La bioaccessibilità dei composti fenolici è stata valutata seguendo un metodo di digestione simulata statica *in vitro* (metodica riportata nella sezione 5.6) e sono state analizzate le fasi salivare, gastrica e duodenale. La stima della bioaccessibilità richiede una determinazione quantitativa dei polifenoli e degli acidi fenolici: la concentrazione in ogni fase della digestione simulata viene riferita alla quantità totale inizialmente presente negli estratti esaustivi chimici ed enzimatici.

Le tabelle 4.10 e 4.11 e la figura 4.5 riportano i dati relativi alla bioaccessibilità (espressa come dato percentuale rispetto alla quantità presente nella matrice) per i campioni di radicchio rosso tondo e lungo di Massenzatica per i sette composti target precedentemente quantificati (sezione 4.4.2, tabella 4.9). Le due tipologie di radicchio mostrano valori di bioaccessibilità comparabili per i sette composti selezionati. In particolare, i valori di bioaccessibilità relativi alla fase salivare di entrambi gli ecotipi sono simili per tutti i composti: per C3OG e Q3OMG sono inferiori a 0,1%; per DTCA, K7OG e 3CQA sono compresi tra 0,35% e 1%; per 5CQA e A7OG sono compresi tra 2% e 5%. Nella fase gastrica il radicchio tondo e quello lungo presentano valori simili di bioaccessibilità per C3OG, DTCA, A7OG, K7OG e Q3OMG ma non per 5CQA e 3CQA, per i quali si registra una bioaccessibilità molto maggiore per il radicchio lungo rispetto al tondo (54,6% vs 15,2% e 46,8% vs 19,3%, rispettivamente). Nella fase duodenale, le differenze di bioaccessibilità più significative tra radicchio rosso a foglia tonda e lunga si registrano per DTCA e 5CQA. Nello specifico, per DTCA i valori sono maggiori nel radicchio tondo (37,9%) rispetto a quello lungo (16,9%) mentre per 5CQA i valori sono maggiori nel lungo (10,8%) rispetto al tondo (2,0%). Differenze minori (inferiori al 4%) si registrano per A7OG (29,9% vs 26,0%, rispettivamente per il radicchio tondo e lungo) e per K7OG (8,3% vs 10,8%, rispettivamente per il radicchio tondo e lungo). Per tutti gli altri composti, le variazioni registrate sono correlate all'errore sperimentale e la bioaccessibilità può essere quindi considerata costante.

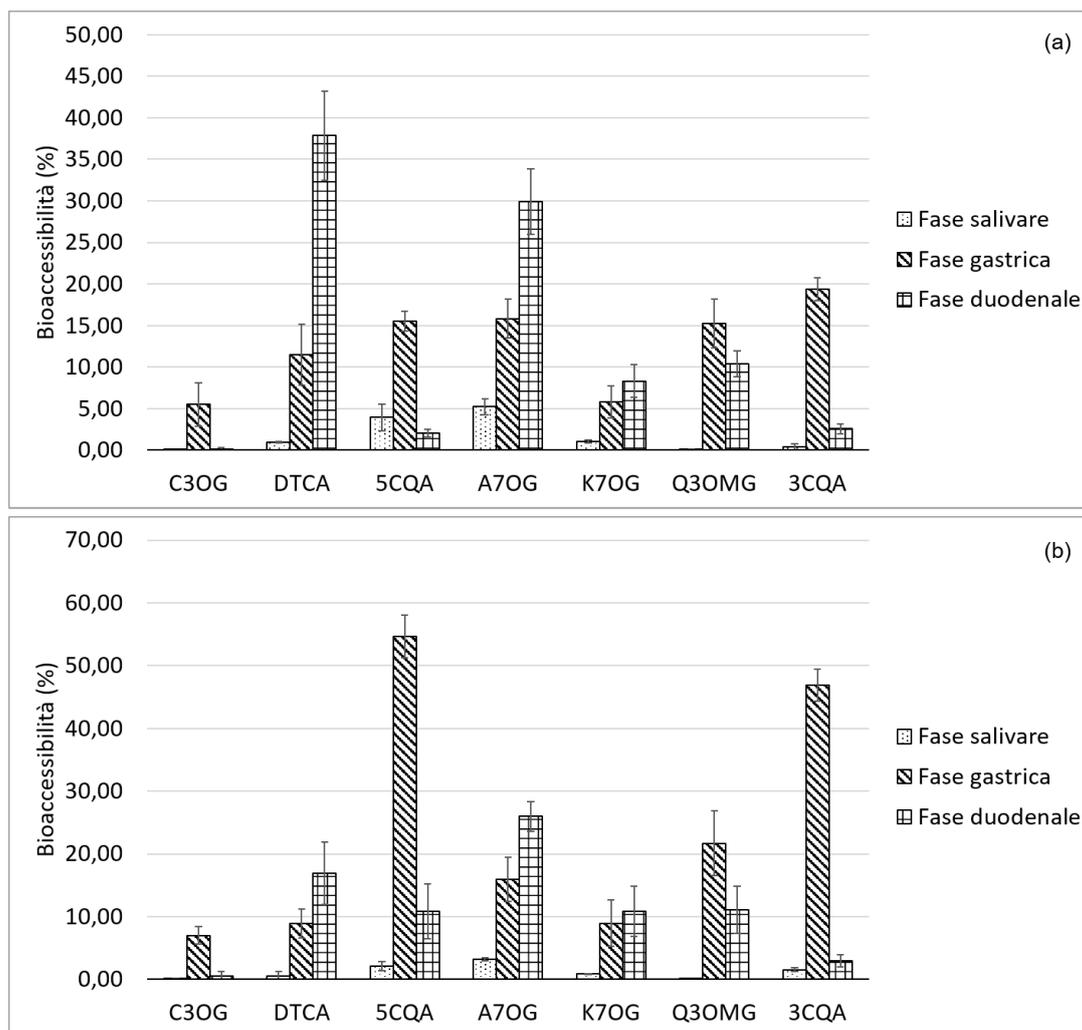
	Fase salivare	Fase gastrica	Fase duodenale
<b>C3OG</b>	0,03±0,01	5,52±2,40	0,13±0,11
<b>DTCA</b>	0,95±0,07	11,49±3,60	37,87±4,36
<b>5CQA</b>	3,94±1,50	15,52±1,18	2,05±0,42
<b>A7OG</b>	5,23±0,95	15,84±2,14	29,90±3,07
<b>K7OG</b>	1,01±0,17	5,80±1,68	8,31±1,66
<b>Q3OMG</b>	0,07±0,02	15,26±2,94	10,38±1,43
<b>3CQA</b>	0,36±0,25	19,35±1,39	2,56±0,62

**Tabella 4.10:** Bioaccessibilità % dei fluidi gastrointestinali simulati per il radicchio tondo di Massenzatica. I risultati sono espressi con le deviazioni standard relative a 5 analisi. I sette composti considerati sono: cianidina-3-O-glucoside (C3OG), acido dicaffeiltartarico o acido cicorico (DTCA), acido 5-caffeilchinico o acido neoclorogenico (5CQA), apigenina-7-O-glucoside (A7OG), kaempferolo-7-O-glucoside (K7OG), quercetina-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside (Q3OMG) e acido 3-caffeilchinico o acido clorogenico (3CQA).

	Fase salivare	Fase gastrica	Fase duodenale
<b>C3OG</b>	0,08±0,03	7,03±1,17	0,53±0,25
<b>DTCA</b>	0,57±0,22	8,87±2,21	16,89±3,97
<b>5CQA</b>	2,11±0,61	54,60±3,40	10,82±4,09
<b>A7OG</b>	3,22±0,21	15,99±3,04	25,98±2,38
<b>K7OG</b>	0,86±0,10	8,97±3,31	10,85±3,00
<b>Q3OMG</b>	0,06±0,01	21,70±5,11	11,10±3,59
<b>3CQA</b>	1,56±0,32	46,84±2,55	2,95±0,64

**Tabella 4.11:** Bioaccessibilità % dei fluidi gastrointestinali simulati per il radicchio lungo di Massenzatica. I risultati sono espressi con le deviazioni standard relative a 5 analisi. I sette composti considerati sono: cianidina-3-O-glucoside (C3OG), acido dicaffeiltartarico o acido cicorico (DTCA), acido 5-caffeilchinico o acido neoclorogenico (5CQA), apigenina-7-O-glucoside (A7OG), kaempferolo-7-O-glucoside (K7OG), quercetina-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside (Q3OMG) e acido 3-caffeilchinico o acido clorogenico (3CQA).

Osservando i grafici relativi alla bioaccessibilità, indipendentemente dal tipo di radicchio considerato, si evidenziano tre differenti comportamenti in riferimento ai sette composti selezionati. In primo luogo, si registra un progressivo e lineare incremento della bioaccessibilità, dalla fase salivare a quella duodenale, per DTCA, A7OG e K7OG (trend di tipo-1). Per C3OG, 5CQA



**Figura 4.5:** Bioaccessibilità % dei fluidi gastrointestinali simulati per il radicchio tondo (a) e lungo (b) di Massenzatica. I risultati sono espressi con le deviazioni standard relative a 5 analisi. I sette composti considerati sono: cianidina-3-O-glucoside (C3OG), acido dicaffeiltartarico o acido cicorico (DTCA), acido 5-caffeilchinico o acido neoclorogenico (5CQA), apigenina-7-O-glucoside (A7OG), kaempferolo-7-O-glucoside (K7OG), quercetina-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside (Q3OMG) e acido 3-caffeilchinico o acido clorogenico (3CQA).

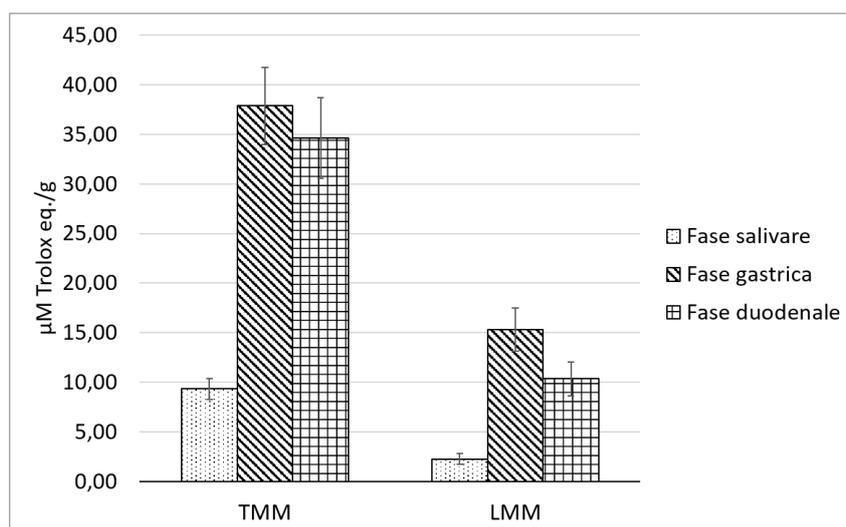
e 3CQA la bioaccessibilità a livello gastrico è particolarmente elevata e subisce una notevole diminuzione nella fase duodenale (trend di tipo-2). Infine, il composto Q3OMG presenta una bioaccessibilità gastrica elevata con un decremento nella fase duodenale meno rilevante rispetto al caso precedente (trend di tipo-3). Soffermandosi sui tre diversi andamenti elencati, si può individuare una correlazione tra la struttura chimica della molecola e la relativa bioaccessibilità. La O-glicosilazione al carbonio 7 fornisce ad apigenina e kaempferolo, molecole dalla struttura chimica simile ad eccezione del gruppo -OH al carbonio 3, l'andamento di tipo-1. La O-glicosilazione al carbonio 3, potrebbe conferire una bioaccessibilità maggiore durante la fase gastrica. I due acidi caffeilchinici (3CQA e 5CQA) mostrano inoltre un andamento del tutto simile (tipo-2). È tuttavia difficile stabilire se e quale ruolo abbiano la struttura degli agliconi e la posizione della O-glicosilazione nel determinare la bioaccessibilità di ciascun composto, sia in termini di quantità che tipologia di comportamento. Studi più dettagliati su un più ampio numero di polifenoli glicosilati potrebbe portare ad argomentazioni più precise. Considerando i risultati relativi alla bioaccessibilità dei sette composti selezionati da un punto di vista globale, si può notare come il rilascio di composti bioattivi dalla matrice iniziale sia maggiore

durante la fase duodenale per il radicchio tondo, mentre per il radicchio lungo si registra l'apice di bioaccessibilità durante la fase gastrica, dove il contributo maggiore è dato dall'acido clorogenico (3CQA) e dal suo isomero, l'acido neoclorogenico (5CQA).

#### 4.4.4 Capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati

La stabilità dei composti fenolici durante i processi digestivi li rende potenzialmente attivi a livello gastrointestinale: essendo molecole a proprietà antiossidanti possono contribuire al controllo dello stress ossidativo lungo tutto il tratto digerente. Questo potenziale effetto benefico, unitamente alle proprietà probiotiche dei composti fenolici, ha incentivato studi sulla presenza ed il meccanismo d'azione di queste molecole a livello del tratto gastrointestinale [81].

È stato effettuato uno studio sulla capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati attraverso il metodo della fotochemiluminescenza. Lo strumento Photochem<sup>®</sup> permette una valutazione delle proprietà scavenger di un liquido nei confronti del radicale anione superossido, una delle specie reattive dell'ossigeno più importanti a livello fisiologico. La capacità antiossidante di ciascun fluido simulato è stata testata seguendo la metodologia PCL-ACL (descrizione completa nella sezione 5.6.2) ed i risultati sono espressi in capacità antiossidante equivalente ad una soluzione  $\mu\text{M}$  di Trolox/g di campione utilizzato nella digestione.



**Figura 4.6:** Capacità antiossidante (valutata con metodo PCL-ACL) dei fluidi gastrointestinali simulati ottenuti dalla digestione di foglie di radicchio tondo e lungo di Massenzatica (TMM e LMM, rispettivamente). I risultati sono espressi come  $\mu\text{M}$  di Trolox eq./g con le deviazioni standard relative a 5 analisi.

In figura 4.6 sono posti a confronto i risultati delle analisi PCL-ACL sui fluidi simulati della digestione di entrambe le tipologie di radicchio rosso. I composti fenolici presenti e bioaccessibili esplicano capacità antiossidante nei confronti del radicale  $\text{O}_2^{\bullet-}$  lungo tutto il tratto gastrointestinale. In particolare, l'effetto radical scavenger maggiore si registra a livello gastrico sia per il radicchio tondo sia per il lungo, con una leggera diminuzione a livello duodenale. I fluidi relativi al radicchio tondo raggiungono tuttavia valori più elevati rispetto al radicchio lungo per tutte e tre le fasi analizzate. Nello specifico i valori medi, per il radicchio tondo e lungo rispettivamente, sono pari a  $9,34 \mu\text{M}$  di Trolox eq./g e  $2,26 \mu\text{M}$  di Trolox eq./g per la fase salivare,  $37,90 \mu\text{M}$  di Trolox eq./g e  $15,29 \mu\text{M}$  di Trolox eq./g per la fase gastrica,  $34,62 \mu\text{M}$  di Trolox eq./g e  $10,34 \mu\text{M}$  di Trolox eq./g per la fase duodenale.

Globalmente, la capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati dei due ecotipi è in parziale disaccordo con i dati relativi alla bioaccessibilità, per la quale il valore complessivo era maggiore nella fase duodenale per il tondo e gastrica per il lungo. La bioaccessibilità è stata

tuttavia monitorata per soli sette composti sui 36 identificati durante lo studio LC-MS/MS e proprio questi polifenoli, oltre ad eventuali composti non ancora identificati, potrebbero essere i responsabili di questo diverso comportamento rispetto alla capacità antiossidante.

#### **4.4.5 Studio dell'andamento temporale degli acidi fenolici**

La disponibilità di campionamenti in annate successive e con più raccolte all'anno ha permesso il monitoraggio di alcuni composti nel tempo. Nello specifico, sono state considerate le raccolte di Dicembre 2015, Novembre 2016, Dicembre 2016 e Novembre 2017, per entrambe le tipologie di radicchio prodotte e coltivate nel territorio di Massenzatica. Nei grafici in figura 4.7 sono riportate le concentrazioni dell'acido dicaffeiltartarico o acido cicorico, dell'acido 3-caffeilchinico o acido clorogenico e dell'acido 5-caffeilchinico o acido neoclorogenico. Si può individuare un trend generale per tutti e tre i composti: le raccolte di Dicembre, indipendentemente dall'anno di riferimento, presentano maggiori concentrazioni sia per il radicchio tondo che lungo. In letteratura esistono studi che sottolineano come l'andamento climatico abbia ripercussioni sulle concentrazioni dei composti fenolici, che risultano più basse nei mesi estivi più caldi rispetto a quelli invernali più freddi [109]. Si può quindi supporre che i dati di Dicembre 2015 e 2016, caratterizzati in Emilia Romagna da temperature inferiori anche a 0 °C e brinate notturne, siano più elevati perché relativi ai mesi più freddi. Per i due acidi clorogenici, inoltre, le concentrazioni del tondo sono sempre maggiori rispetto al lungo, mentre per l'acido cicorico non si registra tale differenza.

### **4.5 Confronto tra radicchio di Massenzatica e competitors commerciali**

#### **4.5.1 Stesso seme, terreni diversi**

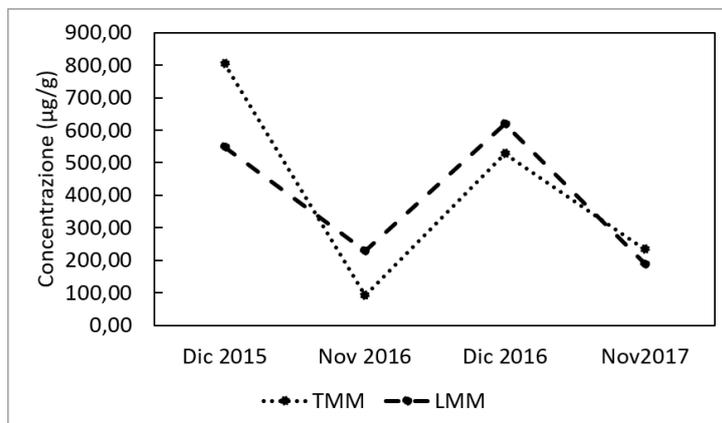
In seguito alla completa caratterizzazione, in termini bromatologici, della frazione antiossidante e del profilo polifenolico del radicchio tondo e lungo prodotto e coltivato a Massenzatica, è stato effettuato uno studio sugli stessi ecotipi coltivati però in un terreno diverso. Nello specifico, semi del radicchio tondo e lungo di Massenzatica sono stati coltivati in Veneto, nel territorio di Chioggia, in provincia di Venezia.

Il radicchio delle annate 2016/2017 e 2017/2018 è quindi stato raccolto e preparato per le analisi in modo analogo a quanto fatto con i campioni provenienti da Massenzatica. Nella tabella 4.12 sono elencate le raccolte per tipologia di radicchio, anno e mese con le relative sigle identificative; la sigla generale dei campioni fa riferimento nelle lettere "T" e "L" alle tipologie tondo e lungo, mentre nelle successive lettere "MC" alla provenienza del seme (Massenzatica) ed al terreno di coltivazione (Chioggia).

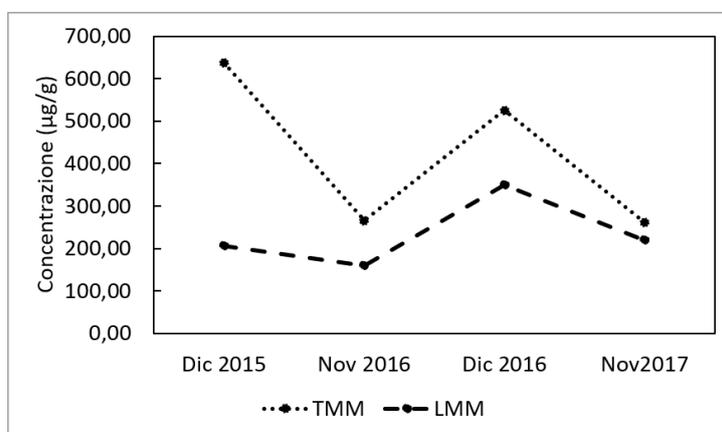
Sono state svolte le stesse analisi bromatologiche riportate nelle sezioni precedenti, ad eccezione della quantificazione del contenuto lipidico dal momento che il dato ottenuto per i campioni coltivati a Massenzatica era estremamente basso, in modo tale da poter effettuare uno studio comparativo. I dati di tutte le analisi sono stati rielaborati usando il programma IBM SPSS Statistics® mediante ANOVA ad una via per valutare se vi fossero differenze significative ( $p < 0,05$ ) tra le differenti tipologie di radicchio, a parità del territorio di coltivazione.

Si può notare come il contenuto di umidità sia quello caratteristico per questo tipo di ortaggio e come il contenuto in proteine sia leggermente superiore nel radicchio lungo rispetto a quello tondo, in modo analogo a quanto registrato per il campione LMM. Anche per il contenuto di ceneri i dati sono in pieno accordo con quelli ottenuti per i campioni coltivati a Massenzatica, con valori prossimi all'11% per il radicchio tondo e al 13% per quello lungo.

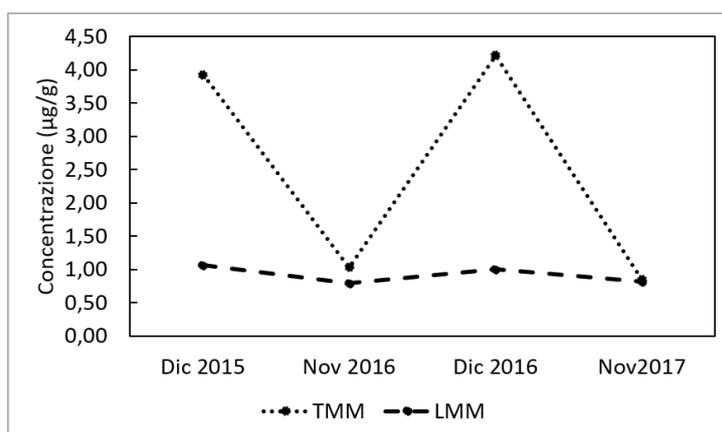
L'analisi dei dati mediante ANOVA ad una via sottolinea come le differenze del contenuto in



(a) Acido dicaffeiltartarico o acido cicorico (DTCA).



(b) Acido 3-caffeilchinico o acido clorogenico (3CQA).



(c) Acido 5-caffeilchinico o acido neoclorogenico (5CQA).

**Figura 4.7:** Studio delle concentrazioni di tre composti target in annate successive, con campionamenti a Dicembre 2015, Novembre 2016, Dicembre 2016 e Novembre 2017.

Campione	Annata	Mese raccolta	Sigla specifica	Sigla generale
Radicchio Tondo	2016/2017	Novembre	TMC1	TMC
		Dicembre	TMC2	
	Febbraio	TMC3		
	2017/2018	Novembre	TMC4	
		Dicembre	TMC5	
Radicchio Lungo	2016/2017	Novembre	LMC1	LMC
		Dicembre	LMC2	
	2017/2018	Novembre	LMC3	
		Dicembre	LMC4	

**Tabella 4.12:** Elenco dei campioni di radicchio rosso con seme di Massenzatica e coltivati a Chioggia (VE).

Campione	Umidità (g/100 g di s. fresca)	Proteine (g/100 g di s. secca)	Ceneri
TMC	92,63±0,51	16,86±3,61 <sup>a</sup>	11,12±0,58 <sup>a</sup>
LMC	93,30±0,20	21,17±2,38 <sup>a</sup>	13,06±0,47 <sup>a</sup>

**Tabella 4.13:** Caratterizzazione bromatologica dei campioni di radicchio tondo e lungo con seme di Massenzatica coltivato a Chioggia (TMC e LMC, rispettivamente). I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016/2017 e 2017/2018. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie ( $p < 0,05$ ).

proteine e ceneri siano statisticamente significative, come denota la presenza dell'apice a in tabella 4.13.

Nella tabella 4.14 sono riportati i dati relativi alle concentrazioni di calcio, sodio, potassio e magnesio nei campioni con seme di Massenzatica coltivati a Chioggia e si può notare come, in riferimento ai campioni TMM e LMM (tabella 4.3), le differenze non siano particolarmente rilevanti. Anche per gli oligoelementi considerati, i valori tra le coltivazioni di Massenzatica e Chioggia sono estremamente simili (tabelle 4.4 vs 4.15). Ai fini di una differenziazione dell'ecotipo in relazione al terreno di coltivazione, si rivelano statisticamente significativi i dati di Ca, Mg e Zn. Le deviazioni standard presentate sono elevate poiché derivano non solo dal confronto di più campionamenti per la stessa annata ma anche dalla media tra annate diverse ed in riferimento al contenuto in macro ed oligoelementi, tali variazioni possono derivare anche dalla concimazione dei terreni e dalle caratteristiche fisico-chimico ed idrologiche del terreno stesso.

Campione	Calcio (mg/g s.s.)	Sodio (mg/g s.s.)	Potassio (mg/g s.s.)	Magnesio (mg/g s.s.)
TMC	2,97±0,11 <sup>a</sup>	0,57±0,19	38,90±8,90	1,40±0,12 <sup>a</sup>
LMC	4,12±0,99 <sup>a</sup>	0,76±0,18	37,13±5,33	1,68±0,12 <sup>a</sup>

**Tabella 4.14:** Contenuto di macroelementi (mg/g di sostanza secca) nel radicchio tondo e lungo con seme di Massenzatica coltivato a Chioggia (TMC e LMC, rispettivamente). I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016/2017 e 2017/2018. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie ( $p < 0,05$ ).

La quantificazione della fibra totale e la sua ripartizione in solubile ed insolubile, confermano i dati ottenuti per i campioni prodotti e coltivati a Massenzatica, con la frazione di fibra insolubile pari a circa il doppio rispetto a quella solubile (tabelle 4.5 vs 4.16) ed anche in questo caso non risultano utili per una differenziazione dei campioni in base alla tipologia di radicchio considerato.

Campione	Ferro ( $\mu\text{g/g s.s.}$ )	Rame ( $\mu\text{g/g s.s.}$ )	Zinco ( $\mu\text{g/g s.s.}$ )	Manganese ( $\mu\text{g/g s.s.}$ )
TMC	41,50 $\pm$ 9,78	11,32 $\pm$ 3,40	19,50 $\pm$ 3,76 <sup>a</sup>	14,09 $\pm$ 1,91
LMC	39,50 $\pm$ 4,72	13,24 $\pm$ 0,58	25,06 $\pm$ 2,10 <sup>a</sup>	20,34 $\pm$ 7,01

**Tabella 4.15:** Contenuto di oligoelementi ( $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca) con seme di Massenzatica coltivato a Chioggia (TMC e LMC, rispettivamente). I risultati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016/2017 e 2017/2018. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie ( $p < 0,05$ ).

Campione	Fibra Totale (% s.s.)	Fibra Solubile (% s.s.)	Fibra Insolubile (% s.s.)
TMC	34,70 $\pm$ 2,39	12,26 $\pm$ 1,93	22,45 $\pm$ 1,53
LMC	36,13 $\pm$ 2,00	12,57 $\pm$ 2,47	23,56 $\pm$ 1,48

**Tabella 4.16:** Contenuto di fibra (% su sostanza secca) nei campioni di radicchio tondo e lungo con seme di Massenzatica coltivato a Chioggia (TMC e LMC, rispettivamente). I risultati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016/2017 e 2017/2018. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie ( $p < 0,05$ ).

Anche per i campioni con seme di Massenzatica coltivati a Chioggia, sono state effettuate le analisi riguardanti la componente antiossidante. I dati ottenuti per il contenuto di polifenoli totali attraverso il metodo Folin-Ciocalteu, per l'attività antiossidante con il saggio DPPH ed il contenuto in antocianine sono riportati in tabella 4.17. I polifenoli totali e l'attività antiossidante totale, in accordo con quanto registrato per i campioni TMM e LMM, non si rivelano utili per la distinzione tra radicchio tondo e lungo (si veda la tabella 4.6). Mentre il contenuto di polifenoli totali per i campioni TMC e TMM sono estremamente simili, il campione LMC presenta un valore maggiore rispetto al campione LMM (2045 $\pm$ 186 e 1416 $\pm$ 232  $\mu\text{g/g}$  catechina eq., rispettivamente); i dati relativi al saggio DPPH sono invece in pieno accordo, a parità di seme e differente terreno di coltivazione, con valori prossimi a 6 mM/g Trolox eq. Il contenuto in antocianine è statisticamente significativo per la differenziazione delle due tipologie di radicchio considerato e presenta valori comparabili tra i campioni LMC e LMM, mentre risulta maggiore per TMM rispetto a TMC (303,7 $\pm$ 31,4 vs 195,0 $\pm$ 18,6  $\mu\text{g/g}$  cianidina-3-glucoside cloridrato, rispettivamente).

Campione	Folin-Ciocalteu $\mu\text{g/g catechina eq.}$	DPPH mM/g Trolox eq.	Antocianine $\mu\text{g/g cianidina-3-glucoside cloridrato}$
TMC	1735 $\pm$ 397	6,61 $\pm$ 2,33	195,0 $\pm$ 18,6 <sup>a</sup>
LMC	2045 $\pm$ 186	6,12 $\pm$ 0,17	137,3 $\pm$ 20,1 <sup>a</sup>

**Tabella 4.17:** Contenuto di polifenoli totali (Folin-Ciocalteu), attività antiossidante (DPPH) e antocianine totali nei campioni di radicchio tondo e lungo con seme di Massenzatica coltivato a Chioggia (TMC e LMC, rispettivamente). I risultati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016/2017 e 2017/2018 e fanno riferimento ad analisi effettuate sulla matrice fresca. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5.2 Diverso seme, terreni diversi

Uno degli obiettivi di questa tesi di dottorato è l'indagine delle due tipologie coltivate a Massenzatica in riferimento a campioni di diversa provenienza sia nella natura del seme sia nel territorio di coltivazione. Nello specifico, oltre ai campioni analizzati nella sezione precedente, sono stati considerati due tra i competitors ampiamente presenti sul mercato e che presentano il marchio IGP: il radicchio rosso tondo di Chioggia IGP ed il radicchio lungo precoce di Treviso IGP. In aggiunta a questi, è stato considerato anche il radicchio lungo di Chioggia, che non prevede il riconoscimento europeo ma che è largamente coltivato in Veneto ed è presente sul mercato. Correlare tutte le analisi effettuate ed affiancarle ad un approccio biomolecolare, con-

siderando le variabili "seme" e "terreno", permette di caratterizzare i prodotti di Massenzatica con il fine ultimo di concorrere al riconoscimento con marchio IGP.

Nelle tabella 4.18 sono elencate le raccolte per tipologia e provenienza dei campioni; le sigle fanno riferimento nelle lettere "T" e "L" alle tipologie tondo e lungo, nelle seconde lettere "C" alla provenienza del seme Chioggia e "T" Treviso e con le successive lettere "C" e "T" al terreno di coltivazione rispettivamente di Chioggia e Treviso.

Campione	Annata	Mese raccolta	Sigla specifica	Sigla generale
Radicchio Tondo di Chioggia IGP	2016/2017	Dicembre	TCC1	TCC
		Febbraio	TCC2	
	2017/2018	Dicembre	TCC3	
		Febbraio	TCC4	
Radicchio Lungo di Chioggia	2016/2017	Dicembre	LCC1	LCC
		Febbraio	LCC2	
	2017/2018	Dicembre	LCC3	
		Febbraio	LCC4	
Radicchio Lungo Precoce di Treviso IGP	2016/2017	Novembre	LTT1	LTT
	2017/2018	Novembre	LTT2	

**Tabella 4.18:** Elenco dei campioni di radicchio rosso con seme di Chioggia e coltivati a Chioggia (VE) e con seme di Treviso e coltivati a Treviso (TV).

Le analisi bromatologiche svolte riguardano, come di prassi, il contenuto in umidità, proteine e ceneri. I valori riportati in tabella 4.19 seguono l'andamento di quelli riportati nelle tabelle 4.2 e 4.13.

In particolare, dopo l'elaborazione mediante analisi della varianza ad una via, solo il parametro delle ceneri risulta statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) per distinguere il radicchio tondo di Chioggia dal lungo di Chioggia.

Campione	Umidità (g\100 g di s. fresca)	Proteine (g\100 g di s. secca)	Ceneri
TCC	93,20±0,17	18,70±2,08	11,92±0,99 <sup>a</sup>
LCC	93,47±0,09	20,50±0,93	9,09±0,44 <sup>a</sup>
LTT	93,45±0,45	23,10±2,19	9,23±3,20

**Tabella 4.19:** Caratterizzazione bromatologica dei campioni di radicchio tondo di Chioggia IGP, lungo di Chioggia e lungo precoce di Treviso IGP (TCC, LCC e LTT, rispettivamente). I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016/2017 e 2017/2018. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie prodotte e coltivate a Chioggia ( $p < 0,05$ ).

Il confronto del contenuto in macroelementi (tabella 4.20 vs 4.3 e 4.14) permette di osservare come il contenuto di calcio e magnesio sia estremamente confrontabile mentre il sodio presenta valori che superano i 4 mg/g di sostanza secca per LCC e LTT, mentre nei campioni precedentemente analizzati e in TCC è inferiore a 1 mg/g di sostanza secca. Anche la concentrazione del potassio differisce, sempre per i campioni LCC e LTT, da quanto presentato sino ad ora. Tutti e quattro i macroelementi considerati, unitamente a rame, zinco e manganese, si rivelano utili per la differenziazione delle tipologie coltivate a Chioggia. Osservando le concentrazioni degli oligoelementi (tabella 4.21 vs 4.4 e 4.15), si può notare come il ferro sia in accordo con i dati relativi ai campioni di Massenzatica, coltivati sia a Massenzatica sia a Chioggia. Per il rame,

i campioni LCC e LTT presentano invece valori superiori a 20  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca, rispetto a valori inferiori a 15  $\mu\text{g/g}$  per i campioni analizzati in precedenza. Lo zinco, nei campioni con seme di Massenzatica ed indipendentemente dal terreno di coltivazione, risulta compreso tra 18,34 e 25,06  $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca: il campione TCC appartiene a tale intervallo mentre sia LCC che LTT superano i 33  $\mu\text{g/g}$ . Per il manganese, infine, si confermano valori minori per la tipologia del tondo rispetto al lungo e si sottolinea, per il campione LCC, il valore più elevato tra tutti quelli registrati

Campione	Calcio (mg/g s.s.)	Sodio (mg/g s.s.)	Potassio (mg/g s.s.)	Magnesio (mg/g s.s.)
TCC	3,22±0,17 <sup>a</sup>	0,87±0,01 <sup>a</sup>	31,60±0,87 <sup>a</sup>	1,50±0,01 <sup>a</sup>
LCC	4,02±0,03 <sup>a</sup>	4,37±1,01 <sup>a</sup>	23,34±0,35 <sup>a</sup>	2,38±0,94 <sup>a</sup>
LTT	4,80±0,88 <sup>a</sup>	4,29±0,04 <sup>a</sup>	25,51±1,34 <sup>a</sup>	2,54±0,49 <sup>a</sup>

**Tabella 4.20:** Contenuto di macroelementi (mg/g di sostanza secca) nei campioni di radicchio tondo di Chioggia IGP, lungo di Chioggia e lungo precoce di Treviso IGP (TCC, LCC e LTT, rispettivamente). I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016/2017 e 2017/2018. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie prodotte e coltivate a Chioggia ( $p < 0,05$ ).

Campione	Ferro ( $\mu\text{g/g}$ s.s.)	Rame ( $\mu\text{g/g}$ s.s.)	Zinco ( $\mu\text{g/g}$ s.s.)	Manganese ( $\mu\text{g/g}$ s.s.)
TCC	40,25±8,25	9,13±1,02 <sup>a</sup>	22,90±2,75 <sup>a</sup>	9,03±0,59 <sup>a</sup>
LCC	40,00±0,01	20,55±0,21 <sup>a</sup>	33,15±0,49 <sup>a</sup>	27,55±0,49 <sup>a</sup>
LTT	52,90±9,88	23,52±5,65	33,13±1,76	21,18±1,45

**Tabella 4.21:** Contenuto di oligoelementi ( $\mu\text{g/g}$  di sostanza secca) nei campioni di radicchio tondo di Chioggia IGP, lungo di Chioggia e lungo precoce di Treviso IGP (TCC, LCC e LTT, rispettivamente). I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016/2017 e 2017/2018. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie prodotte e coltivate a Chioggia ( $p < 0,05$ ).

Il confronto tra i dati relativi alla percentuale di fibra (tabella 4.22) permette di affermare che non vi sono differenze significative in relazione alle variabili "seme" e "terreno": il contenuto di fibra totale è compreso tra il 32% ed il 37%, con simile ripartizione dei contributi di fibra solubile ed insolubile (si vedano le tabelle 4.5 e 4.16).

Anche in questo caso, tali parametri non sono utili per una distinzione tra radicchio tondo e lungo a parità di seme e terreno di coltivazione, come sottolineato dalla presenza dell'apice a.

Campione	Fibra Totale (% s.s.)	Fibra Solubile (% s.s.)	Fibra Insolubile (% s.s.)
TCC	37,41±1,01	15,30±1,94	22,11±2,65
LCC	37,30±2,12	13,62±0,99	23,69±1,78
LTT	32,84±3,92	9,03±1,11	23,81±2,82

**Tabella 4.22:** Contenuto di fibra (% su sostanza secca) nei campioni di radicchio tondo di Chioggia IGP, lungo di Chioggia e lungo precoce di Treviso IGP (TCC, LCC e LTT, rispettivamente). I risultati sono espressi come media±deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016/2017 e 2017/2018. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie prodotte e coltivate a Chioggia ( $p < 0,05$ ).

I risultati relativi alle analisi della componente antiossidante, evidenziano, ad eccezione del contenuto totale di polifenoli, differenze rispetto ai campioni analizzati in precedenza (tabella 4.23 vs 4.6 e 4.17). Nello specifico, per il radicchio con seme di Massenzatica, coltivato rispettivamente a Massenzatica e Chioggia, i dati relativi all'attività antiossidante erano estremamente lineari e prossimi a 6 mM/g Trolox eq. mentre per i campioni con diverso seme e terreno di coltivazione si ottengono valori compresi tra 3,19±0,80 mM/g Trolox eq. per LTT e 4,13±0,31

mM/g Trolox eq. per TCC. Anche per il contenuto di antocianine si registra un andamento differente: TCC, LCC e LTT presentano valori inferiori a 90  $\mu\text{g/g}$  cianidina-3-glucoside cloridrato, mentre per i campioni con seme di Massenzatica il range era compreso tra 303,7 $\pm$ 31,4  $\mu\text{g/g}$  cianidina-3-glucoside cloridrato per TMM e 137,3 $\pm$ 20,1  $\mu\text{g/g}$  cianidina-3-glucoside cloridrato per LMC.

Nelle sezioni precedenti, il contenuto in antocianine era il solo parametro, tra le analisi relative alla frazione ad attività antiossidante, utile per la differenziazione tra tondo e lungo: in questo caso si rivelano utili i dati relativi all'attività antiossidante.

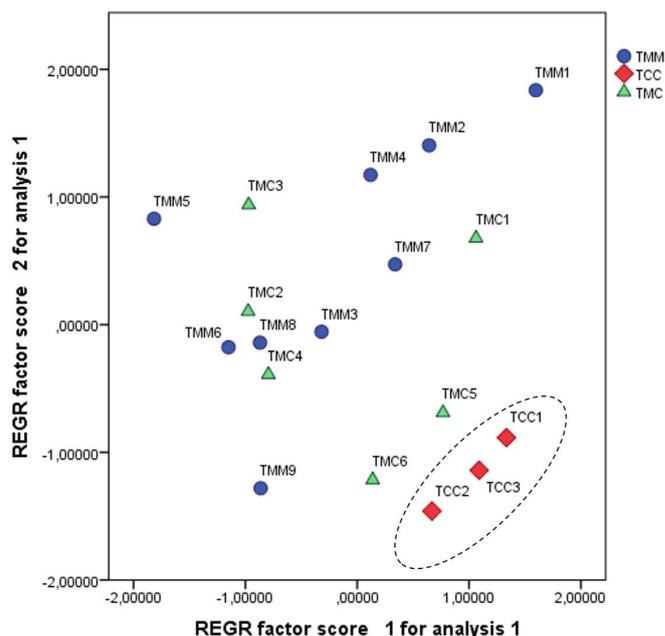
Campione	Folin-Ciocalteu $\mu\text{g/g}$ catechina eq.	DPPH mM/g Trolox eq.	Antocianine $\mu\text{g/g}$ cianidina-3-glucoside cloridrato
TCC	1338 $\pm$ 64	4,13 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	85,3 $\pm$ 13,0
LCC	114 $\pm$ 36	3,64 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	87,7 $\pm$ 15,6
LTT	950 $\pm$ 153	3,19 $\pm$ 0,80	71,6 $\pm$ 4,1

**Tabella 4.23:** Contenuto di polifenoli totali (Folin-Ciocalteu), attività antiossidante (DPPH) e antocianine totali nei campioni di radicchio tondo di Chioggia IGP, lungo di Chioggia e lungo precoce di Treviso IGP (TCC, LCC e LTT, rispettivamente). I risultati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard dei dati ottenuti nelle annate 2016/2017 e 2017/2018 e fanno riferimento ad analisi effettuate sulla matrice fresca. L'apice a indica che esiste differenza statisticamente significativa tra le due tipologie prodotte e coltivate a Chioggia ( $p < 0,05$ ).

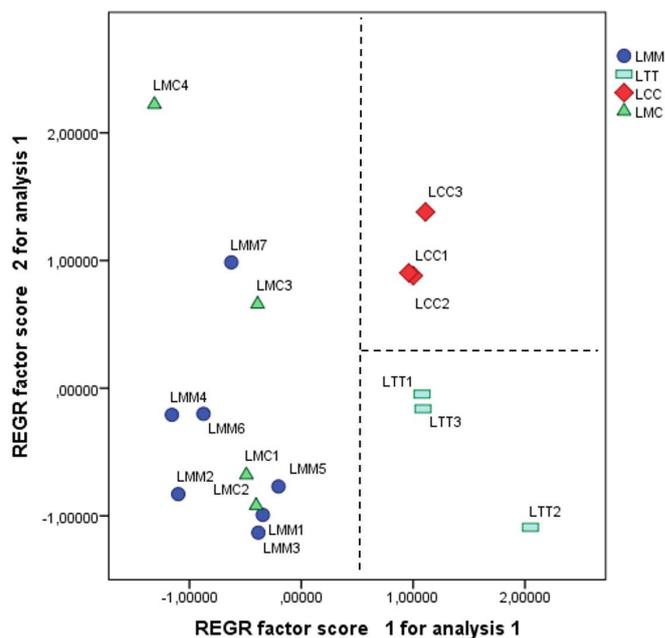
#### 4.5.3 Analisi statistica dei dati derivanti dalle analisi chimico-bromatologiche

Confrontando i dati riportati nelle sezioni precedenti si può affermare che, indipendentemente dall'origine del seme e dal terreno di coltivazione, sono globalmente 3 i parametri utili per una differenziazione secondo il test ANOVA ad una via tra radicchio tondo e lungo: il contenuto in ceneri e la concentrazione di calcio e magnesio.

La consultazione dei dati relativi alle analisi eseguite sulla totalità dei campioni non permette inoltre l'individuazione di un netto e costante trend che permetta l'identificazione del radicchio in relazione al territorio di produzione e coltivazione. A tale scopo, è stata quindi effettuata l'analisi delle componenti principali (PCA) rispettivamente tra i campioni di radicchio tondo e di radicchio lungo ed i grafici ottenuti sono riportati nelle figure 4.8 e 4.9. Per il radicchio tondo, si evidenzia come i campioni con seme di Chioggia e coltivati a Chioggia tendano a clusterizzare nel quarto quadrante (in basso a destra), separandosi dagli altri campioni. La maggior parte dei campioni con seme di Massenzatica si posiziona nella regione superiore del grafico ma non si individua una separazione in relazione al territorio di coltivazione. Il terreno in cui vengono coltivate le singole piantine di questo radicchio sembra quindi non influire sui costituenti principali di questo ortaggio. La PCA relativa al radicchio lungo mette in evidenza la differenziazione in relazione al diverso seme e differente territorio di coltivazione: nel primo quadrante (in alto a destra) si posizionano i campioni prodotti e coltivati a Chioggia e nel quarto quadrante quelli prodotti e coltivati a Treviso, separandosi dagli altri campioni che tendono a raggrupparsi nel terzo quadrante (in basso a sinistra). Anche in questo caso, si conferma l'indistinguibilità tra i campioni con seme di Massenzatica coltivati a Massenzatica e Chioggia, a conferma di quanto sopra riportato per la tipologia di radicchio tondo.



**Figura 4.8:** PCA relativa alle analisi bromatologiche e della frazione ad attività antiossidante dei campioni di radicchio tondo. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: TMM (seme Massenzatica, coltivato a Massenzatica), TMC (seme Massenzatica, coltivato a Chioggia) e TCC (seme Chioggia, coltivato a Chioggia). L'analisi della matrice delle due componenti estratte permette di affermare che le variabili che maggiormente incidono sono, in ordine decrescente di importanza: il contenuto di umidità, il contenuto proteico totale, la concentrazione del magnesio, i dati relativi all'attività antiossidante (saggio DPPH), la concentrazione dello zinco ed il contenuto della frazione minerale totale.



**Figura 4.9:** PCA relativa alle analisi bromatologiche e della frazione ad attività antiossidante dei campioni di radicchio lungo. Le sigle fanno rispettivamente riferimento a: LMM (seme Massenzatica, coltivato a Massenzatica), LMC (seme Massenzatica, coltivato a Chioggia), LCC (seme Chioggia, coltivato a Chioggia) e LTT (seme Treviso, coltivato a Treviso). L'analisi della matrice delle due componenti estratte permette di affermare che le variabili che maggiormente incidono sono, in ordine decrescente di importanza: il contenuto in antocianine, la percentuale di fibra dietetica solubile, la concentrazione del magnesio, la concentrazione del sodio, il contenuto della frazione minerale totale ed i dati relativi all'attività antiossidante (saggio DPPH).

#### 4.5.4 Confronto mediante analisi biomolecolari

L'approccio biomolecolare, rappresentato in questo studio da amplificazioni di tipo RAPD, è stato eseguito con il fine di caratterizzare dal punto di vista genetico i campioni provenienti da Massenzatica rispetto ad alcuni prodotti concorrenti presenti sul mercato. Le analisi sono state effettuate sia sui semi dei campioni di radicchio rosso di entrambi gli ecotipi e di differente provenienza, sia sulle foglie (si vedano le tabelle 4.24 e 4.25 per le relative sigle). In particolare, il confronto mediante analisi genetiche è stato svolto sui campioni di Massenzatica e sui soli concorrenti con marchio IGP precedentemente considerati, ovvero il radicchio rosso tondo di Chioggia ed il radicchio lungo precoce di Treviso, prodotti e coltivati quindi in terreni diversi.

Campione	Territorio produzione	Marchio	Mese raccolta	Sigla
Radicchio Tondo	Massenzatica(FE)		Novembre 2017	STMM1
			Febbraio 2018	STMM2
	Chioggia (VE)	IGP		STCC
Radicchio Lungo	Massenzatica (FE)			SLMM
	Treviso (TV)	IGP		SLTT

**Tabella 4.24:** Elenco dei campioni di semi di radicchio rosso indagati con analisi biomolecolari.

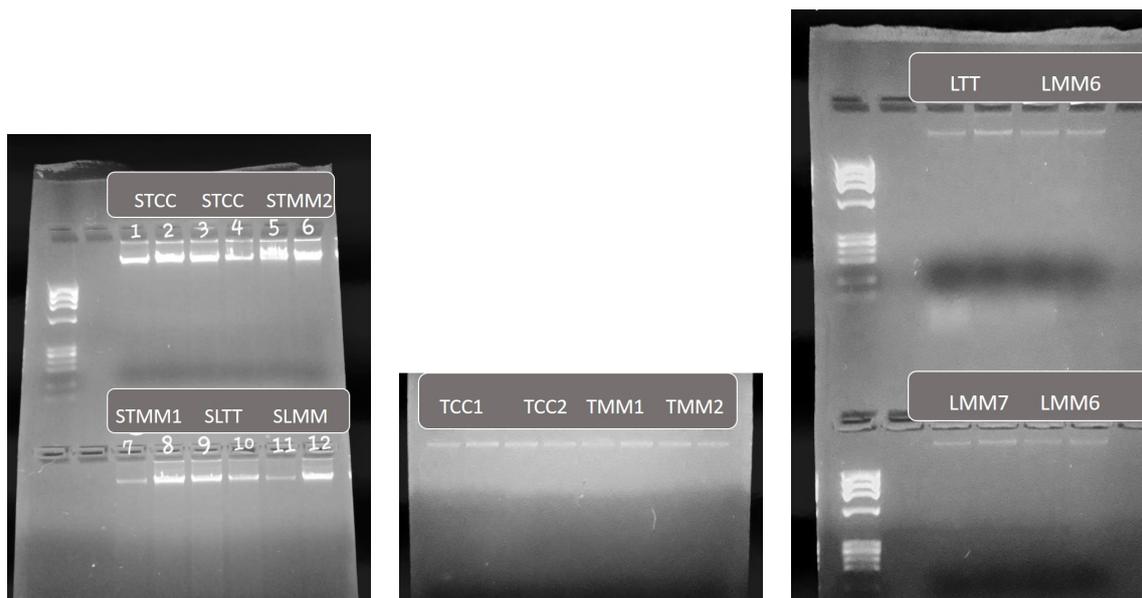
Campione	Territorio produzione	Marchio di riconoscimento	Mese raccolta	Sigla
Radicchio Tondo	Massenzatica (FE)		Dicembre 2017	TMM8
			Febbraio 2018	TMM9
	Chioggia (VE)	IGP	Dicembre 2017	TCC1
			Febbraio 2018	TCC2
Radicchio Lungo	Massenzatica (FE)		Novembre 2017	LMM6
			Dicembre 2017	LMM7
	Treviso (TV)	IGP	Novembre 2017	LTT

**Tabella 4.25:** Elenco dei campioni di foglie di radicchio rosso indagati con analisi biomolecolari. Le sigle fanno riferimento a quelle già elencate in tabella 4.1 e nella sezione 4.5.2.

#### Estrazione del DNA

Il radicchio appartenendo alla famiglia delle *Asteraceae*, sottofamiglia *Cichorioidea* contiene lattice, oltre ad un alta concentrazione di polifenoli coniugati, di oligo e polisaccaridi. La presenza di tutti questi composti rende problematico l'isolamento di acidi nucleici di alta qualità, complica l'estrazione del DNA stesso ed interferisce nelle reazioni enzimatiche [110]. Proprio per questo motivo, i protocolli standard ed i kit disponibili in commercio spesso non producono rese soddisfacenti in termini di estrazione ed amplificazione del DNA e necessitano di ulteriori modifiche in relazione alla matrice considerata.

L'estrazione del DNA è stata inizialmente eseguita sui semi dopo un'opportuna triturazione con mortaio e pestello ed omogeneizzazione del campione e successivamente direttamente sulle foglie di radicchio, per le quali dopo prove preliminari, è stata mantenuta la sola parte bianca della foglia in modo tale da limitare il più possibile il problema delle interferenze (in particolare le antocianine presenti principalmente nella frazione rosso-violacea). Per verificare



(a) Estrazione DNA genomico da semi.

(b) Estrazione DNA genomico da foglia di radicchio tondo.

(c) Estrazione DNA genomico da foglia di radicchio lungo.

**Figura 4.10:** Corsa elettroforetica su gel di agarosio di DNA genomico di diversi campioni di radicchio.

l'efficienza di estrazione è stata eseguita una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% p/v. Le corse elettroforetiche riportate in figura 4.10 mostrano come il protocollo adottato risulti idoneo per l'isolamento e l'estrazione dei DNA genomici dai campioni di radicchio.

I DNA genomici ottenuti sia dai semi sia dalle foglie sono risultati di buona qualità e non degradati. Per quantificare il DNA estratto e verificare la purezza degli estratti è stata eseguita la lettura spettrofotometrica a 260 nm, 280 nm e 230 nm. La concentrazione viene espressa in  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ed è definita dai valori di assorbanza a 260 nm attraverso una specifica formula di conversione. Il rapporto  $A_{260}/A_{280}$  è un indice del grado di purezza o clean-up del DNA genomico estratto, in quanto alla lunghezza d'onda di 280 nm si ha il massimo di assorbimento tipico di tutte le proteine; il rapporto  $A_{260}/A_{230}$  è indice invece del grado di purezza rispetto alle contaminazioni da fenoli, carboidrati e peptidi. Quando il valore del primo rapporto è prossimo a 1,7 ed il valore del secondo a 2,2, il DNA estratto si considera di ottima qualità. A scopo esemplificativo nelle tabelle 4.26 e 4.27 sono riportati i rapporti di assorbanza relativi alle contaminazioni da proteine e fenoli e la concentrazione del DNA estratto da alcuni dei campioni analizzati. Si può notare come i valori relativi al rapporto  $A_{260}/A_{280}$  siano superiori a 1,2 per i semi e prossimi a 1,7 per le foglie mentre per il rapporto  $A_{260}/A_{230}$  siano compresi tra 1,065 e 1,382, indice che il DNA risulta ancora contaminato da fenoli, sia nei semi che nelle foglie. Le quantificazioni in  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mostrano come sia maggiore la concentrazione di DNA estratto dai semi rispetto alle foglie. I dati ottenuti non precludono tuttavia le amplificazioni RAPD, che sono infatti state eseguite sia sul DNA genomico estratto dai semi, sia su quello estratto dalle foglie.

### Amplificazione RAPD

L'amplificazione di segmenti di DNA innescata da primer a sequenza casuale (tecnica RAPD), può mettere in luce eventuali polimorfismi e/o differenze a livello genetico poiché il numero ed il tipo di frammenti che si ottengono dalla reazione di amplificazione dipendono esclusivamente dalla sequenza del primer e da quella del DNA genomico amplificato.

Campione	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	DNA ( $\mu\text{g/mL}$ )
STMM1	1,244	1,117	1329,8
STMM2	1,231	1,097	1325,8
STCC	1,229	1,119	1450,8
SLMM	1,277	1,085	1115,7
SLTT	1,248	1,065	1117,0

**Tabella 4.26:** Rapporti di assorbanza e concentrazione ( $\mu\text{g/mL}$ ) del DNA estratto dai semi di radicchio rosso tondo e lungo.

Campione	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	DNA ( $\mu\text{g/mL}$ )
TMM8	1,714	1,212	634,9
TMM9	1,770	1,284	707,4
TCC1	1,767	1,336	535,8
TCC2	1,917	1,382	410,2
LMM6	1,449	1,069	408,8
LMM7	1,596	1,128	397,7
LTT	1,602	1,103	277,7

**Tabella 4.27:** Rapporti di assorbanza e concentrazione ( $\mu\text{g/mL}$ ) del DNA estratto dalle foglie di radicchio rosso tondo e lungo.

Durante le prime amplificazioni si sono verificati numerosi problemi nell'ottenere profili RAPD sufficientemente definiti e che potessero consentire le successive analisi d'immagine delle bande. Questi problemi sono riconducibili alle caratteristiche della tecnica RAPD, che richiede particolare cura nella fase di ottimizzazione ed alla matrice che contiene una elevata quantità di sostanze fenoliche che possono inibire la reazione di polimerizzazione a catena.

Partendo quindi da indicazioni di letteratura ed in relazione ai risultati dei test preliminari, è stata applicata una diluizione 1:5000 del DNA genomico estratto sia dai semi, sia dalle foglie [111]. Ciascun campione è stato sottoposto ad amplificazione utilizzando i 10 primers riportati in tabella 5.2 (sezione 5.7.4) ed il risultato dell'amplificazione è stato verificato mediante separazione elettroforetica su gel d'agarosio al 2% p/v.

Dei 10 primers utilizzati per l'analisi dei semi, tutti hanno presentato bande di amplificazione, in particolare i primer V19, M03 e H03 hanno evidenziato numerosi ampliconi.

A titolo di esempio in figura 4.11 (a) vengono mostrate le bande di amplificazione relative al primer OPH-03 (estrazione DNA dai semi), dove si evidenzia la presenza di una banda intensa a 1000 pb per tutti i campioni, indipendentemente dalla tipologia considerata e dalla zona di produzione, perciò riconducibile al genotipo specie *Cichorioidea*.

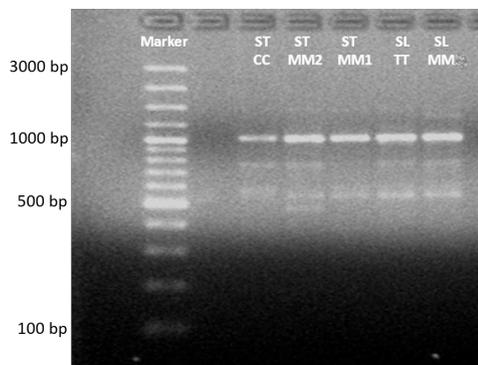
Analizzando le amplificazioni del radicchio tondo (estrazione DNA da foglia) si evidenzia come due primer (B10 e D08) non hanno determinato la formazione di ampliconi, mentre per gli altri primers utilizzati sono state registrate una o più bande. In figura 4.11 (b), si può notare a titolo di esempio come l'amplificazione con primer OPV-19 dia origine ad una banda intensa a 500 pb per tutti i campioni e quindi caratteristica del fenotipo tondo; gli ampliconi a 400 pb si evidenziano invece per i soli campioni TCC1 e TCC2 e potrebbero quindi essere caratteristici per l'ecotipo prodotto e coltivato a Chioggia. L'analisi genetica del radicchio lungo (estrazione DNA da foglia) ha presentato ampliconi per tutti i primer analizzati, seppur con diversa intensità di banda. I primer D08, B10, M13 e M03 e H03 hanno mostrato più bande di amplificazione, mentre gli altri primer hanno amplificato un solo segmento corrispondente ad una singola banda. Nella figura 4.11 (c), relativa al primer OPB-05 sui campioni di DNA estratto dalle foglie del radicchio lungo, si individua una banda a 700 pb, di differente intensità, presente su tutti i campioni e caratteristica quindi di tale fenotipo.

L'individuazione dei singoli ampliconi non permette tuttavia di caratterizzare i campioni in relazione al territorio di produzione ed è per questo che si rende necessaria una valutazione

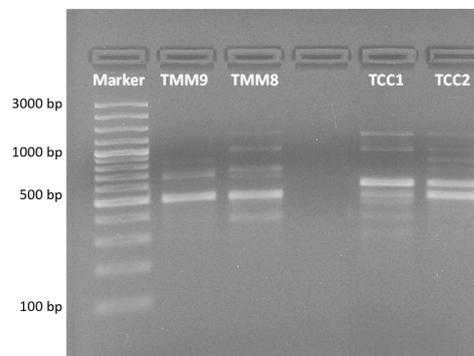
globale dei risultati delle amplificazioni di tipo RAPD, in modo tale da valutare la variabilità genetica tra i campioni oggetto di studio. Per fare ciò è stata costruita una matrice in cui sono stati inseriti valori numerici che prendono in considerazione l'assenza o la presenza di amplificazione e, in quest'ultimo caso, l'assenza o la presenza di ampliconi. In particolare, per ogni profilo elettroforetico, nella matrice è stato inserito il valore 0 nel caso in cui il campione non mostri amplificazione con quel tipo di primer, il valore 1 nel caso in cui il campione presenti l'amplicone, ed il valore 2 nel caso di un campione amplificato ma che non presenti quel determinato amplicone. Sulla matrice così ottenuta è stata successivamente applicata l'analisi delle componenti principali.

In figura 4.12 è riportata la PCA per le analisi genetiche effettuate sui semi e si può notare come vi sia una differenziazione in relazione al fenotipo, che distingue quindi il radicchio lungo da quello tondo. Per i campioni di radicchio tondo provenienti da Massenzatica, il Consorzio ha fornito due diversi semi (STMM1 e STMM2), corrispondenti a fioriture in tempi successivi e che danno luogo quindi a raccolte in mesi differenti (Novembre 2017 e Febbraio 2018). Il grafico evidenzia come i due campioni di seme di radicchio tondo di Massenzatica, siano quasi esattamente sovrapponibili tra loro e diversi da quello di Chioggia. Questa evidenza sperimentale potrebbe essere indice di una effettiva differenza a livello genetico tra i semi dei campioni di Massenzatica e di Chioggia, a parità di ecotipo.

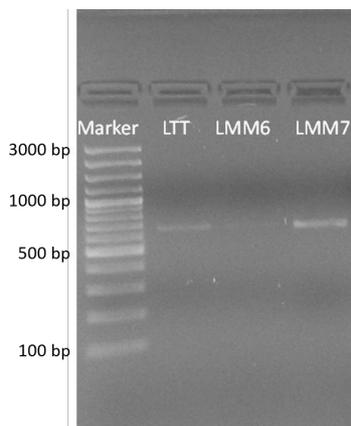
Per il radicchio tondo, le analisi sui campioni di foglia sono state eseguite sulle raccolte di Dicembre 2017 e Febbraio 2018, sia per i campioni di Massenzatica, sia per quelli di Chioggia IGP. In figura 4.13 si evidenzia come esista una distinzione in relazione al territorio di produzione e coltivazione, sottolineando quindi come i campioni presentino alcune differenze a livello genetico. Anche il confronto tra il radicchio lungo di Massenzatica (raccolte Novembre 2017 e Dicembre 2017) ed il precoce di Treviso IGP, porta ad un riscontro positivo poiché i due campioni si differenziano in relazione al territorio di produzione e coltivazione.



**(a)** Separazione elettroforetica RAPD con primer OPH-03 dei campioni di DNA estratto dai semi di radicchio. Le sigle fanno riferimento ai campioni: radicchio tondo di Chioggia (STCC), radicchio tondo di Massenzatica (STMM1 e STMM2), radicchio lungo di Treviso (SLTT), radicchio lungo di Massenzatica (SLMM).

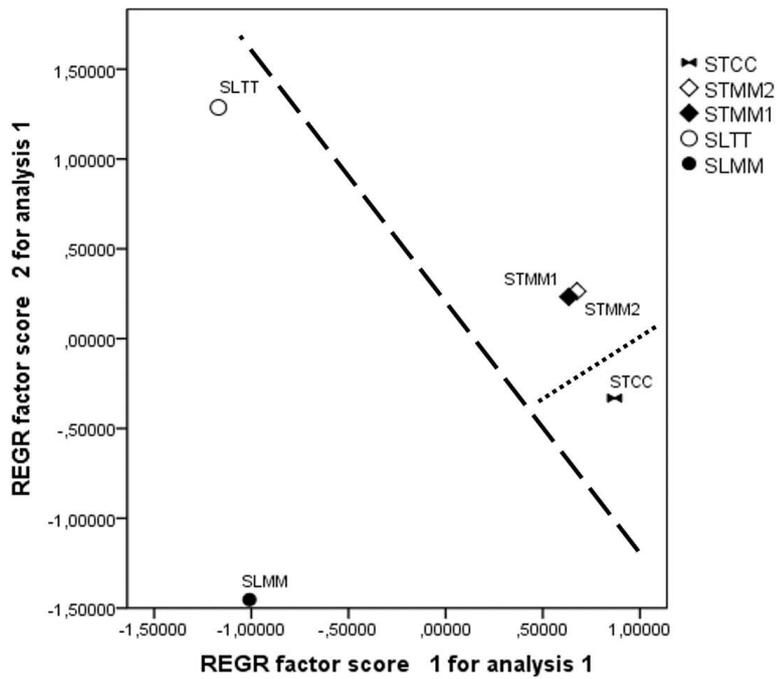


**(b)** Separazione elettroforetica RAPD con primer OPV-19 dei campioni di DNA estratto dalle foglie di radicchio tondo. Le sigle fanno riferimento ai campioni: radicchio tondo di Massenzatica (TMM9 e TMM8), radicchio tondo di Chioggia (TCC1 e TCC2).

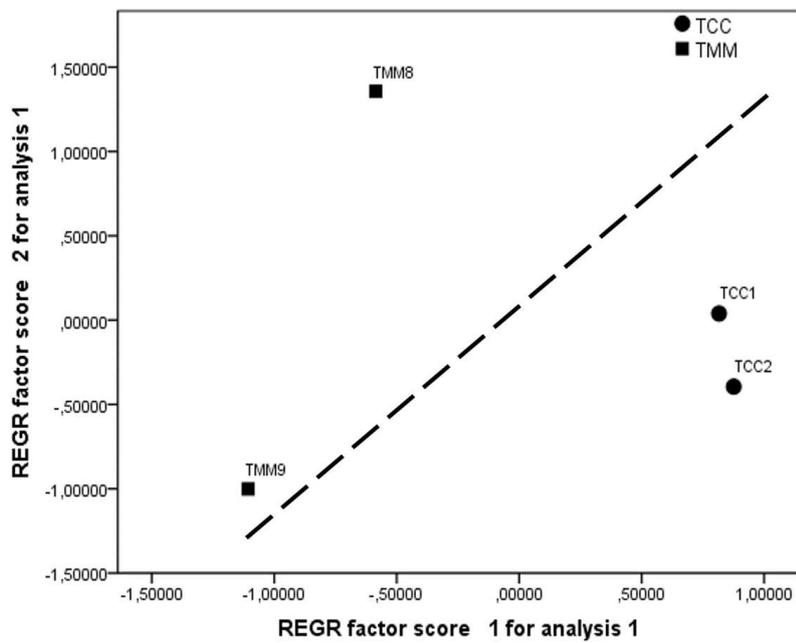


**(c)** Separazione elettroforetica RAPD con primer OPB-05 dei campioni di DNA estratto dalle foglie di radicchio lungo. Le sigle fanno riferimento ai campioni: radicchio lungo di Treviso (LTT), radicchio lungo di Chioggia (LMM6 e LMM7).

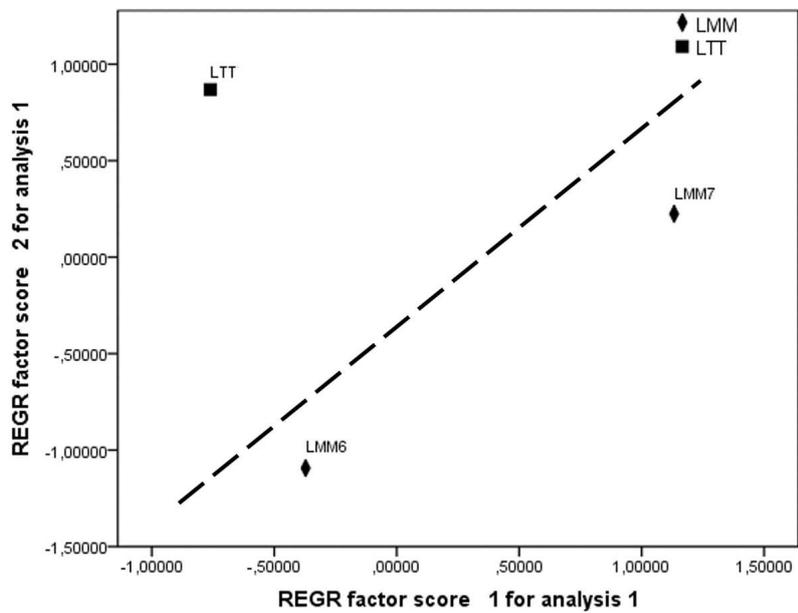
**Figura 4.11**



**Figura 4.12:** Analisi statistica PCA relativa alle analisi biomolecolari effettuate sui semi, evidenziando il fenotipo ed il luogo di produzione.



**Figura 4.13:** Analisi statistica PCA relativa alle analisi biomolecolari effettuate sulle foglie di radicchio tondo, evidenziando luogo di produzione e coltivazione.



**Figura 4.14:** Analisi statistica PCA relativa alle analisi biomolecolari effettuate sulle foglie di radicchio lungo, evidenziando luogo di produzione e coltivazione.



## 5 | Materiali e metodi

### 5.1 Analisi bromatologiche

#### 5.1.1 Determinazione del contenuto di umidità e sostanza secca

La sostanza secca in un campione è la parte residua dopo l'allontanamento dell'acqua. Per la sua determinazione vengono utilizzati pesafiltri vuoti e numerati. Questi vengono pesati, riempiti con i campioni da analizzare, sottoposti a nuova pesata e successivamente posti in stufa a 80 °C overnight fino a peso costante. In seguito sono stati raffreddati in un essiccatore fino a raggiungere la temperatura ambiente. Si procede calcolando il peso secco ed il relativo contenuto in acqua dei campioni. Il risultato dell'umidità è espresso in percentuale peso/peso (% p/p).

#### 5.1.2 Determinazione del contenuto proteico totale

Si esegue con il tradizionale metodo Kjeldahl utilizzando un apparecchio semiautomatico (digestore, distillatore). Inizialmente si procede con la mineralizzazione del campione: un'aliquota di sostanza secca circa esattamente pesata (1 g) viene posta in un provettone con 0,7 g di ossido di rame, 10 g di solfato di potassio e 25 mL di acido solforico 96%, quindi si lascia mineralizzare per 40 minuti ad una temperatura di 400 °C. Tutto l'azoto presente si trasforma in  $(NH_4)_2SO_4$ . Al termine della mineralizzazione si lascia raffreddare e si aggiungono 10 mL di acqua deionizzata e 25 mL di tiosolfato di sodio. Il solfato d'ammonio, fatto reagire in eccesso di base forte, libera ammoniaca, che viene distillata in corrente di vapore e raccolta in beuta. In questa beuta, è contenuto  $H_2SO_4$  in quantità e concentrazione nota. Retrotitolando con NaOH 0,5 N si risale alla quantità di azoto, che moltiplicata per un fattore di conversione (6,25) esprime direttamente la quota proteica [112].

#### 5.1.3 Determinazione del contenuto minerale totale

La quantificazione del contenuto minerale totale si esegue trattando il campione essiccato circa esattamente pesato (1 g) in muffola a 570 °C per 6 ore. La carbonizzazione e successiva completa ossidazione della frazione organica ad acqua ed anidride carbonica, allontanate per evaporazione, permette di ottenere la componente inorganica o frazione minerale totale. Il quantitativo di ceneri si ottiene per differenza con la tara iniziale della capsula e rapportando il valore a 100.

#### 5.1.4 Determinazione del contenuto minerale specifico

L'analisi della componente minerale si effettua utilizzando uno spettrofotometro atomico Perkin Elmer 1100B in configurazione fiamma ad aria/acetilene. Prima dell'analisi spettrofotometrica il campione deve essere sottoposto a mineralizzazione per mineralizzare tutta la matrice

e solubilizzare tutti i metalli presenti sotto forma di sali nitrati. La mineralizzazione prevede l'aggiunta di 5 mL di  $HNO_3$  concentrato al campione circa esattamente pesato, il tutto posto all'interno di provettoni muniti di refrigerante a ricaduta, con lo scopo di condensare i vapori che si formano durante la mineralizzazione e recuperare così eventuali metalli trascinati via dai vapori stessi. I provettoni sono posti all'interno del mineralizzatore che provvederà al loro riscaldamento in 5 step secondo lo schema di temperature riportato in tabella 5.1.

	Temperatura (°C)	Tempo (minuti)
Step 1	50	20
Step 2	90	20
Step 3	140	20
Step 4	200	40
Step 5	240	40

**Tabella 5.1:** Parametri del programma di riscaldamento del processo di mineralizzazione.

Al termine del processo di mineralizzazione, tutte le molecole organiche sono ossidate a  $H_2O$  e  $CO_2$ , mentre tutti i metalli presenti si sono convertiti nei rispettivi sali nitrati. Terminato il processo, il sistema viene lasciato raffreddare, si aggiunge 1 mL di  $H_2O_2$  al 40% p/v e si esegue uno step di riscaldamento per 20 minuti a 200 °C. Una volta raffreddato, il campione mineralizzato viene trasferito in un matraccio e portato ad un volume di 20 mL; la soluzione viene agitata e filtrata con carta Whatman senza ceneri. Oltre ai campioni viene sempre preparato un bianco, seguendo la medesima procedura.

Per ogni metallo che si intende analizzare viene costruita la retta di taratura con opportuni standard a concentrazione nota. Nell'intervallo di concentrazioni selezionate per la costruzione della retta è applicabile la legge di Lambert-Beer, che associa a determinati valori di assorbanza i rispettivi valori di concentrazione. I campioni vengono quindi analizzati, dopo opportuna diluizione, con spettrofotometro ad assorbimento atomico (Perkin-Elmer), che fornisce automaticamente il valore della concentrazione (ppm) del metallo considerato.

### 5.1.5 Determinazione della frazione lipidica

La determinazione della frazione lipidica viene eseguita previa estrazione con metodo Soxhlet. Viene quindi eseguita un'estrazione ponderale del grasso dal campione (circa 3 grammi di campione essiccato) con etere etilico (50 mL) in un apparecchio distillatore (VELP Scientifica, Milano). Il processo estrattivo si compone di tre fasi: 30 minuti in immersione in solvente, 30 minuti con refluxo a ricadere, 10 minuti di recupero del solvente. Al termine, dopo raffreddamento a temperatura ambiente, si pesa l'estratto ottenuto, risalendo così al contenuto totale di lipidi.

### 5.1.6 Determinazione del profilo degli acidi grassi mediante GC-MS

Il contenuto lipidico estratto con metodo Soxhlet viene recuperato con 3 mL di esano e transesterificato con 1,5 mL di metanolo con idrossido di sodio al 5%. La miscela così ottenuta viene agitata per qualche minuto e viene effettuato il recupero della fase superiore, contenente gli acidi grassi metilati che verranno analizzati mediante GC-MS. Lo strumento utilizzato è un Gascromatografo VARIAN 3900 con iniettore split-splitless e rivelatore spettrometro di massa VARIAN 2100 ad impatto elettronico che consente di effettuare l'analisi in tempo reale dei singoli composti in uscita dalla colonna, permettendo una determinazione quali-quantitativa

mediante il confronto dello spettro registrato con spettri memorizzati in libreria. Le condizioni sperimentali sono:

- colonna Zebron ZB-WAX Phenomenex (60 m x 0,25 mm) con fase stazionaria polare di polietilenglicole (0,25  $\mu\text{m}$ )
- temperatura massima pari a 200 °C
- temperatura iniettore pari a 260 °C
- gas carrier elio, con pressione iniziale di 10 psi
- temperatura iniziale pari a 100 °C mantenuta per 2 minuti, gradiente di temperatura con aumento pari a 10 °C/min fino al raggiungimento di 200 °C e successiva isoterma per 58 minuti
- solvent delay pari a 3 minuti
- modalità di iniezione split e modalità di acquisizione scan, con rapporto di splittaggio 1:20
- volume iniettato pari a 1  $\mu\text{L}$
- durata totale della corsa pari a 70 minuti.

I picchi cromatografici registrati corrispondono agli esteri metilici degli acidi grassi presenti nel campione. L'identificazione è stata eseguita mediante confronto dello spettro di massa con quelli presenti nella libreria NIST dello strumento mentre l'area sottesa ad ogni picco ha permesso la quantificazione dei singoli composti. Nello specifico, è stata eseguita la quantificazione sommando tra loro tutte le aree registrate e rapportando poi a cento il dato di ogni singolo acido grasso identificato.

### 5.1.7 Determinazione della fibra alimentare solubile ed insolubile

La determinazione della fibra alimentare è stata eseguita utilizzando un kit enzimatico (Total Dietary Fiber Assay Kit, Megazyme®). 1 grammo circa esattamente pesato di campione essiccato viene addizionato con 40 mL di MES/TRIS e 50  $\mu\text{L}$  di  $\alpha$ -amilasi (per gelatinizzare, idrolizzare e depolimerizzare l'amido), posto in bagno termostato a 95 °C per 35 minuti. Terminata l'incubazione, si lasciano raffreddare i campioni fino a 60 °C e si addizionano 10 mL di acqua deionizzata e 100  $\mu\text{L}$  di proteasi (per solubilizzare e depolimerizzare le proteine), si incuba nuovamente a 60 °C per 30 minuti. Si aggiungono 5 mL di HCl 0,561 M; si modifica il pH con NaOH 4 M fino ad un valore compreso tra 4,1 e 4,8, si addizionano 200  $\mu\text{L}$  di amiloglicosidasi (per idrolizzare frammenti di amido in glucosio) e si pone in incubazione e agitazione per altri 30 minuti. La fibra insolubile si ottiene filtrando su un crogiolo contenente 1g di celite. La soluzione rimanente è recuperata con etanolo al 96% (in quantità 4 volte superiore al volume di partenza) per far precipitare la fibra solubile, che verrà successivamente lasciata depositare per qualche ora e successivamente filtrata anch'essa su celite. Il quantitativo di fibra solubile ed insolubile si ottiene per differenza con la tara iniziale dei singoli crogioli e riportando il valore a 100, mentre il valore di fibra totale è la somma delle frazioni solubile ed insolubile. Il contenuto di fibra (solubile, insolubile e totale) deve tuttavia essere corretto per il contenuto in proteine e ceneri. È quindi necessario effettuare un'analisi in doppio aggiuntiva così da ottenere un residuo di ciascun tipo di fibra per l'analisi delle proteine ed il secondo residuo del duplicato per le analisi delle ceneri. Il calcolo della percentuale proteica viene svolto dopo analisi con metodo Kjeldahl, utilizzando il fattore 6,25 come fattore di conversione (sezione

5.1.2). Il calcolo della percentuale in ceneri prevede la metodica riportata nella sezione 5.1.3. La somma delle due percentuali deve essere sottratta ai valori di fibra precedentemente ottenuti.

## 5.2 Valutazione delle caratteristiche organolettiche

### 5.2.1 Determinazione del grado Brix della polpa di zucca

Il grado Brix è una misura delle sostanze solide disciolte in un liquido e nel caso di frutta e verdura è indice della quantità di zucchero disciolto in acqua. Il punteggio in gradi Brix viene utilizzato come indice di qualità nell'industria alimentare in quanto direttamente proporzionale alla dolcezza del frutto e pertanto alla sua piacevolezza organolettica. La misura prevede la valutazione dell'attività ottica delle sostanze disciolte in soluzione e per i campioni di zucca è stata effettuata mediante rifrattometro manuale. Alcune gocce del succo della polpa di zucca vengono poste sul vetrino del rifrattometro e, indirizzando lo strumento verso una fonte luminosa, è possibile effettuare la lettura della gradazione.

### 5.2.2 Determinazione di pH e acidità della zucca

Tutti gli alimenti, data la loro particolare e specifica composizione chimica, presentano un determinato grado di acidità che influisce sul sapore ed è quindi un indicatore della qualità del prodotto considerato. Il pH viene misurato mediante piaccametro e l'acidità totale attraverso una titolazione con NaOH. 5 grammi circa esattamente pesati di polpa di zucca opportunamente omogeneizzata vengono diluiti con acqua milli-Q. La soluzione ottenuta viene titolata con NaOH 0,1 M fino a pH pari a 8,5. L'acidità viene espressa come grammi di acido citrico su 100 grammi di polpa mediante la seguente relazione:

$$\frac{g_{ac.citrico}}{100gzucca} = \frac{V_{NaOH} * N_{NaOH} * PE_{ac.citrico}}{peso} \quad (5.1)$$

### 5.2.3 Determinazione e quantificazione degli acidi organici nella zucca

#### Estrazione chimica degli acidi organici

La procedura di estrazione degli acidi organici dalla purea di zucca è stata ottimizzata a partire da metodi già pubblicati in letteratura [89]. 5 grammi circa esattamente pesati di purea di zucca precedentemente frullata, sono stati posti all'interno di falcon da 50 mL. Dopo l'aggiunta di 15 mL di acqua di milli-Q, il campione è stato omogeneizzato con Ultra-Turrax® per un minuto e centrifugato (7000 rpm, 5 °C) per 10 minuti. Il surnatante è stato recuperato e filtrato (filtri Minisart RC 25, 0,45 µm) in modo da poter essere iniettato in elettroforesi capillare.

#### Analisi degli acidi organici mediante elettroforesi capillare

Le analisi sono state effettuate utilizzando il sistema di elettroforesi capillare P/ACE MDQ (Beckmann), dotato di detector Diode Array. L'elettroforesi capillare (CE) è infatti un tecnica separativa molto utilizzata nel settore agro-alimentare e particolarmente indicata per la classe di composti considerata [112]. Il limitato uso di solventi organici ed il ridotto volume dei campioni e delle soluzioni necessarie all'analisi, accompagnati da un'elevata efficienza strumentale, rendono particolarmente vantaggioso l'utilizzo dell'elettroforesi capillare.

Lo strumento utilizzato è dotato di cartuccia con finestra di rivelazione di 100x800 µm e capillare avente diametro interno e lunghezza rispettivamente di 75 µm e 50 cm. Il detector copre l'intervallo di rivelazione 190-250 nm e gli spettri sono stati acquisiti a 200 nm. Il tampone

utilizzato è stato preparato con  $Na_2HPO_4$  180 mM e CTAB 1 mM; il pH della soluzione è stato acidificato con  $H_3PO_4$  fino al valore di 6,25. L'iniezione del campione dura 5 secondi e viene effettuata a una pressione di 1 psi, la separazione prevede un voltaggio di -12 KV per 15 minuti a 25 °C. Prima di ogni analisi, il sistema effettua un lavaggio del capillare della durata di 3 minuti con NaOH 0,1 N, 2 minuti con acqua e 3 minuti con il tampone.

Sono stati identificati, mediante confronto con gli standard di riferimento e gli spettri di assorbimento, l'acido fumarico, malico e citrico. La quantificazione di questi 3 acidi organici nei campioni di zucca è stata effettuata previa costruzione delle rispettive rette di calibrazione. Le analisi sono state svolte dapprima sui diversi quarti di entrambe le varietà di zucca e successivamente sui campioni totali omogeneizzati.

### 5.3 Analisi della componente antiossidante e dei composti funzionali nel radicchio

#### 5.3.1 Estrazione chimica della frazione ad attività antiossidante

Le molecole ad attività antiossidante caratteristiche del radicchio sono principalmente acidi fenolici e flavonoidi (si consulti la sezione 1.5.2). Generalmente queste classi di composti sono estratte da piante naturali mediante estrazione solido-liquido, utilizzando come solventi di estrazione alcoli (metanolo, etanolo), acetone, etere etilico ed acetato di etile. Gli acidi fenolici maggiormente polari non possono tuttavia essere estratti in maniera esaustiva con miscele di solventi organici e vengono quindi raccomandate miscele idroalcoliche [113]. Esistono inoltre altri fattori (pH, temperatura, rapporto volumetrico campione-solvente, estrazioni ripetute) che risultano fondamentali per conseguire un'estrazione esaustiva.

Nelle matrici di tipo alimentare, i composti fenolici si possono trovare in forma libera o coniugata (ad esempio con molecole glicosidiche) di natura solubile; la frazione solubile rappresenta generalmente almeno l'80% dei composti fenolici totali [56].

Il metodo di estrazione della frazione solubile ad attività antiossidante applicato prevede la pesata di circa 5 g di campione congelato all'interno di falcon da 50 mL. Vengono aggiunti 20 mL di miscela estrattiva metanolo/acqua/acido formico 80/20/0,1% (v/v). Il campione viene omogeneizzato con Ultra-Turrax® per un minuto, posto in agitazione a temperatura ambiente ed al riparo da fonti luminose per un'ora ed infine lasciato a macerare per tutta la notte. La miscela viene successivamente centrifugata per 7 minuti (9000 rpm, 5 °C) e si effettua il recupero del surnatante. Sul residuo solido vengono eseguiti altri 5 step estrattivi con 10 mL della stessa miscela, agitazione a temperatura ambiente ed al riparo da fonti luminose per 10 minuti, centrifuga e recupero del surnatante. Il residuo solido viene conservato, le fasi liquide vengono riunite e poste in freezer a -20 °C fino al momento dell'analisi.

#### 5.3.2 Determinazione del contenuto totale di polifenoli: metodo di Folin-Ciocalteu

Il metodo elaborato da Otto Folin e Vintila Ciocalteu è il sistema più semplice ed utilizzato per la quantificazione dei polifenoli totali contenuti in un campione. Il metodo prevede l'utilizzo di un reattivo formato da una miscela di acido fosfotungstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e acido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), in cui entrambi i metalli presentano stato di ossidazione +6 e conferiscono alla miscela una colorazione gialla. In presenza di composti fenolici, si verifica una reazione di trasferimento elettronico a carico dei gruppi ossidrilici ed i due acidi si riducono ai rispettivi ossidi ( $W_8O_{23}$  e  $Mo_8O_{23}$ ), dando origine ad un complesso che conferisce colorazione blu alla soluzione e che può essere dosato spettrofotometricamente [114]. Il segnale di assorbanza a 700 nm ottenuto è infatti direttamente proporzionale alla quantità di gruppi fenolici presenti in soluzione. Questo saggio prevede l'utilizzo di:

- 2.5 mL di acqua deionizzata
- 100  $\mu\text{L}$  di campione o standard di riferimento (+)-catechina, utilizzato per la costruzione della retta di calibrazione alle concentrazioni di 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 ppm
- 500  $\mu\text{L}$  di reattivo di Folin
- 2.0 mL di carbonato di sodio al 10%, dopo aver lasciato i campioni al buio per 5 minuti

I campioni vengono lasciati al buio per 90 minuti e successivamente si effettua la lettura spettrofotometrica a 700 nm. Il contenuto di polifenoli viene espresso come  $\mu\text{g}$  di catechina per g di campione.

Grazie alla sua versatilità questo metodo è ampiamente utilizzato per stimare il contenuto totale di polifenoli in matrici vegetali, in particolare quando si deve confrontare un numero elevato di campioni.

### 5.3.3 Determinazione della capacità antiossidante totale: metodo DPPH

Il metodo DPPH è un metodo indiretto (inibente), che viene utilizzato per misurare la capacità antiossidante totale di una soluzione, cioè le moli di radicale libero che essa è in grado di inibire. Si tratta di un metodo semplice, di tipo colorimetrico, basato sull'utilizzo di un radicale azotato, il 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH $\cdot$ ), che grazie alla sua struttura presenta delocalizzazione dell'elettrone spaiato sull'intera molecola (figura 5.1).

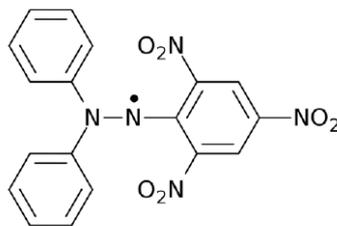


Figura 5.1: Struttura chimica del radicale DPPH $\cdot$ .

La struttura molecolare è responsabile del colore violaceo di questa sostanza che presenta una banda di assorbimento alla lunghezza d'onda di 515 nm. La forma non radicalica perde invece tale caratteristica e si presenta con una colorazione giallo tenue. Il saggio monitora, mediante misure spettrofotometriche alla  $\lambda$  stabilita, l'inibizione del radicale stabile da parte delle sostanze antiossidanti presenti nella soluzione in esame. L'attività antiossidante può essere definita o come riduzione percentuale della concentrazione del DPPH, o come quantità di antiossidante necessario a ridurre del 50% la concentrazione iniziale di DPPH [115]. Il potere antiossidante è espresso come Trolox equivalenti e corrisponde alla concentrazione millimolare di una soluzione di Trolox la cui capacità antiossidante equivale a quella di una soluzione 1 mM della sostanza in esame.

Questo saggio prevede l'utilizzo di:

- una soluzione di DPPH $\cdot$  0,06 mM (il radicale risulta stabile a temperatura ambiente per 12 ore se conservato al riparo da fonti luminose)
- una soluzione dello standard di riferimento Trolox, con la quale viene costruita la retta di calibrazione alle concentrazioni di 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 mM
- estratti fenolici, opportunamente diluiti

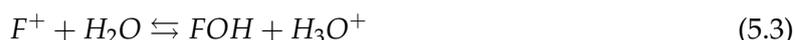
Un'aliquota pari a 1,45 mL della soluzione di DPPH viene posta in cuvette di quarzo (10 mm di cammino ottico) e si effettua la lettura alla lunghezza d'onda di 515 nm, ottenendo il valore dell'assorbanza al tempo zero ( $A_{t=0min}$ ). Si aggiungono 50  $\mu$ L di standard o di campione e si registra il valore dell'assorbanza dopo 15 minuti, durante i quali la soluzione viene mantenuta al buio ( $A_{t=15min}$ ). Il calcolo della percentuale di inibizione avviene secondo la seguente formula:

$$\%inibizioneDPPH^{\bullet} = \frac{A_{t=0min} - A_{t=15min}}{A_{t=15min}} * 100 \quad (5.2)$$

Dalla percentuale di inibizione si calcola quindi la capacità antiossidante dei campioni, espressa come mM di Trolox equivalenti.

### 5.3.4 Determinazione della quantità di antociani

Le antocianine, pigmenti idrosolubili appartenenti alla famiglia dei flavonoidi e responsabili del colore violaceo del radicchio, presentano attività antiossidante (si consulti la sezione 1.5.2). Il pH delle soluzioni influenza fortemente l'intensità ed il colore delle antocianine percepito dall'occhio umano. Le variazioni di colore sono infatti conseguenza diretta della protonazione e deprotonazione delle molecole secondo l'equilibrio riportato [116]:



In soluzione acquosa fortemente acida (pH $\sim$ ) la forma predominante è il catione rosso flavilio ( $F^+$ ), che diventa incolore quando si presenta nella forma FOH ed il pH viene portato a 5. Il metodo utilizzato prevede misure spettrofotometriche ai valori di pH=1,0 e pH=4,5 secondo il metodo di Rapisarda et al. (1994) [116]. Il metodo prevede la preparazione di una soluzione tampone di potassio cloruro a pH=1 e di una soluzione tampone di sodio acetato a pH=4,5. Il campione va diluito con i tamponi in modo tale che il campione non deve superare il 20% del volume totale, si lasciano le diluizioni in incubazione al buio per 15 minuti e successivamente si legge ogni soluzione alla lunghezza d'onda di 510 nm. I valori ottenuti si inseriscono nella seguente formula così da trovare la concentrazione di antocianine in mg/L:

$$C_{mg/L} = (A_{pH=1} - A_{pH=4.5}) * 484.82 * \frac{1000}{24825} * DF \quad (5.4)$$

dove i valori di assorbanza a 510 nm sono misurati rispettivamente ai valori di pH pari a 1 e 4,5; 484,82 corrisponde alla massa molecolare della cianidina-3-glucoside cloridrato e 24825 è il suo coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) a 510 nm e pH=1; DF corrisponde al fattore di diluizione.

Al fine di rendere i dati confrontabili coi risultati ottenuti dalle altre analisi effettuate sui polifenoli, il contenuto viene espresso in mg cianidina-3-glucoside cloridrato/100g.

## 5.4 Determinazione e quantificazione dei composti fenolici contenuti nel radicchio mediante analisi LC-MS/MS

### 5.4.1 Estrazione chimica

I composti fenolici sono stati estratti seguendo la procedura riportata nella sezione 5.3.1. Le frazioni sono state riunite ed è stato prelevato 1 mL che, dopo filtrazione (nylon, 0,22  $\mu$ m), è stato analizzato.

## 5.4.2 Estrazione enzimatica

I composti fenolici si possono spesso trovare chimicamente legati a molecole di natura polisaccaridica. L'estrazione di tipo solido-liquido con solventi organici risulta quindi non esaustiva ed è necessario procedere con un'idrolisi di tipo enzimatico, in grado di estrarre i polifenoli legati alla fibra [117].

In seguito all'estrazione chimica, al residuo solido vengono addizionati 35 mL di acqua milliQ, 2 mL di sali biliari in soluzione, 1 mL pancreatina in soluzione e 0,5 mL di pepsina in soluzione. Il campione viene omogeneizzato con Ultra-Turrax® e sottoposto ad agitazione costante a 37 °C per 2 ore. Al termine del periodo di incubazione, il campione viene centrifugato (9000 rpm, 5 °C) ed il surnatante recuperato. L'estrazione enzimatica viene ripetuta due volte sullo stesso residuo solido, le due frazioni vengono mantenute separate, filtrate ed analizzate.

## 5.4.3 Analisi HPLC-MS/MS

I composti fenolici contenuti negli estratti chimico ed enzimatico sono stati analizzati mediante separazione cromatografica con strumentazione HPLC-MS/MS. Per le analisi, è stato usato un cromatografo liquido (modello Surveyor Plus, Thermo Scientific) equipaggiato con micro-pompa quaternaria e sistema di valvole per la selezione del solvente, un autocampionatore termostato, reparto termostato in cui alloggiare la colonna ed uno spettrometro di massa a trappola ionica lineare (modello LTQ XL, Thermo Scientific); l'accoppiamento tra i due sistemi è stato effettuato mediante interfaccia ESI. È stata utilizzata una colonna Symmetry C18 (Waters, Milford, MA, USA) 2,1x150 mm, con particelle totalmente porose di diametro 3,5 µm, termostata a 30 °C. La separazione è stata effettuata in condizioni di gradiente utilizzando come fase mobile per il canale A, una miscela di acqua e acido formico 0,1% (v/v), per il canale B, una miscela di acetonitrile e acido formico 0,1% (v/v). Il gradiente prevede un passaggio dal 5% al 30% del canale B in 25 minuti seguito da 5 minuti in condizioni isocratiche al 95% del canale B. La colonna viene quindi ricondizionata e riportata alle condizioni iniziali per l'analisi successiva. Il flusso utilizzato è di 150 µL/min; l'autocampionatore è termostato a 15 °C e la quantità di campione iniettato è pari a 2 µL.

Le condizioni operative sono le seguenti. Modalità ESI positiva: voltaggio dello spray=4,5 kV, voltaggio del capillare=16 V, voltaggio delle lenti=45 V. Modalità ESI negativa: voltaggio dello spray=4 kV, voltaggio del capillare=-6 V, voltaggio delle lenti=-47 V. La temperatura del capillare è di 275 °C per entrambe le modalità. Gli spettri MS<sup>2</sup> e MS<sup>3</sup> sono stati ottenuti con dissociazione indotta da collisione (CID). I valori della CID (espressi come valore relativo) sono stati ottimizzati in modo tale da massimizzare il picco caratteristico per ogni transizione monitorata. Modalità ESI positiva: cianidina-3-O-glucoside (C3OG) 449 m/z, CID=20%; quercetina-3-O-(6"-malonil)-glucoside (Q3OMG) 551 m/z, CID=20%; quercetina aglicone 303 m/z, CID=35%. Modalità ESI negativa: acido caffeilchinico (5CQA e 3CQA) 353 m/z, CID=18%, acido dicaffeiltartarico (DTCA) 473 m/z, CID=20%; apigenina-7-O-glucoside (A7OG) 431 m/z, CID=20%; kaempferolo-7-O-glucoside (K7OG) 447 m/z, CID=20%; kempferolo aglicone 285 m/z, CID=25%.

## 5.5 Determinazione e quantificazione dei carotenoidi

### 5.5.1 Estrazione chimica dei carotenoidi

I carotenoidi sono stati estratti facendo riferimento a metodi riportati in letteratura ed adattati alla matrice considerata [118] [119]. La procedura di estrazione deve infatti salvaguardare il campione da modifiche o danni strutturali ed al tempo stesso deve essere esaustiva. Per questo

motivo deve essere dedicata particolare attenzione al solvente e si deve lavorare in condizioni ottimali di luce e temperatura.

I campioni di zucca sono state macinati finemente prima di procedere con l'estrazione. Tutto il procedimento è stato svolto al riparo da fonti luminose e di calore. Circa 5 g di purea di zucca sono stati posti in una falcon da 50 mL, a cui sono stati aggiunti 15 mL di una miscela di esano/metanolo/acetone (2:1:1, v/v/v). L'estrazione è stata eseguita a temperatura ambiente per 30 minuti, sotto continua e lieve agitazione. Il campione è stato centrifugato (9000 rpm, 5 °C) per 5 minuti ed il surnatante è stato recuperato. L'estrazione viene ripetuta due volte, ottenendo un volume finale di 45 mL, e le fasi organiche vengono riunite ed evaporate ad una temperatura inferiore a 30 °C mediante l'utilizzo di un rotavapor. Gli estratti così ottenuti vengono sciolti in 4 mL di acetonitrile e filtrati (nylon, 0,22 µm) prima delle analisi HPLC. In accordo con dati di letteratura, la saponificazione non è stata eseguita poiché tale procedura può provocare la perdita di una parte dei carotenoidi, soprattutto xantofille, che sono contenuti in basse concentrazioni nella matrice di interesse [23] [120].

### 5.5.2 Metodi di cottura

La zucca è un alimento che viene consumato cotto, perciò è stato ritenuto opportuno valutare la variazione del contenuto in carotenoidi con due tipologie di cottura generalmente utilizzate, per avere valori più realistici sulla quantità di carotenoidi introdotti con la dieta. Nello specifico, sono state eseguite una cottura al forno (200 °C per 20 minuti) ed una cottura al vapore (100 °C per 20 minuti). Per le analisi, una porzione dei campioni cotti è stata omogeneizzata ed è stata eseguita la procedura riportata nella sezione precedente (5.5.1).

### 5.5.3 Analisi HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS

I carotenoidi contenuti negli estratti di entrambe le varietà di zucca sono stati analizzati mediante separazione cromatografica con strumentazione HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS (Agilent, serie 1100) equipaggiata con pompa binaria, degassatore, autocalibratore, reparto termostato per la colonna e rivelatore a serie di diodi (DAD), accoppiato in linea con uno spettrometro di massa a trappola ionica lineare con sorgente APCI (modello LTQ XL, Thermo Scientific). La separazione cromatografica è stata eseguita mediante l'utilizzo di una colonna C30 Develosil RP-Aqueos (Phenomenex) 3,0x150 mm, impaccata con particelle aventi diametro 3,0 µm e porosità di 140 Å. Le fasi mobili utilizzate sono miscele composte da acqua e acetonitrile (70:30, v/v; canale A) e metanolo e metil-t-butil-etero (50:50, v/v; canale B). La separazione prevede un gradiente di concentrazione con passaggio dal 20% al 47% del canale B in 10 minuti, dal 47% al 57% del canale B in 10 min e dal 57% al 100% del canale B in 20 minuti, seguito da un'isocratica al 100% del canale B per 13 minuti. La corsa cromatografica presenta quindi una durata di 53 minuti ed al termine di ogni analisi la colonna deve essere ri-equilibrata alle condizioni iniziali. Il flusso utilizzato è di 0,4 mL/min e la colonna termostata a 23 °C, in modo tale da ottimizzare la separazione degli isomeri in relazione alla colonna utilizzata [121]. La quantità di campione iniettato è pari a 5 µL e tutti i carotenoidi vengono monitorati a 450 nm. Sono stati inoltre registrati tutti gli spettri UV-Vis tra 200 e 600 nm a una velocità di acquisizione spettrale di 0,5 scans/s (larghezza del picco di 0,03 min). Per la registrazione degli spettri di massa è stata utilizzata la sorgente APCI in modalità di ionizzazione positiva e normali condizioni di scansione (velocità di scansione pari a 10 msec per MS and 100 msec per MS/MS). I parametri operativi sono i seguenti: scarico corona 4-6 µA, temperatura del vaporizzatore 400 °C, temperatura del capillare 300 °C, voltaggio del capillare 45 V, voltaggio delle lenti 85 V.

## 5.6 Studi di bioaccessibilità

Lo studio della bioaccessibilità dei composti fenolici del radicchio e dei carotenoidi contenuti nella zucca, è stato eseguito applicando un modello statico di digestione simulata *in vitro*, adattando la procedura di studi già pubblicati [122] [78].

La digestione simulata è condotta all'interno di falcon da 50 mL che, dopo le aggiunte di seguito riportate, vengono poste all'interno di un agitatore termostato alla temperatura fisiologica di 37 °C. L'agitazione deve essere lenta e non turbolenta per simulare i movimenti fisiologici a livello intestinale.

Il modello seguito prevede l'utilizzo di tre fluidi simulati -salivare, gastrico e duodenale- che vengono preparati a partire da soluzioni elettrolitiche alle seguenti concentrazioni: KCl 0,5 M;  $KH_2PO_4$  0,5 M;  $NaHCO_3$  1 M; NaCl 2 M;  $MgCl_2(H_2O)_6$  0,15 M;  $(NH_4)_2CO_3$  0,5 M;  $CaCl_2(H_2O)_2$  0,3 M.

- Fluido salivare simulato (SSF): 15,1 mL di KCl, 3,7 mL di  $KH_2PO_4$ , 6,8 mL di  $NaHCO_3$ , 0,5 mL di  $MgCl_2$ , 0,06 mL di  $(NH_4)_2CO_3$ ;
- Fluido gastrico simulato (SGF): 0,9 mL di KCl, 0,9 mL di  $KH_2PO_4$ , 12,5 mL di  $NaHCO_3$ , 0,4 mL di  $MgCl_2$ , 0,5 mL di  $(NH_4)_2CO_3$ , 11,8 mL di NaCl. Il pH della fase così ottenuta viene aggiustato a 3,0 con HCl 1 M;
- Fluido intestinale simulato (SIF): 6,8 mL di KCl, 0,8 mL di  $KH_2PO_4$ , 85 mL di  $NaHCO_3$ , 0,33 mL di  $MgCl_2$ , 38,4 mL di NaCl. Il pH della fase così ottenuta viene aggiustato a 7,0 con HCl 1 M.

Le soluzioni appena elencate devono essere portate ad un volume finale di 500 mL con acqua milli-Q.

Il modello di digestione simulata prevede l'uso di enzimi specifici che vengono appositamente preparati come riportato di seguito:

- $\alpha$ -amilasi 1500 u/mL: 30 mg di enzima in 20 mL di SSF;
- pepsina 20000 u/mL: 600 mg di enzima in 20 mL di SGF;
- pancreatina 800 u/mL: 320 mg in 40 mL di SIF;
- sali biliari: 625 mg in 25 mL di SIF.

L'acqua, gli enzimi e tutti i reagenti devono essere mantenuti alla temperatura di 37 °C prima e dopo il loro utilizzo, per tutta la durata della digestione simulata.

### **Fase salivare**

Circa 3 g di campione vengono posti in una falcon da 50 mL alla quale si aggiungono 3,5 mL di SSF, 975  $\mu$ L di  $H_2O$  milli-Q, 25  $\mu$ L di  $CaCl_2$  e 500  $\mu$ L di  $\alpha$ -amilasi. Si utilizza il vortex per 30 secondi, si centrifuga il campione per 5 minuti (9000 rpm, 5 °C) e si preleva il surnatante necessario per l'analisi.

### **Fase gastrica**

Al campione proveniente dalla fase salivare vengono addizionati 7,5 mL di SGF, 295  $\mu$ L di  $H_2O$  milli-Q, 5  $\mu$ L di  $CaCl_2$ , 200  $\mu$ L di HCl 1 M e 2 mL di pepsina. Dopo 30 secondi di vortex, il pH viene misurato ed aggiustato, se necessario, con HCl 1 M fino al raggiungimento di un valore prossimo a 3. Il campione viene quindi incubato per 2 ore a 37 °C con agitazione lieve e

costante. Al termine della simulazione della fase gastrica, si procede con centrifugazione (9000 rpm, 5 °C) per 5 minuti e si preleva il volume necessario all'analisi.

#### **Fase duodenale**

Alla soluzione proveniente dalla fase gastrica vengono addizionati 11 mL di SIF, 3,61 mL di H<sub>2</sub>O milli-Q, 40 µL di CaCl<sub>2</sub>, 150 µL di NaOH 1 M, 5 mL di pancreatina e 200 µL di sali biliari. Dopo 30 secondi di vortex, il pH viene misurato ed aggiustato, se necessario, con NaOH 1 M fino al raggiungimento di un valore prossimo a 7. Il campione viene quindi incubato per 2 ore a 37 °C con agitazione lieve e costante. Al termine della simulazione della fase gastrica, si procede con centrifugazione (9000 rpm, 5 °C) per 5 minuti e si preleva il volume necessario all'analisi.

Per le analisi dei composti fenolici contenuti nel radicchio, i campioni provenienti dalle tre fasi sono stati filtrati (nylon, 0,22 µm) e direttamente iniettati in HPLC-MS/MS mentre per quanto riguarda le analisi dei carotenoidi contenuti nella zucca è stata eseguita la procedura riportata nella sezione seguente 5.6.1.

### **5.6.1 Estrazione dei carotenoidi dai fluidi gastrointestinali simulati**

Al termine di ogni fase gastrointestinale simulata, la frazione micellare è stata separata dal resto della soluzione utilizzando il metodo proposto da E. Biehler et al. (2011) con alcune modifiche [123].

Aliquote dei digestati ottenuti sono state prelevate e la seguente procedura è stata eseguita due volte. I carotenoidi sono stati estratti mediante l'aggiunta di 2,5 mL (nel caso della fase salivare) o 5 mL (nel caso delle altre due fasi) di una miscela di esano/metanolo/acetone (2:1:1, v/v/v). I campioni sono stati agitati su vortex per 1 minuto, centrifugati (9000 rpm a 5 °C) per 5 minuti ed infine il surnatante è stato recuperato e riunito. Le fasi corrispondenti agli step salivare, gastrico e duodenale sono state trattate come riportato nella sezione 5.5.1. Gli estratti ottenuti sono stati sciolti in 1 mL di acetonitrile, filtrati (nylon, 0,22 µm) ed iniettati per le analisi HPLC-MS/MS.

### **5.6.2 Determinazione della capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati del radicchio nei confronti del radicale anione superossido -metodo della fotochemiluminescenza - Photochem<sup>®</sup>**

Il metodo della fotochemiluminescenza (PCL) consente la quantificazione della capacità anti-ossidante di sostanze pure ed estratti liquidi di matrici complesse di varia origine (sintetica, vegetale, animale e umana), in fase lipidica (metodo ACL, Antioxidant Capacity Lipid soluble) ed in fase acquosa (metodo ACW, Antioxidant Capacity Water soluble). Il metodo PCL è basato su un'accelerazione delle reazioni ossidative *in vitro* di circa 1000 volte rispetto alle condizioni normali grazie alla presenza di un opportuno fotosensibilizzatore. La metodologia sfrutta le caratteristiche di Photochem<sup>®</sup>, uno strumento commercializzato da Analytic Jena AG (Jena, Germania) e basato sull'autossidazione fotoindotta del Luminol accompagnata da un'intensa chemiluminescenza. L'esposizione di una sostanza fotosensibile (presente nel kit di lavoro) ad una radiazione UV, genera radicali liberi, i quali reagendo con la sostanza chemiluminescente (Luminol), emettono fotoni misurati da un fotomoltiplicatore che quantifica la produzione di radicali liberi. La presenza di antiossidanti inibisce l'autossidazione del Luminol, dovuta all'interazione con il radicale O<sub>2</sub><sup>•-</sup> generato per via fotochimica. In presenza di sostanze che reagiscono come trappole per radicali l'intensità della fotochemiluminescenza viene quindi attenuata in funzione della loro concentrazione. Il test di fotochemiluminescenza è stato eseguito secondo la metodica descritta da Popov e Lewin [124] costruendo un'opportuna retta di

calibrazione. Le analisi eseguite con il metodo ACL presentano delle curve di saturazione che raggiungono il plateau dopo pochi minuti e la capacità antiossidante viene misurata dall'area sottesa alla curva, effettuando un confronto con il bianco. La durata di ogni singola analisi è di 180 secondi; la capacità antiossidante viene misurata dall'integrale al di sotto della curva ed è espressa in nM Trolox equivalente.

## 5.7 Analisi biomolecolari

### 5.7.1 Estrazione del DNA

Prima di procedere alla fase di estrazione, i campioni analizzati sono stati ridotti in pezzi di piccole dimensioni, avendo cura di evitare eventuali contaminazioni. I puntali delle micropipette ed i tubi eppendorf utilizzati durante i vari procedimenti sono stati sterilizzati in autoclave a 120 °C per 20 minuti.

La matrice accuratamente pesata viene posta in un tubo eppendorf da 1,5 mL al quale vengono aggiunti 600  $\mu$ L di buffer di lisi (NaCl 2,5M, EDTA 0,5M, sodio dodecilsolfato (SDS) soluzione al 10%, Tris-Cl a pH 8, acqua milli-Q sterile). Il campione viene rotto con una spatola, agitato al vortex ripetutamente e messo a bagnomaria a 65 °C per ora. Si aggiungono quindi 60  $\mu$ L di acetato sodico 3M e si agita manualmente. Dopo 10 minuti a -20 °C, si procede con centrifuga a 11000 rpm per 10 minuti. La fase acquosa contenente il DNA viene prelevata e trasferita in un tubo eppendorf sterilizzato, a cui si aggiungono 7  $\mu$ L di RNAasi (soluzione 10 mg/mL). Il campione viene incubato a 37 °C per due ore, al termine delle quali si procede con l'aggiunta di 150  $\mu$ L di fenolo e 150  $\mu$ L di CIA (24 mL di cloroformio + 1 mL di alcol isoamilico), si agita manualmente e si centrifuga a 11000 rpm per 5 minuti. Il surnatante viene recuperato facendo particolare attenzione a non asportare parte dell'interfase in cui sono presenti le proteine. Dopo l'aggiunta di etanolo assoluto (96%) freddo (-20 °C), si agita prima manualmente e poi con il vortex, per poi centrifugare a 11000 rpm per 10 minuti. Il surnatante viene eliminato e la provetta viene capovolta su carta assorbente. Al pellet, contenente il DNA, si aggiungono 200  $\mu$ L di Et-OH al 70% senza agitare e si centrifuga a 11000 rpm per 5 minuti. Il surnatante viene eliminato e l'etanolo residuo evaporato a temperatura ambiente, fino a scomparsa di goccioline visibili sulle pareti. Vengono quindi aggiunti 50  $\mu$ L di  $H_2O$  sterile in modo tale da portare il DNA in soluzione, la cui presenza verrà confermata mediante corsa elettroforetica.

### 5.7.2 Corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% p/v

Il gel d'agarosio al 2% p/v in tampone TBE 1x (Tris 89mM, Acido Borico 89mM, EDTA 2mM; pH=8,3) viene preparato sciogliendo 1 g di agarosio in 50 mL di TBE soluzione 1x, a caldo e fino a completa limpidezza. A dissoluzione avvenuta, si aggiungono 2,5  $\mu$ L di etidio bromuro. La soluzione viene versata nella vaschetta in cui sono stati inseriti precedentemente i pettini. Per la fase di caricamento si opera nel seguente modo: nel 1° pozzetto si aggiungono 3  $\mu$ L di marker e 3  $\mu$ L di loading buffer (glicerolo e blu di bromofenolo) mentre nei successivi si aggiungono 7  $\mu$ L di soluzione e 3  $\mu$ L di loading buffer. La corsa elettroforetica viene effettuata a 90 V per 40 minuti.

### 5.7.3 Lettura spettrofotometrica UV-Vis del DNA estratto

Il DNA estratto viene opportunamente diluito con  $H_2O$  milli-Q sterile e vengono effettuate letture spettrofotometriche a lunghezze d'onda di 230, 260 e 280 nm per verificare l'efficienza dell'estrazione ed il clean-up.

## 5.7.4 Protocollo di amplificazione RAPD

La RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) consiste nell'amplificazione del DNA, innescata da oligonucleotidi scelti casualmente, in modo da evidenziare polimorfismi genetici. Questo tipo di amplificazione supera la limitazione della PCR, ovvero di dover conoscere la sequenza nucleotidica che si vuole amplificare. La RAPD permette infatti l'amplificazione di frammenti di DNA facendo uso di oligonucleotidi che per la loro piccola dimensione (circa 10 paia di basi) e bassa temperatura di appaiamento, generano numerosi prodotti di amplificazione per ogni reazione (figura 5.2) [125]. Punto di forza della RAPD è proprio la lunghezza dei primers, che hanno la possibilità di individuare più sequenze complementari disposte casualmente nel DNA genomico. Il numero ed il tipo di frammenti che si ottengono dalla reazione di amplificazione dipendono esclusivamente dalla sequenza del primer e da quella del DNA genomico amplificato. Le analisi di tipo RAPD presentano il grande vantaggio di rilevare anche piccole differenze genetiche dal momento che può essere analizzata una percentuale maggiore del genoma rispetto ad altre tecniche [126].

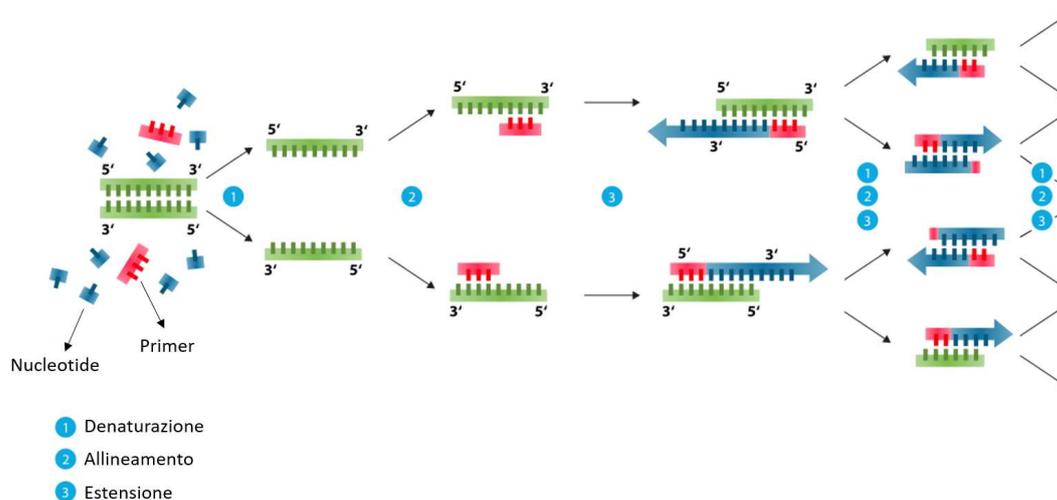


Figura 5.2: Ciclo di amplificazione del DNA mediante la reazione di polimerizzazione a catena.

Per le amplificazioni RAPD sono stati testati, durante la fase iniziale di messa a punto della metodica e test preliminari, numerosi primers e tra questi ne sono stati selezionati 10, che sono stati utilizzati per le analisi su tutti i campioni. In tabella 5.2 sono riportate le sequenze nucleotidiche dei primers utilizzati.

Primer	Sequenza
OPB-05	TGCGCCCTTC
OPB-10	CTGCTGGGAC
OPD-08	GTGTGCCCCA
OPH-03	AGACGTCCAC
OPM-02	ACAACGCCTC
OPM-03	GGGGGATGAG
OPM-13	GGTGGTCAAG
OPO-10	TCAGAGCGCC
OPU-18	GAGGTCCACA
OPV-19	GGGTGTGCAG

Tabella 5.2: Sequenze nucleotidiche dei 10 primers selezionati ed utilizzati nelle amplificazioni RAPD.

In seguito a prove volte all'ottimizzazione della tecnica RAPD, è stata selezionata la seguente composizione della miscela di reazione: (I) 6  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q sterile, (II) 15  $\mu\text{L}$  di master mix, (III) 1  $\mu\text{L}$  di primer (0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La master mix utilizzata è composta da: Taq DNA polimerasi 0,05 unità/ $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  4 mM, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0,4 mM ognuno, buffer di reazione. Aliquote di 22  $\mu\text{L}$  della miscela di reazione vengono addizionate a 8  $\mu\text{L}$  di DNA genomico (diluito 1:1000) in tubi eppendorf. La reazione di polimerizzazione a catena viene effettuata in un termocilatore secondo il seguente protocollo di amplificazione:

Fase	Numero di cicli	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tempo (minuti, secondi)
Denaturazione iniziale	1	95	5
Denaturazione		94	1
Allineamento	45	37	1
Estensione		72	1,30
Estensione finale	1	72	5

**Tabella 5.3:** Protocollo di amplificazione della tecnica RAPD.

## 6 | Conclusioni

Negli ultimi anni il settore agroalimentare è stato caratterizzato dall'affermarsi di un modello di produzione e consumo sempre più orientato verso i prodotti tradizionali e tipici ed è proprio per questo motivo che un numero crescente di produttori manifesta la volontà di certificare i propri prodotti. L'ottenimento di un marchio di riconoscimento europeo (DOP, IGP o STG) conferisce al prodotto selezionato un valore aggiunto e permette di tutelarne la qualità. L'Italia è un Paese molto ricco di prodotti tipici di specifiche aree geografiche e da tali riconoscimenti può trarre importanti vantaggi commerciali, sia sui mercati interni che sui mercati esteri. Il consumatore che decide quindi di acquistare un prodotto "Made in Italy", pone attenzione non solo all'origine ed alla qualità, ma anche alla sicurezza, al patrimonio culturale, al contesto sociale ed economico in cui è avvenuta la produzione.

Il Consorzio Uomini di Massenzatica, in provincia di Ferrara, si presenta come una realtà molto attenta alla valorizzazione del proprio territorio in termini di coltivazione e tradizioni locali. Tra i prodotti maggiormente coltivati all'interno del Consorzio hanno particolare importanza la zucca, nelle varietà Delica (*Cucurbita maxima*) e Violina (*Cucurbita moschata*), ed il radicchio rosso (*Cichorium intybus*), nelle tipologie tondo e lungo, rispetto ai quali è stato intrapreso un progetto della durata di tre anni, mirato alla completa caratterizzazione, alla compilazione della loro etichetta nutrizionale e ad una loro valorizzazione. Per conseguire tale scopo è stato effettuato anche un confronto con competitors presenti sul mercato di diversa provenienza territoriale.

Per quanto concerne la zucca, le analisi bromatologiche svolte sui campioni di varietà Delica e Violina provenienti dal territorio di Massenzatica hanno permesso di definire i parametri essenziali per l'etichetta nutrizionale dei prodotti. Nello specifico, per la varietà Delica sono stati determinati i seguenti contenuti: proteine  $13,20 \pm 2,24$  g, ceneri  $6,00 \pm 0,50$  g, lipidi  $2,17 \pm 0,36$  g, fibra dietetica totale  $30,75 \pm 11,96$  g e carboidrati totali, calcolati per differenza rispetto ai dati sopra elencati,  $47,91 \pm 11,76$  g. Tali valori sono espressi su 100 g di sostanza secca e dovranno essere riferiti alla sostanza fresca considerando per questi campioni un'umidità media pari a  $83,07 \pm 1,55$  g/100 g di sostanza fresca nel prodotto crudo. Per la zucca di varietà Violina i valori ottenuti sono: proteine  $16,21 \pm 2,11$  g, ceneri  $9,99 \pm 0,83$  g, lipidi  $1,49 \pm 0,27$  g, fibra dietetica totale  $24,11 \pm 3,35$  g, carboidrati totali  $48,20 \pm 5,99$  g su 100 g di sostanza secca, considerando un'umidità media pari a  $89,60 \pm 0,50\%$ .

Un'analisi approfondita dei risultati ottenuti attraverso le analisi bromatologiche, sottolinea inoltre come questo alimento sia una buona fonte di minerali (potassio, ferro e zinco in particolare), ma povero di sodio e quindi ideale per soggetti che presentano problemi cardiovascolari e di ipertensione. Nonostante la frazione lipidica sia ridotta, l'analisi degli acidi grassi evidenzia come gli acidi grassi insaturi siano presenti in concentrazioni maggiori e con un rapporto ottimale degli insaturi rispetto ai saturi. Tra gli acidi grassi identificati si ricorda inoltre la presenza del linoleico e dell' $\alpha$ -linolenico, che appartengono al gruppo degli acidi grassi essenziali.

Analizzando i risultati relativi alla quantificazione della fibra alimentare, si può notare come sia maggiore la frazione di fibra insolubile rispetto alla solubile, a testimonianza di come il consumo di zucca possa regolarizzare le funzioni intestinali.

L'indagine è stata ripetuta su campioni della stessa varietà ma provenienti dal territorio di Sermide per entrambe le tipologie considerate, ed i dati ottenuti sono stati elaborati dal punto di vista statistico mediante analisi delle componenti principali (PCA), mostrando una buona differenziazione, in relazione alla varietà considerata, rispetto al territorio di provenienza.

In riferimento ai risultati ottenuti dalle analisi bromatologiche per le due tipologie di radicchio rosso prodotto e coltivato nel territorio di Massenzatica è emersa una composizione del radicchio rosso tipologia tondo pari a: proteine  $15,76 \pm 2,05$  g, ceneri  $10,94 \pm 0,74$  g, lipidi  $1,14 \pm 0,06$  g, fibra totale  $32,92 \pm 1,92$  e carboidrati totali, calcolati per differenza,  $39,24 \pm 3,52$  g in percento sulla sostanza secca e considerando un contenuto di umidità totale pari a  $92,35 \pm 0,26$  g/100 g di sostanza fresca. Infine per il radicchio rosso di Massenzatica a foglia lunga sono stati quantificati contenuti di: proteine  $21,27 \pm 1,75$  g, ceneri  $13,09 \pm 0,80$  g, lipidi  $0,82 \pm 0,10$  g, fibra totale  $34,16 \pm 1,63$  g e carboidrati totali  $30,66 \pm 0,53$  g su 100 g di sostanza secca, con un'umidità media pari a  $93,08 \pm 0,08\%$ .

In particolare, le analisi chimiche hanno evidenziato come questo alimento sia una verdura ricca di acqua ma povera di proteine e lipidi. L'alto contenuto di fibra alimentare, caratterizzata da una maggior frazione di fibra insolubile, lo rende un ortaggio utile in caso di stipsi, di ipercolesterolemia e di diabete di tipo II. La frazione fibrosa del radicchio è inoltre una delle più ricche in inulina, che ha una riconosciuta attività prebiotica. Questo vegetale contiene molti sali minerali ed in particolare, per entrambe le tipologie, si sottolineano le elevate concentrazioni di calcio e potassio tra i macroelementi, ferro e zinco tra gli oligoelementi analizzati. La tipica colorazione rosso-violacea di questo vegetale è data dalla presenza di una sottoclasse di polifenoli, le antocianine. Lo studio delle proprietà antiossidanti ha confermato, sia nel radicchio rosso tondo che lungo, la presenza di un elevato contenuto in polifenoli ed antocianine, che manifestano quindi una buona capacità antiossidante.

Le analisi chimiche effettuate sulla totalità dei campioni, seme Massenzatica coltivato a Massenzatica a confronto con campioni di seme e/o origine differente, sono state rielaborate statisticamente mediante PCA, evidenziando un diverso comportamento dei campioni di radicchio rispetto al loro luogo di coltivazione ed al patrimonio genetico del seme di origine. È stato inoltre adottato un approccio biomolecolare che, seppur con un limitato numero di primers, non solo ha confermato la differenziazione dei prodotti in relazione al territorio di produzione, ma ha anche sottolineato come l'affiancamento di questi due diversi metodi, si riveli un ottimo strumento per studi di questo tipo.

A completamento della caratterizzazione e della valutazione degli aspetti salutistici per i prodotti di Massenzatica, è stato effettuato uno studio sulle due classi di composti bioattivi caratteristici per le matrici alimentari considerate e della loro bioaccessibilità. Per la zucca i metaboliti secondari di interesse nutraceutico esaminati sono stati i carotenoidi, mentre per il radicchio i polifenoli.

L'identificazione dei carotenoidi (HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS) ha permesso innanzitutto di evidenziare come esistano differenze quali e quantitative tra le due varietà considerate. I cromatogrammi registrati evidenziano due differenti gruppi di picchi che corrispondono rispettivamente agli epossidi ed idrossi-carotenoidi, ed ai caroteni. Tra i primi sono stati identificati tutti e cinque i segnali cromatografici (violaxantina, astaxantina, anteraxantina, zeaxantina e luteina), mentre dei 6 picchi cromatografici appartenenti al secondo gruppo è stata possibile l'identificazione solo per licopene,  $\alpha$ -carotene e  $\beta$ -carotene. Si sottolinea in particolare come la zeaxantina sia presente nella sola zucca varietà Delica mentre l' $\alpha$ -carotene nella Violina. È

interessante notare come le concentrazioni di alcuni dei carotenoidi identificati siano statisticamente significativi per la differenziazione in relazione al territorio di provenienza, Massenzatica o Sermide (tutti i picchi eccetto astaxantina, zeaxantina e licopene per la zucca Delica, anteraxantina, luteina e picco 9 per la zucca Violina). I carotenoidi sono composti sensibili ai trattamenti termici e la necessità di consumare gli alimenti cotti spesso può comportare una perdita consistente di queste importanti sostanze. Lo studio della variazione delle concentrazioni di due carotenoidi target (luteina e  $\beta$ -carotene) in seguito alla cottura della zucca con due metodiche, al forno e al vapore, ha portato a risultati interessanti. In particolare, con la cottura al vapore luteina e  $\beta$ -carotene subiscono variazioni che non superano il 10%, mentre la cottura al forno provoca perdite prossime al 30%. Lo studio della bioaccessibilità, effettuato seguendo un metodo di digestione simulata statica *in vitro*, di questi due composti ha permesso di valutare il rilascio dopo l'ingerimento della zucca cotta secondo entrambe le modalità. Si evidenzia, nello specifico, un trend generale di aumento progressivo della bioaccessibilità dalla fase salivare a quella duodenale, per entrambe le tipologie di zucca ed i metodi di cottura eseguiti. I dati di bioaccessibilità nella fase duodenale sono maggiori del doppio rispetto al valore registrato nella fase gastrica.

Lo studio qualitativo del profilo fenolico negli estratti di radicchio autoprodotti e coltivati a Massenzatica ha fornito informazioni su due ecotipi che non erano stati fino ad ora caratterizzati. Sono stati identificati, in entrambe le tipologie, 36 composti mediante analisi HPLC-MS/MS, lavorando sia in modalità ESI positiva (15 composti) che negativa (21 composti). In entrambi i casi, sono stati analizzati sia gli spettri MS/MS che MS<sup>3</sup> degli ioni figlio caratteristici. Tra le classi di polifenoli individuate si sottolinea la presenza di acidi fenolici e di numerosi derivati glicosilati, le cui forme più diffuse sono quella malonile ed acetile. Sono stati selezionati sette composti target, scegliendo composti caratteristici delle varie classi di polifenoli presenti in questa matrice (cianidina-3-O-glucoside, acido dicaffeiltartarico, acido 5-caffeilchinico, apigenina-7-O-glucoside, kaempferolo-7-O-glucoside, quercetina-3-O-(6''-malonil)-glucoside, acido 3-caffeilchinico) rispetto ai quali è stata effettuata la quantificazione. In particolare è stata posta attenzione alla frazione di bound fenolici, ovvero a quei composti che essendo legati alla fibra potrebbero non essere presenti negli estratti di tipo chimico. A tale scopo, in aggiunta all'estrazione chimica, è stata effettuata un'estrazione di tipo enzimatico, che ha incrementato le quantità di alcuni composti e che non ha tuttavia portato all'identificazione di composti aggiuntivi. È interessante notare come per cinque tra i sette target, le concentrazioni siano molto maggiori nel radicchio rosso tondo rispetto al lungo. In riferimento ai dati di bioaccessibilità ottenuti, questo studio fornisce un primo tentativo di interpretazione dei risultati in relazione alla struttura chimica dei composti, quindi alla natura dell'aglicone e/o alla posizione della O-glicosilazione. Indipendentemente dall'ecotipo considerato, si evidenziano infatti tre differenti comportamenti: (I) progressivo aumento della bioaccessibilità dalla fase salivare a quella duodenale; (II) bioaccessibilità particolarmente elevata nella fase gastrica con decremento nella fase duodenale; (III) andamento generale simile al secondo elencato ma con una diminuzione meno importante nella fase duodenale. Globalmente si evidenzia inoltre come le molecole monitorate risultino bioaccessibili durante tutte le fasi della digestione e possano quindi diventare substrato metabolico per la flora batterica intestinale.

A conclusione di questo progetto è possibile affermare che il lavoro svolto ha permesso di approfondire le conoscenze bromatologico-nutrizionali di questi prodotti. La determinazione di carotenoidi e polifenoli e lo studio della loro bioaccessibilità ha fornito maggiori informazioni sugli aspetti salutistici di zucca e radicchio nella dieta. Questi composti, possono inoltre rappresentare dei marker identificativi nello sviluppo di prodotti trasformati.

Tutti i risultati prodotti sono stati messi a disposizione del CUM che ha manifestato la volontà

di intraprendere l'iter per un riconoscimento europeo.

Le tipologie di zucca analizzate sono varietà comuni sul mercato e ampiamente coltivate. Nonostante ciò, la zucca di Massenzatica ha mostrato caratteristiche bromatologico-nutrizionali interessanti che potrebbero essere sfruttate per promuovere un legame con piatti tipici del territorio, *cappellaccio ferrarese IGP*, al fine di creare un connubio tra territorio, materie prime e prodotto trasformato.

I risultati ottenuti sul radicchio lungo e tondo di Massenzatica confermano le buone caratteristiche del prodotto e ne giustificano l'apprezzamento sul mercato. Meritano approfondimento i risultati genetici mediante l'utilizzo di un numero maggiore di primer. La conferma della differenziazione dell'ecotipo potrebbe permettere la richiesta di un marchio europeo a tutela dell'originalità del prodotto.

## Bibliografia

- [1] Bruce D Smith. The initial domestication of cucurbita pepo in the americas 10,000 years ago. *Science*, 276(5314):932–934, 1997.
- [2] Tabelle di composizione degli alimenti: zucca gialla. [nut.entecra.it](http://nut.entecra.it), 2019.
- [3] Ting Zhou, Qian Kong, Jingrong Huang, Ruitong Dai, and Quanhong Li. Characterization of nutritional components and utilization of pumpkin. *Food*, 1(2):313–321, 2007.
- [4] SD Fang, L-Chuan Li, CI Niu, and KF Tseng. Chemical studies on cucurbita moschata duch. i. the isolation and structural studies of cucurbitine, a new amino acid. *Scientia Sinica*, 10:845, 1961.
- [5] Mukesh Yadav, Shalini Jain, Radha Tomar, GBKS Prasad, and Hariom Yadav. Medicinal and biological potential of pumpkin: an updated review. *Nutrition research reviews*, 23(2):184–190, 2010.
- [6] Barry Halliwell. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 23(Suppl. 1):118–126, 1993.
- [7] Atef T Fahim, Amal A Abd-El Fattah, Azza M Agha, and Mohamed Z Gad. Effect of pumpkin-seed oil on the level of free radical scavengers induced during adjuvant-arthritis in rats. *Pharmacological research*, 31(1):73–79, 1995.
- [8] Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin e and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *New England Journal of Medicine*, 330(15):1029–1035, 1994.
- [9] Hana Al Zuhair, Amal A Abd El-Fattah, and Moushira Ibrahim El-Sayed. Pumpkin-seed oil modulates the effect of felodipine and captopril in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacological Research*, 41(5):555–563, 2000.
- [10] Renée A Street, Jasmeen Sidana, and Gerhard Prinsloo. Cichorium intybus: Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 2013.
- [11] Wanda Kisiel and Klaudia Zielińska. Guaianolides from cichorium intybus and structure revision of cichorium sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 57(4):523–527, 2001.
- [12] Vanisree Mulabagal, Haibo Wang, Mathieu Ngouajio, and Muraleedharan G Nair. Characterization and quantification of health beneficial anthocyanins in leaf chicory (cichorium intybus) varieties. *European Food Research and Technology*, 230(1):47, 2009.

- [13] Regolamento (CE) N. 1263/96 della Commissione del 1° luglio 1996. *Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee*. 163/19.
- [14] Regolamento (CE) N. 1263/96 della Commissione del 1° luglio 1996. *Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee*. 163/19.
- [15] Regolamento (CE) N. 1025/2008 della Commissione del 17 ottobre 2008. *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea*. 277/30.
- [16] Regolamento (CE) N. 98/2009 della Commissione del 2 febbraio 2009. *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea*. 33/8.
- [17] Regolamento di esecuzione (UE) 2016/164 della Commissione del 28 gennaio 2016. *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea*. 32/30.
- [18] Rui Hai Liu. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American journal of clinical nutrition*, 78(3):517S–520S, 2003.
- [19] Francesco Sofi, Claudio Macchi, Rosanna Abbate, Gian Franco Gensini, and Alessandro Casini. Mediterranean diet and health. *Biofactors*, 39(4):335–342, 2013.
- [20] Giuseppe Arienti. *Le basi molecolari della nutrizione*. Piccin, 2003.
- [21] Robert EC Wildman. *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. CRC press, 2016.
- [22] George Britton. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15):1551–1558, 1995.
- [23] Delia B Rodriguez-Amaya, Mieko Kimura, et al. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*, volume 2. Citeseer, 2004.
- [24] Shan Lu and Li Li. Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(7):778–785, 2008.
- [25] Paul D Fraser and Peter M Bramley. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, 43(3):228–265, 2004.
- [26] Gerhard Sandmann, Susanne Römer, and Paul D Fraser. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic engineering*, 8(4):291–302, 2006.
- [27] Me O'Neill, Y Carroll, B Corridan, B Olmedilla, F Granada, I Blanco, H Van den Berg, I Hininger, A-M Rousell, Mridula Chopra, et al. A european carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *British Journal of Nutrition*, 85(4):499–507, 2001.
- [28] G Sandmann, S Southon, and W Stahl. H van den berg, r faulks, 2 h fernando granado, 3 j hirschberg, 4 b olmedilla, 3. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:880–912, 2000.
- [29] Akihiko Nagao. Absorption and function of dietary carotenoids. In *Food Factors for Health Promotion*, volume 61, pages 55–63. Karger Publishers, 2009.
- [30] CY Lee. Changes in carotenoid content of carrots during growth and post-harvest storage. *Food chemistry*, 20(4):285–293, 1986.

- [31] Delia B Rodriguez-Amaya. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 49(3 Suppl 1):38S–47S, 1999.
- [32] Barbara A Underwood and Paul Arthur. The contribution of vitamin a to public health. *The FASEB journal*, 10(9):1040–1048, 1996.
- [33] A Venket Rao and Leticia G Rao. Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 55(3):207–216, 2007.
- [34] S Pandrangi and Luke F Laborde. Retention of folate, carotenoids, and other quality characteristics in commercially packaged fresh spinach. *Journal of food science*, 69(9):C702–C707, 2004.
- [35] Keith P West Jr, Joanne Katz, Subarna K Khattry, Steven C LeClerq, Elizabeth K Pradhan, Sharada R Shrestha, Paul B Connor, Sanu M Dali, Parul Christian, Ram P Pokhrel, et al. Double blind, cluster randomised trial of low dose supplementation with vitamin a or  $\beta$ carotene on mortality related to pregnancy in nepal. *Bmj*, 318(7183):570–575, 1999.
- [36] Alfred Sommer. Vitamin a deficiency. *e LS*, 2001.
- [37] Howard D Sesso. Carotenoids and cardiovascular disease: what research gaps remain? *Current opinion in lipidology*, 17(1):11–16, 2006.
- [38] NJ Barber, X Zhang, G Zhu, R Pramanik, JA Barber, Francis L Martin, JDH Morris, and GH Muir. Lycopene inhibits dna synthesis in primary prostate epithelial cells in vitro and its administration is associated with a reduced prostate-specific antigen velocity in a phase ii clinical study. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 9(4):407, 2006.
- [39] Ulrike Heinrich, Christine Gartner, Mathilde Wiebusch, Olaf Eichler, Helmut Sies, Hagen Tronnier, and Wilhelm Stahl. Supplementation with  $\beta$ -carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from uv-induced erythema. *The Journal of nutrition*, 133(1):98–101, 2003.
- [40] Kanti Bhooshan Pandey and Syed Ibrahim Rizvi. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5):270–278, 2009.
- [41] FA Tomas-Barberan and MN Clifford. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives and their possible role in health protection. *J Sci Food Agric*, 80:1024–32, 2000.
- [42] MN Clifford and A Scalbert. Ellagitannins, occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J Food Sci Agric*, 80:1118–25, 2000.
- [43] Claudine Manach, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, and Liliana Jiménez. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5):727–747, 2004.
- [44] P.C H Hollman and Martijn B Katan. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and chemical toxicology*, 37(9-10):937–942, 1999.
- [45] Jeffrey B Harborne. *The flavonoids: advances in research since 1980*. Springer, 2013.
- [46] Domenico Caridi, V Craige Trenerry, Simone Rochfort, Samantha Duong, Dianne Lougher, and Rod Jones. Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*allium cepa* l.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 105(2):691–699, 2007.

- [47] Witold M Mazur, James A Duke, Kristiina Wähälä, Sirpa Rasku, and Herman Adlercreutz. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 9(4):193–200, 1998.
- [48] Kyung K Han, Jose M Soares Jr, Mauro A Haidar, Geraldo Rodrigues De Lima, and Edmund C Baracat. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstetrics & Gynecology*, 99(3):389–394, 2002.
- [49] Rong Tsao. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12):1231–1246, 2010.
- [50] Ahmad R Tapas, DM Sakarkar, and RB Kakde. Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3):1089–1099, 2008.
- [51] Laura Bravo. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11):317–333, 1998.
- [52] Vincenzo Brandolini, Annalisa Maietti, Paola Tedeschi, Elisa Durini, Silvia Vertuani, and Stefano Manfredini. Capillary electrophoresis determination, synthesis, and stability of resveratrol and related 3-o- $\beta$ -d-glucopyranosides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(25):7407–7411, 2002.
- [53] M Nardini and A Ghiselli. Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chemistry*, 84(1):137–143, 2004.
- [54] GR Velderrain-Rodriguez, H Palafox-Carlos, A Wall-Medrano, JF Ayala-Zavala, CY O Chen, M Robles-Sanchez, H Astiazaran-Garcia, E Alvarez-Parrilla, and GA Gonzalez-Aguilar. Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & function*, 5(2):189–197, 2014.
- [55] John Van Duynhoven, Elaine E Vaughan, Doris M Jacobs, Robèr A Kemperman, Ewoud JJ Van Velzen, Gabriele Gross, Laure C Roger, Sam Possemiers, Age K Smilde, Joël Doré, et al. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(Supplement 1):4531–4538, 2011.
- [56] Beatriz A Acosta-Estrada, Janet A Gutiérrez-Urbe, and Sergio O Serna-Saldívar. Bound phenolics in foods, a review. *Food chemistry*, 152:46–55, 2014.
- [57] Sun Jin Hur, Beong Ou Lim, Eric A Decker, and D Julian McClements. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1):1–12, 2011.
- [58] J Parada and JM Aguilera. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of food science*, 72(2):R21–R32, 2007.
- [59] Massimo D’Archivio, Carmelina Filesi, Rosaria Vari, Beatrice Scazzocchio, and Roberta Masella. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4):1321–1342, 2010.
- [60] Teresa Requena, M Monagas, MA Pozo-Bayón, Pedro J Martín-Álvarez, Begoña Bartolomé, R Del Campo, Marta Ávila, M Carmen Martínez-Cuesta, Carmen Peláez, and MV Moreno-Arribas. Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends in food science & technology*, 21(7):332–344, 2010.

- [61] Maria V Selma, Juan C Espin, and Francisco A Tomas-Barberan. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(15):6485–6501, 2009.
- [62] Daniele Del Rio, Gina Borges, and Alan Crozier. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*, 104(S3):S67–S90, 2010.
- [63] Addie A van der Sluis, Matthijs Dekker, and Martinus Ajs van Boekel. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. stability during storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(4):1073–1080, 2005.
- [64] Addie A van der Sluis, Matthijs Dekker, Anton de Jager, and Wim MF Jongen. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8):3606–3613, 2001.
- [65] Ryszard Amarowicz, Reinhold Carle, Gerhard Dongowski, Alessandra Durazzo, Rudolf Galensa, Dietmar Kammerer, Guisepe Maiani, and Mariusz K Piskula. Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular nutrition & food research*, 53(S2):S151–S183, 2009.
- [66] Garry Duthie and Alan Crozier. Plant-derived phenolic antioxidants. *Current opinion in lipidology*, 11(1):43–47, 2000.
- [67] Pier-Giorgio Pietta. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7):1035–1042, 2000.
- [68] Elliott Middleton, Chithan Kandaswami, and Theoharis C Theoharides. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4):673–751, 2000.
- [69] Sattu Kamaraj, Radhakrishnan Vinodhkumar, Pandi Anandakumar, Sundaram Jagan, Gopalakrishnan Ramakrishnan, and Thiruvengadam Devaki. The effects of quercetin on antioxidant status and tumor markers in the lung and serum of mice treated with benzo (a) pyrene. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 30(12):2268–2273, 2007.
- [70] Zahra Bahadoran, Parvin Mirmiran, and Fereidoun Azizi. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of diabetes & metabolic disorders*, 12(1):43, 2013.
- [71] Joseph A Vita. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1):292S–297S, 2005.
- [72] Hua Zhang and Rong Tsao. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8:33–42, 2016.
- [73] Silvia Mandel and Moussa BH Youdim. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3):304–317, 2004.
- [74] Martin Wickham, Richard Faulks, and Clare Mills. In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular nutrition & food research*, 53(8):952–958, 2009.

- [75] Veerle Snoeck, Bruno Goddeeris, and Eric Cox. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes and infection*, 7(7-8):997–1004, 2005.
- [76] David Julian McClements, Fang Li, and Hang Xiao. The nutraceutical bioavailability classification scheme: classifying nutraceuticals according to factors limiting their oral bioavailability. *Annual review of food science and technology*, 6:299–327, 2015.
- [77] Aurélie Guerra, Lucie Etienne-Mesmin, Valérie Livrelli, Sylvain Denis, Stéphanie Blanquet-Diot, and Monique Alric. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in biotechnology*, 30(11):591–600, 2012.
- [78] Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, and Harry Wichers. *The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models*. Springer, 2015.
- [79] Ann-Sofie Sandberg. Methods and options for in vitro dialyzability; benefits and limitations. *International journal for vitamin and nutrition research*, 75(6):395–404, 2005.
- [80] Paz Etcheverry, Michael A Grusak, and Lisa E Fleige. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins b6, b12, d, and e. *Frontiers in physiology*, 3:317, 2012.
- [81] Helmut Sies. Polyphenols and health: update and perspectives. *Archives of biochemistry and biophysics*, 501(1):2–5, 2010.
- [82] Elisabet Fernández-García, Irene Carvajal-Lérida, Manuel Jarén-Galán, Juan Garrido-Fernández, Antonio Pérez-Gálvez, and Dámaso Hornero-Méndez. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46(2):438–450, 2012.
- [83] Inke Paetau, Frederick Khachik, Ellen D Brown, Gary R Beecher, Tim R Kramer, Jesse Chittams, and Beverly A Clevidence. Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 68(6):1187–1195, 1998.
- [84] Keith R Martin, Christy L Appel, et al. Polyphenols as dietary supplements: a double-edged sword. *Nutr Diet Suppl*, 2(1):12, 2010.
- [85] Robert M Hackman, John A Polagruto, Qin Yan Zhu, Buxiang Sun, Hajime Fujii, and Carl L Keen. Flavanols: digestion, absorption and bioactivity. *Phytochemistry Reviews*, 7(1):195, 2008.
- [86] James M Lattimer and Mark D Haub. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*, 2(12):1266–1289, 2010.
- [87] A Aytekin Polat and O Caliskan. Fruit characteristics of table fig (*ficus carica*) cultivars in subtropical climate conditions of the mediterranean region. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 36(2):107–115, 2008.
- [88] Branca Maria Silva, Paula Branquinho Andrade, Ana Cláudia Gonçalves, Rosa Maria Seabra, Maria Beatriz Oliveira, and Margarida Alice Ferreira. Influence of jam processing upon the contents of phenolics, organic acids and free amino acids in quince fruit (*cydonia oblonga miller*). *European Food Research and Technology*, 218(4):385–389, 2004.

- [89] Agnieszka Nawirska-Olszanska, Anita Biesiada, Anna Sokol Letowska, and Alicja Z Kucharska. Characteristics of organic acids in the fruit of different pumpkin species. *Food chemistry*, 148:415–419, 2014.
- [90] Julian P Wald, Donatus Nohr, and Hans K Biesalski. Rapid and easy carotenoid quantification in ghanaiian starchy staples using rp-hplc-pda. *Journal of Food Composition and Analysis*, 67:119–127, 2018.
- [91] Caterina Bergantin, Annalisa Maietti, Paola Tedeschi, Guillermina Font, Lara Manyes, and Nicola Marchetti. Hplc-uv/vis-apci-ms/ms determination of major carotenoids and their bioaccessibility from “delica”(cucurbita maxima) and “violina”(cucurbita moschata) pumpkins as food traceability markers. *Molecules*, 23(11):2791, 2018.
- [92] Erika Turcsi, Veronika Nagy, and József Deli. Study on the elution order of carotenoids on endcapped c18 and c30 reverse silica stationary phases. a review of the database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 47:101–112, 2016.
- [93] G Britton, GA Hendry, and JD Houghton. Carotenoids, natural food colorants, 1996.
- [94] Cristiane H Azevedo-Meleiro and Delia B Rodriguez-Amaya. Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among cucurbita moschata, cucurbita maxima, and cucurbita pepo. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(10):4027–4033, 2007.
- [95] João Gustavo Provesi, Carolinne Odebrecht Dias, and Edna Regina Amante. Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree. *Food Chemistry*, 128(1):195–202, 2011.
- [96] Veridiana V de Rosso and Adriana Z Mercadante. Identification and quantification of carotenoids, by hplc-pda-ms/ms, from amazonian fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(13):5062–5072, 2007.
- [97] Dámaso Hornero-Méndez and María Isabel Mínguez-Mosquera. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3):407–412, 2007.
- [98] Stefano Amaducci and Giuseppe Pritoni. Effect of harvest date and cultivar on cichorium intybus yield components in north italy. *Industrial Crops and Products*, 7(2-3):345–349, 1998.
- [99] Chiara Carazzone, Dora Mascherpa, Gabriella Gazzani, and Adele Papetti. Identification of phenolic constituents in red chicory salads (cichorium intybus) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138(2-3):1062–1071, 2013.
- [100] Dora Mascherpa, Chiara Carazzone, Giorgio Marrubini, Gabriella Gazzani, and Adele Papetti. Identification of phenolic constituents in cichorium endivia var. crispum and var. latifolium salads by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(49):12142–12150, 2012.
- [101] Arafa I Hamed, Ridha Ben Said, Bogdan Kontek, Abdullah S Al-Ayed, Mariusz Kowalczyk, Jaroslaw Moldoch, Anna Stochmal, and Beata Olas. Lc-esi-ms/ms profile of phenolic and glucosinolate compounds in samh flour (mesembryanthemum forsskaei hochst. ex boiss) and the inhibition of oxidative stress by these compounds in human plasma. *Food research international*, 85:282–290, 2016.

- [102] Naiara Orrego-Lagarón, Anna Vallverdú-Queralt, Miriam Martínez-Huélamo, Rosa M Lamuela-Raventos, and Elvira Escribano-Ferrer. Metabolic profile of naringenin in the stomach and colon using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole-orbitrap-mass spectrometry (lc-esi-ltq-orbitrap-ms) and lc-esi-ms/ms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 120:38–45, 2016.
- [103] Filip Cuyckens and Magda Claeys. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass spectrometry*, 39(1):1–15, 2004.
- [104] Nicolas Fabre, Isabelle Rustan, Edmond de Hoffmann, and Joëlle Quetin-Leclercq. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6):707–715, 2001.
- [105] Adele Papetti, Maria Daglia, Camilla Aceti, Barbara Sordelli, Valentina Spini, Chiara Carrazzone, and Gabriella Gazzani. Hydroxycinnamic acid derivatives occurring in cichorium endivia vegetables. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(2):472–476, 2008.
- [106] Caterina Bergantin, Annalisa Maietti, Alberto Cavazzini, Luisa Pasti, Paola Tedeschi, Vincenzo Brandolini, and Nicola Marchetti. Bioaccessibility and hplc-ms/ms chemical characterization of phenolic antioxidants in red chicory (*cichorium intybus*). *Journal of Functional Foods*, 33:94–102, 2017.
- [107] Christopher A Lipinski, Franco Lombardo, Beryl W Dominy, and Paul J Feeney. Experimental and 497 computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and 498 development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 64:4–17, 2012.
- [108] Juana M Carbonell-Capella, Magdalena Buniowska, Francisco J Barba, María J Esteve, and Ana Frígola. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2):155–171, 2014.
- [109] Vincent EJ Jassey, Geneviève Chiapusio, Daniel Gilbert, Alexandre Buttler, Marie-Laure Toussaint, and Philippe Binet. Experimental climate effect on seasonal variability of polyphenol/phenoloxidase interplay along a narrow fen-bog ecological gradient in sphagnum fallax. *Global Change Biology*, 17(9):2945–2957, 2011.
- [110] AN Michiels, Wim Van den Ende, Mark Tucker, Liesbet Van Riet, and André Van Laere. Extraction of high-quality genomic dna from latex-containing plants. *Analytical biochemistry*, 315(1):85–89, 2003.
- [111] K Edwards, C Johnstone, and C1 Thompson. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic dna for pcr analysis. *Nucleic acids research*, 19(6):1349, 1991.
- [112] Paolo Cabras, Tuberoso, and Carlo Ignazio Giovanni. *Analisi dei prodotti alimentari*. Piccin, Nuova Libreria Padova, 2003, 2013.
- [113] Constantine D Stalikas. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18):3268–3295, 2007.
- [114] J Sutharut and J Sudarat. Total anthocyanin content and antioxidant activity of germinated colored rice. *International Food Research Journal*, 19(1), 2012.

- [115] Kriengsak Thaipong, Unaroj Boonprakob, Kevin Crosby, Luis Cisneros-Zevallos, and David Hawkins Byrne. Comparison of abts, dpph, frap, and orac assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6-7):669–675, 2006.
- [116] Paolo Rapisarda, Fabiana Fanella, and Emanuele Maccarone. Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6):2249–2252, 2000.
- [117] Jara Pérez-Jiménez and Fulgencio Saura-Calixto. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(12):5036–5040, 2005.
- [118] HS Lee, WS Castle, and GA Coates. High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (earlygold) grown in florida, usa. *Journal of Chromatography A*, 913(1-2):371–377, 2001.
- [119] Christina Kurz, Reinhold Carle, and Andreas Schieber. Hplc-dad-msn characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chemistry*, 110(2):522–530, 2008.
- [120] Delia B Rodriguez-Amaya et al. *A guide to carotenoid analysis in foods*, volume 71. ILSI press Washington, 2001.
- [121] Volker Böhm. Use of column temperature to optimize carotenoid isomer separation by c30 high performance liquid chromatography. *Journal of separation science*, 24(12):955–959, 2001.
- [122] M Minekus, Marie Alminger, Paula Alvito, S Ballance, Torsten Bohn, C Bourlieu, F Carriere, Rachel Boutrou, M Corredig, Didier Dupont, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6):1113–1124, 2014.
- [123] Eric Biehler, Anouk Kaulmann, Lucien Hoffmann, Elmar Krause, and Torsten Bohn. Dietary and host-related factors influencing carotenoid bioaccessibility from spinach (*spinacia oleracea*). *Food Chemistry*, 125(4):1328–1334, 2011.
- [124] I Popov and G Lewin. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. vi. antioxidant characteristics of human blood plasma, low density lipoprotein, serum albumin and amino acids during in vitro oxidation. *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence*, 14(3):169–174, 1999.
- [125] John GK Williams, Anne R Kubelik, Kenneth J Livak, J Antoni Rafalski, and Scott V Tingey. Dna polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22):6531–6535, 1990.
- [126] Leonardo Congiu, Milvia Chicca, R Cella, Remigio Rossi, and Giovanni Bernacchia. The use of random amplified polymorphic dna (rapd) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. *Molecular Ecology*, 9(2):229–232, 2000.



**PUBBLICAZIONE**

**1**

Article

# HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS Determination of Major Carotenoids and Their Bioaccessibility from “Delica” (*Cucurbita maxima*) and “Violina” (*Cucurbita moschata*) Pumpkins as Food Traceability Markers

Caterina Bergantin <sup>1</sup>, Annalisa Maietti <sup>1</sup>, Paola Tedeschi <sup>1</sup>, Guillermina Font <sup>2</sup> and Lara Manyes <sup>2</sup> and Nicola Marchetti <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, University of Ferrara, via L. Borsari 46, 44121 Ferrara, Italy; caterina.bergantin@unife.it (C.B.); annalisa.maietti@unife.it (A.M.); paola.tedeschi@unife.it (P.T.)

<sup>2</sup> Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Av. Vicent Andres Estelles s/n, 46100 Burjassot, Spain; guillermina.font@uv.es (G.F.); lara.manyes@uv.es (L.M.)

\* Correspondence: nicola.marchetti@unife.it; Tel.: +39-0532-455-176

Received: 9 October 2018; Accepted: 24 October 2018; Published: 27 October 2018



**Abstract:** Carotenoids are a widespread group of fat-soluble pigments, and their major nutritional importance comes from their pro-vitamin A activity and their antioxidant capacity. In this study, two different pumpkin cultivars (*Cucurbita maxima*, also named ‘Delica’ and *Cucurbita moschata*, also known as ‘Violina’) from the southern Po Delta area were investigated in terms of carotenoid content and the influence of food processing on compositional changes and carotenoid bioaccessibility. Quali- and quantitative determination of carotenoids in sample extracts were performed on a C30 column by means of an online coupled HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS technique. The identification of separated compounds was tentatively achieved by merging (i) chromatographic data, (ii) UV-Vis spectra, and (iii) MS/MS fragmentation spectra. The chromatographic profiles for the two cultivars showed qualitative differences. Two major carotenoids were considered for quantification purposes and further investigations: lutein and  $\beta$ -carotene. Quantification of target carotenoids was performed with external calibration through analytical standards. The concentration of lutein and  $\beta$ -carotene was higher in *C. maxima* than in the other variety, *C. moschata*. Carotenoids are susceptible to degradation (isomerization and oxidation) during food processing (i.e., cooking), and the concentration of lutein and  $\beta$ -carotene were monitored in oven-cooked and steam-cooked pumpkins. The steam-cooking process was superior in terms of limiting carotenoid loss. A complete functional profile of pumpkins as a source of carotenoids was gained with the evaluation of their in vitro bioaccessibility and their bioavailability after intake during human digestion. Bioaccessibility of lutein and  $\beta$ -carotene were estimated by an in vitro static digestion model that involved salivary, gastric, and duodenal phases. Bioaccessibility values progressively increased from the salivary to the duodenal phase for both pumpkin varieties and cooking methods. Bioaccessibility of lutein was always lower than  $\beta$ -carotene for both cultivars and for both cooking methods. Bioaccessibility values for lutein and  $\beta$ -carotene changed from 1.93% to 2.34% vs. 4.94% and 8.83% in the salivary phase, from 2.7% to 4.63% vs. 7.83% and 15.60% in the gastric phase, and from 10.04% to 13.42% vs. 25.81% and 35.32% in the duodenal phase. For both target compounds, bioaccessibility in the duodenal phase was more than twice the gastric values, and it underlined that the type of cooking did not influence release from the initial matrix.

**Keywords:** carotenoids; pumpkins; HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS; C30-column; bioaccessibility

## 1. Introduction

Carotenoids are fat-soluble plant pigments associated with lipid fractions due to their hydrophobicity. These compounds are generally made up of two C<sub>20</sub> geranylgeranyl diphosphate units joined by tail-to-tail bonds. Most carotenoids have one or two ring structures formed by the cyclization of the end groups. In addition to carbon and hydrogen, they may also contain oxygen atoms. The most characteristic property of the carotenoid structure is the long system of alternating double and single bonds. This forms a conjugated system in the central part of the molecule, in which the  $\pi$ -electrons are delocalized for the entire length of the polyene chain. This feature is responsible for the molecular shape, chemical reactivity, light-absorbing properties, and hence the color of carotenoids [1]. Two geometric configurations, *cis* or *trans* isomers, can exist for each double bond in the polyene chain. Most carotenoids are present in nature in the *trans* form [2]. About 750 different carotenoids (without counting their geometrical isomers) have been isolated and identified from natural sources, and some of them are very important to human health thanks to their antioxidant properties. Carotenoids are counted among the major groups of phytochemicals that may contribute to the total antioxidant capacity (TAC) of plant foods [3]. Among the 600 carotenoids in nature, only 40 are present in the human diet, and about 20 of these have been identified in human blood and tissue. The most common are  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lycopene, lutein, zeaxanthin, and cryptoxanthin.

There are several reaction mechanisms that allow carotenoids to exercise their antioxidant functions. The first mechanism that was clearly described is the ability of carotenoids to quench a highly reactive form of oxygen known as singlet oxygen. Many studies report on the ability of various carotenoids to interfere with radical-initiated reactions, particularly with those that result in lipid peroxidation [4]. Carotenoids react with free radicals thanks to the electron transfer mechanism or possible addition reactions. In this way, carotenoids protect cells from damage and oxidative stress, and are also able to boost immune function [5,6].

Epidemiological studies suggest that a diet high in fruit and vegetables is associated with decreased incidence of cancer, cardiovascular disease, and probably of other degenerative or age-related diseases. In fact, fiber, vitamins, phytosterols, sulfur compounds, organic acids, polyphenols, and carotenoids are contained in plant foods and contribute to their health effects [7]. As mentioned above, carotenoids are excellent antioxidants, and a limited number of them are the molecular precursor of vitamin A. Vitamin A is an essential nutrient for humans; pro-vitamin A carotenoids are partly converted to retinol by the oxygenase and reductase enzymes, and the retinol so produced is available for absorption [8].

However, the potential beneficial effects of these bioactive molecules are strictly limited by their bioavailability. There are many factors that influence phytochemical bioavailability, such as the class of the compounds, molecular mass, polarity, solubility, stability, isomerization, associations with the plant matrix, and digestion by gastrointestinal enzymes [9]. The Food and Drug Administration (FDA) has defined bioavailability as the rate and extent to which the active substances or therapeutic moieties contained in a drug are absorbed and become available at the site of action [10]. This definition is also extended to active compounds present in foods. A prerequisite for absorption is the release from the food matrix and solubilization during digestion, which is commonly indicated by the term bioaccessibility [11]. Bioaccessibility includes all events that occur during food digestion, but excludes absorption and assimilation through epithelial tissue and presystemic metabolism. This last concept is incorporated in another definition that is bioactivity. It evaluates how bioactive compounds are transported and arrive at the target tissue, how they interact with other molecules, the biotransformations that can occur, the generation of biomarkers, and the physiological response induced. Bioaccessibility and bioactivity are part of a unique term, bioavailability [12]. It is clear that a multidisciplinary approach from medicine, food and analytical chemistry, and nutraceutical studies is necessary to obtain a complete description and relevant results.

There are several studies that analyze the composition of carotenoids in different species and varieties of pumpkins, emphasizing that there are high concentrations of these compounds closely

related to the varieties or growing conditions [13–15]. It is common that many vegetables are cooked by a simple boiling, steaming, baking, or microwave process before being consumed. These cooking methods would involve a series of changes in the physical characteristics and chemical composition of vegetables, which can take place consecutively or simultaneously. Many studies focused attention on the isomerization and/or degradation of these compounds, but it is known that both positive and negative effects are possible with regard to cooking conditions, chemical structure, and characteristics of the vegetable matrix [16]. For this reason, the investigation of the concentrations of a target compound before and after a cooking process is essential for bioaccessibility studies. Carotenoid absorption and metabolism have been comprehensively investigated [9,17,18]. Generally, the absorption of lipophilic compounds includes several passages: the mechanical and enzymatic disruption of food matrix, release and emulsification into lipid droplets in the stomach followed by incorporation into mixed micelles, and transition through intestinal cells where they are packed into chylomicrons and secreted into the lymphatic system.

Considering what has been mentioned above, the main objectives of this study are: (1) characterization of major carotenoids in two varieties of pumpkins, commonly cultivated in the northeast of Italy; (2) evaluation of the effects of two different cooking methods on the concentration of lutein and  $\beta$ -carotene; (3) investigation of the bioaccessibility of the two selected compounds.

## 2. Results and Discussion

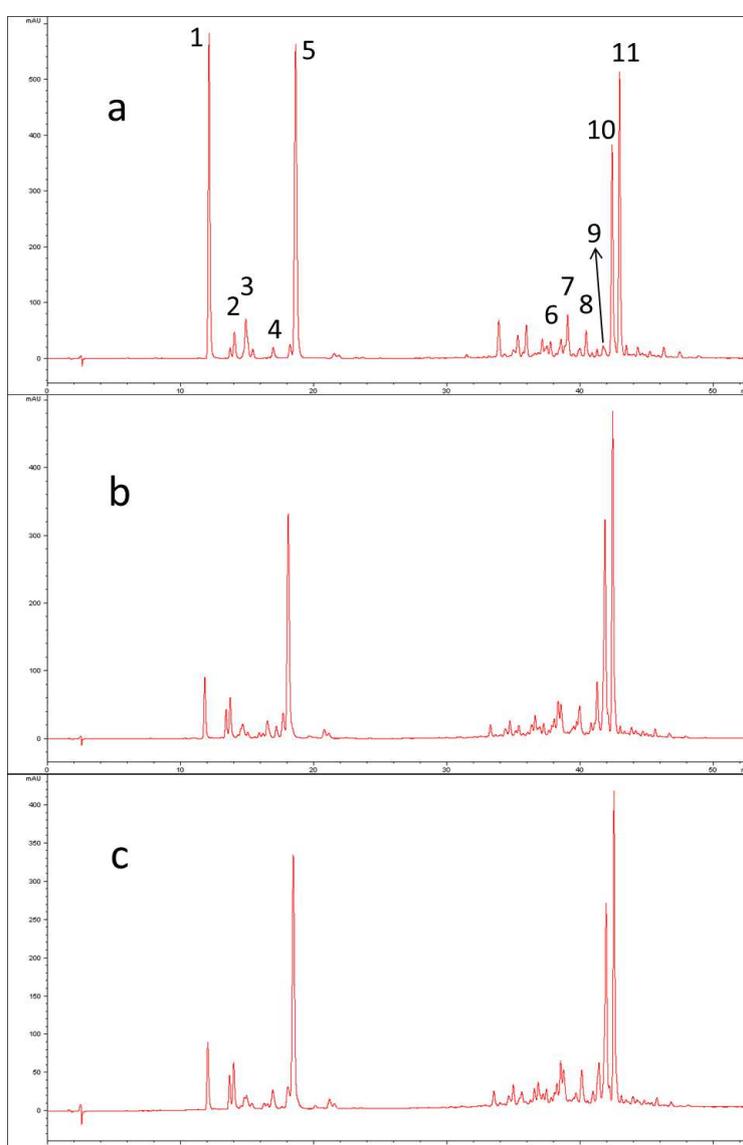
### 2.1. Carotenoid Determination by HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS

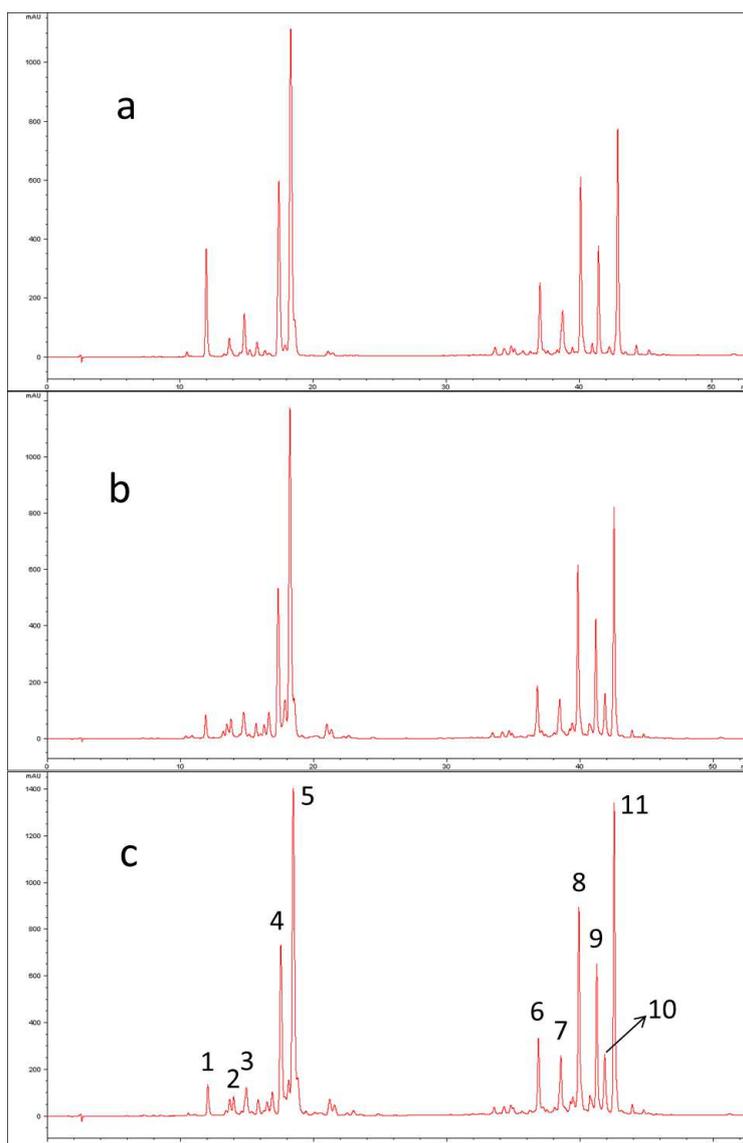
There are many factors that can influence biosynthesis and metabolism and modify the concentration of bioactive compounds in fruits and vegetables [19]. Major qualitative and quantitative differences in carotenoids can be noted in relation to cultivar, environmental conditions (temperature, nutrient availability, intensity of sunlight, ripening stage, harvest time), and genetic factors. The composition of carotenoids in the raw pumpkins was determined by reverse-phase HPLC. In this study, a C30 column was used because the recent literature showed that this type of column is the most suitable for carotenoid separations [20,21]. This stationary phase exhibits enhanced selectivity towards *cis-trans* carotenoids compared to C18 ligands [22]. Usually in reverse-phase analysis, the sequence of chromatographic peaks reflects a decreasing polarity of eluted compounds, and more polar xanthophylls are eluted first. However, on a C30 column the length of the polyene chain is the essential parameter for the observed retention time and isomer separation [20]. Even if there are small differences in the molecular structure, significant differences in retention times were observed.

The UV-Vis parameters used for the identification of peaks are shown in Table 1 together with their chromatographic retention and positive APCI-MS/MS data (protonated molecular ion and its fragment ions). Usually, UV/Vis carotenoid spectra show three relative maxima. Wavelengths are reported in the fourth column of Table 1. The %III/II data represent ratios between the third and second relative maxima for each chromatographic peak. Peak numbers refer to those chromatographic bands identified in Figures 1a and 2c. It was possible to tentatively identify seven peaks out of eleven by means of both UV-Vis and MS data, whereas for Peak 3 the proposed identification was made possible only on the basis of spectrophotometric and literature data because no clear MS and MS/MS spectra were obtained.

**Table 1.** Chromatographic, spectroscopic, and APCI-MS/MS mass spectrometric parameters of the tentatively identified carotenoid peaks (see Figures 1 and 2).

Peak	Retention Time (min)	Compound	$\lambda_{max}$	% III/II	$[M + H]^+$ ( $m/z$ )	Fragment Ions ( $m/z$ )
1	12.08	violaxanthin	418, 442, 470	87	601	534, 583, 429
2	13.83	astaxanthin	418, 442, 470	82	597	579, 285, 379
3	15.00	antheraxanthin	426, 448, 474	27		
4	17.61	zeaxanthin	422, 447, 476	53	569	551, 489, 477, 416
5	18.54	lutein	422, 446, 474	53	569	495, 459, 430, 477
6	37.15	lycopene	419, 442, 470	72	537	457, 413, 177
7	38.85		420, 442, 470	58		
8	40.20		422, 446, 474	54		
9	41.54		422, 446, 474	53		
10	42.18	$\alpha$ -carotene	422, 446, 474	51	537	457, 413, 177
11	42.85	$\beta$ -carotene	425, 452, 477	18	537	457, 445, 413, 400, 269, 177

**Figure 1.** HPLC-UV/Vis chromatograms of “Violina” pumpkin extracts: (a) raw fresh sample; (b) steam-cooked sample; (c) oven-cooked sample.



**Figure 2.** HPLC-UV/Vis chromatograms of “Delica” pumpkin extracts: (a) raw fresh sample; (b) steam cooked sample; (c) oven cooked sample.

The first group of chromatographic peaks includes epoxy- and hydroxy-carotenoids, followed by the second group that consists of nonpolar carotenenes. Peaks 5 and 11 were assigned to lutein and  $\beta$ -carotene, respectively, using analytical standards. For other peaks, a tentative identification was made based on comparison of the parameters with the literature data.

Peak 4 has very low intensity in the chromatogram of *C. moschata* “Violina”, while it is more abundant in *C. maxima* “Delica”. The opposite scenario occurs for Peak 1, even if its intensity is higher in raw pumpkin than cooked. By comparing with other published works concerning analysis of other pumpkin varieties, it can be hypothesized that the signal for Peak 1 is attributable to violaxanthin, while Peak 4 refers to zeaxanthin. Azevedo-Meleiro and Rodriguez-Amaya (2007) do not identify violaxanthin in the *C. moschata* “Menina Brasileira”, while Provesi et al. (2011) identify the signal both in the *C. moschata* “Menina Brasileira” and in the *C. maxima* “Exposicao” but the quantification is smaller in the first one. On the contrary, peak 10 is clearly present in the chromatographic profile of *C. moschata*, while it can not be evidenced in raw *C. maxima*. Literature data show that  $\alpha$ -carotene is absent or present in extremely low concentration in the *C. maxima* [14,15]. For this signal,  $\lambda_{max}$  and %III/II registered are very similar to tabulated references and it can be hypothesized that it corresponds

to  $\alpha$ -carotene [14,23]. The parameter % III/II is the ratio of the height of the longest wavelength absorption peak, designated III, and that of the middle absorption peak, designated as II, taking the minimum between the two peaks as baseline [24].

## 2.2. Carotenoid Levels in Raw and Cooked Pumpkins

Concentrations of carotenoids in raw pumpkins are different from those reported in other studies regarding the same varieties and similar cultivars of pumpkins [25]. An external calibration method was applied for quantitative purposes. Area vs. concentration data have been fitted with linear regression for the two standards, obtaining correlation coefficients higher than 0.995. Table 2 reports the amount of lutein and  $\beta$ -carotene in samples. Quantitative data have been obtained by means of UV/Vis detector with external calibration method, whereas APCI-MS/MS was hyphenated for qualitative purposes aimed at molecular identification of carotenoids.

**Table 2.** Quantification of known and unknown chromatographic peak in fresh raw pumpkins. For each peak determination was reported: as absolute quantification ( $\mu\text{g/g}$  of fresh matter), by using external calibration curve of lutein (peaks from 1 to 5) and of  $\beta$ -carotene (peaks 6 to 11); as relative quantification in terms of peak area%.

Peak	Absolute Quantification		Relative Quantification	
	<i>C. maxima</i> (Delica)	<i>C. moschata</i> (Violina)	<i>C. maxima</i> (Delica)	<i>C. moschata</i> (Violina)
violaxanthin	9.09 $\pm$ 0.99	10.53 $\pm$ 0.96	7.24 $\pm$ 0.42	24.72 $\pm$ 1.04
astaxanthin	2.54 $\pm$ 0.39	1.18 $\pm$ 0.06	1.70 $\pm$ 0.04	1.73 $\pm$ 0.10
antheraxanthin	4.34 $\pm$ 0.74	1.73 $\pm$ 0.14	3.21 $\pm$ 0.07	3.08 $\pm$ 0.09
zeaxanthin	16.99 $\pm$ 3.08	nd	13.83 $\pm$ 0.21	nd
lutein	37.12 $\pm$ 3.08	10.30 $\pm$ 1.01	30.74 $\pm$ 0.10	24.12 $\pm$ 0.65
lycopene	19.25 $\pm$ 2.69	6.44 $\pm$ 0.24	5.08 $\pm$ 0.03	2.38 $\pm$ 0.09
7	17.79 $\pm$ 2.42	7.55 $\pm$ 0.30	4.58 $\pm$ 0.03	3.49 $\pm$ 0.18
8	38.73 $\pm$ 6.09	6.89 $\pm$ 0.40	11.71 $\pm$ 0.06	2.82 $\pm$ 0.02
9	23.66 $\pm$ 3.28	6.39 $\pm$ 0.61	6.59 $\pm$ 0.02	2.31 $\pm$ 0.29
$\alpha$ -carotene	nd	17.56 $\pm$ 2.26	nd	13.40 $\pm$ 0.41
$\beta$ -carotene	49.29 $\pm$ 3.78	26.22 $\pm$ 2.23	15.32 $\pm$ 0.08	21.95 $\pm$ 1.44

Azevedo-Meleiro and Rodriguez-Amaya (2007) detected concentrations of  $66.7 \pm 9.1 \mu\text{g/g}$  f.m. (fresh matter) all-*trans*- $\beta$ -carotene in the *C. moschata* "Menina Brasileira", and of  $15.4 \pm 4.2 \mu\text{g/g}$  f.m. for *C. maxima* "Exposicao". Lutein was also slightly higher in the former than in the latter, with values of  $17.4 \pm 3.5$  vs.  $10.7 \pm 3.9 \mu\text{g/g}$  f.m., respectively [15]. On the contrary, Provesi et al. (2011) noted that lutein levels were higher in *C. maxima* "Exposicao" than *C. moschata* "Menina Brasileira" ( $10.43 \pm 0.13$  vs.  $0.59 \pm 0.18 \mu\text{g/g}$  f.m.), while the concentration of all-*trans*- $\beta$ -carotene was similar between the two varieties, but lower than previous cited work [14]. Different factors may be responsible for the different detected concentrations. It is well known that climate has a significant influence on the content of carotenoids in vegetables. Fruits of the same cultivars produced in different regions exhibit higher or lower carotenoid concentrations in relation to warmer or a more temperate climates. It is probably connected with the increase of carotenogenesis, when fruits are more exposed to sunlight, even if it may cause photodegradation. Table 2 not only reports the amount of lutein and  $\beta$ -carotene in the two fresh raw cultivars, but it also compares absolute determination calculated as lutein-equivalents and  $\beta$ -carotene-equivalents with relative quantification (area %). This means that, in the first case, all other carotenoids were quantified by using a calibration curve obtained for lutein (Peaks 1 to 4) and for  $\beta$ -carotene (Peaks 6 to 10). In the second case, on the other hand, each peak area was reported as a percentage of the total area.

Pumpkin pulp is commonly consumed cooked and, in Italy, baked, and steamed pumpkins are particularly widespread. In this study, the two cooking methods are compared in terms of carotenoid content. The only difference between the two methods was temperature:  $200^\circ\text{C}$  for oven-cooked samples, and  $100^\circ\text{C}$  for steamed, while time was kept constant (20 min). However, the two cooking

methods caused different loss of humidity; to make a direct comparison between raw and cooked samples, the percentage of dry matter was calculated. Data as  $\mu\text{g/g}$  of dry matter are reported in Table 3. The percentage loss of content both in lutein and in  $\beta$ -carotene was less than 10% in the steam-cooked pumpkins, while it was about 30% in the oven-cooked pumpkins. Therefore, steam cooking was outlined as the optimal method, and this is probably due to lower thermal shock suffered compared to oven cooking. This is partially in agreement with previous studies that explain that heat treatment improves the bioavailability of carotenoids. Cooking practices break down food matrices and loosen carotene-binding fibers, but the bioavailability and, sometimes, the carotene content could increase [26].

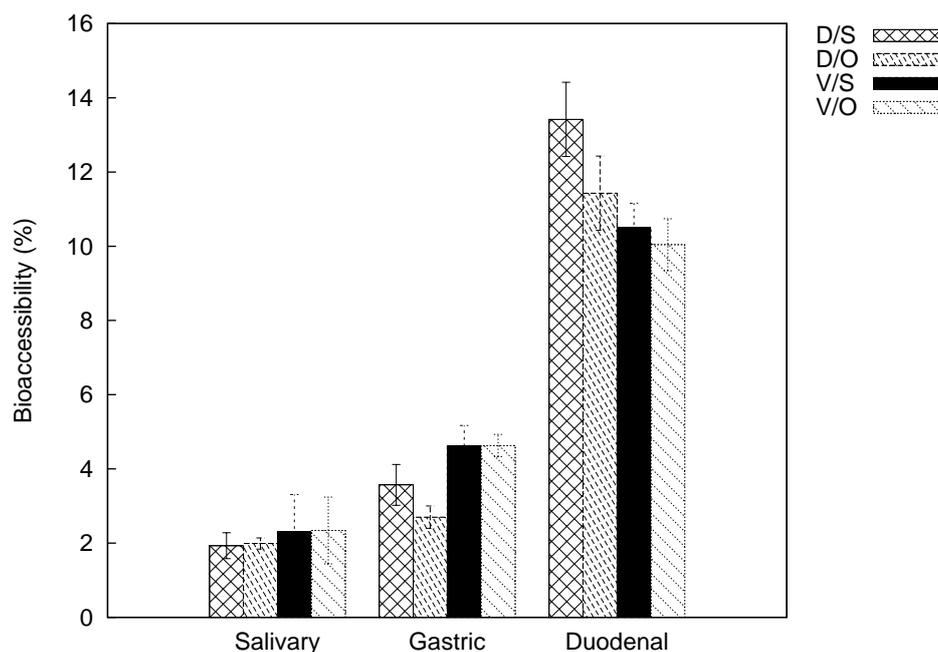
**Table 3.** Quantification of lutein and  $\beta$ -carotene in cooked pumpkin samples. Data are reported as  $\mu\text{g/g}$ .

	<i>C. maxima</i> (Delica)		<i>C. moschata</i> (Violina)	
	Lutein	$\beta$ -carotene	Lutein	$\beta$ -carotene
Oven-cooked	41.18 $\pm$ 1.39	58.46 $\pm$ 1.85	11.22 $\pm$ 0.08	25.71 $\pm$ 2.36
Steam-cooked	39.09 $\pm$ 0.35	47.00 $\pm$ 3.06	10.86 $\pm$ 0.23	31.99 $\pm$ 0.48

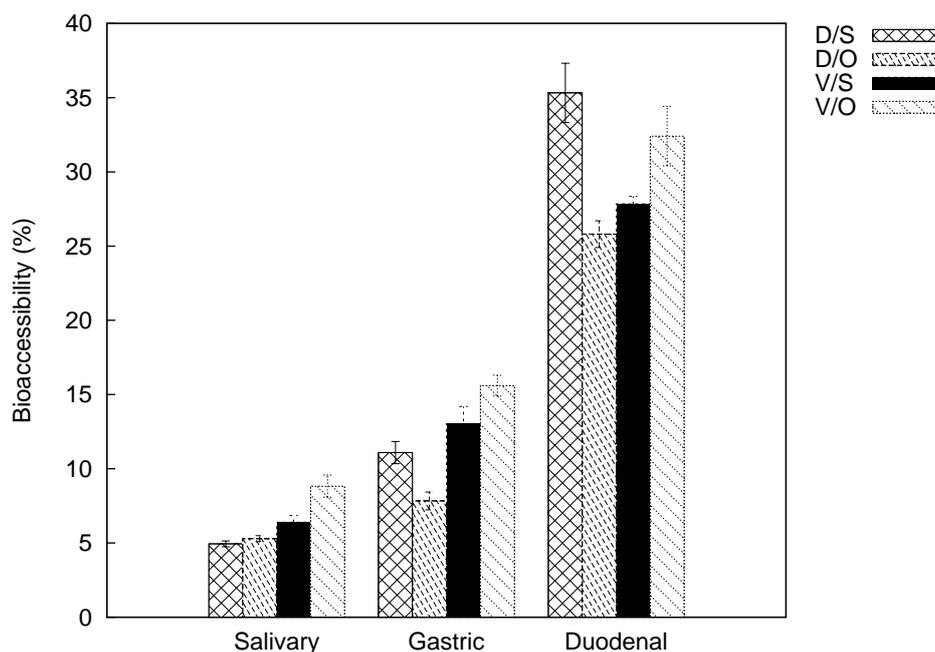
### 2.3. Carotenoid Bioaccessibility

It is well known that the absorption of hydrophobic molecules depends upon efficient release from the food matrix and subsequent solubilization by bile acids and digestive enzymes, culminating in their incorporation into mixed micelles [27]. Micellarization is required for the cellular uptake of carotenoids. In vitro digestion models were used to investigate the structural changes, modifications, digestibility, and release of components during simulated gastrointestinal digestion. Depending on the type of study performed, it is evaluated whether to follow a static or dynamic in vitro model. In vitro dynamic digestion is closest to in vivo conditions: it can simulate gastric emptying rate, peristaltic movements, gradual pH changes in different compartments, and transit time through the small intestine [9]. Unfortunately, this method requires complex computer-controlled systems, higher operating costs, and more time. On the other hand, static digestion takes shape as a more flexible and less expensive model. It is particularly indicated for a large number of samples or to assess many experimental conditions. Unfortunately, static models do not evaluate the dynamic physiological response to the introduction of a food bolus. In both cases, for the analysis of lipophilic compounds, a separation of the micellar fraction is required before investigation: ultracentrifugation for the static model; filtration or employing a membrane for a dynamic model.

A quantitative determination of carotenoids is required for a correct estimation of bioaccessibility. For this purpose, bioaccessibility is calculated as the percentage of the present quantities in the exhaustive extracts of fresh matter, for each variety and each cooking method (see Tables 2 and 3). The bioaccessibility results for lutein and  $\beta$ -carotene from oven- and steam-cooked samples and for each cultivar are reported in Figures 3 and 4, respectively. Samples were subject to simulated digestion through the salivary, gastric, and duodenal steps.



**Figure 3.** Bioaccessibility of lutein from cooked pumpkins: D/S, “Delica” steam-cooked; D/O, “Delica” oven-cooked; V/S, “Violina” steam-cooked; V/O, “Violina” oven-cooked.



**Figure 4.** Bioaccessibility of  $\beta$ -carotene from cooked pumpkins: D/S, “Delica” steam-cooked; D/O, “Delica” oven-cooked; V/S, “Violina” steam-cooked; V/O, “Violina” oven-cooked.

The bioaccessibility values of lutein and  $\beta$ -carotene progressively increase from the salivary to the duodenal phase for both pumpkin varieties and cooking methods. Our findings revealed that the bioaccessibility of lutein is always lower than that of  $\beta$ -carotene. This evidence is not attributable to the lower lutein content in the initial matrix, but rather to possible food-related factors that influence bioaccessibility itself. Bioaccessibility values for lutein in the salivary phase are similar and the average is 2.14% (data changed from 1.93% to 2.34%), while for  $\beta$ -carotene they were more heterogeneous (data changed from 4.94% to 8.83%). Both compounds were less bioaccessible for ‘Delica’ than ‘Violina’

regardless of cooking mode. Comparable behavior can be evidenced in the gastric phase: lutein values were similar and lower than 5% (from 2.70% to 4.63%), while  $\beta$ -carotene did not have a well-defined average value (from 7.83% to 15.60%). In this case, bioaccessibility was also higher for Violina both in oven and steam-cooked samples. In the duodenal phase, lutein values ranged from 10.04% to 13.42%, whereas for  $\beta$ -carotene from 25.81% to 35.32%.

The calculation of the difference in bioaccessibility data between the gastric and salivary phases shows values of about 2 for lutein and 6 for  $\beta$ -carotene (for both compounds, the gap was smaller in the case of the oven-cooked Delica). The same calculation between the other two phases underlined that bioaccessibility in the duodenal phase is more than twice the gastric values (data are lower than 10 for lutein and 25 for  $\beta$ -carotene).

A global examination of the bioaccessibility results shows that the release of lutein and  $\beta$ -carotene was higher during the duodenal phase and also that cooking method did not affect the release of carotenoids from the initial matrix. All of these aspects require further investigation, paying attention to all the causes that influence bioaccessibility of carotenoids.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Chemicals

Ultrapure water was obtained by a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Hexane, methanol, and acetone from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) were used for the extraction. Methanol (HPLC grade), acetonitrile (HPLC grade), methyl tert-butyl ether (HPLC grade), purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), were employed for high-performance liquid chromatographic analyses. Pepsin from porcine gastric mucosa ( $\geq 400$  U/mg),  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* ( $\geq 500$  U/mg), bile salts (microbiology grade), and pancreatin from porcine pancreas (USP grade) were purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). The lutein and  $\beta$ -carotene standards were obtained from Extrasynthese (Genay, France).

#### 3.2. Instrumentation

An ALC multispeed refrigerated centrifuge (PK121R) was purchased from Thermo-Scientific (Waltham, MA, USA). An Ultraturrax (T18 basic) was obtained from IKA (Staufen im Breisgau, Germany). HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS analyses were performed with a modular Agilent liquid chromatographer (1100 series) equipped with a binary pump, a degasser, an autosampler injector, a column oven, and a photodiode array detector. The outstream of the detector high-pressure flow-cell was online coupled with a Thermo Scientific LTQ XL linear ion trap mass spectrometer through an APCI ion source.

#### 3.3. Reagent Preparation

Electrolyte stock solutions were prepared at the following concentrations: KCl 0.5 M;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 M;  $\text{NaHCO}_3$  1 M; NaCl 2 M;  $\text{MgCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$  0.15 M;  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0.5 M;  $\text{CaCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$  0.3 M.

These solutions were used to simulate biofluids involved in the gastrointestinal digestion process and build an in vitro model. Three different solutions were prepared as reported by Minekus [27,28]: Simulated salivary fluid (SSF): 15.1 mL of KCl; 3.7 mL of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 6.8 mL of  $\text{NaHCO}_3$ ; 0.5 mL of  $\text{MgCl}_2$ ; 0.06 mL of  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ . Simulated gastric fluid (SGF): 6.9 mL of KCl; 0.9 mL of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 12.5 mL of  $\text{NaHCO}_3$ ; 0.4 mL of  $\text{MgCl}_2$ ; 0.5 mL of  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ; 11.8 mL of NaCl. SGF was adjusted to pH = 3 with HCl 1 M. Simulated intestinal fluid (SIF): 6.8 mL of KCl; 0.8 mL of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 85 mL of  $\text{NaHCO}_3$ ; 0.33 mL of  $\text{MgCl}_2$ ; 38.4 mL of NaCl. SIF was adjusted to pH = 7 with HCl 1 M.

Enzyme solutions were freshly prepared and preincubated at 37 °C before use.  $\alpha$ -amylase 1500 u/mL: 30 mg of enzyme in 20 mL of SSF. Pepsin 20,000 u/mL: 600 mg of enzyme in 20 mL of SGF. Pancreatin 800 u/mL: 320 mg in 40 mL of SIF. Bile salts: 625 mg in 25 mL of SIF. Purchased enzymes were evaluated according to reference tests as specified in the literature and by the manufacturers [27]: (a) the determination of  $\alpha$ -amylase activity was done with an enzymatic assay,

which was based on spectrophotometric stop reaction using soluble potato starch as a substrate; (b) pepsin activity assay was based on spectrophotometric stop reaction using hemoglobin as the substrate; (c) pancreatin activity was evaluated for its trypsin and chymotrypsin activity based on continuous spectrophotometric rate determination using *p*-toluene-sulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME) and *N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) as substrates.

### 3.4. Sample Collection and Preparation

The two pumpkin cultivars under study were produced in a well-defined area in the southern part of Po Delta (Massenzatica, Ferrara, Italy). Samples were collected from randomized fields in November 2016, and 10 mature pumpkins of each variety were sampled for the analysis. *Cucurbita maxima* 'Delica' weighs approximately 2 kg and has a 12–16 cm longitudinal and a 20–25 cm transverse diameter. It is spherical but flattened at both extremities, and it has a dark-green peel and a light-orange pulp. *Cucurbita moschata* 'Violina' is 45–55 cm long, with an 8–12 cm transverse diameter in the cylindrical portion and a 15–20 cm transverse diameter in the bulbous portion, and weighs approximately 3 kg. For sample preparation, *C. maxima* 'Delica' was divided into four parts by two longitudinal cuts, while *C. moschata* 'Violina' was quartered longitudinally and transversely, resulting in two bulbous and two cylindrical portions. For each pumpkin, peel and seeds were removed and the pulp was cut into small pieces, mixed and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analyzed. For analyses, samples were collected from each section and homogenized in a food multiprocessor to obtain a homogeneous mass.

### 3.5. Cooking Methods

In this work, two different cooking methods were considered. Refrigerated and raw pieces were collected from every section of pumpkins, and were then oven-cooked ( $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min) or steam-cooked ( $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min). For analyses, cooked samples were placed in a food multiprocessor to obtain a homogeneous samples.

### 3.6. Carotenoids Extraction

Carotenoids were extracted from the (raw and cooked) samples using a modified literature procedure by H. S. Lee et al. [22] and C. Kurz et al. [29]. The extraction procedure was checked with regard to structural modifications or damage. The extraction procedure had to be adapted to the matrix being analyzed because carotenoids are found in a considerable variety of foods. The chosen solvent should efficiently extract all carotenoids present in the sample. For this reason pumpkin samples were finely grinded before extraction.

About 5 g of pumpkin puree (raw and cooked), obtained as previously described, was extracted with 15 mL of a mixture of hexane/methanol/acetone (2:1:1, *v/v/v*) in a centrifuge tube (50 mL). The extraction was performed at room temperature for 30 min under continuous and slight shaking. The sample was centrifuged (9000 rpm at  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) for 5 min and the supernatant was recovered. This step was repeated in sequence twice more, and the collected organic portions were evaporated at a temperature lower than  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  using a rotary evaporator. The dried extracts were dissolved in 4 mL of acetonitrile and filtered (nylon,  $0.22\text{ }\mu\text{m}$ ) before HPLC analyses. According to the literature data [14], saponification was not performed because it causes loss in carotenoid content, especially xanthophylls, which are in lower concentrations in this matrix. All procedures were carried out with as dim a light as possible.

### 3.7. In Vitro Static Digestion Model

The in vitro digestion model and the composition of simulated fluids were adapted from earlier studies as described in Section 3.3 and below [27,30]. The mouth, stomach, and small-intestine (duodenum) phases were evaluated and simulated using the three fluids reported above (SSF, SGF, and SIF). Digestion simulation was performed with a thermostatic shaker at a physiological temperature of  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Water and all reagent solutions were warmed at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  before and during

use. Analyses were carried out on the cooked samples of both varieties of pumpkins and for both cooking methods.

*Salivary phase*—About 3 g of the homogenized matrix were mixed with 3.5 mL of SSF, 975  $\mu\text{L}$  of water, 25  $\mu\text{L}$  of  $\text{CaCl}_2$  and 500  $\mu\text{L}$  of  $\alpha$ -amylase solution. Sample was vortex-mixed for 1 min, centrifuged (9000 rpm at 5  $^\circ\text{C}$ ) for 5 min, and then an aliquot of 2.5 mL was obtained for the analysis.

*Gastric phase*—Sample from the salivary phase was added with 7.5 mL of SGF, 295  $\mu\text{L}$  of water, 5  $\mu\text{L}$  of  $\text{CaCl}_2$ , 200  $\mu\text{L}$  of HCl 1 M, and 2 mL of pepsin solution. After vortex-mixing for 30 s, pH was measured and readjusted with HCl 1 M if it was higher than 3. Samples were incubated for 2 h at 37  $^\circ\text{C}$  in the thermostatic shaker. Then, samples were centrifuged (9000 rpm at 5  $^\circ\text{C}$ ) for 5 min and 5 mL of each solutions was collected.

*Intestinal phase*—The sample from the previous phase was mixed with 11 mL of SIF, 3.61 mL of water, 40  $\mu\text{L}$  of  $\text{CaCl}_2$ , 150  $\mu\text{L}$  of NaOH 1 M, 5 mL of pancreatin solution, and 0.2 mL of bile salts solution. It was vortexed for 30 s, and the pH was measured and readjusted with NaOH 1 M if it was not close to the value of 7. Samples were then incubated for 2 h at 37  $^\circ\text{C}$ . At the end of the intestinal phase, samples were centrifuged (9000 rpm at 5  $^\circ\text{C}$ ) for 5 min and 5 mL of solutions was collected.

#### Carotenoid Extraction from Digesta

At the end of each simulated gastrointestinal step, the micellar fraction was separated using the method proposed by E. Biehler et al. with some modifications [31]. Aliquots from different digesta were separately conveyed to centrifuge tubes, and the following extraction procedure was repeated twice. Carotenoids were extracted by the addition of 2.5 mL (in the case of the salivary phase) or 5 mL (in the case of other two phases) of a mixture of hexane/methanol/acetone (2:1:1, *v/v/v*). Samples were vortexed for 1 min, centrifuged (9000 rpm at 5  $^\circ\text{C}$ ) for 5 min, and finally the supernatant was recovered. The combined hexane phases were dried as reported in Section 3.6. The dried extracts were dissolved in 1 mL of acetonitrile and filtered (nylon, 0.22  $\mu\text{m}$ ) before HPLC analyses.

#### 3.8. HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS Analysis

Chromatographic separation was performed on a C30 Develosil RP-Aqueous by Phenomenex (Torrance, CA, USA) 150  $\times$  3.0 mm column, packed with 3.0  $\mu\text{m}$  particles and a porosity of 140  $\text{\AA}$ . Mobile phases were mixtures of water and acetonitrile (70:30 *v/v*; channel A), and methanol: methyl tert-butyl ether (50:50 *v/v*; channel B). Eluent composition changed from 20% to 47% of channel B in 10 min, from 47% to 57% of channel B in 10 min, from 57% to 100% of channel B in 20 min, followed by 100% channel B isocratic for 13 min: total run time was 53 min. After each analysis, the column was re-equilibrated at the starting conditions. The running flow rate was 0.4 mL/min, and the column temperature was set at 23  $^\circ\text{C}$  to optimize carotenoid isomer separation by the column used [32]. The quantity of injected sample was 5  $\mu\text{L}$  and all carotenoids were monitored at 450 nm. Additionally, UV-Vis spectra were obtained between 200 and 600 nm at a spectral acquisition rate of 0.5 scans/s (peak width 0.03 min). HPLC-UV/Vis was coupled in the series with an APCI-MS/MS mass spectrometer. APCI was operated in positive ionization mode and under normal scan condition (10 msec scan rate for MS and 100 msec scan rate for MS/MS). The following source parameters were also used: corona discharge 4–6  $\mu\text{A}$ ; vaporizer temperature 400  $^\circ\text{C}$ ; capillary temperature 300  $^\circ\text{C}$ ; capillary voltage 45 V; tube lens voltage 85 V.

## 4. Conclusions

In this work, two main pumpkin varieties from the northeast of Italy were investigated in terms of their carotenoid resistance to two different cooking methods. Pumpkins are employed as cooked food to prepare processed typical foodstuffs (mainly pasta). Nowadays, some of these agrofood products have a protected geographical indication (PGI) from the European Community, whereas the same does not happen for fresh raw material such as pumpkins. This is the reason why the authors consider it is of fundamental importance to also trace the production origin of fresh ingredients. Thus, this study

was aimed at preliminarily evaluating if selected carotenoids could be considered as traceability markers that are able to aid in the identification of different cultivars even after cooking. This can be considered a first step towards using molecular markers in cooked vegetables employed in processed food. Additionally, the bioaccessibility of two selected carotenoids was studied by means of a static in vitro gastrointestinal digestion process. Obtained results evidenced that, within the general trend where bioaccessibility progressively increases from the salivary step to the duodenal, cooking method can influence bioaccessibility data, particularly during the duodenal stage: the “Delica” pumpkin showed the latest bioaccessibility for both lutein and  $\beta$ -carotene when it has been steam-cooked; on the contrary, “Violina” provided for comparable bioaccessibility for lutein regardless of cooking method, while  $\beta$ -carotene displayed larger bioaccessibility when oven-cooked.

**Author Contributions:** Conceptualization, writing, and supervision, N.M.; investigation and writing—original draft preparation, C.B.; editing, A.M., P.T., G.F., and L.M. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

**Funding:** This research was partially funded by the “Consorzio Uomini di Massenzatica” (CUM) Farmers Consortium in Ferrara with collectively private funding.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Britton, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* **1995**, *9*, 1551–1558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Meléndez-Martínez, A.J.; Britton, G.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chem.* **2007**, *101*, 1145–1150. [[CrossRef](#)]
3. Lako, J.; Trenerry, V.C.; Wahlqvist, M.; Wattanapenpaiboon, N.; Sotheeswaran, S.; Premier, R. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chem.* **2007**, *101*, 1727–1741. [[CrossRef](#)]
4. Palozza, P.; Krinsky, N.I. Antioxidant effects of carotenoids in Vivo and in Vitro: An overview. In *Methods in Enzymology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1992; Volume 213, pp. 403–420.
5. El-Agamey, A.; Lowe, G.M.; McGarvey, D.J.; Mortensen, A.; Phillip, D.M.; Truscott, T.G.; Young, A.J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *430*, 37–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Mortensen, A.; Skibsted, L.H.; Sampson, J.; Rice-Evans, C.; Everett, S.A. Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett.* **1997**, *418*, 91–97. [[CrossRef](#)]
7. Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 230S–242S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Harrison, E.H. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *BBA-Mol. Cell Biol.* **2012**, *1821*, 70–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Alminger, M.; Aura, A.M.; Bohn, T.; Dufour, C.; El, S.; Gomes, A.; Karakaya, S.; Martínez-Cuesta, M.; McDougall, G.; Requena, T.; et al. In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13*, 413–436. [[CrossRef](#)]
10. Balant, L. Is there a need for more precise definitions of bioavailability? *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1991**, *40*, 123–126.
11. Parada, J.; Aguilera, J. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, R21–R32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Verhoeckx, K.; Cotter, P.; López-Expósito, I.; Kleiveland, C.; Lea, T.; Mackie, A.; Requena, T.; Swiatecka, D.; Wichers, H. *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*; Springer: Berlin, Germany, 2015.
13. Carvalho, L.M.J.D.; Smiderle, L.D.A.S.M.; Carvalho, J.L.V.D.; Cardoso, F.D.S.N.; Koblitz, M.G.B. Assessment of carotenoids in pumpkins after different home cooking conditions. *Food Sci. Technol.* **2014**, *34*, 365–370. [[CrossRef](#)]
14. Provesi, J.G.; Dias, C.O.; Amante, E.R. Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree. *Food Chem.* **2011**, *128*, 195–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Azevedo-Meleiro, C.H.; Rodriguez-Amaya, D.B. Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4027–4033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Miglio, C.; Chiavaro, E.; Visconti, A.; Fogliano, V.; Pellegrini, N. Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *56*, 139–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Yeum, K.J.; Russell, R.M. Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 483–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Yonekura, L.; Nagao, A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 107–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Cazzonelli, C.I.; Pogson, B.J. Source to sink: Regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* **2010**, *15*, 266–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Turcsi, E.; Nagy, V.; Deli, J. Study on the elution order of carotenoids on endcapped C18 and C30 reverse silica stationary phases. A review of the database. *J. Food Compos. Anal.* **2016**, *47*, 101–112. [[CrossRef](#)]
21. Wald, J.P.; Nohr, D.; Biesalski, H.K. Rapid and easy carotenoid quantification in Ghanaian starchy staples using RP-HPLC-PDA. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *67*, 119–127. [[CrossRef](#)]
22. Lee, H.; Castle, W.; Coates, G. High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. *J. Chromatogr. A* **2001**, *913*, 371–377. [[CrossRef](#)]
23. de Rosso, V.V.; Mercadante, A.Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5062–5072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Britton, G. Carotenoids. In *Natural Food Colorants*; Springer: Berlin, Germany, 1996; pp. 197–243.
25. Rodriguez-Amaya, D.B.; Kimura, M.; Godoy, H.T.; Amaya-Farfan, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21*, 445–463. [[CrossRef](#)]
26. Hornero-Méndez, D.; Mínguez-Mosquera, M.I. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2007**, *8*, 407–412. [[CrossRef](#)]
27. Minekus, M.; Alminger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carriere, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—An international consensus. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1113–1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Minekus, M. The TNO gastro-intestinal model (TIM). In *The Impact of Food Bioactives on Health*; Springer: Berlin, Germany, 2015; pp. 37–46.
29. Kurz, C.; Carle, R.; Schieber, A. HPLC-DAD-MS characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chem.* **2008**, *110*, 522–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Alegría, A.; Garcia-Llatas, G.; Cilla, A. Static digestion models: General introduction. In *The Impact of Food Bioactives on Health*; Springer: Berlin, Germany, 2015; pp. 3–12.
31. Biehler, E.; Kaulmann, A.; Hoffmann, L.; Krause, E.; Bohn, T. Dietary and host-related factors influencing carotenoid bioaccessibility from spinach (*Spinacia oleracea*). *Food Chem.* **2011**, *125*, 1328–1334. [[CrossRef](#)]
32. Böhm, V. Use of column temperature to optimize carotenoid isomer separation by C30 high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **2001**, *24*, 955–959. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**PUBBLICAZIONE**

**2**



## Bioaccessibility and HPLC-MS/MS chemical characterization of phenolic antioxidants in Red Chicory (*Cichorium intybus*)



Caterina Bergantin, Annalisa Maietti, Alberto Cavazzini, Luisa Pasti, Paola Tedeschi, Vincenzo Brandolini, Nicola Marchetti\*

University of Ferrara, Department of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Ferrara, Italy

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 November 2016

Received in revised form 21 February 2017

Accepted 27 February 2017

#### Keywords:

Bioaccessibility

Red chicory

HPLC-MS/MS

Polyphenols

Antioxidants

### ABSTRACT

Two varieties of red chicory from southern Po Delta area have been characterized in terms of polyphenols content by HPLC-MS/MS. Seven target compounds were selected for determining their bioaccessibility from vegetable matrix. Simulated digestion process was employed for this purpose by means of an in-vitro static model. Salivary, gastric and duodenal phases were realized by using solutions of different physiological enzymes miming the stages of digestion process. Results show well defined behaviors associated with specific structures of aglycone or phenolic acid and position of O-glycosyl moiety. Dicafeoyltartaric acid together with apigenin-7-O-glucoside and kaempferol-7-O-glucoside have similar bioaccessibility trend that is characterized by a higher value for duodenal phase than for gastric one. Quercetin-3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside behaves in reverse way and gastric bioaccessibility turns higher than duodenal. Lastly, the difference between gastric and duodenal bioaccessibility is enhanced in the case of cyanidin-3-O-glucoside and the isomers of caffeoylquinic acid.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Phenolic compounds are well known natural antioxidants that occur in plants, fruits and vegetables as secondary metabolites. They have a protection role for aerial part of plants against UV solar radiation or pests and in the past they have been broadly characterized in their chemical structure and properties (Marais, Deavours, Dixon, & Ferreira, 2006; Shahidi & Naczk, 1995). Today it is recognized that flavonoids represent the largest group of plant phenolic compounds, accounting for over half of the 8,000 naturally occurring phenolic antioxidants (Harborne, Baxter, & Moss, 1999). Some foods, such as fruits, vegetables, cereals and edible plants, represents an important source of antioxidants in human diet with recognized health benefits (Lin & Weng, 2006; Peer & Murphy, 2006). Additionally, the chemical structure can considerably influence antioxidant activity as demonstrated in literature (Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002). Hence, polyphenols may differently contribute to the nutraceutical role of specific food products and they can have variable health-related benefits (Cencic & Chingwaru, 2010). Multidisciplinary studies that involve medicine, nutraceuticals, food chemistry and analytical chemistry seem today the most promising approach to obtain relevant results, informa-

tion and advancement in this field (Prasain, Wang, & Barnes, 2004; Valls, Millàn, Martí, Borrás, & Arola, 2009).

Scientific investigations during last 10 years demonstrated that polyphenols are involved in prevention of chronic-degenerative diseases, such as those of the digestive tract and cardiovascular system (Serafini, Bellocco, Wolk, & Ekstrom, 2002). Today, epidemiological studies are strongly sustained by targeted investigations on digestion, intestinal absorption and metabolism of polyphenols from food (i.e., fruits, vegetables, edible plants and herbs). This might enlighten different perspectives on polyphenols intake and bioactivity (Cilla, Gonzalez-Sarrias, Tomas-Barberan, Espin, & Barbera, 2009; Heim et al., 2002). The fundamental evidence is that the most common polyphenols in human diet are not necessarily the most active toward cells, tissues or organs: this can be related to either a lower intrinsic activity or a limited absorption. For the sake of completeness, also those compounds that are highly metabolized or rapidly eliminated might show a reduced bioactivity (Prasain & Barnes, 2007). In addition to clinical investigations, it appears clear that studies on the role of polyphenols in nutrition and nutraceuticals cannot do without their determination in food matrix (Abu-Reidah, Ali-Shtayeh, Jamous, & Arráez-Román, 2015; Chen et al., 2015), bioaccessibility study (Gil-Izquierdo, Gil, Ferreres, & Tomas-Barberan, 2001) and in-vivo bioactivity determination (Etcheverry, Grusak, & Fleige, 2012).

\* Corresponding author.

E-mail address: [nicola.marchetti@unife.it](mailto:nicola.marchetti@unife.it) (N. Marchetti).

Beyond all this there is an increasing demand for discovering new metabolites, elucidate chemical structures of unknown bioactive molecules and improving knowledge on their metabolic pathway and biochemical role. The employment of advanced, high technology analytical instruments, such as highly efficient liquid chromatographic separations and high resolution mass spectrometry (Capriotti et al., 2015; Chiozzi et al., 2016; Piovesana et al., 2015) is fundamental to achieve valuable understanding in this field. Investigations of bioaccessibility and bioactivity are strongly sustained by advanced instrumentation and column technology, as well as reliable gastrointestinal models (e.g., chemical/enzymatic food matrix dissolution and cellular absorption of solubilized components) that are useful for elucidating bioactives transfer from food matrix to blood stream, and thus for the comprehension of those mechanisms that drive compounds to target tissue or organ.

The principal aim of this work is to contribute with new insights into chemical properties of polyphenols that reflect their behavior in biological processes (i.e., intake, digestion, intestinal absorption) and/or biochemical functions (i.e., trans-epithelial transport, delivery through blood circulation, metabolism, bioactivity). Highlighting possible structure-bioaccessibility relationships of polyphenols during gastrointestinal digestion is a relevant objective of these investigations. Secondly, fully chemical characterization of bioactives profile in foods can have relevant fall-out in understanding the cause of variation of polyphenols mainly in fruits, vegetables and edible plants, particularly those deviations due to environmental factors (such as pedoclimatic, agronomic, ripeness) and to genetic factors. This can have strong impact in protecting typical agrifood products and giving denomination/indication labels to preserve their authenticity. On one side, it has been evidenced that agricultural employment of genetically modified seeds can have negative and harmful effects on the environment, thus, the modern trend is to use seeds and plants that do not undergo hybridization or genetic modification. On the other side, characterization of major varieties of chicory present on the market has successfully been performed and these literature information represent a valid background for further comparison and investigations (Carazzone, Mascherpa, Gazzani, & Papetti, 2013; Mascherpa, Carazzone, Marrubini, Gazzani, & Papetti, 2012; Papetti et al., 2008; Papetti et al., 2013).

Main objectives of this study are the characterization of major polyphenols in two varieties of red chicory from southern Po Delta area and the investigation of bioaccessibility for selected polyphenols. These two varieties resemble two well established cultivars, largely present on the market: “Chioggia”-like (round leaves) and “Treviso”-like (long leaves) red chicory. Thus, it can be relevant to establish whether or not these local varieties are effectively individual cultivars.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampling of red chicory cultivars

The two inspected red chicory varieties (long-leaves and round-leaves) are cultivated in a well defined area in the southern part of Po Delta (see Fig. 1). Lands where vegetables are produced are sited around Massenzatica (Municipality of Mesola, Province of Ferrara), as represented by dark gray circle. Sampling was undertaken between November and December 2015. Red chicory samples were collected from a randomized field and four replicates of each sample were taken from every experimental plot, then cut, mixed and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analyzed.

### 2.2. Chemicals

Methanol (HPLC grade), acetonitrile (LC-MS grade), formic acid (LC-MS grade), potassium chloride (KCl), monobasic phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), magnesium chloride hexahydrate ( $\text{MgCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$ ), ammonium carbonate ( $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ), calcium chloride dihydrate ( $\text{CaCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$ ), quercetin-3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside (Q3OMG), pepsin from porcine gastric mucosa ( $\geq 400$  U/mg),  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* ( $\geq 500$  U/mg), bile salts (microbiology grade), pancreatin from porcine pancreas (USP grade) were purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Dicafeoyltartaric acid (DCTA), apigenin-7-O-glucoside (A7OG), cyanidin-3-O-glucoside chloride (C3OG), kaempferol-7-O-glucoside (K7OG), 3-O-cafeoylquinic acid (3CQA) and 5-O-cafeoylquinic acid (5CQA) were purchased from Extrasynthese (Genay, France). sodium chloride (NaCl) and sodium hydrogen carbonate anhydrous ( $\text{NaHCO}_3$ ) were purchased from Carlo Erba Reagents (Milan, Italy).

### 2.3. Instruments

ALC multi-speed refrigerated centrifuge (model PK121R) was from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Ultra-turrax (model T18 basic) was from IKA (Staufen im Breisgau, Germany). Water-bath with shaking device (model WBN 22) was from Memmert (Schwabach, Germany). Linear ion trap mass spectrometer (model LTQ XL) and HPLC (model Surveyor Plus) equipped with solvent delivery system, degaser, quaternary micro-pump, thermostated auto-sampler and column compartment were Thermo Scientific.

### 2.4. Reagents preparation

Electrolyte stock solutions were prepared at the following concentrations: KCl 0.5 M;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 M;  $\text{NaHCO}_3$  1 M; NaCl 2 M;  $\text{MgCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$  0.15 M;  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0.5 M;  $\text{CaCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$  0.3 M.

*Simulated fluids* - Simulated static in-vitro digestion uses three different electrolyte solutions prepared as reported by Minekus et al. (2014) and Minekus (2015).

Simulated salivary fluid (SSF): 15.1 mL of KCl; 3.7 mL of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 6.8 mL of  $\text{NaHCO}_3$ ; 0.5 mL of  $\text{MgCl}_2$ ; 0.06 mL of  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ . Simulated gastric fluid (SGF): 6.9 mL of KCl; 0.9 mL of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 12.5 mL of  $\text{NaHCO}_3$ ; 0.4 mL of  $\text{MgCl}_2$ ; 0.5 mL of  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ; 11.8 mL of NaCl. SGF was adjusted to pH = 3 with HCl 1 M. Simulated intestinal fluid (SIF): 6.8 mL of KCl; 0.8 mL of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 85 mL of  $\text{NaHCO}_3$ ; 0.33 mL of  $\text{MgCl}_2$ ; 38.4 mL of NaCl. SIF was adjusted to pH = 7 with HCl 1 M.

*Enzyme solutions* - Enzymes provided by the supplier were assayed according to reference tests as reported in literature (Minekus et al., 2014) and manufacturer's protocols: (i)  $\alpha$ -amylase assay was based on spectrophotometric stop reaction using soluble potato starch as substrate; (ii) Pepsin activity assay was based on spectrophotometric stop reaction using hemoglobin as substrate; and (iii) pancreatin activity was assayed in terms of its trypsin and chymotrypsin activity based on continuous spectrophotometric rate determination using p-toluene-sulfonyl-L-arginine methyl ester and N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester as substrates, respectively. Different enzymes were added to specific simulated fluid as reported below, either in case of enzymatic polyphenols extraction or for bioaccessibility experiments (simulated digestion). All enzyme solutions were freshly prepared, preincubated at  $37^{\circ}\text{C}$  before use and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for maximum three days.  $\alpha$ -Amylase 1500 u/mL: 30 mg of enzyme in 20 mL of



**Fig. 1.** Map of southern Po Delta area where Red Chicory cultivars are produced (Massenzatica territory).

SSF. Pepsin 20,000 u/mL: 600 mg of enzyme in 20 mL of SGF. Pancreatin 800 u/mL: 320 mg in 40 mL of SIF. Bile salts: 0.625 g in 25 mL of SIF.

### 2.5. Polyphenols extraction

**Chemical extraction.** 5 g of frozen sample were dispersed in 20 mL of methanol/water/formic acid 80/20/0.1% (v/v) solution by means of ultra-turrax® for 1 min. Then, sample was stirred for 1 h and left overnight in the dark. Next day, sample was centrifuged (10,100g at 5 °C) for 5 min and supernatant was recovered. Successively, the following three steps were repeated in sequence for 5 times: (i) extraction with 10 mL of methanol/water/formic acid 80/20/0.1% (v/v) solution; (ii) magnetic stirring for 10 min; and (iii) centrifuge (10,100g at 5 °C) for 7 min. Fractions were kept separate and 1 mL from each were gathered. A 1 mL aliquot of extracted sample was filtered and injected into HPLC-MS/MS. Pellet undergoes enzymatic extraction as reported in the following.

**Enzyme-assisted extraction.** This procedure is a modified approach described in literature (Chandrasekara & Shahidi, 2012; del Pilar Sánchez-Camargo et al., 2016; Pineda-Vadillo et al., 2016; Saura-Calixto, Serrano, & Goni, 2007) that exploits enzymatic hydrolysis reactions to solubilize polyphenols bound to dietary fiber. 35 mL of milliQ water, 2 mL of bile salts solution, 1 mL of pancreatin solution and 0.5 mL of pepsin solution were added to pellet from previous chemical extraction. Sample was

vortex-mixed and left under agitation at 37 °C for 2 h. After that, sample was centrifuged (10,100g at 5 °C) for 5 min and supernatant was recovered, filtered and analyzed. Enzymatic extraction was repeated twice on the same pellet and supernatants analyzed separately.

### 2.6. In-vitro static digestion model

Bioaccessibility studies were assessed by *in-vitro* static digestion simulation (Alegria, Garcia-Llatas, & Cilla, 2015). Mouth, stomach and small intestine (duodenum) phases were considered and simulated by means of the three simulated fluids (SSF, SGF and SIF, respectively) as reported above and incubation at 37 °C for different durations according with physiological processes. Roughly 3 g of frozen sample were placed inside the fermenter vessel and all reagent solutions and water were warmed at 37 °C before use. Composition of simulated fluids and static digestion procedure were adapted from literature works as described in previous section and below (Chandrasekara & Shahidi, 2012; del Pilar Sánchez-Camargo et al., 2016; Pineda-Vadillo et al., 2016; Saura-Calixto et al., 2007).

**Mouth** - Sample was crushed and coarsely grinded then 3.5 mL of SSF, 975 µL of water, 25 µL of CaCl<sub>2</sub> and 500 µL of α-amylase solution were added. Sample was vortex-mixed for 30 s, then a 300 µL aliquot was taken for the analysis.

**Stomach** – Sample from previous phase was mixed with 7.5 mL of SGF, 295  $\mu$ L of water, 5  $\mu$ L of  $\text{CaCl}_2$ , 200  $\mu$ L of HCl 1 M and 2 mL of pepsin solution. After vortex-mixing for 10 s, samples were incubated for 2 h. Then, samples were centrifuged (10,100g at 5 °C) for 5 min and 1 mL aliquot was filtered and injected for analysis.

**Duodenum** – Sample from stomach phase was added with 11 mL of SIF, 3.61 mL of water, 40  $\mu$ L of  $\text{CaCl}_2$ , 150  $\mu$ L of NaOH 1 M, 5 mL of pancreatin solution and 0.2 mL of bile salts solution. After vortex-mixing for 10 s, samples were incubated for 2 h. Then, samples were centrifuged (10,100g at 5 °C) for 5 min and 1 mL aliquot was filtered and injected for analysis.

### 2.7. HPLC-MS/MS analysis

Liquid chromatographic separation has been done with a Symmetry C18 column (Waters, Milford, MA, USA) 2.1  $\times$  150 mm, packed with 3.5  $\mu$ m fully porous particles, thermostated at 30 °C, under gradient elution condition. Mobile phases were mixtures of water and formic acid 0.1% (v/v), channel A, and acetonitrile and formic acid 0.1% (v/v), channel B. Eluent composition changed from 5% to 30% of channel B in 25 min, followed by 5 min at 95% of B as column cleaning step. Then, column was re-equilibrated at beginning condition for further analysis. The running flow rate was 150  $\mu$ L/min. Auto-sampler compartment was thermostated at 15 °C and the injected sample quantity was 2  $\mu$ L. The chromatographic method was validated according to ICH (ICH, 2005) and resulting parameters reported in Section 3.2 (Polyphenols bioaccessibility). Validation occurred in terms of the following estimators: relative error (RE); relative standard deviation (RSD); linear fit coefficient of determination ( $R^2$ ). Quantitative range of validity for target compounds were: C3OG 0.055–11  $\mu$ g/mL, DCTA 0.11–22  $\mu$ g/mL, 5CQA 0.0565–22.6  $\mu$ g/mL, A7OG 0.0101–1.01  $\mu$ g/mL, K7OG 0.053–1.06  $\mu$ g/mL, Q3OMG 0.07–28  $\mu$ g/mL, 3CQA 0.206–20.6  $\mu$ g/mL. All analyses were repeated five times.

ESI-MS operating conditions were as in the following. Positive ESI: spray voltage = 4.5 kV; capillary voltage = 16 V; tube lens = 45 V. Negative ESI: spray voltage = 4 kV; capillary voltage = –6 V; tube lens = –47 V. Capillary temperature was 275 °C for both positive and negative ESI.  $\text{MS}^2$  and  $\text{MS}^3$  spectra were obtained by collision induced dissociation (CID). CID values (expressed as relative value) were optimized to maximize characteristic base peak intensity for each transition. Positive ESI: cyanidin-3-O-glucoside (C3OG), 449  $m/z$ , CID = 20%; quercetin-3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside (Q3OMG), 551  $m/z$ , CID = 20%; quercetin aglycone, 303  $m/z$ , CID = 35%. Negative ESI: caffeoylquinic acid (3CQA and 5CQA), 353  $m/z$ , CID = 18%; dicaffeoyltartaric acid (DCTA), 473  $m/z$ , CID = 20%; apigenin-7-O-glucoside (A7OG), 431  $m/z$ , CID = 20%; kaempferol-7-O-glucoside (K7OG), 447  $m/z$ , CID = 20%; kaempferol aglycone, 285  $m/z$ , CID = 25%.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Polyphenols determination

On the basis of recent literature, both positive and negative ESI-MS detection was used to identify phenolic acids and flavonoids in different fresh food samples (Hamed et al., 2016; Orrego-Lagaron, Vallverdú-Queralt, Martínez-Huelamo, Lamuela-Raventos, & Escribano-Ferrer, 2016; Plazonic et al., 2009; Quifer-Rada et al., 2015). Analogous compounds were already determined also in commercial chicory varieties (i.e., Chioggia and Treviso) (Carazzone et al., 2013) and MS/MS fragmentation was employed also in this study to detect characteristic daughter ions and, thus, to confirm chemical structure of polyphenolics in our samples. A

total of 36 compounds (15 and 21 in positive and negative ESI condition, respectively) were identified as most abundant and common components. Table 1 lists compounds detected under positive ESI condition, while Table 2 reports those negatively ionized. Both tables also list tentative compounds together with parent  $m/z$  values and characteristic daughter ions found in MS/MS and  $\text{MS}^3$  spectra. Among the identified simplest phenolic acids (malic, caffeic, quinic and caftaric acids), all identified components were in the glycosylated or ester form. Acetyl and malonyl derivatives were also found as mostly diffuse.

MS/MS spectra, and in a few cases further selected precursor ion fragmentations, were useful to confirm the tentative compounds. Glycosylated derivatives were promptly recognized by the most intense MS/MS transition, usually determined by characteristic neutral loss of glycosyl moiety. Less intense MS/MS peaks (when present) can refer to typical fragmentations of involved saccharide unit or loss of malonyl and acetyl groups.  $\text{MS}^3$  spectra of isobaric aglycones might be required as confirmation step (Cuyckens & Claeys, 2004; Fabre, Rustan, de Hoffmann, & Quetin-Leclercq, 2001; Stobiecki, 2000): in this work  $\text{MS}^3$  fragments were used to identify kaempferol, cyanidin (both at  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 287 \text{ m/z}$ ) and less common isorhamnetin ( $[\text{M} - \text{H}]^- = 315 \text{ m/z}$ ) as reported in Tables 1 and 2). Isorhamnetin aglycone shows characteristic loss of methyl group in both positive and negative ESI ( $[\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3]^+ = 302 \text{ m/z}$ ) and  $[\text{M} - \text{H} - \text{CH}_3]^- = 300 \text{ m/z}$ , respectively). Kaempferol fragmentation gives rise to characteristic  $^{1,3}\text{A}$  ion (153  $m/z$ ) while this does not happen with cyanidin.

By inspecting  $\text{MS}^2$  and  $\text{MS}^3$  characteristic daughter ions in both tables it is possible to evidence typical neutral losses of 176  $m/z$  and 162  $m/z$  that refer to glucuronide and glycosyl (hexose) groups, respectively (see entries 1–6 in Table 1 and 9–11 in

**Table 1**

Identified polyphenols in positive ESI mode. Number in square brackets represents the parent ion, while those in parentheses are the relative abundance for each daughter ion.

Entry	Tentative name	$m/z$	$\text{MS}^n (m/z)$
1	Pelargonidin-3-O-monoglucuronide	447	$\text{MS}^2$ [447]: 271(100)
2	Cyanidin-3-O-glucoside	449	$\text{MS}^2$ [449]: 287.1(100)
3	Cyanidin-3-O-galactoside	449	$\text{MS}^2$ [449]: 287.1(100)
4	Kaempferol-7-O-glucuronide	463	$\text{MS}^2$ [463]: 287.1(100); $\text{MS}^3$ [287.1]: 152.9(100); 258.1(30)
5	Quercetin-7-O-glucoside	465	$\text{MS}^2$ [465]: 303(100)
6	Quercetin-7-O-glucuronide	479	$\text{MS}^2$ [479]: 303(100)
7	Cyanidin-3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside	535	$\text{MS}^2$ [535]: 287(100); 449.2(5); $\text{MS}^3$ [287]: 213(100); 136; 188; 231; 259; 269
8	Kaempferide-3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside	549	$\text{MS}^2$ [549]: 301.1(100); 505.2(15); 463.1(10)
9	Quercetin-3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside	551	$\text{MS}^2$ [551]: 303(100)
10	Isorhamnetin-7-O-(6''-O-malonyl)-glucoside	565	$\text{MS}^2$ [565]: 317.1(100); 479(3); $\text{MS}^3$ [317.1]: 302.1(100); 285.1(45)
11	Kaempferol-3-O-glucuronide-7-O-glucoside	625	$\text{MS}^2$ [625]: 449.2(100); 287.1(10)
12	Kaempferol-7-O-glucosyl-3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside	697	$\text{MS}^2$ [697]: 535.2(100); 287.1(20); 449.4(10)
13	Delphinidin-3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside-5-O-glucoside	713	$\text{MS}^2$ [713]: 303.1(100); 465.1(95); 551.2(60)
14	Quercetin-3-O-glucuronide-7-O-(6''-O-malonyl)-glucoside	727	$\text{MS}^2$ [727]: 479.1(100); 303.1(15)
15	Cyanidin-3,5-di-O-(6''-O-malonyl)-glucoside	783	$\text{MS}^2$ [783]: 535.1(100); 287(30)

**Table 2**  
Identified polyphenols in negative ESI mode. Number in square brackets represents the parent ion, while those in parentheses are the relative abundance for each daughter ion.

Entry	Tentative name	<i>m/z</i>	MS <sup>n</sup> ( <i>m/z</i> )
1	Malic acid	133	MS <sup>2</sup> [133]: 114.8(100)
2	Caffeic acid	179	MS <sup>2</sup> [179]: 134.9(100)
3	Quinic acid	191	MS <sup>2</sup> [191]: 110.8(100); 172.9(25)
4	Caftaric acid	311	MS <sup>2</sup> [311]: 148.9(100); 178.9(55); 134.9(5)
5	5- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	337	MS <sup>2</sup> [337]: 190.9(100)
6	3-Caffeoylquinic acid	353	MS <sup>2</sup> [353]: 190.9(100); 178.9(40); 134.9(10)
7	5-Caffeoylquinic acid	353	MS <sup>2</sup> [353]: 190.9(100); 178.9(5)
8	5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	367	MS <sup>2</sup> [367]: 190.9(100); 172.9(3)
9	Apigenin-7- <i>O</i> -glucoside	431	MS <sup>2</sup> [431]: 269.1(100); 268.1(5)
10	Kaempferol-7- <i>O</i> -glucoside	447	MS <sup>2</sup> [447]: 285.7(100); 284.1(70); 255.1(15); 327(13)
11	Quercetin-7- <i>O</i> -galactoside	463	MS <sup>2</sup> [463]: 301.1(100); 300.1(15)
12	Dicaffeoyltartaric acid (chicoric acid)	473	MS <sup>2</sup> [473]: 311(100); 293(80); 178.9(5); 148.9(3)
13	Kaempferide-glucuronide	475	MS <sup>2</sup> [475]: 299.1(100)
14	Kaempferol-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -acetyl)-glucoside	489	MS <sup>2</sup> [489]: 285.1(100); 284.1(18); 299.1(5)
15	Isorhamnetin-7- <i>O</i> -glucuronide	491	MS <sup>2</sup> [491]: 315.1(100); MS <sup>3</sup> [315]: 300.1(100)
16	Quercetin-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -acetyl)-glucoside	505	MS <sup>2</sup> [505]: 301(100); 300(45); 463.2(20)
17	3,5-Di-caffeoylquinic acid	515	MS <sup>2</sup> [515]: 353.1(100); 335.1(2); 191(1); MS <sup>3</sup> [353.1]: 190.9(100); 179(50); 135.9(10); 172.9(5)
18	Isorhamnetin-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -acetyl)-glucoside	519	MS <sup>2</sup> [519]: 315.1(100); MS <sup>3</sup> [315]: 300.1(100)
19	Kaempferol-7- <i>O</i> -rutinoside	593	MS <sup>2</sup> [593]: 285.1(100)
20	Quercetin-7- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroylglucoside	609	MS <sup>2</sup> [609]: 301.1(100); 300.1(25); 343.1(12); 463.3(3)
21	Isorhamnetin-7- <i>O</i> -neohesperidoside	623	MS <sup>2</sup> [623]: 315.1(100); MS <sup>3</sup> [315]: 300.1(100)

Table 2). The presence of Y fragment as the most intense or even as the only one detected is a strong evidence of O-glycosylated derivatives. Assignment of glycosylation position (3 or 7) was tentatively given on the basis of known mostly diffuse flavonoids in chicory varieties already investigated in detail (Carazzone et al., 2013). Analogous arguments can be done for other compounds (i.e., malonyl, acetyl, coumaroyl derivatives, O-diglycosylated, etc.): Tables 1 and 2 show MS<sup>2</sup> daughter ions that reveal the simultaneous loss of malonyl or acetyl and glycosyl moieties as most intense fragmentation, a mass change of 248 *m/z* (i.e., 162 *m/z* for hexose and 86 *m/z* for malonyl group) and 204 *m/z* (i.e., 162 *m/z* for hexose and 42 *m/z* for acetyl group), respectively. This can be seen for entries 7–10 in Table 1 and 14, 16 and 18 in Table 2. Secondly, individual loss of glycosyl, malonyl or acetyl moieties can also be present in MS/MS spectra as less intense fragment ions (roughly 5–20%). In case of malonyl derivatives, CO<sub>2</sub> neutral loss (44 *m/z* mass change) can also be detected as for kaempferide-3-*O*-(6''-*O*-malonyl)-glucoside at entry 8 of Table 1 (transition 549 *m/z* → 505.2 *m/z*). Also, a coumaroylglucoside derivative of quercetin (entry 20 Table 2) was identified by typical coumaroylglucose cleavage (308 *m/z* mass change), 609 *m/z* → 301 *m/z*, and loss of coumaroyl moiety (146 *m/z*), 609 *m/z* → 463 *m/z*.

Compounds reported in entries 11–15 of Table 1 were identified as O-diglycosyl flavonoids and their malonyl derivatives. Mass peaks corresponding to neutral losses of both sugar rings were detected as well as cleavage of malonyl group (i.e., transitions for kaempferol-7-*O*-glucosyl-3-*O*-(6''-*O*-malonyl)-glucoside, 697 *m/z* → 535 *m/z*, 535 *m/z* → 449 and 449 *m/z* → 287 *m/z*).

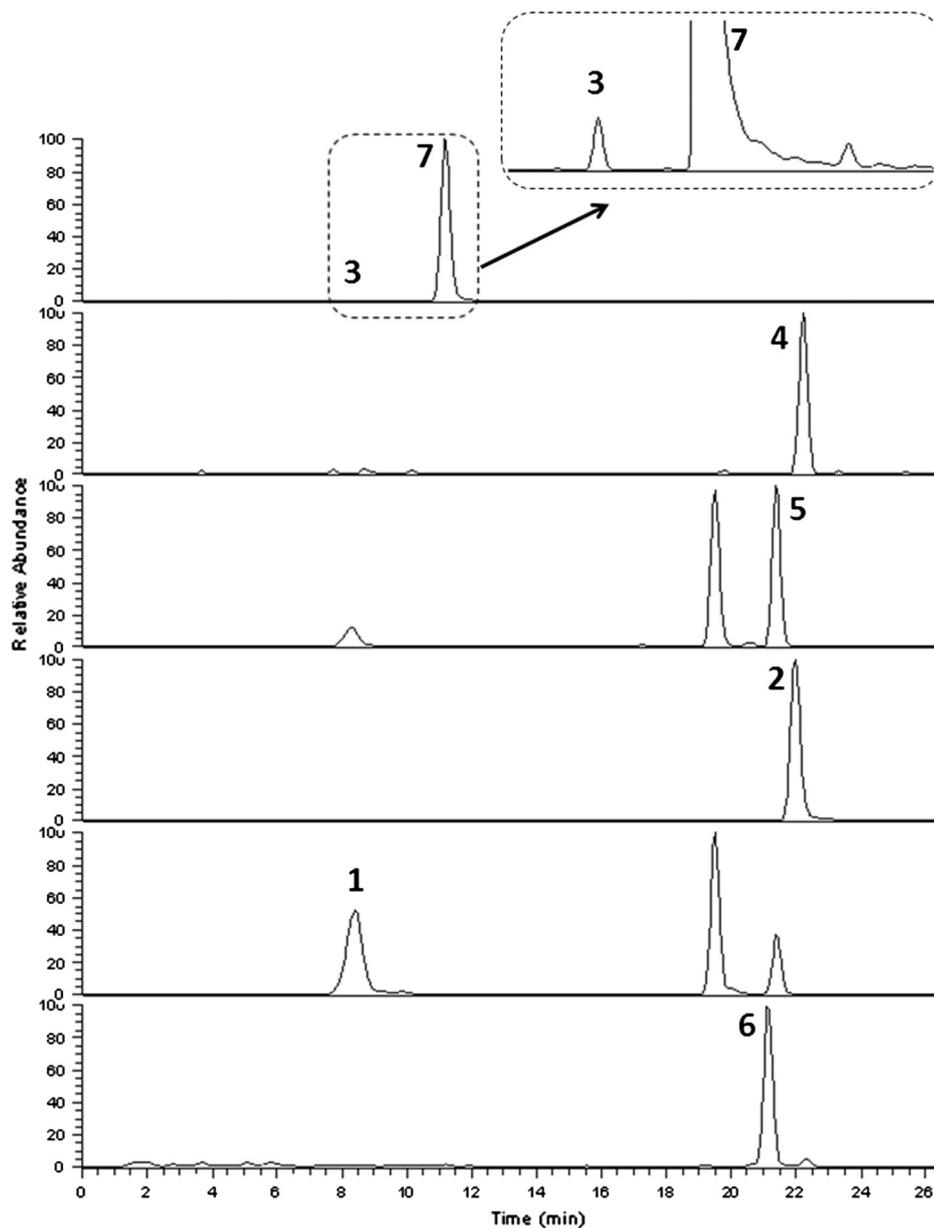
Phenolic acids were promptly identified by their negative pseudo-molecular ion (see Table 2, entries 1–8) and confirmed by MS<sup>2</sup> spectra. They show characteristic transitions that are helpful also in case of esterified derivatives: malic acid (133 *m/z* → 115 *m/z*), caffeic acid (179 *m/z* → 135 *m/z*), quinic acid (191 *m/z* → 111 *m/z*) and caftaric acid (311 *m/z* → 149, 311 *m/z* → 179 *m/z*). Esters of quinic acid give rise to specific fragmentations: loss of coumaroyl moiety (146 *m/z*) for 5-*p*-coumaroylquinic acid (337 *m/z* → 191 *m/z*); loss of caffeoyl group (162 *m/z*) and detection of caffeate negative ion (179 *m/z*) for caffeoylquinic acid (353 *m/z* → 191 *m/z*, 337 *m/z* → 179 *m/z*); losses of ferulyc group (176 *m/z*) and ferulyc acid (194 *m/z*) for feruloylquinic acid (367 *m/z* → 191 *m/z*, 367 *m/z* → 173 *m/z*).

Fig. 2 reports an example of HPLC-MS/MS run for the seven selected target compounds. It can be seen that for some monitored transitions more than one peak is present in the chromatogram. Further investigations with the help of high resolution mass spectrometry has been started to investigate these aspects. This means that positional isomers or different hexose derivatives can be present in the extract. By looking at the third filtered chromatogram (K7OG, 447 *m/z* → 285, 255, 327 *m/z*), kaempferol-3-*O*-glucoside can be responsible for the second most intense peak. Analogously, the fifth chromatogram (C3OG, 449 *m/z* → 287 *m/z*) shows two more peaks that can be related to cyanidin-3-*O*-glucoside and cyanidin-3-*O*-galactoside.

### 3.2. Polyphenols bioaccessibility

Molecular complexity and intrinsic chemical properties of bioactive compounds can strongly influence the absorption process and this partially explains their limited uptake and the extremely low levels in blood and cells (Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney, 2012). Other variables can negatively influence the amount of polyphenols available for absorption in the gut after digestion (bioaccessibility), such as competitive and anti-synergic effects of dietary components (Fernandez-Garcia, Rincon, & Perez-Galvez, 2008), or physical and chemical properties of food matrix (Hedren, Mulokozi, & Svanberg, 2002). Estimation of the bioaccessibility requires quantitative determination of polyphenols and phenolic acids: the total amount in exhaustive extracts (see Table 3) and concentration in each digestion step (salivary, gastric, duodenal). For this purpose, calibration curves were required and external calibration method was applied. Area vs concentration data have been fitted to straight line equations for all standards except for 3CQA and 5CQA, where a quadratic polynomial fit resulted in higher values of correlation coefficient. Method validation resulted in very satisfying parameters for repeatability (RSD < 5%), intermediate precision (RSD < 10%), accuracy (RE < 10%) and linearity (R<sup>2</sup> ≥ 0.995).

Fig. 3a and b report the bioaccessibility results of the seven selected target compounds (see Section 2.7 and Table 3), for both round and long-leaves Red Chicory varieties. The two varieties of Red Chicory show comparable bioaccessibility values for all target compounds in the salivary phase: C3OG and Q3OMG between 0.01% and 0.1%; DCTA, K7OG, 3CQA between 0.35% and 1%; 5CQA and A7OG between 2% and 5%. In the gastric phase round and long leaves red chicory display similar bioaccessibility for C3OG, DCTA, A7OG, K7OG and Q3OMG, but in the case of 5CQA and 3CQA bioaccessibility is much higher (more than twice) for long leaves than round red chicory (54.6% vs 15.2% and 46.8% vs



**Fig. 2.** LC-MS/MS analysis of red chicory extract. Peaks were identified and confirmed by MS/MS transitions (see Tables 1 and 2) as: (1) cyanidin-3-O-glucoside (C3OG); (2) dicaffeoyltartaric acid (DCTA); (3) 5-caffeoylquinic acid (5CQA); (4) apigenin-7-O-glucoside (A7OG); (5) kaempferol-7-O-glucoside (K7OG); (6) quercetin-3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside (Q3OMG); and (7) 3-caffeoylquinic acid (3CQA). The inset figure shows enlarged chromatogram (dashed line border) to display peak 3 and its relative intensity vs peak 7.

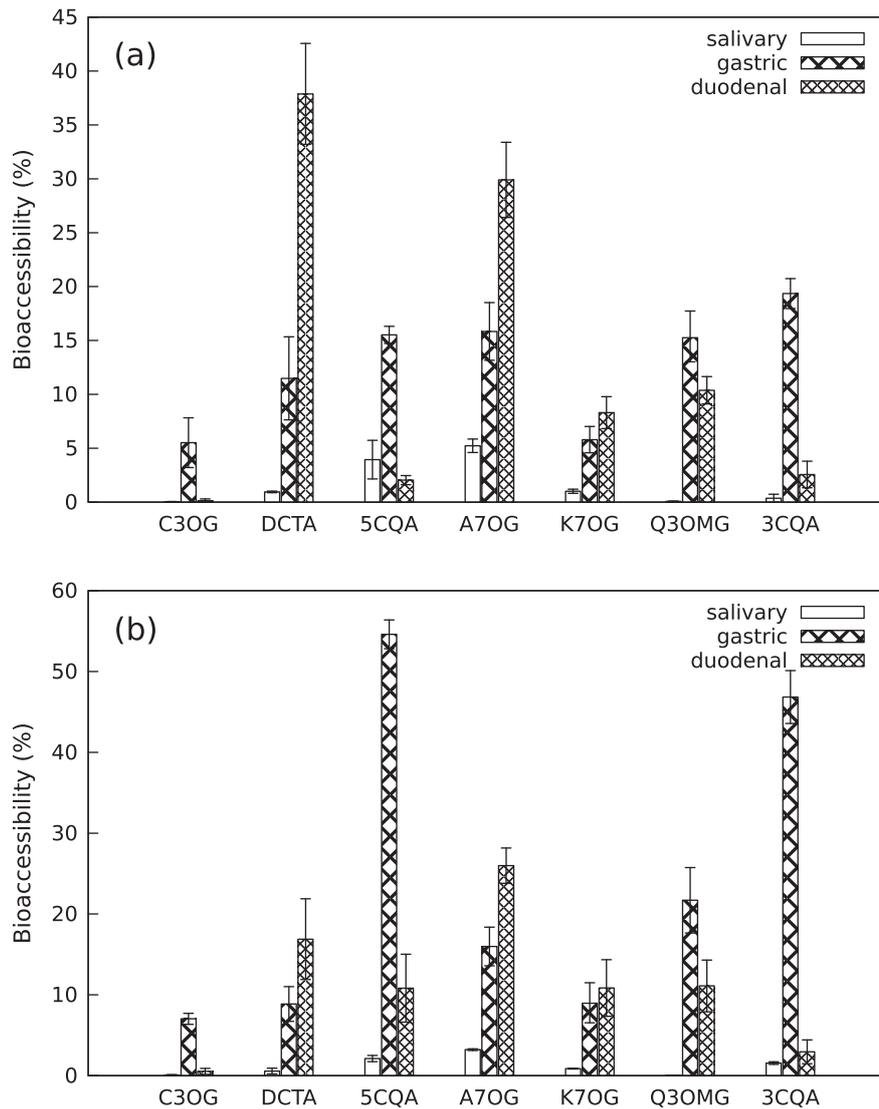
**Table 3**

Total quantification of target compounds for bioaccessibility determination. Target polyphenols are: cyanidin-3-O-glucoside (C3OG); dicaffeoyltartaric acid (DCTA); 5-caffeoylquinic acid (5CQA); apigenin-7-O-glucoside (A7OG); kaempferol-7-O-glucoside (K7OG); quercetin-3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside (Q3OMG); 3-caffeoylquinic acid (3CQA). Errors are reported as standard deviation of five sample extracts.

Peak	Compound name	t <sub>r</sub> (min)	Round-leaves (μg/g)	Long-leaves (μg/g)
1	C3OG	8.4	61.0 ± 5.9	14.6 ± 1.2
2	DCTA	21.9	804 ± 78	548 ± 42
3	5CQA	8.0	3.920 ± 0.053	1.060 ± 0.082
4	A7OG	22.2	0.340 ± 0.031	0.410 ± 0.044
5	K7OG	21.3	6.55 ± 0.61	7.00 ± 0.63
6	Q3OMG	21.1	521 ± 38	280 ± 21
7	3CQA	11.2	638 ± 18	206 ± 14

19.3%, respectively). In the case of duodenal phase, major differences between the two chicories occur for DCTA and 5CQA bioaccessibility data. DCTA has been found higher for round leaves

chicory (37.9%) than for that long leaves one (16.9%); 5CQA is higher for long leaves chicory (10.8%) than for the other (2.0%). Small differences (below 4%) are noticed for A7OG (29.9% vs 26.0%



**Fig. 3.** Results of bioaccessibility experiments for (a) round-leaves and (b) long-leaves Red Chicory varieties. Target compounds are: cyanidin-3-O-glucoside (C3OG); dicaffeoyltartaric acid (DCTA); 5-caffeoylquinic acid (5CQA); apigenin-7-O-glucoside (A7OG); kaempferol-7-O-glucoside (K7OG); quercetin-3-O-(6'-O-malonyl)-glucoside (Q3OMG); 3-caffeoylquinic acid (3CQA). Error bars refer to standard deviation based on five determinations.

for round and long leaves red chicory, respectively) and K7OG (8.3% vs 10.8% for round and long leaves red chicory, respectively). For all the other compounds variations are within the experimental error and, hence, bioaccessibility can be considered constant.

Three different behaviors can be evidenced for the target compounds with an identical pattern for the two red chicories (see Fig. 3a and b). Firstly, a progressive, linear increase of bioaccessibility value from salivary to duodenal phase as seen for DCTA, A7OG and K7OG was observed (type-1 trend, see Fig. 3a and b). Secondly, a clear bioaccessibility maximum value that occurs at gastric phase for C3OG, 5CQA and 3CQA was recognized (type-2 trend). Finally, slightly distinct trend where still gastric bioaccessibility is high but duodenal one is immediately below was characteristic of Q3OMG (type-3 trend). Accordingly to these data, relationships between chemical structure and bioaccessibility seem relevant and significant. O-glycosylation at C7 brings apigenin and kaempferol (having similar aglycone structure, except for -OH moiety at C3) to the same type-1 trend. Conversely, O-glycosylation at C3 seems to enhance gastric bioaccessibility and to modify behavior in the direction of type-2 trend. Also, 3- and 5-Caffeoylquinic acids have the same behavior. However, it is difficult to establish if agly-

cone structure and position of O-glycosylation can have interplay in determining the bioaccessibility of each compound (relative amount and trend).

More detailed systematic comparison between glycosylated polyphenols has undoubtedly to be performed and this is already planned for ongoing works. A global point of view on bioaccessibility data for the studied seven target compounds shows that release of bioactives from Red Chicory matrix is larger during duodenal phase for round leaves variety, while for the long leaves variety total bioaccessibility is higher during gastric phase mainly due to chlorogenic acid and its isomer 5-caffeoylquinic acid. In absolute terms this does not closely follow the outcome of total antioxidant capacity (unpublished data) for the three phases. It is our idea that other polyphenols may be the cause for this deviation and in particular those yet unidentified in this work and that can be present in the two red chicory varieties with different abundance.

#### 4. Conclusions

This study provides preliminary new information about the polyphenol content found in two red chicory cultivars that have

never been investigated before. This study described a first tentative interpretation of bioaccessibility results from a chemical structure point of view. Relative amount of polyphenols released from red chicory matrix during each of the three investigated digestive phases are related with overall chemical structure of antioxidant compounds. Both aglycone and position of O-glycosylated moiety have been discussed and this has never been reported so far.

Further work has to be done to achieve a more detailed chemical characterization of bioactives in these vegetable matrices. High resolution tandem mass spectrometry coupled with ultra high efficient liquid chromatographic separation is fundamental to acquire precise structural information necessary for a unique identification of flavonoids and phenolic acids.

### Conflict of interest statement

The authors whose names are listed in the first page of this manuscript certify that they have NO affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest (such as honoraria; educational grants; participation in speakers' bureaus; membership, employment, consultancies, stock ownership, or other equity interest; and expert testimony or patent-licensing arrangements), or non-financial interest (such as personal or professional relationships, affiliations, knowledge or beliefs) in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

### Acknowledgments

The authors thank the Italian University and Scientific Research Ministry (Grant PRIN 2012 ATMNJ\_003) and the Laboratory Terra&Acqua Tech, Member of Energy and Environment Cluster, Technopole of Ferrara of Emilia-Romagna High Technology Network (POR-FESR 2014–2020). AM and VB also thank CUM Consortium (Massenzatica, Ferrara).

### References

- Abu-Reidah, I. M., Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., & Arráez-Román, D. (2015). HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chemistry*, *166*, 179–191.
- Alegria, A., Garcia-Llatas, G., & Cilla, A. (2015). Static digestion models: General introduction. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. Lopez-Exposito, C. Kleiveland, T. Lea, & A. Mackie, et al. (Eds.), *The impact of food bio-actives on gut health: In vitro and ex vivo models* (pp. 3–12). New York: Springer.
- Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Samperi, R., Ventura, S., Chiozzi, R. Z., & Laganá, A. (2015). Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. *Journal of Food Composition and Analysis*, *44*, 205–213.
- Carazzone, C., Mascherpa, D., Gazzani, G., & Papetti, A. (2013). Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *138*, 1062–1071.
- Cencic, A., & Chingwaru, W. (2010). The role of functional foods, nutraceuticals and food supplements in intestinal health. *Nutrients*, *2*, 611–625.
- Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2012). Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. *Journal of Functional Foods*, *4*, 226–237.
- Chen, Y., Yu, H., Wu, H., Pan, Y., Wang, K., Jin, Y., & Zhang, C. (2015). Characterization and quantification by LC-MS/MS of the chemical components of the heating products of the flavonoids extract in *Pollen Typhae* for transformation rule exploration. *Molecules*, *20*, 18352–18366.
- Chiozzi, R. Z., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Barbera, G. L., Piovesana, S., & Laganá, A. (2016). Identification of three novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides derived from cauliflower by-products by multidimensional liquid chromatography and bioinformatics. *Journal of Functional Foods*, *27*, 262–273.
- Cilla, A., Gonzalez-Sarrias, A., Tomas-Barberan, F. A., Espin, J. C., & Barbera, R. (2009). Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*, *114*, 813–820.
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, *39*, 1–15.
- del Pilar Sánchez-Camargo, A., Montero, L., Stiger-Pouvreau, V., Tanniou, A., Cifuentes, A., Herrero, M., & Ibáñez, E. (2016). Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. *Food Chemistry*, *192*, 67–74.
- Etcheverry, P., Grusak, M. A., & Fleige, L. E. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc and vitamins B6, B12, D and E. *Frontiers in physiology*, *3*, 1–21.
- Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E., & Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, *12*, 707–715.
- Fernandez-García, E., Rincon, F., & Perez-Galvez, A. (2008). Developing an emulsifier system to improve the bioaccessibility of carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 10384–10390.
- Gil-Izquierdo, A., Gil, M. I., Ferreres, F., & Tomas-Barberan, F. A. (2001). In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 1035–1041.
- Hamed, A. I., Said, R. B., Kontek, B., Al-Ayed, A. S., Kowalczyk, M., Moldoch, J., Stochmal, A., & Olas, B. (2016). LC-ESI-MS/MS profile of phenolic and glucosinolate compounds in Samh flour (*Mesembryanthemum frsskali* Hochst. ex Boiss) and the inhibition of oxidative stress by these compounds in human plasma. *Food Research International*, *85*, 282–290.
- Harborne, J. B., Baxter, H., & Moss, G. P. (1999). *Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants* (2nd ed.). London: Taylor & Francis.
- Hedren, E., Mulokozi, G., & Svanberg, U. (2002). In vitro accessibility of carotenes from green leafy vegetables cooked with sunflower oil or red palm oil. *International Journal of Food Science and Nutrition*, *53*, 445–453.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*, 572–584.
- ICH (2005). Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline. Geneva, Switzerland.
- Lin, J.-K., & Weng, M.-S. (2006). Flavonoids as nutraceuticals. In E. Grotewold (Ed.), *The science of flavonoids* (pp. 213–238). New York: Springer.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*, 4–17.
- Marais, J. P. J., Deavours, B., Dixon, R. A., & Ferreira, D. (2006). The stereochemistry of flavonoids. In E. Grotewold (Ed.), *The science of flavonoids* (pp. 1–46). New York: Springer.
- Mascherpa, D., Carazzone, C., Marrubini, G., Gazzani, G., & Papetti, A. (2012). Identification of phenolic constituents in *Cichorium endivia* var. crispum and var. latifolium salads by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 12142–12150.
- Minekus, M. (2015). The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM). In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. Lopez-Exposito, C. Kleiveland, T. Lea, & A. Mackie, et al. (Eds.), *The impact of food bio-actives on gut health: In vitro and ex vivo models* (pp. 37–46). New York: Springer.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food an international consensus. *Food & Function*, *5*, 1113–1124.
- Orrego-Lagaron, N., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huelamo, M., Lamuela-Raventos, R. M., & Escribano-Ferrer, E. (2016). Metabolic profile of naringenin in the stomach and colon using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS) and LC-ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *120*, 38–45.
- Papetti, A., Daglia, M., Aceti, C., Sordelli, B., Spini, V., Carazzone, C., & Gazzani, G. (2008). Hydroxycinnamic acid derivatives occurring in *Cichorium endivia* vegetables. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, *48*, 472–476.
- Papetti, A., Mascherpa, D., Carazzone, C., Stauder, M., Spratt, D. A., Wilson, M., ... Gazzani, G. (2013). Identification of organic acids in *Cichorium intybus* inhibiting virulence-related properties of oral pathogenic bacteria. *Food Chemistry*, *138*, 1706–1712.
- Peer, W. A., & Murphy, A. S. (2006). Flavonoids as signal molecules. In E. Grotewold (Ed.), *The science of flavonoids* (pp. 239–268). New York: Springer.
- Pineda-Vadillo, C., Nau, F., Dubiard, C. G., Cheynier, V., Meudec, E., Sanz-Buenhombre, M., ... Dupont, D. (2016). In vitro digestion of dairy and egg products enriched with grape extracts: Effect of the food matrix on polyphenol bioaccessibility and antioxidant capacity. *Food Research International*, *88*, 284–292.
- Piovesana, S., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Barbera, G. L., Samperi, R., Chiozzi, R. Z., & Laganá, A. (2015). Peptidome characterization and bioactivity analysis of donkey milk. *Journal of Proteomics*, *119*, 21–29.
- Plazonic, A., Bucar, F., Males, Z., Mornar, A., Nigovic, B., & Kujundzic, N. (2009). Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpus* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, *14*, 2466–2490.
- Prasain, J. K., & Barnes, S. (2007). Metabolism and bioavailability of flavonoids in chemoprevention: Current analytical strategies and future prospectus. *Molecular Pharmaceutics*, *4*, 846–864.

- Prasain, J. K., Wang, C.-C., & Barnes, S. (2004). Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology & Medicine*, *37*, 1324–1350.
- Quifer-Rada, P., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huelamo, M., Chiva-Blanch, G., Jauregui, O., Estruch, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (2015). A comprehensive characterization of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chemistry*, *169*, 336–343.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goni, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, *101*, 492–501.
- Serafini, M., Bellocchio, R., Wolk, A., & Ekstrom, A. M. (2002). Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, *123*, 985–991.
- Shahidi, F., & Naczk, M. (1995). *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications*. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc..
- Stobiecki, M. (2000). Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*, *54*, 237–256.
- Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borrás, E., & Arola, L. (2009). Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*, *1216*, 7143–7172.

**PUBBLICAZIONE**

**3**



# Rationale behind the optimum efficiency of columns packed with new 1.9 $\mu\text{m}$ fully porous particles of narrow particle size distribution



Martina Catani<sup>a</sup>, Omar H. Ismail<sup>b</sup>, Alberto Cavazzini<sup>a,\*</sup>, Alessia Ciogli<sup>b</sup>, Claudio Villani<sup>b</sup>, Luisa Pasti<sup>a</sup>, Caterina Bergantin<sup>a</sup>, Deirdre Cabooter<sup>c</sup>, Gert Desmet<sup>d</sup>, Francesco Gasparrini<sup>b</sup>, David S. Bell<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Dept. of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, University of Ferrara, via L. Borsari 46, 44121 Ferrara, Italy

<sup>b</sup> Dept. of Drug Chemistry and Technology, "Sapienza" Università di Roma, P.le A. Moro 5, 00185 Roma, Italy

<sup>c</sup> KU Leuven, Department of Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Analysis, Herestraat 49, Leuven 3000, Belgium

<sup>d</sup> Vrije Universiteit Brussel (VUB), Department of Chemical Engineering, 1050 Brussels, Belgium

<sup>e</sup> Applied Research and Development, Millipore Sigma, 595 North Harrison Road, Bellefonte, PA 16823, USA

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 6 March 2016

Received in revised form 7 May 2016

Accepted 10 May 2016

Available online 12 May 2016

### Keywords:

Column efficiency

Sub-2  $\mu\text{m}$  fully porous particles of narrow particle size distribution (nPSD)

Mass transfer

Eddy dispersion

## ABSTRACT

Columns packed with new commercially available 1.9 fully porous particles of narrow particle size distribution (nPSD) are characterized by extremely high efficiency. Under typical reversed phase conditions, these columns are able to generate very high number of theoretical plates (in the order of 300,000 plates/m and more). In this paper, we investigate the origin of the high performance of these nPSD columns by performing a series of measurements that include, in addition to the traditional determination of the van Deemter curve, peak parking, pore blocking and inverse size exclusion experiments. Two nPSD columns (both  $100 \times 3.0$  mm) have been considered in this study: the first one, packed with particles of 80 Å pore size, is commercially available. The second one is a prototype column packed with 1.9 fully porous particles of 120 Å pore size.

The main conclusion of our study is that these nPSD columns are characterized by extremely low eddy dispersion, while longitudinal diffusion and mass transfer kinetics are substantially equivalent to those of other fully porous particles of similar chemistry.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

In the companion paper to this one [1], the kinetic performance of columns packed with the recently introduced 1.9  $\mu\text{m}$  fully porous particles (average pore diameter 80 Å), known with the commercial name of Titan C<sub>18</sub>, has been investigated by using a series of benzene derivatives under reversed phase (RP) conditions. The study was performed on a set of 6 columns (length: 50, 75 and 100 mm, internal diameter 2.1 and 3 mm) that represents, in our opinion, a large enough sample to draw reliable conclusions on their kinetic behaviour. The most relevant results from that study confirmed, on the one hand, the excellent kinetic performance of narrow particle size distribution (nPSD) columns already demonstrated in literature [2,3] (with reduced HETP,  $h$ , as small as 1.7–1.9) but, on the other hand, revealed how these columns can be very efficiently operated even at relatively large flow rates [1].

This latter conclusion thus contrasts those of Gritti and Guiochon [2,3] who observed, by using a series of phenone derivatives under RP conditions, a dramatic loss of performance when the column was operated at velocities slightly larger than the optimum. Gritti and Guiochon explained this finding on the base of the very low intraparticle diffusivity that would characterize the Titan C<sub>18</sub> particles (about three times smaller, for a retention factor of 2, than for typical fully porous C<sub>18</sub> particles). Following [2,3], the unusually low intraparticle diffusivity not only explains the very good performance of these columns at relatively low flow rates (thanks to very reduced longitudinal dispersion) but also their scarce performance at high flow rates due to slow mass transfer [2,3]. On the other hand, no effect on eddy dispersion was observed.

In the attempt of giving an explanation for the observed differences, in this study we present a detailed investigation of contributions to band broadening of the individual steps involved in the migration of the compound peaks through heterogeneous porous media. Essentially the same experimental protocol as in [2,3] was employed. It requires peak parking [4–7], total pore-blocking [8,9] and accurate HETP measurements. Combined with

\* Corresponding author.

E-mail address: [cvz@unife.it](mailto:cvz@unife.it) (A. Cavazzini).

models of effective longitudinal diffusion through the packed bed [10–12], this information permits to achieve a physically-sound interpretation of mass transfer in modern liquid chromatography (LC) columns. The main study was performed by using a series of benzene derivatives as probe compounds, however, for the sake of comparison, the van Deemter curves of phenone derivatives used in [2,3] were also measured.

Finally, besides the Titan C<sub>18</sub> column packed with 1.9 μm fully porous particles with average pore size 80 Å used in previous works [1–3], a prototype column (supplied by Supelco) was also fully characterized from a kinetic viewpoint. This column is packed with Titan C<sub>18</sub> 1.9 μm but of average pore size 120 Å

## 2. Theory

Under the hypothesis of independence of the different contributions leading to peak broadening in LC [13,14], the functional relationship between the reduced plate height  $h=H/d_p$  (being  $H$  the HETP and  $d_p$  the particle diameter) and the interstitial reduced velocity  $\nu$  is commonly written as the sum of three terms including the eddy dispersion,  $a(\nu)$ , the longitudinal diffusion,  $b/\nu$ , and the mass transfer resistance across the stationary phase,  $c_s\nu$  [15,16], that is:

$$h = a(\nu) + \frac{b}{\nu} + c_s\nu \quad (1)$$

The interstitial reduced velocity is defined as:

$$\nu = \frac{u_e d_p}{D_m} \quad (2)$$

where  $D_m$  is the bulk molecular diffusion coefficient and  $u_e$  is the interstitial velocity, i.e. the velocity referred to the mobile phase moving between particles [17]:

$$u_e = \frac{F_v}{\pi r_c^2 \epsilon_e} \quad (3)$$

being  $F_v$  the flow rate,  $r_c$  the inner column radius and  $\epsilon_e$  the external column porosity:

$$\epsilon_e = \frac{V_e}{V_{col}} \quad (4)$$

with  $V_{col}$  the geometric volume of the column.

For columns packed with very fine particles, usually a term accounting for the frictional heating due to the stream of the mobile phase against the bed under significant pressure must be added to Eq. (1). However, given the quasi-adiabatic conditions under which experiments were performed, it was not necessary to add this term [18–21].

The meaning of the different terms appearing in Eq. (1) is well known. The longitudinal (or axial) diffusion term describes the band broadening due to the diffusion of molecules through the porous particles and the interstitial volume in absence of flow. Since this is the only contribution to band broadening when the flow is switched off, it is best estimated through peak parking experiments [4–7]. In reduced coordinates, the longitudinal diffusion term  $b$  is given by [5,13,15,22]:

$$b = 2(1 + k_1) \frac{D_{eff}}{D_m} = 2(1 + k_1) \gamma_{eff} \quad (5)$$

where  $D_{eff}$  is the effective longitudinal diffusion coefficient,  $\gamma_{eff}$  ( $=D_{eff}/D_m$ ) is the dimensionless effective diffusion coefficient and  $k_1$  is the zone retention factor, defined as [5,23]:

$$k_1 = \frac{t_R - t_e}{t_e} \quad (6)$$

being  $t_R$  the retention time and  $t_e$  the time spent by a species molecule in the interstitial volume.  $k_1$  is connected to the more often employed phase retention factor,  $k$ , via:

$$k_1 = \frac{(1 + k)\epsilon_{tot}}{\epsilon_e} - 1 \quad (7)$$

where  $\epsilon_{tot}$  ( $=V_0/V_{col}$ , being  $V_0$  the thermodynamic void volume) is the total column porosity. In place of the traditional Knox parallel zone model (also referred to as residence time weighted model) very often used in LC for the interpretation of  $D_{eff}$  [5,13,24,25], in this work we made use of the more advanced Effective Medium Theory (EMT) [26], which allows for a more physically-sound description of diffusion through complex composite porous media [10,11]. Among the many EMT models available in literature, the simplest Maxwell's expression of the effective longitudinal diffusion in fully porous ordered and random sphere packings is written as [10,11,15,27–30]:

$$D_{eff} = \frac{1}{\epsilon_e(1 + k_1)} \left[ \frac{1 + 2(1 - \epsilon_e)\beta}{1 - (1 - \epsilon_e)\beta} \right] D_m \quad (8)$$

where  $\beta$  is the so-called polarizability constant:

$$\beta = \frac{\alpha_{part} - 1}{\alpha_{part} + 2} \quad (9)$$

and  $\alpha_{part}$  is the relative permeability:

$$\alpha_{part} = \frac{D_{part} K_p}{D_m} \quad (10)$$

where  $D_{part}$  is the overall diffusion coefficient through the porous particles (including diffusion in the stagnant mobile phase and surface diffusion) and  $K_p$  is the whole-particle volume ( $V_{part}$ )-based equilibrium constant, that is:

$$K_p = \frac{m/V_{part}}{C_m} \quad (11)$$

where  $m$  and  $C_m$  represent the mass of the adsorbed species and the equilibrium concentration in the mobile phase, respectively. Therefore, operatively,  $K_p$  can be calculated by:

$$K_p = \frac{k_1 \epsilon_e}{1 - \epsilon_e} \quad (12)$$

Other EMT models, such as for instance the Torquato's one, allows in principle for a more accurate estimation of these parameters. However, under the experimental conditions employed in this work (namely, retention factor always larger than 0.5), it has been demonstrated [12,28,29] that the difference between the simple Eq. (8) and the Torquato's model is negligible (see also later on).

The kinetic  $c_s$  term appearing in Eq. (1) describes the mass transfer across the stationary phase. Since there is absence of flow inside particles, the mass transfer coefficient across the stationary phase is velocity-independent, which makes it easier to establish theoretically-sound expression for this contribution [16]. Following Giddings [13], for fully porous spherical particles this term is commonly expressed as [15,22]:

$$c_s = \frac{1}{30} \frac{k_1}{(1 + k_1)^2} \frac{D_m}{D_{part}} \quad (13)$$

Finally, the eddy dispersion term,  $a(\nu)$  in Eq. (1), is caused by the erratic flow profile in the through-pores of the packed bed. It includes trans-channel eddy dispersion, short-range inter-channel eddy dispersion, trans-column eddy dispersion. Despite the fundamental work of Giddings culminated in the well-known coupling theory [13], there is still considerable debate in literature regarding the values of the geometrical parameters needed to describe the complex structures of packed beds [31]. Much work in this direction has been done by Tallarek's group with a very sophisticated

approach based on the morphology reconstruction of the actual stationary phase structure and the calculation of transport properties in the reconstructed materials [32–35]. On the other hand, an experimental estimation of  $a(v)$  can be achieved by subtracting to accurately measured  $h$  values (Eq. (1)) both the longitudinal diffusion and the mass transfer terms independently estimated by Eqs. (5) and (13) [15]:

$$a(v) = h - \frac{b}{v} - c_s v \quad (14)$$

### 3. Experimental

#### 3.1. Columns and materials

Two  $100 \times 3.0$  mm (length  $\times$  internal-diameter) stainless steel Titan  $C_{18}$  columns packed with  $1.9 \mu\text{m}$  particles of respectively  $80 \text{ \AA}$  and  $120 \text{ \AA}$  pore size were employed.  $C_{18}$  ligand density was  $2 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  for the  $80 \text{ \AA}$  column (specific surface area  $400 \text{ m}^2/\text{g}$ ) and  $3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  for the  $120 \text{ \AA}$  one (specific surface area  $300 \text{ m}^2/\text{g}$ ). The columns were generously donated by Supelco Analytical (USA). Polystyrene standards (molecular weights 500, 2000, 2500, 5000, 9000, 17,500, 30,000, 50,000, 156,000, 330,000, 565,000, 1,030,000, 1,570,000, 2,310,000) employed for Inverse Size Exclusion measurements were purchased from Supelco. Decane, 2-propanol, tetrahydrofuran, uracil, phenol, nitrobenzene, benzaldehyde, benzene, toluene, ethylbenzene, butylbenzene, propylbenzene, pentylbenzene were from Sigma–Aldrich. Acetonitrile (ACN) was from VWR International. Ultra-high quality Milli-Q water was obtained by a Milli-Q water purification system (Millipore).

#### 3.2. Equipment

A Waters Acquity UPLC, controlled by Empower 3 software and equipped with a binary solvent delivery system, an autosampler, a column thermostat, a photodiode array detector with a 500 nL cell, was used for the determination of the van Deemter curves. The equipment was operated under still-air [21,36] and quasi-adiabatic conditions. The maximum back pressure reachable by the system is 1000 bar. To reduce the extra-column contributions, two  $250 \times 0.075$  mm nano-Viper capillary tubes (Thermo Scientific) were used to connect, respectively, the injector to the column and the column to the detector. The extra column peak variance, measured from the injector needle port to the detector cell, was  $1.2 \mu\text{L}^2$  (calculated through peak moments) at a flow rate of 1 mL/min. ISEC experiments were carried out on an Agilent 1100 Series Capillary LC system equipped with a binary pump system, an autosampler, a column thermostat and a photodiode array detector. This equipment was also employed for peak parking experiments.

#### 3.3. Inverse size exclusion chromatography (ISEC)

ISEC measurements were performed by using tetrahydrofuran as the mobile phase [37]. Injection volume, flow rate and detection wavelength were, respectively,  $2 \mu\text{L}$ , 0.1 mL/min and 254 nm. Retention volumes were corrected for the extra-column contribution before being plotted against the cubic root of the molecular weight. As shown in [1], the (ISEC estimation of) external column volume,  $V_e$ , is calculated by extrapolating the excluded branch of this plot. The thermodynamic void volume,  $V_0$ , was calculated from the corrected elution volume of benzene in tetrahydrofuran.

#### 3.4. Total pore blocking

The external column volume was also estimated by using the so-called total pore blocking method [8,38]. In this case, columns were firstly flushed with 100 mL of 2-propanol and then with 60 mL of decane to fill with it the pores of the stationary phase. Finally, pure water was used to remove decane from interstitial space of columns. Complete removal of decane was confirmed by monitoring both DAD signal and column backpressure and by repeatedly injecting an unretained molecule (thiourea dissolved in pure water) until a constant elution volume was achieved, which gives (the total pore blocking estimation of)  $V_e$ . Columns were flushed again with 2-propanol to remove the blocking agent from the pores before further use.

#### 3.5. Peak parking measurements

The flow rate used for peak parking measurements was 0.1 mL/min. Parking times were 0, 120, 600, 1800 and 3600 s. The detailed description of peak parking procedure is given in the companion paper [1].

#### 3.6. Van Deemter curve measurements

The van Deemter curves for nitrobenzene, toluene, ethylbenzene and butylbenzene were measured at  $35.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ . The mobile phase was a binary mixture of ACN/water 60:40 v/v. The injection volume was  $0.5 \mu\text{L}$ . Retention time and column efficiency ( $N$ ) of eluted peaks were automatically calculated by the Empower software (v. 3). The detection wavelength was 214 nm; sampling rate was 80 points/s. Due to the very reduced extra-column volume of the modified Waters UPLC employed in this work (see before for details), no correction was applied to compensate for the extra-column contribution. The flow rates employed for studying the dependence of  $H$  on the mobile phase velocity were 0.025, 0.05, 0.1 mL/min and then, from 0.1 mL/min to the maximum reachable flow rate, step increments of 0.1 mL/min were applied (see figure captions for more information).

#### 3.7. SEM measurements

SEM images of both bare-silica and  $C_{18}$ -functionalized Titan  $C_{18}$  particles were obtained with a Zeiss EVO 40. The instrument was operate with an accelerating voltage of 20 kV and with  $5000\times$  magnification. Particles were conductive enough to omit the use of carbon coating. Of every particle batch, the diameter of at least 500 particles was measured. To determine particle sizes, SEM pictures were uploaded in a drawing program (Windows Paint) and straight lines, corresponding to the diameter of particles, were manually drawn over them. This manual procedure was preferred because it allowed determining the position of particle circumference with the highest possible degree of precision and certainty. The length of straight lines was determined in an automated way using an in-house written script in Imaq Vision Builder (National Instruments Corporation, Austin, TX, USA).  $d_{\text{Sauter}}$  was calculated as:

$$d_{\text{Sauter}} = \frac{\sum_{i=1}^n n_i d_i^3}{\sum_{i=1}^n n_i d_i^2} \quad (15)$$

where  $d_i$  and  $n_i$  are, respectively, a given particle size and the number of particles with diameter included between  $d_i$  and  $d_i + \Delta d_i$ .  $\Delta d_i$  was assumed 0.07.

The particle size distribution of the different supports was subsequently determined from the nominal particle sizes, by

**Table 1**

Geometrical characteristics and physico-chemical properties of Titan C<sub>18</sub> columns: total ( $\epsilon_t$ ), interstitial ( $\epsilon_e$ ) and particle ( $\epsilon_p$ ) porosities; specific permeability ( $k_0$ ); Kozeny–Carman constant ( $K_c$ ). Batch: number of silica batch. Calculation of  $K_c$  for the Titan C<sub>18</sub> columns was based on  $d_{sauter}$ . See Ref. [1] for further details.

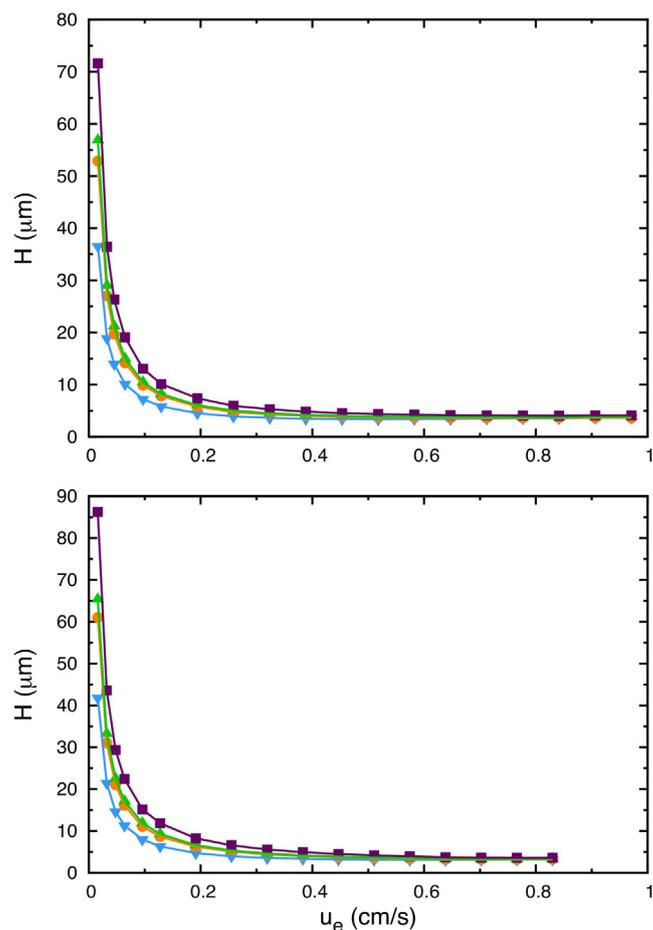
Column	Batch #	$\epsilon_{tot}$	$\epsilon_e$	$\epsilon_p$	$k_0 \times 10^{11}$ (cm <sup>2</sup> )	$K_c$
Titan-C <sub>18</sub> , 80 Å	7001	0.593	0.364	0.360	2.77	179
Titan-C <sub>18</sub> , 120 Å	2090	0.597	0.369	0.361	2.70	170

expressing the diameter of at least 500 particles per column batch in a frequency distribution diagram. To properly normalize the graph (surface under curves should be unity), the results were plotted as  $(d_{ave} \times n_i) / \sum(n_i \times \Delta d_i)$  vs.  $d_i/d_{ave}$ , being  $d_{ave}$  the average particle diameter.

#### 4. Results and discussion

Geometric characteristics of Titan columns employed in this work are compared in Table 1 (experimental details on these measurements are given in [1]).  $\epsilon_e$  was estimated by both ISEC and total pore blocking experiments. The agreement between the two techniques was within about  $\pm 3\%$  (in Table 1, only the ISEC-based estimations of  $\epsilon_e$  have been reported). It is worth to notice how experimental values of  $\epsilon_e$  (0.364 and 0.369, respectively for the 80 and the 120 Å column) are very close to the theoretical limit (0.36) calculated by Baranau and Tallarek [39] for frictionless random-close packings of particles with a PSD similar to that of the Titan C<sub>18</sub> columns (about 10%) [1]. This confirms that packing of columns has been extremely efficient. Due to the relationship between  $\epsilon_e$  and hydraulic permeability, it is not surprising that specific permeabilities of columns (Table 1, sixth column) were also very similar (plots of column backpressure vs. mobile phase velocity needed for the estimation of  $k_0$  are reported under Supporting Information).

The van Deemter curves measured on the two columns are given in Fig. 1 in the form of  $H$  vs.  $u_e$ . Four compounds were considered in this work, nitrobenzene, toluene, ethylbenzene and butylbenzene. They cover a wide range of retention factors going from 2.7 to more than 20 if given as zone retention factor  $k_1$  (see Table 2, columns 2–3) or from 1.2 to 12.3, if expressed as phase retention factor  $k$  (see Table 2, columns 4–5 and Eq. (7)). Two important things can be evidenced by these curves. The first one is the excellent kinetic performance of both columns, with  $H$  values at the minimum of the van Deemter curves ( $H_{min}$ ) significantly lower than twice the particle diameter, traditionally taken as a “reference” value for well-packed fully porous particle columns [17]. This is especially evident for the Titan C<sub>18</sub> 120 Å column. Calculated as the average of the minimum heights obtained for the four compounds, indeed,  $H_{min}$  was 3.7  $\mu\text{m}$  for the Titan C<sub>18</sub> 80 Å column (at  $u_e$  roughly 0.65 cm/s) and only 3.3  $\mu\text{m}$  for the Titan C<sub>18</sub> 120 Å one ( $u_e$  approx. 0.7 cm/s). The second interesting aspect is that, up to maximum achievable velocity (back-pressure reachable by the system is max 1000 bar), van Deemter curves for all compounds on both columns are very flat. Therefore, Titan C<sub>18</sub> columns can be employed at (relatively) large flow rates, without losing performance. As a visual proof of the excellent performance



**Fig. 1.** van Deemter plots showing the plate height,  $H$ , vs. the interstitial linear velocity,  $u_e$ , for Titan C<sub>18</sub> 80 Å (top) and 120 Å (bottom) columns. Experimental data: nitrobenzene (cyan), toluene (orange), ethylbenzene (green), butylbenzene (purple). The maximum  $u_e$  corresponds to a flow rate  $F_v = 1.5$  mL/min for the Titan C<sub>18</sub> 80 Å column (system back-pressure: 945 bar; column back-pressure: 764 bar) and 1.3 mL/min for the Titan C<sub>18</sub> 120 Å one (system back-pressure: 829 bar; column back-pressure: 673 bar). (For interpretation of references to colour in this figure, readers are referred to the web version of the article.)

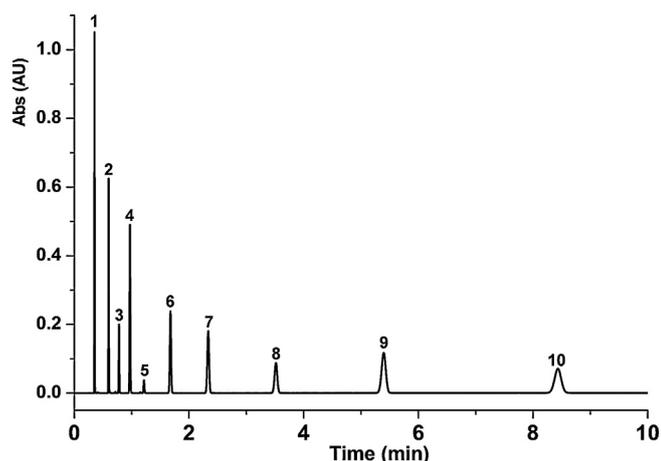
of these columns, in Figs. 2 and 3 the chromatograms for the separation of a mixture of benzene derivatives (including phenol, benzaldehyde, nitrobenzene, benzene, toluene, ethylbenzene, propylbenzene, butylbenzene, pentylbenzene), whose retention factors range from 1 to almost 24, are reported: some 300,000 and 320,000 N/m were measured on the Titan C<sub>18</sub> 80 Å and the Titan C<sub>18</sub> 120 Å column, respectively (see figure captions for details).

A more quantitative measure of column performance can be obtained by plotting the van Deemter curves in reduced coordinates.  $d_{sauter}$ -based reduced van Deemter curves are shown in Fig. 4. Following [2], in these plots,  $d_{sauter}$  was assumed equal to 2.04  $\mu\text{m}$ . Impressive reduced  $h_{min}$ s were observed. For instance,  $h_{min}$  as small as 1.65 (at  $v_{opt} = 5.5$ ) and 1.52 (at  $v_{opt} = 6.1$ ) was obtained with

**Table 2**

Zone retention factor ( $k_1$ ), retention factor ( $k$ ), optimal reduced velocity ( $v_{opt}$ ), minimum reduced plate height ( $h_{min}$ ) and reduced plate height at the maximum reduced velocity ( $v_{max}$ ) for the four compounds on the two Titan C<sub>18</sub> columns.

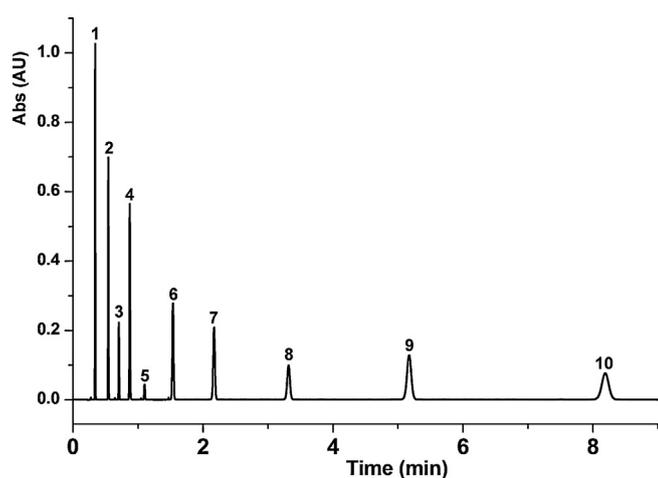
	$k_1$		$k$		$v_{opt}$		$h_{min}$		$h(v_{max})$	
	80 Å	120 Å	80 Å	120 Å	80 Å	120 Å	80 Å	120 Å	80 Å	120 Å
Nitrobenzene	2.7	2.7	1.3	1.3	5.5	6.1	1.65	1.52	1.80 (10.3)	1.57 (8.8)
Toluene	5.6	5.6	3.1	3.1	6.3	6.8	1.78	1.57	1.79 (9.4)	1.59 (8.1)
Ethylbenzene	8.0	8.1	4.5	4.7	8.4	7.6	1.85	1.62	1.87 (10.6)	1.63 (9.0)
Butylbenzene	19.1	20.5	11.3	12.3	9.8	8.9	1.98	1.77	2.00 (11.3)	1.78 (9.6)



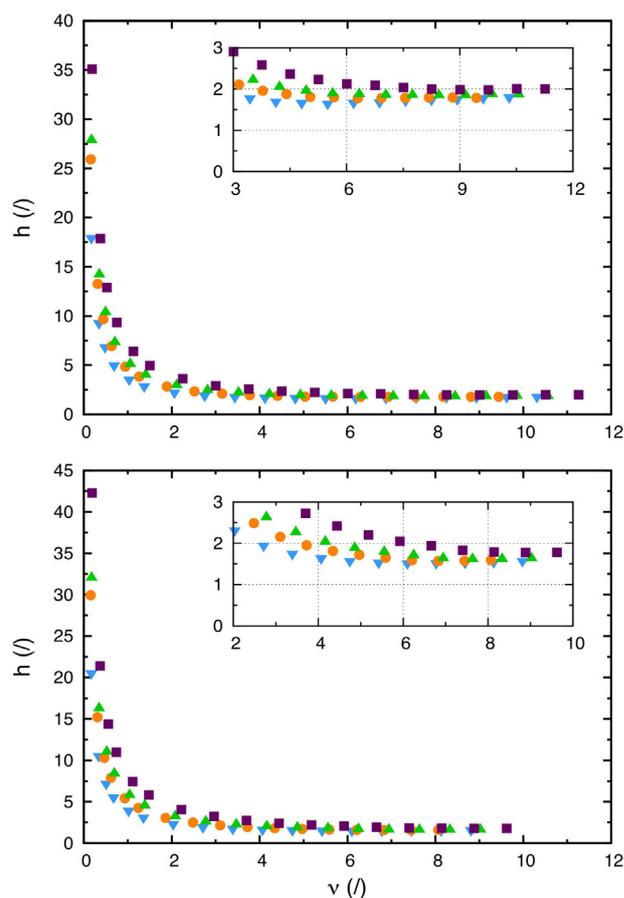
**Fig. 2.** Chromatogram showing the separation of a mixture of benzene derivatives on the Titan C<sub>18</sub> 80 Å column. Flow rate: 1.0 mL/min. Mobile phase: ACN/water 60:40, v/v; T = 35 °C. Compounds: (1) Uracil (255,980 N/m); (2) Phenol (283,000,  $k = 0.7$ ); (3) Benzaldehyde (289,160 N/m,  $k = 1.3$ ); (4) Nitrobenzene (291,850 N/m,  $k = 1.9$ ); (5) Benzene (280,660 N/m,  $k = 2.6$ ); (6) Toluene (279,800 N/m,  $k = 4.0$ ); (7) Ethylbenzene (264,080 N/m,  $k = 5.9$ ); (8) Propylbenzene (251,060 N/m,  $k = 9.4$ ); (9) Butylbenzene (241,010 N/m,  $k = 15.1$ ); (10) Pentylbenzene (230,270 N/m,  $k = 24.1$ ). The retention factor  $k$  was calculated by using uracil as the void time marker.

nitrobenzene ( $k = 1.3$ ), respectively on the Titan C<sub>18</sub> 80 Å and the Titan C<sub>18</sub> 120 Å column.  $h_{min}$  and  $v_{opt}$  for all the compounds considered in this work are reported in Table 2 (columns 5–8).

From the data reported in the last two columns of this table, one may also appreciate how the efficiency of columns is substantially maintained at the largest velocities reached in this work. For instance, by considering ethylbenzene ( $k_1 \approx 8.0$ ),  $h$  changes by only about 1%, on the Titan C<sub>18</sub> 80 Å column, going from  $v_{opt}$  (8.4) to the maximum velocity  $v_{max} = 10.6$  and by less than 1%, on the Titan C<sub>18</sub> 120 Å one, passing from  $v_{opt} = 7.6$  to  $v_{max} = 9$ . Even though the compounds employed for measuring column performance are different (benzene- vs. phenone-derivatives), this example allows for a qualitative comparison with the work by Gritti and Guiochon [2,3] who obtained, on a Titan C<sub>18</sub> 80 Å column (100 × 3 mm) under RP conditions for a compound with comparable retention



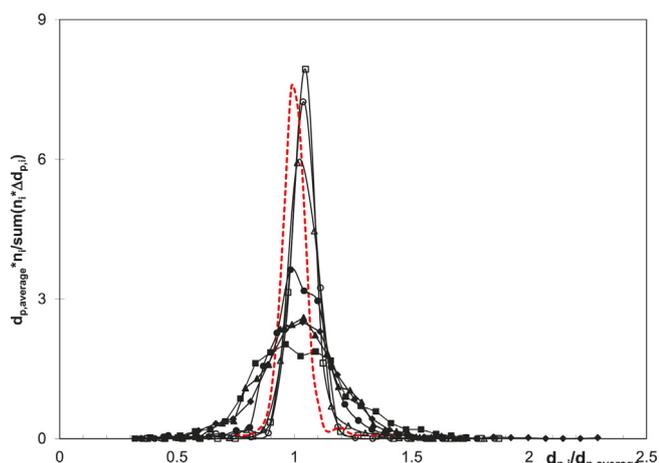
**Fig. 3.** Chromatogram showing the separation of a mixture of benzene derivatives on the Titan C<sub>18</sub> 120 Å column. Flow rate: 1.1 mL/min. Mobile phase: ACN/water 60:40, v/v; T = 35 °C. Compounds: (1) Uracil (235,310 N/m); (2) Phenol (298,700,  $k = 0.4$ ); (3) Benzaldehyde (310,320 N/m,  $k = 1.0$ ); (4) Nitrobenzene (320,320 N/m,  $k = 1.6$ ); (5) Benzene (306,722 N/m,  $k = 2.3$ ); (6) Toluene (312,330 N/m,  $k = 3.7$ ); (7) Ethylbenzene (302,840 N/m,  $k = 5.6$ ); (8) Propylbenzene (288,995 N/m,  $k = 9.1$ ); (9) Butylbenzene (274,270 N/m,  $k = 14.8$ ); (10) Pentylbenzene (255,640 N/m,  $k = 24.0$ ). The retention factor  $k$  was calculated by using uracil as the void time marker.



**Fig. 4.**  $d_{Sauter}$ -based ( $d_{Sauter} = 2.04$ ) reduced van Deemter plots ( $h$  vs.  $v$ ) for Titan C<sub>18</sub> 80 Å (top) and 120 Å (bottom) columns. Insets: zooms of regions corresponding to reduced interstitial velocity between 3–12 (80 Å column) and 2–10 (120 Å column). Experimental points: nitrobenzene (cyan), toluene (orange), ethylbenzene (green), butylbenzene (purple). (For interpretation of references to colour in this figure, readers are referred to the web version of the article.)

(octaphenone,  $k_1 = 10.2$ ), very similar  $h_{min}$  (1.7) but at a significantly lower optimal velocity  $v_{opt} = 5$ . Contrary to us, in addition, they observed a dramatic loss of efficiency by slightly increasing the flow rate over the optimum value. As it was already mentioned before, the explanation proposed by Gritti and Guiochon [3] to explain this behaviour is that C<sub>18</sub> fully porous Titan particles are characterized by an unusually low (if compared to other particles of similar geometrical characteristics and chemistry) intraparticle diffusivity. To further compare our results with those of Gritti and Guiochon, we therefore performed a series of van Deemter curve measurements by using the same set of phenone derivatives employed in [2,3] (acetophenone, propiophenone, butyrophenone, valerophenone, hexanophenone) as probe compounds. The detailed results of this study are given as Supplementary Information. The performance of columns with phenones were substantially similar to those with benzene derivatives (e.g., on the Titan C<sub>18</sub> 80 Å column, the average  $H_{min}$  calculated on the five phenones was 3.25 at  $u_e = 0.45$  vs. average  $H_{min} = 3.7$  at  $u_e = 0.65$  for benzene derivatives, see before). In addition, we could not observe the same loss of performance, by increasing the flow rate over its optimum value, as reported in [2,3].

For the sake of comparison between different packing porous particles used in LC, the Titan C<sub>18</sub> 80 Å column was emptied and particles were subjected to SEM analysis. After elaboration of SEM images (reported under Supplementary Information), PSD and  $d_{Sauter}$  of Titan C<sub>18</sub> 80 Å particles were calculated as described under

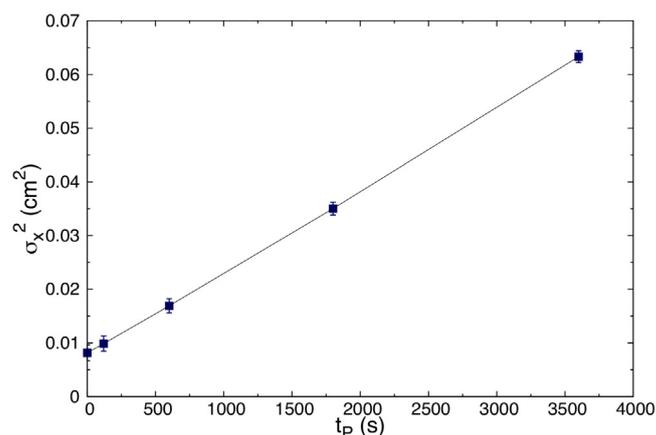


**Fig. 5.** Normalized particle size distributions (from SEM images) of the Titan C<sub>18</sub> material ( $d_p = 1.9 \mu\text{m}$ ) (red dotted line), compared to that of some common fully porous and superficially porous particles: XBridge C<sub>18</sub> ( $d_p = 3.5 \mu\text{m}$ ) (■), ACE3 C<sub>18</sub> ( $d_p = 3.0 \mu\text{m}$ ) (●), Gemini NX C<sub>18</sub> ( $d_p = 3.0 \mu\text{m}$ ) (◆), Hypersil GOLD C<sub>18</sub> ( $d_p = 3.0 \mu\text{m}$ ) (▲), Kinetex Fused Core C<sub>18</sub> ( $d_p = 2.6 \mu\text{m}$ ) (□), HALO Fused Core C<sub>18</sub> ( $d_p = 2.7 \mu\text{m}$ ) (△) and Poroshell C<sub>18</sub> ( $d_p = 2.7 \mu\text{m}$ ) (○). (For interpretation of references to colour in this figure, readers are referred to the web version of the article.)

Data adapted from [40].

Section 3. In Fig. 5, the normalized PSD of Titan C<sub>18</sub> 80 Å particles is represented together with those of some common fully porous and superficially porous particles (see figure caption for details), whose PSD was calculated in the same manner in [40]. From this figure, it is evident that Titan particles have an extremely narrow PSD, even comparable to those of superficially porous particles (which are well known for being characterized by nPSDs) and significantly narrower than those of other common fully porous particles. A strong (nearly linear) correlation between the width of the PSD and the  $a$ -term of the van Deemter equation has been previously observed [40] and could indicate that the excellent performance and low reduced  $a$ -terms observed for the Titan particles in this study are a consequence of their excellent packing structure. On the other hand, application of Eq. (15) to SEM image of Titan C<sub>18</sub> 80 Å particles returned  $d_{\text{Sauter}} = 2.4 \mu\text{m}$ . By recalculating  $h_{\text{min}}$  and  $v_{\text{opt}}$  based on this value, an average  $h_{\text{min}}$  (calculated on the four compounds) of 1.56 at  $v_{\text{opt}} = 8.16$  was obtained.

In the following, the single terms of the van Deemter equation on Titan C<sub>18</sub> columns will be independently evaluated by following an approach based on the combination of stop-flow experiments and the EMT-based Maxwell's model (Eq. (8)) for the interpretation of diffusion through porous media. We anticipate that, for the sake of comparison, all parameters were estimated also through the more sophisticated Torquato's model (see before). The results of these calculations are reported as Supporting Information. Essentially, only very small differences were observed between the coefficients calculated by the Maxwell's model and the Torquato's one. For the calculation of the  $b$ -term, the knowledge of the apparent or effective axial diffusion coefficient  $D_{\text{eff}}$  is required (Eq. (5)). As it was



**Fig. 6.** Band broadening (spatial peak variance,  $\sigma_x^2$ ) as a function of parking time,  $t_p$ . Compound: toluene; eluent: ACN/water 60:40 v/v%;  $T = 35^\circ\text{C}$ ; column: Titan C<sub>18</sub> 80 Å. Linear regression coefficient,  $R^2 > 0.999$ .

detailedly described in [1] (but for the estimation of the bulk molecular diffusion  $D_m$ ),  $D_{\text{eff}}$  can be estimated by the slope of the plot reporting the variance of the eluted peak against the time the peak was left to diffuse inside the Titan C<sub>18</sub> columns without flow (parking time). One example of such a plot is given in Fig. 6.  $D_{\text{eff}}$  and  $b$  coefficients for the compounds considered in this work are reported in Table 3, while the dependence of  $b/v$  on  $v$  is given graphically in Fig. 7 (red points, right y-axis). As it can be seen from these data, in all cases,  $b$  represents roughly 35–40% of  $h_{\text{min}}$ , which is the typical value for modern columns packed with fully porous particles [12,41]. On the other hand,  $b$ -terms estimated in this work are some 15% larger than those reported by Gritti and Guiochon for Titan C<sub>18</sub> 80 Å columns in [3,42] (at comparable  $k_1$ ).

According to the EMT, the correct driving force for diffusion in presence of preferential solubility (such as in LC) is the gradient in chemical potential and not the gradient in concentration. Accordingly, the correct property obeying EMT-rules is the permeability and not the diffusivity [10]. The calculation of the relative permeability,  $\alpha_{\text{part}}$ , can be easily performed from Eqs. (10) and (9) since  $\beta$  can be unequivocally measured from Eq. (8) (being  $D_{\text{eff}}$ ,  $\epsilon_e$ ,  $k_1$  and  $D_m$  known).  $\alpha_{\text{part}}$  values are reported in Table 3.  $\alpha_{\text{part}}$  corresponds to the so-called sample intraparticle diffusivity,  $\Omega$ , of [3,42]. Therefore, following what is usually done in literature [12,42], these values can be expressed as a function of  $k_1$  and compared each others. This comparison, whose results are graphically given under Supporting Information, has evidenced that  $\alpha_{\text{part}}$ s measured in this work are about 30% larger than values given in [42].

The next step is the estimation of  $D_{\text{part}}$ , which can be done by means of Eq. (10), once  $K_p$  (Eq. (12)) is known (see Table 3, columns 8–11). Interestingly, for all benzene derivatives,  $D_{\text{part}}$  was found about 20% larger on the Titan C<sub>18</sub> 120 Å column than on the 80 Å one. The faster the intraparticle mass transfer, the smaller the  $c_s$  term (Eq. (13)) of the van Deemter equation. Indeed, Table 3 (columns 12–13) shows how  $c_s$ s on the Titan 120 Å column are about 20%

**Table 3**

Effective diffusion coefficient ( $D_{\text{eff}}$ ), reduced longitudinal diffusion coefficient ( $b$ ), relative permeability ( $\alpha_{\text{part}}$ ), whole-particle volume based equilibrium constant ( $K_p$ ), overall diffusion coefficient through the porous particles ( $D_{\text{part}}$ ) and mass transfer resistance across the stationary phase coefficient ( $c_s$ ) for the four compounds in ACN/water 60:40 (v/v) at  $35^\circ\text{C}$  on Titan C<sub>18</sub> columns.

	$D_{\text{eff}} \times 10^6$ (cm <sup>2</sup> /s)		$b$		$\alpha_{\text{part}}$		$K_p$		$D_{\text{part}} \times 10^6$ (cm <sup>2</sup> /s)		$c_s$	
	80 Å	120 Å	80 Å	120 Å	80 Å	120 Å	80 Å	120 Å	80 Å	120 Å	80 Å	120 Å
Nitrobenzene	8.50	9.51	3.32	3.65	0.42	0.51	1.9	1.9	5.31	6.27	0.0244	0.0202
Toluene	6.85	7.64	4.31	4.78	0.67	0.82	4.4	4.5	4.42	5.27	0.0204	0.0171
Ethylbenzene	5.25	5.83	5.03	5.68	0.87	1.08	6.6	6.9	3.57	4.24	0.0173	0.0144
Butylbenzene	2.98	3.27	6.79	7.98	1.39	1.83	16.5	18.2	2.24	2.68	0.0124	0.0097

**Table 4**  
Comparison between eddy dispersion values at  $\nu \simeq 10$  between columns of different dimensions and particle diameters ( $d_p$ ) packed with fully porous<sup>(†)</sup> (including Titan C<sub>18</sub> 80 Å and 120 Å columns) and core-shell<sup>(\*\*)</sup> particles. The last column reports literature reference from where the information was taken (JCA: Journal of Chromatography A).

Column	$d_p$	Length × I.D. (mm)	$a(\nu \sim 10)$	Ref.
Symmetry <sup>(†)</sup>	5.0	150 × 4.6	1.30	JCA, 1355, 2014, 164 [3]
Luna <sup>(†)</sup>	5.0	150 × 4.6	1.60	JCA, 1355, 2014, 179 [2]
Titan 80 Å <sup>(†)</sup>	1.9	100 × 3.0	1.20	This work
Titan 120 Å <sup>(†)</sup>	1.9	100 × 3.0	1.00	This work
Kinetex 1.7 <sup>(**)</sup>	1.7	100 × 4.6	1.80–1.90	JCA, 1355, 2014, 179 [2]
Kinetex 2.6 <sup>(**)</sup>	2.6	100 × 4.6	0.90–1.00	JCA, 1217, 2010, 1589 [44]

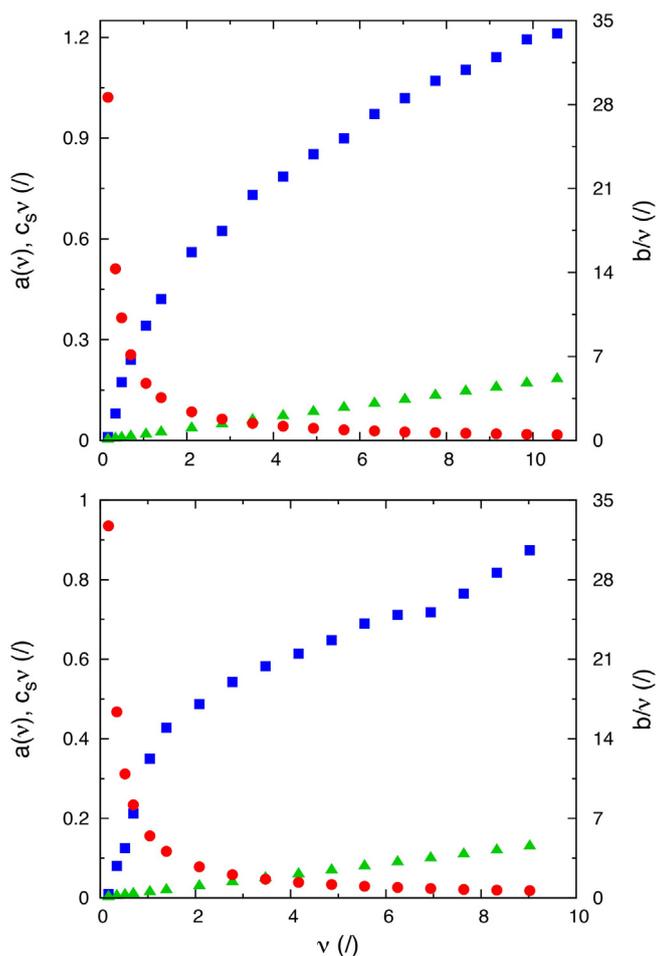
smaller than those measured on the 80 Å one. Fig. 7 (green triangles, left y-axis) represents as the term  $c_s \nu$  changes by changing  $\nu$ . In terms of  $c_s$  coefficient, the comparison between our data and those obtained by Gritti and Guiochon [42] with a similar Titan C<sub>18</sub> 80 Å column shows that  $c_s$ -terms measured in this work are about 25–30% smaller than those obtained for phenones of comparable  $k_1$ .

Finally, the information in our possession permits to estimate  $a(\nu)$  by difference between  $h$  and the independent estimates of  $b$  and  $c_s$  (Eq. (14)). Fig. 7 (blue squares, left y-axis) shows how  $a(\nu)$  changes with  $\nu$  for the two Titan C<sub>18</sub> columns.  $a(\nu)$  was calculated as the average of the values obtained for the four compounds. As it can be seen, eddy dispersion term presents the typical asymptotic behaviour already reported by other authors, e.g. [15,43].

However, on the Titan columns,  $a(\nu_{max})$  is remarkably small. Indeed at  $\nu_{max} \simeq 10$ , its value is only 1.2 on the Titan C<sub>18</sub> 80 Å column and even 1.0 on the Titan C<sub>18</sub> 120 Å one. In Table 4, eddy dispersion values (at  $\nu \simeq 10$ ) taken from literature for different fully porous and core-shell commercial particles are reported. These data point out the very small eddy dispersion of Titan C<sub>18</sub> columns, particularly for the Titan C<sub>18</sub> 120 Å one, whose  $a$ -term is very close to that of core-shell Kinetex 2.6  $\mu\text{m}$  particles [44]. Fig. 7 also shows that, by increasing the flow rate,  $a(\nu)$  increases less on the 120 Å column than on the 80 Å one, but it is very difficult to provide a physically-sound explanation to these experimental findings. In a recent study, it was observed that the inner particle morphology of a packing also has a significant effect on the dispersion [45]. The combination of nPSD and differences in pore size of the 80 Å and 120 Å could hence provide an explanation for the observed differences in eddy dispersion, that are anyhow very small in both cases.

## 5. Conclusions

A detailed investigation of mass transfer processes on two nPSD Titan C<sub>18</sub> columns, by employing a series of benzene derivatives as test compounds, has revealed that these columns are characterized by an extremely small eddy dispersion, even comparable to those of columns packed with core-shell particles. On the other hand, contrary to previous conclusions, the  $b$  and  $c_s$  terms of the van Deemter equation were found to be essentially comparable to those of other columns packed with particles of similar chemistry and characteristics. Our findings therefore do not confirm the previous hypothesis that the extraordinary efficiency of these nPSD columns is generated by a very small intraparticle diffusion. We observe that the differences in the experimental conditions employed in this work and in [2,3] are too small (namely, about 10 °C in temperature and 15 v/v% in the amount of ACN in the eluent) to explain the observed differences in  $b$  and  $c_s$  terms. Analogously, equipment characteristics (extra-column volume, etc.) were demonstrated not to significantly contribute (see [1]). Moreover, on the Titan C<sub>18</sub> 80 Å column employed in this work, the behaviour of phenone derivatives was found to be comparable to that of benzene derivatives (see Supporting Information), so that this variable can be excluded as well. Thus, the only significant difference between the Titan C<sub>18</sub> 80 Å columns used in this work and those employed in [2,3] is in their external porosity and permeability. In [2,3], indeed, the authors found a permeability about 40% larger than in our case. However, they report about a dramatic loss of performance of columns at high flow rates due to frictional heating that, at comparable flow rates (and column geometries), was not observed in our case. In conclusion, without knowing the individual history of columns, it is very difficult to compare our results with those given in [2,3]. On the other hand, we believe that this work (together with its companion [1]) demonstrates that the value of using nPSD particles in HPLC is a question that is still controversial and open and that requires, to be solved, the collection of accurate (and reproducible) experimental data.



**Fig. 7.** Plot showing the average contribution of  $a$ -  $b$ - and  $c_s$ -term to  $h$  for the Titan C<sub>18</sub> 80 Å column (top) and the 120 Å one (bottom).  $a(\nu)$  (blue squares) and  $c_s \nu$  (green triangles): left y-axis.  $b/\nu$  (red circles): right y-axis. Averages were calculated on the four compounds considered in this work. (For interpretation of references to colour in this figure, readers are referred to the web version of the article.)

## Acknowledgments

The authors thank the Italian University and Scientific Research Ministry (Grant PRIN 2012ATMNJ.003) and the Laboratory Terra&Acqua Tech, Member of Energy and Environment Cluster, Technopole of Ferrara of Emilia-Romagna High Technology Network. Dr. Valentina Costa from the University of Ferrara is acknowledged for technical support. Dr. Daniela Palmeri from the University of Ferrara is acknowledged for SEM measurements.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.037>.

## References

- [1] O.H. Ismail, M. Catani, L. Pasti, A. Cavazzini, A. Ciogli, C. Villani, D. Kotoni, F. Gasparrini, D.S. Bell, Experimental evidence of the kinetic performance achievable with columns packed with the new 1.9  $\mu\text{m}$  fully porous particles Titan C<sub>18</sub>, *J. Chromatogr. A* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.038>.
- [2] F. Gritti, D.S. Bell, G. Guiochon, Particle size distribution and column efficiency. An ongoing debate revived with 1.9  $\mu\text{m}$  Titan-C<sub>18</sub> particles, *J. Chromatogr. A* 1355 (2014) 179–192.
- [3] F. Gritti, G. Guiochon, The rationale for the optimum efficiency of columns packed with new 1.9  $\mu\text{m}$  fully porous Titan-C<sub>18</sub> particles. A detailed investigation of the intra-particle diffusivity, *J. Chromatogr. A* 1355 (2014) 164–178.
- [4] J.H. Knox, L. McLaren, New gas chromatographic method for measuring gaseous diffusion coefficients and obstructive factors, *Anal. Chem.* 36 (1964) 1477–1482.
- [5] J.H. Knox, H.P. Scott, B and C terms in the van Deemter equation for liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 282 (1983) 297–313.
- [6] K. Miyabe, Y. Matsumoto, G. Guiochon, Peak parking-moment analysis. A strategy for the study of the mass-transfer kinetics in the stationary phase, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1970–1982.
- [7] K. Miyabe, N. Ando, G. Guiochon, Peak parking method for measurement of molecular diffusivity in liquid phase systems, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4377–4382.
- [8] D. Cabooter, F. Lynen, P. Sandra, G. Desmet, Total pore blocking as an alternative method for the on-column determination of the external porosity of packed and monolithic reversed-phase columns, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 131–141.
- [9] A. Liekens, D. Cabooter, J. Denayer, G. Desmet, A study of the parameters affecting the accuracy of the total pore blocking method, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6754–6761.
- [10] G. Desmet, K. Broeckhoven, J. De Smet, S. Deridder, G.V. Baron, P. Gzil, Errors involved in the existing B-term expressions for the longitudinal diffusion in fully porous chromatographic media. Part I: Computational data in ordered pillar arrays and effective medium theory, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 171–188.
- [11] K. Broeckhoven, D. Cabooter, F. Lynen, P. Sandra, G. Desmet, Errors involved in the existing B-term expressions for the longitudinal diffusion in fully porous chromatographic media. Part II: Experimental data in packed columns and surface diffusion measurements, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 189–198.
- [12] A. Liekens, J. Denayer, G. Desmet, Experimental investigation of the difference in b-term dominated band broadening between fully porous and porous-shell particles for liquid chromatography using the effective medium theory, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4406–4416.
- [13] J.C. Giddings, *Dynamics of Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 1965.
- [14] D. De Wilde, F. Detobel, J. Deconinck, G. Desmet, A numerical study of the assumptions underlying the calculation of the stationary zone mass transfer coefficient in the general plate height model of chromatography in two-dimensional pillar arrays, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1942–1949.
- [15] F. Gritti, G. Guiochon, Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 2–40.
- [16] G. Desmet, K. Broeckhoven, Equivalence of the different C<sub>m</sub>- and C<sub>s</sub>-term expressions used in liquid chromatography and a geometrical model uniting them, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8076–8088.
- [17] U.D. Neue, *HPLC Columns: Theory, Technology and Practice*, Wiley-VCH, 1997.
- [18] C. Horváth, H.J. Lin, Band spreading in liquid chromatography: general plate height equation and a method for the evaluation of the individual plate height contributions, *J. Chromatogr.* 149 (1978) 43–70.
- [19] H. Poppe, J.C. Kraak, J.F.K. Huber, J.H.M.V. Berg, Temperature gradients in HPLC columns due to viscous heat dissipation, *Chromatographia* 14 (1981) 515–523.
- [20] I. Halász, R. Endeje, J. Asshauer, Ultimate limits in high-pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 112 (1975) 37–60.
- [21] A. de Villiers, H. Lauer, R. Szucs, S. Goodall, P. Sandra, Influence of frictional heating on temperature gradients in ultra-high-pressure liquid chromatography on 2.1 mm i.d. columns, *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 84–91.
- [22] G. Desmet, D. Cabooter, K. Broeckhoven, Graphical data representation methods to assess the quality of LC columns, *Anal. Chem.* 87 (2015) 8593–8602.
- [23] J.H. Knox, Practical aspects of LC theory, *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 352–364.
- [24] R.W. Stout, J.J. DeStefano, L.R. Snyder, High-performance liquid chromatographic column efficiency as a function of particle composition and geometry and capacity factor, *J. Chromatogr.* 282 (1983) 263–286.
- [25] F. Gritti, G. Guiochon, General HETP equation for the study of mass-transfer mechanisms in RPLC, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5347–5392.
- [26] H.T. Davis, The effective medium theory of diffusion in composite media, *J. Am. Ceram. Soc.* 60 (1977) 499–501.
- [27] M. Barrande, R. Bouchet, R. Denoyel, Tortuosity of porous particles, *Anal. Chem.* 79 (2007) 9115–9121.
- [28] G. Desmet, S. Deridder, Effective medium theory expressions for the effective diffusion in chromatographic beds filled with porous, non-porous and porous-shell particles and cylinders. Part I: Theory, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 32–45.
- [29] S. Deridder, G. Desmet, Effective medium theory expressions for the effective diffusion in chromatographic beds filled with porous, non-porous and porous-shell particles and cylinders. Part II: Numerical verification and quantitative effect of solid core on expected B-term band broadening, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 46–56.
- [30] A. Liekens, J. Billen, R. Sherant, H. Ritchie, J. Denayer, G. Desmet, High performance liquid chromatography column packings with deliberately broadened particle size distribution: relation between column performance and packing structure, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6654–6662.
- [31] G. Desmet, S. Eeltink, Fundamentals for LC miniaturization, *Anal. Chem.* 85 (2013) 543–556.
- [32] S. Bruns, T. Müllner, M. Kollmann, J. Schachtner, A. Hölzel, U. Tallarek, Confocal laser scanning microscopy method for quantitative characterization of silica monolith morphology, *Anal. Chem.* 82 (2010) 6569–6575.
- [33] S. Bruns, U. Tallarek, Physical reconstruction of packed beds and their morphological analysis: core-shell packings as an example, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1849–1860.
- [34] D. Hlushkou, S. Bruns, U. Tallarek, High-performance computing of flow and transport in physically reconstructed silica monoliths, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3674–3682.
- [35] S. Bruns, J.P. Grinias, L.E. Blue, J.W. Jorgenson, U. Tallarek, Morphology and separation efficiency of low-aspect-ratio capillary ultrahigh pressure liquid chromatography columns, *Anal. Chem.* 84 (2012) 4496–4503.
- [36] D. Åsberg, J. Samuelsson, M. Lesko, A. Cavazzini, K. Kaczmarek, T. Fornstedt, Method transfer from high-pressure liquid chromatography to ultra-high-pressure liquid chromatography. II. Temperature and pressure effects, *J. Chromatogr. A* 1401 (2015) 52–59.
- [37] I. Halász, K. Martin, Pore size of solids, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17 (1978) 901–908.
- [38] F. Gritti, G. Guiochon, Impact of retention on trans-column velocity biases in packed columns, *AIChE J.* 56 (2010) 1495–1509.
- [39] V. Baranau, U. Tallarek, Random-close packing limits for monodisperse and polydisperse hard spheres, *Soft Matter* 10 (2014) 3826–3841.
- [40] D. Cabooter, A. Fanigliulo, G. Bellazzi, B. Allieri, A. Rottigni, G. Desmet, Relationship between the particle size distribution of commercial fully porous and superficially porous high-performance liquid chromatography column packings and their chromatographic performance, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7074–7081.
- [41] F. Gritti, A. Cavazzini, N. Marchetti, G. Guiochon, Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C<sub>18</sub>-bonded silica materials, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 289–303.
- [42] F. Gritti, G. Guiochon, The quantitative impact of the mesopore size on the mass transfer mechanism of the new 1.9  $\mu\text{m}$  fully porous Titan-C<sub>18</sub> particles. I: Analysis of small molecules, *J. Chromatogr. A* 1384 (2015) 76–87.
- [43] A. Andrés, K. Broeckhoven, G. Desmet, Methods for the experimental characterization and analysis of the efficiency and speed of chromatographic columns: a step-by-step tutorial, *Anal. Chim. Acta* 894 (2015) 20–34.
- [44] F. Gritti, I. Leonardis, D. Shock, P. Stevenson, A. Shalliker, G. Guiochon, Performance of columns packed with the new shell particles Kinetex-C<sub>18</sub>, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1589–1603.
- [45] H. Song, G. Desmet, D. Cabooter, Evaluation of the kinetic performance differences between hydrophilic-interaction liquid chromatography and reversed-phase liquid chromatography under conditions of identical packing structure, *Anal. Chem.* 87 (2015) 12331–12339.



Il tuo indirizzo e-mail

caterina.bergantin@unife.it

Oggetto:

Dichiarazione di conformità della tesi di Dottorato

Io sottoscritto Dott. (Cognome e Nome)

Bergantin Caterina

Nato a:

Rovigo

Provincia:

Rovigo

Il giorno:

08/09/1989

Avendo frequentato il Dottorato di Ricerca in:

Scienze Chimiche

Ciclo di Dottorato

31

Titolo della tesi:

Caratterizzazione chimica di zucca e radicchio a tutela di prodotti tipici del Delta del Po

Titolo della tesi (traduzione):

Chemical characterization of pumpkin and red chicory to protect typical products of the Po Delta

Tutore: Prof. (Cognome e Nome)

Maietti Annalisa

Settore Scientifico Disciplinare (S.S.D.)

CHIM/10

Parole chiave della tesi (max 10):

caratterizzazione chimica, radicchio rosso, zucca, bioaccessibilità chemical characterization, red chicory, pumpkin, bioaccessibility

Consapevole, dichiara

**CONSAPEVOLE:** (1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; (2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; (3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 2 copie di cui una in formato cartaceo e

una in formato pdf non modificabile su idonei supporti (CD-ROM, DVD) secondo le istruzioni pubblicate sul sito: <http://www.unife.it/studenti/dottorato> alla voce ESAME FINALE – disposizioni e modulistica; (4) del fatto che l'Università, sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze; DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITÀ: (1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo è del tutto identica a quella presentata in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrò in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; (2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie; (3) che il contenuto e l'organizzazione della tesi è opera originale da me realizzata e non compromette in alcun modo i diritti di terzi, ivi compresi quelli relativi alla sicurezza dei dati personali; che pertanto l'Università è in ogni caso esente da responsabilità di qualsivoglia natura civile, amministrativa o penale e sarà da me tenuta indenne da qualsiasi richiesta o rivendicazione da parte di terzi; (4) che la tesi di dottorato non è il risultato di attività rientranti nella normativa sulla proprietà industriale, non è stata prodotta nell'ambito di progetti finanziati da soggetti pubblici o privati con vincoli alla divulgazione dei risultati, non è oggetto di eventuali registrazioni di tipo brevettale o di tutela. PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO

Firma del dottorando

Ferrara, li 29/01/2020 (data) Firma del Dottorando

Cesare Bevilacqua

Firma del Tutore

Visto: Il Tutore Si approva Firma del Tutore

Annalisa Meietti