



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

Dipartimento di Farmacia e Scienze della Salute e della Nutrizione

Scuola di Dottorato di Scienza e Tecnica B. Telesio

Indirizzo

OMPI – Materiali Organici di Interesse Farmacologico

Con il contributo di

FSE – Fondo Sociale Europeo

INFLUENZA DEI PROCESSI TECNOLOGICI SUL CONTENUTO DI COMPOSTI BIOATTIVI, BIOACCESSIBILITÀ E ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DI PEPERONCINI (*Capsicum*)

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/08

Direttore

Ch.mo Prof. Roberto Bartolino

Supervisor

Dottorando

Ch.mo Prof. Antonio Garofalo

Ch.mo Prof. Francesco Menichini

Dott.ssa Monica Rosa Loizzo

Dott. Pugliese Alessandro

XXVI CICLO – 2010/2011

La presente tesi è cofinanziata con il sostegno della Commissione Europea, Fondo Sociale Europeo e della Regione Calabria. L'autore è il solo responsabile di questa tesi e la Commissione Europea e la Regione Calabria declinano ogni responsabilità sull'uso che potrà essere fatto delle informazioni in essa contenuto.

Riassunto

Il peperoncino (*Capsicum*) è da tempo riconosciuto come un'eccellente fonte di composti fitochimici bioattivi quali i carotenoidi, i polifenoli e i capsaicinoidi, noti per esercitare vari effetti biologici positivi e di svolgere un ruolo importante nella prevenzione di molte malattie croniche. Inoltre, composizione e concentrazione dei principi attivi possono essere influenzata dai metodi di processazione e di conservazione.

La relazione tra il contenuto in fitocomposti e il loro assorbimento è molto importante, giacché questi prodotti sono valutati in funzione del loro contributo alla dieta umana. Col termine bioaccessibilità si descrive il potenziale di una sostanza a essere assorbita, tuttavia, vi sono pochissime informazioni in letteratura riguardanti la biodisponibilità delle molecole presenti nei peperoncini. Gli attuali metodi per stimare la biodisponibilità includono studi sia a breve sia a lungo termine, in esseri umani e in modelli animali. Tuttavia, questi studi *in vivo* hanno un certo numero di limitazioni, come il costo elevato, il limitato numero di soggetti che possono essere sottoposti a studio e la difficoltà nell'interpretazione dei dati, vista l'influenza di fattori ospite-correlati quali lo stato di salute dell'intestino, lo stato nutrizionale e il genotipo del soggetto sottoposto a esame. L'uso di metodi *in vitro* fornisce un'alternativa agli studi umani e animali ed è un modello maggiormente riproducibile.

Il primo obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare l'effetto dei diversi metodi di processazione (congelamento, cottura ed essiccazione) sul contenuto iniziale, sul contenuto micellare e sulla bioaccessibilità dei carotenoidi violaxantina, neoxantina, anteraxantina, luteina, capsantina, zeaxantina, β -criptoxantina e β -carotene.

Peperoncini rossi, arancio e gialli hanno confermato di essere una buona fonte di carotenoidi, ma si è visto che il colore, molto più della specie, ne è indicativo del contenuto. I frutti gialli, infatti, sono molto ricchi di luteina, che è scarsamente

presente, invece, nei peperoncini rossi, nei quali abbondano la capsantina, i carotenoidi con azione di pro-vitamina A (β -carotene e β -criptoxantina) e, in misura minore, la zeaxantina.

Dopo digestione il contenuto di carotenoidi nelle micelle diminuisce notevolmente, particolarmente nei peperoncini essiccati al sole.

E' noto che il trasferimento dei carotenoidi nelle micelle è inversamente proporzionale all'idrofobicità del carotenoide.

La lipofilia della β -carotene ha, infatti, influenzato negativamente la sua incorporazione nelle micelle, mentre capsantina, zeaxantina e luteina hanno mostrato una maggiore bioaccessibilità.

Sono state riscontrate differenze nel contenuto e nella bioaccessibilità dei carotenoidi nei frutti sottoposti ai vari metodi di processazione. Generalmente la bollitura e il congelamento, diminuiscono il contenuto di carotenoidi. Nei frutti secchi, invece, la quantità di carotenoidi è stata generalmente superiore a quella riscontrato nei peperoncini freschi, bolliti e congelati.

La quantità effettiva di carotenoidi incorporata nelle micelle è, però, un fattore predittivo più accurato del potenziale di assorbimento dei carotenoidi. Dallo studio si evince che la bioaccessibilità media di ogni carotenoide analizzato è aumentata dopo congelamento o bollitura, quindi, nonostante la diminuzione del contenuto dei carotenoidi dopo congelamento e cottura, il contenuto micellare non era significativamente più basso rispetto a quello dei peperoncini freschi e conseguentemente i valori di bioaccessibilità dei carotenoidi dei peperoncini processati sono risultati spesso simili o, più spesso, leggermente superiori a quelli non processati, equilibrando, in questo modo, la perdita di carotenoidi inizialmente provocata dalla processazione. Discorso diverso per i frutti essiccati, i quali, partendo da un contenuto nettamente più elevato nel frutto non digerito, hanno evidenziato, nonostante la drastica diminuzione di carotenoidi dopo digestione, un ottimo contenuto micellare di pigmenti.

Il secondo obiettivo della ricerca è stato quello di investigare la possibile influenza dei diversi processi tecnologici applicati ai peperoncini sulle proprietà

antiossidanti e sul profilo fitochimico delle ventidue differenti varietà di peperoncino.

Tramite i diversi approcci tecnologici adottati e grazie alle metodologie di studio applicate, è possibile concludere che i peperoncini secchi, seguiti da quelli freschi hanno il più alto contenuto di capsaicinoidi, polifenoli, flavonoidi e carotenoidi, dimostrando che le operazioni di congelamento e cottura influiscono negativamente sul contenuto di questi principi attivi.

Dalla valutazione dell'attività antiossidante effettuata non sembra però esserci una diretta correlazione tra l'abilità antiossidante e la quantità di fitocomposti contenuti nei peperoncini. Le singole classi di composti sono debolmente associate con la capacità antiossidante rivelata, suggerendo che l'espressione dell'attività antiossidante degli estratti di peperoncino potrebbe essere piuttosto una conseguenza del sinergismo tra vari composti fenolici, o altre molecole qui non quantificate, e non semplicemente attribuibile a composti di una specifica classe chimica.

Concludendo, è possibile affermare che i frutti di peperoncino, siano essi appartenenti a diverse specie o cultivar, sono un'ottima fonte carotenoidi, polifenoli e capsaicinoidi sia se assunti freschi sia dopo processazione, che comunque ne limita in una certa misura il contenuto.

Abstract

Chili pepper (*Capsicum* species) has been recognized as an excellent source of bioactive phytochemicals such as carotenoids, polyphenols and capsaicinoids. These molecules are well known to exert various positive biological effects, such as antioxidant activity, and to play an important role in the prevention of many chronic diseases. The composition and concentration of active ingredients in peppers can depend on factors such as processing and storage methods adopted. The relation between carotenoid content and their absorption is significant, since this product is evaluated in function of their contribute to human diet. Bioaccessibility represent the potential for a substance to be absorbed by humans. However, there is very limited information in the literature regarding the bioavailability of molecules from peppers. Existing methods to estimate bioavailability include both short- and long-term studies in humans as well as in animal models, but human and animal studies have a number of limitations including expense, restrictions on the number of samples which can be investigated and difficulty in the interpretation of the data due to the influence of host-related factors such as gut health, nutritional status and genotype. The use of *in vitro* methods provides an alternative to human and animal studies and is a more reproducible model.

The first objective of this thesis was to evaluate the effect of different processing methods (freezing, cooking and drying) on the initial content, micellar content and bioaccessibility of different carotenoids: violaxanthin, neoxanthin, anteraxanthin, lutein, capsanthin, zeaxanthin, β -cryptoxanthin and β -carotene.

Red, oranges and yellow chilies have confirmed to be a good source of carotenoids, but it is seen that color, much more than species, is indicative of the content. The yellow fruits, in fact, are very rich in lutein, which is scarcely present, however, in the red chilies, in which abound capsanthin, pro-vitamin A carotenoids (β -carotene and β -cryptoxanthin) and, to a lesser extent, zeaxanthin.

After digestion, the content of carotenoids in micelles decreases considerably, particularly in sun-dried chilies.

It is well known that the transfer of the carotenoids in the micelles is inversely proportional to the hydrophobicity of carotenoids.

The lipophilicity of β -carotene, in fact, affected its incorporation into micelles, whereas capsanthin, zeaxanthin and lutein showed a higher bioaccessibility.

There were no differences in the content and bioaccessibility of carotenoids in fruits subjected to various methods of processing. Generally boiling and freezing decreased the content of carotenoids. In dried fruits, instead, the amount of carotenoids was generally superior to that found in fresh, boiled and frozen chilies.

The actual amount of carotenoid incorporated into micelles is, however, a more accurate predictor of the potential for absorption of carotenoids. The study suggests that the bioaccessibility average of each carotenoid analyzed is increased after freezing or boiling and then, despite the decrease of the content of carotenoids after freezing and cooking, the micellar content was not significantly lower than that of fresh chilies and consequently the values of bioaccessibility of carotenoids of processed chilies are often similar or, more often, slightly higher than those of not processed fruits, balancing, in this way, the loss of carotenoids initially caused by the processing. Different speech for the dried fruit, which, starting from a content significantly higher in the undigested peppers, have shown, despite the drastic decrease of carotenoids after digestion, a great micellar content of pigments.

The second objective of the research was to investigate the possible influence of different technological processes applied to the same peppers on antioxidant properties and phytochemical profile of twenty-two different varieties of chili.

Through the various technological approaches adopted and thanks to the methods of study applied, it is possible to conclude that the dried chilies, followed by fresh ones have the best content of capsaicinoids, polyphenols, flavonoids and

carotenoids, demonstrating that the operations of freezing and cooking had a detrimental effect on the content of these active ingredients.

However, the evaluation of the antioxidant activity do not showed a direct correlation between the antioxidant ability and the amount of phytochemicals contained in chilies. In fact, the individual classes of compounds are weakly associated with the antioxidant capacity detected, suggesting that the expression of the antioxidant activity of the extracts of chili could be rather a consequence of the synergism between various phenolic compounds, or other molecules not quantified here, and not simply attributable to compounds of a specific chemical class.

In conclusion, we can affirm that chili peppers, whether they belong to different species or cultivars, are an excellent source of carotenoids, polyphenols and capsaicinoids both when taken fresh or after processing, which, however, limits to some extent the content.

INDICE

INTRODUZIONE	Pag. 1
SEZIONE GENERALE	
CAPITOLO 1	
Spezie come alimento funzionale	Pag. 6
Bibliografia	Pag. 12
CAPITOLO 2	
Piante del genere <i>Capsicum</i>, classificazione, principi attivi e proprietà biologiche	Pag. 14
2.1 Botanica e classificazione delle specie di <i>Capsicum</i>	Pag. 15
2.1.1 <i>Capsicum annuum</i>	Pag. 19
2.1.2 <i>Capsicum chinense</i>	Pag. 20
2.1.3 <i>Capsicum baccatum</i>	Pag. 21
2.1.4 <i>Capsicum chacoense</i>	Pag. 21
2.1.5 <i>Capsicum pubescens</i>	Pag. 21
2.1.6 <i>Capsicum frutescens</i>	Pag. 22
2.2 La piccantezza dei peperoncini	Pag. 23
2.3 Cenni storici	Pag. 24
2.4 I principi attivi del peperoncino	Pag. 25
2.5 Proprietà biologiche	Pag. 30
2.5.1 Proprietà antiossidanti	Pag. 30

2.5.2 Proprietà antitumorali	Pag. 32
2.5.3 Proprietà antidolorifiche	Pag. 33
2.5.4 Proprietà antitrombotiche e vasodilatatorie	Pag. 34
2.5.5 Proprietà battericide e batteriostatiche	Pag. 35
2.5.6 Proprietà antiulcera	Pag. 35
Bibliografia	Pag. 37
CAPITOLO 3	
Radicali liberi e Antiossidanti	Pag. 42
3.1 Radicali liberi: generalità e definizioni	Pag. 43
3.2 Stress ossidativi e specie reattive all'ossigeno (ROS)	Pag. 47
3.3 Antiossidanti	Pag. 51
3.3.1 Antiossidanti endogeni	Pag. 53
3.3.2 Antiossidanti esogeni	Pag. 56
Bibliografia	Pag. 62
CAPITOLO 4	
Carotenoidi: chimica e attività biologica	Pag. 66
Bibliografia	Pag. 73
CAPITOLO 5	
Processi tecnologici e loro influenza sulla biodisponibilità	Pag. 75
5.1 Trattamento con calore	Pag. 75
5.1.1 Cottura	Pag. 76

5.1.2 Variazione di qualità degli alimenti dopo trattamento termico	Pag. 78
5.2 Metodi di essiccamento	Pag. 80
5.2.1 Variazioni di qualità che avvengono durante l'essiccamento	Pag. 81
5.3 Utilizzo delle basse temperature	Pag. 82
5.3.1 Congelamento	Pag. 83
5.3.2 Refrigerazione	Pag. 84
5.3.3 Surgelazione	Pag. 85
5.3.4 Variazioni di qualità durante congelamento	Pag. 85
5.4 Tecniche di conservazione che sfruttano i fattori chimici	Pag. 87
5.4.1 Uso del sale	Pag. 87
5.4.2 Uso dello zucchero	Pag. 87
5.4.3 Affumicamento	Pag. 88
5.4.4 Uso di sostanze chimiche	Pag. 88
Bibliografia	Pag. 90

CAPITOLO 6

Biodisponibilità di composti bioattivi: bioaccessibilità, assorbimento e contributo nutrizionali composti organici delle piante	Pag. 91
6.1 Metodi di screening della bioaccessibilità	Pag. 92
6.1.1 Metodi di digestione <i>in vivo</i>	Pag. 93
6.1.2 Metodi di digestione <i>in vitro</i>	Pag. 94
6.1.3 Confronto tra metodi di digestione <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Pag. 96
6.2 Stabilità dei carotenoidi	Pag. 97

6.3 Fattori che influenzano bioaccessibilità di principi funzionali	Pag. 97
6.3.1 Fattori dietetici	Pag. 97
6.3.2 Fattori fisiologici	Pag. 99
6.3.3 Fattori di trasformazione	Pag. 100
6.4 Bioaccessibilità di ingredienti alimentari funzionali	Pag. 102
6.4.1 I carotenoidi	Pag. 102
Bibliografia	Pag. 104

SEZIONE SPERIMENTALE

Introduzione	Pag. 113
Bibliografia	Pag. 105
Tabella generale	Pag. 116
Figure generali	Pag. 117

CAPITOLO 7

Bioaccessibilità di carotenoidi da frutti di peperoncino processati	Pag. 120
7.1 Materiali e metodi	Pag. 123
7.1.1 Preparazione del campione	Pag. 123
7.1.2 Digestione <i>in vitro</i>	Pag. 124
7.1.3 Estrazione di carotenoidi e saponificazione	Pag. 125
7.1.4 Analisi HPLC	Pag. 125
7.1.5 Analisi statistica	Pag. 126

7.2 Risultati e Discussioni	Pag. 126
7.3 Risultati e discussioni del contenuto e della bioaccessibilità di carotenoidi da frutti di peperoncino freschi, bolliti e congelati	Pag. 128
7.3.1 Contenuto carotenoidi	Pag. 128
7.3.2 Contenuto micellare e bioaccessibilità	Pag. 130
7.3.3 Discussione	Pag. 132
7.4 Risultati e discussioni del contenuto e della bioaccessibilità di carotenoidi da frutti di peperoncino secchi	Pag. 136
7.4.1 Contenuto carotenoidi	Pag. 136
7.4.2 Contenuto micellare e bioaccessibilità	Pag. 138
Bibliografia	Pag. 140
Tabelle capitolo 7	Pag. 150

CAPITOLO 8

Analisi fitochimica e valutazione attività antiossidante di frutti di peperoncino	Pag. 165
8.1 Materiale e Metodi	Pag. 166
8.1.1 Preparazione degli estratti e resa estrattiva	Pag. 166
8.1.2 Composizione chimica degli estratti totali dei peperoncini	Pag. 166
8.1.2.1 Dosaggio polifenoli totali	Pag. 167
8.1.2.2 Dosaggio flavonoidi totali	Pag. 167
8.1.2.3 Dosaggio capsaicinoidi: capsaicina e diidrocapsaicina	Pag. 168
8.1.2.4 Dosaggio carotenoidi totali	Pag. 169

8.1.3 Attività antiossidante di frutti di peperoncino e metodi chimico-fisici <i>in vitro</i> utilizzati per lo studio degli antiossidanti	Pag. 169
8.1.3.1 DPPH test	Pag. 170
8.1.3.2 ABTS test	Pag. 171
8.1.3.3 β -Carotene bleaching test	Pag. 173
8.1.3.4 FRAP test	Pag. 175
8.1.4 Analisi statistica	Pag. 176
8.2 Risultati	Pag. 176
8.2.1 Risultati screening fitochimico	Pag. 177
8.2.1.1 Risultati dosaggio polifenoli	Pag. 177
8.2.1.2 Risultati dosaggio flavonoidi	Pag. 179
8.2.1.3 Risultati dosaggio capsaicinoidi	Pag. 180
8.2.1.4 Risultati dosaggio carotenoidi	Pag. 182
8.2.2 Risultati attività antiossidante	Pag. 182
8.2.2.1 Risultati DPPH test	Pag. 182
8.2.2.2 Risultati ABTS test	Pag. 183
8.2.2.3 Risultati β -carotene bleaching test	Pag. 185
8.2.2.4 Risultati FRAP test	Pag. 187
8.3 Discussioni	Pag. 189
Bibliografia	Pag. 192
Tabelle capitolo 8	Pag. 195
CONCLUSIONE	Pag. 207

INTRODUZIONE

Il ruolo primario della dieta è di fornire nutrienti sufficienti a soddisfare le esigenze metaboliche, dando al consumatore una sensazione di soddisfazione e di benessere. Le moderne conoscenze, tuttavia, sostengono l'ipotesi che, oltre alle esigenze nutrizionali, la dieta può modulare diverse funzioni del corpo e può giocare un ruolo dannoso o benefico in alcune malattie.

Nel mondo occidentale si sta assistendo alla modifica del concetto di nutrizione legato a motivi di sopravvivenza e alla soddisfazione della fame, verso l'utilizzo del cibo come mezzo per promuovere uno stato di benessere e di salute e contribuire così a ridurre il rischio di malattia. Questi concetti sono particolarmente importanti alla luce del crescente costo dell'assistenza sanitaria, del costante aumento della vita media dell'uomo, e dell'esigenza della popolazione anziana di migliorare la propria qualità di vita.

Nell'Unione Europea, è già da qualche tempo riconosciuto che la ricerca scientifica ha un'importanza primaria nella comprensione del ruolo che gli alimenti hanno nel modulare le funzioni del corpo, mantenendo e migliorando il benessere e la salute dell'uomo, e riducendo altresì il rischio dell'insorgenza di gravi malattie.

L'interesse verso una dieta "funzionale", ovvero che apporta benefici alla salute è un aspetto che oggi interessa prima di tutto il consumatore e dunque l'industria che non può farsi sfuggire questa opportunità. Sono poche le persone che oggi non conoscono l'importanza della nutrizione sul benessere dell'organismo, e la consapevolezza dei consumatori in merito cresce ogni anno molto sensibilmente. E', altresì, noto che l'effetto dell'alimentazione sulla salute umana si realizza soprattutto attraverso l'ingestione di piante alimentari, ricche in composti bioattivi. Col termine pianta alimentare s'indicano tutti quei vegetali che, direttamente o indirettamente, sono utilizzati per l'alimentazione umana. Di alcuni di essi vengono usati i frutti o i semi, di altri i bulbi, i tuberi, i rizomi, di

altri infine le parti erbacee. Le piante alimentari, secondo le diverse categorie, contengono albumine o proteine vegetali, idrati di carbonio (amido e zuccheri), grassi, sali minerali e organici. Molte fra esse sono ricche di vitamine, polifenoli, carotenoidi e di altre importanti classi di composti di cui si è ormai accertato il contributo contro i radicali liberi, l'invecchiamento cellulare e le altre malattie correlate allo stress ossidativo.

Appartengono alla categoria delle piante alimentari le erbe e le spezie. Le spezie sono state le protagoniste della nostra alimentazione da secoli, conosciute e utilizzate fin da tempi antichissimi, esse sono diventate parte integrante della vita di tutte le popolazioni anche grazie agli esploratori europei, che hanno contribuito alla loro diffusione dal loro luogo di origine a tutto il mondo. Oltre al ruolo che queste svolgono nell'impartire gusto e sapore al cibo che mangiamo, le spezie contengono una serie impressionante di fito-nutrienti (antiossidanti, minerali e vitamine, etc.), composti chimici di origine vegetale che sono essenziali per il nostro benessere. Il lungo elenco di effetti fisiologici benefici che le spezie hanno sulla salute suggerisce che queste potrebbero a buon ragione essere considerate come naturale ed essenziale componente della nostra dieta. Ogni spezia ha una sua proprietà potenzialmente benefica ed esiste anche la possibilità di effetti sinergici tra le varie spezie, aumentandone il potenziale salutistico.

Tra le spezie maggiormente utilizzate, sia per insaporire le pietanze sia per arricchirle di colore, ritroviamo il peperoncino (*Capsicum*).

Innumerevoli studi hanno caratterizzato sia chimicamente sia biologicamente le piante del genere *Capsicum*, scoprendone gli effetti positivi sulla salute.

Il peperoncino è, infatti, ormai noto per avere un importante ruolo nella prevenzione di diverse malattie e nella cura di numerose sindromi.

Tuttavia, nonostante la molteplicità di attività potenzialmente benefiche che il peperoncino possiede, sono, oggi, richieste maggiori informazioni riguardo al reale contributo dato dall'assunzione del peperoncino e dall'impatto che il suo consumo può avere sulla salute.

Pochi sono, infatti, gli studi mirati alla comprensione dell'effettivo quantitativo di nutriente assorbito e disponibile all'azione biologica.

Solo dalla comprensione dell'assorbimento, e quindi dalla biodisponibilità delle varie molecole contenute nella matrice vegetale sarà possibile valutare con esattezza l'impatto del peperoncino sulla salute umana, e solo in presenza di questo tipo di informazioni sarà possibile definire strategie di intervento per ottenere i massimi benefici, ed, eventualmente, evitare eventuali effetti collaterali indesiderati causati da una eccessiva assunzione.

Con il termine biodisponibilità s'indica la percentuale di nutriente che viene effettivamente assorbita dall'organismo, ed è quindi la misura di alimento disponibile ad esercitare un'attività fisiologica.

Il parametro della biodisponibilità è, evidentemente, importante per valutare l'appropriato apporto di nutrienti e ottimizzare il regime dietetico sia ordinario sia terapeutico. Un altro valore che può essere utilizzato come indice dell'assorbimento di una determinata classe di nutrienti è la bioaccessibilità. Essa descrive la porzione di composti liberati dalla matrice vegetale e incorporata nelle micelle miste, dalle quali, successivamente, verranno trasferiti alle cellule intestinali per essere assorbite e mandate nel circolo sanguigno.

La biodisponibilità e la bioaccessibilità di un nutriente sono regolate da fattori interni ed esterni. I fattori esterni comprendono la matrice alimentare e la forma chimica del nutriente in questione, mentre il genere, l'età, lo stato del nutriente e lo stadio della vita sono tra i fattori interni.

Inoltre, l'influenza di fenomeni di processazione (cottura, congelamento, essiccazione) può agire sulla matrice alimentare e sulla stabilità chimica di un nutriente determinando sostanziali variazioni della biodisponibilità dei nutrienti.

Tutto ciò ha indirizzato il presente lavoro di tesi a concentrare l'attenzione sullo studio del contenuto e della bioaccessibilità di otto carotenoidi presenti in venti diverse cultivar di peperoncino, analizzati sia allo stato crudo e fresco, sia dopo tre diversi approcci tecnologici tipici della tradizione calabrese, quali la cottura, il congelamento e l'essiccazione al sole.

Lo studio è stato arricchito anche dalla valutazione dell'attività antiossidante degli estratti di peperoncino e dalla misurazione del contenuto in polifenoli e capsaicinoidi.

I risultati ottenuti contribuiranno a meglio comprendere quanto i trattamenti tecnologici possano influenzare il contenuto di composti bioattivi, la bioaccessibilità e l'attività antiossidante di peperoncini.

SEZIONE GENERALE

Capitolo 1

Spezie come alimento funzionale

I primi usi documentati di spezie risalgono al 5000 a.C. quando i Sumeri usavano il timo per il suo benefico effetto. Papiri egiziani del 1555 a.C. menzionano l'uso di coriandolo, finocchio, ginepro, cumino, aglio e timo (Bellamy e Pfister, 1992), ma anche della menta (Block, 1986).

L'uso delle spezie era pratica comune anche nell'antica Grecia e a Roma, anche se il loro più ampio utilizzo ha avuto inizio con Carlo Magno. Con i viaggi di Marco Polo (XIII secolo) e la colonizzazione europea di America, Africa e Asia (XV-XVIII secoli) si diffonde il loro utilizzo anche in paesi più lontani.

Le spezie sono una parte importante della nutrizione umana e hanno importanza nell'alimentazione di tutte le culture del mondo. In letteratura troviamo diverse descrizioni del loro uso culinario, come aromatizzanti, come condimenti e digestivi, nonché come fonte di sostanze antiossidanti (Perez-Alvarez et al., 2002).

E' possibile, quindi, definire le spezie: alimenti "funzionali".

Un alimento può dirsi funzionale se è ricco di sostanze capaci di apportare un beneficio a uno o a un numero limitato di funzioni nel corpo in modo mirato, ovvero in maniera tale da essere rilevante per uno stato di benessere e di salute o per la riduzione del rischio di una malattia (Bellisle et al., 1998), e che abbia un effetto fisiologico o psicologico oltre l'effetto nutrizionale tradizionale (Clydesdale, 1997).

Un composto bioattivo di un alimento funzionale può essere un macronutriente se ha effetti fisiologici specifici o un micronutriente essenziale se il suo apporto è superiore alle raccomandazioni quotidiane. Può anche essere un ingrediente alimentare che non è essenziale (ad esempio, alcuni oligosaccaridi) o se è addirittura privo di valore nutritivo (ad esempio, microrganismi o sostanze

chimiche vegetali). Infatti, oltre al suo valore nutrizionale e alla funzione di procurare piacere, una dieta fornisce ai consumatori i composti in grado sia di modulare le funzioni del corpo sia ridurre il rischio di alcune malattie.

Un prodotto alimentare può anche essere reso funzionale utilizzando qualsiasi di questi 5 approcci:

- 1) Eliminare una molecola nota per causare un effetto deleterio se consumato (ad esempio, una proteina allergenica);
- 2) Aumentare la concentrazione di un composto naturalmente presente in cibo a tal punto da indurre effetti prevedibilmente positivi, come ad esempio assumendo micronutrienti fino a raggiungere una dose giornaliera superiore alla dose raccomandata ma compatibile con le linee guida dietetiche atte alla riduzione del rischio di malattie (Block, 1993), o aumentando la concentrazione di un componente non nutritivo ad un livello conosciuto per produrre un effetto benefico (Roberfroid, 2000);
- 3) Aggiungere una molecola che non è normalmente presente nella maggior parte degli alimenti e che non sia necessariamente un macronutriente o micronutriente ma per i quali si sono dimostrati effetti benefici (ad esempio, antiossidanti non vitaminici o fruttani prebiotici);
- 4) Sostituzione di un composto (solitamente un macronutriente come gli acidi grassi, cui assunzione è solitamente eccessiva e quindi causa di effetti deleteri) con un composto di cui si sono dimostrati effetti benefici, come ad esempio l'inulina (Franck-Frippiat, 1992);
- 5) Aumentare la biodisponibilità o la stabilità di un composto noto per produrre un effetto funzionale o per ridurre il potenziale rischio di malattia di un particolare cibo.

La dimostrazione di tali effetti benefici deve basarsi su dati scientifici. Avere il supporto scientifico di questi alimenti funzionali sarà necessario per garantire la credibilità di qualsiasi affermazione di beneficio.

Gli effetti positivi di un alimento funzionale possono risiedere sia nel mantenimento di uno stato di benessere e di salute, sia nella riduzione del rischio d'insorgenza di patologie.

Il primo passo nella ricerca e nello sviluppo di un alimento funzionale è l'identificazione di un'interazione specifica tra uno o più componenti di questo alimento e una funzione (cioè, genomica, cellulare, biochimica o fisiologica) dell'organismo. Questo passaggio è fondamentale e la ricerca dovrebbe portare a una o più proposte d'ipotetici meccanismi d'azione nonché allo sviluppo e alla convalida di biomarcatori rilevanti. Un effetto funzionale deve quindi essere dimostrato in modelli rilevanti. Questa parte sperimentale di sviluppo si conclude con una nuova ipotesi sulla rilevanza degli effetti funzionali sulla salute umana. L'ipotesi deve essere testata rigorosamente progettando studi nutrizionali condotti su volontari scelti accuratamente, e la dimostrazione di tali effetti deve essere accompagnata da una valutazione di sicurezza, che è un assoluto prerequisito per lo sviluppo di alimenti funzionali. In ogni caso, il vantaggio sulla salute di un alimento funzionale sarà limitato se il cibo non è parte della dieta. Gli alimenti funzionali devono rimanere degli alimenti, non sono pillole o capsule ma sono parte di una dieta o di parte di un modello alimentare riconosciuto come benefico per il benessere e la salute (Pascal, 1996).

La progettazione e lo sviluppo di alimenti funzionali sono una sfida scientifica che deve basarsi su una procedura graduale.

Il processo inizia con la conoscenza scientifica di base pertinente a funzioni che sono sensibili alla modulazione da composti alimentari, che sono fondamentali al mantenimento del benessere e della salute, e che, quando alterate, possono essere collegate a una variazione del rischio di una malattia. Successivamente vi è lo sfruttamento di questa conoscenza nello sviluppo di marcatori che possono essere rilevanti nelle funzioni chiave. Poi vi è una nuova generazione di studi d'intervento umano che includerà l'uso di questi marcatori convalidati, pertinenti e consentirà la creazione di diete efficaci e sicure. Infine vi è lo sviluppo di tecniche

avanzate per studi *in vivo* sull'uomo che, preferibilmente, devono essere minimamente invasivi e applicabili su larga scala.

Gli obiettivi più promettenti per la scienza degli alimenti funzionali sono i seguenti:

1) Il metabolismo dei macronutrienti. Quest'obiettivo riguarda il metabolismo di carboidrati, aminoacidi e acidi grassi e, in particolare, la modulazione ormonale del loro metabolismo attraverso l'equilibrio insulina/glucagone o la produzione gastrointestinale di peptidi. L'obiettivo di questo processo è di ridurre il rischio di effetti patologici associato a resistenza all'insulina e a malattie cardiovascolari. Esso richiede lo studio delle interazioni tra l'assunzione di nutrienti e la regolazione dell'espressione genica, ad esempio il ruolo diretto del glucosio o di qualche acido grasso polinsaturo (Clarke & Jump, 1994), o di interazioni più indirette, come la riduzione della lipogenesi epatica dei fruttani (Fiordaliso et al., 1995; Kok et al., 1996).

2) Sviluppo durante la vita fetale e nelle prime settimane di vita. Sia la dieta della madre, sia quella futura del bambino possono influenzare lo sviluppo di un uomo, si veda l'importanza dell'acido folico nella dieta delle donne in gravidanza e il ruolo degli acidi grassi polinsaturi a catena lunga nei primi stadi dello sviluppo cerebrale.

3) Il metabolismo degli xenobiotici e la sua modulazione da parte dei componenti della dieta non nutritivi, come ad esempio alcune sostanze fitochimiche. Tali modulazioni possono avere importanti implicazioni per il controllo di tossicità o cancerogenicità causati dai contaminanti chimici presenti negli alimenti o nell'ambiente.

4) L'umore e il comportamento o la cognizione e la performance fisica. Molte questioni sono state sollevate circa l'effetto degli alimenti su queste funzioni, ma il confine tra nutrizionale ed effetti farmacologici non è sempre facile da disegnare. Inoltre, le metodologie per lo studio di tali effetti sono generalmente percepite come inadeguati a generare i dati quantitativi necessari per

un'affidabile analisi statistica. I nuovi sviluppi attesi in questo campo permetteranno di affrontare in maniera adeguata questi problemi.

5) funzioni gastrointestinali. Queste funzioni comprendono gli studi della microflora del colon, controllando la biodisponibilità dei nutrienti, il tempo di transito e la motilità intestinale (Roberfroid, 1996);

6) sistemi redox e antiossidanti. Questi sistemi richiedono un equilibrato e soddisfacente apporto di (pro) vitamine antiossidanti così come sostanze non vitaminiche quali i polifenoli e altri antiossidanti naturali di origine vegetale. Attività redox e protezione antiossidante sono importanti per quasi tutte le cellule e tessuti, e il loro squilibrio è associato a varie patologie.

La base scientifica generata dalla ricerca e sviluppo nel campo degli alimenti funzionali stabilirà le indicazioni sulla salute che possono essere tradotte in messaggi per i consumatori. Secondo Clydesdale (Clydesdale, 1997) un'indicazione sulla salute descrive "un rapporto positivo (cioè, la riduzione del rischio e/o la diminuzione di un'avversa condizione fisiologica o psicologica) tra una sostanza alimentare di una dieta e una malattia o altra correlata condizione di salute". Con riferimento alla strategia per la ricerca e sviluppo, queste affermazioni si riferiscono sia ad avanzate funzioni o alla riduzione del rischio di malattia.

L'indicazione della funzione migliorata descrive le conseguenze positive d'interazioni tra un componente alimentare e una specifica funzione biochimica, cellulare, o d'organo, senza riferimento diretto a qualsiasi beneficio per la salute o alla riduzione del rischio di malattia. Esempi includono:

- la modulazione positiva delle attività metaboliche (es, omeostasi lipidica) che si ha rafforzando le funzioni immunitarie (l'immunostimolazione);
- la riduzione del rischio di stress ossidativo (per esempio, utilizzando antiossidanti);
- la protezione contro la tossicità chimica (ad esempio la steatosi chimicamente indotta);

- il ripristino o la stabilizzazione di un'equilibrata microflora del colon (ad esempio, attraverso la stimolazione selettiva di bifidobatteri da fruttani quali l'inulina) migliorando la biodisponibilità di nutrienti (ad esempio, dei minerali con l'aggiunta di oligopeptidi o fruttani (Roberfroid, 2000).

La ricerca sulle affermazioni di funzione avanzata ha già portato e continuerà a portare a nuovi concetti di nutrizione. Esempi di questi nuovi concetti sono i prebiotici e simbiotici, e i fattori bifidogenici (Gibson & Roberfroid, 1995).

La riduzione del rischio di malattia correlata all'assunzione di alimenti specifici comporta la riduzione del rischio di effetti patologici o malattie. Esempi sono gli alimenti che riducono il rischio di malattie cardiovascolari, di tumori, d'infezioni (ad esempio intestinali), di aterosclerosi, di malattia epatiche, di diarrea, di costipazione, di osteoporosi o di malattie associate a sindrome da resistenza all'insulina (ad esempio, il diabete di tipo 2 o l'obesità).

La manifestazione di effetti benefici sulla salute rimane un difficile compito che richiede esperimenti a lungo termine, e i risultati finali sono difficili da prevedere e spesso anche da interpretare. Ad esempio, in alcuni recenti studi a lungo termine sugli effetti delle vitamine antiossidanti sul cancro ai polmoni si era previsto un effetto protettivo, ma è stato effettivamente trovato il contrario (Hennekens et al., 1996).

Questa scoperta rafforza l'importanza di utilizzare un attento approccio scientifico basato su una giusta ipotesi e una ragionevole evidenza del meccanismo di risposta sanitaria prevista. I protocolli dei criteri di valutazione non sono necessariamente quelli attualmente utilizzati negli studi clinici per lo sviluppo di farmaci.

La popolazione target per gli studi di nutrizione deve essere costituita da persone sane o persone apparentemente in buona salute così da andare a studiare se effettivamente si avrà un significativo miglioramento (statisticamente e, forse più importante, biologicamente) dei biomarkers indicativi di uno stato di buona salute. Nella stragrande maggioranza dei casi, queste variabili o questi biomarcatori devono ancora essere scoperti e validati (Roberfroid, 2000).

Bibliografia

- Bellamy D, Pfister A (1992) *World Medicine: Plants, Patients and People*. Oxford, Blackwell Publishers
- Bellisle F, Diplock AT, Hornstra G, Koletzko B, Roberfroid M, Salminen S (1998) Functional food science in Europe. *Br J Nutr* 80:S3-S193
- Block E (1986) Antithrombotic agent of garlic: A lesson from 5000 years of folk medicine. In: *Folk Medicine, the Art and the Science*. pp 125-137. Steiner, R. P., Ed., American Chemical Society. Washington DC
- Block G (1993) Micronutrients and cancer: time for action? *J Natl Cancer Inst* 85:846-848
- Clarke SD, Jump DB (1994) Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu Rev Nutr* 14:93-98
- Clydesdale F (1997) A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. *Nutr Rev* 55:413-22
- Fiordaliso M, Kok N, Desager JP, Goethals F, Deboyser D, Roberfroid M, Delzenne N. (1995) Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids, and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. *Lipids* 30:163-167
- Franck-Frippiat A (1992) Rafticreaming: the new process allowing to turn fat into dietary fiber. *FIE Conference Proceedings*. Maarsen, Netherlands: FIE 1903–1907
- Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125:1401-12
- Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, Belanger C, LaMotte F, Gaziano JM, Ridker PM, Willett W, Peto R (1996) Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the

- incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334:1145-55
- Kok N, Roberfroid M, Robert A, Delzenne N (1996) Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in the rat. *Br J Nutr* 76:881-890
- Pascal G (1996) Functional foods in the European Union. *Nutr Rev* 54(suppl):S29-S32
- Pérez Alvarez JA, Fernandez Lopez J, Sayas Barberá E (2002) Las especias en la Dieta Mediterranea. In: *Fundamentos Tecnológicos y Nutritivos de la Dieta Mediterranea*. pp. 103-119. Perez-Alvarez JA Sayas-Barberá, Fernandez-Lopez EJ, Eds. Universidad Miguel Hernandez, Elche.
- Roberfroid MB (2000) Concepts and strategy of functional food science: the European perspective 1–3 *Am J Clin Nutr* 71(suppl):1660S-1664S
- Roberfroid MB (1996) Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. *Nutr Rev* 54(suppl):S38-S42

Capitolo 2

Piante del genere *Capsicum*: classificazione, principi attivi e proprietà biologiche

Tra le matrici di possibile interesse sono state individuate le piante del genere *Capsicum*, spezia largamente utilizzata a livello mondiale non solo per insaporire piatti semplici ma anche per arricchire in colore le pietanze.

Sun et al. (2007), infatti, riportano l'evidenza sperimentale secondo cui il colore dei peperoni è il principale fattore che determina la decisione di acquisto e di consumo. A seconda dell'intensità del sapore e della consistenza, il loro uso culinario cambia da quello di vegetale (peperone) a quello di spezie o di colorante (peperoncino e paprika). I frutti delle diverse piante di *Capsicum* hanno alcune proprietà biologiche che possono avere effetti positivi sulla salute umana e sulle malattie croniche (Materska et al., 2005).

2.1 Botanica e classificazione delle specie di *Capsicum*

Il genere *Capsicum* appartiene alla famiglia Solanaceae e comprende circa ventisette specie e oltre 2000 varietà di piante perenni e annuali, delicate e rustiche, a portamento suffruticoso o arbustivo, tra le quali troviamo anche il comune peperone (Andrews, 1995; Dewitt et al., 1996).

Secondo alcuni il nome "*Capsicum*", attribuitogli dal naturalista svedese Linneo, deriva dal latino "capsa", che significa scatola e ad indicare quella particolare forma del frutto che ricorda proprio una scatola con dentro i semi. Altri, invece, lo fanno derivare dal greco "κάπτω" che significa "mordo", con evidente riferimento al piccante che "morde" la lingua quando si mangia.

Il numero delle varietà di peperoncino è difficilmente valutabile in quanto a quelle più conosciute si aggiungono ogni anno selezioni nuove e varietà ibride.

Nondimeno, soprattutto negli ultimi anni, sono state riconsiderate e si cerca di salvare le varietà locali, non solo per un insieme di caratteri esteriori, ma principalmente per le loro caratteristiche gustative che fanno riferimento a particolari tradizioni dei singoli luoghi di coltivazione.

Il *Capsicum annuum* L. è la specie da cui derivano la maggior parte delle varietà sia di peperone sia di peperoncino. Oltre a tale specie sono da annoverarsi: *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. pubescens* e *C. baccatum*.

La specie diffusa in Italia è il *C. annuum*, mentre le altre si coltivano soprattutto in America Meridionale e in Messico (Guidi, 1996).

2.1.1 *Capsicum annuum*

Il *C. annuum* L. è un arbusto alto da 40 a 80 cm con fusti eretti e foglie ovali, picciolate e di colore verde scuro. I fiori (prodotti da giugno ad agosto) che compaiono all'ascella delle foglie uno per nodo e presentano una corolla bianca con 5-7 petali e stami giallo tenue; a questi faranno seguito i frutti di colore e dimensioni variabili a seconda della varietà. Se ne conoscono con frutti eretti o pendenti, conici o sferici, lisci o grinzosi, lunghi da 2 a 20 cm e di colore verde, giallo o rosso.

Tale specie è, tra le cinque, la più coltivata e comprende un notevole numero di varietà con un grado di piccantezza variabile (Enciclopedia Agraria Italiana, 1962).

C. annuum var. *annuum*, in cui ritroviamo i seguenti gruppi e varietà:

Gruppo *Ancho*, che annovera i famosi peperoncini *Ancho*, *Dolmalik* e *Mulato* (conosciuto come *Mulato pepper* o *chile achocolatado* o *Ancho negro*). Non sono particolarmente piccanti e sono i peperoncini più famosi in Messico,



Figura 1.1. *Capsicum Annuum* L.

- molto utilizzati nella cucina locale soprattutto per la preparazione di salse. Il peperoncino *Ancho* è largo e scuro con un aroma resinoso e fruttato ed è l'unico peperoncino che viene farcito secco dopo essere stato ammorbidito.
- Gruppo *Cayenna*, in cui ritroviamo il peperoncino conosciuto come *Pepe di cayenna* che deve il nome alla città di Cayenna nella Gujana francese. Il termine “cayenna” viene spesso usato per indicare qualsiasi tipo di peperoncino. In America è usato comunemente il termine “*Red pepper*” per indicare la polvere di peperoncini di Cayenna. I peperoncini Cayenna hanno tutti la particolarità di essere lunghi (arrivano a 10 cm) e sottili con la punta spesso arricciata. All'interno di questo gruppo si annoverano le varietà: *Mirasol*, *Red Cayenna*, *Yellow Cayenna* e *De Arbol*.
- Gruppo *Jalapeño*, che contiene i peperoncini Jalapeño, il cui nome deriva dalla città di Jalapa (capitale dello stato di Veracruz, in Messico). Sono i peperoncini rossi messicani più conosciuti in Europa, hanno un moderato grado di piccantezza e vengono consumati in genere in salamoia. In genere questi peperoncini sono conservati in scatola o marinati o ridotti in polvere sia verdi che rossi. Le bacche dei Jalapeño sono molto carnose e piccanti; per questo non si essiccano naturalmente ma vengono asciugati facendo bruciare del legno di buona qualità che gli conferisce il caratteristico aroma affumicato. Il prodotto secco è chiamato *Chipotle*. In questo gruppo ritroviamo i peperoncini noti come *Jalapeño* con le varietà: *Early Jalapeño* e *Jumbo Jalapeño*.
- Gruppo *Pasilla*, che annovera i peperoncini noti come *Pasilla*, conosciuti in Messico come *Chile achocolatado* o *Chile negro* in quanto, una volta maturi, sono di colore quasi nero. Ritroviamo qui la varietà *Pasilla* che ha una forma lunga e sottile con un particolare gusto affumicato. Quando è fresco è anche conosciuto come *Chilaca*.

- Gruppo *Banana*, che racchiude le varietà *Sweet Banana* e *Hungarian Wax* con un sapore delicato e dolce.
- a) *C. annuum* var. *abbreviatum*. Il *C. annuum* var. *abbreviatum*, il classico peperoncino rosso italiano, ha frutti piccoli e conici che non superano i cinque centimetri. Si pensa che questo peperoncino sia la specie più vicina all'antenato comune di tutti i peperoncini.
- b) *C. annuum* var. *pimento*, conosciuto in Europa come “peperoncino cuoriforme americano” ed in America come “Pimento pepper”.
- c) *C. annuum* var. *glabriusculum*, in cui viene identificata la cultivar *Chilipiquin o Chiltepin o Tepin o Piquin o Chilipequin*. Il nome deriva da una lingua indigena messicana (nahuatl) con la quale si chiamava *chilitecpintl* che significa “peperoncino pulce”, per le piccole dimensioni delle bacche e l'elevata piccantezza. Il suo colore splendente lo rende molto ricercato dagli uccelli, che sono stati sicuramente determinanti nella nascita delle numerosissime varietà del peperoncino che ritroviamo oggi anche allo stato selvatico.
- d) *C. annuum* var. *grossum*, che rappresenta il classico peperone dolce italiano (*Sweet bell*), chiamato anche “Chili dolce”.
- e) *C. annuum* var. *cerasiforme*. I frutti di questa specie sono piccoli e rotondi come le ciliege dalle quali prendono il nome. Le piante sono alte da 20 a 40 cm. Esistono due varietà a frutti sferici: “Ciliegia rosso” e “Ciliegia giallo”.
- f) *C. annuum* var. *parvo-acuminatum*. La varietà *acuminatum* dà origine a un gruppo di piante alte dai 40 ai 60 cm, con frutti conici, eretti, leggermente allungati di colore rosso e lunghi fino a 15 cm.

Altre varietà sono: *C. annuum* var. *peperoncini*; *C. annuum* var. *pinguita de Mono*; *C. annuum* var. *anomalum*; *C. annuum* var. *conoide*; *C. annuum* var. *conicum*; *C. annuum* var. *cordiforme*; *C. annuum* var. *cuneatum*; *C. annuum* var. *leucocarpum*; *C. annuum* var. *longum*; *C. annuum* var. *luteum*; *C. annuum* var.

lycopersiciforme; *C. annuum* var. *microcarpum*; *C. annuum* var. *piramidale*; *C. annuum* var. *violaceum*.

2.1.2 *Capsicum chinense*

La specie *C. chinense* comprende i peperoncini più piccanti in assoluto, quali l'*Habanero*, il *Naga Dorset* e lo *Scotch Bonnet*. La caratteristica principale del *C. chinense* è a prescindere da forma e livello di piccantezza, l'odore simile ad un'albicocca ed un sapore fruttato. La pianta è simile a un piccolo albero, a crescita lenta, che può però arrivare fino a 2 metri d'altezza. I fiori, bianchi o verdastri, con stami viola, possono essere campanulati, altro elemento distintivo della specie. Le foglie, larghe, carnose e rugose possono avere una leggera peluria sulla pagina inferiore. E' molto sensibile all'insolazione. In questa specie ritroviamo le seguenti varietà:

- a) *C. chinense* var.: *Habañero*, *Habañero Rojo*, *Chocolate Habañero* e *Yellow Habañero* Gli *Habañero*, tra i peperoncini più piccanti al mondo, sono originari dell'America meridionale. Hanno la forma arrotondata e possono essere, a maturazione, rossi o arancioni con un caratteristico sapore leggermente fruttato.
- b) *C. chinense* var. *red savina*, tipico della penisola dello Yucatan, che si trova nel Guinness dei primati per la sua elevata piccantezza.
- c) *C. chinense* var. *scotch bonnet*, che segue come grado di piccantezza l'*Habañero*.
- d) *C. chinense* var. *micro carpa*, che Annovera i peperoncini noti come *African Devil* (diavolo africano) o *Bird's eye* (occhio d'uccello) o *Piri piri* o *Pilipili*, molto usati in Africa e molto piccanti.
- e) *C. chinense* var. *naga dorset*, creato recentemente (2006) in Inghilterra.
- f) *C. chinense* var. *congo*, i cui frutti sono noti come *Carribean* o peperoncini del Congo.

Altre varietà sono: *C. chinense* var. *datil*; *C. chinense* var. *limo*; *C. chinense* var. *panca*; *C. chinense* var. *red squash*; *C. chinense* var. *rocotillo*; *C. chinense* var. *uvilla grande*; *C. chinense* var. *yuquitania*; *C. chinense* var. *charapa*, *chinchichu*; *C. chinense* var. *pucomncho*.

2.1.3 *Capsicum baccatum*

La specie è originaria della Bolivia e del Perù con un medio grado di piccantezza, di colore rosso o giallo. Il frutto è utilizzato in Perù per la preparazione del piatto tipico nazionale, il *ceviche*.

La specie *baccatum* contiene molte varietà, sia ornamentali sia eduli. Tra le prime ricordiamo il “Cappello del vescovo”. La pianta è un arbusto a portamento eretto, simile a un piccolo albero, alto da 0,5 fino a 2 metri nei paesi d’origine, con foglie lanceolate e verdi. I fiori, a corolla bianca con macchie dal giallo al verde al marrone, singoli con stami gialli e antera gialla o marrone a 5-7 petali compaiono all’ascella delle foglie, uno per nodo, in estate. Il frutto è una bacca di colore verde all’inizio con colorazioni del frutto maturo dal bianco al viola, passando per le varie tonalità di giallo, arancio e rosso. Anche la forma è variabilissima, tanto che la maggior parte delle varietà è utilizzata a scopo ornamentale. Produce molti frutti arrivando a più di quaranta per pianta. Una varietà nota come *puca-uchu* è simile a un rampicante.

Fanno parte della specie le seguenti varietà: *C. baccatum* var. *ají cereza e ají limon*; *C. baccatum* var. *bolivian long*; *C. baccatum* var. *christmas bell*; *C. baccatum* var. *cohabamba*; *C. baccatum* var. *dedo do moca*; *C. baccatum* var. *kovinchu*; *C. baccatum* var. *mono*; *C. baccatum* var. *peri-peri*; *C. baccatum* var. *pilange*; *C. baccatum* var. *serranito*; *C. baccatum* var. *baccatum*; *C. baccatum* var. *microcarpum*; *C. baccatum* var. *pendulum*; *C. baccatum* var. *praetermissum*.

2.1.4 *Capsicum chacoense*

Il *Capsicum chacoense* è una specie del genere *Capsicum* originaria del Sud America. *C. chacoense* è, infatti, nativo dell'Argentina, della Bolivia e del Paraguay. Non è una specie molto coltivata, ma, come tutti i frutti di *Capsicum*, è commestibile. Le piante di *Capsicum chacoense* sono arbusti compatti perenni (annuale nei climi più freddi) che crescono in prossimità del suolo. Alti circa 80 cm e fino a 1 metro di altezza e di larghezza. I fiori compaiono in estate e sono dei piccoli fiori bianchi con cinque petali. Il frutto, di forma rotondeggiante o triangolare, cresce e si allunga di massimo 2,5 cm, mentre rimane largo di 0,5 cm in piena maturazione. La maturazione rende il frutto verde o rosso o giallo. Le foglie della pianta sono grandi, piatte, e tondeggianti.

2.1.5 *Capsicum pubescens*

Il *C. pubescens*, conosciuto anche come *Manzana*, è la specie più diffusa in Perù e Bolivia. Presente anche nei Caraibi e in Messico è la specie più resistente al freddo; cresce, infatti, ad altitudini elevate. A causa del notevole sviluppo verticale, la pianta può arrivare a qualche metro. E' anche nota come "tree chile" (albero del peperoncino) e cresce velocemente come un rampicante.

La caratteristica principale del *C. pubescens* sono i semi neri o marrone scuro nel frutto, a prescindere da forma e livello di piccantezza. I fiori, di colore violaceo con antere bianche sono un'altra caratteristica che ne rende semplice l'identificazione. Le foglie ovali possono avere una leggera peluria sulla pagina inferiore. E' l'unica specie, tra le cinque, delle quali non si conosca la specie selvatica. Tra le varietà più note si annoverano:

- a) *C. pubescens* var. *rocoto* conosciuta in Messico come *Manzano* e in Perù, Cile ed Ecuador come *Rocoto*. La pianta produce un frutto di colore rosso, che per la forma ricorda la mela. E' molto piccante e viene solitamente

consumato fresco in quanto ricco di polpa e non si presta bene all'essiccazione.

- b) *C. pubescens* var. *canario*, conosciuta in Messico come *Yellow Rocoto*. Produce un frutto dal colore giallo.

2.1.6 *Capsicum frutescens*

Capsicum frutescens significa “a forma di arbusto”. E' una pianta perenne, molto diffusa in India. Necessità di temperature piuttosto elevate, ma resiste anche a -5 °C per brevi periodi; ha il fusto legnoso che può superare il mezzo metro d'altezza; le foglie sono ovali, ma hanno cinque punte; i frutti sono dei piccoli peperoni in miniatura; i fiori sono bianchi con il centro di un bel giallo arancio e appaiono in estate; i frutti coriacei e commestibili, hanno colore verde quando sono acerbi, giallo, rosso vivo, viola, porpora o marrone quando giungono a maturazione. Il *C. frutescens* pur raccogliendo peperoncini che hanno dei gradi di piccantezza variabili, rimane secondo alla specie *C. chinense* (la più piccante). In questa specie ritroviamo le seguenti varietà:

- a) *C. frutescens* var. *fasciculatum*, in cui ritroviamo peperoncini noti come “Santaka”. I frutti sono diritti e sottili molto piccanti.
- b) *C. frutescens* var. *malagueta*, nota semplicemente come “Malagueta”.
- c) *C. frutescens* var. *tabasco*, molto diffusa in tutto il continente americano e in parte anche nel bacino asiatico. Sono peperoncini che a maturazione hanno una colorazione rosso vivo, sono di forma allungata, molto succosi e con un elevato grado di piccantezza.

Altre varietà sono: *C. frutescens* var. *abbreviatum*; *C. frutescens* var. *baccatum*; *C. frutescens* var. *cerasiforme*; *C. frutescens* var. *conoides*.

2.2 La piccantezza dei peperoncini

La piccantezza dei peperoncini si misura abitualmente tramite la Scala di Scoville (o più brevemente Scala Scoville). Il numero di unità di Scoville della scala (SHU, Scoville Heat Units) indica la quantità di capsaicina equivalente contenuta.

La scala di Scoville prende il nome dal suo ideatore, Wilbur Scoville, che sviluppò il SOT (Scoville Organoleptic Test) nel 1912. Questo test originariamente prevedeva che una soluzione dell'estratto del peperoncino venisse diluita in acqua e zucchero finché il "bruciore" non fosse più percettibile ad un insieme di assaggiatori (generalmente 5); il grado di diluizione, posto pari a 16.000.000 per la capsaicina pura, dava il valore di piccantezza in unità di Scoville. Il valore 16.000.000 per la capsaicina fu deciso arbitrariamente da Scoville.

Un peperone dolce, che non contiene capsaicina, ha un valore 0 sulla scala Scoville, a significare che l'estratto di peperone non è piccante anche se non diluito. Al contrario, uno dei peperoncini più piccanti, l'Habanero Red Savina, fa misurare un valore superiore a 300.000 sulla scala Scoville. Oltre alle varietà di Habanero e Scotch Bonnet, anche altre varietà sono in lizza per il riconoscimento ufficiale come varietà più piccante: il Naga Jolokia o Bih Jolokia indiano (*C. chinense*), il Naga Dorset ed il Thai verde.

Il peperoncino italiano ha un valore che va da 100 a 500 sulla scala Scoville. Il SOT dipende, però, dalla soggettività umana, per cui sono stati sviluppati anche altri tipi di test, molto più sofisticati, tra cui il "Metodo Gillette", che prevede l'impiego dell'HPLC (High performance liquid chromatography) per valutare direttamente la quantità di capsaicinoidi in un estratto di peperoncino.

2.3 Cenni storici

Il peperoncino piccante è un alimento consumato sin dall'antichità. Dalla testimonianza di reperti archeologici sappiamo che era conosciuto in Messico 9.000 anni fa, presente in quelle zone come pianta coltivata ed era la sola spezia usata dagli indiani del Cile e del Messico. Una precisa testimonianza è contenuta nella biografia di Montezuma, ultimo signore degli Aztechi, che mentre era prigioniero di Cortez, passava il tempo scherzando con le sue concubine e mangiando pietanze con peperoncino rosso.

In Europa il peperoncino è arrivato con Cristoforo Colombo (Beutler et al., 2004) dalle Americhe nel suo secondo viaggio, nel 1493, anche se prima di quella data si era già diffuso in Asia e Africa “per vie diverse da quelle dei bianchi”. Vinigi Grottanelli, infatti, ricorda che: “alcune spezie ebbero una spiccata fortuna presso molti popoli lontanissimi e del tutto diversi gli uni dagli altri, dando luogo a fenomeni di diffusione in gran parte estranei alle correnti mercantili dei bianchi. Un esempio tipico è offerto dalla più piccante fra tutte le spezie nata da noi come pepe di Cayenna o paprika: originaria dell'America tropicale e conosciuta quindi nel vecchio mondo prima della scoperta, questa spezia fu precocemente trasportata e trapiantata in Asia e Africa, ove si propagò da una tribù all'altra con tanto successo da esservi considerata come ingrediente della cucina tradizionale, quando gli Europei penetrarono più tardi in queste regioni”.

Colombo, approdando su un'isola caraibica, molto probabilmente incontrò un *Capsicum chinense*, delle varietà *Scotch Bonnet* o *Habanero*, i peperoncini più diffusi del luogo. Sul diario di bordo della prima spedizione di Colombo, Bartolomeo de Las Casas scriveva: “La spezia che essi mangiano è abbondante e più importante del pepe nero”. Introdotto quindi in Europa dagli Spagnoli, ebbe un immediato successo, ma i guadagni che la Spagna si aspettava dal commercio di tale frutto (come quello di altre spezie orientali) furono deludenti, poiché il peperoncino si acclimatò benissimo nel vecchio continente, diffondendosi in tutte le regioni meridionali e venne così adottato come spezia anche da quella parte

della popolazione che non poteva permettersi l'acquisto di cannella, noce moscata. Nicolò Monardes diceva: "le spezie aromatiche costano molti ducati, l'altro (il peperoncino) non costa altro che seminarlo". Diventò così la droga dei poveri, di tutti quelli che non potevano permettersi le costosissime spezie orientali.

Un destino popolare e democratico, dunque, in pochissimo tempo diffonde il peperoncino in tutto il mondo, soprattutto tra le popolazioni povere con regimi alimentari monotoni, carenti di proteine. Con il peperoncino i Messicani impararono a insaporire le "tortillas", gli Africani la manioca, gli Asiatici il riso. In Italia, soprattutto i meridionali e in special modo i calabresi hanno reso più vivace e gradevole una cucina povera, vegetariana, fatta d'ingredienti umili e di pochissima carne.

Il nome del frutto deriva dalla somiglianza nel gusto, sebbene non nell'aspetto, con il pepe (piper in latino). Il nome con il quale era chiamato nel nuovo mondo in lingua nahuatl era "chili", e tale è rimasto nella lingua inglese e in alcuni nomi di varietà, come il chiltepin. Il chiltepin è ritenuto l'antenato di tutte le altre specie. Nei paesi del Sudamerica di lingua spagnola e portoghese, invece, viene comunemente chiamato ají, modernizzazione dell'antillano asci. La parola in lingua quechua per i peperoncini è uchu, come nel nome usato per il rocoto dagli Inca: rócot uchu, peperoncino spesso, polposo.

2.4 I principi attivi del peperoncino

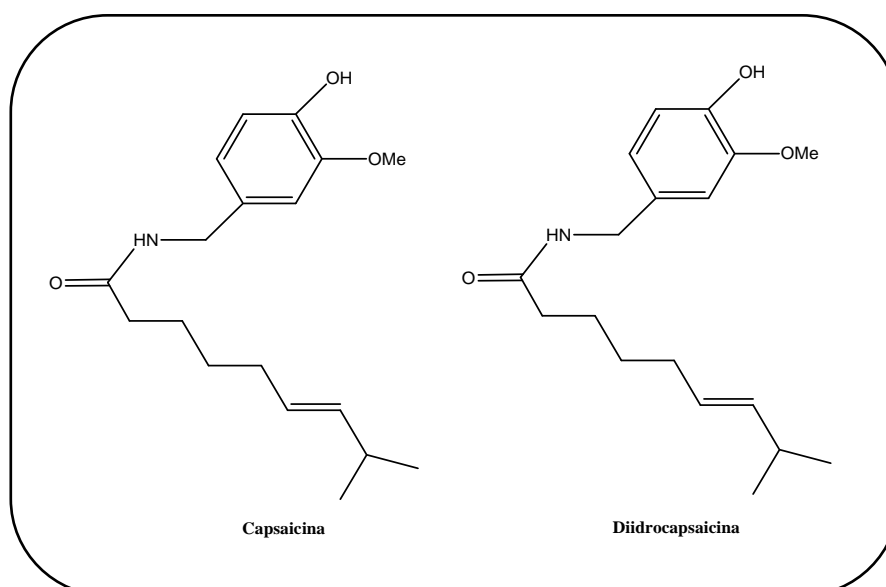
I più abbondanti e noti principi attivi presenti nelle specie di *Capsicum*, responsabili per il 90% della piccantezza di queste piante, sono capsaicina (detta anche capseicina o capsina o 8-metil-*N*-vanillil-6-nonenamide, $C_{18}H_{27}NO_3$) e diidrocapsaicina (Wachtel, 1999).

Entrambi, insieme ad altri minori capsacinoidi, tra cui omodiidrocapsaicina, nordiidrocapsaicina e omocapsaicina, sono i principali prodotti di un "pathway" metabolico che consente la loro sintesi attraverso la condensazione della

vanillilamina con acidi grassi ramificati a catena corta. La porzione dell'acido grasso deriva biosinteticamente dalla valina, mentre la vanillilamina origina dalla L-fenilalanina, attraverso il "pathway" dei fenilpropanoidi (Leete et al., 1968). I capsaicinoidi sono alcaloidi che si caratterizzano per la presenza di un atomo di azoto che non fa parte, come per gli altri alcaloidi, di un anello eterociclico; per questo motivo sono classificati come proto-alcaloidi o pseudo-alcaloidi (Suzuki et al., 1984).

I capsaicinoidi sono prodotti da ghiandole situate tra la parete del frutto e la placenta (il tessuto che sorregge i semi): soprattutto questa ultima è ricca di capsaicina, mentre i semi, contrariamente all'opinione comune, sono ricoperti in superficie di capsaicinoidi, ma ne sono internamente privi.

La capsaicina e gli altri capsaicinoidi sono alcaloidi incredibilmente stabili: restano inalterati per lungo tempo, anche dopo cottura e congelamento.



La capsaicina fu scoperta nel 1816 da Bucholtz, il quale isolò la sostanza piccante dai peperoncini macerati mediante solventi organici. Il metodo è tuttora utilizzato per estrarre l'oleoresina dai peperoncini. Come tutti i capsaicinoidi, la capsaicina è irritante nei mammiferi, incluso l'uomo, e produce una sensazione di bruciore alle mucose, bocca inclusa, dove passa in soluzione e stimola i recettori

VR1 (Vanilloid Receptor type 1), i quali a loro volta attivano la proteina VRL-1 (Vanilloid Receptor-Like 1) (Szallasi et al., 1990; Szallasi et al., 1999).

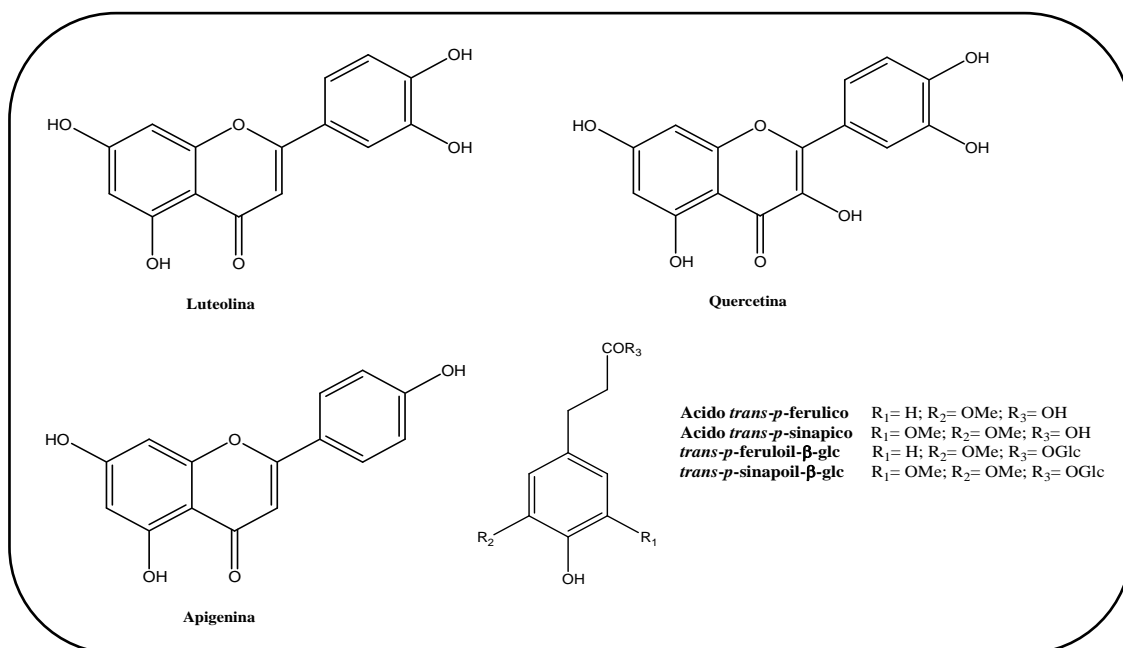
I composti fenolici sono un importante gruppo di metaboliti secondari, sintetizzati dalle piante nella fase di adattamento a condizioni di stress. Negli ultimi anni i fenoli hanno attratto l'interesse dei ricercatori in quanto promettenti antiossidanti in grado di proteggere l'organismo umano dai radicali liberi, la formazione dei quali è associata con il normale metabolismo delle cellule.

Diversi studi sono stati realizzati al fine di valutare la presenza di fenoli ed il loro dosaggio quantitativo in piante del genere *Capsicum*. Tra questi, Sukrasno & Yeoman (1993) hanno evidenziato la presenza dei due flavonoidi 3-*O*-ramnosilquercetina, 7-*O*-glucosilluteolina e di tre derivati dell'acido cinnamico, *p*-cumaril-cinnamoil glucoside, caffeoil-cinnamoil glucoside e 3,4-dimetossicinnamoil glucoside. Altri autori hanno valutato il contenuto di due flavonoidi (quercetina e luteolina) dopo idrolisi acida della porzione fenolica di un estratto di *C. annuum* (Lee et al., 1995).

Una più dettagliata analisi della porzione fenolica di peperoncini è stata realizzata da Iorizzi et al. (2001)

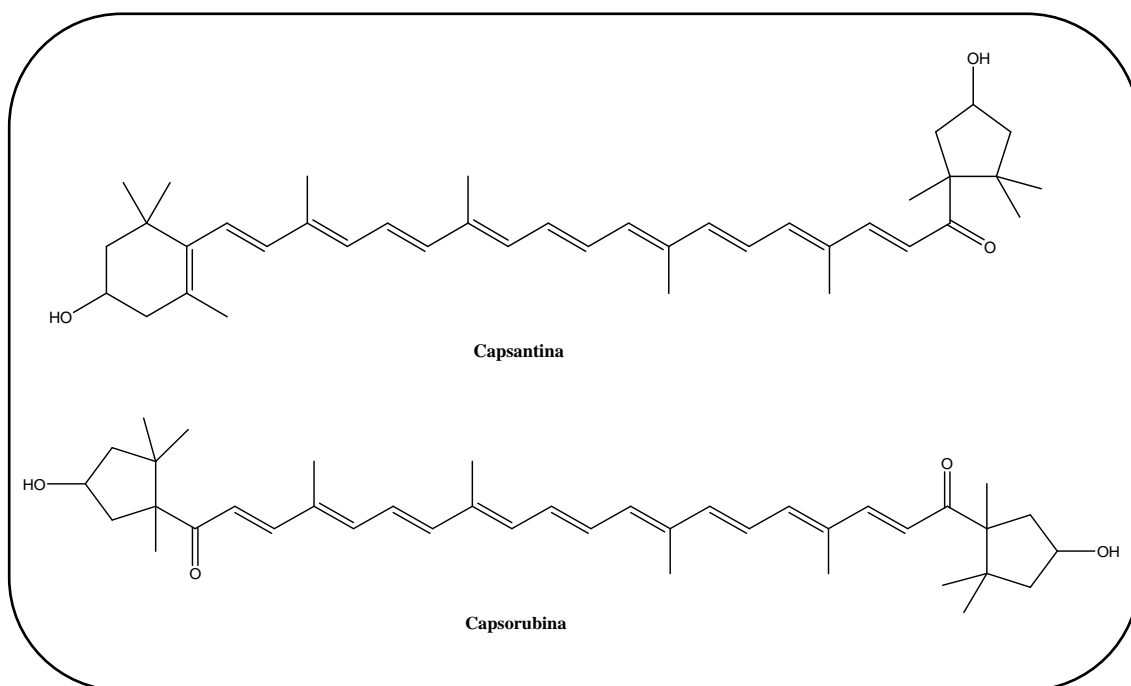
che ha identificato dieci composti, tre dei quali sono risultati nuovi: capsioside A, capsioside B e capsianoside VII.

Altri fenoli identificati in piante del genere *Capsicum* sono: *trans-p*-feruloil- β -D-glucopiranoside, *trans-p*-sinapoil- β -D-glucopiranoside, apigenina 6-C- β -D-glucopiranoside-8-C- α -L-arabinopiranoside, β -D-glucopiranoside, quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranoside-7-*O*- β -D-glucopiranoside, quercetina 3-*O*- α -L-ramnopiranoside, luteolina 7-*O*-[2-(β -D-apiofuranosil)-4-(β -D-glucopiranosil)-6-malonil]- β -D-glucopiranoside, luteolina 6-C- β -D-glucopiranoside-8-C- α -L-arabinopiranoside luteolina 7-*O*-[2-(β -D-apiofuranosil) (Malgorzata et al, 2005).



L'intenso e il caratteristico colore rosso dei frutti del peperoncino è dovuto alla presenza dei carotenoidi, sintetizzati massivamente durante lo stadio di maturazione. Alcuni di essi (capsantina, capsorubina e capsantina 5,6-epossido) appartengono quasi esclusivamente al genere *Capsicum* (Davies et al., 1970).

Tutti i carotenoidi presenti nel peperoncino sono isoprenoidi con 40 atomi di carbonio e contengono nove doppi legami coniugati nella catena centrale, con differenti gruppi finali (β , ϵ , κ , 3-idrossi-5,6-epossido) che cambiano le proprietà



cromofore di ogni pigmento, consentendo loro di essere classificati in due famiglie isocromiche: rossa (R) and gialla (Y). La frazione rossa contiene soprattutto capsantina, capsantina-5,6-epossido e capsorubina (insieme ad altri minori carotenoidi), mentre la frazione gialla comprende il resto dei pigmenti (principalmente zeaxantina, violaxantina, anteraxantina, β -criptoxantina, β -carotene e cucurbitaxantina A). Oltre a questi carotenoidi i peperoncini sono una buona fonte dei carotenoidi ossigenati, che possono variare nella composizione e nella concentrazione a seconda della genetica e del grado di maturazione (Davies et al., 1970).

Riccamente presenti nei peperoncini sono le vitamine (Osuna-Garcia et al., 1998).

Le vitamine sono composti organici essenziali per l'uomo. Esse sono incluse tra quei micronutrienti che devono essere assunti con la dieta, quotidianamente ed in piccole quantità, poiché non vengono sintetizzati dall'organismo umano. Nelle piante del genere *Capsicum* troviamo abbondanti le vitamine A, C ed E (Lee et al., 2007),

ma anche le vitamine D e quelle del gruppo B.

L'acido ascorbico è una sostanza con proprietà antiossidanti nei sistemi biologici che limita i processi degenerativi (Davey et al., 2000).

L'acido ascorbico è la principale forma biologicamente attiva, ma l'acido deidroascorbico è altrettanto importante poiché può essere convertito facilmente in acido ascorbico nel corpo umano. E' importante perciò misurare sia l'acido ascorbico sia l'acido deidroascorbico. I livelli della vitamina C nei frutti di *Capsicum* dipendono da parecchi fattori: il genere, la varietà, le pratiche di produzione, la maturità alla raccolta e gli stati d'immagazzinaggio (Lee et al., 2000; Howard et al., 2002).

La vitamina E è un composto oleoso, insolubile in acqua e solubile nei solventi apolari. E' facilmente degradata dall'ossigeno e dai raggi UV ed è abbastanza resistente al calore. I suoi composti variano da pianta a pianta come detto per

l'acido ascorbico. Sono sintetizzati esclusivamente dagli organismi fotosintetici comprese le più alte piante con importi significativi nei semi (Koch et al., 2003). Considerevoli sono le concentrazioni di vitamine come la K, alcune vitamine del gruppo B, la vitamina A e la D.

Ricca è la presenza di lipidi, acidi grassi semplici e complessi. Ricordiamo, ad esempio, la lecitina (nota anche come fosfatidilcolina) che è una tipologia molto comune di lipide complesso, contenuto abbondantemente nelle membrane cellulari ed endocellulari di organismi vegetali e animali. Essa è una molecola anfipatica, prodotta dalla condensazione di una molecola di ceramide (formata da sfingolo e acido palmitico) con una molecola di fosforilcolina. Il colesterolo presente nelle lipoproteine plasmatiche è spesso esterificato con una molecola di lecitina. Questa molecola è molto abbondante soprattutto nei semi della pianta di peperoncino (Jemal et al., 2000).

2.5 Proprietà biologiche

2.5.1 Proprietà antiossidanti

I principi attivi di origine vegetale mostrano importanti effetti protettivi nei confronti del danno ossidativo provocato dai radicali liberi e, in diverse piante, è stata già identificata un'ampia varietà di composti che presentano una notevole attività antiossidante. I radicali liberi rivestono, infatti, un ruolo importante nell'insorgenza di danni tessutali ed eventi patologici.

La formazione di queste specie reattive può essere innescata nella cellula da diversi fattori come l'assorbimento di energia radiante; molte reazioni enzimatiche a carico di sostanze chimiche esogene o farmaci; metalli di transizione come ferro e rame, che donano o accettano elettroni durante le reazioni intracellulari. I radicali liberi più comuni, le specie reattive dell'ossigeno (i cosiddetti ROS), quali il superossido, l'acqua ossigenata, il radicale idrossile, sono prodotti durante i normali processi metabolici. Le nostre cellule, per

produrre energia, riducono l'ossigeno molecolare ad acqua. Nel corso della respirazione mitocondriale sono inevitabilmente prodotte specie di ossigeno parzialmente ridotte, molto reattive e quindi tossiche.

L'organismo dispone di efficaci meccanismi di difesa contro i livelli fisiologici delle specie attive dell'ossigeno, costituite da accettori fisiologici di queste molecole, detti "scavengers". Tuttavia è possibile che si verifichi uno squilibrio tra la produzione di queste specie reattive e i processi endogeni ed esogeni protettivi. Una condizione di questo tipo è definita "stress ossidativo" e pur non essendo in genere un fattore primitivo di malattia, entra fra i meccanismi di danno cellulare in numerose condizioni patologiche, e contribuisce ad accelerare il processo fisiologico di invecchiamento. E' evidente quindi la necessità di trovare molecole che siano in grado di contrastare le azioni dei radicali liberi, cioè di molecole che agiscano come antiossidanti. I fenoli sono un gruppo importante di metaboliti secondari, che sono sintetizzati dalle piante come conseguenza dell'adattamento agli stati biotici ed abiotici (infezione, ferite, freddo).

Negli ultimi anni i fenoli hanno attratto l'interesse dei ricercatori in quanto potenti antiossidanti in grado di proteggere il corpo umano dai radicali liberi, responsabili di numerose patologie. Studi hanno evidenziato come l'attività antiradicalica dei flavonoidi e principalmente dei composti fenolici sia basata sulle proprietà redox dei loro gruppi idrossilati e dei rapporti strutturali fra le differenti parti della loro struttura chimica (Malgorzata et al., 2005).

Le piante del genere *Capsicum* sono una notevole fonte di antiossidanti (Lee et al., 1995; Matsufuji et al., 1998).

Di questi i più importanti sono: flavonoidi (quercetina, luteolina), acidi fenolici, carotenoidi (carotene, capsantina, zeassantina) e vitamine (vitamina A, acido ascorbico, tocoferoli) (Osuna-Garcia et al., 1998, Howard et al., 2000).

Anche gli alcaloidi capsaicina e diidrocapsaicina mostrano un'interessante attività antiossidante (Materska et al., 2005).

2.5.2 Proprietà antitumorali

La capsaicina ha attratto recentemente un'attenzione considerevole a causa delle sue proprietà protettive contro determinati agenti cancerogeni e mutageni (Surh et al., 1998).

Per esempio, una riduzione del rischio di cancro alla prostata è stata associata ad un maggior consumo di verdure tra cui alcuni peperoni (Ambrosini, et al, 2008).

E' stato segnalato da uno studio condotto da Morré et al. (1995) come un analogo della capsaicina (8-metil-*N*-vanillil-6-nonamide) sia in grado di diminuire lo sviluppo e in alcuni casi provocare apoptosi di differenti tipi di cellule tumorali. Questi risultati sembrano essere consequenziali alla diminuzione dell'attività dell'enzima NADH-ossidasi, enzima che, situata in prossimità della membrana plasmatica favorisce la crescita cellulare.

In un'altra ricerca Kim et al. (1997) hanno valutato come la capsaicina induca apoptosi in cellule tumorali dello stomaco (SNU-1). Sembra che l'attività sia dovuta all'aumento dell'espressione del gene p53 ovvero del cosiddetto gene soppressore di tumore. Ancora si è visto come questa molecola inibisca la proliferazione indotta da VEGF (angiogenesi tumorale), la sintesi del DNA, l'espansione e la formazione delle cellule endoteliali *in vitro* e *in vivo*. Questa attività deriva dalla capacità della capsaicina di bloccare in queste cellule il ciclo cellulare nella fase G₁. Questo sembra a sua volta essere correlato alla "down-regulation" dell'espressione della ciclica D1 che quindi non può più attivare la chinasi ciclica dipendente 4 (CDK4) portando a blocco della crescita cellulare (Min et al., 2004).

I peperoncini sono una ricca fonte di β -carotene, che come è noto ha proprietà antimutageniche e anticarcinogeniche. Laohavechvanicha et al. (2006) hanno dimostrato queste proprietà analizzando come l'attività genotossica dell'uretano su cellule di lievito, batteri e cellule di mammifero, diminuisca in presenza di estratto di peperoncino rosso. In questo studio l'attività antimutagenica è attribuita soprattutto a carotenoidi e anche a capsaicinoidi.

2.5.3 Proprietà antidolorifiche

Il peperoncino è usato nel trattamento di episodi dolorosi, quali le malattie reumatiche, l'emicrania, la neuropatia diabetica dolorosa, la nevralgia del trigemino e nelle artriti, (Bevan et al., 1990).

La capsaicina e i capsaicinoidi sono, infatti, potenti analgesici usati in medicina per attenuare il dolore. Queste molecole agiscono a livello dei nocicettori (neuroni con terminali liberi coinvolti nella genesi e modulazione del dolore), soprattutto a livello dei neuroni sensoriali afferenti, mediante i recettori vanilloidi VR-1 (Buck et al., 1986).

L'esposizione dei nocicettori a capsaicina conduce inizialmente all'eccitazione del neurone, con conseguente percezione di dolore e rilascio locale di mediatori infiammatori. Dopo esposizione prolungata, invece, i terminali di nocicettori diventano insensibili alla capsaicina, così come ad altri mediatori responsabili del dolore. Questo fenomeno di desensibilizzazione dei nocicettori è alla base dell'uso, apparentemente paradossale, di capsaicina come agente analgesico. Questa diminuita sensibilità agli stimoli può derivare da cambiamenti nei nocicettori, ma la perdita della risposta può essere spiegata dalla morte del nocicettore o dalla distruzione dei relativi terminali periferici dopo esposizione a capsaicina. Sembra che la capsaicina eccita i nocicettori aumentando la permeabilità della membrana plasmatica ai cationi, in particolare ioni calcio, che entrano nella cellula dopo stimolazione e apertura del recettore canale VR-1.

Questo recettore sembra essere espresso esclusivamente dai neuroni all'interno del ganglio sensitivo. Questo è inoltre un sensore termico che è attivato fortemente quando le temperature ambientali sono elevate. Per questo motivo la capsaicina provoca la sensazione di bruciore (Caterina et al., 1997).

Si è anche ipotizzato che la capsaicina stimoli il cervello a produrre endorfine, un oppiaceo naturale in grado di agire da analgesico e produrre una sensazione di benessere (Cordell et al., 1993).

2.5.4 Proprietà antitrombotiche e vasodilatatorie

Com'è noto, alti livelli di colesterolo nel sangue sono tra le cause principali di ateromi e trombi (blocco del flusso ematico in un vaso sanguigno). Abbassando il livello di colesterolo si previene questa evenienza (Stamler et al., 1986).

In un recente studio sono stati analizzati gli effetti dell'oleoresina di peperoncino sui maschi di gerbillo (piccoli roditori simili ai criceti). Si è notato come l'oleoresina riduce i livelli di trigliceridi e colesterolo nel sangue del 66% e 70% rispettivamente e si è ipotizzato che ciò è dovuto ad una diminuzione dell'assorbimento intestinale di colesterolo esogeno all'aumento dell'escrezione biliare del colesterolo endogeno (Gupta et al., 2002).

Un altro studio ha evidenziato come il peperoncino rosso abbia effetti anti-aterosclerotici. A questa conclusione sono arrivati Kwon et al. (2003) dopo aver nutrito per 12 settimane alcuni conigli con una dieta ricca in colesterolo (1%) e peperoncino (1%). A termine delle 12 settimane è stata osservata una minore attività della proteina di trasferimento dell'estere del colesterolo (CEPT), rispetto al controllo (conigli alimentati senza peperoncino). Sono risultate, quindi, più basse le concentrazioni ematiche di colesterolo, lipoproteina LDL e VLDL, con conseguente riduzione dei rischi di formazione di ateromi. E' noto, inoltre, che i semi di peperoncino contengono lecitina, che è un emulsionante naturale dei grassi, che mantiene in sospensione il colesterolo nel sangue, impedendo che si depositi sulle arterie.

Causa di danni a carico del sistema cardiovascolare è sicuramente anche l'alto livello di glucosio nel sangue. Tolan et al. (2001) hanno dimostrato in modelli animali come la capsaicina sia responsabile della diminuzione del contenuto di glucosio nel plasma (4.91 mM/dl contro 6.40 mM/dl del controllo) e dell'aumento dei livelli ematici di insulina (5.78 µIU/ml contro 3.70 µIU/ml del controllo).

Altri studi indicano inoltre che i capsaicinoidi inibiscono l'aggregazione delle piastrine. Wang et al. (1984) hanno effettuato una ricerca in cui la capsaicina si è dimostrata potente inibitore dell'aggregazione delle piastrine (IC50 85 µg/ml).

2.5.5 Proprietà battericide e batteriostatiche

Le molecole con attività antimicrobica sono una componente importante delle difese naturali della maggior parte degli organismi viventi contro l'invasione degli agenti patogeni. Alcune piante fin da tempi antichi sono utilizzate come meccanismo di difesa contro una vasta gamma di microorganismi, compresi batteri, protozoi, lieviti, funghi e virus. Un'indagine della Farmacopea Maya ha rivelato che i frutti delle specie di *Capsicum* sono citati come rimedi naturali contro le infezioni dai microbi. Saggiando estratti acquosi riscaldati di peperoncino fresco (genere *annuum*, *baccatum*, *chinense*, *frutescens* e *pubescens*) sono state esaminati i loro possibili effetti antimicrobici su quindici specie batteriche ed una specie del lievito. Sono stati testati anche capsaicina e diidrocapsaicina. I risultati hanno evidenziato diversi gradi di inibizione contro il bacillus *Cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani* e *Streptococcus pyogenes* (Cichewicz et al., 1996). Ancora la capsaicina isolata dai frutti di peperoncino è stata analizzata al fine di valutarne la possibile attività contro *Escherichia coli*, *Pseudomonas solanacearum*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Alte concentrazioni di capsaicina (200 o 300 µg/ml) hanno soltanto ritardato lo sviluppo di *E. coli* e *Pseudomonas solanacearum*, mentre è stato fortemente inibito, alla concentrazione di 25 µg/ml lo sviluppo del *Bacillus subtilis* (Molina-Torres et al., 1996).

2.5.6 Proprietà antiulcera

Il peperoncino rosso è stato usato per secoli come condimento per aiutare la digestione. Tradizionalmente i medici raccomandano ai pazienti con ulcera di

non consumare alimenti piccanti, mentre gli erboristi tendono ad usarli proprio per alleviare le ulcere. Uno studio di Jones et al. (1997) ha indicato che la capsaicina inibisce lo sviluppo *in vitro* dell'*Helicobacter pylori* alla concentrazione di almeno 10 µg/ml influenzando così negativamente sulla genesi dell'ulcera peptica e duodenale.

Inoltre, la capsaicina stimola la formazione di prostaglandine (Uchida et al., 1991) da parte di nervi sensibili alla capsaicina. In questa ricerca si è visto come l'assunzione di 0.1 e 0.5 mg/Kg di capsaicina dopo trattamento con indometacina (FANS), riduceva le possibili lesioni gastriche consequenziali all'uso di agenti antinfiammatori non steroidei. Queste lesioni normalmente sono causate dalla riduzione, mediata dai FANS, della produzione di prostaglandine da parte della mucosa gastrica. Le prostaglandine, infatti, prevengono le lesioni gastriche in quanto fungono da stimolanti della produzione di muco e bicarbonato.

Bibliografia

- Ambrosini GL, De Klerk NH, Fritschi L, Mackerras D, Musk B (2008) Fruit, vegetable, vitamin A intakes, and prostate cancer risk. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 11:61-66
- Andrews J (1995) *Peppers, the Domesticated Capsicums*. UT Press, Austin, Utah
- Dewitt D, Bosland PW (1996) *Peppers of the World: An Identification Guide*. Ten Speed. Press, Berkeley
- Guidi S (1996) *Piante Medicinali*. EDAGRICOLE
- Bevan S, Szolcsányi J (1990) Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends in Pharmacological Sciences* 11:330-333
- Buck SH, Burks TF (1986) The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. *Pharmacological Reviews* 38:179-226
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor-A heat-activated ion-channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824
- Cichewicz RH, Thorpe PA (1996) The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *J Ethnopharmacol* 52:61-70
- Cordell GA, Araujo OE (1993) Capsaicin: identification, nomenclature, and pharmacotherapy. *Annals of Pharmacotherapy* 27:330-336
- Davey MW, Montagu MV, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D, Fletcher J (1970) Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J Sci Food Agric* 80:825-860
- Davies BH, Matthews S, Kirk JTO (1970) The Nature and biosynthesis of the carotenoids of different color varieties of *Capsicum annum*. *Phytochemistry* 9:797-805

- Enciclopedia Agraria Italiana (1962) Ramo Editoriale degli Agricoltori
- Gupta RS, Dixit VP, Dobhal MP (2002) Hypocholesterolaemic Effect of the Oleoresin of *Capsicum annum* L. in Gerbils (*Meriones hurrianae* Jerdon). *Phytother Res* 6:273-275
- Howard LR, Pandjaitan N, Morelock T, Gil MI (2002) Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and growing season. *J. Agric. Food Chem* 50:5891-5891
- Howard LR, Talcott ST, Brenes CH, Villalon B (2000) Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *J Agric Food Chem* 48:1713-1720
- Iorizzi M, Lanzotti V, De Mario S, Zollo F, Blanco-Molina M, Macho A, Munoz E (2001) New glycosides from *Capsicum annum* L. var. *acuminatum*. Isolation, structure determination and biological activity. *J Agric Food Chem* 49:2022-2029
- Jones NL, Shabib S, Sherman PM (1997) Capsaicin as an inhibitor of growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 146:23-227
- Kim JD, Kim JM, Pyo JO, Kim SY, Kim BS, Yu R, Han IS (1997) Capsaicin can alter the expression of tumor forming-related genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean stomach cancer cell line, SNU-1. *Cancer Lett* 120:235-241
- Koch M, Lemke R, Heise KP, Mock HP (2003) Characterization of γ -tocopherol methyltransferases from *Capsicum annum* L. and *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem* 270:84-92
- Jemal F, Zarrouk M, Ghorbal MH (2000) Effect of cadmium on lipid composition of pepper 28:907-910

- Kwon MJ, Song YS, Choi MS, Song YO (2003) Red pepper attenuates cholesteryl ester transfer protein activity and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Clinica Chimica Acta* 332:37-44
- Laohavechvanicha P, Kangsadalampaia K, Tirawanchaib N, Kettermanc AJ (2006) Effect of different Thai traditional processing of various hot chili peppers on urethane-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*: Assessment of the role of glutathione transferase activity. *Food and Chemical Toxicology* 44:1348–1354
- Lee JH, Kiyota N, Ikeda T, Nohara T (2007) Acyclic Diterpene Glycosides, Capsianosides C, D, E, F and III, from the Fruits of Hot Red Pepper *Capsicum annuum* L. Used in Kimchi and Their Revised Structures. *Chem Pharm Bull* 55:1151-1156
- Lee Y, Howard LR, Villalon B (1995) Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*C. annuum*) cultivars. *J Food Sci* 60:473-47
- Malgorzata M, Irene P (2005) Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L.) *J Agric Food Chem* 53:1750-175
- Materska M, Perucka I (2005) Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem* 53:1750-1756
- Matsufuji H, Nakamura H, Chino M, Takeda M (1998) Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *J Agric Food Chem* 46:3468-3472
- Min JK, Han KY, Kim EC, Kim YM, Lee SW, Kim OH, Kim KW, Gho YS, Kwon YG (2004) Capsaicin inhibits *in vitro* and *in vivo* angiogenesis. *Cancer Research* 64:644-651

- Molina-Torres J, García-Chávez A, Ramírez-Chávez E (1999) Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *J Ethnopharmacol* 64:241-248
- Morrè DJ, Chuen PJ, Morre DM (1995) Capsaicin inhibits preferentially the NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1831-1835
- Osuna-Garcia JA, Wall MM, Waddell CA (1998) Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of new Mexican-type chile (*C. annuum* L.) cultivars. *J Agric Food Chem* 46:5093-5096
- Stamler J, WelthWorth D, Necton JD (1986) Is there a relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease and grade? *J Am Med Assoc* 253:2823-2826
- Sukrasno N, Yeoman MM (1993) Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry* 32:839-844
- Sun T, Xu Z, Wu CT, Janes M, Prinyawiwatkul W, No HK (2007) Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *J Food Sci* 72:98-102
- Surh YJ, Lee E, Lee JM (1998) Chemopreventive properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. *Mutat Res* 402:259-267
- Szallasi A, Blumberg PM (1990) Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. *Life Sci* 47:1399-1408
- Szallasi A, Blumberg PM (1999) Vanilloids (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharm. Rev* 31:139-212
- Tolan I, Ragoobirsingh D, Morrison A (2001) The effect of capsaicin on blood glucose, plasma insulin levels and insulin binding in dog models. *Phytotherapy Research* 15(5):391-394

- Uchida M, Yano S, Watanabe K (1991) The role of capsaicin sensitive afferent nerves in protective effect of capsaicin against absolute ethanol-induced gastric lesions in rats. *Jpn J Pharmacol* 55:279-282
- Wachtel RE (1999) Capsaicin Regist *Anest Pain Med* 24:361-363
- Leete E, Loudon MCL (1968) Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *J Am Chem Soc* 90:6837-6841
- Suzuki T, Iwai K (1984) Constituents of red pepper species: chemistry, biochemistry, pharmacology, and food science of the pungent principle of *Capsicum* species. In *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. Brossi A, Ed. Academic Press: New York 227-299
- Wang JP, Hsu MF, Teng CM (1984) Antiplatelet effect of capsaicin. *Thrombosis Research* 36:497-507

Capitolo 3

Radicali liberi e antiossidanti

Nella seconda metà del secolo scorso, in Italia, come negli altri stati industrializzati, sono avvenuti profondi cambiamenti che hanno portato all'abbandono dei moderati e tradizionali costumi di vita e delle più frugali abitudini alimentari mediterranee.

La progressiva diffusione del benessere e la scomparsa delle manifestazioni carenziali hanno portato a un miglioramento dello stato generale di nutrizione della popolazione, ma, allo stesso tempo, si è anche verificato un eccessivo e/o squilibrato consumo di alimenti con l'insorgenza di situazioni di rischio per la salute. In particolare, le modificazioni dietetiche hanno portato a una minore introduzione di proteine e di grassi di origine vegetale, e a un incremento di grassi e proteine di origine animale (Binetti et al., 2011).

Il consumo di frutta e verdura fornisce ottimi benefici per la salute, perché sono fonte d'importanti sostanze fitochimiche, buone per ridurre il rischio di malattie.

Studi epidemiologici hanno dimostrato che determinati schemi alimentari sono significativamente associati con la prevenzione di numerose malattie croniche.

I processi metabolici endogeni, specialmente nelle infiammazioni croniche, sono fonte di radicali liberi, molecole in grado di reagire e danneggiare le biomolecole, quali i lipidi, le proteine, i carboidrati e il DNA.

L'organismo dispone di efficaci meccanismi di difesa contro i livelli fisiologici delle specie reattive dell'ossigeno, detti scavengers, costituiti da accettori fisiologici di queste molecole. Tuttavia è possibile che si verifichi uno squilibrio tra la produzione di queste specie reattive e i processi protettivi endogeni ed esogeni. Una condizione di questo tipo è definita "stress ossidativo" che, pur non essendo in genere un fattore primitivo di malattia, entra fra i meccanismi di danno cellulare in numerose condizioni patologiche e contribuisce ad accelerare

il processo fisiologico d'invecchiamento. La formazione di composti radicalici può essere innescata nella cellula da diversi fattori: assorbimento di energia radiante, reazioni enzimatiche a carico di sostanze chimiche esogene o farmaci, metalli di transizione come ferro e rame che donano o accettano elettroni durante le reazioni intracellulari.

Un aumento di antiossidanti nella dieta può essere una strategia per prevenire una serie di condizioni croniche, come il processo d'iniziazione da parte di cellule tumorali.

In diverse piante alimentari è stata già identificata un'ampia varietà di composti che presentano una notevole attività antiossidante.

Molte ricerche scientifiche sono focalizzate sull'esplorazione di composti antiossidanti sicuri ed efficaci. Estratti di piante, da cui derivano i composti antiossidanti, potenziano le difese dell'organismo e agiscono come antiossidanti di scelta per la loro sicurezza rispetto a quelli sintetici. Pertanto, negli ultimi anni, notevole attenzione è stata rivolta all'identificazione di composti con potere antiossidanti naturalmente presenti in alimenti di uso quotidiano.

E' evidente, quindi, la necessità di trovare molecole che siano in grado di contrastare l'azione dei radicali liberi, cioè di molecole che agiscano come antiossidanti.

3.1 Radicali liberi: generalità e definizioni

Le specie chimiche reattive sono agenti di varia natura accomunati dalla capacità di ossidare, cioè sottrarre uno o più equivalenti riducenti (elettroni o atomi d'idrogeno) a un gran numero di atomi o molecole organiche (Malatesta & Cenini, 1986).

Alla capacità ossidante, più o meno spiccata a seconda delle varie specie chimiche, si riconduce l'attitudine degli agenti in questione a indurre un danno - detto, appunto, ossidativo - a carico di componenti strutturali e/o funzionali degli organismi viventi. A seconda dell'atomo responsabile della loro reattività, le

specie chimiche reattive possono essere classificate in specie reattive dell'ossigeno, specie reattive dell'azoto e specie reattive del carbonio. Queste, a loro volta, possono essere distinte in forme radicaliche o non radicaliche (Iorio, 2006).

Per radicale libero s'intende una specie chimica, capace di esistenza indipendente, contenente un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno. Tali molecole sono instabili e altamente reattive in quanto tendono a sottrarre ad altre molecole un elettrone per raggiungere una stato di inerzia chimica (Valko et al., 2007).

Le specie chimiche reattive, in particolar modo i radicali liberi, possono essere generate attraverso due meccanismi generali, enzimatici o non enzimatici (Karlsson, 1997).

Una volta formati i radicali, essi possono dar luogo a una serie di reazioni a catena, nel corso delle quali il sito radicalico può essere trasferito o, eventualmente, inattivato (Wa,1986; Tannini, 1990).

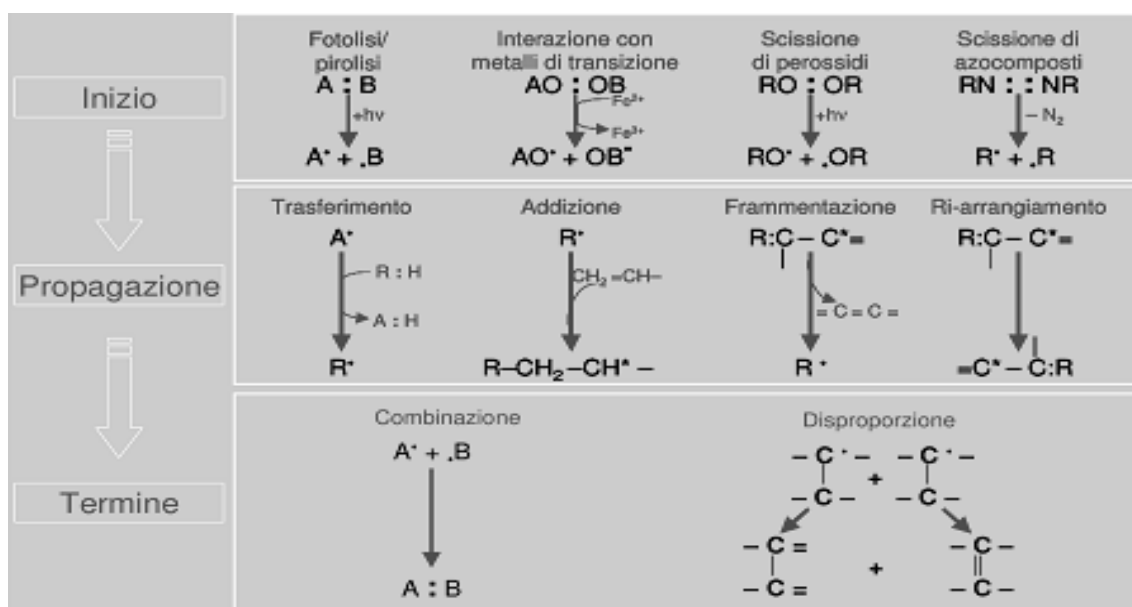


Figura 3.1 Schema delle reazioni radicaliche a catena

Fase 1

I principali meccanismi attraverso cui si generano i radicali liberi (step 1, reazione di inizio) sono la scissione omolitica e l'interazione con i metalli di transizione (Tannini,1990).

Con il termine scissione omolitica s'intende la divisione di una molecola a livello di uno dei suoi legami covalenti per effetto della somministrazione di energia con generazione di due nuove specie chimiche, ciascuna con un elettrone spaiato, elemento distintivo dei radicali liberi (Fehèr et al., 1985).



Figura 3.2 Scissione omolitica

Oltre che per scissione omolitica, i radicali liberi possono essere prodotti in seguito all'interazione di particolari molecole con alcuni metalli di transizione.

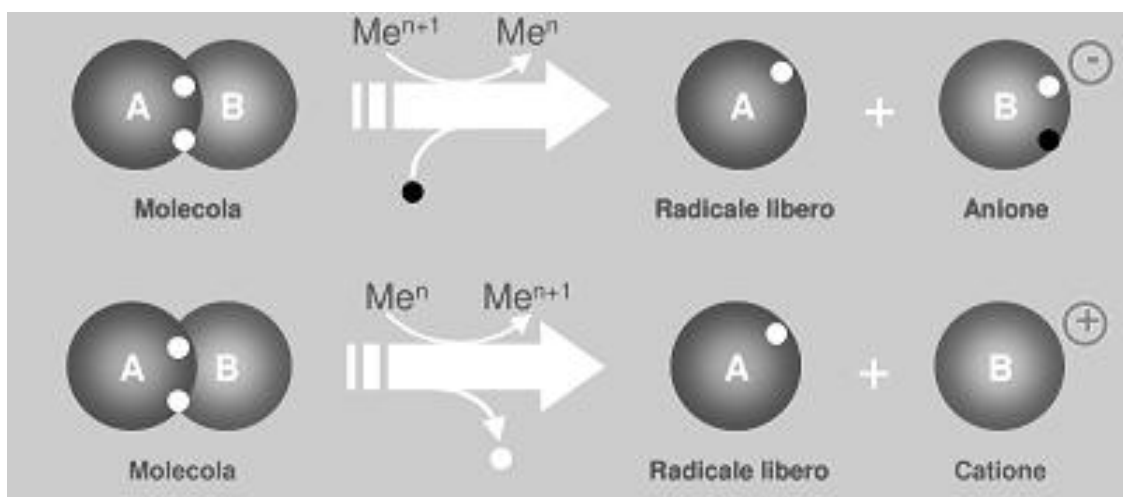


Figura 3.3 Interazione con i metalli di transizione

Nell'interazione con i metalli di transizione, l'elettrone generato dall'ossidazione di un metallo di transizione in forma ionica (es. da Fe^{2+} a Fe^{3+} , o da Cu^+ a Cu^{2+}) spezza un legame covalente di una molecola bersaglio, generando così un

radicale libero e un anione. Alternativamente, l'elettrone richiesto per ridurre un metallo di transizione in forma ionica (da Fe^{3+} a Fe^{2+} o da Cu^{2+} a Cu^+) viene estratto dal legame covalente di una molecola bersaglio, che si decompone in un radicale libero ed un catione (Albertini et al.,2000; Halliwell et al.,1986; Halliwell & Gutteridge,1990; Hocstein et al.,1980; Paoletti et al.,1994).

Fase 2

Una volta innescata, una reazione radicalica a catena tende a propagarsi. Si distinguono quattro meccanismi fondamentali di propagazione delle reazioni radicaliche: *trasferimento*, *addizione*, *frammentazione* e *riarrangiamento*. Tra questi, il più comune nell'ambito delle reazioni radicaliche è il *trasferimento*. In tale modalità, il radicale libero, generato da una delle precedenti reazioni di inizio, attacca una molecola sottraendo ad essa uno dei suoi atomi (generalmente un atomo di idrogeno). Il risultato finale è la formazione di una nuova specie reattiva e, in pratica, il trasferimento del sito radicalico.

Fase 3

Infine, una reazione radicalica a catena può arrestarsi o per *combinazione* o per *disproporzionazione*. Nella *combinazione*, che è la reazione inversa della scissione omolitica, due radicali liberi reagiscono tra loro dando luogo a una molecola non più reattiva.



Figura 3.4 Reazione di combinazione

Il primo radicale agisce come ossidante, mentre il secondo si comporta come un generico antiossidante. Questo meccanismo viene sfruttato per bloccare una reazione radicalica e in generale, un qualsiasi processo radicalico a catena, sia

esso industriale o biologico, può essere interrotto grazie all'intervento di agenti denominati antiossidanti.

3.2 Stress ossidativi e specie reattive all'ossigeno (ROS)

La maggior parte delle patologie e l'invecchiamento degli esseri viventi sono causati da processi chimici ossidativi, dovuti a un'eccessiva produzione di radicali liberi. La presenza dei radicali liberi in organismi viventi ha normalmente conseguenze negative, come il danneggiamento diretto o indiretto del DNA cellulare, la modificazione strutturale di proteine e lipidi (Valko et al., 2006).

In condizioni normali il potenziale tossico dei radicali liberi è neutralizzato da un complesso sistema di fattori antiossidanti che rappresenta il meccanismo fisiologico di difesa: il rapporto tra fattori ossidanti e difese antiossidanti rappresenta il cosiddetto "bilancio ossidativo". Lo stress ossidativo è, pertanto, l'espressione biologica di un danno che si verifica quando i fattori pro-ossidanti (farmaci, sostanze tossiche, radiazioni, stati infiammatori, attività fisica esacerbata, etc.) superano le difese antiossidanti endogene (enzimi come la superossido dismutasi, il coenzima Q10, la catalasi, la perossidasi, etc.) ed esogene (antiossidanti, presenti per esempio negli alimenti).

Si può incorrere in stress ossidativo sia in condizioni normali di salute sia negli stati patologici. Nell'ambito dei danni cellulari causati dalle specie reattive dell'ossigeno, quello al DNA è potenzialmente il più pericoloso poiché tali alterazioni sono spesso associate a mutazioni genetiche e allo sviluppo di cancro. E' emerso inoltre un legame sempre più evidente tra alterazioni al DNA ROS-mediate e il processo d'invecchiamento, la patogenesi del diabete mellito e di alcune malattie a carico del fegato (Urso et al., 2003).

Oggi si sta dedicando sempre maggiore attenzione alla comprensione dei fattori che sono alla base del processo d'invecchiamento cellulare, che potrebbero aiutare a comprendere le patologie involutive e degenerative che si possono

manifestare in età avanzata a carico di diversi organi e apparati (Govoni et al., 2001).

Recentemente, si è osservato un crescente interesse nel capire il ruolo che lo stress ossidativo svolge nella patogenesi dei disordini neurologici. Vi è una marcata evidenza che i radicali liberi sono implicati nello sviluppo della malattia da ischemia-riperfusion, della malattia di Parkinson, della Sclerosi Laterale Amiotrofica, della sindrome di Down e della malattia di Alzheimer (Markesbery, 1996).

Negli organismi viventi le specie chimiche reattive, e in particolare, le specie reattive all'ossigeno, sono generate nel corso della normale attività metabolica cellulare; alcuni agenti esogeni, quali il fumo, le radiazioni ionizzanti e gli antibiotici, o una dieta sbilanciata, possono tuttavia incrementarne la produzione (Pryor, 1973).

In condizioni fisiologiche, l'1-2% di O₂ molecolare consumato dalle cellule animali è convertito a ROS attraverso la perdita di elettroni dalla catena di trasporto mitocondriale. Per questo motivo, i mitocondri rappresentano una fonte primaria di ROS endogene (McCord, 2000; Mancuso et al., 2006).

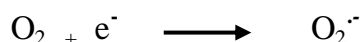
L'ossigeno è per gli uomini un elemento indispensabile, senza il quale non potrebbero sopravvivere, ma anche un nemico da cui difendersi, tanto che gli organismi aerobi hanno dovuto sviluppare difese antiossidanti per proteggersi dal 21% d'ossigeno che compone l'atmosfera. Le specie altamente reattive e ossidanti, che si generano *in vivo*, prendono il nome di ROS (reactive oxygen species).

L'ossigeno si trova in natura sotto forma di molecole biatomiche che presentano due elettroni spaiati con spin paralleli sistemati sugli ultimi due orbitali. Il fatto di possedere elettroni disaccoppiati lo rende particolarmente reattivo. Esso, tuttavia, pur favorendo i fenomeni ossidativi, non possiede un elevato potere ossidante, cioè non strappa facilmente un elettrone da un substrato. Questa è la ragione per cui nell'ossidazione di biomolecole, per il trasferimento di un elettrone dalla sostanza biologica all'ossigeno, devono intervenire dei trasferitori

di elettroni, che in genere sono degli ioni di metalli di transizione nel loro stato di ossidazione più basso o degli enzimi, che contengono ioni metallici nel loro sito attivo.

Nelle prime fasi di reazione, si formano inevitabilmente forme parzialmente ridotte dell'ossigeno: lo ione superossido ($O_2^{\cdot -}$), che è immediatamente protonato a perossido d'idrogeno (H_2O_2), il radicale idrossilico (OH^{\cdot}) e infine lo ione idrossile (OH^-) che è trasformato in acqua dall'aggiunta di un protone. I tre intermedi, in particolare il radicale OH^{\cdot} , sono molto reattivi e per tale motivo sono indicati come specie reattive dell'ossigeno (ROS). Un'ulteriore specie molto dannosa è l'ossigeno singoletto (O_2^{\cdot}).

Quindi partendo da una molecola di ossigeno e aggiungendo un elettrone nell'orbitale esterno, otteniamo il radicale superossido che è il primo prodotto della riduzione univalente dell'ossigeno.



Esso può essere prodotto accidentalmente, a livello della catena di trasferimento elettronico mitocondriale e microsomiale, per trasferimento di un elettrone dai trasportatori di elettroni direttamente all'ossigeno, che quindi viene ridotto a radicale superossido. Il radicale superossido pur essendo citotossico può causare un danno limitato nelle nostre cellule poiché non è in grado di attraversare la membrana mitocondriale, perché bloccato dalla carica negativa; può essere inoltre inattivato dall'enzima protettivo *superossido dismutasi* (SOD) (Halliwell & Gutteridge, 1990)

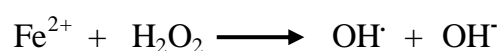
che lo converte a perossido di idrogeno attraverso una reazione nella quale una molecola di superossido si ossida diventando ossigeno e l'altra molecola di superossido si riduce e si protona diventando acqua ossigenata.



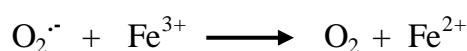
Il radicale superossido reagisce con proteine, lipidi, polisaccaridi e acidi nucleici, ma la sua reattività è piuttosto bassa, tanto che non rappresenta una sostanza eccessivamente tossica per l'organismo. La sua azione tossica dipende in larga misura dalla produzione di acqua ossigenata e dall'interazione con essa.

Il perossido d'idrogeno (H_2O_2) non è un radicale perché non contiene elettroni spaiati e reagisce lentamente, tuttavia, esso è sempre un agente potenzialmente pericoloso in quanto:

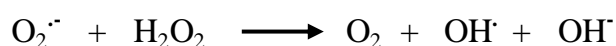
- a) attraversa facilmente le membrane cellulari diffondendosi tra i diversi compartimenti cellulari;
- b) può interagire con i complessi di alcuni ioni metallici di transizione nella forma ridotta come il Fe^{2+} che lo decompongono nel radicale idrossilico molto reattivo e nello ione idrossilico secondo la seguente reazione (reazione di Fenton):



- c) Poiché la maggior parte del ferro cellulare libero è presente allo stato ferrico Fe^{3+} , questo deve essere ridotto allo stato ferroso (Fe^{2+}) prima di partecipare alla reazione e questo può avvenire per azione del superossido:



Combinando le due equazioni si ottiene la reazione di Haber-Weiss, in cui il perossido d'idrogeno è ridotto dal superossido, in presenza di quantità catalitiche di ioni metallici (Nohl et al.,1981)



Il radicale ossidrilico (OH^\cdot) generato nelle reazioni è, fra i radicali dell'ossigeno, la molecola più tossica perché altamente reattiva e priva di ogni meccanismo di inattivazione endogena. Costituisce l'agente responsabile della fase iniziale dei processi perossidativi che avvengono a livello dei tessuti dell'organismo ed è in grado di danneggiare tutte le macromolecole cellulari: proteine, acidi nucleici, glicosaminoglicani e gli acidi grassi poliinsaturi dei fosfolipidi di membrana (Zhang et al., 2006).

Un'altra forma reattiva dell'ossigeno che però non è un radicale è l'ossigeno singoletto O_2^\cdot . Questo è uno stato eccitato dell'ossigeno molecolare che si forma quando sufficiente energia è assorbita dalla molecola di ossigeno in modo da attuare un'inversione di spin di uno degli elettroni spaiati accompagnata da uno spostamento in un diverso orbitale. Esso è in grado di reagire con parecchie classi di composti, molte delle quali sono d'interesse biologico. L'ossigeno singoletto danneggia i polipeptidi e le proteine, poiché ossida soprattutto i residui di metionina, triptofano, istidina e cisteina, può attaccare i doppi legami dei caroteni, delle clorofille e degli acidi grassi insaturi, ed è in grado di ossidare le basi puriniche e pirimidiniche provocando quindi danni anche al DNA.

Nei sistemi biologici, l'ossigeno singoletto può formarsi per dismutazione spontanea del superossido radicale oppure per interazione di quest'ultimo con il radicale idrossilico o con l'acqua ossigenata. La tossicità del superossido radicale deve quindi anche essere riferita alla possibilità di agire da precursore di ossigeno singoletto.

3.3 Antiossidanti

L'organismo combatte lo stress ossidativo utilizzando una serie di sistemi che limitano il potenziale danno causato dalle specie reattive dell'ossigeno.

Con il termine antiossidante ci si riferisce a "qualsiasi sostanza che, presente in bassa concentrazione rispetto a un substrato ossidabile, è in grado di rallentare o inibire l'ossidazione di quel substrato" (Laguerre et al., 2007).

In questo modo substrati ossidabili come lipidi, proteine e DNA sono protetti dall'ossidazione e rimangono inalterati (Antolovich et al., 2002).

Il complesso sistema antiossidante che l'organismo umano ha sviluppato per proteggere le cellule dalle specie reattive dell'ossigeno coinvolge componenti endogeni ed esogeni che funzionano sinergicamente per neutralizzare i radicali liberi.

Gli antiossidanti possono essere classificati in funzione del loro meccanismo d'azione. Essi, infatti, possono bloccare la fase d'iniziazione, inibendo enzimi pro-ossidanti che producono radicali o chelando ioni di metalli di transizione che catalizzano la formazione di radicali, oppure possono agire nella fase di propagazione della reazione a catena neutralizzando i radicali che si formano in questo stadio (Zhang et al., 2006).

Tra i componenti endogeni possiamo includere alcuni enzimatici quali la *superossido dismutasi*, la *catalasi*, la *glutazione perossidasi*, o non enzimatici quali il *glutazione*, in grado di catalizzare reazioni di inattivazione di radicali liberi.

Tra gli agenti esogeni, invece, possiamo includere gli antiossidanti assunti con la dieta quali l'acido ascorbico, la vitamina E, i carotenoidi, i polifenoli e altri composti a basso peso molecolare (Giovannini et al., 2006).

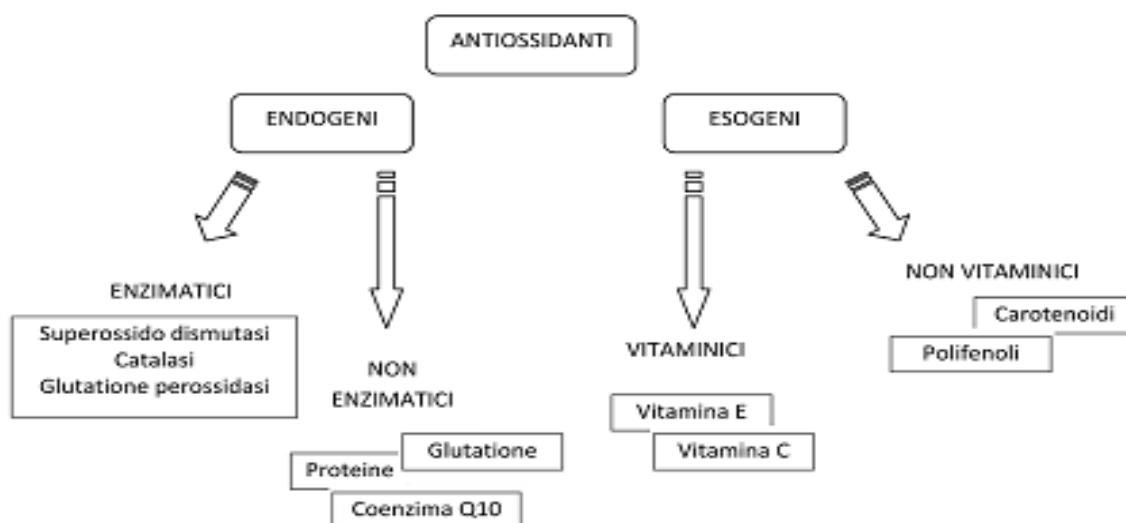


Figura 3.5 Classificazione degli antiossidanti

3.3.1 Antiossidanti endogeni

Enzimi antiossidanti, come la *superossido dismutasi* (SOD) e la *catalasi*, convertono le specie reattive all'ossigeno in composti meno dannosi. Questi enzimi, nel loro complesso rappresentano una prima linea di difesa che ha un'enorme importanza nel limitare i danni prodotti dalle ROS, sia a carico dei fosfolipidi di membrana sia delle macromolecole biologiche. Questi stessi enzimi, però, nello svolgere la loro azione protettiva, non garantiscono una completa copertura dal danno, perché alcuni composti generati dall'interazione con le ROS sono altamente reattivi. Quindi, è necessaria una seconda azione di detossificazione di tali prodotti per impedire ulteriori danni intracellulari. Questa seconda linea di difesa è rappresentata da enzimi come la *glutazione perossidasi* (GPx), la *glutazione S-transferasi* (GST), l'*aldo- chetoreduccasi* e l'*aldeide deidrogenasi*.

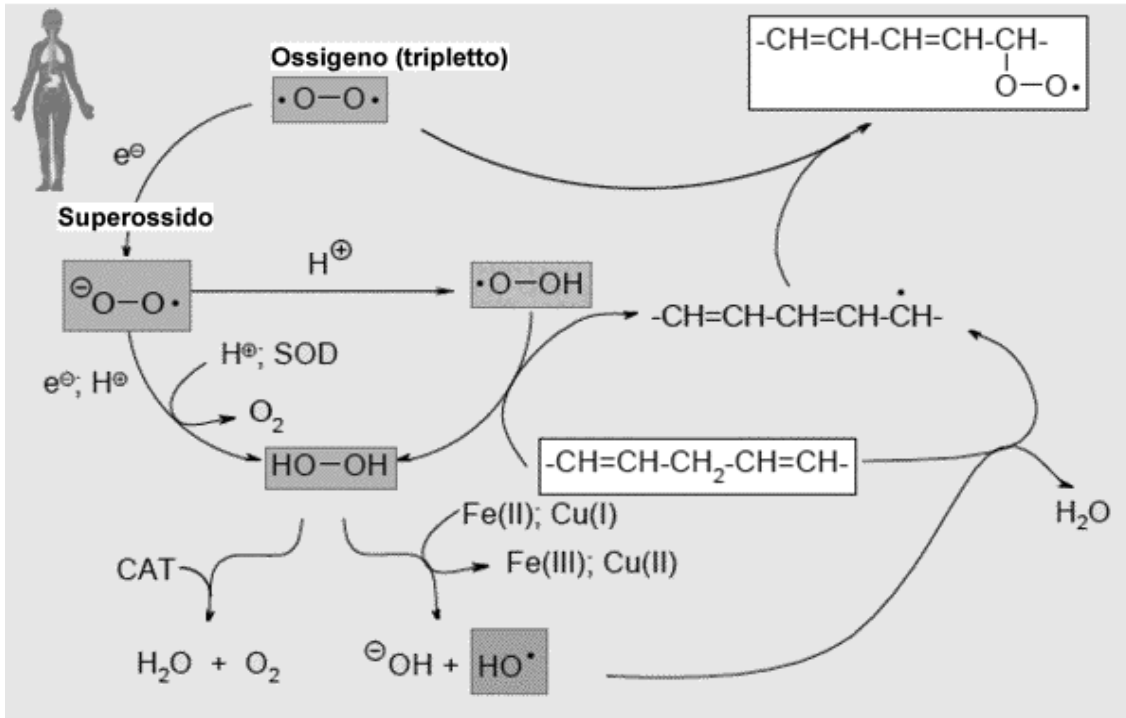


Figura 3.6 Azione della superossido dismutasi (SOD) e della catalasi (CAT)

Il *glutathione*, coinvolto in entrambe le linee di difesa contro le ROS, riveste un ruolo centrale (Giovannini et al., 2006).

La *superossido dismutasi* (SOD) è un enzima appartenente alla famiglia delle metalloproteine la cui funzione è quella di convertire lo ione superossido ($O_2^{\cdot-}$) in ossigeno molecolare (O_2) e perossido d'idrogeno (H_2O_2). La SOD è presente in diverse isoforme, identificabili in base agli ioni presenti nel sito attivo (rame, ferro o manganese), alla composizione amminoacidica e alla distribuzione negli organismi. Nell'uomo sono presenti tre isoforme di SOD: la SOD1 è distribuita nel citoplasma, la SOD2 nei mitocondri, mentre la SOD3 è localizzata a livello extracellulare (Rahman, 2007).

Negli organismi aerobi, sono presenti due famiglie di enzimi capaci di degradare il H_2O_2 , le catalasi e la glutathione perossidasi.

Le *catalasi* (CAT) sono metalloproteine, localizzate a livello dei perossisomi delle cellule eucariotiche, il cui gruppo prostetico, la parte non proteica dell'enzima, è rappresentato dal ferro (Izawa et al., 1997).

Questi enzimi hanno la capacità di proteggere i tessuti dai perossidi; la reazione catalizzata dalle catalasi è la decomposizione del H_2O_2 ad H_2O ed O_2 molecolare (Valko et al., 2006).

Le CAT hanno un'alta velocità di turn-over: una molecola può convertire, ogni minuto, approssimativamente sei milioni di molecole di H_2O_2 ad H_2O e O_2 (Rahman, 2007).

Quando, però, i livelli di perossido d'idrogeno sono troppo bassi per attivare le catalasi, la decomposizione delle specie reattive all'ossigeno avviene per attivazione della *glutathione perossidasi* (Iorio, 2006),

enzima presente in due diverse forme, una selenio-dipendente (GPx), l'altra selenio indipendente (glutathione-S-tranferasi, GST). Le differenze sono dovute al numero di subunità, ai meccanismi catalitici e al legame del selenio nel centro attivo (Valko et al., 2006; Rahman, 2007).

Nell'organismo umano sono presenti quattro tipi differenti di GPx, le quali hanno la funzione di ridurre i perossidi. La GPx agisce in associazione con il

glutathione, una molecola presente ad alte concentrazioni nelle cellule, costituito da acido γ -glutammico, cisteina e glicina, che può esistere in una forma ridotta (GSH) oppure in una forma dimerica, ossidata (GS-SG). L'interconversione dall'una all'altra forma, resa possibile grazie al gruppo tiolico della cisteina, è sfruttata dalle GPx per catalizzare reazioni di ossido-riduzione finalizzate all'inattivazione del perossido d'idrogeno o di altri perossidi (Gibson et al., 1985). La GPx utilizza come substrato il H_2O_2 o un perossido organico (ROOH) e catalizza la conversione dei perossidi ad acqua o alcol e, simultaneamente, reagendo con il H_2O_2 , ossida il glutathione (Valko et al., 2006; Rahman, 2007). Il tripeptide γ -glutamilcisteinglicina o glutathione (GSH) è il regolatore non enzimatico più importante dell'omeostasi redox intracellulare ed è presente ubiquitariamente in tutti i tipi di cellule a concentrazioni millimolari (Meister & Anderson, 1983).

Questo tripeptide (Figura 3.7), contenente cisteina, esiste sia in forma ridotta (GSH) che in forma ossidata (GSSG), meglio indicata come glutathione bisolfuro, e prende parte alle reazioni redox grazie all'ossidazione reversibile dei suoi gruppi tiolici attivi (Kalyanaraman et al., 1996; Brivida et al., 1999)

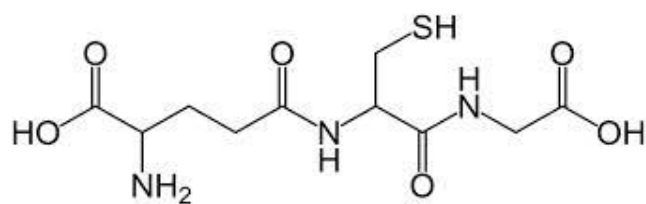


Figura 3.7 Formula di struttura del glutathione

Il *glutathione* è il regolatore non enzimatico più importante dell'omeostasi redox intracellulare ed è presente ubiquitariamente in tutti i tipi di cellule a concentrazioni millimolari. Nella cellula, in condizioni redox normali, la maggior parte del GSH è in forma ridotta ed è distribuito nel nucleo, nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri. Oltre che in forma libera, il GSH, mediante un

processo chiamato glutationilazione, può anche essere legato covalentemente a proteine, regolandone la funzione o fungendo da coenzima in sistemi enzimatici antiossidanti. Il GSH può quindi agire direttamente da scavenger (spazzino) di radicali liberi, oppure da substrato per le glutatione perossidasi (GPxs) e glutatione S-transferasi (GSTs), durante i processi di detossificazione del perossido di idrogeno, di idroperossidi lipidici e di composti elettrofili (Giovannini et al., 2006).

3.3.2 Antiossidanti esogeni

Negli alimenti di origine vegetale sono naturalmente presenti alcuni composti bioattivi, cioè composti che al di là del valore nutrizionale, sono dotati di attività biologica che si esplica nel ridurre il rischio di sviluppo di numerose malattie croniche. Essi svolgono, quindi, una fondamentale azione protettiva sulla nostra salute. All'interno di questo gruppo di composti si inseriscono gli antiossidanti naturali, ampiamente presenti in alimenti quali la frutta e i vegetali in genere. Essi ricadono essenzialmente in tre grandi gruppi di sostanze: le vitamine, i composti polifenolici e i carotenoidi (Halliwell, 1996).

Tra gli antiossidanti vitaminici, i più efficienti sono la *vitamina C* (acido ascorbico) e la *vitamina E*. Essi svolgono fondamentalmente la stessa funzione, la prima in ambiente acquoso, la seconda in ambiente lipofilo.

La *vitamina C* è una vitamina idrosolubile la cui attività antiossidante, *in vivo*, dipende dall'alternanza tra la sua forma ridotta (acido ascorbico) e quella ossidata (acido deidroascorbico). Essa è in grado di agire come scavenger (spazzino) nei confronti dei radicali superossido ed idrossilico e di intrappolare i radicali idroperossilici nella fase acquosa prima che diffondano nei lipidi della membrana plasmatica, prevenendo la lipoperossidazione.

Il nome chimico, acido ascorbico, è dovuto alla capacità della vitamina C di curare lo scorbuto, una malattia mortale che colpiva soprattutto gli equipaggi

delle navi, costretti a rimanere a lungo in mare senza potersi approvvigionare di alimenti vegetali freschi.

Inoltre, la vitamina C è anche in grado di rigenerare la forma non radicalica della vitamina E dopo che questa ha agito con un radicale libero (Kalyanarman et al., 1992; Wefers & Sies, 1988).

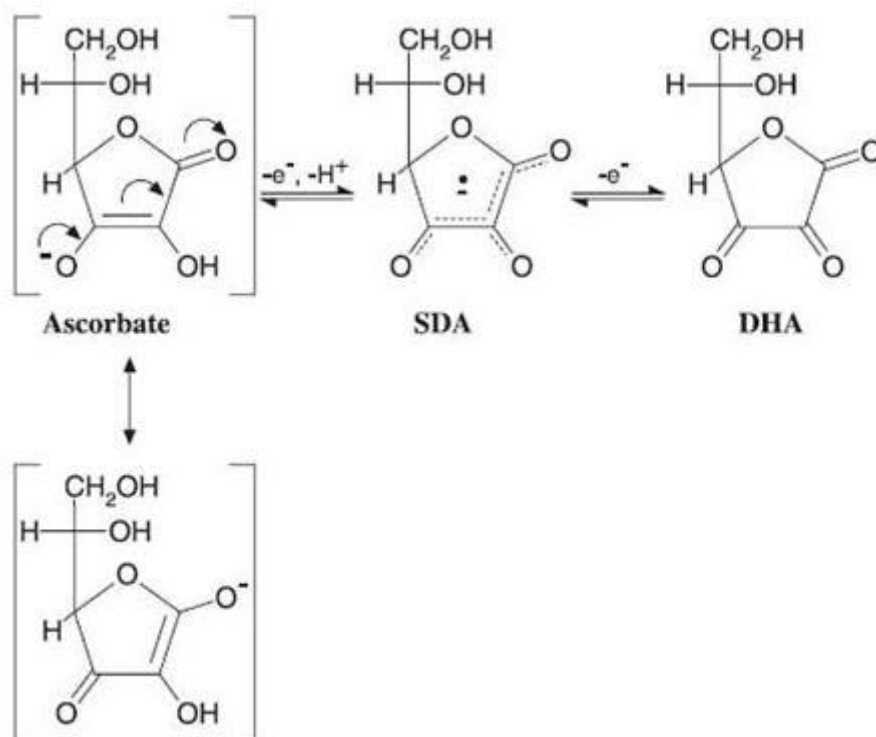


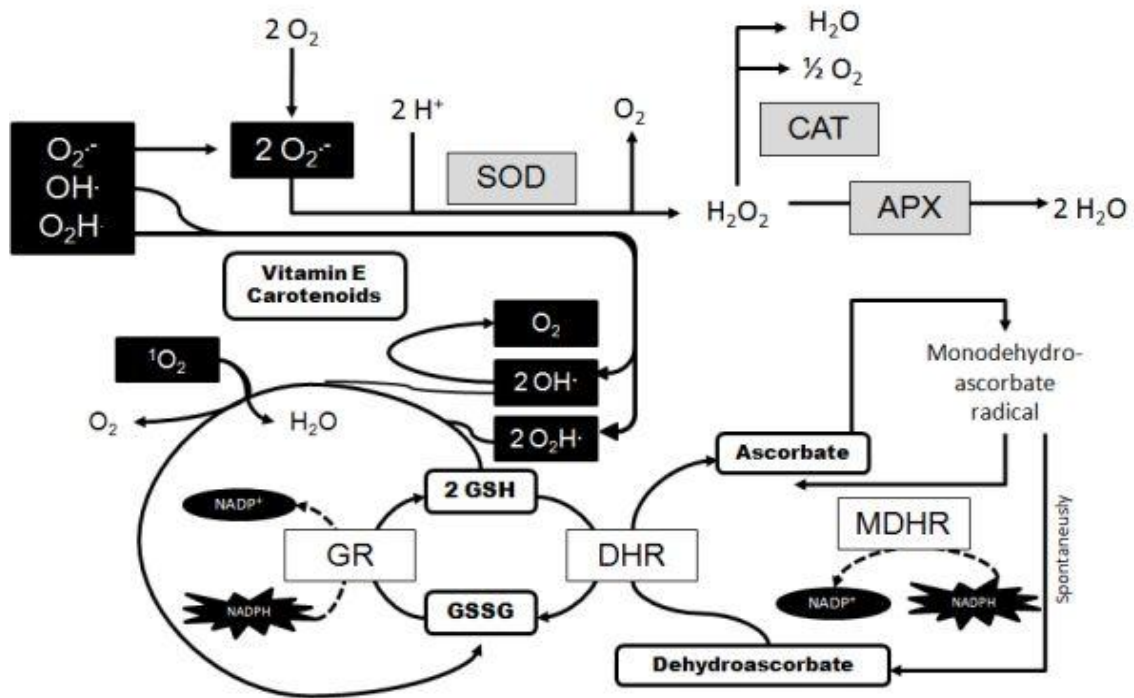
Figura 3.8 Acido ascorbico/acido deidroascorbico

La vitamina C può sequestrare direttamente O_2^- , OH^\cdot , O_2 ; e ridurre H_2O_2 ad H_2O nella reazione dell'ascorbato per ossidasi (APX) (Li,1999):



dove DAH è l'acido deidroascorbico.

Figura 3.9 Enzimi endogeni con antiossidanti esogeni



La *vitamina E* è un potente antiossidante liposolubile e nell'uomo è presente in differenti forme delle quali la più attiva è l' α -tocoferolo (Valko et al., 2006)

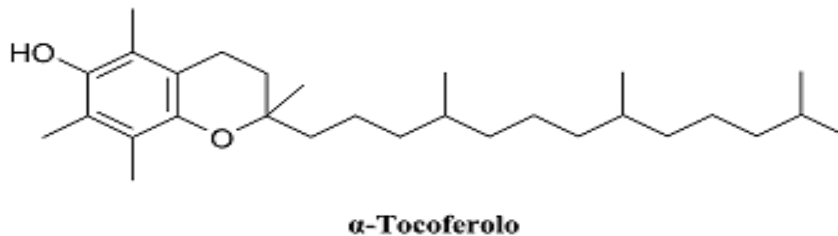


Figura 3.10 Forma più attiva della vitamina E

Ha un ruolo importante nella prevenzione dell'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, che rappresenta l'evento chiave nello sviluppo del processo di perossidazione lipidica. Tale evento, scatenato dall'azione di radicali liberi, si sviluppa attraverso delle reazioni a catena che continuano il processo. La vitamina E è in grado di bloccare questo fenomeno donando un atomo di idrogeno con un elettrone ai radicali perossilipidici, rendendoli in tal modo meno

reattivi e bloccando di fatto la perossidazione lipidica. Tale reazione redox trasforma la vitamina E in un radicale α -tocoferossilico che è piuttosto stabile e che può reagire con la vitamina C o con il glutatione per riformare l' α -tocoferolo.

Poiché lo sviluppo della perossidazione lipidica può determinare profonde alterazioni delle membrane cellulari, si comprende il motivo per cui alla vitamina E è riconosciuto un ruolo importante nel mantenere tali strutture indenni (Valko et al., 2006).

Altri importantissimi composti per la loro azione antiossidante sono i *polifenoli*. I *fenoli* sono un gruppo importante di metaboliti secondari, sintetizzati dalle piante come conseguenza dell'adattamento agli stati biotici e abiotici. Negli ultimi anni i fenoli hanno attirato l'interesse dei ricercatori in quanto potenti antiossidanti in grado di proteggere il corpo umano dai radicali liberi, responsabili di numerose patologie. Diversi studi hanno evidenziato come l'attività antiradicalica di composti fenolici come i flavonoidi sia basata sulle proprietà redox dei gruppi idrossilati e sui rapporti strutturali fra le differenti parti della loro struttura chimica (Materska & Perucka, 2005).

I *polifenoli* sono i più abbondanti antiossidanti nella nostra dieta e sono presenti in frutta, vegetali, cereali, olive, legumi secchi, cioccolato e bevande, come tè, caffè e vino. Nonostante la loro ampia distribuzione, gli studi sugli effetti dei polifenoli sono cominciati solamente negli ultimi anni.

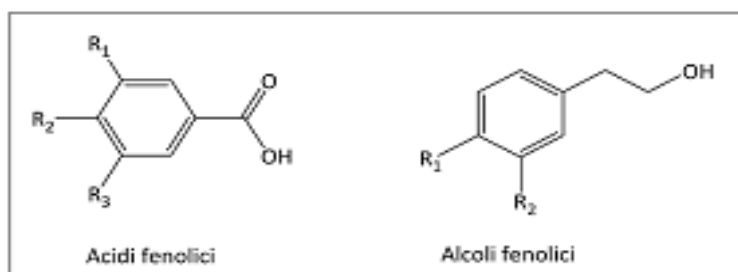


Figura 3.11 Formula di struttura di acidi e alcoli fenolici

La classica struttura polifenolica è caratterizzata da diversi gruppi ossidrilici su anelli aromatici, ma possono essere considerati polifenoli anche molecole con un solo anello fenolico, come gli acidi e gli alcoli fenolici (D'archivio et al., 2007).

I polifenoli sono largamente distribuiti in natura, pertanto si calcola che una dieta ricca di vegetali freschi dia un apporto giornaliero da 200 mg a 1 g di queste sostanze, tale da assicurare un apporto sufficiente di antiossidanti. L'azione antiossidante non è l'unica attribuita a questi composti; studi effettuati *in vivo* ed *in vitro* tendono ad assegnare ai polifenoli un'azione anticarcinogenica, antinfiammatoria, antibatterica e antivirale. L'azione anticarcinogenica dei fenoli è stata correlata con l'inibizione del cancro al colon, esofago, polmone, fegato, seno e pelle. I flavonoidi e i polifenoli in generale hanno mostrato un impatto sullo step di iniziazione dello sviluppo del cancro, proteggendo le cellule contro l'attacco diretto da carcinogeni o alterando il loro meccanismo d'attivazione. L'attività antitumorale dei flavonoidi è stata correlata all'inibizione delle DNA e RNA polimerasi e/o all'attivazione dell'ornitina decarbossilasi (Taiz & Zieger, 2002).

I polifenoli naturali, a seconda del numero di anelli fenolici che contengono ed agli elementi strutturali che legano ciascun anello con un altro (Laguerre et al., 2007), sono suddivisi in: acidi idrossibenzoici, acidi idrossicinnamici, stilbeni, lignani e flavonoidi.

Il loro potere antiossidante dipende dal numero di anelli fenolici, dal numero e posizione di gruppi idrossilici e di doppi legami presenti nella molecola, ed è determinato in particolare dalla presenza di un anello B diidrossilato (gruppo catecolico), di un'insaturazione in posizione 2,3 associata a una funzione carbonilica sull'anello C e di gruppi funzionali capaci di chelare i metalli di transizione (Giovannini et al., 2006).

L'azione antiossidante dei polifenoli è del tipo chain-breaking (spezzano la catena): reagiscono con i radicali cedendo loro un radicale idrogeno (Laguerre et al., 2007).

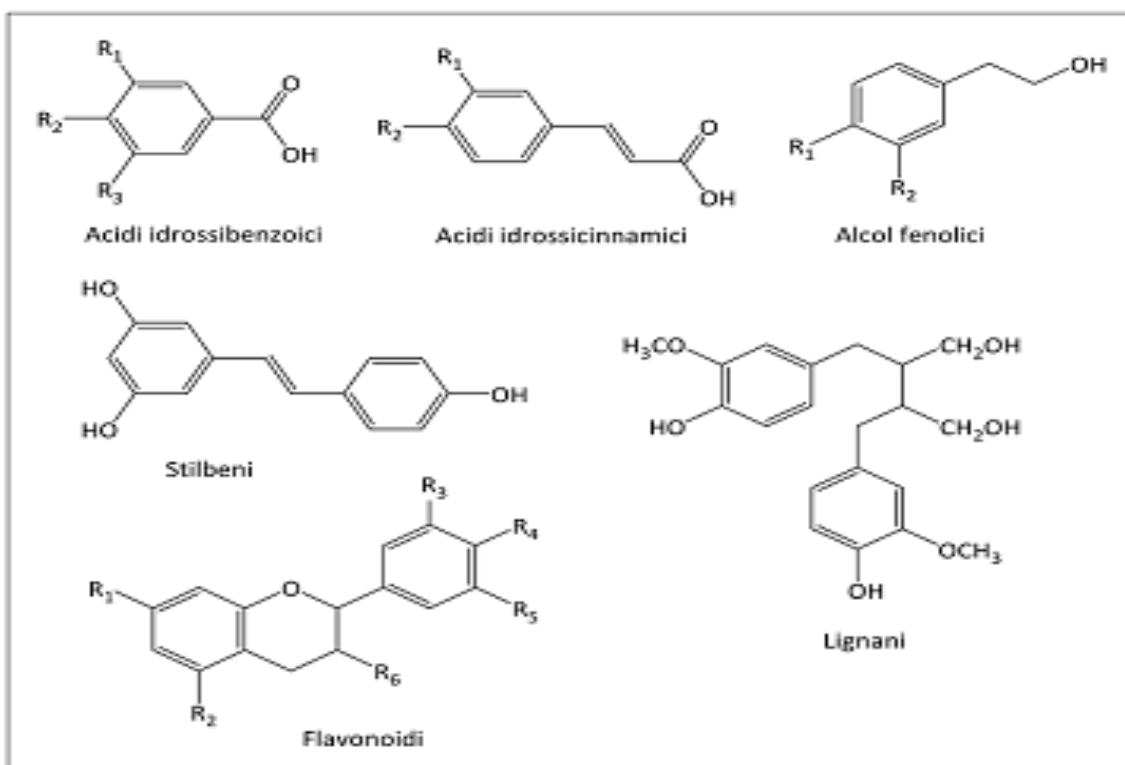


Figura 3.12 Classi di polifenoli

I flavonoidi rappresentano i polifenoli più abbondanti nelle piante. Strutturalmente sono caratterizzati da due anelli benzenici legati da una catena lineare di tre atomi di carbonio, che può formare un anello a 6 atomi con un gruppo ossidrilico di uno degli anelli benzenici. Sono stati identificati più di 4000 singoli flavonoidi, divisi in sottoclassi secondo lo schema di sostituzione e dello stato di ossidazione dell'anello centrale (D'archivio et al., 2007).

In base al tipo di eterociclo, ai suoi sostituenti e ai sostituenti degli anelli benzenici, i flavonoidi sono suddivisi in: antocianidine, flavonoli, flavani, flavanoni, flavoni, isoflavoni, tannini idrolizzabili (Harborne, 1989).

Altre molecole implicate nel processo di detossificazione dai radicali liberi sono i carotenoidi ai quali, è stato dedicato il prossimo capitolo.

Bibliografia

- Albertini A, Bolognini L, Macciantelli D, Carratelli M (2000) The radical cation of N,N-diethyl-para-phenyldiamine a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res Chem Intermed* 26(3):253-267
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K (2002) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127(1):183-198
- Binetti P, Marcelli M, Baisi R (2011) Manuale di nutrizione clinica e scienze dietetiche applicate. Società editrice universo 4:42-43
- D'archivio M, Filesi C, Di Benetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annal Istit Super San* 43(4):348-361
- Fehér J, Csomós G, Vereckei A (1985) Free radical reactions in medicine. Springer-Verlag, Heidelberg 2-30
- Gibson DO, Hawrylko J, McCay PB.(1985) GSH dependent inhibition of lipid peroxidation: properties of a potent cytotoxic system which protects cell membrane. *Lipids*. 20:704-711
- Giovannini C, Filesi C, D'Archivio M, Scazzocchio B, Santangelo C, Masella R (2006) Polifenoli e difese antiossidanti endogene: effetti sul glutatione e sugli enzimi ad esso correlati. *Ann Ist Super Sanità* 42(3):336-347
- Govoni S, Pelosi C, Racchi M (2001) Stress ossidativo, demenza e invecchiamento: i confini incerti di un continuum biologico di difficile valutazione
- Halliwell B (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition* 16:33-50
- Halliwell B, Gutteridge JM (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* 186:1-85

- Halliwell B, Gutteridge JMC (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* . 246:501-514
- Halliwell B., Gutteridge JMC (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth Enzymol* 186:1-85
- Hocstein P., Kumar KS, Forman SI (1980) Lipid peroxidation and cytotoxicity of copper. *Ann. NY Acad Sci* 355:240-248
- Iorio EL (2006) Specie chimiche reattive e radicali liberi. Convegno "Radicali liberi e antiossidanti in medicina nello sport"
- Izawa S, Inoue Y, Kimura A (1997) Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 320:61-7
- Kalyanaraman B, Darley-Usmar VM, Wood I, Joseph I, Parthasarathy S (1992) Synergistic interaction between the probucol phenoxyl radical and ascorbic acid in inhibition the oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 267:6789-7502
- Kalyanaraman, B, Karoui H, Singh RJ, Felix CC (1996) Detection of thiol radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols-a high resolution ESR spin-trapping study at Q-band. *Anal Biochem* 241:75-81
- Briviba K, Klotz LO, Sies H (1999) Defenses against peroxynitrite. *Methods Enzymol* 301-311
- Karlsson J (1997) Antioxidants and exercise. *Human Kinetics*
- Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* 46(5):244-282

- Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve PE (2007) Valuation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res* 46:244-282
- Li J (1999) Antioxidant and Oxidative Stress in Exercise. *Proceed of the Soc for Experimen Biolog and Med* 222:283-290
- Malatesta L, Cenini S (1986) *Principi di Chimica Generale*. Editrice scientifica Guadagni. pp. 273
- Malgorzata M, Perucka I (2005) Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L.) *J Agric Food Chem* 53:1750-175
- Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri L (2006) Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 10:59-73
- Markesbery WR (1996) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 23(1):134-147
- McCord JM (2000) The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am J Med* 108:652-659
- Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Ann Rev Biochem* 52:711-760
- Nohl H, Jordan W, Hegner D (1981) Identification of free hydroxyl radicals in respiring rat heart mitochondria by spin trapping with the nitrene DMPO. *FEBS* 123(2):241-4
- Paoletti R, Samuelsson B, Catapano AL, Poli A, Rinetti M (1994) Oxidative processes and antioxidants. Raven Press, New York 117-134
- Pryor WA (1973) Free radical reactions and their importance in biochemical systems. *Fed Proc.* 32:1862-1869
- Rahman K (2007) Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventionsentions in Aging* 2(2):219-236

- Taiz L, Zieger E (2002) *Fisiologia vegetale*. Piccin. Padova
- Tannini M (1990) Radicali liberi: aspetti generali. In Bompiani CD, Galluzzo A. Radicali liberi in fisiologia e patologia. Edizioni Minerva Medica, Torino 3-18
- Urso ML, Clarkson PM (2003) Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189:41-54
- Valko M, Luibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology* 39:44-84
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160(1):1-40
- Wa P (1986) Oxy radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu Rev Physiol* 48:657-667
- Wefers H, Sies H (1988) The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem* 174: 353-357
- Zhang HY, Yang DP, Tang GY (2006) Multipotent antioxidants: from screening to design. *Drug Discovery Today* 11:749-754

Capitolo 4

Carotenoidi: chimica e attività biologica

I carotenoidi sono pigmenti naturali che sono sintetizzate da piante e sono responsabili dei colori rosso, giallo ed arancione di frutta e verdura. Ci sono diverse decine di carotenoidi negli alimenti che mangiamo, e la maggior parte di questi carotenoidi ha attività antiossidante (Paiva et al. 1999).

Gli animali, compreso l'uomo, non sono in grado di sintetizzare questi composti; se ne riforniscono quindi dal mondo vegetale attraverso l'alimentazione e poi li modificano. Nonostante siano stati caratterizzati chimicamente più di 600 carotenoidi, il β -carotene è stato da sempre considerato il carotenoide biologicamente più attivo, grazie alla sua elevata attività di provitamina A (doppia rispetto a quella di α - e γ -carotenoidi), cioè alla possibilità di essere utilizzato come fonte di vitamina A da parte dell'organismo umano.

I carotenoidi sono pigmenti naturali sintetizzati da piante e microrganismi, ma non da animali. I carotenoidi sono classificati come segue:

1) idrocarburi noti come caroteni e contengono gruppi terminali specifici. Il licopene ad esempio ha due gruppi terminali aciclici, mentre il β -carotene ha due cicloeseni (Figura 4.2).

2) carotenoidi ossigenati sono noti come xantofille. Zeaxantina, violaxantina, neoxantina, capsantina, β -criptoxantina e luteina sono xantofille con gruppi terminali idrossilici; la spirilloxantina ha gruppi metossilici; l'echinenone un gruppo gruppi ossilico; l'anteraxantina un gruppo epossilico (Figura 4.3) (Goodwin, 1980).

La sequenza di biosintesi dei carotenoidi in piante è la seguente: fitoene \rightarrow \rightarrow fitofluene \rightarrow \rightarrow ζ -carotene \rightarrow \rightarrow neurosporene licopene \rightarrow \rightarrow γ -carotene e β -carotene (figura 4.1). Ogni passo enzimatico da fitoene a licopene aggiunge un doppio legame alla molecola, con conseguente licopene, che è una

molecola simmetrica contenente 13 doppi legami. Il passo di biosintesi dopo il licopene comporta la ciclizzazione enzimatica dei gruppi terminali, e si traduce nella sintesi del γ -carotene (un anello beta) e β -carotene (due anelli beta).

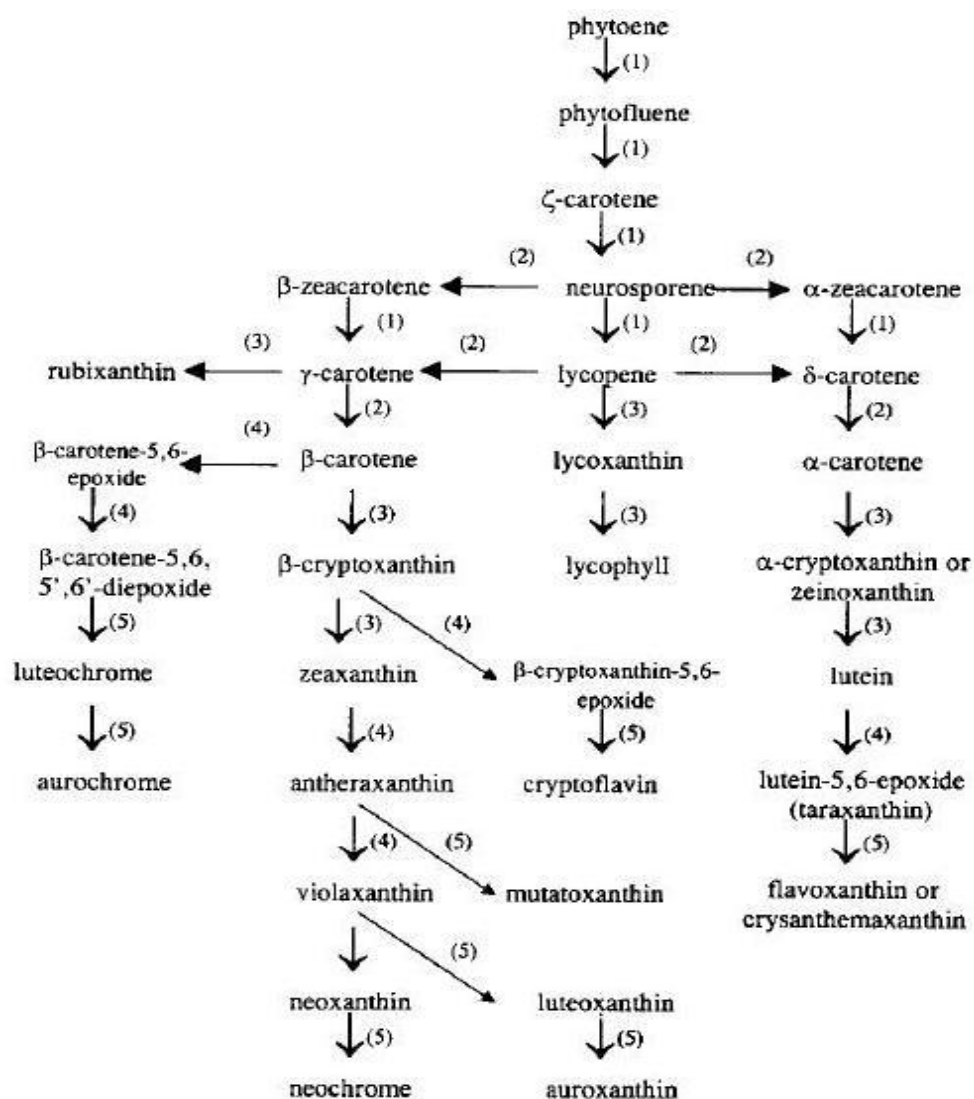


Figura 4.1 Ultime fasi della biosintesi dei carotenoidi e possibili trasformazioni dei carotenoidi. Reazioni: (1) Desaturazione; (2) Ciclizzazione; (3) Idrossilazione; (4) Epossidazione; (5) Riarrangiamento epossido-furanoside.

Alcuni carotenoidi, come il β -carotene, una volta introdotti nell'organismo possono produrre molecole di retinolo. Il retinolo e altri retinoidi che posseggono la sua stessa attività biologica (retinale, acido retinoico, 3-idroretinolo e loro

derivati) sono chiamati vitamina A. La vitamina A è richiesta per la formazione del pigmento fotosensibile della retina, indispensabile per il processo visivo. Inoltre, è necessaria per il funzionamento delle cellule epiteliali capaci di secernere muco, per la crescita, per lo sviluppo del tessuto osseo e per la riproduzione; possiede inoltre ruoli fondamentali sulla regolazione della crescita e della differenziazione cellulare (Arienti, 2003).

La concentrazione di ogni carotenoide in una frutta o verdura può suggerire che l'enzima o gli enzimi responsabili della sintesi di quel determinato carotenoidi possono essere limitanti nella cascata di biosintesi. Ad esempio una concentrazione molto elevata di licopene nei pomodori rossi può suggerire un'attività enzimatica insufficiente della ciclasi, enzima responsabile della conversione del licopene in γ -carotene (Beecher, 1998) (Figura 4.1).

Degli oltre 600 carotenoidi presenti in natura, circa 40 sono presenti in una tipica dieta umana. Di questi carotenoidi, solo 14 e alcuni dei loro metaboliti sono stati identificati nel sangue e nei tessuti (Gerster, 1997).

Molti studi epidemiologici hanno associato ad un alta assunzione di carotenoidi una diminuzione dell'incidenza di malattie croniche. Tuttavia, i meccanismi biologici di una tale tutela sono attualmente poco chiari.

Esistono molteplici possibilità per i carotenoidi:

- 1) conversione in retinoidi (agendo così da provitamina A);
- 2) modulazione delle attività enzimatiche delle lipossigenasi, enzimi coinvolti nella risposta infiammatoria e immunomodulatoria;
- 3) possono avere proprietà antiossidanti superiori a quelle della vitamina A
- 4) attivazione dell'espressione di geni che codificano per la produzione di una proteina, la connessina 43, importante componente delle giunzioni necessaria alla comunicazione cellulare (Bendich, 1993).

La maggior parte delle azioni antiossidanti dei carotenoidi sembrano basate sulla capacità di "spegnere" (placare) l'ossigeno singoletto e sulla capacità di intrappolare i radicali perossilici (Stahl & Sies, 1996).

Dall'interazione tra carotenoidi e radicale ne deriva un carotenoide eccitato che

ha la capacità di dissipare l'energia appena acquisita attraverso una serie di interazioni rotazionali e vibrazionale con il solvente, rigenerando così il carotenoide originale non eccitato, che può essere riutilizzato per altri cicli di smorzamento dell'ossigeno singoletto. Questa attività dei carotenoidi dipende principalmente dal numero di doppi legami coniugati della molecola ed è influenzata in misura minore da gruppi terminali carotenoidi (ciclico o aciclico) e dai sostituenti presenti su questi gruppi terminali ciclici. Il licopene, infatti, (con undici doppi legami coniugati e due non coniugati) è tra i più efficienti carotenoidi naturali dotati dell'abilità di placare l'ossigeno singoletto (Stahl & Sies, 1996).

Secondo Sies & Stahl (1997) la prevenzione della perossidazione lipidica dei carotenoidi è dovuta soprattutto alla capacità di spegnere l'ossigeno singoletto, senza degradarlo e di reagire chimicamente con i radicali liberi (Rahman, 2007). Essi agiscono contro l'ossigeno singoletto con effetto "quenching" (placante) intervenendo sul trasferimento di energia tra le molecole. Infatti, i carotenoidi sono in grado di ricevere l'energia molecolare dell'ossigeno singoletto producendo ossigeno stabilizzato e caroteni eccitati allo stato di triplette. Invece di generare ulteriori reazioni chimiche, i carotenoidi dissipano l'energia in eccesso nel mezzo in cui si trovano. Inoltre, poiché nel corso di questa reazione i carotenoidi non si modificano, si rendono nuovamente disponibili per altri cicli di "^dO₂ (ossigeno singoletto) – quenching" (Stahl & Sies, 2003).

L'efficacia dei carotenoidi come quenchers è relazionata al numero di doppi legami; pertanto, il N-carotene, la zeaxantina, la criptoxantina, il W-carotene e, soprattutto, il licopene sono molecole particolarmente attive da questo punto di vista. Nella mucosa intestinale degli animali, dal β-carotene, per azione enzimatica, si forma la vitamina A (Lotti, 1985).

I carotenoidi sono attivi anche contro i radicali perossilici come "spazzini" (scavenger) proteggendo le membrane cellulari e le lipoproteine dai danni dell'ossidazione (Sies & Stahl, 1995).

Il β -carotene ha mostrato anche attività di scavenger nei confronti dei radicali perossilici, soprattutto a bassa tensione di ossigeno (Krinsky, 1998).

Questa attività può anche essere esibita da altri carotenoidi. L'interazione dei carotenoidi con i radicali perossilici può procedere tramite la formazione di una molecola di β -carotene in forma di intermedio radicale (Krinsky & Johnson, 2005).

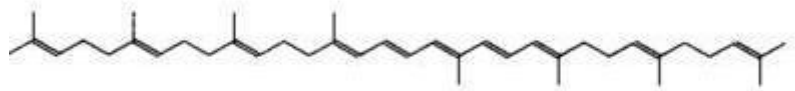
Questi intermedi radicali hanno dimostrato di essere molto stabili grazie a meccanismi di risonanza e s'intuisce che questa forma non sia particolarmente reattiva. Essi possono inoltre subire decadimento generando prodotti non radicali e terminando la reazione legandosi ad altri radicali liberi (Burton & Ingold, 1984).

I carotenoidi agiscono come antiossidanti reagendo più rapidamente con i radicali perossilici di quanto non facciano le catene di acidi insaturi delle membrane plasmatiche, prevenendone così la perossidazione lipidica, passaggio fondamentale del danno da radicale libero. In questo processo, i carotenoidi vengono distrutti (Woodall et al., 1997).

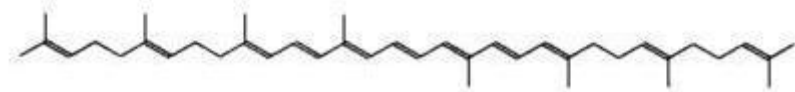
D'altra parte, si deve riconoscere che in alcuni casi, l'ottimo risultato ottenuto in molti studi epidemiologici potrebbe essere il risultato non solo dell'azione dei carotenoidi, ma anche di altri composti noti per avere azione protettiva in frutta e verdura. E', infatti, opportuno sottolineare che l'attività antiossidante dei carotenoidi dipende dalla presenza di altre specie antiossidanti, quali la vitamina E e C e dalla tensione dell'ossigeno presente nel sistema (Young & Lowe, 2001).



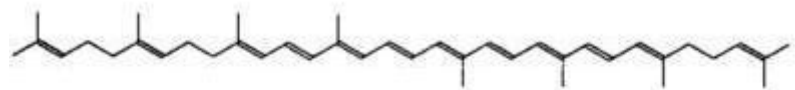
Phytoene



Phytofluene



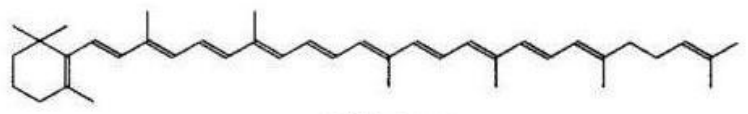
ζ-Carotene



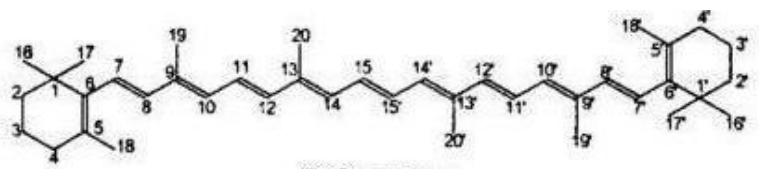
Neurosporene



Lycopene



γ-Carotene



β-Carotene

Figura 4.2 Strutture dei principali carotenoidi

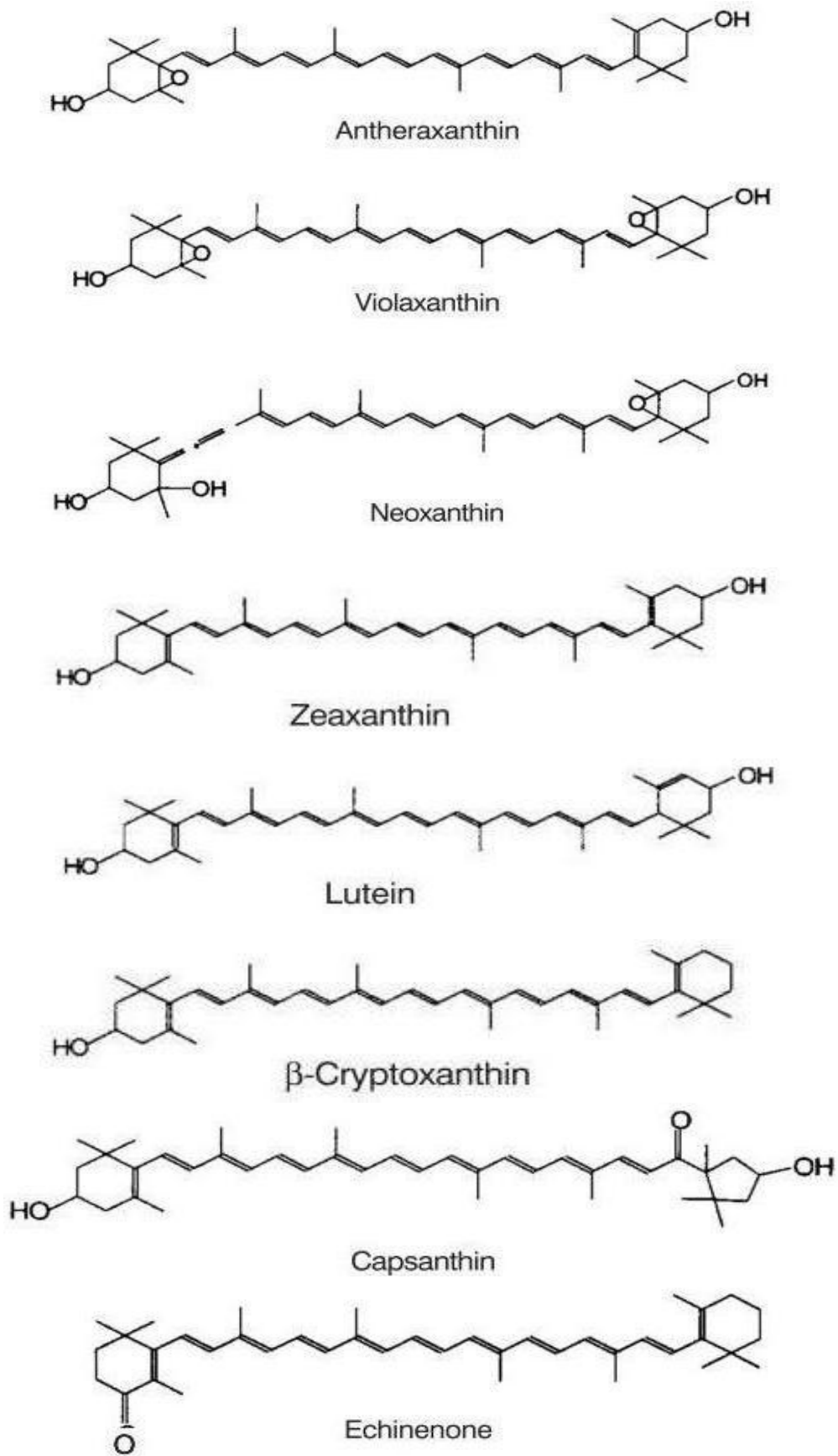


Figura 4.3 Strutture dei principali carotenoidi

Bibliografia

- Arienti G. Le basi molecolari della nutrizione. Padova: Piccin 2003
- Beecher GR (1998) Nutrient content of tomatoes and tomatoes products. Proc Soc Exp Biol Med 218:98-100
- Bendich A (1993) Biological functions of dietary carotenoids. Ann NY Acad Sci 691:61-67
- Burton GW, Ingold KU (1984) Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science 224:569-573
- Gerster H (1997) The potential role of lycopene for human health. J Am Coll Nutr 16:109-126
- Goodwin TW (1980) The Biochemistry of the Carotenoids. Vol. 1: Plants. New York: Chapman and Hall p.203
- Krinsky NI (1998) Overview of lycopene, carotenoids, and disease prevention. Proc Soc Exp Biol Med 218:95-97
- Krinsky NI, Johnson EJ (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. Molecular Aspects of Medicine 26:459-516
- Lotti G (1985) Principi di chimica e biochimica vegetale. ETS Editrice Pisa
- Paiva SA, Russell RM (1999) Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. Journal of the American College of Nutrition 18(5):426-433
- Rahman K (2007) Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clin Interv in Agin 2(2):219-236
- Sies H, Stahl W (1995) Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. Am J Clin Nutr 62:1315–1321
- Sies H, Stahl W (1997) Carotenoids and intercellular communication via gap junctions. Int J Vitam Nutr Res 67:364-367

- Stahl W, Sies H (1996) Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? Arch Biochem Biophys 336:1-9
- Stahl W, Sies H (2003) Antioxidant activity of carotenoids. Molec Aspec of Medic 24:345-351
- Woodall AA, Britton G, Jackson MJ (1997) Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. Biochim Biophys Acta 1336:575-586
- Young AJ, Lowe GM (2001) Antioxidant and pro-oxidant properties of carotenoids. Arch Biochem Biophys 385:20-27

Capitolo 5

Processi tecnologici e loro influenza sulla biodisponibilità

Tutti gli alimenti sono soggetti a deterioramento. Per migliaia di anni l'uomo ha utilizzato tecniche come l'essiccamento, la salagione e l'affumicamento per fronteggiare l'alterazione (processo attraverso il quale in un alimento si sono verificate delle modificazioni sia chimiche che biologiche, ad opera di microrganismi, in particolare batteri alterativi, tali da aver determinato modificazioni a livello delle caratteristiche organolettiche del prodotto stesso: odore, sapore, consistenza, colore) e prolungare nel tempo la loro conservabilità (periodo nel quale l'alimento è sicuro, apprezzabile e nutriente) (Viuda-Martos et al., 2011).

La conservazione dei prodotti, quindi, è legata al mantenimento da parte dell'alimento stesso delle caratteristiche proprie di qualità igienico-sanitaria, commerciale e organolettica.

Le tecniche di conservazione hanno lo scopo di impedire o rallentare l'instaurarsi di processi alterativi di diversa natura. I metodi principali di conservazione li possiamo distinguere in: tecniche di conservazione che sfruttano i fattori fisici, e tecniche di conservazione che sfruttano i fattori chimici. Le tecniche che sfruttano i fattori fisici sono il trattamento con il calore e l'utilizzo delle basse temperature (Hemphill & Cobiac, 2006).

5.1 Trattamento con calore

La conservazione degli alimenti per mezzo del calore ha assunto una notevole importanza nel settore della produzione delle derrate alimentari, in particolare se si tiene conto dell'effetto che le alte temperature esercitano sulla flora microbica di qualsiasi prodotto.

Il calore agisce sui microorganismi prima inibendone la moltiplicazione, poi salendo a temperature più elevate, determinando la morte per effetto della coagulazione (calore umido) o per ossidazione (calore secco) delle loro componenti proteiche. La sensibilità termica è variabile a seconda delle caratteristiche delle diverse specie microbiche presenti ed è condizionata, inoltre, da fattori quali la composizione del mezzo in cui si trovano, il pH (più è basso il pH e più bassa sarà la temperatura del trattamento termico), la presenza di sostanze grasse che fungono da protezione, il tempo di durata del trattamento termico, eccetera (Cappelli & Vannucchi, 2000).

5.1.1 Cottura

Tutti i sistemi di cottura provocano trasformazioni negli alimenti a cui vengono applicati. Il calore modifica fisicamente e chimicamente la struttura del cibo. Lo scopo principale della cottura è quello di:

- ✓ rendere l'alimento sicuro da un punto di vista igienico, cioè distruggere i potenziali microrganismi patogeni eventualmente presenti ed elimina potenziali sostanze tossiche (ad esempio la solanina delle patate);
- ✓ migliorare le caratteristiche organolettiche dei cibi modificandone l'aspetto, il colore, il sapore e l'aroma e contribuendo a renderli più appetibili;
- ✓ aumentare la disponibilità di alcuni nutrienti attraverso l'inattivazione di sostanze presenti negli alimenti che impediscono la loro utilizzazione (ad esempio l'avidina nell'albume d'uovo);
- ✓ aumentare la digeribilità dei nutrienti presenti negli alimenti attraverso alcune trasformazioni chimiche;
- ✓ bloccare l'attività di alcuni enzimi che operano trasformazioni indesiderate soprattutto negli alimenti di origine vegetale (quali la polifenolo ossidasi che degrada i polifenoli).

La trasmissione del calore agli alimenti può avvenire in diversi modi:

- per *conduzione*, cioè quando si ha il contatto diretto con la fonte di calore (cottura su un frytop, piastra, in padella o altro recipiente con poco o niente grasso e soprattutto nessun liquido);
- per *convezione*, cioè quando il calore viene trasportato dalla fonte di calore all'alimento per mezzo di un fluido. Il vapore, l'acqua, l'olio, sono fluidi più o meno densi che usiamo per trasferire il calore agli alimenti nelle cotture al forno, a vapore, per ebollizione o in frittura. Tanto più è denso il fluido e tanto più efficace è la trasmissione del calore.
- per *irraggiamento*, cioè quando il calore viene trasmesso all'alimento per mezzo di raggi infrarossi. Il sole, per esempio, riscalda la terra e il suo calore ci giunge attraversando lo spazio, dove non c'è aria, cioè nessun fluido. Sono i raggi infrarossi che trasportano il calore. Quando ci sediamo a 5 metri di distanza dal fuoco di un camino percepiamo ugualmente una sensazione di calore, ma se fra noi e il fuoco mettiamo uno schermo opaco (o un qualsiasi ostacolo che non ci permette di vedere il fuoco) interrompiamo il flusso di raggi infrarossi e la percezione del calore diminuisce. Anche nel forno a microonde c'è un irraggiamento, ma di tipo diverso: sono onde elettromagnetiche di una frequenza tale da mettere in agitazione continua le molecole d'acqua, zucchero o grasso contenute nell'alimento, che si scaldano dall'interno per attrito molecolare. Praticamente le molecole sottoposte all'azione del microonde cambiano il loro orientamento milioni di volte al secondo e si scaldano più o meno allo stesso modo di quando ci scaldiamo le mani strofinandole velocemente una contro l'altra.

Le cotture si dividono in diverse tipologie. Esistono cotture per *concentrazione*, per *espansione* e *miste*, cioè in cui vengono applicate sia la concentrazione che l'espansione. Sono generalmente cotture effettuate a temperature comprese tra 120° e 250°C.

Quando si parla di cotture per *concentrazione* non si utilizzano liquidi e una parte dell'acqua contenuta nell'alimento evapora, concentrando il gusto del cibo. La

concentrazione comporta anche altre trasformazioni che sviluppano sapori interessanti in buona parte dei cibi.

Nelle cotture per *espansione* il cibo è a contatto con un liquido, che in modo più o meno marcato estrae o scambia con esso aromi e sapori. La lessatura, la cottura a vapore, la stufatura si basano su questo principio. L'acqua è sempre presente in queste cotture e ciò impedisce di superare la temperatura di 100°C. Si ha lo scioglimento di varie sostanze che passano dall'alimento al liquido di cottura, mentre altre sostanze o aromi eventualmente presenti nel liquido insaporiscono l'alimento.

In molti casi si applica prima una cottura per *concentrazione* seguita da una per *espansione* allora si ha una cottura *mista*. Nella prima fase di concentrazione generalmente si fa rosolare l'alimento a calore forte per ottenere lo sviluppo dei sapori gradevoli dati dalla caramellizzazione di amidi e proteine. Nella fase successiva per espansione, si aggiungono liquidi che hanno lo scopo di sciogliere e diffondere nel tutto le parti rosolate nonché di intenerire l'alimento. Nella prima fase la temperatura è piuttosto alta: 160/180°C. La rosolatura della superficie esterna infarinata crea una crosta colorita e croccante ricca di gusto, ma l'interno è ancora praticamente crudo. Nel passaggio successivo con l'aggiunta del liquido la temperatura scende intorno ai 100°C. L'umidità ammorbidisce la crosta e ne diffonde nel fondo di cottura gli aromi. Questa parte di cottura va avanti per oltre un'ora, spesso anche per due o tre, secondo le dimensioni del pezzo (Reyes De Corcuera et al., 2004).

5.1.2 Variazione di qualità degli alimenti dopo trattamento termico

I principali componenti alimentari subiscono, in seguito al riscaldamento, importanti trasformazioni.

Le proteine vanno incontro a denaturazione (sopra i 60°C) e generalmente diventano più digeribili. La denaturazione comporta una specie di "srotolamento" della loro complessa struttura, trasformazione che consente agli enzimi digestivi

di utilizzarle al meglio. Solo quando il trattamento di cottura è prolungato o improprio assistiamo a trasformazioni negative a carico di alcuni amminoacidi in esse contenuti (che possono diventare indisponibili), o a reazione con gli altri componenti (ad esempio zuccheri o grassi), che ne limitano la valenza nutrizionale. Questo è il caso della cosiddetta reazione di Maillard che prevede l'imbrunimento non enzimatico e il primo stadio della caramellizzazione, che si produce con una prolungata tostatura o con un'eccessiva esposizione alle alte temperature, come avviene durante la cottura in forno (Hurst, 2009).

I carboidrati complessi come ad esempio l'amido sopra dei 60°C e alla presenza di acqua, modificano la loro struttura trasformandola in cristallina gelificata. L'amido gelatinizzato (a differenza di quello in forma cristallina) è facilmente e rapidamente digerito e utilizzato per finalità energetiche. In piccola misura l'amido gelatinizzato (se la cottura è prolungata e avviene in acqua) migra nel mezzo di cottura. Gli zuccheri semplici, invece, sono abbastanza stabili durante il riscaldamento e al massimo si possono sciogliere, perdendosi, quando il mezzo di cottura è l'acqua. Solo con un riscaldamento intenso e prolungato e in presenza di proteine assistiamo alla loro trasformazione, che conduce alla produzione di composti oggi guardati con qualche sospetto sul piano della tossicità.

I grassi sono molto stabili al riscaldamento, tant'è che l'impiego di condimenti lipidici per regolare e migliorare il trasferimento di calore (brasatura, stufatura, cottura con velo di olio o burro, frittura) è da sempre uno dei metodi che meglio garantiscono l'espressione della qualità gastronomica delle preparazioni alimentari. I grassi solidi si sciolgono sopra i 40°C e possono fuoriuscire dall'alimento (se contenuti, come nel caso delle carni o del pesce), "smagrendolo" in un certo senso. Solo al di sopra del loro cosiddetto "punto di fumo" (che a seconda del tipo di acidi grassi costitutivi è situato a 130-200°C) i grassi vanno incontro a trasformazioni negative, che possono coinvolgere la loro ossidazione accelerata, la isomerizzazione e la loro polimerizzazione, con la produzione di composti tossici. Per questo si consiglia di non abusare con le

fritture in generale, e soprattutto con le fritture che prevedono la riutilizzazione dei condimenti.

Le vitamine sono sensibili al riscaldamento ed all'ossidazione, per cui le lunghe cotture ne diminuiscono la biodisponibilità.

I sali minerali, al contrario, sono stabili al calore e si possono perdere solo perché si disciolgono nei mezzi di cottura, che comunque possono essere riutilizzati (ad es. brodi) per altre preparazioni (Cappelli e Vannucchi, Chimica degli Alimenti, 2000).

5.2 Metodi di essiccamento

L'essiccamento è una tecnica di conservazione del cibo che consiste nell'eliminazione di liquidi a seguito dell'applicazione di una fonte di calore. Infatti, è proprio l'acqua presente nei prodotti a causare lo sviluppo di muffe e batteri. Alla presenza di acqua, i microrganismi trovano l'ambiente ideale per moltiplicarsi. Senza acqua le reazioni chimiche sono fortemente rallentate e le attività degli enzimi sono assenti. Una volta essiccati, gli alimenti devono essere chiusi ermeticamente in contenitori o involucri impermeabili per evitare che il cibo possa riassorbire l'acqua dall'aria. Questo procedimento è utilizzato sin dall'antichità, dove era pratica comune esporre gli alimenti al sole o all'aria (come nel caso dello stoccafisso). Altre antiche tecniche di essiccazione sono la salagione o anche alcuni tipi di cottura, come la frittura.

Nella terminologia specifica, si utilizza il termine essiccamento quando si procede con mezzi naturali, sfruttando l'azione dei raggi del sole. Quando invece il processo è artificiale, come in ambito industriale, si parla di disidratazione.

La disidratazione a livello industriale si è sviluppata all'inizio del '900, attraverso tecniche di riscaldamento dell'alimento tramite aria calda, gas, contatto con superfici calde o radiazioni infrarosse.

A seconda della percentuale d'acqua presente, gli alimenti sono sottoposti a diverse temperature: tra i 30 e i 40°C si parla di bassa temperatura; tra i 50° e i

60° a media temperatura, mentre tra i 70 e i 90°C abbiamo l'essiccazione ad alta temperatura. L'essiccamento è una tecnica di conservazione molto praticata, perché consente di mantenere i cibi anche a lungo senza alterare in maniera eccessiva le proprietà organolettiche. Si nota però una buona perdita di vitamina C. Inoltre si può incorrere in altri svantaggi: è ovvio che un prodotto essiccato prima di essere consumato deve essere reidratato. Gli alimenti però riassorbono solo circa i due terzi dell'acqua iniziale, tendendo a risultare più duri e gommosi rispetto all'origine: è il caso dei funghi secchi, che si presentano meno teneri rispetto a quelli freschi. Alcuni cibi possono assumere un colore scuro e un sapore amaro. Per questo motivo l'essiccazione è utilizzata soprattutto per alcuni alimenti mirati, come latte, minestre, lievito, caffè in polvere e uova. Tra le varie tecniche di disidratazione esiste anche la liofilizzazione, chiamata anche crio-essiccamento. Gli alimenti, infatti, dopo essere stati frammentati e omogeneizzati, sono congelati per poi essere sottoposti all'estrazione di tutta l'acqua attraverso la sublimazione, ovvero il passaggio del ghiaccio allo stato di vapore senza passare per lo stato liquido. La liofilizzazione originariamente era considerata un processo molto costoso; per questo motivo era applicata esclusivamente ai prodotti destinati agli astronauti e ai neonati. Oggi le nuove tecniche industriali hanno permesso un abbassamento dei costi e una conseguente introduzione dei prodotti liofilizzati nel mercato alimentare meno specifico. Rispetto ai prodotti essiccati in maniera tradizionale, i liofilizzati presentano il notevole vantaggio di una rapida reidratazione. Inoltre, la perdita di caratteristiche organolettiche dell'alimento è notevolmente inferiore nei prodotti liofilizzati rispetto a quelli essiccati o disidratati con altre tecniche (Cabras e Martelli, 2000).

5.2.1 Variazioni di qualità che avvengono durante l'essiccamento

Gli alimenti essiccati presentano modifiche dei nutrienti e delle qualità organolettiche anche notevoli, a seconda dell'alimento e delle tecniche di

essiccamento. Spesso si formano croste, ovvero zone superficiali ad alta concentrazione, variazione di colore, separazione di sostanze poco solubili.

- Le proteine possono diventare più dure e perdere la capacità di riassorbire l'acqua perduta. Possono subire denaturazione, la reazione di Maillard e assumere colore bruno e sapore amaro o di bruciato.
- I lipidi possono andare incontro a irrancidimento ossidativo, evitabile aggiungendo antiossidanti.
- I glucidi possono subire caramellizzazione e reazione di Maillard.
- Le vitamine si perdono soprattutto a causa delle alte temperature.

Le qualità organolettiche vengono alterate, soprattutto il colore, ma vi è anche una perdita parziale dell'aroma (Toontom et al., 2012).

5.3 Utilizzo delle basse temperature

Le basse temperature esplicano la loro azione attraverso un progressivo rallentamento (refrigerazione), fino ad un blocco totale (congelamento, surgelazione) dell'attività di tutti gli enzimi presenti in una derrata alimentare, sia quelli propri di un alimento sia quelli prodotti dai microorganismi. Pertanto batteri, lieviti e muffe, sono messi quanto meno in condizioni non più adatte per moltiplicarsi. Si deve sottolineare che il freddo non è un processo sterilizzante, esso si limita a mettere in uno stato di quiescenza i microorganismi, fino a che il prodotto verrà mantenuto in quelle particolari condizioni di bassa temperatura (D.P.R 327/80 allegato C, art 31) (Cappelli & Vannucchi, 2000).

L'applicazione del freddo può essere condotta con modalità di tempo e di temperatura ben precise e diversificate. In base ad esse si possono distinguere: la refrigerazione, il congelamento e la surgelazione.

5.3.1 Congelamento

Il congelamento è l'operazione che consiste nel raffreddare un prodotto, agendo dall'esterno, portando sotto forma di cristalli di ghiaccio la maggior parte dell'acqua contenuto nell'alimento stesso. Il congelamento differisce dalla refrigerazione perchè vengono applicate temperature più basse che bloccano la crescita, le attività microbiche e rallentano le reazioni enzimatiche. La proporzione di acqua allo stato di ghiaccio aumenta con la diminuzione della temperatura, una parte di acqua resta allo stato liquido a qualsiasi temperatura. Sotto i $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ non si ha più variazione del tenore di ghiaccio nella maggior parte degli alimenti e la percentuale di acqua non congelabile rispetto alla sostanza secca è uguale pur tra alimenti molto diversi. Durante il processo di congelamento e scongelamento si ha una certa distruzione microbica, ma il congelamento non deve essere considerato un mezzo affidabile per distruggere i microorganismi, a parte i parassiti. Particolarmente resistenti sono le spore e certi virus, di regola lieviti e muffe sono più resistenti dei batteri. Batteri Gram positivi (lattici, enterococchi, micrococchi) sono molto più resistenti dei Gram negativi (*Pseudomonas* ed enterobatteriaceae). Il *Clostridium perfringens* muore già a temperature di frigorifero. Lo scopo del congelamento è il mantenimento delle caratteristiche originali del prodotto per un periodo più lungo rispetto alla refrigerazione. Il requisito principale è che il prodotto sia in condizioni ottimali all'origine, sia dal punto di vista microbiologico che chimico. Il congelamento causa delle modificazioni che di solito non sono apportate dal processo di refrigerazione. L'entità delle lesioni dipende principalmente dalla velocità di congelamento che è di grande importanza specialmente nell'intervallo da -2°C a -4°C , poiché condiziona le dimensioni dei cristalli di ghiaccio. Nel congelamento lento post-rigor la formazione dei cristalli di ghiaccio inizia nei compartimenti acquosi extracellulari, poi in quelli intracellulari. Con il procedere della formazione di ghiaccio extracellulare, aumentano la concentrazione del fluido extracellulare e la sua forza ionica, causando una diffusione di acqua verso

l'esterno. L'acqua si condensa sui cristalli già presenti ingrossandoli fino ad un diametro 150µm e causando danno e distorsione alle fibre ed agli organuli con fuoriuscita di succhi ed enzimi. L'alta forza ionica causa la parziale denaturazione delle proteine. Ne consegue la perdita della capacità legante dell'acqua ed una diminuzione della capacità da parte della fibrocellula, di riassorbire, durante lo scongelamento, i liquidi persi con il congelamento. Si hanno modificazioni del pH, con accelerazione o ritardo di reazioni chimiche ed enzimatiche da esso dipendenti. Infine congelerà l'acqua intracellulare. Congelando lentamente si avranno così più perdite con lo scongelamento. Quando invece l'intervallo critico di temperatura (da -1°C a -4°C) viene passato rapidamente (entro 80-120minuti), come nel congelamento rapido, l'acqua nella cellula congela prima che possa avvenire una diffusione considerevole, si formano numerosi piccoli cristalli di ghiaccio con limitato rischio di deformazione cellulare. Il terzo caso è il congelamento ultrarapido o surgelazione che riduce ancor più i rischi di danni cellulari per la formazione di numerosissimi e piccolissimi cristalli (Harris, 1998; Cappelli & Vannucchi, 2000).

5.3.2 Refrigerazione

La refrigerazione (0-4 °C) è il metodo più diffuso per conservare a breve termine ogni tipo di alimento deperibile e consente il mantenimento delle caratteristiche organolettiche e di quelle igienicosanitarie di partenza (temperature differenti a seconda dell'alimento, D.P.R. 327/80 ALL. C e art. 31 D.P.R. 327/80). Il rallentamento del metabolismo cellulare è esclusivamente dovuto alla diminuzione della temperatura. Allo stato refrigerato le cellule microbiche restano in vita mentre il loro metabolismo viene rallentato, si ha l'arresto quasi totale della replicazione dei patogeni mesofili (Harris, 1998).

5.3.3 Surgelazione

Si differenzia dal congelamento per le modalità di applicazione del freddo (in meno di 4 ore si raggiunge una temperatura al cuore del prodotto di -18°C , mantenuta ininterrottamente fino alla distribuzione finale) e dalle regolamentazioni di leggi specifiche (D.lgs 110/92); inoltre mantiene maggiormente il valore nutritivo ed i caratteri organolettici dei prodotti naturali (D.P.R 327/80 allegato C). Sia nel congelamento che nella surgelazione vi è un'inibizione delle attività microbiche ed enzimatiche dovuta anche a sottrazione di acqua dell'alimento che passa allo stato solido (Cabras & Martelli, 2000).

5.3.4 Variazioni di qualità durante congelamento

In seguito al congelamento gli alimenti possono subire un cambiamento.

- Carboidrati e proteine

Il valore nutritivo dei carboidrati non è intaccato dal congelamento; durante la conservazione si verifica una lenta e graduale scissione dei composti più complessi in altri più semplici, una sorta di pre-digestione, tanto che il fenomeno viene paragonato a quello che avviene nell'organismo umano durante la digestione. Il congelamento induce nelle proteine un cambiamento della struttura, una denaturazione con modificazioni della forma della molecola. Il fenomeno evolve e prosegue anche durante la conservazione ma non influisce sul valore nutrizionale della proteina, che è fissato dalla composizione in aminoacidi. Viceversa si nota qualche effetto sulla digeribilità delle proteine: alcuni esperti riferiscono che la digeribilità può aumentare, in misura anche consistente, fino a un anno di conservazione, mentre dopo due anni di conservazione la digeribilità diminuisce notevolmente.

Il consumatore può rendersi conto personalmente di questi fenomeni, che sono accompagnati da difetti nei caratteri organolettici, particolarmente avvertibili nelle carni e nei pesci surgelati, prodotti che contengono elevate quantità di

proteine. La presenza di disidratazioni superficiali, un colore più scuro delle masse muscolari, la presenza di fibrosità, la sensazione di stopposità e di eccessiva consistenza, una sapidità ridotta o, addirittura la comparsa di retrogusti rappresentano degli indizi rimarchevoli dei cambiamenti a carico delle proteine.

- Lipidi

La stabilità dei lipidi durante il congelamento e, soprattutto, la conservazione, è in relazione con il grado d'insaturazione dei grassi. I grassi animali, caratterizzati da un'alta percentuale di acidi grassi saturi, si dimostrano piuttosto stabili, mentre gli oli dei pesci, altamente insaturi, sono più facilmente soggetti a essere ossidati e a irrancidire. Gli oli vegetali si collocano in una posizione intermedia: quelli a media insaturazione (olio di oliva, olio di semi di arachide, olio di semi di mais) sono più vicini al comportamento dei grassi saturi; quelli ad alta insaturazione (oli di semi di soia, di girasole di vinaccioli) si avvicinano al comportamento degli oli di pesce (Cappelli & Vannucchi, 2000).

È importante conoscere questi fenomeni perché è impossibile bloccare le lipasi (gli enzimi che innescano le reazioni di scissione delle sostanze grasse e rendono disponibili gli acidi grassi per i successivi attacchi dell'ossidazione) finché non si raggiunge una temperatura inferiore a -29°C , sensibilmente più bassa di quella normalmente impiegata nei magazzini di stoccaggio (da -22°C a -25°C). Quindi il tempo di conservazione, data per scontata la continuità e l'efficienza della catena del freddo, diventa un fattore determinante.

L'ossidazione e l'irrancidimento dei grassi coinvolgono tutti i componenti lipidici e comportano una notevole perdita di valore nutritivo (difficile assimilazione, distruzione di vitamine lipo-solubili e di acidi grassi essenziali) e l'alterazione dei caratteri organolettici (comparsa di odori e sapori anomali). Fortunatamente, anche in questo caso il consumatore possiede uno strumento, i propri sensi, in grado di rivelare la comparsa di questi fenomeni fin dal loro inizio. Un esame dell'odore e del sapore del prodotto, se condotto con attenzione, può svelare la comparsa dei primi composti derivanti dall'ossidazione dei lipidi e quindi l'inizio dell'alterazione.

- Minerali e Vitamine

Passando a esaminare elementi inorganici e vitamine, che spesso sono considerati, a torto, gli unici fattori importanti nel valutare il valore nutritivo dei surgelati, bisogna notare ancora una volta la disomogeneità dei dati risultanti dagli studi scientifici, che riguardano singoli aspetti del processo tecnico o condizioni di conservazione riprodotte in laboratorio, ma quasi mai l'intero ciclo che va dalla raccolta/pesca/macellazione al consumo, compresi quindi lo scongelamento e la cottura (Harris, 1998).

5.4 Tecniche di conservazione che sfruttano i fattori chimici

5.4.1 Uso del sale

Questo sistema di conservazione si basa sull'azione del cloruro di sodio, che ha essenzialmente un effetto disidratante (impedisce la moltiplicazione dei microrganismi agendo sui loro fabbisogni di acqua libera), e sulla produzione di ioni cloruro che sono nocivi per i batteri. Il sale, inoltre, riduce la quantità di ossigeno che può sciogliersi nei tessuti degli alimenti, bloccando la moltiplicazione dei microrganismi che hanno bisogno di ossigeno (Cappelli & Vannucchi, 2000).

5.4.2 Uso dello zucchero

Gli zuccheri esercitano sui microrganismi un'azione inibente molto simile a quella del sale anche se più blanda. Legano l'acqua e, di conseguenza, impediscono la moltiplicazione dei microrganismi agendo sui loro fabbisogni di acqua libera (Cappelli & Vannucchi, 2000).

5.4.3 Affumicamento

Consiste nell'esporre gli alimenti all'azione di alcuni prodotti aromatici che si sviluppano dalla combustione di alcuni vegetali; di norma è usato in associazione ad altri sistemi di conservazione, come la salagione e l'essiccamento, per permettere un prolungato tempo di conservazione. Il potere conservante del fumo sugli alimenti si attua attraverso: sottrazione di acqua dagli alimenti, azione del calore, coagulazione delle sostanze albuminoidi, apporto di sostanze aromatiche (aldeide formica, acido acetico, ecc.) ad azione antisettica (Cappelli & Vannucchi, 2000).

5.4.4 Uso di sostanze chimiche

E' possibile utilizzare intenzionalmente una serie di sostanze durante la produzione di un alimento allo scopo di consentirne una maggiore durata nel tempo e di mantenerne il più possibile a lungo inalterate le qualità nutrizionali. Negli alimenti possono essere presenti sostanze chimiche che svolgono un'azione contro i microrganismi come ad es. il lisozima presente nell'albume delle uova. Durante la preparazione si possono inoltre aggiungere sostanze quali aceto, limone, ecc., che agiscono sul pH (abbassandolo) creando un ambiente sfavorevole alla moltiplicazione microbica. Esiste, poi, una serie di sostanze chiamate additivi che non sono considerate un ingrediente tipico dell'alimento e che non hanno valore nutrizionale, ma che sono aggiunte esclusivamente per un fine tecnologico. Nel contesto della conservazione hanno interesse soprattutto gli antimicrobici che svolgono un'azione diretta sui microrganismi e gli antiossidanti che, anche se non agiscono direttamente sui microrganismi, svolgono comunque un'azione di protezione dell'alimento. Il loro impiego previene un gran numero di modificazioni indesiderabili provocate dai fenomeni ossidativi, quali l'irrancidimento dei grassi, il cambiamento di colore della carne, l'imbrunimento di frutta e ortaggi. (D.M. 209/96 e successive modifiche).

Qualunque sia la tecnica utilizzata per la conservazione degli alimenti, dopo che il prodotto confezionato viene aperto e/o utilizzato in parte, il contenuto deve essere conservato, manipolato come se fosse fresco e consumato in tempi ridotti (Cappelli & Vannucchi, 2000).

Bibliografia

Cabras P, Martelli A (2000) Chimica degli alimenti

Cappelli P, Vannucchi V (2000) Chimica Degli Alimenti Ed. Zanichelli

Harris LJ (1998) Peppers: Safe Methods to Store, Preserve, & Enjoy. UCANR Publications

Hemphill I, Cobiac L (2006) The historical and cultural use of herbs and spices. The medical journal of Australia 185:84

Hurst C (2009) Harvest, handling and sanitation: In: Commercial pepper production handbook. The University of Georgia, Georgia, USA, 41-47

Nogueira RI, Cornejo FEP, Leal WF, Junior Bizzo HR, Antoniassi R, Freitas SP (2005) Effects of drying parameters on pepper (*Capsicum* spp) quality. 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, Village Rio das Pedras, Club Med, Rio de Janeiro 14-18 August

Reyes De Corcuera JI, Cavalieri RP (2004) Blanching of Foods. In: Heldman, D. (ed) Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering 1-5

Toontom N, Meenune M, Posri W, Lertsiri S (2012) Effect of drying method on physical and chemical quality, hotness and volatile flavour characteristics of dried chilli. International Food Research Journal, 19:1023-1031

Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA (2011) Spices as functional foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51:13-28

Capitolo 6

Biodisponibilità di composti bioattivi: Bioaccessibilità, assorbimento e contributo nutrizionali composti organici delle piante

Gli ingredienti funzionali diventano sempre più importanti nel settore alimentare, in risposta alla domanda dei consumatori di alimenti con benefici aggiunti per migliorare la salute, il benessere e la qualità della vita (Bleiel, 2010).

L'aumento della speranza di vita, gli alti costi sanitari, i progressi nel campo della scienza e della tecnologia alimentare e la maggiore consapevolezza nel campo della salute e della nutrizione, sono tra le ragioni per cui i consumatori sono alla ricerca di un cibo più sano. Il termine alimento funzionale è sinonimo di nutraceutico, e sta a indicare un alimento che fornisce ulteriori benefici fisiologici oltre la nutrizione di base (Day et al., 2009).

Il mercato mondiale dei nutraceutici è in rapida espansione e vale circa 23 miliardi di euro (Freedonia, 2005).

Visti i numerosi studi epidemiologici che hanno mostrato l'associazione tra il consumo di cibo ricco di carotenoidi e la riduzione del rischio di diverse malattie croniche umane (Cooper, 2004), disturbi cardiovascolari (Machlin, 1995), degenerazione maculare correlata all'età (Bone et al., 2000) e vista anche la loro peculiare bioattività, che comprende l'attività di provitamina A, l'azione antiossidante, la modulazione immunitaria e il coinvolgimento nella segnalazione cellulare (Rodríguez et al., 2006), il presente lavoro di tesi ha approfondito lo studio dei carotenoidi presenti in frutti di peperoncino.

Evidenze scientifiche dimostrano che l'assorbimento intestinale di questi composti è però un elemento critico nella valutazione del ruolo sulla salute dei composti presenti nei cibi vegetali assunti dall'uomo (Granado-Lorencio et al., 2007a).

Si è pensato quindi di focalizzare l'ambito della ricerca allo studio della biodisponibilità di alcuni tra i più comuni carotenoidi presenti in questi frutti.

Gli effetti *in vivo* degli antiossidanti dipendono, infatti, non solo dalle loro concentrazioni nella frutta e verdura, ma anche dalla loro bioaccessibilità e biodisponibilità dopo ingestione. Ad oggi, molti studi sono già stati affrontati al fine di comprendere meglio la biodisponibilità di questi composti (Manach et al., 2005; Perez et al., 2009).

Determinare la biodisponibilità di un composto è essenziale per la valutazione nutrizionale di un determinato alimento e per la determinazione delle relazioni tra dieta e salute (Palafox-Carlos et al., 2011).

Con biodisponibilità si definisce la quantità di molecole che viene digerita, assorbita, ed utilizzata in presenza di un normale metabolismo. Dato che la misura della biodisponibilità si basa su stime della quantità assorbita, molto utile potrebbe, quindi, essere la considerazione della bioaccessibilità di un composto, ovvero la quantità di nutriente ingerito che diventa disponibile all'assorbimento nell'intestino dopo la digestione (Hedren et al., 2002).

6.1 Metodi di screening della bioaccessibilità

E' molto importante, quindi, valutare la bioaccessibilità di determinati alimenti al fine di studiarne l'effettivo o il probabile beneficio che l'organismo e il metabolismo umano trarrebbero dalle sostanze contenute in questi cibi.

Il sistema digerente umano è un apparato molto complesso e consta di molti processi che avvengono in momenti diversi durante tutto il tratto gastrointestinale. Masticazione e degradazione enzimatica (con enzimi salivari amilasi, lipasi linguale) si verificano nella bocca, producendo un bolo alimentare che viene trasportato allo stomaco dalla peristalsi esofagea (Guerra et al., 2012).

Nello stomaco, il bolo alimentare è esposto al succo gastrico comprendente pepsina, lipasi gastrica e acido cloridrico (HCl) e meccanicamente degradato mediante macinazione e miscelazione. Il chimo viene trasferito nel duodeno e poi

nell'intestino tenue dove il pH viene tamponato e basificato con bicarbonato di sodio (NaHCO_3). Qui, diversi enzimi biliari e pancreatici (proteasi, lipasi, amilasi) continuano la digestione del cibo. Onde peristaltiche guidano poi il contenuto gastrointestinale attraverso l'intestino tenue (Trendelenburg, 2006). Il materiale non assorbito raggiunge l'intestino crasso, dove vengono riassorbiti acqua, elettroliti e sali biliari e si formano le feci (Guerra et al., 2012).

6.1.1 Metodi di digestione *in vivo*

Diversi studi hanno determinato la bioaccessibilità *in vivo* di una serie di ingredienti bioattivi tra cui carotenoidi e tocoferoli (Granado et al., 2006), luteina (Granado-Lorencio et al., 2010a) e estratto di procianidine da semi d'uva (Serra et al., 2010).

Gli attuali metodi per stimare la biodisponibilità dei carotenoidi comprendono studi a breve che a lungo termine sia sugli esseri umani (Micozzi et al., 1992; de Pee et al., 1995; Castenmiller et al., 1999) così come su modelli animali appropriati, come ad esempio sul furetto (White et al., 1993) e su vitelli preruminanti (Poor et al., 1993).

Il metodo più comunemente applicato prevede la misurazione dell'aumento delle concentrazioni plasmatiche di carotenoidi nell'uomo in seguito a somministrazione di una dose acuta o cronica di carotenoidi isolati o cibo ricco in carotenoidi. Questa però è una misura relativa, perché le concentrazioni plasmatiche di nutrienti sono altamente dinamiche così come sono altamente variabili le risposte individuali (Dimitrov et al., 1988).

Approcci più recenti, che utilizzano isotopi stabili e analisi spettrali di massa dei carotenoidi e dei rispettivi metaboliti, potrebbero essere potenziali metodi di studio dell'assorbimento intestinale umano, sebbene la loro complessa applicazione e il loro elevato costo appaiono limitare significativamente tale approccio sperimentale (During & Harrison., 2005).

Un ottimo approccio per ottenere una misura quantitativa della biodisponibilità dei carotenoidi è utilizzare il bilancio oro-fecale (Roels et al., 1958; Shiau et al., 1994).

Gli studi basati su esseri umani o animali sono però tedious e costosi e non sono utilizzabili per esaminare un gran numero di campioni alimentari. Vi è pertanto la necessità di un modello *in vitro* che simuli ciò che accade durante la digestione umana, ma soprattutto che rendi lo studio e la valutazione dei risultati quanto più standardizzabile e riproducibile (van Buggenhout et al, 2010).

6.1.2 Metodi di digestione *in vitro*

Vari modelli di digestione *in vitro* sono stati sviluppati come alternativa più veloce ed a basso costo rispetto i metodi *in vivo*. Dalla misurazione della bioaccessibilità con metodi *in vitro* si ottengono una serie di vantaggi, ma ci sono anche alcuni limiti, che sono principalmente legati alla incapacità di imitare esattamente il processo di digestione *in vivo*. I modelli di digestione *in vitro* possono essere statici o dinamici. I modelli statici non tengono conto dei processi fisici che si verificano *in vivo*, come la miscelazione, la peristalsi e cambiamenti di condizioni nel corso del tempo (Fernández-García et al., 2009).

29:751-760 I modelli dinamici, invece, comprendono questi processi fisici e consentono di imitare processi quale lo svuotamento gastrico e i continui cambiamenti di pH e portate secrezione (Guerra et al., 2012).

I modelli statici (anche definiti “modelli biochimici”) sono i più comuni e solitamente imitano sia la digestione gastrica sia quella intestinale attraverso l'uso di pepsina, pancreatina e sali biliari, rispettivamente. La temperatura è mantenuta a 37°C.

Purtroppo, un limite di questi esperimenti risiede nel fatto che con questi modelli la digestione è lungi dall'essere completa, questo perché la digestione degli alimenti vegetali richiederebbe l'imitazione della digestione in tutto il tratto gastro intestinale e non solo di quello superiore. Questo è particolarmente vero

per la digestione degli alimenti di origine vegetale, in cui le pareti cellulari delle piante non sono degradate nel tratto gastrointestinale superiore.

Ad esempio, è noto che il β -carotene è rilasciato dalla matrice alimentare prevalentemente nell'intestino crasso (Goñi et al., 2006).

Poiché l'ambiente luminale influenza la velocità, la portata e il preciso tratto dove un nutriente diventa disponibile per la digestione, sono stati sviluppati modelli dinamici che incorporano condizioni fisiche e variazioni delle condizioni luminali nel tempo. Un modello dinamico gastro intestinale è stato sviluppato dal TNO Nutrition and Food Research (Paesi Bassi), che riproduce la complessità del processo di digestione *in vivo*. Sulla base di studi su volontari umani sono stati replicati parametri quali il pH, la temperatura, la peristalsi, il contenuto biliare e le secrezioni pancreatiche. Col sistema TNO è anche possibile riprodurre eventuali condizioni patologiche del tratto gastro intestinale (Blanquet et al., 2004).

Un certo numero di studi hanno impiegato questo modello gastro intestinale dinamico per determinare la bioaccessibilità di vari composti compresi xantofille e acidi idrossicinnamici (Blanquet-Diot et al., 2009; Hemery et al., 2010).

Uno studio sulla determinazione della bioaccessibilità di xantofille e carotenoidi ha evidenziato che il sistema TNO ha permesso l'identificazione dei 4 parametri che influenzano la biodisponibilità: la matrice alimentare, la natura della pianta, la conformazione isomerica del composto e il compartimento digestivo (Blanquet-Diot et al., 2009).

Hemery et al. hanno indagato la bioaccessibilità di acidi idrossicinnamici nel pane e ha scoperto che il modello dinamico TNO fornisce risultati comparabili con un precedente studio *in vivo* (Hemery et al., 2010; Kerm et al., 2003).

Molte prove sono state effettuate per indagare la bioaccessibilità di carotenoidi (Rodriguez-Amaya, 2010), ed è generalmente accettato che le simulazioni *in vitro* della digestione gastrica ed intestinale, accoppiate con esperimenti in cellule differenziate Caco-2, rappresenta un valido modello per la comprensione iniziale della bioaccessibilità di carotenoidi (Rodriguez-Amaya, 2010). L'accoppiamento

di modelli in digestione *in vitro* con esperimenti in cui vengono usate cellule di cancro intestinale Caco-2 in coltura permette di replicare con precisione la risposta *in vivo*. Cellule Caco-2 imitano epitelio intestinale assorbente quando coltivate in un monostrato e rappresentano il miglior modello disponibile di coltura cellulare dei piccoli enterociti intestinali (Ferruzza et al., 2012).

Combinando il TNO modello dinamico in digestione *in vitro* con un modello cellulare Caco-2 si è dimostrato di poter ottenere valori coerenti con i risultati *in vivo* sulla biodisponibilità di licopene e α -tocoferolo (Deat et al., 2009).

6.1.3 Confronto tra metodi di digestione *in vivo* e *in vitro*

Un confronto degli approcci di digestione *in vivo* e *in vitro* è stata studiato, da Granado et al. (2006) e Granado-Lorencio et al. (2010).

Uno studio sulla bioaccessibilità di carotenoidi e tocoferoli da broccoli ha evidenziato che gli approcci *in vivo* e *in vitro* possono dare risultati contrastanti (Granado et al., 2006).

Da studi *in vitro* effettuati tramite cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) della frazione digerita si è scoperto che la luteina e il β -carotene hanno una stabilità simile, mentre le effettuate *in vivo* hanno mostrato che i livelli di luteina aumentano significativamente dopo digestione, cosa che non accade per quanto riguarda i livelli di β -carotene (Granado et al., 2006).

Un analogo studio di un estere della luteina ha prodotto risultati coerenti in entrambi gli approcci e i risultati della bioaccessibilità *in vitro* sono risultati essere predittivi della biodisponibilità *in vivo* (Granado-Lorencio et al., 2010a).

I metodi *in vitro* non tengono conto di fattori ospite-correlati, quali le azioni biologiche nel corpo (Granado et al., 2006).

In definitiva, entrambi gli approcci dovrebbero essere considerati complementari e non intercambiabili.

6.2 Stabilità dei carotenoidi

La stabilità dei carotenoidi nel lume intestinale può essere influenzata dai diversi livelli d'idrofobicità dei carotenoidi nel trasferimento nelle micelle miste (Blanquet-Diot et al., 2009).

La stabilità durante la digestione e la successiva biodisponibilità possono essere spiegate dalla differente localizzazione dei carotenoidi nelle gocce lipidiche (Borel et al., 1996).

E' stato dimostrato che gioca un ruolo fondamentale nella biodisponibilità dei carotenoidi sia la posizione di carotenoidi nella matrice alimentare, sia le interazioni dei carotenoidi sia la localizzazione geografica di produzione degli ortaggi (Aherne et al., 2010a; Aherne et al., 2009).

E' stato ripetutamente riportato che le xantofille sono più bioaccessibili dei caroteni, sia in modelli di digestione statici sia dinamici (Blanquet-Diot et al., 2009; Granado-Lorencio et al., 2007; Kean et al., 2008).

6.3 Fattori che influenzano bioaccessibilità di principi funzionali

Vi è un gran numero di fattori che influenza il bioaccessibilità/biodisponibilità dei principi funzionali, alterando il contenuto di composto bioattivo direttamente o indirettamente. Questi comprendono i fattori dietetici, fisiologici e di trasformazione.

6.3.1 Fattori dietetici

La distruzione della matrice alimentare e il rilascio dei costituenti nel mezzo è il primo passo di assorbimento. L'influenza della matrice alimentare sulla bioaccessibilità di componenti alimentari è stata ben documentata. E' stato riportato che il β -carotene è meno biodisponibile dalle verdure che non da una matrice semplice (van het Hof et al., 2008).

Inoltre, luteina e β -carotene sono meno bioaccessibili dalle verdure a foglia verde che da altri vegetali (Otsuki, 2002).

Studi che seguono l'intero processo di digestione di frutta e verdura dimostrano che luteina, licopene e β -carotene sono biodisponibili per il 91% (Goñi et al., 2006).

Ci sono prove contrastanti per quanto riguarda l'effetto delle diverse matrici alimentari sulla biodisponibilità *in vivo*; la genisteina è più biodisponibile da una matrice liquida che da una matrice solida, mentre, la biodisponibilità della daidzeina non è influenzata dalla matrice alimentare di biscotti, succhi di frutta e barrette di cioccolato (de Pascual-Teresa et al., 2006).

Oltre alla matrice alimentare, i componenti dietetici consumati assieme ai composti fenolici possono influenzare notevolmente la bioaccessibilità. E' stato più volte confermato che la presenza di lipidi aumenta la bioaccessibilità di potenziali ingredienti alimentari funzionali, come i carotenoidi (Hornero-Méndez & Mínguez-Mosquera, 2007) e gli isoflavoni (Walsh et al., 2003).

Questo è probabilmente attribuibile alla capacità degli alimenti contenenti lipidi e proteine di aumentare la colecistochinina (CCK) plasmatica e indurre il rilascio di bile nel duodeno (Gibson et al., 2007), aumentando così la biodisponibilità. È stato anche suggerito che interazioni non competitive che formano complessi solubili e insolubili con i grassi di digestione migliorano l'assorbimento di vitamine e carotenoidi liposolubili (Tousen et al., 2012).

È importante notare che la presenza di composti liposolubili non assorbibili, come il saccarosio poliestere può ridurre i livelli plasmatici di composti bioattivi come i carotenoidi (Weststrate et al., 1995; Schlagheck et al., 1997).

Al contrario della presenza di grassi e proteine, le fibre possono ridurre la biodisponibilità di genisteina (Tamura et al., 2009).

Ci sono prove contrastanti per quanto riguarda il rapporto tra le fibre e la biodisponibilità della daidzeina. Il consumo di fibra alimentare ha dimostrato di stimolare la produzione di equol, un metabolita della daidzeina (Lampe et al., 2009; Gardana et al., 2009).

Tuttavia, è stato anche riferito che i soggetti produttori di equol hanno una minore assunzione di fibre alimentari (D'Archivio et al., 2010).

Il legame degli acidi biliari da lignina e pectina e la ritenzione di acqua e formazione di soluzioni viscosi nel budello di pectine, gomme e psillio contribuiscono al ridotto assorbimento di vitamine liposolubili, carotenoidi e sostanze nutritive (Tousen et al., 2012).

6.3.2 Fattori fisiologici

I fattori ospite-correlati che possono influenzare la bioaccessibilità di componenti della dieta includono fattori intestinali (attività enzimatica, microflora del colon) e sistemiche (sesso, età, patologie e disturbi, genetica) (Nolan et al., 2012).

La digestione e l'assorbimento intestinale dei composti dietetici è in gran parte influenzata da gastrite atrofica e dalla diminuzione della secrezione di acido cloridrico. L'alterazione risultante può compromettere l'assorbimento di vitamine e minerali, tra cui ferro, calcio, magnesio e vitamina C (Zheng et al., 2003).

La proliferazione batterica è anche associata a gastrite atrofica e può alterare l'integrità della mucosa intestinale, aumentando la permeabilità intestinale e riducendo l'assorbimento dei nutrienti (Tousen et al., 2012).

L'infezione da salmonella, da rotavirus, la malaria e la *Giardia lamblia* sono in grado di ridurre il tempo di transito intestinale, riducendo il tempo di solubilizzazione nel tratto gastrointestinale e compromettendo l'assorbimento dei nutrienti (Tousen et al., 2012).

I potenziali ingredienti funzionali come isoflavoni e γ -tocoferolo sono più biodisponibili nelle donne (Lu & Anderson, 1998; Granado et al., 2006).

In uno studio a lungo termine è stata registrata una maggiore escrezione urinaria di coniugati degli isoflavoni nelle donne, seguita da un aumento dell'escrezione urinaria di equol (Lu & Anderson, 1998).

Mentre i livelli sierici di luteina sono stati aumentati in entrambi i soggetti di sesso maschile e femminile dopo il consumo di broccoli (200 g) per più giorni, i

livelli di γ -tocoferolo nel siero sono stati aumentati (da ~ 23%) sole nelle donne (Granado et al., 2006).

La risposta a xenobiotici, sia fitochimici alimentari sia farmaci, può essere influenzata da variazioni genetiche derivanti dai polimorfismi di geni che codificano per la fase 1 e la fase 2 degli enzimi che li metabolizzano (Fairweather-Tait, 1996).

Il conseguente aumento o diminuzione dell'attività enzimatica, o l'assenza di un enzima, possono portare ad alterata biodisponibilità (Fairweather-Tait, 1996).

Le malattie croniche renali, il morbo di Crohn, la malattia di Wilson (Cu), l'iper- e l'ipoparatiroidismo (Ca), la diarrea e il vomito possono anche influenzare la biodisponibilità, in particolare di minerali, sia direttamente, aumentando o diminuendo i requisiti fisiologici o indirettamente, alterando la funzione intestinale e le vie metaboliche (Granado-Lorencio et al., 2010b).

6.3.3 Fattori di trasformazione

I fattori di trasformazione più studiati che influenzano la bioaccessibilità e la biodisponibilità sono il trattamento termico, l'omogeneizzazione, la conservazione e il congelamento. Questi fattori influenzano la bioaccessibilità indirettamente, alterando il contenuto del componente alimentare.

L'effetto della cottura domestica sulla biodisponibilità *in vivo* di polifenoli pomodoro è stata determinata da Bugianesi et al. (2004).

I livelli plasmatici di acido clorogenico e naringenina sono stati aumentati a seguito di consumo di pomodori cotti. È stato suggerito che l'aumento della biodisponibilità della naringenina è dovuto alla capacità del trattamenti termico di abbattere l'interazione tra poliesteri insolubili (fibre tipiche del pomodoro) e la naringenina nel frutto di pomodoro maturo (Bugianesi et al., 2004).

Uno studio più recente ha dimostrato che il vapore aumenta la bioaccessibilità delle verdure surgelate, mentre la bollitura delle verdure surgelate ha comportato

una generale perdita di carotenoidi, composti fenolici e anche della capacità antiossidante totale (Mazzeo et al., 2011).

Una severa bollitura di pomodori ha determinato un aumento della bioaccessibilità del licopene, anche se questo aumento non è stato significativo (van het Hof et al., 2000).

Nello stesso studio, il consumo di pomodori moderatamente e severamente omogeneizzati ha aumentato in modo significativo i livelli di licopene nel plasma, rispetto a campioni di pomodoro non omogeneizzato (van het Hof et al., 2000).

Proprio come la durata e il metodo di cottura influenza l'esito della bioaccessibilità, il tipo di metodo di conservazione e le condizioni di conservazione influiscono sul contenuto fenolico e sulla bioaccessibilità di cibi diversi. Le condizioni di conservazione adottate nei supermercati (4°C, 3 giorni) e in ambiente domestico non (18°C, 1 giorno) non influenzano in maniera differente il contenuto di antociani (Mullen et al., 2002).

Nello stesso studio, è stato trovato che il congelamento di lamponi rossi aumenta la concentrazione di acido coumarico. Allo stesso modo, il deposito di wurstel per 22 giorni a 4°C non ha influenzato il contenuto di luteina (Napolitano et al., 2004).

Tuttavia, la conservazione in frigo delle mele aumenta i livelli di catechina (van het Hof et al., 1999).

Lo stoccaggio delle patate dolci in un pozzo con temperatura tra 17 e 21°C e umidità relativa tra 90 e 100% ha riportato un più alto contenuto di β -carotene rispetto alle radici conservate in condizioni ambiente (24-27°C, UR 68-100%), fornendo le prove che la conservazione delle patate a temperature inferiori mantiene più alti i livelli di β -carotene e i valori di bioaccessibilità (Tumuhimbise et al., 2010).

6.4 Bioaccessibilità di ingredienti alimentari funzionali

6.4.1 I carotenoidi

I carotenoidi svolgono molte funzioni e azioni in tutti gli organismi viventi, compresi gli animali e di microrganismi, nonostante sia convenzionalmente considerato come pigmenti vegetali responsabili della colorazione gialla, arancione e rosso di fiori e frutta. I carotenoidi sono cruciali per la fotosintesi, ma sono stati anche associati con la prevenzione delle malattie umane tra cui il cancro (Eliassen et al., 2010).

Oltre seicento carotenoidi sono stati identificati, quaranta dei quali sono presenti nella dieta umana (Yonekura & Nagao, 2007).

Tuttavia, i carotenoidi non possono essere sintetizzati dall'organismo animale, e devono quindi essere assunti con la dieta. La loro bioaccessibilità è quindi cruciale. Solo alcuni carotenoidi e alcuni loro metaboliti sono stati identificati nel sangue e nei tessuti. Yonekura & Nagao, 2007

Hanno riscontrato la presenza plasmatica di alcuni caroteni (licopene, β -carotene, α -carotene) e alcune xantofille (luteina, β -criptoxantina, zeaxantina).

Patate dolci, pomodori, peperoni, carote, spinaci e cavoli sono alcune delle maggiori fonti di carotenoidi. L'assorbimento dei carotenoidi dipende dal rilascio di queste sostanze della matrice alimentare e dall'incorporazione in goccioline lipidiche, le micelle miste. Sali biliari, fosfolipidi, lipidi alimentari e loro prodotti d'idrolisi producono queste micelle. Questa fase è seguita da assorbimento da parte delle cellule intestinali, il trasferimento nei chilomicroni e la secrezione al sistema linfatico (Yonekura & Nagao, 2007; Rodriguez-Amaya, 2010).

Questo modello è stato utilizzato per misurare la bioaccessibilità dei carotenoidi in peperoni dolci e piccanti e in carote crude e cotte (O'Sullivan et al., 2010; Aherne et al., 2010b).

Uno studio di Goni et al. analizza la bioaccessibilità di carotenoidi da frutta e verdura, attraverso l'uso di un metodo che include sia la digestione enzimatica *in*

vitro (bioaccessibilità intestino piccolo) sia la digestione nell'intestino crasso (bioaccessibilità grande intestino) e afferma che l'intestino crasso può essere un sito d'assorbimento di carotenoidi (Goñi et al., 2006).

Così, la scelta della metodologia del progetto di studio ha un grande impatto sui risultati che si otterranno.

In questi termini, la biodisponibilità dipende strettamente dalla bioaccessibilità. In generale, i processi di assorbimento e di trasporto di molti dei composti potenzialmente bioattivi di frutta e verdura sono molto complessi e non pienamente compresi, quindi, la previsione della loro biodisponibilità è abbastanza problematica.

Alla luce di questa evidenza, è chiaro che l'influenza della lavorazione sulla bioaccessibilità e sul contenuto di carotenoidi e altre sostanze dipende dai diversi ingredienti funzionali studiati e dai diversi metodi di processazione adottati.

Il presente lavoro di dottorato s'inserisce in questo contesto, ed ambisce a fornire dei risultati che aiuteranno la ricerca scientifica a meglio comprendere i complessi e controversi meccanismi alla base dell'assorbimento dei carotenoidi.

Bibliografia

- Aherne S, Jiwan M, Daly T, O'Brien N (2009) Geographical location has greater impact on carotenoid content and bioaccessibility from tomatoes than variety. *Plant Food Hum Nutr* 64:250-256
- Aherne S, O'Sullivan L, Jiwan M, Daly T, O'Brien N (2010a) Content and bioaccessibility of carotenoids from sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Proceedings of the Nutrition Society* 69 (OCE6): E509
- Aherne SA, Daly T, Jiwan MA, O'Sullivan L, O'Brien NM (2010b) Bioavailability of β -carotene isomers from raw and cooked carrots using an in vitro digestion model coupled with a human intestinal Caco-2 cell model. *Food Res Int* 43:1449-1454
- Blanquet S, Zeijdner E, Beyssac E, Meunier JP, Denis S, Havenaar R, Alric M (2004) A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. *Pharm Res* 21:585-591
- Blanquet-Diot S, Soufi M, Rambeau M, Rock E, Alric M (2009) Digestive stability of xanthophylls exceeds that of carotenes as studied in a dynamic *in vitro* gastrointestinal system. *J Nutr* 139:876-883
- Bleiel J (2010) Functional foods from the perspective of the consumer: How to make it a success? *Int Dairy J* 20:303-306
- Bone RA, Landrum JT, Dixon Z, Chen Y, Llerena CM (2000) Lutein and zeaxanthin in the eyes, serum and diet of human subjects. *Exp Eye Res* 71:239-245
- Borel P, Grolier P, Armand M, Partier A, Lafont H, Lairon D, Azais-Braesco V (1996) Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *J Lipid Res* 37:250-261

- Bugianesi R, Salucci M, Leonardi C, Ferracane R, Catasta G, Azzini E, Maiani G (2004) Effect of domestic cooking on human bioavailability of naringenin, chlorogenic acid, lycopene and β -carotene in cherry tomatoes. *Eur J Nutr* 43:360-366
- Castenmiller JJM, West CM, Linssen JPH, van het Hof KH, Voragen AGJ (1999) The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of β -carotene and to a lesser extent of lutein in humans. *J Nutr* 129:349-355
- Cooper DA (2004) Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *J Nutr* 134:221-224
- D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Sczzocchio B, Masella R (2010) Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci* 11:1321-134
- Day L, Seymour RB, Pitts KF, Konczak I, Lundin L (2009) Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends Food Sci Tech* 20:388-395
- de Pascual-Teresa S, Hallund J, Talbot D, Schroot J, Williams CM, Bugel S, Cassidy A. (2006) Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. *J Nutr Biochem* 17:257-264
- de Pee S, West CE, Muhilal, Karyadi D, Hautvast, JGAJ (1995) Lack of improvement in vitamin A status with increased consumption of dark-green leafy vegetables. *Lancet* 346:75-81
- Deat E, Blan uet-Diot Sp, Jarrige J-Fo, Denis S, Beyssac E, Alric M (2009) Combining the Dynamic TNO-Gastrointestinal Tract System with a Caco-2 Cell Culture Model: Application to the Assessment of Lycopene and α -Tocopherol Bioavailability from a Whole Food. *J Agric Food Chem* 57:11314-11320
- Dimitrov NV, Meyer C, Ullrey DE, Chenoweth W, Michelakis A, Malone W, Boone C, Fink G (1998) Bioavailability of b-carotene in humans. *Am J Clin Nutr* 48:298-304

- During A, Harrison E (2005) An in vitro model to study the intestinal absorption of carotenoids. *Food Res Int* 38:1001-1008
- Eliassen AH, Hendrickson SJ, Brinton LA, Buring JE, Campos H, Dai Q, Dorgan JF, Franke AA, Gao YT, Goodman MT, Hallmans G, Helzlsouer KJ, Hoffman-Bolton J, Hultén K, Sesso HD, Sowell AL, Tamimi RM, Toniolo P, Wilkens LR, Winkvist A, Zeleniuch-Jacquotte A, Zheng W, Hankinson SE (2010) Circulating carotenoids and risk of breast cancer: Pooled Analysis of eight Prospective Studies. *J Natl Cancer Inst* 104:1905-1916
- Fairweather-Tait S (1996) Bioavailability of dietary minerals. *J Intern Med* 235:192-193
- Fernández-García E, Carvajal-Lérida I, Pérez-Gálvez A (2009) *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr Res* 29:751-760
- Ferruzza S, Rossi C, Scarino ML, Sambuy Y (2012) A protocol for differentiation of human 1 intestinal Caco-2 cells in asymmetric serum-containing medium. *Toxicol In Vitro* 26:1252-1255
- Freedonia Group Inc (2015) World nutraceutical ingredients; Demand to increase 7.2% annually through [web] 2011. Available at www.marketresearch.com/Freedonia-Group-13-Inc-v1247/Nutraceutical-Ingredients-6694298
- Gardana C, Canzi E, Simonetti P (2009) The role of diet in the metabolism of daidzein by human 18 faecal microbiota sampled from Italian volunteers. *J Nutr Biochem* 20: 940-947
- Gibson RS (2007) The role of diet-and host-related factors in nutrient bioavailability and thus in nutrient-based dietary requirement estimates. *Food Nutr Bull* 28:77S-100S
- Goñi I, Serrano J, Saura-Calixto F (2006) Bioaccessibility of β -carotene, lutein, and lycopene from fruits and vegetables. *J Agric Food Chem* 54:5382-5387

- Granado F, Olmedilla B, Herrero C, Perez-Sacristan B, Blanco I, Blazquez S (2006) Bioavailability of carotenoids and tocopherols from broccoli: *in vivo* and *in vitro* assessment. *Exp Biol Med* 231:1733-1738
- Granado-Lorencio F, Herrero-Barbudo C, Olmedilla-Alonso B, Blanco-Navarro I, Pérez-Sacristán B (2010a) Lutein bioavailability from lutein ester-fortified fermented milk: *in vivo* and *in vitro* study. *J Nutr Biochem* 21:133-139
- Granado-Lorencio F, Lopez-Lopez I, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I, Cofrades S, Perez-Sacristan B, Delgado-Pando G, Jimenez-Colmenero F (2010b) Lutein-enriched frankfurter-6 type products: Physicochemical characteristics and lutein *in vitro* bioaccessibility. *Food Chem* 120:741-748
- Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Perez-Sacristan, B, Blanco-Navarro I, Blazquez-Garcia S (2007) Comparative *in vitro* bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. *J Agric Food Chem* 55:6387-6394
- Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M (2012) Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol* 30:591-600
- Hedren E, Diaz V, Svanberg U (2002) Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method. *Eur J Clinical Nutr* 56:425-430
- Hemery YM, Anson NM, Havenaar R, Haenen GR, Noort MW, Rouau X (2010) Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions. *Food Res Int* 43:1429-1438
- Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI (2007) Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innov Food Sci Emerg* 8:407-412

- Kern SM, Bennett RN, Fred A, Kroon PA, Garcia-Conesa M-T (2003) Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. *J Agric Food Chem* 51:6050-6055
- Lampe JW, Karr SC, Hutchins AM, Slavin JL (2009) Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Exp Biol Med* 1998; 217: 335-339
- Lu L, Anderson KE (1998) Sex and long-term soy diets affect the metabolism and excretion of soy isoflavones in humans. *Am J Clin Nutr* 68:1500S-1504S
- Machlin LJ (1995) Critical assessment of the epidemiological data concerning the impact of antioxidant nutrients on cancer and cardiovascular disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35:41-50
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81(1):230-242
- Mazzeo T, N'Dri D, Chiavaro E, Visconti A, Fogliano V, Pellegrini N (2011) Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. *Food Chem* 128:627-633
- Micozzi MS, Brown ED, Edwards BK, Bieri JG, Taylor PR, Khachik F, Beecher GR, Smith Jr. JC (1992) Plasma carotenoid response to chronic intake of selected foods and beta-carotene supplements in men. *Am J Clin Nutr* 55:1120-1125
- Mullen W, Stewart AJ, Michael E, Gardner P, Duthie GG, Crozier A (2002) Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J Agric Food Chem* 50:5197-5201
- Napolitano A, Cascone A, Graziani G, Ferracane R, Scalfi L, Di Vaio C, Ritieni A, Fogliano V (2004) Influence of variety and storage on the polyphenol composition of apple flesh. *J Agric Food Chem* 52:6526-6531

- Nolan JD, Johnston IM, Walters JR (2012) Physiology of malabsorption. *Surgery (Oxford)* 30:268-274
- O'Sullivan L, Jiwan MA, aly T, O'Brien NM, Aherne SA (2010) Bioaccessibility, uptake, and transport of carotenoids from peppers (*Capsicum* Spp.) Using the coupled *in vitro* digestion and human intestinal Caco-2 cell model. *J Agric Food Chem* 58:5374-5379
- Otsuki M (2002) Pathophysiological role of cholecystokinin in humans. *J Gastroen Hepatol* 15:71-83
- Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, Gonzalez-Aguilar GA (2011) The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science* 76(1):6-15
- Perez J, Serrano J, Taberner M, Arranz S, Diaz ME, Garcia L, Goni I, Saura F (2009) Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods Hum Nutr* 64:102-107
- Poor CL, Bierer TL, Merchen NR, Fahey GC, Erdman JW (1993) The accumulation of α -and β -carotene in serum and tissues of pre-ruminant calves fed raw and steamed carrot slurries. *J Nutr* 123:1296-1304
- Rodriguez-Amaya DB (2010) Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids - A review. *J Food Compos Anal* 23: 726-740
- Rodríguez-Bernaldo de Quiros AR, Costa HS (2006) Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: a review. *J Food Compos Anal* 9:97-111
- Roels OA, Trout M, Dujacquier R (1958) Carotene balances on boys in Ruanda where vitamin A deficiency is prevalent. *J Nutr* 65:115-127

- Schlagheck TG, Riccardi KA, Zorich NL, Torri SA, Dugan LD, Peters JC (1997) Olestra dose response on fat-soluble and water-soluble nutrients in humans. *J Nutr* 127:1646S-1665S
- Serra A, Macià A, Romero MP, Valls J, Bladé C, Arola L, Motilva MJ 2010 Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in *in vitro* and *in vivo* models. *Brit J Nutr* 103:944
- Shiau A, Mobarhan S, Stacewicz-Sapuntzakis M, Mobarhan S, Stacewicz-Sapuntzakis M, Benya R, Liao Y, Ford C, Bowen P, Friedman H, Frommel TO (1994) Assessment of the intestinal retention of beta-carotene in humans. *J Am Coll Nutr* 13:369-375
- Tamura M, Iwami T, Hirayama K, Itoh K (2009) High Fiber Diet Supplemented with Rice Bran Hemicellulose May Reduce Daidzein Absorption in Mice. *Food Sci Technol Res* 15:141-146
- Tousen Y, Uehara M, Kruger MC, Ishimi Y (2012) Effects of dietary fibre and tea catechin, 8 ingredients of the Japanese diet, on equol production and bone mineral density in isoflavone-treated ovariectomised mice. *Journal of Nutritional Science* 1(13):1-9
- Trendelenburg P (2006) Physiological and pharmacological investigations of small intestinal peristalsis. *N-S Arch Pharmacol* 373:101-133
- Tumuhimbise G, Namutebi A, Muyonga J (2010) Changes in microstructure, beta carotene content and *in vitro* bioaccessibility of orange-fleshed sweet potato roots stored under different 21 conditions. *African J Food Agric Nutr Devel* 10:3015-3028
- Van Buggenhout S, Alminger M, Lemmens L, Colle I, Knockaert G, Moelants K, Van Loey A, Hendrickx M (2010) *In vitro* approaches to estimate the effect of food processing on carotenoid bioavailability need thorough understanding of process induced microstructural changes. *Trends in Food Sci Technol* 21:607-618

- van het Hof KH, de Boer BCJ, Tijburg LBM, Lucius BRHM, Zijl I, West CE, Hautvast JGAJ, Weststrate JA (2000) Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the 12 triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after 13 four days of consumption. *J Nutr* 130:1189-1196
- van het Hof KH, Tijburg LB, Pietrzik K, Weststrate JA (1999) Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix. *Brit J Nutr* 82:203-212
- van het Hof KH, West CE, Weststrate JA, Hautvast JG (2008) Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr* 130:503-506
- Walsh KR, Zhang YC, Vodovotz Y, Schwartz SJ, Failla ML (2003) Stability and bioaccessibility of isoflavones from soy bread during *in vitro* digestion. *J Agric Food Chem* 51:4603-4609
- Weststrate JA, van het Hof KH (1995) Sucrose polyester and plasma carotenoid concentrations in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 62:591-597
- White WS, Peck KM, Ulman EA, Erdman JW (1993) The ferret as a model for evaluation of the bioavailabilities of all-trans- β -carotene and its isomers. *J Nutr* 123:1129-1139
- Yonekura L, Nagao A (2007) Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol Nutr Food Res* 51:107-115
- Zheng Y, Hu J, Murphy PA, Alekel DL, Franke WD, Hendrich S (2003) Rapid gut transit time and slow fecal isoflavone disappearance phenotype are associated with greater genistein bioavailability in women. *J Nutr* 133:3110-3116

SEZIONE SPERIMENTALE

INTRODUZIONE

I frutti delle piante del genere *Capsicum* sono stati tra i più antichi, i più importanti, e ampiamente utilizzati additivi alimentari in tutto il mondo grazie alla loro combinazione di colore, sapore e valore nutritivo. Essi sono usati come aromatizzanti, coloranti, nonché per aggiungere gusto ai cibi. I peperoncini sono stati oggetto di studio principalmente perché fonte di capsaicina, sostanza responsabile della piccantezza (Oboh et al., 2007), ma sono oramai ben noti per essere ricchi di sostanze fisiologicamente attive, come i composti fenolici ed i carotenoidi, pigmenti naturali e agenti antiossidanti (Kim et al., 2008).

Negli ultimi anni sta crescendo notevolmente l'interesse nei confronti della corretta alimentazione e in particolare riguardo alla tipologia, concentrazione, proprietà benefiche, meccanismi chimico-fisici di tutte quelle sostanze note per contribuire in maniera positiva allo stato di benessere psico-fisico dell'uomo.

L'attività di ricerca svolta durante il corso di Dottorato ha focalizzato l'attenzione sulla valutazione del contenuto e della bioaccessibilità di carotenoidi in frutti di peperoncino (*Capsicum*). Tale attività è stata svolta durante lo stage di dodici mesi presso l'UCC (University College of Cork), nell'unità di ricerca di biochimica degli alimenti diretta dalla Professoressa Nora O'Brien, che da anni si occupa di queste tematiche.

Parallelamente, presso il laboratorio di Scienze e Tecnologie Alimentari e Fitofarmacia si è analizzata, tramite l'utilizzo di diversi test, l'attività antiossidante e la composizione fitochimica (polifenoli, flavonoidi, capsaicinoidi) degli estratti ottenuti dalla macerazione dei frutti di peperoncino.

Naturalmente, essendo lo scopo del presente lavoro di dottorato quello di approfondire le conoscenze sull'effetto dei metodi di processazione tipici della tradizione calabrese, i frutti sono stati analizzati, oltre che allo stato fresco, anche dopo averli sottoposti a tre diversi metodi di processazione, quali la cottura (per dieci minuti in acqua bollente), il congelamento (per 4 mesi in un comune

congelatore domestico ed alla temperatura di -20°C) e l'essiccazione (ottenuta tramite l'esposizione dei frutti per un mese al sole in ambiente aperto e areato).

Le venti differenti cultivar di peperoncino prese in esame appartenevano a quattro diverse specie (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chacoense* e *C. chinense*) e apparivano di colorazione differente (Vedi Tabella generale e Figure generali).

Considerando che i carotenoidi sono pigmenti naturali responsabili della colorazione di frutta e verdura, la diversa colorazione dei peperoncini oggetto d'indagine potrebbe essere l'evidenza macroscopica di un diverso contenuto di questi pigmenti.

Bibliografia

- Kim S, Ha TY, Park J (2008) Characteristics of pigment composition and colour value by the difference of harvesting times in Korean red pepper varieties (*Capsicum annuum*, L.). J Eur Food Res Technol 43:915-920
- Oboh G, Puntel RL, Rocha JBT (2007) Hot pepper (*Capsicum annuum*, Tepin and *Capsicum chinese*, Habanero) prevents Fe²⁺-induced lipid peroxidation in brain-*in vitro*. Food Chem 102:178-185

Tabella generale: campioni di peperoncino oggetto del lavoro di dottorato

	Specie	Cultivar	Colore	Piccantezza*
1	<i>C. annuum</i>	Yellow Cayenne	giallo	3
2	<i>C. annuum</i>	Portafortuna	rosso	2
3	<i>C. annuum</i>	Idealino	rosso	3
4	<i>C. annuum</i>	Sole	rosso	1
5	<i>C. baccatum</i>	Campana	rosso	2
6	<i>C. annuum</i>	Duemila	rosso	2
7	<i>C. annuum</i>	Pellegrino	rosso	5
8	<i>C. annuum</i>	Fantasia	rosso	5
9	<i>C. chacoense</i>	Chaco	rosso	8
10	<i>C. annuum</i>	Loco	rosso	3
11	<i>C. baccatum</i>	Aji Angelo	rosso	5
12	<i>C. annuum</i>	Effix	rosso	4
13	<i>C. annuum</i>	Acrata	rosso	6
14	<i>C. annuum</i>	O di Giotto	rosso	5
15	<i>C. annuum</i>	Arlecchino	rosso	3
16	<i>C. annuum</i>	Nobile	rosso	3
17	<i>C. annuum</i>	Taballo	arancione	6
18	<i>C. annuum</i>	Border	rosso	4
19	<i>C. annuum</i>	Hierro	rosso	4
20	<i>C. chinense</i>	Capezzolo di scimmia	arancione	3

* Media valore attribuito da analisi sensoriale su frutto fresco (panel 5 persone) – Limite valori 1-10

Figure generali: campioni di peperoncino oggetto del presente studio



1 cv Cayenna Yellow



2 cv Portafortuna



3 cv Idealino



4 cv Sole



6 cv Campana



5 cv Duemila



7 cv Pellegrino



8 cv Fantasia

Figure generali (cont.): campioni di peperoncino oggetto del presente studio



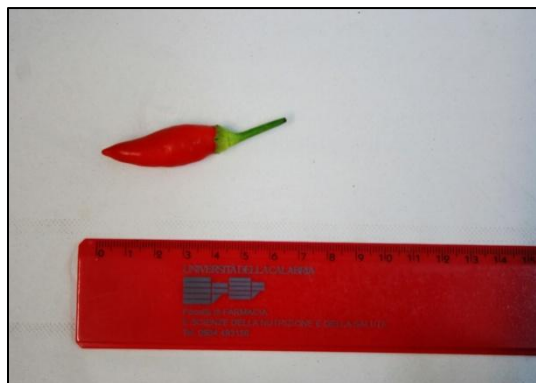
9 cv Chaco



10 cv Loco



11 cv Aji Angelo



12 cv Effix



13 cv Acrata



14 cv O di Giotto



15 cv Arlecchino



16 cv Nobile

Figure generali (cont.): campioni di peperoncino oggetto del presente studio



17 cv *Taballo*



18 cv *Border*



19 cv *Hierro*



20 cv *Capezzolo di Scimmia*

Capitolo 7

Bioaccessibilità di carotenoidi da frutti di peperoncino processati

C'è un interesse crescente per la determinazione dei carotenoidi nella frutta e verdura consumata quotidianamente. I carotenoidi consumati come parte di una dieta regolare possono promuovere effetti antiossidanti *in vivo* e la loro presenza è associata alla riduzione dell'insorgenza di molte gravi malattie (Cook & Samman, 1996; Kaur & Kapoor, 2001; Moure et al., 2001).

I carotenoidi sono responsabili dei diversi e attraenti colori dei peperoncini, dal bianco al rosso intenso (Howard, 2001).

La composizione e la concentrazione di carotenoidi nei peperoncini possono variare a causa di differenze nella genetica e nella maturazione (Markus et al., 1999) e dipende anche da fattori quali la conservazione post-raccolta, la trasformazione e l'elaborazione (Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al., 2006).

I carotenoidi sono terpenoidi con un minimo di quaranta atomi di carbonio formati dalla condensazione di otto unità di isoprene contenenti nove doppi legami nella catena polienica centrale e aventi diverse strutture di anello in una o entrambe le estremità della molecole che determinano le proprietà di cromofori. E' possibile classificare i carotenoidi dei peperoncini in due famiglie isocromiche: rosso e giallo (Tundis et al., 2012).

Mentre la clorofilla contribuisce al colore verde (Marin et al., 2004), l' α - e il β -carotene, la zeaxantina, la luteina e la β -criptoxantina sono responsabili del colore giallo-arancio (Howard, 2001). Il rosso dei frutti della pianta di *Capsicum* è, invece, dovuto alla presenza di capsantina e capsorubina (Matsufuji et al., 1998).

Numerosi studi epidemiologici hanno associato il consumo di cibi ricchi di carotenoidi a un ridotto rischio di diverse malattie croniche umane (Rao & Rao, 2007).

I presunti benefici per la salute del peperoncino sono stati attribuiti, in parte, al contenuto di carotenoidi. Infatti, questi composti liposolubili hanno dimostrato di proteggere contro alcuni tumori, prevenire le ulcere gastriche, stimola il sistema immunitario, la protezione contro le malattie cardiovascolari, la degenerazione maculare senile e la cataratta (Krinsky & Johnson, 2005).

Come già detto, i carotenoidi sono presenti a concentrazioni elevate nei frutti di peperoncino, tuttavia la biodisponibilità dei carotenoidi può essere altamente variabile (Faulks & Southon, 2005).

Gli attuali metodi per stimare la biodisponibilità dei carotenoidi includono modelli sia a breve sia a lungo termine sugli esseri umani (Micozzi et al., 1992; de Pee et al., 1995; Castenmiller et al., 1999; Roels et al., 1958; Shiau et al., 1994) e in modelli animali (White et al., 1993; Poor et al., 1993; Hedren et al., 2002).

Tuttavia, gli studi su umani e animali hanno un certo numero di limitazioni che riguardano: i costi, la limitazione del numero di campioni che possono essere studiati, le difficoltà nell'interpretazione dei dati vista l'influenza di fattori ospite-correlati, come la salute dell'intestino, lo stato nutrizionale e il genotipo (Van Buggenhout et al., 2010).

L'uso di metodi *in vitro* fornisce un'alternativa agli studi umani e animali ed risulta essere un modello più riproducibile per la stima della biodisponibilità e bioaccessibilità dei carotenoidi.

Mentre col termine biodisponibilità s'intende la misura di composto che raggiunge il torrente ematico, la parola bioaccessibilità descrive la frazione di un nutriente rilasciato dalla matrice alimentare durante la digestione, trasferito alle micelle e reso così disponibile all'assorbimento da parte della mucosa intestinale (Van Buggenhout et al., 2010).

È possibile determinare la bioaccessibilità di un carotenoide misurando la quantità trasferita alla frazione micellare seguendo una procedura di digestione simulata *in vitro* (Jiwan et al., 2010).

Questo metodo è adatto per lo screening di routine di alimenti vegetali e può essere utilizzato come indicatore della potenziale biodisponibilità dei carotenoidi (Garrett et al., 2000; Hornero-Méndez et al., 2000).

Nella dieta mediterranea, il peperoncino è mangiato in forma cruda, cotta, o processata. Alcuni metodi tipici di lavorazione comprendono il congelamento del frutto, la sua cottura e l'essiccazione.

La disidratazione comporta la rimozione di acqua in un alimento a un livello in cui le reazioni microbiche sono minimizzate ed è uno dei metodi più usati per la conservazione di frutta e verdura. Un metodo di conservazione ottimale diminuisce l'attività dell'acqua, mantenendo la consistenza, i valori nutrizionali e le proprietà fisiche del cibo (Chenlo et al., 2006).

Già esistono studi che riportano l'effetto del trattamento sul contenuto di carotenoidi di verdure (Ryan et al., 2008; Nunn et al., 2006) tuttavia, le informazioni sugli effetti dei diversi metodi di processazione sul contenuto e sulla bioaccessibilità dei carotenoidi nei peperoncini sono limitate.

Questi processi possono influenzare il contenuto e la bioaccessibilità dei carotenoidi contenuti negli alimenti. La bioaccessibilità dei carotenoidi, e dunque la biodisponibilità, è influenzata dalle proprietà fisico-chimiche del carotenoide, dalla matrice alimentare, dalla presenza di promotori e inibitori di assorbimento di carotenoidi come grassi e fibre nel pasto (O'Connell et al., 2007) e dal tipo di processazione (Hedren et al., 2002; Thakkar et al., 2007; Garrett et al., 2000; Rock et al., 1998).

Alcuni studi (Palafox-Carlos et al., 2011) evidenziano, infatti, che la fibra può intrappolare le molecole di lipidi e sali biliari evitando la formazione di micelle con i carotenoidi e bloccando l'assorbimento passivo nel piccolo intestino. Inoltre, poiché le fibre aumentano la viscosità del contenuto intestinale, si avrà una riduzione dell'assorbimento di antiossidanti a causa sia della rallentata attività enzimatica nel pancreas sia della maggiore difficoltà di avvicinarsi agli enterociti intestinali. Tutti i carotenoidi, i lipidi e i sali biliari che non vengono assorbiti perché intrappolati con la fibra alimentare passano al crasso, dove i

polisaccaridi sono idrolizzati dai batteri e i carotenoidi possono eventualmente esercitare la loro attività antiossidante nell'ambiente del crasso.

7.1 Materiali e metodi

7.1.1 Preparazione del campione

Nel mese di Ottobre 2011 sono stati raccolti, a maturazione ultimata e presso l'azienda Miceli srl, i frutti di peperoncino delle venti cultivar (Vedi Tabella generale nel capitolo introduttivo).

I frutti sono stati esaminati al fine di eliminare eventuali residui di polvere e/o insetti. Tutte le varietà hanno ricevuto un quantitativo simile di acqua ed di fertilizzante e sono stati raccolti completa maturazione. La procedura di digestione *in vitro* è stata eseguita secondo il metodo di Aherne et al. (2009).

Tutte le operazioni di lavorazione dei campioni, sono state eseguite in laboratori dotati di luce gialla, così da minimizzare l'eventuale foto-decomposizione dei carotenoidi.

Essendo lo scopo del presente lavoro di dottorato quello di approfondire le conoscenze sull'effetto dei metodi di processazione tipici della tradizione calabrese, i frutti sono stati analizzati, oltre che allo stato crudo (fresco), anche dopo averli sottoposti a tre metodi di processazione: cottura, congelamento e essiccazione. La procedura di cottura è stata eseguita immergendo i peperoncini in acqua bollente e cuocendoli per dieci minuti; al fine di simulare il tipico metodo tradizionale e domestico di conservazione dei peperoncini tramite l'utilizzo della basse temperature si è proceduto al congelamento in un tipico freezer domestico (-20°C) per un periodo di mesi; mentre come metodo di essiccazione i peperoncini sono stati essiccati al sole secondo la metodologia tradizionale. Questo tradizionale metodo di conservazione degli alimenti consiste nel lasciare all'aria aperta e al sole i peperoncini freschi e lasciarli appesi a un

filo per un mese e fino a completa essiccazione. I frutti sono infilati e appesi interi e intatti, con i semi ancora all'interno del frutto.

I frutti sono stati lavati con acqua distillata deionizzata e sono stati tagliati longitudinalmente in pezzettini standardizzati al fine di garantire quanto più possibile la replicazione delle condizioni. Dopo averne pesato approssimativamente 2 g, i frutti sono stati omogeneizzati in 5 mL di HBSS (Hank's Buffered Salt Solution).

7.1.2 Digestione *in vitro*

La digestione è stata eseguita aggiungendo all'omogeneizzato pepsina suina sciolta in HCl 0.1 M e acidificando con HCl 1 M fino a pH 2. Subito dopo i campioni sono stati incubati in bagnetto termostato (37°C) sotto agitazione per simulare al meglio la fase gastrica. Dopo un'ora si è innalzato il pH a 5.3 con bicarbonato di sodio e sono stati aggiunti alla soluzione i sali biliari (glicodeossicolato 0.8 mmol/L, taurodeossicolato 0.45 mmol/L e taurocolato 0.75 mmol/L), la pancreatina suina (0.08 g/mL) e l'enzima colesterolo esterasi (1U/mL). Granado-Lorencio et al. (2007a) furono i primi a introdurre l'uso della colesterolo esterasi nel modello di digestione *in vitro*. Infatti, loro per primi capirono l'importanza di usare questo enzima, fondamentale per scindere eventuali esteri dei carotenoidi.

Dopo aver portato il pH di ciascun campione al valore di 7.4 utilizzando NaOH il volume è stato uniformato a 20 mL aggiungendo HBSS.

Quindi, i campioni sono stati incubati per 2.5 ore in bagnetto termostato e orbitante per altre due ore così da completare la simulazione della fase intestinale.

Cinque millilitri della soluzione risultante sono stati ultracentrifugati per 95 min al fine di isolare le micelle contenenti il materiale lipofilo. Il surnatante di ogni campione è stato raccolto con una siringa sterilizzata ed è stato filtrato per rimuovere eventuali aggregati microcristallini.

7.1.3 Estrazione di carotenoidi e saponificazione

Una volta ottenuta la separazione delle micelle si è potuto procedere all'estrazione dei carotenoidi così da separarli dal resto della componente lipidica indesiderata, dalla clorofilla e da altre sostanze che potrebbero interferire come i prodotti di degradazione degli esteri dei carotenoidi (Olives-Barba et al., 2006; Granado et al., 2001).

L'inclusione di questo passaggio non comporta alcuna perdita di contenuto di carotenoidi (O'Sullivan et al., 2008).

Nello specifico, i campioni sono stati estratti due volte per mezzo di una soluzione esano/etanolo/acetone (50:25:25 v/v/v) e centrifugati per 5 min. Quindi si è potuto saponificare con KOH ed estrarre per mezzo di una soluzione di diclorometano/metanolo 5:1. I risultanti surnatanti sono stati rimossi, riuniti ed essiccati.

I campioni sono stati quindi congelati e conservati a -80°C sotto azoto fino al momento dell'analisi in HPLC.

La medesima estrazione è stata eseguita sul frutto prima dell'operazione digestiva, così da poter comparare il contenuto di carotenoidi prima e dopo la digestione.

7.1.4 Analisi HPLC

I vari campioni precedentemente congelati a -80°C sono stati ricostituiti sciogliendo il contenuto secco in 1 mL di soluzione di metanolo e etilacetato (MeOH/ EtOAc) 4:1. Successivamente, 20 microlitri della soluzione preparata sono stati iniettati in HPLC. Lo strumento è dotato di una colonna YMC C30 a fase inversa. I campioni sono stati fatti eluire tramite l'utilizzo di due fasi mobili costituite la prima (A) da metanolo/acqua (10 mmol/L acetate di ammonio) e la seconda (B) da Terz-metil-butil-etero (4.5 mmol/L idrossitoluene butilato, e 3.6

mmol/L di trietilammina). Si è proceduto a una analisi in eluizione a gradiente così da permettere una ottimale separazione dei picchi dei relativi carotenoidi: 95% di A per 35° minuti, 62% di A al 36° minuto, 32% A al 39° minuto, e successivamente di nuovo a 95% di A al 45° minuto, ed, infine, 10 minuti di A al 100%. La velocità di eluizione è stata impostata ad 1 mL/min e l'analisi dei picchi è stata effettuata a 450 nm.

I risultati sono stati raccolti e analizzati mediante il software ChromQuest.

Le concentrazioni dei carotenoidi sono state calcolate confrontando i tempi di ritenzione e le aree delle rispettive curve con quelle di autentici standard di carotenoidi. Infine, grazie all'utilizzo di β -apo-8'-carotenale come standard interno si potrà correggere il valore ottenuto dal precedente calcolo così da tener conto dell'efficienza della metodica estrattiva.

7.1.5 Analisi statistica

Col termine bioaccessibilità s'intende la frazione di un nutriente disponibile per l'assorbimento da parte della mucosa dell'intestino durante la digestione umana. Essa viene quantificata calcolando la quantità di carotenoide presente nelle micelle rispetto alla quantità di carotenoide presente nel cibo crudo non digerito. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. I dati sono stati espressi come media \pm SEM. I risultati tra le diverse cultivar di peperoncino e tra i diversi metodi di processazione sono stati analizzati mediante il test della varianza ANOVA a due vie seguito dal test di Bonferroni come post hoc test. Queste statistiche sono state eseguite col programma Prism GraphPad versione 5.0 per Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, Stati Uniti d'America).

7.2 Risultati e Discussioni

I carotenoidi possiedono varie proprietà, ad esempio attività antiossidante, di provitamina A, di segnalazione cellulare e di protezione contro la degenerazione

maculare correlata all'età (Rao e Rao, 2007; Strobel et al., 2007.; Stahl e Sies, 2005).

Pochi carotenoidi sono assorbiti in quantità tali da essere rilevati nel plasma umano (Khachik et al., 1992) e i carotenoidi α -carotene, β -carotene, licopene, β -criptoxantina, luteina e zeaxantina risultano essere circa il 90% dei carotenoidi trovati nel plasma umano (Bieri et al., 1985).

La biodisponibilità dei carotenoidi dopo un pasto è influenzata da molti fattori come la presenza di grassi, di fibre e di altri carotenoidi (Castenmiller & West, 1998).

In questa prima sezione saranno commentati i risultati relativi alle analisi effettuate sulle venti cultivar di peperoncino (*C. annuum*) prima e dopo processazione, ovvero dopo bollitura (dieci minuti in acqua bollente) e dopo congelamento (quattro mesi a -20°C). Mentre i risultati ottenuti dalle analisi effettuate sui campioni essiccati saranno considerati successivamente ed in maniera separata, vista l'oggettiva impossibilità di comparare i valori ottenuti da una matrice secca con quelli ottenuti da una matrice fresca e molto ricca dell'acqua di vegetazione. E' importante, infatti, sottolineare che i vari metodi di processazione possono alterare la quantità di acqua presente nella matrice vegetale. Nel presente studio abbiamo analizzato la possibile perdita di acqua causata dai metodi di processazione adottati e abbiamo riscontrato come la bollitura, ed in misura minore il congelamento, alterino minimamente il contenuto di acqua dei peperoncini analizzati (Tabella 7.15). Diversamente, l'essiccazione dei frutti di *Capsicum* causa una perdita media del 74.11 per cento di peso del frutto. A causa di ciò non ci è sembrato utile paragonare i risultati ottenuti dagli studi condotti sui peperoncini secchi con quelli ottenuti dagli altri metodi di processazione e dai frutti freschi. Quindi, le discussioni riguardanti lo studio del contenuto e della bioaccessibilità di carotenoidi nei frutti secchi saranno discusse separatamente da quelle riguardanti i peperoncini freschi, bolliti e congelati, per i quali l'alterazione sul contenuto di acqua riscontrato non è stata tale da dover essere presa in considerazione.

7.3 Risultati e discussioni del contenuto e della bioaccessibilità di carotenoidi da frutti di peperoncino freschi, bolliti e congelati

7.3.1 Contenuto carotenoidi

Secondo Aherne et al. (2009) e Guil-Guerrero et al. (2006) la varietà della piante è un fattore determinante sia per la composizione che per il contenuto di pigmenti vegetali come i carotenoidi. Abbiamo trovato un alto livello di variabilità nel contenuto di carotenoidi nelle venti cultivar di peperoncino oggetto d'indagine. Il contenuto totale di carotenoidi, determinato dalla somma degli otto carotenoidi quantificati nel presente studio, è massima nella cultivar Portafortuna (6991.0 µg/100g) e minimo nella cultivar Capezzolo di Scimmia (146.7 µg/100g) (Tabella 7.1).

I peperoncini rossi sono una fonte di alcuni carotenoidi unici del genere *Capsicum*, quali la capsantina e la capsorubina. La capsantina è stato uno dei carotenoidi rilevati in concentrazioni più elevate nei peperoni non processati (282.6-1865.3 µg/100g) (Hornero-Méndez et al, 2000).

Il carotenoide presente in concentrazioni più alte è stato il β-carotene (2310.9 – 10.4 µg/100g) e la β-criptoxantina (1587.5 – 9.0 µg/100g) che è stato rilevato a concentrazioni di poco inferiori alla capsantina (1865.3 – 0.0 µg/100g). Antheraxantina (527.8 – 13.7 µg/100g), violaxantina (1119.0 – 9.4 µg/100g) e zeaxantina (448.4 – 0.0 µg/100g) hanno riportato concentrazioni molto simili. Luteina (613.7 – 0.0 µg/100g) e neoxantina (82.2 – 0.0 µg/100g) sono risultati essere i carotenoidi meno abbondanti nei peperoncini rossi non processati ed hanno mostrato livelli più alti nel campione arancione Taballo e nel giallo Cayenna Yellow (613.7 – 0.0 µg/100g e 82.2 – 0.0 µg/100g rispettivamente).

Come in precedenza riportato da Minguez-Mosquera & Hornero-Mendez (2004) la capsantina è un carotenoide molto presente nei peperoncini rossi, con contenuti che vanno da 229.9 a 847.5 µg/100g di frutto. O'Sullivan et al. (2010a)

hanno comparato il contenuto di carotenoidi di peperoncini rossi di due varietà di peperoncino provenienti dal Kenya e dalla Turchia, e hanno scoperto che il contenuto di β -carotene variava da 5241.6 a 34137.3 $\mu\text{g}/100\text{g}$, la β -criptoxantina da 2484.0 a 3338.4 $\mu\text{g}/100\text{g}$, la luteina da 1297.9 a 2178.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e la zeaxantina variava da 664.8 a 488.2 $\mu\text{g}/100\text{g}$.

Il congelamento dei peperoncini ha comportato mediamente una lieve diminuzione del contenuto totale di carotenoidi dei campioni freschi (Fig. 5). Trend differente, invece, si è osservato il campione giallo Cayenne Yellow e l'arancione Capezzolo di Scimmia, per i quali si è assistito ad un aumento delle concentrazioni della maggior parte dei carotenoidi analizzati.

Dutta et al. (2009) hanno riscontrato una perdita del 15-20% del contenuto totale di carotenoidi in zucche trattate termicamente, ovvero conservate a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 80 giorni, che è risultata essere inferiore alla diminuzione osservata in seguito a conservazione a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (35-40%) o a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (25-30%). Oruña et al. (1997) hanno, invece, trovato che la quantità di pigmenti in peperoncini Padrón congelati è stata più o meno costante lungo un periodo di 12 mesi.

Nel presente studio, non è stata rilevata capsantina nei frutti di peperoncino giallo (Cayenne Yellow) e arancione (Taballo), sia freschi sia congelati.

Il campione Capezzolo di Scimmia, anch'esso arancione, conteneva, invece, un apprezzabile livello di capsantina (104.1 $\mu\text{g}/100\text{g}$).

Come è possibile osservare nelle tabelle 7.3, 7.4 e 7.5 i valori di zeaxantina, anteraxantina, neoxantina, violaxantina e luteina diminuiscono lievemente dopo trattamento con basse temperature, salvo in alcuni casi in cui la diminuzione risulta significativa ($P < 0.05$). Differente risultato per i carotenoidi con attività di pro vitamina A (β -carotene e β -criptoxantina) per i quali si assiste nella maggioranza dei casi a una forte ($P < 0.05$) diminuzione del contenuto (Tabella 7.6).

La cottura dei frutti di *Capsicum* conferma il trend riportato dai risultati del contenuto di carotenoidi assistito dopo congelamento, salvo riportare, per alcuni campioni (es: Duemila), un aumento dei pigmenti analizzati, spesso in maniera

significativa ($P < 0,05$). In particolare, i campioni Acrata, Effix, Aji Angelo, Loco e Hierro mostrano un aumento, in alcuni casi significativo, del contenuto di capsantina.

Anche in questo caso, l'influenza negativa maggiore ($P < 0,05$) è stata riscontrata per i carotenoidi β -carotene e β -criptoxantina.

È stato precedentemente dimostrato che la processazione alimentare è associata ad una maggiore estrattività e biodisponibilità dei nutrienti liposolubili come il β -carotene (Rickman et al., 2007).

In fagioli congelati non sbollentati Oruña et al. (1997) hanno rilevato che il contenuto di β -carotene era diminuito del 30% dopo un mese, e per un totale del 93% dopo il secondo mese; invece la luteina è diminuita di circa il 58% nel primo mese, ma era più o meno stabile per i successivi undici mesi. Nelle zucche, il contenuto totale di carotenoidi, era diminuito del 13.35% in seguito a riscaldamento a 95 °C per 10 minuti, tuttavia, il contenuto di carotenoidi è stata incrementato a seguito di riscaldamento a temperature comprese tra 55 °C e 75 °C per 10 minuti (Dutta et al., 2009).

Generalmente, quindi, β -carotene, β -criptoxantina, capsantina e violaxantina sono stati generalmente i carotenoidi predominanti nei peperoncini freschi. Con l'eccezione del β -carotene, della β -criptoxantina e, in misura minore, della capsantina, nella maggior parte dei campioni di peperoncino il contenuto dei pigmenti non è stato influenzato significativamente dal trattamento.

Salvo alcune eccezioni, quando si sono verificati cambiamenti nel contenuto di carotenoidi, si è solitamente assistito a una loro diminuzione.

7.3.2 Contenuto micellare e bioaccessibilità

Dopo digestione, la capsantina è stato il carotenoide predominante nelle micelle, maggiormente per l'O di Giotto non processato e a una concentrazione di 460.1 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (Tabella 7.7). Sebbene il β -carotene sia stato il carotenoide rilevato a più alte concentrazioni nei peperoncini non digeriti, nella maggioranza dei campioni

digeriti era presente a concentrazioni molto più basse rispetto alla capsantina e il più alto contenuto di β -carotene nelle micelle è stato di 152.9 $\mu\text{g}/100\text{g}$ nella varietà Pellegrino (Tabella 7.10). Il più alto contenuto di anteraxantina e zeaxantina rilevato nelle micelle è risultato vicino al valore di 100.0 $\mu\text{g}/100\text{g}$, mentre il miglior risultato per la β -criptoxantina è stato di 71.7 $\mu\text{g}/100\text{g}$ trovato nel campione Duemila congelato (Tabella 7.10). Non è stata rilevata anteraxantina nelle micelle delle cultivar gialle e arancioni. La violaxantina è stata rilevata solo nelle micelle di cinque peperoncini freschi non processati (Portafortuna, Aji Angelo, O di Giotto, Arlecchino, Nobile, Border), con una concentrazione maggiore nelle micelle di Portafortuna (62.1 $\mu\text{g}/100\text{g}$). In misura ancora minore il contenuto micellare di violaxantina dopo cottura mentre i frutti congelati hanno riportato valori rilevabili in un più alto numero di peperoncini con valori compresi tra 7.1 $\mu\text{g}/100\text{g}$ del frutto Chaco e 41.3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ del campione Duemila.

Luteina e neoxantina non sono stati rilevati in nessuna micella ad eccezione del frutto di Yellow Cayenna e di Taballo nei quali si è riscontrato un interessante contenuto di luteina sia nei frutti freschi che in quelli processati.

Generalmente, le xantofille sono più bioaccessibili dei caroteni, in quanto, essendo più polari, si distribuiscono sulla superficie dell'emulsione così da poter essere trasferite direttamente nelle micelle miste, mentre caroteni, che si trovano nel cuore idrofobico delle micelle, risultano meno disponibili all'assorbimento (O'Connell et al., 2007).

A conferma di ciò, nel presente studio e nei frutti freschi, i carotenoidi lipofilici, come il β -carotene e la β -criptoxantina hanno avuto una bioaccessibilità inferiore (0.0-7.9% e 0.0-14.3% rispettivamente, se escludiamo il buon risultato di 38.5% del β -carotene e di 53.3% della β -criptoxantina del campione Capezzolo di Scimmia) in confronto a capsantina (0-98.5%), zeaxantina (0.0-74.4% e anteraxantina (0.0-50,1%). Granado-Lorencio et al. (2007b) hanno riscontrato una bioaccessibilità compresa tra 48,0 e 97,0% nei peperoncini rossi. O'Sullivan et al., (2010a), invece, hanno trovato che la bioaccessibilità del β -carotene

variava da 8.2 a 16.9%, della β -criptoxantina da 30.3 a 78.3%, della luteina da 36.3 a 106.2% e della zeaxantina da 34.1 a 106.9%, a seconda del loro colore e del paese di origine.

Nel complesso, la cottura diminuisce la bioaccessibilità di capsantina, zeaxantina e violaxantina, tuttavia, la bioaccessibilità di β -carotene è stata aumentata in diverse cultivar di peperoncino rosso (Portafortuna, Campana, Loco, Effix, Arlecchino, Nobile, Taballo, Capezzolo di Scimmia) e tutte le cultivar di frutti rossi, eccetto il peperoncino Border, hanno mostrato un aumento della bioaccessibilità di β -criptoxantina dopo bollitura (Tabella 7.14) Ryan et al. (2008) trovarono che la micellarizzazione del β -carotene da peperoncino rosso era significativamente aumentata dopo bollitura, tuttavia il contenuto micellare di β -criptoxantina e luteina è stato diminuito a seguito dell'ebollizione. Il congelamento ha comportato un aumento più pronunciato della bioaccessibilità dei carotenoidi in confronto alla cottura, soprattutto della β -criptoxantina e della zeaxantina (Tabella 7.11, 7.14).

Nel presente studio abbiamo trovato anche che la capsantina è stato il carotenoide più abbondante nelle micelle grazie alla sua maggiore bioaccessibilità rispetto al β -carotene, seppur quest'ultimo fosse stato il carotenoidi maggiormente presente nella matrice di frutto fresco (Tabella 7.6).

Border, Pellegrino e Arlecchino sono stati i peperoncini che hanno mostrato un maggior contenuto di carotenoidi nelle micelle (Tabella 7.2). Tuttavia, il contenuto di carotenoidi nelle micelle di ciascuna di queste cultivar è risultato notevolmente diminuito dopo processazione. Il contenuto più alto di carotenoidi da peperoncini congelati è stato riscontrato nelle cultivar Duemila e Aji Angelo, mentre da frutti bolliti nelle cultivar Portafortuna, Sole e Duemila (Tabella 7.2).

7.3.3 Discussione

Molti studi hanno associato i benefici sulla salute del consumare frutta e verdura ricca di carotenoidi con una riduzione del rischio di incorrere in malattie croniche

(Rao & Rao, 2007), ma è noto che l'assorbimento di questi composti può essere molto variabile (Faulks & Southon, 2005).

È possibile determinare la quantità di un nutriente disponibile all'assorbimento intestinale studiando il trasferimento del composto dalla matrice alimentare alle micelle miste. Questo trasferimento è definito bioaccessibilità e rappresenta la frazione di un nutriente accessibile per l'assorbimento intestinale (Van Buggenhout et al., 2010).

I carotenoidi contenuti nei peperoncini sono stati studiati per decenni; gli studi sono stati generalmente eseguiti in cultivar di *Capsicum annuum* e, in misura minore, nelle cultivar di *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. cachoense*.

Nel nostro studio la capsantina, così come il β -carotene e la β -criptoxantina sono risultati carotenoidi molto abbondanti in tutti i genotipi di *C. annuum*, *C. baccatum* e *C. cachoense*; capsantina era presente a concentrazioni significative nella cultivar di frutto arancio (Capezzolo di Scimmia, *C. chinense*), in contrasto con quanto riscontrato negli altri campioni giallo arancione (Cayenna Yellow e Taballo, *C. annuum*). La luteina è stata segnalata come il principale carotenoide nei frutti acerbi di entrambi i genotipi rosso e giallo/arancio di *C. annuum* (Matus et al., 1991).

Tuttavia, il contenuto di luteina diminuisce durante la maturazione nelle varietà rosse, mentre rimane costante o aumenta nelle varietà gialle/arancio (Hornero-Méndez et al., 2000).

A sostegno di questi studi abbiamo trovato una maggiore quantità di luteina nei frutti gialli (Cayenna) e arancione (Taballo) se confrontata con i campioni rossi. È interessante notare che la luteina non è stata rilevata nel peperoncino arancione Capezzolo di Scimmia, appartenente al genere *chinense*.

Il contenuto dei carotenoidi e la bioaccessibilità degli alimenti vegetali sono determinati dalle caratteristiche fisiologiche, genetiche e biochimiche, (Maiani et al., 2009), comprese le specie, la parte della pianta analizzata, il grado di maturazione alla raccolta, la gestione post-raccolta, la provenienza geografica, e la stagione (Chen & Chen, 1992).

Le xantofille sono state segnalate per avere una maggiore bioaccessibilità (Chitchumroonchokchai et al., 2004) se paragonate ai caroteni più lipofili come il β -carotene e la β -criptoxantina che hanno una minor tendenza ad incorporarsi nelle micelle (Goni et al., 2006; Rich et al., 2003; van Het Hof KH et al., 2000).

L'efficienza di trasferimento dalle cellule alle micelle miste varia tra i prodotti alimentari (Failla & Chitchumroonchokchai, 2005) e, inoltre, il trasferimento dei caroteni alle micelle può essere compromesso dalla presenza di altri carotenoidi (sia dai caroteni, sia dalle xantofille) (Reboul et al., 2006) ha riportato che la micellarizzazione dei carotenoidi può variare da un carotenoide all'altro in un determinato alimento e per ciascun carotenoide in vari alimenti. O'Sullivan et al. (2010a) hanno rilevato che la bioaccessibilità di carotenoidi da peperoncini variava tra 6.2% e 100.0% secondo il carotenoide e dell'alimento testato.

Nel presente studio, i peperoncini rossi freschi contenevano elevate quantità dei carotenoidi noti per avere attività di provitamina A (β -carotene e β -criptoxantina), ma i valori di questi carotenoidi sono stati più bassi nei campioni di frutto giallo e arancione. Tuttavia, abbiamo notato che il β -carotene e la β -criptoxantina mostravano valori di bioaccessibilità inferiore rispetto alle xantofille analizzate, particolarmente capsantina e zeaxantina, e in misura minore anteraxantina e luteina. In generale, la bioaccessibilità dei carotenoidi da campioni di peperoncino rosso era simile a quella riportata in precedenza da Hervert-Hernández et al. (2010) e O'Sullivan et al. (2010a).

Pochi studi hanno indagato sulla bioaccessibilità di violaxantina e neoxantina nei peperoncini. Dopo digestione la quantità micellare di neoxantina e violaxantina variava da non rilevabile a molto bassa e di conseguenza la bioaccessibilità è stata vicina allo zero per la maggior parte dei campioni con l'eccezione dei frutti rossi congelati che hanno mostrato discreti valori di bioaccessibilità della violaxantina. Non è stata rilevata capsantina nelle micelle del peperoncino giallo Cayenna Yellow e in quelle dell'arancione Taballo e quindi la bioaccessibilità è risultata dello 0.0%. È interessante notare che, al contrario del campione giallo e

arancione appena citati, la capsantina era presente ad alte concentrazioni nel frutto e nelle micelle del campione arancione Capezzolo di Scimmia.

Similmente al contenuto di carotenoidi, la biodisponibilità dei carotenoidi può essere anche influenzata da una serie di fattori come la lavorazione, la cottura, il contenuto di grassi e/o la presenza di fibre (Garret et al., 2000; Hedren et al., 2002; Rock et al., 1998).

Il rilascio dei carotenoidi dalla matrice alimentare può essere migliorato con la cottura, sebbene sia stato anche riscontrato che la cottura può avere un effetto dannoso sulla bioaccessibilità dei carotenoidi presenti nelle verdure (Bugianesi et al., 2004; Bernhardt & Schlich, 2006; Nunn et al., 2006).

La processazione può causare isomerizzazione e degradazione alla forma tutto-trans del β -carotene (Deming et al., 2002).

Ryan et al. (2008) riportano che la micellarizzazione del β -carotene dei peperoncini rosso è significativamente aumentata a seguito della bollitura per 10 minuti.

Oruna et al. (1997), invece, hanno dimostrato che la quantità di β -carotene e luteina nella cultivar congelata di peperoncino Padrón era più o meno costante per un periodo di 12 mesi. Diversi altri studi hanno riportato che a seguito di congelamento la perdita di carotenoidi varia dal 5% al 48%, mentre vi è soltanto uno studio sul mais in cui si è assistito a un aumento del β -carotene dopo congelamento (Howard et al., 1999; Scott & Eldridge, 2005; Bushway et al., 1985).

Nel nostro studio abbiamo riscontrato che l'influenza dei metodi di trasformazione varia per ogni cultivar e anche in base al metodo di trattamento impiegato. β -Carotene e β -criptoxantina sono stati più colpiti dalla processazione; sia il congelamento sia la cottura ha comportato riduzioni significative di questi due carotenoidi in diversi campioni studiati. Tuttavia, nonostante l'alto contenuto di questi due carotenoidi nei peperoncini freschi e il relativamente basso contenuto nei frutti processati, non vi è stata alcuna rilevante differenza tra il contenuto di β -carotene e β -criptoxantina nelle micelle dei

freschi, dei congelati e dei cotti, quindi un aumento di valori di bioaccessibilità dei peperoncini processati sembra poter bilanciare e compensare la riduzione nel contenuto di carotenoidi che segue la processazione.

7.4 Risultati e discussioni del contenuto e della bioaccessibilità di carotenoidi da frutti di peperoncino secchi

7.4.1 Contenuto carotenoidi

La disidratazione del materiale di cibi freschi è un metodo tradizionale impiegato nell'area del Mediterraneo e in tutto il mondo per estendere la shelf-life del prodotto. Il processo di essiccazione riduce anche il volume dei frutti e viene spesso utilizzato per produrre prodotti in polvere come la paprika, spezia ottenuta dalla macinazione e polverizzazione dei frutti di *Capsicum*.

I carotenoidi hanno dimostrato effetti antiossidanti, attività di provitamina A e altre attività *in vivo* (Baker & Günther, 2004; Krinsky et al., 2004).

La cultivar è un fattore importante per determinare la composizione e il contenuto di pigmenti vegetali come i carotenoidi (Aherne et al., 2009; Guil-Guerrero et al., 2006), che sono responsabili per la colorazione di molti frutti e vegetali.

In questo paragrafo andremo ad analizzare il contenuto in carotenoidi e la bioaccessibilità delle venti differenti cultivar di peperoncino secco oggetto, tra le altre processazioni, del dottorato (Vedi Tabella generale).

Precedenti ricerche hanno riportato una grande variabilità nel contenuto di carotenoidi nei peperoncini secchi. Tundis et al. (2011; 2012) hanno misurato il contenuto di carotenoidi totali in peperoncini (*C. annuum*) calabresi rossi essiccati secondo il metodo tradizionale ed appartenenti alle cultivar *acuminatum* e *cerasiferum*, riscontrando valori compresi tra 133.9-324.7 mg/100g di peso secco (DW).

Hervert-Hernández et al. (Hervert-hernández et al., 2010) hanno quantificato il contenuto totale di carotenoidi di peperoncino rosso, varietà Arbol, Chipotle, Guajillo e Morita, trovando rispettivamente un contenuto di 365.8, 191.4, 87.6 e 373.3 mg/100g DW. Guzman et al. (2010) hanno riportato un contenuto totale di carotenoidi variabile tra 37.7 e 316.9 µg/g di peso secco di frutto piccante (*Capsicum*).

Nel presente studio il contenuto di carotenoidi totali (somma di tutti gli otto carotenoidi quantificati mediante HPLC) variava da 143.76 µg/100g DW per il peperoncino Yellow Cayenne) a 42347,55 µg/100g nel peperoncino della varietà Chaco. La violaxantina era presente in tutti i campioni di peperoncino, tranne che nel peperoncino giallo (Cayenna) e in quello arancione (Capezzolo di Scimmia); di contro, la più alta concentrazione di violaxantina (6593.41 µg/100g) è stato trovata nel peperoncino arancione Taballo. I carotenoidi luteina e neoxantina sono i carotenoidi predominanti dei frutti verdi (Minguez-Mosquera et al., 1993). Almela et al. (1991) hanno trovato neoxantina nei peperoncini rossi a concentrazioni comprese 13 e 78 mg/100g ed hanno anche rilevato la presenza di luteina in sei delle sette varietà di frutto analizzato a livelli che vanno da 3 a 35 mg/100g. Tuttavia, nel nostro studio la neoxantina non è stata rilevata nella metà delle cultivar testate ed è stato trovata a basse concentrazioni nei campioni rimanenti (Tabella 1).

Non è stata riscontrata luteina nel campione arancione (Capezzolo di Scimmia), e in tutti i peperoni rossi. Concentrazione di luteina molto bassa anche nel peperoncino giallo Cayenna, ma, curiosamente, il peperone arancione Taballo, ne conteneva 3640.77 µg/100g (Tabella 7.5).

I livelli di anteraxantina rilevati nei campioni erano simili ai livelli precedentemente riportati da Almela et al. (Almela et al., 1991) e variava tra 910.37 µg/100g nella varietà *C. annuum* rosso (Portafortuna) a 5826.64 µg/100g nella varietà *C. chacoense* (Chaco). In generale, la zeaxantina è stata rilevata a concentrazioni inferiori rispetto all'anteraxantina, come precedentemente riportato da Almela et al. (1991).

Non è stata rilevata zeaxantina nel peperoncino arancione Capezzolo di Scimmia (Tabella 7.3), e il campione arancione appartenente alla varietà Taballo conteneva zeaxantina ad una concentrazione di 854.00 µg/100g. I peperoncini ossi contenevano zeaxantina a livelli compresi tra 192.13 e 2828.61 µg/100g.

Il β-carotene era presente in tutte le cultivar di peperoncino testate e la più alta concentrazione (17327.45 µg/100g), è stato trovato nella cultivar Sole. Il Cayenne Yellow e il campione Capezzolo di Scimmia contenevano i più bassi livelli di β-carotene. In ciascuno dei campioni peperoncino testato la concentrazione di β-criptoxantina era inferiore a quella di β-carotene (Tabella 7.6). La capsantina, carotenoide unico del genere *Capsicum* (Camera et al., 1978), è stato trovato ad elevate concentrazioni in ciascuno dei campioni rossi dello studio (Tabella 7.3). Risultato interessante per l'arancione Capezzolo di Scimmia (*C. chinense*) che conteneva anche una quantità elevata di capsantina.

7.4.2 Contenuto micellare e bioaccessibilità

Pochi studi hanno quantificato la bioaccessibilità di carotenoidi da peperoncini secchi. Al fine di poter esercitare la loro attività biologica *in vivo* è essenziale che i carotenoidi siano assorbiti, dunque la bioaccessibilità è un fattore determinante della potenziale bioattività di un carotenoide. I carotenoidi sono molecole liposolubili e vengono assorbiti in modo simile a quello dei trigliceridi. Dopo ingestione, i carotenoidi sono incorporati nelle micelle formate dai lipidi e dagli acidi biliari e, successivamente, vengono trasferiti nelle cellule della mucosa intestinale, dove i carotenoidi sono assemblati nei chilomicroni e trasportati al sangue attraverso il sistema linfatico (Pérez-Gálvez et al., 2003).

Per le xantofille può essere necessaria l'idrolisi dell'estere per azione delle lipasi e alcuni autori hanno suggerito che l'enzima colesterolo-esterasi potrebbe essere responsabile della produzione di carotenoidi liberi nell'intestino (Breithaupt et al., 2002).

E' stato suggerito che il trasferimento dei carotenoidi nelle micelle è inversamente proporzionale all'idrofobicità del carotenoide (Rich et al., 2003; van Het Hof et al., 2000), il che è in accordo con i nostri risultati.

Riscontriamo, inoltre, che capsantina, zeaxantina e luteina hanno avuto la maggiore bioaccessibilità e, viceversa, la lipofilia della β -carotene ha influenzato negativamente la sua incorporazione in micelle e portato a basso bioaccessibilità (Tabella 2). I nostri risultati sono supportati dalla precedente ricerca di O'Sullivan et al. (2010a).

Tuttavia, Hervert-hernández et al. (2010) hanno riportato valori simili di bioaccessibilità sia per i caroteni sia per le xantofille. La percentuale di bioaccessibilità dei carotenoidi può essere usata come indicatore del potenziale impatto nutrizionale dei peperoncini, o dei cibi in generale, ma è anche importante per quantificare il contenuto esatto dei carotenoidi nelle micelle di modo da poter quantificare l'esatta quantità di carotenoidi disponibile all'assorbimento *in vivo*. Il presente studio mostra che il contenuto di carotenoidi nelle micelle diminuisce notevolmente se confrontato con il contenuto originario nel cibo crudo e il contenuto medio totale di carotenoidi trasferito alle micelle era approssimativamente del 15%. Come riportato precedentemente (Ha et al., 2007) i peperoncini rossi sono una buona fonte di capsantina. La capsantina è il carotenoide predominante delle micelle dei frutti rossi, con il più alto valore di 3998.79 $\mu\text{g}/100\text{g}$ nel campione Arlecchino (Tabella 7.7). I frutti rossi hanno avuto anche un elevato contenuto micellare di zeaxantina e anteraxantina. Curiosamente, anche le micelle del peperoncino arancione Taballo hanno riportato un contenuto di 785.03 $\mu\text{g}/100\text{g}$ di zeaxantina e 436.26 $\mu\text{g}/100\text{g}$ di anteraxantina (Tabella 7.7, 7.8). La luteina non è stata rilevata in quantità elevate nelle micelle dei frutti rossi. I valori di luteina variavano tra 0.0 e 259.75 $\mu\text{g}/100\text{g}$, con l'eccezione della cultivar Taballo. Infatti, il campione Taballo, che non conteneva capsantina, ha avuto il più alto contenuto di luteina (2419.75 $\mu\text{g}/100\text{g}$) e β -carotene (1290.48 $\mu\text{g}/100\text{g}$) nelle micelle (Tabella 2), pertanto è possibile pensare che la capsantina possa competere con questi due carotenoidi

per l'incorporazione in micelle. I potenziali benefici per la salute di capsantina devono essere ancora completamente studiati, tuttavia, il β -carotene, la luteina e la zeaxantina sono carotenoidi ben conosciuti per apportare un grosso beneficio per la salute, attraverso azioni di antiossidanti e la conseguente capacità di prevenire un'ampia varietà di malattie gravi, tra cui alcuni tipi di cancro e alcune malattie degli occhi (Krinsky & Johnson, 2005).

In generale, le micelle dei peperoncini rossi contenevano quantità simili dei carotenoidi luteina, violaxantina, β -carotene e β -criptoxantina, mentre sono stati rilevati alti livelli di anteraxantina e zeaxantina.

Bibliografia

- Aherne SA, Jiwan MA, Daly T, O'Brien NM (2009) Geographical location has greater impact on carotenoid content and bioaccessibility from tomatoes than variety. *Plant Foods Hum Nutr* 4:250-256
- Almela L, López-Roca JM, Candela ME, Alcázar MD (1991) Carotenoid Composition of New Cultivars of Red Pepper for Paprika. *J Agric Food Chem* 39:1606-1609
- Almela L, López-Roca JM, Candela ME, Alcázar MD (1991) Carotenoid Composition of New Cultivars of Red Pepper for Paprika. *J Agric Food Chem* 39:1606-1609
- Baker R, Günther C (2004) The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends Food Sci Technol* 15:484-488
- Bernhardt S, Schlich E (2006) Impact of different cooking methods on food quality: retention of lipophilic vitamins in fresh and frozen vegetables. *Journal of Food Engineering* 77:327-333
- Bieri JG, Brown ED, Smith JC (1985) Determination of individual carotenoids in human plasma by high performance. *J Liq Chromatogr* 8:473-484
- Breithaupt DE, Bamedi A & Wirt U (2002) Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes? *Comparative Biochemistry and Physiology B* 132:721-728
- Bugianesi R, Salucci M, Leonardi C, Ferracane R, Catasta G, Azzini E, Maiani G (2004) Effect of domestic cooking on human bioavailability of naringenin, chlorogenic acid, lycopene and β -carotene in cherry tomatoes. *European Journal of Nutrition* 43:360-366

- Bushway AA, Serreze DV, McGann DF, True RH, Work TM, Bushway RJ (1985) Effect of processing method and storage time on the nutrient composition of fiddlehead greens. *J Food Science* 50:1491-1492
- Camera B, Monéger R (1978) Free and esterified carotenoids in green and red fruits of *Capsicum annuum*. *Phytochemistry* 17:91-93
- Castenmiller JJ, West CE (1998) Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annu Rev Nutr* 18:19-38
- Castenmiller JJM, West CM, Linssen JPH, van het Hof KH, Voragen AGJ (1999) The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of β -carotene and to a lesser extent of lutein in humans. *J Nutr* 129:349-355
- Chen BH, Chen YY (1992) Determination of carotenoids and chlorophylls in water convolvulus by liquid chromatography. *Food Chemistry* 45:129-134
- Chenlo F, Chaguri L, Santos F, Moreira R (2006) Osmotic dehydration/impregnation kinetics of padrón pepper (*Capsicum annuum* L. Longum) with sodium chloride solutions: process modelling and colour analysis. *Food Sci Technol Int* 12(3):221-227
- Chitchumroonchokchai C, Schwartz S, Failla M (2004) Assessment of lutein bioavailability from meals and a supplement using simulated digestion and Caco-2 cells human intestinal cells. *J Nutr* 34:2280-2286
- Cook NC, Samman S (1996) Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr Bio* 7:66-76
- de Pee S, West CE, Muhilal, Karyadi D, Hautvast, JGAJ (1995) Lack of improvement in vitamin A status with increased consumption of dark-green leafy vegetables. *Lancet* 346:75-81

- Deming DM, Teixeira SR, Erdman JW (2002) All-trans- β -carotene appears to be more bioavailable than 9-cis or 13-cis- β -carotene in gerbils given single oral doses of each isomer. *J Nutr* 132:2700-2708
- Dutta D, Chaudhuri R, Chakraborty R (2009) Degradation of total carotenoids and texture in frozen pumpkins when kept for storage under varying conditions of time and temperature. *Int J Food Sci Nutr* 60:17-26
- Failla M, Chitchumroonchokchai C (2005) *In vitro* models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods. Technical Monographs. Series 3, HarVest Plus
- Faulks RM, Southon S (2005) Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *Biochim Biophys Acta* 1740:95-100
- Garcia MI, Lozano M, deEspinosa VM, Ayuso MC, Bernalte MJ, Vidal-Aragon MC, Perez MM (2007) Agronomic characteristics and carotenoid content of five Bola-type paprika red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Sci Hortic* 113:202-207
- Garrett D, Failla M, Sarama R (2000) Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *J Nutr Biochem* 11:574-580
- Goni I, Serrano J, Saura-Calixto F (2006) Bioaccessibility of β -carotene, lutein, and lycopene from fruits and vegetables. *J Agric Food Chem* 54:5382-5387
- Granado F, Olmedilla B, Gil-Martinez E, Blanco I (2001) A fast, reliable and low-cost saponification protocol for analysis of carotenoids in vegetables. *J Food Compos Anal* 14:479-489
- Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Perez-Sacristan B, Blanco-Navarro I, Blazquez-Garcia S (2007a) Comparative *in vitro* bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. *Journal Agricultural Food Chemistry* 55:6387-6394

- Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I, Perez-Sacristan B, Blazquez-Garcia S (2007b) *In vitro* bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chemistry* 102:641-648
- Guil-Guerrero JL, Martinez-Guirado C, del Mar Reboloso-Fuentes M, Carrique-Perez A (2006) Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annuum*) varieties. *Eur Food Res Technol* 224:1-9
- Guzman I, Hamby S, Romero J, Bosland PW, O'Connell MA (2010) Variability of Carotenoid Biosynthesis in Orange Colored *Capsicum* spp. *Plant Sci* 179(1-2):49-59
- Ha SH, Kim JB, Park JS, Lee SW, Ch KJ (2007) A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *Journal of Experimental Botany* 58(12):3135-314
- Hedren E, Diaz V, Svanberg U (2002) Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in-vitro* digestion method. *Eur. J Clin Nutr* 56:425-430
- Hervert-hernández D, Sáyago-ayerdi SG, Goñi I (2010) Bioactive Compounds of Four Hot Pepper Varieties (*Capsicum annuum* L.), Antioxidant Capacity, and Intestinal Bioaccessibility *J Agric Food Chem* 58:3399-3406
- Hornero-Méndez D, Gómez-Ladrón de Guevara R, Mínguez-Mosquera MI (2000) Carotenoids biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. *J Agric Food Chem* 48:3857-3864
- Howard LR (2001) (Ed.) Antioxidant vitamin and phytochemical content of fresh and processed pepper fruit (*Capsicum annuum*). In: *Handbook of Nutraceuticals*

- and Functional Foods (Wildman RC, Ed) (pp 209-233).CRC Press, Boca Raton, FL, USA
- Jiwan MA, Duane DL, O'Sullivan L, O'Brien NM, Aherne SA (2010) Content and bioaccessibility of carotenoids from organic and non-organic baby foods. *J Food Comp Anal* 23:346-352
- Kaur C, Kapoor HC (2001) Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *Int J Food Sci Technol* 36:703-725
- Khachik F, Goli M, Beecher GR, Holden JM, Lusby WR, Tenorio MD, Barrera MR (1992) Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. *J Agric Food Chem* 40:390-398
- Krinsky NI, Johnson EJ (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Asp Med* 26:459:516
- Krinsky NI, Mayne ST, Sies H (2004) Carotenoids in health and disease. Marcel Dekker, New York
- Maiani G, Castón MJP, Catasta G, Toti E, Cambrodón IG, Bysted A, Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Knuthsen P, Valoti M, Böhm V, Mayer-Miebach E, Behnlian D, Schlemmer U (2009) Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res* 53:194-218
- Marin A, Ferreres F, Tomas-Barberan FA, Gil MI (2004) Characterization and quantification of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *J Agric Food Chem* 52:3861-3869
- Markus F, Daood HG, Kapitany J, Biacs PA (1999) Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. *J Agric Food Chem* 47:100-107

- Matsufuji H, Nakamura H, Chino M, Takeda M (1998) Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annum*). J Agric Food Chem 46:3468-3472
- Matus Z, Deli J, Szabolcs J (1991) Carotenoid composition of yellow pepper during ripening: isolation of β -cryptoxanthin 5,6-epoxide. J Agric Food Chem 39:1907-1914
- Micozzi MS, Brown ED, Edwards BK, Bieri JG, Taylor PR, Khachik F, Beecher GR, Smith Jr. JC (1992) Plasma carotenoid response to chronic intake of selected foods and beta-carotene supplements in men. Am J Clin Nutr 55:1120-1125
- Minguez-Mosquera MI, Hornero-Mendez D (1993) Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annum* L.), paprika and oleoresin by reversed-phase HPLC. J Agric Food Chem 41:1616-1620
- Minguez-Mosquera MI, Hornero-Mendez D (2004) Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of *Capsicum annum* cv. Bola and Agridulce. Journal Agricultural Food Chemistry 42:38-44
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Domíngueza JM, Sineirob J, Domíngueza H, Núñezb MJ, Parajóa JC (2001) Natural antioxidants from residual sources. Food Chem 72:145-171
- Nunn M, Giraud D, Parkhurst A, Hamouz F (2006) Effects of cooking methods on sensory qualities and carotenoid retention in selected vegetables. J Food Qual 29:445-457
- O'Connell O, Ryan L, O'Brien N (2007) Effect of fibre on the bioaccessibility of carotenoids from a combination of vegetables. Proc Nutr Soc 66:113
- O'Sullivan L, Jiwan M, Daly T, O'Brien NM, Aherne SA (2010a) Bioaccessibility, uptake, and transport of carotenoids from peppers (*Capsicum* spp.) using the coupled *in vitro* digestion and human intestinal Caco-2 cell model. J Agric Food chem 58(9):5374-5379

- O'Sullivan L, Aherne SA, O'Brien NM (2010b) Investigation of β -carotene and lutein transport in Caco-2 cells: carotenoid-carotenoid interactions and transport inhibition by ezetimibe. *International J Vit Nutr Res* 79:337-347
- O'Sullivan L, Galvin K, Jiwan MA, Aherne SA, O'Brien NM (2008) Content and bioaccessibility of carotenoids from green vegetables is not affected by saponification. In *Proceedings of the 38th Annual Conference on Food, Nutrition and Consumer Sciences*, Sept 11 University College Cork: Ireland
- Rao AV, Rao LG (2007) Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* 55:207-216
- O'Connell O, Ryan L, O'Brien NM (2007) Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutr Res* 27:258-264
- Olives Barba A, Hutado M, Sanchez Mata M, Fernandez Ruiz V, Lopez Saenz de Tejada M (2006) Application of a UV-Vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chem* 95:328-336
- Oruna-Concha MJ, González-Castro MJ, López-Hernández J, Simal-Lozano J (1997) Effects of freezing on the pigment content in green beans and padrón peppers. *Z Lebensm Unters Forsch A* 205:148-152
- Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, Gonzalez-Aguilar GA (2011) The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *J Food Sci* 76(1):6-15
- Pérez-Gálvez A, Martin Hans D, Sies H, Stahl W (2003) Incorporation of carotenoids from paprika oleoresin into human chylomicrons. *Brit J Nutr* 89:787-793
- Poor CL, Bierer TL, Merchen NR, Fahey GC, Erdman JW (1993) The accumulation of α - and β -carotene in serum and tissues of pre-ruminant calves fed raw and steamed carrot slurries. *J Nutr* 123:1296-1304

- Rao AV, Rao LG (2007) Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* 55:207-216
- Reboul E, Richelle M, Perrot E, Desmoulins-Malezet C, Pirisi V, Borel P (2006) Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J Agric Food Chem* 54:8749-8755
- Rich GT, Faulks RM, Wickham MS, Fillery-Travis A (2003) Solubilisation of carotenoids from carrot juice and spinach in lipid phases: II. Modelling the duodenal environment. *Lipids* 38:947-956
- Rickman JC, Bruhn CM, Barrett DM (2007) Nutritional comparison of fresh, frozen, and canned fruits and vegetables II. Vitamin A and carotenoids, vitamin E, minerals and fiber. *J Sci Food Agric* 87:1185-1196
- Rock C, Lovalvo J, Emenhiser C, Ruffin M, Flatt S, Schwartz S (1998) Bioavailability of β -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *J Nutr* 128:913-916
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós A, Costa HS (2006) Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *J Food Comp Anal* 97-111
- Roels OA, Trout M, Dujacquier R (1958) Carotene balances on boys in Ruanda where vitamin A deficiency is prevalent. *J Nutr* 65:115-127
- Ryan L, O'Connell O, O'Sullivan L, Aherne SA, O'Brien NM (2008) Micellarisation of carotenoids from raw and cooked vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition* 63:127-133
- Scott CE, Eldridge AL (2005) Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. *J Food Comp Anal* 18:551-559
- Shiau A, Mobarhan S, Stacewicz-Sapuntzakis M, Mobarhan S, Stacewicz-Sapuntzakis M, Benya R, Liao Y, Ford C, Bowen P, Friedman H, Frommel TO (1994) Assessment of the intestinal retention of beta-carotene in humans. *J Am Coll Nutr* 13:369-375

- Stahl W, Sies H (2005) Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta* 1740:101-107
- Strobel M, Tinz J, Biesalski HK (2007) The importance of beta-carotene as a source of vitamin A with special regard to pregnant and breastfeeding women. *Eur J Nutr* 46:1-20
- Thakkar S, Maziya-Dixon B, Dixon A, Failla M (2007) β -Carotene micellarization during *in vitro* digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to β -carotene content in different genotypes of cassava. *J Nutr* 137:2229-2233
- Tundis R, Loizzo MR, Menichini F, Bonesi M, Conforti F, De Luca D, Menichini F (2012) Air-dried *capsicum annuum* var. *acuminatum medium* and *big*: Determination of bioactive constituents, antioxidant activity and carbohydrate-hydrolyzing enzymes inhibition. *Food Res Int* 45:170-176
- Tundis R, Loizzo MR, Menichini F, Bonesi M, Conforti F, Statti G, De Luca D, de Cindio B, Menichini F (2011) Comparative study on the chemical composition, antioxidant properties and hypoglycaemic activities of two *Capsicum annuum* L. cultivars (*acuminatum small* and *cerasiferum*). *Plant Food for Hum Nutr* 66(3):261-269
- Van Buggenhout S, Alming M, Lemmens L, Colle I, Knockaert G, Moelants K, Van Loey A, Hendrickx M (2010) *In vitro* approaches to estimate the effect of food processing on carotenoid bioavailability need thorough understanding of process induced microstructural changes. *Trends in Food Sci Technol* 21:607-618
- van Het Hof KH, West CE, Weststrate JA, Hautvast JG (2000) Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr* 130:503-506
- White WS, Peck KM, Ulman EA, Erdman JW (1993) The ferret as a model for evaluation of the bioavailabilities of all-trans- β -carotene and its isomers. *J Nutr* 123:1129-1139

Tabella 7.1: Contenuto totale di carotenoidi ($\mu\text{g}/100\text{g}$) ottenuto da peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi

Specie <i>Capsicum</i>	cultivar	fresco	congelato	bolliti	secco
<i>annuum</i>	Yellow Cayenne	546.1	1190.0	294.4	143.8
<i>annuum</i>	Portafortuna	6991.0	1565.5	2052.3	22857.9
<i>annuum</i>	Idealino	4735.3	1391.9	4910.8	32292.7
<i>annuum</i>	Sole	3386.8	936.6	2351.0	36267.0
<i>baccatum</i>	Campana	2036.4	1053.6	572.5	17376.8
<i>annuum</i>	Duemila	4806.5	1291.7	5624.0	25163.3
<i>annuum</i>	Pellegrino	4378.1	2130.0	3133.3	28143.1
<i>annuum</i>	Fantasia	3977.4	1683.2	4495.4	23801.5
<i>chacoense</i>	Chaco	2308.1	702.8	1446.6	42347.5
<i>annuum</i>	Loco	4312.4	1869.3	3278.6	20091.2
<i>baccatum</i>	Aji Angelo	2763.1	1258.9	1714.7	11343.3
<i>annuum</i>	Effix	2499.8	1224.0	1481.2	17226.2
<i>annuum</i>	Acrata	1734.0	1390.2	1422.4	10183.5
<i>annuum</i>	O di Giotto	3774.0	919.2	2752.4	32363.0
<i>annuum</i>	Arlecchino	3807.7	1002.4	3017.2	22657.8
<i>annuum</i>	Nobile	3162.0	1687.1	2231.2	29671.0
<i>annuum</i>	Taballo	3139.2	2318.5	484.4	19474.0
<i>annuum</i>	Border	5473.9	1420.7	3144.9	23797.5
<i>annuum</i>	Hierro	3343.5	2027.5	3233.7	16951.2
<i>chinense</i>	Cap. di Scimmia	146.7	377.3	102.2	578.5

I risultati sono espressi come somma aritmetica degli otto carotenoidi riscontrati nei peperoncini non digeriti.

Tabella 7.2: Contenuto totale di carotenoidi ($\mu\text{g}/100\text{g}$) ottenuto dalle micelle dei peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi.

Specie <i>Capsicum</i>	Nome	fresco	congelato	bolliti	secco
<i>annuum</i>	Yellow Cayenne	50.4	141.2	43.6	82.3
<i>annuum</i>	Portafortuna	427.9	470.9	712.8	3605.6
<i>annuum</i>	Idealino	422.5	262.8	292.7	5652.2
<i>annuum</i>	Sole	479.9	464.3	757.1	5531.3
<i>baccatum</i>	Campana	297.3	307.8	251.0	3270.7
<i>annuum</i>	Duemila	578.4	729.3	770.9	4371.2
<i>annuum</i>	Pellegrino	720.4	331.9	348.1	3636.3
<i>annuum</i>	Fantasia	66.8	408.2	119.3	2230.7
<i>chacoense</i>	Chaco	430.7	194.7	87.5	5939.8
<i>annuum</i>	Loco	697.6	391.8	570.1	5041.1
<i>baccatum</i>	Aji Angelo	668.1	514.1	297.3	2881.7
<i>annuum</i>	Effix	575.4	192.2	305.4	3591.3
<i>annuum</i>	Acrata	475.6	204.3	131.6	2408.9
<i>annuum</i>	O di Giotto	643.4	248.8	404.7	6823.5
<i>annuum</i>	Arlecchino	724.8	270.3	415.6	6445.2
<i>annuum</i>	Nobile	485.4	224.2	195.8	1822.2
<i>annuum</i>	Taballo	291.2	155.0	20.0	5428.4
<i>annuum</i>	Border	776.6	384.4	479.5	4856.8
<i>annuum</i>	Hierro	486.6	358.0	202.3	1318.7
<i>chinense</i>	Cap. di Scimmia	75.3	26.8	53.2	174.9

I risultati sono espressi come somma aritmetica degli otto carotenoidi riscontrati nelle micelle dei peperoncini.

Tabella 7.3: Contenuto di carotenoidi ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$) ottenuto da peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi

Capsantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	11.7 \pm 4.3	0.0 \pm 0.0
2	1735.2 \pm 28.9	443.5 \pm 29.5*	944.1 \pm 54.3*	3161.3 \pm 35.0*
3	947.3 \pm 53.7	270.5 \pm 65.8*	678.4 \pm 22.0*	4971.9 \pm 58.7*
4	1383.7 \pm 27.7	503.5 \pm 29.4*	858.8 \pm 39.2*	5461.3 \pm 66.5*
5	229.9 \pm 43.8	358.5 \pm 57.5	114.6 \pm 6.6	6163.8 \pm 52.7*
6	1145.6 \pm 43.5	469.3 \pm 22.1*	2507.6 \pm 43.9*	7654.6 \pm 60.1*
7	773.4 \pm 16.3	376.2 \pm 54.1*	708.9 \pm 54.0	6242.9 \pm 50.3*
8	360.3 \pm 80.6	283.3 \pm 27.4*	504.4 \pm 32.3	6275.7 \pm 52.1*
9	847.5 \pm 27.1	348.8 \pm 30.0*	791.8 \pm 73.5	15312.9 \pm 34.7*
10	808.2 \pm 65.5	621.7 \pm 42.8*	918.2 \pm 76.3	2542.7 \pm 23.9*
11	592.1 \pm 64.4	375.6 \pm 37.9*	812.6 \pm 74.2*	1676.2 \pm 35.5*
12	673.0 \pm 70.0	333.5 \pm 54.5*	726.7 \pm 52.6	6948.0 \pm 78.4*
13	282.6 \pm 4.9	593.2 \pm 32.4*	696.0 \pm 85.9*	3965.6 \pm 65.9*
14	1498.2 \pm 60.3	506.3 \pm 25.5*	1277.9 \pm 79.8*	6808.7 \pm 64.6*
15	1325.3 \pm 23.8	348.3 \pm 20.7*	1345.3 \pm 97.6	6936.1 \pm 112.5*
16	772.0 \pm 63.0	325.4 \pm 54.4	931.7 \pm 52.8	7969.7 \pm 82.3*
17	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	113.1 \pm 12.1*
18	1865.3 \pm 3.9	425.1 \pm 51.9	1222.0 \pm 64.5*	9570.3 \pm 82.4*
19	786.3 \pm 45.7	422.1 \pm 62.2*	1016.2 \pm 71.6*	6444.1 \pm 52.2*
20	104.1 \pm 10.4	267.7 \pm 49.2	66.7 \pm 9.7	540.7 \pm 19.6*

Zeaxantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	40.4 \pm 14.1	239.7 \pm 56.9*	60.6 \pm 21.3	0.0 \pm 0.0
2	164.2 \pm 24.3	111.7 \pm 14.2	104.8 \pm 12.36	909.8 \pm 44.6*
3	367.7 \pm 48.2	211.6 \pm 81.5	254.2 \pm 61.28	1419.5 \pm 66.5*
4	94.3 \pm 13.5	24.7 \pm 1.4	80.1 \pm 23.99	2828.6 \pm 7.0*
5	70.7 \pm 5.9	89.5 \pm 22.9	35.4 \pm 9.0	821.7 \pm 6.8*
6	448.4 \pm 61.3	128.5 \pm 4.9	346.3 \pm 38.56	1075.2 \pm 57.7*
7	132.0 \pm 10.0	51.5 \pm 6.9	103.0 \pm 1.11	1459.4 \pm 75.2*
8	231.5 \pm 50.7	100.1 \pm 4.7	294.5 \pm 71.14	536.7 \pm 47.3
9	58.8 \pm 0.9	17.6 \pm 3.8	42.2 \pm 6.5	2131.1 \pm 85.2*
10	165.2 \pm 31.8	81.2 \pm 21.9	164.9 \pm 18.30	1499.4 \pm 90.0*
11	95.6 \pm 10.6	34.9 \pm 7.0	85.8 \pm 12.9	192.1 \pm 20.3
12	69.4 \pm 5.4	35.8 \pm 3.5	57.6 \pm 7.90	654.6 \pm 87.0*
13	81.0 \pm 3.9	51.5 \pm 9.2	64.5 \pm 19.44	519.8 \pm 50.7*
14	106.2 \pm 23.0	17.4 \pm 2.2	78.8 \pm 11.04	1604.4 \pm 36.7*
15	68.6 \pm 9.2	15.8 \pm 4.2	75.5 \pm 18.95	873.2 \pm 46.7*
16	94.1 \pm 1.5	48.1 \pm 10.3	90.5 \pm 6.11	898.0 \pm 36.2*
17	278.9 \pm 43.8	168.0 \pm 63.5*	71.2 \pm 15.9*	854.0 \pm 13.6*
18	164.7 \pm 28.0	33.7 \pm 6.3	101.8 \pm 29.21	1503.1 \pm 95.4*
19	56.4 \pm 5.8	26.7 \pm 6.4	34.3 \pm 7.9	803.4 \pm 47.1*
20	0.0 \pm 0.0	30.8 \pm 5.7	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0*

I risultati sono espressi come media \pm SE di tre esperimenti indipendenti. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. Gli asterischi denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione contro il fresco usato come controllo positivo.

Tabella 7.4: Contenuto di carotenoidi ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) ottenuto da peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi

Anteraxantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	20.1 \pm 9.0	45.7 \pm 12.1	8.5 \pm 1.5	0.0 \pm 0.0
2	527.8 \pm 61.0	106.4 \pm 14.5*	182.7 \pm 84.1*	910.4 \pm 20.8*
3	263.0 \pm 41.2	69.7 \pm 14.0*	262.1 \pm 41.71	6675.2 \pm 77.2*
4	317.4 \pm 46.0	80.2 \pm 10.5*	268.8 \pm 85.91	3163.7 \pm 55.7*
5	116.1 \pm 21.4	73.3 \pm 32.3	54.7 \pm 12.5	1647.2 \pm 21.6*
6	378.8 \pm 54.4	85.4 \pm 2.1*	869.9 \pm 61.0*	2223.3 \pm 53.3*
7	272.4 \pm 34.6	102.8 \pm 12.7*	215.5 \pm 18.4	2451.1 \pm 26.3*
8	212.1 \pm 52.8	100.8 \pm 12.3	219.8 \pm 42.6	1847.6 \pm 15.6*
9	225.3 \pm 11.3	73.0 \pm 3.6**	175.3 \pm 46.6	5826.6 \pm 28.5*
10	285.4 \pm 36.0	139.2 \pm 11.4	252.4 \pm 15.8	1868.6 \pm 45.3*
11	282.6 \pm 38.7	152.8 \pm 54.7*	207.6 \pm 17.1	1185.8 \pm 55.8*
12	174.7 \pm 25.1	73.8 \pm 13.9	151.2 \pm 16.7	1889.6 \pm 57.1*
13	193.9 \pm 35.0	152.5 \pm 9.0	192.9 \pm 43.4	1594.1 \pm 37.5*
14	395.6 \pm 63.7	90.6 \pm 5.7*	410.3 \pm 44.5	4796.0 \pm 40.9*
15	271.2 \pm 28.4	60.7 \pm 5.0*	263.7 \pm 70.2	2336.7 \pm 49.6*
16	215.6 \pm 42.5	90.1 \pm 21.9	255.6 \pm 30.3	2070.5 \pm 67.6*
17	248.5 \pm 46.0	176.2 \pm 73.9	26.5 \pm 7.7**	1260.0 \pm 43.7*
18	502.1 \pm 41.9	106.2 \pm 16.8*	317.0 \pm 30.3*	3596.9 \pm 30.2*
19	186.2 \pm 29.2	88.2 \pm 9.1	216.5 \pm 49.1	1560.6 \pm 66.7*
20	13.7 \pm 1.5	25.1 \pm 12.9	12.2 \pm 1.0	0.0 \pm 0.0*

Violaxantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	150.8 \pm 48.7	274.3 \pm 10.1	0.0 \pm 0.0*	0.0 \pm 0.0*
2	548.6 \pm 73.5	103.8 \pm 10.5*	139.4 \pm 22.9*	979.7 \pm 44.6*
3	194.1 \pm 59.1	69.2 \pm 18.5	260.4 \pm 22.5	1506.6 \pm 73.1*
4	165.8 \pm 27.8	51.9 \pm 8.2	149.7 \pm 32.5	1437.1 \pm 65.3*
5	171.5 \pm 35.6	91.1 \pm 19.3	50.6 \pm 17.3	536.1 \pm 60.9*
6	181.2 \pm 42.9	46.6 \pm 1.6	317.3 \pm 133.9	1192.9 \pm 95.1*
7	223.7 \pm 53.6	105.1 \pm 31.0	185.5 \pm 9.5	1694.3 \pm 51.3*
8	122.9 \pm 19.3	134.6 \pm 46.0	138.2 \pm 51.9	767.0 \pm 86.5*
9	194.2 \pm 38.1	62.5 \pm 9.7*	104.8 \pm 22.4	1853.5 \pm 24.2*
10	303.0 \pm 82.2	92.4 \pm 10.2*	203.5 \pm 24.3	721.2 \pm 18.6*
11	214.3 \pm 55.1	209.2 \pm 49.8	188.2 \pm 25.0	2006.3 \pm 55.4*
12	121.2 \pm 10.2	70.8 \pm 15.1	97.3 \pm 21.4	597.9 \pm 54.0*
13	139.1 \pm 20.8	114.6 \pm 25.2	108.6 \pm 12.9	926.5 \pm 29.8*
14	195.9 \pm 47.6	36.2 \pm 4.7	201.5 \pm 17.2	1912.9 \pm 181.9*
15	212.1 \pm 21.2	50.9 \pm 12.3	198.0 \pm 17.8	749.1 \pm 41.3*
16	322.5 \pm 49.1	118.5 \pm 36.3*	158.4 \pm 31.1	1315.2 \pm 8.0*
17	1119.0 \pm 70.7	1065.2 \pm 24.9	0.0 \pm 0.0*	6593.4 \pm 51.5*
18	206.7 \pm 29.2	67.1 \pm 27.3	118.1 \pm 45.0	432.0 \pm 42.3*
19	248.6 \pm 45.1	118.7 \pm 28.1	222.7 \pm 39.2	740.3 \pm 73.4*
20	9.4 \pm 2.5	26.3 \pm 2.9	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0*

I risultati sono espressi come media \pm SE di tre esperimenti indipendenti. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. Gli asterischi denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione contro il fresco usato come controllo positivo.

Tabella 7.5: Contenuto di carotenoidi ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$) ottenuto da peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi

Neoxantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	34.6 \pm 9.2	47.8 \pm 9.7	21.8 \pm 9.4	0.0 \pm 0.0
2	82.2 \pm 12.4	14.8 \pm 2.0*	19.1 \pm 9.1*	184.0 \pm 35.1
3	30.2 \pm 10.5	10.6 \pm 2.2	41.3 \pm 16.5	0.0 \pm 0.0
4	21.0 \pm 2.0	5.3 \pm 1.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0*
5	30.7 \pm 8.7	18.2 \pm 7.4	11.6 \pm 0.9	95.3 \pm 7.5*
6	32.6 \pm 4.9	8.9 \pm 0.8	49.7 \pm 20.3	234.2 \pm 22.0*
7	34.6 \pm 4.1	12.0 \pm 2.8	16.7 \pm 3.4	157.7 \pm 19.4*
8	8.7 \pm 1.9	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0*
9	32.1 \pm 4.2	9.5 \pm 1.6	0.0 \pm 0.0*	0.0 \pm 0.0*
10	39.5 \pm 13.9	0.0 \pm 0.0	32.7 \pm 11.6	71.8 \pm 13.0*
11	35.1 \pm 11.4	30.7 \pm 12.8	25.3 \pm 2.1	334.6 \pm 29.4*
12	14.5 \pm 2.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0*
13	18.3 \pm 4.0	9.1 \pm 4.6	12.1 \pm 3.9	0.0 \pm 0.0*
14	16.7 \pm 3.4	8.1 \pm 6.3	23.1 \pm 8.7	204.6 \pm 39.7*
15	27.6 \pm 3.8	10.2 \pm 4.9	22.7 \pm 6.7	0.0 \pm 0.0*
16	36.7 \pm 4.8	27.6 \pm 13.4	19.7 \pm 6.4	129.2 \pm 11.1*
17	54.4 \pm 11.9	61.0 \pm 11.2	18.2 \pm 2.4*	171.8 \pm 6.5*
18	36.9 \pm 5.1	6.1 \pm 3.1*	18.5 \pm 4.9	0.0 \pm 0.0*
19	34.2 \pm 6.8	49.6 \pm 12.8	29.9 \pm 6.6	123.4 \pm 10.9*
20	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0*

Luteina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	266.3 \pm 45.0	538.8 \pm 9.8	182.7 \pm 37.2	113.0 \pm 24.3*
2	34.6 \pm 7.9	8.8 \pm 4.8	4.1 \pm 1.3	122.7 \pm 6.1
3	18.1 \pm 3.6	4.3 \pm 2.2	33.2 \pm 11.8	622.7 \pm 6.2*
4	48.2 \pm 4.3	9.7 \pm 1.2*	0.0 \pm 0.0*	300.0 \pm 45.6*
5	20.5 \pm 7.0	10.3 \pm 1.9	0.0 \pm 0.0	262.6 \pm 26.7*
6	22.8 \pm 9.5	7.2 \pm 1.7	81.7 \pm 12.0*	164.3 \pm 22.1*
7	40.0 \pm 9.0	5.2 \pm 2.7	0.0 \pm 0.0*	338.0 \pm 43.1*
8	15.1 \pm 3.4	0.0 \pm 0.0	36.9 \pm 13.1	211.1 \pm 16.1*
9	31.0 \pm 5.2	4.8 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	783.9 \pm 30.0*
10	37.6 \pm 3.1	13.8 \pm 5.5	8.8 \pm 4.4	164.6 \pm 18.9
11	59.2 \pm 11.4	21.8 \pm 9.2	2.8 \pm 2.8	164.3 \pm 48.3*
12	26.9 \pm 6.0	6.4 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0	197.3 \pm 9.9*
13	22.0 \pm 2.4	10.9 \pm 0.5	32.8 \pm 32.8	240.8 \pm 14.8*
14	52.2 \pm 1.9	7.4 \pm 1.3*	34.7 \pm 19.3	613.9 \pm 143.6*
15	44.7 \pm 10.2	6.9 \pm 1.4*	15.6 \pm 15.6	259.8 \pm 9.9*
16	21.8 \pm 6.1	4.4 \pm 1.1	2.1 \pm 2.2	240.4 \pm 24.3*
17	613.7 \pm 10.5	369.8 \pm 67.7	161.4 \pm 40.1*	3640.8 \pm 50.8*
18	76.1 \pm 13.0	6.1 \pm 1.1*	11.4 \pm 1.9*	427.9 \pm 31.5*
19	17.8 \pm 7.3	19.3 \pm 1.5	0.0 \pm 0.0	285.1 \pm 30.5*
20	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0*

I risultati sono espressi come media \pm SE di tre esperimenti indipendenti. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. Gli asterischi denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione contro il fresco usato come controllo positivo.

Tabella 7.6: Contenuto di carotenoidi ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$) ottenuto da peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi

	β-Criptoxantina			
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	9.8 \pm 5.1	4.0 \pm 0.3	2.0 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0*
2	1587.5 \pm 28.4	198.7 \pm 32.9*	284.3 \pm 34.8*	2952.4 \pm 20.2
3	959.7 \pm 81.0	151.5 \pm 54.9*	861.5 \pm 62.0*	2238.4 \pm 56.5*
4	285.5 \pm 33.9	14.7 \pm 1.8*	55.1 \pm 17.1*	5749.0 \pm 89.4*
5	138.9 \pm 18.6	50.1 \pm 10.0	37.5 \pm 15.5*	568.4 \pm 33.7*
6	649.1 \pm 78.2	96.2 \pm 9.4*	226.3 \pm 77.2*	2716.1 \pm 9.7*
7	715.1 \pm 33.3	48.1 \pm 7.0*	89.3 \pm 14.1*	3691.5 \pm 50.0*
8	665.7 \pm 43.4	63.6 \pm 16.5*	200.7 \pm 88.1*	1588.9 \pm 35.4*
9	237.5 \pm 52.2	22.9 \pm 3.2	39.6 \pm 13.2*	3666.0 \pm 63.4*
10	607.2 \pm 24.6	54.7 \pm 11.3*	134.7 \pm 57.0*	3089.8 \pm 35.7*
11	334.7 \pm 27.7	64.1 \pm 22.7	89.9 \pm 39.3*	691.4 \pm 8.3*
12	297.5 \pm 33.2	36.6 \pm 9.6*	39.9 \pm 0.8*	1192.7 \pm 88.0*
13	303.1 \pm 21.4	83.3 \pm 12.0*	35.1 \pm 12.5*	1641.9 \pm 38.3*
14	249.3 \pm 23.1	25.2 \pm 5.0*	79.6 \pm 16.7*	3217.2 \pm 40.2*
15	263.0 \pm 17.5	24.3 \pm 5.1*	68.0 \pm 21.7*	1518.5 \pm 30.9*
16	645.1 \pm 24.4	104.2 \pm 32.9*	53.1 \pm 24.3*	4351.3 \pm 97.6*
17	277.1 \pm 28.8	19.1 \pm 12.2	30.2 \pm 2.6*	3425.1 \pm 72.9*
18	537.9 \pm 45.6	86.8 \pm 10.0*	119.8 \pm 29.9*	1601.2 \pm 30.3*
19	489.8 \pm 15.1	48.4 \pm 9.8	170.0 \pm 46.5*	1647.2 \pm 32.7*
20	9.0 \pm 1.5	0.0 \pm 0.0	0.5 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0*

	β-Carotene			
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	24.0 \pm 11.7	39.7 \pm 10.6	7.1 \pm 1.8	30.7 \pm 7.5
2	2310.9 \pm 46.2	577.8 \pm 70.1*	373.8 \pm 74.5*	13637.6 \pm 154.1*
3	1955.2 \pm 47.4	604.4 \pm 79.2*	2519.9 \pm 126.7*	14858.4 \pm 178.1*
4	1070.9 \pm 80.3	246.6 \pm 33.4*	938.4 \pm 107.2	17327.4 \pm 191.7*
5	1258.3 \pm 33.0	362.6 \pm 106.6*	268.0 \pm 66.7*	7281.8 \pm 64.7*
6	1948.0 \pm 20.7	449.5 \pm 13.7*	1225.1 \pm 88.1*	9902.8 \pm 84.6*
7	2186.9 \pm 34.4	1429.1 \pm 58.1*	1814.4 \pm 66.5*	12108.2 \pm 199.1*
8	2361.1 \pm 62.1	1000.9 \pm 78.1*	3101.0 \pm 64.7*	12574.5 \pm 82.8*
9	681.7 \pm 50.3	163.7 \pm 46.1*	292.8 \pm 65.8**	12773.5 \pm 79.1*
10	2066.3 \pm 47.0	866.4 \pm 54.2*	1563.2 \pm 40.2*	10133.0 \pm 75.5*
11	1149.6 \pm 131.5	369.9 \pm 72.4*	302.5 \pm 108.7*	5092.4 \pm 29.7*
12	1122.6 \pm 34.0	667.2 \pm 79.5*	408.4 \pm 79.3*	5746.0 \pm 54.6*
13	694.1 \pm 59.3	375.1 \pm 19.7*	280.5 \pm 40.7*	1294.9 \pm 52.9*
14	1260.0 \pm 72.1	228.0 \pm 49.7*	646.5 \pm 81.3*	13205.3 \pm 127.8*
15	1595.2 \pm 14.2	485.3 \pm 61.8*	1028.3 \pm 86.8*	9984.5 \pm 13.1*
16	1054.2 \pm 82.0	968.8 \pm 59.9	720.1 \pm 99.1*	12696.8 \pm 161.8*
17	547.6 \pm 51.8	459.2 \pm 65.0	176.9 \pm 14.0*	3415.7 \pm 195.0*
18	2084.2 \pm 30.4	689.6 \pm 59.9*	1236.1 \pm 43.0*	6666.0 \pm 71.9*
19	1524.2 \pm 42.3	1254.5 \pm 88.1*	1544.2 \pm 73.7	5347.0 \pm 265.9*
20	10.4 \pm 0.3	27.4 \pm 15.8	22.8 \pm 1.7	37.7 \pm 11.5

I risultati sono espressi come media \pm SE di tre esperimenti indipendenti. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. Gli asterischi denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione contro il fresco usato come controllo positivo.

Tabella 7.7: Contenuto micellare di carotenoidi ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$) ottenuto da peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi

Capsantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
2	264.9 \pm 43.1	242.2 \pm 27.5	414.0 \pm 50.7	1418.9 \pm 52.5*
3	216.0 \pm 38.1	112.4 \pm 9.7	146.6 \pm 22.1	3901.3 \pm 48.7*
4	297.3 \pm 20.4	295.6 \pm 59.5	441.5 \pm 26.0	2404.0 \pm 31.7*
5	169.3 \pm 20.0	181.2 \pm 24.5	92.6 \pm 3.2	2018.8 \pm 40.7*
6	357.8 \pm 31.4	398.5 \pm 73.6	438.9 \pm 53.4	1956.1 \pm 72.0*
7	387.3 \pm 88.1	138.8 \pm 26.3*	153.1 \pm 25.6*	1862.8 \pm 6.0*
8	0.0 \pm 0.0	167.9 \pm 35.0*	54.9 \pm 5.3	1089.5 \pm 12.1*
9	277.5 \pm 78.8	113.5 \pm 29.7*	69.1 \pm 37.1*	3816.8 \pm 36.5*
10	390.4 \pm 28.9	212.1 \pm 32.1*	259.1 \pm 61.4	2475.1 \pm 27.4*
11	400.1 \pm 57.4	243.6 \pm 10.7*	193.6 \pm 32.5*	1174.8 \pm 43.6*
12	363.9 \pm 36.0	106.3 \pm 30.2*	186.4 \pm 3.4*	2022.1 \pm 85.5*
13	278.2 \pm 8.4	113.8 \pm 18.1*	81.8 \pm 11.8*	1479.7 \pm 56.4*
14	460.1 \pm 35.1	168.8 \pm 32.9*	278.2 \pm 45.1*	4320.5 \pm 365.7*
15	430.9 \pm 38.0	166.6 \pm 30.4*	270.3 \pm 35.8	3998.8 \pm 67.7*
16	274.8 \pm 54.7	102.9 \pm 3.8*	110.8 \pm 6.6*	960.8 \pm 42.0*
17	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0*
18	430.9 \pm 22.3	203.3 \pm 23.6*	257.7 \pm 80.3*	2981.3 \pm 42.0*
19	257.4 \pm 22.8	138.5 \pm 66.4	125.6 \pm 2.7*	755.4 \pm 51.5
20	67.0 \pm 17.9	23.8 \pm 5.6	33.1 \pm 9.2	174.9 \pm 18.0*

Zeaxantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 \pm 0.0	52.0 \pm 9.6*	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
2	0.0 \pm 0.0	58.4 \pm 6.6*	54.7 \pm 0.0	659.7 \pm 69.4*
3	75.3 \pm 13.2	64.1 \pm 17.2	58.4 \pm 2.8	500.2 \pm 23.4*
4	26.7 \pm 13.3	16.0 \pm 0.7	64.7 \pm 3.5	1586.6 \pm 54.7*
5	42.7 \pm 7.0	25.1 \pm 5.3	62.3 \pm 2.9	450.9 \pm 53.2*
6	111.3 \pm 22.7	89.1 \pm 8.6	84.4 \pm 15.5	756.6 \pm 74.3*
7	44.6 \pm 13.2	39.6 \pm 3.8	32.2 \pm 0.0	689.9 \pm 239.1*
8	0.0 \pm 0.0	69.6 \pm 7.6*	0.0 \pm 0.0	225.1 \pm 76.8*
9	34.4 \pm 11.6	14.0 \pm 3.0	0.0 \pm 0.0	465.6 \pm 44.7*
10	109.4 \pm 15.4	59.0 \pm 8.8*	99.5 \pm 24.3	1229.5 \pm 62.8*
11	50.3 \pm 14.3	28.7 \pm 6.6	0.0 \pm 0.0*	86.8 \pm 9.3*
12	41.0 \pm 5.6	18.2 \pm 5.3	27.2 \pm 0.0	509.2 \pm 19.3*
13	56.9 \pm 4.8	12.4 \pm 3.9*	0.0 \pm 0.0*	194.3 \pm 22.5*
14	32.8 \pm 7.0	10.8 \pm 1.9	0.0 \pm 0.0*	627.6 \pm 27.3*
15	41.3 \pm 8.3	14.7 \pm 1.6	0.0 \pm 0.0*	740.9 \pm 62.7*
16	68.7 \pm 8.7	35.3 \pm 1.8	0.0 \pm 0.0*	226.6 \pm 14.3*
17	77.6 \pm 32.9	74.0 \pm 14.3	0.0 \pm 0.0*	785.0 \pm 3.4*
18	56.3 \pm 15.9	27.2 \pm 4.7	0.0 \pm 0.0*	615.8 \pm 35.7*
19	38.4 \pm 6.5	16.9 \pm 7.0	0.0 \pm 0.0*	216.4 \pm 3.2*
20	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

I risultati sono espressi come media \pm SE di tre esperimenti indipendenti. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. Gli asterischi denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione contro il fresco usato come controllo positivo.

Tabella 7.8: Contenuto micellare di carotenoidi ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$) ottenuto da peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi

Anteraxantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
2	45.1 \pm 26.6	34.6 \pm 3.0	82.4 \pm 16.1	546.4 \pm 61.3*
3	36.4 \pm 2.8	28.0 \pm 4.3	31.7 \pm 5.7	729.5 \pm 78.9*
4	73.4 \pm 41.6	49.3 \pm 12.1	108.5 \pm 11.3	907.8 \pm 20.3*
5	41.5 \pm 9.3	47.1 \pm 6.3	51.4 \pm 2.6	438.0 \pm 71.6*
6	41.0 \pm 5.5	79.7 \pm 10.8	111.6 \pm 14.4*	622.9 \pm 48.2*
7	84.0 \pm 29.5	37.9 \pm 4.0	50.1 \pm 8.3	566.5 \pm 69.7*
8	0.0 \pm 0.0	52.9 \pm 13.5	0.0 \pm 0.0	445.3 \pm 62.9
9	74.4 \pm 32.3	32.3 \pm 5.2*	0.0 \pm 0.0	836.9 \pm 51.5*
10	79.2 \pm 15.8	51.8 \pm 9.1	82.1 \pm 8.0	782.3 \pm 32.7*
11	74.7 \pm 15.9	92.2 \pm 28.6	41.5 \pm 10.3	543.2 \pm 40.6*
12	62.1 \pm 3.7	25.9 \pm 6.0	31.8 \pm 8.3	482.0 \pm 15.5*
13	89.9 \pm 29.2	38.0 \pm 4.8	32.5 \pm 6.7	310.7 \pm 41.5
14	79.1 \pm 5.2	32.4 \pm 5.0	62.8 \pm 16.4	1002.2 \pm 26.7*
15	111.5 \pm 26.8	39.6 \pm 4.8*	52.9 \pm 6.5	1082.1 \pm 54.8*
16	65.2 \pm 12.9	33.8 \pm 0.5	35.6 \pm 4.6	226.2 \pm 10.9*
17	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	436.3 \pm 38.7*
18	101.3 \pm 12.4	41.5 \pm 5.5*	52.9 \pm 17.3	948.1 \pm 75.5*
19	54.0 \pm 21.3	33.5 \pm 8.0*	0.0 \pm 0.0	194.2 \pm 3.2*
20	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

Violaxantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
2	62.1 \pm 37.0	18.0 \pm 1.2*	56.7 \pm 7.5	156.5 \pm 6.0
3	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	93.6 \pm 14.7*
4	0.0 \pm 0.0	25.2 \pm 4.2	34.9 \pm 5.7*	153.6 \pm 67.5*
5	0.0 \pm 0.0	18.2 \pm 5.3*	0.0 \pm 0.0	62.4 \pm 1.8*
6	0.0 \pm 0.0	41.3 \pm 10.1*	0.0 \pm 0.0	236.7 \pm 58.0*
7	0.0 \pm 0.0	11.1 \pm 0.6	0.0 \pm 0.0	94.2 \pm 22.3*
8	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0*	0.0 \pm 0.0	70.1 \pm 10.8*
9	0.0 \pm 0.0	7.1 \pm 3.7	0.0 \pm 0.0	163.7 \pm 42.6*
10	0.0 \pm 0.0	21.3 \pm 1.2	0.0 \pm 0.0	155.3 \pm 27.2*
11	18.1 \pm 5.0	20.4 \pm 4.0	0.0 \pm 0.0*	145.4 \pm 36.8*
12	0.0 \pm 0.0	7.9 \pm 2.3	0.0 \pm 0.0	39.7 \pm 11.8
13	0.0 \pm 0.0	11.3 \pm 2.5	0.0 \pm 0.0	175.9 \pm 49.9*
14	20.4 \pm 5.0	10.3 \pm 1.8	0.0 \pm 0.0	242.3 \pm 11.6*
15	30.2 \pm 2.2	13.7 \pm 0.9	0.0 \pm 0.0*	155.3 \pm 56.5
16	14.1 \pm 2.4	12.6 \pm 1.2	0.0 \pm 0.0	193.8 \pm 24.5*
17	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	154.3 \pm 6.2*
18	34.1 \pm 8.1	14.9 \pm 1.9	29.0 \pm 9.0	60.1 \pm 9.8
19	0.0 \pm 0.0	14.0 \pm 4.2*	0.0 \pm 0.0	43.1 \pm 5.5*
20	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

I risultati sono espressi come media \pm SE di tre esperimenti indipendenti. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. Gli asterischi denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione contro il fresco usato come controllo positivo.

Tabella 7.9: Contenuto micellare di carotenoidi ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$) ottenuto da peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi

Neoxantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	163.2 \pm 32.1*
3	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
4	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
5	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
6	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	91.1 \pm 2.9*
7	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
8	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
9	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
10	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	40.9 \pm 1.5*
11	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	57.3 \pm 4.2*
12	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
13	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
14	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
15	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
16	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
17	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	139.3 \pm 8.0
18	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
19	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
20	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

Luteina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	50.4 \pm 10.1	86.6 \pm 15.2	43.6 \pm 9.0	82.3 \pm 6.3*
2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	96.7 \pm 9.7*
3	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	223.5 \pm 7.9*
4	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	146.9 \pm 12.1*
5	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	100.9 \pm 19.3*
6	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	116.3 \pm 7.9*
7	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	119.7 \pm 7.0*
8	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	116.6 \pm 11.1*
9	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	217.7 \pm 17.8*
10	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	86.0 \pm 5.4*
11	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	95.4 \pm 26.1*
12	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	148.5 \pm 11.6*
13	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	64.1 \pm 19.2*
14	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	259.7 \pm 40.5*
15	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	173.5 \pm 1.5*
16	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	54.7 \pm 6.6*
17	176.6 \pm 19.3	53.9 \pm 2.3	0.0 \pm 0.0	2419.7 \pm 247.2*
18	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	92.0 \pm 3.3*
19	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	46.3 \pm 2.3*
20	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

I risultati sono espressi come media \pm SE di tre esperimenti indipendenti. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. Gli asterischi denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione contro il fresco usato come controllo positivo.

Tabella 7.10: Contenuto micellare di carotenoidi ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) ottenuto da peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi

β-Criptoxantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
2	20.1 \pm 8.2	60.6 \pm 7.2*	52.4 \pm 3.0*	360.6 \pm 64.2*
3	35.5 \pm 5.5	35.6 \pm 2.9	33.8 \pm 7.3	85.2 \pm 18.5
4	16.7 \pm 7.2	11.9 \pm 2.5	27.9 \pm 3.2	247.2 \pm 49.9*
5	15.1 \pm 2.2	8.9 \pm 1.5	14.4 \pm 1.3	58.6 \pm 7.8*
6	30.5 \pm 6.4	71.7 \pm 7.2*	49.3 \pm 8.0	340.1 \pm 63.6*
7	51.6 \pm 21.3	22.9 \pm 0.5*	23.8 \pm 3.5	158.3 \pm 32.4
8	23.1 \pm 9.4	40.9 \pm 11.5	11.8 \pm 3.0	117.6 \pm 12.2
9	15.7 \pm 5.5	8.5 \pm 2.2	6.4 \pm 4.0	274.4 \pm 72.0*
10	49.2 \pm 8.7	23.5 \pm 3.8	47.6 \pm 4.7	153.7 \pm 67.0
11	45.4 \pm 11.9	35.5 \pm 9.9	23.8 \pm 3.8	114.2 \pm 11.5*
12	18.9 \pm 0.4	9.1 \pm 2.9	9.5 \pm 2.9	130.0 \pm 47.6*
13	31.9 \pm 3.8	9.5 \pm 4.3	10.2 \pm 3.4	118.8 \pm 72.5*
14	16.9 \pm 1.8	5.4 \pm 2.2	29.1 \pm 4.7	190.3 \pm 24.8*
15	21.1 \pm 3.6	5.5 \pm 2.3	17.2 \pm 5.6	96.2 \pm 28.4*
16	35.2 \pm 4.3	16.3 \pm 1.8	16.9 \pm 2.2	110.2 \pm 15.5
17	19.8 \pm 11.2	8.5 \pm 1.0	1.4 \pm 1.4	203.3 \pm 54.6*
18	43.1 \pm 15.8	26.4 \pm 2.7	31.8 \pm 8.4	81.7 \pm 9.0
19	28.7 \pm 5.1	40.9 \pm 26.4	3.9 \pm 2.6	39.8 \pm 9.8
20	4.3 \pm 1.5	0.0 \pm 0.0	3.3 \pm 3.3	0.0 \pm 0.0

β-Carotene				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 \pm 0.0	2.6 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
2	35.8 \pm 7.6	57.2 \pm 14.4	52.6 \pm 7.0	203.6 \pm 24.6*
3	59.3 \pm 10.8	22.6 \pm 4.3	22.2 \pm 3.0	118.8 \pm 21.0
4	65.8 \pm 14.1	66.4 \pm 17.9	79.6 \pm 12.8	85.3 \pm 8.1
5	28.7 \pm 3.6	27.1 \pm 12.6	30.4 \pm 6.2	141.1 \pm 24.5*
6	37.8 \pm 4.3	49.0 \pm 5.9	86.7 \pm 21.3	251.3 \pm 53.0
7	152.9 \pm 39.9	81.7 \pm 7.0*	89.0 \pm 13.0	144.9 \pm 25.8
8	43.7 \pm 13.1	76.8 \pm 23.8	52.5 \pm 13.9	166.4 \pm 33.6
9	28.7 \pm 5.8	19.2 \pm 4.0	12.0 \pm 1.1	164.7 \pm 33.5
10	69.4 \pm 12.8	24.0 \pm 3.6	81.8 \pm 20.4	118.4 \pm 5.1
11	79.5 \pm 14.2	93.9 \pm 41.4	38.3 \pm 10.8	664.6 \pm 43.3*
12	89.5 \pm 27.8	24.8 \pm 7.0*	50.5 \pm 5.9	259.8 \pm 48.0
13	18.8 \pm 5.4	19.3 \pm 8.2	7.1 \pm 2.6	65.4 \pm 9.7
14	34.0 \pm 6.8	21.1 \pm 9.5	34.7 \pm 9.0	180.8 \pm 22.2*
15	89.9 \pm 19.6	30.1 \pm 3.4	75.2 \pm 13.7	198.4 \pm 22.6
16	27.4 \pm 13.2	23.4 \pm 0.8	32.5 \pm 5.6	49.9 \pm 7.9
17	17.2 \pm 5.9	18.6 \pm 2.5	18.5 \pm 3.0	1290.5 \pm 73.4*
18	110.9 \pm 36.1	71.0 \pm 5.1	108.1 \pm 15.1	77.6 \pm 10.9
19	108.2 \pm 7.9	114.2 \pm 17.6	72.9 \pm 8.0	23.3 \pm 4.9*
20	4.0 \pm 0.4	3.0 \pm 0.9	16.8 \pm 3.3	0.0 \pm 0.0*

I risultati sono espressi come media \pm SE di tre esperimenti indipendenti. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. Gli asterischi denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione contro il fresco usato come controllo positivo.

Tabella 7.11: Bioaccessibilità di carotenoidi (%) di peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi

Capsantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2	15.2 ± 2.3	54.3 ± 2.9*	44.7 ± 8.1*	44.9 ± 1.5*
3	23.3 ± 5.2	45.7 ± 9.2	21.6 ± 3.1	78.5 ± 0.4*
4	21.5 ± 1.6	57.8 ± 9.4*	51.4 ± 2.3*	44.0 ± 0.9*
5	76.0 ± 6.3	53.3 ± 11.4	81.0 ± 2.4	32.8 ± 0.6*
6	31.5 ± 3.8	85.6 ± 1.7*	17.4 ± 1.9	25.6 ± 1.1
7	50.2 ± 11.8	40.2 ± 11.9	22.4 ± 5.4	29.8 ± 0.3*
8	0.0 ± 0.0	58.0 ± 6.7*	11.0 ± 1.5	17.4 ± 0.1*
9	32.2 ± 8.0	32.1 ± 7.0	9.7 ± 5.4	24.9 ± 0.2
10	48.4 ± 1.4	34.3 ± 5.1	28.4 ± 7.2	97.4 ± 2.0*
11	69.7 ± 13.3	66.2 ± 7.1	23.7 ± 2.8*	70.2 ± 3.9
12	54.2 ± 2.4	32.6 ± 7.7	25.9 ± 1.5*	29.1 ± 1.6*
13	98.5 ± 3.2	19.2 ± 3.1*	11.8 ± 13*	37.4 ± 2.0*
14	30.8 ± 2.8	33.1 ± 6.1	21.8 ± 3.3	63.5 ± 5.7*
15	32.6 ± 3.5	48.1 ± 9.0	20.6 ± 4.0	57.7 ± 1.9*
16	36.9 ± 9.8	33.7 ± 6.2	12.0 ± 1.1	12.1 ± 0.6
17	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
18	23.1 ± 1.2	50.4 ± 10.7	21.2 ± 6.5	31.2 ± 0.7*
19	33.3 ± 4.7	29.4 ± 11.9	12.5 ± 1.1	11.7 ± 0.7
20	69.3 ± 26.2	8.8 ± 0.0*	47.8 ± 6.3	32.6 ± 4.2

Zeaxantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 ± 0.0	26.3 ± 9.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2	0.0 ± 0.0	52.7 ± 2.8*	0.0 ± 0.0	72.4 ± 6.5*
3	20.9 ± 4.0	38.1 ± 16.7	25.0 ± 4.4	35.5 ± 3.3
4	30.5 ± 17.1	64.9 ± 3.4	93.4 ± 21.4*	56.1 ± 2.0
5	59.6 ± 5.2	29.7 ± 6.2	201.9 ± 54.1*	55.0 ± 6.8
6	25.5 ± 5.0	69.3 ± 6.2	24.0 ± 2.4	70.2 ± 4.8*
7	35.3 ± 12.1	79.5 ± 11.8	0.0 ± 0.0	47.5 ± 16.7
8	0.0 ± 0.0	69.2 ± 5.5	0.0 ± 0.0	41.2 ± 12.2
9	58.7 ± 20.0	79.6 ± 2.7	0.0 ± 0.0	21.8 ± 1.6
10	74.5 ± 24.1	83.8 ± 23.7	58.8 ± 7.7	82.1 ± 1.9
11	53.9 ± 17.9	81.2 ± 2.4	0.0 ± 0.0	45.4 ± 3.8
12	61.0 ± 13.4	53.1 ± 16.9	0.0 ± 0.0*	79.8 ± 7.8
13	70.0 ± 3.7	23.9 ± 4.8	0.0 ± 0.0*	38.1 ± 5.2*
14	31.0 ± 2.2	67.6 ± 21.9	0.0 ± 0.0	39.1 ± 1.1*
15	59.6 ± 7.4	90.0 ± 11.3*	0.0 ± 0.0*	84.6 ± 2.8
16	73.3 ± 10.3	82.1 ± 21.5*	0.0 ± 0.0*	25.3 ± 2.0
17	27.3 ± 11.3	89.8 ± 62.1	0.0 ± 0.0	92.0 ± 1.8
18	32.7 ± 5.9	89.3 ± 24.2	0.0 ± 0.0	41.2 ± 2.4
19	68.5 ± 11.6	73.7 ± 36.0	0.0 ± 0.0	27.1 ± 1.3
20	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

I risultati sono espressi come media ± SE di tre esperimenti indipendenti. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. Gli asterischi denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione contro il fresco usato come controllo positivo.

Tabella 7.12: Bioaccessibilità di carotenoidi (%) di peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi

Anteraxantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2	9.1 ± 5.4	33.0 ± 1.7	42.4 ± 15.3	60.0 ± 6.3*
3	14.9 ± 3.5	41.1 ± 4.7	13.0 ± 3.2	10.9 ± 1.1
4	28.3 ± 19.5	59.3 ± 8.5	48.5 ± 14.7	28.7 ± 1.1
5	37.5 ± 9.0	87.3 ± 28.4*	103.0 ± 20.0*	26.7 ± 4.7
6	11.4 ± 2.6	94.0 ± 2.0*	12.7 ± 0.9	28.0 ± 1.7
7	35.2 ± 17.2	38.8 ± 8.2	24.3 ± 6.3	23.1 ± 2.6
8	0.0 ± 0.0	50.9 ± 7.7	0.0 ± 0.0	24.1 ± 3.5*
9	33.7 ± 15.3	44.8 ± 8.5	0.0 ± 0.0	14.4 ± 0.9
10	28.1 ± 6.0	38.7 ± 9.0	32.4 ± 1.7	42.0 ± 2.7
11	27.1 ± 6.6	62.4 ± 3.5	20.8 ± 5.9	45.7 ± 1.4
12	37.5 ± 7.2	38.9 ± 11.7	21.4 ± 5.9	25.5 ± 1.0
13	50.1 ± 19.0	25.2 ± 4.0	17.4 ± 3.4	19.6 ± 2.9
14	20.6 ± 1.8	35.4 ± 4.0	15.6 ± 4.6	20.9 ± 0.4
15	44.3 ± 15.8	65.7 ± 8.0	23.8 ± 8.1	46.4 ± 2.8
16	36.6 ± 16.2	41.8 ± 8.9	14.9 ± 4.0	11.0 ± 0.9
17	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	34.5 ± 2.1*
18	20.0 ± 1.0	42.2 ± 10.0	16.5 ± 4.4	26.4 ± 2.2
19	35.2 ± 19.9	37.4 ± 6.7	0.0 ± 0.0	12.5 ± 0.7
20	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Violaxantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2	12.5 ± 7.1	17.5 ± 1.3	43.9 ± 11.2	16.1 ± 1.3
3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.3 ± 1.2
4	0.0 ± 0.0	52.0 ± 12.4	23.8 ± 1.2	11.1 ± 4.9
5	0.0 ± 0.0	19.2 ± 2.2*	0.0 ± 0.0	11.9 ± 1.0
6	0.0 ± 0.0	88.4 ± 1.2*	0.0 ± 0.0	19.7 ± 4.0
7	0.0 ± 0.0	12.9 ± 4.1	0.0 ± 0.0	5.6 ± 1.5
8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.7 ± 2.4
9	0.0 ± 0.0	9.9 ± 5.3	0.0 ± 0.0	8.9 ± 2.4
10	0.0 ± 0.0	23.8 ± 3.6	0.0 ± 0.0	21.7 ± 4.1
11	11.1 ± 5.3	9.9 ± 0.4*	0.0 ± 0.0*	7.4 ± 2.0
12	0.0 ± 0.0	12.8 ± 4.7	0.0 ± 0.0	6.7 ± 2.1*
13	0.0 ± 0.0	10.3 ± 2.1	0.0 ± 0.0	19.4 ± 6.2*
14	12.8 ± 6.0	29.5 ± 6.1	0.0 ± 0.0	12.8 ± 1.1
15	14.3 ± 0.6	29.6 ± 5.4	0.0 ± 0.0	20.0 ± 6.7
16	4.9 ± 1.6	12.4 ± 3.1	0.0 ± 0.0	14.7 ± 1.8*
17	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.3 ± 0.1*
18	17.4 ± 4.6	41.5 ± 23.9	42.5 ± 23.9	14.1 ± 2.1
19	0.0 ± 0.0	11.4 ± 0.0*	0.0 ± 0.0	5.8 ± 0.6*
20	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

I risultati sono espressi come media ± SE di tre esperimenti indipendenti. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. Gli asterischi denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione contro il fresco usato come controllo positivo.

Tabella 7.13: Bioaccessibilità di carotenoidi (%) di peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi

Neoxantina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	94.8 ± 27.3*
3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	39.7 ± 4.3*
7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	60.2 ± 9.7*
11	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	17.3 ± 1.9*
12	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
13	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
14	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
15	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
16	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
17	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	81.5 ± 7.1*
18	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
19	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
20	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Luteina				
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	20.7 ± 6.5	16.0 ± 2.6	25.5 ± 5.8	82.9 ± 23.9
2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	80.0 ± 12.1*
3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	35.9 ± 1.0*
4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	52.6 ± 12.1*
5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	41.0 ± 12.7*
6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	72.5 ± 6.5*
7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	36.9 ± 5.8*
8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	55.3 ± 3.1*
9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	27.7 ± 1.2*
10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	53.7 ± 7.5*
11	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	59.5 ± 3.1*
12	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	76.2 ± 10.0*
13	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	26.5 ± 7.4*
14	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	44.2 ± 5.6*
15	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	67.0 ± 2.8*
16	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	23.4 ± 4.5*
17	28.9 ± 3.6	15.8 ± 3.4*	0.0 ± 0.0*	66.7 ± 7.7
18	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	21.7 ± 1.7*
19	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	16.7 ± 2.2*
20	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

I risultati sono espressi come media ± SE di tre esperimenti indipendenti. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. Gli asterischi denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione contro il fresco usato come controllo positivo.

Tabella 7.14: Bioaccessibilità di carotenoidi (%) di peperoncini freschi, congelati, bolliti e secchi

	β-Criptoxantina			
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2	1.2 ± 0.5	32.9 ± 7.9	18.8 ± 1.5	12.2 ± 2.1*
3	3.7 ± 0.5	30.3 ± 9.4	4.1 ± 1.2	3.8 ± 0.7
4	6.0 ± 2.8	79.0 ± 8.3	74.0 ± 38.4	4.3 ± 0.9
5	11.3 ± 2.4	18.4 ± 3.1	51.3 ± 15.9	10.2 ± 0.7
6	4.7 ± 0.9	74.4 ± 1.2	24.2 ± 3.5	12.5 ± 2.3
7	7.4 ± 3.4	49.7 ± 7.3	29.1 ± 8.8	4.3 ± 0.8
8	3.3 ± 1.2	63.5 ± 8.7	8.1 ± 3.0	7.3 ± 0.6
9	8.8 ± 5.3	36.6 ± 7.8	31.6 ± 24.9	7.6 ± 2.1
10	8.0 ± 1.2	47.1 ± 13.0	45.2 ± 12.3	4.9 ± 2.1
11	14.3 ± 4.6	58.0 ± 3.8	68.3 ± 50.7	16.5 ± 1.8*
12	6.5 ± 0.7	27.0 ± 8.1	23.7 ± 7.1	10.6 ± 3.7
13	10.6 ± 1.3	13.1 ± 6.1	56.3 ± 40.8	7.2 ± 4.4
14	6.8 ± 0.5	23.8 ± 8.8	39.3 ± 9.2	5.9 ± 0.8
15	7.9 ± 0.8	27.6 ± 13.0	29.8 ± 9.3	6.4 ± 2.0
16	5.5 ± 0.8	19.4 ± 6.0	24.9 ± 92.0	2.5 ± 0.3
17	6.5 ± 3.6	97.2 ± 41.5	5.4 ± 5.4	5.9 ± 1.6
18	7.6 ± 2.6	32.1 ± 7.5	33.0 ± 16.2	5.1 ± 0.6
19	5.9 ± 1.1	98.7 ± 71.5	3.5 ± 2.6	2.4 ± 0.6*
20	53.3 ± 20.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0

	β-Carotene			
	freschi	congelati	bolliti	secchi
1	0.0 ± 0.0	8.2 ± 3.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2	1.5 ± 0.3	10.7 ± 3.5*	15.0 ± 2.8	1.5 ± 0.2
3	3.0 ± 0.6	3.9 ± 0.9	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.2*
4	6.4 ± 1.6	25.9 ± 4.5	9.0 ± 2.3	0.5 ± 0.0
5	2.3 ± 0.3	6.9 ± 1.3	13.2 ± 4.0	1.9 ± 0.3
6	1.9 ± 0.2	10.9 ± 1.3*	6.9 ± 1.4	2.5 ± 0.5
7	7.1 ± 1.9	5.7 ± 0.6	5.0 ± 0.9	1.2 ± 0.2
8	1.8 ± 0.5	7.5 ± 2.1	1.7 ± 0.4	1.3 ± 0.3
9	4.2 ± 0.6	16.0 ± 8.3	4.4 ± 0.8	1.3 ± 0.3*
10	3.3 ± 0.6	2.8 ± 0.4	5.2 ± 1.2	1.2 ± 0.0
11	7.4 ± 2.0	23.2 ± 6.5	16.7 ± 6.2	13.1 ± 0.9
12	7.9 ± 2.4	3.6 ± 0.7	13.4 ± 3.3	4.5 ± 0.8
13	2.6 ± 0.5	5.0 ± 1.9	2.8 ± 1.3	5.0 ± 0.7
14	2.7 ± 0.4	9.4 ± 4.6	5.3 ± 1.2	1.4 ± 0.2
15	5.6 ± 1.2	6.3 ± 0.5	7.2 ± 0.7	2.0 ± 0.2
16	2.4 ± 1.2	2.4 ± 0.2	4.5 ± 0.4	0.4 ± 0.1
17	3.3 ± 1.4	4.3 ± 1.0	10.8 ± 2.4	38.0 ± 2.9*
18	5.4 ± 1.8	10.4 ± 0.9	8.7 ± 1.1	1.2 ± 0.2
19	7.1 ± 0.5	9.0 ± 0.8	4.7 ± 0.5	0.4 ± 0.1*
20	38.5 ± 3.4	17.4 ± 6.5*	73.3 ± 12.6*	0.0 ± 0.0*

I risultati sono espressi come media ± SE di tre esperimenti indipendenti. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. Gli asterischi denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione contro il fresco usato come controllo positivo.

Tabella 7.15: Rese percentuali e perdita contenuto acqua di vegetazione dei frutti di peperoncino dopo i diversi metodi di processazione

Processazione		Bollito		Congelato		Essiccato	
Specie	cultivar	Resa %	Perdita %	Resa %	Perdita %	Resa %	Perdita %
<i>annuum</i>	Yellow Cayenne	93.73	6.27	99.63	0.37	28.54	71.46
<i>annuum</i>	Portafortuna	90.12	9.88	98.76	1.24	29.86	70.14
<i>annuum</i>	Idealino	98.54	1.46	99.73	0.27	26.71	73.29
<i>annuum</i>	Sole	97.81	2.19	99.48	0.52	30.64	69.36
<i>baccatum</i>	Campana	99.01	0.99	98.35	1.65	27.54	72.46
<i>annuum</i>	Duemila	98.19	1.81	99.69	0.31	27.36	72.64
<i>annuum</i>	Pellegrino	98.77	1.23	98.88	1.12	31.32	68.68
<i>annuum</i>	Fantasia	97.95	2.05	99.64	0.36	21.95	78.05
<i>chacoense</i>	Chaco	98.12	1.88	99.36	0.64	23.65	76.35
<i>annuum</i>	Loco	95.76	4.24	99.32	0.68	24.66	75.34
<i>baccatum</i>	Aji Angelo	92.75	7.25	99.30	0.70	29.87	70.13
<i>annuum</i>	Effix	91.87	8.13	99.75	0.25	22.54	77.46
<i>annuum</i>	Acrata	92.37	7.63	99.25	0.75	25.84	74.16
<i>annuum</i>	O di Giotto	93.72	6.28	99.12	0.88	27.89	72.11
<i>annuum</i>	Arlecchino	96.56	3.44	99.45	0.55	26.19	73.81
<i>annuum</i>	Nobile	95.21	4.79	99.51	0.49	28.36	71.64
<i>annuum</i>	Taballo	94.84	5.16	99.58	0.42	25.01	74.99
<i>annuum</i>	Border	96.71	3.29	99.18	0.82	23.71	76.29
<i>annuum</i>	Hierro	85.55	14.45	99.69	0.31	20.33	79.67
<i>chinense</i>	Cap. di Scimmia	99.27	0.73	99.16	0.84	22.51	77.49
Media		95.72	4.27	99.36	0.64	25.89	74.11
Range	Limite superiore	99.27	0.73	99.16	0.27	31.32	68.68
	Limite inferiore	74.97	4.28	99.88	1.12	20.33	79.67

Capitolo 8

Analisi fitochimica e valutazione attività antiossidante di frutti di peperoncino

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono coinvolte nella patogenesi di diverse malattie umane e vi sono prove crescenti che il consumo di alcuni alimenti, tra cui anche i peperoncini, porta a una riduzione di alcuni parametri di danno ossidativo nei sistemi biologici (Materska & Perucka, 2005).

E', infatti, oramai accertato il legame tra assunzione di determinati alimenti e la prevenzione di numerose malattie.

Partendo da queste evidenze, il secondo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare l'abilità antiossidante degli estratti totali ottenuti dai frutti di *Capsicum* e confrontare i risultati ottenuti dai diversi test con la presenza di carotenoidi, capsaicinoidi, polifenoli totali, flavonoidi.

Diversi metodi sono stati sviluppati recentemente per misurare la capacità antiossidante di una matrice alimentare. Questi saggi differenziano nell'utilizzo di differenti radicali e/o di diverse molecole bersaglio, e nel modo in cui vengono misurati i risultati. E' opportuno, però, considerare che diversi composti antiossidanti possono agire attraverso diversi meccanismi, e nessun singolo metodo può essere in grado di valutare pienamente l'abilità antiossidante di un alimento (Pellegrini et al., 2003).

Il processo ossidativo *in vivo*, infatti, è piuttosto complesso e coinvolge vari attori. Pertanto, indagare l'attività antiossidante scegliendo un adeguato saggio è una operazione particolarmente critica (Moon & Shibamoto, 2009).

Un approccio vincente che possa rendere conto di questa complessità vede la necessità di impiegare differenti metodiche analitiche.

L'attività antiossidante è stata, quindi, valutata impiegando quattro sistemi *in vitro*: il DPPH test, l'ABTS test, il β -carotene blanching test e il FRAP test.

8.1 Materiale e Metodi

8.1.1 Preparazione degli estratti di peperoncino e resa estrattiva

I frutti di peperoncino delle venti cultivar elencate nella Tabella generale sono stati lavati con acqua distillata deionizzata e tagliati longitudinalmente in pezzettini standardizzati al fine di garantire quanto più possibile la replicazione delle condizioni. I frutti, similmente allo studio sulla bioaccessibilità dei carotenoidi, sono stati analizzati, oltre che allo stato crudo (fresco), anche dopo averli sottoposti ai metodi di processazione. La procedura di cottura è stata eseguita immergendo i peperoncini in acqua bollente e cuocendoli per dieci minuti, il congelamento è avvenuto tramite l'utilizzo di un normale freezer domestico per un periodo di quattro mesi a -20°C , mentre per l'essiccazione i peperoncini sono stati essiccati al sole secondo la metodologia tradizionale calabrese già descritta nel precedente capitolo.

L'estratto totale di ogni cultivar di peperoncino è stato ottenuto tramite una procedura di macerazione in solvente a temperatura ambiente. Le venti cultivar di peperoncino sono state poste a macerare in etanolo per un periodo di tempo utile al completo esaurimento della matrice vegetale.

8.1.2 Composizione chimica degli estratti totali dei peperoncini

L'analisi della composizione chimica degli estratti totale di peperoncino ha contemplato l'utilizzo di due metodi spettrofotometrici, per la valutazione del profilo polifenolico e flavonoico, e un'analisi gas-cromatografica per la misura del contenuto in capsaicinoidi.

Per il profilo in carotenoidi è stato, invece, usato il risultato ottenuto dall'estrazione effettuata nello studio della bioaccessibilità e dall'analisi in HPLC.

8.1.2.1 Dosaggio polifenoli totali

Il contenuto in polifenoli totali dei campioni di fiori edibili è stato valutato utilizzando il metodo colorimetrico del Folin-Ciocalteu.

Il metodo Folin-Ciocalteu è ancora il metodo ufficiale per la determinazione del contenuto totale di polifenoli (TPC) nella Comunità Europea. Questo metodo si basa sull'ossidazione chimica dei composti fenolici da parte di una miscela ossidante, chiamata reattivo di Folin-Ciocalteu, costituita da acido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) che, riducendosi, forma una miscela di ossidi (W_8O_{23} e Mo_8O_{23}) di colore azzurro. L'analisi è condotta mediante determinazione spettrofotometrica (Singleton & Rossi, 1965). Il saggio consiste nell'aggiungere 200 μ L del reattivo di Folin-Ciocalteu e 2 mL di acqua a 100 μ L dell'estratto da analizzare. Dopo 8 min e 30 s, si aggiunge 1 mL di Na_2CO_3 al 15% e si misura l'assorbanza a 765 nm dopo aver lasciato il campione per 2 h a temperatura ambiente. Nel saggio è stato utilizzato acido clorogenico come standard e i risultati sono stati determinati in triplicato. Il contenuto in polifenoli totali è stato espresso alla fine come equivalenti di acido clorogenico in mg per 100 g di fiori freschi (FW).

8.1.2.2 Dosaggio flavonoidi totali

Il contenuto in flavonoidi totali è stato valutato usando il saggio colorimetrico precedentemente sviluppato da Zhishen et al., 1999.

Il principio di base si fonda sul fatto che l'alluminio cloruro è in grado di formare complessi con i flavonoidi che posseggono gruppi orto-diidrossi, peri-idrossi-osso e orto-idrossi-osso. La formazione dei complessi è accompagnata da uno spostamento della banda di assorbimento nello spettro UV. In ambiente acido il complesso nei gruppi orto-diidrossi si rompe e vengono mantenuti solo i complessi tra il carbonile in C-4 e gli idrossidi in C-3 o C-5, più stabili (Smirnova & Pervykh, 1998).

Un millilitro di estratto o delle soluzioni standard di quercetina è aggiunto in una provetta con 5 ml di acqua distillata. Successivamente si aggiungono 0.3 ml di una soluzione al 5% (w/v) di nitrito di sodio. Dopo 5 minuti si aggiungono 0.6 ml di una soluzione al 10% (w/v) di AlCl₃ e, dopo altri 6 minuti, 2 ml di idrossido di sodio 1 M e 2.1 ml di acqua distillata. L'assorbanza è letta a 510 nm (spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 40 UV/VIS). Nel saggio è stato utilizzato il flavonoide quercetina come standard e i risultati sono stati determinati in triplicato. I dati sono stati espressi come milligrammi di quercetina equivalenti (QE)/100 g di pianta fresca (FW) (Yoo et al., 2008).

8.1.2.3 Dosaggio capsaicinoidi

Secondo il test di Scoville capsaicina e diidrocapsaicina sono i due capsaicinoidi più abbondanti e maggiormente responsabili della piccantezza dei frutti di *Capsicum*. Il loro valore di Scoville (Scoville Heat Units, SHU) è uguale a 16×10^6 , ed è paragonabile al valore dell'omocapsaicina e a quello della nordiidrocapsaicina che è di 9.1×10^6 e 8.6×10^6 , rispettivamente (Ravishankar et al., 2003).

Il contenuto in capsaicina e diidrocapsaicina è stato valutato mediante gas cromatografia, ma anche attraverso un test sensoriale gustativo effettuato su cinque persone non addestrate che hanno potuto descrivere la piccantezza dei peperoncini valutandoli su una scala da 1 a 10.

Per le analisi gascromatografiche è stato impiegato il gas cromatografo Shimadzu modello GC17 equipaggiato con FID detector e una colonna capillare non polare SE-54 (30 m; 0.25 mm i.d.; 0.25 μ m) e controllato con il software Borwin. Le analisi sono state realizzate in isoterma a 210 °C, utilizzando azoto come gas di trasporto. L'iniettore e il detector sono stati mantenuti a 250 °C e 280 °C, rispettivamente. Le analisi sono state realizzate in triplicato utilizzando capsaicina e diidrocapsaicina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) come standard esterni.

8.1.2.4 Dosaggio carotenoidi

Il metodo per l'analisi dei carotenoidi è stato descritto nel paragrafo 7.1.3 dove viene descritta l'estrazione dei carotenoidi dai frutti non sottoposti a procedura digestiva e utilizzati come paragone per i frutti sottoposti a digestione. Come valore dei carotenoidi totali è stata utilizzata la somma degli otto carotenoidi quantificati tramite HPLC (Tabella 7.1). In particolare, i valori dei frutti secchi (Tabella 8.11) sono il risultato dell'adattamento dei valori presenti in Tabella 7.1 riformulati in base alla perdita d'acqua (Tabella 7.15) e al conseguenziale fattore di concentrazione. È importante sottolineare, infatti, che per i campioni secchi è stato utilizzato il valore ottenuto dai frutti secchi non digeriti corretto in base alla resa percentuale ottenuta dall'analisi sui campioni secchi (7.15). Come specificato nel paragrafo 7.2, infatti, dopo le operazioni di processazioni si è assistito ad una minima, e quindi non importante, perdita d'acqua dai frutti congelati e bolliti, mentre dai frutti secchi la perdita d'acqua è stata in media del 74% (Tabella 7.15) Si è ritenuto, quindi, indispensabile la correzione di questi valori per uniformarli con quelli dei frutti sottoposti alle altre processazioni e con i frutti freschi (Tabella 8.11)

8.1.3 Attività antiossidante di frutti di peperoncino e metodi chimico-fisici *in vitro* utilizzati per lo studio degli antiossidanti

I metodi atti alla valutazione dell'attività antiossidante usati nel presente lavoro di tesi sono basati su una reazione di trasferimento elettronico (SET) nel caso del FRAP test, e su una reazione di trasferimento di un atomo d'idrogeno (HAT) tra un ossidante e un radicale libero nel caso dell'ABTS test e del DPPH test.

Al fine di ottenere un profilo più completo dell'attività antiossidante totale è stato effettuato anche il β -carotene bleaching test, saggio in grado di dare una stima della capacità dell'estratto di proteggere le molecole biologiche dall'ossidazione.

Gli estratti sono stati testati a diverse concentrazioni ed è stato calcolato un valore di IC₅₀ (concentrazione che provoca il 50% d'inibizione dell'ossidazione) per ogni saggio, tranne che nel FRAP test, in cui gli estratti sono stati testati a una sola concentrazione e il risultato è espresso in equivalenti di FeSO₄.

8.1.3.1 DPPH test

Il principio di questo metodo è l'inibizione del radicale stabile 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH⁺) (Brand-Williams et al., 1995).

Il DPPH, che è un radicale libero molto stabile, viene solitamente usato per testare la capacità di alcuni composti di agire come scavengers di radicali liberi. E' stabile grazie alla capacità di delocalizzare l'elettrone spaiato su tutta la molecola; in questo modo non si ha dimerizzazione, come invece accade nel caso di altri radicali

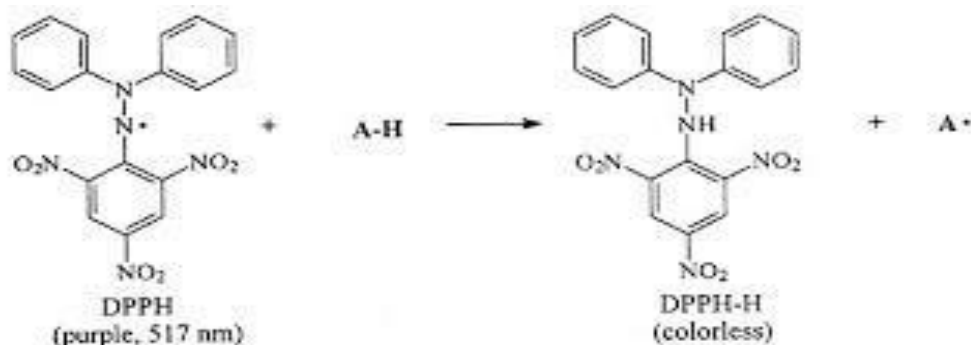


Figura 8.2 Struttura del DPPH prima e dopo la reazione con l'antiossidante (A-H)

La delocalizzazione dà luogo a un colore viola profondo (Molyneux et al., 2004), con massimo assorbimento a 517 nm, che varia da viola a giallo quando questo radicale lega un atomo di idrogeno ceduto da un antiossidante (*scavenger*) per formare la forma ridotta DPPH-H. Questa reazione è quindi facilmente monitorabile spettrofotometricamente. La percentuale di decolorazione è proporzionale all'attività antiossidante (attività "scavenger") dell'estratto

esaminato. Questo saggio può essere effettuato in microplate con 96 pozzetti in modo da poter testare più campioni alla volta a diverse concentrazioni. Per la realizzazione sono stati impiegati sei pozzetti della microplate per ogni concentrazione testata. In tre pozzetti sono stati aggiunti 240 µl di soluzione metanolica o di DPPH 1×10^{-4} M e 60 µl di soluzione contenente l'estratto, in altri tre pozzetti vengono aggiunti 240 µl di metanolo o e 60 µl di soluzione contenente l'estratto. Altri tre pozzetti sono stati utilizzati per allestire un controllo negativo in cui sono stati aggiunto 240 µl di DPPH e 60 µl di metanolo. La microplate viene riposta al buio per un tempo di trenta minuti. Successivamente, si passa alla lettura allo spettrofotometro per valutare l'assorbanza del campione alle diverse concentrazioni; se vi è attività antiossidante si verifica un cambiamento di colore dal viola al giallo. La lettura allo spettrofotometro (ELISA reader) viene fatta ad una lunghezza d'onda di 492 nm.

L'attività antiossidante degli estratti viene calcolata come la % di inibizione del radicale DPPH secondo la seguente equazione:

$$\% = 1 - (\text{Abs DPPH con ext} - \text{Abs ext}) / (\text{Abs DPPH senza ext}) \times 100$$

Dai valori delle percentuali d'inibizione si è calcolato l'IC₅₀, espresso in µg/mL.

Come controllo positivi è stato utilizzato l'acido ascorbico.

8.1.3.2 ABTS test (o TEAC Trolox Equivalence Antioxidant Capacity)

Il metodo ABTS si basa sull'utilizzo del cromogeno 2,2-azinobis(3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) che reagendo con potassio persolfato genera un catione radicalico di colore blu/verde. Questo saggio è utilizzato per la misura dell'attività antiossidante totale di sostanze pure, fluidi biologici e composti vegetali ed è basato sulla reazione degli antiossidanti con il radicale cationico ABTS^{•+} (2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato). Questo radicale

può essere ridotto da un antiossidante, con conseguente perdita di assorbanza. La capacità scavenger può essere misurata spettrofotometricamente a 734 nm. L'attività antiossidante determinata utilizzando il catione radicale (ABTS^{•+}) si basa su una metodologia descritta da Re et al. (1996).

Il catione radicale ABTS (ABTS^{•+}) viene preparato 12/16 ore prima dell'esperimento attraverso la reazione tra una soluzione di 2 mM di ABTS e una soluzione di persolfato di potassio 70 mM che avviene al buio a temperatura ambiente. La soluzione di ABTS preparata, viene diluita con metanolo fino a che dalla lettura spettrofotometrica non risultano valori tra 0.70 e 0.73. Per l'esecuzione del test si aggiungono 15 µl di campione opportunamente diluito a 1.5 ml di soluzione di ABTS^{•+} in cuvetta; dopo sei minuti si legge l'assorbanza a 734 nm utilizzando uno spettrofotometro (Perkin Elmer Lambda 40 UV/VIS).

La diminuzione dell'assorbimento che si verifica durante l'esperimento è utilizzata per il calcolo della capacità antiossidante. Si è, infatti, preparata precedentemente una curva di calibrazione ottenuta dalla misurazione della riduzione di assorbanza di ABTS^{•+} a diverse concentrazioni di standard Trolox.

I risultati sono stati espressi come TEAC (equivalenti di Trolox).

L'attività radical scavenging è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$\% \text{ d'inibizione} = [(A_0 - A_1 / A_0) \times 100]$$

dove A_0 è l'assorbanza del controllo (in bianco, senza estratto) e A_1 è l'assorbanza in presenza dell'estratto. La decolorazione dell'ABTS è direttamente proporzionale alla capacità antiossidante dei campioni.

Dai valori delle percentuali d'inibizione si è calcolato l'IC₅₀, espresso in µg/mL.

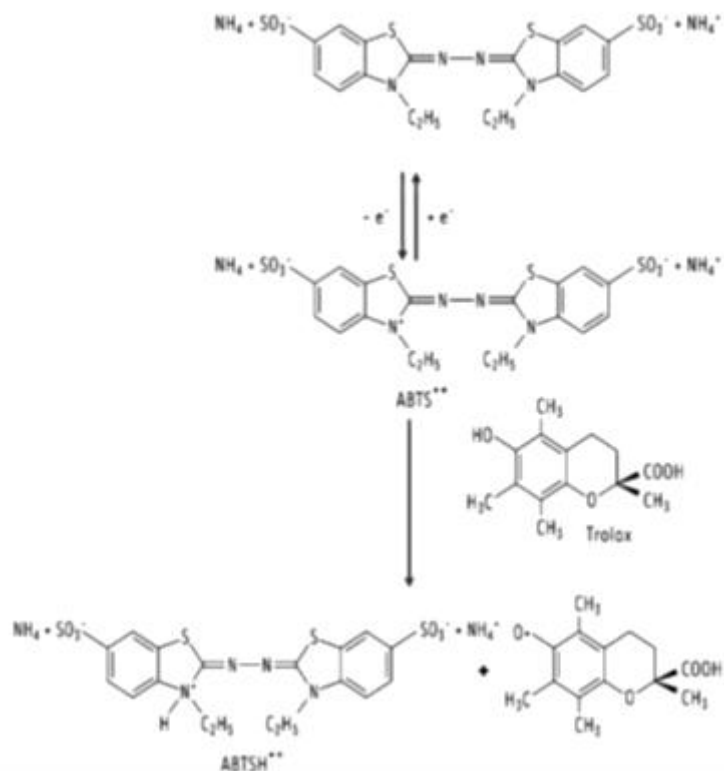


Figura 8.1: Formazione del radicale cationico ABTS^{•+} e reazione con Trolox

8.1.3.3 β -Carotene bleaching test

Questo metodo di valutazione dell'attività antiossidante di estratti vegetali è basato sull'ossidazione del β -carotene accoppiata a quella dell'acido linoleico. La tecnica consiste nella misurazione della decolorazione (bleaching) del β -carotene dovuta all'ossidazione causata dai prodotti di degradazione dell'acido linoleico per effetto della temperatura (Taga et al., 1984).

A causa della temperatura (45°C), infatti, avviene l'ossidazione sul C13 dell'acido linoleico con formazione del radicale perossile. Questo radicale sarà responsabile della propagazione dell'ossidazione su altre molecole di acido linoleico o sulla molecola di β -carotene presente nella soluzione. La reazione con il β -carotene ne causerà la decolorazione.

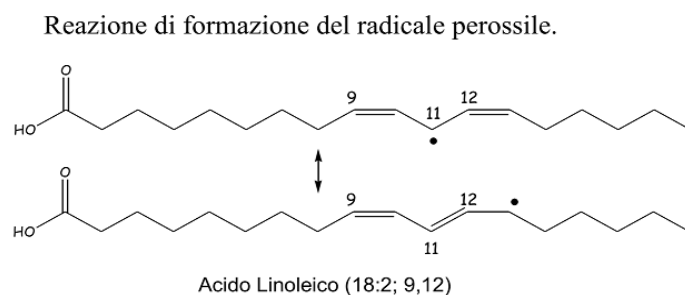


Figura 8.3: Reazione di formazione del radicale perossile

L'aggiunta alla miscela di reazione (β -carotene + acido linoleico) di una sostanza antiossidante inibisce l'ossidazione del β -carotene (l'effetto visibile a livello macroscopico è la persistenza della caratteristica colorazione arancione) e mantiene costante nel tempo i valori di assorbanza. In dettaglio, 1 ml di soluzione di β -carotene (0.2 mg/ml in cloroformio) è aggiunto a 20 μ l di acido linoleico e 200 μ l di 100% Tween 20. La miscela viene poi evaporata a 40 °C per 10 min utilizzando un evaporatore rotante per eliminare il cloroformio. Dopo evaporazione la miscela viene immediatamente diluita con 100 ml di acqua distillata. L'acqua è aggiunta alla miscela e agitata vigorosamente per ottenere un'emulsione. 5 ml dell'emulsione vengono trasferiti in differenti provette contenenti 200 μ l dei campioni da testare a diverse concentrazioni. Come controllo è stato usato il solo metanolo al posto dell'estratto. Le provette vengono poi agitate e poste a 45 °C in un bagno di acqua per 60 min. L'assorbanza dei campioni, dello standard e del controllo, viene misurata a 470 nm usando un Perkin Elmer Lambda 40 UV/VIS spettrofotometro contro un bianco che consiste nell'emulsione (Tween 20 + acido linoleico + acqua distillata) senza β -carotene. Si misura ad un tempo iniziale zero ($t = 0$) e successivamente a 30 e 60 min. Tutti i campioni vengono saggiati in triplicato e ne viene fatta la media. L'attività antiossidante (AA) viene misurata in termini di successo di decolorazione del β -carotene usando la seguente equazione.

$$AA = [1 - (A_0 - A_t) / (A_0^\circ - A_t^\circ)] \times 100$$

dove A_0 e A°_0 sono i valori di assorbanza misurati al tempo iniziale di incubazione, rispettivamente per campioni/standard e controllo, mentre A_t and A°_t sono i valori di assorbanza misurati nei campioni/standard e controllo a $t = 30$ min e $t = 60$ min. Dai valori dell'AA si è calcolato il rispettivo IC_{50} in $\mu\text{g/mL}$.

8.1.3.4 FRAP test (Ferric Ion Antioxidant Power Assay)

Il metodo FRAP è un sistema in grado di determinare la capacità antiossidante di fluidi biologici basato sulla reazione di trasferimento di un singolo elettrone.

Questo saggio (Ferric Reducing Antioxidant Power) misura l'abilità degli antiossidanti di ridurre il complesso di $(\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2)^{3+}$ (ferro(III)-2,4,6-tripiridil-s-triazina) a complesso ridotto $(\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2)^{2+}$ (ferro(II)), evidenziando così la capacità delle molecole contenute all'interno di matrici vegetali di ridurre il ferro (FRAP).

Il ferro ridotto può partecipare, insieme all'ossigeno, alla generazione dei radicali liberi, ma i metalli di transizione esercitano la loro azione lesiva quando sono in forma libera e non quando vengono complessati (Gutteridge et al., 1989).

Quando il ferro è complessato con il TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) in una soluzione di sodio acetato a pH acido, la sua riduzione è evidente dal cambiamento di colorazione della soluzione che da ambra diventa blu. In breve, il reagente FRAP contiene 2.5 ml di soluzione 10 mM di TPTZ in 40 mM di HCl, 2.5 ml di 20 mM di FeCl_3 e 25 ml di tampone acetato 0.3 M (pH 3,6). L'estratto viene disciolto in metanolo ad una concentrazione di 1,5 mg/ml. Un'aliquota di 0.2 ml soluzione viene mescolata con 1.8 ml di reagente FRAP e l'assorbimento della miscela di reazione viene misurata spettrofotometricamente (con Perkin Elmer Lambda 40 UV/VIS) a $\lambda = 593$ nm.

Diverse soluzioni a concentrazione nota di Fe (II) (da 50 a 500 mM di FeSO_4) sono state utilizzate per ottenere la curva di calibrazione che servirà come riferimento per quantizzare la capacità antiossidante del campione testato. Il risultato sarà espresso in equivalenti di FeSO_4 .

8.1.4 Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. I dati sono stati espressi come media \pm SD. Nei test che valutano l'attività antiossidante i risultati delle diverse cultivar di peperoncino sono stati confrontati con un controllo positivo attraverso l'utilizzo della metodica ANOVA ad una via seguita dal test di multicomparazione di Dunnett. Tutti i risultati (fitochimici e antiossidanti) sono stati analizzati attraverso l'utilizzo della metodica ANOVA ad una via seguita dal test post hoc di Bonferroni al fine di riscontrare differenze più o meno significative tra i vari metodi di processazione adottati.

Queste statistiche sono state eseguite col programma Prism GraphPad versione 5.0 per Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, Stati Uniti d'America).

8.2 Risultati

Nella tabella 8.1 sono elencate le quantità di frutto sottoposto a macerazione, con la relativa resa estrattiva e la resa percentuale di ciascuna varietà. È possibile evidenziare che la resa estrattiva maggiore si ottiene dai frutti secchi, dove si hanno percentuali di resa che variano tra il 10.82% della cultivar Nobile (*C. annuum*) e il 49.98% del campione Campana (*C. baccatum*); seguono i congelati con una resa che varia dal 4.60% del campione Sole (*C. annuum*) a 9.53% del campione Aji Angelo (*C. baccatum*); infine troviamo i frutti freschi (2.22 – 7.52% per il campione Sole (*C. annuum*) e Aji Angelo (*C. baccatum*) rispettivamente) e quelli bolliti (1.45 – 7.29% per Sole (*C. annuum*) e Aji Angelo (*C. baccatum*), rispettivamente).

La più alta resa estrattiva è stata riscontrata per il *C. baccatum* Aji Angelo, sia fresco sia processato, mentre dalla cultivar Sole (*C. annuum*) si è ottenuta, in media, la più bassa resa estrattiva, sia per i frutti crudi sia per quelli processati.

È possibile supporre che la migliore resa estrattiva dei peperoncini secchi sia causata dal fatto che la matrice vegetale secca sia molto più ricca e concentrata di

principi attivi e rilasci nel mestruo un maggiore contenuto di molecole d'interesse durante l'estrazione, mentre, per quanto concerne la buona resa estrattiva ottenuta dai peperoncini congelati, questa è sicuramente dipendente dalla procedura di congelamento che, com'è noto, causa la formazione di macrocristalli di ghiaccio che danneggiano i tessuti del frutto, poiché rompono le membrane cellulari, permettendo così alle sostanze contenute nel tessuto vegetale di passare più facilmente in soluzione (solvente) una volta sottoposti a macerazione.

I peperoncini di colore arancione e giallo, così come i frutti appartenenti a specie diverse dal *C. annuum* non hanno mostrato risultati particolarmente differenti dai frutti di colore rosso o di altre specie.

Dalla procedura di macerazione e dalla successiva operazione di evaporazione del solvente di estrazione si sono ottenuti gli estratti totale. Questi estratti sono stati utilizzati nei diversi approcci metodologici per valutare e comprendere la capacità antiossidante dei frutti di peperoncino e il contenuto fitochimico.

Per la comparazione dei carotenoidi con i risultati dei test antiossidanti abbiamo utilizzato i dati ottenuti dall'estrazione dei carotenoidi effettuata direttamente sul frutto non digerito.

8.2.1 Risultato screening fitochimico

8.2.1.1 Risultato dosaggio polifenoli

La ricerca delle sostanze polifenoliche nell'estratto totale delle diverse varietà di piante appartenenti al genere *Capsicum* è stata condotta utilizzando il saggio di Folin-Ciocalteu. Il reattivo di Folin-Ciocalteu è costituito da una miscela di acido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e acido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) che si riduce in condizioni alcaline ad una miscela di ossidi blu di tungsteno e molibdeno (W_8O_{23} e Mo_8O_{23}), grazie all'ossidazione dei fenoli. La colorazione blu prodotta riflette

la quantità di fenoli. Il contenuto in polifenoli totali è stato espresso come milligrammi equivalenti di acido clorogenico per grammo di prodotto.

Loizzo et al. (2013) hanno quantificato il contenuto di polifenoli in peperoni freschi e secchi riscontrando valori di 127.5 e 116.7 mg/g, rispettivamente. Dopo frittura il contenuto è calato drasticamente a 15 mg/g.

Invece, dagli studi di Tundis et al. (2011, 2012) sono stati riscontrati valori di 970, 843, 748 e 426 mg/100g in diverse varietà di peperoncino (*C. annuum acuminatum* piccolo, medio, grande e *cerasiferum*, rispettivamente). Tutti i campioni erano stati essiccati all'aria in maniera molto simile alla procedura approntata nel presente studio. Menichini et al. (2009), invece, nel frutto di peperoncino Habanero fresco ha trovato 759 mg/100g di polifenoli totali.

Nella tabella 8.2 è possibile osservare che i peperoncini essiccati mostrano il maggiore contenuto di polifenoli, con valori che variano dai 9.9 mg/g di pianta della cultivar Capezzolo di Scimmia (*C. annuum*) ai 419.3 mg/g di pianta della cultivar Duemila (*C. annuum*). Il minor contenuto di polifenoli è stato riscontrato nei frutti congelati, il cui contenuto varia da 1.5 mg/g di pianta, anche qui del campione Capezzolo di Scimmia (*C. chinense*) ai 37.3 mg/g del campione Duemila (*C. annuum*).

I freschi hanno un contenuto che varia da 2.3 mg/g di pianta del campione Capezzolo di Scimmia (*C. chinense*) al 71.4 mg/g di pianta del campione Hierro *C. annuum*, mentre i bolliti presentano valori da 0.5 mg/g di pianta del campione Capezzolo di scimmia *C. chinense* al 44.9 mg/g di pianta del campione Idealino *C. annuum*.

E' stato possibile rilevare, quindi, che il campione Capezzolo di scimmia (*C. chinense*) ha esibito il minor quantitativo di polifenoli, sia nella forma fresca sia processata. Il campione Duemila (*C. annuum*) mostra un ottimo contenuto da secco e fresco, mentre i polifenoli diminuiscono notevolmente dopo cottura e congelamento riportando valori rispettivamente di 14.0 mg/g di pianta e 37.3 mg/g di pianta.

I frutti appartenenti alla specie *C. baccatum* (Aji Angelo e Campana) presentano un basso contenuto di polifenoli totali nei frutti freschi, congelati e bolliti. Nei secchi, invece, la concentrazione raggiunge valori di 62.9 mg/g di pianta per il campione Aji angelo e 67.3 mg/g di pianta per il campione Campana.

Il campione Chaco (*C. chacoense*) mostra un maggior contenuto nei frutti secchi ed uno scarso contenuto in seguito a cottura.

L'effetto della cottura valutato nel presente studio è in disaccordo con Turkmen et al. (2005) che ha riferito come diverse modalità di cottura, compresa bollitura, cottura a vapore e microonde aumenterebbero il contenuto di fenoli nei peperoni. Questo incremento è stato attribuito alla disidratazione di matrice alimentare e una migliore estraibilità dei fenoli dal cibo (Schweiggert et al., 2006).

Mentre, Ewald et al. (1999), hanno riferito come bollitura, cottura a microonde e frittura, non avessero influenzato i livelli di polifenoli. Entrambe le cultivar erano state essiccate secondo il metodo tradizionale prima del consumo. In questo caso, quindi, l'essiccazione non aveva influenzato in modo significativo il contenuto di fenoli del peperone dolce.

La cottura è in grado di inattivare l'enzima polifenolo-ossidasi, determinando l'inibizione della degradazione dei fenoli. Tuttavia, perdite significative di composti fenolici di peperoni (verdi, gialli e rossi) e altre verdure sono stati riportate dopo cottura sia domestica sia industriale (Chuah et al., 2008).

8.2.1.2 Risultato dosaggio flavonoidi

Analizzando la tabella 8.3 possiamo osservare che anche in questo caso i secchi sono quelli col maggior contenuto di flavonoidi. I campioni (*C. annuum*) Nobile e *C. chacoense* Chaco hanno un contenuto pari a 3.5 mg/g di pianta mentre il campione *C. baccatum* Campana ha il più alto contenuto di flavonoidi con un valore di 10.9 mg/g di pianta.

Il minor contenuto di flavonoidi è stato riscontrato nei frutti bolliti che mostrano valori che variano da 0.4 mg/g di pianta del campione Sole a 1.7 mg/g di pianta del campione Acrata.

I peperoncini freschi presentano un contenuto di flavonoidi che varia da 0.9 mg/g di pianta del campione Sole (*C. annuum*) a 11.1 mg/g di pianta dell'Aji Angelo (*C. baccatum*), mentre i congelati dallo 0.9 mg/g di pianta dei campioni Nobile, Fantasia ed Effix (*C. annuum*) al valore di 1.8 mg/g dei campioni *baccatum* Campana ed Aji Angelo.

Minor contenuto di flavonoidi totali (45 mg/100g) è stato, invece, riscontrato in frutti di *C. chinense* varietà habanero (Menichini et al., 2009).

Interessante è osservare che i *C. baccatum* presentano un buon contenuto di flavonoidi dopo le operazioni di processazione, ma, mentre Aji angelo è tra i peperoncini freschi con un maggior contenuto di flavonoidi, il campione fresco Campana risulta, in questo caso, tra i peperoncini col minor contenuto in flavonoidi.

8.2.1.3 Risultati dosaggio capsaicinoidi

Analizzando la tabella 8.4 si osserva che il maggior contenuto di capsaicina e di diidrocapsaicina lo rinveniamo, come nel caso dei polifenoli e flavonoidi, nella forma essiccata, e, a seguire, i campioni freschi, bolliti e infine i frutti congelati.

La metodologia adottata (GC) non ha permesso l'individuazione di capsaicinoidi nelle cultivar Campana (*C. baccatum*) che evidentemente mostrava una quantità di capsaicina e diidrocapsaicina non sufficiente da poter essere quantificata gascromatograficamente, ipotesi avvalorata dal fatto che solamente nel campione Campana essiccato è stato possibile quantificare il contenuto di capsaicina, pari a 125.5 mg/100g, e di diidrocapsaicina, pari a 57.9 mg/100g. Questi valori risultano comunque modesti se paragonati a quelli degli altri peperoncini secchi studiati.

Il campione Acrata *C. annuum* è il peperoncino nel quale si è riscontrato il maggior contenuto sia di capsaicina sia di diidrocapsaicina nella forma fresca (1362.7 mg/100g) e congelata (844.9 mg/100g). Invece, la diidrocapsaicina è stata rilevata a valori massimi nel frutto fresco (612.4 mg/100g) e poi a seguire nel bollito (519.7 mg/100g) e congelato (400.2 mg/100g).

Nella forma secca e bollita il maggior contenuto di capsaicina lo raggiungiamo con la cultivar Capezzolo di Scimmia (3491.7 mg/100g e 1487.8 mg/100g rispettivamente). Mentre il maggior contenuto di diidrocapsaicina dei frutti essiccati lo raggiungiamo con il campione Taballo (1628.3 mg/100g).

Analizzando l'altro peperoncino appartenente alla specie *C. baccatum*, ovvero l'Aji Angelo, si osservano valori piuttosto bassi. Il campione Chaco (*C. chacoense*) ha riportato valori intermedi sia di capsaicina sia di diidrocapsaicina. Il contenuto di capsaicina varia dai valori di 45.0 mg/100g e 49.0 mg/100g rispettivamente della forma bollita e congelata, a quelli di 78.9 mg/100g e 1497.9 mg/100g dei freschi e dei secchi. Riguardo al contenuto di diidrocapsaicina, invece, il contenuto varia da 40.1 mg/100g di matrice vegetale nella forma bollita, a 44.4 mg/100g nella forma congelata, a 61.2 mg/100g nella forma fresca e, infine, a 753.7 mg/100g nella forma secca.

A differenza della maggior parte dei peperoncini, i valori di capsaicina e diidrocapsaicina del campione Effix sono molto simili nonostante l'influenza dei trattamenti applicati. Precisamente il contenuto di capsaicina e diidrocapsaicina del campione Effix congelato è pari a 38.4 mg/100g e 35.2 mg/100g rispettivamente; a 95.2 mg/100g e a 94.6 mg/100g nella forma bollita, a 626.7 mg/100g e a 620.9 mg/100g nei secchi ed infine a 122.4 mg/100g e a 95.7mg/100g rispettivamente nei frutti freschi.

Precedentemente, Tundis et al. (2012) hanno riscontrato, nelle cultivar acuminatum (*C. annuum*) medio e grande un contenuto di capsaicina di 1.4 e 0.9 mg/g, rispettivamente, e di diidrocapsaicina pari a 0.5 e 4.7 mg/g, rispettivamente, mentre Menichini et al. (2009), invece, hanno rilevato un

quantitativo di capsaicina e diidrocapsaicina di 4363 e 2498 $\mu\text{g/g}$ in frutti freschi di habanero (*C. chinense*).

Dal test sensoriale il peperoncino fresco risultato maggiormente piccante è stato il Chaco (*C. chacoense*) seguito dalla cultivar Acrata e Taballo (*C. annuum*).

8.2.1.4 Risultati dosaggio carotenoidi

Dalla tabella 7.10 si evince come anche nel caso dei carotenoidi i frutti essiccati contengono maggiori quantità di carotenoidi. I campioni analizzati risentono in maniera particolare delle operazioni di congelamento e bollitura. Il maggior contenuto in assoluto è stato riscontrato nel campione Sole (*C. annuum*) secco con 11112.2 $\mu\text{g}/100\text{g}$. E' possibile notare un interessante comportamento nei campioni giallo e arancione Cayenna Yellow e Capezzolo di Scimmia, nei quali il contenuto di carotenoidi totali dei campioni secchi è in controtendenza rispetto alla maggior parte degli altri frutti essendo inferiore al valore trovato nei freschi e congelati. Nel campione arancione Taballo, invece, i valori di carotenoidi totali nel frutto secco, fresco e congelato, sono in linea con la maggior parte degli altri peperoncini.

8.2.2 Risultati attività antiossidante

8.2.2.1 Risultati DPPH test

La prima metodica, il DPPH, utilizza il radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazile e valuta l'attività "radical scavenger" degli estratti esaminati.

Dai risultati ottenuti (Tabella 8.7) si evince che i peperoncini freschi hanno dimostrato la maggiore attività antiossidante con valori di IC_{50} che variano da 3.90 $\mu\text{g/ml}$ del campione Effix a 468.85 $\mu\text{g/ml}$ del campione Aji Angelo *C. baccatum*. Secchi e bolliti mostrano un'attività antiossidante intermedia, con IC_{50} tra il valore di 28.12 $\mu\text{g/ml}$ del peperoncino Loco (*C. annuum*) al valore di

396.56 µg/ml del Campana (*C. baccatum*) per i bolliti, e 54.65 µg/ml del campione Acrata (*C. annuum*) a 382.01 µg/ml del Jalapeno (*C. annuum*) per i secchi. I congelati, invece, hanno mostrato la minore attività di stabilizzazione del radicale DPPH con valori di IC₅₀ che vanno da 180.69 µg/ml dei campioni Acrata e Nobile ai 1926.06 µg/ml del campione Aji Angelo *C. baccatum*.

I valori di IC₅₀ dei frutti della cultivar Loco (*C. annuum*) hanno però mostrato delle difformità rispetto a quanto finora osservato, poiché hanno avuto una buona attività da fresco (non trattato) (5.53 µg/ml) e da bollito (28.12 µg/ml), mentre da secco (106.19 µg/ml) e da congelato (294.12 µg/ml) hanno esibito una minore attività.

In definitiva, il campione Effix e Loco, entrambi *C. annuum*, hanno manifestato un'attività prossima e addirittura superiore alla vitamina C, utilizzata come metro di paragone dell'attività radical scavenger.

Tundis et al. (2011; 2012) e Menichini et al. (2009), nei loro studi su peperoncini rossi secchi e su un campione di *C. chinense* habanero fresco, hanno riportato valori oscillanti tra 85.3 e 463.0 µg/ml per i secchi e di 287 µg/ml per l'habanero.

8.2.2.2 Risultati ABTS test

I frutti di peperoncino sono stati sottoposti a un secondo test che, similmente al DPPH test, valuta la capacità degli estratti di stabilizzare, attraverso la donazione d'idrogeni, molecole radicaliche particolarmente instabili, come il radicale radicale ABTS^{•+}.

Dalla tabella 8.6 emerge che i congelati sono i campioni più attivi seguiti dai secchi, dai bolliti e per ultimo dai freschi.

I nostri risultati, quindi, sembrano in disaccordo con quanto riportato da Loizzo et al. (2013), che hanno documentato che l'essiccazione riduce drasticamente l'abilità di stabilizzare il radicale ABTS, ed è possibile anche osservare una

situazione opposta a quanto riscontrato nel DPPH test, nonostante le due metodiche condividano le stessi basi molecolari di stabilizzazione dei radicali.

I migliori campioni per metodo di processazione sono stati il congelato *C. annuum* Nobile con 26.47 µg/ml di IC₅₀, il bollito Capezzolo di scimmia (*C. chinense*) con un valore di 38.82 µg/ml, il secco Taballo (*C. annuum*) con un valore di 22.65 µg/ml e la cultivar fresca Sole (*C. annuum*) con un valore di 30.24 µg/ml.

In campioni di *Capsicum acuminatum* (medio e grande) è stata osservata una discreta abilità di stabilizzare il radicale ABTS, con valori di IC₅₀ di 21.5 e 16.4 µg/ml (Tundis et al., 2012).

Il campione Nobile ha una maggiore attività da congelato ma ritroviamo buoni valori anche da secco (46.91 µg/ml), da bollito (65.21 µg/ml) e da fresco (83.53 µg/ml).

Per il campione Taballo si hanno valori che variano dal già citato 22.65 µg/ml del secco a 48.90 µg/ml del congelato.

Per la cultivar Capezzolo di scimmia si hanno valori che variano da 27.60 µg/ml del secco a 45.34 µg/ml del fresco.

Il peperoncino con maggiore attività risulta essere il Taballo nella forma essiccata con un IC₅₀ di 22.65 µg/ml e quello con minor attività il Campana *C. baccatum* nella forma bollita con un IC₅₀ di 483.56 µg/ml.

I *Capsicum* con minor attività sono il Campana *C. baccatum* per i congelati con un valore di 317.44 µg/ml, Jalapeno *C. annuum* con un valore di 464.62 µg/ml per i secchi, Aji Angelo *C. baccatum* con un valore di 452.88 µg/ml per i freschi, Campana *C. baccatum* con un valore di 483.56 µg/ml per i bolliti. E' possibile quindi notare come anche qui i *C. baccatum*, soprattutto il Campana, mostrano una minore attività.

Il *Chacoense* Chaco (Red) risulta avere una buona attività con valori oscillanti da 58.91 µg/ml del congelato a 80.67 µg/ml del secco.

8.2.2.3 Risultati test β -carotene bleaching test

Il β -carotene bleaching test è basato sull'ossidazione del β -carotene accoppiata a quella dell'acido linoleico. Il test consiste nel misurare la decolorazione (bleaching) del β -carotene causata dai prodotti di degradazione dell'acido linoleico. Si valuta quindi la capacità degli estratti di proteggere il β -carotene dall'ossidazione.

Nella tabella 8.8 è possibile osservare che dopo 30 minuti i peperoncini con maggior attività sono i campioni secchi (IC_{50} da 3.16 $\mu\text{g/ml}$ a 21.07 $\mu\text{g/ml}$), seguiti dai freschi (3.67 $\mu\text{g/ml}$ – 76.85 $\mu\text{g/ml}$) e dai congelati (3.15 $\mu\text{g/ml}$ – 90.95 $\mu\text{g/ml}$), ed infine dai bolliti che mostrano valori oscillanti tra il 2.61 $\mu\text{g/ml}$ del campione Hierro *C. annuum* al 93.69 $\mu\text{g/ml}$ del peperoncini Campana *C. baccatum*.

Menichini et al. (2009) hanno osservato, in frutti di *C. chinense*, varietà habanero, presentano un'ottima attività antiossidante nel test del β -carotene con valori di IC_{50} di 4.57 $\mu\text{g/ml}$ a 30 minuti e 5.31 $\mu\text{g/ml}$ a 60 minuti.

Analizzando ciascun processo tecnologico cui sono stati sottoposti i peperoncini, osserviamo che quelli con maggiore attività sono il Nobile (*C. annuum*) per i secchi, O di Giotto (*C. annuum*) per i freschi e i congelati, e infine il campione Hierro (*C. annuum*) per i bolliti, che mostrano valori molto prossimi al valore di 1 $\mu\text{g/ml}$ del controllo positivo (propil gallato).

Il peperoncino Nobile (*C. annuum*) ha dimostrato di avere un'ottima attività antiossidante anche in seguito ai vari approcci tecnologici con valori che oscillano da 3.16 $\mu\text{g/ml}$ del secco a 20.06 $\mu\text{g/ml}$ del bollito.

Il campione O di Giotto (*C. annuum*) ha mostrato buonissimi risultati sia da congelato sia da fresco, mentre notiamo valori leggermente più alti per i frutti bolliti e secchi (13.14 $\mu\text{g/ml}$ e 15.33 $\mu\text{g/ml}$ rispettivamente).

Anche il campione Hierro (*C. annuum*) ha dato ottimi risultati, più precisamente 2.61 $\mu\text{g/ml}$ dopo cottura, 3.23 $\mu\text{g/ml}$ dopo essiccazione al sole, 4.46 $\mu\text{g/ml}$ fresco e 10.85 $\mu\text{g/ml}$ dopo congelamento.

Un'attività più bassa è stata ottenuta con i campioni appartenenti alla specie *C. baccatum*.

Anche dopo 60 minuti di incubazione a 45°C è possibile ed interessante osservare che i peperoncini con maggiore attività sono quelli secchi, con valori di IC₅₀ che vanno da 3.23 µg/ml a 39.13 µg/ml, seguiti dai freschi (7.77 µg/ml - 88.56 µg/ml), dai congelati (5.05 µg/ml - 94.09) e infine dai bolliti con valori di IC₅₀ che vanno da 9.97 µg/ml a 143.72 µg/ml (Tabella 8.9).

Il campione Taballo (*C. annuum*) ha una buona attività in seguito ai vari trattamenti. Infatti, abbiamo degli IC₅₀ che vanno da 5.05 µg/ml del congelato a 13.01 µg/ml del secco, mentre per il fresco l'IC₅₀ ottenuto è stato di 41.86 µg/ml. I frutti freschi e congelati di O di Giotto (*C. annuum*) presentano un'ottima attività (IC₅₀ da 7.77 µg/ml a 8.55 µg/ml) mentre i frutti bolliti e secchi riportano una minore attività, come dimostrato dai relativi IC₅₀ di 15.28 µg/ml e di 39.13 µg/ml. Quest'ultimo (secco), risulta essere il peperoncino con la minore attività in assoluto.

I frutti di *Capsicum baccatum* confermano, ad eccezione dei campioni secchi, anche in questo saggio di essere i peperoncini con la minor attività in cui il campione Campana bollito arriva a un IC₅₀ di 143.72 µg/ml, mentre il campione Aji Angelo fresco ad un IC₅₀ di 88.56 µg/ml.

Il campione Hierro (*C. annuum*) ha la più alta attività nella forma essiccata con un IC₅₀ di 3.24 µg/ml, nella forma fresca ha un valore di IC₅₀ pari a 8.49 µg/ml, in quella congelata di 11.95 µg/ml ed, infine, in quella bollita di 15.76 µg/ml.

Nobile (*C. annuum*) dopo 60 minuti presenta una leggera diminuzione di attività con valori che variano da 3.44 µg/ml secco a 56.96 µg/ml fresco.

Il frutto fresco di Acrata (*C. annuum*) presenta una buona attività con un IC₅₀ 9.28 µg/ml; si osserva però una diminuzione dell'attività dei campioni secchi e congelati (10.74 µg/ml e 10.76 µg/ml rispettivamente), e un'ulteriore diminuzione del frutto bollito (16.46 µg/ml).

La cultivar Piccante a mazzetti *C. annuum* ha sua massima attività in seguito ad essiccamento con un IC₅₀ di 6.36; infatti da fresco ha un attività di 10.16 µg/ml, da bollito di 20.37 µg/ml, e infine da congelato di 56.74 µg/ml.

Stesso comportamento è possibile osservarlo anche nel frutto di Loco *C. annuum* in cui fresco ha un IC₅₀ di 14.60 µg/ml mentre essiccando si aumenta l'attività al valore di 7.94 µg/ml, che diminuisce a 38.88 µg/ml e a 12.66 µg/ml in seguito a cottura e congelamento.

Le cultivar Fantasia, Pellegrino, Effix e Sole (*C. annuum*) e tutti gli altri presentano anche essi un aumento dell'attività in seguito all'essiccamento, con ulteriore diminuzione nei congelati e nei bolliti.

Nello studio di Loizzo et al. (2013) è stato osservato che l'estratto totale dei peperoni secchi Roggiano e Senise mostrava, col test del β-carotene, valori di IC₅₀ di 38.1 e 43.7 µg/mL rispettivamente. In precedenza, Tundis et al., (2011) avevano notato, studiando gli estratti dei peperoncini secchi *C. annuum* var. acuminato e *C. annuum* var. cerasiferum, una notevole inibizione dell'ossidazione dell'acido linoleico con valori di IC₅₀, a 30 minuti, di 16.3 e 3.1 µg/mL, ed a 60 minuti, di 17.2 e 10 µg/mL, rispettivamente. La capacità di peperoni secchi di inibire l'ossidazione dell'acido linoleico potrebbe essere attribuito soprattutto ai carotenoidi e alla presenza di capsaicinoidi (Loizzo et al. 2013).

Si è visto, infatti, come questi composti pungenti possono inibire la perossidazione lipidica mediata dal ferro e l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità rame-dipendente, un effetto attribuito alla loro capacità di formare complessi con metalli ridotti e agire come donatori di idrogeno (Rosa et al., 2002).

8.2.2.4 Risultati FRAP test

L'unità FRAP viene arbitrariamente definita come la riduzione di 1 mole di ferro ferrico (FeIII) a ferro ferroso (FeII). Diverse soluzioni a concentrazione nota di

solfato ferroso (FeSO_4 , FeII), da 50 a 500 mM, sono state utilizzate per ottenere una curva di calibrazione che è servita come riferimento per quantizzare la capacità antiossidante dei campioni testati.

I nostri risultati sono stati espressi in equivalenti di FeSO_4 (Tabella 8.10).

Gli ottantotto campioni sono stati testati alla concentrazione di estratto totale di 2.5 mg/ml.

Dai risultati emerge che i peperoncini secchi e freschi hanno una maggiore attività con valori in equivalenti di FeSO_4 compresi tra 9.19 mM Fe(II)/g a 79.50 mM Fe(II)/g e da 9.10 mM Fe(II)/g a 86.34 mM Fe(II)/g rispettivamente.

I frutti bolliti mostrano valori tra 7.27 mM Fe(II)/g e 53.17 mM Fe(II)/g, e, infine, troviamo i frutti congelati con valori tra 0 mM Fe(II)/g e 44.60 mM Fe(II)/g.

Acrata (*C. annuum*) ha evidenziato ottima attività sia fresco sia processato. I suoi valori in equivalenti di FeSO_4 oscillano da 44.60 mM Fe(II)/g a 79.51 mM Fe(II)/g. Sole (*C. annuum*) presenta anche buoni valori in tutti i trattamenti con la massima attività nella forma fresca (86.34 mM Fe(II)/g), il cui valore supera addirittura quello del controllo (BHT).

Anche in questo test la specie *C. baccatum* (Campana e Aji angelo) si contraddistingue per scarsa attività, addirittura non rivelabile per la forma congelata.

La specie *C. chacoense* presenta dei valori che vanno da 14.21 mM Fe(II)/g della forma congelata a 31.74 mM Fe(II)/g della forma essiccata.

I risultati della specie *C. chinense* (Capezzolo di Scimmia) oscillano intorno a valore dei 50 equivalenti di FeSO_4 , sia trattato che fresco, tranne che congelato in cui si manifesta il valore di 34.78 mM Fe(II)/g.

Tra i due *Capsicum* di colore arancione possiamo osservare come il *chinense* abbia maggiore attività rispetto all'*annuum*, contrariamente a quanto accadeva nei saggi precedenti, in cui la specie arancione di *annuum* mostrava una maggiore attività.

8.3 Discussioni

La seconda parte del presente lavoro di ricerca ha avuto come obiettivo l'analisi dell'attività antiossidante e il profilo fitochimico di diverse cultivar di peperoncino analizzate sia allo stato fresco sia dopo tre diverse operazioni di processazione tipiche della tradizione e cultura culinaria calabrese.

L'attenzione è stata rivolta alla valutazione dell'attività antiossidante degli estratti totali ottenuti dai frutti presi in esame e allo studio del contenuto totale in polifenoli, flavonoidi, capsaicinoidi e carotenoidi, così da poter verosimilmente giungere a delle correlazioni tra il contenuto in sostanze bioattive, già note per essere ottimi agenti antiossidanti, e l'attività anti-radicalica riscontrata.

Le analisi effettuate mostrano che i peperoncini secchi, seguiti da quelli freschi hanno il più alto contenuto di capsaicinoidi, polifenoli, flavonoidi e carotenoidi, dimostrando che le operazioni di congelamento e cottura influiscono negativamente sul contenuto di questi principi attivi. E' bene, comunque, tenere presente che la discussione non deve limitarsi a includere ragionamenti sull'ipotetico effetto che la temperatura può avere sulle singole molecole, ma è appropriato ampliare la riflessione anche agli altri fattori che possono influenzare il contenuto di molecole riscontrato. E', infatti, opportuno considerare innanzitutto l'operazione di estrazione effettuata inizialmente, in cui è facile notare come i peperoncini secchi abbiano manifestato una maggiore resa estrattiva, e, evidentemente, un maggiore arricchimento ed esaurimento dei principi attivi contenuto nella matrice vegetale. Anche l'operazione di congelamento ha riportato valori di rese estrattive percentuali oltre la media dei frutti bolliti e secchi, e questo, come già precedentemente accennato, potrebbe essere causato dall'azione dei cristalli di ghiaccio formatisi in seguito al lento abbassarsi delle temperature, sulle membrane delle cellule vegetali, facilitando la fuoriuscita delle molecole dalla matrice verso il mestruo. Tuttavia, diversamente da quanto accaduto per i secchi, non si è riscontrato a una maggiore presenza di principi attivi, lasciando intuire che il deterioramento causato dalle basse

temperature superiori l'influenza positiva della rottura della parete da parte di cristalli di ghiaccio.

Un pensiero separato merita, invece, la discussione riguardante l'abilità di combattere dai radicali liberi degli estratti oggetto del presente lavoro di dottorato. Dai risultati ottenuti dalle metodiche usate (DPPH test, ABTS test, β -Carotene bleaching test, FRAP test) non è emersa una particolare tendenza degli estratti che risulti in linea con i metodi di processazione adottati. Nel test del DPPH, in media, i composti maggiormente abili ($P < 0.05$) di stabilizzare, donando uno ione idrogeno, sono risultati quelli freschi, seguiti, rispettivamente, dai secchi, dai bolliti e dai congelati ($P < 0.05$). Nell'ABTS test, invece, nonostante il meccanismo di reazione sia simile a quello del DPPH test, i campioni maggiormente attivi sono stati i congelati, seguiti dai secchi, dai freschi e dai bolliti ($P < 0.05$).

Nel test del β -carotene e in quello del FRAP, nonostante si basino sui meccanismi d'azione totalmente diversi, i frutti secchi evidenziano una maggiore abilità antiossidante, seguiti, nel FRAP test, dai freschi, bolliti e congelati, mentre, nel test del β -carotene, dai congelati, bolliti e freschi.

Queste differenze di comportamento tra le varie processazioni sono generalmente statisticamente significative, se fatta eccezione per i risultati del β -carotene a 30 minuti, e del saggio del FRAP.

Nel presente studio si evince come, salvo in alcuni casi, non ci sia una diretta correlazione tra l'abilità antiossidante riscontrata e la quantità di polifenoli, di capsaicinoidi e di carotenoidi, mostrando che le singole classi di composti sono debolmente associate con i parametri antiossidanti e suggerendo che l'espressione dell'attività antiossidante degli estratti di peperoncino potrebbe essere piuttosto una conseguenza del sinergismo tra vari composti fenolici, o altre molecole non quantificate (es. vitamine) e non è semplicemente attribuibile a specifiche e singoli composti. Secondo Arnous et al. (2001) un numero elevato di sostanze quali le vitamine e gli alcaloidi e tante altre ancora, da sole e in sinergia tra loro, sono responsabili dell'attività antiossidante di un estratto.

Infatti, è ormai ampiamente riconosciuto il possibile effetto sinergico, così come la possibilità d'interferenze, tra le molecole di origine naturale e l'attività antiossidante (Halliwell & Gutteridge, 1981), specie se presenti in una stessa matrice vegetale.

D'altro canto, il totale contenuto fenolico determinato attraverso il reattivo di Folin-Ciocalteu e il contenuto flavonoico determinato per mezzo della procedura introdotta da Zhishen et al. (1999) non sono misure assolute della quantità di molecole ricercate. Diversi tipi di composti fenolici e flavonoidi hanno differenti abilità antiossidante, che dipendono dalla loro struttura. Gli estratti contengono verosimilmente diversi tipi di queste molecole, che, inevitabilmente, rivelano una diversa capacità antiossidante. Per quel che riguarda, invece, il dosaggio dei carotenoidi totali, è bene sottolineare che la misura riscontrata non è altro che la somma degli otto carotenoidi ricercati e quantificati tramite HPLC, che sebbene siano sicuramente tra i carotenoidi predominanti nei frutti del genere *Capsicum*, non sono certo gli unici. Non è possibile, quindi, escludere la presenza, più o meno abbondante, di altri carotenoidi che posseggono un'altissima abilità antiossidante (es. licopene). La mancanza di correlazione riscontrata tra il contenuto in polifenoli e capsaicinoidi e l'attività antiossidante dei frutti di peperoncino può essere legata a uno dei succitati motivi.

Di contro, un'ulteriore osservazione, volta ad analizzare l'influenza dei diversi trattamenti tecnologici all'interno delle varie cultivar studiate, mette in evidenza come i *Capsicum baccatum* abbiano il minor contenuto di polifenoli, ed un bassissimo contenuto di capsaicina e diidrocapsaicina e ciò sembra riflettersi sulla minor attività antiossidante, mentre i *C. annuum* hanno una maggior attività, relazionabile al maggior contenuto in polifenoli e capsaicinoidi.

Si ha, inoltre, prevalenza di polifenoli totali nei campioni *C. annuum* mentre i flavonoidi totali sono contenuti in abbondanza nei peperoncini appartenenti alla specie *C. baccatum*.

Capsaicina e diidrocapsaicina sono maggiormente contenute nel campione Capezzolo di Scimmia (*C. chinense*) e nel campione Acrata *C. annuum*.

Bibliografia

- Arnous A, Makris DP, Kefalas P (2001) Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines. *J Agric Food Chem* 49(12):5736–5742
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995) “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”. *Lebensm Wiss Technol/Food Sci Technol* 28:25-30
- Chuah AM, Lee YC, Yamaguchi T, Takamura H, Yin LJ, Matoba T (2008) Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chem* 111:20-28
- Ewald C, Fjelkner-Modig S, Johnsson K, Sjöholm I, Åkesson B (1999) Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans and peas. *Food Chem* 64:231-235
- Gutteridge JMC (1989) Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin: a study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Acta* 869:119-127
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1981) Formation of thiobarbituric acid reactive substances from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Lett* 128:347-352
- Loizzo MR, Pugliese A, Bonesi M, De Luca D, O’Brien NM, Menichini F, Tundis R (2013) Influence of drying and cooking process on the phytochemical content, antioxidant and hypoglycaemic properties of two bell *Capsicum annum* L. cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 53:392-401
- Materska M, Perucka I (2005) Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annum* L.) *J Agric Food Chem* 53:1750-1756

- Menichini F, Tundis R, Bonesi M, Loizzo MR, Conforti F, Statti G, De Cindio B, Houghton PJ, Menichini F (2009) The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero Food Chemistry 114:553-560
- Menichini F, Tundis R, Bonesi M, Loizzo MR, Conforti F, Statti G, De Cindio B, Houghton PJ, Menichini F (2009) The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero Food Chemistry 114:553-560
- Molyneux P (2004) ‘The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity’. Songklanakarin J.Sci.Techol. 26(2):211-21
- Moon JK, Shibamoto T (2009) Antioxidant assays for plant and food components. J Agric Food Chem 57:1655-1666
- Pellegrini M, Serafini B, Colombi D, del Rio S, Salvatora M and Bianchi Brighenti F (2003) Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy by three different *in vitro* assays. J Nutr 133:2812-2819
- Ravishankar GA, Suresh B, Girindhar P, Ramachandra Rao S, Sudhakar Johnson T (2003) Biotechnological studies on *Capsicum* for metabolite production and plant improvement. In: *Capsicum: the genus Capsicum* 96-128. De AK, Eds., Taylor & Francis, London
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1996) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology Medicine* 26:1231-1237
- Rosa A, Deiana M, Casu V, Paccagnini S, Appendino G, Ballero M, Dessi MA (2002) Antioxidant activity of capsinoids. J Agr Food Chem. 50:7396-7401
- Schweiggert U, Schieber A, Carle R (2006) Effects of blanching and storage on apsaicinoid stability and peroxidase activity of hot chili peppers (*Capsicum frutescens* L.). *Innovat. Food Sci Emerg Tech* 7:217-224

- Singleton VL, Rossi JAJ. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*; 16(3):144-158
- Smirnova LP, Pervykh LN (1998) Quantitative determination of the total content of flavonoids in the flowers of immortal Helichrysum arenarium. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 32(6):35-38
- Taga MS, Miller EE Pratt DE (1984) Chia Seeds as a source of natural lipid antioxidants. Department of food and Nutrition. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 61:5
- Tundis R, Loizzo MR, Menichini F, Bonesi M, Conforti F, De Luca D, Menichini F (2012) Air-dried *capsicum annum* var. acuminatum medium and big: Determination of bioactive constituents, antioxidant activity and carbohydrate-hydrolyzing enzymes inhibition. *Food Research International* 45:170-176
- Tundis R, Loizzo MR, Menichini F, Bonesi M, Conforti F, Statti G, De Luca, de Cindio B, Menichini (2011) Comparative Study on the Chemical Composition, Antioxidant Properties and Hypoglycaemic Activities of Two *Capsicum annum* L. Cultivars (Acuminatum small and Cerasiferum). *Plant Foods Hum Nutr* 66:261-269
- Turkmen N, Sari F, Velioglu YS (2005) The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chem.* 93:713-718
- Yoo MK, Lee CH, Lee H, Moon B, Lee CY (2008) Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry* 106:929-936
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming Wn (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64(4):555-559

Tabella 1: Resa estrattiva frutti di peperoncino

Cultivar	Specie		Peso pianta (g)	Estratto (tot. g)	% Resa
Yellow Cayenne	<i>C. annuum</i>	<i>F</i>	81.63	4.46	5.47
		<i>C</i>	60.01	5.37	8.94
		<i>B</i>	73.29	3.25	4.42
		<i>S</i>	12.82	3.09	24.07
Portafortuna	<i>C. annuum</i>	<i>F</i>	95.85	4.23	4.41
		<i>C</i>	77.32	4.87	6.29
		<i>B</i>	85.32	2.70	3.16
		<i>S</i>	12.89	3.52	27.34
Idealino	<i>C. annuum</i>	<i>F</i>	56.74	3.77	6.64
		<i>C</i>	53.07	4.44	8.36
		<i>B</i>	66.25	3.72	5.61
		<i>S</i>	15.99	3.68	23.02
Sole	<i>C. annuum</i>	<i>F</i>	79.41	1.77	2.22
		<i>C</i>	79.80	3.68	4.60
		<i>B</i>	109.35	1.59	1.45
		<i>S</i>	17.08	2.56	15.00
Campana	<i>C. baccatum</i>	<i>F</i>	47.85	2.90	6.06
		<i>C</i>	43.08	3.94	9.14
		<i>B</i>	42.96	3.07	7.13
		<i>S</i>	2.79	1.31	49.98
Duemila	<i>C. annuum</i>	<i>F</i>	45.52	2.45	5.37
		<i>C</i>	32.89	2.85	8.67
		<i>B</i>	40.93	2.24	5.48
		<i>S</i>	16.15	3.56	22.03
Pellegrino	<i>C. annuum</i>	<i>F</i>	27.00	1.22	4.51
		<i>C</i>	39.92	2.62	6.55
		<i>B</i>	28.34	1.60	5.64
		<i>S</i>	6.95	1.75	25.19
Fantasia	<i>C. annuum</i>	<i>F</i>	69.27	2.01	2.0
		<i>C</i>	58.57	4.36	6.35
		<i>B</i>	79.54	2.05	2.57
		<i>S</i>	26.89	4.15	15.43
Chaco	<i>C. chacoense</i>	<i>F</i>	37.62	1.11	2.96
		<i>C</i>	30.54	1.49	4.87
		<i>B</i>	35.35	1.29	3.64
		<i>S</i>	28.15	3.61	12.82
Loco	<i>C. annuum</i>	<i>F</i>	60.34	2.03	3.75
		<i>C</i>	46.72	2.95	6.31
		<i>B</i>	55.37	2.44	4.40
		<i>S</i>	19.34	3.18	16.42

Processi impiegati: F: freschi; C: congelati; B: bolliti; S: secchi.

Tabella 1 (cont.): Resa estrattiva frutti di peperoncino

Cultivar	Specie		Peso pianta (g)	Estratto (tot. g)	% Resa
Aji Angelo	<i>C. baccatum</i>	F	64.00	4.81	7.5
		C	50.91	4.85	9.3
		B	51.08	3.72	7.29
		S	15.07	7.22	47.90
Effix	<i>C. annuum</i>	F	44.03	1.34	3.04
		C	28.57	1.85	6.49
		B	29.14	1.27	4.35
		S	7.54	2.11	27.96
Acrata	<i>C. annuum</i>	F	51.99	2.27	4.36
		C	43.64	3.81	8.72
		B	43.02	2.38	5.54
		S	22.79	5.44	23.89
O di Giotto	<i>C. annuum</i>	F	58.50	2.08	3.55
		C	37.70	2.31	6.14
		B	44.57	1.68	3.77
		S	18.43	4.62	25.05
Arlecchino	<i>C. annuum</i>	F	42.06	1.68	4.00
		C	32.04	2.11	6.60
		B	34.38	1.42	4.14
		S	22.08	3.98	18.02
Nobile	<i>C. annuum</i>	F	42.12	1.13	2.68
		C	34.80	1.81	5.20
		B	46.22	0.88	1.91
		S	25.61	2.77	10.82
Taballo	<i>C. annuum</i>	F	39.21	1.20	3.07
		C	35.57	2.38	6.69
		B	42.80	1.39	3.23
		S	23.74	3.47	14.60
Border	<i>C. annuum</i>	F	44.91	1.71	3.81
		C	33.16	2.59	7.82
		B	41.20	2.22	5.39
		S	21.66	5.27	24.34
Hierro	<i>C. annuum</i>	F	50.32	1.56	3.09
		C	42.61	3.25	7.63
		B	42.28	1.65	3.90
		S	28.53	5.16	18.08
Capezzolo di	<i>C. chinense</i>	F	42.96	1.79	4.16
		C	33.47	2.36	7.06
		B	38.30	1.91	4.72
		S	19.39	3.99	20.58

Processi impiegati: F: freschi; C: congelati; B: bolliti; S: secchi.

Tabella 2: Contenuto polifenoli totali (mg/g di estratto)

Nome botanico (specie)	Fresco	Secco	Bollito	Congelato
Y. Cayenne (a)	16.3 ± 0.7 ²	48.5 ± 0.8 ¹	11.1 ± 0.4	13.4 ± 1.1
Portafortuna (a)	15.0 ± 0.5 ²³	342.4 ± 2.8 ¹³⁴	5.2 ± 0.8 ¹²⁴	12.5 ± 0.6 ²³
Idealino (a)	56.9 ± 1.7 ²³⁴	136.2 ± 2.0 ¹³⁴	44.9 ± 0.8 ¹²⁴	35.6 ± 1.2 ¹²³
Sole (a)	48.7 ± 1.6 ²³⁴	94.7 ± 1.9 ¹³⁴	8.9 ± 0.6 ¹²⁴	19.6 ± 0.6 ¹²³
Campana (b)	6.8 ± 0.8	67.3 ± 1.8 ¹³⁴	1.4 ± 0.5 ²	2.7 ± 0.3 ²
Due mila (a)	59.9 ± 1.1 ²³⁴	419.3 ± 2.6 ¹³⁴	14.0 ± 0.6 ¹²⁴	37.3 ± 0.9 ¹²³
Pellegrino (a)	32.4 ± 1.3	185.6 ± 5.6 ¹³⁴	28.3 ± 0.6	27.5 ± 1.0 ²
Fantasia (a)	8.0 ± 0.6	167.4 ± 4.2 ¹³⁴	2.3 ± 0.4	2.7 ± 0.5 ²
Chaco (ch)	23.6 ± 0.8 ²³⁴	77.5 ± 1.6 ¹³⁴	14.5 ± 0.9 ¹²	16.3 ± 0.7 ¹²
Loco (a)	61.5 ± 0.8 ²³⁴	117.9 ± 1.9 ¹³⁴	30.6 ± 1.0 ¹²	32.7 ± 0.8 ¹²
Aji Angelo (b)	7.4 ± 0.4	62.9 ± 0.8 ¹³⁴	4.2 ± 0.2 ²	5.2 ± 0.4 ²
Effix (a)	19.6 ± 0.2 ²⁴	117.2 ± 1.5 ¹³⁴	16.7 ± 0.8 ²	12.7 ± 0.4 ¹²
Acrata (a)	15.9 ± 0.6	196.0 ± 2.3 ¹³⁴	13.8 ± 0.6 ²	13.4 ± 0.5 ²
O di Giotto (a)	43.6 ± 0.5 ²³⁴	212.5 ± 2.7 ¹³⁴	18.2 ± 0.6 ¹²⁴	32.8 ± 0.6 ¹²³
Arlecchino (a)	13.8 ± 0.6	121.7 ± 2.0 ¹³⁴	8.7 ± 0.9 ²	11.7 ± 0.8 ²
Nobile (a)	14.3 ± 0.7	197.1 ± 1.9 ¹³⁴	8.8 ± 0.7 ²	8.9 ± 0.8 ²
Taballo (a)	21.0 ± 1.1 ²³⁴	86.8 ± 2.1 ¹³⁴	6.3 ± 0.7 ¹²	6.8 ± 0.8 ¹²
Border (a)	17.4 ± 0.9	128.0 ± 1.6 ¹³⁴	13.5 ± 0.5 ²	15.0 ± 0.8 ²
Hierro (a)	71.4 ± 1.7 ²³⁴	87.6 ± 2.9 ¹³⁴	7.7 ± 0.4 ¹²⁴	21.0 ± 1.2 ¹²³
Ca. Scimm (c)	2.3 ± 0.9 ²	9.9 ± 0.7 ¹³⁴	0.5 ± 0.03 ²	1.5 ± 0.5 ²

I risultati sono espressi come media ± S.D. (n= 3). (a) = *C. annuum*. (b) = *C. baccatum*. (c) = *C. chinense*. (ch) = *C. chacoense*. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. I numeri (1-4) denotano una differenza significativa (P < 0.05) tra i vari metodi di processazione (1=fresco; 2=secco; 3=bollito; 4=congelato).

Tabella 3: Contenuto flavonoidi totali (mg/g di estratto)

Nome botanico (specie)	Fresco	Secco	Bollito	Congelato
Y. Cayenne (a)	2.3 ± 0.3 ²	7.2 ± 0.4 ¹³⁴	1.1 ± 0.02 ²	1.6 ± 0.03 ²
Portafortuna (a)	1.4 ± 0.2 ²	7.4 ± 0.2 ¹³⁴	0.7 ± 0.02 ²	1.1 ± 0.02 ²
Idealino (a)	2.2 ± 0.1 ²	6.3 ± 0.1 ¹³⁴	1.6 ± 0.08 ²	1.6 ± 0.02 ²
Sole (a)	0.9 ± 0.1 ²	4.6 ± 0.2 ¹³⁴	0.4 ± 0.01 ²	1.3 ± 0.01 ²
Campana (b)	1.4 ± 0.6 ²	10.9 ± 0.7 ¹³⁴	1.5 ± 0.01 ²	1.8 ± 0.05 ²
Duemila (a)	2.1 ± 0.02 ²	6.3 ± 0.2 ¹³⁴	1.3 ± 0.02 ²	1.4 ± 0.01 ²
Pellegrino (a)	1.7 ± 0.3 ²	8.2 ± 0.2 ¹³⁴	1.5 ± 0.02 ²	1.4 ± 0.05 ²
Fantasia (a)	1.7 ± 0.5 ²	4.6 ± 0.2 ¹³⁴	0.7 ± 0.03 ²	0.9 ± 0.01 ²
Chaco (ch)	1.5 ± 0.04 ²	3.5 ± 0.1 ¹³⁴	0.8 ± 0.03 ²	1.0 ± 0.06 ²
Loco (a)	1.7 ± 0.4 ²	5.2 ± 0.3 ¹³⁴	1.1 ± 0.05 ²	1.2 ± 0.02 ²
Aji Angelo (b)	11.1 ± 0.7 ³⁴	10.5 ± 0.3 ³⁴	1.6 ± 0.05 ¹²	1.8 ± 0.03 ¹²
Effix (a)	1.5 ± 0.09 ²	7.6 ± 0.5 ¹³⁴	1.3 ± 0.05 ²	0.9 ± 0.01 ²
Acrata (a)	2.8 ± 0.1 ²	9.1 ± 0.3 ¹³⁴	1.7 ± 0.04 ²	1.8 ± 0.01 ²
O di Giotto (a)	1.5 ± 0.03 ²	7.0 ± 0.2 ¹³⁴	1.0 ± 0.04 ²	1.2 ± 0.03 ²
Arlecchino (a)	1.6 ± 0.02 ²	6.7 ± 0.2 ¹³⁴	1.2 ± 0.02 ²	1.2 ± 0.04 ²
Nobile (a)	1.3 ± 0.01 ²	3.5 ± 0.1 ¹³⁴	0.5 ± 0.01 ²	0.9 ± 0.04 ²
Taballo (a)	1.8 ± 0.03 ²	5.5 ± 0.1 ¹³⁴	0.9 ± 0.02 ²	1.1 ± 0.02 ²
Border (a)	1.9 ± 0.03 ²	6.6 ± 0.4 ¹³⁴	1.2 ± 0.03 ²	1.4 ± 0.01 ²
Hierro (a)	2.0 ± 0.05 ²	5.9 ± 0.3 ¹³⁴	0.9 ± 0.06 ²	1.0 ± 0.01 ²
Ca. Scimm (c)	2.3 ± 0.08 ²	7.7 ± 0.3 ¹³⁴	1.2 ± 0.03 ²	1.6 ± 0.02 ²

I risultati sono espressi come media ± S.D. (n= 3). (a) = *C. annuum*. (b) = *C. baccatum*. (c) = *C. chinense*. (ch) = *C. chacoense*. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. I numeri (1-4) denotano una differenza significativa (P < 0.05) tra i vari metodi di processazione (1=fresco; 2=secco; 3=bollito; 4=congelato).

Tabella 4: Dosaggio capsaicina (mg/100g di estratto)

Nome botanico (specie)	Fresco	Secco	Bollito	Congelato
Y. Cayenne (a)	135.9 ± 5.1 ²³⁴	1147.7±21.4 ¹³⁴	95.1 ± 3.5 ¹²⁴	32.4 ± 2.4 ¹²³
Portafortuna (a)	10.9 ± 0.6 ²	105.7 ± 3.1 ¹³⁴	6.3 ± 0.4 ²	10.5 ± 1.4 ²
Idealino (a)	1184.5 ± 11.6 ²³⁴	2932.1 ± 12.5 ¹³⁴	333.6 ± 3.8 ¹²⁴	558.4 ± 2.7 ¹²³
Sole (a)	230.6 ± 3.2 ²³⁴	344.3 ± 3.2 ¹³⁴	25.2 ± 0.6 ¹²	34.3 ± 0.7 ¹²
Campana (b)	-	125.5 ± 2.7 ¹³⁴	-	-
Duemila (a)	37.1 ± 1.3 ²	411.5 ± 3.8 ¹³⁴	36.6 ± 0.7 ²	12.4 ± 0.6 ²
Pellegrino (a)	406.0 ± 4.6 ²⁴	1624.2 ± 31.8 ¹³⁴	376.7 ± 4.0 ²⁴	308.6 ± 3.0 ¹²³
Fantasia (a)	245.3 ± 3.5 ²³⁴	890.2 ± 7.9 ¹³⁴	102.8 ± 1.5 ¹²⁴	197.9 ± 3.9 ¹²³
Chaco (ch)	78.9 ± 2.1 ²	1497.9 ± 14.4 ¹³⁴	45.0 ± 0.8 ²	49.9 ± 1.6
Loco (a)	289.1 ± 5.3 ²³⁴	764.9 ± 8.5 ¹³⁴	145.7 ± 2.4 ¹²⁴	218.5 ± 1.1 ¹²³
Aji Angelo (b)	19.0 ± 0.8 ²	175.2 ± 2.6 ¹³⁴	7.5 ± 0.6 ²	13.6 ± 0.8 ²
Effix (a)	122.4 ± 1.6 ²⁴	626.7 ± 3.1 ¹³⁴	95.2 ± 2.0 ²⁴	38.4 ± 0.8 ¹²³
Acrata (a)	1362.7 ± 11.7 ²³⁴	1722.4 ± 26.4 ¹³⁴	1255.8 ± 21.6 ¹²⁴	844.9±3.1 ¹²³
O di Giotto (a)	88.9 ± 2.4 ²³⁴	546.5 ± 6.4 ¹³⁴	28.6 ± 1.7 ¹²	36.8 ± 1.2 ¹²
Arlecchino (a)	303.1 ± 4.5 ²³⁴	550.0 ± 11.5 ¹³⁴	167.3 ± 3.1 ¹²	184.6 ± 1.8 ¹²
Nobile (a)	57.0 ± 1.6 ²	229.4 ± 4.7 ¹³⁴	20.7 ± 0.9 ²	22.9 ± 0.7 ²
Taballo (a)	327.2 ± 3.9 ²³⁴	2101.6 ± 41.0 ¹³⁴	267.3 ± 2.4 ¹²⁴	369.2 ± 4.0 ¹²³
Border (a)	267.7 ± 3.6 ²³⁴	820.2 ± 13.6 ¹³⁴	73.6 ± 2.4 ¹²⁴	176.1 ± 2.1 ¹²³
Hierro (a)	259.3 ± 2.2 ²³⁴	1476.4 ± 18.5 ¹³⁴	216.2 ± 3.6 ¹²	176.3 ± 3.2 ¹²
Ca. Scimm (c)	903.3 ± 7.2 ²³⁴	3491.7 ± 11.4 ¹³⁴	1487.8 ± 19.7 ¹²⁴	567.5 ± 5.7 ¹²³

I risultati sono espressi come media ± S.D. (n= 3). (a) = *C. annuum*. (b) = *C. baccatum*. (c) = *C. chinense*. (ch) = *C. chacoense*. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. I numeri (1-4) denotano una differenza significativa (P < 0.05) tra i vari metodi di processazione (1=fresco; 2=secco; 3=bollito; 4=congelato).

Tabella 5: Dosaggio diidrocapsaicina (mg/100g di estratto)

Nome botanico (specie)	Fresco	Secco	Bollito	Congelato
Y. Cayenne (a)	68.8 ± 3.7 ²³⁴	539.5 ± 4.6 ¹³⁴	43.5 ± 2.2 ¹²⁴	16.8 ± 1.4 ¹²³
Portafortuna (a)	4.9 ± 0.7 ²	27.8 ± 1.0 ¹³⁴	2.5 ± 0.5	2.6 ± 0.9 ²
Idealino (a)	344.3 ± 2.6 ²³⁴	1053.5±13.2 ¹³⁴	100.3 ± 2.2 ¹²⁴	145.0± 1.9 ¹²³
Sole (a)	167.3 ± 2.5 ²³⁴	258.9 ± 4.7 ¹³⁴	16.2 ± 0.7 ¹²	23.1 ± 0.9 ¹²
Campana (b)	-	57.9 ± 3.8 ¹³⁴	-	-
Duemila (a)	25.3 ± 0.4 ²	263.6 ± 1.9 ¹³⁴	24.8 ± 0.8 ²	6.5 ± 0.8 ²
Pellegrino (a)	304.2 ± 5.2 ²⁴	1291.2 ± 21.3 ¹³⁴	309.1 ± 1.7 ²⁴	243.7± 2.9 ¹²³
Fantasia (a)	180.5 ± 2.2 ²³⁴	717.7 ± 5.4 ¹³⁴	71.9 ± 2.1 ¹²⁴	155.3± 3.5 ¹²³
Chaco (ch)	61.2 ± 1.7 ²³⁴	753.7 ± 6.3 ¹³⁴	40.1 ± 0.8 ¹²⁴	44.4 ± 1.9 ¹²³
Loco (a)	166.8 ± 2.8 ²³	348.9 ± 2.6 ¹³⁴	73.3 ± 1.5 ¹²	99.8 ± 2.3 ²
Aji Angelo (b)	15.2 ± 0.9 ²	155.7 ± 1.8 ¹³⁴	3.0 ± 0.1 ²	9.1 ± 0.6 ²
Effix (a)	95.7 ± 1.2 ²⁴	620.9 ± 2.2 ¹³⁴	94.6 ± 2.0 ²⁴	35.2 ± 1.3 ¹²³
Acrata (a)	612.4 ± 2.7 ²³⁴	840.7 ± 4.3 ¹³⁴	519.7 ± 4.3	400.2 ± 3.4 ¹²³
O di Giotto (a)	45.1 ± 1.6 ²³⁴	383.1 ± 2.5 ¹³⁴	17.3 ± 0.8 ²⁴	19.1 ± 0.6 ¹²
Arlecchino (a)	235.7 ± 2.1 ²³⁴	394.9 ± 3.7 ¹³⁴	128.2 ± 2.7 ¹²	102.7 ± 1.8 ¹²³
Nobile (a)	26.4 ± 0.7 ²	101.5 ± 1.6 ¹³⁴	10.4 ± 1.1 ²	13.6 ± 0.7 ²
Taballo (a)	233.3 ± 4.2 ²³⁴	1628.3±18.5 ¹³⁴	171.3 ± 4.6 ¹²⁴	258.3 ± 2.7 ¹²³
Border (a)	116.8 ± 1.8 ²³⁴	300.0 ± 2.9 ¹³⁴	30.3 ± 1.5 ¹²⁴	67.4 ± 1.7 ¹²³
Hierro (a)	71.3 ± 2.3 ²⁴	408.4 ± 5.2 ¹³⁴	59.5 ± 2.2 ²	46.7 ± 2.1 ¹²
Ca. Scimm (c)	132.1 ± 6.2 ²³⁴	531.1 ± 4.6 ¹³⁴	310.1 ± 3.0 ¹²⁴	100.5 ± 1.9 ¹³

I risultati sono espressi come media ± S.D. (n= 3). (a) = *C. annuum*. (b) = *C. baccatum*. (c) = *C. chinense*. (ch) = *C. chacoense*. La statistica è stata eseguita tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. I numeri (1-4) denotano una differenza significativa (P < 0.05) tra i vari metodi di processazione (1=fresco; 2=secco; 3=bollito; 4=congelato).

Tabella 6: Attività radical scavenging valutata tramite ABTS assay (IC₅₀ µg/ml)

Nome botanico (specie)	Fresco	Secco	Bollito	Congelato
Y. Cayenne (a)	143.3 ± 3.1 ^{a234}	69.7 ± 2.8 ^{a134}	103.5 ± 3.2 ^{a124}	62.5 ± 0.8 ^{a123}
Portafortuna (a)	226.5 ± 3.7 ^{a234}	110.3 ± 3.2 ^{a134}	155.0 ± 3.8 ^{a124}	116.2 ± 3.2 ^{a123}
Idealino (a)	100.3 ± 2.1 ^{a234}	45.7 ± 0.8 ^{a134}	44.3 ± 1.1 ^{a124}	58.0 ± 1.1 ^{a123}
Sole (a)	30.2 ± 0.5 ^{a234}	68.7 ± 0.7 ^{a134}	40.9 ± 1.2 ^{a124}	44.5 ± 1.2 ^{a123}
Campana (b)	169.7 ± 1.9 ^{a234}	167.0 ± 2.6 ^{a134}	483.6 ± 3.9 ^{a124}	317.4 ± 3.9 ^{a123}
Duemila (a)	107.1 ± 1.3 ^{a34}	76.4 ± 2.5 ^{a34}	39.2 ± 1.2 ^{a124}	62.2 ± 1.3 ^{a123}
Pellegrino (a)	56.9 ± 0.6 ^{a234}	45.2 ± 0.4 ^{a134}	77.9 ± 3.1 ^{a124}	48.6 ± 1.2 ^{a123}
Fantasia (a)	61.4 ± 2.1 ^{a234}	63.6 ± 0.6 ^{a134}	55.3 ± 2.4 ^{a12}	46.2 ± 1.1 ^{a12}
Chaco (ch)	78.3 ± 2.0 ^{a24}	80.7 ± 0.9 ^{a14}	60.1 ± 2.5 ^{a4}	58.9 ± 0.9 ^{a123}
Loco (a)	41.2 ± 0.9 ^{a234}	54.6 ± 0.4 ^{a134}	63.3 ± 2.6 ^{a124}	32.5 ± 0.2 ^{a123}
Aji Angelo (b)	452.9 ± 3.6 ^{a234}	256.1 ± 3.8 ^{a134}	319.7 ± 4.2 ^{a124}	214.5 ± 3.3 ^{a123}
Effix (a)	69.3 ± 2.4 ^{a234}	83.6 ± 2.4 ^{a134}	73.4 ± 1.2 ^{a124}	37.4 ± 0.9 ^{a123}
Acrata (a)	33.7 ± 2.1 ^{a234}	25.0 ± 0.5 ^{a134}	43.1 ± 0.8 ^{a124}	27.3 ± 0.6 ^{a123}
O di Giotto (a)	52.4 ± 2.0 ^{a234}	88.8 ± 0.7 ^{a134}	91.0 ± 1.0 ^{a124}	60.4 ± 1.2 ^{a123}
Arlecchino (a)	88.7 ± 3.1 ^{a234}	36.0 ± 0.2 ^{a13}	68. ± 2.2 ^{a14}	36.0 ± 0.2 ^{a123}
Nobile (a)	83.5 ± 2.9 ^{a234}	46.9 ± 0.8 ^{a134}	65.2 ± 1.2 ^{a124}	26.5 ± 0.6 ^{a123}
Taballo (a)	35.0 ± 0.8 ^{a234}	22.6 ± 0.1 ^{a134}	44.0 ± 1.0 ^{a124}	48.9 ± 1.3 ^{a123}
Border (a)	41.4 ± 0.5 ^{a234}	62.9 ± 0.9 ^{a134}	73.6 ± 1.1 ^{a124}	56.4 ± 2.0 ^{a123}
Hierro (a)	47.4 ± 0.6 ^{a234}	50.4 ± 0.7 ^{a134}	94.3 ± 2.4 ^{a24}	40.6 ± 0.9 ^{a12}
Ca. Scimm (c)	45.3 ± 0.4 ^{a234}	27.6 ± 0.1 ^{a134}	38.8 ± 2.2 ^{a124}	32.8 ± 0.8 ^{a123}
Acido Ascorbico	1.7 ± 0.06			

I risultati sono espressi come media ± S.D. (n= 3). (a) = *C. annuum*. (b) = *C. baccatum*. (c) = *C. chinense*. (ch) = *C. chacoense*. La capacità antiossidante è stata determinata tramite l'utilizzo del radicale cationico ABTS⁺; Ascorbico è usato come controllo positivo. La prima statistica è stata effettuata tra i campioni e il controllo positivo: **FRESCO** - One-way ANOVA ****p* < 0.0001 (F= 4734, R²= 0.999) seguito dal test di multicomparsazione di Dunnett: ^a*p* < 0.01 confrontato con l'acido ascorbico. **SECCO** - One-way ANOVA ****p* < 0.0001 (F= 4860, R²= 0.999) seguito dal test di multicomparsazione di Dunnett: ^a*p* < 0.01 confrontato con l'acido ascorbico. **BOLLITO**- One-way ANOVA ****p* < 0.0001 (F= 5603, R²= 0.999) seguito dal test di multicomparsazione di Dunnett: ^a*p* < 0.01 confrontato con l'acido ascorbico. **CONGELATO** - One-way ANOVA ****p* < 0.0001 (F= 2407, R²= 0.999) seguito dal test di multicomparsazione di Dunnett: ^a*p* < 0.01 confrontato con l'acido ascorbico. Ulteriore metodo statistico, volto all'analisi delle differenze tra le varie processazioni, è stato eseguito tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. I numeri (1-4) denotano una differenza significativa (P < 0.05) tra i vari metodi di processazione (1=fresco; 2=secco; 3=bollito; 4=congelato).

Tabella 7: Attività radical scavenging valutata tramite DPPH assay (IC₅₀ µg/ml)

Nome botanico (specie)	Fresco	Secco	Bollito	Congelato
Y. Cayenne (a)	359.9 ± 4.5 ^{a234}	244.9 ± 4.8 ^{c134}	150.1 ± 2.5 ^{a124}	290.3 ± 3.9 ^{a123}
Portafortuna (a)	261.1 ± 4.2 ^{a234}	199.6 ± 2.5 ^{b134}	343.6 ± 6.5 ^{a124}	420.5 ± 5.1 ^{a123}
Idealino (a)	173.0 ± 3.2 ^{a234}	110.3 ± 3.2 ^{a134}	29.3 ± 0.8 ^{a124}	203.6 ± 3.3 ^{a123}
Sole (a)	33.1 ± 1.1 ^{a234}	63.7 ± 4.1 ^{a134}	82.3 ± 1.2 ^{a124}	266.6 ± 4.0 ^{a123}
Campana (b)	142.2 ± 2.8 ^{a234}	367.8 ± 4.3 ^{a134}	396.6 ± 4.9 ^{a124}	1914.6 ± 7.1 ^{a123}
Duemila (a)	112.5 ± 2.5 ^{a34}	111.3 ± 4.1 ^{a34}	51.1 ± 0.9 ^{a124}	287.6 ± 4.2 ^{a123}
Pellegrino (a)	62.9 ± 1.5 ^{a234}	139.1 ± 3.8 ^{a134}	177.5 ± 4.3 ^{a124}	209.9 ± 4.4 ^{a123}
Fantasia (a)	92.7 ± 1.8 ^{a234}	166.1 ± 4.2 ^{a134}	274.5 ± 4.6 ^{a12}	286.1 ± 3.5 ^{a12}
Chaco (ch)	74.8 ± 1.6 ^{a24}	75.1 ± 1.5 ^{a14}	62.5 ± 0.8 ^{a4}	290.3 ± 2.8 ^{a123}
Loco (a)	5.5 ± 0.5 ^{b234}	106.2 ± 4.3 ^{a134}	28.1 ± 0.5 ^{a124}	294.1 ± 2.5 ^{a123}
Aji Angelo (b)	468.8 ± 4.8 ^{a234}	369.2 ± 3.7 ^{a134}	385.3 ± 4.8 ^{a124}	1926.1 ± 6.5 ^{a123}
Effix (a)	3.9 ± 1.1 ^{a234}	232.2 ± 4.2 ^{a134}	115.3 ± 4.5 ^{a124}	526.6 ± 3.3 ^{a123}
Acrata (a)	11.9 ± 1.4 ^{a234}	54.6 ± 1.3 ^{a134}	83.7 ± 4.3 ^{a214}	180.7 ± 3.4 ^{a123}
O di Giotto (a)	17.4 ± 3.1 ^{a234}	106.2 ± 2.7 ^{a134}	141.7 ± 4.2 ^{a124}	202.4 ± 4.0 ^{a123}
Arlecchino (a)	85.8 ± 2.2 ^{a234}	204.4 ± 3.4 ^{a14}	205.0 ± 5.5 ^{a14}	398.9 ± 4.6 ^{a123}
Nobile (a)	125.0 ± 1.3 ^{a234}	91.4 ± 2.7 ^{a134}	152.1 ± 4.4 ^{a124}	180.7 ± 2.1 ^{a123}
Taballo (a)	49.4 ± 1.8 ^{a234}	131.8 ± 2.5 ^{a134}	74.1 ± 1.5 ^{a124}	248.4 ± 3.5 ^{a123}
Border (a)	93.0 ± 1.3 ^{a234}	208.8 ± 4.7 ^{a134}	159.4 ± 4.6 ^{a124}	271.2 ± 3.1 ^{a123}
Hierro (a)	76.4 ± 1.4 ^{a234}	129.2 ± 2.2 ^{a134}	361.0 ± 4.7 ^{a12}	374.8 ± 4.4 ^{a12}
Ca. Scimm (c)	89.5 ± 1.6 ^{a234}	162.2 ± 4.5 ^{a134}	105.5 ± 4.3 ^{a124}	194.3 ± 4.1 ^{a123}
Acido Ascorbico	5.0 ± 0.8			

I risultati sono espressi come media ± S.D. (n= 3). (a) = *C. annuum*. (b) = *C. baccatum*. (c) = *C. chinense*. (ch) = *C. chacoense*. acido ascorbico è usato come controllo positivo. La prima statistica è stata effettuata tra i campioni e il controllo positivo: **FRESCO** - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 7313, $R^2 = 0.999$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.05$ confrontato con l'acido ascorbico. **SECCO** - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 5415, $R^2 = 0.999$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.05$, ^c $p > 0.05$ confrontato con l'acido ascorbico. **BOLLITO** - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 6429, $R^2 = 0.999$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$ confrontato con l'acido ascorbico. **CONGELATO** - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 109200, $R^2 = 1.0$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$ confrontato con l'acido ascorbico. Ulteriore metodo statistico, volto all'analisi delle differenze tra le varie processazioni, è stato eseguito tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. I numeri (1-4) denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione (1=fresco; 2=secco; 3=bollito; 4=congelato).

Tabella 8: Attività protettiva sul bilayer lipidico valutata tramite β -carotene bleaching test a 30 min (IC_{50} μ g/ml)

Nome botanico (specie)	Fresco	Secco	Bollito	Congelato
Y. Cayenne (a)	13.1 \pm 1.1 ^a	11.6 \pm 2.3 ^a	32.1 \pm 3.1 ^a	13.1 \pm 1.4 ^a
Portafortuna (a)	22.3 \pm 2.2 ^a	20.4 \pm 2.1 ^a	13.3 \pm 2.4 ^a	27.0 \pm 2.1 ^a
Idealino (a)	20.4 \pm 2.1 ^a	10.5 \pm 1.3 ^a	8.5 \pm 1.1 ^a	13.1 \pm 1.2 ^a
Sole (a)	8.5 \pm 0.8 ^{a4}	9.7 \pm 0.9 ^a	7.5 \pm 1.3 ^{a4}	30.1 \pm 1.5 ^{a13}
Campana (b)	32.6 \pm 3.1 ^{a34}	21.1 \pm 1.4 ^{a34}	93.7 \pm 3.6 ^{a12}	90.9 \pm 3.6 ^{a12}
Duemila (a)	46.1 \pm 2.6 ^{a2}	11.5 \pm 1.1 ^{a14}	28.0 \pm 2.4 ^a	34.5 \pm 3.1 ^{a2}
Pellegrino (a)	16.5 \pm 1.5 ^a	7.7 \pm 1.0 ^a	12.5 \pm 1.3 ^a	10.8 \pm 2.1 ^a
Fantasia (a)	10.0 \pm 1.1 ^{a3}	6.3 \pm 0.8 ^{b3}	37.1 \pm 1.8 ^{a124}	11.8 \pm 2.0 ^{a3}
Chaco (ch)	31.8 \pm 0.4 ^a	14.8 \pm 1.1 ^a	19.3 \pm 1.1 ^a	21.4 \pm 2.3 ^a
Loco (a)	10.6 \pm 0.6 ^a	7.1 \pm 1.2 ^a	27.9 \pm 2.6 ^a	12.5 \pm 1.4 ^a
Aji Angelo (b)	76.8 \pm 3.5 ^{a234}	20.7 \pm 1.4 ^{a1}	23.7 \pm 2.4 ^{a1}	26.3 \pm 2.5 ^{a1}
Effix (a)	24.7 \pm 2.2 ^a	7.8 \pm 0.9 ^a	7.5 \pm 0.8 ^a	6.3 \pm 0.6 ^a
Acrata (a)	6.1 \pm 0.4 ^a	9.5 \pm 1.1 ^a	13.5 \pm 1.1 ^a	10.4 \pm 3.1 ^a
O di Giotto (a)	3.7 \pm 0.2 ^c	15.3 \pm 2.1 ^a	13.1 \pm 1.3 ^a	3.6 \pm 0.4 ^c
Arlecchino (a)	6.2 \pm 0.5 ^a	10.6 \pm 1.9 ^a	12.8 \pm 1.2 ^a	3.2 \pm 0.9 ^c
Nobile (a)	10.9 \pm 1.1 ^a	3.2 \pm 0.6 ^a	20.1 \pm 2.1 ^a	9.7 \pm 0.5 ^a
Taballo (a)	40.9 \pm 2.6 ^{a234}	13.4 \pm 1.4 ^{a1}	3.1 \pm 0.5 ^{c1}	3.2 \pm 0.2 ^{c1}
Border (a)	13.8 \pm 2.7 ^a	17.3 \pm 1.2 ^a	7.1 \pm 0.4 ^a	6.4 \pm 0.1 ^a
Hierro (a)	4.5 \pm 0.1 ^c	3.2 \pm 0.5 ^a	2.6 \pm 0.1 ^c	10.8 \pm 2.1 ^a
Ca. Scimm (c)	27.8 \pm 1.4 ^a	17.0 \pm 1.6 ^a	28.7 \pm 1.1 ^a	9.5 \pm 1.4 ^a
Propil Gallato	1.0 \pm 0.04			

I risultati sono espressi come media \pm S.D. (n= 3). (a) = *C. annuum*. (b) = *C. baccatum*. (c) = *C. chinense*. (ch) = *C. chacoense*. Propil gallato è stato usato come controllo positivo. La prima statistica è stata effettuata tra i campioni e il controllo positivo: FRESCO - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 270.5, $R^2 = 0.992$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$, ^c $p > 0.05$ confrontato col propil gallato. SECCO - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 33.29, $R^2 = 0.940$) seguito dal multicomparison Dunnett's test: ^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.05$ confrontato col propil gallato. BOLLITO - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 349.9, $R^2 = 0.994$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$, ^c $p > 0.05$ confrontato col propil gallato. CONGELATO - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 354.3, $R^2 = 0.994$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$, ^c $p > 0.05$ confrontato col propil gallato. Ulteriore metodo statistico, volto all'analisi delle differenze tra le varie processazioni, è stato eseguito tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. I numeri (1-4) denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione (1=fresco; 2=secco; 3=bollito; 4=congelato).

Tabella 9: Attività protettiva sul bilayer lipidico valutata tramite β -carotene bleaching test a 60 min (IC₅₀ μ g/ml)

Nome botanico (specie)	Fresco	Secco	Bollito	Congelato
Y. Cayenne (a)	13.3 \pm 2.1 ^{a34}	12.2 \pm 2.4 ^{a34}	36.2 \pm 3.4 ^{a124}	23.8 \pm 2.5 ^{a123}
Portafortuna (a)	26.9 \pm 2.4 ^{a34}	31.7 \pm 3.1 ^{a3}	59.3 \pm 3.7 ^{a124}	35.2 \pm 2.8 ^{a113}
Idealino (a)	26.3 \pm 2.1 ^{a23}	12.0 \pm 2.2 ^{a14}	11.9 \pm 2.1 ^{a14}	30.0 \pm 3.1 ^{a23}
Sole (a)	18.9 \pm 1.4 ^{a4}	10.5 \pm 2.0 ^{a4}	11.0 \pm 2.4 ^{a4}	30.7 \pm 3.3 ^{a123}
Campana (b)	36.1 \pm 2.1 ^{a34}	28.6 \pm 3.3 ^{a34}	143.7 \pm 5.1 ^{a124}	94.1 \pm 6.1 ^{a123}
Duemila (a)	75.5 \pm 3.1 ^{a234}	13.6 \pm 1.9 ^{a134}	34.0 \pm 2.2 ^{a12}	35.6 \pm 3.0 ^{a12}
Pellegrino (a)	21.1 \pm 2.2 ^{a2}	9.2 \pm 0.7 ^a	19.0 \pm 2.0 ^a	11.9 \pm 2.0 ^a
Fantasia (a)	11.3 \pm 2.1 ^{a3}	9.0 \pm 0.8 ^{a3}	32.6 \pm 1.8 ^{a124}	14.3 \pm 1.2 ^{a3}
Chaco (ch)	45.0 \pm 2.8 ^{a234}	17.2 \pm 2.0 ^{a14}	25.2 \pm 1.4 ^{a14}	24.2 \pm 2.5 ^{a13}
Loco (a)	14.6 \pm 1.4 ^{a3}	7.9 \pm 0.7 ^{a3}	38.9 \pm 1.8 ^{a124}	12.7 \pm 1.2 ^{a13}
Aji Angelo (b)	88.6 \pm 3.6 ^{a234}	25.9 \pm 2.1 ^{a14}	23.7 \pm 1.2 ^{a14}	42.9 \pm 3.1 ^{a123}
Effix (a)	44.3 \pm 3.1 ^{a234}	9.4 \pm 0.8 ^{a1}	10.7 \pm 1.1 ^{a1}	10.9 \pm 2.4 ^{a1}
Acrata (a)	9.3 \pm 1.1 ^a	10.7 \pm 2.0 ^a	16.5 \pm 1.0 ^a	10.8 \pm 2.6 ^a
O di Giotto (a)	7.8 \pm 0.9 ^{a2}	39.1 \pm 2.8 ^{a134}	15.3 \pm 1.4 ^{a2}	8.6 \pm 0.8 ^{a2}
Arlecchino (a)	17.4 \pm 1.4 ^{a4}	10.8 \pm 2.2 ^a	14.5 \pm 1.3 ^a	5.1 \pm 0.4 ^{b1}
Nobile (a)	57.0 \pm 3.2 ^{a234}	3.4 \pm 0.1 ^{c13}	21.9 \pm 2.1 ^{a124}	10.5 \pm 2.1 ^{a13}
Taballo (a)	41.9 \pm 2.5 ^{a234}	13.0 \pm 1.1 ^{a1}	10.0 \pm 0.8 ^{a1}	5.0 \pm 0.3 ^{b1}
Border (a)	14.9 \pm 2.2 ^{a4}	17.9 \pm 1.3 ^{a4}	11.4 \pm 1.4 ^{a4}	11.5 \pm 1.2 ^{a123}
Hierro (a)	8.5 \pm 0.8 ^a	3.2 \pm 0.8 ^{c3}	15.8 \pm 1.6 ^{a2}	12.0 \pm 1.5 ^a
Ca. Scimm (c)	26.4 \pm 2.3 ^{a4}	18.9 \pm 1.6 ^{a3}	30.4 \pm 2.5 ^{a24}	12.1 \pm 2.0 ^{a13}
Propil Gallato	1.0 \pm 0.03			

I risultati sono espressi come media \pm S.D. (n= 3). (a) = *C. annuum*. (b) = *C. baccatum*. (c) = *C. chinense*. (ch) = *C. chacoense*. Propil gallato è stato usato come controllo positivo. La prima statistica è stata effettuata tra i campioni e il controllo positivo: FRESCO - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 270.5, $R^2 = 0.992$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$, ^c $p > 0.05$ confrontato col propil gallato. SECCO - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 33.29, $R^2 = 0.940$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.05$ confrontato col propil gallato. BOLLITO - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 349.9, $R^2 = 0.994$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$, ^c $p > 0.05$ confrontato col propil gallato. CONGELATO - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 354.3, $R^2 = 0.994$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$, ^c $p > 0.05$ confrontato col propil gallato. Ulteriore metodo statistico, volto all'analisi delle differenze tra le varie processazioni, è stato eseguito tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. I numeri (1-4) denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione (1=fresco; 2=secco; 3=bollito; 4=congelato).

Tabella 10: Attività riducente il ferro valutata tramite FRAP $\mu\text{M Fe(II)/g}$ [2,5 mg/mL]

Nome botanico (specie)	Fresco	Secco	Bollito	Congelato
Y. Cayenne (a)	20.5 \pm 2.0 ^a	33.5 \pm 2.4 ^a	25.9 \pm 2.0 ^a	14.8 \pm 1.0 ^a
Portafortuna (a)	12.9 \pm 1.4 ^a	21.0 \pm 2.0 ^a	16.2 \pm 2.4 ^a	8.4 \pm 0.9 ^a
Idealino (a)	17.4 \pm 1.5 ^a	43.9 \pm 2.2 ^a	43.8 \pm 3.6 ^a	27.6 \pm 1.2 ^a
Sole (a)	86.3 \pm 2.8 ^{a234}	35.2 \pm 2.6 ^{a1}	41.5 \pm 3.1 ^{a1}	28.7 \pm 1.4 ^{a1}
Campana (b)	15.2 \pm 1.0 ^a	13.5 \pm 1.8 ^a	7.3 \pm 0.8 ^a	NA
Duemila (a)	23.0 \pm 2.1 ^a	24.7 \pm 2.0 ^a	25.2 \pm 1.4 ^a	12.9 \pm 1.2 ^a
Pellegrino (a)	39.8 \pm 3.4 ^a	37.9 \pm 2.4 ^a	31.0 \pm 1.2 ^a	24.9 \pm 1.8 ^a
Fantasia (a)	28.8 \pm 2.8 ^a	35.1 \pm 2.5 ^a	35.4 \pm 1.3 ^a	20.5 \pm 2.9 ^a
Chaco (ch)	28.8 \pm 2.9 ^a	31.7 \pm 2.6 ^a	25.9 \pm 1.7 ^a	14.2 \pm 1.4 ^a
Loco (a)	43.2 \pm 3.3 ^a	40.5 \pm 3.4 ^a	28.7 \pm 1.2 ^a	19.8 \pm 1.1 ^a
Aji Angelo (b)	9.1 \pm 0.4 ^a	9.2 \pm 0.8 ^a	9.9 \pm 0.7 ^a	NA
Effix (a)	28.4 \pm 1.1 ^a	26.8 \pm 1.4 ^a	33.2 \pm 1.8 ^a	11.3 \pm 1.4 ^a
Acrata (a)	52.4 \pm 3.1 ^a	79.5 \pm 3.4 ^a	53.2 \pm 2.4 ^a	44.6 \pm 2.1 ^a
O di Giotto (a)	47.6 \pm 3.5 ^a	22.1 \pm 1.1 ^a	25.3 \pm 1.6 ^a	13.1 \pm 1.5 ^a
Arlecchino (a)	29.4 \pm 3.2 ^a	42.3 \pm 2.4 ^a	28.6 \pm 2.4 ^a	12.7 \pm 1.4 ^a
Nobile (a)	28.2 \pm 3.0 ^a	33.9 \pm 2.9 ^a	28.5 \pm 2.0 ^a	11.7 \pm 1.2 ^a
Taballo (a)	52.9 \pm 4.1 ^a	62.6 \pm 3.9 ^{c4}	47.6 \pm 3.1 ^a	23.6 \pm 1.8 ^{a2}
Border (a)	47.2 \pm 3.9 ^a	27.9 \pm 2.2 ^a	31.5 \pm 1.8 ^a	12.1 \pm 1.0 ^a
Hierro (a)	40.9 \pm 4.4 ^a	37.0 \pm 2.7 ^a	23.5 \pm 1.4 ^a	15.6 \pm 1.1 ^a
Ca. Scimm (c)	46.6 \pm 4.8 ^a	57.7 \pm 3.1 ^b	50.2 \pm 2.8 ^a	34.8 \pm 2.7 ^a
BHT	63.2 \pm 4.3			

I risultati sono espressi come media \pm S.D. (n= 3). (a) = *C. annuum*. (b) = *C. baccatum*. (c) = *C. chinense*. (ch) = *C. chacoense*. Potere antiossidante di riduzione del ferro (FRAP); BHT è usato come controllo positivo. NA: non attivo. La prima statistica è stata effettuata tra i campioni e il controllo positivo: FRESCO - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 174.5, $R^2 = 0.988$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0$. confrontato col BHT. SECCO - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 155.04, $R^2 = 0.987$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.05$, ^c $p > 0.05$ confrontato col BHT. BOLLITO - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 99.89, $R^2 = 0.980$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$ confrontato col BHT. CONGELATO - One-way ANOVA *** $p < 0.0001$ (F= 151.0, $R^2 = 0.986$) seguito dal test di multicomparazione di Dunnett: ^a $p < 0.01$ confrontato col BHT. Ulteriore metodo statistico, volto all'analisi delle differenze tra le varie processazioni, è stato eseguito tramite il metodo ANOVA a una via seguito dal test post hoc di Bonferroni. I numeri (1-4) denotano una differenza significativa ($P < 0.05$) tra i vari metodi di processazione (1=fresco; 2=secco; 3=bollito; 4=congelato).

Tabella 11: Contenuto carotenoidi totali ($\mu\text{g}/100$ g di estratto)

Nome botanico (specie)	Fresco	Secco	Bollito	Congelato
Y. Cayenne (a)	546.1	41.0	294.4	1190.0
Portafortuna (a)	6991.0	6825.4	2052.3	1565.5
Idealino (a)	4735.3	8625.4	4910.8	1391.9
Sole (a)	3386.8	11112.2	2351.0	936.6
Campana (b)	2036.4	4785.6	572.5	1053.6
Duemila (a)	4806.5	6884.7	5624.0	1291.7
Pellegrino (a)	4378.1	8814.4	3133.3	2130.0
Fantasia (a)	3977.4	5224.4	4495.4	1683.2
Chaco (ch)	2308.1	10015.2	1446.6	702.8
Loco (a)	4312.4	4954.5	3278.6	1869.3
Aji Angelo (b)	2763.1	3388.2	1714.7	1258.9
Effix (a)	2499.8	3882.8	1481.2	1224.0
Acrata (a)	1734.0	2631.4	1422.4	1390.2
O di Giotto (a)	3774.0	9026.0	2752.4	919.2
Arlecchino (a)	3807.7	5934.1	3017.2	1002.4
Nobile (a)	3162.0	8414.7	2231.2	1687.1
Taballo (a)	3139.2	4870.4	484.4	2318.5
Border (a)	5473.9	5642.4	3144.9	1420.7
Hierro (a)	3343.5	3446.2	3233.7	2027.5
Ca. Scimm (c)	146.7	130.2	102.2	377.3

I risultati sono espressi come somma degli otto singoli carotenoidi ottenuti nello studio della bioaccessibilità tramite analisi in HPLC. I valori dei frutti secchi sono il risultato dell'adattamento dei valori presenti in Tabella 7.1 riformulati in base alla perdita d'acqua.

CONCLUSIONI

Le piante del genere *Capsicum* sono fin dai tempi antichi utilizzate in campo alimentare, e, in virtù dei principi attivi che le caratterizzano, stanno acquistando sempre maggiore importanza e interesse in campo farmaceutico e nel settore dei “functional food”.

I frutti di peperoncino sono, infatti, una delle spezie maggiormente apprezzate e utilizzate non solo nell’area mediterranea ma in ogni parte del mondo.

L’obiettivo del lavoro di ricerca è stato lo studio di venti diverse cultivar di frutti di peperoncino, appartenenti a varie specie e aventi differente colore. L’utilizzo dei diversi approcci sperimentali adottati ha cercato di far luce sul profilo chimico, sull’attività biologica e sulla bioaccessibilità di carotenoidi dei peperoncini sottoposti a quattro diversi processi tecnologici, comunemente utilizzati per conservare e cucinare questa spezia.

Nello specifico, l’obiettivo del presente studio è stato quello di analizzare, in venti cultivar di peperoncino appartenenti a specie diverse (*C. annuum*, *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. chacoense*), l’effetto del congelamento (quattro mesi a -20°C), della cottura (dieci minuti a 100°C) e dell’essiccazione (all’aria aperta e al sole per un mese) su:

- bioaccessibilità di otto carotenoidi selezionati come marker;
- contenuto di polifenoli, flavonoidi, capsaicinoidi e carotenoidi;
- attività antiossidante valutata tramite i test del DPPH, ABTS, β -carotene e del FRAP.

La biodisponibilità è, quindi, legata alla bioaccessibilità, ma si riferisce alla frazione di un composto alimentare che dopo essere stato incorporato nelle micelle miste, viene assorbito attraverso le cellule intestinali e diviene disponibile nel sangue per l’utilizzazione dell’organismo. La bioaccessibilità di un costituente alimentare descrive lo step iniziale di incorporazione nelle micelle. La simulazione *in vitro* della digestione umana è comunemente usata come strumento per misurare la bioaccessibilità. La valutazione della bioaccessibilità

di principi funzionali è fondamentale per determinare la potenziale biodisponibilità ed è essenziale nella progettazione di alimenti che rivendicano un beneficio per la salute a causa della presenza d'ingredienti bioattivi.

Il primo obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare l'effetto dei diversi metodi di processazione (congelamento, cottura ed essiccazione) sul contenuto iniziale, sul contenuto micellare e sulla bioaccessibilità dei carotenoidi violaxantina, neoxantina, anteraxantina, luteina, capsantina, zeaxantina, β -criptoxantina e β -carotene.

Peperoncini rossi, arancio e gialli hanno confermato di essere una buona fonte di carotenoidi, ma si è visto che il colore, molto più della specie, ne è indicativo del contenuto. I frutti gialli, infatti, sono molto ricchi di luteina, che è scarsamente presente, invece, nei peperoncini rossi, nei quali abbondano la capsantina, i carotenoidi con azione di pro-vitamina A (β -carotene e β -criptoxantina) e, in misura minore, la zeaxantina.

Dopo digestione il contenuto di carotenoidi nelle micelle diminuisce notevolmente, particolarmente nei peperoncini essiccati al sole.

E' noto che il trasferimento dei carotenoidi nelle micelle è inversamente proporzionale all'idrofobicità del carotenoide.

La lipofilia della β -carotene ha, infatti, influenzato negativamente la sua incorporazione nelle micelle, mentre capsantina, zeaxantina e luteina hanno mostrato una maggiore bioaccessibilità.

Sono state riscontrate differenze nel contenuto e nella bioaccessibilità dei carotenoidi nei frutti sottoposti ai vari metodi di processazione. Generalmente la bollitura e il congelamento, diminuiscono il contenuto di carotenoidi. Nei frutti secchi, invece, la quantità di carotenoidi è stata generalmente superiore a quello riscontrato nei peperoncini freschi, bolliti e congelati.

La quantità effettiva di carotenoidi incorporato nelle micelle è, però, un fattore predittivo più accurato del potenziale di assorbimento dei carotenoidi. Dallo studio si evince che la bioaccessibilità media di ogni carotenoide analizzato è

aumentata dopo congelamento o bollitura, quindi, nonostante la diminuzione del contenuto dei carotenoidi dopo congelamento e cottura, il contenuto micellare non era significativamente più basso rispetto a quello dei peperoncini freschi e conseguentemente i valori di bioaccessibilità dei carotenoidi dei peperoncini processati sono risultati spesso simili o, più spesso, leggermente superiori a quelli non processati, equilibrando, in questo modo, la perdita di carotenoidi inizialmente provocata dalla processazione. Discorso diverso per i frutti essiccati, i quali, partendo da un contenuto nettamente più elevato nel frutto non digerito, hanno evidenziato, nonostante la drastica diminuzione di carotenoidi dopo digestione, un ottimo contenuto micellare di pigmenti.

Il secondo obiettivo della ricerca è stato quello di investigare la possibile influenza dei diversi processi tecnologici applicati ai peperoncini sulle proprietà antiossidanti e sul profilo fitochimico delle ventidue differenti varietà di peperoncino.

Tramite i diversi approcci tecnologici adottati e grazie alle metodologie di studio applicate, è possibile concludere che i peperoncini secchi, seguiti da quelli freschi hanno il più alto contenuto di capsaicinoidi, polifenoli, flavonoidi e carotenoidi, dimostrando che le operazioni di congelamento e cottura influiscono negativamente sul contenuto di questi principi attivi.

Dalla valutazione dell'attività antiossidante effettuata non sembra però esserci una diretta correlazione tra l'abilità antiossidante e la quantità di fitocomposti contenuti nei peperoncini. Le singole classi di composti sono debolmente associate con la capacità antiossidante rivelata, suggerendo che l'espressione dell'attività antiossidante degli estratti di peperoncino potrebbe essere piuttosto una conseguenza del sinergismo tra vari composti fenolici, o altre molecole qui non quantificate, e non semplicemente attribuibile a composti di una specifica classe chimica. Questi risultati, peraltro, sono in accordo con quanto riportato in letteratura su altri vegetali.

Concludendo, è possibile affermare che i frutti di peperoncino, siano essi appartenenti a diverse specie o cultivar, sono un'ottima fonte carotenoidi, polifenoli e capsaicinoidi sia se assunti freschi sia dopo processazione, che comunque ne limita in una certa misura il contenuto.

Maggiori ricerche aiuteranno a confermare i risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi e ad acquisire maggiori conoscenze sugli effetti dei metodi di processazione su contenuto, attività antiossidante e bioaccessibilità dei principi attivi presenti nei peperoncini. Le conoscenze messe in evidenza con questo lavoro contribuiranno a far luce sulle proprietà salutistiche degli alimenti di origine vegetale, tenendo presente che negli studi in cui non si misura la biodisponibilità dei principi funzionali, il significato dell'impatto sulla salute sarà limitato.