



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II  
FACOLTÀ DI FARMACIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN AZIENDA IN  
IN  
"SCIENZA DEL FARMACO"  
XXVII CICLO**

**Potenziale nutraceutico della frazione polifenolica  
di *Cynara Scolymus***

Tutor  
Ch.mo Prof.re  
Ritieni Alberto

Dott.ssa  
Daniela Giannetti

## Indice

<b>Introduzione .....</b>	<b>pag . 7</b>
<b>Capitolo 1</b>	
<i>Cynara Scolymus</i> .....	pag. 12
<b>Capitolo 2</b>	
<b>I polifenoli.....</b>	<b>pag. 22</b>
<b>Capitolo 3</b>	
<b>Materiali e Metodi .....</b>	<b>pag. 33</b>
<b>Capitolo 4</b>	
<b>Risultati e Discussione .....</b>	<b>pag. 44</b>
<b>Conclusioni .....</b>	<b>pag. 79</b>
<b>Referenze .....</b>	<b>pag. 81</b>

## Sommario

E' stato studiato il potere nutraceutico di *Cynara Scolymus* attraverso la valutazione del profilo qualitativo e quantitativo dei metaboliti secondari, studi di bioaccessibilità in vitro della componente polifenolica bioattiva e test cellulari in vitro per valutare effetti su parametri metabolici. Sono state considerate due parti della pianta: il capolino ed il gambo. Il confronto tra cinque diversi genotipi di carciofo ha mostrato un profilo metabolomico simile, ma ha evidenziato una ricchezza maggiore del gambo rispetto al capolino corrispondente di ogni genotipo, confermata poi dai test sull'attività antiossidante. Dagli studi di bioaccessibilità in vitro è emerso che il processo di cottura al microonde innalza il contenuto polifenolico della matrice vegetale di partenza (+175,5 %), e che i polifenoli risultano poco bioaccessibili (17% in media) a causa della sensibilità alle condizioni di digestione gastrica. I test cellulari in vitro, su cellule HepG2 mostrano che il capolino cotto di carciofo è il più attivo nell'inibire l'up-take di glucosio cellulare (+17 volte la sua quota extracellulare rispetto al controllo). Inoltre, esso è in grado di agire sul metabolismo lipidico, riducendo l'assorbimento cellulare dei trigliceridi (+109 volte il contenuto extracellulare rispetto al controllo), mediante inibizione dell'attività della lipasi pancreatica (-60% rispetto al controllo); inibendo l'up-take del colesterolo (+53 volte la sua quota extracellulare rispetto al controllo); aumentando l'assorbimento cellulare delle LDL (-75% del contenuto extracellulare rispetto al controllo); aumentando l'espressione della ApoA1 (+1400% rispetto al controllo). Infine, l'estratto polifenolico del capolino cotto svolge un'azione protettiva sulle cellule, mediante aumento della loro proliferazione (+76% rispetto al controllo), riduzione delle specie reattive dell'azoto (TBARS) (-68% rispetto al controllo) e aumento dell'ossido nitrico (NO) extracellulare (+866.6% rispetto al controllo). I nostri risultati vogliono essere d'aiuto alle industrie produttrici di integratori alimentari, suggerendo l'applicazione di stress termici alle matrici di partenza al fine di

aumentarne il contenuto di molecole bioattive; suggeriscono la formulazione dell'estratto di *Cynara Scolymus* in compresse o capsule gastroresistenti per preservarne la quota polifenolica; propongono l'utilizzo del gambo come matrice di partenza, in quanto fonte ricca di metaboliti bioattivi; e incoraggiano l'utilizzo di formulazioni farmaceutiche a base di *Cynara Scolymus* per il trattamento di diverse patologie metaboliche. Ovviamente, ulteriori studi in vivo e clinici sono necessari per confermare tali proprietà salutistiche.

## Introduzione

La “Nutraceutica”, parola che nasce dalla crasi di nutrizione e farmaceutica, è una disciplina che indaga tutti i componenti degli alimenti con proprietà salutistiche per l’uomo, in termini di prevenzione e trattamento delle malattie. “Lasciate che il cibo sia la vostra medicina e la vostra medicina sia il cibo”, diceva Ippocrate, e in effetti, l'utilizzo del cibo come medicina risale all'alba dei tempi. Che una corretta alimentazione sia in grado di prevenire le malattie o di accelerarne il decorso grazie alle proprietà di alcuni alimenti cosiddetti “funzionali” era cosa nota non solo ai greci ma anche a sumeri, cinesi, egiziani e indiani che, in modo particolare, dedicano a questo tema molto spazio nella loro medicina tradizionale ayurvedica. Il termine “nutraceutica” viene coniato solo alla fine degli anni Ottanta da Stephen De Felice, ricercatore americano fondatore e presidente di FIM (Foundation for Innovation in Medicine). Con il tempo si è sviluppato il mercato dei prodotti "nutraceutici", ossia sostanze derivate da piante, alimenti e fonti microbiche che, per le loro proprietà funzionali, si allineano appunto al limite tra l'alimento ed il farmaco. Ci sono tre possibili modalità di assunzione: con il cibo che li contiene naturalmente, con il cibo arricchito e potenziato con il nutraceutico in questione, o tramite integratori alimentari. La modalità più corretta varia di volta in volta.

L’importanza e lo stretto legame del binomio “alimentazione e buona salute” è sottolineata dall’Organizzazione mondiale della sanità (OMS) che considera nutrizione adeguata e salute diritti umani fondamentali. Una dieta ricca di nutraceutici è utile per aumentare le aspettative di vita, per contrastare l’invecchiamento, per prevenire le malattie croniche e in generale per migliorare lo stato di salute e rafforzare le difese immunitarie. I nutraceutici più importanti sono:

- i probiotici (latticini e yogurt);

- gli antiossidanti (bacche di Goji, kiwi, tè verde, frutti rossi e bacche di acai);
- gli acidi grassi poli-insaturi: omega 3 (olio di lino e di semi di canapa, semi di chia, noci, pesce e crostacei); omega 6 (noci, pane integrale, olio di semi di canapa e di lino, cereali e semi di canapa);
- le vitamine;
- i complessi enzimatici;

ed è possibile trovarli soprattutto in alimenti di origine vegetale, quindi frutta e verdura, ma anche sotto forma di integratori alimentari.

Il Fondo mondiale per la ricerca sul cancro (World Cancer Research Fund) ha concluso nel 2007 un'opera ciclopica di revisione di tutti gli studi scientifici sul rapporto tra alimentazione e tumori a cui hanno collaborato oltre 150 ricercatori, epidemiologi e biologi provenienti dai centri di ricerca più prestigiosi del mondo. Ne è nato un decalogo, che viene regolarmente aggiornato.

Addirittura un'analisi della letteratura scientifica di qualche anno fa (Da Vanzo et al., 2006), ha messo in evidenza come pochi integratori chiave potrebbero prevenire molte malattie croniche e far risparmiare miliardi di dollari in pochi anni. Lo studio ha preso in considerazione solo integratori basilari usati per scopi tradizionali:

- Calcio e vitamina D contro l'osteoporosi;
- Acido folico per la prevenzione dei difetti del tubo neurale;
- Omega-3 per ridurre il rischio cardiovascolare;
- Luteina e zeaxantina per prevenire la degenerazione maculare.

Sono stati presi in considerazione solo gli studi che rispettavano i seguenti criteri:

- l'integratore deve produrre un effetto fisiologico misurabile;
- l'effetto fisiologico deve corrispondere ad un cambiamento della condizione di salute;

- il cambiamento dello stato di salute deve corrispondere ad una diminuita spesa sanitaria.

I risultati sono stati davvero interessanti. Lo studio del Lewin Group stima che l'uso di calcio e vitamina D potrebbe prevenire oltre 776.000 ospedalizzazioni per frattura dell'anca in 5 anni, con un risparmio di 16.1 miliardi di dollari. Invece, l'uso di omega-3 per prevenire aritmie cardiache, ridurre l'infiammazione, abbassare il colesterolo e la pressione potrebbe prevenire 374.000 ospedalizzazioni, riducendo i costi di 3.2 miliardi di dollari in 5 anni. L'uso di luteina e zeaxantina potrebbe invece aiutare 190.000 persone ad evitare l'assistenza per cecità, comportando costi ridotti per 3.6 miliardi di dollari. Infine 44 milioni di donne negli USA non assumono acido folico durante la gravidanza; se solo 11.3 milioni di esse lo assumesse ci sarebbero 600 neonati in meno con difetti del tubo neurale, con un risparmio di 1.4 miliardi di dollari. Se si sommano questi dati si arriva alla conclusione che spendendo qualche soldo in più al giorno, in 5 anni si otterrebbero 24 miliardi di costi sanitari in meno. Questi sono dati americani ma quelli per l'Europa e l'Italia non si discosterebbero di molto.

E' proprio in questo ambito che si colloca il mio progetto di ricerca, ponendosi l'obiettivo della valutazione del potenziale nutraceutico della pianta *Cynara Scolymus*, come possibile fonte di metaboliti bioattivi da utilizzare nella formulazione di integratori alimentari con specifiche indicazioni terapeutiche.

Il carciofo (*Cynara scolymus*) è una pianta appartenente alla famiglia delle Asteraceae, originaria della Sicilia. La produzione mondiale di carciofo avviene per oltre il 60% nei paesi del Mediterraneo, l'Italia tiene il record del mondo (Llorach et al., 2002). La parte commestibile, il capolino, è ampiamente consumata in tutto il mondo, cruda o bollita, non solo in quanto alimento gustoso ma anche per le sue proprietà salutari note. Il carciofo è ricco, infatti, di fibre naturali, minerali, vitamine e ha un basso contenuto di lipidi e

glicidi disponibili rispetto ad altri ortaggi e verdure (Lutz et al., 2011). E 'anche ricco di composti polifenolici, in particolare gli acidi caffeilchinici e flavonoidi, principali responsabili delle sue proprietà benefiche (Lutz et al., 2011). Le sue proprietà antiossidante, antitumorale, antigenotossica, ipocolesterolemizzante, epatoprotettiva, bile-espellente, diuretica, antinfiammatoria, antimicotica, anti-HIV e antibatterica sono ben note (Pereira et al., 2013; Rodriguez de Sotillo et al., 2002; Funakoshi-Tago et al., 2011; Adzet et al., 1987; Wan et al., 2013).

Dato che continuamente sono richieste dai rivenditori e dalle industrie di trasformazione nuove selezioni di cultivar di carciofo con specifiche caratteristiche fisiche, fisiologiche e biochimiche al fine di commercializzare i carciofi come prodotti freschi o di IV gamma, il progetto di ricerca è partito con il confronto e la valutazione delle proprietà nutrizionali e nutraceutiche di cinque diversi genotipi di *Cynara Scolymus*. Le analisi sono state condotte sia sulla classica parte edibile del carciofo, il capolino, che sulla parte di "scarto" alimentare, il gambo. In collaborazione con l'industria Semiorto Sementi s.r.l., con sede a Sarno (Salerno), è stato possibile ottenere tre ibridi F1 di produzione aziendale, il Romolo F1, il Violet F1 e l'Istar F1, e due varietà coltivate localmente e presenti sul mercato ortofrutticolo, il Catanese e il Capuanella. A tale scopo è stata eseguita un'analisi qualitativa e quantitativa dei metaboliti secondari presenti nei diversi campioni.

La tecnica più diffusa per la caratterizzazione metabolomica di substrati vegetali è generalmente la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata alla spettrometria di massa (MS) (Rijke et al., 2006). Molti metodi HPLC sono stati applicati all'analisi di flavonoidi del carciofo (Schutz et al., 2004), la separazione viene di solito effettuata su convenzionali colonne C-18, mentre l'identificazione degli analiti si ottiene tramite un rivelatore a serie di diodi (DAD), a causa della loro forte assorbimento nella regione compresa tra 280 e 350 nm, e tramite MS. Il nostro studio del profilo

metabolomico si è invece servito della cromatografia liquida ad ultra alta prestazione (UHPLC) che ha aperto nuove possibilità per l'analisi di matrici naturali complesse, e possiede diversi vantaggi rispetto alle tecniche HPLC tradizionali, soprattutto in termini di velocità e risoluzione, e solo di recente è stato applicato per l'analisi di matrici alimentari (Abu-Reidah et al., 2013). Inoltre, la spettrometria di massa tandem (MS-MS) e la spettrometria di massa ad alta risoluzione sono particolarmente utili per l'identificazione di composti noti e sconosciuti (Gonzales et al., 2014; Sommella et al., 2013).

Accanto alla delineazione del pattern polifenolico, è stata valutata l'attività antiossidante dei diversi campioni, tramite due differenti test, il DPPH ed il FRAP test, che mostrano l'attività antiradicalica e ferro-riducente, rispettivamente.

Lo studio della bioaccessibilità dei composti polifenolici si rende necessario nell'ambito di matrici destinate alla produzione di formulazioni farmaceutiche. Test di digestione gastro-intestinale (GI) simulata in vitro sono stati eseguiti su un solo genotipo di carciofo, il Violet F1, selezionato in base alla completezza del profilo metabolomico, di modo che potesse rappresentare un riferimento per quello che avviene anche negli altri campioni.

Infine, per la completezza dell'analisi del potere nutraceutico del carciofo, sono stati effettuati test cellulari in vitro, per valutare potenziali attività ipoglicemizzante, ipotrigliceridemizzante, ipocolesterolemizzante e protettiva delle cellule contro lo stress ossidativo.

## CAPITOLO 1

### *Cynara Scolymus*

#### **Storia e origine**

Il carciofo (*Cynara scolymus* L.) è una pianta della famiglia Asteraceae coltivata in Italia e in altri Paesi per uso alimentare e, secondariamente, medicinale. Documentazioni storiche, linguistiche e molecolari sembrano indicare che la domesticazione del carciofo (*Cynara scolymus*) dal suo progenitore selvatico (*Cynara cardunculus*) possa essere avvenuta in Sicilia, a partire dal I secolo circa. Proprio in orti familiari della Sicilia centro-occidentale (nei dintorni di Mazzarino) ancora oggi si conserva un'antica cultivar che, sotto il profilo morfo-biologico e molecolare, sembrerebbe una forma di transizione tra il cardo selvatico ed alcune delle varietà di carciofo di più ampia diffusione.

La pianta chiamata *Cynara* era già conosciuta dai greci e dai romani, ma sicuramente si trattava di selvatico. A quanto sembra le si attribuivano poteri afrodisiaci, e prende il nome da una ragazza sedotta da Giove e quindi trasformata da questi in carciofo.

Nel secolo XV il carciofo era già consumato in Italia. Venuto dalla Sicilia, appare in Toscana verso il 1466.

La tradizione dice che fu introdotto in Francia da Caterina de' Medici, la quale gustava volentieri i cuori di carciofo. Sarebbe stata costei che lo portò dall'Italia alla Francia quando si sposò con il re Enrico II di Francia. Luigi XIV era pure un gran consumatore di carciofi.

Gli olandesi introdussero i carciofi in Inghilterra: abbiamo notizie che nel 1530 venivano coltivati nel Newhall nell'orto di Enrico VIII.

I colonizzatori spagnoli e francesi dell'America introdussero il carciofo in questo continente nel secolo XVIII, rispettivamente in California e in Louisiana. Oggi in

California i cardi sono diventati un'autentica piaga, esempio tipico di specie aliena invasiva in un habitat in cui non si trovava precedentemente.

### **Descrizione**

Il carciofo è una pianta erbacea perenne alta fino a 1,5 metri, provvista di un rizoma sotterraneo dalle cui gemme si sviluppano più fusti, che all'epoca della fioritura si sviluppano in altezza con una ramificazione dicotomica. Il fusto, come in tutte le piante "a rosetta", è molto raccorciato (2-4cm), mentre lo stelo florale è robusto, cilindrico e carnoso, striato longitudinalmente.

Le foglie presentano uno spiccato polimorfismo anche nell'ambito della stessa pianta (eterofillia). Sono grandi (fino a circa 1,5 m in alcune cultivar da seme), oblungo-lanceolate, con lamina intera nelle piante giovani e in quelle prossime ai capolini, pennatosetta e più o meno incisa in quelle basali. La forma della lamina fogliare è influenzata anche dalla posizione della gemma da cui si sviluppa la pianta. La superficie della lamina è verde lucida o verde-grigiastra sulla pagina superiore, mentre nella pagina inferiore è verde-cinerea per la presenza di una fitta tomentosità. Le estremità delle lacinie fogliari possono essere spinose in alcune varietà (Spinoso di Palermo, Spinoso Sardo).

I fiori sono riuniti in un capolino (detto anche *calatide*) (Fig. 1) di forma sferoidale, conica o cilindrica e di 5–15 cm di diametro, con un ricettacolo carnoso e concavo nella parte superiore. Sul ricettacolo sono inseriti i fiori (flosculi), tutti con corolla tubulosa e azzurro-violacea e calice trasformato in un pappo setoloso, utile alla dispersione degli acheni tramite il vento (disseminazione anemocora). Nel capolino immaturo l'infiorescenza vera e propria è protetta da una serie di brattee involucri strettamente embricate, con apice inerme, mucronato o spinoso, a seconda della varietà. Fiori e setole sono ridotti ad una corta peluria che si sviluppa con il procedere della fioritura. In piena fioritura le brattee

divergono e lasciano emergere i fiori. La parte edule del carciofo è rappresentata dalla base delle brattee e dal ricettacolo, quest'ultimo comunemente chiamato *cuore*. In Sardegna è molto richiesta anche la parte terminale dello scapo florale dalla terzultima o penultima foglia.



Fig. 1: Capolino di carciofo in piena fioritura

Il frutto è un achenio (spesso chiamato erroneamente "seme") allungato e di sezione quadrangolare, provvisto di pappo. Il colore varia dal marrone più o meno scuro al grigio con marmorizzazioni brune.

In questa specie sono stati identificati, con l'ausilio di marcatori molecolari (AFLP, microsatelliti e transposon display), tre differenti taxa:

- *C. cardunculus* L. var. *sylvestris* Lam. (cardo o carciofo selvatico) abbondantemente diffusa allo stato spontaneo nel bacino del mediterraneo centro-occidentale;
- *C. cardunculus* L. var. *atilis* DC. (cardo coltivato o cardo domestico);
- *C. cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori (carciofo).

Le varietà di carciofo sono classificate secondo diversi criteri. I principali sono i seguenti:

- In base alla presenza e allo sviluppo delle spine si distingue fra varietà *spinose* e *inermi*. Le prime hanno capolini con brattee terminati con una spina più o meno robusta, le inermi hanno invece brattee mutiche o mucronate.
- In base al colore del capolino si distingue fra varietà *violette* e *verdi*.
- In base al comportamento nel ciclo fenologico si distingue fra varietà *autunnali* o rifiorenti e varietà *primaverili* o unifere. Le prime si prestano alla forzatura in quanto possono produrre capolini nel periodo autunnale e una coda di produzione nel periodo primaverile. Le seconde sono adatte alla coltura non forzata in quanto producono capolini solo dopo la fine dell'inverno.

Fra le varietà più famose si annoverano il *Brindisino*, il "*Paestum*" (carciofo IGP proveniente dall'omonima città della magna Grecia di Capaccio-Paestum) *Spinoso sardo* (coltivato anche in Liguria con il nome di *Carciofo spinoso d'Albenga*), il *Catanese*, il *Verde di Palermo*, la *Mammola verde*, il *Romanesco*, il *Mazzaferrata di Cupello*, il *Violetto di Toscana*, il *Precoce di Chioggia*, il *Violetto di Provenza*, il *Violetto di Niscemi*.

Le varietà di maggiore diffusione in passato erano il *Catanese*, lo *Spinoso sardo* e il *Violetto di Provenza*, fra i tipi autunnali forzati, e il *Romanesco* e il *Violetto di Toscana* fra quelli primaverili non forzati. Lo *Spinoso sardo*, una delle varietà più apprezzate nel mercato locale e in alcuni mercati dell'Italia settentrionale ha subito un drastico ridimensionamento dagli anni novanta a causa della ridotta pezzatura media dei capolini e della minore capacità produttiva rispetto ad altre cultivar (*Tema*, *Terom*, *Macau*, ecc.).

## **Coltivazione**

La produzione mondiale del carciofo, secondo la FAO, nel 2011 è stata superiore a 1,5 milioni di tonnellate, di cui oltre il 60% nell'area mediterranea. Di fatto i carciofi si coltivano soprattutto in Italia, Egitto e Spagna. Negli Stati Uniti d'America la maggior

produzione di carciofi si ha nello Stato della California, e all'interno della California la contea di Monterey concentra più dell'80% del totale. Da qualche anno, a causa di un'epidemia degli asparagi, nelle terre nuove del progetto Chavimochic del Perù si cominciò a coltivare il carciofo con il fine di esportarlo ai paesi europei, facendo del Perù il quarto produttore mondiale.

L'Italia detiene il primato mondiale nella produzione di questo ortaggio (pari a circa il 30%). Le zone di maggiore produzione sono la Sicilia (Piana di Gela e Piana di Catania), Sardegna e Puglia.

### **Ciclo fenologico e propagazione**

Il carciofo è una tipica pianta degli ambienti mediterranei. Il suo ciclo naturale è autunno-primaverile: alle prime piogge autunnali le gemme del rizoma si risvegliano ed emettono nuovi getti. I primi capolini sono emessi verso la fine dell'inverno, a partire dal mese di febbraio. In tarda primavera la pianta va in riposo con il disseccamento di tutta la parte aerea.

Nelle zone più calde delle regioni mediterranee il carciofo viene coltivato con una tecnica di forzatura che ha lo scopo di anticipare al periodo autunnale la produzione di capolini. La tecnica consiste nel forzare il risveglio nel corso dell'estate: dai rizomi di una coltura precedente si prelevano le gemme, dette ovuli, e dopo una fase di pregermogliamento sono messi a dimora dalla seconda metà di giugno in poi, facendo seguire un'irrigazione copiosa. In questo modo l'attività vegetativa ha inizio in piena estate, con differenziazione a fiore nel mese di settembre e produzione dei capolini di primo taglio nei mesi di ottobre e novembre.

La forzatura del carciofo produce risultati solo nelle *cultivar* riflorenti, e in ogni modo è causa di situazioni di stress biologico che deprimono la longevità della carciofaia.

Per questo motivo le carciofaie forzate sono condotte in coltura annuale, biennale o triennale. Dopo il secondo o terzo anno la percentuale di diradamento è tale da rendere economicamente più vantaggioso il reimpianto della carciofaia.

Il carciofo si può propagare sia per via sessuata, con la riproduzione da seme, sia per via vegetativa sfruttando la sua naturale predisposizione ad emettere nuove piante dalle gemme del rizoma. La riproduzione da seme, pur essendo tecnicamente attuabile, non ha alcuna utilità pratica per le cultivar italiane: a causa del forte grado di eterozigosi delle nostre varietà, le piante nate da seme avrebbero caratteri completamente diversi ed eterogenei rispetto allo standard varietale. La propagazione vegetativa tradizionale segue metodi diversi secondo il tipo di ciclo colturale, ma si riconducono a due tipi: la propagazione per ovoli e quella per carducci.

Gli ovoli sono porzioni di rizoma ingrossate provviste di una o più gemme. La propagazione per ovoli si pratica con il prelievo, all'inizio dell'estate, dei rizomi dalle vecchie carciofaie. Da questi vengono separati gli ovoli, messi a pregermogliare per uno o due giorni e poi messi a dimora in un periodo che va dalla seconda metà di giugno fino agli inizi di agosto. L'epoca di "semina" è correlata all'epoca del raccolto del primo taglio.

I carducci sono i polloni basali emessi dal rizoma delle piante di oltre un anno d'età nelle prime fasi vegetative. Fra le operazioni colturali che si praticano durante la fase vegetativa è prevista la scarducciatura, ossia il diradamento della coltura con l'eliminazione dei polloni in quanto sottraggono risorse nutritive alla pianta a scapito delle rese qualitative della produzione. I polloni asportati possono essere messi a dimora in autunno per impiantare una carciofaia poliennale che darà la prima produzione al secondo anno d'impianto.

Le colture ottenute da ovoli iniziano il loro ciclo in piena estate e sono pertanto in grado di produrre capolini già nell'autunno successivo o nella primavera successiva.

Questa tecnica di propagazione è pertanto utilizzata per le varietà autunnali o rifiorenti in coltura forzata. Le colture ottenute da carducci iniziano il loro ciclo in autunno inoltrato e poiché la pianta non riesce ad acquisire una sufficiente vigoria l'impianto è finalizzato a dare la prima produzione al secondo anno. Questa tecnica si adotta pertanto per le varietà primaverili in coltura non forzata.

La propagazione vegetativa ha il pregio di trasmettere il genotipo delle piante madri alle piante propagate, permettendo il mantenimento dello standard varietale. Ha però lo svantaggio di trasmettere le virosi accumulate, che sono una delle principali cause che riducono la longevità di una carciofaia. Per migliorare lo stato fitosanitario delle colture si può ricorrere a piante ottenute da micropropagazione. Questa tecnica consiste in una moltiplicazione *in vitro* con l'espianto dei meristemi apicali dagli apici vegetativi delle piante. I meristemi prelevati, detti espianti, essendo composti da cellule embrionali possono rigenerare un'intera pianta se opportunamente trattati (coltivazione *in vitro* su substrati nutritivi in cella climatica).

Il principio su cui si basa la micropropagazione risiede nel fatto che le cellule vegetali embrionali, essendo in fase di moltiplicazione, non sono infettate dai virus, pertanto le piante micropropagate sono risanate, ossia esenti da virus. In realtà la sicurezza del risanamento dipende dall'età delle cellule prelevate: le cellule effettivamente sane sono quelle del cono vegetativo, che rappresentano una porzione minima del meristema apicale, mentre all'aumentare della distanza dall'apice meristemico aumenta la probabilità che la cellula sia infettata dai virus. Con espianti di dimensioni ridotte aumenta la percentuale di risanamento delle piante micropropagate, per contro si riduce la percentuale di attecchimento. Un congruo compromesso si raggiunge prelevando espianti di dimensioni dell'ordine di mezzo millimetro.

Le colture ottenute da piante micropropagate presentano, almeno nei primi anni, un migliore stato fitosanitario che si manifesta con una maggiore vigoria e, di riflesso, una più elevata produttività. La micropropagazione presenta per contro degli svantaggi:

- Le colture micropropagate sono più suscettibili alle avversità ambientali, pertanto il mantenimento dello stato fitosanitario richiede cure colturali più attente.
- La micropropagazione è una tecnica costosa perché la prima fase richiede l'impiego di attrezzature di laboratorio e tecnici altamente specializzati. Il materiale micropropagato pertanto è molto più costoso di quello tradizionalmente usato, che in sostanza è materiale di scarto il cui costo è essenzialmente legato alla manodopera richiesta per il prelievo.
- Le piante micropropagate danno produzioni qualitativamente differenti da quelle micropropagate quando allo standard varietale contribuisce la base genetica dei virus latenti integrati nel DNA dell'ospite. Questo fenomeno si è riscontrato ad esempio nello Spinoso sardo, che con la micropropagazione perde in modo significativo parte delle proprietà organolettiche.

### **Proprietà salutistiche del carciofo**

Il carciofo è un alimento ricco di fibre naturali, minerali, vitamine e ha un basso contenuto di lipidi e glicidi disponibili rispetto ad altri ortaggi e verdure (Lutz et al., 2011).

Le proprietà salutistiche del carciofo sono legate alla sua composizione chimica, costituita da elevate quantità di composti polifenolici e inulina. I derivati dell'acido caffeico, gli acidi caffeilchinici, sono i principali acidi fenolici presenti nelle porzioni edibili e non del carciofo, con l'acido clorogenico (Acido 5-O-caffeilchinico) come capostipite di questi derivati. Altri composti fenolici sono stati poi identificati nei tessuti di carciofo: i flavonoidi, apigenina e luteolina (presenti come glucosidi e rutinosidi) sono i

principali esponenti della categoria, e diversi derivati caffeilglucosidici della cianidina (Lattanzaio et al., 2009). Sono ben note le proprietà antiossidanti, antitumorali, antigenotossiche, ipocolesterolemizzanti, epatoprotettive, bile-espellente, diuretiche, antinfiammatorie, antimicotiche, anti-HIV, e antibatteriche di questi metaboliti secondari (Pereira et al., 2013; Rodriguez de Sotillo et al., 2002; Funakoshi-Tago et al., 2011; Adzet et al., 1987; Wan et al., 2013).

Inoltre, il carciofo, come altri membri della famiglia delle Asteraceae, sintetizza e accumula inulina nei suoi organi di riserva. L'inulina appartiene ad un gruppo di polisaccaridi chiamati fruttani, che non vengono digeriti nell'intestino tenue dell'uomo a causa della mancanza degli enzimi necessari all'idrolisi di queste molecole. Il recente interesse per l' inulina è dovuto alla pubblicazione di dati scientifici che dimostrando come questa molecola sia in grado di influenzare positivamente la composizione della microflora intestinale, ed in particolare vi sono indicazioni di effetti benefici sull'assorbimento minerale, sulla composizione lipidica del sangue, e addirittura su un effetto di prevenzione di cancro al colon. Inoltre, l'inulina è una fibra a basso contenuto calorico e si presenta quindi come potenziale ingrediente per la produzione di alimenti magri (Lattanzaio et al., 2009).

### **Attuale utilizzo della pianta di *Cynara Scolymus***

Il carciofo è una pianta davvero “generosa” di cui si può utilizzare praticamente tutto: dai capolini freschi, utilizzati in ambito agroalimentare, ai carducci o alle foglie fresche e secche, per la produzione di biomassa e di foraggio destinato all'alimentazione del bestiame, per finire con le foglie e le radici, utilizzati in farmacologia e nell'industria dei liquori (aperitivi e digestivi) come fonte di metaboliti bioattivi.

In farmacia ed erboristeria, infatti, sono ormai facilmente reperibili preparazioni omeopatiche e integratori alimentari a base di estratto polifenolico di carciofo, utilizzati per le sue proprietà coleretica, epatoprotettiva e diuretica. Per la presenza di orto-difenoli e di lattoni sequiterpenici, questa pianta è annoverata tra gli amari, dotata di funzioni eupeptiche e stomachiche.

Gli scarti della lavorazione del carciofo sono tuttavia elevati; essi rappresentano circa il 70-80% rispetto al prodotto iniziale, ma rappresentano ancora una fonte importante di metaboliti bioattivi. In questo senso, infatti, negli ultimi anni si sta pensando molto a politiche che incentivino il riutilizzo di questi scarti, ad esempio per usi di tipo non alimentare.

## CAPITOLO 2

### I polifenoli

#### **Biosintesi e classificazione**

I polifenoli sono una famiglia numerosa ed eterogenea di sostanze organiche naturali polimeriche; tra essi sono presenti molecole lipofile, acidi carbossilici, glucosidi solubili in acqua e grandi polimeri insolubili. Questi composti sono metaboliti secondari delle piante che entrano a far parte di numerosi processi (riproduzione, crescita, difesa da raggi ultravioletti) e conferiscono resistenza contro patogeni e predatori e sono responsabili della colorazione di molti fiori e frutti. Essi, inoltre, hanno proprietà antibatteriche, antiossidanti, antinfiammatorie e antitumorali. La biosintesi di questi composti all'interno della pianta è frutto di numerose reazioni catalizzate da enzimi, che sono finemente regolati da moltissimi fattori esogeni (luce, temperatura, disponibilità idrica, patogeni) ed endogeni (ormoni). La biosintesi parte da due metaboliti primari che derivano dalla via dei pentosi fosfato e dalla glicolisi, rispettivamente l'eritrosio-3-fosfato ed il fosfoenolpiruvato. Mediante la via dell'acido shikimico questi composti vanno a formare l'acido corismico che è il precursore della sintesi degli amminoacidi aromatici fenilalanina, triptofano e tirosina. La fenilalanina rappresenta il precursore di tutti i composti fenolici sintetizzati dalle piante. Attraverso la via dei fenil-propanoidi, infatti, questo amminoacido viene convertito prima ad acido cinnamico, e successivamente ad acido cumarico, da cui parte la sintesi della lignina e dei flavonoidi. Mediante l'intervento di una Cumaroil-CoA sintasi, l'acido cumarico si può legare ad una molecola di acetil-CoA per formare una molecola di para-cumaroil-CoA. Questa molecola reagisce a sua volta con tre molecole di malonil-CoA attraverso l'azione dell'enzima calcione sintasi (CHS). L'intervento di quest'ultimo enzima, porta alla sintesi della naringenina, il primo

composto della via biosintetica con la struttura flavonoide, in cui un atomo d'ossigeno chiude l'anello centrale della molecola. Dall'acido trans-cinnamico si formano gli acidi benzoici ed i tannini semplici (o idrolizzabili). L'acido cumarico, invece, può essere convertito negli acidi idrossicinnamici. L'acido cumarico ottenuto a partire dalla fenilalanina può proseguire lungo la via biosintetica senza essere trasformato in acidi cinnamici. Mediante l'intervento di una Cumaroil-CoA sintasi si può legare ad una molecola di acetil-CoA per formare una molecola di para-cumaroil-CoA. Questa molecola reagisce a sua volta con tre molecole di malonil-CoA attraverso l'azione di due diversi enzimi: la stilbene sintasi (SS) e formare gli stilbeni, un'altra classe di polifenoli. I polifenoli, sono stati divisi in 10 classi generali in funzione del numero di anelli fenolici che essi contengono e degli elementi strutturali che legano questi anelli gli uni agli altri.

### **I polifenoli di *Cynara Scolymus***

I polifenoli del carciofo sono principalmente acidi fenolici, derivati idrossibenzoici ed idrossicinnamici; flavonoidi, derivati flavonoli, flavoni e flavanoni; lignani. I flavonoidi rappresentano circa il 3,5% dei polifenoli totali sull'intero ortaggio, mentre il 95% dei polifenoli è costituito dagli acidi fenolici.

Acidi fenolici: sono costituiti da uno o più gruppi fenolici e metossilici e da un gruppo carbossilico. Comprendono due classi: quelli derivanti dall'acido benzoico (Acidi Idrossibenzoici) e quelli derivanti dall'acido cinnamico (Acidi Idrossicinnamici).

Tra gli acidi idrossicinnamici, il carciofo accumula vari depsidi dell'acido caffeico, che sono isomeri posizionali di esteri degli acidi caffeico e chinico. Alla formazione di questi esteri possono concorrere due meccanismi diversi, uno che coinvolge l'enzima idrossicinnamoil-CoA tioestere e l'altro l'1-O-(acido idrossicinnamico) acil-glucoside (Barz et al., 1985; Strack et al., 1987).

Per quanto concerne la localizzazione sub-cellulare dei derivati caffeilchinici, è stata dimostrata una stretta compartimentalizzazione nella sintesi e trasporto di questi composti fenolici nella cellula. Sembrerebbe che le fasi finali di sintesi degli esteri chinici avvengano nei cloroplasti: questa associazione suggerisce che gli acidi caffeilchinici abbiano un ruolo nella protezione contro i danni della luce (Lattanzaio et al., 2009).

Il derivato caffeilchinico più conosciuto, anche se non è il più abbondante, è la cinarina (acido 1,3-*O*-dicaffeoilchinico) (Panizzi et al., 1965) (Fig. 2), identificata già tra il 1950-1960 durante uno studio multidisciplinare che voleva identificare i componenti di carciofo che stimolano la secrezione biliare e il metabolismo del colesterolo. Altri derivati caffeilchinici individuati negli estratti di carciofo sono: acido 1-*O*-caffeilchinico, acido 3-*O*-caffeilchinico (acido neoclorogenico), acido 4-*O*-caffeilchinico (acido criptoclorogenico), acido 5-*O*-caffeilchinico (acido clorogenico) (Fig. 2), acido 1,3-*O*-dicaffeoylquinico, acido 1,4-*O*-dicaffeoylquinico, e acido 3,5-*O*-dicaffeoilchinico. Generalmente nell'estratto metanolico di carciofo, tra i derivati caffeilchinici, l'acido clorogenico è il componente più abbondante (39%), seguito dagli acidi 1,5-*O*-dicaffeoilchinico (21%) e 3,4-*O*-dicaffeoilchinico (11%), rispetto al contenuto totale di acidi caffeilchinici. Il contenuto di cinarina, invece, è molto basso (circa 1,5%). È importante precisare che il contenuto in acidi caffeilchinici è direttamente proporzionale allo stadio fisiologico dei tessuti: esso varia da circa l'8% nel materiale secco in tessuti giovani a meno dell'1% nei tessuti senescenti (Lattanzaio et al., 2009).

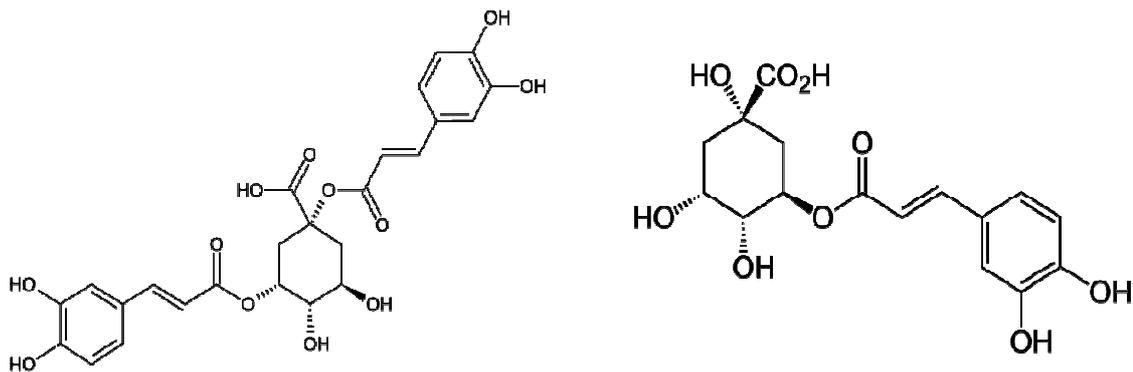


Fig. 2: Cinarina e acido clorogenico

Flavonoidi: sono la più ampia classe di polifenoli presenti in natura (ne sono stati identificati più di 4000), sostanze polifunzionali e ad elevata bioattività. Dal punto di vista chimico presentano una struttura costituita da 2 anelli aromatici a 6 atomi di carbonio (A e B) uniti da un anello benzopiranicco a 3 atomi di carbonio (C), spesso glicosilato (Fig. 3). In base all'eterociclico, ai suoi sostituenti ed ai sostituenti degli anelli benzenici, i flavonoidi vengono distinti in: antocianidine, flavonoli, flavanoli, flavanoni, flavoni, isoflavoni e tannini idrolizzabili.

Il numero e le specifiche posizioni dei gruppi OH o la natura dei gruppi funzionali determinano la funzione dei flavonoidi come agenti antiossidanti, antinfiammatori, citotossici e agenti mutageni in vitro e in vivo.

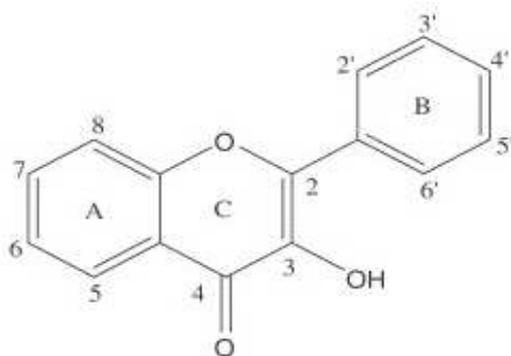


Fig. 3: Scheletro base dei flavonoidi

I flavoni presentano una struttura chimica basata su uno scheletro C15 di atomi di carbonio composto da due anelli aromatici ed uno eterociclico; un anello aromatico (anello A) risulta condensato con l'eterociclico (anello C) ed il terzo (anello aromatico B) collegato all'anello C in posizione 2 (Fig. 4). Dei fenoli sono la classe più numerosa, contando diverse centinaia solo come aglicone, tanto che spesso ci si riferisce ai flavoni con il termine flavonoidi. L'Apigenina e la Luteolina sono i più comuni (Fig. 5).

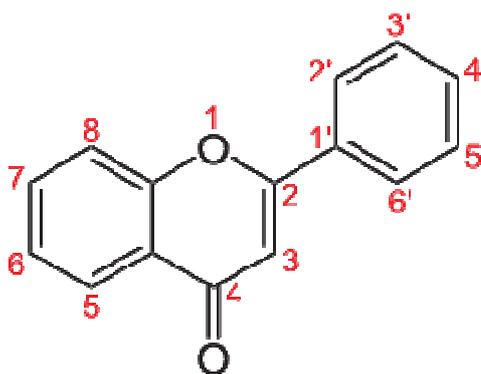


Fig. 4: Struttura molecolare del flavone e numerazione d'anello

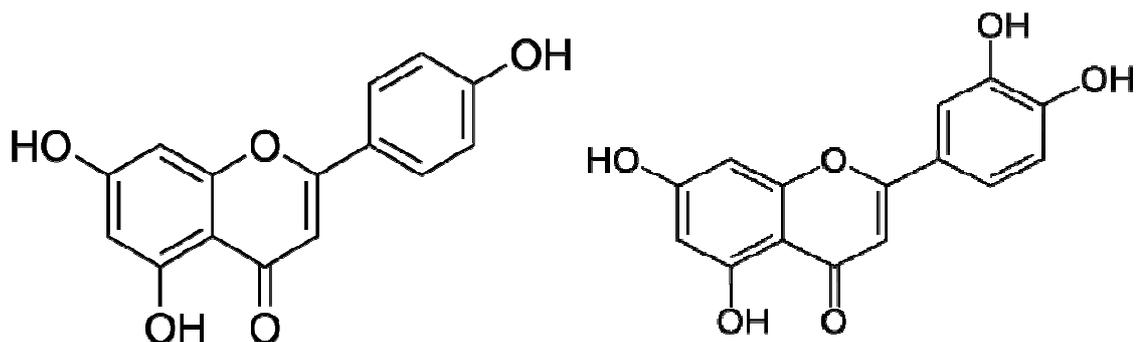


Fig. 5: Apigenina e Luteolina

I flavonoli sono un sottogruppo dei flavoni, in quanto presentano come struttura di base il 3-idrossiflavone (Fig. 6). In molti casi sono glicosilati. Il legame glicosidico si forma sul gruppo ossidrilico in posizione 3. Le strutture monoglicosilate più diffuse sono, nell'ordine, 3-glucoside, 3-galattoside, 3-ramnoside e 3-glucoronide. Sono stati isolati più di 200 agliconi, tra questi, la quercetina, il kamferolo, la miricetina e l'isoramnetina sono i più diffusi. Il kamferolo e la quercetina glicosilati sono i più abbondanti in natura, seguiti da rutina, quercetina 3-rutinoside e kamferolo 3-rutinoside.

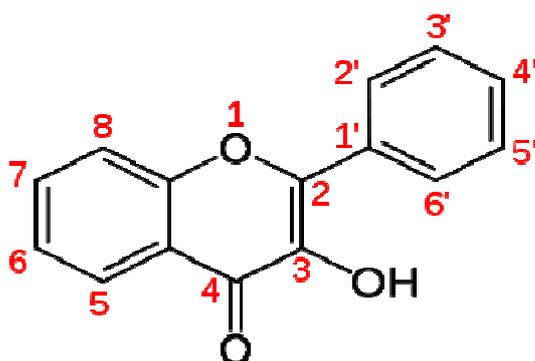


Fig. 6: Struttura molecolare base di un flavonolo (3-idrossiflavone) e numerazione d'anello

I flavanoni sono basati sulla struttura dello scheletro di atomi di carbonio del capostipite flavone, dal punto di vista strutturale viene a mancare rispetto a quest'ultimo il doppio legame tra il carbonio 2 ed il carbonio 3, ottenendo un composto in forma ridotta (Fig. 7). Naringenina ed Esperetina rappresentano i flavanoni presenti nel carciofo (Fig. 8).

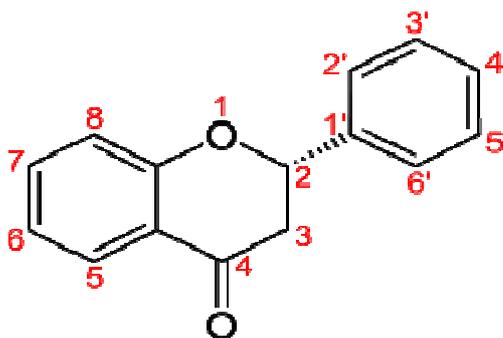


Fig. 7: Struttura molecolare base di un flavanone e numerazione d'anello

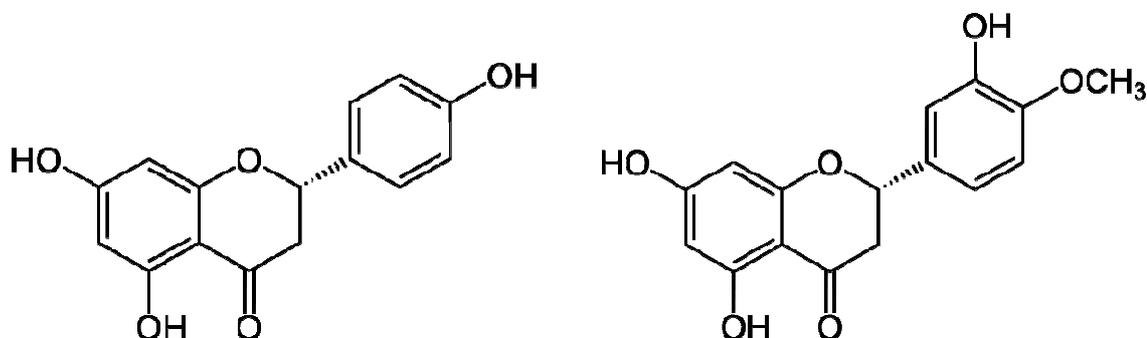


Fig. 8: Naringenina ed Esperetina

Le antocianidine costituiscono gli agliconi, ovvero la parte priva della molecola zuccherina, degli antociani. Sono caratterizzate da una carica positiva sull'ossigeno dell'eterociclo ossigenato e dal fatto che tutti gli atomi di carbonio sono insaturi. Sono i responsabili della pigmentazione di molti fiori e frutti: hanno infatti la capacità di essere

colorati in modo diverso a seconda del pH del mezzo in cui si trovano. Tra le antocianidine più comuni si ricorda la cianidina, delphinidina, peonidina, pelargonidina, petunidina e malvidina. Le loro formule di struttura, si differenziano per il tipo di sostituente legato alla struttura base (Fig. 9).

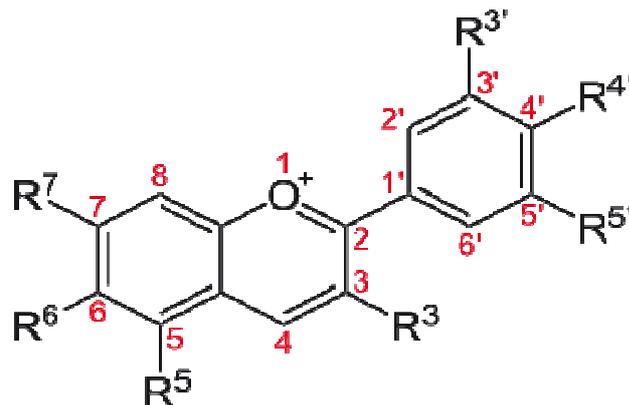


Fig. 9: Struttura molecolare base di un'antocianidina e numerazione d'anello

In natura, si trovano quasi esclusivamente forme antocianiche, in quanto le antocianidine sono legate con una o più molecole di zucchero responsabile della loro stabilità e solubilità in acqua. L'idrossilazione dell'anello B tende ad abbassare la stabilità della molecola, al contrario di quanto avviene con la metilazione. Lo zucchero che frequentemente esterifica con gli agliconi è il glucosio, però si possono trovare anche il ramnosio, il galattosio e l'arabinosio.

Rispetto al contenuto fenolico totale del carciofo, i flavonoidi sono considerati costituenti minori, il loro contenuto si aggira infatti intorno al 10% o meno. Tuttavia, la luteolina è un forte antiossidante che protegge le lipoproteine a bassa densità dall'ossidazione, mentre le antocianidine, oltre le loro proprietà salutari, giocano un ruolo

importante nell' aspetto dei vegetali in ambito alimentare e di conseguenza nell' accettazione del prodotto da parte dei consumatori (Lattanzaio et al., 2009).

I lignani sono molecole derivate dalla fenilalanina attraverso la dimerizzazione di alcoli cinnamici sostituiti, noti come monolignoli, ad uno scheletro di dibenzilbutano. Un esempio di lignano presente nel carciofo è il pinoresinolo (Fig. 10).

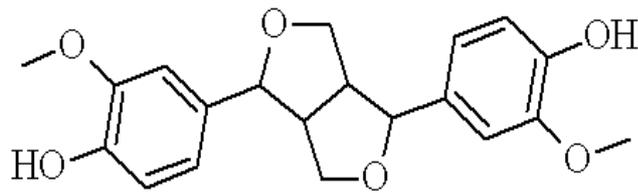


Fig. 10: Pinoresinolo

Introdotti con l'alimentazione, alcuni lignani vegetali sono metabolizzati dai batteri intestinali a lignani "mammiferi" enterodiolo ed enterolactone (Heinonen et al., 2001). I lignani sono una delle principali classi di fitoestrogeni, che sono molecole chimiche estrogeno-simile e agiscono anche come antiossidanti. Tali composti si trovano associati alle fibre alimentari, quindi cibi ricchi in fibre rappresentano una buona fonte di lignani.

I lignani mostrano proprietà antiossidanti nelle difese della pianta contro fattori biotici e abiotici, e hanno dimostrato attività anti-infiammatoria ed antiossidante in modelli di ricerca di base di malattie umane (Korkina et al., 2011; Korkina, 2007). Inoltre, questi metaboliti secondari possono anche avere attività anticancerogena. Alcuni studi epidemiologici hanno dimostrato infatti un'associazione tra esposizione ai lignani e minor rischio di contrarre cancro al seno . Studi sperimentali hanno confermato che l'

enterolattone, il metabolita intestinale di molti lignani vegetali , ha attività anticancerogena in modelli sperimentali di tumore al seno (Boccardo et al., 2006).

### **Proprietà terapeutiche**

E' noto che gli estratti di carciofo hanno mostrato attività epatoprotettiva, antitumorale, antiossidante, antibatterica, anti-HIV, bile-espellente, diuretica, inibente la biosintesi di colesterolo e l'ossidazione delle LDL (Pereira et al., 2013; Rodriguez de Sotillo et al., 2002; Funakoshi-Tago et al., 2011; Adzet et al., 1987; Wan et al., 2013). Questi potenziali terapeutici non sono dovuti ad un singolo composto, ma a diversi metaboliti bioattivi che mostrano effetti farmacologici additivi o sinergici (Brown et al., 1998; Speroni et al., 2003; Wang et al., 2003; Schutz et al., 2004).

Tra diversi composti polifenolici testati per l'attività epatoprotettiva contro la tossicità indotta da CCl<sub>4</sub> nei ratti, solo la cinarina ha mostrato un'interessante azione citoprotettiva, a dimostrazione che il responsabile sia il gruppo caffeil . Quest effetto è dovuto all'attività antiossidante della cinarina, che previene l'ossidazione indotta da CCl<sub>4</sub> dei fosfolipidi costituenti le membrane degli epatociti (Adzet et al., 1987). E' stato anche dimostrato che l'estratto acquoso di *Cynara Scolymus* riduce la perossidazione lipidica e la citotossicità causata da t-BHT negli epatociti di ratto. In questo caso però, non solo la cinarina ma anche altri composti polifenolici possono contribuire a tale effetto epatoprotettivo (Gebhardt et al., 1997).

L'estratto di foglie di carciofo viene utilizzato tradizionalmente per la sua attività antidispeptica, che è svolta attraverso un' attività coleretica. Infatti, è stato osservato un aumento nel flusso di bile successivamente a somministrazioni acute e ripetute di estratto di carciofo in ratti Wistar (Saénz Rodriguez et al., 2002). In particolare, elevate dosi di cinarina (75-100 mg/Kg) provocano un aumento del flusso di bile del 130% rispetto al

volume basale (Preziosi et al., 1959). Questo effetto provoca di conseguenza anche un aumento nel flusso urinario, quindi un effetto diuretico.

L'estratto di carciofo può anche ritardare l'ossidazione delle LDL in maniera dose dipendente (Brown et al., 1998).

L'estratto di foglie di carciofo viene utilizzato anche per il trattamento dell'ipercolesterolemia, in quanto l'estratto acquoso di carciofo, somministrato ad elevate dosi, inibisce la biosintesi di colesterolo negli epatociti di ratto (Gebhardt, 1998). Inoltre, esso risulta anche in grado di inibire l'attività dell'idrossimetilglutaril-CoA-reduttasi indotta dall'insulina, nonostante non ne siano influenzati altri fenomeni insulino-dipendenti. La luteolina-7-*O*-glucoside e il suo aglicone sono i maggiori responsabili di quest'azione, mentre l'acido clorogenico risulta essere meno attivo (Gebhardt, 1998).

Infine, è stato dimostrato che l'estratto di *Cynara Cardunculus* è in grado di aumentare la produzione di ossido nitrico (NO), fattore vasorilassante, in colture di cellule aortiche endoteliali, e che, aggiungendo al mezzo di incubazione luteolina ed apigenina si ottenga un migliore rilassamento aortico (Rossoni et al., 2005). Focalizzando l'attenzione sull'NO sintetasi endoteliale (eNOS), Li et al. (2004) hanno mostrato che i flavonoidi del carciofo possono rappresentare dei mediatori nella sua up-regolazione. In particolare la luteolina e il cinaroside aumentano l'attività dei promotori di eNOS e l'espressione dell'mRNA di eNOS.

## Capitolo 3

### Materiali e Metodi

#### Reagenti e standard

Tutti i prodotti chimici e i reagenti usati erano di tipo analitico o per HPLC. L'acqua è stata trattata con il sistema di purificazione d'acqua Milli Q prima dell'uso (Millipore, Bedford, MA). DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), 2,4,6-tris-2,4,6-tripiridyl-2-triazina (TPTZ), ferro (III) cloruro (secco), 6-idrossi-2,2-tetramethylchroman-2-carbossilico (Trolox), cloruro di alluminio (a secco) sono stati acquistati dalla Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Acetonitrile (ACN) di grado LC-MS e acido formico (HCOOH) sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia). Per la separazione dei polifenoli è stata impiegata una colonna Kinetex™ C18 150 x 2,1 mm 2,6 micron (Phenomenex, Bologna, Italia).

#### Materiale

#### vegetale

Cinque diversi genotipi di carciofo sono stati selezionati e campionati (marzo 2013) alla Semiorio Sementi srl (Sarno, Salerno, Italia): Romolo F1, Istar F1, Violet F1, Capuanella e Catanese. Le porzioni edibili (capolini) sono state separate dai gambi, ed entrambe le frazioni sono state poi congelate a -20 ° C prima dell'estrazione. Romolo è un ibrido di tipo Romanesco con produttività e uniformità eccezionali; produce capolini senza spine, arrotondati e di colore verde con riflessi violacei, ideale per il consumo fresco. La semina avviene in tarda primavera e la raccolta a fine inverno / primavera dell'anno successivo. Istar è un ibrido di tipo verde; è precoce: se seminato in tarda primavera, la fruttificazione inizia a novembre (i capolini sono di colore viola sfumato) proseguendo fino alla primavera successiva (quando produce capolini verdi). I carciofi sono arrotondati, di

colore verde brillante. Violet F1 appartiene al genere Romanesco, presenta caratteristiche sovrapponibili al Romolo ma si differenzia da quest ultimo per un capolino di evidente colore viola. Capuanella è una varietà locale prodotta nella provincia di Napoli, è una varietà di medie dimensioni e di colore verde scuro, che matura tra la fine di marzo ed i primi di aprile. Appartiene alla famiglia del Romanesco, e ha foglie molto raccolte e un capolino quasi sferico. Infine, il Catanese rappresenta la varietà più coltivata in Italia, fornisce circa il 56% della produzione nazionale, è definito "precoce" in quanto la raccolta può avvenire già in periodo autunnale, e presenta un capolino di colore verde-violaceo.

### **Preparazione del campione**

I campioni congelati sono stati omogeneizzati utilizzando un Ultra-Turrax T-25 IKA (IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA). La polvere fresca (1 g) è stata posta in una provetta ed estratta in 10 mL di metanolo / acqua (80:20) con 0,1% HCOOH ed è stata accuratamente agitata a temperatura ambiente per 15 min. La miscela è stata centrifugata e il pellet è stato nuovamente estratto altre due volte, con la stessa soluzione. La soluzione ottenuta è stata evaporata con un evaporatore IKA RV 10 Digital Rapid (IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA) equipaggiato con una unità di evaporazione controllata Vacuubrand PC 3001 Vario e un condensatore in uscita di ghiaccio secco (Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Germania ) a 30 ° C, e ridisciolti in 10 mL di metanolo / acqua (80:20) con 0,1% HCOOH ad una concentrazione finale di 1 mg / 10 ml. Gli estratti sono stati conservati a -20 ° C prima di ulteriori analisi.

### **Strumentazione**

Le analisi spettrofotometriche sono state eseguite utilizzando uno spettrofotometro Jasco V-530 UV-vis (Tokyo, Giappone) fissato a lunghezze d'onda appropriate a ogni test.

Le analisi UHPLC sono state effettuate su un sistema Shimadzu Nexera UHPLC, costituito da un controller CBM-20A, due pompe doppio pistone in flusso parallelo LC-30AD, un degasatore DGU-20 A5, un rilevatore a fotodiodi SPD-M20A (dotato di una cella di 2,5  $\mu$ l), una forno per colonna CTO-20A, un autocampionatore SIL-30AC. Il sistema UHPLC è stato accoppiato in linea ad uno spettrometro di massa LCMS-IT-TOF ibrido attraverso una sorgente ESI (Shimadzu, Kyoto, Giappone). L'elaborazione dei dati LC-MS è stata effettuata dal software LCMSsolution® (versione 3.50.346, Shimadzu). Il volume extracolonna del sistema (ECV) è stato calcolato iniettando toluene, ed è stato stimato in 28,6 microlitri.

### **Condizioni**

### **UHPLC**

La fase mobile ottimale consisteva dello 0,1% HCOOH / H<sub>2</sub>O v / v (A) e 0,1% HCOOH / ACN v / v (B). L'analisi è stata eseguita in gradiente di eluizione come segue: 0,01-20 min, 5-40% B, 20-25 min 40-95% B, 25-27 min, isocratica al 95% tasso B. Il flusso era di 0,5 ml / min. La temperatura della colonna forno è stata impostata a 35 ° C. Il volume di iniezione era di 2 ml di estratto. Sono stati applicati i seguenti parametri di PDA: frequenza di campionamento, 40 Hz; costante di tempo del rivelatore, 0.160 s; temperatura della cella, 40 ° C. L'acquisizione dei dati è stata impostata nell'intervallo 190-400 nm e i cromatogrammi sono stati monitorati a 280 e 330 nm al massimo assorbimento dei composti di interesse.

### **Parametri**

### **ESI-IT-TOF**

L'UHPLC è stato accoppiato in linea a uno strumento ibrido IT-TOF, il flusso dall' LC è stato splittato in rapporto 50:50 prima della sorgente ESI mediante una Tee union in acciaio inossidabile (1/16 in., Foro 0,15 mm Valco HX, Texas Stati Uniti). Risoluzione,

sensibilità e la calibrazione del della trappola ionica e dell'analizzatore TOF sono stati regolati mediante una soluzione standard di trifluoroacetato di sodio. Dopo il passaggio del calibrante, le operazioni di pulizia del tubo e della sorgente ESI sono state effettuate flussando acetonitrile (0.2 mL / min, 20 min). La rivelazione MS è stato effettuato in modalità di ionizzazione negativa con i seguenti parametri: voltaggio detector, 1,55 kV; voltaggio interfaccia -3.5 kV, capillare di desolvatazione curvo (CDL) temperatura, 250 ° C; temperatura del riscaldatore del blocco riscaldante, 250 ° C; flusso di gas nebulizzante (N<sub>2</sub>), 1.5 L / min, gas di supporto, 100 kPa. I dati MS in full scan sono stati acquisiti nel range di 150-1000 m / z, tempo di accumulo di ioni, 30 ms; IT, repeat = 3. Gli esperimenti MS / MS sono stati condotti data dependent mode, gli ioni precursori sono stati acquisiti nel range 150-900 m / z; ampiezza del picco, 3 Da; tempo di accumulo di ioni, 50 ms; Energia CID, il 55%; repeat= 1; scelta precursore su intensità picco base (BPC): 500.000, al 95% del livello di arresto. I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli in letteratura. Le formule molecolari sono state calcolate dal software Formula Predictor (Shimadzu), impostando una bassa tolleranza (deviazione dalla massa massima precisione: 6 ppm, dati di frammentazione MS / MS, regola dell' azoto).

### **Attività**

### **antiossidante**

Per ogni test antiossidante, un'aliquota di Trolox è stata usata per sviluppare una curva standard 50-500 µmol / L. Tutti i dati sono stati poi espressi come Trolox equivalenti (µmol TE / 100 g peso fresco).

### **DPPH test: valutazione dell'attività antiradicalica**

La capacità dei campioni estratti di reagire con il radicale DPPH è stata misurata con il metodo di Brand-Williams et al., (1995). Aliquote (20 microlitri) di estratti sono stati

aggiunti a 3 mL di soluzione di DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol / L) e l'assorbanza è stata determinata a 515 nm dopo 30 min utilizzando uno spettrofotometro Jasco V-530 UV-vis (Tokyo, Giappone). La capacità di purificare il radicale DPPH è stata calcolata con la seguente equazione:

$$\text{Capacità antiradicalica (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100.$$

Dove  $A_0$  è l'assorbanza del controllo,  $A_s$  è l'assorbanza del campione testato.

### **FRAP test: valutazione dell'attività ferro-riducente**

Il potenziale antiossidante degli estratti di carciofo è stato determinato anche attraverso la valutazione del potere ferro-riducente (FRAP test) seguendo la metodica di Benzie & Strain (1996). Una soluzione di 10 mmol / L TPTZ in 40 mmol / L HCl e 12 mmol / L di cloruro ferrico è stata diluita in 300 mmol / L di tampone acetato di sodio (pH 3,6) in un rapporto di 1: 1: 10. Aliquote (20 microlitri) di estratti sono stati aggiunti a 3 ml della soluzione FRAP e l'assorbanza è stata determinata a 593 nm dopo 30 min utilizzando uno spettrofotometro Jasco V-530 UV-vis (Tokyo, Giappone).

### **Digestione gastrointestinale *in vitro***

Il saggio è stato eseguito secondo la procedura descritta da Raiola et al. (2012), con una leggera modifica. La digestione GI è stata distinta in tre step digestivi : salivare, gastrica e duodenale . Per la digestione salivare, gli infusi di tè (20 mL) sono stati mescolati con 6 mL di saliva artificiale composta da KCl (89,6 g / L), KSCN (20 g / L), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (88,8 g / L), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (57,0 g / L), NaCl (175,3 g / L), NaHCO<sub>3</sub> (84,7 g / L), urea (25,0 g / L) e 290 mg di  $\alpha$ -amilasi. Il pH della soluzione è stato regolato a 6,8 con HCl 0,1 N. La miscela è stata introdotta in un sacchetto di plastica contenente 40 ml di acqua e omogeneizzato in uno Stomacher 80 Microbiomaster (Seward, Worthing, UK) per 3 min.

Immediatamente sono stati aggiunti 0,5 g di pepsina (14.800 U) disciolti in HCl 0,1 N, il pH è stato regolato a 2,0 con HCl 6 N, e poi la miscela è stata incubata a 37 ° C in un agitatore orbitale Polymax 1040 (250 rpm) (Heidolph, Schwabach , Germania) per 2 h. Dopo la digestione gastrica è stata simulata la digestione pancreatica nel seguente modo : il pH è stato aumentato a 6,5 con NaHCO<sub>3</sub> 0,5 N e poi sono stati aggiunti 5 ml di una miscela pancreaticina (8,0 mg / ml) e sali biliari (50,0 mg / mL) (01:01 , v / v) disciolti in 20 mL di acqua, il tutto è stato incubato a 37 ° C in un agitatore orbitale (250 rpm) per 2 h. Dopo ogni fase di digestione 10 ml dell'estratto ottenuto sono stati centrifugati a 4000 rpm e 4 ° C per 1 h: prima di ogni passo successivo, la procedura di digestione è stata avviata di nuovo. Per determinare il profilo polifenolico, i surnatanti sono stati estratti con una miscela acetonitrile-acqua (84:16; v / v) e poi analizzati mediante HPLC.

### **Colture cellulari**

Per il presente studio sono state utilizzate linee cellulari umane di carcinoma epatocellulare (HepG2, HB-8065), ottenute dall' American Type Culture Collection. Tali cellule sono state cresciute in terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a cui è stato aggiunto il 10% (v/v) di Siero Fetale Bovino (FBS), 1% di una soluzione antibiotico/antimicotico (Gibco-Invitrogen, MountWaverley, Australia), 0,375% di NaHCO<sub>3</sub> e 20mmol/L HEPES a pH 7,4. Le cellule sono state mantenute in incubatore alla temperatura di 37° C in un'atmosfera umidificata composta per il 95% da O<sub>2</sub> e per il 5% da CO<sub>2</sub>.

Ogni due giorni è stato effettuato il cambio del terreno di coltura al fine di mantenere le cellule in uno stato nutritivo ottimale, previo lavaggio in tampone fosfato salino (PBS). Per eseguire i saggi descritti successivamente le cellule (1,0x 10<sup>5</sup>/ml) sono state trattate con tripsina-EDTA (0,05% tripsina, 0,02% EDTA) e successivamente

piastrate in piastre multi-pozzetto con 200  $\mu$ L di terreno di coltura, in cui sono state sottoposte al trattamento con 1  $\mu$ g di estratto polifenolico della mela per 72 ore.

### **Uptake del glucosio**

Le cellule sia nel compartimento superiore che in quello inferiore (pH 7,4) sono state lavate due volte con 2 mL della soluzione A costituita da una soluzione tampone HEPES (HEPES, 20 mM; NaCl, 137 mM; KCl, 4,7 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1.8 Mm). Nel compartimento superiore sono stati aggiunti 1 mL di soluzione tampone HEPES contenente D-[U-<sup>14</sup>C] glucosio 0.5 mCi/mL e 1 mM di glucosio totale (soluzione B). Le cellule sono state incubate per 30 minuti a 37 °C. L'uptake del glucosio è stato interrotto lavando entrambe le membrane con PBS, dopo di che le cellule sono state lisate con 1 mL NaOH (0,1 mol/L) e aliquote del campione sono state prelevate per analisi al contatore a scintillazione e per la valutazione delle proteine.

### **Test delle lipasi**

Le cellule sono state coltivate in piastre da 6 pozzetti con 2 mL di terreno di coltura per pozzetto. Dopo 48 h di incubazione, il terreno è stato rimosso e le cellule sono state incubate per altre 12 h in un mezzo di coltura fresco (1 mL/ pozzetto) contenente 25 IU di eparina (Leo Pharmaceuticals, Breda, Olanda). L'attività della lipasi è stata determinata mediante un saggio con la triacilglicerolo idrolasi a pH 8,5 in NaCl 0,6 M, scegliendo come substrato gomma di acacia stabilizzata mediante un' emulsione di glicerolo [<sup>14</sup>C] trioleato. I saggi sono stati eseguiti per 2 ore a 30 ° C. Le attività sono espresse come m-unità (nmol di acidi grassi liberi rilasciati per min). In un volume totale di 125  $\mu$ L, il rilascio di acidi grassi liberi era lineare con il tempo e volume del campione fino a 50  $\mu$ L per il mezzo privo di cellule e di 20  $\mu$ L per i lisati cellulari. Nei saggi di immuno-

inibizione, 40  $\mu\text{L}$  di mezzo privo di cellule o 10 ml di lisato cellulare sono stati preincubati per 3 ore su ghiaccio in un volume totale di 50  $\mu\text{L}$  con 50  $\mu\text{g}$  di IgG anti-(umana HL) di capra. Questo anticorpo è stato posto contro l' HL umana parzialmente purificata dal plasma dopo trattamento con eparina. Dopo centrifugazione (10 min, 10000 g, 4 ° C), 75  $\mu\text{L}$  ml della miscela substrato sono stati aggiunti al surnatante ed è stata determinata l' attività della triacilglicerolo idrolasi immunoresistente residua.

### **Uptake del [ $^3\text{H}$ ] colesterolo**

Per determinare l'inibizione dell'uptake del colesterolo le cellule sono state incubate nel mezzo di coltura F-12 contenente 10 nmol/L di [1,2- $^3\text{H}$ ] colesterolo (Perkin Elmer Pty Ltd, Melbourne, Australia). Le cellule sono state lavate due volte per rimuovere il [ $^3\text{H}$ ]colesterolo non legato. In seguito 0,5 mL di una soluzione allo 0,1 % di sodio dodecil solfato sono stati aggiunti ad ogni pozzetto per solubilizzare le cellule. Sono stati addizionati poi tre millilitri di Ultima Gold scintillant e la radioattività delle cellule solubilizzate è stata rilevata utilizzando il contatore a scintillazione liquida Wallac 1410 (Pharmacia, Turku, Finland). Per l'esperimento sull'efflusso di colesterolo le cellule sono state incubate per 45 minuti in F-12 contenente 20 nmol/L di [ $^3\text{H}$ ]colesterolo per "caricare" le cellule di colesterolo. Le cellule sono state lavate due volte e incubate con i campioni in esame per valutare l'efflusso del colesterolo.

Come controllo positivo è stato usato metil- $\beta$ -cicoldestrina all'1% per una completa deplezione del colesterolo cellulare. Previo lavaggio in F-12, 0,5 ml di SDS 0,1 % sono stati aggiunti per solubilizzare le cellule e consentire l'analisi al contatore a scintillazione liquida.

### **Attività di legame al recettore delle LDL**

L'effetto dei polifenoli del tè all'interno delle cellule HepG2 sull'attività di legame al recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL), è stata valutata indirettamente misurando la concentrazione di LDL nel mezzo cellulare. Le cellule HepG2 sono state coltivate in piastre da 12 pozzetti, successivamente lavate in PBS e incubate per 24 ore in DMEM senza siero. Le cellule sono state quindi lavate in PBS e incubate per ulteriori 6 ore in DMEM senza siero e con il marcatore fluorescente Dil-LDL (10 mg / L, Biomedical Technologies, Stoughton, MA). La fluorescenza del mezzo cellulare è stata misurata alle seguenti lunghezze d'onda: 514 nm (eccitazione) e 550 nm (emissione), utilizzando uno spettrofotometro a luminescenza LS 50B (Perkin-Elmer, Waltham, MA).

### **Quantificazione dei livelli di Apolipoproteina A1 in terreni di coltura**

La concentrazione di apolipoproteina A1 (ApoA1) nei mezzi di coltura cellulare è stata quantificata in piastre a 96 pozzetti utilizzando un saggio immunoenzimatico (E90519Hu kit 96; Gentaur molecolare Prodotti Kampenhout, Belgio), secondo le istruzioni del produttore.

### **Proliferazione cellulare**

La proliferazione cellulare è stata determinata usando Cell-Titer Blue (Promega, Alexandria, Australia). Le cellule sono state piastrate come già descritto. Dopo 48 ore sono stati aggiunti 20  $\mu$ L di Cell-Titer Blue e le cellule sono state incubate per 2 ore a 37° C in un'atmosfera umidificata composta per il 95% da O<sub>2</sub> e per il 5% da CO<sub>2</sub>. La fluorescenza è stata valutata con lunghezze d'onda di eccitazione ( $\lambda_{ex}$  = 550 nm) ed emissione ( $\lambda_{em}$  = 615 nm) in Victor3 multilabel plate counter (Perkin Elmer, Waltham MA).

### **Misurazione dell'accumulo di ROS intracellulare**

Il saggio delle sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARs) è stato eseguito su membrane estratte da cellule Caco-2 e H-Caco2 dopo 48 h di incubazione con 0.0125 a 1 mg/mL di MBCP in soluzione acquosa, e da cellule di controllo non trattate, usando un tampone di lisi ghiacciato (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton) addizionato di una miscela di inibitori delle proteasi. L'omogenato è stato centrifugato a 1200 giri per 10 min per separare il citosol (surnatante) dalle membrane (pellet). Il pellet è stato sciolto in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, and 10 mM EDTA. Aliquote (10 µL) della preparazione di membrane sono stati aggiunti a 2 mL di soluzione TBA-TCA (15% TCA, 0.3% TBA in 0.12 M HCl) a 100 °C per 30 min. La reazione è stata stoppata raffreddando il campione in acqua fredda. I campioni sono stati centrifugati a 5000 giri per 10 min e il cromogeno (TBARs) quantificato mediante spettrofotometria a 532 nm. La quantità di TBARs è stata espressa come µM/µg di proteine.

### **Saggio di Griess**

Il saggio prevede la misurazione di ossido nitrico (NO) totale, ossia dei nitriti ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrati ( $\text{NO}_3^-$ ). Si utilizza una soluzione costituita da Sulfanilamide 1 % e naftiletilendiammina 0.1 %. La sulfanilamide agisce come analogo dell'acido p-aminobenzoico che assieme alla pteridina e all'acido glutammico reagisce a formare l'acido diidrofolic, un precursore degli acidi nucleici. La sulfanilamide rappresenta l'esempio di un antibiotico sintetico, anche detto chemioterapico. Lo ione  $\text{NO}_2^-$  può essere determinato per via fotometrica, utilizzando la colorazione che tale ione forma in ambiente acido, per ac. ortofosforico o ac. cloridrico, con il "reattivo di GRIESS". Tale reattivo, è formato da una miscela di acido Solfanilico (oppure Solfanilamide) e alfa-naftilammina. L'acido solfanilico (o la solfanilamide) in ambiente acido viene diazotata dallo ione nitrito.

Successivamente il diazocomposto viene copulato dall'alfanaftilammina formando un colorante azoico che presenta un massimo di assorbimento intorno a 520 nm se si usa solfanilammide, il colorante azoico corrispondente presenta un massimo di assorbimento intorno a 543 nm, in questo caso la copulazione viene eseguita con naftiletildiammina: NEDA. La determinazione spettrofotometrica è estremamente sensibile, fino a 0,02 ppm. Per il calcolo della concentrazione si utilizza una curva standard fatta utilizzando una soluzione di  $\text{NaNO}_2$  1M. Questa soluzione contiene circa 0,1 mg/ml di Azoto (N). La soluzione si stabilizza con 1 ml di cloroformio. Dalla soluzione madre si prelevano 5, 10, 15, 20 $\mu$ l e si portano a 1 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata, in modo da ottenere soluzioni diluite contenenti rispettivamente 0,5, 1, 2 ppm in azoto nitroso (Giustarini et al., 2008).

### **Analisi Statistica**

Salvo indicazione contraria, tutti i risultati sperimentali sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard (SD) di almeno cinque repliche. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con il test t di Student o ANOVA a due vie seguita dal test di confronto multiplo Tukey-Kramer per valutare le differenze significative tra una coppia di medie. Il livello di significatività (valore di  $\alpha$ ) era del 95% in tutti i casi ( $P < 0.05$ ).

## CAPITOLO 4

### Risultati E Discussione

#### Identificazione dei composti polifenolici tramite UHPLC-ESI-TOF

Come si può osservare dalle figure 10 e 11, in cui è raffigurato rispettivamente il profilo polifenolico del capolino Capuanella e del gambo Romolo F1, la separazione è stata effettuata in 27 minuti attraverso l'uso di una colonna di dimensioni 15 cm x 2,6 micron, ottenendo una notevole riduzione dei tempi di analisi rispetto ad altri metodi riportati in letteratura (Lombardo et al., 2010). Nonostante ci sia un metodo cromatografico che riporta tempi di analisi più brevi (Farag et al., 2013), nel nostro caso è stata ottenuta una migliore risoluzione cromatografica. L'identificazione dei composti è stata effettuata mediante spettri in foto diodi, confronto del tempo di ritenzione con standard quando disponibili, e, cosa più importante, mediante misurazione della massa accurata MS e MS / MS. Il modello isotopico e la frammentazione sono stati utilizzati per generare la formula molecolare da un software dedicato, ed è stato ottenuto un errore medio di 3 ppm. I profili quali / quantitativi per capolini e gambi sono mostrati nelle tabelle 1 e 2 in ordine crescente di massa molecolare.

Molte differenze possono essere evidenziate nel profilo polifenolico di capolini e gambi dei genotipi esaminati. In accordo con la letteratura già esistente (Abu-Reidah et al, 2013; Schutz et al, 2004; Farag et al, 2013), i derivati dell'acido idrossicinnamico e i derivati dei flavoni sono stati ampiamente identificati in tutti i campioni. In particolare, l'acido mono-caffeilchinico e suoi isomeri, facilmente identificabili dal frammento a  $m/z$  191 [MH-162]<sup>-</sup>, sono presenti sia nei capolini che nei gambi, come pure l'acido di-caffeilchinico e i suoi isomeri caratterizzati da due principali frammenti ionici a  $m/z$  353,0877 [MH -162]<sup>-</sup>, 191,0567 [MH-162]<sup>-</sup>. Tra gli acidi idrossicinnamici sono stati

rilevati anche l'acido 3-*p*-Coumaroilchinico e l'acido 3-*O*-Feruloilchinico, i cui MS / MS sono dominati da frammenti ionici a  $m/z$  191 [MH-146]<sup>-</sup> e [MH-176]<sup>-</sup>, rispettivamente, che rappresentano la perdita della porzione di acido chinico.

Tra i flavonoli troviamo principalmente i derivati zuccherini di apigenina e luteolina. Sono stati identificati i derivati 7-*O*-glucuronide e 7-*O*-glucoside (cosmoside) dell'apigenina. Tali molecole sono presenti soltanto nei capolini, rivelano tempi di ritenzione molto simili, mostrano masse a  $m/z$  445 e 431, con lo stesso spettro MS<sup>2</sup>, ed entrambi frammenti ionici a  $m/z$  269 ([MH-176]<sup>-</sup> e [MH-162]<sup>-</sup>).

La stessa situazione è stata osservata per i derivati della luteolina, scolimoside e cinaroside, che mostrano due frammenti ionici a  $m/z$  285 corrispondenti alla perdita di rutinoside [MH-326]<sup>-</sup> e glucoside [MH-162]<sup>-</sup>, rispettivamente; essi sono stati osservati nei capolini e nei gambi.

Tra i flavonoli, è interessante la presenza in tracce solo nei capolini del composto crisoeriol glucoside (C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>), caratterizzato da un frammento a  $m/z$  299 [MH-162]<sup>-</sup>.

La forma acetilglucoside dell' apigenina è stata rilevata nei capolini, e solo in tracce nei gambi, come evidenziato dal frammento ionico a  $m/z$  269 e la conseguente perdita del frammento acetil [MH-162-acetil]<sup>-</sup>.

Lo stesso schema di frammentazione è stato osservato per un altro composto, il cui spettro MS<sup>2</sup> è caratterizzato dal frammento a  $m/z$  285 (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>) rappresentante l'aglicone della luteolina, derivante dalla conseguente perdita di uno zucchero e un residuo acetil [MH-162-aceyl]<sup>-</sup> (figura 12). Questo composto è stato provvisoriamente identificato come luteolina 7-*O*- (6'acetyl) glucoside, e con nostro vanto evidenziamo che la sua presenza nei capolini di carciofo non è stata segnalata finora.

I derivati dei lignani sono stati rilevati solo nei capolini; in particolare, la presenza di pinoresinolo, caratterizzato dal frammento ionico a  $m/z$  357 [MH-162]<sup>-</sup>, e dei suoi

derivati, è interessante per la loro conosciuta attività biologica, come ad esempio il potenziale ipoglicemizzante e l'attività antinfiammatoria (During et al., 2012).

Come si può vedere dal cromatogramma nella figura 10, i picchi di ultima eluizione sono acidi grassi ossigenati; questi composti sono caratterizzati dalla perdita neutrale di acqua  $[MH-H_2O]^-$  nello spettro  $MS^2$ . Sono stati identificati gli acidi diidrossi-octadecadienoico e diidrossi-octadecatrienoico, per i quali è stata osservata una differenza di 2 amu, a causa del diverso grado di insaturazione.

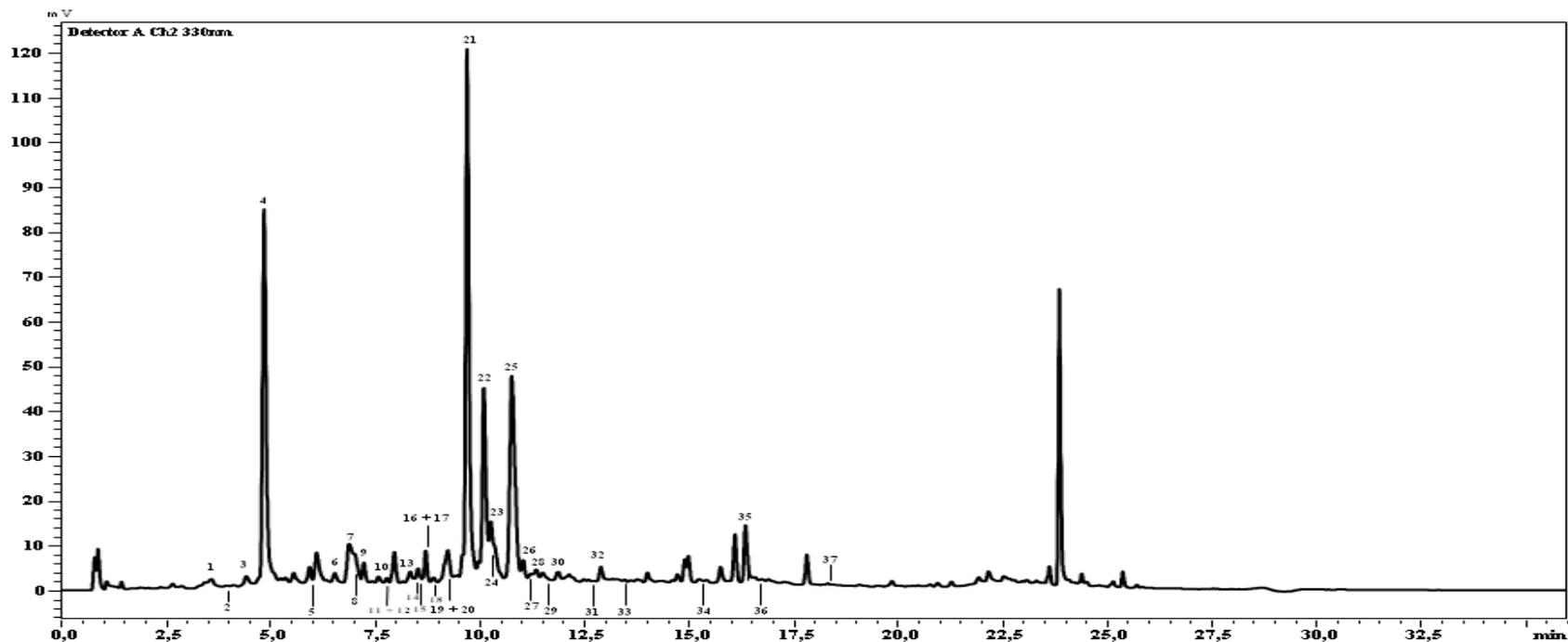


Fig 10: Cromatogramma UHPLC-PDA dell'estratto polifenolico di capolino di *Cynara Scolymus* (Catanesa). I picchi identificati sono: (1): Acido Siringico *O*-exoside; (2): Acido Triidrossioctadecenoico; (3): Acido dicaffeilchinico; (4): Acido monocaffeilchinico; (5): Acido propadienoico; (6): Acido dicaffeilchinico (isomero I); (7): Apigenin-7-*O*-glucoside; (8): Acido propadienoico; (9): Sconosciuto; (10): Apigenin-7-*O*-cinnamoylglucoside; (11): 1-Idrossipinoresinol 1-*O*- $\beta$ -D-glucoside; (12): Sconosciuto; (13): Acido 3-*O*-Feruloilchinico; (14): Acido 3-*O*-Feruloilchinico (isomero); (15): Lusitanicoside (cavicol  $\beta$  rutinoside); (16): Luteolin-7-*O*-glucoside (Cinaroside); (17): Crisoeriol 7-*O*-glucoside; (18): Lusitanicoside (Cavicol  $\beta$ -rutinoside) (isomero); (19) : Sconosciuto; (20): Pinoresinol-4-*O*- $\beta$ -glucoside; (21): Acido dicaffeilchinico (isomer II); (22): Acido dicaffeilchinico (isomer III); (23): Isoroifolina (Apigenin-7-*O*-rutinoside); (24): Isoquercitrina; (25): Apigenin-7-*O*-glucuronide; (26): Apigenin-7-*O*-glucoside (isomero); (27): Luteolin-7-*O*-rutinoside (scolimoside); (28): Luteolin-7-*O*-(6'acetil) glucoside; (29): Pinoresinolo-acetilexoside; (30): Apigenin-7-*O*-glucuronide (isomero); (31): Acido Diferuloilchinico; (32): Apigenin-7-*O*-(6'acetil) glucoside; (33): Luteolina; (34): Acido Idrossioctadecatrienoico; (35): Apigenina; (36): Diidrossipropionend-exoside; (37): Acido Triidrossioctadecenoico.

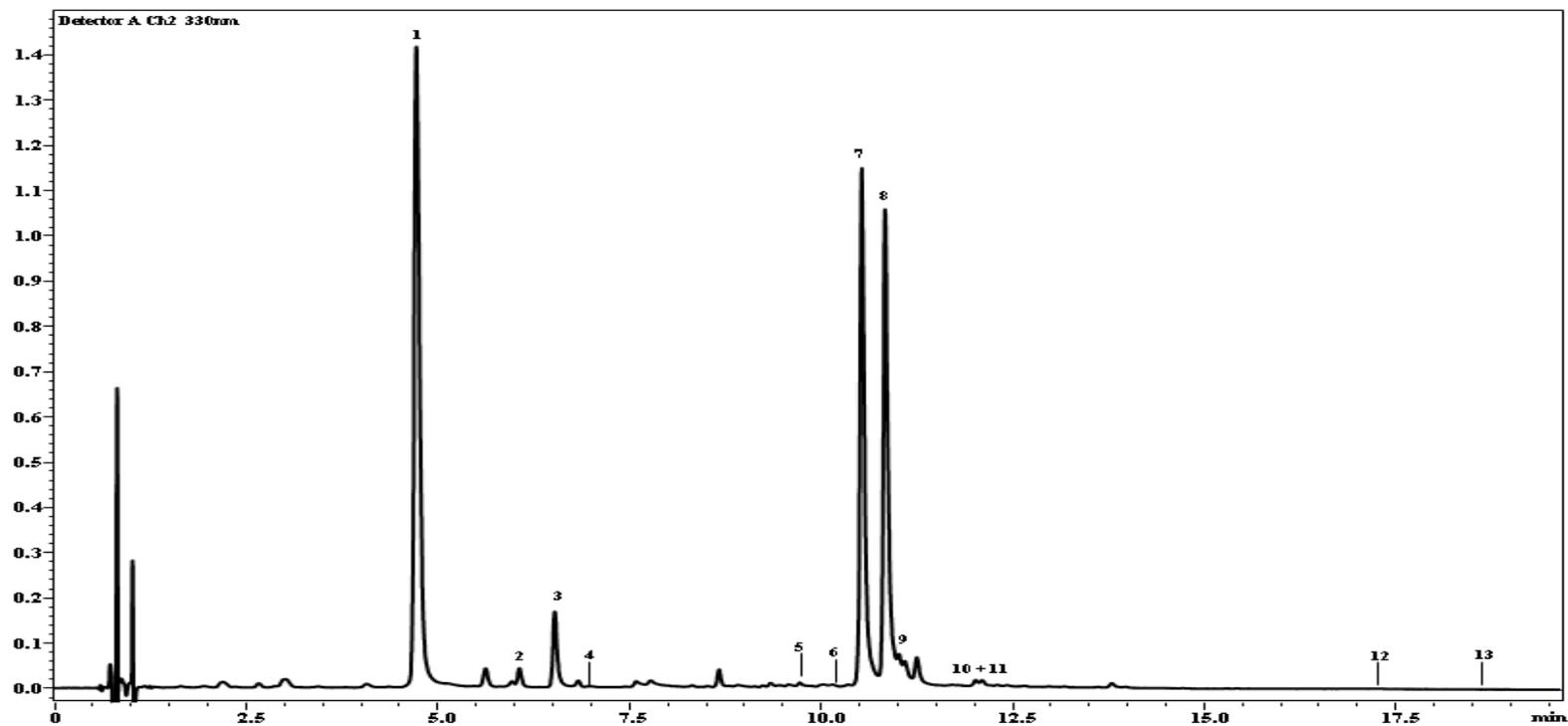


Fig 11: Cromatogramma UHPLC-PDA dell'estratto polifenolico di gambo di *Cynara Scolymus* (Romolo). I picchi identificati sono: (1): Acido Monocaffeilchinico ; (2): Acido Monocaffeilchinico (isomero I); (3): Acido 3-*p*-Cumarilchinico; (4): Sconosciuto; (5): Luteolin-7-*O*-rutinoside (scolimoside); (6): Luteolin-7-*O*-glucoside; (7): Acido Dicafeilchinico; (8): Acido Dicafeilchinico (isomero I); (9): Acido Dicafeilchinico (isomero); (10): Acido 3-*p*-Cumaroil-4-cafeilchinico; (11) Acido 3-*p*-Cumaroil-4-cafeilchinico (isomero); (12): Diidrossipropionend-exoside; (13): Acido Triidrossioctadecenoico.

## Luteolin 7-O-(6'acetyl) glucoside

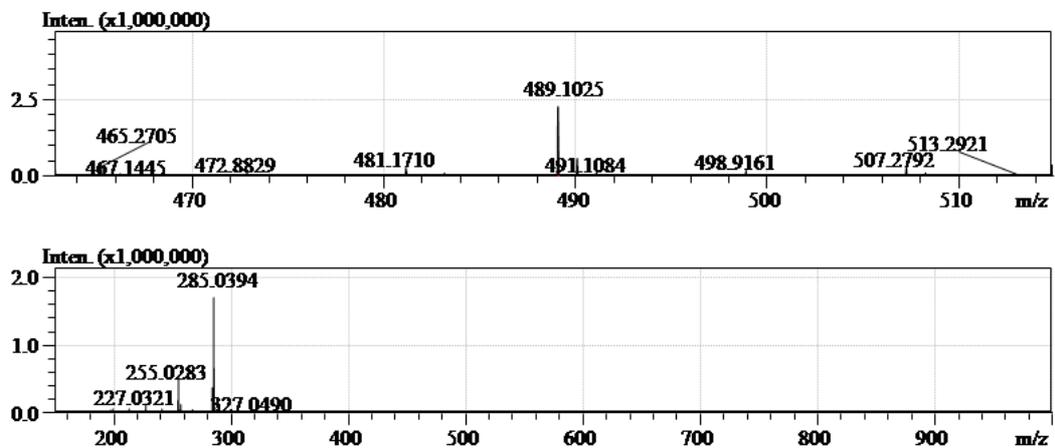
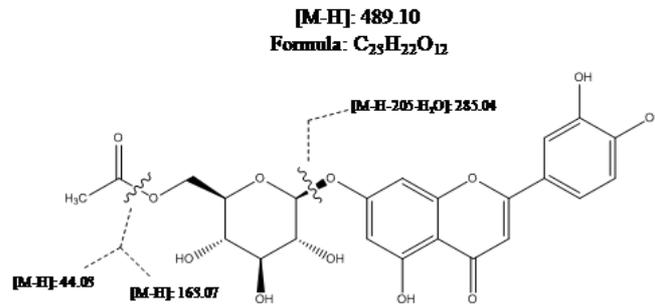


Fig. 12: luteolina 7-O- (6'acetyl) glucoside

### Analisi quantitativa

Per la quantificazione dei composti polifenolici sono stati selezionati tre standard esterni: acido clorogenico, apigenina 7-O-glucoside e luteolina 7-O-glucoside. La soluzione madre (1 mg / mL) è stata preparata in metanolo, le curve di calibrazione sono state ottenute nell'intervallo 1-500 µg / mL con sette livelli di concentrazione e sono state eseguite iniezione in triplice copia di ciascun livello di concentrazione. Le aree dei picchi, relative alla lunghezza d'onda di assorbimento massima, di ogni standard sono state relazionate alle concentrazioni corrispondenti e i risultati sono stati espressi come µg / g e riportati in tabella 1 e 2.

Come riportato nelle tabelle 1 e 2, tra i composti identificati, i derivati caffeilchinici e i flavonoidi sono i più abbondanti in tutti i campioni esaminati. Per quanto riguarda gli acidi caffeilchinici, dall'analisi quantitativa dei diversi capolini, Catanese è il genotipo con la più alta quantità di acidi caffeilchinici, seguito da Violet F1, Istar F1 e Capuanella con valori simili, e per ultimo Romolo F1 con il più basso contenuto. Tra i diversi genotipi di gambo, invece, Violet F1 è il più ricco, seguito da Istar F1, Catanese e Romolo F1 con valori di una volta inferiori a Violet F1, e infine Capuanella. L'acido clorogenico e la cinarina sono i composti presenti in più grande quantità tra i derivati caffeilchinici; rappresentano difatti una percentuale importante del totale dei derivati caffeilchinici sia per i capolini che per i gambi (44,1% e il 29,3% del valore medio, rispettivamente). È interessante notare che ogni gambo è più ricco in derivati caffeilchinici del capolino dello stesso genotipo. Ciò è dovuto al fatto che partecipano al sostegno meccanico della infiorescenza; in particolare, sembra che contribuiscano al sostegno strutturale della parete cellulare creando una reticolazione che assicura resistenza (Faulds et al., 1999).

Le proprietà salutari di questi composti sono già ben note; estratti di foglie di carciofo sono stati utilizzati per le loro proprietà antiossidante, antitumorale, antigenotossica, epatoprotettiva, ipocolesterolemizzante, bile-espellente, diuretica, anti-infiammatoria, antimicotica, anti-HIV e antibatterica, grazie ai diversi metaboliti bioattivi (Lattanzio et al., 2009). L'acido clorogenico e suoi derivati sono i principali responsabili di queste azioni biologiche.

Grazie a queste proprietà benefiche, grande interesse è stato rivolto alle fonti naturali di questi metaboliti secondari. I chicchi di caffè sono stati selezionati come una delle principali fonti di acido clorogenico nella dieta, con un'assunzione quotidiana di acido clorogenico in bevitori di caffè di circa 1 g (Sato et al., 2011); i chicchi di caffè,

tuttavia, dovrebbero essere sottratti alla tostatura, e di conseguenza alla produzione di polvere di caffè. Come evidenziato in precedenza dai nostri risultati, i gambi di carciofo sono ugualmente ricchi in acido clorogenico, un motivo trainante per il recupero di tali "scarti" alimentari (Ruiz-Cano et al., 2014).

Per quanto riguarda il profilo dei flavonoidi, tra i capolini, il genotipo Capuanella è più ricco degli altri, seguito da Catanese che presenta un valore simile, Istar F1 e Romolo F1; i flavonoidi sono presenti in tracce in Violet F1. Tra i gambi, questi composti sono quantificabili solo per Violet F1 e Catanese. Apigenina, luteolina e loro derivati sono risultati i flavonoidi più rappresentativi; l'apigenina e i suoi derivati rappresentano una importante percentuale rispetto al totale tra i capolini (71,6%), mentre la luteolina e i suoi derivati sono stati gli unici flavonoidi quantificabili nei i gambi. È interessante notare che i capolini sono più ricchi in flavonoidi rispetto ai corrispondenti gambi; ciò è dovuto al fatto che in essi la pianta stimola la produzione di due enzimi coinvolti nella sintesi flavonoidi, calcione sintasi (CHS) e calcione isomerasi (CHI), essendo più esposti alla luce solare (Pandino et al., 2011).

I flavonoidi contribuiscono alle proprietà benefiche del carciofo insieme a tutti gli altri polifenoli (Lattanzio et al., 2009).

Tra i lignani, il pinoresinolo e i suoi derivati sono presenti solo in tracce in tutti i campioni analizzati, ma sono ugualmente composti interessanti grazie ad alcune attività biologiche ben note, come il potere ipoglicemizzante ed antinfiammatorio (During et al., 2012.).

Gli acidi grassi ossigenati, presenti nei capolini e prevalentemente nei gambi, non sono stati quantificati per la mancanza di standard utilizzabili.

**Tab 1. Profilo polifenolico qualitativo e quantitativo dei genotipi di capolino (µg/g peso fresco).**

Composto	[M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup>	Errore ppm	Formula Molecolare	Capuanella	Romolo F1	Violet F1	Catanese	Istar F1
Apigenina	269.0442	-	4.90	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	-	-	-	<b>21.72 ± 0.85</b>	-
Naringenina	271.0611	183	-0.4	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-	+	-	-	-
Metilgalangina	283.0615	209;183	1.77	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-	+	-	-	-
Luteolina	285.0410	190	1.75	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	-	<b>5.03 ± 0.01</b>	-	+	-
Acido Idrossi-octadecatrienoico	293.2111	275	3.60	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	+	-	-	+	-
Esperetina	301.0733	183	4.32	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	-	+	-	-	-
Acido Diidrossi-octadecatrienoico	309.2021	291;273	5.00	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	+	-	-	-	-
Acido Diidrossi-octadecadienoico	311.1304	275; 293; 171	-2.25	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	-	+	-	-	-
Glucoside dell'acido Protocatechico	315.0710	153	-3.17	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	-	-	+	-	-
<i>p</i> -Coumaroilglucoside	325.0908	230; 163	2.67	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	-	-	+	<b>8.30 ± 0.24</b>	-
Diidrossipropionend-exoside	327.1412	282; 232	-0.61	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	+	-	-	-	-
Acido Triidrossioctadecenoico	329.2332	211; 183	-3.34	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	+	+	-	+	+
Acido 3- <i>p</i> -Cumaroilchinico	337.0919	191	5.34	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	+	<b>2.93 ± 0.1</b>	<b>25.92 ± 0.01</b>	-	-
Acido 3- <i>p</i> -Cumaroilchinico (isomero)	337.0928	191	5.80	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	-	<b>3.60 ± 0.03</b>	<b>11.76 ± 0.01</b>	-	-
Acido Monocaffeilchinico	353.0839	193; 191	-1.42	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	<b>124.11 ± 0.12</b>	<b>10.41 ± 0.34</b>	<b>27.67 ± 0.01</b>	<b>142.69 ± 5.00</b>	<b>73.24 ± 0.09</b>

Acido 3- <i>O</i> -Monocaffeilchinico	353.0854	193; 191	-5.80	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-	+	<b>20.26 ± 0.05</b>	-	-
Acido 4- <i>O</i> -Monocaffeilchinico	353.0855	193; 191	-5.51	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-	-	<b>161.11 ± 0.05</b>	-	-
Acido 5- <i>O</i> -Monocaffeilchinico	353.0853	193; 191	-5.98	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-	-	<b>1.32 ± 0.01</b>	-	-
Acido Siringico <i>O</i> -exoside	359.0983	197; 182	-0.28	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	<b>8.86 ± 0.05</b>	+	+	<b>6.61 ± 0.18</b>	-
Acido 3- <i>O</i> -Feruloilchinico	367.1006	191	2.00	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	-	-	<b>3.07 ± 0.01</b>	<b>8.04 ± 0.26</b>	+
Acido 3- <i>O</i> -Feruloilchinico (isomero)	367.1020	191	-4.09	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	-	-	-	+	-
Apigenin-7- <i>O</i> -glucoside	431.1918	269	-1.16	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	<b>12.06 ± 0.06</b>	+	-	<b>22.62 ± 0.24</b>	<b>12.29 ± 0.02</b>
Apigenin-7- <i>O</i> -glucoside (isomero)	431.0991	269	1.62	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	+	-	-	<b>10.64 ± 0.01</b>	-
Acido Propadienoico	433.2046	304; 174	-3.40	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub>	-	-	-	+	-
Acido Propadienoico (isomero)	433.1110	304; 174	1.77	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub>	-	-	-	+	-
Lusitanicoside (cavicol β-rutinoside)	441.1767	330; 310	-5.98	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	-	-	+	+	-
Apigenin-7- <i>O</i> -glucuronide	445.0739	269	-5.31	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	<b>211.34 ± 0.97</b>	<b>57.24 ± 4.64</b>	-	<b>93.15 ± 0.71</b>	<b>33.21 ± 0.05</b>
Apigenin-7- <i>O</i> -glucuronide (isomero)	445.0836	269	0.90	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	-	-	-	<b>10.78 ± 0.49</b>	-
Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside (Cinaroside)	447.0897	285	2.91	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	+	<b>6.61 ± 0.36</b>	-	+	<b>26.38 ± 0.06</b>
Luteolin-7- <i>O</i> -glucuronide	461.0698	285; 175	-0.43	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	-	<b>9.97 ± 0.11</b>	-	-	<b>32.96 ± 0.18</b>
Crisoeriol-7- <i>O</i> -glucoside	461.1059	299	-4.72	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	-	+	-	-	-
Isoquercitrina	463.2474	301	0.43	C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> O <sub>10</sub>	-	-	-	+	-

Sconosciuto	471.1867	179	0.64	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub>	<b>22.42 ± 0.12</b>	+	<b>0.63 ± 0.01</b>	-	+
Sconosciuto (isomero)	471.1871	179	-0.21	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub>	-	-	<b>11.66 ± 0.02</b>	-	-
Apigenin-7- <i>O</i> -(6' acetil) glucoside	473.1031	269	3.85	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	+	-	-	<b>12.77 ± 0.74</b>	-
Sconosciuto	485.1466	173	2.68	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	-	-	-	+	-
Luteolin-7- <i>O</i> -(6' acetil) glucoside	489.1008	285	1.00	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	<b>17.76 ± 0.01</b>	<b>2.00 ± 0.001</b>	-	<b>10.93 ± 0.72</b>	-
Luteolin-7- <i>O</i> -(6' acetil) glucoside (isomero)	489.1007	285	1.11	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	<b>11.11 ± 0.01</b>	-	-	-	-
Acido Dicaffeilchinico	515.1181	353; 191	3.97	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	<b>45.68 ± 0.09</b>	<b>4.51 ± 0.13</b>	<b>14.59 ± 0.02</b>	<b>7.63 ± 0.001</b>	<b>77.97 ± 0.07</b>
Acido Dicaffeilchinico ( isomero I)	515.1146	353; 191	1.94	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	-	-	-	<b>2.419 ± 0.13</b>	<b>44.86 ± 0.03</b>
Acido Dicaffeilchinico (isomero II)	515.1174	353; 191	3.40	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	-	-	-	<b>152.63 ± 1.89</b>	-
Acido Dicaffeilchinico (isomero III)	515.1177	353; 191	4.00	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	-	-	-	<b>63.25 ± 1.03</b>	-
Glucoside dell'acido Clorogenico	515.1404	323; 284; 191	-0.39	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	-	-	+	-	-
Pinoresinol-4- <i>O</i> -β-glucoside	519.1894	357	1.16	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub>	+	-	+	+	+
1-Idrossipinoresinol-1- <i>O</i> -β-D-glucoside	535.1856	193; 373	5.54	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub>	-	-	-	+	-
1-Idrossipinoresinol-1- <i>O</i> -β-D-glucoside (isomero)	535.1824	193; 373	5.74	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub>	-	-	-	+	-
Sconosciuto	539.2166	491; 357	2.37	C <sub>25</sub> H <sub>31</sub> O <sub>13</sub>	-	-	-	+	-
Sconosciuto (isomero)	539.0952	491; 357	2.30	C <sub>25</sub> H <sub>31</sub> O <sub>13</sub>	-	-	-	+	-
Acido Diferuloilchinico	543.1622	367	5.95	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub>	-	-	-	+	-

Pinoresinol-acetil exoside	561.1929	357; 179	2.49	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>12</sub>	+	+	+	+	+
Apiina	563.1749	337; 309	5.00	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	+	-	<b>13.62 ± 0.07</b>	-	-
Isoroifolina (apigenin-7- <i>O</i> -rutinoside)	577.1595	269	0.17	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	+	<b>3.65 ± 0.23</b>	-	<b>35.37 ± 0.71</b>	<b>31.30 ± 0.07</b>
Narirutina	579.1689	271; 177	-4.66	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	-	+	+	-	-
Apigenin- <i>O</i> -cinnamol-glucoside	581.1837	373; 177; 325	-5.40	C <sub>30</sub> H <sub>29</sub> O <sub>12</sub>	+	-	-	<b>7.10 ± 0.26</b>	-
Luteolin-7- <i>O</i> -rutinoside (scolimoside)	593.1486	285; 199	1.69	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	+	<b>15.30 ± 0.96</b>	-	+	<b>31.40 ± 0.06</b>
Luteolin-7- <i>O</i> -rutinoside (isomero)	593.1446	285; 199	1.73	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	+	-	-	+	-
Eriodictiol glucoside	611.1934	192; 207	1.80	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	-	-	-	-	+

**Tab 2. Profilo polifenolico qualitativo e quantitativo dei genotipi di gambo ( $\mu\text{g/g}$  peso fresco).**

Composto	[M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup>	Errore ppm	Formula Molecolare	Capuanella	Romolo F1	Violet F1	Catanese	Istar F1
Diidrossipropionend-exoside	327.141 2	282, 232	-0.61	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	-	+	-	-	-
Acido Triidrossioctadecenoico	329.233 2	211, 183	4.90	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	-	+	-	-	-
Acido 3- <i>p</i> -Cumaroilchinico	337.094 7	191	5.34	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	-	<b>19.84 ± 0.51</b>	<b>40.08 ± 0.74</b>	<b>2.35 ± 0.03</b>	-
Acido Monocaffeilchinico	353.083 9	193, 191, 173	-1.42	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	<b>131.25 ± 0.41</b>	<b>165.34 ± 0.22</b>	<b>499.38 ± 8.45</b>	<b>188.58 ± 1.66</b>	<b>254.34 ± 2.05</b>
Acido 3- <i>O</i> -Monocaffeilchinico (isomero I)	353.085 6	193, 191, 173	-5.23	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-	<b>4.09 ± 0.01</b>	-	-	-
Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	447.080 9	285	-5.59	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	-	+	<b>22.99 ± 0.03</b>	+	-
Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside (isomero I)	447.082 9	285	4.05	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	-	-	+	-	-
Sconosciuto	471.186 7	179	0.64	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub>	+	+	-	-	-
Apigenin-7- <i>O</i> -(6' acetil) glucoside	473.103 1	179	3.85	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	+	-	+	-	-
Acido 3- <i>p</i> -coumaroil-4-caffeilchinico	499.122 5	353, 191	-4.01	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	-	<b>1.19 ± 0.01</b>	-	-	-
Acido 3- <i>p</i> -coumaroil-4-caffeilchinico (isomero I)	499.123 7	353, 191	1.30	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	-	<b>1.36 ± 0.01</b>	-	-	-
Acido Dicaffeilchinico	515.118 1	353, 191	4.00	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	<b>111.90 ± 0.11</b>	<b>108.29 ± 0.32</b>	<b>529.42 ± 4.51</b>	<b>127.48 ± 0.02</b>	<b>297.45 ± 0.22</b>
Acido Dicaffeilchinico ( isomero I)	515.139 1	353, 191	-2.91	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	<b>87.75 ± 0.98</b>	<b>134.98 ± 4.85</b>	<b>7.38 ± 0.001</b>	<b>87.75 ± 0.98</b>	<b>239.90 ± 1.56</b>
Acido Dicaffeilchinico (isomero II)	515.117 4	353, 191	3.50	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	-	<b>2.37 ± 0.02</b>	-	<b>68.29 ± 0.03</b>	-
Acido Dicaffeilchinico (isomero III)	515.121 5	353, 191	-2.14	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	-	-	-	<b>5.84 ± 0.08</b>	-

Luteolin-7- <i>O</i> -rutinoside (scolimoside)	593.146 5	284, 191	1.84	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	-	+	<b>31.77 ± 0.36</b>	<b>28.77 ± 0.01</b>	-
Luteolin-7- <i>O</i> -rutinoside (isomero)	593.144 8	284, 191	1.69	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	-	-	+	-	-

## **Attività antiossidante**

I risultati relativi all'analisi qualitativa e quantitativa dei composti polifenolici hanno evidenziato una differenza significativa tra i campioni analizzati e per questo motivo l'attenzione è stata concentrata anche sulla loro attività antiossidante. La misurazione dell'attività antiossidante di una sostanza può essere difficile perché le specie radicaliche libere responsabili dello stress ossidativo sono numerose e reagiscono con biomolecole con velocità e meccanismi diversi. È difficile individuare un unico metodo di analisi che può misurare senza ambiguità la capacità di un composto di contrastare l'azione ossidante delle specie reattive, soprattutto quando si ha a che fare con matrici complesse quali alimenti o estratti di alimenti. I radicali liberi, infatti, differiscono per la reattività, per il tipo di biomolecola, per la matrice biologica in cui agiscono (ambiente idrofilo o lipofilo), nonché per il meccanismo con cui vengono generati. A causa della complessa reattività dei fitochimici, l'attività antiossidante di estratti alimentari e di prodotti alimentari non può essere valutata da un singolo metodo, ma almeno due diversi test sono raccomandati per la determinazione dell'attività antiossidante per stabilirne l'autenticità (Schlesier et al., 2002). Per questo motivo, l'attività antiossidante dei campioni è stata determinata mediante due metodi spettrofotometrici, DPPH e FRAP, ed espressa in equivalenti di Trolox (TES) (Tabella 3). La riduzione dell'assorbanza del DPPH è indicativa dell'attività antiradicalica (RSA), mentre il metodo FRAP viene utilizzato per determinare la capacità riducente di un campione.

Per quanto riguarda l'attività antiradicalica dei capolini determinata tramite il DPPH test, il genotipo Catanese risulta il più attivo (25,6% RSA), seguito da Capuanella e Istar F1 (20,7% e 20,6% RSA, rispettivamente), mentre Romolo F1 e Violet F1 sono caratterizzati da valori minori di capacità antiradicalica (7,9% e 7,2% RSA, rispettivamente).

Tra i gambi, invece, il genotipo Istar F1 ha mostrato la più alta attività antiradicalica (88,9% RSA), seguito da Catanese e Capuanella (84,3% e 52,9% RSA, rispettivamente), mentre Violet F1 e Romolo F1 sono i meno attivi (23,7% e 16,1% RSA rispettivamente).

La maggiore attività antiossidante dei gambi può essere associata ad un maggiore contenuto di derivati caffeilchinici rispetto ai capolini. Come riportato in precedenza, questi composti sono i principali responsabili dell'attività antiradicalica del carciofo (Yuan et al., 2012), e questa attività può essere influenzata dal numero e dalla posizione dei sostituenti caffeil sull'acido chinico, quindi non è possibile stabilire una correlazione lineare tra l'attività antiradicalica e il contenuto dei derivati caffeilchinici (Yuan et al., 2012).

Per quanto riguarda l'attività ferro-riducente misurata con il FRAP test, è interessante notare che tutti i campioni di capolini e gambi sono più attivi nell'attività ferro-riducente che in quella antiradicalica. A questo proposito è bene sottolineare che i derivati dell'apigenina, che sono più abbondanti nei capolini, sono poco attivi nel FRAP test, rispetto agli acidi caffeilchinici e derivati della luteolina (Pandino et al., 2011). Infatti la relazione struttura-attività (SAR) è legata all'attività di questi composti: i gruppi idrossilici e soprattutto la frazione catecol, 3-OH e i doppi legami 2,3 sembrano essere i fattori più importanti nel determinare un'elevata attività antiossidante (Firuzi et al., 2005). I risultati del FRAP test non evidenziano differenze significative tra tutti i campioni analizzati (valori compresi tra 180,376 e 219,73 mmol TE / 100 g fw), ad eccezione del genotipo Romolo F1, che ha mostrato il potere riducente più basso. Inoltre, in questo caso, il potere riducente del gambo è tre volte superiore a quello del capolino. Non sempre vi è una relazione diretta tra la quantità di composti fenolici e l'attività antiossidante dei campioni; ciò è dovuto al fatto che i diversi composti fenolici e sostanze non fenoliche

presentano attività antiossidanti diverse (Plumb et al., 1996), e che la presenza di elevati livelli di tali composti nei vegetali non sempre garantisce maggiore potere antiossidante (Tiveron et al., 2012).

Tab 3. Capacità antiossidante degli estratti ottenuti da differenti genotipi di *Cynara Scolymus*.\*

Estratti	DPPH	FRAP
<i>Romolo F1</i> capolino	2.33±0.06 <sup>a</sup>	18.77±0.25 <sup>a</sup>
<i>Romolo F1</i> gambo	4.51±0.07 <sup>b</sup>	67.38±0.22 <sup>b</sup>
<i>Violet F1</i> capolino	2.16±0.08 <sup>c</sup>	187.77±0.65 <sup>c</sup>
<i>Violet F1</i> gambo	5.13±0.08 <sup>d</sup>	201.36±0.59 <sup>d</sup>
<i>Istar F1</i> capolino	5.25±0.08 <sup>d</sup>	203.57±0.58 <sup>e</sup>
<i>Istar F1</i> gambo	21.56±0.04 <sup>e</sup>	211.23±0.14 <sup>f</sup>
<i>Capuanella</i> capolino	5.55±0.06 <sup>f</sup>	213.28±0.43 <sup>g</sup>
<i>Capuanella</i> gambo	13.15±0.16 <sup>g</sup>	216.53±0.47 <sup>h</sup>
<i>Catanese</i> capolino	6.45±0.21 <sup>h</sup>	180.46±0.08 <sup>i</sup>
<i>Catanese</i> gambo	20.97±0.03 <sup>i</sup>	219.36±0.37 <sup>l</sup>

<sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i,l</sup> I valori medi nelle colonne con differenti lettere come indice sono stati valutati significativamente differenti tramite il test statistico Tukey–Kramer (P < 0.05).

\* I valori sono espressi come media (µmol TEs /100g peso fresco) ± SD (n=5).

### Effetti della digestione gastro-intestinale simulata in vitro

Volendo valutare gli effetti del processo di digestione gastro-intestinale in vitro sul profilo polifenolico qualitativo e quantitativo del carciofo, lo studio è proseguito sul genotipo più completo, il Violet F1, per valutare i cambiamenti che avvengono a carico dei singoli metaboliti bioattivi. Essendo i derivati caffeilchinici i polifenoli più rappresentativi del carciofo, è stata focalizzata l'attenzione esclusivamente su questa sottoclasse di composti.

Oggetto di tale studio sono stati il capolino fresco, il capolino cotto al microonde ed il gambo fresco di *Cynara Scolymus*. I dati di composizione dei vegetali di solito sono determinati sulla matrice cruda; tuttavia, ai fini di un'analisi nutrizionale bisogna tener conto che la maggior parte di essi sono cucinati in modi differenti prima di essere

consumati. Questi processi di cottura potrebbero provocare cambiamenti nel profilo qualitativo e quantitativo dei metaboliti secondari (Rehman et al., 2003; Miglio et al., 2008). Di conseguenza, poichè il carciofo è un alimento che generalmente si consuma cotto, sarebbe stato inverosimile non considerare questa opzione. Sono stati poi sottoposti a digestione anche capolino e gambo crudi in quanto generalmente in tale forma vengono utilizzati dalle industrie produttrici di nutraceutici.

Dall'analisi dei risultati, è apparso subito chiaro che il processo di cottura aveva aumentato notevolmente il contenuto polifenolico del capolino (Fig. 13): da 43,04 mg / 100g peso fresco di acidi caffeilchinici totali quantizzati nel campione crudo a 78,09 mg / 100g peso fresco nel campione cotto. In letteratura scientifica ci sono dati discordanti riguardo gli effetti che i diversi processi di cottura possono avere sul contenuto polifenolico nei vegetali. Per alcuni di essi, come broccoli, pomodori e spinaci, diversi studi scientifici dimostrano come la cottura al microonde, la bollitura e la frittura provochino una perdita di composti polifenolici (Zhang et al., 2004; Sahlin et al., 2004); riguardo invece, zucca, piselli e porri è stato dimostrato che il processo di cottura non ha influenzato il profilo polifenolico del materiale di partenza (Turkmen et al., 2006). Riguardo il carciofo, i nostri dati sono in accordo con quelli già presenti in letteratura. Ferracane et al. (2008) mostra, infatti, che vi è un aumento notevole dei derivati caffeilchinici successivamente ai processi di bollitura, cottura al vapore e frittura dei campioni. Probabilmente tale effetto è il risultato di eventi di isomerizzazione e idrolisi che conducono ad una notevole redistribuzione delle concentrazioni degli acidi fenolici. Questo è particolarmente evidente per gli acidi dicaffeilchinici, alcuni dei quali hanno concentrazioni molto basse nel prodotto grezzo o sono addirittura assenti e poi si ritrovano dopo il trattamento. Secondo Slanina et al. (2001) l'aumento nel contenuto di isomeri degli acidi caffeilchinici durante il trattamento termico è causato da processi di

transesterificazione intramolecolare degli acidi 5-*O*-caffeilchinico e 1,5-di-*O*-caffeilchinico provocati dalle alte temperature. Un'altra ipotesi avallata da Llorach et al. (2002) è che la perdita di composti fenolici nel campione crudo potrebbe essere provocata da reazioni catalizzate dalla polifenolo ossidasi (PPO). Nel caso, invece, della cottura della matrice alimentare, le alte temperature potrebbero inattivare la PPO con la conseguente protezione dei composti fenolici.

Questi risultati possono essere di grande aiuto alle aziende produttrici di nutraceutici, in quanto queste ultime potrebbero valutare l'ipotesi di applicare stress termici, come appunto la cottura, alle matrici alimentari di partenza, di modo da aumentarne la resa in composti polifenolici.

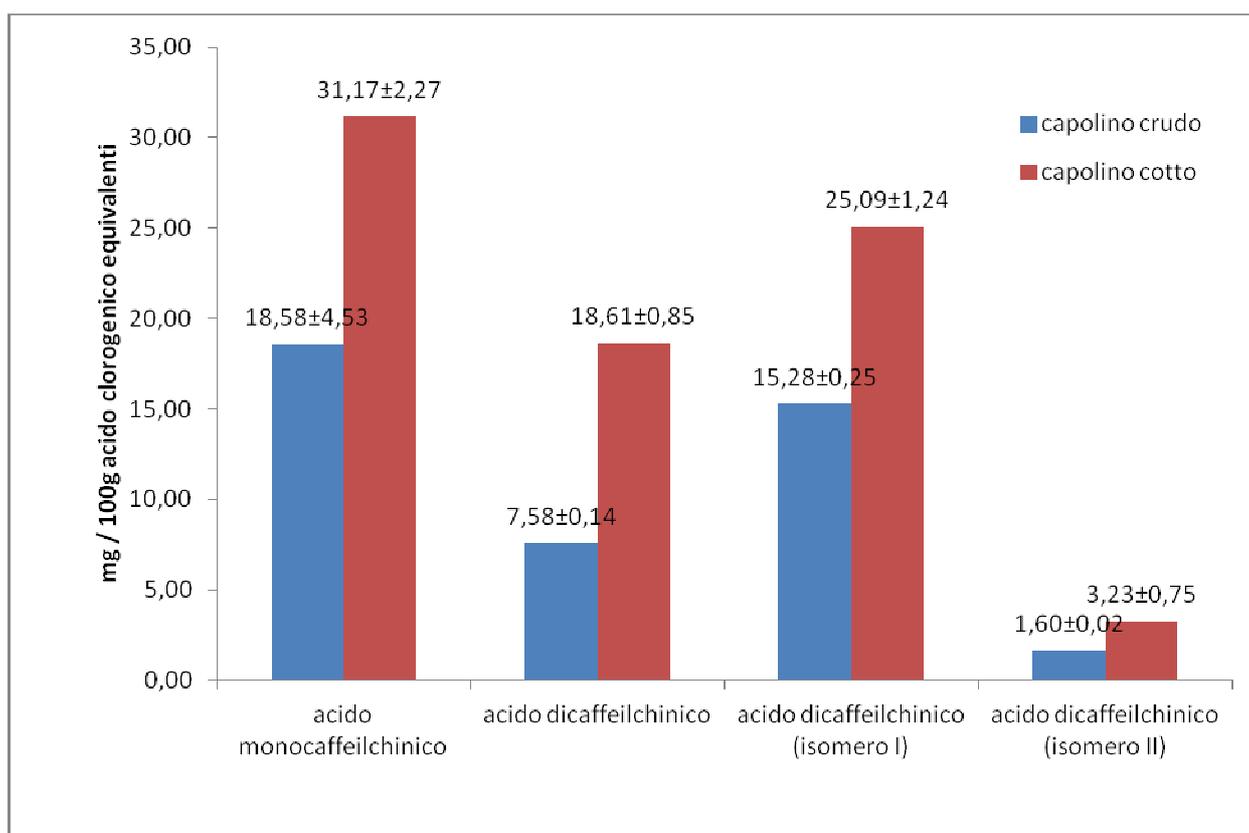


Fig. 13: Derivati caffeilchinici in capolino crudo e cotto

La bioaccessibilità dei derivati caffeilchinici nel lume intestinale si è rivelata molto bassa; dai risultati appare chiaro che solo una piccola percentuale di composti polifenolici si rende disponibile all'assorbimento nel lume intestinale (Fig. 14). Per il digerito GI del capolino crudo, solo il 6% degli acidi caffeilchinici presenti nel materiale di partenza risulta bioaccessibile; per il digerito GI del gambo crudo, invece, il 17% dei metaboliti bioattivi si ritrovano nel lume; e infine, per il digerito GI del capolino cotto ben il 28% dei derivati caffeilchinici risultano bioaccessibili. Studi relativi alla digestione gastro-intestinale in vitro del carciofo sono pochissimi. I nostri risultati sono in accordo con D'Antuono et al. (2015) che dimostra come diminuisce la bioaccessibilità di acido clorogenico e acidi 3,5-*O*-dicaffeilchinico e 1,5-*O*-dicaffeilchinico, a causa della loro sensibilità alle condizioni di digestione gastrica ed intestinale. E' anche da considerare la quota di polifenoli legata alla componente fibrosa del carciofo, che quindi non è disponibile alla quantizzazione nello stomaco e nell'intestino tenue, ma che viene liberata solo nel colon dopo fermentazione della fibra da parte degli enzimi batterici (Saura-Calixto, 2011).

Inoltre, in mancanza di dati relativi allo studio di digestione gastro-intestinale simulata in vitro riguardo le differenti porzioni della pianta di carciofo, si può ipotizzare che la differente entità di degradazione dei composti polifenolici, e di conseguenza la differente percentuale di bioaccessibilità di tali composti, sia dovuta alla basilare differenza in composizione qualitativa e quantitativa delle due parti della pianta di *Cynara Scolymus* e in particolare al diverso contenuto polifenolico di partenza.

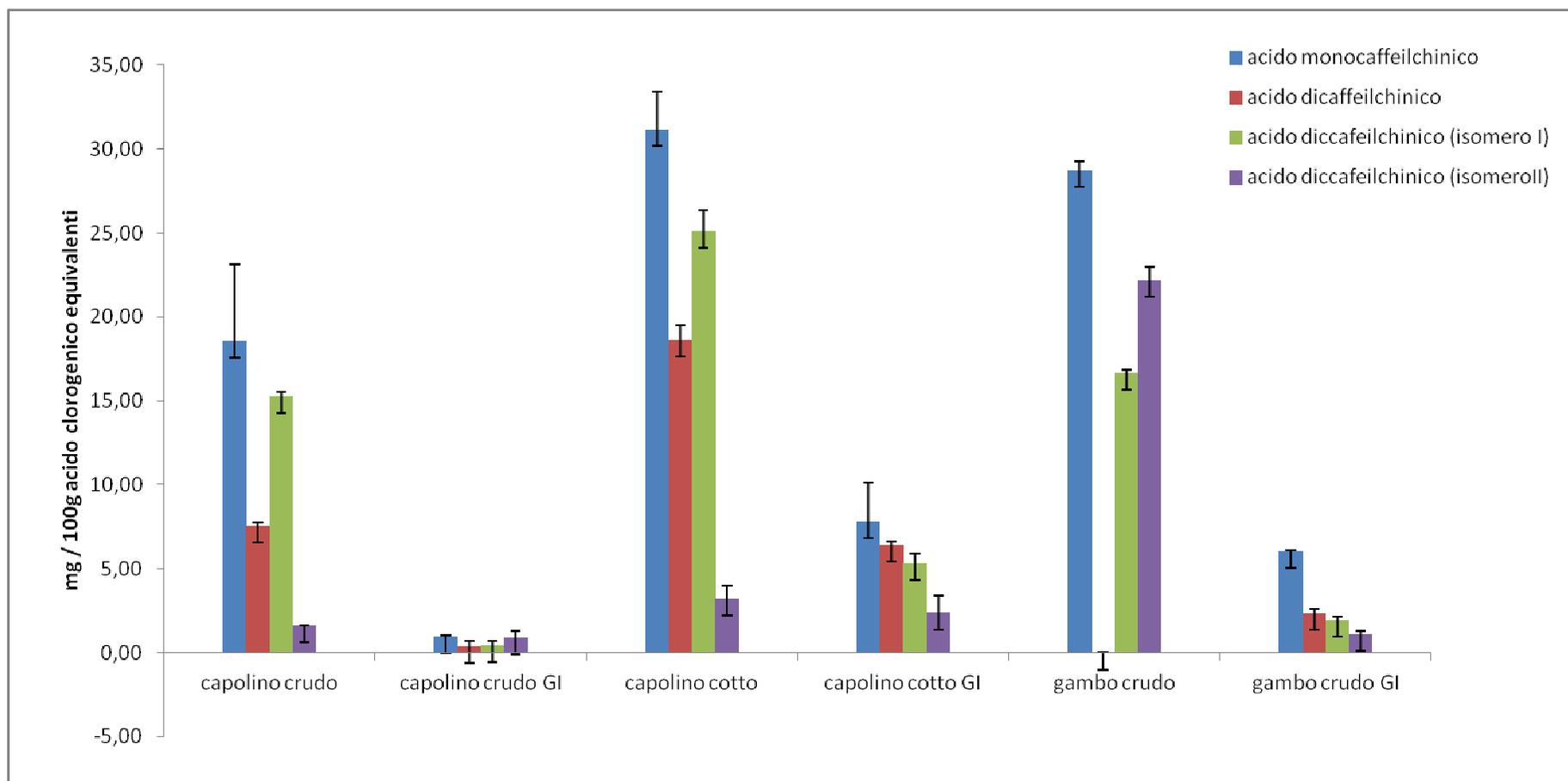


Fig. 14: derivati caffeilchinici nei campioni sottoposti a digestione

L'ipotesi che la degradazione dei polifenoli avvenisse principalmente in ambiente gastrico, a causa del pH acido, ha indotto a ripetere il processo di digestione GI simulata in vitro utilizzando l'estratto in polvere di *Cynara Scolymus*, titolato al 3% in acido clorogenico, in forma di capsule gastroresistenti. I risultati mostrano che la quota di polifenoli presente nell'estratto di partenza risulta totalmente bioaccessibile, a dimostrazione che utilizzando una forma farmaceutica gastroprotetta si evita la parziale perdita della dose ingerita (Fig. 15). Ovviamente in questo caso, non è da considerare la quota di polifenoli legati alla fibra, in quanto trattasi di un estratto polifenolico purificato. I dati ottenuti sono di rilevante importanza data la presenza in commercio di integratori alimentari a base di estratto di *Cynara Scolymus* formulati in semplici compresse o capsule. Mediante la gastroprotezione si veicola la componente bioattiva direttamente al lume intestinale permettendo un assorbimento totale della dose somministrata e di conseguenza garantendo un migliore effetto terapeutico in vivo.

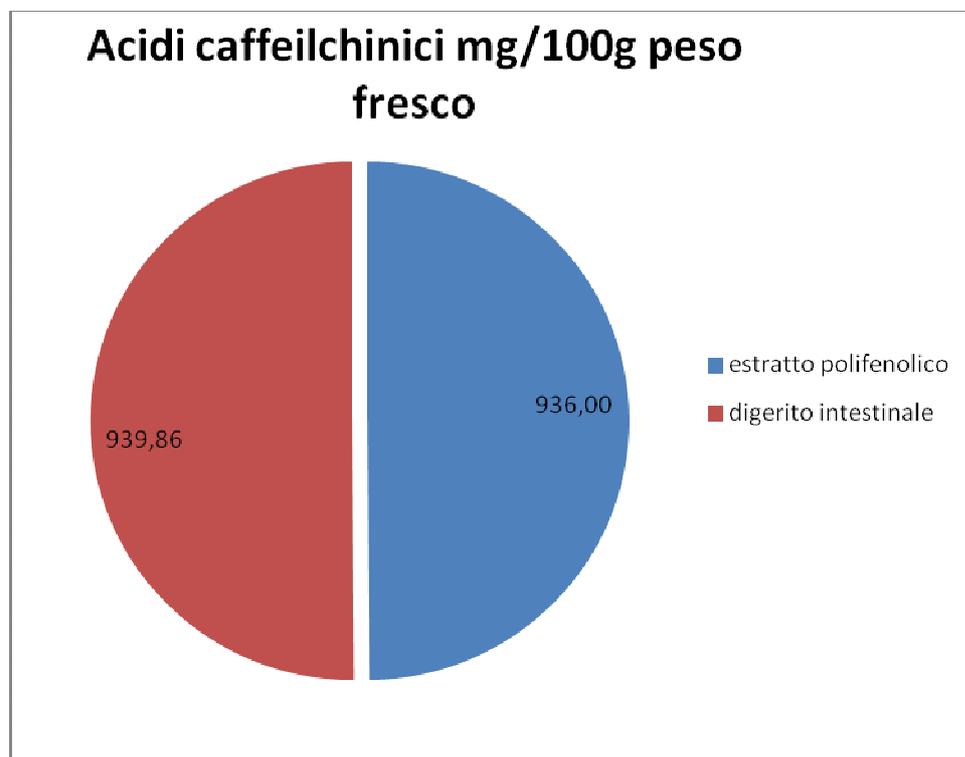


Fig. 15: acidi caffeilchinici dopo digestione in capsule gastroresistenti

## Test cellulari in vitro

I test svolti hanno rivelato in tutti i casi una proporzionalità diretta tra effetto terapeutico e contenuto in derivati caffeilchinici del campione. Infatti nei diversi saggi, l'estratto del capolino cotto al microonde risulta sempre il più attivo biologicamente, seguito dal gambo crudo e dal capolino crudo. I digeriti intestinali sono genericamente tutti poveri in composti polifenolici rispetto agli estratti di partenza, per cui in linea generale non si registrano effetti apprezzabili sui vari parametri metabolici studiati.

I test condotti relativi alla capacità dei polifenoli del carciofo di inibire l'up-take ed il trasporto di glucosio da parte delle cellule Hep-G2 mostrano che tra gli estratti l'attività migliore è svolta dal capolino cotto in quanto più ricco in derivati caffeilchinici ( $R^2=0.942$ ), seguito da gambo crudo e capolino crudo; mentre, tra i digeriti GI, il più attivo è quello del capolino cotto, seguito dal gambo crudo, e per ultimo il capolino crudo che ha un'attività insignificante (Fig. 16).

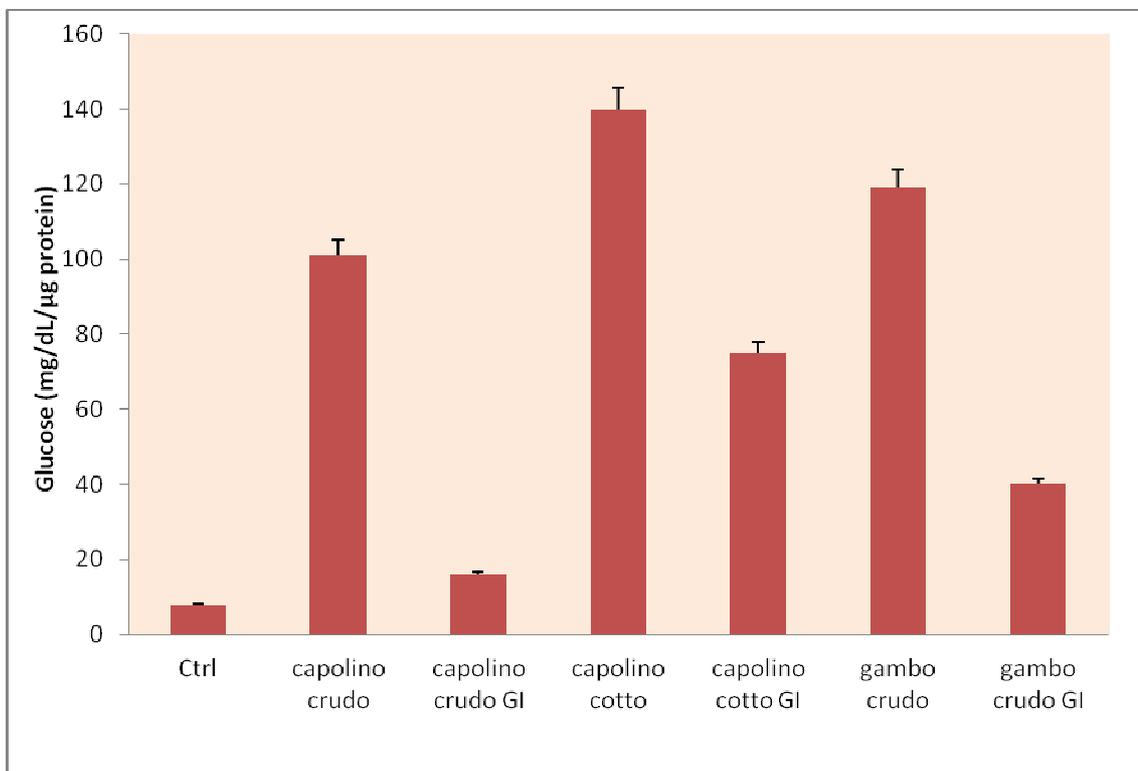


Fig. 16: inibizione dell'up-take di glucosio extracellulare

Il trasporto del glucosio attraverso le membrane è mediato dai trasportatori facilitati di glucosio (GLUTs) che risultano essere molto espressi dalle cellule maligne; per questo motivo le cellule HepG2 rappresentano un buon modello per tale studio in vitro (Wu et al., 2009).

E' già stata dimostrata l'azione ipoglicemizzante dell'estratto polifenolico di capolino di *Cynara Scolymus* su uomini (Nazni et al., 2006) e su animali da laboratorio (Fantini et al., 2011). Fino ad ora, tale effetto di riduzione della glicemia post-prandiale è stato assegnato alla componente fibrosa del carciofo, ma Fantini et al. utilizza nel suo studio, un estratto polifenolico di capolino di carciofo purificato dalle fibre. Data la persistenza dell'effetto terapeutico, altri studi sono necessari per attribuire tale azione ad uno specifico componente del pattern polifenolico. Data la correlazione positiva tra effetto terapeutico e contenuto in acidi caffeilchinici che il nostro studio evidenzia, possiamo affermare che sicuramente essi rappresentano dei principali responsabili dell'effetto ipoglicemizzante in vitro.

Dato che intestino e fegato sono tessuti principalmente coinvolti nel metabolismo dei lipidi, le cellule Hep-G2 anche in questo caso risultano essere uno strumento utile per la valutazione dell'assorbimento e l'accumulo dei lipidi cellulare.

Riguardo l'effetto degli estratti di *Cynara Scolymus* sul metabolismo dei trigliceridi (Fig. 17), i test in vitro mostrano che tra i diversi campioni è ancora una volta l'estratto del capolino cotto il più attivo nell'inibire l'up-take cellulare dei trigliceridi data la sua ricchezza in derivati caffeilchinici ( $R^2=0.699$ ); esso è in grado di aumentare la quota di trigliceridi extracellulare di 109 volte rispetto al controllo. In ordine decrescente di attività, troviamo subito dopo l'estratto del gambo crudo (+60 volte), i digeriti GI del gambo crudo (+40,5 volte) e del capolino cotto (+36 volte), e in ultimo l'estratto del capolino crudo ed il suo digerito GI (+30 volte e +5,5 volte rispettivamente). In questo caso, non vi è un'ottima

correlazione positiva tra l'effetto metabolico e il contenuto di acidi caffeilchinici del campione, difatti i due digeriti intestinali di gambo crudo e capolino cotto risultano più attivi dell'estratto del capolino crudo.

E' stato inoltre valutato l'effetto di estratti e digeriti GI sull'attività della Lipasi pancreatica (Fig. 18): in accordo con i dati precedenti, l'estratto del capolino cotto inibisce più efficacemente l'azione dell'enzima (-60%) ( $R^2=0.9698$ ) tra i diversi campioni (gambo crudo: -42%; capolino crudo: -29%; digerito GI capolino cotto: -18%; digerito GI gambo crudo: -11%), mentre il meno attivo risulta essere proprio il digerito GI del capolino crudo (-3%), con un'attività quasi sovrapponibile a quella del controllo.

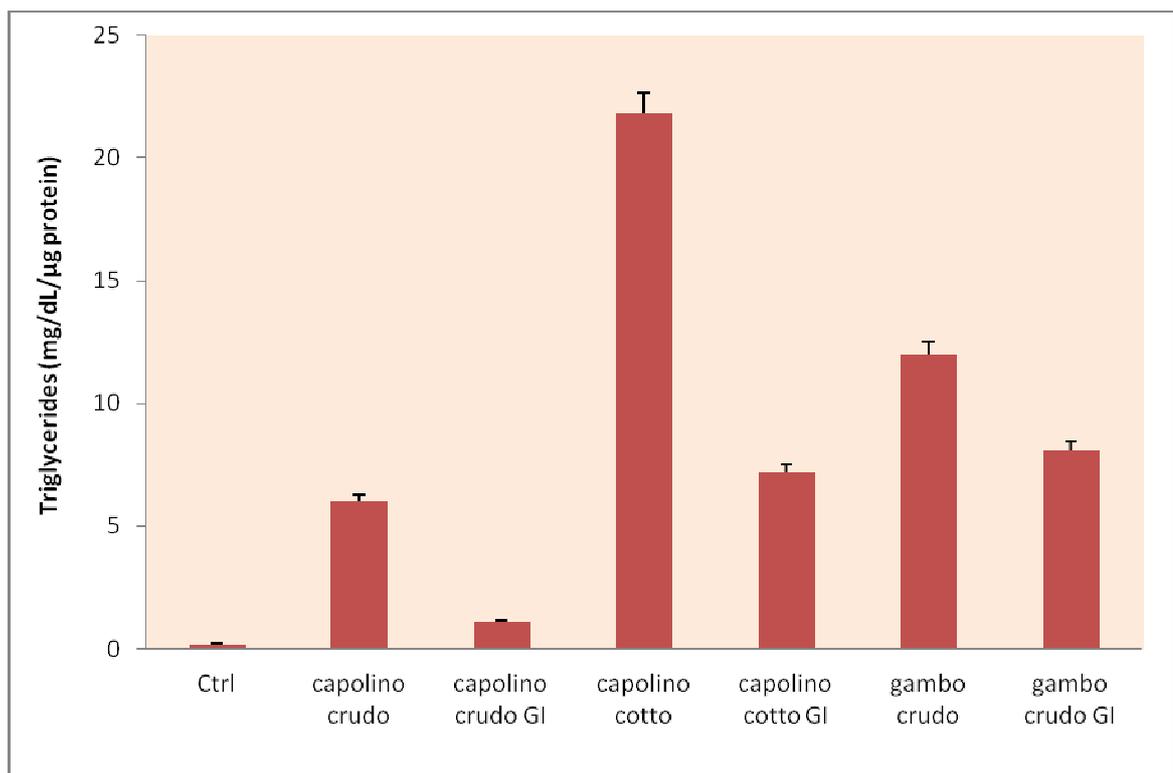


Fig. 17: inibizione dell'up-take dei trigliceridi

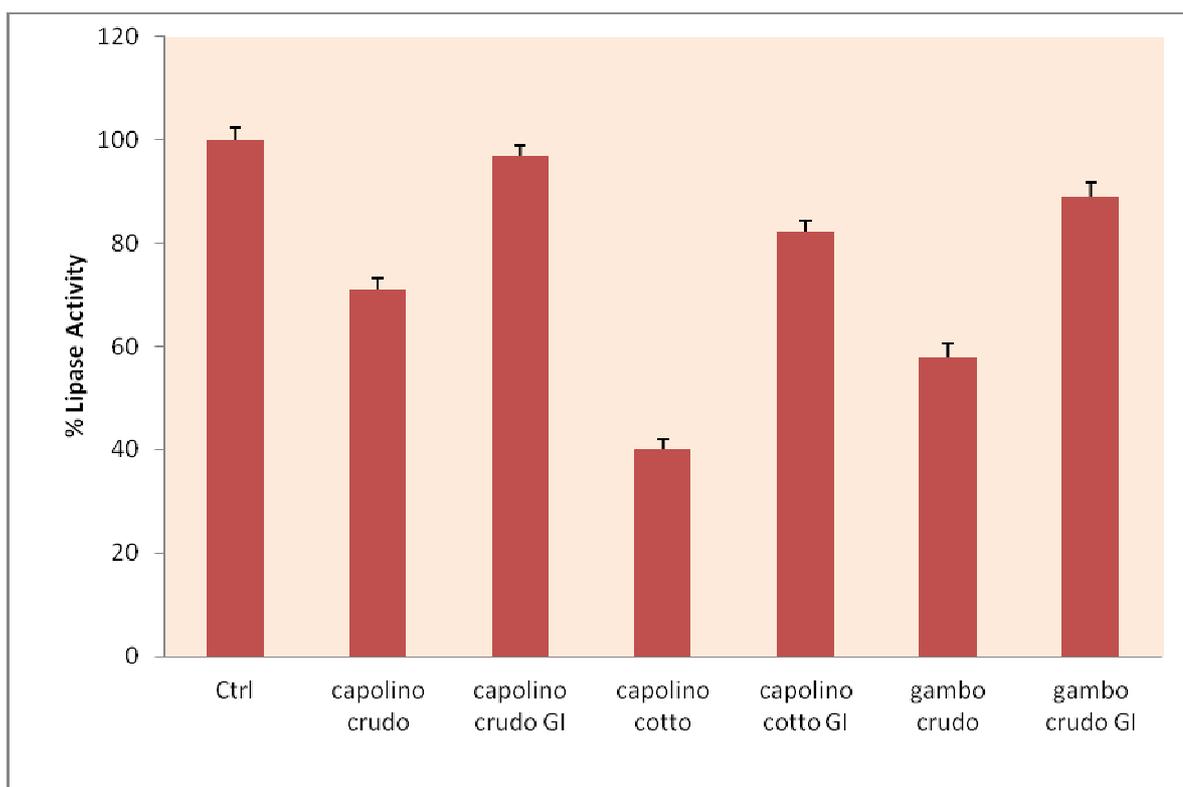


Fig. 18: inibizione dell'attività della lipasi pancreatica

Anche il metabolismo del colesterolo è influenzato dai composti polifenolici presenti negli estratti di *Cynara Scolymus* (Fig. 19). I risultati mostrano che ancora una volta l'estratto del capolino cotto è il più attivo nell'inibire l'up-take del colesterolo cellulare ( $R^2=0.9412$ ), provocando un aumento del suo contenuto extracellulare di 53 volte rispetto al controllo. Il digerito GI del capolino crudo è sempre il meno attivo.

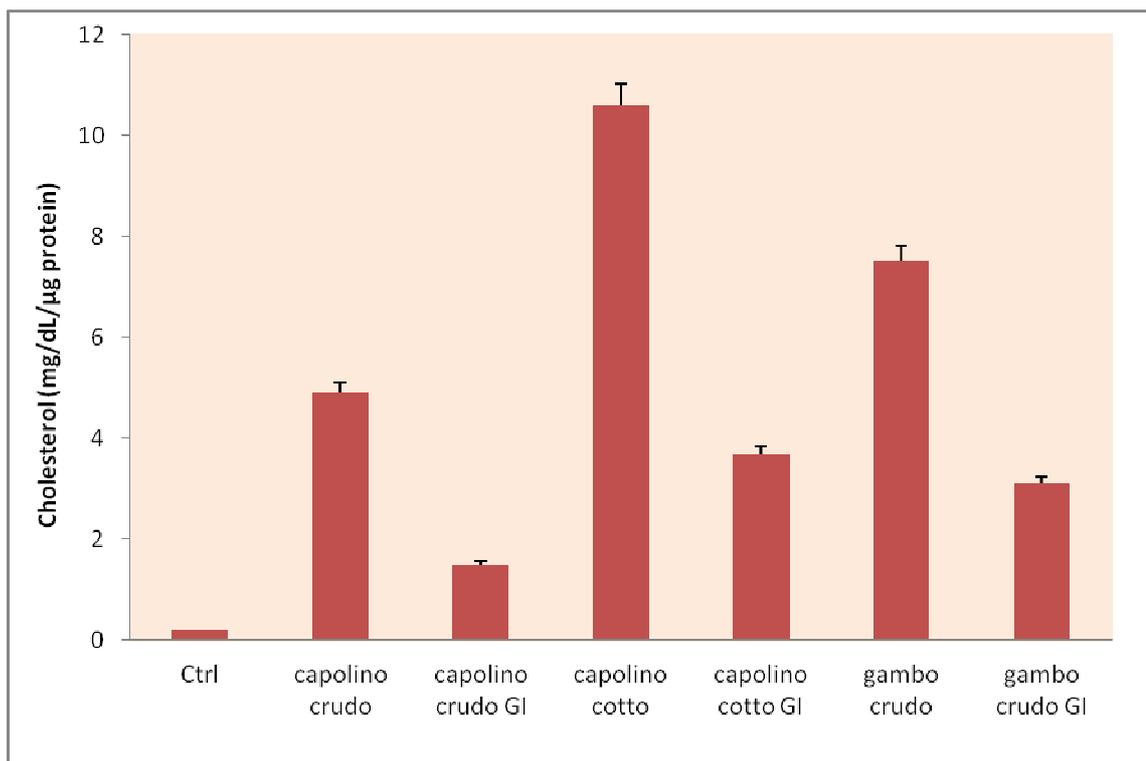


Fig. 19: inibizione dell'up-take del colesterolo

L'estratto polifenolico del capolino cotto è il più efficace nell'aumentare l'espressione del recettore di legame per le lipoproteine a bassa densità (LDL) riducendone la quota extracellulare, e nell'aumentare l'espressione della apolipoproteina A1 (APOA1) nelle cellule Hep-G2 (Fig. 20 e 21) (-75%; +1400%). Seguono poi in ordine di attività decrescente l'estratto polifenolico del gambo crudo (-62.5%; +1071.4%), l'estratto del capolino crudo (-55%; +757.1%), il digerito GI del capolino cotto (-45%; +528.6%), il digerito GI del gambo crudo (-23.5%; +257.1%) e per ultimo il digerito GI del capolino crudo (-13.5%; +121.4). Si evidenzia sempre una correlazione positiva tra effetto terapeutico dei campioni e contenuto in acidi caffeilchinici, per il saggio relativo alla quantizzazione delle LDL extracellulari e per quello relativo alla APOA1 ( $R^2=0.9147$  e  $R^2=0.9816$  rispettivamente).

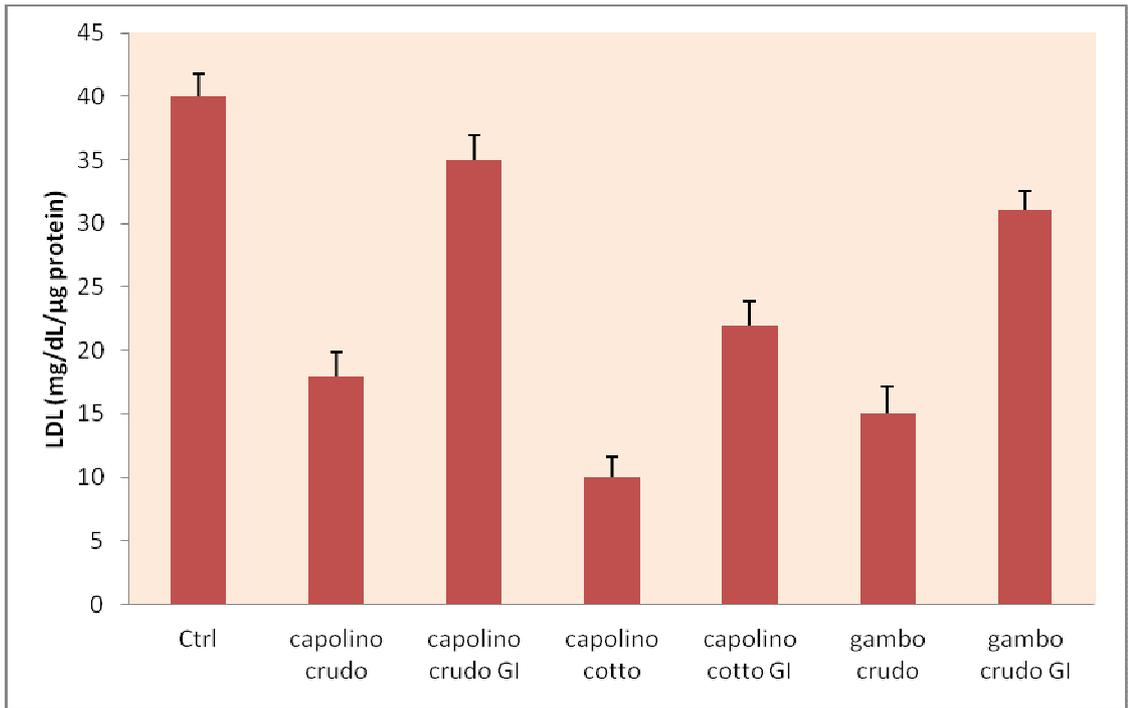


Fig. 20: concentrazione delle LDL nel mezzo extracellulare

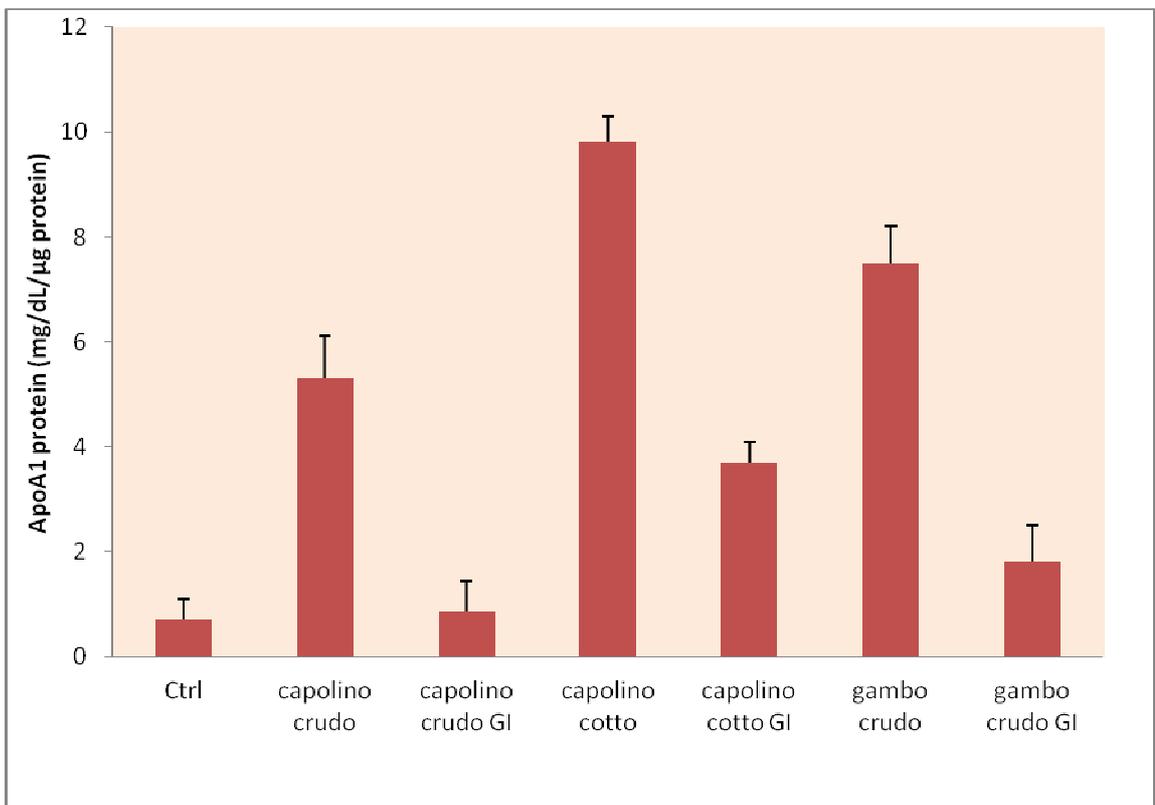


Fig. 21: concentrazione della ApoA1 nel mezzo extracellulare

Heidarian et al. (2011) dimostra che l'estratto acquoso di foglie di *Cynara Scolymus* provoca una riduzione di colesterolo totale, trigliceridi, lipoproteine a bassa densità (LDL), lipoproteine a più bassa densità (VLDL) e indice aterogenico in ratti diabetici. Acidi caffeilchinici e flavonoidi sono ritenuti responsabili per tale effetto antiaterogenico (Gebhardt, 1997; Llorach et al., 2002; Pittler et al., 2002; Wang et al., 2003).

Come discusso in precedenti lavori scientifici, tra i vari derivati caffeilchinici sono coinvolti in particolare nell'effetto ipocolesterolemizzante l'acido clorogenico e la cinarina (Wan et al. 2013; Clifford, 2000).

Wan et al. (2013) dimostra che il trattamento a base di acido clorogenico per 28 giorni nei ratti ipercolesterolemici ha prodotto significativi effetti ipocolesterolemizzanti, in termini di riduzione del colesterolo totale e dei livelli di LDL plasmatici. Dati i miglioramenti dell'indice aterogenico e del fattore di rischio cardiaco, è stato dedotto che l'acido clorogenico possiede capacità ateroscleroprotettive e cardioprotettive, rispettivamente. Inoltre, l'integrazione con acido clorogenico potrebbe presentare una buona funzione epatoprotettiva, in termini di riduzione delle deposizioni di grasso nel fegato.

In particolare, Wan et al. (2013) descrive che l'acido clorogenico interviene nella regolazione genetica degli enzimi coinvolti nel catabolismo del colesterolo. L'enzima CYP7A1 è coinvolto nella sintesi degli acidi biliari, che rappresentano il principale meccanismo di eliminazione di colesterolo. L'espressione di tale enzima è up-regolata da un'elevata quota di colesterolo plasmatico (Yiu et al. 2011). In ratti ipercolesterolemici trattati con acido clorogenico, si osserva una riduzione nell'espressione dell'mRNA dell'enzima CYP7A1, che rappresenta una conseguenza e non la causa della riduzione del colesterolo plasmatico. Inoltre, Wan et al. (2013) mostra un coinvolgimento dell'acido clorogenico anche nella regolazione dei recettori nucleari PPARs. Il meccanismo esatto non è ancora conosciuto, ma sembrerebbe che l'acido clorogenico generi un'up-regolazione

nell'espressione dell'mRNA dei PPARs, stimolando il metabolismo lipidico nel fegato.

Gebhardt (1998) mostra ancora un altro meccanismo d'azione attraverso il quale i metaboliti bioattivi del carciofo possono modulare il metabolismo del colesterolo.

L'estratto di carciofo esercita una modulazione negativa indiretta sull'enzima idrossimetilglutaril-CoA-reduttasi (HMGCoA-reduttasi) coinvolto nella biosintesi del colesterolo. La luteolina rappresenta il composto più attivo, seguito da cinaroside e acido clorogenico. Poichè l'estratto di carciofo può anche aumentare l'escrezione biliare di colesterolo attraverso un'azione coleretica (Saézn Rodriguez et al. 2002), entrambi i meccanismi possono contribuire alla riduzione del colesterolo plasmatico.

E' stata dimostrata l'azione inibitrice sulla lipasi pancreatica da parte degli estratti polifenolici di carciofo, da parte di Villiger et al. (2015). Utilizzando un integratore alimentare a base di *Cynara Scolymus*, *Sylibum marianum*, *Taraxacum officinale* e *Peumus boldus*, hanno dimostrato che l'estratto di carciofo inibisce dal 17 al 20% l'attività dell'enzima ad una concentrazione di 100 µg/mL. E' risaputo che i polifenoli dai vegetali hanno un'elevata affinità per le proteine, maggiormente attraverso interazioni idrofobiche e legami a idrogeno. Quindi, estratti di diversi vegetali potrebbero mostrare un'attività inibitoria su enzimi a causa della denaturazione proteica (Krasteva et al. 2011).

Infine, è stata valutata l'influenza degli estratti polifenoli e dei digeriti GI di carciofo sulla proliferazione cellulare e lo stress ossidativo. Tutti i campioni provocano un aumento della proliferazione cellulare; quest'azione è correlata positivamente con il contenuto in acidi caffeilchinici ( $R^2=0.9596$ ). Difatti, l'estratto polifenolico del capolino cotto mostra l'attività più alta (+76%); troviamo poi l' estratto del gambo crudo (+52%), l'estratto del capolino crudo (+37%), i digeriti GI del capolino cotto (+24%), gambo crudo (+16%) e capolino crudo (+5%) (Fig. 22).

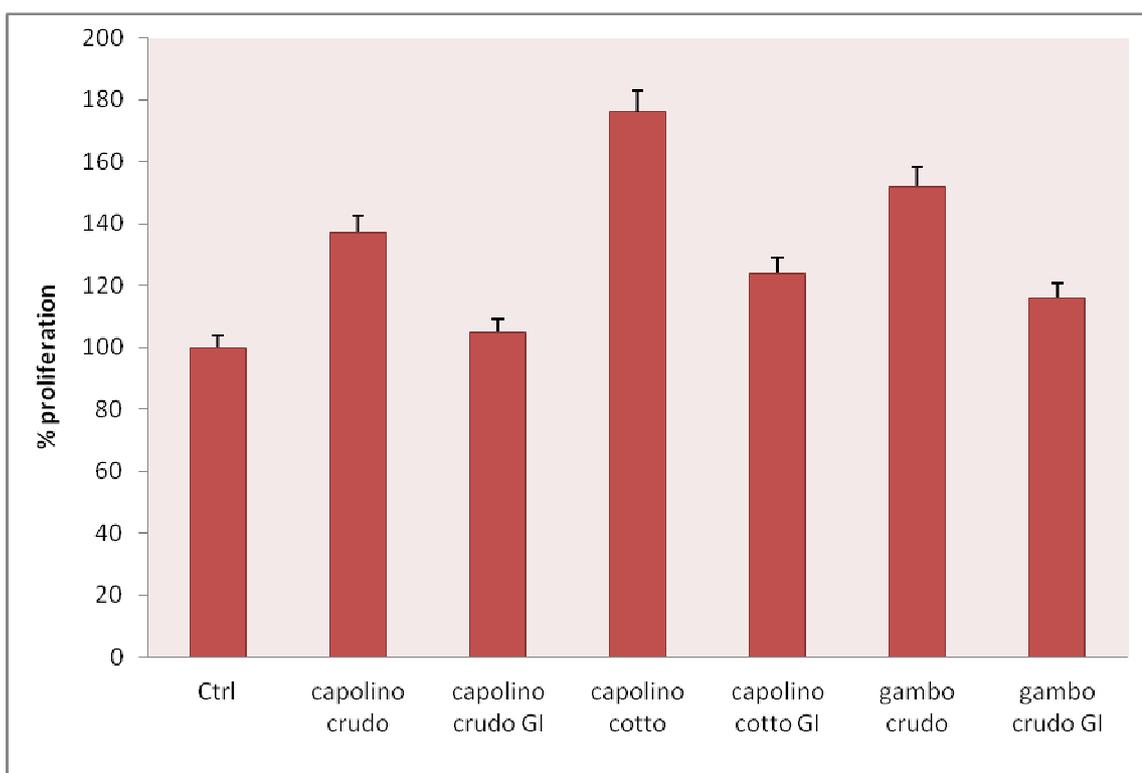


Fig. 22: attività degli estratti sulla proliferazione cellulare

Questa capacità probabilmente è dovuta alla riduzione delle sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico prodotte dalla perossidazione lipidica (TBARS) (Fig. 23). In linea con il test precedente, l'estratto del capolino cotto è il più attivo nel ridurre la quota di TBARS cellulari rispetto al controllo (-68%), seguito dagli estratti di gambo crudo (-60%) e capolino crudo (-36%), digeriti GI del capolino cotto (-24%), gambo crudo (-16%) e capolino crudo (-8%).

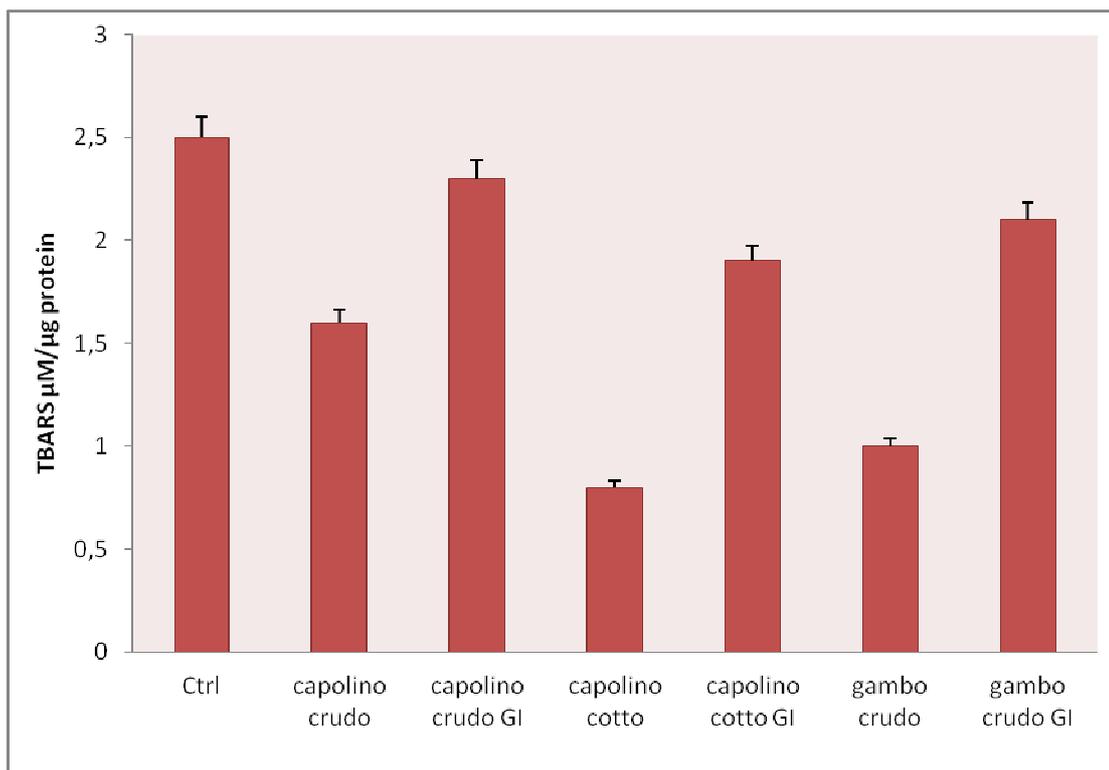


Fig. 23: quantizzazione dei TBARS

Poichè le specie reattive dell'ossigeno (ROS) hanno una vita media molto breve, sono difficili da misurare direttamente. Si possono invece misurare i prodotti del danno dello stress ossidativo come i TBARS (Pryor, 1991).

I nostri risultati sono in accordo con studi precedenti. Heidarian et al. (2011) mostra che in ratti diabetici trattati per 21 giorni con estratto acquoso di foglie di carciofo si ha una significativa riduzione dei livelli di TBARS plasmatici, e contemporaneamente si registra un aumento dell'attività antiossidante.

Evidenze in vitro indicano che i fitochimici antiossidanti possono avere effetti imprevedibili, che possono essere specifici per il tipo di cellula, struttura e concentrazione-dipendenti (Choueiri et al. 2012). Essi possono contrastare i ROS o generare più stress ossidativo. Come detto in precedenza, i derivati caffeilchinici sono i principali responsabili

dell'attività antiradicalica del carciofo (Yuan et al., 2012), e questa attività può essere influenzata dal numero e dalla posizione dei sostituenti caffeil sull'acido chinico. I gruppi idrossilici e soprattutto la frazione catecol, 3-OH e i doppi legami 2,3 sembrano essere i fattori più importanti nel determinare un'elevata attività antiossidante (Firuzi et al., 2005).

Non sempre vi è una relazione diretta tra la quantità di composti fenolici e l'attività antiossidante dei campioni; ciò è dovuto al fatto che i diversi composti fenolici e sostanze non fenoliche presentano attività antiossidanti diverse (Plumb et al., 1996), e che la presenza di elevati livelli di tali composti nei vegetali non sempre garantisce maggiore potere antiossidante (Tiveron et al., 2012).

Per confermare i nostri dati riguardanti la proliferazione cellulare e lo stress ossidativo, è stata valutata anche la quota di ossido nitrico (NO) extracellulare (Fig. 24). L'estratto polifenolico del capolino cotto provoca un aumento di NO extracellulare dell'866% rispetto al controllo, seguito dagli estratti di gambo crudo (+680%) e capolino crudo (+560%), e infine dai digeriti GI di capolino cotto (+400%), gambo crudo (+253,3%) e capolino crudo (+120%).

È ben noto che le specie reattive dell'azoto (RNS), compreso NO, sono espresse in molte cellule, quali macrofagi ed epatociti, dopo stimolazione dei processi immunologico o infiammatorio, e sono rilasciati per agire come secondi messaggeri per modulare le diverse vie di segnale (Akifusa et al., 2008). NO è un messaggero diffusibile, multifunzionale e transcellulare che è implicato nella regolazione di numerose condizioni fisiologiche e patologiche. In particolare, il continuo rilascio di NO dalle cellule svolge un ruolo nel mantenimento dell'endotelio vascolare in uno stato attivato e il sistema nervoso centrale e periferico nel corretto funzionamento della trasduzione del segnale. In una condizione di stress ossidativo, una grande quantità di NO può combinarsi con i radicali superossidi ( $O_2^-$ ) per formare perossinitrito ( $ONOO^-$ ), che è in grado di danneggiare lipidi, proteine e acidi

nucleici, fino a indurre la morte cellulare per apoptosi (Chung et al., 2001). Al contrario, in uno stato di benessere cellulare NO viene massicciamente rilasciato, quindi la sua concentrazione nel mezzo extracellulare potrebbe essere considerata come inversamente proporzionale allo stato di stress ossidativo della cellula. I nostri risultati mostrati in Fig. 24 sono una conferma di quanto detto in precedenza, riguardo la capacità dei diversi campioni di aumentare la proliferazione cellulare e ridurre i livelli delle specie reattive dell'ossigeno.

Difatti, nel caso dell'estratto polifenolico del capolino cotto si ha un aumento del rilascio di NO extracellulare di 8,6 volte più grande del controllo. Seguono poi gli estratti di gambo crudo (+ 6,8 volte) e capolino crudo (+ 5,6 volte), ed i digeriti GI di capolino cotto (+ 4 volte), gambo crudo (+ 2,5 volte) e capolino crudo (+ 1,2 volte).

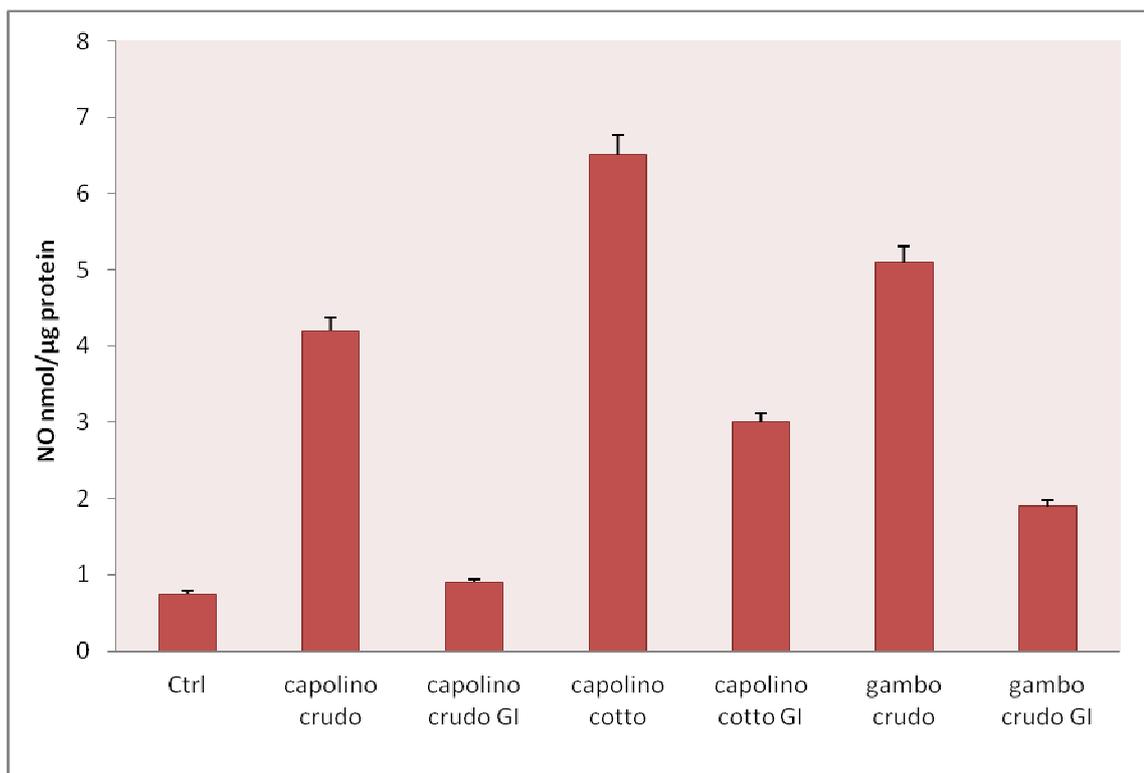


Fig. 24: rilascio di NO extracellulare

Anche in questo caso si evidenzia una correlazione positiva tra effetto terapeutico e contenuto in derivati caffeilchinici degli estratti ( $R^2=0.9684$ ).

Questi risultati devono essere ovviamente interpretati come effetti benefici da poter ottenere su cellule sane mediante la somministrazione di estratto polifenolico di carciofo.

Come detto in precedenza, è stato dimostrato che l'estratto di *Cynara Cardunculus* è in grado di aumentare la produzione di NO in colture di cellule aortiche endoteliali, e che, aggiungendo al mezzo di incubazione luteolina ed apigenina si ottenga un migliore rilassamento aortico (Rossoni et al., 2005). Focalizzando l'attenzione sull'NO sintetasi endoteliale (eNOS), Li et al. (2004) hanno mostrato che i flavonoidi del carciofo possono rappresentare dei mediatori nella sua up-regolazione. In particolare la luteolina e il cinaroside aumentano l'attività dei promotori di eNOS e l'espressione dell'mRNA di eNOS.

## **Conclusioni**

I risultati ottenuti evidenziano che, riguardo il profilo qualitativo e quantitativo dei metaboliti secondari, non vi sono grandi differenze tra i capolini di diverso genotipo di carciofo; tra i gambi invece, si evidenziano notevoli differenze maggiormente quantitative, essendo i due ibridi aziendali Violet F1 e Istar F1 più ricchi rispetto agli altri. E' interessante sottolineare che il gambo, la cosiddetta porzione di "scarto" alimentare, è molto più ricca in composti polifenolici rispetto al capolino corrispondente, per ogni genotipo analizzato.

Riguardo l'attività antiossidante, i campioni analizzati sono più attivi nell'attività ferro-riducente che in quella antiradicalica. Nel DPPH test si evince una correlazione con il contenuto polifenolico totale, in quanto gli estratti di capolini e gambi presentano attività diverse tra di loro ed, in particolare, i gambi possiedono un'attività antiradicalica visibilmente maggiore dei rispettivi capolini; nel FRAP test, invece, le differenze di attività tra i diversi campioni si assottigliano notevolmente, ad eccezione del genotipo Romolo che risulta molto meno attivo degli altri campioni.

Gli studi di bioaccessibilità della componente polifenolica hanno dimostrato prima di tutto che sottoponendo la matrice alimentare ad uno stress termico, come la cottura, si ha un incremento notevolmente nel contenuto di tali metaboliti bioattivi. I derivati caffeilchinici risultano poco bioaccessibili, sia per questioni di sensibilità alle condizioni di digestione gastrica ed intestinale, che per effetto chelante della componente fibrosa presente nel carciofo. Formulare l'estratto polifenolico purificato di *Cynara Scolymus* in compresse gastroresistenti preserva i metaboliti bioattivi dalle condizioni aggressive di pH acido gastrico, ottenendo una biodisponibilità degli stessi del 100% rispetto alla dose somministrata.

Infine, i test cellulari per la valutazione di eventuali effetti terapeutici su parametri metabolici, mostrano che l'estratto polifenolico del capolino cotto è il più attivo nell'inibire l'up-take di glucosio; nel ridurre l'assorbimento cellulare dei trigliceridi attraverso anche un'inibizione della lipasi pancreatica; nell'inibire l'up-take di colesterolo cellulare, e contemporaneamente generare una riduzione dei livelli di LDL extracellulare e un aumento nell'espressione della lipoproteina APOA1; nell'indurre un aumento della proliferazione cellulare, attraverso una riduzione dello stress ossidativo.

I nostri risultati vogliono essere un contributo alla letteratura scientifica già esistente riguardo il potenziale nutraceutico di *Cynara Scolymus*, ma in modo particolare dare degli spunti alle industrie produttrici di integratori alimentari, suggerendo l'applicazione di stress termici alle matrici di partenza al fine di aumentarne il contenuto di molecole bioattive; formulare l'estratto di *Cynara Scolymus* in compresse o capsule gastroresistenti per preservarne la quota polifenolica; di valutare l'utilizzo del gambo come matrice di partenza, in quanto fonte ricca di metaboliti bioattivi; e di poter utilizzare formulazioni a base di *Cynara Scolymus* per il trattamento di diverse patologie metaboliche. Ovviamente, ulteriori studi in vivo e clinici sono necessari per confermare tali proprietà salutistiche.

## Referenze

Abu-Reidah, I. M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2013). Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC–DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Chemistry*, 141, 2269–2277.

Adzet, T., Camarasa, J., & Laguna, J. C. (1987). Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds in isolated rat hepatocytes from *Cynara Scolymus* against CCl<sub>4</sub> toxicity. *Journal of Natural Products*, 50, 612-617.

Akifusa, S., Kamio, N., Shimazaki, Y., Yamaguchi, N., & Yamashita, Y. (2008). Regulation of globular adiponectin-induced apoptosis by reactive oxygen/nitrogen species in RAW264 macrophages. *Free Radical Biology & Medicine*, 45, 1326–1339.

Barz, W., Koster, J., Weltring, K., M., & Strack, D. (1985). Recent advances in the metabolism and degradation of phenolic compounds in plants and animals. *The biochemistry of plant phenolics*, 25, 307–347.

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

Boccardo, F., Puntoni, M., Guglielmini, P., & Rubagotti, A. (2006). Enterolactone as a risk factor for breast cancer: A review of the published evidence. *International journal of clinical chemistry*, 365 (1–2): 58–67.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25-30.

Brown, J. E., & Rice-Evans, C. A. (1998). Luteolin-rich artichoke extracts protects low density lipoproteins from oxidation in vitro. *Free Radical Research*, 29, 247–255.

Choueiri, L., Chedea, V. S., Calokerinos, A., & Kefalas, P. (2012). Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds. Part II: Studies on mixtures of polyphenols at different molar ratios by chemiluminescence and LC–MS. *Food Chemistry*, 133, 1039–1044.

Chung, H. T., Pae, H. O., Choi, B. M., Billiar, T. R., & Kim, Y. M. (2001). Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 1075–1079.

Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80,1033-1043.

Da Vanzo, J. E., Dobson, A., Tannamor, M., & Dollar, J. (2006). An evidencebased study of the role of dietary supplements in helping seniors maintain their independence. *The Dietary Supplement Education Alliance*.

D'Antuono, I., Garbetta, A., Linsalata, V., Minervinia, F., & Cardinali, A. (2015). Polyphenols from artichoke heads (*Cynara cardunculus* (L.) subsp. *scolymus* Hayek): in vitro bio-accessibility, intestinal uptake and bioavailability. *Food & Function*, DOI: 10.1039/C5FO00137D.

During, A., Debouche, C., Raas, T., & Larondelle, Y. (2012). Among plant lignans, pinoresinol has the strongest antiinflammatory properties in human intestinal caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, 142, 1798-1805.

Fantini, N., Colombo, G., Giori, A., Riva, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E., & Carai, M. A. M. (2011). Evidence of Glycemia-lowering Effect by a *Cynara scolymus* L. Extract in Normal and Obese Rats. *Phytotherapy Research*, 25, 463–466.

Farag, M. A., El-Ahmady, S. H., Elian, F. S., & Wessjohann, L. A. (2013). Metabolomics driven analysis of artichoke leaf and its commercial products via UHPLC–q-TOF-MS and chemometrics. *Phytochemistry*, 95, 177-187.

Faulds, C. B., & Willimason, G. (1999). The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 393-395.

Ferracane, R., Pellegrini, N., Visconti, A., Graziani, G., Chiavaro, E., Miglio, C., & Fogliano, V. (2008). Effects of Different Cooking Methods on Antioxidant Profile, Antioxidant Capacity, and Physical Characteristics of Artichoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8601–8608.

Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1721, 174–184.

Funakoshi-Tago, M., Nakamura, K., Tago, K., Mashino, T., & Kasahara, T. (2011). Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *International Immunopharmacology*, 11, 1150-1159.

Gebhardt R (1997). Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 144, 279-286.

Gebhardt, R. (1998). Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 286, 1122–1128.

Gebhardt, R., & Fausel, M. (1997). Antioxidant and hepatoprotective effects of artichoke extracts and constituents in cultured rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 11, 669–672.

Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., & Dalle Donne, I. (2008). Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. *Methods in Enzymology*, 440, 361–380.

Gonzales, G. B., Raes, K., Coelus, S., Struijs, K., Smaghe, G., & Van Camp, J. (2014) Ultra(high)pressure liquid chromatography–electrospray ionization–time-of-flight–ion mobility–high definition mass spectrometry for the rapid identification and structural characterization of flavonoid glycosides from cauliflower waste. *Journal of Chromatography A*, 1323, 39–48.

Heidarian, E., & Soofiniya, Y. (2011). Hypolipidemic and hypoglycemic effects of aerial part of *Cynara scolymus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (13), 2717-2723.

Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., Wähälä, K., Deyama, T., Nishibe, S., & Adlercreutz, H. (2001). In vitro metabolism of plant lignans: New precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49 (7), 3178–86.

Korkina, L. G. (2007). Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health. *Cellular and molecular biology*, 53 (1): 15–25.

Korkina, L., Kostyuk, V., De Luca, C., & Pastore, S. (2011). Plant phenylpropanoids as emerging anti-inflammatory agents. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11 (10): 823–35.

Krasteva, S., Heiss, E., & Krenn, L. (2011). Optimization and application of a fluorimetric assay for the identification of histone deacetylase inhibitors from plant origin. *Pharmaceutical Biology*, 49,658–668.

Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., & Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of functional foods* 1, 131–144.

Li, H., Xia, N., Brausch, I., Yao, Y., & Förstermann, U. (2004). Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus L.*) Up-Regulate Endothelial-Type Nitric-Oxide Synthase Gene Expression in Human Endothelial Cells. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, 310 (3), 926-932.

Llorach, R., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., & Ferreres, F. (2002). Artichoke (*Cynara scolymus L.*) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (12) : 3458-64.

Lombardo, S., Pandino, G., Mauromicale, G., Knödler, M., Carle, R., & Schieber, A. (2010). Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus L. var. scolymus (L.) Fiori*]. *Food Chemistry*, 119, 1175–1181.

Lutz, M., Henriquez, C., & Escobar, M. (2011). Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus L.*), raw and cooked. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 49-54.

Miglio, C., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., & Pellegrini, N. (2008). Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 139–147.

Nazni, P., Poongodi Vijayakumar, T., Alagianambi, P., & Amirthaveni, M. (2006). Hypoglycemic and hypolipidemic effect of *Cynara scolymus* among selected Type 2 diabetic individuals. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5, 147–151.

Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., & Williamson, G. (2011). Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chemistry*, 126, 417-422.

Panizzi, L., & Scarpati, M. L. (1965). Sugli acidi 1, 4- e 1, 5-dicaffeilchinici. *Gazzetta Chimica Italiana*, 95, 71–82.

Pereira, C., Calhelha, R. C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Antioxidant properties, anti-hepatocellular carcinoma activity and hepatotoxicity of artichoke, milk thistle and borututu. *Industrial Crops and Products*, 49, 61-65.

Pittler, M., Thompson, C., & Ernst, E. (2002). Artichoke leaf extract for treating hypercholesterolaemia. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 3, CD003335.

Plumb, G. W., Lambert, N., Chambers, S. J., Wanigatunga, S., Heaney, R. K., Plumb, J. A., Aruoma, O. I., Halliwell, B., Miller, N. J., & Williamson, G. (1996). Are whole extracts and purified glucosinolates from cruciferous vegetables antioxidants?. *Free Radical Research*, 25, 75-86.

Preziosi, P., Loscalzo, B., & Marmo, E. (1959). Comparison of choleric effects of CYN and Na-dehydrocholate. *Experientia*, 15, 135–138.

Pryor, W. (1991). The antioxidant nutrients and disease prevention--what, do we know and what, do we need to find out?. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53 (1), 391S–393S.

Raiola, A., Meca, G., Mañes, J., & Ritieni, A. (2012). Bioaccessibility of deoxynivalenol and its natural co-occurrence with ochratoxin A and aflatoxin B1 in Italian commercial pasta. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 280–287.

Rehman, Z. U., Islam, M., & Shah, W. H. (2003). Effect of microwave and conventional cooking on insoluble dietary fibre components of vegetables. *Food Chemistry*, 80, 237–240.

Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. Th. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112, 31–63.

Rodriguez de Sotillo, D. V., & Hadley, M. (2002). Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 717-726.

Rossoni, G., Grande, S., Galli, C., & Visioli, F. (2005). Wild artichoke prevents the age-associated loss of vasomotor function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10291–10296.

Ruiz-Cano, D., Pérez-Llamas, F., Frutos, M. J., Arnao, M. B., Espinosa, C., López-Jiménez, J. A., Castillo, J., & Zamora, S. (2014). Chemical and functional properties of the different by-products of artichoke (*Cynara scolymus* L.) from industrial canning processing. *Food Chemistry*, 160, 134-140.

Saéñz Rodriguez, T., García Giménez, D., & a Vázquez, R. (2002). Choleric activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke extract in rats. *Phytomedicine*, 9, 687–693.

Sahlin, E., Savage, G. P., & Lister, C. E. (2004). Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 635–647.

Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., & Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403, 136-138.

Saura-Calixto, F. (2011). Dietary Fiber as a Carrier of Dietary Antioxidants: An Essential Physiological Function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 43–49.

Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36, 177-187.

Schutz, K., Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4090-4096.

Slanina, J., Taborska, E., Bochorakova, H., Slaninova, I., Humpa, O., Robinson, W. E. Jr., & Schrame, K. H. (2001). New and facile method of preparation of the anti-HIV-1 agent, 1,3-dicaffeoylquinic acid. *Tetrahedron Letters*, 42, 3383–3385.

Sommella, E., Pepe, G., Pagano, F., Tenore, G.C., Dugo, P., Manfra, M., & Campiglia, P. (2013). Ultra high performance liquid chromatography with ion-trap TOF-

MS for the fast characterization of flavonoids in Citrus bergamia juice. *Journal of Separation Science*, 36, 3351–3355.

Speroni, E., Cervellati, R., Govoni, P., Guizzardi, S., Renzulli, C., & Guerra, M. C. (2003). Efficacy of different *Cynara scolymus* preparations on liver complaints. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 203–211.

Strack, D., Gross, W., Wray, V., & Grotjahn, L. (1987). Enzymic synthesis of caffeoylglucaric acid from chlorogenic acid and glucaric acid by a protein preparation from tomato cotyledons. *Plant Physiology*, 83, 475–478.

Tiveron, A. P., Melo, P. S., Bergamaschi, K. B., Vieira, T. M. F. S., Regitano-d'Arce, M. A. B., & Alencar, S. M. (2012). Antioxidant activity of brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 8943-8957.

Turkmen, N., Poyrazoglu, E. S., Sari, F., & Velioglu, Y. S. (2006). Effects of cooking methods on chlorophylls, pheophytins and colour of selected green vegetables. *International Journal of Food Science and Technoly*, 41, 281–288.

Villiger, A., Sala, F., Suter, A., & Butterweck, V. (2015) In vitro inhibitory potential of *Cynara scolymus*, *Silybummarianum*, *Taraxacum officinale*, and *Peumus boldus* on key enzymes relevant to metabolic syndrome. *Phytomedicine*, 22, 138–144.

Wan, C. W., Wong, C. N. Y., Pin, W. K., & Wong, M. H. Y. (2013). Chlorogenic acid exhibits cholesterol lowering and fatty liver attenuating properties by up-regulating the gene expression of PPAR- $\alpha$  in hypercholesterolemic rats induced with a high-cholesterol diet. *Phytotherapy research*, 27, 545-551.

Wang, M., Simon, J. E., Aviles, I. F., He, K., Zheng, Q. Y., & Tadmor, Y. (2003). Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 601-608.

Wu, C. H., Ho, Y. S., Tsai, C. Y., Wang, Y. J., Tseng, H., & Wei, P.L. (2009). In vitro and in vivo study of phloretin-induced apoptosis in human liver cancer cells involving inhibition of type II glucose transporter. *International Journal of Cancer*, 124, 2210–2219.

Yiu, W. F., Kwan, P. L., & Wong, C. Y. (2011). Attenuation of fatty liver and prevention of hypercholesterolemia by extract of *Curcuma longa* through regulating the expression of CYP7A1, LDL-receptor, HO-1, and HMG-CoA reductase. *Journal of Food Science*, 76, H80–H89.

Yuan, X., Gao, M., Xiao, H., Tan, C., & Du, Y. (2012). Free radical scavenging activities and bioactive substances of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) leaves. *Food Chemistry*, 133, 10–14.

Zhang, D., & Hamazu, Y. (2004). Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chemistry*, 88, 503–509.