



CATERINA BERGANTIN, ANNALISA MAIETTI, ALBERTO CAVAZZINI, PAOLA TEDESCHI, NICOLA MARCHETTI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE E FARMACEUTICHE  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA  
CATERINA.BERGANTIN@UNIFE.IT

# VALUTAZIONE DELLA BIOACCESSIBILITÀ DEI POLIFENOLI NEL RADICCHIO ROSSO (*CHICORIUM INTYBUS*)

*Il presente lavoro presenta due diversi scopi: 1) la caratterizzazione mediante analisi HPLC-MS/MS del contenuto in polifenoli di due differenti tipologie di radicchio rosso coltivate nel sud del Delta del Po (Massenzatica, FE); 2) la quantificazione nella matrice originaria di alcuni composti target selezionati con successiva valutazione della bioaccessibilità durante una simulazione del processo digestivo (fase salivare, gastrica e duodenale).*

I polifenoli sono prodotti secondari del metabolismo delle piante e sono generalmente coinvolti in meccanismi di difesa nei confronti delle radiazioni ultraviolette e contro l'aggressione di patogeni. Questi composti, già caratterizzati per quanto riguarda la struttura chimica e le proprietà, sono presenti negli alimenti e contribuiscono al colore, all'aroma e all'odore. Complessivamente in natura sono stati identificati più di 8.000 composti, che presentano una struttura simile, caratterizzata dalla presenza di uno o più anelli aromatici sostituiti con funzioni ossidriliche. Il profilo in polifenoli è caratteristico di ogni singola specie vegetale e si rivela quindi utile sia all'identificazione della pianta considerata, sia alla valutazione delle sue proprietà nutraceutiche.

La determinazione quali-quantitativa dei composti bioattivi presenti all'interno degli alimenti, in particolare frutta e verdura, è estremamente utile per monitorare variazioni dovute a fattori ambientali e/o a fattori genetici. Studi di questo tipo si rivelano di fondamentale importanza nell'ottica dell'assegnazione di marchi di denominazione/indicazione protetta per prodotti agroalimentari tipici, al fine di certificarne e garantirne l'autenticità.

I polifenoli sono molecole in grado di contrastare i radicali liberi agendo da antiossidanti contro la perossidazione lipidica e l'infiammazione cronica,

con meccanismo di azione diretto o indiretto [1]. Negli ultimi dieci anni sono aumentate le ricerche epidemiologiche che associano una dieta a lungo termine ricca di polifenoli ad effetti benefici sulla salute umana, nello specifico riguardo la prevenzione di malattie cardiovascolari, tumori, malattie neurodegenerative e dell'apparato digerente, diabete ed osteoporosi [2]. Gli studi scientifici sono sempre più spesso accompagnati da ricerche relative al processo digestivo, all'assorbimento intestinale ed al metabolismo dei polifenoli. Il potenziale effetto benefico può infatti essere limitato dalla scarsa e/o variabile biodisponibilità della molecola considerata, in relazione a meccanismi chimici, fisici e fisiologici. La biodisponibilità viene definita come la frazione di una molecola ingerita e disponibile al sito di azione nelle normali condizioni fisiologiche e presuppone due concetti estremamente importanti: la bioaccessibilità e la bioattività. La bioaccessibilità si identifica con la porzione rilasciata dalla matrice durante il processo digestivo e disponibile quindi per l'assorbimento; la bioattività considera invece l'assorbimento e la via metabolica seguita dal composto per raggiungere il tessuto target, l'interazione con le biomolecole e la generazione di marker e risposte fisiologiche indotte.

Il radicchio rosso (*Chicorium intybus*) è un vegetale ampiamente coltivato e consumato, soprattutto nel

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.

periodo invernale, in Europa, in Asia Occidentale e nel Nord America. Nello specifico, in Italia la coltivazione di questo ortaggio è concentrata nelle regioni settentrionali, dove esistono molti prodotti certificati con marchio europeo (radicchio rosso di Treviso IGP tardivo e precoce, radicchio di Verona IGP, radicchio tondo di Chioggia IGP, radicchio variegato di Castelfranco IGP). Studi già pubblicati hanno sottolineato come il radicchio rosso sia un'ottima fonte di polifenoli, alcuni dei quali sono stati caratterizzati nelle varietà di pregio presenti sul mercato.

Lo studio qui presentato prevede una prima valutazione del contenuto totale in polifenoli e della capacità antiossidante della frazione solubile, seguita da una caratterizzazione del maggior numero di polifenoli contenuti in due tipologie di radicchio rosso, lungo e tondo, coltivate nel sud del Delta del Po, nel territorio di Massenzatica (FE).

Il contenuto totale di polifenoli è stato determinato mediante l'utilizzo del reattivo di Folin-Ciocalteu ed è stata misurata la capacità antiossidante nei confronti del radicale DPPH. Sono stati utilizzati estratti idroalcolici per entrambe le tipologie considerate ed i dati ottenuti per il radicchio tondo sono maggiori rispetto al radicchio lungo sia per il contenuto totale in polifenoli ( $2398 \pm 251$  vs  $1797 \pm 168$   $\mu\text{g}$  catechina/g di campione  $\pm$ ds), sia per la capacità antiossidante ( $7,27 \pm 0,91$  vs  $5,70 \pm 0,62$   $\mu\text{mol}$  di Trolox/g di campione  $\pm$ ds).

Lo studio del profilo in polifenoli è stato eseguito mediante l'utilizzo di una strumentazione HPLC-MS/MS, in modalità di determinazione ESI positiva e negativa, portando all'identificazione di 36 composti tra i più abbondanti e comuni [3]. In accordo con dati presenti in letteratura, ad eccezione degli acidi fenolici più semplici (acido malico, caffeico, chinico e caftarico), tutti gli altri composti sono presenti in forma glicosilata o esterea, con maggior frequenza dei derivati acetile e malonile [4].

Le proprietà chimiche di una molecola e la complessità biochimica, sommate a effetti associativi e/o competitivi, possono influenzare il processo di assorbimento, limitandone quindi la disponibilità nel sangue e conseguentemente nelle cellule. Per questo motivo, è importante effettuare la quantificazione esatta del composto considerato nella matrice iniziale e monitorarne poi la concentrazione durante i diversi step digestivi.

Nello specifico sono stati selezionati sette differenti composti target (tra i 36 totali), le cui concentrazioni sono state determinate, per entrambi i tipi di radicchio rosso analizzati, in seguito ad un processo di estrazione chimico-enzimatico esaustivo. L'associazione tra questi due metodi estrattivi si rivela particolarmente utile per matrici in cui la percentuale di fibra è elevata. I polifenoli possono infatti presentarsi in forma legata ed in tal caso solo l'utilizzo di opportuni enzimi risulta efficace per poterli estrarre e quantificare nella matrice considerata. I composti monitorati sono: cianidina-3-O-glucoside (C3OG), acido dicaffeiltartarico (DCTA), acido 5-caffeilchinico (5CQA), apigenina-7-O-glucoside (A7OG), kaempferolo-7-O-glucoside (K7OG), quercetina-3-O-malonil-glucoside (Q3OMG) e acido 3-caffeilchinico (3CQA).

Gli studi di bioaccessibilità sono stati eseguiti seguendo il modello statico *in vitro* di riferimento, analizzando rispettivamente gli step salivare, gastrico e duodenale [5]. La Fig. 1, riporta i risultati espressi come bioaccessibilità % per i composti target selezionati, in riferimento alle quantità determinate nella matrice iniziale e riportate in Tab. 1.

Durante la fase salivare, tutti i composti mostrano valori simili di bioaccessibilità: C3OG e Q3OMG tra

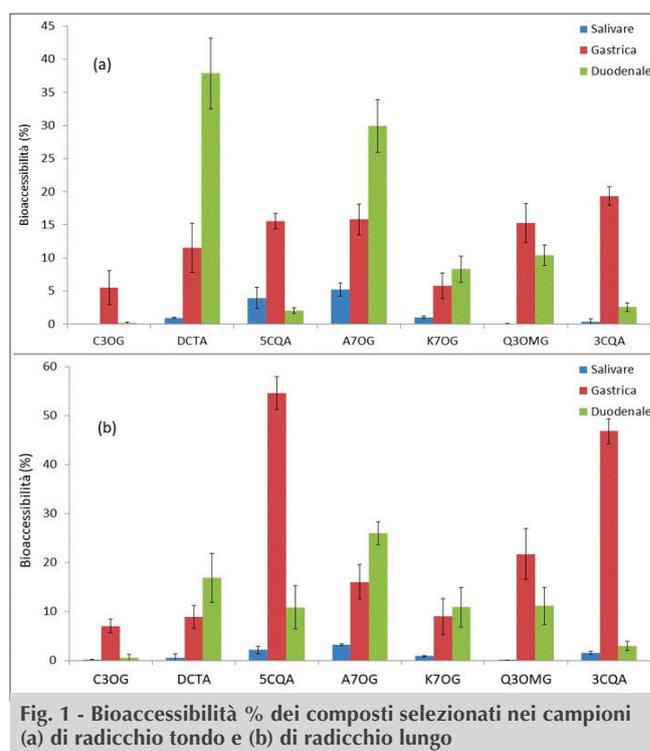


Fig. 1 - Bioaccessibilità % dei composti selezionati nei campioni (a) di radicchio tondo e (b) di radicchio lungo



Composto	Radicchio tondo ( $\mu\text{g/g}$ )	Radicchio lungo ( $\mu\text{g/g}$ )	% step enzimatico
C3OG	61,0 $\pm$ 5,9	14,6 $\pm$ 1,2	-
DTCA	804 $\pm$ 78	548 $\pm$ 42	10,4
5CQA	3,920 $\pm$ 0,053	1,060 $\pm$ 0,082	9,1
A7OG	0,340 $\pm$ 0,031	0,410 $\pm$ 0,044	-
K7OG	6,55 $\pm$ 0,61	7,00 $\pm$ 0,63	-
Q3OMG	521 $\pm$ 38	280 $\pm$ 21	2,4
3CQA	638 $\pm$ 18	206 $\pm$ 14	3,1

**Tab. 1 - Quantificazione totale dei 7 composti target selezionati nelle due differenti varietà considerate. La deviazione standard riportata è relativa a cinque diversi estratti chimici ed enzimatici**

0,01% e 0,1%; DTCA, K7OG e 3CQA tra 0,35% e 1%; 5CQA e A7OG tra 2% e 5%. Nella fase gastrica i valori di bioaccessibilità sono simili per entrambe le tipologie in riferimento ai composti C3OG, DTCA, A7OG, K7OG e Q3OMG, mentre per gli acidi 5CQA e 3CQA si registrano valori più elevati nel radicchio lungo rispetto al radicchio tondo (54,6% vs 15,2% e 46,8% vs 19,3%). Nella fase duodenale si osservano invece le maggiori differenze: il composto DTCA presenta una maggiore bioaccessibilità nel radicchio tondo (37,9%) rispetto al lungo (16,9%) mentre l'acido 5CQA registra valori più elevati nel radicchio lungo (10,8%) rispetto al tondo (2,0%). Differenze minime (inferiori al 4%) si registrano per A7OG e K7OG, mentre per gli altri composti i valori di bioaccessibilità sono confrontabili (considerando la variabilità della matrice).

Si possono quindi individuare tre diversi comportamenti che coincidono per le due tipologie di radicchio studiate. In primo luogo, si evidenzia un aumento progressivo e lineare della bioaccessibilità, dalla fase salivare a quella duodenale, per i composti DTCA, A7OG e K7OG (tipo-1). Per i composti C3OG, 3CQA e 5CQA la bioaccessibilità a livello gastrico è particolarmente elevata e subisce una notevole diminuzione nella fase duodenale (tipo-2). Infine, il composto Q3OMG presenta una bioaccessibilità gastrica elevata con un decremento nella fase duodenale meno rilevante rispetto al caso precedente (tipo-3).

Soffermandosi sui tre diversi andamenti elencati, si può individuare una correlazione tra la struttura chimica della molecola e la relativa bioaccessibilità. L'O-glicosilazione al carbonio 7 fornisce ad apigenina e kaempferolo, molecole dalla struttura chimica simile ad eccezione del gruppo -OH al carbonio 3, l'andamento di tipo-1. L'O-glicosilazione al carbonio 3, potrebbe conferire una bioaccessibilità maggiore durante la fase ga-

strica. I due acidi caffeilchinici (3CQA e 5CQA) mostrano, inoltre, un andamento del tutto simile (tipo-2). Per individuare se esista effettivamente una correlazione tra la bioaccessibilità e la posizione della glicosilazione sull'aglicone, sono tuttavia necessari studi aggiuntivi,

che coinvolgano un maggior numero di composti.

I possibili effetti benefici dei composti bioattivi presenti all'interno degli alimenti sono determinati dalla loro biodisponibilità, che è influenzata da diversi fattori, che comprendono la natura della molecola considerata, la forma in cui si presenta, l'associazione con la matrice vegetale, la digestione da parte degli enzimi presenti nel tratto gastro-intestinale e l'assorbimento.

La valutazione della bioaccessibilità di una serie di polifenoli target e l'interpretazione dei risultati in relazione alla struttura chimica dei composti presentata in questo lavoro, si rivela quindi interessante e può stimolare studi futuri.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] W.A. Peer, A.S. Murphy, *The Science of Flavonoids*, E. Grotewold (Ed.), Springer, 2006, 239.
- [2] I.C.W. Arts, P.C.H. Hollman, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, **81**(Suppl. 1), 317S.
- [3] C. Bergantin *et al.*, *Journal of Functional Foods*, 2017, **33**, 94.
- [4] C. Carazzone *et al.*, *Food Chemistry*, 2013, **138**, 1062.
- [5] M. Minekus *et al.*, *Food and Function*, 2014, **5**, 1113.

### Evaluation of Bioaccessibility of Polyphenols in Red Chicory (*Chicorium intybus*)

The present work had a twofold objective: 1) the characterization in terms of polyphenols content by HPLC-MS/MS of two different varieties of red chicory from southern Po Delta area (Massenzatica, FE); 2) the concentration assessment of several target compounds throughout a simulated gastro-intestinal digestion after a precise quantification in the vegetable matrix.