



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO
**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE FARMACEUTICHE
APPLICATE**

TESI DI LAUREA

Antocianine in *Prunus cerasus* L.

RELATORE: CHIAR.MA PROF.SSA ANNA PIOVAN

LAUREANDO: FRANCESCO BARISON

ANNO ACCADEMICO: 2022/2023

Con gioia
a quanti hanno creduto in me e mi hanno voluto bene.
Un pensiero particolare alla memoria di papà Leonello, mamma Augusta, sorella
Emilia e Piergiorgio che dal cielo tanto mi hanno amato e aiutato.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 Storia e distribuzione	1
1.2 Le caratteristiche della pianta e del frutto	3
1.3 La produzione mondiale di ciliegie.....	4
1.4 Caratteristiche nutrizionali delle ciliegie	8
1.5 I polifenoli contenuti nelle ciliegie: proprietà chimiche, biochimiche e nutraceutiche.....	9
1.6 Le antocianine.....	13
1.6.1 Antocianine: utilizzo come additivi alimentari.....	19
2. IL CILIEGIO ACIDO (<i>P. cerasus</i>).....	21
2.1 Il ciliegio acido (<i>P. cerasus</i>) e le ciliegie acide	21
2.2 La qualità della ciliegia acida e dei derivati: i componenti attivi, le antocianine .	
2.2.1 Metodi estrattivi e analitici per la caratterizzazione del frutto e dei derivati ...	23
2.2.1a Estrazione con solventi (estrazione solido-liquido, SLE)	23
2.2.1b Estrazione con solvente e ultrasuoni (Ultrasound assisted Extraction).....	27
2.2.1c Estrazione con solvente e microonde (Microwave-Assisted Extraction - MAE)	30
2.2.1d Estrazione con enzimi (Enzyme-Assisted Extraction - EAE).....	34
3. PROPRIETÀ E UTILIZZI DELLE CILIEGIE ACIDE	41
3.1 Proprietà delle ciliegie acide	41
3.2 Utilizzo delle ciliegie acide.....	46
3.2.1..... Effetti benefici sulla salute delle ciliegie acide e dei preparati che ne contengono i polifenoli e, in particolare, le antocianine	48
4. CONCLUSIONI.....	53
5. BIBLIOGRAFIA	55

1. INTRODUZIONE

1.1 Storia e distribuzione

Finora sono state recensite più di trenta specie di ciliegi, per la maggior parte originarie dall'Europa e dall'Asia¹. Le principali specie di ciliegio coltivate a scopi commerciali sono: il ciliegio dolce (*Prunus avium* L.), quello acido (*Prunus cerasus* L.) e il ciliegio cespuglioso (*Prunus fruticosa* Pall.)².



Ciliegio dolce (*Prunus avium* L.), ciliegio acido (*Prunus cerasus* L.) e ciliegio cespuglioso (*Prunus fruticosa* Pall.)

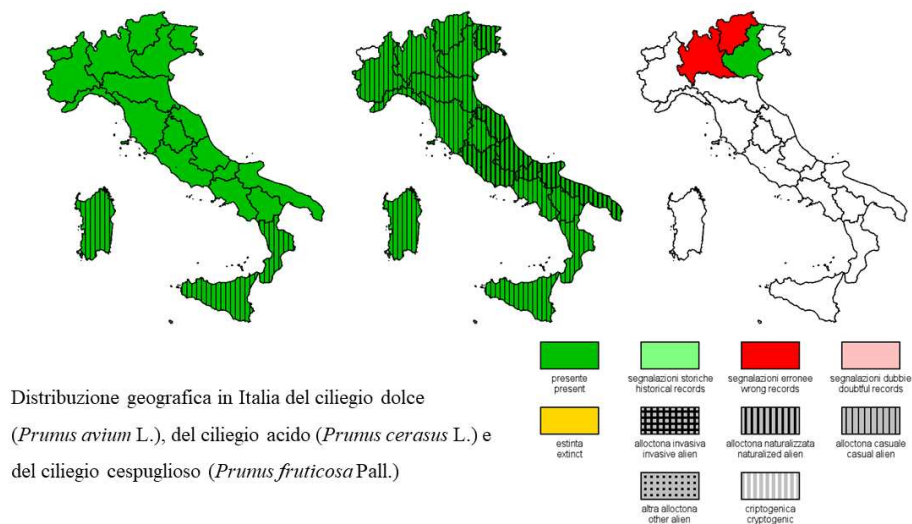


Figura 1. Ciliegio dolce, ciliegio acido e ciliegio cespuglioso foto delle piante e distribuzione geografica in Italia (<https://www.actaplantarum.org/index.php>)

Il commercio globale interessa essenzialmente solo il ciliegio dolce e quello acido (rispettivamente *P. avium* e *P. cerasus*). Questi appartengono al genere *Prunus* della famiglia delle Rosaceae³.

La distinzione tra *P. avium* e *P. cerasus* è spesso poco chiara e prevalentemente basata su criteri storici derivanti dalle varietà coltivate ai tempi dell'impero romano. E' stato suggerito che i due morfotipi, *P. avium* e *P. cerasus*, corrispondano a due varietà di *P. avium* coltivate in quei tempi. La coltivazione del *P. avium* cominciò

nei territori attorno al mar Caspio e al mar Nero o come specie indigena di quei territori o introdottavi dal Neolitico o dall'età del Bronzo (5500 – 4000 a.C.). Tale coltivazione poi si è diffusa in tutta l'Europa. I ritrovamenti fossili suggeriscono che anche *P. cerasus* sia originario dalle zone del mar Caspio⁴.

Analisi genetiche recenti supportano l'ipotesi che il ciliegio acido (Marena, Marasca, Amareno) sia un ibrido inter-specifico tra il ciliegio cespuglioso (*P. fruticosa*) e il ciliegio dolce (*P. avium*) che porta al ciliegio acido tetraploide¹.

Sebbene il ciliegio sia stato coltivato per più di 2000 anni, fino al secolo scorso è rimasta una coltura per gruppi di persone e non per vaste comunità a causa della facile deperibilità dei frutti. Durante il diciannovesimo secolo tecnici e coltivatori in diverse parti del mondo cominciarono a sviluppare nuovi ibridi di ciliegio dolce⁵ permettendo di dilatare i tempi di raccolta. Inoltre si diffusero sempre più le tecniche che permettevano di conservare il prodotto fresco e di trasportarlo velocemente.

Il ciliegio acido non è diffuso come quello dolce e ne vengono piantate solo alcune cultivar regionali. Le prime coltivazioni di ciliegio acido sono state fatte nella Federazione Russa, in Europa ed anche negli Stati Uniti. Negli ultimi 30 anni sono stati resi disponibili per il mercato 209 cultivar di ciliegio (135 di ciliegio dolce e 74 di ciliegio acido). L'Europa (Germania, repubblica Ceca, Russia, Ungheria, Estonia, Francia, Romania e Italia) ha contribuito con 56 cultivar (84% del totale)⁶.

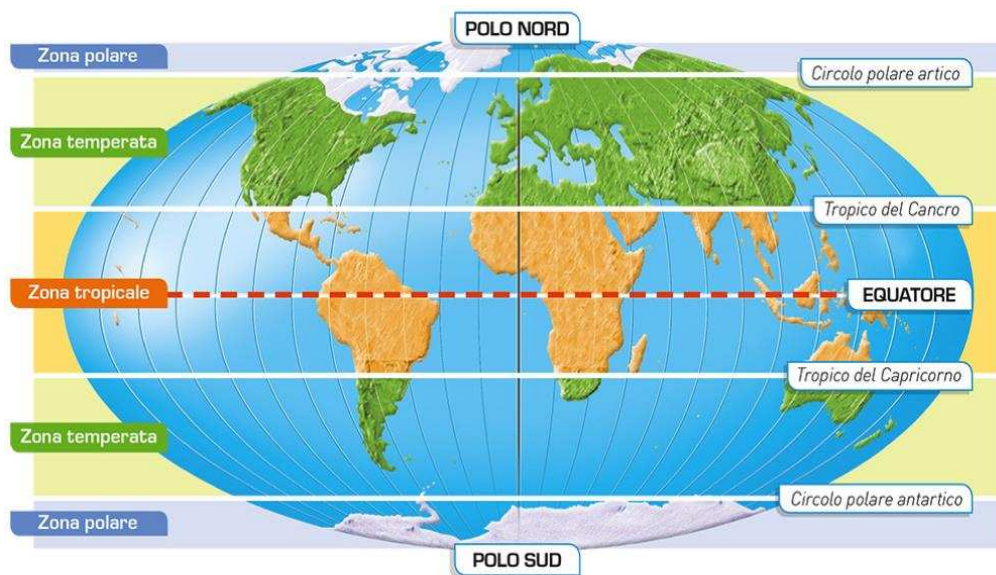


Figura 2. Zone climatiche

Le ciliegie sono un prodotto stagionale, il periodo di raccolta in Europa è piuttosto breve (da maggio a luglio) ed è simile negli Stati Uniti. La disponibilità sul mercato è solo durante il periodo di raccolta, poiché non possono essere conservate a lungo (attualmente più di due settimane) né con il freddo né in atmosfera inerte⁷. Per poter trasportare il frutto in mercati lontani si stanno sperimentando tecniche di manipolazione e conservazione della ciliegia raccolta oltre a perfezionare le tecniche già in uso di raffreddamento e confezionamento^{8,9}. L'importazione in Europa da paesi come Cile, Australia o nuova Zelanda permette di avere ciliegie in periodi diversi da quelli descritti sopra.

Nei paesi a clima temperato il ciliegio è coltivato in circa 40 stati e in Italia, in particolare, è diffuso soprattutto in Puglia, Campania, Veneto, Emilia Romagna. Le varietà colturali, o cultivar, più diffuse in queste regioni sono 'Ferrovia', 'Bigarreau Burlat', 'Lapins', 'Malizia', 'Giorgia', 'Durone', 'Mora di Cazzano', 'Anellone', 'Van', 'Sweet Heart', 'Black Star'¹⁰.

1.2 Le caratteristiche della pianta e del frutto

Le caratteristiche del ciliegio più ricercate attualmente, per mezzo di ibridizzazioni, sono:

- l'autofertilità
- la buona innestabilità
- la possibilità di una raccolta meccanica
- la dilatazione dei tempi di maturazione
- la fioritura tardiva
- l'elevata produttività
- la compattezza e la grossezza del frutto
- la resistenza del frutto alle manipolazioni meccaniche, ai parassiti (per es. *Pseudomonas*, *Monilia*, *Drosophila suzukii*) e ai pesticidi
- la facile conservabilità.

Per quanto riguarda il frutto possono essere presi come riferimento i parametri indicati dall'Università di Bologna, che ha una lunga tradizione nello studio della coltivazione del ciliegio¹¹, secondo i quali la ciliegia "ideale" dovrebbe avere:

- buone dimensioni (diametro fino a 34 mm e peso di 12-15 g),

- essere molto colorata¹², e anche densa (≥ 400 g misurati con il penetrometro),
- un grado brix elevato ($\geq 18^\circ$ Brix),
- un pH e una acidità ottimali del succo (pH $\sim 3,8$ e acidità espressa in acido malico ≥ 8 g/l)
- un buon bilanciamento tra dolce e acido (valori compresi tra 1.5 e 2 per il rapporto [soluble solids content, SSC¹³] /ml NaOH)^{4,6}.

La ricerca attuale è volta alla valorizzazione della biodiversità naturale delle varietà nelle diverse regioni. La caratterizzazione del germoplasma, materiale in grado di trasmettere i caratteri ereditari da una generazione all'altra, raccolto da varietà autoctone delle diverse regioni può essere utile per selezionare nuovi genotipi con rilevanti qualità organolettiche ed elevato contenuto di sostanze antiossidanti¹⁴.

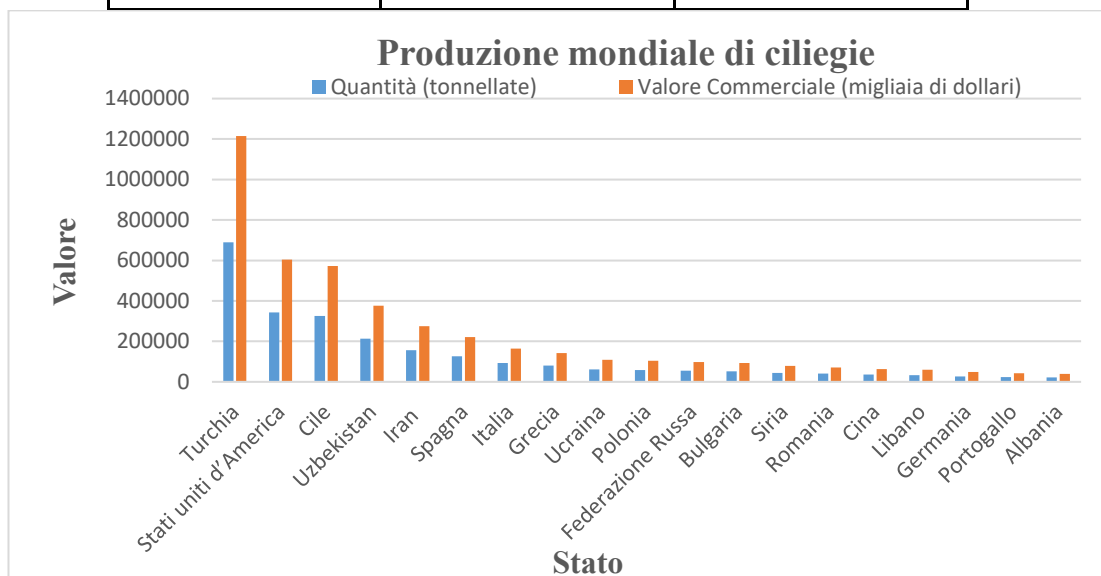
1.3 La produzione mondiale di ciliegie

La distribuzione della produzione mondiale di ciliegie (*P. avium* e *P. cerasus*) in diverse aree geografiche nel 2021 è mostrata in tabella 1 e nel grafico allegato.

Tabella 1. Produzione mondiale nel 2021. Fonte: FAOSTAT (il Valore Commerciale fa riferimento al valore medio del dollaro nel periodo 2014-2016) (https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity)

Stato	Quantità (tonnellate) <i>P. avium</i> e <i>P. cerasus</i>	Valore Commerciale (migliaia di \$)
Turchia	689.834	\$ 1.215.516
Stati Uniti d'America	343.190	\$ 604.715
Cile	325.049	\$ 572.749
Uzbekistan	213.600	\$ 376.372
Iran	156.134	\$ 275.115
Spagna	125.810	\$ 221.682
Italia	93.030	\$ 163.923
Grecia	80.740	\$ 142.267
Ucraina	61.850	\$ 108.982
Polonia	59.100	\$ 104.137
Federazione Russa	55.400	\$ 97.617

Bulgaria	52.620	\$	92.719
Siria	44.343	\$	78.134
Romania	40.670	\$	71.662
Cina	35.746	\$	62.987
Libano	33.684	\$	59.352
Germania	27.340	\$	48.174
Portogallo	23.930	\$	42.166
Albania	22.050	\$	38.853



Invece la variazione della produzione mondiale di ciliegie dolci e acide nel tempo (anni 1961-2021) è mostrata in Tabella 2 e nel grafico allegato.

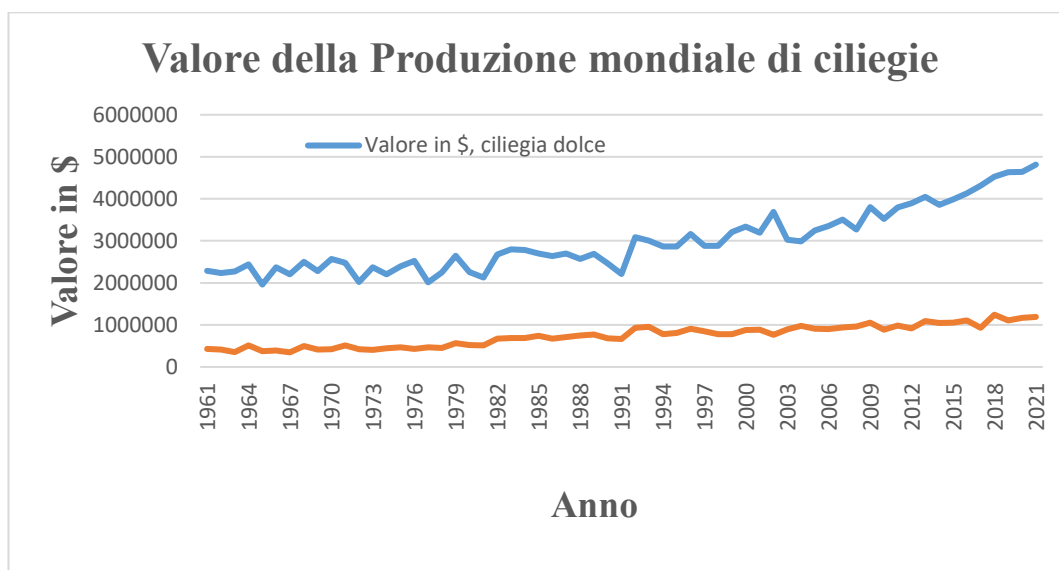
Tabella 2. *Produzione mondiale di ciliegie nel periodo 1961-2021. Fonte: FAOSTAT con riferimento al valore medio del dollaro nel periodo 2014-2016.*

<https://www.fao.org/faostat/en/#compare>

ANNO	CILIEGIA DOLCE	CILIEGIA ACIDA
1961	\$ 2.288.028	\$ 426.196
1962	\$ 2.232.830	\$ 413.541
1963	\$ 2.270.707	\$ 355.447
1964	\$ 2.443.646	\$ 515.232
1965	\$ 1.960.558	\$ 376.453
1966	\$ 2.373.707	\$ 389.809
1967	\$ 2.206.962	\$ 347.377
1968	\$ 2.501.702	\$ 494.623
1969	\$ 2.282.955	\$ 413.144
1970	\$ 2.572.599	\$ 423.548

1971	\$	2,477.107	\$	514.842
1972	\$	2,023.075	\$	422.261
1973	\$	2,373.228	\$	404.615
1974	\$	2,204.245	\$	441.237
1975	\$	2,396.043	\$	466.931
1976	\$	2,525.088	\$	430.484
1977	\$	2,011.639	\$	463.885
1978	\$	2,247.889	\$	450.122
1979	\$	2,648.617	\$	568.750
1980	\$	2,253.783	\$	523.019
1981	\$	2,129.511	\$	513.986
1982	\$	2,679.106	\$	674.481
1983	\$	2,795.547	\$	690.683
1984	\$	2,785.665	\$	688.951
1985	\$	2,695.762	\$	739.289
1986	\$	2,636.847	\$	673.103
1987	\$	2,696.559	\$	707.707
1988	\$	2,571.944	\$	749.639
1989	\$	2,689.253	\$	774.997
1990	\$	2,462.156	\$	682.479
1991	\$	2,214.857	\$	667.917
1992	\$	3,091.115	\$	933.263
1993	\$	3,002.139	\$	957.909
1994	\$	2,866.888	\$	779.743
1995	\$	2,866.780	\$	811.231
1996	\$	3,162.363	\$	912.029
1997	\$	2,882.504	\$	848.005
1998	\$	2,883.558	\$	782.184
1999	\$	3,211.408	\$	776.494
2000	\$	3,342.675	\$	880.438
2001	\$	3,197.800	\$	882.907
2002	\$	3,689.305	\$	764.825
2003	\$	3,022.761	\$	891.077
2004	\$	2,989.428	\$	974.430
2005	\$	3,248.284	\$	907.250
2006	\$	3,353.286	\$	897.997
2007	\$	3,506.808	\$	937.011
2008	\$	3,270.839	\$	959.905
2009	\$	3,800.926	\$	1,053.396
2010	\$	3,519.880	\$	889.153
2011	\$	3,797.534	\$	983.822
2012	\$	3,892.440	\$	912.890
2013	\$	4,043.916	\$	1,089.506
2014	\$	3,854.943	\$	1,047.554

2015	\$	3.986.828	\$	1.055.571
2016	\$	4.133.769	\$	1.104.463
2017	\$	4.316.599	\$	932.560
2018	\$	4.527.765	\$	1.243.289
2019	\$	4.635.121	\$	1.107.250
2020	\$	4.639.428	\$	1.164.217
2021	\$	4.814.624	\$	1.190.655



Le ricerche condotte per determinare le proprietà nutrizionali e salutistiche delle ciliegie assieme al progredire dei metodi di manipolazione, trasporto e conservazione hanno incrementato nel tempo la produzione di ciliegie sia nei paesi che erano già forti produttori sia in quelli in cui la produzione era scarsa.

La produzione e il consumo di ciliegie sono aumentati anche grazie ai maggiori guadagni dei produttori e oltre all'aumento della consapevolezza dei benefici nutrizionali, in particolare quelli collegati al potere antiossidante delle antocianine contenute nella buccia, di questo frutto da parte dei consumatori.

I maggiori produttori di ciliegie dolci sono: Turchia, Stati Uniti d'America, Iran, Italia e Spagna che producono circa la metà delle ciliegie nel mondo, mentre i principali esportatori sono Stati Uniti d'America, Turchia e Cile (FAOSTAT).

Le ciliegie acide sono prodotte soprattutto in Europa e nella Federazione Russa (FAOSTAT).

1.4 Caratteristiche nutrizionali delle ciliegie

In letteratura sono presenti numerosi studi che descrivono i componenti attivi delle ciliegie.

Questi frutti contengono livelli relativamente alti di composti nutraceutici, in particolare polifenoli, e questo ha aumentato l'attenzione verso le ciliegie.

Tabella 3. *Proprietà nutrizionali e nutraceutiche medie delle ciliegie dolci e acide per 100 grammi (peso fresco) – Si vedano anche le tabelle 7 – 10 per le ciliegie acide*

Nutrienti/Nutraceutici	Ciliegie dolci	Ciliegie acide
Energia (kcal)	63,00	50,00
Fibre (g)	2,10	1,60
Zuccheri totali (g)	12,80	8,50
Saccarosio (g)	0,15	0,80
Glucosio (g)	6,60	4,20
Fruttosio (g)	5,30	3,50
Vitamina A (Unità Internazionali)	64,00	1.283,00
Vitamina C (mg)	7,00	10,00
Vitamina E (µg)	70,00	70,00
Potassio (mg)	222,00	173,00
β-carotene (µg)	38,00	770,00
Antocianine (mg)	171,40	131,30
Flavonoli (mg)	2,64	12,40
Flavanoli (mg)	15,07	20,30
Acidi idrossicinnammici (mg) - Saggio di Folin	87,80	42,38

1.5 I polifenoli contenuti nelle ciliegie: proprietà chimiche, biochimiche e nutraceutiche

I flavonoidi vegetali, e in particolare le antocianine, sono composti polifenolici capaci di ossidarsi più facilmente di altre sostanze presenti nel vegetale o nel frutto di origine.

In questo modo impediscono l'ossidazione di costituenti più pregiati – come acidi nucleici, proteine e lipidi – contenuti nel vegetale o nel frutto^{15,16}.

I flavonoidi contenuti nei vegetali e nei loro frutti vengono suddivisi in flavoni, isoflavoni, flavani, flavanoni, flavonoli, isoflavonoli, antocianine e antocianidine e vengono sintetizzati attraverso percorsi biosintetici diversi^{17,18}.

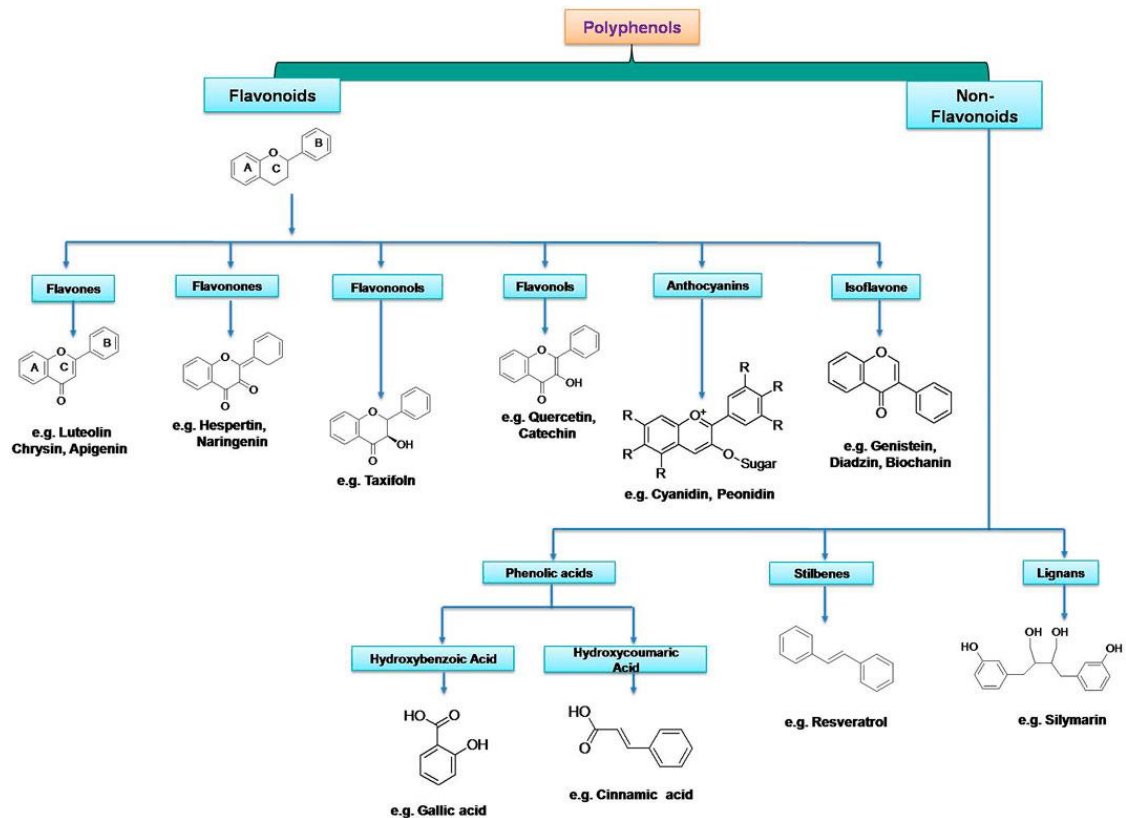


Figura 3. Polifenoli naturali¹⁹

Molti di questi polifenoli sono noti per le loro proprietà antiossidanti, cioè come composti capaci di antagonizzare i processi ossidativi disregolati/eccessivi dell'organismo che possono essere causa o concausa di diverse patologie come, per esempio, malattie neurodegenerative o tumori.

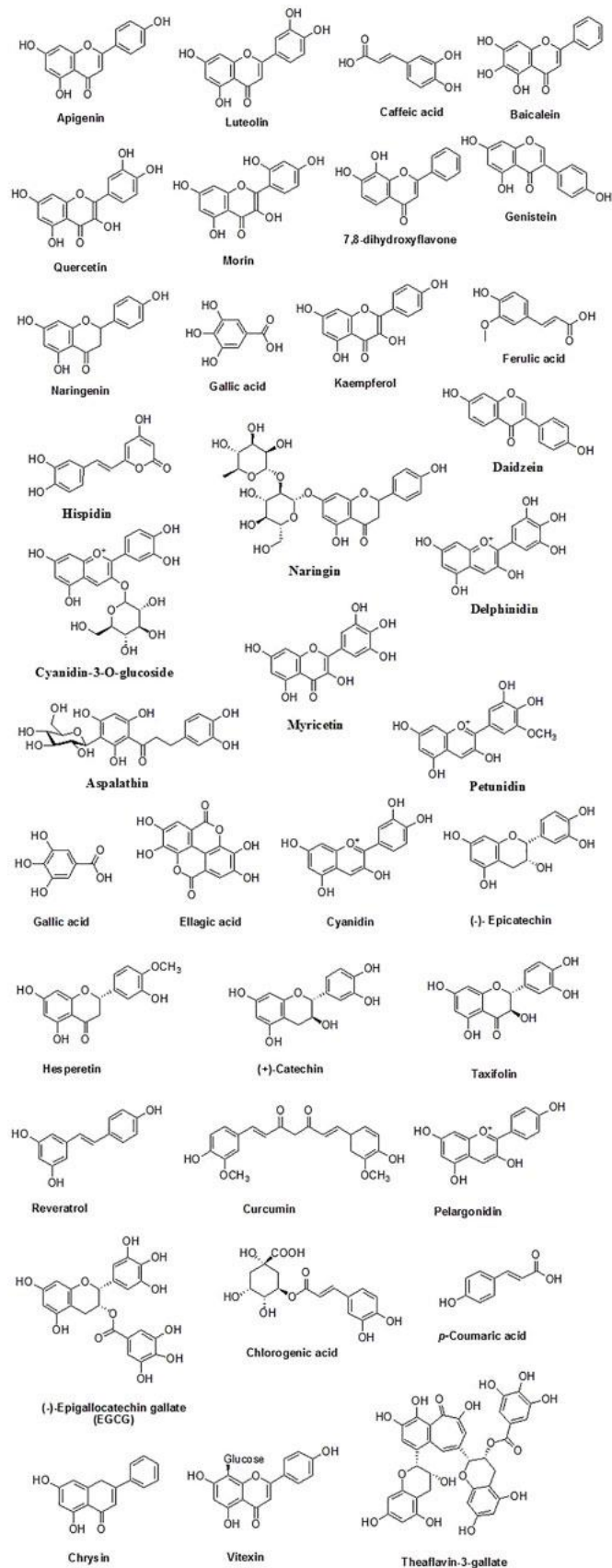


Figura 4. Strutture chimiche di alcuni polifenoli con proprietà nutraceutiche ¹⁹

Per quanto riguarda gli effetti antiossidanti dei polifenoli, e in particolare delle antocianine, la letteratura è ricca di esempi^{20,21}.

Il metabolismo animale è di solito ossidativo: ricava energia dagli alimenti e in particolare ossida il carbonio contenuto nei vegetali fino ad anidride carbonica. Quindi nell'organismo sono presenti molti cicli redox che vengono gestiti attraverso una serie di meccanismi di feedback. Un prodotto del metabolismo possono essere alcune specie radicaliche che, di solito, essendo ad alta energia sono molto reattive e a vita breve come intermedi di reazioni. In condizioni fisiologiche normali queste specie radicaliche non sono dannose, perché l'eventuale eccesso viene controllato dall'organismo, ma in alcune situazioni patologiche o in seguito a alcune condizioni ambientali (per esempio l'esposizione a radiazioni, il contatto con agenti chimici, ecc.) la produzione di specie radicaliche supera la capacità dell'organismo di utilizzarle o di rimuoverle e allora si possono verificare le condizioni per l'insorgere di fenomeni infiammatori o di patologie per reazione delle specie radicaliche con acidi nucleici, proteine e lipidi. Generalmente fenoli e i polifenoli reagiscono con le specie radicaliche più facilmente e velocemente delle macromolecole e così impediscono il danno radicalico all'organismo.

I polifenoli, introdotti con la dieta oppure ottenuti per sintesi chimica, neutralizzano i radicali trasferendo un atomo di H e così contribuiscono a diminuire il danno ossidativo sull'organismo²².

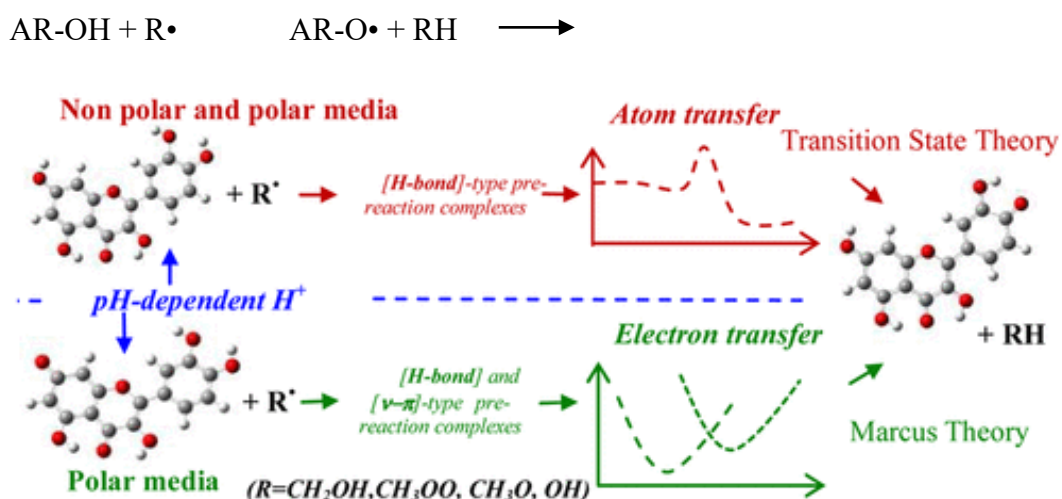


Figura 5. Meccanismo di neutralizzazione di radicali da parte dei polifenoli

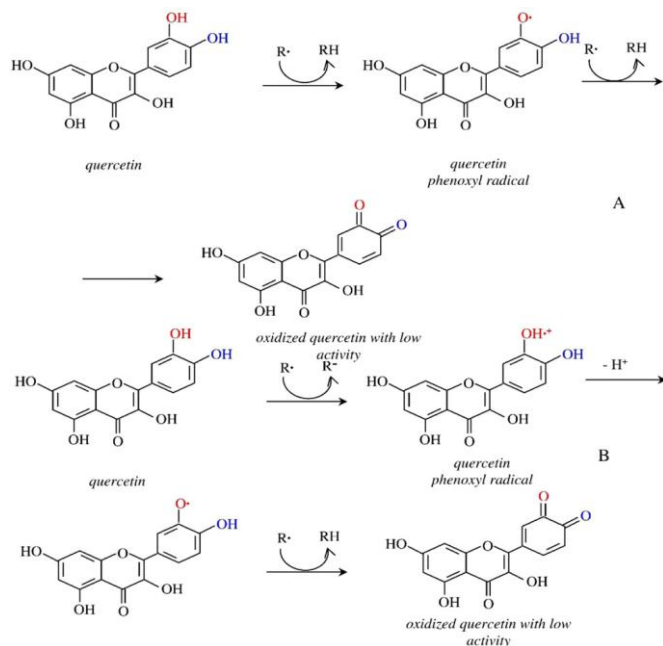


Figura 6. Ipotesi di meccanismo di neutralizzazione di radicali da parte della quercetina (A) Trasferimento dell'elettrone (vedi Figura 5 e bibliografia: DiMeo et al. - *The J.Physical Chemistry A 2013 Radical Scavenging Natural Polyphenols*). (B) Trasferimento dell'elettrone e del protone²³

L'insorgere di fenomeni infiammatori cronici è spesso all'origine di molte patologie²⁴. L'infiammazione è una risposta normale ed essenziale ad ogni stimolo nocivo che minaccia l'ospite e può variare da una risposta localizzata ad una generalizzata. Uno dei meccanismi primari di un evento infiammatorio è il rilascio di mediatori chimici proinfiammatori (per es. istamina, serotonina, leucochine, sostanza a reazione lenta dell'anafilassi [SRS-A], enzimi lisosomiali, linfocinine e prostaglandine [PG]). Le fonti più comuni di questi mediatori chimici includono neutrofili, basofili, mastociti, piastrine, macrofagi e linfociti²⁵. Una infiammazione troppo prolungata o eccessiva può danneggiare l'organismo. I farmaci antinfiammatori attualmente disponibili alleviano i sintomi dolorosi della malattia, ma non sono considerati curativi. Tutti i principi attivi naturali che aiutano a controllare un'infiammazione eccessiva o cronica possono quindi essere considerati dei nutraceutici. La letteratura che descrive gli effetti antinfiammatori delle singole antocianine e delle antocianine in generale è molto ampia^{26,27}, per questo le proprietà antinfiammatorie delle antocianine di *P. cerasus* verranno trattate nella seconda parte della tesi.

1.6 Le antocianine

Le antocianine sono derivati glicosidici dell'antocianidina (aglicone) contenuti nei petali, nelle foglie e nei frutti. Chimicamente costituiscono un sottoinsieme dei polifenoli vegetali visti nel paragrafo precedente. Sono pigmenti idrosolubili costituiti di solito da una parte costituita da zuccheri e da una con struttura diversa dagli zuccheri (aglicone). Queste molecole (dal greco άνθος "fiore" e κύανος "azzurro", cioè pigmenti azzurri contenuti nei fiori come furono visti nelle prime separazioni cromatografiche) sono composti presenti in proporzione dello 0,1-1% che contribuiscono alla colorazione rossa, blu e porpora dei frutti e dei vegetali e che possono venire estratti da varie parti della pianta e in particolare dalla buccia del frutto delle ciliegie^{7,27-29}.¹

Le antocianine infatti sono ben presenti anche nelle ciliegie dolci e acide, soprattutto nella buccia³⁰, ma la loro attività nutraceutica può essere compromessa da diversi fattori quali la temperatura di conservazione del frutto, il pH, le radiazioni, la presenza di particolari enzimi o ioni metallici, la quantità di ossigeno, l'umidità e la presenza di microorganismi.

Nonostante le antocianine siano molte gli agliconi antocianidinici più diffusi sono solo 6: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (Figura 7).

Le antocianine più comuni sono derivati 3-glucosidici oppure 3,5-diglucosidici delle antocianidine. Oltre al glucosio, lo zucchero più comune, la parte zuccherina legata all'aglicone può essere costituita da galattosio, ramnosio, xilosio e arabinosio.

In alcuni casi l'aglicone antocianidinico può essere acilato da un residuo di acido cinnamico, p-coumarico, caffeico, ferulico, malonico, succinico o acetico, oltre a formare acetale/acetali con residui zuccherini.

Le antocianine cambiano colore al variare del pH: in ambiente fortemente acido il loro colore varia tra il rosso e l'arancio, mentre in ambiente debolmente acido mostrano un colore che va dal rossastro al violetto. Il colore blu compare solo in ambiente alcalino.

Le antocianine sono quindi glicosidi e alchilglicosidi idrosolubili delle antocianidine composti chimici aventi come struttura base il catione flavilio (2-fenil-1-benzopirilio).

In Figura 7 sono indicate le antocianine più diffuse il cui colore, tra l'altro, dipende dai sostituenti che decorano il nucleo flavilico: al crescere del numero di gruppi fenolici sull'anello C di figura 7 il massimo di assorbimento nella regione del visibile (cioè il colore complementare) si sposta a lunghezze d'onda più alte. Per esempio le λ_{\max} di una soluzione con concentrazione 0.01 % in HCl-MeOH sono: 520 nm per la pelargonidina, 535 nm per la cianidina, 532 nm per la peonidina, 546 nm per la delphinidina, 543 nm per la petunidina e 547 nm per la malvidina e cambiano in funzione del solvente (in figura 7 sono riportate le λ_{\max} di una soluzione acquosa).

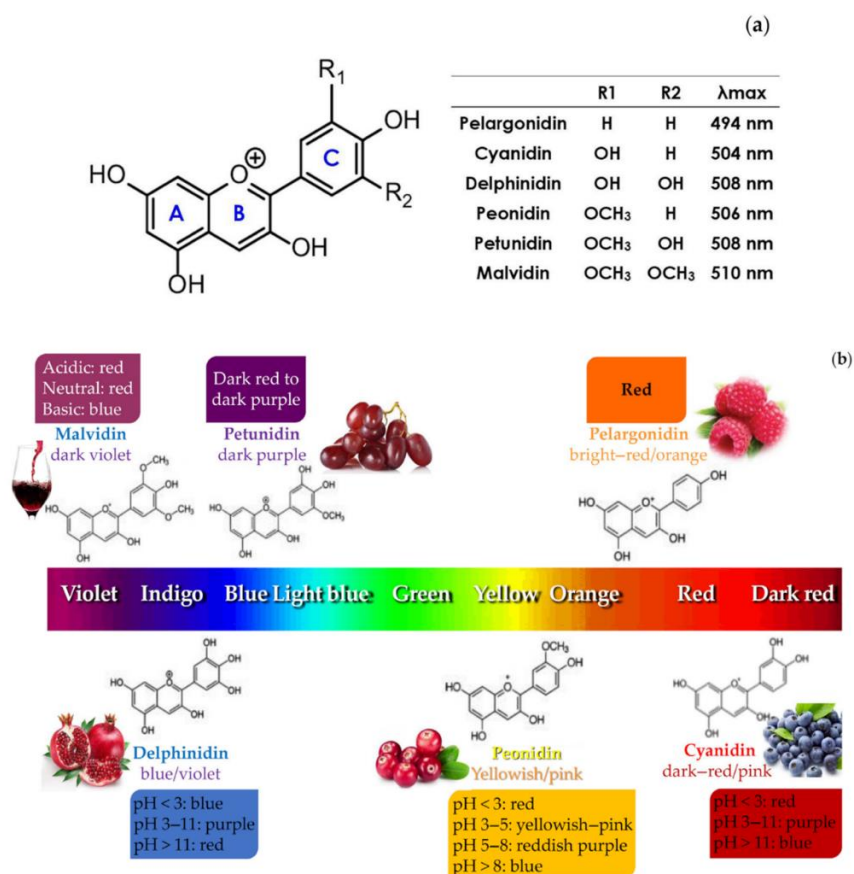


Figura 7. (a) Struttura chimica comune delle antocianine più diffuse con l'indicazione del massimo di assorbimento. (b) Colori delle antocianine più comuni in funzione del pH ³¹

Le antocianine sono acidi/basi deboli come gli indicatori comunemente usati in chimica analitica. La variazione di colore delle antocianine, in funzione dei sostituenti negli anelli, e quindi dell'acidità dei gruppi fenolici, si può vedere dalla figura 7 e dalla tabella 4 sotto mentre le strutture sono riportate nelle figure 8 e 9 seguenti.

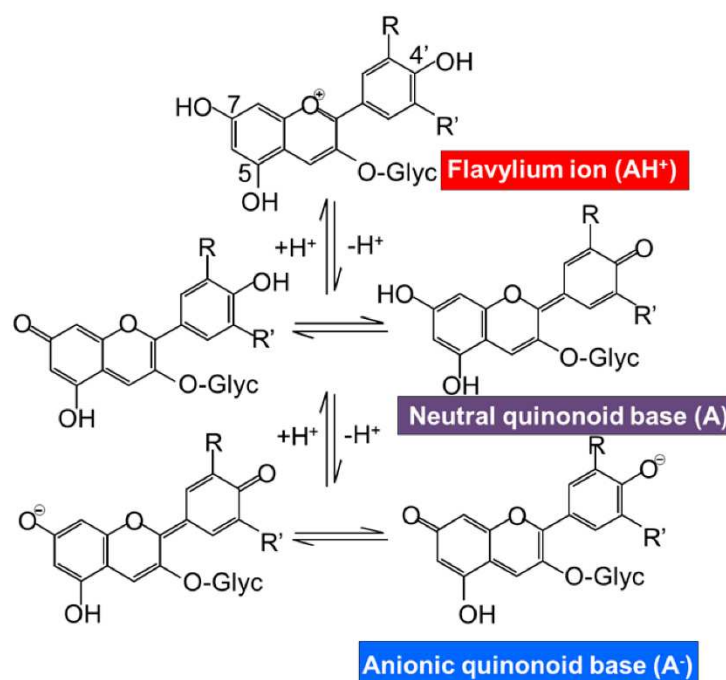


Figura 8. Effetto del pH sullo stato di ionizzazione e sul colore delle antocianine ²¹

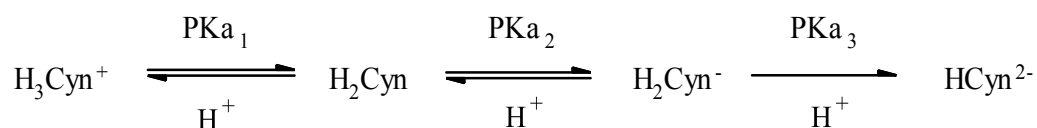


Tabella 4. Costanti di ionizzazione delle antocianine più abbondanti in natura

	pKa1	pKa2	pKa3
Cianidina (Cyn)	5.28	6.91	8.67
Delfinidina (Dlp)	4.97	6.81	8.08
Malvinidina (Mlv)	5.19	7.26	8.73
Pelargonidina (Plg)	5.79	7.20	8.91
Peonidina (Pnd)	5.73	7.53	8.51
Petunidina (Ptn)	5.38	6.99	8.27

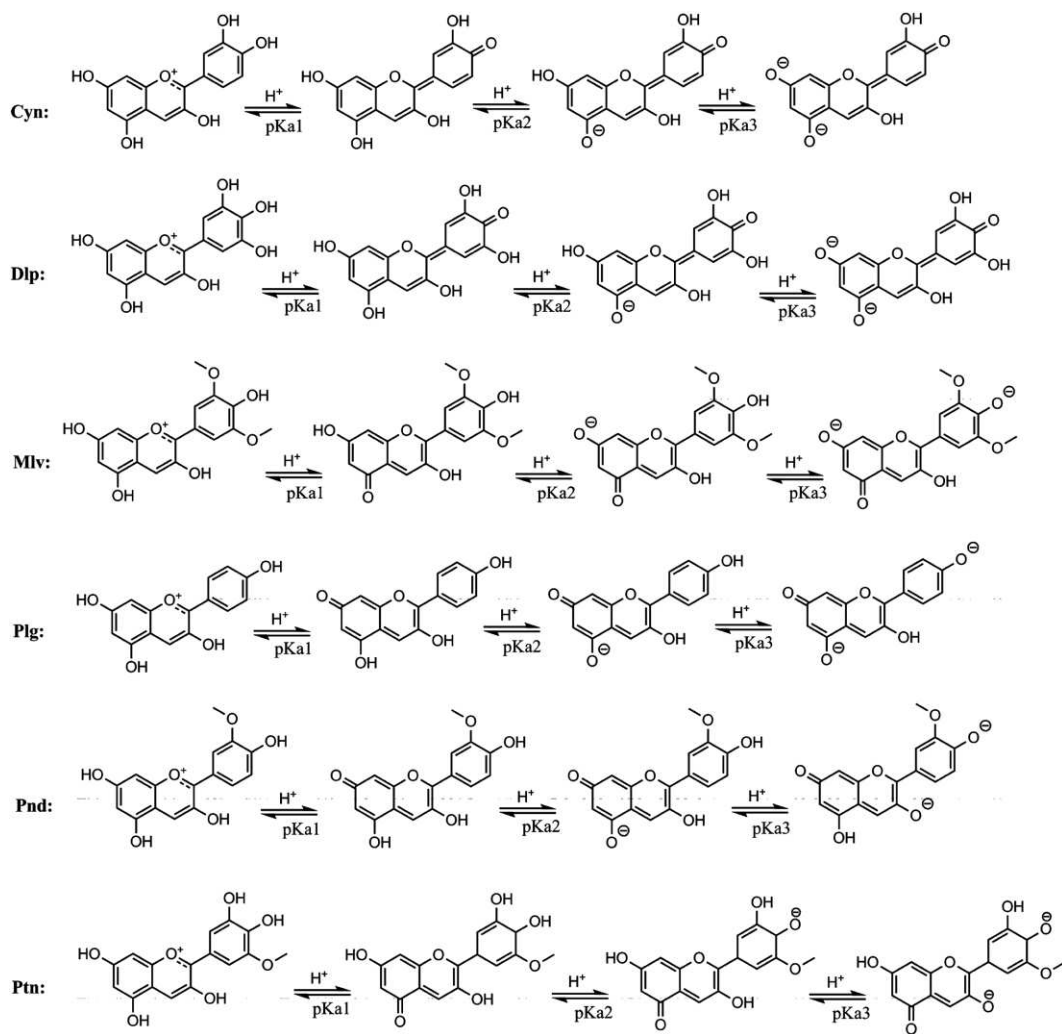


Figura 9. Strutture delle antocianine più comuni in natura a diversi pH³²

Per ogni antocianina si può tracciare il diagramma che mostra la concentrazione (in frazione molare) delle specie (e quindi il colore prevalente, figura 10.2) in funzione del pH come viene mostrato in figura 10.1 per la cianidina³².

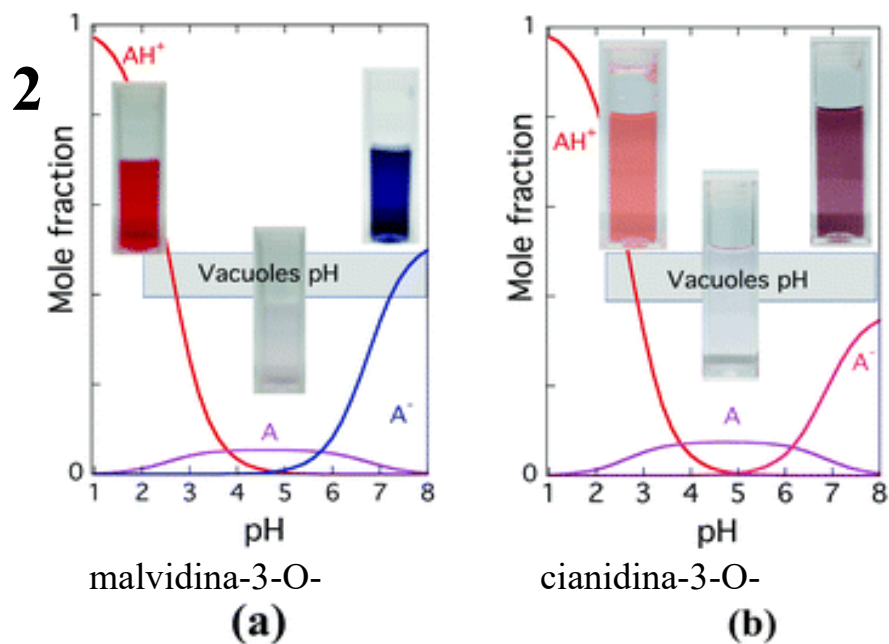
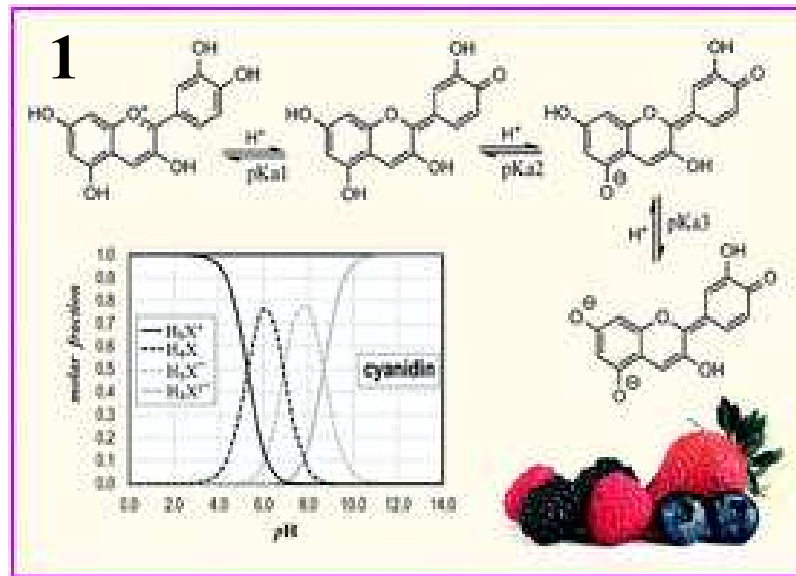


Figura 10. Strutture e frazioni molari della cianidina a differenti pH (1) e colori di soluzioni di malvidina-3-O-glucoside (2a) e cianidina-3-O-glucoside (2b) in funzione della loro frazione molare e del pH³³

Finora sono state individuate più di 700 antocianine diverse, di cui 270 circa negli ultimi 20 anni, ma quelle contenute più comunemente negli alimenti (figura 11).

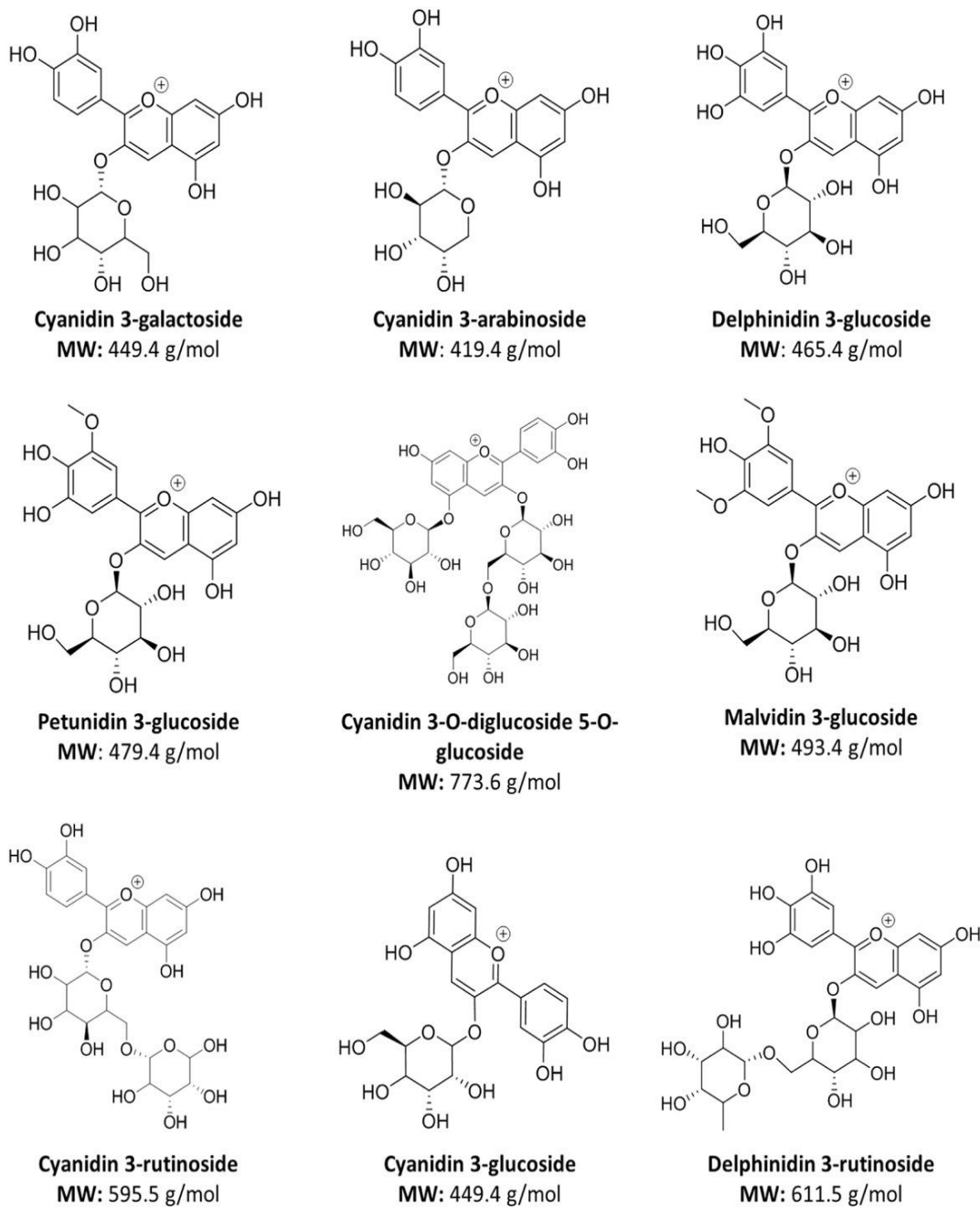


Figura 11. Antocianine contenute frequentemente negli alimenti ³⁴

Gli effetti benefici delle antocianine sulla salute, effetti nutraceutici, sono quelli antiossidanti che hanno come conseguenze più importanti la diminuzione di fenomeni antinfiammatori, la minor probabilità dell'insorgere di fenomeni cancerosi (effetto antitumorale sia delle antocianine che di composti ispirati alla loro struttura³⁵⁻³⁷) ed effetto antimutageno³⁸.

Le antocianine sono anche state mostrate avere un effetto antibatterico^{39,40}. Più direttamente sull'organismo umano sono state riportate attività antipertensive,⁴¹ cardioprotettive⁴², anti-Alzheimer⁴³, la capacità di proteggere il DNA da danni⁴⁴ e altre²⁷.

Naturalmente poi l'effetto della singola antocianina dipende dalla sua concentrazione, dalla presenza/assenza di molecole con attività sinergica/antagonista.

Diversi studi hanno dimostrato come le antocianine a un dosaggio 2,5-50 µg/mL abbiano ridotto, in maniera dose dipendente, la differenziazione degli adipociti, l'accumulo lipidico, la lipolisi (una delle caratteristiche dell'obesità è l'infiammazione cronica di grado basso che è causata da un malfunzionamento degli adipociti) e la secrezione di citochine infiammatorie⁴⁵.

Per questo è importante il metodo di conservazione del frutto o del vegetale che deve garantire il più possibile la stabilità delle antocianine nel tempo che trascorre tra la raccolta e il consumo. Questo è un settore multidisciplinare e in continua evoluzione per questo verrà discusso solo il caso delle antocianine in *P. cerasus* nella seconda parte di questo lavoro di tesi.

1.6.1 Antocianine: utilizzo come additivi alimentari

La crescente richiesta di alimenti non sofisticati con sostanze chimiche non naturali (additivi alimentari) ha aumentato la domanda di antocianine per usarle come coloranti o come additivi nell'industria alimentare.

Gli additivi alimentari infatti sono sostanze utilizzate nell'industria alimentare durante la preparazione, l'immagazzinamento e la commercializzazione di prodotti destinati all'alimentazione. Svolgono determinate funzioni quali, ad esempio, colorare, dolcificare o conservare.

Il Regolamento (CE) n. 1333/2008 definisce additivo alimentare "qualsiasi sostanza abitualmente non consumata come alimento in sé e non utilizzata come ingrediente caratteristico di alimenti, con o senza valore nutritivo, la cui aggiunta intenzionale ad alimenti per uno scopo tecnologico nella fabbricazione, nella trasformazione, nella preparazione, nel trattamento, nell'imballaggio, nel trasporto o nel

magazzinaggio degli stessi, abbia o possa presumibilmente avere per effetto che la sostanza o i suoi sottoprodotti diventino, direttamente o indirettamente, componenti di tali alimenti".

Nell'Unione Europea tutti gli additivi alimentari sono identificati da un numero preceduto dalla lettera E e vengono raggruppati a seconda della loro funzione:

E100-E199, coloranti, migliorano l'aspetto di bevande e alimenti vari

E200-E299, conservanti, rallentano, o bloccano, le alterazioni provocate dai microrganismi

E300-E399, antiossidanti e regolatori di acidità, impediscono i processi di irrancidimento dei grassi e l'imbrunimento di frutta e verdura

E400-E499, addensanti, stabilizzanti e emulsionanti

E500-E599, regolatori di acidità e anti agglomeranti

E600-E699, esaltatori di sapidità, esaltano il sapore e la fragranza di un prodotto

E900-E999, vari

E1000-E1999, sostanze che non rientrano nelle classificazioni precedenti

Gli additivi alimentari, quando presenti, devono sempre essere indicati tra gli ingredienti degli alimenti, come stabilito dalle norme del Regolamento (UE) n.1169/2011. In particolare le etichette dei prodotti devono riportare la funzione svolta dall'additivo (ad esempio, colorante o conservante) seguita dalla sostanza specifica usata (ad esempio E100 o curcumina). La curcumina in etichetta, quindi, sarà indicata come "colorante: curcumina" oppure "colorante: E100". (Istituto Superiore di Sanità - <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/a/additivi-alimentari> e regolamento (CE) n. 1333/2008 del parlamento europeo e del consiglio del 16 dicembre 2008 relativo agli additivi alimentari (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02008R1333-20161027&from=PL>).

2. IL CILIEGIO ACIDO (*P. cerasus*)

2.1 Il ciliegio acido (*P. cerasus*) e le ciliegie acide

Recentemente si è osservato che le ciliegie acide contengono livelli relativamente alti di composti nutraceutici, polifenoli, e questo ha aumentato l'attenzione verso questo frutto. In particolare per le ciliegie acide 'Montmorency' coltivate in Michigan (USA) è interessante il sito internet: <https://www.choosecherries.com/>.

Le ciliegie acide sono state incluse nell'elenco dei "super-frutti" a causa dei loro effetti benefici sull'organismo⁴⁶ e negli ultimi vent'anni la loro composizione chimica è stata caratterizzata con sempre maggior precisione e completezza.

Le cultivar di ciliegio acido si possono suddividere in tre gruppi: le "amarene", i cui frutti, appiattiti alle estremità, sono di colore rosso pallido con succo incolore e sapore leggermente acidulo-amaro; le "visciole" o "agriotte", caratterizzate da frutti tondeggianti o cuoriformi, di colore rosso scuro, con succo rossastro e sapore decisamente acido e infine le «marasche», con frutti tondi e piccoli, buccia e polpa di colore rosso scuro e sapore fortemente amaro-acido⁴⁷.

Il ciliegio dolce e quello acido sono diversi. Il primo è un albero tendenzialmente alto, può raggiungere i 20 metri, con foglie ovali doppiamente dentate, rugose e leggermente pelose nella parte inferiore. Il ciliegio acido è, invece, più simile a un arbusto o alberello, con altezza di 4-5 metri e ramoscelli sottili. Le foglie, abbastanza dure, lisce e diritte, sono di colore verde scuro. Il colore del frutto varia, a seconda della varietà, da rosso chiaro a rosso molto scuro. La buccia tende a staccarsi dalla polpa che è molto succosa.

La coltura del ciliegio acido è molto diffusa in Nord Europa mentre in Italia è marginale (e i frutti sono destinati per il 90% all'industria) mentre siamo tra i primi Paesi produttori al mondo di ciliegie dolci⁴⁸.

Nella tabella 5 sono mostrate la produzione italiana e mondiale di ciliegie acide nel periodo 1993-2017. Dall'ultima colonna a destra che mostra la percentuale della produzione italiana rispetto a quella mondiale si può notare come la produzione italiana rivesta, almeno per ora, un ruolo marginale.

Tabella 5. Produzione italiana e mondiale di ciliegie acide nel periodo 1993-2017

Fonte: FAOSTAT <https://data.un.org/Data.aspx?d=FAO&f=itemCode%3A530>

Anno	Superficie italiana coltivata - ha	Resa Italia (hg/ha)	in Produzione italiana (tonnellate)	Superficie mondiale coltivata (ha)	Resa nel mondo (hg/ha)	Produzione mondiale (tonnellate)	Produzione % (italiana/mondiale)
2017	1.604	47.294	7.586	207.631	57.107	1.185.712	0,64%
2016	1.602	47.278	7.574	214.974	65.358	1.405.018	0,54%
2015	1.622	46.757	7.584	209.614	64.062	1.342.821	0,57%
2014	1.600	47.306	7.569	208.582	63.890	1.332.622	0,57%
2013	1.581	47.679	7.538	206.069	67.259	1.385.990	0,54%
2012	1.577	47.717	7.525	226.379	51.300	1.161.313	0,65%
2011	1.604	46.908	7.524	227.003	55.134	1.251.548	0,60%
2010	1.582	49.102	7.768	216.710	52.195	1.131.116	0,69%
2009	1.600	50.000	8.000	231.105	57.985	1.340.054	0,60%
2008	1.500	50.000	7.500	226.314	53.957	1.221.122	0,61%
2007	1.541	45.425	7.000	252.830	47.146	1.191.997	0,59%
2006	1.700	40.000	6.800	259.613	44.003	1.142.366	0,60%
2005	1.670	41.916	7.000	239.090	48.272	1.154.137	0,61%
2004	1.650	37.576	6.200	266.586	46.499	1.239.599	0,50%
2003	1.670	42.455	7.090	248.723	45.575	1.133.563	0,63%
2002	1.680	52.315	8.789	231.495	42.029	972.954	0,90%
2001	1.500	52.413	7.862	240.194	46.761	1.123.169	0,70%
2000	1.500	66.667	10.000	227.946	49.136	1.120.028	0,89%
1999	1.560	56.859	8.870	216.136	45.703	987.799	0,90%
1998	1.400	44.286	6.200	227.390	43.759	995.037	0,62%
1997	1.300	46.154	6.000	224.557	48.040	1.078.770	0,56%
1996	1.500	48.000	7.200	240.660	48.210	1.160.218	0,62%
1995	1.251	50.360	6.300	230.086	44.852	1.031.988	0,61%
1994	1.400	52.857	7.400	238.869	41.526	991.931	0,75%
1993	1.300	53.846	7.000	238.439	51.107	1.218.582	0,57%

2.2 La qualità della ciliegia acida e dei derivati: i componenti attivi, le antocianine

Le antocianine hanno importanti proprietà nutraceutiche e industriali (coloranti, conservanti) per questo sono importanti i metodi di caratterizzazione delle antocianine sia nella ciliegia acida tal quale, allo scopo di caratterizzarne la qualità e le caratteristiche nutrizionali, sia negli estratti che dovranno essere titolati sia per l'aggiunta ad altri alimenti. Bisogna anche ricordare che le antocianine si degradano

con una cinetica che è funzione della temperatura, del pH, della quantità di ossigeno presente, della presenza di alcuni enzimi e/o di altre molecole organiche che reagiscono con loro.

Non sempre è possibile eseguire l'analisi desiderata delle antocianine contenute nel frutto del ciliegio acido o in un alimento senza rimuovere delle sostanze interferenti. Per questo consideriamo ora brevemente alcuni metodi di estrazione/purificazione da varie matrici.

2.2.1 Metodi estrattivi e analitici per la caratterizzazione del frutto e dei derivati

2.2.1a Estrazione con solventi (estrazione solido-liquido, SLE)

Questo metodo viene usato per estrarre antocianine da diverse matrici vegetali⁴⁹. È stato recentemente pubblicato un interessante studio dell'estrazione di antocianine dalle bucce dei frutti di *Prunus cerasifera* Ehrh. (rosacea molto comune detta anche amolo, mirabolano o brombolo)⁵⁰. Poiché le antocianine contenute sono simili a quelle del ciliegio, in particolare la più abbondante è la cianidina-3-glucoside come nel ciliegio acido^{47,51}, considereremo in dettaglio la procedura più recente riportata utile sia a scopi analitici che preparativi per ottenere antocianine da usare sia come nutraceutici che come coloranti.

Gli autori hanno immerso 10 g di bucce di amoli (in veneto è il nome più comune per il frutto del *P. cerasifera*) in diversi solventi ottenendo delle sospensioni. Quindi le sospensioni sono state scaldate in un termostato per un certo tempo e poi filtrate. Dopo la prima estrazione le bucce sono state riestratte con nelle stesse condizioni ma con metà del solvente usato nella prima estrazione. Gli estratti sono stati riuniti e centrifugati per essere usati nelle misure.

Sono stati quindi studiati gli effetti del tipo di solvente, del rapporto solido/liquido, del tempo di estrazione e della temperatura di estrazione per quanto riguarda l'estrazione di antocianine.

Le antocianine estratte sono state determinate con il seguente metodo colorimetrico: un'aliquota di 2 mL di centrifugato è stata diluita con 18 mL di soluzione tampone [pH= 3,0 (0,6 mol/L Na₂HPO₄·12H₂O:0,3 mol/L acido citrico = 100:127, v/v)].

Come bianco è stata utilizzata una soluzione costituita da 2 mL del solvente utilizzato diluito con 18 mL dello stesso tampone. Si è quindi misurata l'assorbanza nell'intervallo 390-780 nm usando uno spettrofotometro UV-Vis. La concentrazione di antocianine **E** è stata calcolata con la formula: $E = A \times 10 \times a / W$, dove A è un massimo di assorbanza, W è il peso (g) of del campione e a è il fattore di diluizione.

Le antocianine estratte sono state determinate anche spettrofotometricamente in condizioni differenti: un'aliquota di 2 mL di centrifugato è stata diluita con 18 mL di soluzione tampone 1 [pH=1,0 (0,2 mol/L KCl:0,2 mol/L HCl =25:67, v/v)] e un'altra aliquota di 2 mL di centrifugato è stata diluita con 18 mL di soluzione tampone 2 [pH=4,5 (0,2mol/L NaAc•3H₂O:0,2 mol/L HAc=1:1, v/v)] per ottenere 20 mL delle soluzioni a pH 1,0 e 4,5. Come bianco è stata utilizzata una soluzione costituita da 2 mL del solvente utilizzato puro diluito con 18 mL della stessa miscela di tamponi. Si è misurata l'assorbanza a 510 nm e 700 nm determinando il contenuto di antocianine come cianidina-3-glucoside, uno dei pigmenti rossi più comuni del gruppo degli antociani e nelle ciliegie⁵², utilizzando la formula: $A = [(A_{510} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5}]$, cianidina-3-glucoside (mg/100g) = $A \times 449.2 \times 10 \times V \times 100 / 26900 \times m$ dove V è il volume totale (mL) dell'estratto; m è il peso (g) del campione di bucce; 26900 è il coefficiente di estinzione molare (ϵ) della cianidina-3-glucoside; e 449.2 è il peso molecolare della cianidina-3-glucoside (la cui formula di struttura è mostrata sotto, Pubchem).

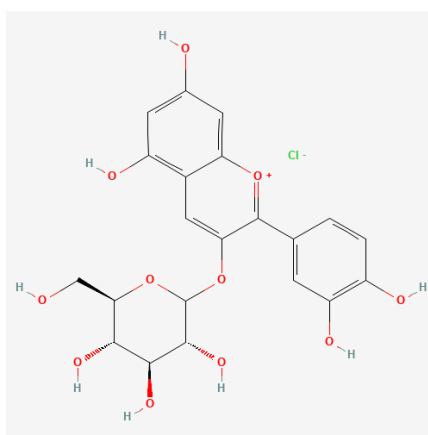


Figura 12. *Struttura chimica cianidina- 3 glucoside*

Infine le antocianine estratte sono state determinate anche cratograficamente usando una colonna RP18 (250 mm × 3.0 mm, 5µm) e in condizione isocratiche (fase mobile acetonitrile con 2% acido formico; flusso 0.3 mL/min; temperatura della colonna 35°C). Il rivelatore era uno spettrometro di massa in con una scansione degli ioni positivi (ESI+).

I risultati ottenuti sono illustrati nelle figure seguenti:

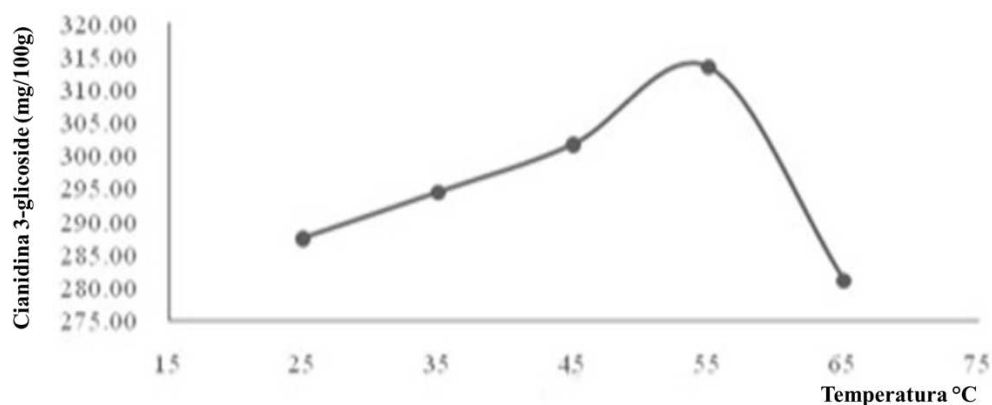


Figura 13. Effetto della temperatura sull'estrazione della cianidina-3-glucoside (le altre condizioni sperimentali erano: solvente di estrazione etanolo 2% HCl; rapporto solido:solvente = 1:4; tempo di estrazione 60 minuti)

Si nota il calo di resa di estrazione sopra i 55 °C a causa della degradazione della cianidina-3-glicoside.

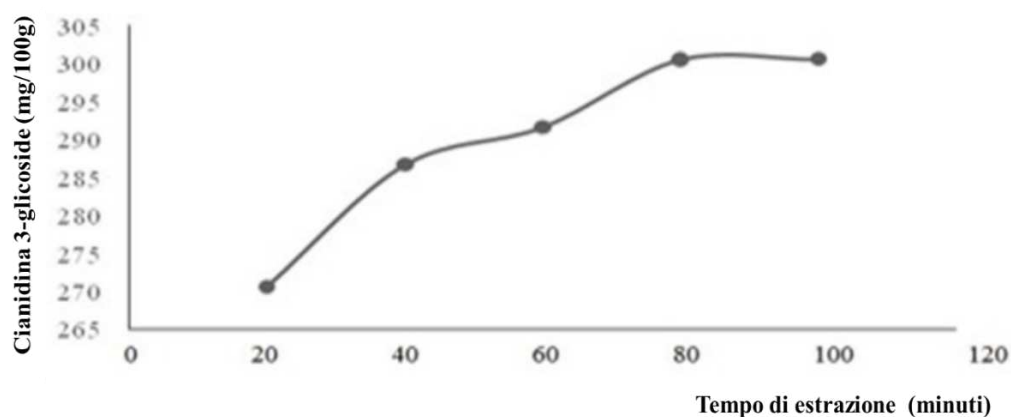


Figura 14. Effetto tempo sull'estrazione della cianidina-3-glucoside (le altre condizioni sperimentali erano: solvente di estrazione etanolo 2% HCl; rapporto solido:solvente = 1:4; temperatura di estrazione 25 °C)

Si vede come, una volta terminata l'estrazione, prolungare ancora il tempo di estrazione diminuisca la resa di estrazione poiché le antocianine sono meno stabili nel solvente di estrazione che nella matrice vegetale di origine.

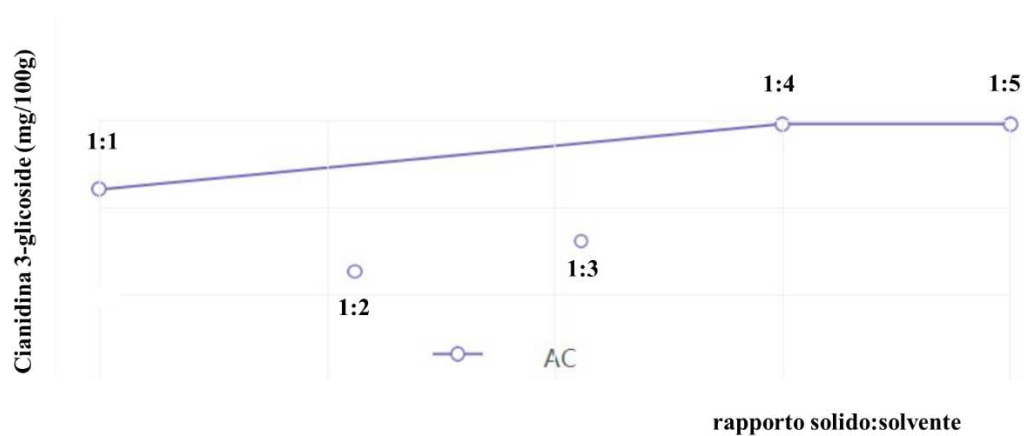


Figura 15. Effetto rapporto solido:solvente sull'estrazione della cianidina-3-glucoside (le altre condizioni sperimentali erano: solvente di estrazione etanolo 2% HCl; tempo di estrazione 60 minuti; temperatura di estrazione 25 °C) AC = concentrazione di antocianina estrapolata.

Si vede come un eccesso di solvente non serve ad aumentare la resa di estrazione.

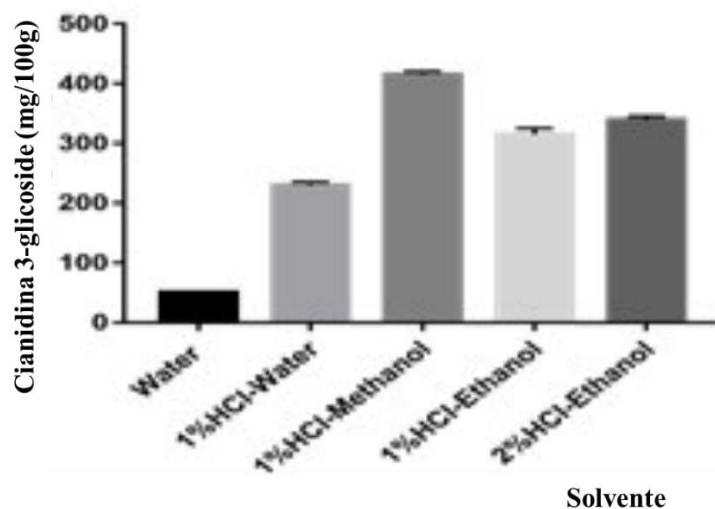


Figura 16. Effetto del solvente di estrazione sulla resa di cianidina-3-glucoside estratta (le altre condizioni sperimentali erano: rapporto solido:solvente = 1:4; tempo di estrazione 60 minuti; temperatura di estrazione 25 °C) AC = concentrazione di antocianina estrapolata.

Come riportato nelle figure 8, 9 e 10 e in tabella 4 si vede che a $\text{pH} < 2$ si ha la formazione quasi completa del catione flavilio o 2-fenil-1-benzopirilio. Quindi la presenza di acido cloridrico aumenta la solubilità come anche la presenza di un solvente organico polare (metanolo, etanolo). Un pH troppo basso non serve (HCl 2%). Infatti anche in cromatografia si utilizzano fasi mobili acidificate.

Sono anche stati condotti studi con solvente in pressione, temperature di estrazione più elevate, ma le antocianine sono termolabili in queste condizioni e quindi questa procedura va valutata con attenzione²⁷.

E' stata usata anche la CO_2 in fase supercritica come solvente di estrazione di polifenoli dalle sanse di ciliegio acido⁵³. I risultati ottenuti con questa tecnica non sono migliori di quelli ottenuti con solventi "convenzionali" e il profilo cromatografico delle antocianine ottenute è riportato nella figura 17.

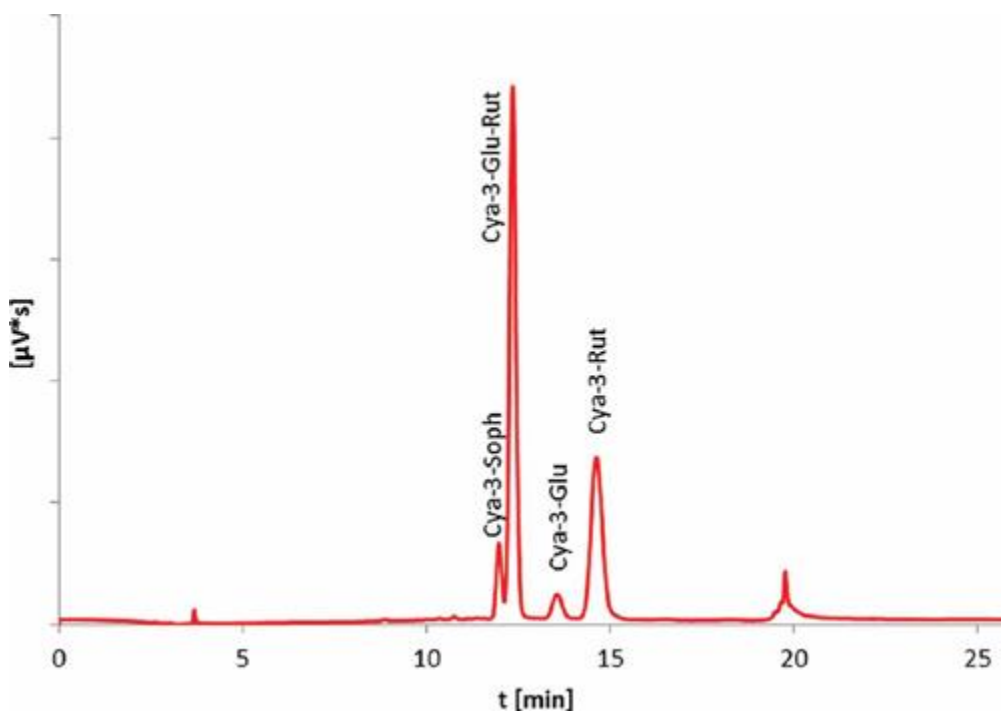


Figura 17. Antocianine ottenute da sanse di *Prunus C. L.*

2.2.1b Estrazione con solvente e ultrasuoni (Ultrasound assisted Extraction)

Gli ultrasuoni sono delle onde elettromagnetiche con frequenze superiori a quelle che l'orecchio umano può percepire, convenzionalmente superiori a 20 kHz. Di solito vengono divisi in ultrasuoni a bassa potenza (100 – 1000 kHz a bassa

intensità) e ultrasuoni ad alta potenza (20 – 100 kHz ad alta intensità). Questi ultimi sono usati per applicazioni come la miscelazione e l'omogeneizzazione, la macinazione a umido e la dispersione, l'emulsificazione, l'estrazione, la disintegrazione e le reazioni ecochimiche.

Gli ultrasuoni ad alta potenza possono generare bolle di cavitazione che vibrano e si espandono finché si rompono. Questo genera forze di taglio capaci di dilatare i pori sulle membrane cellulari ed eventualmente di romperle²⁷. Quindi l'energia fornita con le microonde aumenta e accelera il trasferimento di massa, nel nostro caso di antocianine, dalla cellula vegetale al solvente rispetto all'estrazione solido-liquido vista precedentemente. L'estrazione facilitata con ultrasuoni ha anche altri vantaggi rispetto a quella con solo solvente: la scalabilità lineare da laboratorio a dimensione industriale; il fatto che non è un processo termico (ciò impedisce/diminuisce la decomposizione termica di molecole termolabili), e la possibilità di ottenere effetti sinergici con sistemi esistenti (<https://www.hielscher.com/it/information-about-ultrasound.htm>). Si deve anche dire che l'effetto termico, cioè il riscaldamento della sospensione di vegetale, non è trascurabile anche quando si raffredda il reattore⁵⁴.

Naturalmente anche questo metodo estrattivo, come quello in solo solvente, non è selettivo per le antocianine del ciliegio amaro ma estrae diversi principi attivi nutritivi (zuccheri semplici e piccole quantità di proteine) e non nutritivi (spesso con proprietà nutraceutiche, es. le vitamine A, B₁, B₂, B₃ e C, i minerali come K, Fe, Ca e P e i polifenoli come antocianine e flavonoli che conferiscono a questi frutti proprietà antiossidanti e antiradicaliche molto utili dal punto di vista salutistico)⁴⁷.

Le ciliegie acide mostrano un contenuto peculiare di antocianine. La più rappresentativa è la cianidina (una delle più diffuse nei vegetali) che qui è presente in tre forme glucosilate caratteristiche di *P. cerasus*: la 3-soforoside, 3-rutinoside, la 3-glucosil-rutinoside e la 3-glucosil-rutinoside (le cui strutture, da Pubchem, sono nella Figura 18 sotto)⁴⁷.

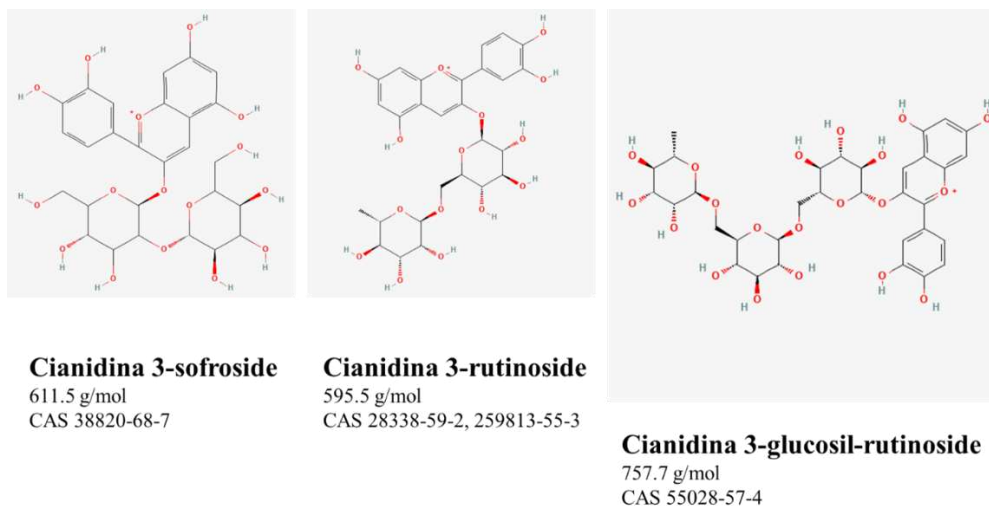


Figura 18. Antocianine caratteristiche di *Prunus C. L.*

L'estrazione di antocianine con l'auto di ultrasuoni da ciliegie acide è stata studiata anche recentemente^{55,56}.

Si è visto che i parametri più importanti sono il tipo di solvente utilizzato, il rapporto solido/solvente, la temperatura e il tempo di estrazione, la potenza dell'irraggiamento con ultrasuoni.

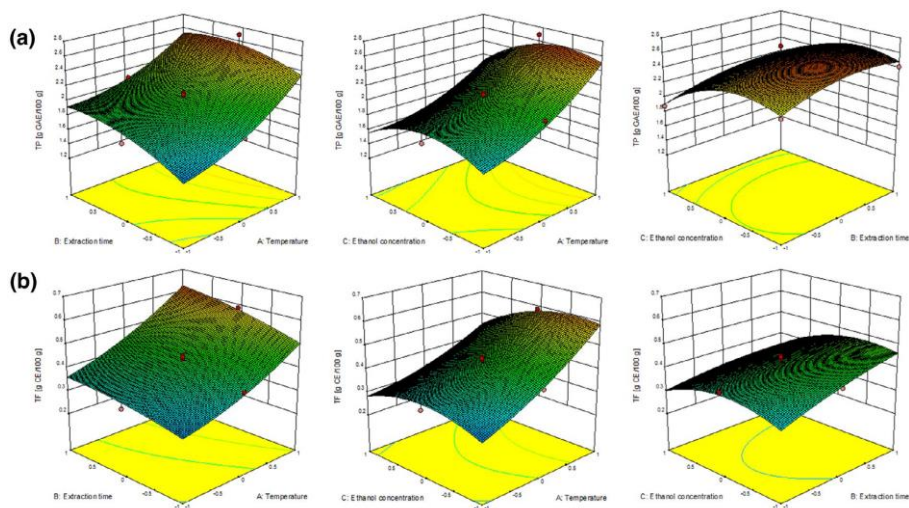


Figura 19. Esempi di grafici che, in una estrazione con solvente e ultrasuoni, correlano la concentrazione del solvente (Etanolo), il tempo di estrazione e il rapporto soluto/solvente. (a) contenuto totale di fenoli, (b) contenuto totale di flavonoidi nell'estratto⁵⁶

2.2.1c Estrazione con solvente e microonde (Microwave-Assisted Extraction - MAE)

L'estrazione con solvente e microonde di antocianine dalle ciliegie acide è cominciata nel 1986 ed è stata studiata recentemente anche in combinazione con gli ultrasuoni⁵⁷⁻⁵⁹. La tecnica estrattiva MAE si è dimostrata efficiente sia per preparazioni di laboratorio che per processi industriali. In questo caso poiché si tratta di estrarre composti abbastanza polari come i polifenoli, in particolare le antocianine, il solvente più indicato è l'acqua perché è anche il solvente più polare e quindi quello che meglio assorbe l'energia delle microonde. Inoltre l'acqua è un solvente "green" che non ha bisogno di energia per essere preparato o smaltito. Nelle ciliegie, le antocianine sono concentrate soprattutto nei vacuoli delle cellule della buccia. L'acido abscisico -ABA- (negli studi spesso sostituito dall'acido 1-naftalenacetico) è una auxina molto importante per la maturazione delle ciliegie, e degli altri frutti non-climaterici, in particolare per l'accumulo di antociani nei vacuoli delle cellule soprattutto della buccia. Questo è stato usato per studiare la maturazione delle ciliegie e l'accumulo di antociani nei vacuoli^{60,61}.

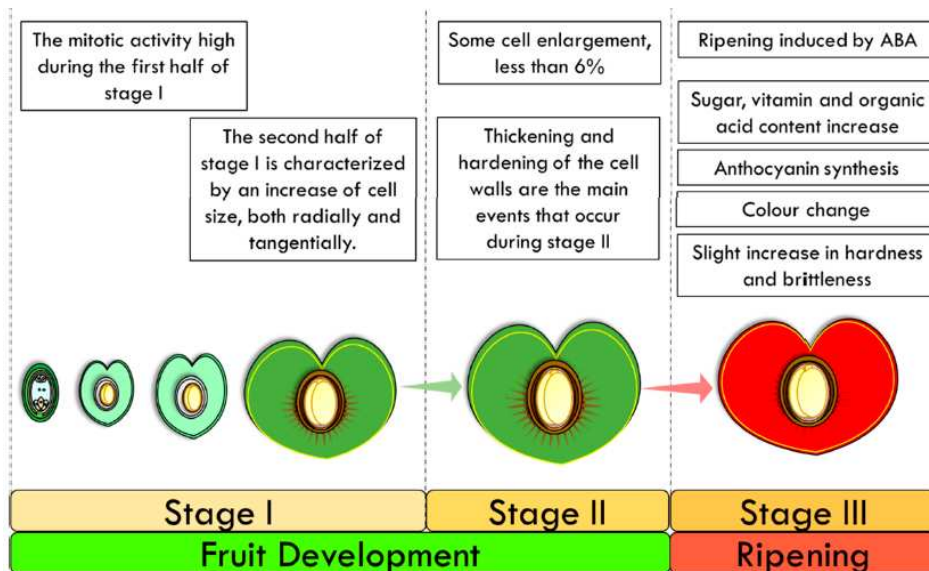


Figura 20. Maturazione di ciliegie coltivate. A una fase di crescita esponenziale (Stadio I) segue un plateau (Stadio II) e quindi un'altra fase di crescita esponenziale (Stadio III) di maturazione del frutto e, in particolare, di sintesi di antociani⁶¹

La biosintesi di antociani in seguito al trattamento con acido 1-naftalenacetico può essere seguita colorimetricamente (o con un rivelatore a diodi –DAD- usando le lunghezze d’onda nel visibile) o con rivelatori basati sulla spettrometria di massa (nella figura seguente MS/MS). Questi metodi permettono anche di seguire con precisione le fasi di estrazione delle antocianine dai frutti.

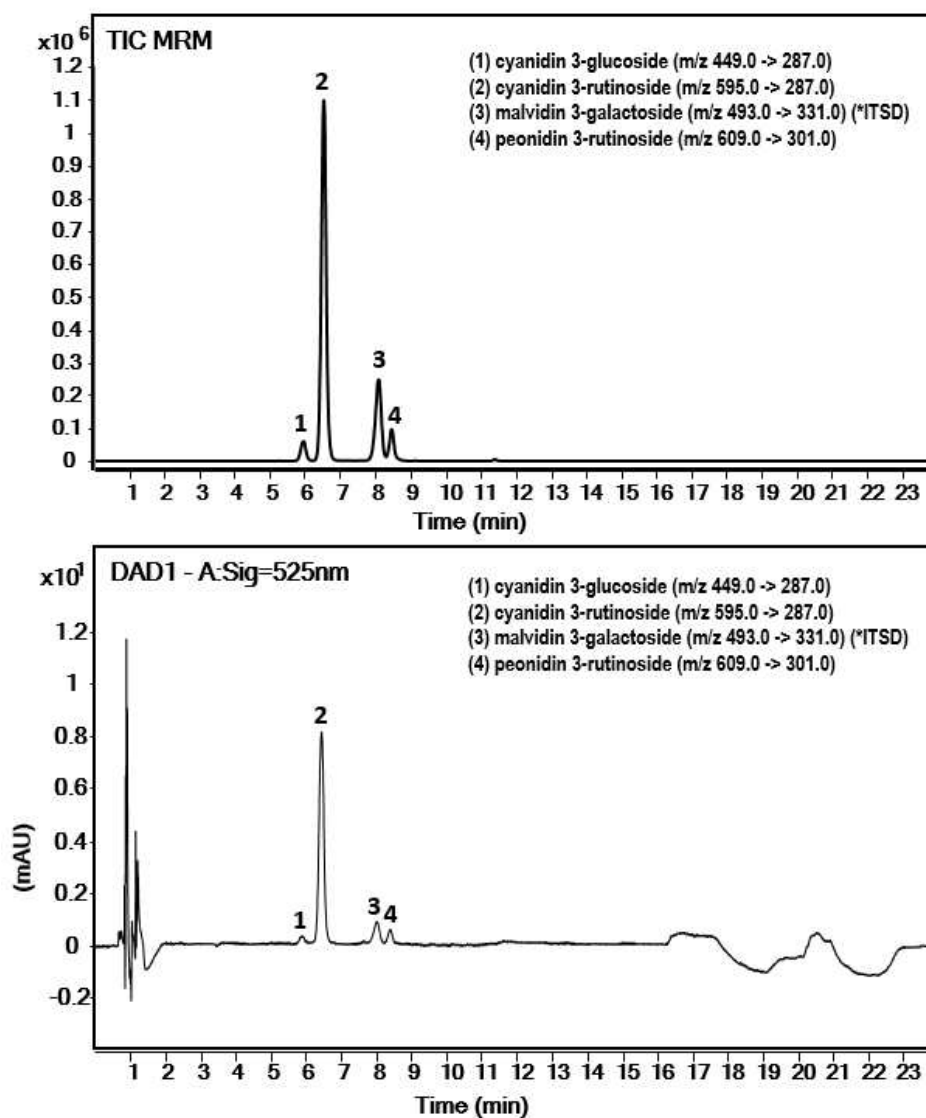


Figura 21. Metodi analitici per seguire la biosintesi di antocianine nelle ciliegie durante la maturazione⁶⁰. (TIC = total-ion current; mass spectra were recorded in multiple reaction monitoring (MRM) mode. DAD = Diode Array Detector, si vede che viene monitorata la lunghezza d’onda di 525 nm)

L'estrazione con solvente e microonde delle antocianine dalle ciliegie acide (*P. cerasus*, var. Marasca) è stata esaminata da Ivona Elez Garofulic e coll. dal frutto intero⁵⁷ e da Ebru Kurtulbaş Şahin e coll. dalle bucce⁶². Garofulic e coll. hanno valutato l'influenza dei parametri quali temperatura (nell'intervallo 50 – 70°C), tempo di irraggiamento (5 – 12 minuti) e potenza delle microonde (350–500 W) nell'estrazione delle singole antocianine, di tutte le antocianine e dei composti fenolici. In questo modo sono arrivati a ottimizzare i parametri di estrazione.

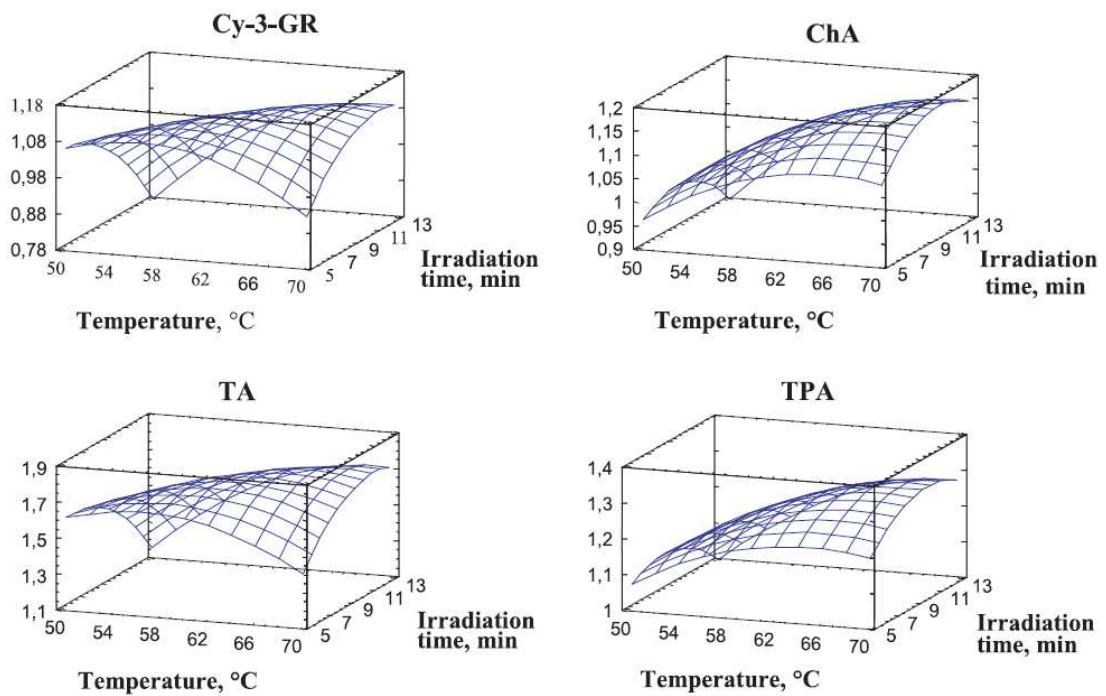


Figura 22. Curve che mostrano la concentrazione di cianidina-3-glucosilrutinoside, antocianine totali, acido clorogenico e polifenoli totali estratti dalle Marasche usando microonde con potenza di 425 W con tempi e temperature variabili. Le concentrazioni sono espresse in mg/g di frutta fresca. **Cy-3-GR**, cianidin-3-glucosylrutinoside; **TA**, total anthocyanins; **ChA**, chlorogenic acid; **TPA**, total phenolic acids

L'estrazione con solvente e microonde delle antocianine dalle bucce di ciliegie acide, che costituivano lo scarto della produzione di succo, è stata esaminata da Ebru Kurtulbaş Şahin e collaboratori. Anche questi autori hanno preso in considerazione la potenza di irraggiamento con microonde e il tempo di

irraggiamento ma hanno usato etanolo come solvente. Per ottimizzare i parametri di estrazione hanno quantificato nell'estratto:

- a) i composti polifenolici totali sono determinati usando la spettrofotometria UV-VIS (assorbimento a 765nm), con il metodo colorimetrico tramite il reagente Folin-Ciocalteu. La quantità di polifenoli è espressa in mg equivalenti di acido gallico per grammo di prodotto di partenza.
- b) Le antocianine totali furono determinate diluendo una aliquota di estratto in un tampone KCl/NaOAc a pH 4,5 quindi misurando spettrofotometricamente l'assorbimento a 520 e a 700 nm. Il risultato viene espresso in mg equivalenti di cianidina-3-glucoside per grammo di prodotto di partenza. Si è usato il valore di 26900 L/mol.cm per l'assorbività molare (o coefficiente di assorbimento molare) della cianidina-3-glucoside (MM 449,2 g/mol). La cianidina-3-glucoside è stata anche determinata con un HPLC-DAD (colonna Agilent Eclipse Plus C18 RRHD 3.0mm x 50.0mm id, 1.8 mm particle size) usando una curva di taratura.
- c) Il potere antiossidante è determinato aggiungendo la specie radicalica 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH) a una aliquota di soluzione, che poi viene mantenuta al riparo della luce per 30 minuti a 25 °C, e misurando l'assorbanza a 517nm contro un bianco costituito dalla stessa soluzione senza il DPPH.

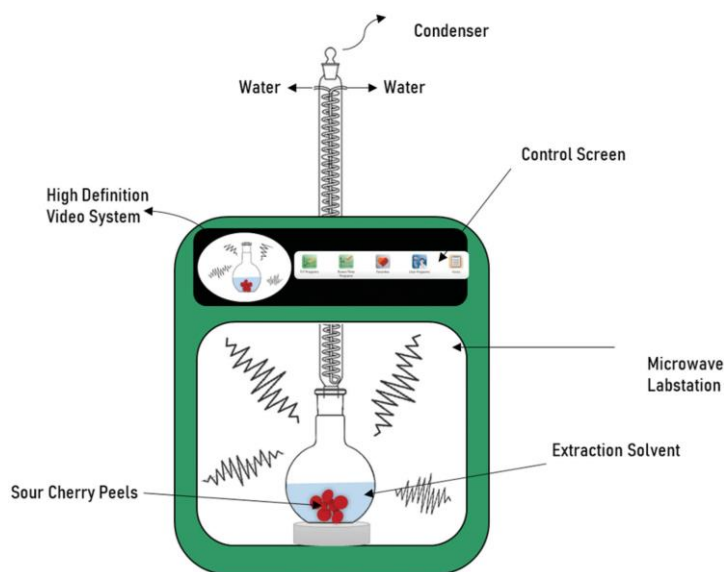


Figura 23. Apparecchiatura sperimentale usata per l'estrazione.

2.2.1d Estrazione con enzimi (Enzyme-Assisted Extraction - EAE)

L'estrazione con enzimi è stata usata anche per estrarre antocianine e sfrutta la capacità di alcuni enzimi (amilasi, cellulasi, pectinasi, proteasi, poligalatturonasi,...) di idrolizzare le pareti cellulari vegetali. In questo procedimento le condizioni di reazioni sono blande, il consumo di solvente è basso, la resa può essere alta e non servono particolari accorgimenti per gli ingrandimenti di scala operativa. Spesso non servono neanche particolari attrezzature né in laboratorio né in industria.

L'efficienza del processo estrattivo è condizionata da diversi fattori: il tipo di enzima, il rapporto enzima/substrato, la concentrazione della soluzione, il tempo di estrazione, il pH, la presenza di attivatori/inibitori...

Per ora l'estrazione con l'aiuto di enzimi presenta ancora due grosse difficoltà per la sua applicazione industriale: i tempi di reazione lunghi e l'elevato costo degli enzimi. Tali difficoltà potranno sicuramente venir risolte in futuro qualora ci fosse un forte interesse come si è verificato per la produzione di farmaci antibatterici per via fermentativa.

Un esempio di estrazione aiutata da enzimi, anche se da bucce di ciliegie dolci, è stato riportato recentemente⁶³. Secondo gli autori le tecniche di estrazione moderne, viste in precedenza, sono più selettive e forniscono rese di estrazione più elevate rispetto al passato esse lasciano nella matrice una importante aliquota di polifenoli coniugati con peso molecolare più alto di quelli estratti abitualmente. Tali polifenoli sono quasi sempre costituiti da proantocianidine.

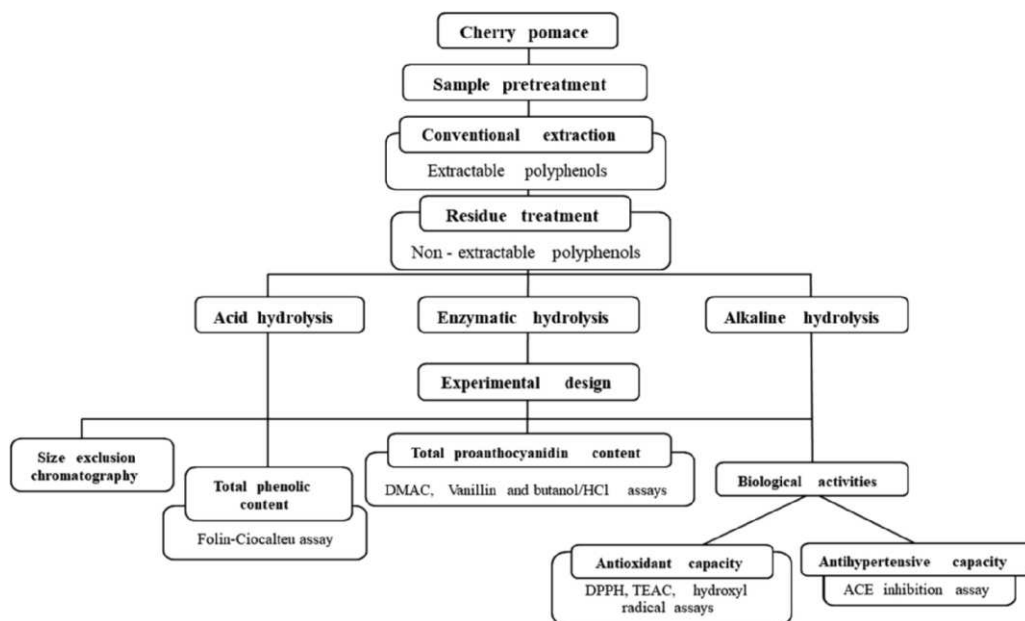


Figura 24. Procedura usata per l'estrazione aiutata da enzimi seguita dalla caratterizzazione e dalla determinazione delle proprietà antiossidanti e anti-ipertensive della frazione proantocianidinica dalle sanse di ciliegio dolce

2.3 Considerazioni sui metodi analitici qualitativi e quantitativi per l'identificazione di antocianine

Nel corso del tempo sono stati sviluppati diversi metodi qualitativi/quantitativi per la determinazione del contenuto di antocianine nei prodotti vegetali e nei loro derivati come si è visto nei paragrafi precedenti.

Considerando la letteratura pubblicata negli ultimi anni si vede l'utilizzo quasi esclusivo di due tecniche: spettrofotometrica (colorimetrica, visto che le antocianine presentano nel visibile picchi di assorbimento utilizzabili per la quantificazione) e HPLC (con rivelatori spettrofotometrici-DAD o di massa o MS/MS) ^{29,64}.

In letteratura sono riportati parecchi cromatogrammi, se ne riporta qualcuno per mostrare come le diverse varietà possono dare profili diversi per tipo di antocianine e quantità delle singole antocianine:

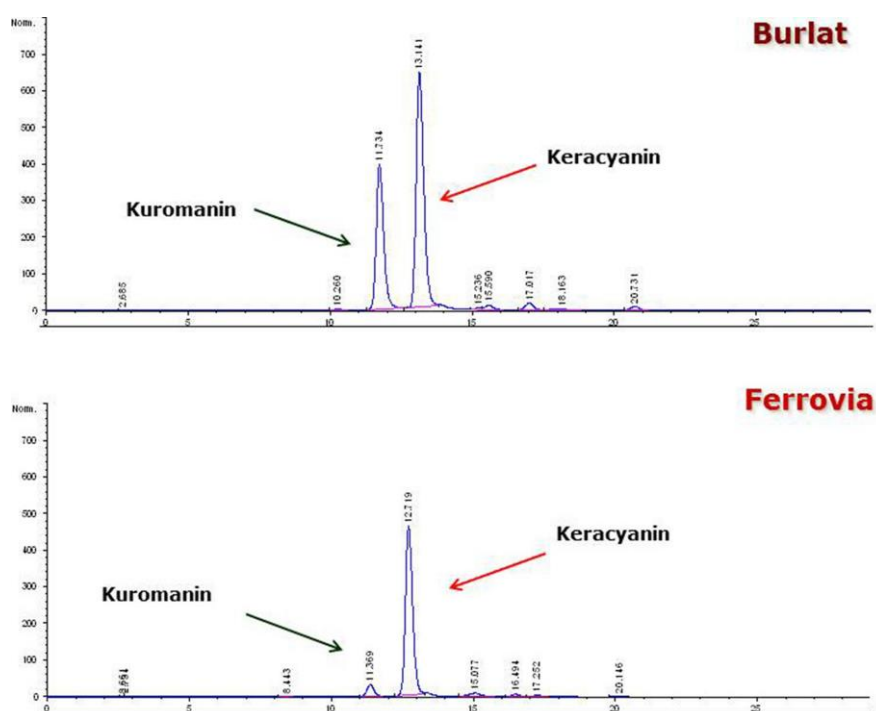


Figura 25a. Profilo HPLC dell'estratto di due cultivar varietali di ciliegio dolce: *Bigarreau Burlat* e *'Ferrovia'*. Kuromanin (cianidina 3-O-glucoside, RT 11,3–11,7) e keracyanin (cianidina 3-O-rutinoside, RT 12,7–13,1)⁴

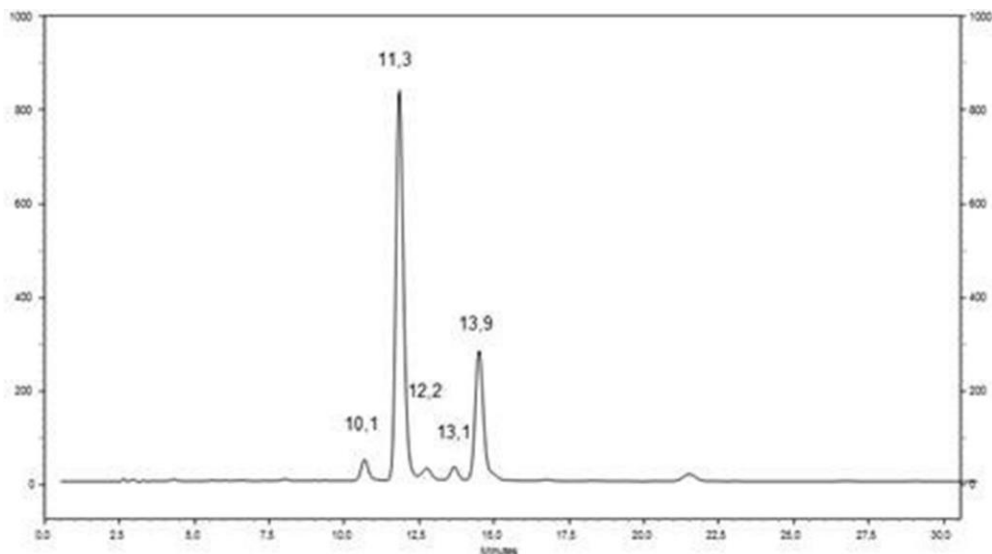


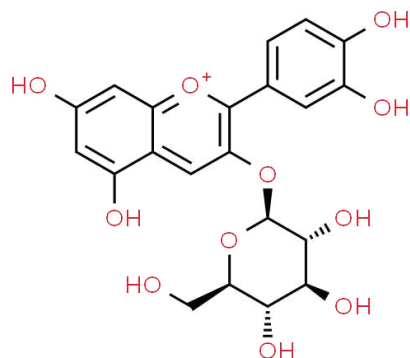
Figura 25b. Profilo HPLC dell'estratto di ciliegia acida 'Amarena Mattarello'. Identificazione dei picchi: cianidina 3-O-soforoside (RT 10,133); cianidina 3-O-glucosilrutinoside (RT 11,300), cianidina 3-O-glucoside (RT 12,200), cianidina 3-O-rutinoside (RT 13,967)⁶⁵

Per quanto riguarda la tecnica spettrofotometrica una procedura ufficiale che ne illustra il suo utilizzo è la: "AOAC Official Method 2005.02 - Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines".

In letteratura si possono trovare anche esempi di caratterizzazione delle antocianine con la risonanza magnetica nucleare (NMR)^{64,66,67}.

Sotto, a titolo di esempio⁶⁷, (figura 25) sono riportati gli spettri NMR (protone e ¹³C) e altre caratteristiche analitiche di due⁶⁸ delle antocianine più importanti contenute nel ciliegio amaro:

La cianidina-3-O-glucoside

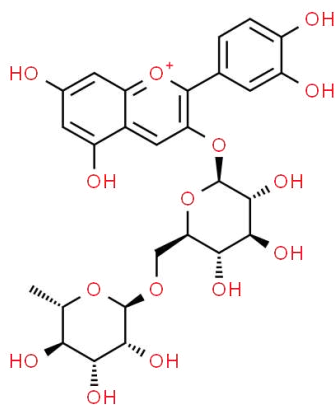


¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 9.02 (s, 1H), 8.26 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 5.32 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.94 (dd, *J* = 12.1, 2.2 Hz, 1H), 3.78 – 3.65 (m, 2H), 3.64 – 3.52 (m, 2H), 3.50 – 3.36 (m, 1H); **¹³C NMR** (100 MHz, CD₃OD): δ 169.0, 162.8, 157.9, 156.3, 154.4, 146.0, 144.3, 135.4,

126.9, 119.8, 116.9, 116.0, 111.9, 102.3, 101.8, 93.7, 77.4, 76.7, 73.4, 69.7, 61.0.

HRMS (ESI-QTOF) *m/z*: calcolata per lo ione molecolare [M]⁺ C₂₁H₂₁O₁₁⁺ 449.1078; trovata 449.1086.

La cianidina-3-O-rutinoside



UV (tamponi pH 1.0): λ_{max} nm (log ε) 510 (3.87).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD/CF₃COOD 95:5): δ 8.95 (1H, s, H-4), 8.27 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, H-6'), 8.05 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-2'), 7.04 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.91 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-8) and 6.69 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-6), 5.29 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1''), 4.65 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-1'''), 4.06 (1H, dd, *J* = 11.1, 1.5 Hz, H-6a''), 3.80 (1H,

dd, *J* = 3.5, 1.5 Hz, H-2'''), 3.72 (1H, ddd, *J* = 9.0, 7.0, 1.5 Hz, H-5''), 3.67 (1H, dd, *J* = 9.0, 7.5 Hz, H-2''), 3.63 (1H, dd, *J* = 9.3, 3.0 Hz, H-3'''), 3.59 (1H, dd, *J* = 11.1, 7.0 Hz, H-6b''), 3.54 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, H-3'''), 3.42 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, H-4''), 3.33 (1H, m, H-4''') and 1.13 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H-6'''). **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD/CF₃COOD 95:5): δ 70.5 (C-7), 164.2 (C-2), 164.1 (C-5), 159.1 (C-9), 155.9 (C-4'), 147.5 (C-3'), 145.7 (C-3), 136.2 (C-4), 128.4 (C-6'), 120.3 (C-1'), 118.4 (C-2'), 117.5 (C-5'), 111.8 (C-10), 103.5 (C-6), 103.4 (C-1''), 102.2 (C-1'''), 95.2 (C-8), 78.0 (C-3''), 77.5 (C-5''), 74.7 (C-2''), 73.9 (C-4''), 72.5 (C-3'''), 71.9 (C-2''), 71.2 (C-4''), 69.8 (C-5'''), 67.4 (C-6'') and 17.9 (C-6'''). **HRMS** (ESI+) calcolata

per la formula $C_{27}H_{32}O_{15}$ 596.1671, trovata 595.1711. **IR** (composto puro, senza solvente): ν_{\max} 3370, 2955, 1651, 1510, 1490 cm^{-1} .

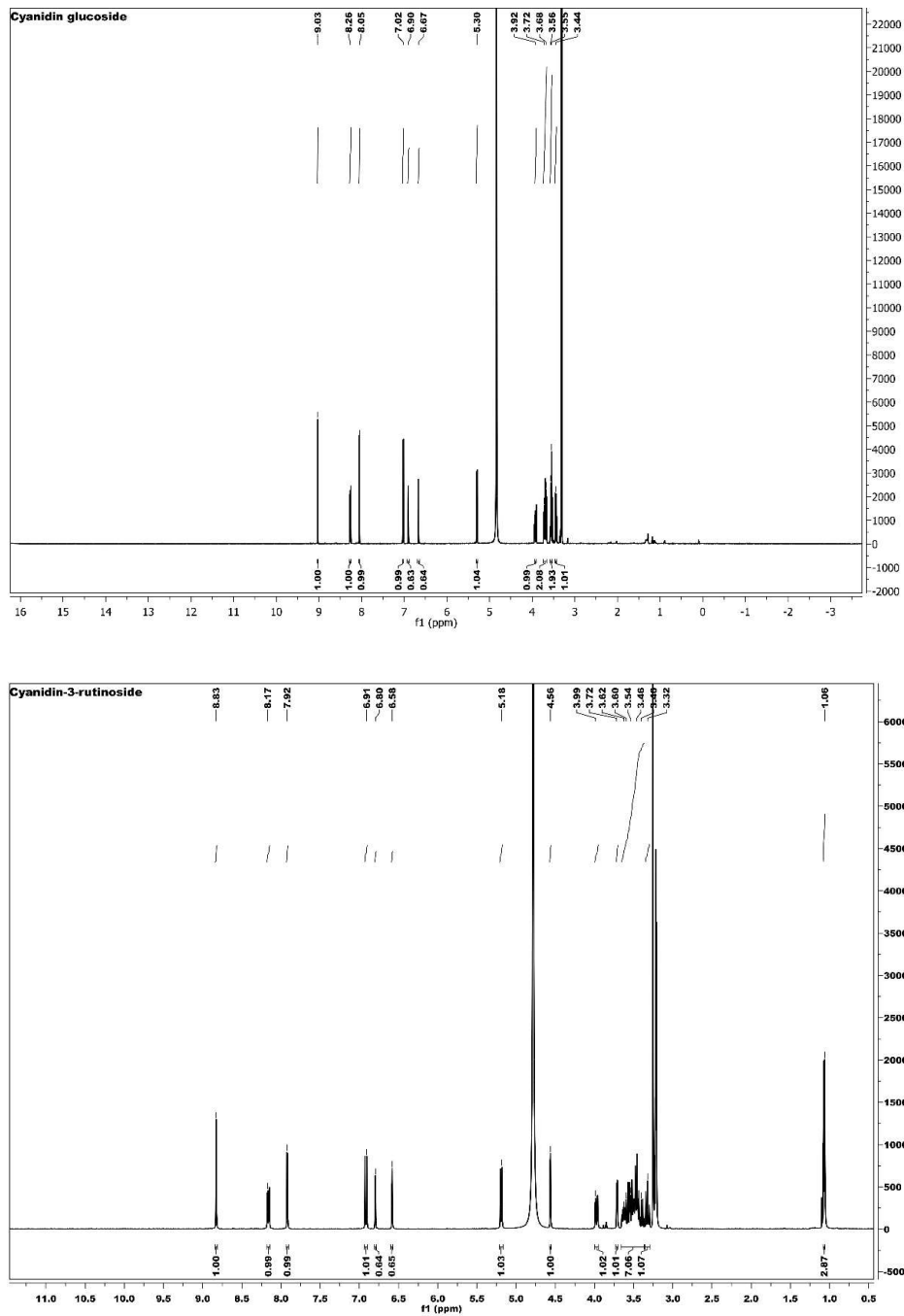


Figura 26. Caratteristiche analitiche, in particolare spettri NMR, della cianidina-3-O-glucoside e della cianidina-3-O-rutinoside

3. PROPRIETÀ E UTILIZZI DELLE CILIEGIE ACIDE

3.1 Proprietà delle ciliegie acide

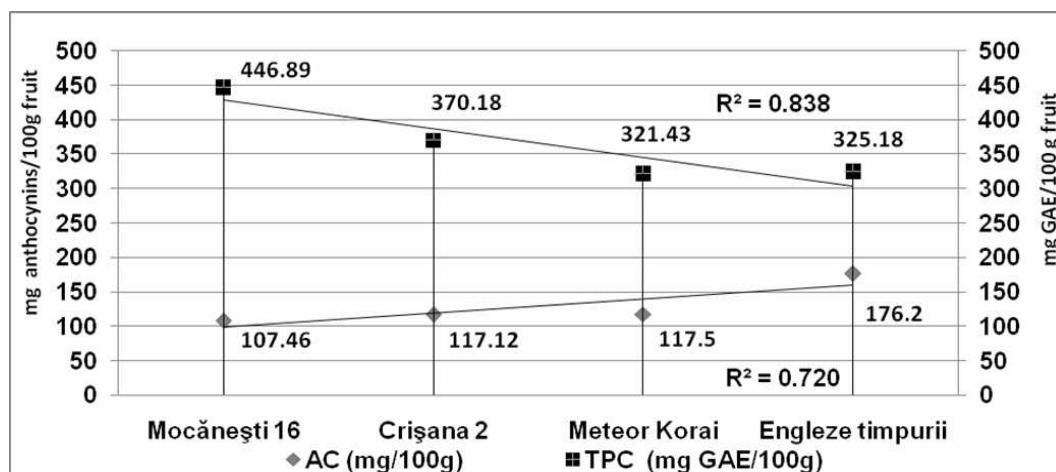
Le proprietà nutrizionali e gli effetti nutraceutici delle ciliegie acide non differiscono molto da quelle del ciliegio dolce e sono state descritte nella prima parte di questo lavoro di tesi.

Nella tabella 3 si può notare come le proprietà nutrizionali e nutraceutiche delle ciliegie dolci e acide siano molto simili⁴.

I polifenoli, responsabili di molte proprietà nutrizionali, mostrano una elevata variabilità tra le diverse varietà di ciliegio dolce e acido e anche in funzione della composizione dei suoli dove vengono coltivate e dei microclimi⁶⁹.

Considerando solo le ciliegie acide si vede però un'elevata variabilità anche all'interno di queste piante.

Per esempio Filimon e altri⁷⁰ hanno esaminato il contenuto di Antocianine (AC), di polifenoli totale (Total Phenolic Compounds (TPC) espresso come Gallic Acid Equivalent (GAE) determinati con il metodo di Folin) e di Acido Ascorbico (AC) in quattro varietà di ciliegie acide della Romania.



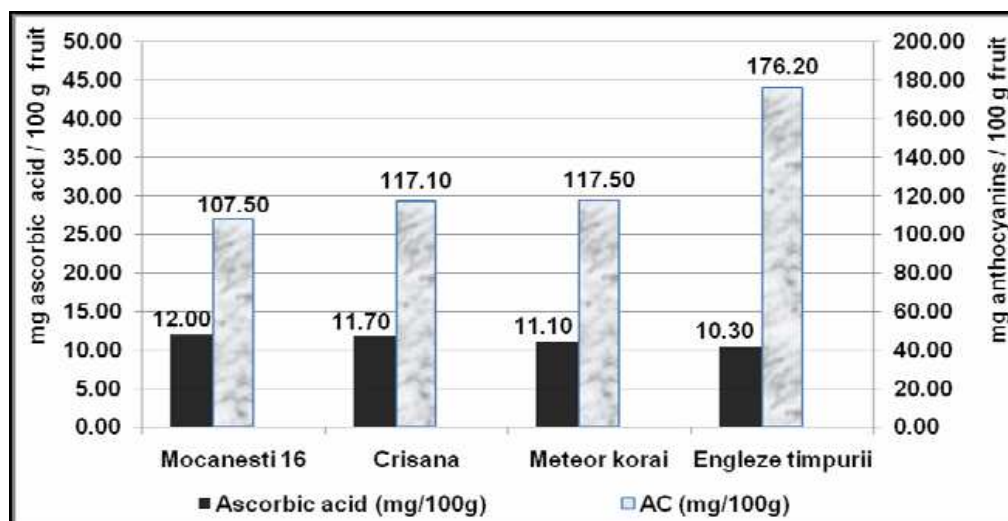


Figura 27. Rappresentazioni grafiche delle quantità di antocianine-fenoli totali e antocianine-acido ascorbico

Anche se si esaminano solo le antocianine si vede ancora una differenza di contenuto molto elevata nelle diverse cultivar. Un esempio è quello mostrato da Homoki e altri⁵¹ in 5 differenti varietà di ciliegio acido ungherese.

Tabella 6. Contenuto di antocianine totali espresse come cianidina 3-O-glucoside in 5 differenti varietà di ciliegio acido ungherese

Varietà di ciliegio acido	Contenuto in antocianine totali (misurato spettrofotometricamente)		Antocianine totali determinate con estrazione in fase solida (mg/100 g di frutto fresco)
	(mg/100 g frutto fresco)	(mg/100 g frutto liofilizzato)	
C59	206 ± 45	1459 ± 127	186 ± 14
VN1	295 ± 53	1528 ± 135	261 ± 11
A	56 ± 15	299 ± 26	144 ± 10
Db	63 ± 19	367 ± 29	165 ± 4
Kj	21 ± 6	135 ± 24	109 ± 9

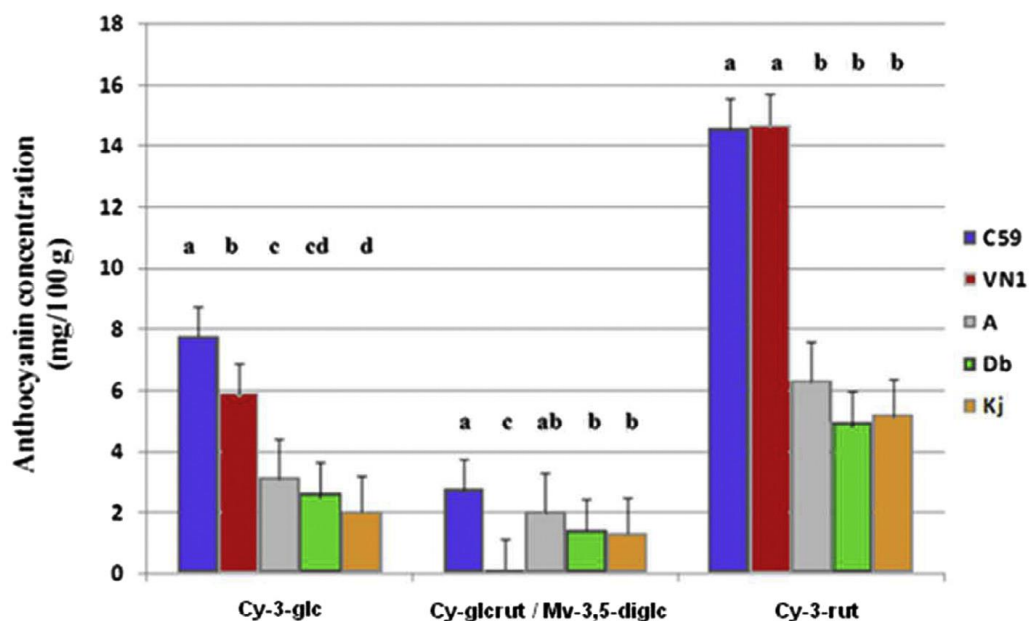


Figura 28. Rappresentazione grafiche delle quantità di diverse antocianine in cinque varietà di ciliegio acido ungherese. *Cy-3-glc*: Cianidina-3-O-monoglucoside, *Cy-3-glc rut*: Cianidina-3-O-glucosilrutinoside, *Mv-3,5-diglc*: Malvidina-3,5-diglicoside, *Cy-3-rut*: Cianidina-3-O-rutinoside

Infine recentemente, a dimostrare l'elevata variabilità del contenuto di nutrienti/nutraceutici nelle ciliegie acide, è stata condotta una estesa ricerca su 21 cultivars varietali di ciliegie acide in Polonia³⁰ usando i metodi analitici oggi comunemente disponibili: HPLC-PDA, HPLC-ELSD e spettrofotometria (a 765 nm dopo reazione con il Folic-Ciocalteu) per la determinazione dei polifenoli e della capacità antiossidante, delle antocianine, dei flavonoli, degli acidi organici e infine dei flavan 3-oli. L'evaporative light scattering detector (ELSD), invece di quello a diodi, venne usato per gli zuccheri.

I risultati sono mostrati nelle tabelle seguenti:

Tabella 7. *Contenuto di zuccheri in 21 cultivar di ciliegie acide polacche (g/100 g peso fresco)*

Cultivar	Glucose	Fructose	Sorbitol	Saccharose	Galactose	Xylose	Total
Demesova	4.85 ± 0.08 ^{hg}	4.00 ± 0.06 ^{ed}	2.74 ± 0.01 ^{dc}	1.41 ± 0.03 ^{ba}	nd	nd*	13.00 ± 0.33 ^d
Dredem	5.37 ± 0.02 ^{cb}	3.99 ± 0.08 ^{ed}	2.40 ± 0.02 ^{ih}	1.35 ± 0.01 ^{edc}	nd	nd	13.11 ± 0.1 ^d
Granatnaja	3.10 ± 0.01 ^m	2.74 ± 0.01 ^k	2.07 ± 0.01 ^k	1.38 ± 0.01 ^{dcb}	nd	1.36 ± 0.02 ^a	10.65 ± 0.20 ^{ih}
Grosenkirch	4.39 ± 0.07 ^{kj}	3.60 ± 0.10 ^{hg}	2.45 ± 0.03 ^{hg}	nd	nd	nd	10.44 ± 0.15 ⁱ
Krasnaja Poodorodnaja	4.43 ± 0.03 ^{kj}	3.71 ± 0.03 ^{gf}	2.42 ± 0.07 ^{hg}	1.38 ± 0.03 ^{cba}	nd	nd	11.93 ± 0.35 ^f
Lucyna	5.68 ± 0.12 ^a	4.36 ± 0.03 ^b	2.47 ± 0.03 ^{hgf}	1.38 ± 0.01 ^{cba}	1.50 ± 0.00 ^a	nd	15.38 ± 0.53 ^a
Malinówka	4.91 ± 0.15 ^{gfe}	4.00 ± 0.11 ^{fe}	2.16 ± 0.07 ^k	1.28 ± 0.04 ^{hg}	nd	nd	12.34 ± 0.26 ^{fe}
Marasca	4.74 ± 0.07 ^{hgf}	3.89 ± 0.08 ^f	2.34 ± 0.03 ^{ji}	nd	nd	nd	10.97 ± 0.36 ^g
Meteor	3.91 ± 0.01 ^l	4.88 ± 0.15 ^a	3.12 ± 0.08 ^a	1.28 ± 0.02 ^{hg}	1.39 ± 0.03 ^b	nd	14.58 ± 0.05 ^b
Mołodioznaja	5.07 ± 0.07 ^{fed}	4.06 ± 0.13 ^d	2.61 ± 0.04 ^{fe}	1.40 ± 0.04 ^{ba}	1.53 ± 0.01 ^a	nd	14.67 ± 0.46 ^{ba}
Montmorency	3.32 ± 0.09 ^m	4.22 ± 0.13 ^{dc}	2.75 ± 0.08 ^{edc}	nd	Nd*	nd	10.29 ± 0.04 ⁱ
Nana	4.20 ± 0.12 ^k	3.55 ± 0.07 ^h	1.93 ± 0.05 ^l	1.03 ± 0.00 ^j	nd	nd	10.71 ± 0.27 ^{hg}
Paraszt Meggy	4.74 ± 0.08 ^{ih}	4.09 ± 0.08 ^{dc}	2.85 ± 0.03 ^c	nd	nd	nd	11.68 ± 0.05 ^g
Sokówka Nowotomyska	4.80 ± 0.16 ^{hg}	3.31 ± 0.08 ⁱ	2.29 ± 0.04 ^j	1.32 ± 0.00 ^{fed}	nd	1.31 ± 0.04 ^a	13.03 ± 0.17 ^d
Sokówka nr 6	5.18 ± 0.16 ^{edcb}	4.09 ± 0.12 ^{ed}	2.31 ± 0.01 ^{ij}	1.31 ± 0.00 ^{fe}	nd	nd	12.90 ± 0.02 ^{de}
Sokówka nr 9	4.63 ± 0.11 ^{ij}	3.87 ± 0.07 ^f	2.52 ± 0.08 ^{gfi}	1.25 ± 0.01 ^h	nd	nd	12.27 ± 0.27 ^{fe}
Suda Hardy	5.29 ± 0.07 ^b	4.35 ± 0.04 ^{cb}	3.00 ± 0.03 ^b	1.31 ± 0.04 ^{fe}	nd	nd	13.95 ± 0.20 ^c
Turgieniewka	3.67 ± 0.06 ^l	3.01 ± 0.00 ^j	1.93 ± 0.03 ^b	nd	nd	nd	8.62 ± 0.12 ^j
Wieluń 17	2.81 ± 0.00 ⁿ	3.68 ± 0.09 ^{gf}	2.36 ± 0.02 ^{ij}	1.40 ± 0.02 ^a	nd	nd	10.25 ± 0.22 ⁱ
Wróble	5.02 ± 0.08 ^{edc}	4.32 ± 0.05 ^{cb}	2.71 ± 0.00 ^{fed}	1.32 ± 0.02 ^{gfi}	nd	1.30 ± 0.04 ^b	14.67 ± 0.38 ^b
Zagoriewskaja	5.22 ± 0.01 ^{dcb}	3.94 ± 0.11 ^f	2.69 ± 0.09 ^{edc}	1.24 ± 0.02 ^h	nd	nd	13.09 ± 0.20 ^d
Min-max	2.81–5.68	2.74–4.88	1.93–3.12	1.03–1.41	1.39–1.53	1.30–1.36	8.62–15.38
Average	4.54	3.89	2.48	1.32	1.47	1.33	12.31
Median	4.74	3.99	2.45	1.32	1.50	1.31	12.34

nd*—not detected. Values are expressed as mean ± standard deviation; the same superscripted letters within the same column means a statistically homogeneous group ($p = 0.05$).

Tabella 8. *Contenuto di acidi organici in 21 cultivar di ciliegie acide polacche (g/100 g peso fresco)*

Cultivar	Malic	Malonic	Oxalic	Shikimic	Fumaric	Total
Demesova	1858.77 ± 7.83 ^e	270.64 ± 2.11 ^{ji}	13.93 ± 0.32 ^b	4.08 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.00 ^e	2147.63 ± 10.10 ^c
Dredem	1810.91 ± 2.51 ^g	313.44 ± 1.75 ^{fe}	11.03 ± 0.26 ^e	2.22 ± 0.02 ^h	0.23 ± 0.00 ^d	2137.82 ± 6.53 ^d
Granatnaja	1602.67 ± 6.66 ^l	299.88 ± 9.97 ^{fe}	9.33 ± 0.39 ^g	2.37 ± 0.01 ^f	0.17 ± 0.01 ^{ih}	1914.43 ± 7.30 ⁱ
Grosenkirch	1684.85 ± 5.75 ^j	295.01 ± 5.63 ^{hg}	9.13 ± 0.16 ^h	1.95 ± 0.07 ^j	0.24 ± 0.01 ^d	1991.17 ± 2.27 ⁱ
Krasnaja Poodorodnaja	1976.15 ± 7.73 ^a	258.40 ± 0.18 ^k	6.74 ± 0.09 ^l	1.21 ± 0.03 ^o	0.15 ± 0.00 ^{lkj}	2242.66 ± 4.11 ^b
Lucyna	1636.94 ± 1.30 ^k	372.38 ± 4.48 ^b	8.54 ± 0.28 ⁱ	1.89 ± 0.00 ^{kj}	0.29 ± 0.01 ^b	2020.03 ± 1.20 ^g
Malinówka	1219.56 ± 1.03 ^p	333.46 ± 2.36 ^c	4.75 ± 0.12 ^o	1.92 ± 0.05 ^{jl}	0.35 ± 0.00 ^a	1560.04 ± 5.87 ⁿ
Marasca	1176.83 ± 1.63 ^r	302.28 ± 0.43 ^{gfi}	5.22 ± 0.04 ⁿ	1.74 ± 0.02 ^k	0.15 ± 0.01 ^l	1486.22 ± 2.65 ^o
Meteor	1589.80 ± 4.88 ^{ml}	406.53 ± 4.17 ^a	9.08 ± 0.02 ^h	2.72 ± 0.00 ^e	0.16 ± 0.01 ^{lkj}	2008.29 ± 6.66 ^h
Mołodioznaja	1798.26 ± 8.9 ^h	318.22 ± 3.71 ^{ed}	11.76 ± 0.01 ^d	2.32 ± 0.02 ^{gfi}	0.19 ± 0.00 ^f	2130.75 ± 3.69 ^d
Montmorency	1027.35 ± 2.75 ^t	260.13 ± 4.32 ^{kj}	5.03 ± 0.02 ⁿ	1.67 ± 0.04 ^l	0.16 ± 0.01 ^{kji}	1294.35 ± 2.63 ^p
Nana	1599.93 ± 1.60 ^l	279.38 ± 3.46 ^{ih}	5.91 ± 0.17 ^m	1.05 ± 0.06 ^p	0.19 ± 0.00 ^g	1886.46 ± 5.14 ^k
Paraszt Meggy	1963.60 ± 3.79 ^b	322.60 ± 0.23 ^{dc}	10.16 ± 0.30 ^f	3.86 ± 0.07 ^b	0.26 ± 0.00 ^c	2300.47 ± 1.37 ^a
Sokówka Nowotomyska	1784.40 ± 3.80 ^h	235.65 ± 5.42 ^l	9.03 ± 0.12 ^h	1.44 ± 0.03 ⁿ	0.18 ± 0.00 ^{hg}	2030.71 ± 0.10 ^g
Sokówka nr 6	1579.90 ± 7.59 ^m	317.01 ± 2.24 ^{ed}	7.23 ± 0.10 ^k	2.01 ± 0.11 ⁱ	0.24 ± 0.01 ^d	1906.39 ± 6.51 ^j
Sokówka nr 9	1491.26 ± 3.70 ^o	290.46 ± 1.23 ^{gfi}	23.44 ± 0.39 ^a	2.26 ± 0.07 ^{dgs}	0.26 ± 0.00 ^c	1807.67 ± 5.46 ^l
Suda Hardy	1915.88 ± 4.74 ^d	369.96 ± 3.14 ^b	10.33 ± 0.27 ^f	3.12 ± 0.02 ^c	0.23 ± 0.00 ^d	2299.52 ± 1.25 ^a
Turgieniewka	1825.73 ± 6.33 ^f	231.52 ± 6.88 ^l	7.81 ± 0.10 ^j	2.08 ± 0.00 ^{ih}	0.20 ± 0.00 ^e	2067.35 ± 9.93 ^f
Wieluń 17	1528.21 ± 2.65 ⁿ	260.08 ± 1.01 ^{kj}	8.84 ± 0.23 ⁱ	2.06 ± 0.05 ^{ih}	0.20 ± 0.01 ^f	1799.38 ± 5.08 ^m
Wróble	1939.57 ± 3.65 ^c	337.84 ± 5.81 ^c	12.74 ± 0.20 ^c	2.97 ± 0.02 ^d	0.16 ± 0.01 ^{lk}	2293.28 ± 1.02 ^a
Zagoriewskaja	1748.39 ± 0.90 ⁱ	330.58 ± 2.10 ^c	6.84 ± 0.07 ^l	1.55 ± 0.07 ^m	0.16 ± 0.01 ^{ji}	2087.52 ± 4.24 ^e
Min-max	1027.35–1976.15	231.52–406.53	4.75–23.44	1.05–4.08	0.15–0.35	1294.35–2300.47
Average	1655.19	305.02	9.38	2.21	0.21	1972.01
Median	1684.85	302.28	9.03	2.06	0.20	2020.03

Values are expressed as mean ± standard deviation, the same superscripted letters within the same column means statistically homogeneous group ($p = 0.05$).

Tabella 9. *Contenuto di fenoli in 21 cultivar di ciliegie acide polacche (g/100 g peso fresco)*

Cultivar	Anthocyanins	Flavonols	Phenolic Acids	Flavan 3-ols	Total
Demesova	128.17 ± 1.06 ^b	18.12 ± 0.24 ^e	26.53 ± 0.09 ⁿ		154.69 ± 0.97 ^f
Dradem	17.97 ± 0.16 ^P	15.84 ± 0.42 ^f	44.00 ± 0.25 ^h	40.10 ± 0.11 ^b	117.91 ± 0.72 ^m
Granatnaja	81.50 ± 1.46 ^h	15.61 ± 0.11 ^{gf}	35.10 ± 0.08 ^j	2.87 ± 0.04 ⁱ	119.45 ± 1.50 ^j
Grosenkirch	121.38 ± 0.23 ^c	19.65 ± 0.25 ^d	76.25 ± 0.29 ^b	35.44 ± 0.27 ^c	252.72 ± 0.50 ^b
Krasnaja Plodnorodnaja	80.85 ± 0.55 ^h	13.19 ± 0.23 ⁱ	32.33 ± 0.04 ^k		126.37 ± 0.74 ^l
Lucyna	107.91 ± 0.56 ^e	19.51 ± 0.21 ^d	30.94 ± 0.06 ^l	9.45 ± 0.23 ^g	167.81 ± 0.52 ^g
Malinówka	85.39 ± 1.47 ^g	14.09 ± 0.54 ^{ih}	57.13 ± 0.07 ^d		1656.61 ± 1.94 ^h
Marasca	112.95 ± 0.99 ^d	21.60 ± 0.17 ^c	44.45 ± 0.10 ^h		178.99 ± 1.06 ^e
Meteor	51.28 ± 0.71 ^l	15.50 ± 0.10 ^{hgf}	126.99 ± 0.94 ^a	40.81 ± 1.15 ^b	219.07 ± 2.80 ^d
Mołodiożnaja	84.14 ± 1.52 ^g	13.30 ± 0.18 ⁱ	49.28 ± 0.81 ^f	8.73 ± 0.15 ^g	155.45 ± 2.37 ^h
Montmorency	30.35 ± 0.59 ^o	14.18 ± 2.62 ^{ih}	73.35 ± 0.86 ^c	26.94 ± 1.36 ^e	144.82 ± 2.53 ⁱ
Pamięci Wawilowa	33.38 ± 0.87 ⁿ	11.09 ± 0.24 ^j	46.54 ± 0.92 ^g	5.55 ± 0.10 ^h	96.56 ± 2.14 ^P
Paraszt Meggy	100.30 ± 0.48 ^f	16.16 ± 0.03 ^f	28.27 ± 0.05 ^m		144.73 ± 0.55 ⁱ
Sokówka Nowotomyska	130.14 ± 0.13 ^{ab}	23.18 ± 0.08 ^b	53.71 ± 0.28 ^e	33.82 ± 0.27 ^d	240.85 ± 0.06 ^c
Sokówka nr 6	67.72 ± 0.57 ^k	14.39 ± 0.20 ^{ihg}	44.84 ± 0.63 ^h	26.69 ± 0.07 ^e	153.64 ± 1.47 ^h
Sokówka nr 9	81.02 ± 1.27 ^h	14.06 ± 0.28 ⁱ	35.91 ± 0.57 ^j		130.99 ± 1.57 ^k
Suda Hardy	107.06 ± 0.90 ^e	25.08 ± 0.00 ^a	37.42 ± 0.12 ⁱ		169.55 ± 1.02 ^g
Turgeniewka	74.61 ± 1.1 ⁱ	14.32 ± 0.09 ^{ihg}	16.56 ± 0.06 ^o		105.50 ± 1.25 ⁿ
Wieluń 17	131.28 ± 0.91 ^a	20.73 ± 0.14 ^{dc}	53.90 ± 0.19 ^e	63.08 ± 0.54 ^a	268.98 ± 0.32 ^a
Wróble	48.49 ± 1.64 ^m	10.81 ± 0.29 ^j	29.13 ± 0.19 ^m	13.31 ± 1.57 ^f	101.74 ± 0.55 ^o
Zagoriewskaja	72.28 ± 1.44 ^j	10.41 ± 0.21 ^j	44.23 ± 0.44 ^h		126.92 ± 2.09 ^l
Min-max	17.97–131.28	10.41–25.08	16.56–126.99	0.00–63.08	96.56–268.98
Average	83.24	16.23	46.99	14.61	161.07
Median	81.47	15.50	44.23	5.55	153.64

Values are expressed as mean ± standard deviation; the same superscripted letters within the same column means a statistically homogeneous group ($p = 0.05$).

Tabella 10. *Proprietà antiossidanti (Gallic Acid Equivalents (GAE)/100 g peso fresco e Trolox Equivalents (TE)/100 g peso fresco) in 21 cultivar di ciliegie acide polacche*

Cultivar	FCRS mg GAE/100 g	DPPH μ mol TE/100 g	FRAP μ mol TE/100 g
Demesova	267.00 ± 0.81 ^{ghij}	647.09 ± 0.64 ^e	1461.00 ± 5.04 ^{gf}
Dredem (Mačkowiaka)	262.75 ± 17.68 ^{hij}	695.39 ± 1.72 ^j	1673.66 ± 22.94 ^k
Granatnaja	250.46 ± 11.47 ^{hg}	675.22 ± 13.51 ^f	1681.80 ± 17.59 ^h
Grosenkirch	495.20 ± 5.31 ^b	984.81 ± 11.95 ^b	3065.78 ± 36.24 ^b
Krasnaja Plodnorodnaja	239.35 ± 18.21 ^{hij}	552.32 ± 9.09 ^h	1183.87 ± 7.80 ⁱ
Lucyna	244.17 ± 2.89 ^e	739.90 ± 4.92 ^c	1853.96 ± 2.41 ^d
Malinówka	238.44 ± 1.31 ^f	634.20 ± 6.63 ^e	1539.87 ± 54.43 ^f
Marasca	432.29 ± 10.95 ^{cd}	910.45 ± 11.08 ^b	2650.47 ± 42.80 ^c
Meteor	245.36 ± 3.51 ^f	631.65 ± 1.36 ^g	1472.12 ± 29.10 ⁱ
Mołodiożnaja	412.35 ± 6.92 ^f	907.86 ± 11.02 ^e	2613.64 ± 0.31 ^g
Montmorency	309.18 ± 3.08 ^{ijk}	655.14 ± 5.77 ^k	1542.40 ± 28.06 ^{kl}
Nana	340.16 ± 16.41 ^g	826.61 ± 17.55 ^h	2174.62 ± 4.42 ^{ij}
Paraszt Meggy	227.71 ± 0.94 ^{ghi}	510.62 ± 0.69 ^{gf}	1111.10 ± 88.16 ^h
Sokówka Nowotomyska	220.22 ± 3.81 ^a	607.84 ± 3.12 ^a	1444.57 ± 55.15 ^a
Sokówka nr 6	376.70 ± 14.46 ^d	804.12 ± 6.00 ^{cd}	2197.94 ± 52.67 ^d
Sokówka nr 9	475.68 ± 0.09 ^e	975.62 ± 8.56 ^d	3028.11 ± 24.87 ^e
Suda Hardy	306.71 ± 16.67 ^{bc}	749.08 ± 17.19 ^b	1930.53 ± 59.23 ^b
Turgeniewka	342.96 ± 5.87 ^{ghi}	802.01 ± 7.78 ^h	2082.88 ± 33.92 ^{ij}
Wieluń 17	205.71 ± 0.66 ^a	520.98 ± 29.49 ^a	1045.68 ± 31.84 ^a
Wróble	392.83 ± 19.05 ^k	891.29 ± 6.52 ^k	2501.18 ± 1.27 ^l
Zagoriewskaja	298.34 ± 12.74 ^k	726.10 ± 3.95 ⁱ	1792.50 ± 23.78 ^j
Min-max	205.71–495.20	510.62–984.81	1045.68–3065.78
Average	313.50	735.63	1907.03
Median	298.34	726.10	1792.50

Values are expressed as mean ± standard deviation; the same superscripted letters within the same column means a statistically homogeneous group ($p = 0.05$).

3.2 Utilizzo delle ciliegie acide

Nell'ambito delle notevoli differenze viste nel paragrafo precedente per quanto riguarda il contenuto di sostanze nutrienti (es. zuccheri) e nutraceutiche (es. antocianine e polifenoli) esamineremo ora alcune delle proprietà nutrizionali delle ciliegie acide considerando in particolare i gli effetti benefici sulla salute collegati al contenuto di antocianine.

Di solito le ciliegie acide vengono consumate come tali o trasformate, sia in casa che industrialmente, in succhi e imbottigliate. Possono anche essere confezionate in barattolo come confetture o marmellate o candite. Possono venire anche fermentate per ottenere bevande alcoliche o aceti⁷¹ o distillati come fa la ditta Luxardo a Torreglia (Padova).



Figura 29. Marasche in vasetto e liquore a base di sugo di marasche.

Tra i prodotti nutraceutici sono disponibili anche capsule contenenti i polifenoli estratti dalle ciliegie acide come mostrato, per esempio, nella figura sotto:



Figura 30. Capsule contenenti estratti polifenolici di ciliegie acide.

Le antocianine contenute nelle ciliegie acide hanno un elevato potere antiossidante che è alla base dei loro usi nutraceutici. Nelle ciliegie acide, e spesso nei preparati per uso nutraceutico derivati da esse, sono presenti diversi altri composti con attività antiossidante che si sommano a quella delle antocianine.

Un esempio è mostrato nella tabella sotto⁷².

Tabella 11. Quattro gruppi di composti fenolici identificati nei frutti del ciliegio acido

compound	t_R (min)	λ_{max} (nm)	$[M - H]^-$ (m/z)	
			MS	MS/MS ^b
Anthocyanins				
cyanidin-3-O-diglucoside-5-glucoside	3.46	279/515	773.2294 ⁴	579.1520/305.0685/287.0536
cyanidin-3-O-sophoroside	3.69	242/278/515	611.1564+	449.1063/287.0536
cyanidin-3-O-(2'-glucosyl)rutinoside	3.89	242/278/517	757.2184+	611.1614/433.1125/287.0536
cyanidin-3-O-glucoside	4.01	242/516	449.1063+	287.0571
cyanidin-3,5-pentoside-hexoside	4.03	241/277/517	581.1671+	287.0571
cyanidin-3-O-(xylosyl)rutinoside	4.09	242/278/513	727.2052+	581.1573/363.7898/287.0571
cyanidin-3-O-rutinoside	4.31	242/279/517	595.1664+	499.1063/287.0571
pelargonidin-3-O-(2'-glucosyl)rutinoside	4.66	241/282/310/506	741.2279+	579.1520/271.0601
peonidin-3-(6'-p-coumaroyl)glucoside	4.98	241/277/517	771.2365+	577.1355/301.0730
peonidin-3-O-rutinoside	5.45	241/279/517	609.1857+	301.0730/463.9432
cyanidin-3-(6'-p-coumaroyl)glucoside	6.36	241/278/513	595.1664+	287.0571
Hydroxycinnamic Acids				
neochlorogenic acid (3-O-caffeoylquinic acid)	2.09	323	353.0840	191.0524
3-p-coumaroylquinic acid	2.92	310	337.0899	191.0524/183.0112
chlorogenic acid (5-O-caffeoylquinic acid)	3.20	324	353.0879	191.0553
4-O-caffeoylquinic acid	4.85	320	353.0840	191.0581/183.0140
3,5-dicafeoylquinic acid	7.65	326	515.1196	353.0879/191.0524/173.0446
Flavan-3-ols				
(+)-catechin	3.15	279	289.0688	
procyanidin B1	3.88	278	577.1349	289.0758
procyanidins, tetramer	3.99	279	1153.2776	577.1349/275.0286
procyanidins, dimer	4.23	280	577.1398	275.0286
(-)-epicatechin	4.59	278	289.0723	
procyanidins, trimer	5.02	278	865.1967	577.1349/289.0758
procyanidins, trimer	5.25	278	865.1967	577.1349/289.0758
procyanidins, trimer	5.32	278	865.1967	577.1349/289.0758
procyanidins, trimer	5.45	278	865.1967	577.1349/289.0758
procyanidins, trimer	5.52	278	865.1967	577.1349/289.0758
procyanidins, tetramer	5.62	278	1153.2776	577.1349/289.0758
procyanidins, trimer	5.75	278	865.1967	577.1349/289.0758
procyanidins, dimer	7.19	278	577.1349	289.0758
procyanidins, trimer	7.30	278	865.1967	577.1349/289.0758
Flavonols and Flavon				
kaempferol-trihexose	3.42	242/337	773.2153	488.2101/285.0394
quercetin-3-O-rutinoside-glucoside	5.25	253/351	771.1962	609.1438/301.0277
quercetin-3-O-glucoside-dirhamnoside	5.95	241/351	755.2006	301.0319/183.0140
quercetin-3-O-rutinoside	6.61	254/352	609.1483	577/407/301.0319
quercetin-3-O-galactoside	6.73	251/350	463.0887	301.0319
isorhamnetin-3-rutinoside-7-rhamnoside	6.90	241/351	769.2195	315.0457/183.0140/229.0226
dihydrokaempferol-dihexoside	7.09	275/346	611.2565	285.0252
apigenin-7-O-glucoside	7.26	241/340	431.0994	183.0140/269.0435/137.0086
kaempferol-3-O-rutinoside	7.72	264/347	593.1507	285.0394
isorhamnetin-3-O-rutinoside	7.98	253/352	623.1598	315.0512/183.0167
dihydrokaempferol-glucoside	8.20	242/278/348	449.2017	285.0252

⁴ $[M + H]^+$ (m/z) for anthocyanins were obtained in the positive ion mode. ^bThe m/z values of the predominant ions are given in bold type.

3.2.1 Effetti benefici sulla salute delle ciliegie acide e dei preparati che ne contengono i polifenoli e, in particolare, le antocianine

E' ormai generalmente accettato che il consumo di ciliegie consente di ottenere diversi effetti benefici sulla salute dovuti alla capacità antiossidante dei polifenoli contenuti in questi frutti, capace di ridurre lo stress ossidativo e l'infiammazione.

a) Effetto antinfiammatorio

Numerosi studi riportati in letteratura hanno collegato il consumo di ciliegie acide ad una diminuzione dell'infiammazione e delle patologie collegate ad essa. Per esempio recentemente è stato pubblicato uno studio⁷³ in cui si dimostrano le proprietà antinfiammatorie e antiossidanti delle ciliegie acide sul cuore di ratti obesi. In questo studio gli autori partono dalla considerazione che la secrezione di adipociti e citochine o chemochine non è regolata in un tessuto adiposo. Queste molecole hanno un ruolo nella regolazione dell'appetito e dell'omeostasi energetica, nel metabolismo dei lipidi (TNF- α), dell'immunità, dell'angiogenesi, della regolazione della pressione sanguigna e dei meccanismi emostatici (plasminogen activator inhibitor, PAI-1). Un'altra considerazione da cui partono gli autori per dimostrare l'effetto benefico sulla salute dell'ingestione di molecole antiossidanti, e quindi antinfiammatorie, è che l'obesità provoca una leggera infiammazione nel sistema nervoso centrale che porta a stress ossidativo e quindi a patologie in tale sistema.

Quindi, secondo gli autori, una dieta ricca di antiossidanti protegge le cellule da danni dovuti a radicali liberi che interagiscono con molecole come gli acidi nucleici, le proteine o i lipidi danneggiandole in modo che non svolgano più correttamente la loro funzione fisiologica. Le sostanze antiossidanti, come polifenoli e antocianine, reagiscono con i radicali liberi non controllati dall'organismo ossidandosi esse stesse al posto degli acidi nucleici, delle proteine o dei lipidi.

Gli autori affermano che le ciliegie acide contengono dei polifenoli, e tra essi in particolare le antocianine, capaci di avere un effetto benefico sulla salute umana.

L'attenzione degli autori quindi si concentra sulla capacità delle antocianine di conservare o migliorare la salute del sistema cardiovascolare. Per questo studiano

l'effetto di un dieta ricca di frutti di *P. cerasus* e del loro succo, che era stata caratterizzata precedentemente dagli stessi autori⁷⁴, su ratti.

Gli autori concludono lo studio affermando che l'azione antiossidante-antinfiammatoria delle ciliegie acide può rappresentare una strategia terapeutica interessante per fornire un supplemento dietetico a persone con patologie collegate all'obesità come quelle cardiovascolari.

Le pubblicazioni che riportano l'effetto benefico delle antocianine contenute nelle ciliegie acide sulla salute di persone obese sono numerose e Harlan e Collaboratori ne discutono un meccanismo⁴⁵. Questi autori si basano sull'ipotesi che nelle persone obese è presente una leggera infiammazione capace di portare a disfunzioni metaboliche che sono la causa di numerose patologie. Gli autori dimostrano che un supplemento dietetico di delta-tocotrienolo e antocianine di ciliegie acide protegge gli adipociti dall'infiammazione e che tale effetto è mediato dal fattore nucleare k potenziatore di cellule B attivate (NFkB).

Il delta-tocotrienolo appartiene alla classe delle Vitamine E^{75,76} ed è noto per le sue numerose proprietà salutari.

Vitamina E (tocoferoli)

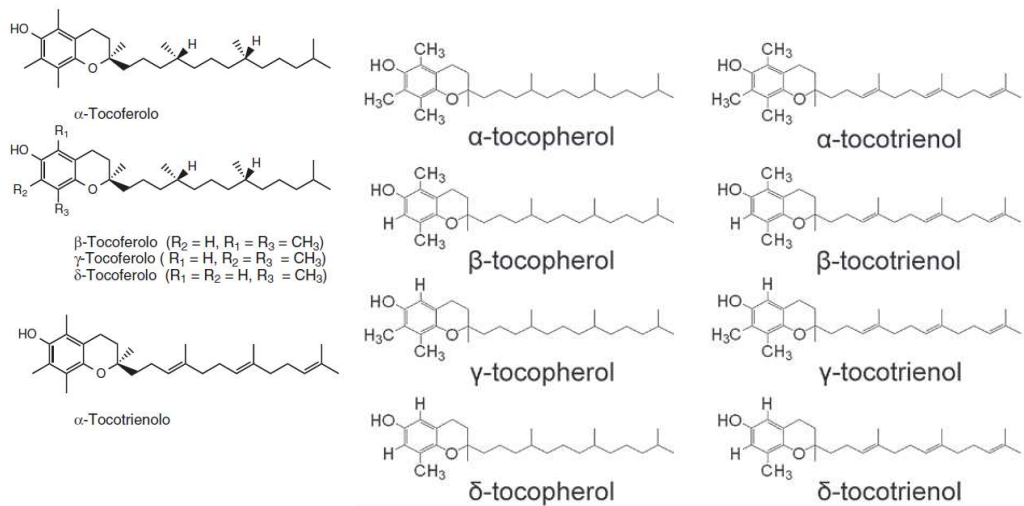


Figura 31. Tocoferoli e tocotrienoli

Nel contesto dell'effetto antinfiammatorio delle antocianine di *P. cerasus* è molto interessante una recente pubblicazione⁷⁷ che ne esamina l'effetto farmacocinetico e farmacodinamico sull'infiammazione conseguente alla gotta.

La gotta è una malattia del metabolismo, caratterizzata da attacchi ricorrenti di artrite conseguenti al deposito di cristalli di acido urico nelle articolazioni che causano infiammazione e dolore intenso.

Per questo molti farmaci sintomatici che si usano nel trattamento della gotta sono degli antinfiammatori quali i farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS), la colchicina, i glucocorticoidi o antagonisti dell'interleuchina-1 (IL-1).

Gli autori, che lavorano nel New Jersey (USA), constatano che negli Stati Uniti molte persone cercano rimedi alternativi all'uso dei farmaci. Tra questi rimedi alternativi (usati da circa il 29% della popolazione con una soddisfazione del 90% per quanto riguarda sicurezza di uso, qualità degli integratori ed efficacia) figurano gli integratori alimentari e, in particolare, il succo delle ciliegie acide. Gli autori cercano allora una spiegazione scientifica all'uso di alimenti o integratori dietetici ricchi di antocianine nel controllo dei sintomi della gotta.

Nella pubblicazione gli autori affermano che: “il succo delle ciliegie acide contiene un'elevata concentrazione di antocianine a cui vengono attribuiti effetti antiossidanti, antidiabetici, antitumorali, neuroprotettivi e la prevenzione delle patologie cardiovascolari⁷⁸. Le antocianine maggiormente presenti nel succo di ciliegie acide sono la cianidina-3-glucosilrutinoside e la cianidina-3-rutinoside. Le antocianine sono state studiate estesamente per le loro proprietà antiossidanti ed è stato dimostrato che possono attivare il fattore di trascrizione nucleare eritroide-2 (NRF2) il principale regolatore della risposta allo stress ossidativo. Inoltre le antocianine e altri polifenoli del succo di ciliegie acide possono inibire la produzione di ossido di azoto (NO) nei macrofagi attivati e inibire la biosintesi del fattore di necrosi tumorale (TNF). Le proprietà antinfiammatorie delle antocianine sono state paragonate a quelle dei FANS”.

Variable	
Mean age [years] (SD)	44.2 (13.5)
Race, n [%]	
White	8 (80)
Asian	2 (20)
Current gout medications, n [%]	
Allopurinol	6 (60)
Colchicine	6 (60)
Prednisone	2 (20)
Comorbidities, n [%]	
Diabetes	1 (10)
Hypertension	4 (40)
Dyslipidemia	1 (10)
Mean weight [kg] (SD)	88.6 (23.5)
Mean body mass index (SD)	28.69 (6.1)

All subjects participating in the study were male. SD, standard deviation.

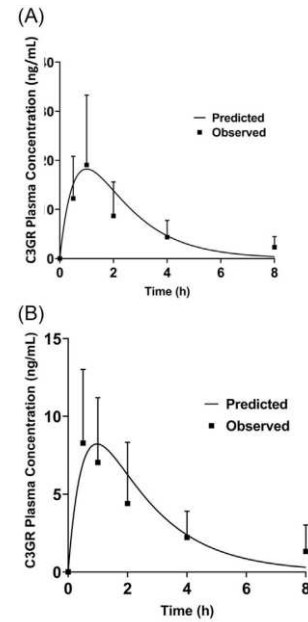


Figura 32. *Caratteristiche dei soggetti studiati e curve concentrazione plasmatica-tempo di cianidina-3-glucosilrutinoside*

Vengono studiate la farmacocinetica, la farmacodinamica e l'espressione dei geni che esprimono proteine antiossidanti e infiammatorie.

Nella figura 30 si può vedere la l'andamento nel tempo della concentrazione di cianidina-3-glucosil-rutinoside dopo la somministrazione orale di una dose elevata (A) e bassa (B) di succo di ciliegie acide. La biodisponibilità orale è limitata e si nota un significativo metabolismo di primo passaggio epatico. Le antocianine oggetto dello studio sono assorbite e metabolizzate velocemente mediante glucouronazione, solfatazione e metilazione.

Per quanto riguarda la farmacodinamica gli autori riportano che “uno studio precedente riporta una diminuzione sierica di urati e di proteina C-reattiva ad alta sensibilità (high-sensitivity C-reactive protein, hsCRP) con 30 e 60 mL di succo concentrato di ciliegie Montmorency”. Ma affermano: “Noi abbiamo osservato una riduzione significativa della proteina C-reattiva ad alta sensibilità nel siero...La somministrazione di succo di ciliegie acide ha portato ad aumento dell'espressione dei geni antiossidanti, NRF2 e HO-1, e una riduzione dell'espressione dei geni infiammatori”.

b) Effetto antitumorale

Varie sono le pubblicazioni che riportano un effetto positivo delle antocianine contenute nelle ciliegie acide nella prevenzione e nella terapia di alcuni tumori.

Una pubblicazione recente⁷⁹ identifica i fitocomponenti di un estratto metanolico di ciliegie acide e ne esamina le capacità chemopreventive su colture cellulari (o misurando l'inibizione della crescita cellulare in diverse linee cancerose umane con il metodo MTT o con la misura colorimetrica della solforodamina-B) e su modelli murini. I risultati sono mostrati nelle figure seguenti.

Antiproliferative activity of PcMFE by MTT assay.

Tissue type	Lung	Leukemia	Breast	Prostate	Lung
Cell line type	A-549	THP-1	MCF-7	PC-3	NCI- H322
PcMFE (µg/ml)	% Growth Inhibition				
10	21	15	17	12	80
30	47	42	40	29	94
50	80	77	71	40	100
Mitomycin-C 0.15	71	-	-	69	-
5-FU 2.60	-	67	-	-	-

The PcMFE at three different concentrations (10, 30 and 50 µg/ml) against different human cancer cell lines using MTT cell viability assay. The results are expressed as percent of cell growth inhibition determined relative to that of untreated control cells.

Figura 32. *Inibizione della crescita cellulare in alcune colture di linee cellulari tumorali umane a tre concentrazioni di estratto metanolico di ciliegie acide (P. cerasus methanolic fruit extract - PcMFE) determinata con il metodo MTT*

Evaluation of in vitro cytotoxicity of PcMFE by SRB assay.

Cell line type	A549	THP-1	MCF-7	PC-3	NCI-H322	FR-2(Normal Cell line)
Tissue type	(Lung)	(Leukemia)	(Breast)	(Prostate)	(Lung)	(Breast)
PcMFE (µg/ml)	% Growth Inhibition					
2	2	5	2	1	10	0
5	5	10	6	4	35	0
10	21	22	10	8	82	10
30	41	37	36	25	88	12
50	74	70	74	43	93	14
IC ₅₀	33.86	36.05	35.93	>50	5.59	-
Doxorubicin 5.0	-	66	72	-	79	19

The PcMFE at three different concentrations (2, 5, 10, 30 and 50 µg/ml) against different human cancer cell lines using SRB cell viability assay. The results are expressed as percent of cell growth inhibition determined relative to that of untreated control cells.

Figura 33. *Citotossicità per alcune colture di linee cellulari tumorali umane a tre concentrazioni di estratto metanolico di ciliegie acide (P. cerasus methanolic fruit extract - PcMFE) determinata con il metodo colorimetrico della solforodamina-B.*

Gli autori concludono: “Abbiamo dimostrato che il frutto del ciliegio acido mostra una significativa attività antitumorale su un pannello di linee tumorali umane ... e ha impedito la crescita di tumori ascitici (carcinoma ascitico di Ehrlich e indotto da metilcolantrene) in modelli murini”.

4. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono state esaminate le caratteristiche delle ciliegie e in particolare delle ciliegie acide con particolare attenzione alle proprietà salutistiche e nutraceutiche del frutto o dei derivati come succhi o capsule di frutto disidratato e polverizzato.

Si è visto che cultivar varietali, tipologia del suolo di coltivazione e condizioni meteorologiche possono avere un ruolo molto importante sulla composizione del frutto, in termini di contenuto qualitativo e quantitativo di polifenoli e di antocianine in particolare.

Sono stati considerati diversi metodi per l'estrazione e la caratterizzazione dei principi attivi che conferiscono le proprietà antiossidanti caratteristiche delle ciliegie acide. Si è anche accennato ai metodi di conservazione delle ciliegie acide e dei loro derivati⁴⁷.

Si può concludere che la ciliegia acida è un ottimo frutto con molte proprietà nutrizionali e nutraceutiche che vengono conservate in preparati quali succhi, conserve, marmellate, infusi e capsule ottenute dai frutti, o parti dei frutti, seccate e polverizzate preparati e conservati opportunamente.

E' quindi da incoraggiare l'attività di ditte specializzate anche in questo settore.

5. BIBLIOGRAFIA

- (1) Iezzoni, A. F. Cherries. In *Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics*; 2008; Vol. 9781402069, pp 151–175. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6907-9_5.
- (2) Blasi, Carlo; Alessandrini, Alessandro; Conti, Fabio; Abbate, G. "*An Annotated Checklist of the Italian Vascular Flora*" Palombi Editori, 2005.
- (3) Hummer, K. E.; Janick, J. Rosaceae: Taxonomy, Economic Importance, Genomics BT - Genetics and Genomics of Rosaceae; Folta, K. M., Gardiner, S. E., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2009; pp 1–17. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6_1.
- (4) Blando, F.; Oomah, B. D. Sweet and Sour Cherries: Origin, Distribution, Nutritional Composition and Health Benefits. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *86* (February), 517–529. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.052>.
- (5) Quero-García, J.; Iezzoni, A.; Pulawska, J.; Lang, G. *Cherries: Botany, Production and Uses*; 2017.
- (6) Kappel, F.; Granger, A.; Hrotkó, K.; Schuster, M. Cherry. In *Fruit Breeding*; 2012; pp 459–504. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9_13.
- (7) Habib, M.; Bhat, M.; Dar, B. N.; Wani, A. A. Sweet Cherries from Farm to Table: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57* (8), 1638–1649. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1005831>.
- (8) Zoffoli, J. P.; Toivonen, P.; Wang, Y. Postharvest Biology and Handling for Fresh Markets. In *Cherries: Botany, Production and Uses*; 2017; pp 460–484.
- (9) Zoffoli, J. P. New Post Harvest Technologies for High Quality Sweet Cherries. *Italus Hortus* **2022**, *29* (1), 68–81. <https://doi.org/10.26353/j.itahort/2022.1.C5>.
- (10) Longobardi, F.; Casiello, G.; Ventrella, A.; Mazzilli, V.; Nardelli, A.; Sacco, D.; Catucci, L.; Agostiano, A. Electronic Nose and Isotope Ratio Mass Spectrometry in Combination with Chemometrics for the Characterization of the Geographical Origin of Italian Sweet Cherries. *Food Chem.* **2015**, *170*, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.057>.
- (11) Dondini, L.; Lugli, S.; Sansavini, S. Cherry Breeding: Sweet Cherry (*P. avium*) and Sour Cherry (*P. cerasus*). In *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits*; 2018; Vol. 3, pp 31–88. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7_2.
- (12) Timm, E. J.; Guyer, D. E.; Brown, G. K.; Schulte, N. L. Michigan Sweet Cherry Color Measurement and Prototype Color Chip Development. *Appl. Eng. Agric.* **1995**, *11* (3), 403–407.
- (13) Lafuente, V.; Herrera, L. J.; Val, J.; Ghinea, R.; Negueruela, A. I.

Determination of Soluble Solids Content in *P. avium* by Vis/NIR Equipment Using Linear and Non-Linear Regression Methods. *Spanish J. Agric. Res.* **2019**, *17* (4). <https://doi.org/10.5424/sjar/2019174-13891>.

- (14) Ceccarelli, D.; Talento, C.; Favale, S.; Caboni, E.; Cecchini, F. Phenolic Compound Profile Characterization by Q-TOF LC/MS in 12 Italian Ancient Sweet Cherry Cultivars. *Plant Biosyst.* **2018**, *152* (6), 1346–1353. <https://doi.org/10.1080/11263504.2018.1478899>.
- (15) Parhiz, H.; Roohbakhsh, A.; Soltani, F.; Rezaee, R.; Iranshahi, M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of Their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phyther. Res.* **2015**, *29* (3), 323–331. <https://doi.org/10.1002/ptr.5256>.
- (16) Praveena, R.; Sadasivam, K. Theoretical Simulations on the Antioxidant Mechanism of Naturally Occurring Flavonoid: A DFT Approach. In *AIP Conference Proceedings*; 2016; Vol. 1728. <https://doi.org/10.1063/1.4946646>.
- (17) Feitosa, B. F.; Decker, B. L. A.; Brito, E. S. de; Rodrigues, S.; Mariutti, L. R. B. Microencapsulation of Anthocyanins as Natural Dye Extracted from Fruits – A Systematic Review. *Food Chem.* **2023**, *424* (April). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136361>.
- (18) Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition*; 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470742761>.
- (19) Rudrapal, M.; Khairnar, S. J.; Khan, J.; Dukhyil, A. B.; Ansari, M. A.; Alomary, M. N.; Alshabrimi, F. M.; Palai, S.; Deb, P. K.; Devi, R. Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>.
- (20) Khan, M. S.; Ikram, M.; Park, T. J.; Kim, M. O. Pathology, Risk Factors, and Oxidative Damage Related to Type 2 Diabetes-Mediated Alzheimer's Disease and the Rescuing Effects of the Potent Antioxidant Anthocyanin. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, *2021*. <https://doi.org/10.1155/2021/4051207>.
- (21) Tena, N.; Martín, J.; Asuero, A. G. State of the Art of Anthocyanins: Antioxidant Activity, Sources, Bioavailability, and Therapeutic Effect in Human Health. *Antioxidants* **2020**, *9* (5). <https://doi.org/10.3390/antiox9050451>.
- (22) Di Meo, F.; Lemaur, V.; Cornil, J.; Lazzaroni, R.; Duroux, J.-L.; Olivier, Y.; Trouillas, P. Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols: Atom versus Electron Transfer. *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117* (10), 2082–2092. <https://doi.org/10.1021/jp3116319>.
- (23) Papuc, C.; Goran, G. V.; Predescu, C. N.; Nicorescu, V.; Stefan, G. Plant

- Polyphenols as Antioxidant and Antibacterial Agents for Shelf-Life Extension of Meat and Meat Products: Classification, Structures, Sources, and Action Mechanisms. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, *16* (6), 1243–1268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12298>.
- (24) Caiati, C.; Stanca, A.; Lepera, M. E. Free Radicals and Obesity-Related Chronic Inflammation Contrasted by Antioxidants: A New Perspective in Coronary Artery Disease. *Metabolites* **2023**, *13* (6). <https://doi.org/10.3390/metabo13060712>.
- (25) Roche, V. F.; Zito, S. W.; Lemke, T. L.; Williams, D. A. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*; 2019.
- (26) Ma, Z.; Du, B.; Li, J.; Yang, Y.; Zhu, F. An Insight into Anti-Inflammatory Activities and Inflammation Related Diseases of Anthocyanins: A Review of Both in Vivo and in Vitro Investigations. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (20). <https://doi.org/10.3390/ijms222011076>.
- (27) Li, B.; Wang, L.; Bai, W.; Chen, W. *Anthocyanins*.
- (28) Liu, H.; Zhou, K.; Jiang, H.; Wen, L.; He, Y.; Lu, S.; Wang, B.; Li, J. Current Advances in Anthocyanins: Structure, Bioactivity and Human Health. *J. Food Nutr. Res.* **2021**, *60* (3), 203–216.
- (29) Mattioli, R.; Francioso, A.; Mosca, L.; Silva, P. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules* **2020**, *25* (17). <https://doi.org/10.3390/molecules25173809>.
- (30) Sokół-Łętowska, A.; Kucharska, A. Z.; Hodun, G.; Gołba, M. Chemical Composition of 21 Cultivars of Sour Cherry (*P. Cerasus*) Fruit Cultivated in Poland. *Molecules* **2020**, *25* (19). <https://doi.org/10.3390/molecules25194587>.
- (31) Câmara, J. S.; Locatelli, M.; Pereira, J. A. M.; Oliveira, H.; Arlorio, M.; Fernandes, I.; Perestrelo, R.; Freitas, V.; Bordiga, M. Behind the Scenes of Anthocyanins—From the Health Benefits to Potential Applications in Food, Pharmaceutical and Cosmetic Fields. *Nutrients*. 2022. <https://doi.org/10.3390/nu14235133>.
- (32) León-Carmona, J. R.; Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. Deprotonation Routes of Anthocyanidins in Aqueous Solution, p: K_a Values, and Speciation under Physiological Conditions. *RSC Adv.* **2016**, *6* (58), 53421–53429. <https://doi.org/10.1039/c6ra10818k>.
- (33) Basílio, N.; Mendoza, J.; Seco, A.; Oliveira, J.; de Freitas, V.; Pina, F. Strategies Used by Nature to Fix the Red, Purple and Blue Colours in Plants: A Physical Chemistry Approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23* (42), 24080–24101. <https://doi.org/10.1039/d1cp03034e>.
- (34) Cortez, R.; Luna-Vital, D. A.; Margulis, D.; Gonzalez de Mejia, E. Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, *16* (1), 180–198.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244>.

- (35) de Arruda Nascimento, E.; de Lima Coutinho, L.; da Silva, C. J.; de Lima, V. L. A. G.; dos Santos Aguiar, J. In Vitro Anticancer Properties of Anthocyanins: A Systematic Review. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2022**, *1877* (4). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188748>.
- (36) Bhushan, B.; Jat, B. S.; Dagla, M. C.; Aggarwal, S. K.; Rakshit, S. Anthocyanins and Proanthocyanidins as Anticancer Agents. In *Exploring Plant Cells for the Production of Compounds of Interest*; 2021; pp 95–124. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58271-5_4.
- (37) Majhi, S. Discovery, Development and Design of Anthocyanins-Inspired Anticancer Agents: A Comprehensive Review. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2022**, *22* (19), 3219–3238. <https://doi.org/10.2174/1871520621666211015142310>.
- (38) Kumar, S.; Gautam, S.; Sharma, A. Identification of Antimutagenic Properties of Anthocyanins and Other Polyphenols from Rose (*Rosa Centifolia*) Petals and Tea. *J. Food Sci.* **2013**, *78* (6), H948–H954. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12135>.
- (39) Junqueira-Gonçalves, M. P.; Yáñez, L.; Morales, C.; Navarro, M.; Contreras, R. A.; Zúñiga, G. E. Isolation and Characterization of Phenolic Compounds and Anthocyanins from Murta (*Ugni Molinae Turcz.*) Fruits. Assessment of Antioxidant and Antibacterial Activity. *Molecules* **2015**, *20* (4), 5698–5713. <https://doi.org/10.3390/molecules20045698>.
- (40) Dong, Y.; Yang, C.; Zhong, W.; Shu, Y.; Zhang, Y.; Yang, D. Antibacterial Effect and Mechanism of Anthocyanin from *Lycium Ruthenicum* Murr. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.974602>.
- (41) Ubom, R. E.; Ugwu, P. I.; Madueke, S. P.; Okorie, P. O.; Nwachukwu, D. C. Anti-Hypertensive Effects of Anthocyanins from *Hibiscus Sabdariffa* Calyx on the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Wistar Rats. *Niger. J. Physiol. Sci.* **2022**, *37* (1), 113–117. <https://doi.org/10.54548/njps.v37i1.14>.
- (42) Koning, R. A.; Grayson, I.; Weckbecker, C. The Effects of Bilberries, Blackcurrants and Their Constituent Anthocyanins on Heart Health in Humans. *Agro Food Ind. Hi. Tech.* **2015**, *26* (5), 16–20.
- (43) Suresh, S.; Begum, R. F.; Singh S, A.; V, C. Anthocyanin as a Therapeutic in Alzheimer’s Disease: A Systematic Review of Preclinical Evidences. *Ageing Res. Rev.* **2022**, *76*. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101595>.
- (44) Singletary, K. W.; Jung, K.-J.; Giusti, M. Anthocyanin-Rich Grape Extract Blocks Breast Cell DNA Damage. *J. Med. Food* **2007**, *10* (2), 244–251. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.258>.
- (45) Harlan, L.; Mena, L. T.; Ramalingam, L.; Jayarathne, S.; Shen, C.-L.; Moustaid-Moussa, N. Mechanisms Mediating Anti-Inflammatory Effects of Delta-Tocotrienol and Tart Cherry Anthocyanins in 3T3-L1 Adipocytes. *Nutrients*. 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12113356>.

- (46) Mayta-Apaza, A. C.; Pottgen, E.; De Bodt, J.; Papp, N.; Marasini, D.; Howard, L.; Abranko, L.; Van de Wiele, T.; Lee, S.-O.; Carbonero, F. Impact of Tart Cherries Polyphenols on the Human Gut Microbiota and Phenolic Metabolites in Vitro and in Vivo. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *59*, 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.04.001>.
- (47) Cairone, F.; Frascchetti, C.; Menghini, L.; Zengin, G.; Filippi, A.; Casadei, M. A.; Cesa, S. Effects of Processing on Chemical Composition of Extracts from Sour Cherry Fruits, a Neglected Functional Food. *Antioxidants* **2023**, *12* (2). <https://doi.org/10.3390/antiox12020445>.
- (48) Palese, C. Ciliegia a Tutto Tondo. *Inf. Agrar.* **2008**. <https://doi.org/10.1016/j.jweia.2023.105362>.
- (49) Silva, S.; Costa, E. M.; Calhau, C.; Morais, R. M.; Pintado, M. E. Anthocyanin Extraction from Plant Tissues: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57* (14), 3072–3083. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1087963>.
- (50) Shen, J.; Zhang, P.; Zhang, X.; Yao, J.; Chang, J.-M. Extraction Process and Composition Identification of Anthocyanins from Xinjiang Wild Prunus Cerasifera Fruit Peel. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2021**, *34* (6), 2409–2415.
- (51) Homoki, J. R.; Nemes, A.; Fazekas, E.; Gyémánt, G.; Balogh, P.; Gál, F.; Al-Asri, J.; Mortier, J.; Wolber, G.; Babinszky, L.; Remenyik, J. Anthocyanin Composition, Antioxidant Efficiency, and α -Amylase Inhibitor Activity of Different Hungarian Sour Cherry Varieties (*P. cerasus*). *Food Chem.* **2016**, *194*, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.130>.
- (52) Ulaszewska, M.; Vázquez-Manjarrez, N.; Garcia-Aloy, M.; Llorach, R.; Mattivi, F.; Dragsted, L. O.; Praticò, G.; Manach, C. Food Intake Biomarkers for Apple, Pear, and Stone Fruit Lars Dragsted. *Genes Nutr.* **2018**, *13* (1). <https://doi.org/10.1186/s12263-018-0620-8>.
- (53) Woźniak, Ł.; Marszałek, K.; Skąpska, S. Extraction of Phenolic Compounds from Sour Cherry Pomace with Supercritical Carbon Dioxide: Impact of Process Parameters on the Composition and Antioxidant Properties of Extracts. *Sep. Sci. Technol.* **2016**, *51* (9), 1472–1479. <https://doi.org/10.1080/01496395.2016.1165705>.
- (54) Galván D'Alessandro, L.; Dimitrov, K.; Vauchel, P.; Nikov, I. Kinetics of Ultrasound Assisted Extraction of Anthocyanins from Aronia Melanocarpa (Black Chokeberry) Wastes. *Chem. Eng. Res. Des.* **2014**, *92* (10), 1818–1826. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.11.020>.
- (55) Wang, W.; Jung, J.; Tomasino, E.; Zhao, Y. Optimization of Solvent and Ultrasound-Assisted Extraction for Different Anthocyanin Rich Fruit and Their Effects on Anthocyanin Compositions. *Lwt* **2016**, *72*, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.041>.
- (56) Vakula, A.; Šumić, Z.; Zeković, Z.; Tepić Horecki, A.; Pavlić, B. Screening,

- Influence Analysis and Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction Parameters of Cornelian Cherries (*Cornus Mas L.*). *J. Food Process. Preserv.* **2019**, *43* (12), 1–14. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14226>.
- (57) Elez Garofulić, I.; Dragović-Uzelac, V.; Režek Jambrak, A.; Jukić, M. The Effect of Microwave Assisted Extraction on the Isolation of Anthocyanins and Phenolic Acids from Sour Cherry Marasca (*P. Cerasus* Var. Marasca). *J. Food Eng.* **2013**, *117* (4), 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.043>.
- (58) Kurtulbaş Şahin, E.; Bilgin, M.; Şahin, S. Recovery of Anthocyanins from Sour Cherry (*P. cerasus*) Peels via Microwave Assisted Extraction: Monitoring the Storage Stability. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2021**, *51* (7), 686–696. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1852418>.
- (59) Başığit, B.; Görgüç, A.; Gençdağ, E.; Cansu, Ü.; Yılmaz, F. M.; Karaaslan, M. Functional Characterization of High-Yield Plant Protein Powder Valorized from de-Oiled Sour Cherry Seed Using Microwave-Assisted Enzymatic Extraction Followed by Spray- and Freeze-Drying. *Biomass Convers. Biorefinery* **2022**. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03225-2>.
- (60) Clayton-cuch, D.; Yu, L.; Shirley, N.; Bradley, D.; Bulone, V.; Böttcher, C. Auxin Treatment Enhances Anthocyanin Production in the Non-climacteric Sweet Cherry (*P. avium L.*). *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910760>.
- (61) Vignati, E.; Lipska, M.; Dunwell, J. M.; Caccamo, M.; Simkin, A. J. Fruit Development in Sweet Cherry. *Plants* **2022**, *11* (12). <https://doi.org/10.3390/plants11121531>.
- (62) Kurtulbaş Şahin, E.; Bilgin, M.; Şahin, S. Recovery of Anthocyanins from Sour Cherry (*P. cerasus*) Peels via Microwave Assisted Extraction: Monitoring the Storage Stability. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2021**, *51* (7), 686–696. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1852418>.
- (63) Domínguez-Rodríguez, G.; Marina, M. L.; Plaza, M. Enzyme-Assisted Extraction of Bioactive Non-Extractable Polyphenols from Sweet Cherry (*P. avium*) Pomace. *Food Chem.* **2021**, *339* (April 2020), 128086. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128086>.
- (64) Farooque, S.; Rose, P. M.; Benohoud, M.; Blackburn, R. S.; Rayner, C. M. Enhancing the Potential Exploitation of Food Waste: Extraction, Purification, and Characterization of Renewable Specialty Chemicals from Blackcurrants (*Ribes Nigrum L.*). *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (46), 12265–12273. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04373>.
- (65) Blando, F.; Gerardi, C.; Nicoletti, I. Sour Cherry (*P. Cerasus*) Anthocyanins as Ingredients for Functional Foods. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, *2004* (5), 253–258. <https://doi.org/10.1155/S1110724304404136>.
- (66) Mollaamin, F.; Kandemirli, F.; Monajjemi, M. Anthocyanin Compounds of the Persian Sour Cherry (*P. cerasus*) as the Fruit with High Antioxidant

- Properties. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2022**, *12* (3), 3696–3709. <https://doi.org/10.33263/BRIAC123.36963709>.
- (67) Hu, J.; Li, Y.; Wu, G.; Liang, S.; Zhao, Z.; Liu, J.; Chen, J.; Yu, G.; Sun, J.; Bai, W. Selective Iodination Enables Anthocyanin Synthesis to Be More General. *Org. Lett.* **2023**, *25* (13), 2289–2293. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.3c00597>.
- (68) Molaeafard, S.; Jamei, R.; Poursattar Marjani, A. Co-Pigmentation of Anthocyanins Extracted from Sour Cherry (*P. cerasus*) with Some Organic Acids: Color Intensity, Thermal Stability, and Thermodynamic Parameters. *Food Chem.* **2021**, *339* (September 2020), 128070. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128070>.
- (69) Vuletić, M. V.; Dugalić, K.; Mihaljević, I.; Tomaš, V.; Vuković, D.; Zdunić, Z.; Puškar, B.; Jurković, Z. Season, Location and Cultivar Influence on Bioactive Compounds of Sour Cherry Fruits. *Plant, Soil Environ.* **2017**, *63* (9), 389–395. <https://doi.org/10.17221/472/2017-PSE>.
- (70) Filimon, R. V.; Beceanu, D.; Niculaua, M.; Arion, C. Study on the Anthocyanin Content of Some Sour Cherry Varieties Grown in Iași Area, Romania. *Cercet. Agron. Mold.* **2013**, *44* (1). <https://doi.org/10.2478/v10298-012-0027-4>.
- (71) Özen, M.; Özdemir, N.; Ertekin Filiz, B.; Budak, N. H.; Kök-Taş, T. Sour Cherry (*P. cerasus*) Vinegars Produced from Fresh Fruit or Juice Concentrate: Bioactive Compounds, Volatile Aroma Compounds and Antioxidant Capacities. *Food Chem.* **2020**, *309* (October 2019), 125664. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125664>.
- (72) Wojdyło, A.; Nowicka, P.; Laskowski, P.; Oszmiański, J. Evaluation of Sour Cherry (*P. cerasus*) Fruits for Their Polyphenol Content, Antioxidant Properties, and Nutritional Components. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (51), 12332–12345. <https://doi.org/10.1021/jf504023z>.
- (73) Martinelli, I.; Tomassoni, D.; Bellitto, V.; Roy, P.; Micioni Di Bonaventura, M. V.; Amenta, F.; Amantini, C.; Cifani, C.; Tayebati, S. K. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Tart Cherry Consumption in the Heart of Obese Rats. *Biology (Basel)*. **2022**, *11* (5), 1–15. <https://doi.org/10.3390/biology11050646>.
- (74) Cocci, P.; Moruzzi, M.; Martinelli, I.; Maggi, F.; Micioni Di Bonaventura, M. V.; Cifani, C.; Mosconi, G.; Tayebati, S. K.; Damiano, S.; Lupidi, G.; Amantini, C.; Tomassoni, D.; Palermo, F. A. Tart Cherry (*P. cerasus*) Dietary Supplement Modulates Visceral Adipose Tissue CB1 mRNA Levels along with Other Adipogenesis-Related Genes in Rat Models of Diet-Induced Obesity. *Eur. J. Nutr.* **2021**, *60* (5), 2695–2707. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02459-y>.
- (75) William Foye, Thomas Lemke, W. Z. *Principi Di Chimica Farmaceutica*; 2021.

- (76) Fukui, K. Neuroprotective and Anti-Obesity Effects of Tocotrienols. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **2019**, *65*, S185–S187. <https://doi.org/10.3177/jnsv.65.S185>.
- (77) Brunetti, L.; Wang, L.; Wassef, A.; Gong, Y.; Brinker, A.; Buckley, B.; Lipsky, P. E.; Ondar, P.; Poiani, G.; Zhao, L.; Kong, A. N.; Schlesinger, N. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anthocyanins after Administration of Tart Cherry Juice to Individuals with Gout. *Mol. Nutr. Food Res.* **2023**, *67* (9), 1–11. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202200550>.
- (78) Khoo, H. E.; Azlan, A.; Tang, S. T.; Lim, S. M. Anthocyanidins and Anthocyanins: Colored Pigments as Food, Pharmaceutical Ingredients, and the Potential Health Benefits. *Food Nutr. Res.* **2017**, *61* (1). <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>.
- (79) Sheikh, A. A.; Wani, Z. A.; Shah, A. M.; Hassan, Q. P.; Mondhe, D. M.; Verma, M. K. Chemopreventive Effects of *P. cerasus* against Human Cancer Cells & Ascites Mice Models and Its Phytochemical Investigation by LC-Q-TOF-MS/MS. *Phytomedicine Plus* **2022**, *2* (4), 100336. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100336>.