

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI BIOMEDICINA COMPARATA ED
ALIMENTAZIONE

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

Polifenoli: attività biologiche e rischi correlati

Relatore

Prof. Fabio Vianello

Laureando

Marco Destro

Matricola n.

2007458

ANNO ACCADEMICO

2022/2023

Indice:

RIASSUNTO:.....	5
ABSTRACT:.....	5
1. I POLIFENOLI	6
1.1 Generalità.....	6
1.2 Classificazione.....	8
1.3 Biosintesi dei Polifenoli	11
1.4 Separazione, Identificazione ed Analisi dei Polifenoli	12
2. DISPONIBILITÀ.....	18
2.1 Effetti dei Metodi di Cottura sui Polifenoli	20
3. LA DIGESTIONE	26
3.1 Interazioni dei Polifenoli a livello Gastrointestinale	26
3.1.1 Interazioni dei Polifenoli con le Fibre Alimentari	26
3.1.2 Interazioni con L'amido	27
3.1.3 Interazioni con i Lipidi	28
3.1.4 Interazioni con le Proteine.....	29
3.1.5 Interazioni con gli Ioni Metallici	30
3.2 Effetti dei Polifenoli sugli Enzimi Digestivi.....	30
3.2.1 Effetti sulle Amilasi	31
3.2.2 Effetti sulle Lipasi	31
3.2.3 Effetti sulle Proteasi.....	32
3.3 Effetti sui Trasportatori Intestinali di Nutrienti	33
3.4 Farmacocinetica dei Composti Fenolici.....	34
3.5 Nanotecnologie per aumentare la Bioefficacia e la Biodisponibilità dei Polifenoli	35
4. ASSORBIMENTO	37
4.1 Diffusione Passiva.....	37
4.2 Trasporto Paracellulare.....	38
4.3 Trasporto Facilitato e Trasporto Attivo.....	38
5. ATTIVITÀ' BIOLOGICHE DEI POLIFENOLI NELLA CELLULA	40
5.1 Attività' Antiossidante	40
5.2 Oltre l'attività Antiossidante	41
6. RISCHI E SICUREZZA CORRELATI AL CONSUMO DI POLIFENOLI	43
6.1 Effetti sulla Salute del Consumatore.....	43
7. POLIFENOLI TOSSICI	47
7.1 Attività Pro Ossidante	47

7.2 Effetti Mutageni, Genotossici e Cancerogeni	47
8. CONCLUSIONI E CONSIDERAZIONI	49
BIBLIOGRAFIA:	50

RIASSUNTO:

I polifenoli sono delle molecole di origine vegetale, molto note per le loro capacità antiossidanti, che sono introdotte all'interno dell'organismo tramite la dieta. L'elaborato descrive le caratteristiche principali dei polifenoli, andando ad analizzare l'influenza dei diversi metodi di cottura sulla loro disponibilità, valutando le interazioni e le modifiche che subiscono una volta ingeriti con nutrienti, enzimi e componenti intestinali, che possono influenzare e modificare il loro assorbimento. Sono state inoltre descritte le azioni biologiche a livello cellulare di alcune molecole di natura polifenolica. Nella parte finale sono stati presi in considerazione i possibili rischi correlati al consumo di polifenoli, andando ad approfondire le caratteristiche di alcuni polifenoli tossici.

ABSTRACT:

Polyphenols are molecules of plant origin, well known for their antioxidant abilities, which are introduced into the body through the diet. The paper describes the main characteristics of polyphenols, going on to analyze the influence of different cooking methods on their availability, evaluating the interactions and changes they undergo once ingested with nutrients, enzymes and intestinal components, which can influence and modify their absorption. The biological actions at the cellular level of some molecules of a polyphenolic nature were also described. In the final part, the possible risks related to the consumption of polyphenols were considered, going into the characteristics of some toxic polyphenols.

1. I POLIFENOLI

I polifenoli sono dei composti organici di origine vegetale, noti per le loro capacità antiossidanti, che li vedono ampiamente proposti per la prevenzione di malattie cardiovascolari e malattie croniche, come il cancro e patologie neurodegenerative. Tali sostanze, però, non possiedono esclusivamente caratteristiche benefiche, ma possono presentare in molti casi nessun effetto oppure delle criticità, dipendenti dalla specifica struttura chimica, dalla dose ingerita e dal loro metabolismo (1).

Possiamo trovare queste molecole in prodotti vegetali, quali la frutta, la verdura, i legumi, i cereali e la frutta secca, o in alimenti come il caffè, il vino ed il tè, e in comuni condimenti come gli oli vegetali (ad esempio, l'olio extravergine di oliva).

Dal punto di vista chimico, i polifenoli sono dei composti che presentano uno o più gruppi fenolici nella loro struttura molecolare, e si fa riferimento ad oltre 8000 differenti molecole prodotte da organismi del regno vegetale. Inoltre, negli organismi vegetali la maggior parte di tali molecole sono modificate mediante glicosilazione con diverse unità mono o oligosaccaridiche in differenti posizioni dello scheletro del polifenolo.

Nelle piante, i polifenoli svolgono diverse funzioni, a partire dal proteggerle da infezioni da parte di patogeni, alla protezione dalle radiazioni UV e dagli stress ambientali.

Nella letteratura scientifica sono riportati numerosissimi studi, la maggior parte svolti *in vitro*, che attribuiscono a tali composti organici, una volta ingeriti dall'uomo, diverse attività nel miglioramento dello stato di salute, come ridurre lo stress ossidativo e l'infiammazione e migliorare la salute del sistema cardiovascolare (2).

1.1 Generalità

Come precedentemente accennato, i composti polifenolici si trovano nei vegetali, nella frutta, verdura, cereali, legumi e in molti alimenti, cioccolato, vino, tè e caffè.

A titolo di esempio, sono state individuate le principali 100 fonti di polifenoli, e queste sostanze sono risultate particolarmente presenti ad elevata concentrazione nelle spezie e nelle erbe aromatiche (3). Nella pubblicazione citata, i chiodi di garofano, la menta piperita e l'anice stellato sono risultati contenere il maggior quantitativo di molecole polifenoliche, riferito a 100 g di prodotto (*Tabella 1*).

Tabella 1: I 4 alimenti più ricchi in polifenoli e il loro quantitativo in mg riferito a 100 g di prodotto secco.

Prodotto	Quantità di polifenoli (mg/100g)
Chiodi di Garofano	15.2
Menta Essiccata	12.0
Anice Stellato	5.5
Cacao in Polvere	3.4

L'approvvigionamento di molecole polifenoliche avviene esclusivamente attraverso l'alimentazione e varia in base alla dieta alimentare seguita (esistono in commercio anche integratori specifici di polifenoli). Tra le varie abitudini alimentari, la dieta delle popolazioni dell'Asia orientale e la dieta mediterranea ricoprono un importante ruolo nell'assunzione dei polifenoli. Le popolazioni asiatiche seguono un regime alimentare ricco di prodotti a base di soia e altri legumi, noti per il loro elevato contenuto in polifenoli.

Numerosi studi scientifici hanno analizzato la correlazione tra l'assunzione di tali prodotti alimentari e la riduzione del rischio d'insorgenza di varie patologie, come il carcinoma mammario. D'altro canto, l'attuale dieta mediterranea si basa sull'abbondante consumo di frutta e verdura, l'utilizzo dell'olio d'oliva e la moderata assunzione di vino. È generalmente accettato che l'incidenza di patologie degenerative e a carico del sistema cardiocircolatorio risulti ridotta nelle popolazioni mediterranee proprio in virtù di assunzione di molecole antiossidanti (4). Va notato che l'analisi dei reports dell'Associazione Internazionale Ricerca sul Cancro (IARC) e della European Heart Network confermano tali certezze ormai di dominio comune (5).

1.2 Classificazione

I polifenoli sono classificati in base alla fonte di origine, alla funzione biologica e alla struttura chimica (2). Va considerato che normalmente la maggior parte dei polifenoli esiste nella pianta come glicoside, ovvero legati a diverse unità zuccherine o con zuccheri acetilati in diverse posizioni dello scheletro carbonioso. Nella presente tesi, la classificazione dei polifenoli verrà fatta in base alla struttura chimica degli agliconi (2).

Acidi fenolici:

Da un punto di vista chimico, gli acidi fenolici presentano almeno un gruppo ossidrilico fenolico e un gruppo carbossilico.

Sono dei composti fenolici di natura non flavonoide, che possono essere suddivisi in 2 tipi principali: i derivati dell'acido benzoico e dell'acido cinnamico (Fig. 1.1). Nella frutta e nella verdura possiamo trovare principalmente gli acidi fenolici liberi, mentre nei cereali e nei semi, gli acidi fenolici sono nella forma glicosilata (6).

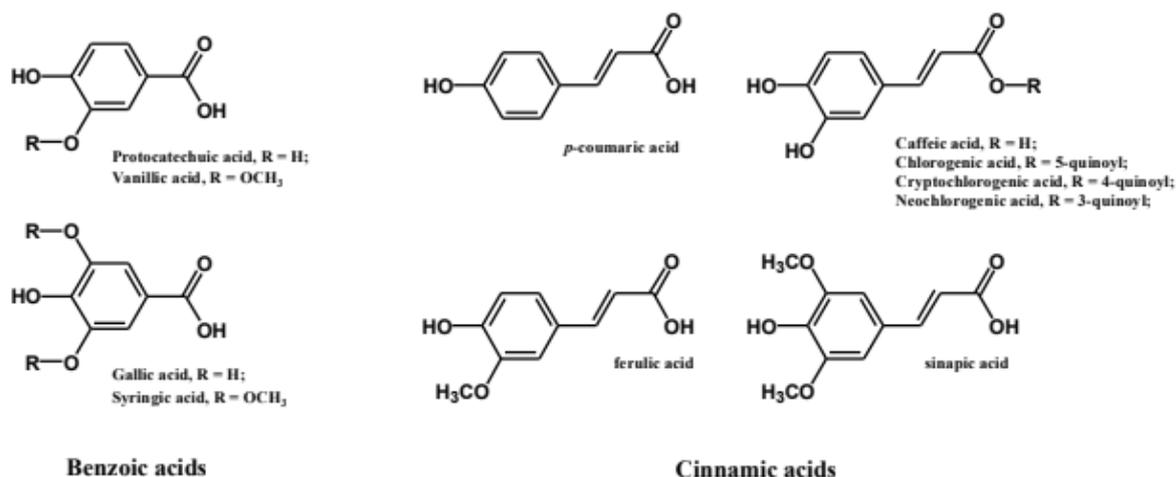


Figura 1.1: Acidi fenolici.

A sinistra, alcuni derivati dell'acido benzoico; a destra, alcuni derivati dell'acido cinnamico.

Flavonoidi:

Presentano una tipica struttura a tre anelli C₆-C₃-C₆, dove i due anelli C₆ sono di natura fenolica. Tipicamente sono formati da uno scheletro a 15 atomi di carbonio, con due anelli benzilici ed un anello eterociclico e rappresentano la principale

categoria di polifenoli, generalmente suddivisi in antocianine, flavoni, flavanoli, flavonoli e flavanoni. Questi composti sono presenti nel regno vegetale principalmente in forma glicosilata, e la loro attività biologica dipende dalla specifica struttura chimica e dal sito di glicosilazione (Fig. 1.2) (2).

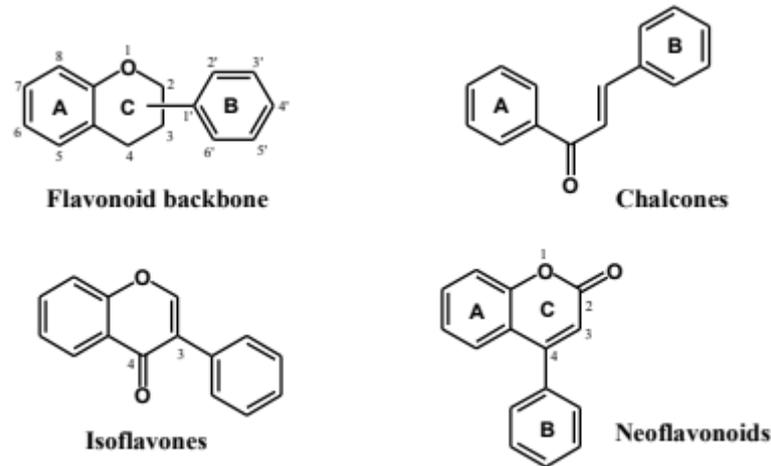


Figura 1.2: Alcuni flavonoidi.

I principali flavonoidi sono:

Isoflavoni, la struttura chimica degli isoflavoni è caratterizzata da un nucleo flavonico modificato, noto come isoflavonico, che presenta una struttura di base costituita da due anelli aromatici (anello A e anello B) collegati da un anello piranico.

Presenti maggiormente nelle leguminose (fagioli, soia) ed esplicano una serie di attività positive: proteggono i recettori degli estrogeni, proteggono le cellule dallo stress ossidativo e riducono i livelli di colesterolo.

Neoflavonoidi, rispetto agli isoflavoni, i neoflavonoidi presentano una struttura caratterizzata da un anello B aperto, che è il principale tratto distintivo di questa classe di composti. Generalmente presenti a concentrazioni molto basse negli alimenti vegetali

Calconi, sono caratterizzati da una struttura chimica specifica, che include due gruppi chetone (C=O) collegati tra loro da un ponte carbonio-carbonio. Questo ponte conferisce loro una struttura ciclica. Presente nei frutti, come mele, e nel luppolo, e di conseguenza nella birra

Flavoni, flavonoli, flavanoli e flavanonoli, rappresentano il gruppo più ampio di polifenoli.

Flavanoli o flavan-3-oli o catechine. Sono costituiti da un nucleo flavonico con una struttura di base composta da tre anelli aromatici (anello A, anello B e anello C). La struttura chimica dei flavanoli può variare a seconda delle sostituzioni presenti sugli anelli aromatici. Si ritrovano in molti frutti, come uva, mele e mirtilli, the e semi di cacao.

Proantocianidine: Sono polimeri di flavanoli e sono costituite da unità ripetitive di flavanoli legate tra loro attraverso legami C-C. La struttura chimica delle proantocianidine può variare a seconda del numero di unità di flavanoli presenti nella catena e dei legami specifici tra di loro.

Antocianidine: La struttura chimica delle antocianidine è composta da un anello A benzoidico, un anello B piranico e un anello C benzoidico. Sono i componenti principali dei pigmenti blu, viola e rossi dei petali dei fiori e del riso nero; il loro colore dipende dal pH, infatti si colorano di rosso in ambiente acido e di blu in ambiente basico. Quando le antocianidine sono glicosilate si parla di antocianine.

Ammidi polifenoliche:

I polifenoli che presentano sostituenti funzionali contenenti atomi di azoto (N) sono chiamati ammidi polifenoliche. In questo gruppo rientra la capsaicina, una sostanza responsabile del gusto piccante dei peperoncini, oltre ad avere proprietà antiossidanti e antinfiammatorie. È stato descritto che questa sostanza è capace di modulare il sistema di difesa allo stress ossidativo nella cellula (7). Tra le ammidi polifenoliche fanno parte anche le avenanthramidi, molecole capaci di inibire l'ossidazione delle LDL, ritrovabili nell'avena (Fig. 1.3) (2).

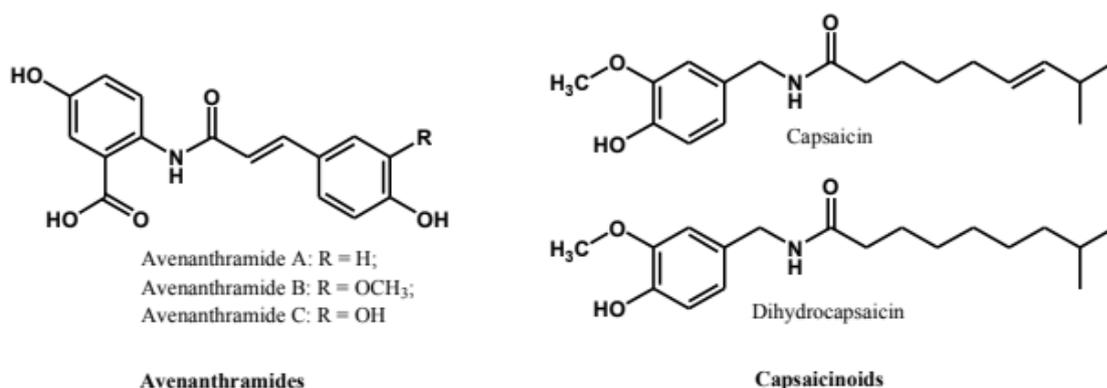


Figura 1.3: Ammidi polifenoliche.

Altri polifenoli (polifenoli che non ricadono nelle categorie precedenti):

Nelle matrici alimentari si trovano anche una serie di polifenoli di natura non flavonoide, ai quali vengono attribuiti importanti effetti sulla salute umana (Fig. 1.4).

Ad esempio, il resveratrolo individuato nell'uva e nel vino, l'acido ellagico trovato nelle fragole e nei lamponi, i lignani del sesamo, la curcumina della curcuma, l'acido rosmarinico del rosmarino. Appartiene a tale categoria un gruppo conosciuto come tannini idrolizzabili, costituiti da esteri dell'acido ellagico e dell'acido gallico (acidi fenolici) ed il glucosio, che presentano varie caratteristiche anti-nutrizionali (2).

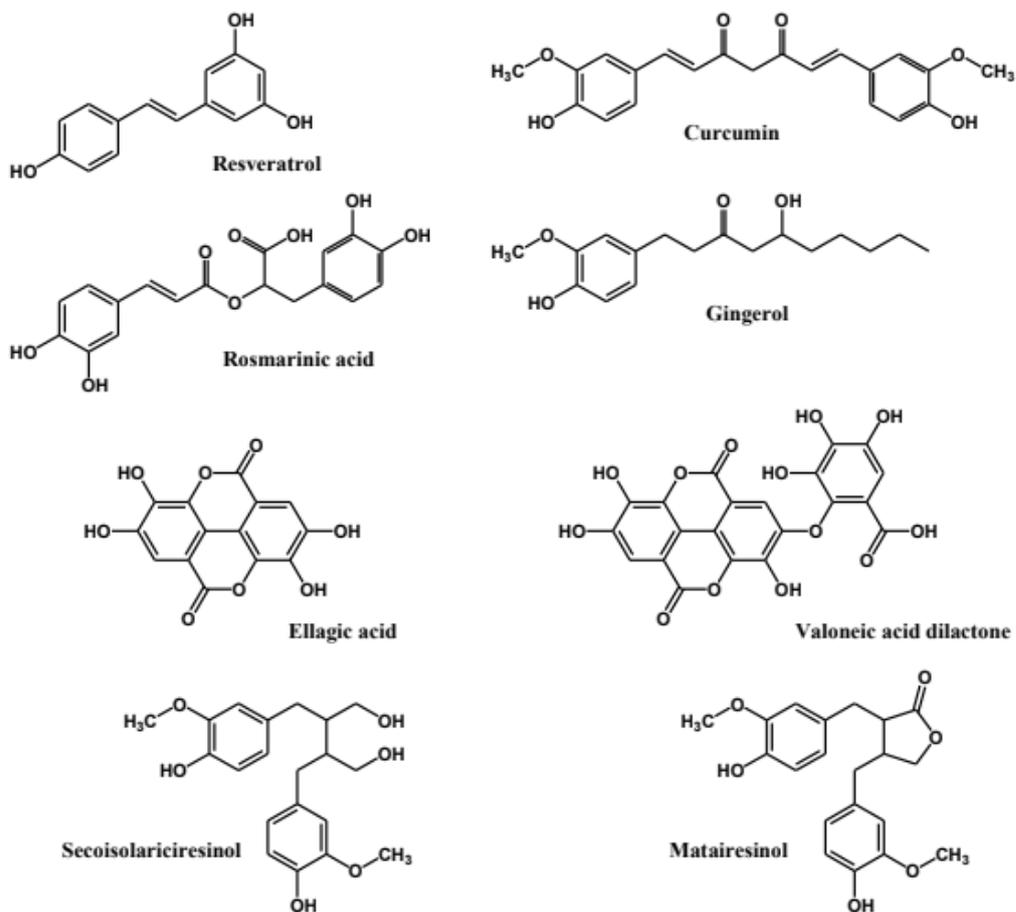


Figura 1.4: Alcuni polifenoli che rientrano nel gruppo degli “altri polifenoli”.

1.3 Biosintesi dei Polifenoli

I polifenoli sono tra i principali prodotti del metabolismo secondario delle piante, e derivano dalla via dell'acido shikimico. La via dello shikimato o via dell'acido shikimico è una via metabolica utilizzata da batteri, funghi, piante, parassiti e alghe per la sintesi

di amminoacidi aromatici (fenilalanina, tirosina e triptofano) a partire dal fosfoenolpiruvato (intermedio della glicolisi) e dall'eritrosio 4-fosfato. Gli amminoacidi aromatici così prodotti sono ulteriormente modificati e condensati permettendo la sintesi dei differenti polifenoli.

Quattro fattori influenzano la produzione e la concentrazione dei polifenoli nelle piante: genetico, ontogenetico, morfogenetico e fattori ambientali. Così piante differenti non presentano le stesse concentrazioni e tipologie di polifenoli. Non solo, ma anche nella stessa pianta, differenti strutture (foglie, fusti, radici) possono presentare tipologie e concentrazioni diverse di polifenoli. Ciò dipende dalla presenza e distribuzione di specifici enzimi con varia funzione ed espressione genica. Sono stati osservati anche effetti ontogenetici, riferendosi alla diversa espressione genica durante le fasi di maturazione di un organismo. Infine, le condizioni ambientali influenzano la distribuzione dei polifenoli: si riconoscono infatti effetti dovuti a fattori biotici, come la presenza di funghi e microorganismi, o abiotici come la temperatura, l'altitudine e l'esposizione luminosa o differenti metodi di coltura (8).

1.4 Separazione, Identificazione ed Analisi dei Polifenoli

Anche se i polifenoli condividono la stessa struttura fenolica di base, possedendo uno scheletro carbonioso e sostituenti differenti, mostrano diverse proprietà fisico-chimiche. A causa di queste ultime, l'estrazione, la separazione, l'identificazione e l'analisi dei polifenoli rimangono ancora oggi complesse e difficilmente generalizzabili. Infatti, risulta quasi impossibile sviluppare dei metodi efficaci per tutti i polifenoli presenti in ogni matrice vegetale, e nel corso del tempo sono stati adottati approcci generici in base alla specifica applicazione (9).

Generalmente, prima di effettuare il processo di estrazione è necessario raccogliere e preparare i campioni in maniera adeguata, conservandoli e trasportandoli con attenzione per minimizzare l'ossidazione dei composti d'interesse. Per impedire l'ossidazione e la degradazione dei polifenoli nativi. I campioni sono spesso essiccati, liofilizzati o congelati prima dell'estrazione per evitare l'azione delle polifenol-ossidasi e delle laccasi. Altri fattori che potrebbero danneggiare i polifenoli nel campione sono: l'esposizione alla luce, le temperature elevate e la presenza di ossigeno. Ad esempio,

bisognerebbe evitare un'essiccazione a temperature elevate perché potrebbe causare perdite importanti di polifenoli nel campione.

Sono stati proposti diversi metodi per l'estrazione dei polifenoli per diversi tipi di campione. La maggior parte dei campioni di origine vegetale sono trattati con metodi di estrazione liquido/liquido o solido/liquido. La natura fenolica delle sostanze di interesse rende tali composti relativamente idrofilici, caratteristica che permette la loro estrazione utilizzando acqua o solventi organici polari, come il metanolo, l'etanolo, l'acetone o l'acetonitrile, o una loro miscela con l'acqua. Inoltre, è molto importante considerare il pH della fase acquosa di estrazione. Infatti, generalmente quest'ultimo ha un pH acido, dato che a pH basici risultano molto più rapidi i processi di ossidazione delle molecole organiche. Inoltre, non tutti i polifenoli sono presenti nella loro forma libera: i lignani o l'acido ferulico, ad esempio, sono spesso legati ad altre sostanze (mono o oligosaccaridi), e per favorire la loro idrolisi sono spesso richieste condizioni acide o basiche. L'idrolisi risulta particolarmente importante per semplificare il profilo cromatografico durante la separazione, oltre a favorirne la quantificazione ed identificazione (1).

In alcuni casi, quando lo schema di glicosilazione del polifenolo è particolarmente complesso, per procedere con l'idrolisi è necessario agire con enzimi (β -glicosidasi), oppure con acidi forti (HCl) ad elevate temperature (6).

Una volta estratti dalla matrice, il quantitativo totale di polifenoli, flavonoidi e antocianine è generalmente stimato mediante spettrofotometria utilizzando differenti metodiche. In tal caso, l'analisi può non essere sempre precisa, perché potrebbero essere presenti interferenze causate da componenti non fenoliche del campione che possono falsificare le letture portando a dei risultati finali errati. Sono stati descritti numerosi metodi per quantificare la quantità di polifenoli nelle matrici vegetali. Tra le metodiche spettrofotometriche più utilizzate per la determinazione del contenuto di polifenoli totale troviamo:

Il metodo di **Folin-Ciocalteu** è una tecnica spettrofotometrica usata per la determinazione dei polifenoli totali in una soluzione. Il principio del metodo si basa sulla riduzione dei reattivi di Folin-Ciocalteu da parte dei polifenoli presenti nel campione, formando un complesso blu che assorbe la luce a una lunghezza d'onda di 765 nm. Il metodo richiede una serie di standard di riferimento, solitamente acido gallico o catechina, per costruire una curva di calibrazione e calcolare la

concentrazione dei polifenoli nel campione espressa in equivalenti di acido gallico (GAE) o equivalenti di catechina (CE).

Condizioni di saggio:

- 1- Preparazione del reagente di Folin-Ciocalteu: Il reagente di Folin-Ciocalteu è una soluzione costituita da una miscela di acido fosfomolibdico, acido fosfotungstico e reattivi alcalini come il sodio o il potassio.
- 2- Preparazione del campione: Il campione da analizzare viene solitamente estratto con un solvente appropriato per estrarre i composti fenolici. Il campione può essere un estratto di piante, un estratto di alimenti o una soluzione contenente i composti fenolici di interesse.
- 3- Reazione: In una provetta, si mescolano il campione estratto, il reagente di Folin-Ciocalteu e una soluzione alcalina (ad esempio idrossido di sodio). La miscela viene quindi agitata e lasciata reagire per un determinato periodo di tempo, di solito da 30 minuti a 2 ore, a temperatura ambiente o a una temperatura controllata.
- 4- Misurazione della lettura: Dopo il periodo di reazione, si misura l'assorbanza della miscela a una lunghezza d'onda specifica, generalmente intorno ai 750 nm o 765 nm, utilizzando uno spettrofotometro. L'assorbanza è proporzionale alla concentrazione dei composti fenolici presenti nel campione.
- 5- Calibrazione: Per quantificare la quantità di composti fenolici nel campione, si utilizza una curva di calibrazione. Si preparano soluzioni standard di un composto fenolico di riferimento (ad esempio acido gallico) in diverse concentrazioni conosciute. Queste soluzioni standard vengono sottoposte allo stesso trattamento del campione e la loro assorbanza viene misurata. Successivamente, si costruisce una curva di calibrazione tracciando l'assorbanza rispetto alla concentrazione delle soluzioni standard.
- 6- Calcolo dei risultati: La concentrazione di composti fenolici nel campione viene calcolata interpolando i dati di assorbanza sulla curva di calibrazione.

Il metodo **FRAP** (Ferric Reducing Antioxidant Power) è una tecnica analitica utilizzata per valutare la capacità antiossidante dei polifenoli presenti in diversi campioni biologici. Il principio di base del metodo consiste nella riduzione del ferro trivalente (Fe^{3+}) a ferro bivalente (Fe^{2+}) da parte dei polifenoli, che agiscono come donatori di elettroni. La quantità di ferro ridotto viene misurata spettrofotometricamente a 593 nm,

in base all'intensità del colore blu formata dalla reazione tra il Fe^{2+} e il 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Il metodo FRAP è semplice, rapido ed economico, e permette di ottenere una stima globale dell'attività antiossidante dei polifenoli in varie matrici alimentari.

Condizioni di saggio:

- 1- Preparazione del reagente FRAP: una soluzione di acetato di sodio, una soluzione di cloruro ferrico e una soluzione di 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) in HCl. Questo reagente forma un colore blu intenso quando il ferro è ridotto a Fe^{2+} .
- 2- Preparazione del campione.
- 3- Reazione: Prendere una quantità nota del campione e mescolarla con il reagente FRAP in una provetta. Agitare la miscela e assicurarsi che il reagente sia ben disperso nel campione. Lasciare reagire la miscela per un periodo di tempo specifico, di solito da 5 a 30 minuti, a temperatura ambiente o a una temperatura controllata.
- 4- Misurazione dell'assorbanza: Dopo il periodo di reazione, misurare l'assorbanza della miscela a una lunghezza d'onda specifica, tipicamente intorno ai 593 nm o 595 nm, utilizzando uno spettrofotometro. L'assorbanza è proporzionale alla quantità di ferro bivalente (Fe^{2+}) generato come risultato della riduzione del ferro trivalente (Fe^{3+}) da parte dei composti antiossidanti presenti nel campione.
- 5- Calibrazione: Per quantificare l'attività antiossidante del campione, è possibile utilizzare una curva di calibrazione.
- 6- Calcolo dei risultati: Utilizzare la curva di calibrazione per determinare la quantità di composti antiossidanti presenti nel campione in base all'assorbanza misurata.

Il metodo **DPPH** è una tecnica spettrofotometrica per la determinazione della capacità antiossidante di sostanze che possono ridurre il radicale 1,1-difenil-2-picril-idrazile (DPPH). Il DPPH è un radicale stabile di colore viola che assorbe la luce a 517 nm. Quando viene ridotto da un antiossidante, il DPPH perde il colore e la sua assorbanza diminuisce. Il metodo consiste nel misurare la variazione di assorbanza di una soluzione di DPPH dopo l'aggiunta di un campione contenente polifenoli o altri

antiossidanti. Il grado di decolorazione è proporzionale alla quantità di polifenoli presenti nel campione.

Condizioni di saggio:

- 1- Preparazione della soluzione di DPPH: Preparare una soluzione di DPPH dissolvendo il DPPH in un solvente appropriato (metanolo o l'etanolo). La concentrazione tipica della soluzione di DPPH è dell'ordine di 0,1-0,2 mM.
- 2- Preparazione del campione:
- 3- Reazione: Prendere una quantità nota del campione e mescolarla con la soluzione di DPPH. Lasciare reagire la miscela per un periodo di tempo specifico e una temperatura specifica.
- 4- Misurazione dell'assorbanza: Dopo il periodo di reazione, misurare l'assorbanza della miscela a una lunghezza d'onda specifica, di solito intorno ai 517 nm, utilizzando uno spettrofotometro. L'assorbanza è proporzionale alla quantità di DPPH ridotto dagli antiossidanti presenti nel campione.
- 5- Calcolo dei risultati: Utilizzando una curva di calibrazione, che viene generata utilizzando antiossidanti di riferimento con concentrazioni conosciute, è possibile determinare la capacità antiossidante del campione.

In alternativa, sono spesso utilizzate tecniche cromatografiche, quali l'**HPLC** (high performance liquid chromatography) o la gascromatografia (**GC**), accoppiate a vari tipi di rivelatore. L'HPLC (fig. 1.5) è una tecnica cromatografica che permette di separare differenti composti in una miscela, utilizzando due fasi immiscibili ed in equilibrio tra loro: una fase stazionaria immobilizzata su dei supporti inerti e una fase mobile composta da solventi puri o miscele. La fase mobile fluisce attraverso la fase stazionaria (fissa) e in base alle interazioni che si creano tra le sostanze disciolte nella fase mobile e la fase stazionaria ne risulta un tempo di ritenzione differente. Una sostanza che mostra un'elevata affinità per la fase stazionaria impiegherà un tempo maggiore per percorrere la colonna cromatografica (maggiore tempo di ritenzione), mentre una sostanza con una scarsa affinità per la stessa fase uscirà per prima. Il campione passa attraverso la fase stazionaria spinto da un'elevata pressione (centinaia di atmosfere), la quale risulta indispensabile per ridurre il tempo di analisi.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

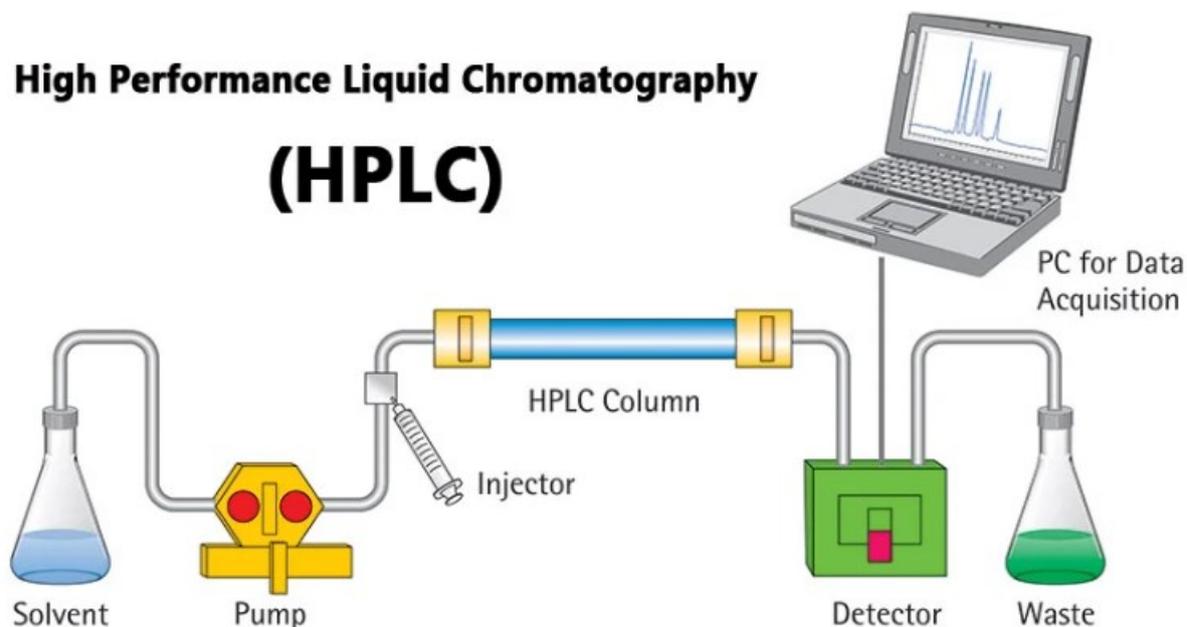


Figura 1.5: Schema semplificato di uno strumento per HPLC

Alla fine della colonna è presente un rivelatore, spesso spettrofotometrico, il cui segnale in uscita, collegato ad un calcolatore, dà luogo ad un cromatogramma che consente l'identificazione e la quantificazione delle sostanze iniettate. La GC è utilizzata meno frequentemente, e solamente per analizzare gli isoflavoni, i quali devono essere derivati nei loro metil-esteri per renderli volatili.

2. DISPONIBILITÀ

I polifenoli sono gli antiossidanti maggiormente presenti nella nostra dieta, e sono presenti in vari alimenti di origine vegetale. Risulta complesso stabilire il quantitativo preciso di polifenoli in un alimento a causa delle loro diversità strutturali e delle differenti caratteristiche chimico-fisiche, dovute al variabile grado di idrossilazione dell'anello fenolico, all'eventuale grado di glicosilazione, o di acilazione con gli acidi fenolici.

A titolo di esempio, il contenuto medio dei più importanti polifenoli in alcuni alimenti è riportato nella Tabella 2.

Tabella 2: Contenuto di polifenoli in 100g o 100ml di alcuni alimenti e bevande. (10)

Cibo (quantità)	Acidi fenolici (mg)	Flavonoli (mg)	Catechine (mg)	Proantocianidine (mg)	Flavanoni (mg)	Antociani (mg)	Polifenoli totali (mg)
Patate, 100 g	14						14
Pomodori, 100 g	8	0,5					8
Lattuga, 100 g	8	1					9
Cipolla, 100 g		35					7
Mela, 100 g	5,5	3,5	10,5	100			119,5
Ciliegie, 100 g	74	2	6	70		400	552
Crusca Frumento, 100 g	500						500

Cioccolato fondente, 100 g			80	430			510
Succo d'arancia , 100 ml					22		22
Vino rosso, 100 ml	9,6	1,6	27,2	36		3,2	77,6
Caffè, 100 ml	75						75
Tè nero, 100 ml		4	65				69

Naturalmente, i valori riportati in Tabella 2 sono indicativi data l'elevata variabilità tra le differenti varietà di alimento; ad esempio per quanto riguarda le mele è stata determinata una variabilità particolarmente importante del rapporto tra flavonoidi e acidi fenolici (10). Inoltre, i polifenoli non sono distribuiti in maniera uniforme nei tessuti dei vegetali: nella mela la quercetina si trova nella buccia (1 mg/g peso fresco) e sono eliminati con la sbucciatura (11). Analogamente, nel grano le sostanze fenoliche sono concentrate negli strati esterni e sono persi con la raffinazione (12). A titolo di esempio, in relazione alla popolazione negli Stati Uniti è stato stimato un introito giornaliero pari a 218 mg di polifenoli (13).

Si consideri che la frutta possiede un quantitativo maggiore di polifenoli (1-2 g/100 g) rispetto alla verdura, oltre a possedere un più alto contenuto in antocianine e proantocianidine, non ritrovati comunemente nelle verdure (14). Anche il cioccolato fondente rappresenta un'ottima fonte di polifenoli, soprattutto per quanto riguarda le catechine e le proantocianidine. Tra le bevande, la migliore fonte di polifenoli risultano essere il caffè, il tè, il vino ed i succhi di frutta. Le bevande al cioccolato sono ricche in proantocianidine, mentre la birra risulta possedere 500-1000 mg/L di polifenoli totali.

Attualmente si ritiene che circa un terzo dei polifenoli ingeriti quotidianamente sia rappresentato da acidi fenolici, mentre i flavonoidi ne rappresentino i due terzi. Ovviamente, questo è un valore medio ed indicativo perché la distribuzione dei polifenoli varia in base agli alimenti ed alle bevande consumate; chi beve molti caffè avrà un quantitativo maggiore di acidi fenolici rispetto ai flavonoidi, per chi invece consuma frequentemente frutta, la maggior parte dei flavonoidi sarà dato dai flavanoli (catechine e proantocianidine) (15).

2.1 Effetti dei Metodi di Cottura sui Polifenoli

La composizione fenolica degli alimenti è molto variabile sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo: alcuni composti polifenolici sono ubiquitari mentre altri sono specifici di particolari specie o famiglie di vegetali.

Va tenuto conto che i polifenoli sono delle specie molto reattive e possono subire varie reazioni nel corso della trasformazione dei prodotti di origine vegetale. Negli alimenti, la cottura, ad esempio, causa modificazioni fisico-chimiche dei composti fenolici, dando luogo, a seconda del processo utilizzato, a fenomeni di degradazione, ossidazione, polimerizzazione ed al possibile rilascio nell'ambiente di cottura di tali sostanze dalle strutture polimeriche delle pareti delle cellule vegetali (16).

L'effetto della cottura sui composti polifenolici dipende dal tipo di processo termico al quale è sottoposto l'alimento (17) e la maggior parte degli studi riporta una perdita di sostanze polifenoliche durante i diversi tipi di cottura.

A titolo di esempio:

- la bollitura dell'alimento in acqua a 100° C rappresenta il metodo di cottura più studiato. È stato dimostrato che la diminuzione del contenuto di composti polifenolici nell'alimento risulta proporzionale al tempo di cottura e al quantitativo di acqua utilizzata. L'effetto della temperatura è da ascrivere ad aumento della velocità di ossidazione di tali sostanze e l'elevato contenuto d'acqua permette ai polifenoli solubili di venire dispersi nell'ambiente di cottura, causando un impoverimento dei composti antiossidanti nel prodotto.
- La bollitura a pressione è un metodo di cottura molto simile alla bollitura tradizionale, dove però si raggiunge la temperatura di 121°C. I risultati ottenuti sul

contenuto di composti polifenolici negli alimenti sono risultati molto simili a quelli osservati nel corso della bollitura tradizionale, ovvero una perdita di sostanze polifenoliche dovuta sia all'ossidazione, più marcata rispetto alla bollitura data la più elevata temperatura, che alla solubilizzazione nell'acqua di cottura.

- Nella cottura a vapore l'alimento non è a diretto contatto con l'acqua di cottura, ed evita i fenomeni di solubilizzazione dei polifenoli. Generalmente, con la cottura a vapore vengono riportate perdite inferiori rispetto agli altri metodi di cottura.

- La cottura in forno a microonde produce effetti molto simili a quelli della bollitura tradizionale, e, data la mancanza di elevati volumi d'acqua, dà luogo ad una ridotta perdita per solubilizzazione.

- La cottura in forno tradizionale e la frittura avvengono a temperature molto elevate (> 170°C) e producono importanti perdite del quantitativo di polifenoli totali.

- L'arrostitimento e la tostatura danno luogo all'imbrunimento del prodotto a causa della reazione di Maillard, che avviene a temperature molto elevate (superiori ai 160°C). Nonostante la reazione di Maillard coinvolga zuccheri e proteine, o amminoacidi, è ritenuta responsabile della diminuzione dei fenoli totali dell'alimento (18).

Nella Figura 2.1 sono riportati i risultati ottenuti da alcuni studi sull'effetto dei differenti metodi di cottura sul contenuto di polifenoli totali.

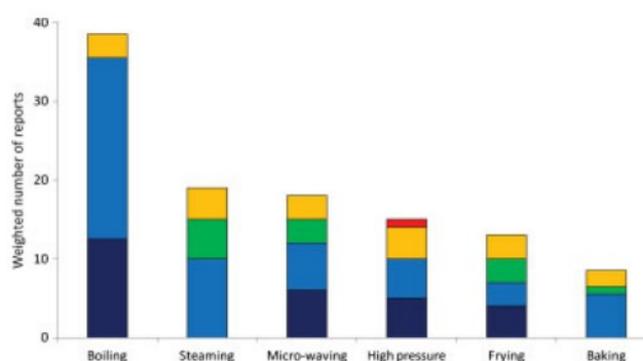


Figura 2.1: Effetto di diversi metodi di cottura sul contenuto di polifenoli totali (17). Sono stati analizzati più studi che hanno riportato l'effetto di diversi metodi di cottura sul contenuto di polifenoli totali. Blu scuro, perdite > 50%; Blu chiaro, perdite < 50%; verde, perdite non significative; arancio, aumento < 50%; rosso, aumento > 50%.

D'altra parte, alcuni autori hanno riportato un aumento nel contenuto totale di polifenoli in seguito a cottura. Ad esempio, lo studio di Faller e Fialho (18) ha descritto l'effetto della cottura su vegetali provenienti da agricoltura biologica e convenzionale: i vegetali biologici hanno dimostrato una sensibilità maggiore ai processi di cottura rispetto ai vegetali convenzionali. Inoltre, è stato verificato un aumento nel contenuto di fenoli totali nell'alimento in seguito a bollitura tradizionale e a bollitura a pressione. Questo fenomeno potrebbe essere spiegato con una maggiore disponibilità di polifenoli dovuta alla migliorata estrazione ad alte temperature e ad un rilascio più efficiente di composti fenolici da compartimenti intracellulari e dalle strutture delle pareti delle cellule vegetali.

Va anche considerato che i trattamenti ad alte temperature sono in grado di inattivare le polifenolossidasi e le laccasi, prevenendo così l'ossidazione enzimatica dei polifenoli (20). Inoltre, il trattamento termico può favorire la rottura dei legami con le componenti mono- e oligo-saccaridiche, liberando il polifenolo corrispondente e rendendolo disponibile all'assorbimento.

Riassumendo, sono stati riportati in letteratura dei risultati molto variabili sul contenuto di polifenoli negli alimenti, sia per i diversi parametri di cottura utilizzati (tempo, temperatura, quantità d'acqua utilizzata) che per i tipi di alimenti sottoposti ai trattamenti termici.

In un interessante studio è stato valutato il contenuto di polifenoli in diversi alimenti in seguito al processo di cottura: i polifenoli dei cereali e dei legumi sono risultati molto sensibili ai trattamenti termici con perdite post cottura superiori all'80%. Anche i polifenoli dei vegetali a foglia sono risultati molto sensibili ai trattamenti termici, ma con delle perdite inferiori, attorno al 50% rispetto al contenuto iniziale. Mentre, i polifenoli presenti nei tuberi hanno mostrato un aumento del loro contenuto, fino al 200% nelle carote. Inoltre è stata osservata una maggior suscettibilità dei vegetali congelati di III gamma, rispetto ai vegetali freschi di I gamma (17). Dal un punto di vista generale, la cottura a vapore risulta il metodo più efficace per preservare l'integrità dei polifenoli, riducendo il rischio di inattivazione mediante ossidazione e di perdita nell'acqua di cottura.

È stato inoltre valutato il comportamento delle differenti classi di sostanze polifenoliche nel corso della cottura: gli acidi fenolici, presenti in moltissimi alimenti e di cui fanno parte l'acido caffeico, cumarico, vanillico, ferulico, protocatechico, subiscono frequentemente reazioni di degradazione ossidativa (includendo l'imbrunimento

enzimatico), rilascio di acidi fenolici liberi dalla forma glicosidica e formazione di strutture complesse con proteine e tannini. In base all'entità di tali reazioni, l'effetto finale può dar luogo ad una diminuzione o ad un aumento degli acidi fenolici nell'alimento dopo cottura. È importante notare che i trattamenti di cottura possono permettere una redistribuzione della concentrazione dei vari acidi fenolici: per esempio, è stato osservato un aumento nel contenuto di acido ferulico nel finocchio in seguito a cottura al forno, che potrebbe essere collegato alla degradazione dell'acido caffeico, un precursore dell'acido ferulico. Sono state osservate anche delle massicce trans-esterificazioni particolarmente evidenti per gli acidi 3,5 e 4,5-di-O-caffeilchinici (acido clorogenico) nei carciofi. Tali composti si formano estensivamente durante i processi di cottura, mentre hanno una bassissima concentrazione nei prodotti crudi (17).

I flavonoidi rappresentano il gruppo più comune di polifenoli nelle piante, e, come già accennato, sono i principali responsabili del colore della frutta e della verdura. Le sei principali classi di flavonoidi sono: flavoni, flavonoli, flavononi, catechine, antocianidine ed isoflavoni. Questi composti sono molto sensibili al calore e l'esposizione ad alte temperature durante la cottura modifica in maniera sostanziale il loro contenuto nei prodotti di origine vegetale. Nella quasi totalità degli articoli scientifici analizzati è stata notata una loro diminuzione in seguito ai differenti metodi di cottura. Ad esempio, Rodrigues e i suoi collaboratori hanno bollito una cipolla per tempi brevi (30 minuti) e per tempi più lunghi (60 minuti), osservando mediamente una perdita del 48% dei flavonoidi, con un effetto dipendente dalla durata e dalla temperatura. Questa grande perdita di polifenoli è stata notata anche nei vegetali bolliti, dove le sostanze fenoliche sono state disperse nell'acqua di cottura (21). Inoltre, i derivati glicosilati e acetilati dei flavonoidi hanno dimostrato un'estrazione inferiore rispetto ai derivati legati all'acido glucuronico, ciò può essere spiegato dalla maggiore solubilità in acqua dei derivati glucuronati rispetto ai composti glicosilati o acetilati.

Nella Figura 2.2 sono stati analizzati i risultati ottenuti sul contenuto di flavonoidi in seguito a differenti metodi di cottura.

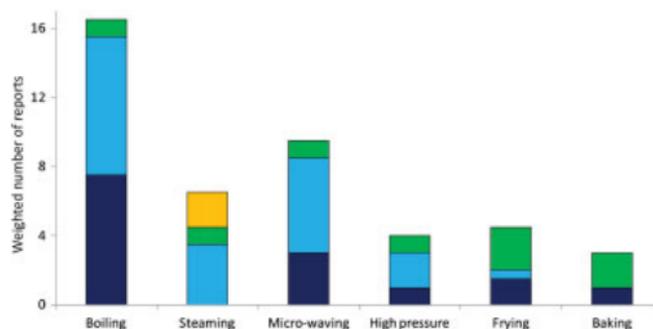


Figura 2.2: Effetto di diversi metodi di cottura sul contenuto di flavonoidi negli alimenti (17). Sono stati analizzati più studi che hanno riportato l'effetto di diversi metodi di cottura sul contenuto di flavonoidi totali.

Blu scuro, perdite >50%; Blu chiaro, perdite <50%; verde, perdite non significative; arancio, aumento <50%.

I fitoestrogeni sono un gruppo di polifenoli prodotti dalle piante, che inducono risposte biologiche e possono imitare o modulare l'azione degli estrogeni endogeni, legandosi ai loro recettori. Nelle piante questi composti agiscono come antiossidanti, protettori contro la luce e come agenti difensivi contro i predatori. I fitoestrogeni si suddividono in isoflavoni, lignani e stilbeni. Gli isoflavoni dei piselli e dei fagioli si degradano totalmente in seguito ad un trattamento termico, mentre gli isoflavoni delle patate dolci non subiscono variazioni. Nelle *brassicacee* risultano aumentare fino all'800% post cottura. Una possibile spiegazione dell'aumento del contenuto in isoflavoni è data dal loro possibile rilascio dalle strutturali cellulari, proteine o polisaccaridi, grazie alle alte temperature (22). I lignani sono composti fenolici localizzati principalmente sulle pareti dei vasi e dei tessuti secondari delle piante superiori, nelle cellule o polimerizzate in strutture della lignina nella parete cellulare. Sono coinvolti principalmente nella difesa delle piante, nella protezione dai parassiti e nella crescita del vegetale. Sono presenti in molti alimenti, particolarmente nei semi di lino e nella crusca di segale, e rappresentano la classe di polifenoli più resistente ai trattamenti termici. Ad esempio, in uno studio è stato trattato l'olio di sesamo, prima friggendolo e poi tostandolo/arrostendolo. Durante la frittura è stata osservata una progressiva conversione da sesamolina (lignano) a sesamolo (derivato del fenolo con proprietà

antiossidanti, antinfiammatorie e neuroprotettive), mentre il contenuto totale di lignani è rimasto invariato (23). Inoltre, sono state riportate delle perdite importanti di lignani in seguito a bollitura: le perdite maggiori (85%) sono state osservate nei fagioli. Il loro contenuto nelle carote e in differenti diversi tuberi è risultato maggiore post cottura (fino al 169% nel sedano rapa). Durante la tostatura invece è stato osservato che una temperatura relativamente bassa favorisce l'estrazione di lignani, senza danneggiarli, mentre una temperatura molto alta favorisce la loro degradazione.

Possiamo concludere dicendo che quando si parla di cottura, e degli effetti che essa può avere sui polifenoli, è molto importante sottolineare a quale sostanza si fa riferimento, a quale tipo di vegetale si sta cuocendo, e quale processo è utilizzato per la cottura. In un quadro generale, la cottura al vapore è considerato il metodo migliore per preservare il quantitativo totale di polifenoli. In questo caso, il vegetale oltre a non entrare direttamente in contatto con l'acqua (i polifenoli sono solubili in acqua), le temperature non sono eccessivamente elevate (circa 95°C). È importante far notare che il quantitativo di polifenoli in un alimento non è correlato con la loro biodisponibilità, che dipende dalla combinazione di fenomeni che avvengono nell'intestino e dalla capacità di assorbimento della barriera intestinale. Un ruolo importante e fondamentale è svolto dal microbiota e dagli enzimi digestivi, che influenzano le modificazioni, il rilascio e l'estrazione di tutti i fitochimici ingeriti (17).

3. LA DIGESTIONE

La digestione è un processo che avviene nella cavità orale, nello stomaco e nella prima parte dell'intestino dove gli alimenti sono trasformati in nutrienti pronti ad essere assimilati. In questo capitolo 3 verranno analizzate le interazioni che possono interessare i polifenoli durante i processi digestivi.

3.1 Interazioni dei Polifenoli a livello Gastrointestinale

Prima di raggiungere il circolo sanguigno, i polifenoli interagiscono con numerose molecole nel lume intestinale, sia già presenti negli alimenti che prodotte dagli enterociti, quali gli enzimi digestivi ed i trasportatori cellulari. Tali interazioni possono influenzare la loro biodisponibilità. Dal punto di vista generale, è stato dimostrato che la maggior parte delle sostanze polifenoliche ingerite con la dieta sono scarsamente assorbite dall'organismo, e vengono eliminate attraverso le feci (24).

3.1.1 Interazioni dei Polifenoli con le Fibre Alimentari

Le fibre alimentari sono degli oligo- e polisaccaridi che compongono le pareti delle cellule vegetali e non sono digeribili ed assorbibili dall'uomo. Nonostante queste sostanze non vengano assorbite dall'intestino umano, rivestono comunque un ruolo fondamentale per la salute dell'organismo perché possono essere fermentate dal microbiota intestinale, favorendo lo sviluppo della flora batterica del colon. Normalmente, gli alimenti ricchi in polifenoli (cereali, frutta, verdura, legumi) sono altrettanto ricchi di fibre e molte sostanze polifenoliche sono naturalmente legate alle fibre, quindi non direttamente accessibili ai processi di digestione e assorbimento (25). La forza e il tipo di legame tra polifenolo e fibra è molto variabile, soprattutto in base alla composizione della fibra. Per esempio, l'estraibilità delle antocianine dell'uva dipende dalla composizione polisaccaridica della parete cellulare (lignina o cellulosa). Altre fibre come la pectina, possono formare delle strutture secondarie che incapsulano i polifenoli, impedendone il loro rilascio.

Alcuni trattamenti, come la lavorazione industriale (trasformazione, taglio) o la cottura, possono aumentare il rilascio dei polifenoli perché indeboliscono i loro legami con le fibre alimentari. Inoltre, anche il trattamento *in vitro* con cellulasi dell'avena permette di liberare sostanze fenoliche legate alle fibre, aumentando in maniera importante la loro capacità antiossidante (26).

Attualmente, quindi, si ritiene che la maggior parte dei polifenoli contenuti negli alimenti non processati non riescano a raggiungere la circolazione sanguigna a causa dei loro legami con le fibre, che favoriscono una loro espulsione con le feci. Tuttavia, nonostante le fibre riducano la biodisponibilità di polifenoli, presentano anche un aspetto positivo dovuto ai processi di degradazione batterica che avvengono nel tratto intestinale inferiore, i quali rilasciano diversi prodotti vantaggiosi e probiotici che promuovono la crescita e lo sviluppo di batteri benefici nell'intestino (24).

3.1.2 Interazioni con L'amido

L'amido è un polisaccaride formato da più unità di glucosio ripetute, unite tramite dei legami α -glicosidici, contenuto in vari alimenti, come la pasta, il pane, le patate, il riso. L'amido è in grado di formare numerosi legami con i differenti polifenoli. I complessi amido-polifenoli svolgono un'attività protettiva nel corso dei processi digestivi. Ad esempio, la genisteina (un isoflavone), che *in vitro* si lega all'amido, è in tale forma protetta dal pH acido dello stomaco, per poi essere trasportata nell'intestino dove le amilasi pancreatiche idrolizzano il polisaccaride rilasciando il polifenolo (27). Per contro, le interazioni tra amido e polifenoli causano una diminuzione della digeribilità dell'amido, aumentando la quota di amido resistente. Si ricorda che l'amido rapidamente digeribile e quello lentamente digeribile sono idrolizzati da enzimi digestivi, mentre l'amido resistente tende a rimanere inalterato, raggiungendo così l'intestino crasso. Proprio per questa sua indigeribilità, l'amido resistente ricorda le fibre alimentari e le attività ad esse collegate sopra descritte. L'amido resistente presenta varie attività positive per la salute: mantiene stabile l'indice glicemico, aumenta il senso di sazietà e modula il metabolismo di carboidrati e lipidi (28).

3.1.3 Interazioni con i Lipidi

I lipidi, o grassi, sono molecole organiche presenti in natura caratterizzate dalla loro insolubilità in acqua. Il loro contenuto, ed in particolare il fenomeno della micellizzazione, sono stati identificati come aspetti fondamentali nel determinare la bio-disponibilità e bio-accessibilità dei polifenoli.

La micellizzazione è un processo che permette alle molecole lipidiche (che non si dissolvono in acqua) di essere trasformate in vescicole di dimensioni da 10 a 100 nm. Tramite questo processo le molecole lipidiche possono formare sospensioni colloidali stabili in acqua, permettendo all'organismo umano di assorbire i lipidi in tempi rapidi (10 minuti circa), e consentendo quindi alle cellule di assorbire direttamente queste sostanze senza alcun processo digestivo.

Nel caso di polifenoli con caratteristiche almeno parzialmente idrofobiche, tali strutture possono favorirne l'assorbimento. Ad esempio, la quercetina (flavonoide) aumenta la propria biodisponibilità nei topi quando viene somministrata assieme a lipidi ed emulsionanti. Tale fenomeno è stato osservato anche nell'uomo (29). L'interazione tra polifenoli e lipidi in forma di micelle ha anche un effetto protettivo sui polifenoli, simile ad amido e fibre. Inoltre, l'aumentata biodisponibilità dei polifenoli può di conseguenza incrementarne l'efficacia biologica (24).

Tra le sostanze lipidiche troviamo il colesterolo, costituente essenziale delle membrane cellulari, e presente in tutti i tessuti e nelle lipoproteine nel sangue. Il colesterolo presente nell'organismo è in parte prodotto a livello endogeno e in parte introdotto tramite l'alimentazione.

Un interessante studio ha dimostrato che la presenza di polifenoli negli alimenti può ridurre l'assorbimento di colesterolo. Tale effetto è dovuto all'interazione tra colesterolo e sostanze polifenoliche a livello della membrana micellare (30). Inoltre, è stato riportato che i polifenoli possono formare dei precipitati insolubili con il colesterolo, impedendone così l'assorbimento (31).

La bile è una sostanza acquosa prodotta dal fegato e accumulata nella cistifellea, formata al 95% da acqua, e la restante parte da sali biliari, lipidi, proteine, elettroliti e pigmenti. La bile è indispensabile per l'assorbimento dei lipidi perché i sali biliari in essa contenuti emulsionano i grassi in micelle, favorendo il lavoro delle lipasi (enzimi che idrolizzano i triacilgliceroli ed i fosfolipidi). È stato riportato che le catechine del tè possono formare legami ad idrogeno con i sali biliari, ostacolando la solubilità del

colesterolo nell'intestino, impedendo il suo assorbimento (32). Nonostante la letteratura scientifica dimostri che le sostanze polifenoliche possono impedire l'assorbimento del colesterolo, gli studi sull'effetto del colesterolo nell'assorbimento di polifenoli al momento sono pochi e poco rilevanti (24).

3.1.4 Interazioni con le Proteine

Le proteine sono delle macromolecole biologiche formate da più aminoacidi uniti da legami peptidici e caratterizzate da particolari strutture secondarie e terziarie. Le proteine sono in grado di formare legami ad idrogeno e interazioni idrofobiche con numerosi polifenoli, formando strutture di vario peso molecolare e creando aggregati colloidali. Una delle reazioni più famose e studiate è proprio la capacità di alcuni polifenoli (i tannini) di legare le proteine. I tannini sono delle sostanze polifenoliche responsabili del senso di astringenza in bocca, una caratteristica organolettica non apprezzata dal consumatore, che comporta un senso di asciuttezza al palato, oltre a ridurre la salivazione (33).

Le interazioni tra proteine e polifenoli sono definite dalle caratteristiche fisico-chimiche delle proteine e dei polifenoli e influenzano entrambi i composti. Alcuni studi *in vitro* hanno dimostrato che le catechine del tè verde rallentano la digestione delle proteine del latte (34). È stato anche osservato che il legame tra catechine e proteine non "annulla" l'effetto antibatterico/antiproliferativo delle catechine, indicando che le interazioni non interferiscono con le attività dei polifenoli (24).

Sono state studiate le interazioni tra differenti polifenoli e le proteine del latte. Ad esempio, il resveratrolo, la curcumina e la genisteina possono interagire con le α - e le β -caseine formando legami ad idrogeno. Inoltre, le catechine possono modificare la struttura secondaria delle caseine (35). Ciononostante, si è visto che le proteine del latte, in particolare le α -caseine, interagendo con alcuni flavonoidi del tè, possono ridurre l'attività antiossidante (35). Quindi, le interazioni con le proteine possono conferire una sorta di protezione al polifenolo. Dal punto di vista tecnologico però queste interazioni possono modificare la capacità casearia del latte e alterarne le caratteristiche organolettiche (gusto, odore, sapore) (36).

3.1.5 Interazioni con gli Ioni Metallici

I polifenoli possono fungere da chelanti nei confronti degli ioni metallici ad il fenomeno può avvenire anche nel lume intestinale, diminuendo la loro biodisponibilità. La chelazione dei metalli da parte dei polifenoli è influenzata dal pH e varia a seconda delle diverse condizioni nello stomaco e nell'intestino (24).

Alcuni studi *in vitro* hanno dimostrato che l'acido clorogenico e la rutina, derivati dalle patate, formano dei complessi con il ferro, diminuendo la biodisponibilità di entrambe le sostanze (37). Inoltre, la quercetina nel vino può formare dei legami con il ferro che ne impedisce il suo assorbimento (38). L'acido gallico, l'acido caffeico, la catechina e la rutina possono chelare ioni rame con affinità più elevata rispetto agli ioni ferro (39). Per contro, l'estratto di semi d'uva ostacola l'assorbimento dello zinco, che viene chelato dalle procianidine (40).

3.2 Effetti dei Polifenoli sugli Enzimi Digestivi

Dal punto di vista generale, gli enzimi sono dei catalizzatori delle reazioni biochimiche che avvengono negli organismi viventi. Gli enzimi digestivi sono proteine che si occupano di scomporre i macronutrienti introdotti nell'organismo tramite l'alimentazione (proteine, polisaccaridi e lipidi), per permettere poi il loro assorbimento ed assimilazione. Dato che gli enzimi sono proteine, come è stato sopra descritto i polifenoli hanno la capacità di interagire con queste macromolecole, inattivandole. Quindi, i polifenoli possono causare un rallentamento della digestione, riducendo l'assorbimento di macronutrienti. In realtà, in molti casi le interazioni polifenolo-enzima non sempre causano un'inibizione dell'attività enzimatica. Infatti, spesso i polifenoli non si legano al sito attivo dell'enzima, o il numero di molecole di polifenolo legate all'enzima potrebbe essere troppo basso per causare un rallentamento significativo (24).

3.2.1 Effetti sulle Amilasi

Le amilasi sono un gruppo di enzimi che catalizzano l'idrolisi del legame α -glicosidico e partecipano alla digestione dell'amido e dei polisaccaridi correlati producendo molecole di glucosio che possono essere poi assorbite. Esistono varie forme di amilasi, ma le più comuni sono prodotte dal pancreas e dalle ghiandole salivari. La loro attività è fortemente influenzata dal pH e dalla temperatura. Ad esempio, le amilasi salivari mostrano un'attività ottimale a pH acido, mentre le amilasi pancreatiche preferiscono un ambiente basico.

Alcuni studi sia *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato che alcuni polifenoli possono inibire le α -amilasi, ritardando la digestione e rallentando l'assorbimento di carboidrati (24). È stato riportato che l'estratto di miglio, ricco in polifenoli, inibisce le amilasi che si sviluppano durante il processo di maltazione, mediante un'inibizione non competitiva. È stato anche osservato che la cinetica di inibizione dipende dallo specifico polifenolo (41). Tale inibizione enzimatica è strettamente dipendente dalla struttura molecolare del polifenolo, ed il grado di idrossilazione, di metossilazione, l'isomeria possono produrre effetti opposti sull'attività delle amilasi. Ad esempio, la presenza di un gruppo galloile in posizione 3 della struttura delle catechine favorisce l'inibizione delle amilasi (42). Grazie a questa attività inibitrice, alcuni polifenoli sono stati proposti in sostituzione dell'acarbosio, un farmaco utilizzato dai diabetici per le sue capacità di inibire l'alfa-glucosidasi, consentendo una riduzione della velocità di assorbimento del glucosio (43). Infatti, alcuni polifenoli, inibendo le amilasi nel tratto gastrointestinale, diminuiscono l'assorbimento di glucosio, riducendo la secrezione di insulina e migliorando il metabolismo glucosio/insulina nell'organismo. Per tal motivo, i flavonoidi sono considerati degli agenti ipoglicemizzanti, diminuendo indirettamente la concentrazione di glucosio nel sangue senza dar luogo ad alcun aspetto negativo sulla salute del consumatore. È stato inoltre notato un effetto sinergico tra l'acarbosio e l'assunzione di polifenoli, sotto forma di tè verde, tè nero e altre fonti. Tale effetto è molto interessante per i pazienti diabetici e come mezzo di prevenzione (24).

3.2.2 Effetti sulle Lipasi

Le lipasi sono un gruppo di enzimi che catalizzano l'idrolisi dei trigliceridi e dei fosfolipidi liberando gli acidi grassi. Il nostro organismo possiede diversi tipi di lipasi

ed il gruppo principale è rappresentato dalle lipasi pancreatiche coinvolte nella digestione dei lipidi degli alimenti, che poi possono essere assorbiti ed essere utilizzati come fonte energetica. Quindi, l'inibizione delle lipasi produce un rallentamento/diminuzione dell'assorbimento di acidi grassi a livello intestinale, riducendo la lipemia postprandiale. Con lipemia postprandiale si intende l'aumento temporaneo di lipidi nel sangue in seguito all'assunzione di un pasto ricco in grassi. Tale accumulo nel sangue è dovuto alla limitata velocità di eliminazione dei lipidi dal sangue; quindi, un loro eccessivo assorbimento è temporaneamente accumulato, ed una elevata lipemia postprandiale può rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari. È stato dimostrato *in vitro* che alcuni polifenoli, ad esempio le catechine del tè nero, hanno la capacità di inibire le lipasi producendo una riduzione della lipemia postprandiale nei ratti (44). Il meccanismo di inibizione dei flavonoidi è di tipo competitivo. Nel caso specifico, l'effetto inibitorio sulle lipasi è particolarmente rilevante se nella molecola è presente un gruppo galloile (45). Un effetto analogo è stato osservato con l'acido caffeico della crusca di riso (46). L'orlistat è un farmaco specifico per il trattamento dell'obesità che inibisce le lipasi, rispetto al quale i polifenoli hanno un'attività inibitoria fortemente inferiore, come ad esempio alcuni polifenoli estratti dal mango (acido tannico) (24).

3.2.3 Effetti sulle Proteasi

Le proteasi sono degli enzimi in grado di idrolizzare il legame peptidico tra il gruppo carbossilico e il gruppo amminico degli aminoacidi che compongono le proteine. Nell'uomo, le proteasi sono presenti nello stomaco e nell'intestino (fornite dal pancreas), e sono essenziali per la digestione delle proteine, che vengono frammentate in aminoacidi, poi assorbiti.

Le più importanti proteasi sono: la pepsina, prodotta nello stomaco in forma inattiva (pepsinogeno) e quindi attivata in presenza di acido cloridrico. Compie la propria attività idrolitica in corrispondenza di aminoacidi aromatici (tirosina, triptofano e fenilalanina) nella struttura primaria delle proteine. La tripsina, prodotta dal pancreas in forma inattiva (tripsinogeno), agisce principalmente sui legami peptidici in corrispondenza di aminoacidi basici. La chimotripsina, prodotta dal pancreas in forma inattiva (chimotripsinogeno), agisce principalmente sui legami peptidici tra

amminoacidi aromatici. Inoltre, a livello intestinale sono presenti anche le carbossipeptidasi, prodotte dal pancreas, che agiscono su legami peptidici all'estremità carbossilica della catena di amminoacidi. Le amminopeptidasi, prodotte nel duodeno, che agiscono principalmente su legami peptidici all'estremità amminica della catena di amminoacidi, e le dipeptidasi, prodotte nell'intestino tenue, che agiscono principalmente sui legami peptidici di frammenti costituiti da due amminoacidi.

Alcuni polifenoli hanno la capacità di legarsi ed inibire la pepsina, la tripsina e la chimotripsina. Le sostanze polifenoliche si legano a tali enzimi mediante interazioni idrofobiche ed interazioni elettrostatiche, con un meccanismo di inibizione di tipo non competitivo ed alterando la struttura secondaria delle proteasi. Ad esempio, le catechine possono inibire la tripsina alterando la sua struttura tridimensionale e, quindi, la sua attività. L'acido tannico, invece, inibisce in maniera modesta la tripsina, mediante una combinazione tra inibizione competitiva e non competitiva. A causa dell'effetto inibitore che mostrano alcuni polifenoli sulle proteasi digestive, la loro assunzione causa una rallentata digestione delle proteine (24).

3.3 Effetti sui Trasportatori Intestinali di Nutrienti

Un altro aspetto su cui i polifenoli interferiscono nell'ambito dei processi di digestione e assorbimento, è rappresentato dall'interazione con i trasportatori intestinali di nutrienti. Ad esempio, alcuni polifenoli (come il tiliroside, un flavonoide glicosidico) possono inibire il trasporto di glucosio, agendo sui trasportatori GLUT2 e SGLT1 (47). Nello specifico, GLUT2 è una proteina trasportatrice transmembrana che consente il trasporto del glucosio attraverso le membrane cellulari, e che utilizza un meccanismo di trasporto facilitato. Il SGLT1 è un trasportatore di glucosio di membrana che consente il movimento del glucosio verso l'interno delle cellule in simporto con lo ione sodio.

Inoltre, è stato osservato che alcuni polifenoli possono interagire con NPC1L1, il principale trasportatore di colesterolo nell'intestino, prevenendone l'assorbimento. La quercetina, oltre ad inibire l'assorbimento di colesterolo, ha anche la capacità di diminuire in maniera significativa l'espressione dell'mRNA che codifica per NPC1L1.

Questo effetto modulatore nei confronti di NPC1L1 è stato osservato anche da alimenti quali l'aronia nera (ricca in antocianine) e dai cachi (ricchi in tannini).

In conclusione, una dieta contenente polifenoli può modulare la digestione di nutrienti mediante legami diretti, inibizione di enzimi e inibizione dei trasportatori di differenti nutrienti. Questi effetti non sono espressi contemporaneamente dalla stessa molecola di polifenolo, ma dall'azione sinergica di più polifenoli. Tali evidenze spiegano che gli eventuali benefici prodotti dal consumo di un alimento possono difficilmente essere attribuiti ad una singola sostanza di natura polifenolica in essi presente (24).

3.4 Farmacocinetica dei Composti Fenolici

Con il termine "farmacocinetica" si intende una branca della farmacologia che studia l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione (ADME) dei farmaci.

Per valutare il comportamento farmacocinetico si utilizzano i seguenti parametri: concentrazione massima (C_{max}), tempo per raggiungere la massima concentrazione (T_{max}), Area della curva di concentrazione plasmatica (AUC), tempo medio di permanenza nell'organismo (MRT), emivita ($T_{1/2}$), ovvero il tempo necessario per ridurre del 50% la concentrazione del farmaco nell'organismo. I parametri farmacocinetici sono caratteristici per ogni composto e dipendono da vari fattori, come la struttura molecolare, la dose, la matrice alimentare, la localizzazione all'interno di un alimento, i modelli di studio.

La somministrazione orale di quercetina e rutina (2 polifenoli) nell'uomo ha riportato differenze per quanto riguarda C_{max} , T_{max} , $T_{1/2}$ e AUC nel plasma. Il C_{max} e AUC della quercetina è risultato maggiore rispetto alla rutina quando sono ingerite contemporaneamente, questo risultato è stato interpretato come una modulazione sull'assorbimento della rutina da parte della quercetina. Invece, quando i due composti sono ingeriti sotto forma di estratti di erbe e vegetali, il C_{max} e AUC della rutina risultano maggiori della quercetina (48).

Alcuni farmaci antitrombotici (*clopidogrel*) spesso sono combinati con l'acido ferulico per mitigare problemi cardiovascolari. Esperimenti sui ratti hanno mostrato che il C_{max} e AUC dell'acido ferulico introdotto mediante l'assunzione di erbe medicinali è aumentato in maniera significativa se somministrato insieme a *clopidogrel* (49).

Naturalmente, tutte le interazioni precedentemente descritte tra polifenoli e i vari nutrienti (fibre, proteine, grassi...) ne influenzano la farmacocinetica. Nei cereali, il 75% dei polifenoli risulta legato a polisaccaridi indigeribili che compongono le pareti cellulari. Prendendo ad esempio l'acido ferulico nel grano, questo si lega agli xilani (polisaccaridi di xilosio) riducendone la biodisponibilità e l'assorbimento (50). Altri studi effettuati su frutta, come il mango, papaya e ananas, hanno dimostrato che le interazioni tra polifenoli e fibre non riducono la biodisponibilità o le attività antiossidanti delle sostanze fenoliche (51). Anche i legami con proteine e lipidi possono modificare l'assorbimento e la farmacocinetica dei polifenoli. Ad esempio, l'acido rosmarinico può formare dei complessi con le proteine del latte, che risultano molto stabili (24).

Riassumendo, le sostanze polifenoliche possono interagire con numerosi nutrienti e macromolecole negli alimenti, e con gli enzimi nel tratto gastro-intestinale, e tali interazioni possono fortemente influenzare la loro digestione e il loro assorbimento.

3.5 Nanotecnologie per aumentare la Bioefficacia e la Biodisponibilità dei Polifenoli

Sono state studiate diverse tecniche per preservare l'efficacia e l'attività dei polifenoli, e differenti approcci biotecnologici sono stati proposti per proteggere le sostanze polifenoliche dall'ossidazione e per permetterne un trasporto mirato verso specifici tessuti dell'organismo.

Le nanotecnologie sono una scoperta recente ed innovativa per manipolare e gestire in maniera efficace numerose sostanze nei sistemi biologici e per veicolare farmaci. Alcuni approcci nanotecnologici permettono di facilitare il passaggio di composti bioattivi attraverso le barriere biologiche, oltre ad impedire la loro degradazione o modificazione metabolica. Tra le nanotecnologie più comuni ritroviamo i nanoliposomi, le nanoemulsioni, i nanovettori lipidici e nanoparticelle di acido polilattico. Questi sistemi, essendo composti da sostanze naturali, sono ottenibili mediante semplici procedure e, essendo già state approvate a livello normativo, potrebbero essere rapidamente implementate in campo nutraceutico (24). Ad esempio, il nano-incapsulamento con liposomi o nanoparticelle polimeriche è stato proposto per permettere un rilascio controllato di polifenoli nell'organismo, migliorando la solubilità

in acqua, la stabilità chimica, la biodisponibilità, il tempo di circolazione e la specificità del bersaglio. A tale scopo sono state utilizzate le micelle caseiniche per incapsulare alcuni polifenoli del tè, ed è stato dimostrato che questo sistema permette di proteggere i polifenoli dall'ossidazione nell'intestino, oltre ad esibire un'intensa attività di inibizione nei confronti di cellule cancerogene intestinali (52).

4. ASSORBIMENTO

L'assorbimento rappresenta la fase nella quale i nutrienti elementari derivanti dalla digestione degli alimenti vengono trasferiti dal lume intestinale al sangue, dove, mediante la circolazione sanguigna e linfatica, sono messi a disposizione delle cellule dell'organismo. Il processo di assorbimento coinvolge vari tipi di trasportatori delle cellule dell'epitelio intestinale. In tale contesto, possiamo definire la biodisponibilità dei polifenoli come la frazione di tali sostanze che viene assorbita rispetto alla quantità ingerita, che dipende dalla struttura del polifenolo, dalla quantità e dalla natura dell'alimento ingerito e dalle caratteristiche specifiche dell'ospite (24). Una volta raggiunto l'intestino mediante l'alimento, sia i polifenoli idrofilici (es: acido ferulico) che lipofilici (es: procianidine) sono trasportati nel sangue mediante differenti meccanismi di trasporto: diffusione passiva, trasporto facilitato, trasporto attivo, trasporto paracellulare.

4.1 Diffusione Passiva

La diffusione passiva avviene secondo il gradiente di concentrazione della sostanza trasportata, senza utilizzare energia. Tale meccanismo si applica a polifenoli a basso peso molecolare idrofobici e neutri e coinvolge la loro emulsione da parte dei sali biliari e la formazione di micelle (come abbiamo visto nel capitolo 3 per i lipidi). I polifenoli nell'olio extravergine di oliva (tirosolo e idrossitirosolo) sono stati studiati in miscele acqua/olio, ed il loro assorbimento è risultato dipendere dalla fase nella quale sono disciolti (53). È stata analizzata la velocità di diffusione transmembrana di alcuni polifenoli (acido caffeico e acido gallico) ed è stata osservata una maggiore permeabilità nella direzione assorbente, quindi presentavano una maggiore probabilità di essere assorbiti rispetto ad essere trasportati nuovamente nel lume intestinale (54). Per quanto riguarda i polifenoli più complessi, come quelli condensati (es: proantocianidine oligomeriche) o idrolizzabili (es: ellagitannini), questi devono assolutamente essere idrolizzati a molecole più semplici per poter essere assorbiti. Al contrario, andranno tal quali nell'intestino crasso, dove vengono fermentati dal microbiota residente (55).

4.2 Trasporto Paracellulare

Il trasporto paracellulare nelle giunzioni strette coinvolge il trasferimento di sostanze attraverso strutture proteiche specializzate che uniscono le membrane di cellule adiacenti. Questo meccanismo è sfruttato per il movimento di acqua, piccoli soluti e ioni, e riguarda inoltre polifenoli neutri o idrofobici. Attraverso tali strutture è stato anche osservato il trasporto di acido rosmarinico ed acido gallico (56).

4.3 Trasporto Facilitato e Trasporto Attivo

Il trasporto facilitato coinvolge proteine intrinseche di membrana in grado di trasferire con elevata specificità molecole attraverso le membrane cellulari senza utilizzare energia, ma sfruttando il gradiente di concentrazione della sostanza che deve essere trasportata. Un esempio è il trasportatore del glucosio GLUT2.

Numerosi studi sono stati riportati sul ruolo dei trasportatori attivi e facilitati nell'assorbimento dei polifenoli. (24).

La quercetina è un polifenolo presente in molti alimenti come frutta, verdura e tè. Questo polifenolo ha una bassa biodisponibilità a causa della sua scarsa solubilità in acqua. Per migliorare la sua assorbibilità, possono essere utilizzati sistemi di trasporto facilitato come complessi con ciclodestrine o nanoformulazioni per aumentare la sua solubilità e favorire l'assorbimento.

La curcumina è un polifenolo estratto dalla radice di curcuma, ed è responsabile del colore giallo intenso della spezia. La curcumina ha una scarsa biodisponibilità dovuta alla sua bassa solubilità in acqua e alla rapida eliminazione dal corpo. Sistemi di trasporto facilitato come nanoparticelle, liposomi o complessi con agenti carrier possono migliorare la sua solubilità e stabilità, consentendo un migliore assorbimento e distribuzione nel corpo.

Il trasporto attivo attraverso le membrane cellulari coinvolge delle proteine trasportatrici energia dipendenti in grado di trasportare molecole contro gradiente di concentrazione. Generalmente, utilizzano come fonte energetica il gradiente di concentrazione transmembrana del sodio (come ad esempio il già citato trasportatore

del glucosio SGLT1). I polifenoli che utilizzano un sistema di trasporto attivo sono relativamente meno comuni rispetto a quelli che utilizzano un sistema di trasporto facilitato.

La quercetina, oltre ad utilizzare il trasporto facilitato, può anche essere trasportata attivamente attraverso il trasportatore di membrana SLC22A4, noto anche come OCTN1 (Organic Cation Transporter Novel 1). Questo trasportatore permette il trasporto attivo di composti come la quercetina nelle cellule.

Anche le catechine possono utilizzare il trasportatore di membrana SLC22A4 (OCTN1) per il trasporto attivo nelle cellule. Questo meccanismo di trasporto può favorire l'assorbimento e la biodisponibilità delle catechine nel corpo.

5. ATTIVITÀ' BIOLOGICHE DEI POLIFENOLI NELLA CELLULA

5.1 Attività' Antiossidante

Come già descritto in Introduzione, i polifenoli sono dei metaboliti secondari prodotti dalle piante come sistema di protezione da stress biotici ed abiotici. Inoltre, i polifenoli sono stati descritti per svolgere numerose funzioni benefiche nell'organismo. Naturalmente, la maggior parte degli studi riportati in letteratura sono volti all'approfondimento degli aspetti positivi dell'assunzione dei polifenoli, mentre esistono anche evidenze di possibili loro effetti tossici (1).

Tutte le fonti di informazione riportano ad ogni occasione che un elevato apporto di frutta, verdura e cereali integrali sono responsabili di un minor rischio di incorrere in malattie croniche, come il cancro, problemi cardiovascolari, infiammazioni croniche e malattie degenerative. In effetti, numerosi studi hanno dimostrato che la maggior parte di queste patologie sono causate da stress ossidativo dovuto ad una elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (57).

È stato ampiamente descritto che i polifenoli sono in grado di intercettare le specie reattive dell'ossigeno ed i radicali liberi, riducendo il tasso di ossidazione di numerose molecole, proteggendo le membrane cellulari dalla perossidazione lipidica. Inoltre, i polifenoli sono noti per la loro capacità di chelare i metalli, prevenendo i fenomeni di ossidazione catalizzati da tali specie. I polifenoli infine possono funzionare come *co-antioxidants*, e sono coinvolti nella rigenerazione di vitamine essenziali (58).

Sono stati sviluppati e messi a punto decine di metodi differenti per la determinazione dell'attività antiossidante dei polifenoli *in vitro*. Tali metodi, la maggior parte dei quali prevedono l'uso di uno spettrofotometro, possono essere raggruppati in due categorie, a seconda del meccanismo utilizzato per la determinazione delle concentrazioni di polifenoli nel campione, reagendo con una molecola che dà luogo a una variazione di colore: i metodi basati sulla misura di un trasferimento elettronico (ET), e di metodi basati sulla misura del trasferimento di un atomo di idrogeno (HAT) (2). Dal punto di vista chimico quando un antiossidante (il polifenolo) cede un elettrone o un atomo di idrogeno ad un radicale libero, diventa esso stesso un radicale, ma una specie molto più stabile rispetto al radicale libero eliminato (figura 5.1).

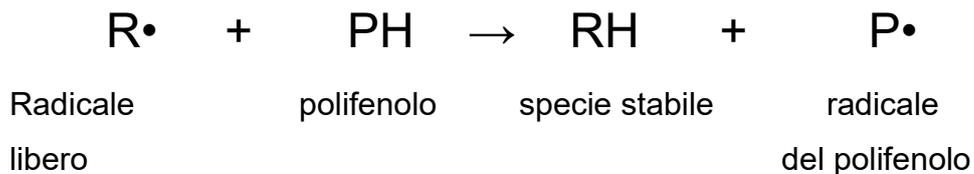


Figura 5.1: Metodo di azione HAT di un polifenolo contro un radicale libero.

Va notato che tutti i metodi proposti per la determinazione della capacità antiossidante dei polifenoli coinvolgono condizioni sperimentali molto lontane da ciò che avviene in ambiente fisiologico all'interno degli organismi. Quindi, non è possibile l'estensione dei risultati sulla capacità antiossidante ottenuti *in vitro* all'attività in ambiente fisiologico delle sostanze analizzate. Inoltre, come sopra descritto, la molecola antiossidante (il polifenolo) reagendo con una specie radicalica diviene esso stesso un radicale libero. Per quanto stabile, tale prodotto ossidato dell'antiossidante, può comunque partecipare ad una attività pro-ossidante. Nonostante questo, il reale ruolo di tale attività pro-ossidante *in vivo* è ancora oggi una domanda senza risposta, per la quale sono necessarie ulteriori ricerche (1).

5.2 Oltre l'attività Antiossidante

Studi recenti effettuati *in vivo* sui polifenoli e sui loro metaboliti hanno messo in evidenza che queste sostanze non agiscono solamente come donatori di elettroni o di atomi di idrogeno, ma possono esercitare attività modulatrici nelle cellule mediante meccanismi che coinvolgono enzimi, recettori e fattori di trascrizione del DNA. (59). Infatti, i polifenoli, oltre a partecipare alle reazioni di eliminazione dei radicali liberi sopra descritte, possono mostrare specifiche attività biologiche e la loro attività reale all'interno delle cellule potrebbe essere molto complessa. Ad esempio, alcune molecole di natura polifenolica possono fungere da inibitori enzimatici, come ad esempio l'effetto sull'inibizione della xantina ossidasi, o da induttori dell'espressione genica. Inoltre, i polifenoli possono attivare l'espressione di alcuni enzimi con funzioni antiossidanti, come la glutazione perossidasi, la catalasi e la superossido dismutasi,

che decompongono rispettivamente idroperossidi, perossido di idrogeno e anione superossido (specie molto reattive dell'ossigeno) (60). Va comunque considerato che per molti polifenoli, come ad esempio i flavonoidi, sono difficilmente assorbiti a livello intestinale. Quindi, anche in seguito all'ingerimento di quantità elevate, la loro concentrazione nel sangue risulta essere molto bassa, spesso molto inferiore a 1 $\mu\text{mol/L}$. Tali concentrazioni risultano troppo basse per svolgere un'attività antiossidante significativa.

Nonostante i numerosi studi, sia sperimentali che epidemiologici, sull'effetto dei polifenoli sulla salute umana, il loro ruolo fisiologico sui sistemi biologici risulta ancora poco chiaro e degno di ulteriori ricerche per poterli utilizzare come biomolecole per combattere numero patologie, quali il cancro e le malattie neurodegenerative (61).

6. RISCHI E SICUREZZA CORRELATI AL CONSUMO DI POLIFENOLI

Si è soliti pensare, e ciò è confermato da tutti i media, che i polifenoli siano dei composti sempre benefici e che comunque abbiano effetti positivi sulla salute umana. Come è ovvio, la realtà è più complicata. È stato dimostrato, ad esempio, che un'assunzione elevata di polifenoli non è sempre correlata a condizioni di sicurezza e benessere (1). In questo capitolo saranno descritte alcune informazioni riportate in letteratura sui possibili rischi per la salute umana dell'assunzione dei polifenoli (62).

6.1 Effetti sulla Salute del Consumatore

Le aziende che producono e mettono in commercio estratti o alimenti ricchi di polifenoli forniscono delle raccomandazioni sulla dose quotidiana consigliata che, ad esempio è di 50 mg/die per gli isoflavoni o di 100-300 mg/die per le proantocianidine. Tali dosi rappresentano allo stesso tempo le quantità medie di sostanze polifenoliche assunte utilizzando una dieta normale, varia e bilanciata. Nonostante questo, alcune aziende che vendono integratori raccomandano delle dosi ben superiori rispetto a quelle appena citate. Possiamo trovare facilmente in vendita compresse contenenti 300 mg di quercetina, 1 g di flavonoidi da agrumi, 20 mg resveratrolo, delle quali è consigliata l'assunzione fino a 1-6 compresse al giorno (Figura 6.1).



Figura 6.1: Integratori di polifenoli disponibili in commercio

Se una persona dovesse assumere queste compresse rispettando le dosi proposte dalle aziende produttrici, si ritroverebbe a consumare circa cento volte più polifenoli rispetto ad una normale dieta. Questi prodotti/integratori appaiono innocui e benefici alla vista del consumatore medio, soprattutto quando è riportato il fatto che derivano direttamente da vegetali. Si consideri che quando si estraggono questi composti bioattivi dai vegetali, il metodo di estrazione usato potrebbe influenzare la composizione degli estratti, alterando la sicurezza del prodotto. In Tabella 2 sono riportati i possibili pericoli correlati all'assunzione di polifenoli (1).

Tabella 2 : pericoli correlati ai polifenoli tossici.

<u><i>Pericoli correlati a polifenoli tossici:</i></u>
Cancerogenicità/genotossicità
Tossicità tiroidea
Attività estrogenica degli isoflavoni
Effetti antinutrizionali
Interazioni con i farmaci

Come già accennato, la maggior parte degli studi in letteratura focalizzano l'attenzione sull'effetto benefico dei polifenoli e sui loro effetti positivi contro varie malattie, mentre solamente una minoranza delle pubblicazioni specialistiche prende in considerazione la loro potenziale tossicità. A titolo di esempio, uno studio effettuato sui ratti ha evidenziato che in seguito alla somministrazione di un'alta dose di quercetina (2/4%) nella dieta ha prodotto nefropatie croniche, riducendo in maniera significativa le aspettative di vita degli animali (63). In un altro studio è stato notato che dosi di acido caffeico anche di poco superiori a quelli consigliati hanno condotto alla proliferazione di cellule cancerogene ed un incremento dei tumori allo stomaco e ai reni (64). È stato inoltre riportato che le catechine del tè verde possono favorire lo sviluppo di tumori del colon (65). Una possibile spiegazione è che quest'effetto tossico/cancerogeno sia dovuto alle alte concentrazioni utilizzate, alle quali un polifenolo può comportarsi come pro-ossidante.

È stato inoltre riportato che alcuni flavonoidi possono inibire la perossidasi tiroidea (enzima coinvolto nella produzione di ormoni tiroidei, come la tiroxina), ostacolando la sintesi degli ormoni tiroidei. In uno studio è stato somministrato ai ratti del *vitexin* (un glicoside del flavonoide apigenina), presente nella soia, nel miglio e nel fiore della passione, ed è stato osservato che ha portato alla diminuzione della concentrazione plasmatica di ormoni tiroidei, oltre ad aver aumentato le dimensioni della tiroide (66). Questo fenomeno può ricollegarsi al fenomeno del gozzo endemico in Africa dell'ovest, dove il miglio è alla base della dieta. Il gozzo è una patologia correlata normalmente ad un malfunzionamento della tiroide, dove non vengono sintetizzati gli ormoni tiroidei, causando un ingrossamento della tiroide. Lo stesso effetto sulla tiroide è stato notato anche con il consumo di genisteina, un isoflavone presente nella soia e nelle fave (67). In particolare, gli isoflavoni sono dei polifenoli noti per possedere un'attività simile agli estrogeni, ormoni sessuali femminili. Gli estrogeni presentano una serie di attività importantissime, collegate alla libido, alla fertilità e alla sfera sessuale, alla salute delle ossa e alla regolazione dell'umore (68). È stato calcolato che generalmente con una dieta adeguata la concentrazione media di isoflavoni nel sangue varia tra 0,05 e 5 $\mu\text{mol/L}$. Tuttavia, nella dieta delle popolazioni che vivono in estremo oriente si osservano concentrazioni di isoflavoni più elevate rispetto alle popolazioni che adottano una dieta in stile occidentale. Ciò è stato attribuito al largo consumo di soia e prodotti derivati. Infatti, mentre una persona che adotta una dieta occidentale introduce mediamente tra i 0,2 e i 5 mg/d di isoflavoni al giorno, una persona asiatica arriva ad ingerirne fino a 20-120 mg.

A tal proposito, numerose pubblicazioni riportano gli effetti positivi degli isoflavoni in vitro, correlati ad una diminuzione della proliferazione delle cellule cancerogene. Tali studi utilizzano dosi ampiamente superiori rispetto a quelli presenti normalmente nel plasma di un soggetto sano (circa 20 volte maggiori) (1). Concentrazioni così elevate di isoflavoni potrebbero avere effetti anti-androgenici, ed influenzare la fertilità e lo sviluppo sessuale. Sono stati inoltre documentati aspetti negativi collegati al consumo di latte di soia, ricco in isoflavoni che sembrano interferire con la maturazione sessuale del neonato, inibendo o ritardando la secrezione di alcuni ormoni. Ad ogni modo, studi su animali hanno mostrato che alte concentrazioni di isoflavoni aumentano il rischio di sterilità.

In ogni caso, non è possibile evincere quali siano gli effetti reali di tali apporti di polifenoli. Infatti, a prescindere dalla carenza di studi dedicati, tali ricerche prevedono

l'analisi di un numero elevatissimo di soggetti trattati con una dieta controllata per un lungo periodo di tempo (1).

Alcuni polifenoli possiedono anche degli effetti anti-nutrizionali. Ad esempio, possedendo in molti casi una struttura chimica in grado di legare i metalli, hanno la capacità di inibire l'assorbimento del ferro, aumentandone il rischio di carenza. Un aspetto interessante è il fatto che tutti gli alimenti ricchi di polifenoli, come il caffè, il tè, il vino, non contengono la vitamina C, che potrebbe favorire l'assorbimento del ferro (69). Un altro esempio è dato dalle proantocianidine e dagli ellagitannini (due polifenoli) che sono considerati fattori anti-nutrizionali nell'alimentazione animale perché possono inibire gli enzimi digestivi. È stato documentato che questi polifenoli possono compromettere la crescita dei ratti quando sono consumati ad alte dosi, mentre in basse quantità non presentano aspetti negativi (15). Alcuni polifenoli, inoltre, possono influenzare la biodisponibilità dei farmaci e la loro farmacocinetica. Ad esempio, la biodisponibilità delle benzodiazepine (farmaci sedativi e ansiolitici) aumenta in concomitanza dell'assunzione di succo d'uva e di pompelmo, che sono ricchi in naringenina, un polifenolo flavanone (1). Quindi, possiamo dire che l'aspetto fondamentale da considerare quando si parla di sicurezza e rischi nei confronti di sostanze introdotte con la dieta è sempre la dose a cui facciamo riferimento. Nel 1600 Paracelso disse: "Tutte le sostanze sono veleno. È la dose a differenziare il veleno dall'antidoto." Infatti, una stessa sostanza potrebbe avere aspetti sia positivi che negativi, ciò che fa la differenza è la dose a cui facciamo riferimento (1).

7. POLIFENOLI TOSSICI

In quest'ultimo capitolo 7 andremo ad approfondire le possibili attività tossiche esercitate dai polifenoli, tra cui l'attività pro-ossidante, gli effetti mutageni, genotossici e cancerogeni.

7.1 Attività Pro Ossidante

Come già accennato, in certe circostanze i polifenoli possono agire da pro-ossidanti, soprattutto in presenza di O₂, in ambienti basici e in presenza di alte concentrazioni di metalli, le quali portano alla formazione di un radicale libero che genererà una serie complessa di reazioni redox. I radicali possono reagire con l'ossigeno portando alla formazione di ROS (reactive oxygen species), molecole molto reattive che possono danneggiare il DNA e ossidare una serie di molecole importanti, tra cui i lipidi (70). In uno studio è stato visto che molecole come l'acido caffeico e l'acido clorogenico, che presentano due gruppi ossidrilici in posizione orto e l'acido ferulico che possiede un gruppo 4-idrossi-3-metossile hanno la capacità di indurre danni al DNA significativamente più elevati rispetto alle molecole che non presentano questi gruppi (*Zheng, L.F. et al. 2008*). Tale effetto è mediato da diversi metalli come Cu, Al, Zn, Ca, Cr, Mn, Co, Ni, Mg, As, e Cd. Inoltre, l'azione pro-ossidante è esercitata sia dai polifenoli puri che da estratti ricchi in polifenoli. Infatti, in uno studio è stato visto che un estratto di vinaccioli ricco in polifenoli genera radicali ossidrilici, esercitando quindi attività pro ossidante (72).

7.2 Effetti Mutageni, Genotossici e Cancerogeni

In diversi casi è stato osservato che i polifenoli possono svolgere attività cancerogena o genotossica, ed avere effetti che stimolano la mutagenesi. È stato dimostrato che alcuni flavonoidi possono danneggiare il DNA interferendo con le topoisomerasi II (73). Le topoisomerasi sono degli enzimi che regolano il metabolismo del DNA, infatti sono delle proteine che determinano il grado di superavvolgimento e d'impacchettamento, essendo in grado di introdurre una rottura del singolo o del doppio filamento di DNA

in modo temporaneo. Le topoisomerasi che interessate a questo tipo di interazione con i polifenoli sono le topoisomerasi di tipo II, le quali rompono entrambe le catene del DNA (le topoisomerasi I invece rompono solo un filamento del DNA). Altri studi invece hanno dimostrato che alcuni polifenoli, come l'epigallo-catechin-gallato (EGCG), l'epigallo-catechina (EGC) e la quercetina, agiscono come inibitori delle topoisomerasi II, e questo effetto è dovuto alla presenza del C4'-OH (quindi potenzialmente tutti gli altri polifenoli con questa struttura dovrebbero agire come inibitori delle topoisomerasi) (73). Tutti questi studi sono stati effettuati su cellule umane ed è stato visto che i flavonoidi agiscono come un veleno per le topoisomerasi. Sono stati anche descritti effetti cancerogeni dei polifenoli dovuti alla loro capacità di intercalarsi nel DNA e di indurre danni ai cromosomi (74). Ad esempio, la quercetina può causare apoptosi o mutazione del DNA mediata da H₂O₂, mentre la luteolina causa apoptosi tramite scissione del DNA mediata dalla topoisomerasi II (75). In uno studio in vitro è stato trattato il DNA del timo di vitello con la quercetina, ed ha rilevato inizialmente un effetto stabilizzante sulle strutture secondarie del DNA, mentre un trattamento di lungo periodo ha portato ad un'importante distruzione della doppia elica (76). Un altro studio ha dimostrato che l'esposizione di cellule staminali umane ad alte dosi di flavonoidi (quercetina, genisteina e kaempferolo) ha causato una rottura del doppio filamento del DNA dose-dipendente (77). Se tali danni non fossero riparati correttamente, potrebbero causare leucemie nei bambini nel corso dello sviluppo e traslocazioni cromosomiche. Lu e i suoi collaboratori hanno dimostrato che l'epigallo-catechin-gallato (EGCG) può indurre morte e danni al DNA nelle cellule del polmone e della pelle umana, oltre a indurre la rottura del doppio filamento di DNA, indurre apoptosi e aumentare il rischio di mutazioni nelle cellule normali (78).

8. CONCLUSIONI E CONSIDERAZIONI

Siamo soliti parlare dei polifenoli facendo riferimento esclusivamente agli aspetti positivi ad essi correlati, i quali, data la complessità delle reazioni che avvengono all'interno del nostro organismo, non sono sempre verificabili. Infatti, spesso i polifenoli non sono assorbiti o sono assorbiti in quantitativi troppo bassi per poter esercitare l'attività antiossidante. Inoltre, è importante notare che molte delle attività positive ad essi correlate sono state studiate *in vitro*, ovvero un sistema molto più semplice che *in vivo*.

L'organismo umano è un sistema molto complesso ed il fatto che un alimento sia ricco in polifenoli non indica necessariamente che saranno successivamente assorbiti, dato che esso subisce una serie di trasformazioni tecnologiche, a partire dalla cottura, la quale normalmente diminuisce in maniera importante la loro disponibilità. I polifenoli, poi, per raggiungere il circolo sanguigno subiranno varie interazioni nel tratto gastrointestinale con enzimi, nutrienti, trasportatori, che coinvolgono il processo di digestione, e queste interazioni possono modificarli o diminuire la loro digeribilità. Le sostanze fenoliche, inoltre, sono correlate a possibili rischi per il consumatore; infatti, diversi studi fatti sugli animali dimostrano la correlazione tra l'esposizione prolungata ad alte dosi di polifenoli e l'insorgere di alcune patologie. Tra le possibili attività negative correlate ai polifenoli rientrano l'attività pro-ossidante che genera radicali liberi molto reattivi, l'attività mutagena, genotossica e citotossica.

In conclusione, va ricordato che il consumo di polifenoli deve essere moderato e bilanciato con altri nutrienti essenziali per l'organismo. Infatti, alcuni polifenoli possono avere effetti tossici o indesiderati se assunti in dosi elevate o in combinazione con farmaci o altre sostanze. Comunque, sono necessari ulteriori studi per chiarire i meccanismi molecolari alla base degli effetti dei polifenoli e per valutare la loro efficacia e sicurezza in condizioni cliniche reali. Quindi, con questo elaborato voglio provare a semplificare un argomento estremamente complesso, per il quale ancora oggi ci sono molte incertezze che rendono i polifenoli un argomento molto discusso e studiato.

BIBLIOGRAFIA:

1. Louise I M. , Ron W. , Catherine B. , and Augustin S. , *Risks and safety of polyphenol consumption*, *Am J Clin Nutr* 2005 ,81, 326S–9S
2. Rong T. , *Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols*, *Nutrients*, 2010, 2, 1231-1246
3. J-Pérez-J. , Neveu V. , Vos F. , Scalbert A. , *Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database*, *PubMed*, 2010, 64, 112-120
4. Fen-Jin He, Jin-Qiang C. , *Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: Differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms*, *Food Science and Human Wellness*, 2013, 2, 146-161
5. Townsend N. ,Kazakiewicz D. , F Lucy Wright, Timmis A. , Huculeci R. , Torbica A. , P Gale C. ,Achenbach S. ,Weidinger F. ,Vardas P. , *Epidemiology of cardiovascular disease in Europe*, *Nature Reviews*, 2022, 19, 133-143
6. Kyung-Hee K. , Rong T. , Raymond Y. , Steve W. Cui, *Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions*, *Food Chem*, 2006, 95, 466-473
7. C. B Davis, C. E Markey, M. A Busch, K. W Busch, *Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data*, *J. Agric. Food Chem*, 2007, 15, 5925-5933
8. N. Verma and S. Shukla, *Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites*, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2015, 2, 105-113
9. Stalikas C. , *Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids*, *J. Sep. Sci*, 2007, 30, 3268-3295
10. A. Scalbert and G. Williamson, *Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols*, *J Nutr*, 2000, 130, 2073-2085
11. S. Burda, W. Oleszek, and Chang Y. Lee, *Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage*, *J. Agric. Food Chem*. 1990, 38, 4, 945–948
12. M. Naczek, F. Shahidi, *Extraction and analysis of phenolics in food*, *J Chromatogr A*, 2004, 29;1054(1-2):95-111

13. J. Vinson, The University of Scranton, Y. Hao, X. Su, L. Zubik, *Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Vegetables*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, 46, 9, 3630–3634
14. J. Paiva Lopes Aguiar, F. das Chagas do Amaral Souza, *Antioxidants, Chemical Composition and Minerals in Freeze-Dried Camu-Camu (Myrciaria dubia (H.B.K.) Mc Vaugh) Pulp*, *Food and Nutrition Sciences*, 2015, 6, 869-874
15. Santos-Buelga C, Scalbert A, *Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health*, *J Sci Food Agric*, 2000, 1094 –1117
16. M. van Boekel 1, V. Fogliano, N. Pellegrini, C. Stanton, G. Scholz, S. Lalljie, V. Somoza, D. Knorr, P. Rao Jasti, G. Eisenbrand, *A review on the beneficial aspects of food processing*, *Nutr Food Res*, 2003, 54(9):1215-47
17. M. Palermo , N. Pellegrini, V. Fogliano, *The effect of cooking on the phytochemical content of vegetables*, *J Sci Food Agric*, 2013, 94(6):1057-70
18. L. Manzocco, S. Calligaris, D. Mastrocola, M. Cristina Nicoli, C. Raffaele Lericci, *Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods*, *Trends Food Sci Technol*, 2000, 11, 340-346
19. A.L.K. Faller, E. Fialho, *The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking*, *Food Res Int*, 2009, 42, 210-215
20. T. Yamaguchi, M. Katsuda, Y. Oda, J. Terao, K. Kanazawa, S. Oshima, T. Inakuma, Y. Ishiguro, H.i Takamura, T. Matoba, *Influence of polyphenol and ascorbate oxidases during cooking process on the radical scavenging activity of vegetables*, *Food Sci Technol*, 2003, 9, 79-83
21. A.S. Rodrigues, M.R. Pérez-Gregorio, M.S. García-Falcón, J. Simal-Gándara, *Effect of curing and cooking on flavonols and anthocyanins in traditional varieties of onion bulbs*, *Food Res*, 2009, 42, 1331-1336
22. X. Wu, G. R Beecher, J. M Holden, D. B Haytowitz, S. E Gebhardt, R. L Prior, *Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption*, *J Agric Food*, 2006, 31 ,4069-4075
23. Wu W, *The contents of lignans in commercial sesame oils of Taiwan and their changes during heating*, *FoodChem*, 2007, 104, 341–344

24. J. Abraham Domínguez-Avila, A. Wall-Medrano, G. R. Velderrain-Rodríguez, C.-Y. O. Chen, N. Julieta Salazar-López, M. Robles-Sánchez, G. A. González-Aguilar, *Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds*, *Food Funct*, 2017, 8, 15-38
25. S. Arranz, J. Manuel Silván, F. Saura-Calixto, *Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: A study on the Spanish diet*, *Mol. Nutr. Food Res*, 2010, 54, 1646-1658
26. D. Chen, J. Shi, X. Hu, *Enhancement of polyphenol content and antioxidant capacity of oat (Avena nuda L.) bran by cellulase treatment*, *Appl. Biol. Chem*, 2016, 59, 397-403
27. R. Cohen, B. Schwartz, I. Peri and E. Shimoni, *Improving Bioavailability and Stability of Genistein by Complexation with High-Amylose Corn Starch*, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 7932–7938
28. L. Zhang, H. T. Li, L. Shen, Q. C. Fang, L. L. Qian and W. P. Jia, *Effect of Dietary Resistant Starch on Prevention and Treatment of Obesity-related Diseases and Its Possible Mechanisms*, *Biomed. Environ. Sci.*, 2015, 28, 291–297.
29. K. Azuma, K. Ippoushi, H. Ito, H. Higashio and J. Terao, *Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats*, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 1706–1712
30. A. de Athayde Moncorvo Collado, F. G. Dupuy, R. D. Morero and C. Minahk, *Cholesterol induces surface localization of polyphenols in model membranes thus enhancing vesicle stability against lysozyme, but reduces protection of distant double bonds from reactive-oxygen species*, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 2016, 1858, 1479–1487
31. Y. Ogino, K. Osada, S. Nakamura, Y. Ohta, T. Kanda and M. Sugano, *Absorption of dietary cholesterol oxidation products and their downstream metabolic effects are reduced by dietary apple polyphenols*, *Lipids*, 2007, 42, 151–161
32. I. Ikeda, T. Yamahira, M. Kato and A. Ishikawa, *Black-Tea Polyphenols Decrease Micellar Solubility of Cholesterol in Vitro and Intestinal Absorption of Cholesterol in Rats*, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 8591–8595

33. V. de Freitas and N. Mateus, *Protein/Polyphenol Interactions: Past and Present Contributions. Mechanisms of Astringency Perception*, *Curr. Org. Chem.*, 2012, 16, 724–746
34. A. Guri, S. Haratifar and M. Corredig, *Bioefficacy of Tea Catechins Associated with Milk Caseins Tested Using Different In Vitro Digestion Models*, *Food Dig.*, 2014, 5, 8–18
35. P. Bourassa, R. Cote, S. Hutchandani, G. Samson and H. A. Tajmir-Riahi, *The effect of milk alpha-casein on the antioxidant activity of tea polyphenols*, *J. Photochem. Photobiol.*, 2013, 128, 43–49
36. D. F. da Silva, P. T. Matumoto-Pintro, L. Bazinet, C. Couillard and M. Britten, *Effect of commercial grape extracts on the cheese-making properties of milk*, *J. Dairy Sci.*, 2015, 98, 1552–1562
37. L. Miranda, H. Deußer and D. Evers, *The impact of in vitro digestion on bioaccessibility of polyphenols from potatoes and sweet potatoes and their influence on iron absorption by human intestinal cells*, *Food Funct.*, 2013, 4, 1595–1601
38. L. B. Escudero, C. M. Fusari, J. C. Altamirano, A. B. Camargo and R. G. Wuilloud, *Stability of IronQuercetin Complexes in Synthetic Wine under In Vitro Digestion Conditions*, *J. Food Sci.*, 2014, 79, C1933–C1938
39. K. Oueslati, D. de La Pomélie, V. Santé-Lhoutellier and P. Gatellier, *Impact of the Fenton process in meat digestion as assessed using an in vitro gastrointestinal model*, *Food Chem.*, 2016, 209, 43–49
40. E. Y. Kim, T. K. Pai and O. Han, *Effect of Bioactive Dietary Polyphenols on Zinc Transport across the Intestinal Caco-2 Cell Monolayers*, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 3606– 3612
41. S. Chethan, Y. N. Sreerama and N. G. Malleshi, *Mode of inhibition of finger millet malt amylases by the millet phenolics*, *Food Chem.*, 2008, 111, 187–191
42. M. Miao, H. Jiang, B. Jiang, Y. G. Li, S. W. Cui and T. Zhang, *Structure elucidation of catechins for modulation of starch digestion*, *Lwt–Food Sci. Technol.*, 2014, 57, 188–193
43. G. Williamson, *Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion*, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2013, 57, 48–57

44. M. Kobayashi, M. Ichitani, Y. Suzuki, T. Unno, T. Sugawara, T. Yamahira, M. Kato, T. Takihara, Y. Sagesaka, T. Kakuda and I. Ikeda, *Black-Tea Polyphenols Suppress Postprandial Hypertriacylglycerolemia by Suppressing Lymphatic Transport of Dietary Fat in Rats*, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 7131–7136
45. T. Buchholz and M. F. Melzig, *Polyphenolic Compounds as Pancreatic Lipase Inhibitors*, *Planta Med.*, 2015, 81, 771–783
46. M. P. Raghavendra, P. R. Kumar and V. Prakash, *Mechanism of inhibition of rice bran lipase by polyphenols - A case study with chlorogenic acid and caffeic acid*, *J. Food Sci.*, 2007, 72, E412–E419
47. T. Goto, M. Horita, H. Nagai, A. Nagatomo, N. Nishida, Y. Matsuura and S. Nagaoka, *Tiliroside, a glycosidic flavonoid, inhibits carbohydrate digestion and glucose absorption in the gastrointestinal tract*, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2012, 56, 435–445
48. AA. K. Kammalla, M. K. Ramasamy, J. Chintala, G. P. Dubey, A. Agrawal and I. Kaliappan, *Comparative pharmacokinetic interactions of Quercetin and Rutin in rats after oral administration of European patented formulation containing Hippophae rhamnoides and Coadministration of Quercetin and Rutin*, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2015, 40, 277–284
49. Y. Li, C. Liu, Y. Zhang, S. Mi and N. Wang, *Pharmacokinetics of ferulic acid and potential interactions with Honghua and clopidogrel in rats*, *J. Ethnopharmacol.*, 2011, 137, 562–567
50. N. Mateo Anson, R. van den Berg, R. Havenaar, A. Bast and G. R. M. M. Haenen, *Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility*, *J. Cereal Sci.*, 2009, 49, 296–300
51. G. Velderrain-Rodríguez, A. Quirós-Sauceda, G. MercadoMercado, J. F. Ayala-Zavala, H. Astiazarán-García, R. M. Robles-Sánchez, A. Wall-Medrano, S. Sayago-Ayerdi and G. A. González-Aguilar, *Effect of dietary fiber on the bioaccessibility of phenolic compounds of mango, papaya and pineapple fruits by an in vitro digestion model*, *Food Sci. Technol.*, 2016, 1–7
52. S. Haratifar, K. A. Meckling and M. Corredig, *Bioefficacy of tea catechins encapsulated in casein micelles tested on a normal mouse cell line (4D/WT) and its cancerous counterpart (D/v-src) before and after in vitro digestion*, *Food Funct.*, 2014, 5, 1160–1166

53. T. Tamura, N. Inoue, M. Ozawa, A. Shimizu-Ibuka, S. Arai, N. Abe, H. Koshino and K. Mura, Peanut-Skin Polyphenols, Procyanidin A1 and Epicatechin-(4 beta -> 6)- epicatechin-(2 beta -> O -> 7, 4 beta -> 8)-catechin, Exert Cholesterol Micelle-Degrading Activity in Vitro, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 2013, 77, 1306–1309
54. H. Rastogi and S. Jana, Evaluation of physicochemical properties and intestinal permeability of six dietary polyphenols in human intestinal colon adenocarcinoma Caco-2 cells, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2016, 41, 33–43
55. R. Campos-Vega, K. Vazquez-Sanchez, D. Lopez-Barrera, G. Loarca-Pina, S. Mendoza-Diaz and B. D. Oomah, Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L): Bioaccessibility and intestinal permeability, *Food Res. Int.*, 2015, 77, 156–161
56. Y. Konishi, Y. Hitomi and E. Yoshioka, Intestinal absorption of p-coumaric and gallic acids in rats after oral administration, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 2527–2532
57. Wang, H.; Cao, G.; Prior, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 701-705
58. Perron N.R., Brumaghim J.L., A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding, *Cell Biochem. Biophys.* 2009, 53, 75-100
59. Williams R.J., Spencer J.P., Rice-Evans C., Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? ,*Free Radic. Biol. Med*, 2004, 36, 838-849
60. Du Y., Guo H., Lou H., Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1695-1701
61. Halliwell B., Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? ,*Arch. Biochem. Biophys.* 2008, 476, 107-112
62. Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group, The effect of vitamin E and -carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers, *N Engl J Med*, 1994, 1029 –1035
63. Dunnick JK, Hailey JR. Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods, *Fundam Appl Toxicol* 1992, 423–431

64. Hagiwara A, Hirose M, Takahashi S, Ogawa K, Shirai T, Ito N., *Forestomach and kidney carcinogenicity of caffeic acid in F344 rats and C57BL/6N C3H/HeN F1 mice*, *Cancer Res*, 1991, 5655– 5660
65. Hirose M, Hoshiya T, Mizoguchi Y, Nakamura A, Akagi K, Shirai T., *Green tea catechins enhance tumor development in the colon without effects in the lung or thyroid after pretreatment with 1,2- dimethylhydrazine or 2,2'-dihydroxy-dim-n-propylnitrosamine in male F344 rats*, *Cancer Lett*, 2001, 23–29
66. Doerge DR, Chang HC. *Inactivation of thyroid peroxidase by soy isoflavones, in vitro and in vivo*, *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2002, 269–279
67. Chang HC, Doerge DR. *Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase in vivo without an apparent hypothyroid effect*, *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 244–252
68. Setchell KDR, Cassidy A, *Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health*, *J Nutr*, 1999, 758S–767S
69. Zijp IM, Korver O, Tijburg LBM, *Effect of tea and other dietary factors on iron absorption*, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2000, 371–98
70. Eghbaliferiz, S.; Iranshahi, M, *Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: Updated review of mechanisms and catalyzing metals*, *Phytother. Res.*, 2016, 30, 1379–1391
71. Zheng, L.F.; Dai, F.; Zhou, B.; Yang, L.; Liu, Z.L., *Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: Mechanism and structure-activity relationship*, *Food Chem. Toxicol.*, 2008, 46, 149–156.
72. Tsukada, M.; Nakashima, T.; Kamachi, T.; Niwano Y., *Prooxidative potential of photo-irradiated aqueous extracts of grape pomace, a recyclable resource from winemaking process*, *PLoS ONE* 2016, 11, e0158197
73. Bandele, O.J., Osheroff, N., *Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase II alpha and II beta*, *Biochemistry*, 2007, 46, 6097–6108
74. Duthie S.J., Johnson W., Dobson V.L., *The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells*, *Mutat. Res.*, 1997, 390, 141–151

75. Yamashita N., Kawanishi S., *Distinct mechanisms of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin*, *Free Rad. Res.*, 2000, 33, 623–633
76. Alvi N.K., Rizvi R.Y., Hadi S.M., *Interaction of quercetin with DNA*, *Biosci Rep.*, 1986, 6, 861–868
77. van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S.B., Janssen J., Maas, L.M., Godschalk R.W., Nijhuis J.G., van Schooten F.J., *Dietary flavonoids induce MLL translocations in primary human CD34+ cells*, *Carcinogenesis*, 2007, 28, 1703–1709
78. Lu L.Y., Ou N., Lu Q.B., *Antioxidant induces DNA damage, cell death and mutagenicity in human lung and skin normal cells*, *Sci. Rep.*, 2013, 3, 3169