

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE)

Corso di laurea in Scienze e tecnologie alimentari

Studio di metodi di estrazione di glucosinolati da cavolo rosso e nero

Relatore  
Prof. Simone Vincenzi

Laureando  
Riccardo Spinello  
Matricola n. 1238891

ANNO ACCADEMICO 2021 -2022





## RIASSUNTO:

La crescente presa di coscienza dei consumatori nei confronti di una sana e bilanciata nutrizione ha portato l'interesse dei produttori e della comunità scientifica verso i "superfood" e gli "alimenti funzionali", ovvero, cibi caratterizzati dall'essere naturalmente ricchi di molecole utili e benefiche per l'organismo (i cosiddetti composti nutraceutici). In questa tesi è stata presa in esame la glucorafanina (GRA), molecola facente parte di una classe di nutraceutici detti glucosinolati (GLS), ed è stato sviluppato e ottimizzato un metodo di estrazione "green" alternativo al metodo ISO 9167-1, spesso usato in letteratura.

Come materiale di studio per l'estrazione della GRA sono stati analizzati microgreens di cavolo rosso (*Brassica oleracea ssp. capitata var. rubra*) e cavolo nero di Toscana (*Brassica oleracea ssp. acephala var. sabellica*) cresciuti in condizioni aeroponiche, forniti dall'azienda Zero s.r.l. .

Nel corso di sperimentazioni precedenti le condizioni di crescita dei microgreens (MGRs) in esame sono state ottimizzate in modo da ottenere la maggior resa possibile di GRA. I glucosinolati rappresentano per le piante una forma di precursore, che, dopo aver reagito con l'enzima mirosinasi, rilasciato dalla rottura dei tessuti, liberano la forma attiva: gli isotiocianati (ITC).

Per quanto gli isotiocianati siano gli unici composti fisiologicamente attivi, queste molecole sono anche molto instabili per cui nel processo di estrazione è preferibile mantenere i glucosinolati nella loro forma originale (e prevedere il rilascio della forma attiva al momento dell'ingestione). Il primo passo fondamentale è quindi l'inattivazione dell'enzima mirosinasi.

Contrariamente al metodo ISO 9167-1, il quale usa metanolo per denaturare l'enzima, il metodo proposto prevede un'estrazione completamente in mezzo acquoso. A tal fine è stata investigata l'inattivazione tramite microonde eseguita dall'estrazione, come già detto, in ambiente totalmente acquoso. Sono state anche studiate le cinetiche di estrazione, confrontando metanolo e acqua. I risultati dimostrano che un trattamento in microonde a massima potenza fino alla perdita dell'80% del peso fresco delle piante costituisce un ottimo compromesso tra disattivazione dell'enzima e degradazione termica. L'estrazione in ambiente acquoso è stata completamente soddisfacente: è stato possibile ottenere concentrazioni finali di GRA addirittura maggiori rispetto all'estrazione in metanolo, raggiungendo la massima estrazione in una sola ora di agitazione.

## ABSTRACT

The growing awareness of consumers towards a healthy and balanced nutrition has led the interest of producers and the scientific community towards "superfoods" and "functional foods", that is, foods characterized by being naturally rich in useful and beneficial molecules for the body (the so-called nutraceutical compounds). In this thesis, glucoraphanin (GRA), a molecule belonging to a class of nutraceuticals called glucosinolates, was examined and a "green" extraction method alternative to the ISO 9167-1 method, often used in the literature, was developed and optimized.

As study material for the extraction of GRA, microgreens of red cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata* var. *rubra*) and Tuscan black cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *acephala* var. *sabellica*) grown in aeroponic conditions, provided by the company Zero s.r.l. were analyzed.

In previous experiments, the growth conditions of the microgreens under examination had been optimized in order to obtain the highest possible yield of GRA. Glucosinolates represent for plants a form of precursor, which, in the presence of the enzyme myrosinase, released by the tissue breakdown, release the physiologically active form: the isothiocyanates (ITC).

Although isothiocyanates are the only physiologically active compounds, these molecules are also very unstable so in the extraction process it is preferable to keep the glucosinolates in their original form (and foresee the release of the active form at the time of ingestion). The first fundamental step is therefore the inactivation of the enzyme myrosinase.

In contrast to the ISO 9167-1 method, which uses methanol to denature the enzyme, the proposed method involves the extraction completely in an aqueous medium. To this end, the inactivation by microwave performed by the extraction, as already mentioned, in a totally aqueous environment was investigated. Extraction kinetics were also studied, comparing methanol and water. The results show that a microwave treatment at maximum power up to the loss of 80% of the fresh weight of the plants constitutes an excellent compromise between enzyme deactivation and thermal degradation. The extraction in an aqueous environment was completely satisfactory: it was possible to obtain final concentrations of GRA even higher than the extraction in methanol, reaching the maximum extraction in just one hour of stirring.

## **INDICE**

<b>RIASSUNTO.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>4</b>
<b>CAPITOLO 1 INTRODUZIONE .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 I MICROGREENS .....</b>	<b>9</b>
- 1.1.1 La coltivazione dei microgreens	
- 1.1.2 La coltivazione acquaponica e idroponica	
- 1.1.3 La coltivazione areoponica	
<b>1.2 I GLUCOSINOLATI .....</b>	<b>18</b>
- 1.2.1 Sistema glucosinolato- mirosinasi	
- 1.2.2 Glucosinolati e microbiota	
- 1.2.3 Glucosinolati e nutraceutica	
- 1.2.4 La biofumigazione	
<b>1.3 ESTRAZIONE ED ANALISI DEI GLUCOSINOLATI .....</b>	<b>28</b>
- 1.3.1 Metodi di estrazione	
- 1.3.2 Metodi di quantificazione	
<b>CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI .....</b>	<b>35</b>
- 2.1 Materiali	
- 2.2 Estrazione a diverse temperature	
- 2.3 Stabilizzazione in microonde a parità di energia fornita	
- 2.4 Stabilizzazione in microonde a parità di perdita di peso	
- 2.5 Cinetica di estrazione in acqua	

- 2.6 Analisi HPLC

**CAPITOLO 3: RISULTATI ..... 39**

- 3.1 Estrazione diretta in metanolo o acqua a diverse temperature
- 3.2 Stabilizzazione in microonde a parità di energia fornita
- 3.3 Stabilizzazione in microonde a parità di perdita di peso
- 3.4 Cinetica di estrazione in acqua e metanolo

**CAPITOLO 4: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI ..... 46**

**BIBLIOGRAFIA ..... 49**





# **CAPITOLO 1**

## **INTRODUZIONE**

### **1.1 I MICROGREENS**

Il termine “microgreens “(MCGs) (figura 1) non ha di per sé una definizione legale ma è un termine di marketing usato per descrivere una nuova categoria di alimenti, che consiste in giovani plantule di diverse specie vegetali. Al contrario degli sprouts che rappresentano solo i semi appena germogliati, l’emergenza dei cotiledoni è la caratteristica peculiare dei microgreens e le piante sono considerate tali fino all’emergenza del primo set di foglie vere. Dal punto di vista morfologico possono presentare una lunghezza variabile tra i 2.5 e i 7.6 cm e sono coltivati per 7-21 giorni dopo la germinazione a seconda della specie, delle caratteristiche del suolo e dell’ambiente (Xiao et al., 2012). Si distinguono dai germogli poiché questi ultimi sono cresciuti in condizioni di buio e alta umidità, entrambe condizioni favorevoli alla proliferazione batterica, che ha causato in passato epidemie alimentari (Xiao et al., 2015). I microgreens al contrario sono cresciuti in condizioni di luce ed irrigazione altamente controllate.



Figura 1: microgreens di senape rossa (*Brassica juncea* L. Czern.)

Nell'ambito alimentare rappresentano una risorsa interessante poiché presentano una grande variabilità di colori, textures e sapori. Queste caratteristiche combinate all'alto contenuto di nutrienti e minerali, alle loro ridotte dimensioni e all'elevata resa di certe specie, rende questi "superfood" un'ottima alternativa come fonte di nutrimento nei prossimi anni, non solo per gli abitanti della terra ma anche per l'equipaggio di missioni spaziali (Marios C. Kyriacou et al., 2017). L'idea di utilizzare queste giovani piante in cucina è nata agli inizi degli anni '80 a San Francisco, (United States Department of Agriculture, 2014), tuttavia, le prime coltivazioni sono iniziate nella parte meridionale della California solo dalla seconda metà degli anni '90. Al giorno d'oggi rappresentano una nuova tendenza culinaria; alcune catene di supermercati americani come Whole Foods e Mom's hanno iniziato a venderli sia come prodotti pronti che come piantine poste in contenitori con terreno di coltura (Brentlinger, 2005). A differenza dei classici ortaggi "baby leaf", la cui porzione edibile è costituita solo dalle foglie e viene raccolta necessariamente tramite un taglio netto della foglia dal terreno, i microgreens hanno il vantaggio

di poter essere venduti anche senza essere raccolti, mantenendo in vita le piantine sul substrato di crescita, in modo che lo chef o il consumatore finale possano effettivamente tagliare il prodotto nella propria cucina, pochi minuti prima del loro utilizzo. L'opportunità di vendere il prodotto ancora in crescita rappresenta una grande innovazione in quanto può garantire una maggiore shelf-life del prodotto sul mercato e può assicurare una maggiore qualità sia in termini di freschezza che di valore nutritivo (Di Gioia & Santamaria, 2015).

Un ulteriore aspetto della loro popolarità è relativo all'elevato contenuto di composti bioattivi e fitonutrienti contenuti in queste piante come molecole antiossidanti, fenoli, vitamine e minerali (Mir, S. et al., 2016). Diversi autori hanno riferito che i microgreens sono caratterizzati da una maggiore concentrazione di nutrienti rispetto alle verdure raccolte dopo una fase di crescita standard (Ebert, et al., 2014; Pinto, et al., 2014; Xiao et al., 2012). Ad esempio, Xiao e colleghi (Xiao et al., 2012) hanno esaminato la concentrazione di vitamine (C, E e K) e carotenoidi ( $\beta$ -carotene, luteina e zeaxantina) in 25 varietà di microgreens ed è stato possibile dimostrare che i microgreens hanno un contenuto di composti antiossidanti anche 10 volte superiore rispetto alle corrispondenti piante mature. Pertanto, i microgreens potrebbero rappresentare una ricca fonte alimentare anche per categorie di consumatori particolarmente esigenti, come vegetariani e vegani, che possono diversificare e arricchire la propria dieta sfruttando la grande varietà di microgreens disponibili (Di Gioia & Santamaria, 2015).

Le specie di ortaggi più comunemente utilizzate per produrre i microgreens appartengono a diverse famiglie botaniche, tra le quali le *Brassicaceae* (es. cavolfiore, broccoli, cavoli, cavoli cinesi, cavoli, verza, crescione, mizuna, ravanello, rucola, senape e tatsoi), *Asteraceae* (es. lattuga, indivia, scarola, cicoria, radicchio), *Apiaceae* (aneto, carota, finocchio, sedano), *Amarillydaceae* (aglio, cipolla, porro), *Amaranthaceae* (amaranto, orza rossa,

bietola, barbabietola, spinaci) e *Cucurbitaceae* (melone, cetriolo, zucca). Altre specie erbacee comunemente utilizzate sono i cereali (avena, grano tenero, grano duro, mais, orzo, riso), la quinoa, che spesso è assimilata ai cereali ma appartiene alla famiglia delle *Amaranthaceae*, le leguminose (ceci, erba medica, fagiolo, fagiolo, fieno greco, fava, lenticchia, pisello, trifoglio), piante oleaginose (girasole) e persino specie di piante da fibra come il lino oltre a molte specie aromatiche come basilico, erba cipollina, coriandolo e cumino. Per tutte queste specie è possibile utilizzare sia varietà commerciali che varietà e popolazioni locali, possibilmente caratterizzate da piantine con forma, colore, consistenza e sapore particolari e da un elevato contenuto di fitonutrienti (Xiao et al., 2012; 2015 ; Ebert et al., 2014; Kou et al., 2014; Di Gioia, Leoni, & Santamaria, 2015a; Koppert Cress, 2016). Non mancano infine le specie selvatiche commestibili, tradizionalmente utilizzate nella cucina popolare, che possono essere valorizzate attraverso la produzione di microgreens e che forniscono un'ampia gamma di colori, forme, gusti e, soprattutto, nutrienti essenziali benefici per la salute del consumatore (Di Gioia et al., 2015).

Microgreens appartenenti alla famiglia del genere *Brassicaceae* (kale, cavolo nero, cavolo rosso, cavolo broccolo ramoso, ecc.) sono caratterizzati da un sapore pungente che è derivato dal fatto che questa varietà di piante contengono una notevole quantità di Glucosinolati, molecole derivate dal metabolismo secondario delle piante appartenenti all'ordine delle *Capparales* che hanno dimostrato avere proprietà antiossidanti , antimicrobiche e antitumorali (Xiao et al., 2016).

### **1.1.1 Coltivazione dei microgreens**

I microgreens possono essere prodotti all'aria aperta o in serre con differenti mezzi di crescita che posso essere con o senza suolo. Tuttavia, il sistema di coltivazione fuori suolo, cui fanno parte le tecniche di coltura verticale, è quello più utilizzato. Questo modo innovativo di coltivare le piante nasce dalla necessità di risparmiare la quantità di terra e acqua utilizzate dall'odierna agricoltura convenzionale ed allo stesso tempo aumentare le rese per sfamare i circa 10 miliardi di persone che si presume popoleranno la terra nel 2050. Attualmente circa 800 milioni di ettari (ovvero il 38% della superficie terrestre) sono destinati all'agricoltura. Per sopperire alle necessità alimentari future la superficie coltivata dovrebbe aumentare ancora comportando deforestazioni che a sua volta farebbero aumentare il livello di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera con il conseguente aumento della temperatura globale, oltre che alla perdita di biodiversità e la distruzione dell'ecosistema, dovuto anche in parte all'utilizzo di grandi quantità di fertilizzanti e sostanze chimiche che inquinano suolo e acqua. L'agricoltura verticale consente di produrre alimenti in supporti verticali in modo rapido e pianificato, impilando numerose unità produttive l'una sull'altra limitando così l'utilizzo del suolo e controllando le condizioni ambientali e nutritive utilizzando metodi e tecnologie all'avanguardia. Nei diversi tipi di agricoltura verticale (principalmente idroponica, aeroponica e acquaponica) i nutrienti sono efficientemente utilizzati ed è possibile un costante controllo dei parametri fisici e chimici come pH della soluzione nutritiva, qualità e quantità di irrigazione ed illuminazione. La luce naturale del sole inoltre è rimpiazzata da LED ad alta efficienza energetica ([Specht et al., 2004](#)).

Uno degli aspetti più critici coinvolti nella produzione di microgreens è la selezione del substrato di crescita; in particolare questo deve possedere una certa porosità ed è importante che non sia microbiologicamente contaminato.

I materiali di origine organica possono contenere microrganismi patogeni per l'essere umano, come *Salmonella* ed *Escherichia coli* (Natvig et al., 2002). Pertanto, per prevenire problematiche igienico-sanitarie, è importante scegliere substrati la cui qualità microbiologica sia garantita o materiali che abbiano subito trattamenti di sterilizzazione (fisici o chimici). I substrati colturali più comunemente utilizzati per la produzione di microgreens, sono torba, perlite e vermiculite, che possono essere utilizzati singolarmente o in miscela (Di Gioia et al., 2015).

Un altro aspetto critico coinvolto nella produzione di microgreens è la scelta di essenze che siano commestibili allo stadio prescelto. Ortaggi che vengono consumati quotidianamente come le *Solanacee* (pomodoro, peperone e melanzana), contengono grandi quantità di antinutrienti nelle parti verdi e quindi non possono essere consumate tal quali (Di Gioia et al., 2015).

### **1.1.2 Coltivazione acquaponica ed idroponica**

Due dei metodi di coltivazione che utilizzano ingegnosi sistemi per produrre in maniera efficiente e sostenibile prodotti di qualità senza l'utilizzo del suolo sono l'acquaponica e l'idroponica. Questi sistemi implicano l'applicazione mirata di nutrienti direttamente alla pianta e permettono il riciclo della soluzione nutritiva evitando lo spreco causato dalla lisciviazione (Savvas et al, 2003). Il vantaggio principale di questi modi di coltivare le piante include la mitigazione dei problemi legati al suolo come le malattie trasmesse dal terreno, e di conseguenza il minor utilizzo di prodotti chimici e fitoprotettivi che potrebbero inquinare le acque, il terreno e la microfauna.

Il termine idroponica deriva dal greco “*hydro*” che significa acqua e “*ponos*” che significa lavoro. Questo metodo di coltivazione utilizza una soluzione di nutrienti in concentrazioni precise e ottimizzate in modo da migliorare la crescita. In questo sistema le piante sono fatte crescere in un supporto spugnoso

immerso in acqua. Le condizioni di crescita sono continuamente monitorate; particolare attenzione viene posta al pH, fondamentale per mantenere lo stato di solubilità degli elementi e ottimizzare i processi di scambio fra le radici e la soluzione nutritiva, alla conducibilità elettrica, parametro che serve per monitorare la concentrazione salina nella soluzione nutritiva, alla portata al tempo ed ai cicli di erogazione e alla composizione chimica della soluzione.

La coltivazione acquaponica invece è un ingegnoso sistema circolare spesso descritto, in modo semplice, come: “tu dai da mangiare ai pesci, i pesci nutrono le piante e le piante puliscono l’acqua per i pesci”. È ispirata quindi in piccolo al ciclo che Madre Natura usa per sostenere il mondo. Oltre agli ecosistemi acquatici naturali di Madre Natura, l’acquaponica è apparsa per la prima volta 1.500 anni fa in Cina, ed era utilizzata per la coltivazione di riso combinata con l’allevamento di pesce gatto (*Ameiurus melas*). Questo sistema oggi combinato alle tecnologie moderne permette di creare un sistema circolare in spazi limitati, in cui il materiale fecale dei pesci diventa il fertilizzante naturale per il raccolto, eliminando la necessità di dover avere un sistema di smaltimento per i rifiuti solidi.

Gli svantaggi che presentano entrambi questi due sistemi sono gli alti costi di installazione e di mantenimento dell’impianto e l’elevata competenza di tecniche necessarie per gestire questi sistemi al fine di ottenere buoni risultati quantitativi e qualitativi.

### **1.1.3 Coltivazione aeroponica**

L’aeroponica è un sistema di coltivazione in cui la pianta cresce in assenza di terreno sospesa in aria con l’assistenza di un supporto artificiale per sostenerla, come mostrato in fig. 2 (Osvald et al., 2001). Fondamentalmente, è un sistema di coltivazione in cui le radici delle piante, esposte all’aria all’interno di un contenitore, ricevono i nutrienti necessari alla loro crescita in forma di soluzione nebulizzata. La parte superiore della pianta invece è esposta

all'illuminazione in tempi stabiliti ed ottimizzati per massimizzare la crescita (Imran Ali Lakhiar et al., 2012).

L'idea di coltivare piante nell'aria fornendo supporto artificiale nasce dall'osservazione di alcuni ricercatori che hanno notato che alcune piante crescevano sulle rocce vicino alle cascate anche se le radici erano esposte all'aria. All'inizio degli anni '20 Barker (Barker, 1922) sviluppò per la prima volta un sistema di coltivazione areoponico che utilizzò nel suo laboratorio per studiare la struttura delle radici delle piante. L'assenza di terra rendeva lo studio molto più facile: le radici delle piante erano appese a mezz'aria mentre gli steli erano trattenuti da un supporto artificiale (Peterson e Krueger, 1988). Nel 1940, questa tecnologia è stata poi spesso utilizzata da molti ricercatori come moderno strumento di ricerca (Christi e Nichols, 2004). Klotz, (Klotz, 1944) è stato il primo ricercatore a far crescere piante di agrumi con questo sistema mentre svolgeva un lavoro che consisteva nel ricercare metodi di prevenzione di malattie che colpiscono le radici di agrumi e avocado e dopo di lui altri utilizzarono questo ingegnoso sistema per studiare le interazioni delle radici con l'ambiente e con la microflora (Hubick et al., 1982, Zobel et al., 1976). Dal 1966 si iniziò ad utilizzare il sistema areoponico per coltivare le piante a finicommerciali tanto che oggi la NASA sta studiando questo metodo per far crescere piante nelle navicelle spaziali. Restando invece sul pianeta terra, è utilizzato per la produzione di piante ornamentali orticole, la radice di erbe e la produzione di piante medicinali in cui il principio attivo si trova nelle radici (Kamies et al., 2010).

Negli anni l'efficienza di questo metodo di coltivazione ha raggiunto ottime prestazioni che permettono un risparmio di acqua fino al 99%, di nutrienti al 50% e richiede il 45% in meno di tempo di crescita rispetto alla convenzionale coltivazione sul suolo (NASA, 2006). Il sistema aeroponico inoltre permette di



ridurre le lesioni meccaniche e permette l'eliminazione delle interferenze che possono derivare crescendo le piante nel terreno, nella sabbia o nell'acqua. Inoltre, la tecnica permette una facile raccolta delle piante (Cho et al., 1996). Pertanto, il sistema aeroponico ha la potenzialità di aumentare il reddito e ridurre i costi di produzione di numerose essenze, rendendolo così più accessibile ai coltivatori nei paesi in via di sviluppo.

Il sistema inoltre avendo la possibilità di controllare la concentrazione di nutrienti, valori di pH, temperatura, umidità, intensità della luce, tempo di atomizzazione, ecc. offre la possibilità di poter studiare con precisione la crescita della pianta e modellizzarla.

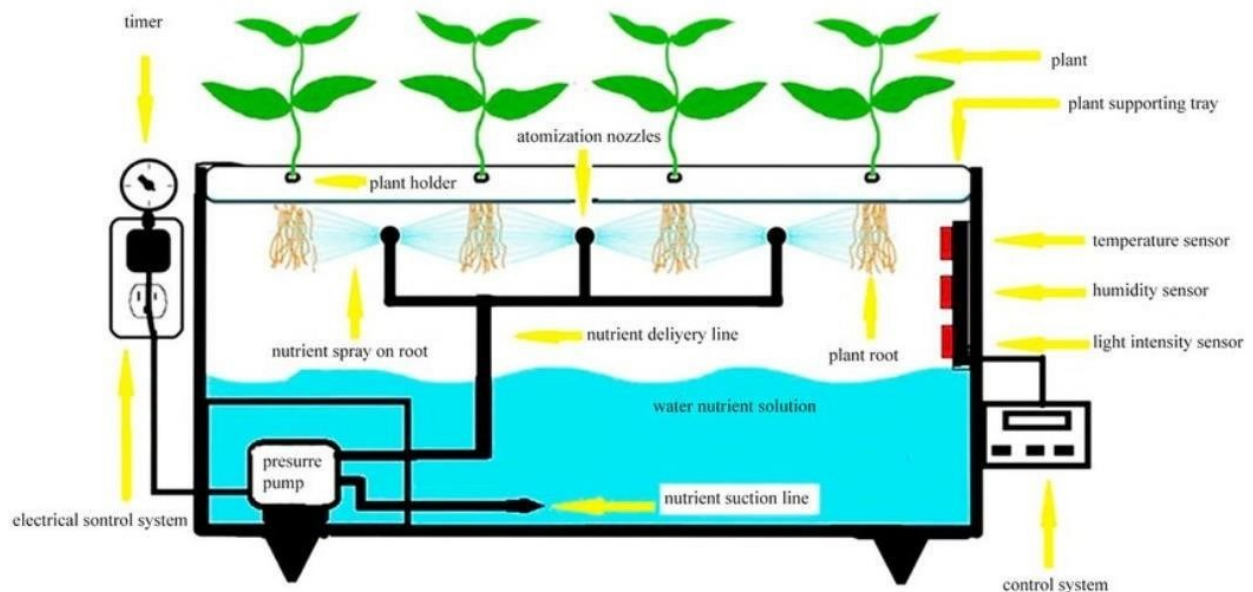


Figura 2: metodo di coltivazione areoponico. Tratto da Imran Ali Lakhiar et al., 2018

## 1.2 I GLUCOSINOLATI

Le prime osservazioni sulle proprietà uniche dei glucosinolati e degli isotiocianati sono state registrate già all'inizio del XVII secolo, quando, nel 1831, Robiquet e Boutron isolarono la sinalbina (P.J.Robiquet, F. Boutron, 1831), in seguito a studi effettuati su semi di senape bianca (*Sinapis alba*) per comprendere l'origine chimica del sapore piccante di questi ultimi. Questa sostanza è stata la prima di una serie di molecole che andarono a costituire la grande famiglia dei glucosinolati (GLS). Ad oggi sono stati caratterizzati più di 130 glucosinolati (Agerbirk et al., 2012), tutti isolati da specie appartenenti all'ordine delle *Brassicales*, a cui appartengono una notevole quantità di piante di interesse commerciale e agricolo. In seguito, vari studi hanno dimostrato le proprietà antiparassitarie, antiossidanti, anticancerogene e antimicrobiche di questi composti ed in particolare di un gruppo di molecole derivanti dall'idrolisi dei glucosinolati: gli isotiocianati (ITC). Visto l'ampio spettro di benefici derivati da queste molecole sia in ambito agricolo, economico e sociale e visto l'aumento dell'interesse da parte dei consumatori per cibi nutraceutici, ovvero che possano apportare un beneficio alla salute di chi li consuma, recentemente si è visto un marcato aumento di interesse di aziende, consumatori ed enti di ricerca verso questi composti (Butkutė, Taujenis, & Norkevičienė, 2019).

I glucosinolati sono composti idrosolubili contenenti zolfo e azoto comunemente prodotti durante il metabolismo secondario delle *Capparales* (*Brassicaceae*, *Capparodaceae*, *Euphorbiaceae*). Tutti i glucosinolati finora caratterizzati hanno in comune la stessa struttura (figura 3), costituita da un residuo di beta-D- Glucopiranosio legato attraverso un atomo di zolfo ad un estere (Z)-N-idrossiammino solfato ed un gruppo variabile R che può essere uno di otto aminoacidi (Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P., 2001). Queste sostanze possono essere classificate in base al loro precursore amminoacidico e al tipo di modificazione del gruppo variabile. Composti derivati da Alanina,

Leucina, Isoleucina, Metionina o Valina sono chiamati glucosinolati alifatici, quelli derivati da Fenilalanina o Tirosina sono i glucosinolati aromatici, mentre quelli derivati dal Triptofano sono gli indol- glucosinolati.

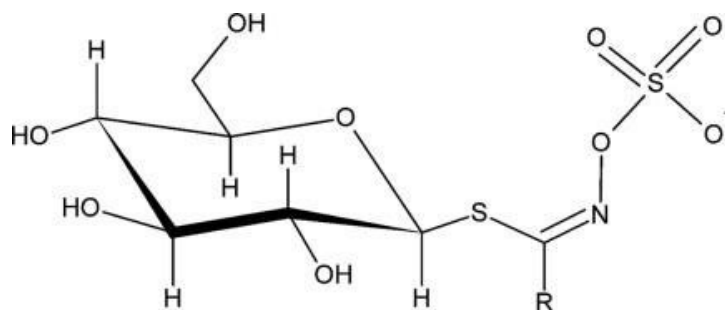


Figura 3: La struttura chimica dei glucosinolati. Tratto da Choi et al., 2014

I tipi e le concentrazioni di glucosinolati variano in modo significativo tra le crucifere e sono anche soggetti a modifiche in base a temperatura ambientale, età della pianta, chimica del suolo, irraggiamento solare, stagione, genetica e ontogenesi delle piante.

La biosintesi dei GLS nella cellula vegetale procede attraverso tre fasi: allungamento della catena di aminoacidi precursori, formazione della struttura principale e modificazioni secondarie della catena laterale dell'amminoacido (J.W. Fahey et al., 2001).

### 1.2.1 Il sistema glucosinolato-mirosinasi

Il sistema di difese chimiche posseduto dalle crucifere ha interessato scienziati e coltivatori per decenni. Il ruolo predominante di questo sistema è quello di fungere da meccanismo difensivo; tuttavia, oltre a questo ruolo ecologico, i prodotti di idrolisi dei GLS influenzano le caratteristiche aromatiche e salutistiche delle *Brassicacee*.

I GLS presenti nel citosol della pianta, in seguito al danneggiamento meccanico

del vegetale, dovuto per esempio alla masticazione da parte di un insetto, entrano in contatto con un enzima endogeno contenuto nel vacuolo chiamato mirosinasi, attivando così il sistema glucosinolato-mirosinasi talvolta chiamato "bomba all'olio di senape" (Grubb & Abel, 2006). Questo, attraverso una reazione di idrolisi, genera una serie di molecole: tiocianati, nitrili, epitioalcani, isotiocianati. Questi composti esplicano varie attività: in particolare antiparassitarie, antimicrobiche e conferiscono alla pianta un sapore piccante ed amaro. Nell'uomo hanno dimostrato avere effetti antiossidanti e anticancerogeni (Adarsh Pal Vig et al., 2009).

La mirosinasi fu scoperta per la prima volta nel 1939 da parte di Bussy che stava studiando una sostanza proteica necessaria al rilascio di olio essenziale dai semi di *Brassica nigra*, e che chiamò in seguito "mirosina" (Bussy, 1840). Successivamente, Heinricher (Heinricher, 1884) identificò una tipologia di cellule ricca di proteine nelle *Brassicaceae* che differiva per morfologia, rifrazione della luce e proprietà di colorazione dalle cellule circostanti; queste cellule verranno in seguito chiamate "cellula della mirosina" da Guignard (Guignard, 1890). All'inizio del XX secolo, si pensava che l'enzima di fosse composto da due subunità, tuttavia, la natura della mirosinasi come monomero è stata confermata in seguito al fallimento di separare ciò che si credeva fossero le due subunità (Nagashima Z et al, 1959).

Oltre che nelle *Brassicaceae* questi enzimi sono stati trovati anche in *Akaniaceae*, *Bataceae*, *Bretschneideraceae*, *Capparaceae*, *Caricaceae*, *Gyrostemonaceae*, *Limnanthaceae*, *Moringaceae*, *Pentadiplandraceae*, *Resedaceae*, *Saivadoraceae*, *Tovariaceae* e *Tropaeolaceae* (Rodman, 1991), nei funghi come *Aspergillus sydowi* (Reese et al, 1958, Ohtsuru et al, 1969) e *Aspergillus niger* (Ohtsuru et al., 1973), e nei batteri intestinali *Enterobacter*

*cloacae* (Tani et al, 1974) e *Faracolobactrum aerogenoides* (Oginsky et al, 1965).

I prodotti che si formano in seguito all'idrolisi dei glucosinolati da parte della mirosinasi sono glucosio e un tioidrossimato-o-sulfonato (un intermedio instabile), il quale rilascia spontaneamente diversi prodotti (isotiocianati, tiocianati, nitrili, epitioalcani e solfato) a seconda della temperatura e del pH in cui avviene la reazione (Bones & Rossiter et al, 1996). Gli isotiocianati contribuiscono al sapore amaro e pungente delle verdure in cui sono contenuti: l'allil- isotiocianato, per esempio è conosciuto per il suo effetto lacrimoso e piccante in senape, rafano e wasabi (Bell L. et al, 2018) Le loro proprietà benefiche sono molte, tanto che questo gruppo di molecole si distingue per essere antinfiammatorio, anticancerogeno, antibatterico e antimicrobico. Stanno acquisendo inoltre molta importanza nella biochimica poiché possono essere utilizzati come marcatori proteici. A dimostrazione di ciò in uno studio condotto da Barbarella e colleghi diversi derivati degli ITC sono stati coniugati all'albumina bovina e le loro proprietà ottiche e di fluorescenza sono state studiate (Barbarella et al., 2001).

### **1.2.2 Glucosinolati e microbiota**

La composizione e l'attività del microbiota intestinale umano ha un'influenza importante sul metabolismo, sulla fisiologia e sulla funzione immunitaria.

Pertanto, l'equilibrio o lo squilibrio del microbiota è direttamente collegato allo stato di salute e di malattia dell'ospite (Oliphant K et al., 2019). Tra le funzioni più importanti del microbioma intestinale umano si ricordano la metabolizzazione della componente indigeribile (fibra), la biosintesi delle vitamine (come riboflavina, biotina, acido pantotenico e tiamina) e la protezione dagli agenti patogeni e la risposta a vari stress (Riccio P. et al., 2019). Losasso e colleghi hanno riscontrato una maggiore ricchezza nel

microbiota intestinale di individui vegetariani rispetto a quelli onnivori (LoSasso et al., 2018). Questa influenza è correlata ad alcuni componenti bioattivi degli alimenti vegetali e al loro ruolo nel plasmare il microbiota intestinale. I risultati del loro studio hanno mostrato che i diversi composti forniti nella dieta ricca di verdure hanno un effetto diretto sulla modellatura del microbiota intestinale e che la parte dei vegetali che esplica l'effetto benefico è costituita da diverse classi di nutrienti. I carboidrati non digeribili (NDC), che includono polisaccaridi come cellulosa, emicellulosa, pectina e fibre, sono substrati adatti per il metabolismo dei Bacteroidetes, in grado di produrre acidi grassi a catena corta (SCFA), che secondo vari studi avrebbero un effetto antagonista sulle malattie infiammatorie intestinali (IBD) e addirittura sulla modulazione del sistema immunitario (Parada Venegas et al., 2019) I polifenoli influenzano positivamente il contenuto del microbiota intestinale aumentando il numero di Bifidobacterium e lactobacilli diminuendo le popolazioni di clostridi. Infine, per quanto riguarda le verdure crucifere, anche i GLS esplicano un'attività benefica sul microbioma e sull'organismo. Si ritiene infatti che una dieta di 3-5 porzioni di verdure crucifere a settimana sia sufficiente per diminuire del 30% o 40% del rischio di alcuni tumori (Cohen et al., 2000). I batteri intestinali sembrano anche idrolizzare i GSL tuttavia quali batteri e in che misura ciò si verifichi sono un'area di ricerca attiva (Cheng et al., 2004; Lai et al., 2010; Mullaney et al., 2013). I primi studi a sostegno della possibilità che l'idrolisi del GSL possa verificarsi nell'intestino hanno mostrato che, quando ai soggetti veniva somministrato un pasto di broccoli cotti (quindi con la mirosinasi degradata dal calore), bassi livelli dei prodotti derivati dall'idrolisi dei GLS comparivano nel plasma e nelle urine (Conaway et al., 2000, Shapiro et al., 1998).

I prodotti del metabolismo degli ITC, ritrovati nell'urina dei pazienti a cui erano stati somministrati broccoli cotti, venivano rilevati dopo un tempo

maggiore rispetto ai pazienti a cui erano stati somministrati broccoli crudi, suggerendo un tempo di transito prolungato nell'intestino prima dell'idrolisi. Questi risultati sono stati ulteriormente supportati da un altro studio in cui a soggetti umani sono stati somministrati antibiotici, nel tentativo di ridurre il microbiota, e poi nutriti con un estratto riscaldato di germogli di broccoli. Quando confrontato con un gruppo di controllo a cui non sono stati somministrati antibiotici avevano meno ITC nelle urine ([Shapiro et al., 1998](#)). Questa importante attività del microbiota è di rilevante importanza in quanto, il più delle volte, broccoli ed altre verdure crucifere vengono cotti e questa operazione degrada la mirosinasi che quindi non idrolizza i GLS liberandone il principio attivo.

Per ovviare a questo problema è stato proposto di utilizzare della mirosinasi esogena estratta da semi di senape bianca (*Sinapis alba*) e aggiunta ai broccoli o ad altri prodotti cotti o precotti per migliorare la resa di produzione degli isotiocianati ([Shapiro et al., 1998](#)). Anche i germogli di broccoli non riscaldati, quindi con la mirosinasi attiva, possono essere utilizzati per fornire attività idrolitica agli estratti di broccoli in cui la mirosinasi è stata disattivata ([Cramer et al., 2011](#)).

Molti integratori di broccoli sul mercato sono una ricca fonte di glucosinolati, ma non contengono la mirosinasi il che rende i GLS non biodisponibili, questo problema potrebbe essere quindi accelerato/migliorato mediante l'aggiunta di una mirosinasi esogena ([Clarke et al., 2011](#)).

### 1.2.3 Glucosinolati e nutraceutica

In seguito a vari studi che dimostrarono l'effetto benefico delle vitamine nel corpo (D. Harman, 1993) e grazie all'avvento della genomica, è diventato evidente come la nutrizione sia fortemente correlata con l'espressione genica la quale a sua volta è responsabile di una moltitudine di funzioni biologiche. Una branca della medicina che si occupa di trovare sostanze benefiche negli alimenti è la nutraceutica, una scienza che viene definita per la prima volta nel 1989 da Stephen Defelice (fondatore di una società americana che si occupa di salute, "The Foundation for Innovation in Medicine"), il quale definì come nutraceutica una "sostanza contenuta in un alimento che offre benefici alla salute prevenendo o curando particolari malattie" (De Felice L Stephen, 1995). Lo scopo della nutraceutica è quello di estrarre dalle piante principi bioattivi che abbiano un'alta biodisponibilità, ovvero, che diventino molto disponibili per l'assorbimento quando vengono rilasciati nel tratto gastrointestinale, nel modo più naturale possibile. Una molecola che esplica molti effetti benefici è il sulforafano (SFN, fig. 4) un isotiocianato alifatico, derivato dalla glucorafanina (GRA) e presente in grandi quantità nei broccoli (N. Hanlon et al., 2009). Il SFN è conosciuto per essere una sostanza fitochimica con un'alta biodisponibilità (80%, fig. 5) dovuta al suo basso peso molecolare (177.29 u.m.a.) e alla sua lipofilità, che altre sostanze fitochimiche di elevato peso molecolare come i polifenoli non hanno (C. Manach, 2005).



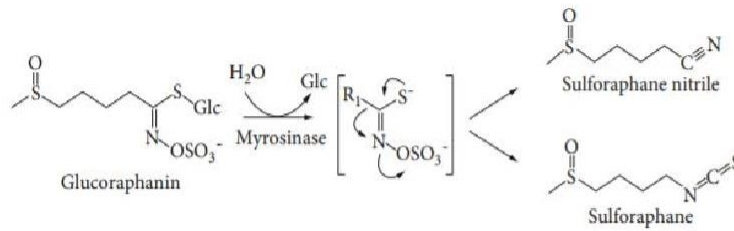


Figura 4: reazioni di idrolisi e riarrangiamento della glucorafanina che generano sulforafano o sulforafano-nitrile a seconda delle condizioni di reazione.

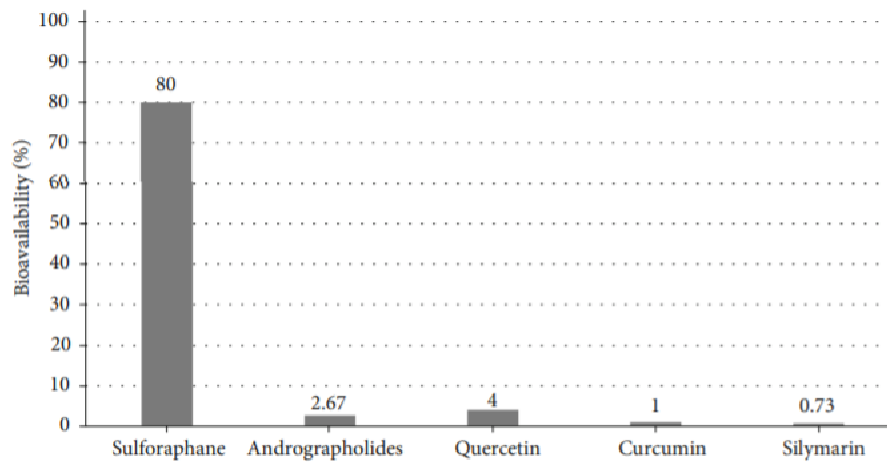


Figura 5: La biodisponibilità del SNF è comparata con alcune sostanze polifenoliche comunemente usate come integratori nella dieta.

L'interesse per il SFN come composto alimentare ad alta attività biologica è iniziato nel 1992 quando un gruppo di ricercatori dell'università Johns Hopkins ha pubblicato 2 articoli che parlavano della presenza di enzimi anticancerogeni derivati da estratti di broccoli e sui test per identificarli (Y. Zhang et al., 1992). Il gruppo ha evidenziato come i semi di broccoli germinati 3 giorni contenessero da 20 a 50 volte più Glucorafanina (GRN) rispetto ai broccoli maturi. Nello studio, inoltre, si è approfondito come il SF agisce sul corpo: quest'ultimo stimola i fattori di trascrizione citoplasmatici come Nrf2 e NK-κB, che in seguito, attivano nel nucleo oltre 500 geni facenti parte dell'elemento di risposta antiossidante (ERA), un promotore di numerosi geni che codificano per enzimi deputati ai processi di difesa cellulare.

Il SFN, inoltre, ha un effetto battericida contro *H. pylori*, un batterio che secondo le stime del NCBI ha colonizzato metà della popolazione mondiale, (M. E. Martin and J. V. Solnick, 2014) che per la maggior parte è portatrice sana ma che in alcuni casi manifesti l'innalzamento del pH dello stomaco, causato dalla continua sintesi di ammonio da parte di *H. pylori*. Questo contribuisce ad alterare la digestione delle proteine e ad alterare l'assorbimento di ferro nei bambini ed aumentare la probabilità di sviluppare cancro allo stomaco (G. J. Fuchs et al., 2004). Uno studio del 2013 di J.W. Fahey e colleghi (J. W. Fahey et al., 2013) ha dimostrato come il SFN inibisca l'attività ureasica che *H. pylori* utilizza per idrolizzare l'urea derivata dalle proteine, disponibili nel lume intestinale, per sintetizzare l'ammonio.

### **1.2.3 La biofumigazione**

La biofumigazione è un termine che è stato coniato per descrivere la soppressione di parassiti e malattie vegetali tramite l'uso di piante contenenti glucosinolati. Questo termine nasce all'inizio degli anni '90 in seguito ad esperimenti effettuati sul grano che evidenziarono come le *graminacee* cresciute in alternanza a colture di brassiche crescessero in modo più vigoroso, rispetto a colture di pausa come lino e orzo. L'effetto benefico è mediato dai prodotti di idrolisi dei GLS glucoiberina, glucoerucina, glucoeirolina e glucotropaeolina che hanno mostrato un'inibizione della crescita del 50% di diversi funghi patogeni delle piante, come *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Diaporthe phaseolorum* e *Pythium irregolare* (Manici et al., 1997).

Analogamente alle malattie delle piante causate da microrganismi, anche i danni di insetti ed erbivori contribuiscono a una grave perdita di produzione agricola. Martin e Muller hanno dimostrato nei loro studi come le piante produttrici di GSL abbiano una maggiore resistenza contro erbivori o insetti attraverso l'accumulo sistematico di alte concentrazioni di GSL (Martin et al., 2003 ; Muller et al., 2001).

Le comuni pratiche erbicide artificiali inquinano l'ambiente e causano vari problemi di salute umana e perdite di raccolti. Al fine di superare le perdite subite dalle piante infestanti e raggiungere sistemi e livelli di produzione agricola sostenibili, sono necessarie strategie di controllo delle erbe infestanti alternative più efficienti e non sintetiche. Il controllo naturale delle erbe infestanti attraverso colture allelopatiche è un efficace processo di controllo in cui la soppressione delle erbe dannose attraverso l'inibizione nelle fasi di crescita e germinazione delle piantine può essere ottenuta dalle sostanze chimiche rilasciate dai GLS (Vig et al, 2009 ). Handiseni e colleghi in una loro ricerca hanno utilizzato farina di semi di Brassicaceae per il controllo delle erbe infestanti. In questo studio sono usati semi di senape bianca intatti, semi di senape indiana e farine di colza per le loro attività erbicide contro diverse erbe infestanti, come l'avena selvatica (*Avena fatua*), il lolietto italiano (*Lolium multiflorum*), e la lattuga spinosa (*Lactuca serriola*). Tra questi, la senape indiana ha mostrato un'efficacia erbicida significativamente maggiore sulle erbacce rispetto alla senape bianca ed, inoltre, hanno dimostrato che l'attività erbicida varia con il tipo di GSL e da specie a specie (Handiseni et al., 2011).

## 1.3 ESTRAZIONE ED ANALISI DEI GLUCOSINOLATI

### 1.3.2 Metodi di estrazione

L'interesse storico della quantificazione dei glucosinolati nelle farine di colza per l'alimentazione del bestiame ha spinto l'organismo ISO (International Organization of Standardization) a formulare un metodo standard per l'estrazione dei glucosinolati: la norma ISO 9167, revisionata nel 2019. Il metodo, formulato per l'estrazione dei glucosinolati da semi e farina di semi di *B. napus*, comporta un numero abbastanza rilevante di operazioni che richiedono una quantità notevole di tempo e sono potenzialmente pericolose (figura 8). Gli step di questo processo comprendono l'iniziale liofilizzazione del materiale, l'omogeneizzazione del tessuto della pianta, l'estrazione in metanolo-acqua bollente (70%) per un tempo di circa 10 minuti, la purificazione dell'estratto tramite cromatografia, la desolfatazione e la rilevazione. Negli anni sono stati sviluppati diversi altri metodi di estrazione ma una parte considerevole è accomunata dai solventi utilizzati e dalla temperatura di estrazione. Queste molecole, infatti, vengono solitamente estratte in una soluzione bollente di metanolo ed acqua in rapporto 7:3, poiché permette una efficace inattivazione della mirosinasi (Kiddle et al., 2001). La durata del trattamento termico idealmente deve essere sufficiente per l'inattivazione dell'enzima, ma il più breve possibile per ridurre al minimo la degradazione termica delle molecole di interesse (Mohn et al., 2007). L'uso del metanolo però pone diversi rischi per la salute: oltre all'inflammabilità, i fumi derivati da questo solvente, che normalmente viene scaldato per favorire la denaturazione della mirosinasi, sono tossici. Questo problema ha portato i ricercatori a valutare delle alternative, come ad esempio rimpiazzarlo con acqua calda, cosa che in alcuni casi ha portato a risultati simili o a volte migliori (Stoin DF et al., 2007).

Anche la temperatura di estrazione risulta essere critica in quanto alcuni degli indol-glucosinolati, come la 4-idrossil-glucobrassicina e 4-metossiglucobrassicina, non sono termostabili. Allo scopo di trovare una soluzione efficiente a questo problema, Ishida e colleghi (Ishida M et al., 2011) hanno dimostrato, in uno studio condotto su radici di ravanello trattate con una soluzione di metanolo all'80%, che l'utilizzo di questo solvente a temperatura ambiente non causa una rilevante riduzione dell'efficacia di estrazione dei GLS rispetto al convenzionale metodo di estrazione a caldo.

La stabilizzazione del materiale organico viene normalmente effettuata tramite liofilizzazione. Questa procedura consiste nel rimuovere l'acqua da un prodotto per sublimazione: il processo avviene abbassando (al di sotto dei 6,19 mbar) la pressione della camera contenente il prodotto previamente congelato, creando così una condizione interna di pressione e temperatura atta a far raggiungere il punto triplo dell'acqua (un particolare stato termodinamico in cui coesistono le 3 fasi: solida, liquida e aeriforme). L'acqua contenuta nel prodotto sublima e il vapore risultante viene catturato per congelamento su una apposita trappola tenuta a bassa temperatura. La perdita d'acqua del prodotto ha un effetto inibitorio sull'enzima che non riesce ad entrare in contatto con i glucosinolati e quindi ne viene impedita la degradazione.

Durante questo processo risulta essenziale controllare il costante stato di congelamento del campione. La liofilizzazione, infatti, non denatura la mirosinasi ma ne impedisce il funzionamento impedendo fisicamente il contatto tra enzima e substrato. Il congelamento necessario prima della liofilizzazione induce danni cellulari diffusi e potenzialmente porta a contatto i glucosinolati con la mirosinasi. Lo scongelamento, anche localizzato, del campione prima della completa sublimazione dell'acqua è quindi altamente dannoso per la quantificazione dei glucosinolati.

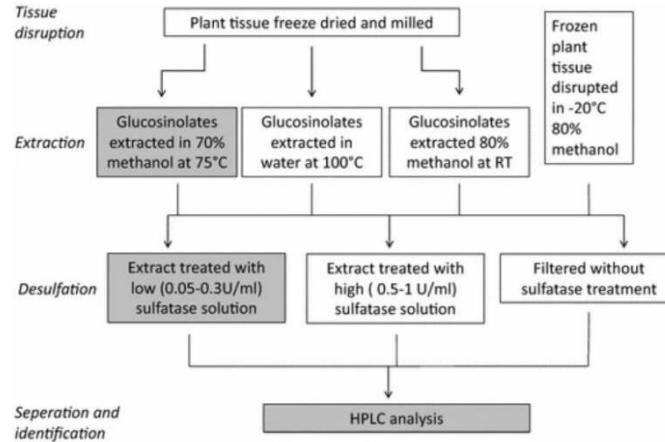


Figura 8: in grigio si riportano le fasi del metodo ISO 9167-1, un metodo nato inizialmente per l'estrazione di GLS da semi di *B. napus* ma che è comunemente usato per l'estrazione dei GLS e la loro analisi. Tratto da T. Doheny- Adams et al, 2017.

### 1.3.2 Metodi di quantificazione

Analizzando la letteratura è evidente che il metodo di quantificazione più utilizzato è la cromatografia ad alte prestazioni (HPLC). La separazione dei glucosinolati può però essere effettuata con due metodiche diverse: cromatografia a fase inversa (RP) e cromatografia a interazione idrofilica (HILIC).

La separazione in fase inversa si effettua, in generale, su colonne impaccate con resina C18, che fornisce una matrice altamente idrofobica. Considerato che la maggior parte dei glucosinolati sono altamente idrofilici, si possono attuare due diverse strategie di separazione.

Una è quella presentata nella norma ISO 9067-1: i glucosinolati isolati dal campione sono separati, prima dell'analisi in HPLC, in colonne di resina DEAE. Questa resina è caricata positivamente e presenta quindi molta affinità con il gruppo solfato dei GLS. In questo modo i GLS sono ritenuti dalla colonna e i contaminanti vengono lavati via dal campione. Successivamente viene aggiunta la solfatasi che idrolizza il gruppo solfato dei GLS che quindi vengono così

staccati fisicamente dalla colonna, eluiti con acqua e raccolti. I glucosinolati così ottenuti, privati del gruppo solfato, sono noti come desulfo-glucosinolati.

L'eliminazione del gruppo solfato permette quindi di aumentare notevolmente l'idrofobicità dei GLS e di analizzare in C18 anche i GLS più idrofili (Mithen et al., 2010) L'incubazione con enzima, tuttavia, presenta degli svantaggi: è infatti noto che la solfatasi non riesce ad agire sull'N-sulfoindol-3-ilmetil-GSL e le preparazioni di solfatasi comunemente utilizzate mostrano un'attività dipendente dalla catena laterale del GSL che porta a idrolisi solo parziali o sbilanciate per alcuni GLS (Wathelet et al., 2004). Un ulteriore passaggio critico nella strategia di separazione è l'utilizzo di eluenti che riescano a distaccare completamente dalla colonna i GLS, poiché questi ultimi possono mostrare enormi variazioni nell'affinità con le matrici delle colonne a scambio ionico. Gli standard utilizzati di frequente (allil-GSL e benzil-GSL) e i loro derivati desolfati sono tra i GSL/desulfo-GSL con l'affinità più bassa per i materiali delle colonne a base di Sephadex; le condizioni di eluizione non dovrebbero quindi essere ottimizzate esclusivamente utilizzando questi standard. Al contrario, gli indol-GSL e i GSL e contenenti gruppi fenolici mostrano un'affinità molto elevata per il materiale Sephadex, (Agerbirk et al., 2001).

Per ovviare all'incertezza dell'uso dell'enzima solfatasi, è possibile utilizzare un'altra metodica di HPLC a fase inversa nota come ion-pairing (IPC). In questa metodica i GLS sono separati senza modificazioni su colonna C18 ma con una fase mobile addizionata con composti ionici che presentano catene idrofobiche in grado di interagire con la fase stazionaria. La parte carica del composto è in grado di interagire e legarsi ai GLS. In questo modo il complesso generato non è più carico ed è in grado di interagire con la colonna C18. Il più utilizzato di questi composti è il tetrabuttil-ammonio idrogeno solfato (TBA). Lo svantaggio di questa metodica è il costo relativamente elevato dei composti di ion-pairing.

Una ulteriore metodica HPLC in grado di quantificare i GLS senza bisogno di modifiche è la cromatografia a interazione idrofila o HILIC (A.J. Alpert et al., 1990).

Le prime separazioni in modalità HILIC sono state riportate nel 1975. Linden e Lawhead (J.C. Linden et al., 1975) che hanno separato i carboidrati utilizzando una fase stazionaria amino-silicea Bondapak e una fase mobile composta da ACN e acqua (75:25 v/v). Oggi sono diventate disponibili numerose matrici per le separazioni HILIC a base di silice legata chimicamente a diversi gruppi funzionali, che permettono di ottenere fasi stazionarie con cariche positive, negative o zwitterioniche. Tuttavia, essendo un sistema di ultima generazione presenta anche alcuni inconvenienti (D.V. McCalley, 2010) che derivano dal fatto che il meccanismo di separazione è attualmente meno ben compreso rispetto a quello dei più comuni metodi HPLC. Pertanto, può essere difficile prevedere l'effetto di un cambiamento nelle condizioni sull'esito della separazione. Ciononostante, questa metodica non richiede nessun trattamento dell'estratto, permette di analizzare i GLS senza alcuna modificazione e non richiede combinazioni di solventi o additivi particolari. Le separazioni vengono tipicamente effettuate con fasi mobili composte da ammonio formiato e acetonitrile in modalità isocratica o con gradienti (Wade et al., 2007). L'utilizzo di metodi come l'HPLC o la gas cromatografia per la determinazione accurata del contenuto di GSL sono tecniche di uso comune ma sono molto costosi e non permettono l'analisi in parallelo di numerosi campioni. Per questa ragione, già nel 1970 Lein, (Lein, K.A., 1970) propose il "glucotest" per la selezione di genotipi di colza a basso contenuto di GSL. Questa tecnica si basa su una valutazione del contenuto di GSL dopo la liberazione enzimatica del glucosio e la sua rilevazione con un test del glucosio disponibile in commercio. Questo sistema divenne un prerequisito essenziale per lo sviluppo delle prime cultivar di colza a basso contenuto di GSL e oggi è utilizzato in tutto il mondo.



Sebbene questo metodo sia eccellente per una caratterizzazione qualitativa dei GLS contenuta nei semi l'interferenza dei composti fenolici con gli enzimi per il test del glucosio diventa rilevante quando le concentrazioni di glucosio liberato dai GLS è bassa.

Nella ricerca di un reagente migliore per la determinazione dei GLS, nel 1982 Thies ([W. Thies et al., 1982](#)) riportò la reazione dei glucosinolati col palladio (Pd). Questo reagente presentava numerosi vantaggi: reazione colorimetrica facilmente determinabile con uno spettrofotometro, stabilità cromatica e reazione completamente in mezzo acquoso.

Thies notò un cambiamento di colore verso il marrone scuro qualora l'estratto di GLS, diluito in HCl, venisse trattato con sodio tetracloropalladato o con palladio cloruro.

La reazione si dimostrò positiva anche con i desulfoglucosinolati, agliconi, tiocianati ed isotiocianati. Sostanze senza azoto ma contenenti solfuro come 2-mercaptoetanololo, tioglucosio, cisteina, fenotiazine e dimetilsolfossido, svilupparono un colore giallo con il tetracloropalladato. La reazione tra palladio e GSL puri o estratti era relativamente veloce, ma quando la soluzione era acida il tempo per raggiungere l'equilibrio poteva essere anche di 60 minuti. Sebbene lo studio non fosse indirizzato a chiarire la struttura dei complessi Pd-GSL Thies ha ipotizzato che, osservando i colori che si sviluppavano in seguito alla reazione, fosse la configurazione S-C-N a reagire col palladio.

Altri metodi colorimetrici si basano sulla reazione del tio-glucosio rilasciato in ambiente acido col timolo o col ferricianuro.

## SCOPO DELLA TESI

Data l'importanza del sulforafano per la salute umana, l'efficiente e sicura estrazione di questa molecola dalla matrice vegetale rappresenta un interesse primario. In particolare, l'estrazione senza l'uso di solventi organici tossici o infiammabili è particolarmente attrattiva. Tuttavia, essendo il sulforafano una molecola estremamente labile si è deciso di propendere per l'estrazione del suo precursore, ovvero la glucorafanina.

Il materiale di partenza è rappresentato dai microgreens di due brassiche: cavolo rosso (*Brassica oleracea ssp. capitata var. rubra*) e cavolo nero di Toscana (*Brassica oleracea ssp. acephala var. sabellica*) forniti dall'azienda Zero Srl. La coltivazione di queste due essenze in coltura aeroponica permette di perfezionare l'uso delle risorse (nutrienti, acqua, ...) e del contenuto di bioattivi ed ottenere quindi un prodotto ottimizzato allo scopo.

Per conseguire lo scopo prefissato sarà inizialmente necessario investigare un modo efficace di disattivazione dell'enzima mirosinasi, in modo da preservare la glucorafanina presente nelle piante. Successivamente andrà individuato un solvente alternativo al metanolo, idealmente a base acquosa, tale da estrarre in maniera efficiente la glucorafanina. Infine, verrà investigata la cinetica di estrazione del bioattivo in questo solvente in modo da ottimizzare i tempi di estrazione.

## CAPITOLO 2

### MATERIALI E METODI

#### 2.1 MATERIALI

Sono stati utilizzati microgreens di Cavolo rosso (*Brassica oleracea ssp. capitata var. rubra*) e cavolo nero (*Brassica oleracea ssp. acephala var. sabellica*) fornite dall'azienda Zero SRL con sede a Pordenone. Le due cultivar sono state coltivate in modalità aeroponica e alimentate con una soluzione di Hoagland (Tabella 1) per 7 giorni. Le ore di luce sono state impostate in modo crescente, legato allo sviluppo della pianta: 6 ore per piante inferiori a 1 cm, 8 per piante da 1 cm a 2 cm e poi 12 fino al momento della raccolta. Un campione casuale di microgreens è stato raccolto dall'azienda Zero e portato in contenitori di polistirolo nel laboratorio dell'università di Padova con sede a Conegliano. Ogni analisi è stata svolta in triplicato.

Tabella 1: composizione della soluzione nutriti Hoagland (Hoagland e Arnon, 1938)

Macronutrienti (mg/L)		Micronutrienti (mg/L)	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	656,4	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
KNO <sub>3</sub>	606,6	MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	1,81
MgSO <sub>4</sub>	240,76	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,22
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	115,03	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,08
		MoO <sub>3</sub>	0,016

#### 2.2 Estrazione a diverse temperature

Sono stati pesati con una bilancia di precisione 2 grammi di campione, i quali sono poi stati macinati in un mortaio insieme a 4 ml di solvente scelto. Questo volume è stato scelto considerando una quantità di acqua nei microgreens pari al 90% del loro peso; considerando la diluizione del solvente dovuta all'acqua

endogena la concentrazione finale del solvente di estrazione, dove rilevante, risulta del 70%. Per l'analisi sono stati impiegati singolarmente: metanolo o acqua bollenti (70 e 100 °C rispettivamente) o a temperatura ambiente. I campioni da estrarre in solvente a caldo, una volta macinati sono stati trasferiti in una falcon da 50 ml ed immersi in un bagnomaria di acqua bollente per 10 minuti. I campioni estratti a freddo sono stati trasferiti in una falcon e lasciati incubare per 10 minuti a temperatura ambiente. Una volta terminata l'incubazione, i campioni sono stati filtrati con l'ausilio del vuoto attraverso un filtro in fibra di vetro. Il filtrato è stato analizzato subito in HPLC o conservato a -20 °C.

### **2.3 Stabilizzazione in microonde a parità di energia fornita**

Aliquote di 50 g e 100g di microgreens sono state irradiate a potenze diverse (116W, 350W,700W) in un microonde casalingo. Da prove preliminari è emerso che 4 minuti a 700W sono risultati sufficienti a degradare l'enzima inibendo l'idrolisi dei GLS. Si è quindi calcolato il tempo necessario per fornire una eguale quantità di energia a potenze differenti. Dopo aver irradiato il prodotto, un'aliquota di 1 grammo sospesa in 2 ml di acqua fredda, è stata omogeneizzata con l'ausilio di un mortaio e si è fatta riposare a temperatura ambiente per 1 ora. Gli estratti sono stati filtrati a vuoto attraverso un filtro di fibra di vetro. Per bloccare l'attività della mirosinasi 600 µL di filtrato sono stati diluiti con 1,4 ml di metanolo 100% (concentrazione finale 70%). I campioni così ottenuti sono stati analizzati subito in HPLC o conservati a -20 °C.

### **2.4 Stabilizzazione in microonde a parità di perdita di peso**

Aliquote di 50 grammi sono state irradiate in microonde ad una potenza di 700W per un tempo determinato in modo da ottenere una perdita di peso pari al 50, 60, 70, 80, 90% del peso fresco. Dal materiale irradiato sono state

prelevate aliquote in pesi tali che il corrispondente peso fresco pre-irradiazione fosse uguale per tutti i campioni e corrispondente a 5 g (es. 2,5g a 50% di perdita di peso, 0,5g a 90% di perdita di peso, ecc.). I campioni così ottenuti sono stati posti in 10 ml di acqua deionizzata e tenuti in agitazione tramite agitatori magnetici per 1 ora. Gli estratti così ottenuti sono stati filtrati a vuoto attraverso un filtro di fibra di vetro. Per bloccare l'attività della mirosinasi 600 µL di filtrato sono stati diluiti con 1,4 mL di metanolo 100% (concentrazione finale 70%). I campioni così ottenuti sono stati analizzati subito in HPLC o conservati a -20 °C.

## **2.5 Cinetica di estrazione in acqua**

Un'aliquota pari a 350g di campione è stata irradiata fino alla perdita dell'80% del peso. Sono poi stati presi 10 grammi e messi in un becker contenente 100ml di acqua e altri 10 grammi sono stati immersi in 100 ml di una soluzione di metanolo al 70%. Le soluzioni sono state continuamente agitate con agitatori magnetici per il tempo totale di un'ora. Un'aliquota di 600 µL è stata prelevata al tempo zero e poi dopo 5, 10, 15, 30 e 60 minuti. Per bloccare l'attività della mirosinasi ogni aliquota è stata diluita con 1,4 mL di metanolo. I campioni così ottenuti sono stati analizzati subito in HPLC o conservati a -20 °C.

## **2.6 Analisi HPLC**

Il cromatografo HPLC utilizzato è uno Shimadzu modello Nexera xr equipaggiato con autocampionatore autosampler sil-20ac xr , forno da colonna cto-20a e, rilevatore diode array spd-m20a. La colonna utilizzata per separare i glucosinolati è una Sequant ZIC-HILIC DA 3,5 µm, 200 Å° 150x 4.6 mm. L'eluizione dei composti avviene in modalità isocratica con solvente composto da 80% di acetonitrile e 20% di ammonio formiato 100 mM pH 4,5 (concentrazione finale 20 mM) pompato a un flusso di 0,7 mL/min. La colonna

è stata mantenuta a una temperatura di 30 C°. I campioni destinati all'analisi sono stati ulteriormente filtrati tramite filtro a siringa da 0,45 µm prima di essere caricati nell'autocampionatore. Per ogni campione sono iniettati 10 µL. I glucosinolati sono stati rilevati tramite assorbimento a 235 nm.

## **CAPITOLO 3**

### **RISULTATI**

#### **3.1 Estrazione diretta in metanolo o acqua a diverse temperature**

Dall'analisi dei dati ottenuti (fig. 9) risulta che, indipendentemente dalla cultivar analizzata, contrariamente a quanto trovato in letteratura (M. Mizani et al, 2016) l'acqua bollente non è in grado di disattivare la mirosinasi. È evidente infatti che nei campioni trattati in acqua bollente non è stato possibile trovare GRA, similmente ai campioni estratti in acqua a temperatura ambiente, che rappresenta in questo caso il controllo positivo dell'attività della mirosinasi. Tale risultato inaspettato potrebbe essere dovuto ad una non sufficiente permanenza del materiale in acqua bollente.

L'utilizzo del metanolo ha consentito di preservare la GRA indipendentemente dal fatto che il solvente fosse bollente o a temperatura ambiente, i risultati infatti non mostrano differenze sostanziali nell'efficienza di estrazione. Si nota inoltre una maggiore quantità di GRA estratta nel cavolo nero rispetto al rosso. È noto da esperimenti condotti in precedenza che il cavolo nero ha una quantità di GRA superiore rispetto al cavolo rosso; tuttavia la diversa efficienza di estrazione nel cavolo nero potrebbe essere dovuta alla maggiore capacità di solubilizzazione del bioattivo da parte del metanolo caldo.

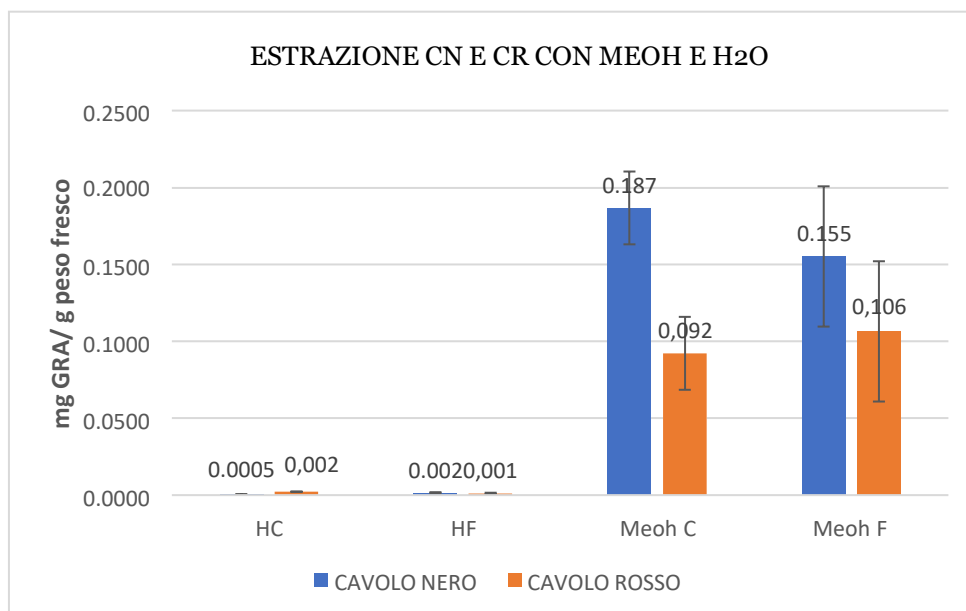


Figura 9: Contenuto di glucorafanina, espresso in mg GRA / g peso fresco, di cavolo rosso e cavolo nero. I campioni sono stati estratti rispettivamente in: acqua bollente, acqua a temperatura ambiente, metanolo bollente e metanolo a temperatura ambiente.

### 3.2 Stabilizzazione in microonde a parità di energia fornita

Avendo eliminato l'acqua bollente come possibile metodo di inattivazione della mirosinasi, si è passati ad indagare la possibilità di disattivare l'enzima per via termica tramite irraggiamento in microonde. Dalle prove sperimentali (figg. 10 e 11) si può notare come la potenza di 100 W non sia sufficiente a disattivare la mirosinasi, a differenza delle potenze maggiori in cui la quantità di GRA estratta è direttamente proporzionale all'aumentare dell'energia fornita. Al fine di valutare se l'irraggiamento in quanto tale fosse sufficiente a disattivare l'enzima, una maggiore quantità di piante (100g contro i 50 iniziali) è stata sottoposta allo stesso trattamento. La resa di estrazione è nettamente diversa nei 50 e nei 100 grammi, in particolare è minore nel caso di pesi maggiori e si attesta su valori pressoché simili a 350 e 700W; ciò è dovuto probabilmente al fatto che nel caso di una maggiore quantità di materiale la penetrazione delle onde elettromagnetiche non sia efficiente tanto quanto quella che avviene nel



caso di minori quantità e dunque la mirosinasi non viene completamente disattivata.

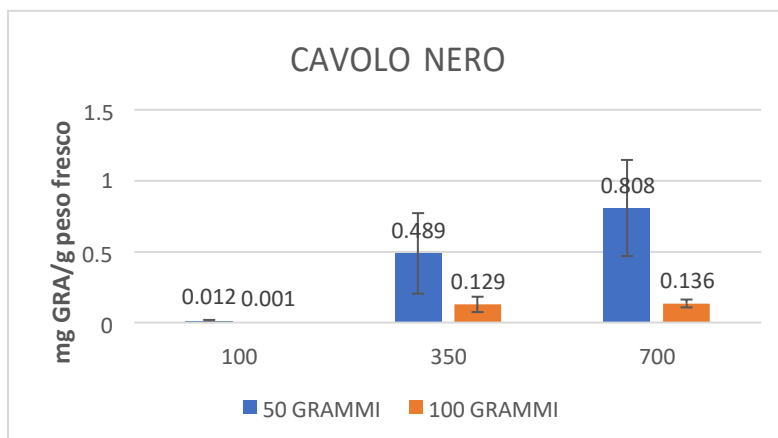


Figura 10: Contenuto di glucorafanina, espresso in mg GRA / g peso fresco, estratti da 50g (blu) e 100g (arancione) di microgreens di cavolo nero irradiati a 100,350, 700 watt per tempi diversi in modo da fornire la stessa quantità di energia.

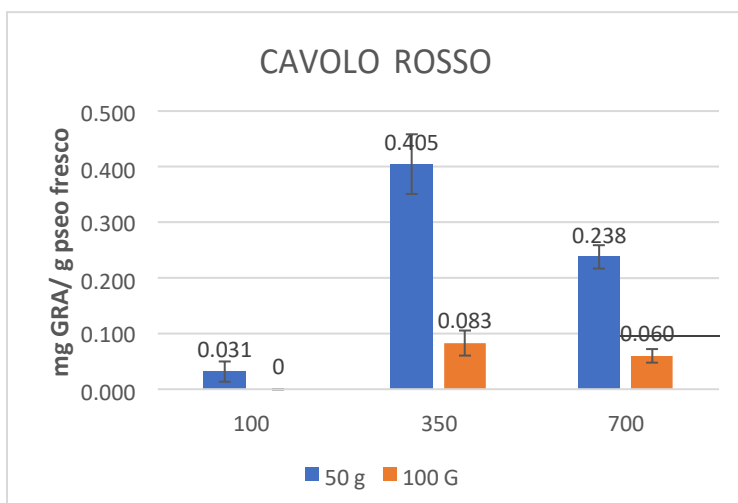


Figura 11: Contenuto di glucorafanina, espresso in mg GRA / g peso fresco, estratti da 50g (blu) e 100g (arancione) di microgreens di cavolo rosso irradiati a 100,350, 700 watt per tempi diversi in modo da fornire la stessa quantità di energia.

### **3.3 Stabilizzazione in microonde a parità di perdita di peso**

Avendo identificato che il trattamento in microonde risulta essere efficace nel disattivare la mirosinasi, è necessario identificare un parametro che permetta di stabilire quando il trattamento ha raggiunto la necessaria eliminazione dell'attività enzimatica senza danneggiare il bioattivo. Dato che le prove precedenti hanno evidenziato che non può essere la quantità di energia fornita, si è proceduto a valutare la perdita di peso durante l'irraggiamento. I dati ottenuti (fig. 12) evidenziano che un calo peso dell'80% permette l'estrazione massima di GRA. Questo perché l'irraggiamento è sufficiente a degradare la mirosinasi, ma, non è abbastanza intenso per degradare i GLS. Cosa che avviene riducendo il peso del 90% in cui si sono rilevati circa la metà dei GLS presenti nella prova sopra menzionata.

Per quanto riguarda gli altri valori si può notare un aumento di GLS tra il 60 e il 70%. I risultati del 50%, per quanto superiori al 60%, vanno interpretati nell'ottica di una considerevole variazione all'interno del campione e quindi la differenza osservata non è significativa. Pertanto, si ritiene corretta l'assunzione che diminuire il peso fino ad un calo dell'80% sia un metodo efficiente per degradare la mirosinasi ed ottenere una buona quantità di GLS.

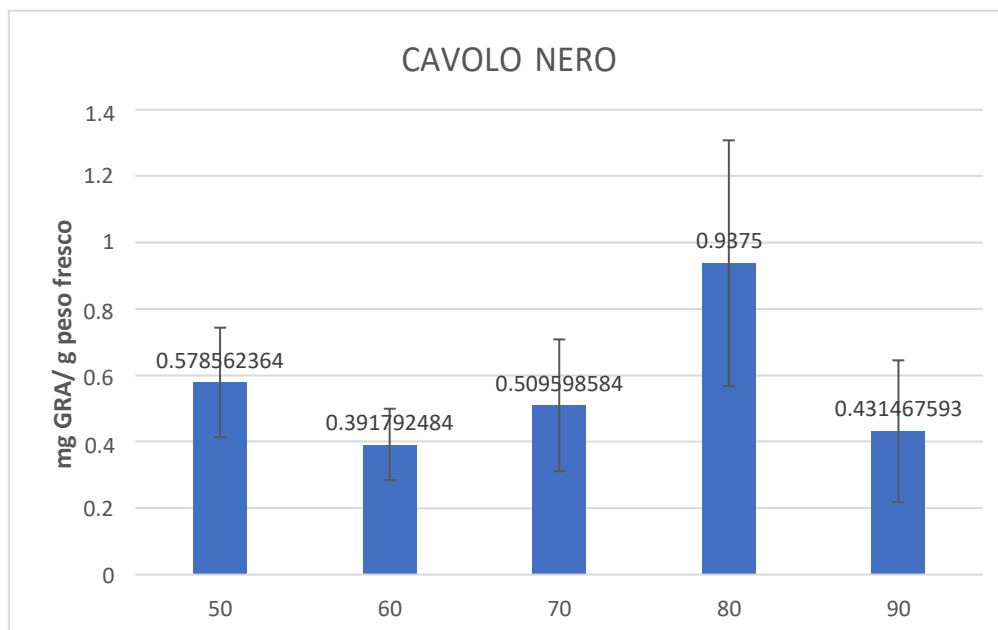


Figura 12: Contenuto di glucorafanina, espresso in mg GRA / g peso fresco, estratti da 350g di microgreens di cavolo nero irradiati fino al raggiungimento di un calo peso di 50,60,70,80,90 % rispetto al peso iniziale.

### 3.4 Cinetica di estrazione in acqua e metanolo

Al fine di poter analizzare più efficacemente i dati raccolti dalle cinetiche (figg. 13 e 14), le curve sono state modellizzate riadattando l'equazione sviluppata inizialmente da Peleg per l'assorbimento di umidità (Peleg, 1988):

$$E(t) = \frac{t}{(k_1 + k_2 t)}$$

dove  $E(t)$  rappresenta la concentrazione di GRA estratta al tempo  $t$ ,  $k_1$  e  $k_2$  sono due costanti che caratterizzano il modello. Di particolare interesse è il valore inverso di  $k_2$  che rappresenta la concentrazione di GRA a saturazione. Il valore inverso di  $k_1$  invece restituisce la velocità iniziale dell'estrazione a  $t=0$ .

I dati del grafico mostrano come l'acqua sia il mezzo di estrazione più efficiente non solo per quanto riguarda la cinetica di estrazione ma anche per quanto

concerne la quantità di prodotto estratto. Nel cavolo rosso l'acqua estrae il 13% di GRA in più rispetto al metanolo mentre nel cavolo nero il 27%. La velocità di estrazione dell'acqua è nettamente superiore a quella del metanolo, come confermato dai valori di  $1/k_1$ , quasi il doppio per l'acqua rispetto al metanolo: per il cavolo nero 0,148 mg/ml·s l'acqua, 0,069 mg/ml·s per il metanolo. Nel cavolo rosso sono invece 0,037 mg/ml·s l'acqua e 0,018 mg/ml·s per il metanolo.

Dall'analisi della costante  $1/k_2$  è inoltre possibile determinare il tempo necessario a raggiungere una determinata frazione della concentrazione di saturazione. In acqua dopo 15 minuti (20 nel cavolo rosso) è già estratto più dell'80% della concentrazione a saturazione e dopo 30 minuti il 90% (40 nel cavolo rosso). Risulta quindi evidente che protrarre l'estrazione oltre i 30 minuti non rappresenta uno sforzo utile, considerando che ulteriori 30 minuti (un'ora totale) apportano un miglioramento del solo 5%.

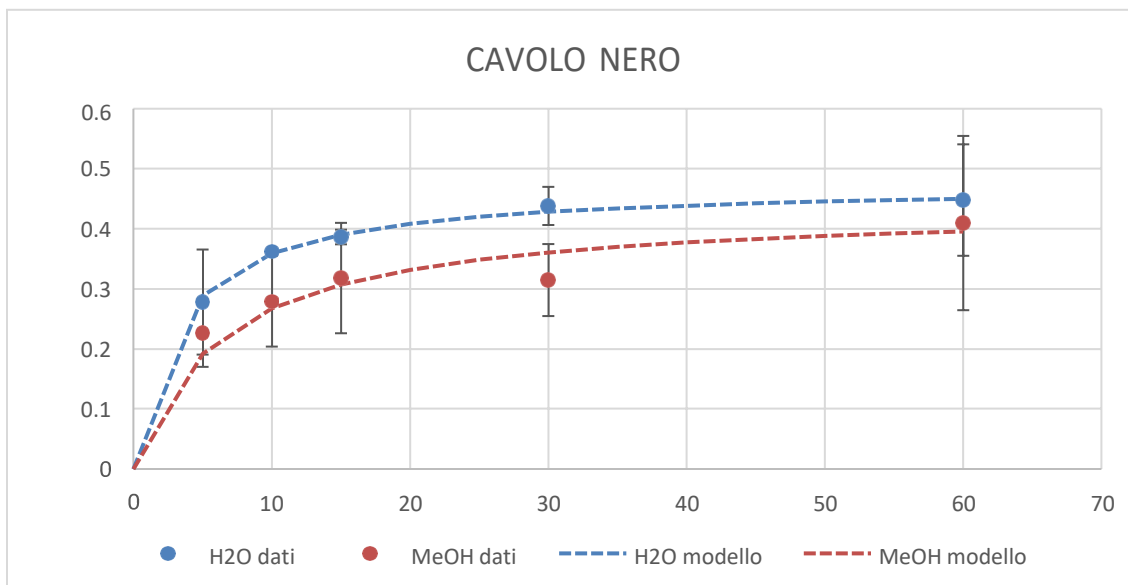


Figura 13: concentrazione di glucorafanina, misurata in mg/mL, estratta da microgreens di cavolo nero irradiati fino a perdere l'80% del peso e tenuti in agitazione per 1 ora in metanolo (blu) o acqua (arancione).

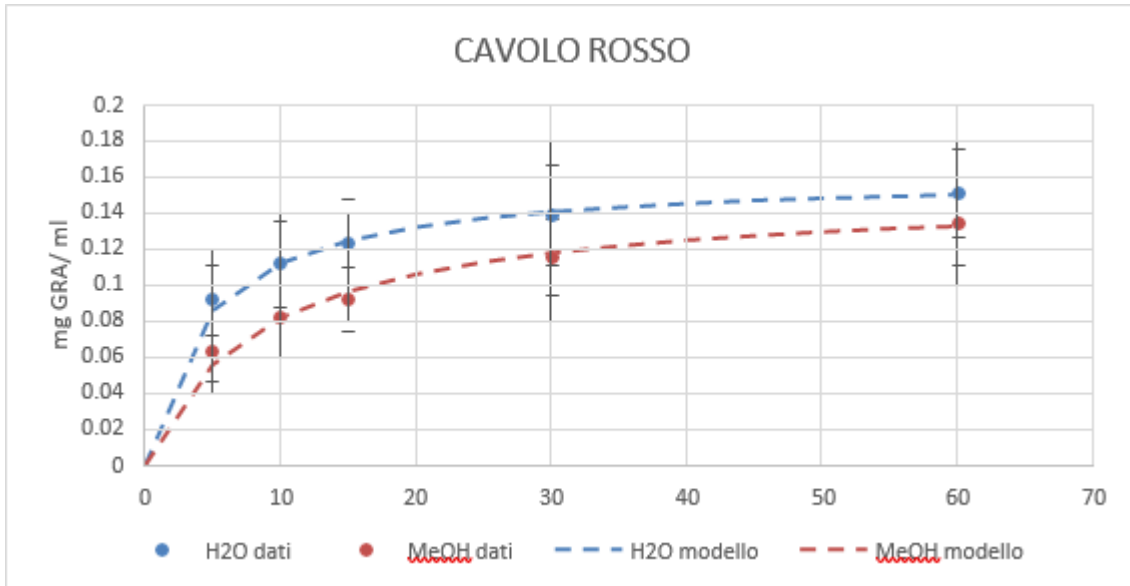


Figura 14: concentrazione di glucorafanina, misurata in mg/mL, estratta da microgreens di cavolo rosso irradiati fino a perdere l'80% del peso e tenuti in agitazione per 1 ora in metanolo (blu) o acqua (arancione).

## CAPITOLO 6

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

#### DISCUSSIONE

Dai risultati iniziali (fig. 9) si evince che l'inattivazione della mirosinasi da parte del metanolo (solvente utilizzato nel tradizionale metodo standard ISO 9167-1) è il sistema più efficace di estrazione sia a caldo che a freddo. Al contrario l'acquacalda non riesce a degradare l'enzima, effetto probabilmente dovuto ad una temperatura o permanenza del materiale nel solvente non sufficiente ad inibire l'enzima. Sebbene il metanolo sia la sostanza più idonea a garantire un buon estratto, non è compatibile con gli standard di sicurezza utilizzati nell'industria alimentare poiché tossico. Conoscendo le proprietà idrofiliche dei GLS, si è quindi cercato di trovare un metodo che riuscisse ad inattivare la mirosinasi permettendo di ottenere le molecole di interesse utilizzando come solvente di estrazione l'acqua.

Per quanto la liofilizzazione del prodotto rappresenti un metodo utilizzato spesso anche in letteratura ([K. Grosser et al., 2017](#) ; [T. Doheny-Adams et al., 2017](#)) i tempi, i costi e le criticità di tale processo, che necessita un previo congelamento del prodotto, difficile da mantenere nel caso di piccole unità come i microgreens, hanno portato verso l'inattivazione dell'enzima tramite l'irradiazione tramite microonde.

Svolgendo delle prove preliminari è stato determinato che 700 W per 4 minuti sono sufficienti ad ottenere una desiderabile disattivazione dell'enzima senza un'eccessiva degradazione termica del prodotto.

Le prove sistematiche svolte al fine di capire se la disattivazione dell'enzima dipendesse solo dalla quantità di energia fornita, è emerso come le potenze maggiori sono più efficaci (figg. 10 e 11), nonostante delle discrepanze tra le due cultivar dovute probabilmente alle differenze della costituzione tissutale tra

cavolo rosso e nero. La minor quantità di GRA estratta dai 100 grammi ha però evidenziato come l'energia fornita a quantità maggiori di materiale non sia efficace tanto quanto quella fornita a quantità inferiori, effetto probabilmente dovuto ad una disomogeneità nella distribuzione delle microonde, che non riescono a penetrare efficientemente al centro della massa del prodotto qual ora si utilizzino ingenti quantità di materiale. Inoltre, è speculabile che non siano tanto le microonde il fattore primo della disattivazione dell'enzima ma piuttosto il riscaldamento stesso del tessuto. Per questo motivo aumentando la massa da riscaldare non è possibile raggiungere la stessa inibizione dell'attività enzimatica che si ottiene con una massa minore.

È risultato quindi necessario individuare un altro parametro per identificare quando il trattamento in microonde ha raggiunto la sua massima efficacia. In quest'ottica è stata analizzata la perdita di peso conseguente all'irradiazione a potenza costante (700W). Dai dati ottenuti (fig. 12) è stato possibile determinare che la perdita di peso ottimale è rappresentata dall'80%. Oltre tale soglia la quantità di acqua presente nei tessuti è troppo limitata per limitare il riscaldamento delle piantine e si va incontro a carbonizzazione, con conseguente perdita di GRA per degradazione termica.

Avendo quindi trovato un buon metodo di degradazione della mirosinasi necessario per effettuare un'efficiente estrazione in acqua, un passo successivo è stato quello di comparare la velocità e la quantità di GRA estraibile confrontando i due solventi (metanolo e acqua). Tramite l'equazione di Peleg ([Peleg et al., 1988](#)), che mette in relazione il tempo con la capacità di estrazione del mezzo, si è dimostrato con successo l'efficienza dell'acqua rispetto al solvente apolare, la prima infatti avendo molta affinità per la polarità dei GLS si è dimostrata un ottimo mezzo per l'estrazione, nonostante necessiti di un pre trattamento del prodotto atto a disattivare l'enzima (fig. 13 e 14).

## **CONCLUSIONI**

Vista la crescente domanda da parte dei consumatori di prodotti salutari che contengano sostanze benefiche per l'organismo, i cosiddetti "alimenti nutraceutici", è cresciuto l'interesse delle aziende per la creazione e la ricerca di questo tipo di alimenti. In questa tesi, è presentato il metodo di estrazione dei glucosinolati (sostanze con vari effetti benefici sull'organismo umano e non solo), da microgreens di cavolo nero e rosso cresciuti in condizioni aeroponiche dall'azienda Zero s.r.l. . Nello svolgimento della tesi si è cercato di utilizzare l'acqua come solvente di estrazione poiché rispetto alla sostanza comunemente usata in letteratura, il metanolo, la prima è compatibile con i prodotti destinati al consumo umano essendo catalogata come "food safe". I risultati sperimentali dei vari test hanno evidenziato come l'acqua sia un buon solvente (anche più efficiente del metanolo), qualora l'estrazione sia preceduta da un irradiazione a microonde, in grado di degradare l'enzima responsabile dell'idrolisi dei GLS. Le prove fatte tuttavia presentano delle ingenti deviazioni standard, indice di errori nella preparazione dei campioni.



## **BIBLIOGRAFIA**

- Adarsh Pal Vig; Geetanjali Rampal; Tarunpreet Singh Thind; Saroj Arora (2009). Bio-protective effects of glucosinolates – A review. , 42(10), 0–1572.
- Andrew J. Alpert (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. , 499(none), 177–196.
- Atle M. Bones; John T. Rossiter (1996). The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. , 97(1), 194–208.
- Barbarella, Giovanna; Zambianchi, Massimo; Pudova, Olga; Paladini, Vanessa; Ventola, Alfredo; Cipriani, Francesco; Gigli, Giuseppe; Cingolani, Roberto; Citro, Gennaro (2001). Oligothiophene Isothiocyanates as a New Class of Fluorescent Markers for Biopolymers. *Journal of the American Chemical Society*, 123(47), 11600–11607.
- Barker BTP. 1922. Long ashton research station annual report: studies on root development.
- B. Butkutė, L. Taujenis, E. Norkevičienė . Small-Seeded legumes as a novel food source. Variation of nutritional, mineral and phytochemical profiles in the chain: Raw seeds-sprouted seeds-microgreens *Molecules*, 24 (1) (2019), p. 133.
- Bell, Luke; Oloyede, Omobolanle O.; Lignou, Stella; Wagstaff, Carol; Methven, Lisa (2018). Taste and Flavour Perceptions of Glucosinolates, Isothiocyanates, and Related Compounds. *Molecular Nutrition & Food Research*, (), 1700990–.
- Brentlinger, D. (2005). New trends in hydroponic crop production in the US. *International Conference and Exhibition on Soilless Culture: ICESC*, 742, 31–33.
- Bussy, A. 1840. Sur la formation de l'huile essentielle de moutarde. 1. *Pharm.* 27: 464-471. Dahlgren, R. 1975. A system of classification of the angiosperms to be used to demonstrate the distribution of characters. *Bot. Not.* 128: 119-147.
- C.C. Conaway, S.M. Getahun, L.L. Liebes, D.J. Pusateri, D.K. Topham, M. Botero-Omary, F.L. Chung Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli *Nutrition and Cancer*, 38 (2000), pp. 168-178
- C. Douglas Grubb; Steffen Abel (2006). Glucosinolate metabolism and its control., 11(2), 0–100.
- Christi CB, Nichols MA. 2004. Aeroponics- a production system and research tool. South Pacific soilless culture conference – SPSCC. *Acta Horti*.
- Cho YD, Kang SG, Kim YD, Shin GH, Ki KT. 1996. Effects of culture systems on growth and yield of cherry tomatoes in hydroponics *RDA. J Agric Sci.* 38:563–567.
- C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, and C. Rémésy, “Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies,” *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 81, no. 1, supplement, pp. 230S–242S, 2005.

- David V. McCalley (2010). Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. , 1217(20), 3408–3417.
- Di Gioia, F., & Santamaria, P. (2015). Le proprietà nutrizionali dei micro-ortaggi—The nutritional properties of microgreens—Las propiedades nutricionales de las micro-hortalizas. In F. Di Gioia & P. Santamaria (Ed.), *Microgreens* (pp. 41–47). Bari, Italy: Eco-logica editore.
- D.L. Cheng, K. Hashimoto, Y. Uda In vitro digestion of sinigrin and glucotropaeolin by single strains of Bifidobacterium and identification of the digestive products *Food and Chemical Toxicology*, 42 (2004), pp. 351-357.
- D. Treadwell, R. Hochmuth, L. Landrum, W. Laughlin *Microgreens: A new specialty crop* University of Florida, IFAS Extension (2010), p. HS1164.
- Ebert, A. W., Wu, T. H., & Yang, R. Y. (2014). Amaranth sprouts and microgreens—A homestead vegetable production option to enhance food and nutrition security in the rural–urban continuum. In J. d’A. Hughes, P. Kasemsap, S. Dasgupta, O. P. Dutta, S. Ketsa, S. Chaikiattiyos.V. Chantrasm (Eds.), *Proceedings of the regional symposium on sustaining small-scale vegetable production and marketing systems for food and nutrition security* (pp. 233–244). Taiwan: AVRDC Publication.
- Fahey, Jed W.; Stephenson, Katherine K.; Wade, Kristina L.; Talalay, Paul (2013). Urease from *Helicobacter pylori* is inactivated by sulforaphane and other isothiocyanates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(1), 1–7.
- G. Kiddle, R.N. Bennett, N.P. Botting, N.E. Davidson, A.A.B. Roberstson, R.M. Wallsgrove High performance liquid chromatography separation of natural and synthetic desulfoglucosinolates and their chemical validation by spectroscopic, NMR and CI-MS methods *Phytochem. Anal.*, 12 (2001), pp. 226-242.
- Guignard, L. 1890. Sur la localisation des principes qui fournissent les essences sulfurees des Cruciferes. *C.R. Acad. Hebd. Seances III*: 249-251.
- GU, Zhen-xin; GUO, Qiang-hui; GU, Ying-juan (2012). Factors Influencing Glucoraphanin and Sulforaphane Formation in Brassica Plants: A Review. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(11), 1804–1816.
- Handiseni, Maxwell; Brown, Jack; Zemetra, Robert; Mazzola, Mark (2011). Herbicidal Activity of Brassicaceae Seed Meal on Wild Oat (*Avena fatua*), Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*), Redroot Pigweed (*Amaranthus retroflexus*), and Prickly Lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology*, 25(1), 127–134.
- Harman D: Free radical involvement in aging: pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs & Aging* 3:60–80, 1993.
- Heinricher, E. 1884. Ueber eiweissstoffe fuhrende idioblasten bei einigen Cruciferen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges. II*: 463-467.

- Houghton, Christine A. (2019). Sulforaphane: Its “Coming of Age” as a Clinically Relevant Nutraceutical in the Prevention and Treatment of Chronic Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019(), 1–27.
- Hubick KT, Drakeford DR, Reid DM. 1982. A comparison of two techniques for growing minimally water-stressed plants. *Can J Bot.* 60:219–223.
- Imran Ali Lakhari, Jianmin Gao, Tabinda Naz Syed . Modern plant cultivation technologies in agriculture under controlled environment: A review on aeroponics *Journal of Plant Interactions* 13(1).
- Ishida, Masahiko; Kakizaki, Tomohiro; Ohara, Takayoshi; Morimitsu, Yasujiro (2011). Development of a simple and rapid extraction method of glucosinolates from radish roots. *Breeding Science*, 61(2), 208–211.
- Ivica Blažević et al. (2020), Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. *Phytochemistry* 112100.
- James C. Linden; Charles L. Lawhead (1975). Liquid chromatography of saccharides., 105(1), 125–133.
- J.A. Mullaney, W.J. Kelly, T.K. McGhie, J. Ansell, J.A. Heyes Lactic acid bacteria convert glucosinolates to nitriles efficiently yet differently from Enterobacteriaceae *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (2013), pp. 3039-3046.
- J.D. Clarke, A. Hsu, K. Riedl, D. Bella, S.J. Schwartz, J.F. Stevens, E. Ho Bioavailability and inter-conversion of sulforaphane and erucin in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement in a cross-over study design *Pharmaceutical Research*, 64 (2011), pp. 456-463.
- Jed W. Fahey; Amy T. Zalcmann; Paul Talalay (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. , 56(1), 5–51.
- J.H. Cohen, A.R. Kristal, J.L. Stanford Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk *J. Natl. Cancer Inst.*, 92 (2000), pp. 61-68.
- J.M. Cramer, M. Teran-Garcia, E.H. Jeffery Enhancing sulforaphane absorption and excretion in healthy men through the combined consumption of fresh broccoli sprouts and a glucoraphanin-rich powder *British Journal of Nutrition*, 13 (2011), pp. 1-6.
- Kathrin Specht, Rosemarie Siebert, Ina Hartmann, Ulf B. Freisinger, Magdalena Sawicka, Armin Werner, Susanne Thomaier, Dietrich Henckel, Heike Walk & Axel Dierich , Urban agriculture of the future: an overview of sustainability aspects of food production in and on buildings (2014), *Agriculture and Human Values* volume 31, pages33–51.
- Kamies R, Rafudeen MS, Farrant J. 2010. The use of aeroponics to investigate antioxidant activity in the roots of *Xerophytaviscosa*.
- Klotz LGA. 1944. A simplified method of growing plants with roots in nutrient vapors. *Phytopathology*. 34:507–508.

- Kou, L., Yang, T., Luo, Y., Liu, X., Huang, L., & Codling, E. (2014). Pre-harvest calcium application increases biomass and delays senescence of broccoli microgreens. *Postharvest Biology and Technology*, 87, 70–78.2013.08.004.
- Koppert Cress (2016). Home. Retrieved from <http://greatbritain.koppertcress.com/> Kou, L., Yang, T., Luo, Y., Liu, X., Huang, L., & Codling, E. (2014). Pre-harvest calcium application increases biomass and delays senescence of broccoli microgreens. *Postharvest Biology and Technology*, 87, 70–78 2013.08.004.
- Lein, K. A. 1970 Enzymatic methods for the determination of the total glucosinolate content of single swede-rape seeds as a basis for the selection of low-glucosinolate rape.
- Losasso, Carmen; Eckert, Ester M.; Mastrorilli, Eleonora; Villiger, Jorg; Mancin, Marzia; Patuzzi, Ilaria; Di Cesare, Andrea; Cibir, Veronica; Barrucci, Federica; Pernthaler, Jakob; Corno, Gianluca; Ricci, Antonia (2018). Assessing the Influence of Vegan, Vegetarian and Omnivore Oriented Westernized Dietary Styles on Human Gut Microbiota: A Cross Sectional Study. *Frontiers in Microbiology*, 9(), 317–.
- Manici, Luisa M.; Lazzeri, Luca; Palmieri, Sandro (1997). In Vitro, Fungitoxic Activity of Some Glucosinolates and Their Enzyme-Derived Products toward Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2768–2773.
- Marios C. Kyriacou, Stefania De Pascale, Angelos Kyrtzis·Youssef Roupheal  
Microgreens as a Component of Space Life Support Systems: A Cornucopia of Functional Food, 2017.
- Martin, F. N. (2003). Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 325–350.
- Martin, Miriam E; Solnick, Jay V (2014). The gastric microbial community, *Helicobacter pylori*, colonization, and disease. *Gut Microbes*, 5(3), 345–350.
- Masaru Ohtsuru & Hata, T, 1973, Studies on the activation mechanism of the myrosinase by L-ascorbic acid. - *Agric, Biol, Chem.* 37: 1971-1972.
- Mir, S. A., Shah, M. A., & Mir, M. M. (2016). Microgreens: Production, shelf life and bioactive components. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- M Mizani, M Yousefi, S Rasouli, A Sharifan ,2016. The effect of different deheating processes on residual myrosinase activity, antimicrobial properties and total phenolic contents of yellow mustard (*Sinapis Alba*)- *Journal of Food Science*.
- Müller, C., Agerbirk, N., Olsen, C. E., Boevé, J.-L., Schaffner, U., & Brakefield, P. M. (2001). Sequestration of host plant glucosinolates in the defensive hemolymph of the sawfly *Athalia rosae*. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 2505–2516

- N. Agerbirk, B.L. Petersen, C.E. Olsen, B.A. Halkier, J.K. Nielsen 1,4-Dimethoxyglucobrassicin in *Barbarea* and 4-hydroxyglucobrassicin in *Arabidopsis* and *Brassica* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001), pp. 1502-1507
- Natalya Hanlon; Nick Coldham; Adriana Gielbert; Maurice J. Sauer; Costas Ioannides (2009). Repeated intake of broccoli does not lead to higher plasma levels of sulforaphane in human volunteers., 284(1), 0–20.
- NASA Spinoff. 2006. Progressive plant growing has business blooming. In: *Environmental and Agricultural Resources*. New York: NASA Spinoff; p. 64–77.
- Natvig, E. E., Ingham, S. C., Ingham, B. H., Cooperband, L. R., & Roper, T. R. (2002). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of rootand leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2737–2744.
- Oginsky, E. L., Stein, A. E., & Greer, M. A. 1965. Myrosinase activity in bacteria as demonstrated by the conversion of progoitrin to aointrin. - *Soc, Exp. Biol, Med, Proc.* 119: 360- 3M.
- Oliphant, Kaitlyn; Allen-Vercoe, Emma (2019). Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*, 7(1), 91–.
- Osvald J, Petrovic N, Demsar J. 2001. Sugar and organic acid content of tomato fruits (*lycopersicon lycopersicum mill.*) grown on aeroponics at different plant density. *Acta Alimentaria*. 30(1):53–61.
- Peterson LA, Krueger AR. 1988. An intermittent aeroponics system. *Crop Sci.* 28:712–713.
- Pinto, E., Almeida, A. A., Aguiar, A. A. R. M., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2014). Changes in macrominerals, trace elements and pigments content during lettuce (*Lactuca sativa L.*) growth: Influence of soil composition. *Food Chemistry*, 152, 603–611.
- P.J. Robiquet, F. Boutron, Sur la semence de moutarde, *J. Pharm. Chim.*, 17 (1831), pp. 279-282.
- Reese, E, T, Clapp, R, C. & Mandels, M. 1958, A thioglucosidase in fungi, - *Arch. Biochem. Biophys.* 75: 228-242.
- Researches regarding the isolation, purification and analysis of sinigrin glucosinolate from *Brassica nigra* and *Armoracia rusticana*, D Stoin, F Radu, D Dogaru - *Bull. USAMV Agric*, 2007.
- R.H. Lai, M.J. Miller, E. Jeffery Glucoraphanin hydrolysis by microbiota in the rat cecum results in sulforaphane absorption *Food and Function*, 1 (2010), pp. 161-166

- Riccio, Paolo; Rossano, Rocco (2019). Undigested Food and Gut Microbiota May Cooperate in the Pathogenesis of Neuroinflammatory Diseases: A Matter of Barriers and a Proposal on the Origin of Organ Specificity. *Nutrients*, 11(11), 2714–.
- Richard Mithen; Richard Bennett; Julietta Marquez (2010). Glucosinolate biochemical diversity and innovation in the Brassicales., 71(17-18), 2074–2086.
- Rodman, J, E, 1991, A taxonomic analysis of glucosinolate-producing plants. Part I: Phenetics, - *Syst, Bot*, 16: 598-618.
- Sarker, Shafiqul A; Davidsson, Lena; Mahmud, Hasan; Walczyk, Thomas; Hurrell, Richard F; Gyr, Niklaus; Fuchs, George J (2004). Helicobacter pylori infection, iron absorption, and gastric acid secretion in Bangladeshi children. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(1), 149–153.
- Savvas, D.: Hydroponics: A modern technology supporting the application of integrated crop management in greenhouse. *J. Food Agricult. Environ.*, 1, 80–86 (2003).
- Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for Inflammatory Bowel Diseases Daniela Parada Venegas, Marjorie K. De La Fuente, Glauben Landskron , MaríaJulietta González , Rodrigo Quera , Gerard Dijkstra , Hermie J.M. Harmsen , Klaas Nico Faber, Marcela A. Hermoso, 2019.
- Stephen L. DeFelice (1995). The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D., 6(2), 0–61.
- Tani, N., Ohtsuru, M, & Hata, T, 1974, Isolation of myrosinase producing microorganism, - *Agric, Biol, Chem*, 38: 1617- 1622.
- T.A. Shapiro, J.W. Fahey, K.L. Wade, K.K. Stephenson, P. Talalay Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 7 (1998), pp. 1091-1100.
- Thies, W. 1978. 5th Int. Rapeseed Conf. Malmo; Proc. \_Col. 1, pp. 136-139.
- Tobias Mohn; Brian Cutting; Beat Ernst; Matthias Hamburger (2007). Extraction and analysis of intact glucosinolates—A validated pressurized liquid extraction/liquid chromatography—mass spectrometry protocol for *Isatis tinctoria*, and qualitative analysis of other cruciferous plants., 1166(1-2), 142–151.
- United States Department of Agriculture—USDA (2014). Specialty greens pack a nutritional punch. *AgResearch Magazine*. Retrieved from <http://agresearchmag.ars.usda.gov/2014/jan/greens>.
- Wade, Kristina L.; Ito, Yoichiro; Ramarathnam, Aarthi; Holtzclaw, W. David; Fahey, Jed W. (2015). Purification of Active Myrosinase from Plants by Aqueous Two-Phase Counter-Current Chromatography. *Phytochemical Analysis*, 26(1), 47–53.

- Wathelet, Jean-Paul; Iori, Renato; Leoni, Onofrio et al. 2004 Guidelines for glucosinolate analysis in green tissues used for biofumigation In *Agroindustria*, 3 (3), p. 257-266.
- Xiao et al, Assessment of Vitamin and Carotenoid Concentrations of Emerging Food Products: Edible Microgreens (2012). *Agric. Food Chem.* 60, 31, 7644–7651
- Xiao, Z., Lester, G. E., Luo, Y., & Wang, Q. (2012). Assessment of vitamin and carotenoid concentrations of emerging food products: Edible microgreens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7644–7651.
- Zenji Nagashima, Masaaki Uchiyama Possibility that Myrosinase is a Single Enzyme and Mechanism of Decomposition of Mustard Oil Glucoside by Myrosinase *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*, Volume 23, Issue 6, 1 November 1959, Pages 555–556.
- Zhang, Y.; Talalay, P.; Cho, C. G.; Posner, G. H. (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure.. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(6), 2399–2403.
- Zobel RW, Tredici DP, Torrey JG. 1976. Methods for growing plants aeroponically. *Plant Physiol.* 57:344–346.
- Z. Xiao, G. Bauchan, L. Nichols-Russell, Y. Luo, Q. Wang, X. Nou Proliferation of *Escherichia coli* O157:H7 in soil-substitute and hydroponic microgreen production systems *Journal of Food Protection*, 78 (10) (2015), pp. 1785-1790