

# Molecole Bioattive: biodisponibilità e fattori che la influenzano

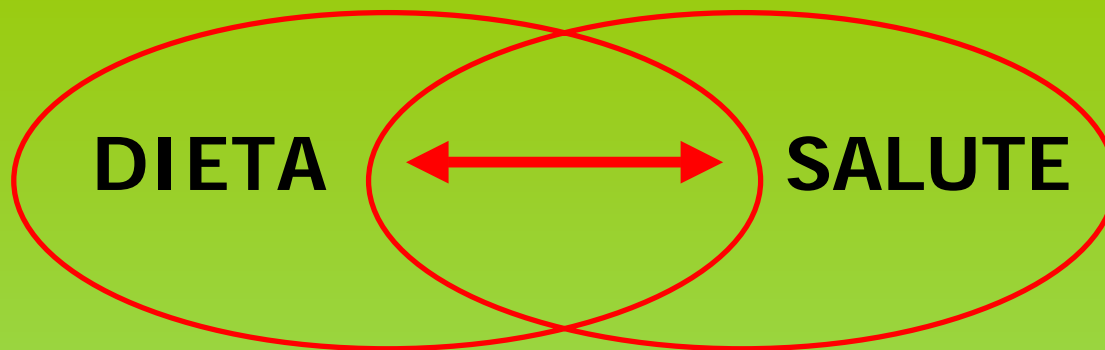
*Giuseppe Maiani e Elena Azzini*

Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione

19 marzo, 1 e 16 aprile 2010

Teramo

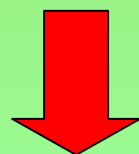




**ANTIOSSIDANTI**



**=**



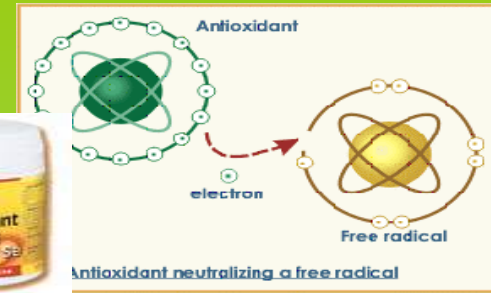
**STRESS  
OSSIDATIVO**  
(radicali liberi)



**MALATTIE  
CRONICO-  
DEGENERATIVE**



**antipertensiva  
antitrombotica**



**antiossidante**

**molecole bioattive**

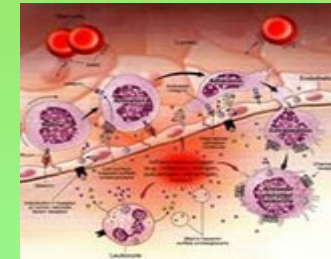


**antiobesità**

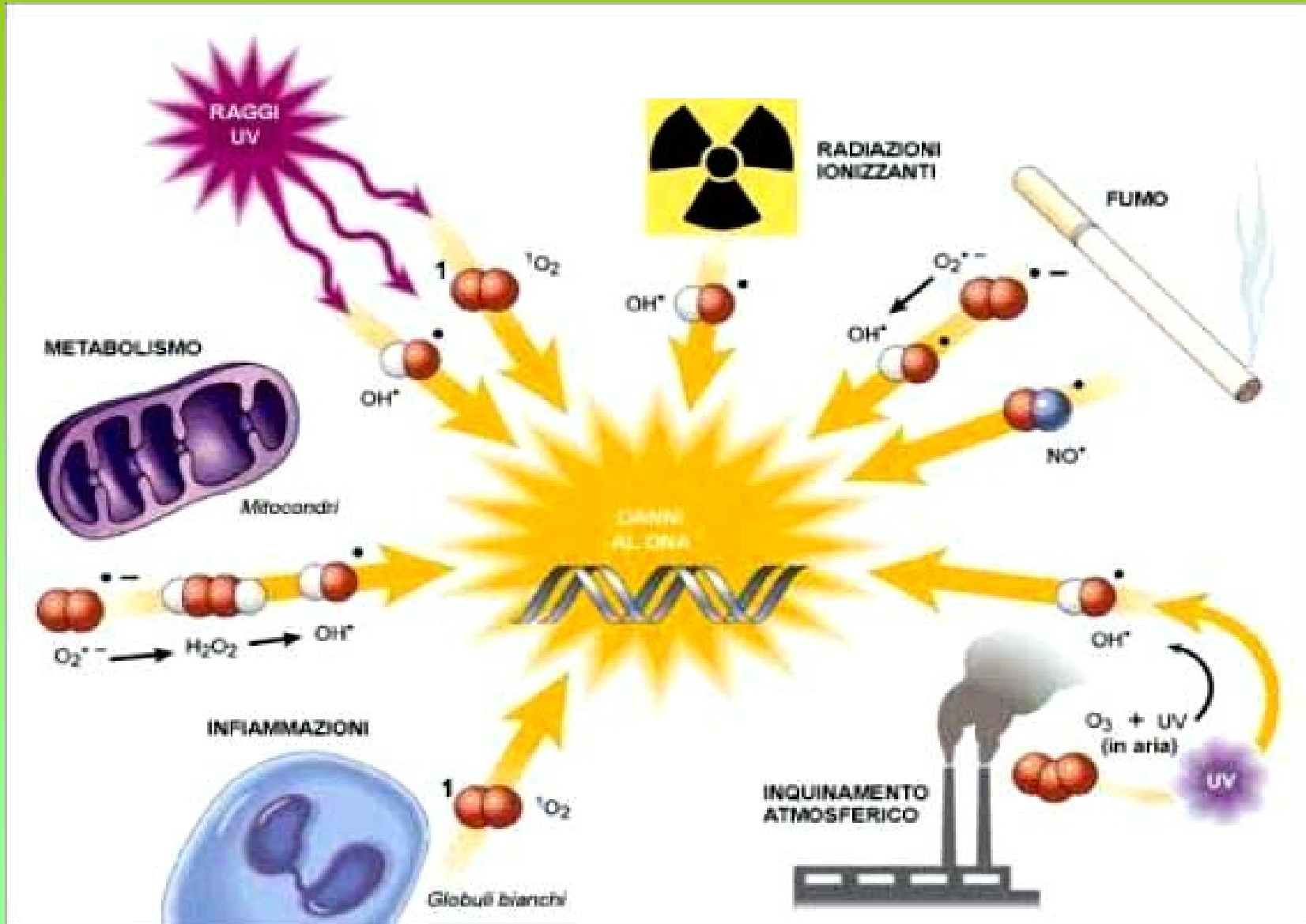


**anticarcinogenica**

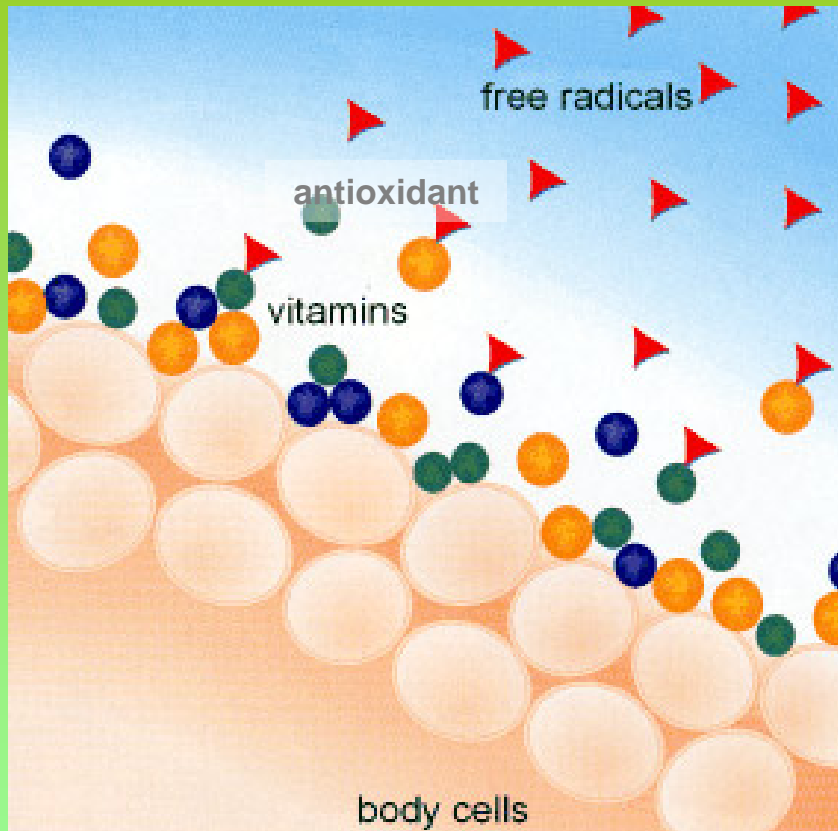
**antinfiammatoria**



# Fonti di radicali liberi



# Antiossidanti



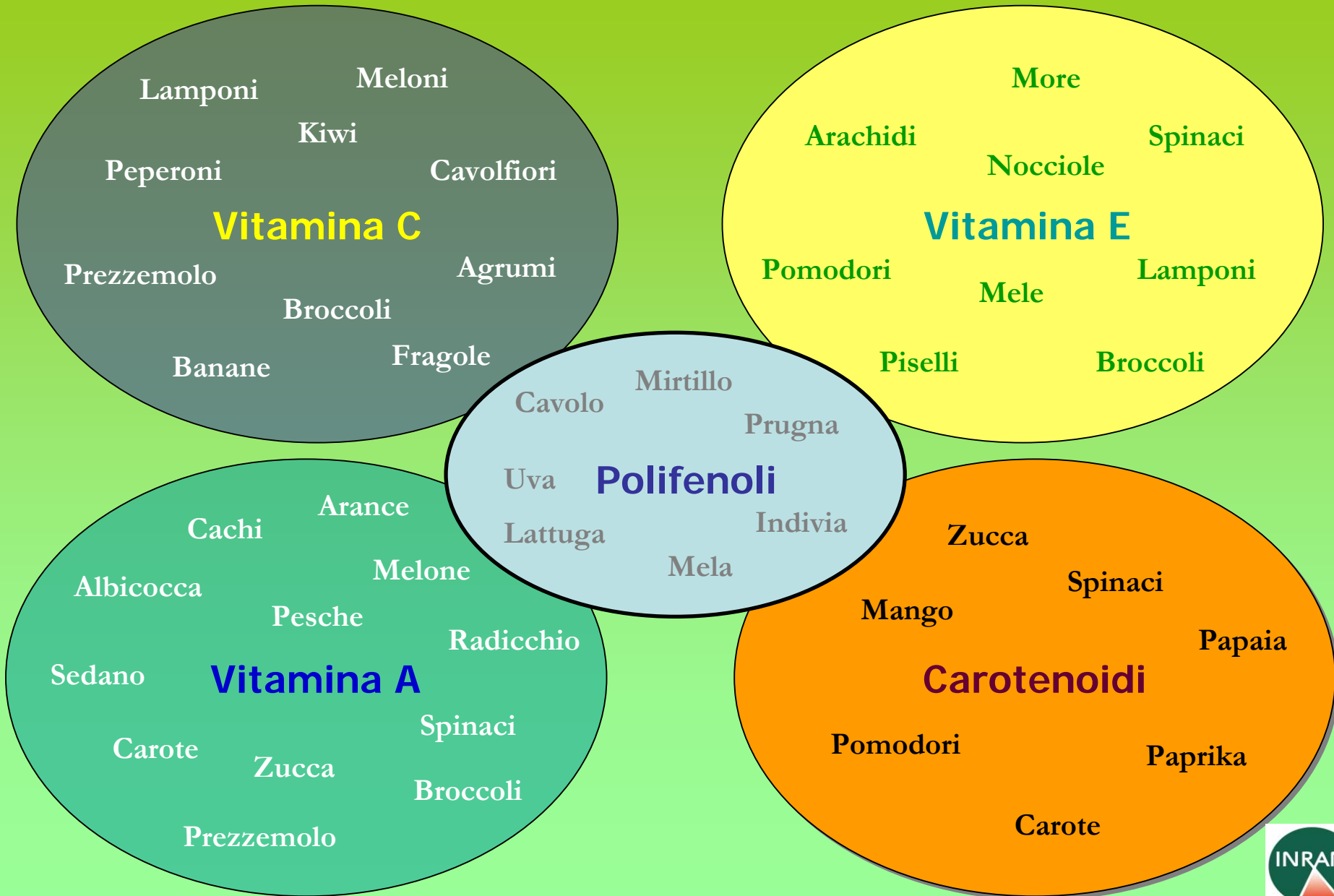
## ENDOGENI

- ❖ SOD
- ❖ CAT
- ❖ GSP<sub>x</sub>

## ESOGENI

- ❖ Vitamina C
- ❖ Vitamina E
- ❖ Vitamina A
- ❖ Carotenoidi
- ❖ Polifenoli
- ❖ Acidi Fenolici

# Antiossidanti esogeni



# Overview of observational epidemiological studies on diet and risk of cancer

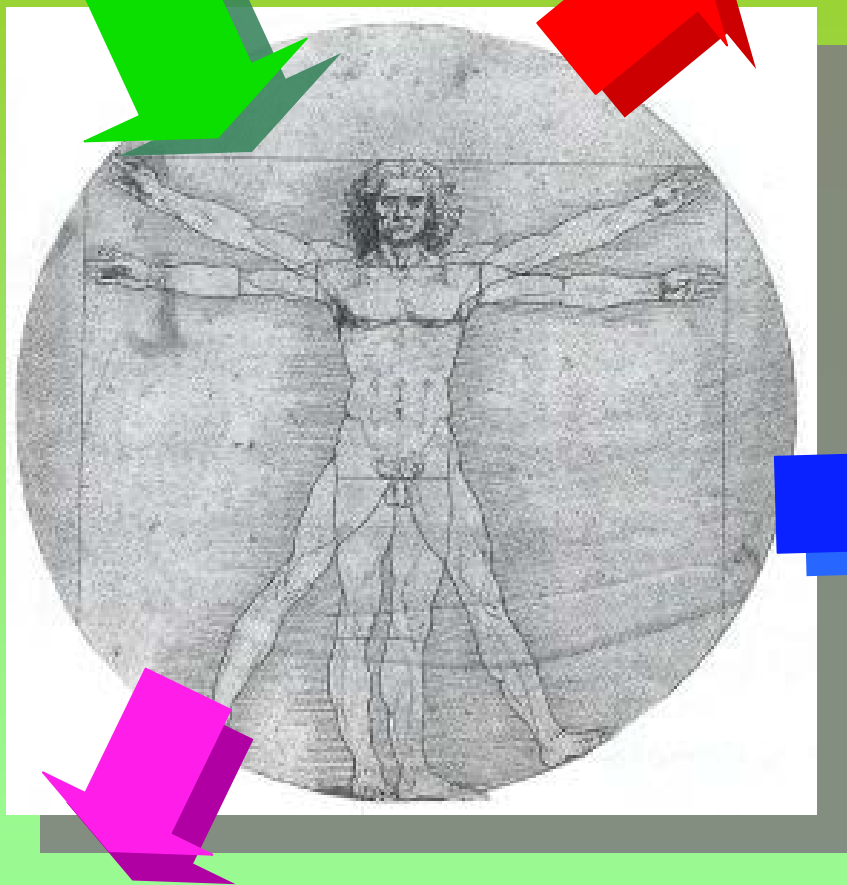
Reference	Study	Sample	Food Assessed	Association	Outcome
Gandini et al, 1999	Meta-analysis of 26 studies	23038 cases	Vegetables and Fruits	– (vegetables RR = 0.75; fruits RR = 0.94)	Breast cancer risk
Kolonel et al, 2000	Multiethnic case-control	1619 prostate cancer patients 1618 control subjects	Vegetables and Fruits	– (cruciferous RR = 0.67; yellow-orange vegetables RR = 0.61)	Prostate cancer risk and development
Feskanich et al, 2000 Michels et al, 2000	Nurses' Health Study	77283 women	Vegetables and Fruits	– (21 % reduction, RR = 0.79) 0	Lung cancer risk Colon and rectal cancer risk
Feskanich et al, 2000 Michels et al, 2000	Health Professionals' Follow-up Study	47778 men	Vegetables and Fruits	0 (RR = 1.12) in the whole group; decrease of the risk on non-smokers (RR = 0.63). 0	Lung cancer risk Colon and rectal cancer risk
Etminan et al, 2004	Meta-analysis of 21 trials	11039 subjects	Tomato products	– RR = 0.89; high intake group	Prostate cancer risk

–: inverse association; 0 = no association; RR = relative risk

# Studi di supplementazione e di intervento

Dieta

Deficienze di parametri nutrizionali  
Supplementazioni di micronutrienti



Influenza sui markers di  
malattie degenerative e  
stato redox

Assorbimento di composti  
bioattivi (e.g. provitamine,  
vitamine, composti fenolici)

Ricerca di nuovi markers delle  
malattie correlati alla dieta.





Frutta, verdura, cereali sono le principali fonti di molecole bioattive naturali per gli uomini, ma le correlazioni tra intake e livelli plasmatici di queste molecole sono variabili. Questa variabilità potrebbe essere attribuita alla biodisponibilità di queste molecole.

## Biodisponibilità

La **biodisponibilità** di un componente della dieta o di un alimento, viene definita come la velocità e l'entità con la quale una sostanza attiva viene assorbita e diventa disponibile nel sito di azione

La biodisponibilità può variare in relazione a numerosissimi fattori, dipendenti in parte dalla natura dell'alimento ed in parte dalle caratteristiche dell'organismo che lo assume. Come tali, questi fattori si distinguono in:

- **intrinseci**, legati cioè all'individuo: età, sesso, stato fisiologico, nutrizionale e di salute, microflora intestinale, genotipo, eventuali intolleranze ecc.
- **ed estrinseci**, legati cioè alla fonte nutrizionale: forma chimica del minerale, interazione con altri nutrienti, cottura, pH, trattamenti tecnologici, presenza di fattori antinutrizionali che ne limitano l'assorbimento o, viceversa, di altri che lo esaltano.



# Livello 1- Trattamenti pre-raccolta



*Fattori genetici*

*Specie*

*Cultivar*

## *Pratiche agronomiche*

*Caratteristiche del terreno*

*Esposizione luce solare*

*Irrigazione*

*Stagione*

*Luogo geografico*

*Condizioni pedo-climatiche*

*Fertilizzazione*

*Grado di maturazione*

*Tempo di raccolta*

*Metodo di raccolta*



# Trattamenti post-raccolta

## Livello 2

### *Processi tecnologici*

*Blanching*  
*Pastorizzazione*  
*Congelamento*  
*Conservazione in scatola*  
*Macinazione*  
*Essiccamento*  
*Trattamenti alte P*  
*Cottura*  
*Conservazione*



## Livello 3

### *Trattamenti domestici*

*Cottura*  
*Conservazione*  
*Modalità di consumo*





# FRAGOLA: effetto cultivar

## Capacità Antiossidante Totale e composti bioattivi nei differenti ecotipi di fragole

Product	FRAP mmol/kg	TRAP mmol/kg	Coumaric acid mg/100 gr	Quercetin mg/100 gr	Kaempferol mg/100 gr	Vitamin C mg/100gr
Mara des Bois	17.78±0.43 <sup>b</sup>	9.87±0.28 <sup>b</sup>	1.24±0.20 <sup>b</sup>	3.10±0.04 <sup>b</sup>	1.56±0.59 <sup>b</sup>	49.8±3.5
Aprica (wild)	62.85±3.23 <sup>a</sup>	16.31±1.20 <sup>a</sup>	0.80±0.31 <sup>b</sup>	2.46±0.45 <sup>b</sup>	3.38±0.97 <sup>a</sup>	52.0±3.1
Favetta di Terracina	18.80±0.70 <sup>b</sup>	10.02±0.68 <sup>b</sup>	7.10±1.70 <sup>a</sup>	5.0±0.30 <sup>a</sup>	1.16±0.40 <sup>b</sup>	55.7±2.5 <sup>a</sup>
Commercial	19.74±0.68 <sup>b</sup>	10.34±0.15 <sup>b</sup>	1.87±0.84 <sup>b</sup>	2.06±0.87 <sup>b</sup>	1.14±0.01 <sup>b</sup>	44.2±2.8 <sup>b</sup>

Different superscript letters within a column indicate significant differences by the Bonferroni's test: **a vs b P<0.05**



# POMODORO : sistemi colturali e stagionalità

Bioactive Molecules	Organic			Conventional		
	I year	II year	P	I year	II year	P
Vitamin C	177.3 ± 14.1 <sup>a</sup>	353.0 ± 10.0 <sup>b</sup>	P<0.001	202.9± 14.9 <sup>a</sup>	280.0 ± 9.90 <sup>b</sup>	P<0.001
Lycopene	21.3 ± 4.5	12.2 ± 3.0	P<0.001	24.0 ± 5.0	17.7 ± 5.0	P<0.001
B-carotene	6.1 ± 0.9 <sup>c</sup>	2.5 ± 1.1	P<0.001	4.7 ± 1.2 <sup>c</sup>	1.88 ± 1.1	P<0.001
Chlorogenic Acid	2.82±0.92	4.04 ± 0.57	P<0.007	3.52±0.74	4.25 ± 0.22	n.s.
Coumaric Acid	3.35±0.48 <sup>d</sup>	1.39 ± 0.21	P<0.001	2.79±0.42 <sup>d</sup>	1.70 ± 0.47	P<0.001
Caffeic Acid	3.29±0.33	5.03 ± 0.17	P<0.001	3.61±0.71	4.85 ± 0.98	P<0.01
Naringenin	41.52±17.71	59.4 ± 7.95 <sup>e</sup>	P<0.005	34.56±11.16	40.2 ± 9.23 <sup>e</sup>	n.s.
Rutin	36.66±17.72	45.9 ± 5.84 <sup>f</sup>	n.s.	37.06±6.68	23.2 ± 7.73 <sup>f</sup>	n.s.
Quercetin	17.92±10.95 <sup>g</sup>	17.8 ± 1.48 <sup>h</sup>	n.s.	33.90±6.31 <sup>g</sup>	8.72 ± 2.18 <sup>h</sup>	P<0.001

a Conventional versus Organic P<0.05

b Organic versus Conventional P < 0.001

c Organic versus Conventional P<0.05

d Organic versus Conventional P<0.05

e Organic versus Conventional P<0.05

f Organic versus Conventional P<0.05

g Conventional versus Organic P<0.001

h Organic versus Conventional P<0.05



## CARCIOFO : cottura

<b>Polifenoli (mg/100 g edibile)</b>	<b>Crudo</b>	<b>Cotto</b>
	<b>media±ds</b>	<b>media±ds</b>
Acido clorogenico	276.1± 30.9	307.5± 10.3
Acidi monocaffeoilchinici totali	16.9± 1.0	66.7± 0.6
Cinarina	0± 0	18.3± 0.5
Acidi dicaffeoilchinici totali	309.7± 21.8	396.3± 8.4
Luteolina-glucoside	7.5± 0.2	7.9± 0.3
Apigenina-glucoside	10.0± 0.7	9.8± 0.1

*British Journal of Nutrition (2007), 97, 963–969*





## Brassicaceae: effetto cottura

	Decremento % in GLS
<i>Cavolfiore violetto</i>	
CV157 marzo (tipico)	68
CV161 marzo (tipico)	74
BR13S1D marzo (tipico)	55
Cultivar dicembre (tipico)	73
<i>Broccoletto siciliano</i>	
Nero marzo (tipico)	73
Verde maro (tipico)	69
Cultivar dicembra (tipico)	87



# Conservazione domestica

## Total antioxidant capacity and bioactive compounds of the experimental meal.

	Fresh Strawberries	Stored Strawberries	Statistic
FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{+2}/300\text{g}$ )	6.96 $\pm$ 0.41	6,89 $\pm$ 0.48	n.s
TRAP (mmol/300gr)	2.65 $\pm$ 0.29	2,85 $\pm$ 0.37	n.s
$\alpha$ -carotene ( $\mu\text{g}/300\text{ gr}$ )	20.58 $\pm$ 5.48	37,53 $\pm$ 7,73	P< 0.05
Vitamin C (mg/300 gr)	119.7 $\pm$ 23.2	127.3 $\pm$ 30.2	n.s
Coumaric acid (mg/300gr)	4.44 $\pm$ 0.93	4.38 $\pm$ 1,52	n.s
Quercetin (mg/300 gr)	10.41 $\pm$ 4.57	19.79 $\pm$ 11.46	P<0.05
Kampferol (mg/300 gr)	5.57 $\pm$ 1.71	9.44 $\pm$ 3.63	P<0.05
Cyandin 3-glucoside (mg/300)	0.20 $\pm$ 0.22	0.20 $\pm$ 0.05	n.s
Pelargonidin 3-glucos (mg/300g)	8.93 $\pm$ 4.20	6.66 $\pm$ 0.97	P<0.05
Pelargonidin malonil–gluc (mg/300g)	0.28 $\pm$ 0.32	0.22 $\pm$ 0.12	n.s
Pelargonidin acetil–gluc (mg/300g)	0.16 $\pm$ 0.16	0.11 $\pm$ 0.10	n.s

mean  $\pm$ sd, Anova –Repeated measures

# Effetti delle metodiche e dei tempi di conservazione

**Durante la conservazione a temperature tra  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$  un decremento di licopene era osservato nei meloni.**



**Davis AR, Fish WW, perkins-Veazie PP: A Rapid Hexane-free Method for Analyzing Lycopene Content in Watermelon. Journal of Food Science 68 (1): 328-332 (2003).**



**Conservazione a  $7-9^{\circ}\text{C}$  per 5 giorni, porta ad una riduzione del contenuto di luteina.**

**De Azevedo-Meleiro CH & Rodriguez-Amaya DB: Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. Journal of Food Composition and Analysis. 18(8): 845-855 (2005).**

**Am J Clin Nutr 2005;81(suppl):230S– 42S.**

**Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies 1–3**

**Claudine Manach, Gary Williamson, Christine Morand, Augustin Scalbert, and Christian Rémésy**

**ABSTRACT**

Polyphenols are abundant micronutrients in our diet, and evidence for their role in the prevention of degenerative diseases is emerging. Bioavailability differs greatly from one polyphenol to another, so that the most abundant polyphenols in our diet are not necessarily those leading to the highest concentrations of active metabolites in target tissues. **Mean values for the maximal plasma concentration, the time to reach the maximal plasma concentration, the area under the plasma concentration-time curve, the elimination half-life, and the relative urinary excretion were calculated** for 18 major poly-phenols.

We used data from 97 studies that investigated the kinetics and extent of polyphenol absorption among adults, after ingestion of a single dose of polyphenol provided as pure compound, plant extract, or whole food/beverage. **The metabolites present in blood, resulting from digestive and hepatic activity, usually differ from the native compounds.** The nature of the known metabolites is described when data are available. The plasma concentrations of total metabolites ranged from 0 to 4  $\mu\text{mol/L}$  with an intake of 50 mg aglycone equivalents, and the relative urinary excretion ranged from 0.3% to 43% of the ingested dose, depending on the polyphenol. Gallic acid and isoflavones are the most well-absorbed polyphenols, followed by catechins, flavanones, and quercetin glucosides, but with different kinetics. The least well-absorbed polyphenols are the proanthocyanidins, the galloylated tea catechins, and the anthocyanins. Data are still too limited for assessment of hydroxycinnamic acids and other polyphenols. These data may be useful for the design and interpretation of intervention studies investigating the health effects of polyphenols.

# Valutazione della biodisponibilità

---

viene effettuata mediante le misurazioni seriate della concentrazione plasmatica e comporta solitamente la determinazione della concentrazione plasmatica massima (di picco) della molecola bioattiva, quella del tempo necessario per raggiungere la concentrazione plasmatica massima (tempo di picco) e il calcolo dell'area al di sotto della curva (concentrazione plasmatica-tempo)

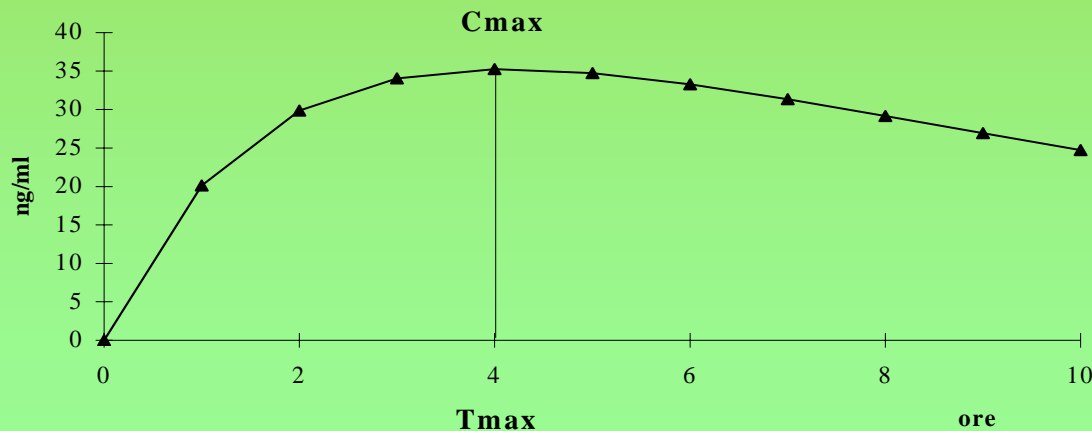
## Parametri farmacocinetici

**C<sub>max</sub> T<sub>max</sub> AUC**

# Stima dei parametri farmacocinetici

## Tmax e Cmax

Il tempo di picco (Tmax) e la concentrazione di picco (Cmax) si ottengono direttamente dalla serie dei dati relativi ai singoli soggetti.

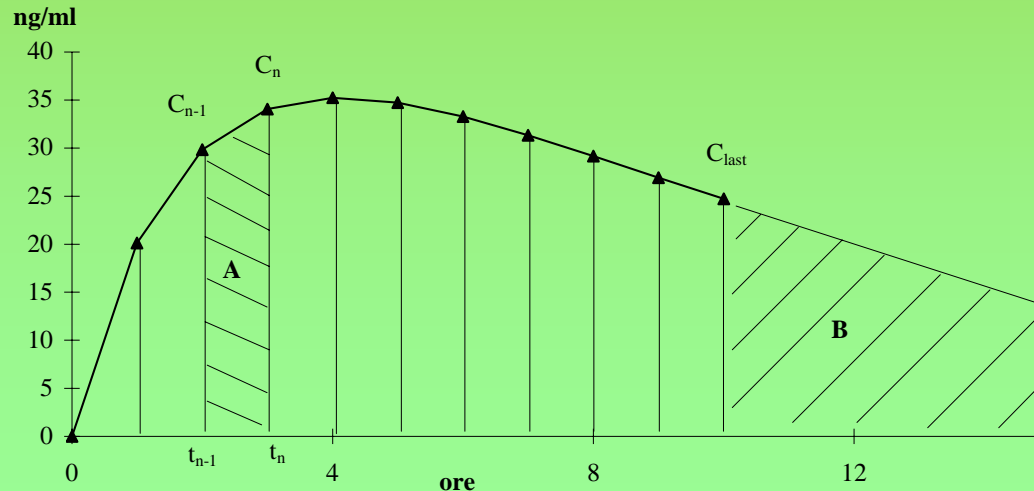


# Stima dei parametri farmacocinetici

## Area sotto la curva: AUC

L'area del trapezio A è:  $(C_{n-1} + C_n) \times (t_n - t_{n-1}) / 2$ .

La parte di area estrapolata ad infinito ( B ) si calcola dalla semivita :  $C_{last} / (0.693 / t_{1/2})$ . Le dimensioni sono sempre date da tempo x concentrazione e nell'esempio riportato si avrà:  $AUC = \text{ng} \times \text{h} \times \text{ml}^{-1}$ .





# CARCIOFO

**Pharmacokinetic parameters of total CGA, CA, FA, DHCA and DHFA absorption in human plasma after consumption of cooked *Cynara scolymus* L (cv Violetto di Provenza) heads.**

Parameter	CGA		DHCA		CA		DHFA		FA	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
$C_{max}(ng\ ml^{-1})$	6.4	1.7	12.1	7.2	19.5	6.9	21.8	9.2	8.4	4.6
$AUC_{0-last}(ng\ ml^{-1}*h)$	9.8	1.6	21.2	6.1	116.1	11.9	58.9	12.3	45.7	5.1
$t_{max}\ (h)$	0.7	0.3	8.0	0.0	1.3	0.7	7.2	1.8	1.1	0.5

CGA, chlorogenic acid; DHCA, dihydrocaffeic acid; CA, caffeic acid; DHFA, dihydroferulic acid; FA, ferulic acid





# FRAGOLA

## Data of plasma concentration of phenolic acids

	4-hydroxybenzoic acid		Protocatechuic acid		Coumaric acid	
	Fresh	Stored	Fresh	Stored	Fresh	Stored
<b>C<sub>max</sub> (μmol/L)</b>	<b>2.5 ±0.7</b>	<b>2.0 ± 0.4</b>	<b>0.17 ±0.03</b>	<b>0.15 ±0.03</b>	<b>0.37±0.06</b>	<b>0.29±0.06</b>
<b>AUC (μmol·h/L)</b>	<b>7.6 ±0.2</b>	<b>5.6 ± 0.2</b>	<b>0.18 ±0.01</b>	<b>0.10±0.01</b>	<b>0.62±0.02</b>	<b>0.45 ±0.02</b>
<b>t<sub>max</sub> (h)</b>	<b>1.9 ± 0.3</b>	<b>1.6 ± 0.2</b>	<b>3.8 ± 0.8</b>	<b>2.9 ± 0.5</b>	<b>1.3 ± 0.4</b>	<b>1.4 ± 0.4</b>

*mean*±SEM. *C* max, maximum plasma concentration; *t* max, time to reach the maximum plasma concentration; AUC area under the curve from zero to the last sampling time.

# Valutazione dell'intake delle molecole bioattive

La validazione degli intakes di nutrienti è basata su:

- la disponibilità e l'accuratezza di dati di composizione alimentare
- il metodo per valutare l'intake dovrebbe essere validato

A livello individuale e di gruppo, è complicato a causa di:

a) L'alta variabilità all'interno e tra i soggetti

b) L'accuratezza associato con i metodi della validazione della dieta

c) L'inconsistenza nelle tabelle e nei databases composizione alimentare



# Impatto dell'alimento sulla salute del consumatore

## Identificazione e caratterizzazione di molecole bioattive

Studi in vivo

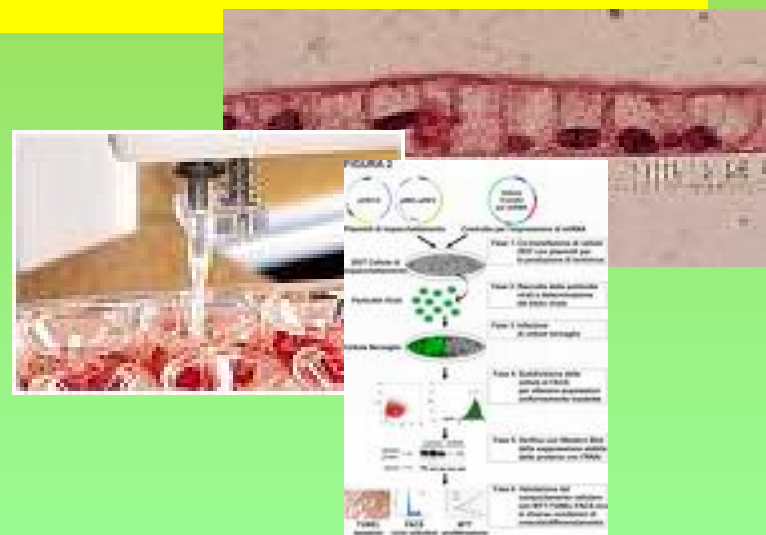
Assorbimento e metabolismo di molecole bioattive

Studi in vitro

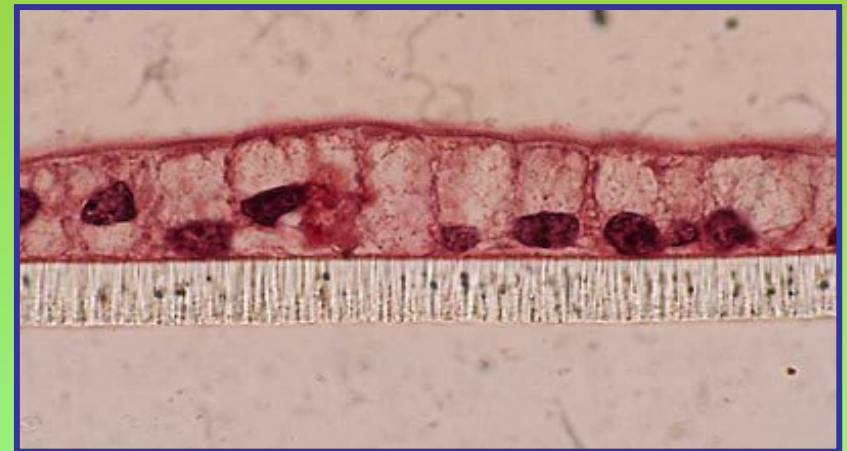
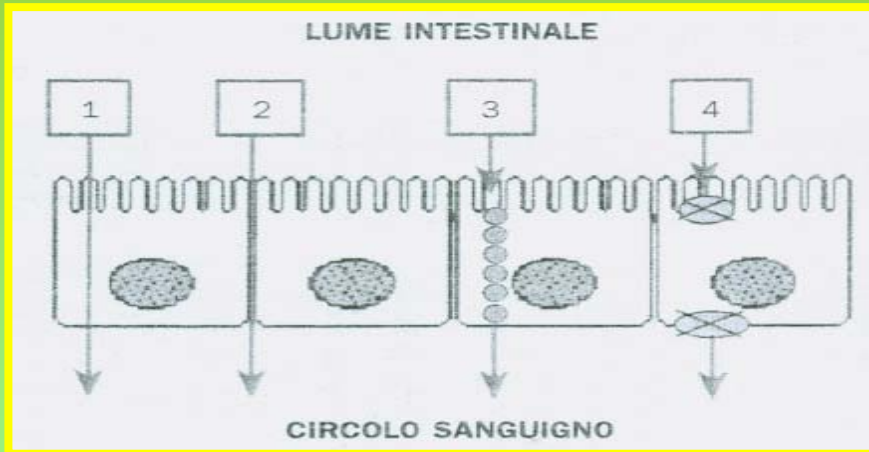
Capacità ed efficacia antiossidante di alimenti e/o componenti di alimenti

Impatto di alimenti e/o componenti di alimenti sulla salute del consumatore

# Biodisponibilità: studi *in vitro* su linee cellulari



# MODELLI CELLULARI

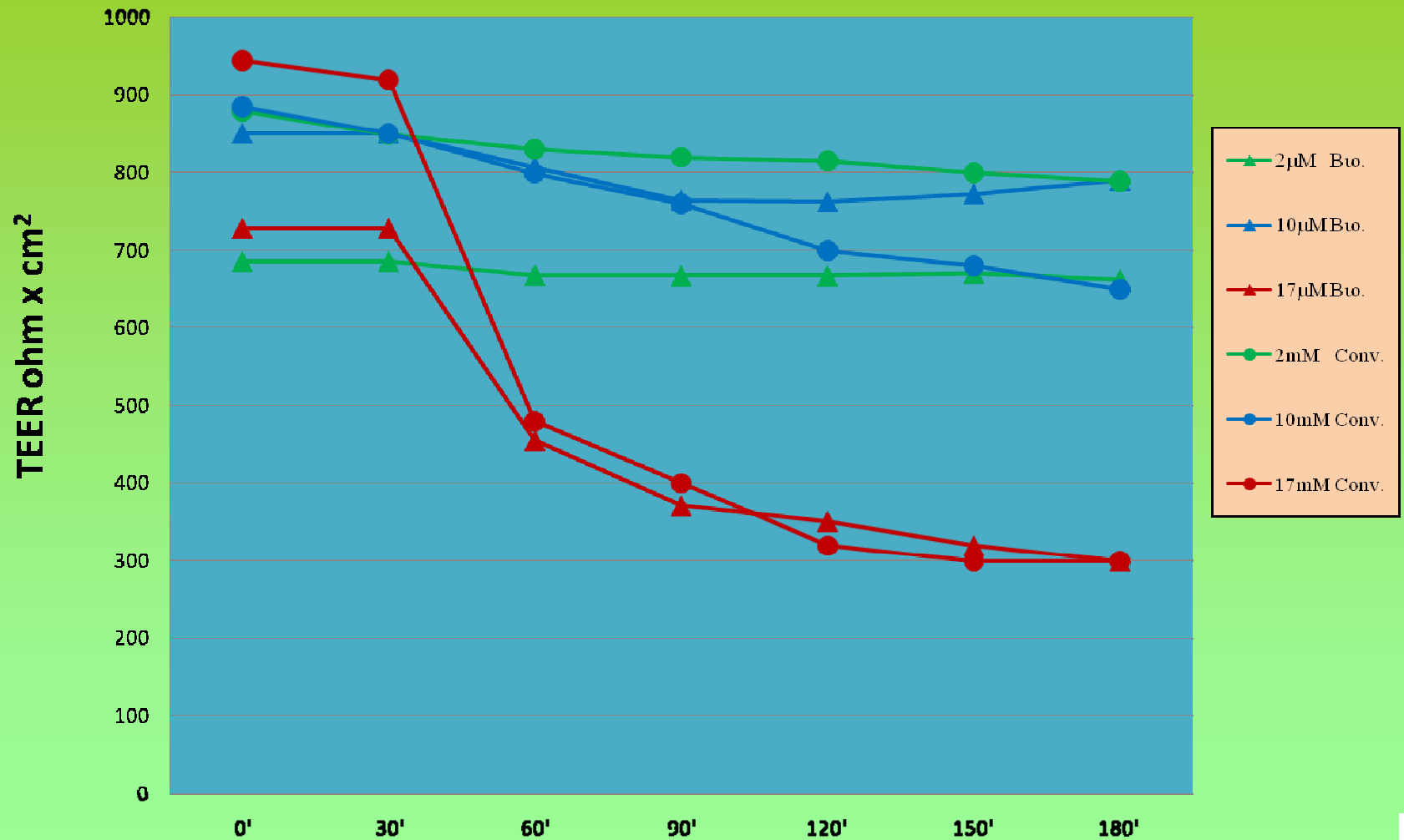


- 1-via transcellulare
- 2-via paracellulare
- 3-via transcitotica
- 4-via mediata da trasportatori apicali e basolaterali

**Cellule di CaCo2 di adenocarcinoma umano del colon**

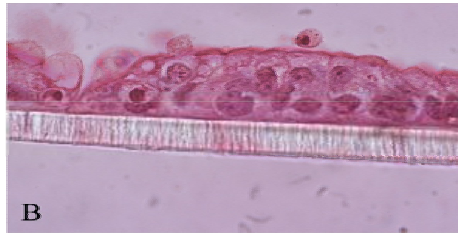


## Estratto polifenolico da pomodoro BIO. e CONV.





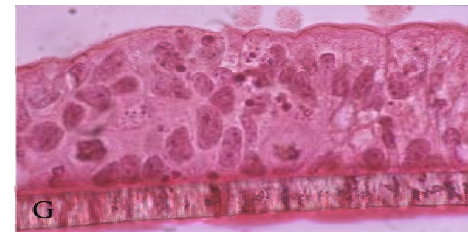
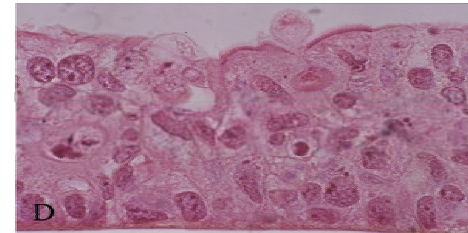
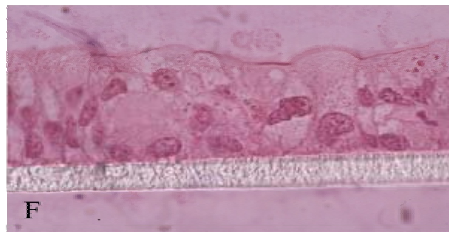
Analisi istologica del su sezioni semifine di 3mm del monolayer colturale di Caco-2 trattato con cocentrazioni crescenti di estratto polifenolico di pomodoro proveniente da agricoltura Biologica e Convenzionale.



**A Control**

**B-C-D 2mM, 10mM, 17mM ORG**

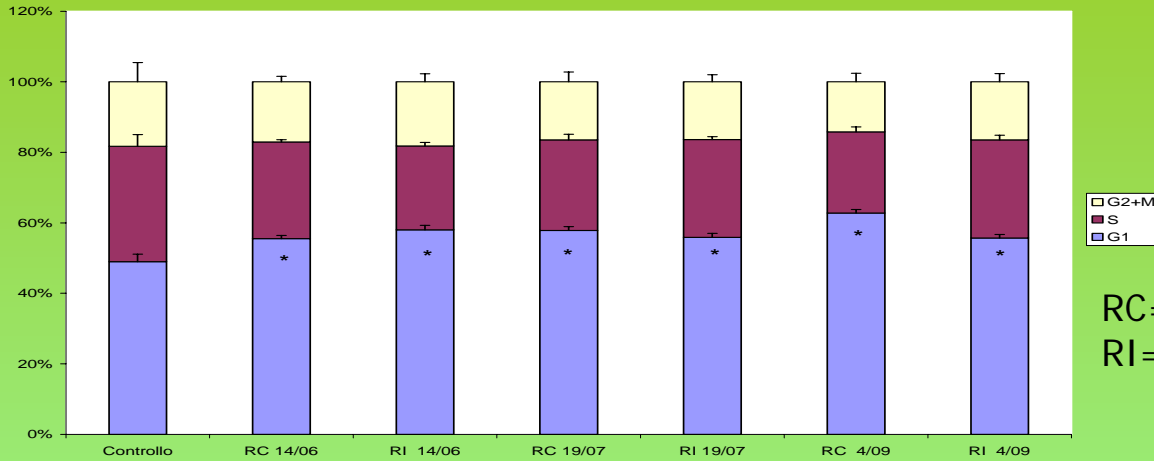
**E-F-G 2mM, 10mM, 17mM CONV**



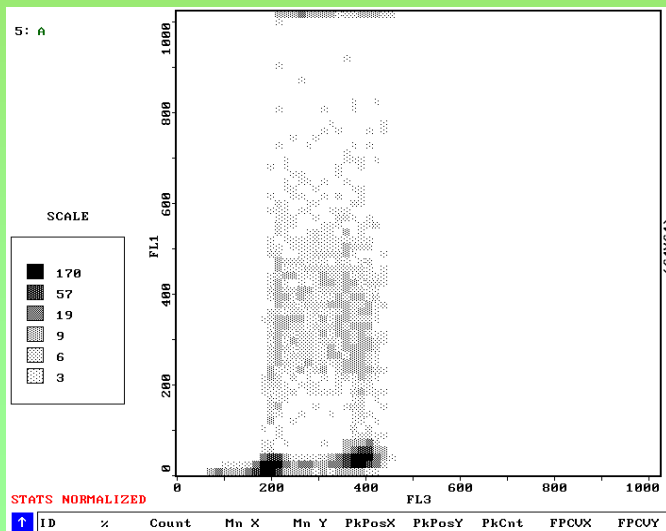


# Ruola: effetti sul ciclo cellulare

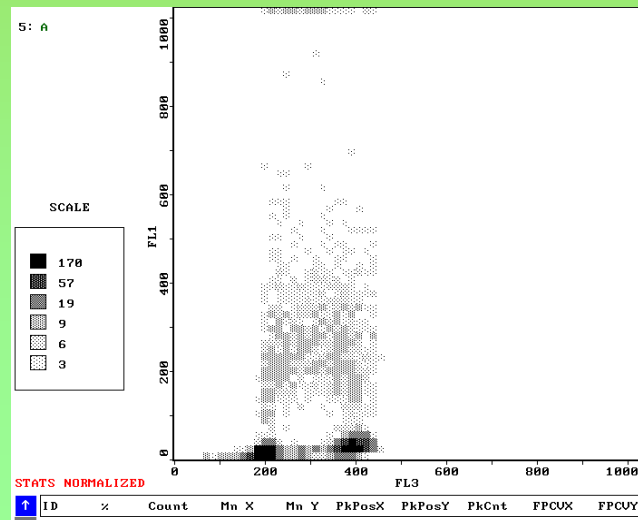
Ruola



RC= Ruola Convenzionale  
RI= Ruola Integrata



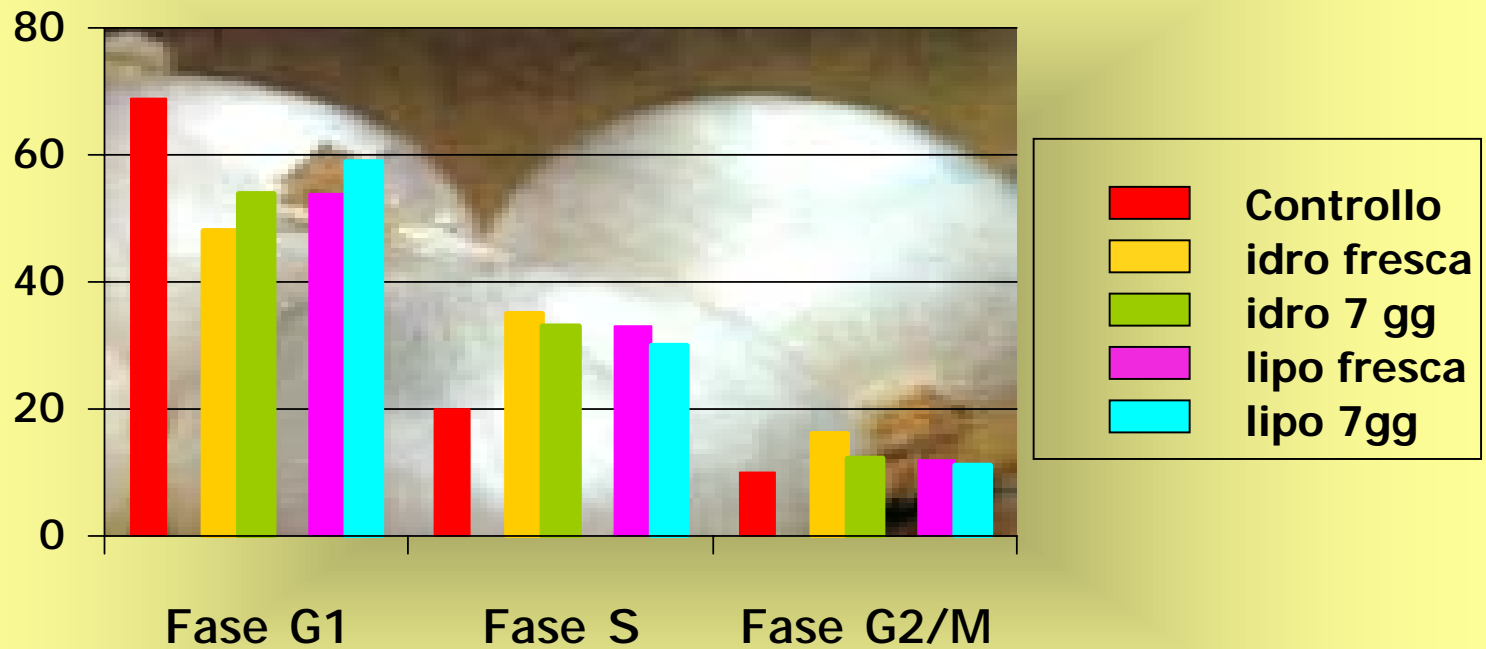
Incorporazione di BrdU in cellule di controllo



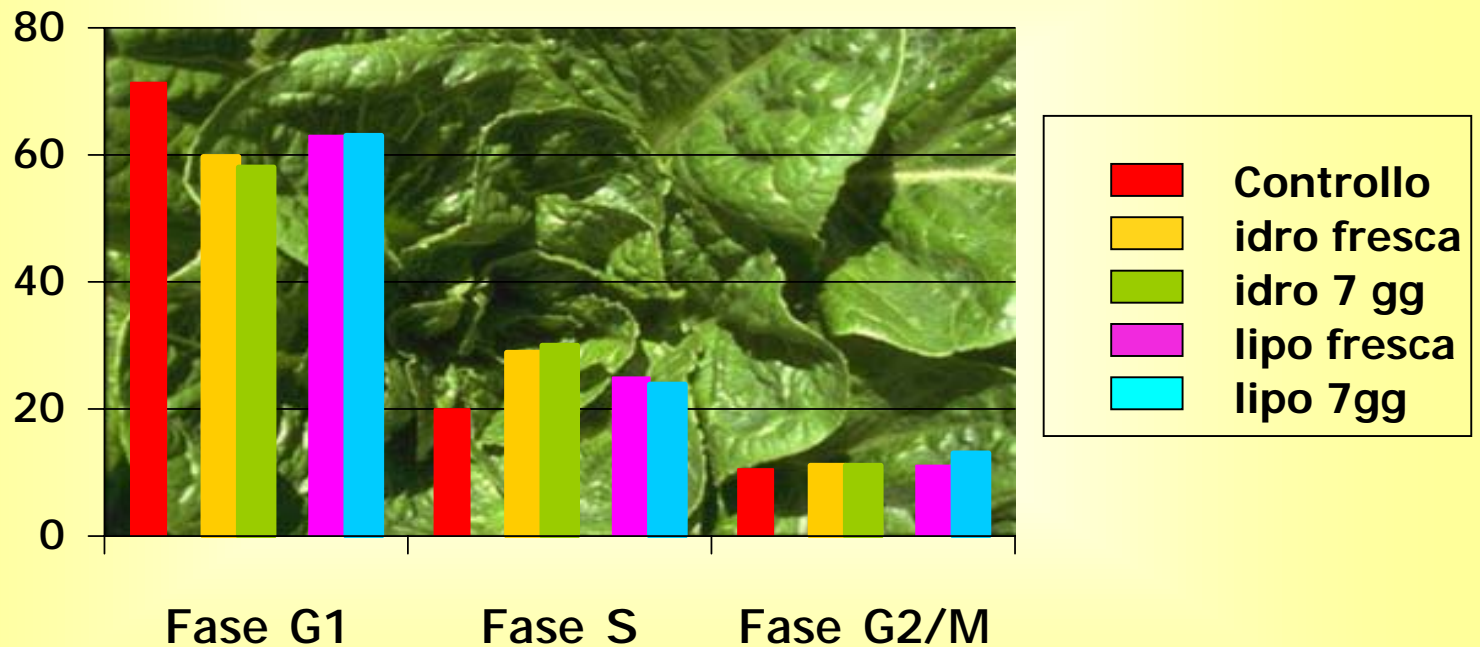
Incorporazione of BrdU in cellule trattate con ruola



Percento di cellule presenti in differenti fasi del Ciclo cellulare prima e dopo incubazione con estratti di **cipolla** in linee cellulari Caco2

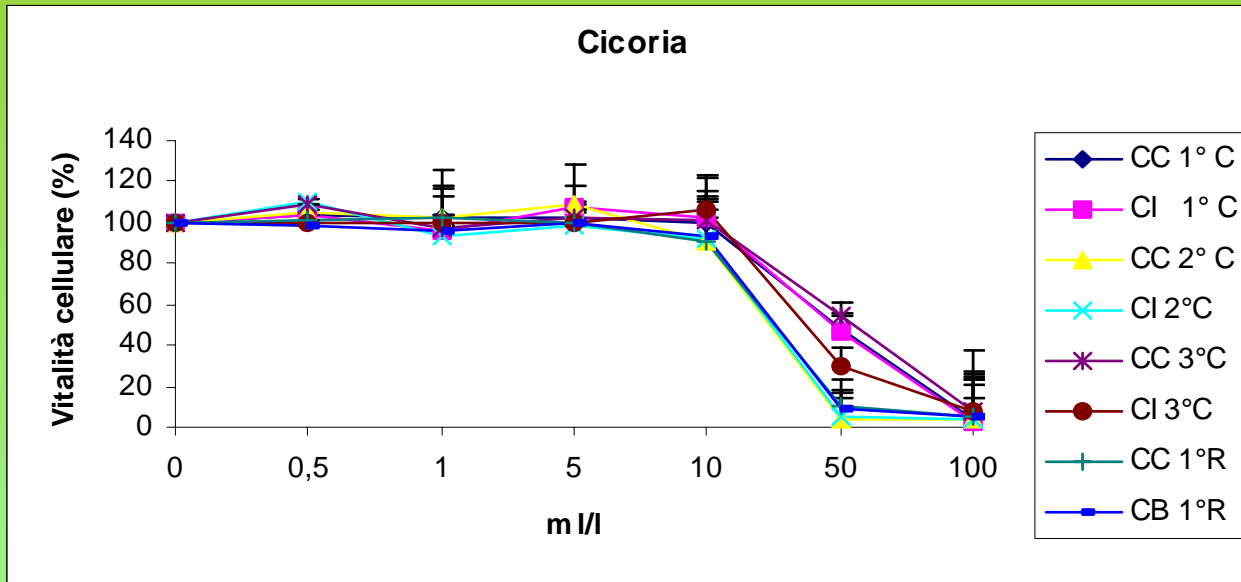


# Percento di cellule presenti in differenti fasi del Ciclo cellulare prima e dopo incubazione con estratti di alimenti in linee cellulari Caco2





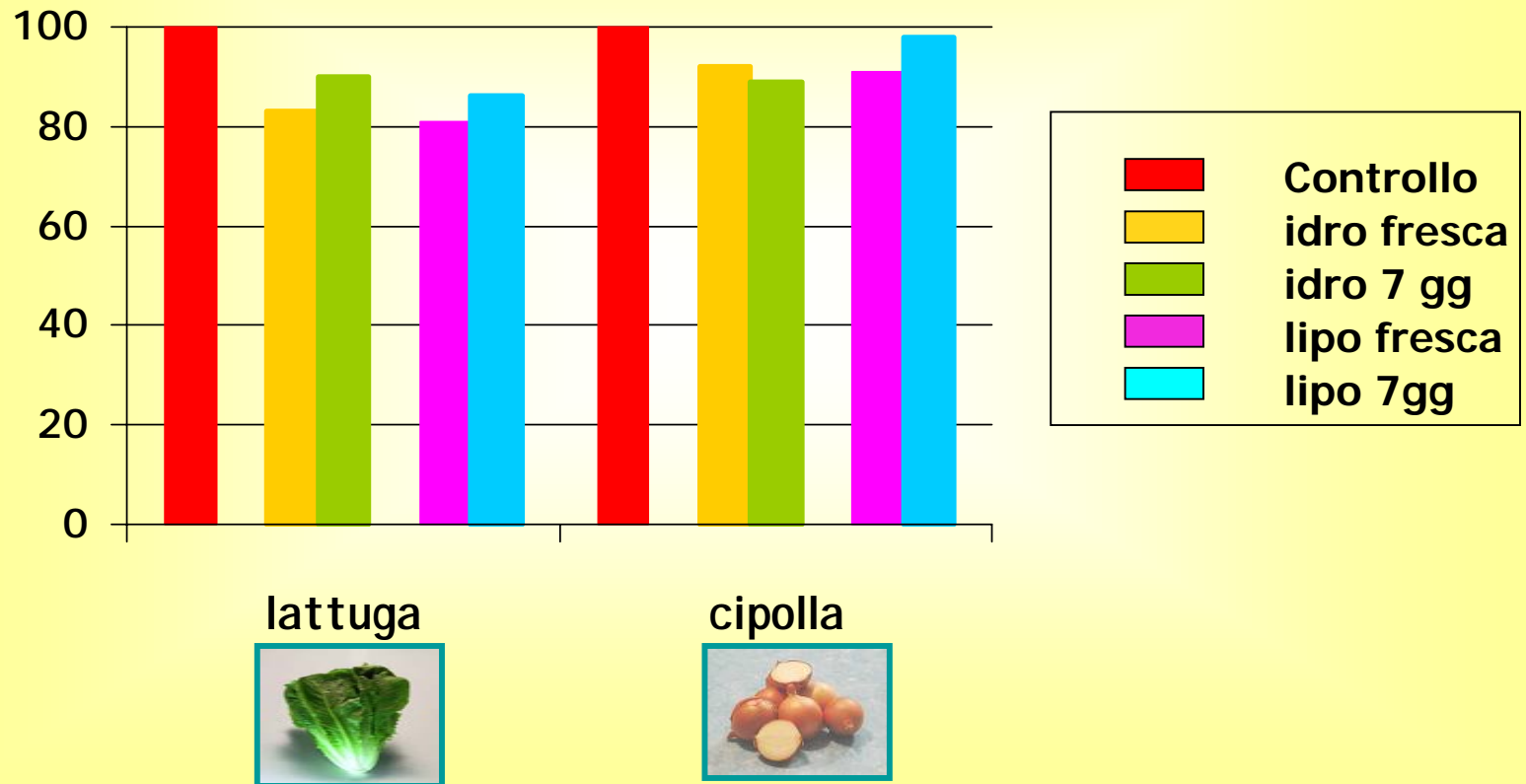
## Cicoria: effetti sulla vitalità cellulare



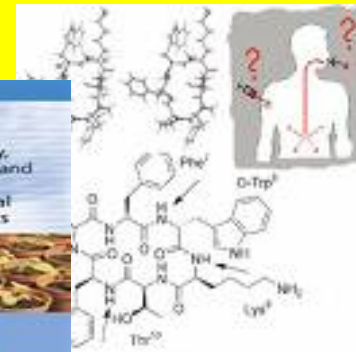
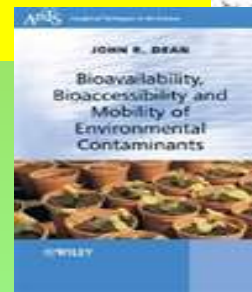
CC= Cicoria Convenzionale; CI= Cicoria Integrata

**Gli estratti di cicoria hanno causato una riduzione della vitalità cellulare alla concentrazione 100ml/l portandola a valori al di sotto del 10%.**

**Percento di sopravvivenza ed effetto tempo di conservazione (+5°C)  
prima e dopo incubazione con estratti di alimenti in linee cellulari Caco2**



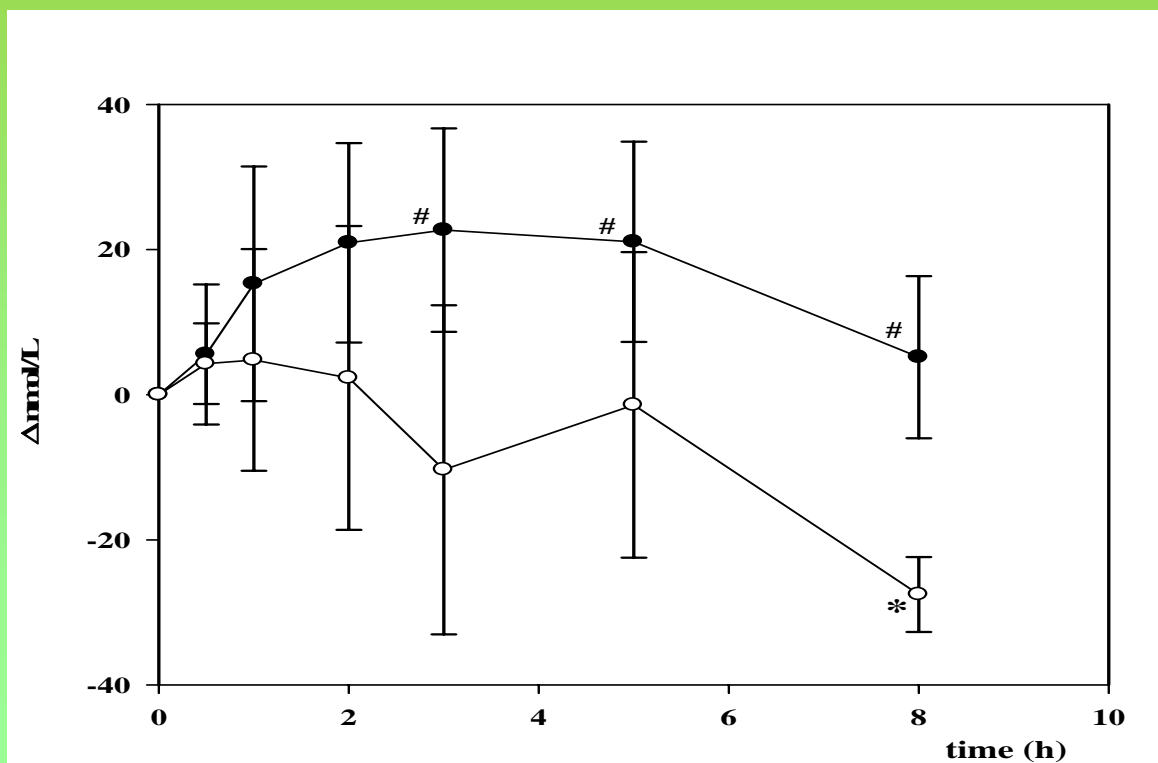
# Biodisponibilità: studi *in vivo* sugli uomini





# FRAGOLA

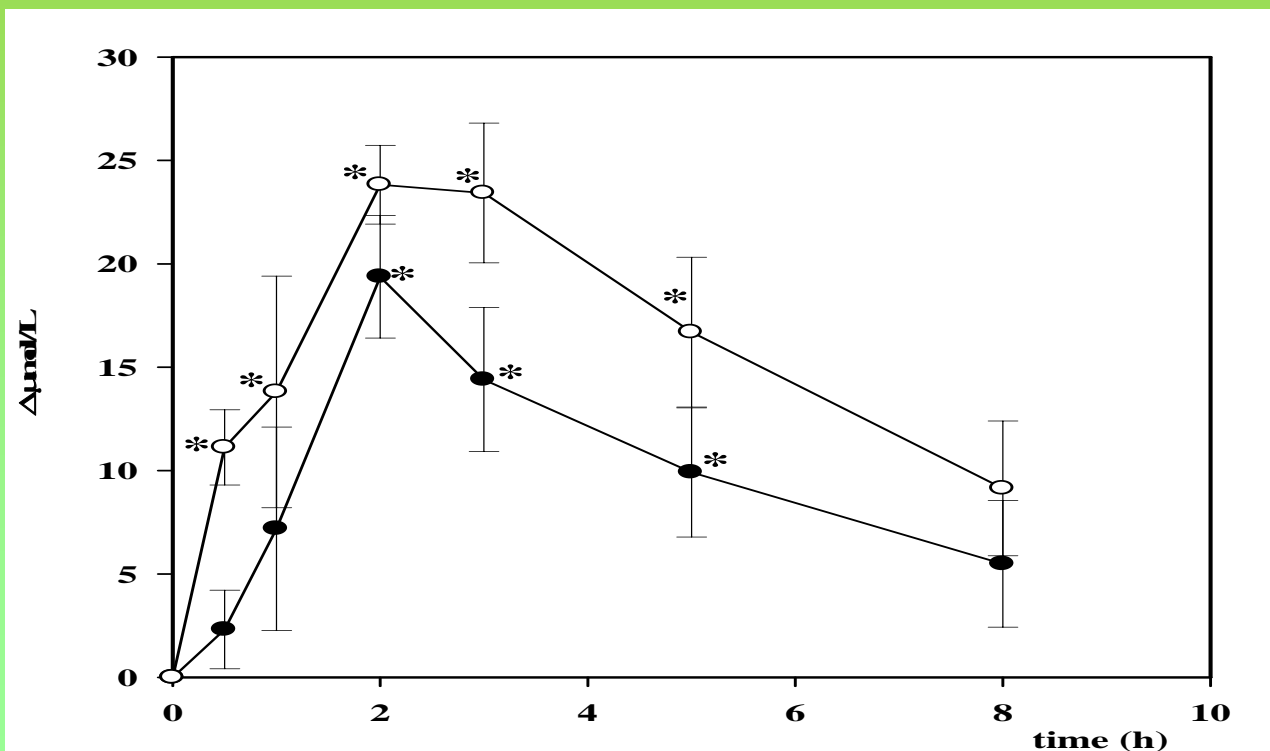
Variations from baseline of **a-carotene** plasma concentrations (nmol/L) upon consumption of 300g fresh (FS, ●) or stored strawberries (SS, ○). Values are mean  $\pm$  SEM (n=13). Note: \* P<0.05 vs baseline; # P<0.05 for FS vs SS





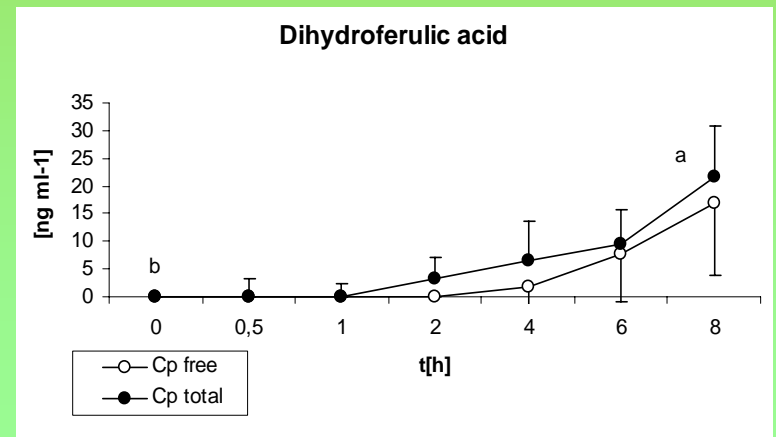
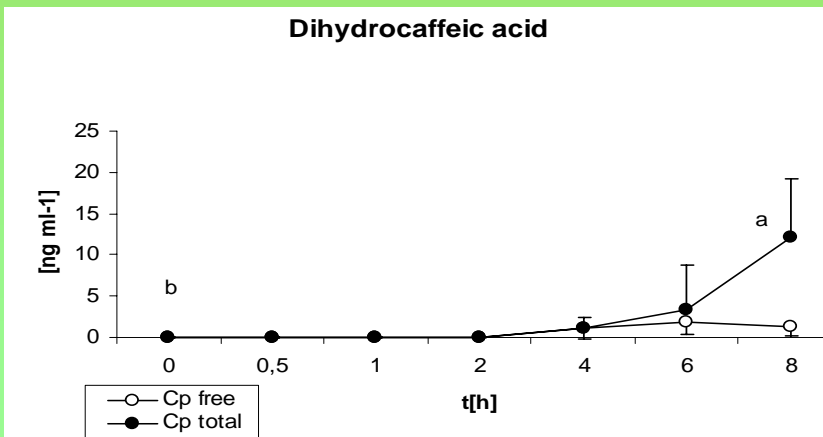
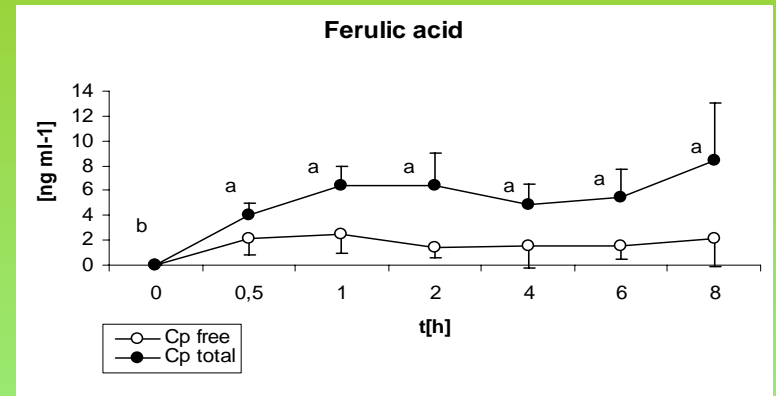
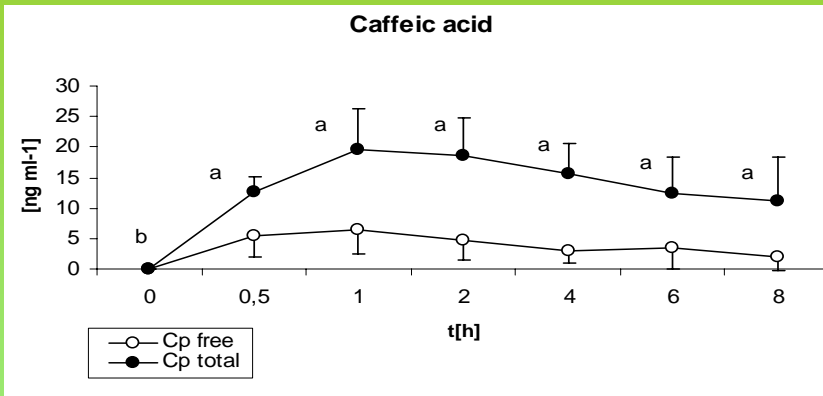
# FRAGOLA

Variations from baseline of **ascorbic acid** plasma concentrations (nmol/L) upon consumption of 300g fresh (FS, ●) or stored strawberries (SS, ○). Values are mean  $\pm$  SEM (n=13). Note: \* P<0.05 vs baseline; # P<0.05 for FS vs SS





# CARCIOFO

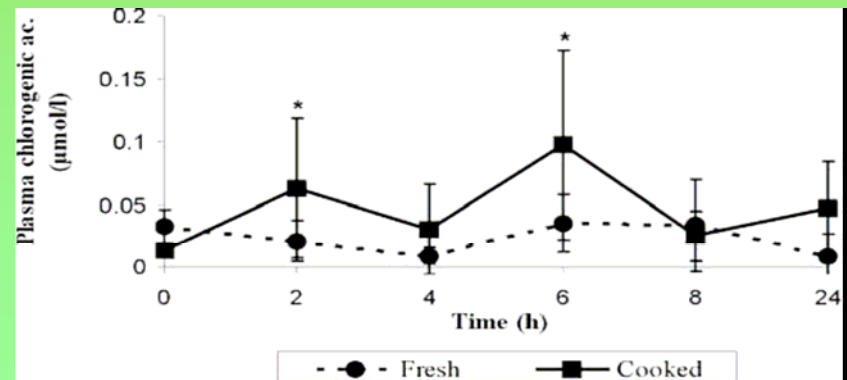
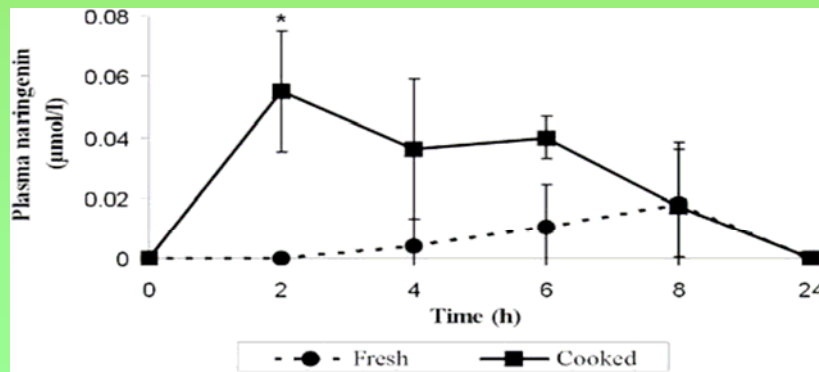
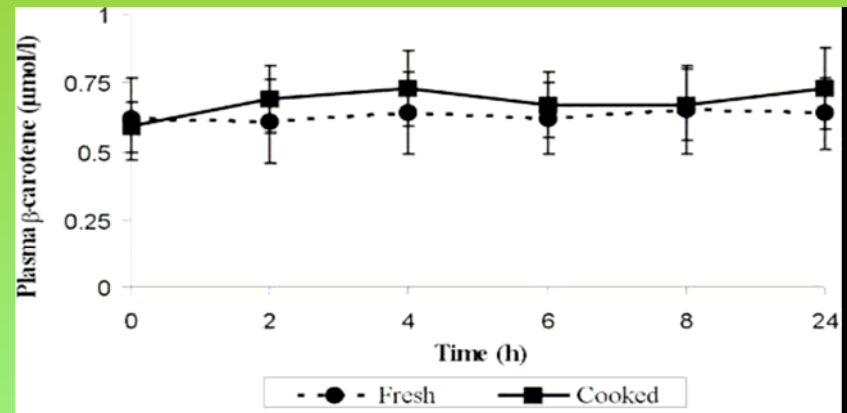
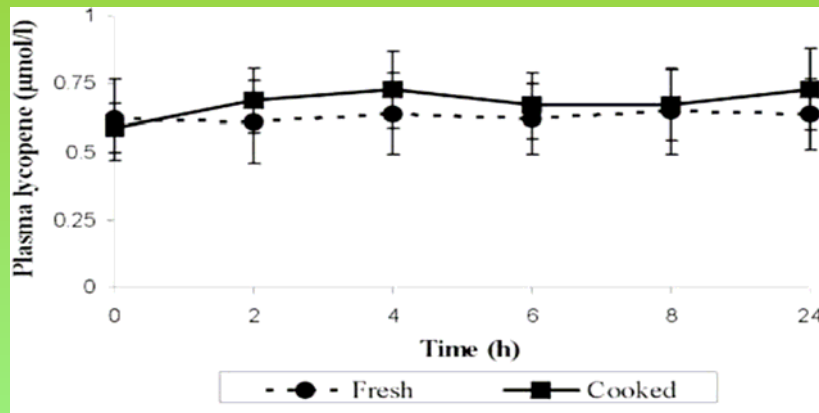




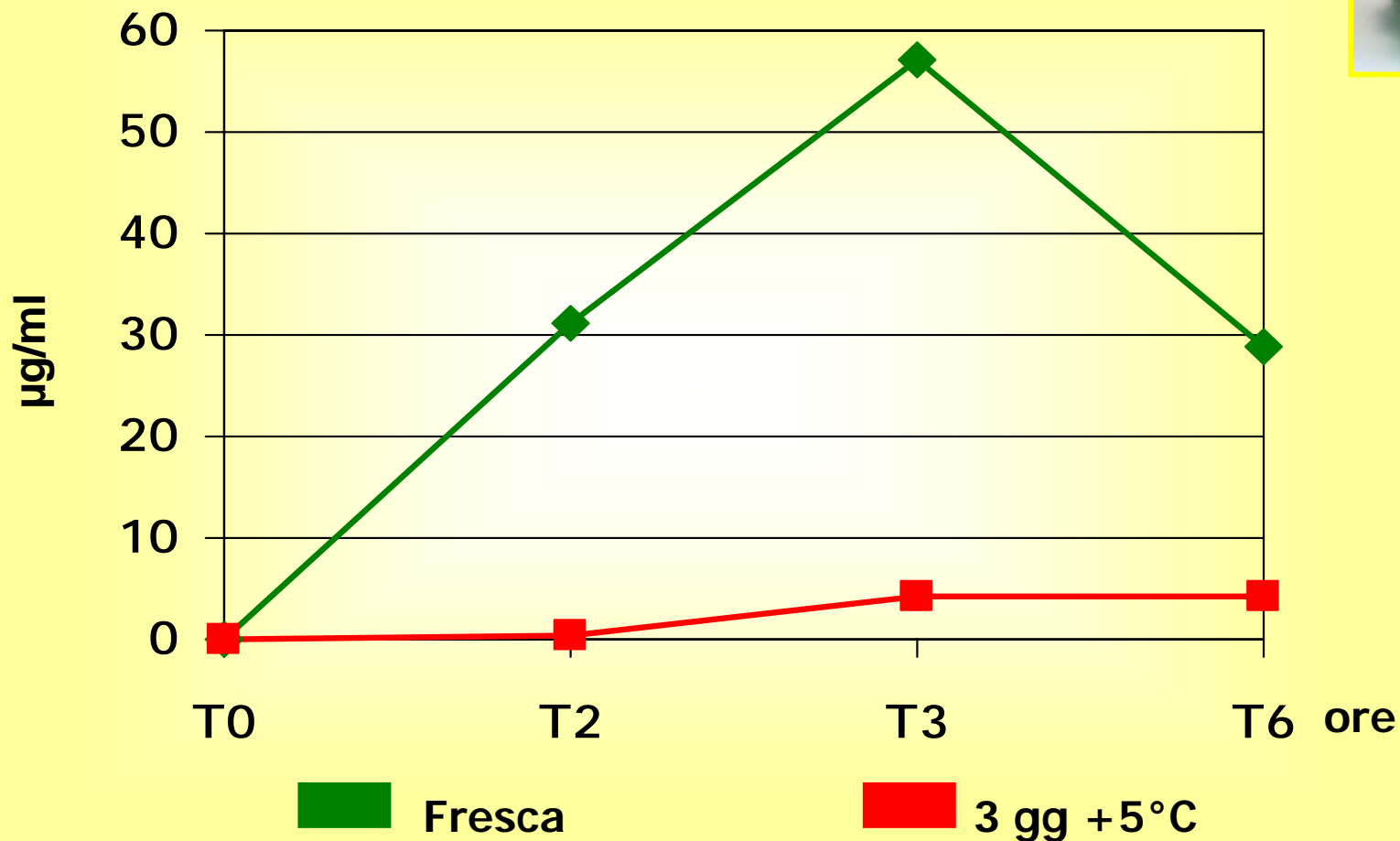


# POMODORO

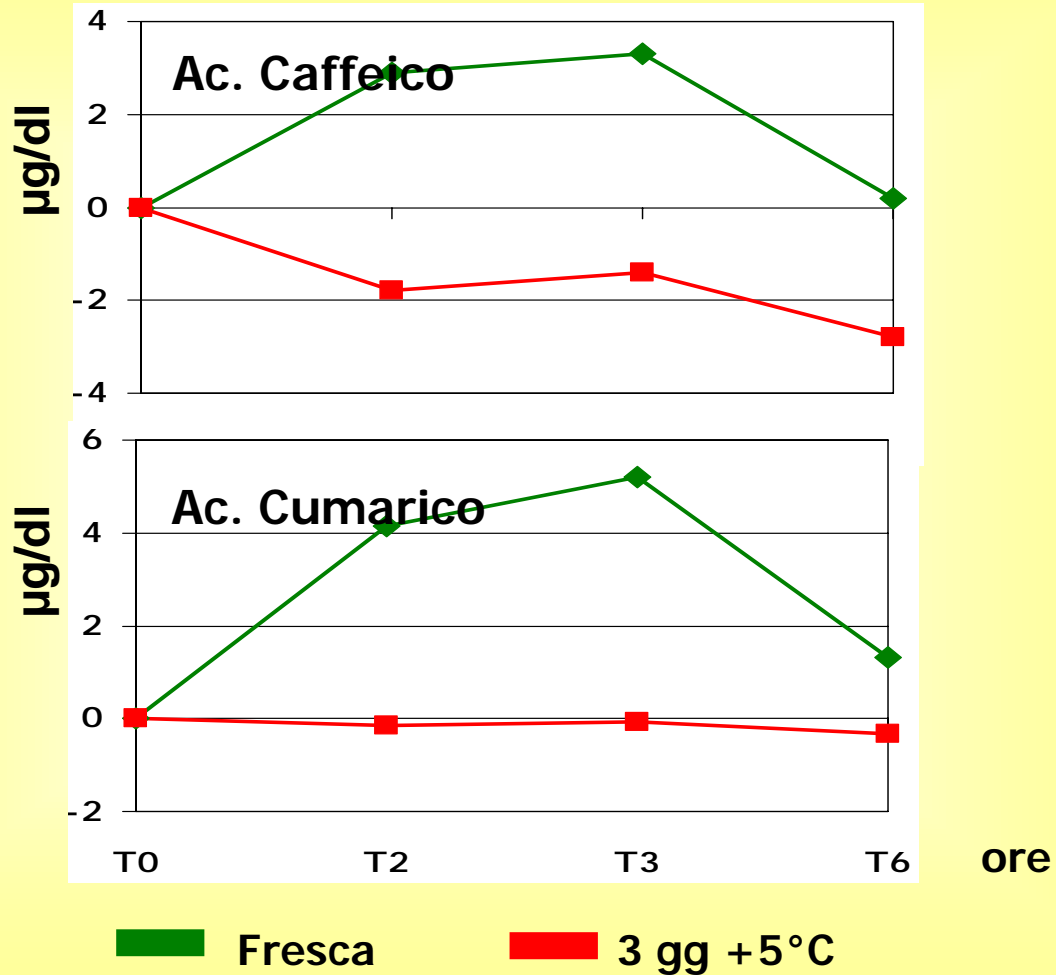
Plasma lycopene,  $\beta$ -carotene, naringenin and chlorogenic acid concentration over time in subjects consuming a single portion of fresh and cooked tomato meals. Values are means of five subjects and bars indicate standard deviation



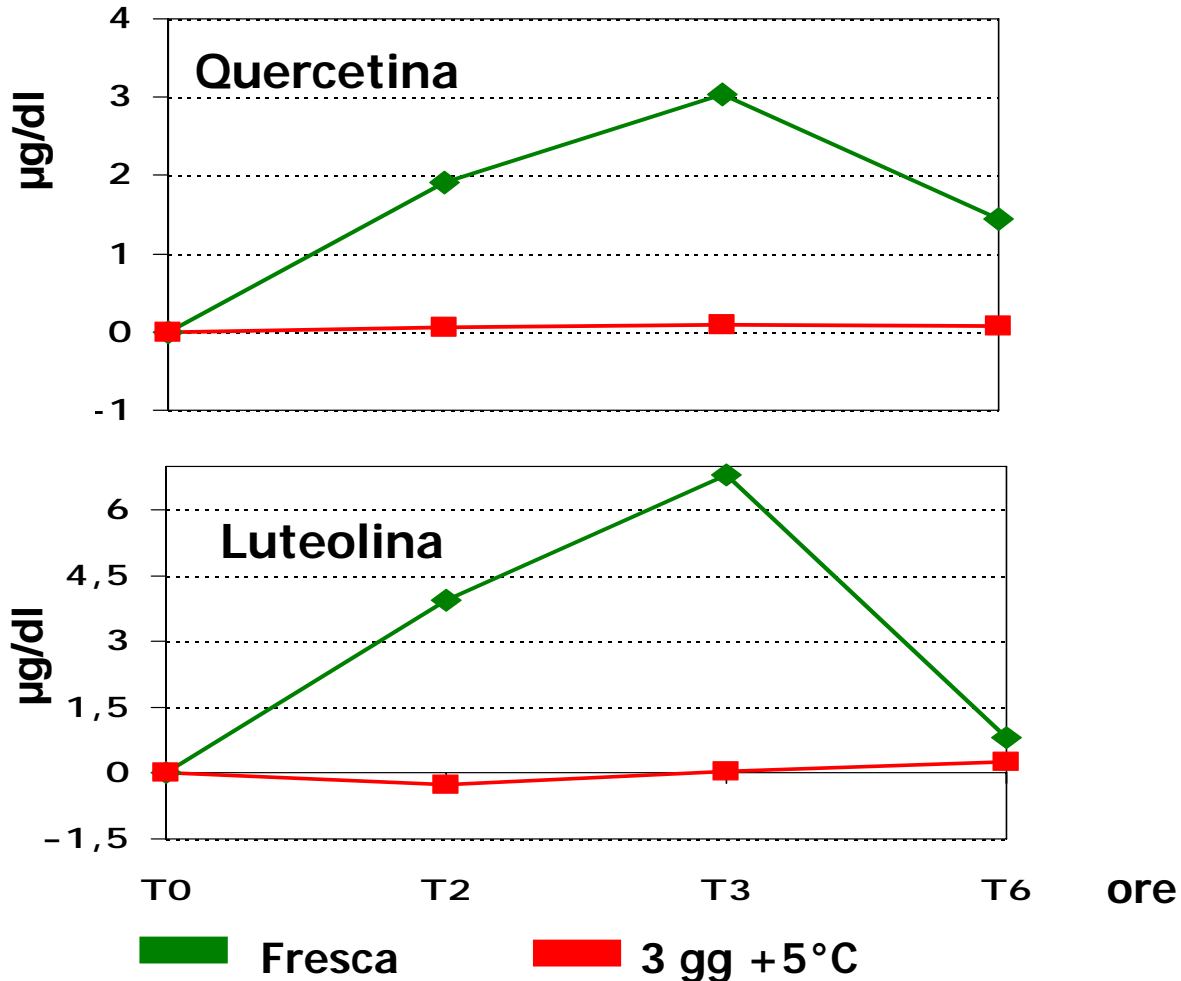
Incremento in termini di valore assoluto rispetto al baseline (T0) dei livelli plasmatici di polifenoli totali dopo ingestione acuta di lattuga fresca e conservata



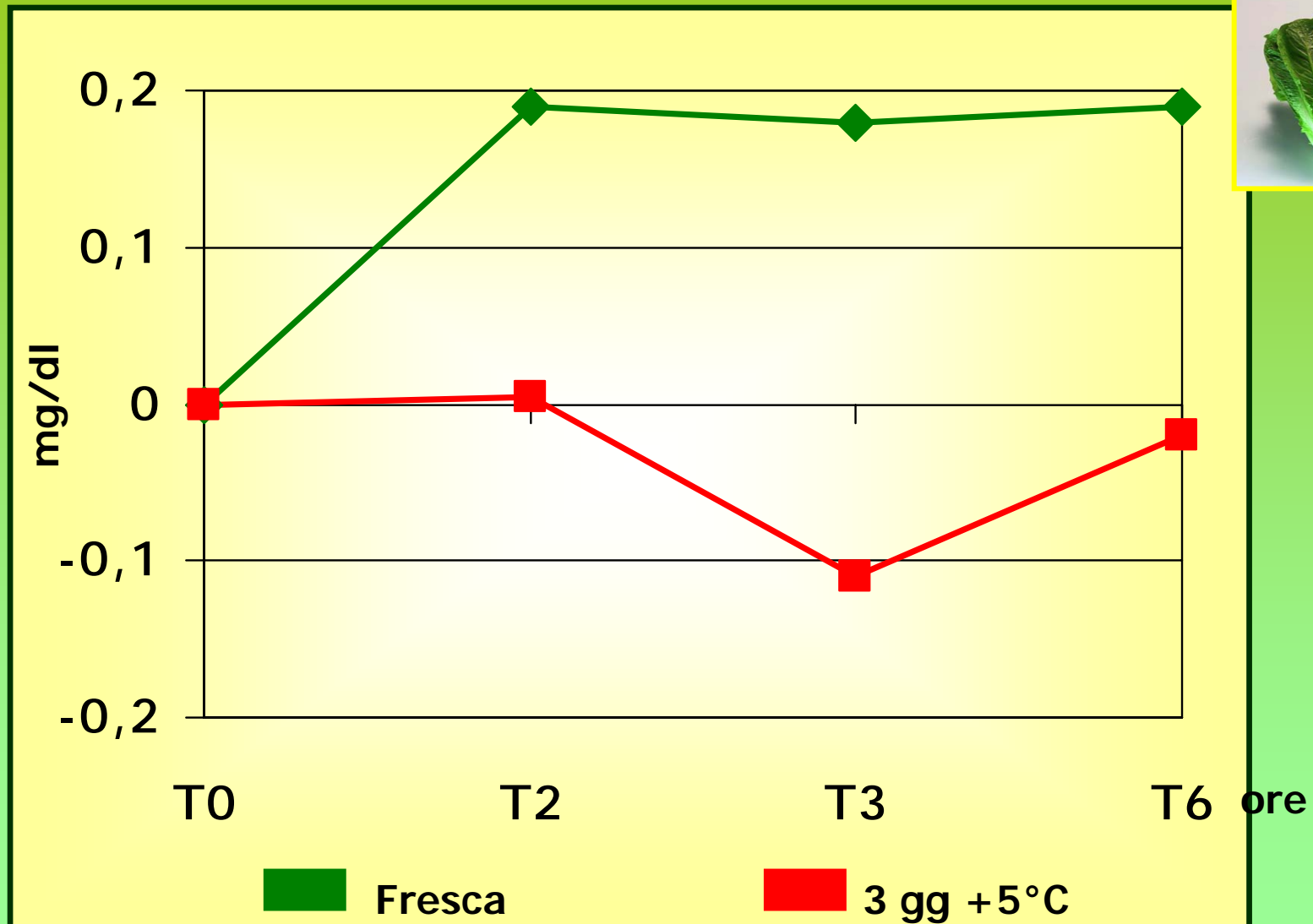
Incremento in termini di valore assoluto rispetto al baseline (T0) dei livelli plasmatici di acidi idrossicinnamici (ac. cumarico e caffeico) dopo ingestione acuta di lattuga fresca e conservata



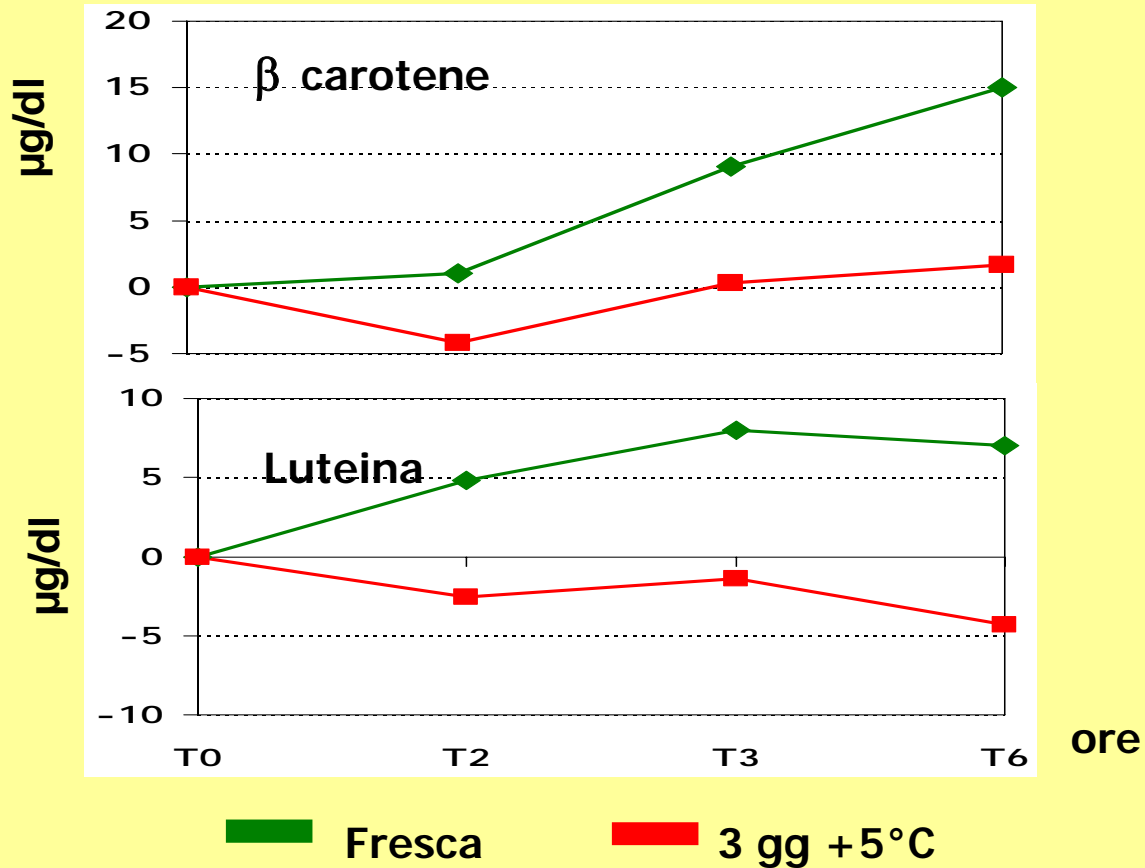
**Incremento in termini di valore assoluto rispetto al baseline (T0) dei livelli plasmatici di quercetina e luteolina dopo ingestione acuta di lattuga fresca e conservata**



**Incremento in termini di valore assoluto (media $\pm$ SEM) rispetto al baseline (T0) dei livelli plasmatici di acido ascorbico dopo ingestione acuta di lattuga fresca e conservata**



**Incremento in termini di valore assoluto rispetto al baseline (T0) dei livelli plasmatici di carotenoidi dopo ingestione acuta di lattuga fresca e conservata**



# Salute e Benessere

Alimentazione

Dieta

Biodisponibilità

Stile di Vita

Salute

Prevenzione



## Benessere

"lo stato emotivo, mentale, fisico, sociale e spirituale di **ben-essere** che consente alle persone di raggiungere e mantenere il loro potenziale personale nella società".

Commissione Salute

Grazie per l'attenzione