

*Realizzazione di nuovi prodotti alimentari a base di
farine addizionate di nuovi principi nutrizionali
terapeuticamente attivi nella prevenzione
dell'invecchiamento e delle patologie dismetaboliche
ad esso correlate*

S. Russo Volpe¹, R. Cazzola², B. Cestaro²

¹ Consorzio di Ricerca "G. P. Ballatore", Zona Industriale Dittaino - Assoro (EN)

² Università degli Studi di Milano, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Dipartimento di Scienze Precliniche LITA Vialba

1. Introduzione

Il progressivo miglioramento delle condizioni di vita nei paesi industrializzati ha determinato una sostanziale diffusione di benessere, caratterizzata da un incremento della disponibilità di cibo e quindi dell'introito calorico giornaliero, parallelamente ad una riduzione del dispendio energetico dovuto all'attività fisica lavorativa, grazie ai progressi della tecnologia. Quest'evoluzione, se da un lato ha indubbiamente limitato o contribuito ad eradicare alcune condizioni di carenza nutrizionale o a ridurre la comparsa o il mantenimento di gravi "endemie" infettive, dall'altro ha cooperato in modo sostanziale nel promuovere l'insorgenza su vasta scala delle malattie cronicodegenerative correlate all'invecchiamento (malattie metaboliche, del sistema vascolare e neoplastiche). Nel corso dell'invecchiamento e delle patologie degenerative ad esso correlate si assiste, da un punto di vista biochimico, ad un aumento progressivo e sinergico dei danni strutturali e funzionali a carico della cellula e dei tessuti che origina innanzitutto da una diminuita efficienza della sintesi mitocondriale di ATP e ad essa ritorna amplificata attraverso le tappe degenerative della diminuita velocità di sintesi delle macromolecole e dei lipidi di membrana, dell'aumento del Ca^{2+} e del K^+ endocellulare e dell'incremento dei processi perossidativi innescato dai radicali liberi.

L'innescò di questa spirale se non più controllato può, in tempi più o meno lunghi, portare ad una perdita sempre maggiore di efficienza o ad un invecchiamento sempre più precoce del tessuto danneggiato. L'aumento dei processi perossidativi tissutali è correlato anche ad un aumento dei processi degenerativi indotti dai radicali nel torrente circolatorio (e nelle sue componenti lipoproteiche) che irrorà i diversi tessuti danneggiati e che con essi continua ad interscambiare ogni sorta di metaboliti, incluse le specie radicaliche. In questi ultimi anni si sono accumulate numerose evidenze che dimostrano come questi radicali giocano un ruolo importante nel progressivo divenire dell'invecchiamento e nell'eziopatogenesi dell'aterosclerosi che ad esso di norma si correla. È infatti ampiamente dimostrato che la perossidazione dei lipidi e delle apolipoproteine è una delle principali cause della formazione della lesione aterosclerotica, così come è noto che una dieta equilibrata e corretta può essere di grande utilità nel prevenire e rallentare l'insorgere di tutti

questi fenomeni degenerativi. Gli alimenti di origine vegetale sono particolarmente ricchi di numerosi principi nutritivi vitaminici e/o vitamino - "simili" dotati di un potenziale effetto preventivo nei confronti delle patologie dismetaboliche. (1,2)

L'attività antiossidante e antiradicalica dei carotenoidi, dei tocoferoli, dei tocotrienoli, dei flavoni e dei fenoli presenti in molti alimenti d'origine vegetale (grano, olive, oli d'oliva, melanzane, timo, maggiorana, pomodoro, semi di pistacchio, agrumi, ecc.) svolge un ruolo preventivo nei confronti dell'ossidazione delle lipoproteine plasmatiche e quindi dell'aterosclerosi (3-19), dell'ossidazione delle basi azotate degli acidi nucleici e quindi del cancro (6,10,18,20-24), e della perdita di funzionalità delle membrane cellulari che si associa all'invecchiamento (14).

È stato inoltre evidenziato che alcune spezie e alcuni lipidi sono in grado di ridurre l'attività dell'enzima α -amilasi (principale responsabile della digestione dell'amido) diminuendo il picco glicemico postprandiale e la sua durata nel tempo riducendo così il rischio d'insorgenza della resistenza periferica all'insulina. A questo proposito si deve considerare che la maggior parte della popolazione italiana consuma un'elevata quantità d'alimenti ricchi di carboidrati raffinati (pane, pasta). Gli esperti concordano nell'affermare che l'assunzione protratta nel tempo d'elevati quantitativi di carboidrati raffinati, e quindi di rapida assimilazione, può favorire l'insorgenza della resistenza periferica all'insulina.

L'aggiunta al pane d'alimenti d'origine vegetale consente quindi di aumentarne notevolmente il valore nutritivo di quest'alimento. Sulla base dei dati in nostro possesso, non esistono nella letteratura scientifica informazioni esaurienti sugli effetti che i processi produttivi esercitano sulle attività di questi principi attivi nutrizionali. Per valutare tali effetti è necessario separare dai vegetali le frazioni con differente solubilità, mediante estrazione con solventi, caratterizzare e dosare i composti presenti in tali estratti e determinare l'attività biologica dei principi attivi selezionati in funzione delle modalità di produzione e di conservazione dei prodotti da forno. La caratterizzazione e il dosaggio vengono di norma effettuati mediante tecniche cromatografiche, in particolare l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (25-36). Per i motivi sopra esposti si è deciso di indagare alcune proprietà degli estratti d'alcune spezie presenti nell'alimentazione mediterranea determinando i seguenti parametri: attività antiossidante totale, attività antiradicalica, livelli dei fenoli totali e, composizione in caroteni, fenoli e vitamine liposolubili e capacità d'inibizione dell'idrolisi dell'amido.

2. Materiali e metodi

Materia prima

La semola e i diversi tipi di pane utilizzati in questo studio (pane di semola, pane semintegrale, pane con pomodoro, pane con olive) erano stati prodotti dal Panificio Valdittaino, mentre le spezie (origano, timo, rosmarino, aglio e peperoncino) erano state acquistate presso un supermercato.

Reagenti

I reagenti chimici erano di grado analitico e forniti da Merck (1,1-difenil-2-picrilidrazile, DPPH). L'acido linoleico e la lipossigenasi erano forniti rispettivamente da Merck (n.5353) e Fluka (n. L-7395).

Caratterizzazione della materia prima

Per i parametri espressi in funzione del contenuto in sostanza secca del campione si è fatto riferimento ai seguenti valori:

	Sostanza secca g/100g
Semola	85,8
Pane con pomodoro	67,5
Pane con olive	64,6
Pane semiintegrale	67,0
Pane di semola	69,0
Timo	92,2
Origano	92,8
Rosmarino	90,7
Aglione	93,5
Peperoncino	90,0

Estrazione

Ad un grammo di semola o di purea di campione erano stati aggiunti 10 ml di solvente d'estrazione (acidificato con 1% di HCl 37%); dopo un riposo a 4°C per 60 min, per permettere l'estrazione dei principi attivi. I campioni sono stati omogeneizzati con Ultra-Turrax T25 e quindi centrifugati due volte. I due surnatanti sono stati filtrati su carta Whatman n°1 e quindi il volume è stato aggiustato a 20 ml con lo stesso solvente d'estrazione, aliquotato in eppendorf e stoccato a -20°C fino alle successive analisi.

Per l'estrazione sono stati impiegati i seguenti solventi: metanolo assoluto (MetOH), etanolo assoluto (EtOH), esano, miscela metanolo/acqua 80:20 e miscela metanolo/cloroformio 1:2, in modo da assicurare l'estrazione dei vari principi attivi caratterizzati da diversa solubilità e polarità. Tutti i solventi (o miscele) d'estrazione erano stati acidificati con HCl, in modo da preservare i fenoli e, allo stesso tempo, da precipitare le proteine che potrebbero interferire in alcune analisi.

Dosaggio dei fenoli totali

I fenoli totali sono stati determinati con un metodo spettrofotometrico (37), utilizzando l'acido clorogenico (uno dei principali composti fenolici dei vegetali) come standard.

Attività antiossidante totale

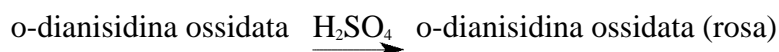
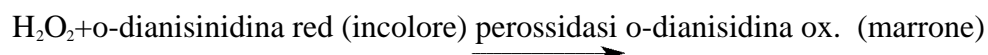
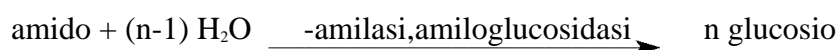
L'attività antiossidante totale è stata determinata con un test spettrofotometrico (38) basato su un sistema di coossidazione: l'enzima lipossigenasi ossida l'acido linoleico che, a sua volta, va ad ossidare il β -carotene causandone una diminuzione d'assorbanza a 460 nm; in presenza di un antiossidante, naturale o sintetico, si assiste ad un minor calo della suddetta assorbanza.

Attività antiradicalica

L'attività antiradicalica è stata determinata misurando la capacità dei differenti estratti di neutralizzare un radicale artificiale stabilizzato, il difenilpicrilidrazile (DPPH 10^{-4} M) mediante un test spettrofotometrico (39-41) basato sulla lettura di densità ottica a 517 nm. Nella prova bianco (DPPH + solvente d'estrazione) si legge una densità ottica corrispondente al 100% di radicale DPPH; nella prova test (contenente l'estratto da testare) si legge una densità ottica tanto minore quanto maggiore è il potere antiradicalico del campione (spegnimento del DPPH).

Idrolisi amido

Si è utilizzato un metodo enzimatico (KIT STA-20, Sigma), quindi sensibile, specifico e ripetibile che richiede una piccola quantità di campione. Il principio del metodo è il seguente:



Si legge infine la colorazione rosa a 540 nm che è proporzionale alla concentrazione originale di glucosio e, perciò, a quella dell'amido idrolizzato (digerito).

Caratterizzazione degli estratti mediante HPLC

Il contenuto in -tocoferolo e -carotene degli estratti è stato determinato mediante HPLC utilizzando una colonna C8; la fase mobile (1ml/min) era costituita da acetonitrile-acqua (95:5).

3. Risultati

Dosaggio fenoli totali

Nella tabella seguente sono mostrati i valori di fenoli totali (mg/100 g s.s.) relativi ai diversi estratti.

campione	mg fenoli/100g ss		
	ex. metanolo	ex. metanolo/acqua	ex. etanolo
Semola	136.7 ± 5.80	96.5 ± 2.55	131.6 ± 5.45
Pane con pomodoro	143.1 ± 7.01	162.3 ± 4.25	72.9 ± 1.44
Pane con olive	226.8 ± 8.12	106.3 ± 3.25	436.1 ± 12.85
Pane semiintegrale	142.3 ± 5.35	47.9 ± 1.60	62.9 ± 2.50
Pane di semola	73.6 ± 2.55	38.6 ± 0.06	23.7 ± 0.05

Dai dati ottenuti si possono trarre alcune considerazioni: la cottura determina un impoverimento dei fenoli totali che però è di minore entità nel pane semiintegrale forse grazie all'apporto endogeno della crusca e nel pane con pomodoro e olive, ingredienti ricchi in fenoli.

I dati riferiti alle spezie sono riportati nella seguente tabella: il dosaggio dei fenoli totali si è effettuato su estratto metanologico acidificato, perché il solo in grado di preservare ed estrarre i fenoli presenti nel materiale di partenza.

campione	Fenoli totali (mg/100g sost. secca)
Timo	2240 ± 53.15
Origano	4020 ± 65.35
Rosmarino	2430 ± 51.05
Aglione	156.75 ± 11.15
Peperoncino	878.32 ± 25.12

Dosaggio α -tocoferolo e β -carotene

I contenuti di α -tocoferolo e di β -carotene degli estratti metanoliche delle spezie determinati mediante HPLC sono riportati nella seguente tabella.

campione	Tocoferolo (mg/100g s.s.)	β-carotene (mg/100g s.s.)
Timo	9.15 ± 0.01000	2.28 ± 0.0150
Origano	9.15 ± 0.01200	1.88 ± 0.008
Rosmarino	1.69 ± 0.00100	4.14 ± 0.030
Aglione	0.03 ± 0.00012	Tracce
Peperoncino	0.80 ± 0.00021	36.36 ± 0.021

Timo e rosmarino presentano i più elevati contenuti di α -tocoferolo, di cui è nota l'attività di antiossidante lipofilo, mentre il peperoncino presenta notevoli quantitativi di β -carotene, sostanza che non solo funge da provitamina A, ma che è anche in grado di neutralizzare alcune specie reattive dell'ossigeno, prevenendo così la formazione di radicali liberi.

Attività antiossidante totale

Gli estratti in metanolo e metanolo/acqua sono stati dosati tal quali; gli estratti in etanolo, esano e metanolo/cloroformio sono stati invece portati a secco insufflando azoto e quindi ripresi con un egual volume di tampone fosfato 0.1 M pH 7 e Triton x-100 come emulsionante. Ogni campione è stato quindi valutato contro un proprio bianco.

Per la semola e i pani i risultati sono riferiti all'estratto ottenuto da 5 mg di materia prima. I risultati, riportati nella seguente tabella, sono stati espressi come indice antiossidante (I_a), compreso tra 0 e 1, dove 0 indica la totale ossidazione del substrato e 1 la completa inibizione dell'ossidazione (massima protezione) dovuta alla presenza di antiossidanti.

campione	I_a				
	ex. MetOH	ex. MetOH/acqua	ex. MetOH/cloroformio	ex. etanolo	ex. esano
Semola	0.10 \pm 0.0020	0.00	0.03 \pm 0.0002	0.03 \pm 0.0001	0.39 \pm 0.002
Pane con pomodoro	0.56 \pm 0.0030	0.37 \pm 0.025	0.44 \pm 0.0020	0.26 \pm 0.0012	0.00
Pane con olive	0.51 \pm 0.0015	0.35 \pm 0.002	0.42 \pm 0.0025	0.37 \pm 0.0010	0.00
Pane semiintegrale	0.34 \pm 0.0020	0.27 \pm 0.001	0.42 \pm 0.0025	0.09 \pm 0.0001	0.15 \pm 0.001
Pane di semola	0.14 \pm 0.0005	0.19 \pm 0.0010	0.41 \pm 0.0020	0.00	0.17 \pm 0.001

Questi risultati mostrano che la cottura determina un leggero incremento dell'attività antiossidante totale, forse dovuto a prodotti delle reazioni di Maillard, che la crusca apporta ulteriori principi antiossidanti e che gli ingredienti oliva e soprattutto pomodoro (ricco in licopene che è stabile al calore) determinano un forte aumento di attività antiossidante totale.

Per quanto riguarda invece le spezie, il dosaggio è stato effettuato sull'estratto metanolico acidificato, perché il solo in grado di preservare ed estrarre i fenoli presenti nel materiale di partenza. Sono stati valutati due I_a : con 5 mg di estratto di spezie si otteneva un $I_a=1$ per tutte e tre le spezie non consentendo di costruire una scala di efficacia, perciò si è rieseguito il test su 0,25 mg di estratto, rianalizzando anche la semola e i pani, nelle stesse condizioni.

campione	$I_a(0.25 \text{ mg})$	$I_a(5 \text{ mg})$
Timo	0.70 ± 0.0012	1 ± 0.0021
Origano	0.75 ± 0.0016	1 ± 0.0025
Rosmarino	0.81 ± 0.0011	1 ± 0.0008
Aglione	0 ± 0.00	0.24 ± 0.0006
Peperoncino	0.023 ± 0.0008	0.86 ± 0.0015
Semola	0 ± 0.00	0.10 ± 0.0010
Pane con pomodoro	0.05 ± 0.0001	0.56 ± 0.0018
Pane con olive	0.05 ± 0.0003	0.51 ± 0.0021
Pane con crusca	0.03 ± 0.0009	0.34 ± 0.0014
Pane di semola	0 ± 0.00	0.14 ± 0.0008

Le spezie, come ci si aspettava, sono ottimi antiossidanti in quanto ricchi di fenoli, flavonoidi e flavoni; da questi risultati la più efficiente sembra essere il rosmarino; i dati relativi a semola e pani confermano i precedenti.

Attività antiradicalica

I risultati ottenuti per estratti di semola, pani e spezie, ottenuti da 60 mg di materia prima, sono riportati nella seguente tabella. I risultati sono espressi come attività antiradicalica percentuale. Il completo spegnimento del DPPH nelle nostre condizioni sperimentali è stato calcolato utilizzando concentrazioni crescenti di acido ascorbico, noto antiradicalico. (42).

campione	AAR (%)
Timo	72.49 ± 1.22
Origano	69.58 ± 1.05
Rosmarino	73.65 ± 1.24
Aglione	76.07 ± 1.05
Peperoncino	95.79 ± 1.25
Semola	33.24 ± 0.07
Pane con pomodoro	80.14 ± 1.00
Pane con olive	84.75 ± 1.15
Pane con crusca	76.83 ± 1.20
Pane di semola	52.37 ± 0.03

Per quanto riguarda semola e pani si può notare come la capacità antiradicalica dell'estratto aumenti con la cottura (il pane di semola ha maggiore potere antiradicalico della semola) e come gli ingredienti aggiunti durante l'impastamento migliorino l'attività antiradicalica dei diversi pani.

I risultati di questo test concordano quindi con quelli trovati nel test dell'attività antiossidante totale.

Come mostrato le spezie sono dotate di forte capacità antiradicalica e anche in questo caso la spezia più efficace sembra essere il rosmarino, insieme ad aglio e peperoncino; sarebbe interessante valutare tale attività su un pane con pomodoro (o con olive) addizionato di una di queste spezie il cui accostamento di gusti risulterebbe molto gradevole al palato.

Idrolisi amido

L'azione degli estratti metanolici delle spezie sulla digeribilità dell'amido è riportata nella seguente tabella. Ogni campione è stato riferito al proprio bianco che conteneva lo stesso volume di metanolo anziché l'estratto metanolico.

campione	Volume test (μL)	mg equivalenti	Inibizione idrolisi amido (%)
Timo	10	0.5	11.61 ± 0.32
	20	1.0	24.64 ± 0.21
	50	2.5	47.75 ± 1.52
Origano	10	0.5	12.66 ± 0.21
	20	1.0	23.84 ± 0.08
	50	2.5	46.88 ± 0.09
Rosmarino	10	0.5	21.56 ± 0.06
	20	1.0	32.30 ± 1.00
	50	2.5	57.69 ± 1.65
Aglione	10	0.5	0.00
	20	1.0	0.00
	50	2.5	1.57 ± 0.08
Peperoncino	10	0.5	0.00
	20	1.0	10.86 ± 1.15
	50	2.5	24.60 ± 0.07

Come si può notare c'è un effetto inibitorio soprattutto col rosmarino (che è la spezia dotata di maggiore attività antiossidante e antiradicalica) e quest'effetto dipende dalla dose utilizzata.

4. Discussione

La maggior parte della popolazione italiana consuma una elevata quantità di alimenti ricchi di carboidrati raffinati, quali pane e pasta, tipici della “dieta mediterranea”. Durante la macinazione del frumento e l’abburattamento si ottengono farine con elevate proprietà funzionali ed organolettiche, ma si perdono molti principi nutritivi della cariosside nativa. Tra questi principi si possono annoverare la fibra dietetica, alcuni acidi grassi (soprattutto oleico e linoleico), composti antiossidanti, vitamine, sali minerali e composti fenolici, composti di cui è noto il ruolo preventivo nei confronti delle patologie dismetaboliche nella cui eziopatogenesi sono coinvolti i radicali liberi dell’ossigeno, quali per esempio le malattie cerebro- e cardio-vascolari, il cancro ed il diabete. Inoltre, i successivi trattamenti tecnologici cui la farina è sottoposta possono causare ulteriori perdite di nutrienti ad effetto benefico, risulta da qui l’importanza di aumentare l’assunzione di cereali integrali (seguendo le indicazioni dei LARN) e/o di arricchire le farine e i prodotti di derivazione con ingredienti che sostituiscano i principi nutrizionali persi. Questo studio ha evidenziato che tutte le spezie da noi testate hanno una più o meno intensa capacità di prevenire la degradazione delle biomelocole mediante processi di perossidazione promossi dai radicali liberi grazie alle loro proprietà antiradicaliche ed antiossidanti. I risultati ottenuti dalle analisi dei pani prodotti aggiungendo all’impasto olive o pomodoro hanno evidenziato che l’aggiunta di ingredienti ricchi di antiossidanti determina un apprezzabile aumento sia dell’attività antiossidante sia dell’attività antiradicalica che non viene del tutto vanificato dalla cottura.

Tutte le spezie hanno mostrato anche un effetto inibitorio nei confronti dell’idrolisi dell’amido e le più efficaci sono risultate timo, origano e rosmarino. Questi dati sono sicuramente d’interesse se si considera che la maggior parte della popolazione italiana consuma una elevata quantità di alimenti ricchi di carboidrati raffinati (pane, pasta) e che gli esperti concordano nell’affermare che l’assunzione protratta nel tempo di elevati quantitativi di carboidrati raffinati, e quindi di rapida assimilazione, può favorire l’insorgenza della resistenza periferica all’insulina. La resistenza periferica all’insulina, dovuta alla riduzione dell’attività dei recettori insulinici localizzati sulle membrane cellulari, determina un innalzamento dell’indice glicemico postprandiale e dell’insulinemia; l’iperinsulinemia determina, a sua volta, un aumento della sintesi di acidi grassi saturi e di colesterolo a livello epatico e, di conseguenza, un aumento della sintesi di trigliceridi e di lipoproteine a

bassissima densità (VLDL). L'innalzamento dei livelli di VLDL induce sia un aumento del deposito di trigliceridi negli adipociti che favorisce l'insorgenza dell'obesità, sia l'incorporazione di acidi grassi saturi e di colesterolo nelle membrane cellulari compromettendone così la funzionalità con gravi ripercussioni sull'omeostasi metabolica che si traducono in un aumento del rischio di patologie dismetaboliche quali diabete e aterosclerosi.

La riduzione dell'attività degli enzimi coinvolti nella digestione dell'amido, dovuta a sostanze contenute in un alimento come il pane determina una riduzione del picco glicemico postprandiale e la sua durata nel tempo riducendo così il rischio d'insorgenza della resistenza periferica all'insulina.

Concludendo, possiamo affermare che questo studio ha contribuito a gettare le basi per la realizzazione di prodotti alimentari a base di farine addizionate di principi nutrizionali potenzialmente attivi nella prevenzione delle patologie dismetaboliche. Il completamento degli studi con l'analisi dell'effetto della cottura sui parametri da noi analizzati e dell'effetto in vivo di prodotti da forno addizionati di queste spezie, se confermerà, come è ragionevole supporre, i risultati finora ottenuti, permetterà di mettere a disposizione della popolazione italiana alimenti di uso quotidiano dotati di un effetto preventivo nei confronti delle principali patologie dismetaboliche.

Bibliografia

- 1) Ghiselli A. D'Amicis A. Giacosa A. (1997) *The antioxidant potential of the Mediterranean diet*. European Journal of Cancer Prevention. 6 Suppl 1:S15-9.
- 2) Trichopoulou A. Lagiou P. (1997) *Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle*. Nutrition Reviews. 55(11 Pt 1):383-9.
- 3) Surh Y. (1999) *Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances*. Mutation Research. 428(1-2):305-27.
- 4) Weisburger JH. (1999) *Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea*. Food & Chemical Toxicology. 37(9-10):943-8.
- 5) Brandi ML. (1997) *Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases*. Calcified Tissue International. 61 Suppl 1:S5-8.
- 6) Hollman PC. Hertog MG. Katan MB. (1996) *Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease*. Biochemical Society Transactions. 24(3):785-9.
- 7) Gaziano JM. (1999) *Antioxidant vitamins and cardiovascular disease*. Proceedings of the Association of American Physicians. 111(1):2-9.
- 8) Hornstra G. Barth CA. Galli C. Mensink RP. Mutanen M. Riemersma RA. Roberfroid M. Salminen K. Vansant G. Verschuren PM. (1998) *Functional food science and the cardiovascular system*. British Journal of Nutrition. 80 Suppl 1:S113-46.
- 9) Visioli F. Galli C. (1998) *The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings*. Nutrition Reviews. 56(5 Pt 1):142-7.
- 10) Hollman PC. Katan MB. (1998) *Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man*. Archives of Toxicology. Supplement. 20:237-48.
- 11) Hertog MG. Hollman PC. (1996) *Potential health effects of the dietary flavonol quercetin*. European Journal of Clinical Nutrition. 50(2):63-71.
- 12) Salonen JT. (1998) *Epidemiological studies on antioxidants, lipid peroxidation and atherosclerosis*. Archives of Toxicology. Supplement. 20:249-67.
- 13) Maxwell SR. Lip GY. (1997) *Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease*. British Journal of Clinical Pharmacology. 44(4):307-17.
- 14) Scarfiotti C. Fabris F. Cestaro B. Giuliani A. (1997) *Free radicals, atherosclerosis, ageing, and related dysmetabolic pathologies: pathological*

- and clinical aspects*. European Journal of Cancer Prevention. 6 Suppl1:S31-6.
- 15) Wedworth SM. Lynch S. (1995) *Dietary flavonoids in atherosclerosis prevention*. Annals of Pharmacotherapy. 29(6):627-8.
- 16) Frei B. (1995) *Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low-density lipoprotein oxidation*. Critical Reviews in Food Science & Nutrition. 35(1-2):83-98.
- 17) Gaziano JM. Manson JE. Buring JE. Hennekens CH. (1992) *Dietary antioxidants and cardiovascular disease*. Annals of the New York Academy of Sciences. 669:249-58.
- 18) Clinton SK. (1998) *Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease*. Nutrition Reviews. 56(2 Pt 1):35-51.
- 19) Paganga G. Miller N. Rice-Evans CA. (1999) *The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute?*. Free Radical Research. 30(2):153-62.
- 20) Mathers JC. Burn J. (1999) *Nutrition in cancer prevention*. Current Opinion in Oncology. 11(5):402-7.
- 21) Prasad KN. Kumar A. Kochupillai V. Cole WC. (1999) *High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy*. Journal of the American College of Nutrition. 18(1):13-25.
- 22) Gescher A. Pastorino U. Plummer SM. Manson MM. (1998) *Suppression of tumour development by substances derived from the diet—mechanisms and clinical implications*. British Journal of Clinical Pharmacology. 45(1):1-12.
- 23) Varma RS. (1996) *Dietary bioflavonoids, chalcones, and related alkenones in prevention and treatment of cancer* Nutrition. 12(9):643-5.
- 24) Dragsted LO. (1998) *Natural antioxidants in chemoprevention*. Archives of Toxicology. 20:209-26.
- 25) Cui H., He C., Zhao G. (1999) *Determination of polyphenols by high-performance liquid chromatography with inhibited chemiluminescence detection*. Journal of Chromatography A. 855(1):171-9.
- 26) Beecher GR. Warden BA. Merken H. (1999) *Analysis of tea polyphenols*. Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine. 220(4):267-70.
- 27) Bode AM. Rose RC. (1999) *Analysis of water-soluble antioxidants by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. Methods in Enzymology. 299:77-83.
- 28) Podda M. Weber C. Traber MG. Milbradt R. Packer L. (1999) *Sensitive high-performance liquid chromatography techniques for simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols, ubiquinols, and ubiquinones in*

biological samples. *Methods in Enzymology*. 299:330-41.

29) Escarpa A. Gonzalez MC. (1999) *Fast separation of (poly)phenolic compounds from apples and pears by high-performance liquid chromatography with diode-array detection*. *Journal of Chromatography A*. 830(2):301-9.

30) Yankah VV. Ushio H. Ohshima T. Koizumi C. (1998) *Quantitative determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, and tert-butyl hydroquinone in oils, foods, and biological fluids by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection*. *Lipids*. 33(11):1139-45.

31) Bourne LC. Rice-Evans CA. (1998) *Urinary detection of hydroxycinnamates and flavonoids in humans after high dietary intake of fruit*. *Free Radical Research*. 28(4):429-38.

32) Yamaguchi T. Takamura H. Matoba T. Terao J. (1998) *HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*. 62(6):1201-4.

33) Mouly P. Gaydou EM. (1998) Auffray A. *Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*. 800(2):171-9.

34) Demertzis PG. Franz R. (1998) *A systematic study on the stability of selected polymer antioxidants in EU official aqueous and alternative food simulants using HPLC*. *Food Additives & Contaminants*. 15(1):93-9.

35) Janebova M. Zima T. (1997) *Methods for determination of vitamins A and E our simple HPLC assay*. *Sbornik Lekarsky*. 98(3):195-208.

36) Maiani G. Serafini M. Salucci M. Azzini E. Ferro-Luzzi A. (1997) *Application of a new high-performance liquid chromatographic method for measuring selected polyphenols in human plasma*. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences & Applications*. 692(2):311-7.

37) Singleton VL., Rossi JA. (1965) *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-58.

38) Marco GJ. (1968) *A rapid method for evaluation of antioxidants*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45: 594-8.

39) Blois MS. (1958) *Antioxidant determination by use of a stable radical*. *Nature*. 4617:1198-1200.

40) Yen GC, Duh PD. (1994) *Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species*. *J. Agric. Food Chem.* 42: 629-32.

41) Pizzocaro F, Russo Volpe S, Morelli R, Oliva C. (1997) *Modificazioni dell'attività antiossidante e antiradicalica in dischi termotrattati di carota*. *Atti*

3° CISETA, Cernobbio, Chiriotti Ed., Pinerolo, 423-35.

42) Russo Volpe S. *Modificazioni dell'attività antiossidante e antiradicalica e dell'ossidazione potenziale dei lipidi in dischi termotrattati di carota*. Tesi di Laurea in Scienze delle Preparazioni Alimentari, Università degli Studi di Milano, Anno Acc. 1995-1996.

