

Report Scientifico III anno di attività “Functional Lab”

L’attività di ricerca condotta durante il III ed ultimo anno del progetto *Functional Lab* ha riguardato l’avvio di alcune nuove attività di ricerca ed il completamento di alcune sperimentazioni in collaborazione con il partner straniero.

In particolare, è stata studiata la componente bioattiva in cladodi di *Opuntia Ficus indica* allo scopo di valorizzare questo sottoprodotto per possibili ricadute salutistiche. Lo studio è stato realizzato in collaborazione di un istituto di ricerca dell’Università di Al Lamar Tunisia. Si è inoltre avviato lo studio su di una *pasta arricchita con inulina* a differente grado di polimerizzazione, allo scopo di evidenziare come tale parametro possa influire sull’effetto prebiotico della stessa.

E’ stato approvato dall’Istituto Superiore di Sanità il progetto di sperimentazione *in vivo* su animali da laboratorio (Autorizzazione n° 849/2019-PR. Resp. a prot. BC793.26), per valutare l’influenza della componente fenolica caratteristica della cultivar di olive *Cellina di Nardò*, sulla riduzione e prevenzione della *steatosi epatica non alcolica in topi obesi*. Il progetto sarà svolto in collaborazione con l’Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) “De Bellis” di Castellana Grotte (BA).

La *Dr.ssa Isabella D’Antuono* ricercatrice dell’CNR-ISPA ha trascorso 2 mesi (maggio-luglio 2019) presso l’Università Laval Québec, Canada per studiare come viene modulato il microbiota umano da polifenoli della filiera dell’olio di oliva.

Interessante opportunità derivata dalla collaborazione con i partner Canadesi dell’Università Laval, ha riguardato il coinvolgimento dei ricercatori del CNR-ISPA, nel progetto *Joint International Research Unit between the CNR and Université Laval for Chemical and Biochemical Research on the Microbiome and its Impact on Metabolic Health and Nutrition (UMI-MicroMeNu)*. Nell’ambito dell’UMI-MicroMeNu sono stati avviati 8 progetti satellite dei quali, il progetto *Targeting the gut microbiota with new extracts enriched with omega-3 PUFAs and polyphenols from nordic biosources to alleviate cardiometabolic diseases*, vede la partecipazione della *Dr.ssa Cardinali Angela* (CNR-ISPA, Italia) insieme al Prof André Marette dell’Università Laval Québec, Canada, ed al Prof. Sebastiano Banni dell’Università di Cagliari, Italia.

➤ *Ingredienti Funzionali da sottoprodotti del Fico d’India*

Questa attività ha come obiettivo il possibile utilizzo dei cladodi di *Opuntia Ficus indica* (OFI) come ingrediente funzionale per la produzione di alimenti salutistici. A tale scopo la matrice è stata caratterizzata per la sua componente polisaccaridica, per il profilo fenolico, per la composizione di minerali e per le possibili proprietà scavenger di radicali liberi. Inoltre sono stati realizzati esperimenti di digestione gastrointestinale *in vitro*, allo scopo di valutare come alcune componenti cellulari

presenti nella matrice di OFI, come la cellulosa e l'emicellulosa, possano avere un effetto sul rilascio dei polifenoli nel tratto gastrointestinale.

La polvere di cladodi di OFI è stata caratterizzata per la componente polifenolica mediante HPLC-DAD; i risultati sono mostrati in Tabella 1.

Tabella 1. Caratterizzazione chimica mediante HPLC-DAD dei principali polifenoli presenti nei cladodi di *Opuntia ficus indica* (OFI). I risultati sono espressi come $\mu\text{g}/100\text{g}$ peso secco (DW).

	OFI (mg/100 g DW)		
Acido Piscidico I	967.2	±	35.9
Acido Piscidico II	17.6	±	5.2
Acido Ferulico derivato I	6.5	±	0.3
Acido Eucomico	48.8	±	2.2
Acido Ferulico derivato II	3.6	±	0.4
Kaempferolo derivato I	6.8	±	1.7
Isoramnetina derivato I	254.4	±	31.8
Isoramnetina derivato II	54.4	±	5.9
Kaempferolo derivato II	1.7	±	0.3
Isoramnetina derivato III	9.3	±	2.0
Isoramnetina-3-O rutinoside (Narcissina)	75.2	±	8.8
Totali	1446.8	±	67.0

n=3 repliche

L'analisi HPLC-DAD mostra la presenza di 11 composti fenolici dei quali i più abbondanti sono l'acido piscidico (PI) e i derivati dell'isoramnetina, seguiti dall'acido eucomico (EU) già identificato negli estratti di *Opuntia* da *Ginestra et al. (2009)*. In particolare tra i flavonoidi, sono stati identificati 3 derivati dell'isoramnetina, quali la narcissina e probabilmente l'isoramnetina-rutinoside-ramnoside e l'isoramnetina-pentoside-esoside, in accordo con quanto riportato da *De Santiago et al. 2018*. Sempre in accordo con gli stessi autori, sono state identificati, anche se in piccole quantità, dei derivati del kaempferolo e dell'acido ferulico.

La composizione di minerali identificati nella polvere di OFI è riportata in Tabella 2. Dalla tabella si evince che il calcio (Ca) è il minerale più abbondante seguito da sodio (Na), potassio (K) e magnesio (Mg). Questi risultati sono in disaccordo rispetto quanto riportato da altri autori che ritrovano come minerale più rappresentativo il potassio (K) (*Hernández-Urbiola, et al., 2011; Ayadi et al., 2009*). Riguardo al contenuto di anioni (nitrati, solfati, cloruri e ossalati) i più rappresentativi erano i solfati ed i cloruri seguiti da ossalati e nitrati; quest'ultimi rappresentano i principali composti anti-nutrizionali determinati in OFI. La concentrazione dei nitrati nelle piante è un importante parametro che può attribuirsi sia alla qualità delle piante che alla salute dei consumatori. Come riportato dalla European Food Safety Authority (EFSA, 2008) l'assunzione giornaliera consentita è pari a 3.7 mg/Kg

di peso corporeo. Nel nostro studio il contenuto di nitrato determinato in OFI era di 580 mg/Kg di sostanza secca, in accordo con i risultati riportati da *Nerd and Nobel (1995)* ed inferiore ai limiti imposti dalla Comunità Europea (EU) No 1258/2011, che stabilisce il range 3000 – 7000 mg/Kg per le piante destinate all'alimentazione. Per gli ossalati, gli altri elementi anti-nutrizionali presenti nell'OFI, la loro assunzione svolge un ruolo chiave nella formazione dei calcoli di ossalato di Ca. Nei campioni OFI il livello di ossalati è pari a 1.05 mg/g di sostanza secca, inferiore rispetto ai valori riportati da altri autori (*Contreras-Padilla et al., 2011*), tale variabilità probabilmente è dovuta al differente stadio fisiologico dei cladodi considerati in questo studio.

Tabella 2. Composizione di minerali nei cladodi di *Opuntia ficus indica*

Ioni	Concentrazione (mg/g dw OFI)
<i>Cationi</i>	
Sodio	19.18 ± 1.05
Potassio	16.84 ± 0.68
Magnesio	13.80 ± 1.37
Calcio	75.18 ± 1.62
<i>Anioni</i>	
Nitrati	0.58 ± 0.06
Solfati	6.26 ± 0.70
Cloruri	7.52 ± 0.30
Ossalati	1.05 ± 0.06

La composizione dei carboidrati in OFI ha evidenziato la presenza di polisaccaridi quali glucani (GLC, 2.5% DW), seguiti dai galattani (GAL, 0.77% DW), arabinani (ARA, 0.65% DW), mannani (MAN, 0.26% DW) e xilani (XIL, 0.05 % DW). I polisaccaridi identificati possono rappresentare un buon substrato per il microbiota intestinale contribuendo al mantenimento dello stato di benessere nell'uomo. Infatti, studi su pazienti affetti da diabete di tipo 2 mostrano che l'assunzione di cladodi OFI può influenzare il controllo del glucosio, modulando il livello renale di sodio e di acqua. (Rocchetti et al.2018).

E' stata inoltre valutata l'attività antiossidante dei composti fenolici presenti in OFI, misurando l'attività scavenging sulla stabilizzazione del radicale chimico DPPH e del radicale cationico ABTS. I risultati ottenuti sono mostrati nella Tabella 3. Dalla tabella si evince che con entrambi i metodi utilizzati, la capacità antiossidante della polvere OFI ha mostrato lo stessa tipologia di andamento con valori simili, in particolare 790 µmol Trolox/ 100g OFI DW per l'ABTS e 740 µmol Trolox/ 100g OFI DW per il DPPH.

Tabella 3. Attività antiossidante nei cladodi di *Opuntia Ficus indica*

	Cladodes OFI TEAC ($\mu\text{mol Trolox}/100\text{g OFI DW}$)
ABTS	790 \pm 120
DPPH	740 \pm 110

Infine, allo scopo di valutare la stabilità digestiva dei composti fenolici e della componente minerale presente nei cladodi di *Opuntia Ficus indica*, gli stessi sono stati sottoposti ad un processo di digestione gastro-intestinale *in vitro*. I risultati sono mostrati nella Tabella 4

Tabella 4. Composizione e bioaccessibilità dei polifenoli e dei cationi in cladodi di *Opuntia Ficus Indica*, dopo digestione gastrointestinale *in vitro*

	Digerito (mg/100g DW)	Bioaccessibilità (%)
<i>Polifenoli:</i>		
Acido Piscidico I	2018.9 \pm 45.3	208.7
Acido Piscidico II	21.4 \pm 2.3	121.3
Acido Ferulico derivato I	8.1 \pm 0.2	123.8
Acido Eucomico	56.7 \pm 0.8	116.2
Acido Ferulico derivato II	3.2 \pm 0.1	88.6
Kaempferolo derivato I	7 \pm 0.2	102
Isoramnetina derivato I	249.5 \pm 7.4	98.1
Isoramnetina derivato II	48.6 \pm 1.4	89.4
Kaempferolo derivato II	1.6 \pm 0.05	96.5
Isoramnetina derivato III	8.4 \pm 0.3	90.7
Isoramnetina-3-O rutinoside (Narcissina)	66.9 \pm 2.05	88.9
<i>Polifenoli Totali</i>	2490.4 \pm 55.6	172.1
<i>Cationi:</i>		
Potassio	883.7 \pm 34.5	52.5
Magnesio	1279.0 \pm 75.1	92.7
Calcio	2373.0 \pm 106.9	31.6

Dalla Tabella 4 si evince che tutti polifenoli identificati sono altamente bioaccessibili, in particolare l'acido piscidico I (~208 %) e gli acidi eucomico e ferulico (> 100%). Questo risultato potrebbe essere spiegato assumendo che i polifenoli siano legati tramite legami deboli, quali idrogeno e forze di Van der Waals, alla componente polisaccaridica presente nella matrice vegetale e quindi rilasciati nel tratto intestinale durante la digestione simulata, aumentando la loro bioaccessibilità così come riportato anche da altri autori (*Jakobek e Matić, 2019*). In conclusione, l'alta concentrazione di polifenoli da OFI rilasciata nel tratto intestinale potrebbe sia migliorare il loro assorbimento sia influire positivamente sul microbiota intestinale, producendo metaboliti ad attività biologica. Nella

Tabella sono anche riportati i risultati relativi alla bioaccessibilità dei cationi. Il principale minerale rilasciato è stato il Ca seguito da Mg e K. Un simile livello di Ca è stato trovato in due diverse cultivar di cladodi di OFI (*Milpa Alta* e *Atlixco*) (Ramírez-Moreno, et al., 2011). Invece, il principale minerale bioaccessibile era Mg, seguito da K e Ca (Tabella 4). Questa bassa bioaccessibilità del Ca potrebbe essere correlata alla presenza degli ossalati che possono combinarsi con Ca ed altri minerali per formare composti poco solubili riducendo la loro disponibilità (Gupta, Lakshmi e Prakash, 2006). Simili risultati sulla bioaccessibilità di Ca e K sono stati trovati in diversi ortaggi a foglia come pubblicato da altri autori (D'Imperio et al., 2016; D'Imperio et al., 2019). Infine, risultati qui riportati consentono di suggerire che il consumo di 5 gr di OFI sia come integratore sia come ingrediente per la realizzazione di alimenti funzionali, consente l'assunzione di circa 64 mg di Mg e 119 mg di Ca.

Risultati parziali relativi alla sperimentazione qui descritta sono stati oggetto di un poster dal titolo: “*Chemical and biochemical characterization of Opuntia ficus-indica cladodes as a bio-product supplement*” by Missaoui M., D'Antuono I., D'Imperio M., Linsalata V., Boukhchina S., Logrieco A.F., Cardinali A. presentato al convegno: GENP 2018 III Edition “Green Extraction of Natural Products, e saranno oggetto di pubblicazione su una rivista scientifica del settore con IF.

➤ ***Studio dell'effetto dei polifenoli sulla steatosi epatica non alcolica in topi obesi***

E' stato approvato dall'Istituto Superiore di Sanità il progetto di sperimentazione *in vivo* su animali da laboratorio (Autorizzazione n° 849/2019-PR. Resp. a prot. BC793.26), per valutare l'influenza della componente fenolica caratteristica della cultivar di olive *Cellina di Nardò*, sulla riduzione e prevenzione della steatosi epatica non alcolica (NAFLD) in topi obesi. Il progetto partirà nel 2020 e sarà svolto in collaborazione con l'Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) De Bellis, di Castellana Grotte (BA).

➤ ***Spaghetti Funzionali con Inulina a diverso grado di polimerizzazione***

In quest'ultimo anno è stato avviato uno studio per la realizzazione di una pasta arricchita con inulina a diverso grado di polimerizzazione (PD), al fine di valutare come lo stesso possa influenzare sulla permanenza dell'inulina nell'intestino tenue.

Due diverse inuline, una estratta da radici di cardo (CRI) ad alto PD (circa 80 unità di fruttosio) e l'altra da cicoria (CHI) a basso PD (circa 20 unità di fruttosio) sono state utilizzate per arricchire gli spaghetti di grano duro cultivar *Timilia*; la concentrazione di inulina utilizzata per entrambi gli spaghetti è stata del 4% (p/p). Dopo una caratterizzazione iniziale degli spaghetti, lo studio ha evidenziato come il grado di polimerizzazione possa influire sul rilascio di inulina nell'intestino tenue

durante una digestione gastrointestinale *in vitro* e come lo stesso possa modulare il previsto indice glicemico. Risultati preliminari mostrano, come atteso, che il contenuto di inulina nelle due tipologie di spaghetti non digeriti era simile, in particolare negli spaghetti CRI era di 8,1 mg/g FW mentre negli spaghetti CHI 8,2 mg/g FW. Tale quantità invece è stata modificata dalle condizioni della digestione gastro intestinale *in vitro* come riportato nella Figura 1. Dalla Figura si evince che dopo digestione *in vitro*, l'inulina è distribuita nelle due frazioni, solubile ed insolubile (pellet) in tutte e due le tipologie di spaghetti.

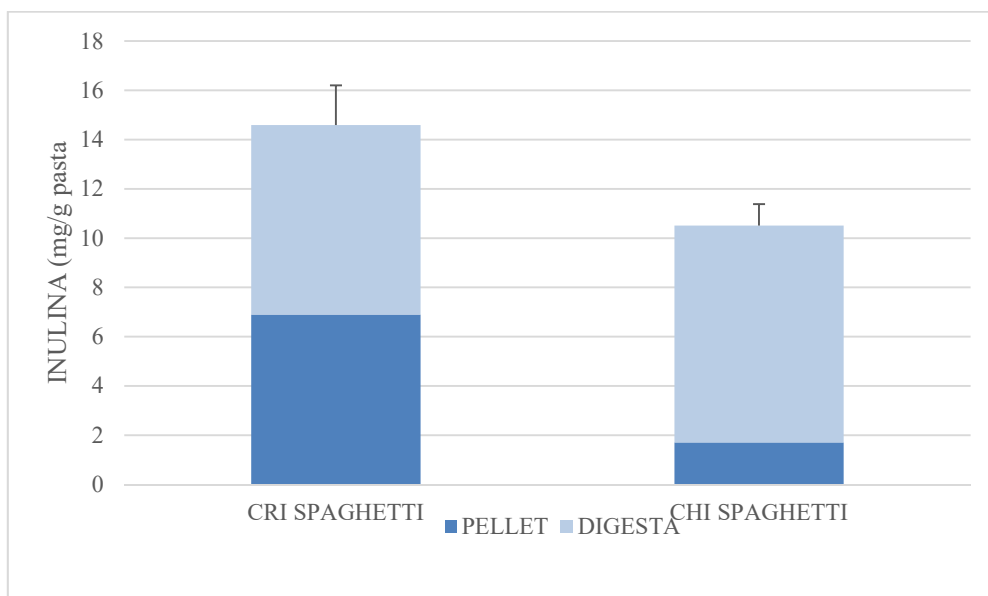


Figura 1. Contenuto di inulina (mg/g pasta) negli spaghetti arricchiti con il 4% di inulina da cardo (CRI) e da cicoria (CHI), dopo digestione *in vitro*.

La figura inoltre evidenzia che il contenuto di inulina presente nella frazione pellet degli spaghetti CRI è significativamente maggiore rispetto al contenuto di inulina della frazione pellet degli spaghetti CHI. In particolare, 6.9 mg/gr pasta e 1.71 mg/gr pasta, rispettivamente. Tale risultato suggerisce che l'accumulo dell'inulina nella pasta rende la stessa direttamente disponibile nell'ultimo tratto dell'intestino per poter svolgere azioni modulatorie del microbiota intestinale e di promozione della salute.

Anche l'indice glicemico degli spaghetti arricchiti con l'inulina è influenzato dal grado di polimerizzazione. Nella Tabella 1 sono riportati i risultati relativi al calcolo dell'indice glicemico nelle due tipologie di spaghetti.

Tabella 1: Indice Glicemico (IG) di spaghetti arricchiti con inulina a basso (cicoria, CHI) e alto (cardo, CRI) grado di polimerizzazione.

<i>Matrice Alimentare</i>	<i>IG</i>
Spaghetti CHI	67.26 ± 0.57 ^a
Spaghetti CRI	62.21 ± 1.12 ^b

Come si evidenzia dalla Tabella, gli spaghetti arricchiti con inulina da cardo ad alto PD presentano un IG inferiore all'altra tipologia di spaghetti. Questi risultati hanno permesso di ipotizzare che l'inulina possa svolgere la sua azione ipoglicemizzante con diversi meccanismi; sia mediante la competizione con l'amido presente nella pasta per l'acqua disponibile o formando una matrice protettiva attorno ai granuli di amido in modo da limitare il movimento dell'acqua, la gelatinizzazione e l'accessibilità all'enzima degradante l'amido.

Risultati parziali relativi alla sperimentazione qui descritta sono stati oggetto di una comunicazione orale dal titolo: “*The high polymerization degree influences the inulin bioaccessibility in durum wheat spaghetti*” by: Garbetta A., D’Antuono I., Melilli M. G., Linsalata V., Scandurra S., Cardinali A.

E di un poster dal titolo: “*Effect of inulin DP on quality characteristics of functional whole-meal spaghetti of durum wheat old varieties* “ by: Sillitti C., Cardinali A., Scandurra S., D’Antuono I., Linsalata V., Conte A., Del Nobile M. A., Melilli M. G.

presentati al convegno: 10TH Probiotics, Prebiotics New Foods, Nutraceuticals And Botanicals For Nutrition & Human And Microbiota Health, Università Urbaniana, Roma 8-10 Settembre 2019.

E saranno oggetto di pubblicazione scientifica su una rivista scientifica del settore con IF.

In uno studio successivo gli stessi spaghetti fortificati con inulina saranno testati in un modello di microbiota intestinale *in vitro* per valutare l'influenza del grado di polimerizzazione sulla vitalità e l'attività metabolica dei batteri selezionati.

➤ ***Attività di cooperazione scientifica con il partner straniero (INAF-LAVAL, Quèbec City, Canada)***

Nell’ambito del progetto “Functional Lab” è stata condotta dalla Dr. Isabella D’Antuono una breve attività di ricerca (dal 15/05/2019 al 15/07/2019) presso l'Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF) Laval University (Québec City, CA) con il Prof. Yves Desjardins, partner canadese del progetto. L’attività è stata finalizzata allo studio di nuovi prodotti nutraceutici da sottoprodotti della catena dell'olio d'oliva da destinare all'alimentazione umana, avente come obiettivo finale la realizzazione di olii di oliva arricchiti con polifenoli.

In particolare l'attività svolta ha riguardato la seguente tematica: Fermentazione colonica *in vitro* dei polifenoli delle acque di vegetazione dell'olio di oliva (AV) e del verbascoside purificato (VB), mediante il modello continuo PolyFermS.

Sono stati condotti due diversi esperimenti:

1. Fermentazione colonica continua *in vitro* con il modello PolyFermS, utilizzando un adulto donatore sano (donna italiana), al fine di osservare l'influenza della frazione di polifenoli presenti nelle AV sul microbiota intestinale;
2. Incubazione per 24 h del VB purificato con il microbiota intestinale umano, stabilizzato nel PolyFermS, per osservare eventuale metabolismo a carico del VB.

Sono stati utilizzati campioni di AV della cultivar di olive *Coratina* (Puglia) ed in particolare negli esperimenti è stata utilizzata la frazione Ultrafiltrato, ottenuta dopo passaggio delle AV nel sistema di filtrazione a membrana, presso i laboratori del CNR-ISPA di Bari. Questo sistema utilizza un flusso parallelo continuo, costituito da una serie di membrane con diversa porosità (da 0,1 a 0,005 μm) per fornire 3 tipi di frazioni di permeato: micro- (MF, sopra 5000 Da), ultra- (UF, da 5000 a 200 Da) e nano-filtrato (NF, inferiore a 200 Da). La frazione UF rappresenta il miglior compromesso tra contenuto di polifenoli e grado di purificazione (*D'Antuono et al., 2014*). Inoltre, durante il periodo di visit research presso i laboratori INAF, la frazione UF è stata ulteriormente processata su resina XAD7 per la rimozione di fibre/zuccheri ed infine concentrata mediante evaporazione sottovuoto. Al termine di tale purificazione e concentrazione, l'analisi HPLC-DAD della frazione UF evidenzia la composizione e la concentrazione dei principali polifenoli così come riportato nella Tabella 1:

Tabella 1. Composizione polifenolica della frazione Ultrafiltrato delle acque di vegetazione *Coratina* cv., dopo processo di rimozione degli zuccheri e concentrazione.

Polifenoli	ppm ($\mu\text{g/mL}$)
Idrossitirosolo	3191
Tirosolo	1245
Tirosolo derivato	2539
VB1 diastereoisomero	1368
VB2 diastereoisomero	1529
Verbascoside	2123
TOTALE	11997

Il VB purificato, invece, fu ottenuto sempre dalla frazione UF mediante cromatografia a filtrazione su gel, resina Sephadex LH-20. Durante tale processo di purificazione sono state raccolte diverse frazioni liquide contenenti VB, aliquotate in quantità di 1 mg e liofilizzate. Il grado di purezza VB era di circa il 95%.

Descrizione della fermentazione mediante PolyFermS con microbiota fecale umano immobilizzato

I modelli di colture cellulari sono particolarmente adatti per studi che simulano il più verosimilmente i processi *in vivo*. Tuttavia, molti di questi modelli sono basati su colture di cellule libere in sospensione, con conseguenti problemi di stabilità come la perdita di batteri meno competitivi durante gli studi sperimentali e il wash-out. Per ridurre tali problematiche e simulare più da vicino le condizioni intestinali in cui i batteri sono naturalmente presenti, è stato applicato il sistema di immobilizzazione cellulare e della fermentazione continua. L'immobilizzazione del microbiota intestinale in microsfere di gel di gellan-xantano si è mostrata utile nel riprodurre sia gli stati liberi sia i biofilm associati alle popolazioni batteriche e nel mantenere la diversità batterica ad alte densità cellulari nei reattori intestinali continui per periodi fino a 71 giorni (Fehlbaum *et al.*, 2015); inoltre il rilascio cellulare da microsfere di gel nel mezzo liquido avviene spontaneamente per via della crescita cellulare attiva nello strato periferico ad alta densità di biomassa. La manipolazione e l'incapsulamento del microbiota fecale in microsfere di gel da 1–2 mm composte da gellano, xantano, e citrato di sodio è stato eseguito in una camera anaerobica. Successivamente il bioreattore madre contenente il medium di fermentazione è stato inoculato con il microbiota incapsulato e mantenuto sotto costante controllo di T, pH, agitazione e alimentazione del medium per 14gg, ossia il periodo necessario per completare la fase di *stabilizzazione*. Successivamente tale bioreattore è stato utilizzato per inoculare continuamente due bioreattori paralleli “figlie”, uno per il trattato e l'altro per il controllo, ed entrambi sono stati alimentati con il solo medium per 4 gg fino a completamento della loro fase di stabilizzazione. Nei cinque giorni successivi, nel bioreattore trattato sono stati aggiunti ogni giorno circa 40 mg di polifenoli (tirosolo, idrossitirosolo, verbascoside,...) delle acque di vegetazione per valutare sia l'influenza sulla popolazione microbica e sia la produzione di nuovi metaboliti. Mentre nel bioreattore controllo è stato aggiunto solo il liquido (acqua) in cui erano stati solubilizzati i polifenoli. Dopo i cinque giorni di trattamento sono seguiti altri 4 giorni di stabilizzazione e i due bioreattori sono stati invertiti nel loro utilizzo, ovvero il bioreattore controllo è diventato il nuovo bioreattore trattato, e nello stesso per 5 gg sono stati aggiunti 40 mg di polifenoli/giorno, mentre l'altro bioreattore è stato utilizzato come controllo. In tal modo sono stati realizzati gli esperimenti con almeno due repliche. I campioni prelevati durante le fasi di stabilizzazione e trattamento sia dal bioreattore “madre” che dai due bioreattori “figlie” (n. 33 campioni) sono stati analizzati per l'analisi della composizione microbica mediante qPCR, quantificazione dei metaboliti microbici come Short Chain Fatty Acid (SCFA, acidi propionico, acetico, butirrico, iso-butyrico, valerico e iso-valerico) e metaboliti polifenolici analizzati mediante UPLC/Q-TOF MS.

L'elaborazione dei dati è ancora in corso ma da dati preliminari sull'andamento dei principali SCFA emerge che nelle fasi di avvio e di stabilizzazione, il contenuto di SCFA era rappresentato per circa il 95% da acetato, propionato e butirato in rapporto rispettivamente di 3: 1: 1, come normalmente riportato nelle condizioni fisiologiche umane (McNabney e Henagan, 2017). Nel confronto tra controllo e trattamento con polifenoli delle AV, non si osserva nessun cambiamento significativo nella produzione di SCFA, ma gli acidi grassi sono mantenuti a livello fisiologico, il che permette di ipotizzare un buon set-up della sperimentazione *in vitro* (Louis et al., 2014).

Incubazione del verbascoside con microflora colonica

1.0 mL di medium di fermentazione anaerobica (MacFarlane) contenente la microflora colonica stabilizzata è stato incubato con 1 mL di soluzione 0.80 mM (0.50 mg/mL) di verbascoside purificato, in piastra da 6 pozzetti ed incubata a 37 °C per 24 ore in giare sigillate con bag per anaerobiosi. Per i gruppi di controllo, è stata utilizzata acqua distillata per sostituire le soluzioni VB. Dopo 0, 6, 12, 24 ore di incubazione, 0.5 mL di ciascun campione sono stati trasferiti in una provetta Eppendorf e la reazione è stata terminata aggiungendo 0.5 mL di metanolo. Il campione è stato immediatamente agitato tramite vortex e poi centrifugato (10.000 rpm per 10 minuti). Il sovrantante è stato filtrato e conservato a – 20°C per le analisi della composizione metabolica mediante MS UPLC / Q-TOF. Le analisi sono attualmente in corso.

➤ *Progetto UMI-MICROMENU*

Nell'ambito progetto “*Joint International Research Unit between the CNR and Université Laval for Chemical and Biochemical Research on the Microbiome and its Impact on Metabolic Health and Nutrition (UMI-MicroMeNu)*”, nell'ultimo anno (2019) sono state avviate attività relative al progetto satellite dal titolo *Targeting the gut microbiota with new extracts enriched with omega-3 pufas and polyphenols from nordic biosources to alleviate cardiometabolic diseases*”.

Tale progetto vede la partecipazione oltre ai partner scientifici sopra riportati, anche di alcune aziende Canadesi della Regione del Québec (es. Silicycle, Coopérative Ferland-et-Boileau and Fruit d'Or), ed ha lo scopo di sviluppare nuovi prodotti ottimizzando i processi di estrazione e purificazione di composti bioattivi. In particolare, si prevede la realizzazione di nuovi prodotti ad alto valore aggiunto ricavati dalle biomasse marine e vegetali tipiche del Nord Canada e dalla combinazione di omega-3 ad alto contenuto di acido docosapentaenoico (DPA), e polifenoli. Questo prodotto potrebbe essere potenzialmente efficace nella prevenzione delle alterazioni del microbiota intestinale con conseguente impatto positivo nel miglioramento delle patologie cardio-metaboliche assicurando anche un elevato potenziale commerciale.

➤ **Convegno: InnoFoodMed 2019, Bari 13-15 marzo**

Infine, nell'ambito del progetto "*Functional Lab*" è stato realizzato a Bari un convegno internazionale di 3 giorni, dal 13 al 15 marzo 2019 dal titolo

InnoFoodMed 2019: Dieta Mediterranea, Alimenti Funzionali e Innovazione.

L'evento ha rappresentato un momento di confronto e dibattito tra le più importanti realtà scientifiche nazionali ed internazionali e le aziende che lavorano nel settore degli alimenti funzionali, innovativi e della nutraceutica e che hanno avuto l'opportunità di valutare la trasferibilità dei "prodotti della ricerca" e avviare azioni per favorire lo sviluppo del settore produttivo delle diverse filiere agroalimentari. La delegazione Canadese della regione del Québec (INAF-Università Laval), partner nel progetto "*Functional Lab*" ha partecipato all'evento con delle relazioni scientifiche al fine di favorire scambi scientifici/imprenditoriali con le aziende partecipanti all'evento. Inoltre, l'evento è stato sponsorizzato da NUTRHEFF CNR, un network di ricercatori coinvolti in azioni di ricerca e sviluppo tecnologico nel campo degli alimenti funzionali e nutraceutici, e dal progetto INNOTIPICO (Innovazione dei Prodotti Agroalimentari Tradizionali Pugliesi attraverso l'applicazione di strategie biotecnologiche), per il quale è stata prevista una tavola rotonda al fine di condividere i risultati e prevedere azioni future.

Di seguito il link del sito web: <http://innofoodmed.it>;

Atti di convegno ISBN 9788880803362, CNR Edizioni Anno 2019.

Bibliografía

- ✓ Ginestra G, Parker M. L., Bennett R. N., Robertson J., Mandalari G, Narbad A., Lo Curto R. B., Bisignano G., Faulds C. B., & Waldron K. W. (2009) Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] *J. Agric. Food Chem.*, 57, 10323–10330.
- ✓ De Santiago, E., Pereira-Caro, G., Moreno-Rojas, J. M., Cid, C., & De Peña, M. P. (2018a). Digestibility of (Poly) phenols and Antioxidant Activity in Raw and Cooked Cactus Cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *J. Agric. Food Chem.*, 66, 5832-5844.
- ✓ Hernández-Urbiola, M. I., Pérez-Torrero, E., & Rodríguez-García, M. E. (2011). Chemical analysis of nutritional content of prickly pads (*Opuntia ficus indica*) at varied ages in an organic harvest. *Int J Environ Res Public Health*, 8(5), 1287-1295.
- ✓ Ayadi, M. A., Abdelmaksoud, W., Ennouri, M., & Attia, H. (2009). Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making. *Ind Crops Prod*, 30(1), 40-47.
- ✓ Nerd, A., & Nobel, P. S. (1995). Accumulation, partitioning, and assimilation of nitrate in *Opuntia ficus-indica*. *J Plant Nutr*, 18(12), 2533-2549.
- ✓ Contreras-Padilla, M., Perez-Torrero, E., Hernández-Urbiola, M. I., Hernandez-Quevedo, G., del Real, A., Rivera-Munoz, E. M., & Rodríguez-García, M. E. (2011). Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. redonda) at different maturity stages. *J Food Compos Anal.*, 24(1), 38-43.
- ✓ Rocchetti, G., Pellizzoni, M., Montesano, D., & Lucini, L. (2018). Italian *Opuntia ficus-indica* cladodes as rich source of bioactive compounds with health-promoting properties. *Foods*, 7, 24; doi:10.3390/foods7020024.
- ✓ Jakobek, L., & Matic, P. (2019). Non-covalent dietary fiber-polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. *Trends Food Sci Tech.* 83: 235–247
- ✓ Ramírez-Moreno, E., Marques, C. D., Sánchez-Mata, M. C., & Goñi, I. (2011). *In vitro* calcium bioaccessibility in raw and cooked cladodes of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). *LWT- Food Sci Technol.*, 44(7), 1611-1615.
- ✓ D’Imperio, M., Renna, M., Cardinali, A., Buttaro D., Serio F., Santamaria P. (2016) Calcium biofortification and bioaccessibility in soilless “baby leaf” vegetable production. *Food Chem*, 213, 149-156.
- ✓ D’Imperio, M.; Montesano, F.F.; Renna, M.; Parente, A.; Logrieco, A.F.; Serio, F. Hydroponic Production of Reduced-Potassium Swiss Chard and Spinach: A Feasible Agronomic Approach to Tailoring Vegetables for Chronic Kidney Disease Patients. *Agronomy* 2019, 9, 627.
- ✓ D'Antuono, I., Kontogianni, V. G., Kotsiou, K., Linsalata, V., Logrieco, A. F., Tasioula-Margari, M., & Cardinali, A. (2014). Polyphenolic characterization of olive mill wastewaters, coming from Italian and Greek olive cultivars, after membrane technology. *Food research international*, 65, 301-310.
- ✓ Fehlbauer, S., Chassard, C., Haug, M. C., Fourmestreaux, C., Derrien, M., & Lacroix, C. (2015). Design and investigation of PolyFermS *in vitro* continuous fermentation models inoculated with immobilized fecal microbiota mimicking the elderly colon. *PLoS One*, 10(11), e0142793.
- ✓ McNabney, S. M., & Henagan, T. M. (2017). Short chain fatty acids in the colon and peripheral tissues: a focus on butyrate, colon cancer, obesity and insulin resistance. *Nutrients*, 9(12), 1348.
- ✓ Louis, P., Hold, G. L., & Flint, H. J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature reviews microbiology*, 12(10), 661-672.