

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÁ DI SCIENZE AGRARIE E ALIMENTARI

Corso di Laurea in

Valorizzazione e Tutela dell'Ambiente e del Territorio Montano



Studio di nuove formulazioni alimentari a base di reishi e shiitake

Relatore: Gigliola Borgonovo

Correlatore: Gemma Assante

Tesi di laurea di:

Jessica Locatelli

Matricola: 781274

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

STUDIO DI NUOVE FORMULAZIONI ALIMENTARI A BASE DI REISHI E SHIITAKE

RIASSUNTO	6
1. INTRODUZIONE	7
1.1 Micoterapia	8
1.2 <i>Ganoderma lucidum</i>	9
1.2.1 Composti presenti nel <i>Ganoderma lucidum</i> : β -glucani e acidi ganoderici	11
1.2.2 Triterpeni: acidi ganoderici	12
1.3 Shiitake	12
1.3.1 Composti presenti nello shiitake	14
1.4 Il sapore amaro	18
1.4.1 Ruoli extragustatori dei recettori per l'amaro	20
2. SCOPO DEL LAVORO	23
3. MATERIALI E METODI	24
3.1 Preparazione delle sfoglie di lampone con le spore di reishi e shiitake	25
3.2 Verifica della conservabilità delle sfoglie	26
3.3 Estrazione con solvente di spore e sfoglie	26
3.4 Analisi degli estratti grezzi ottenuti dalle spore	26
3.5 Purificazione dell'estratto integrale di sfoglie mediante SPE	28
3.6 Analisi HPLC delle frazioni antocianiche	29
3.7 Analisi spettrofotometriche	29

3.7.1 Quantificazione antocianine con il metodo del pH differenziale	30
3.7.2 Determinazione attività antiossidante	32
4. RISULTATI E DISCUSSIONI	33
4.1 Sfoglie ottenute e test effettuati	37
4.2 Valutazioni sensoriali preliminari	38
4.3 Verifica della conservabilità delle sfoglie	41
4.4 Estrazioni con solvente delle spore	45
4.5 Estrazione con solvente delle sfoglie	46
4.6 Purificazione SPE degli estratti delle sfoglie	47
4.7 Analisi TLC e HPLC delle frazioni antocianiche	50
4.8 Analisi spettrofotometriche	51
4.8.1 Metodo del pH differenziale	52
4.8.2 Attività antiossidante	56
5. CONCLUSIONI	59
Bibliografia	
Ringraziamenti	

RIASSUNTO

STUDIO DI NUOVE FORMULAZIONI ALIMENTARI A BASE DI REISHI E SHIITAKE

Il reishi (*Ganoderma lucidum*) è un fungo saprofita appartenente alla classe dei Basidiomiceti e alla famiglia delle *Polyporaceae*. Il corpo fruttifero del fungo ha un colore che varia dal rosso al nero e ha un caratteristico aspetto lucido, da cui il nome scientifico. Le prime testimonianze di impiego del *Ganoderma* risalgono al 2000 a.C.: imperatori e Re orientali (Cina e Giappone) consumavano questo fungo, ritenuto miracoloso, per via delle sue innumerevoli proprietà terapeutiche, sulle quali sono state effettuate in tempi recenti indagini scientifiche. Tra i composti bioattivi presenti nel fungo troviamo i polisaccaridi (β -glucani), triterpeni tra cui gli acidi ganoderici, vitamine A, E e del gruppo B e molti minerali. I β -glucani sembrano avere un ruolo importante per quanto riguarda l'immunomodulazione, studi in vitro hanno dimostrato che questi composti sono in grado di attivare direttamente i leucociti stimolando i processi di fagocitosi, citotossicità ed attività antimicrobica (¹). Altri studi in vitro e in vivo indicano che il reishi ha effetti chemiopreventivi (²). Attività antiinfiammatorie e antitumorali sono state descritte in diversi articoli scientifici (³).

Lo shiitake (*Lentinula edodes*) è un fungo Basidiomicete appartenente alla famiglia delle *Tricholomataceae*, è commestibile e, come il reishi, è conosciuto fin dall'antichità per le sue proprietà medicamentose. Tra le varie proprietà biologiche riportate in letteratura figurano l'attività antivirale, antibatterica, antitumorale e

¹ Cazzavillan S.,2007. I β -glucani struttura e meccanismo d'azione. International Mychoterapy Institute 16-19.

² Weng C.J., Yen G.C.,2010. The in vitro and in vivo experimental evidences dislose the chemio preventive effects of on cancer invasion and metastasis. Clin. Exp Metastasis 27(5):361-369.

³ Patel S. Goyal A.,2012. Recent developments in mushrooms as anticancer therapeutics: a review. Biotech. 2(1):1-15.

l'azione immunostimolante⁽⁴⁾ (⁵). Il lentinano, un β -glucano presente nel fungo, ha proprietà immunostimolanti – immunomodulanti ed agisce riequilibrando e rafforzando l'attività del sistema immunitario. L'aumento della produzione di anticorpi agisce da barriera contro infezioni sia batteriche che virali e, secondo numerosi studi, contribuisce ad inibire la proliferazione delle cellule cancerose in alcune neoplasie. Oggi questi due funghi sono sempre più conosciuti anche in occidente: infatti vengono venduti come integratori in capsule o sottoforma di bevande quali thè, caffè, cioccolata e rientrano in quella categoria di prodotti definiti “funzionali” o “nutraceutici”.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato rivolto alla ricerca di una formulazione alimentare innovativa per le spore dei funghi, cercando di avvicinare e far gradire un nuovo prodotto al consumatore. Nell'ambito di una collaborazione con l'azienda agricola *Settimocielo*, situata a Bretto superiore di Camerata Cornello (BG), sono state realizzate delle sfoglie di lampone addizionate di spore di reishi e shiitake (1% in peso) mediante essiccazione a basse temperature.

La ricerca si è sviluppata secondo le seguenti direttive:

- 1) verifica della conservabilità delle sfoglie di lampone prodotte sia tali e quali sia addizionate di polvere fungina (acquistata da aziende che coltivano questi funghi);
- 2) preliminare valutazione sensoriale sui tre tipi di sfoglie prodotte (TQ, addizionate con reishi o shiitake).;
- 3) valutazione della composizione degli estratti ottenuti dalla polvere di fungo, mediante estrazione con solventi a caldo a polarità crescente (diclorometano, metanolo ed acqua);
- 4) valutazione della composizione degli estratti ottenuti dalle tre sfoglie.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza quanto segue:

⁴ Chang R.,1996. Functional properties of edible mushrooms. Nutr. Rev. 54: 91-93

⁵ Hatvani N.,2001. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. Int. J. Antimicrobial Agents 17: 71-74.

1) Il protocollo messo a punto per la produzione delle sfoglie è valido, non essendo state riscontrate contaminazioni da microrganismi estranei; La polvere fungina utilizzata per la produzione di sfoglie addizionate con reishi o shiitake è formata da spore non vitali.

2) Sono stati eseguiti degli assaggi preliminari per le tre sfoglie e per le spore con un panel di sei giudici non addestrati.

- Le sfoglie sono risultate abbastanza gradite per quanto riguarda colore, aroma, aspetto, consistenza, gusto (quest'ultimo leggermente astringente in tutte e tre le sfoglie e amaro in quelle con l'aggiunta di *Ganoderma*);

- Le spore all'assaggio sono risultate molto amare e sgradevoli.

3) Gli estratti delle polveri fungine valutati per quanto riguarda il profilo compositivo hanno messo in evidenza che:

- gli estratti in diclorometano presentano un profilo ^1H NMR che è coerente con una miscela di triterpeni;

- gli estratti metanolici mostrano segnali tipici di zuccheri;

- l'estratto acquoso che è stato liofilizzato e analizzato mediante NMR in stato solido (CP-MAS) ha evidenziato la presenza di polisaccaridi, probabilmente β -glucani;

Inoltre gli estratti ottenuti sono stati saggiati in vitro con i recettori clonati del sapore amaro, grazie ad una collaborazione con l'azienda AXXAM di Milano.

4) Le sfoglie sono state estratte con metanolo acido e gli estratti sono stati purificati mediante tecnologia SPE (Solid Phase Extration), per separare le antocianine da zuccheri, fenoli e acidi organici. Le frazioni antocianiche purificate delle tre sfoglie sono state analizzate mediante TLC e HPLC. I dati ottenuti hanno rivelato la presenza della cianidina-3-glucoside e di un altro componente antocianico. Sono state fatte analisi spettrofotometriche per la quantificazione delle antocianine monometriche totali (metodo del pH differenziale) e per l'attività antiossidante mediante saggio con DPPH.

In definitiva con questo lavoro di tesi siamo riusciti a realizzare un nuovo prodotto alimentare a base di reishi e shiitake, verificando a grandi linee la presenza di alcuni composti che sembrano dare le proprietà terapeutiche descritte in letteratura.

1. INTRODUZIONE

L'uomo da sempre ha utilizzato gran parte degli elementi naturali del regno vegetale: dal tronco degli alberi per legname, ai rami come legna da ardere, ai frutti per cibo insieme a radici, semi, oltre che come fonte di sostanze medicamentose. La natura ha rappresentato una fonte pressoché inesauribile di farmaci già da ben prima che la ricerca farmaceutica mettesse a disposizione rimedi contro le tante malattie che affliggono l'umanità.

Alcuni funghi quali reishi (*Ganoderma lucidum*) e shiitake (*Lentinula edodes*) vengono utilizzati da millenni nella medicina tradizionale orientale per la prevenzione e la cura di disturbi e malattie.

1.1 Micoterapia

La micoterapia, ovvero quella branca della fitoterapia che utilizza i funghi come medicamento, è diffusa e praticata soprattutto in oriente ove vengono utilizzati i funghi sotto forma di carpofori freschi o secchi oppure come estratto di micelio e carpofori. La medicina sudcoreana fa uso di ben 404 specie fungine diverse e più di 540 specie di funghi medicinali sono menzionate nei libri di materia medica cinese, a 331 sono attribuite attività antitumorali, a 51 antibatteriche e a 4 antivirali. ⁽¹⁾ L'importanza dei funghi per la salute umana è ben nota anche in occidente ed è stata evidenziata dalla scoperta da parte di Alexander Fleming nel 1928 della penicillina, prodotta da diverse specie di *Penicillium*. L'interesse delle industrie farmaceutiche verso i miceti come fonte potenziale di farmaci si è sviluppata a partire dagli anni sessanta; oggi i funghi stanno acquisendo un ruolo sempre più di rilievo nel panorama salutistico-terapeutico nel mondo occidentale grazie alle loro interessanti proprietà. Di 515 pubblicazioni apparse fra il 1850 e il 2012 ed emerse dalla ricerca, 20 descrivono l'uso dei funghi nella realtà clinica e la qualità scientifica di questi studi è discutibile. Lavori di sintesi giungono alla conclusione che la micoterapia necessita di ulteriori ricerche prima di poter essere accettata dalla comunità medica. ⁽²⁾ Studi in vitro su prodotti usati in micoterapia hanno dimostrato attività farmacologiche antibatteriche e antivirali ⁽³⁾ o immunologiche e anticancerogene ⁽⁴⁾.

Composti chimici con tali attività sono presenti in moltissime piante e altri organismi viventi e la loro efficacia in vitro non comporta necessariamente un effetto corrispondente nella pratica clinica. Inoltre, l'attività farmacologica di piante e funghi

è spesso legata a chemotipi ben definiti (⁵). Non bisogna sottovalutare la qualità dei prodotti usati, che possono contenere quantità variabili di principi attivi.

L'uso terapeutico di funghi deve essere preceduto dalla dimostrazione clinica della loro utilità, anche perché è indispensabile conoscere l'efficacia, ma anche il profilo tossicologico. Un medicamento può provocare effetti secondari con reazioni tossicologiche e farmacologiche avverse.

In futuro è opportuno studiare approfonditamente la micoterapia in modo oggettivo, non lasciandosi abbagliare dalle attività rilevate in vitro e spesso non riproducibili in vivo.

Oggi alcuni funghi, come reishi e shiitake, sono presenti sul mercato come integratori dietetici. Le ricerche tossicologiche, cliniche e farmacologiche potrebbero permetterne il passaggio allo stato di medicamento, anche se questa possibilità pare remota a causa dei costi legati allo sviluppo di nuovi farmaci.

1.2 *Ganoderma lucidum*

Il *Ganoderma lucidum* (**Figura 1**) è comunemente chiamato in giapponese reishi o mannetake e in cinese ling-zhi. In italiano il termine ling-zhi può avere varie traduzioni fra cui "Erba dalla potenza spirituale" e "Fungo divino". Il termine giapponese reishi significa "Pianta dell'immortalità", mentre mannetake si traduce come "Fungo dei 10.000 anni".

Il *Ganoderma* è un fungo saprofita che nasce su alberi in decomposizione come la quercia o il castagno, cresce in zone molto umide e calde, solitario o in pochi esemplari.



(Figura 1) *Ganoderma lucidum*

Il *Ganoderma* appartiene alla classe dei Basidiomiceti e alla famiglia delle *Polyporaceae*, non è commestibile per la sua consistenza legnosa e il suo sapore amaro che risulta molto sgradevole.

Il corpo fruttifero del fungo ha un colore che varia dal rosso al nero e ha un caratteristico aspetto lucido, da cui il nome scientifico.

Le prime testimonianze di impiego del reishi risalgono al 2000 a.C.: fin da allora fu identificato all'interno della cultura cinese e giapponese come standardo di regalità, in quanto solo ad Imperatori e Re era concesso il privilegio di usufruire degli effetti benefici del *Ganoderma*. Al contrario, l'onere della raccolta e della polverizzazione ai fini della realizzazione di infusi benefici era riservato alle persone dei ceti meno abbienti.

Proprietà del *Ganoderma lucidum*

Sul *Ganoderma lucidum*, tradizionalmente ritenuto un fungo miracoloso, sono stati effettuati rigorosi studi scientifici, sia in vitro che in vivo su modelli animali ⁽⁶⁾ per quanto riguarda le molteplici proprietà terapeutiche ad esso attribuite: immunomodulanti, antitumorali, adattogene, antiallergiche, antidiabetiche, antiaggreganti piastriniche, antiossidanti, cardiotoniche ed apatopotretive.

Da questo fungo sono stati isolati innumerevoli metaboliti responsabili di attività biologiche. Fra questi vi sono i β -glucani, i polissaccaridi e le glicoproteine con attività immunomodulante e antitumorale, i triterpeni e i metaboliti secondari con attività tra le più svariate (antistaminiche, antiaggreganti, etc.), le vitamine A ed E, nonché le vitamine del gruppo B e molti minerali, tra cui il germanio, che conferisce al reishi proprietà ossigenanti tissutali e ne spiega le proprietà benefiche nei confronti dei disturbi dell'altitudine.

Le proprietà antitumorali o immunostimolanti di sostanze isolate (ad esempio terpeni e polisaccaridi) dal *G.* sono state descritte in diversi articoli scientifici. ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾

Una recente pubblicazione riassuntiva ⁽⁹⁾ ha esaminato l'efficacia del trattamento con *G.* contro le forme cancerose: gli autori hanno concluso che l'evidenza scientifica disponibile non giustificava l'uso del fungo quale unico trattamento curativo.

1.2.1 Composti presenti nel *Ganoderma lucidum*: β -glucani e acidi ganoderici

Polisaccaridi: β -glucani

Fra i composti isolati dal reishi figurano i polisaccaridi, carboidrati complessi costituiti da catene di zuccheri semplici. L'attività biologica di questa classe di composti sembrerebbe essere quella di stabilizzare la pressione sanguigna e la glicemia, e l'azione come antiossidanti.

I polisaccaridi sono presenti sia nelle strutture vegetali che nei tessuti animali, ma quelli fungini sono estremamente più complessi dal punto di vista molecolare.

Diversamente dalle sostanze contenute nelle piante, che sono alla base dell'80% delle molecole utilizzate oggi in farmacologia, i polisaccaridi fungini, per la loro complessità strutturale sono difficilmente sintetizzabili in laboratorio.

Ai polisaccaridi appartengono i β -glucani, che si trovano principalmente nelle pareti cellulari dei funghi medicinali; essi sono un gruppo eterogeneo di polimeri costituiti da scheletri di unità di glucosio in catena lineare unite da legame glucosidico $\beta(1,3)$ e ramificazioni laterali di unità glicopiranosiliche unite da legami $\beta(1,6)$. La variabilità strutturale è elevatissima sia per le possibilità combinatorie che per le capacità di ramificazione. La capacità di immunomodulazione di queste sostanze è molto variabile ed è legata alla diversità strutturale e alla variabilità di queste molecole.

Sui β -glucani sono stati pubblicati moltissimi lavori scientifici: i dati esistenti permettono di affermare che l'effetto di immunomodulazione dipende dalla complessità strutturale, ossia dall'entità di ramificazioni, dalla lunghezza dei polimeri e quindi dalla struttura terziaria. Studi in vitro hanno dimostrato che i β -glucani ad alto peso molecolare possono attivare direttamente i leucociti stimolando i processi di fagocitosi, citotossicità ed attività antimicrobica. ⁽¹⁰⁾

I β -glucani ad alto peso molecolare aumenterebbero, inoltre, le capacità di riconoscimento ed eliminazione delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi.

Anche i β -glucani a intermedio e basso peso molecolare hanno evidenziato attività biologica in vivo, ma i loro effetti a livello cellulare sono meno chiari. I β -glucani a peso molecolare molto basso (5000-10000 Dalton come la Laminarina) sono invece considerati inattivi.

La somministrazione in vivo dei β -glucani sia per via orale che endovenosa ha dimostrato effetti di potenziamento delle risposte dell'ospite a condizioni patologiche quali la trasformazione neoplastica e lo sviluppo di patologie infettive virali, batteriche, fungine e protozoarie.

I dati ottenuti in molti lavori scientifici hanno reso plausibili sperimentazioni cliniche sia come immunoterapia nei tumori, che come profilassi nella prevenzione delle infezioni.

Tra i vantaggi derivati dall'assunzione di queste sostanze vi è la loro capacità di persistere nelle cellule animali per lungo tempo dopo l'assunzione. Le cellule animali infatti non sono in grado di digerire queste molecole per mancanza dell'enzima $\beta(1,3)$ glucanasi.

A livello molecolare i recettori coinvolti nell'azione biologica dei β -glucani fino ad ora identificati sono tre, ma il ruolo centrale sembra averlo il recettore CR3 in grado di indurre attivazione di fenomeni di citotossicità nei confronti delle cellule bersaglio da parte dell'azione concertata di macrofagi, granulociti e NK (Natural Killer).

La scoperta delle modalità di legame dei β -glucani ai recettori, le interazioni fra cellule coinvolte e sistema immunitario ed i risultati della sperimentazione su modelli animali (nei quali si è riscontrata sinergia di azione e aumento della risposta terapeutica), forniscono le basi per l'utilizzo razionale di queste sostanze anche nell'uomo.

1.2.2 Triterpeni: acidi ganoderici

L'acido ganoderico è un triterpene avente proprietà antiinfiammatorie; studi cinesi paragonano l'utilizzo di 220 mg di estratto di reishi ottenuto in etere, a 5 mg di idrocortisone. ⁽¹¹⁾ Come è noto, i farmaci cortisonici vengono impiegati nelle fasi acute di patologie allergiche: a dimostrazione delle proprietà antiinfiammatorie del G. nel 2012 da uno studio sulla rinite allergica, è emerso che il trattamento a lungo termine con *Ganoderma* può essere una valida via terapeutica. L'utilizzo di questo fungo da parte di persone con problemi di allergia potrebbe risultare interessante per limitare l'uso di farmaci cortisonici, che hanno effetti collaterali da non sottovalutare. Il reishi può essere impiegato anche per le patologie bronchiali, l'uso per questi tipi di disturbi è diffuso in Cina e negli USA dove è commercializzato un composto fitoterapico (ASHMI, contenente ling-zhi, *Sophora flavescens* e liquirizia) sul quale sono stati svolti studi nel 2009 da parte della divisione pediatrica di medicina polmonare della Columbia University. Questo studio afferma che l'uso del fitocomposto ASHMI da parte di soggetti asmatici non crea problemi di effetti collaterali. Uno studio successivo sul ASHMI fatto nel marzo del 2010 dal titolo: "The traditional Chinese herbal formula ASHMI inhibits allergic lung inflammation in antigen-sensitized and antigen-challenged aged mice" a cura della Division of

Clinical Immunology, Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine New York afferma che il *Ganoderma* agisce nella modulazione della risposta delle immunoglobuline E, un tipo di anticorpi che intervengono nelle risposte allergiche. Altri studi hanno evidenziato l'azione degli acidi ganoderici e la loro attività apoptotica. L'apoptosi è un processo di morte programmata di una cellula quando questa è danneggiata oltre le proprie capacità di riparazione, oppure infettata da un virus. Il segnale apoptotico può venire dalla cellula stessa, dal tessuto circostante o da cellule del sistema immunitario. Mandare in apoptosi una cellula tumorale vuol dire farla morire, ovvero vuol dire fermarne la proliferazione. Lo studio afferma che reishi è un candidato ideale per l'uso potenziale complementare in chemio-immunoterapia. Riuscendo a direzionare gli acidi ganoderici tramite nanotecnologie direttamente sui tessuti colpiti da tumore, si potrebbe aprire una strada per nuovi protocolli di cura.

1.3 Shiitake

Lo shiitake (*Lentinula edodes*) (**Figura 2**) è un fungo Basidiomicete appartenente alla famiglia delle *Tricholomataceae*, è commestibile e molto ricercato per i suoi effetti terapeutici, soprattutto sul sistema immunitario.

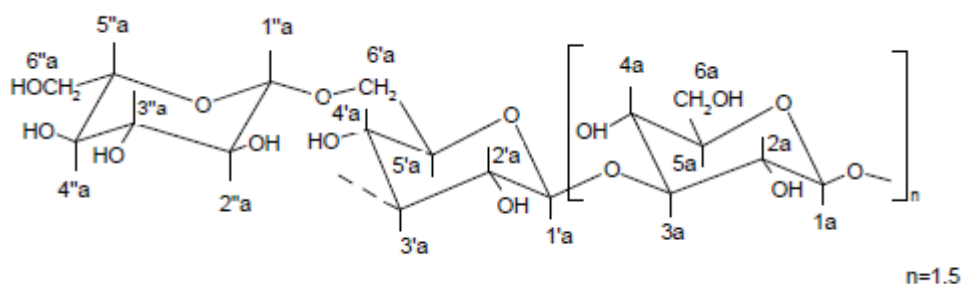


(Figura 2) *Lentinula edodes*

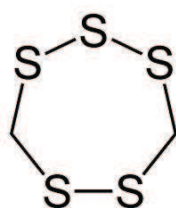
Il nome "shiitake" deriva dalla congiunzione della parola giapponese "shii", che indica la quercia (uno degli alberi su cui questo micete cresce preferenzialmente), con il termine "take", che significa fungo.

1.3.1 Composti presenti nello shiitake

Il fungo contiene amminoacidi essenziali quali Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Trionina e Valina. Le frazioni minerali sono costituite per il 97-98% da potassio, fosforo, calcio e magnesio.⁽¹²⁾ Altri importanti costituenti sono le vitamine del gruppo B, come Tiamina, Riboflavina, Niacina; terpenoidi; steroidi; fenoli e nucleotidi. I principi attivi comprendono il polisaccaride lentinano (1-3) β -D-glucano (**Figura 3**), l'aminoacido non proteico eritadenina e un composto ciclico solforato: la lentionina, parzialmente responsabile del sapore del fungo (**Figura 4**).⁽¹³⁾ Oltre a dare il sapore al fungo, la lentionina inibisce l'aggregazione piastrinica. Altri composti organosolforati rinvenuti nell'aglio presentano effetti simili.



(Figura 3) Struttura del lentinano isolato da *Lentinula edodes*



(Figura 4) Struttura della lentionina

I lipidi estratti contengono steroidi come l'ergosterolo.⁽¹⁴⁾

Lo shiitake ha un alto valore nutrizionale ed è conosciuto fin dall'antichità per le sue proprietà medicamentose. Molte di queste proprietà sono studiate in laboratorio come l'attività antivirale, antibatterica, antitumorale e l'azione immunostimolante.⁽¹⁵⁾

(¹⁶) Il lentinano ha proprietà immunostimolanti – immunomodulanti ed agisce riequilibrando e rafforzando l'attività del sistema immunitario, infatti, è in grado di sollecitare i macrofagi, i linfociti T e le cellule Natural Killer, cioè quei tipi di globuli bianchi deputati a riconoscere e distruggere elementi potenzialmente dannosi per l'organismo.⁽¹⁷⁾ Questo processo, collegato a un'aumentata produzione di anticorpi, agisce da barriera contro infezioni sia batteriche che virali e, secondo numerosi studi, contribuisce ad inibire la proliferazione delle cellule cancerose in alcune neoplasie. Numerose ricerche di istituzioni come il *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* di New York, hanno documentato che i principi attivi dello shiitake, migliorando la risposta immune, possono essere un valido complemento naturale alle terapie tradizionali contro il cancro. In particolare, risale al 2002 uno studio che dimostra come il lentinano agevoli la regressione del cancro al colon. Sperimentazioni ancora più recenti del 2009 collegano la sua somministrazione a un'aumentata sopravvivenza di pazienti affetti da neoplasie gastriche e tumore del pancreas in stadio avanzato.⁽¹⁸⁾

1.4 Il sapore amaro

Le sostanze naturali amare sono caratterizzate da una grande eterogeneità strutturale a cui corrisponde un'elevata variabilità a livello di recettori gustativi per l'amaro.

Il gusto amaro ha l'oneroso compito di prevenire l'ingestione di un vasto numero di composti tossici, che presentano diverse strutture chimiche. Nonostante la vastità di questo repertorio, questi composti evocano tutti una sensazione simile che noi riconosciamo semplicemente come "amaro". Questa osservazione suggerisce che i recettori per l'amaro siano codificati da una grande famiglia di geni, e che la sensazione di amaro si sia evoluta per permettere il riconoscimento di un vasto range di composti, ma non necessariamente per distinguerli gli uni dagli altri.

I recettori per il gusto amaro sono denominati T2R (o TA2R) e sono proteine appartenenti alla classe GPCR (G Protein Coupled Receptor). Questi recettori presentano sette domini transmembrana e un corto dominio amino-terminale extracellulare.

Nel nostro genoma è presente un pattern di circa 30 geni (hTAS2Rs) localizzati sui cromosomi 5, 7 e 12, che codificano per soli 25 recettori (T2Rs); da un punto di vista filogenetico sono molto conservati ma presentano numerose variazioni geniche in

specifici siti all'interno dei loci. Dalla comparazione delle sequenze dei geni si è notato come i TAS2R localizzati sullo stesso cromosoma fossero molto più simili tra loro rispetto a quelli presenti su cromosomi differenti. Questa diversità è stata attribuita a possibili duplicazioni tandem verificatesi nei geni ancestrali che hanno portato alla formazione di una serie diversificata di recettori per l'amaro. ⁽¹⁹⁾

I recettori T2Rs sono proteine costituite da circa 290-330 amminoacidi e dispongono di un livello di variabilità elevato dal 17% al 90%, le parti più diversificate dei TAS2R sono le regioni extracellulari che sono le porzioni deputate al legame con le sostanze amare. Questa variabilità genetica è responsabile dell'alta variabilità nella percezione del sapore amaro riscontrata nell'uomo ⁽²⁰⁾.

L'uomo percepisce come amare migliaia di sostanze, i recettori T2R identificati sono solo 25. Vi è dunque una forte discrepanza tra il numero di molecole riconosciute come amare e il numero dei recettori. Recentemente sono state testate su recettori umani clonati hTAS2Rs 104 molecole, sia di origine vegetale, sia di sintesi, riconosciute come amare. Come si evince dalle **(Figure 5 e 6)**, un composto può agire su più recettori e lo stesso recettore può essere attivato da più molecole, per alcuni recettori, invece, non è stato identificato alcun ligando, sono cioè recettori orfani.

Vi è un crescente interesse del mondo scientifico nella ricerca di nuovi agonisti, e in particolar modo nella deorfanziazione dei recettori per i quali non è ancora stato identificato alcun ligando. ⁽²¹⁾

hTAS2R compound	1	3	4	5	7	8	9	10	13	14	16	38	39	40	41*	42*	43	44	45*	46	47	48*	49	50	60*	n.r	
Absinthin	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	#	-	-	-	-	4
2-Acetylpyrazine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Aloin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	§	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Allylisothiocyanate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Amarogentin	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	#	-	-	#	#	-	-	#	-	-	7
Amygdalin, D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Andrographolide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	#	-	-	#	-	-	3
Arborescin	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	#	-	-	-	-	-	-	6
Arbutin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Arglabin	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	#	-	-	-	-	-	-	4
Aristolochic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	#	#	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Artemorin	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	+	-	-	-	-	-	5
Brucine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	2
Campher	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	4
Caffeine	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	5
Cascarillin	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	+	-	-	-	-	-	5
Chloramphenicol	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	#	-	-	-	-	-	-	6
Cnicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	1
Colchicine	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3
Coumarin	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Crispolide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	1
Cucurbitacin B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Cucurbitacin E	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Curcumin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Digtonin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Emetine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Erythromycin	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Ethylpyrazine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Falcarindiol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Ginkgolide A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Grossheimin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	#	-	-	-	-	-	-	2
Helicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Humulone isomeres	#	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Limonin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Naringin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Neohesperidine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Nicotin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Nimbin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Noscapine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

hTAS2R compound	1	3	4	5	7	8	9	10	13	14	16	38	39	40	41*	42*	43	44	45*	46	47	48*	49	50	60*	n.r.
Ouabain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Papaverine	-	-	-	-	#	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Parthenolide	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	#	-	-	-	-	7
Picrotoxinin	+	-	-	-	-	-	-	+	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	+	-	-	-	5
Phenylethyl isothiocyanate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Quassin	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	5
Quinine	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	9
Riboflavin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
o-salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Sinigrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Solanine, alpha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Solanidine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Strychnine	-	-	-	-	§	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	3
L-sulforaphane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Taurine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Tatridin B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	1
Thiamine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Thujon, (-)-α-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Yohimbine	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	5

(Figura 5) Profilo di risposta di 25 hTAS2R stimolati con 58 molecole amare di origine naturale. Legenda: * recettori rimasti orfani; + risposta; - non risposta; # agonisti già conosciuti confermati da Meyerhof; § agonisti già conosciuti non confermati da Meyerhof.

hTAS2R compound	1	3	4	5	7	8	9	10	13	14	16	38	39	40	41*	42*	43	44	45*	46	47	48*	49	50	60*	n.r.	
Acesulfame K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	#	-	-	-	-	-	-	-	2	
Acetaminophen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Acetylthiourea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Antipyrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Azathioprine	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	5
Benzamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Benzoin	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Caprolactam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Carisoprodol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
Chlorhexidine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Chloroquine	-	+	-	-	§	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Chlorpheniramine	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	8
Cromolyn	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	3
Cycloheximide	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Dapsone	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Denatonium benzoate	-	-	#	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	#	-	-	#	#	-	-	-	-	8
Dextromethopphan	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Dihydrophenanthrene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Dimethyl thioformamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Diphenhydramine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Diphenidol	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	15
Diphenylthiourea	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Divinylsulfoxid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Doxepin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
N-ethylthiourea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
N,N'-ethylene thiourea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Famotidine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2
Fenspiride	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Flufenamic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Haloperidol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Hydrocortisone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
4-Hydroxyanisol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Methimazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
4(6)-Methyl-2-thiouraci	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Methylthiourea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Metronidazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Naphazoline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Orphenadrine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

hTAS2R compound	1	3	4	5	7	8	9	10	13	14	16	38	39	40	41*	42*	43	44	45*	46	47	48*	49	50	60*	n.r	
1,10-Phenanthroline	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Phenylthiocarbamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Propylthiouracil	-	-	§	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Saccharin	-	-	-	-	§	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	#	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Sodium benzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Sodium cyclamate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Sodium thiocyanate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2

(Figura 6) Profilo di risposta di hTAS2R a 46 composti amari sintetici.

1.4.1 Ruoli extragustatori dei recettori per l'amaro

Oltre al meccanismo di selezione negativa, il gusto amaro in molti casi può essere correlato a proprietà benefiche per la salute.

La scoperta dei recettori dell'amaro in tessuti non gustativi ha dato avvio a numerosi studi sulle funzioni extragustative dei T2Rs.

Recettori gustativi T2R sono stati identificati nel tessuto muscolare liscio delle vie aeree umane (AMS). Agonisti T2R come saccarina, cloroquina e denatonio benzoato determinano un aumento del calcio intracellulare, a un livello comparabile a quello causato dai broncocostrittori. Ci si aspetterebbe dunque una contrazione della muscolatura, paradossalmente le sostanze amare causano invece rilassamento del ASM e dunque broncodilatazione. L'effetto di broncodilatazione è più marcato anche degli agonisti dei recettori $\beta 2$ adrenergici comunemente usati nella terapia dell'asma e di altre malattie ostruttive dell'apparato respiratorio quali la bronco pneumopatia cronica ostruttiva.⁽²²⁾ ⁽²³⁾

I recettori maggiormente espressi nelle vie aeree sono i T2R10, 14 e 31.

Un recente studio si è focalizzato sulla potenzialità del recettore T2R38 nella difesa delle vie aeree, dimostrando che T2R38 è espresso nelle ciglia delle cellule epiteliali nasali. Il legame con acil-omoserina lattone (AHL), secreta da batteri gram negativi, stimola un aumento di secrezione di ossido nitrico, che causa un aumento della clearance mucocigliare e uccide direttamente i batteri.⁽²⁴⁾

I recettori T2R4 sono stati isolati nel cervello di ratto, e grazie a test in vitro si è visto che due agonisti esogeni, il denatonio benzoato e la quinina, legano questo recettore e causano un aumento del livello di Ca^{2+} citosolico, che porta a una

maggior secrezione di peptidi regolatori coinvolti in molti processi fisiologici. Non si conoscono però i ligandi endogeni del recettore. ⁽²⁵⁾

Recettori della famiglia T2R sono stati identificati anche nelle cellule epiteliali e neuroendocrine del tratto gastro-intestinale del topo. La loro attivazione a seguito di legame con denatonio benzoato causa l'aumento di Ca^{2+} intracellulare che comporta l'aumento di colecistichina (CCK), un peptide coinvolto nel processo di regolazione dell'assunzione di cibo, il rilascio di bile e di enzimi pancreatici digestivi e determina il senso di sazietà. ⁽²⁶⁾ Uno studio simile, sempre su modello animale, prova che il denatonio benzoato inibisce lo svuotamento gastrico. ⁽²⁷⁾

Foster e colleghi ⁽²⁸⁾ hanno trovato che i recettori per l'amaro sono espressi anche nelle cellule del miocardio di ratti e uomo. La loro presenza in queste cellule suggerirebbe una specializzazione delle cellule nel percepire la condizione dell'ambiente extracellulare e influenzare la sopravvivenza del tessuto, specialmente in caso di mancanza di nutrienti cellulari.

Infine anche le cellule del midollo osseo esprimono i recettori per l'amaro, in particolare il T2R46 con funzione di rilevare i cambiamenti dell'ambiente circostante la cellula. ⁽²⁹⁾

Alla luce di tutto ciò vi è un forte interesse nello studiare sostanze amare, meglio se di origine naturale, da potersi utilizzare come potenziali farmaci per il trattamento di diverse patologie.

2. SCOPO DEL LAVORO

Il concetto di alimentazione tende ad evolversi, allargando il suo ruolo agli aspetti salutistici, che possono apportare benefici fisiologici tali da regolare le funzioni dell'organismo nel prevenire o ritardare alcune malattie, come è testimoniato dall'offerta di alimenti noti sotto il nome di "funzionali" o "nutraceutici". In analogia al settore degli alimenti salutari, sono offerti sul mercato una serie di prodotti cosmetici, con il termine di "cosmoceutici".

Il lavoro di questa tesi nasce dal voler formulare un nuovo prodotto alimentare: le sfoglie di lampone con l'aggiunta di spore dei funghi reishi e shiitake; un prodotto

alternativo alla frutta fresca o secca e ai classici prodotti disponibili sul mercato a base di questi funghi e/o loro spore.

Le sfoglie a base di sola frutta vengono già prodotte e commercializzate dall'azienda *Settimocielo* e consistono sostanzialmente in comode confezioni. **(Figura 7)**



(Figura 7) Sfoglie a base di frutta prodotte dall'azienda *Settimocielo*.

Le sfoglie di frutta, grazie al metodo della disidratazione, si conservano a lungo e sono poco ingombranti, a differenza della frutta fresca che è facilmente deperibile, scomoda da consumare fuori casa e da portare in giro. Inoltre, il metodo della disidratazione mantiene intatte le proprietà organolettiche ed alimentari del frutto, a differenza di altre lavorazioni come i succhi e le confetture in cui vengono alterate tramite cottura. Ogni confezione contiene un etto e mezzo di frutta, che la disidratazione ha ridotto a 15 grammi.

In questo lavoro di tesi abbiamo voluto arricchire le sfoglie di frutta al lampone con le spore di reishi e shiitake per via delle interessanti proprietà che hanno questi funghi, e che vengono documentate con accurate analisi scientifiche in letteratura.

Oggi, sul mercato sono reperibili vari prodotti a base di questi funghi e si tratta principalmente di integratori alimentari venduti come capsule o sottoforma di bevande come thè, caffè e cioccolata. **(Figura 8)**



(Figura 8) Da sinistra verso destra abbiamo rispettivamente: caffè a base di reishi; cioccolata a base di reishi; capsule a base di shiitake.

In primo luogo, è stata verificata la conservabilità delle sfoglie, al fine di assicurarsi che la polvere fungina non contenesse il fungo in condizioni vitali, e l'eventuale contaminazione fungina delle sfoglie di lamponi tale e quali e addizionate di spore.

Parallelamente sono state condotte prove preliminari di analisi sensoriali sulle spore e sulle sfoglie addizionate di spore.

Successivamente sono stati ottenuti tre estratti sottoponendo le spore ad estrazione con solventi a polarità crescente (diclorometano, metanolo e acqua) in modo da frazionare i componenti in base alla polarità. Gli estratti ottenuti sono stati analizzati per quanto riguarda il profilo compositivo con i metodi ^1H NMR e NMR in stato solido (CP-MAS). L'interesse legato al particolare sapore amaro delle spore ci ha indotti a saggiare in vitro gli estratti delle spore con i recettori clonati dell'amaro grazie ad una collaborazione esterna con l'azienda AXXAM di Milano. Le sfoglie sono state sottoposte ad estrazione con metanolo acido, ottenendo tre estratti di cui abbiamo analizzato le frazioni antocianiche con TLC e HPLC. Inoltre, sono state quantificate le antocianine monometriche totali mediante analisi spettrofotometriche (metodo del pH differenziale) e saggiata l'attività antiossidante mediante saggio con DPPH.

Grazie al lavoro svolto siamo riusciti a formulare un nuovo prodotto alimentare a base di reishi e shiitake dal sapore gradevole.

Lo scopo ultimo di questo lavoro potrebbe essere l'identificazione delle specie di reishi e shiitake che crescono naturalmente anche nei nostri boschi, nonché la possibilità di coltivare questi funghi, cosa che per altro viene già fatta.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Preparazione delle sfoglie di lampone con spore di reishi e shiitake

Sono stati utilizzati frutti freschi di varietà di lamponi “*Tulameen*”, coltivati dall’azienda agricola *Settimocielo*, situata a Bratto di Camerata Cornello in provincia di Bergamo. I lamponi sono stati raccolti nel Settembre del 2012 e subito dopo inseriti in un abbattitore per una surgelazione rapida a -20°C . I frutti surgelati vengono mantenuti in cella frigorifera a -20°C per almeno 10 giorni, successivamente vengono scongelati, frullati e miscelati con la polvere di fungo, quest’ultima è stata acquistata in rete da rivenditori certificati. **(Figura 9)**



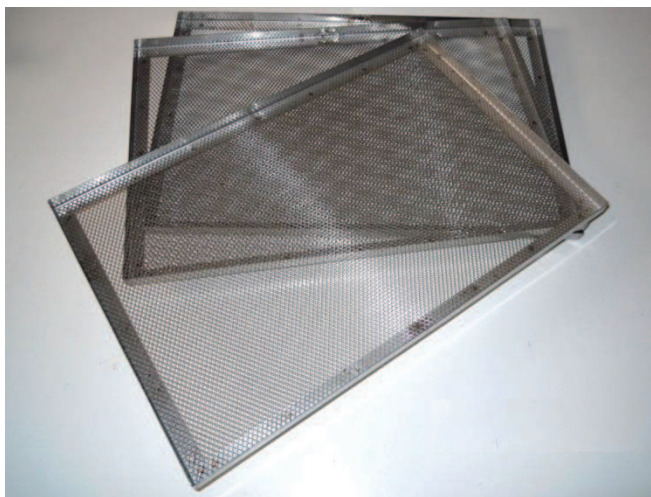
(Figura 9) In alto abbiamo la polvere di fungo shiitake seccato e macinato Lotto 12AA048B scadenza 16/1/2015

In basso abbiamo la polvere di fungo shiitake seccato e macinato Lotto 12AH198B scadenza 15/6/2015

Produttore: DRONANIA Traditionelle Arzneimittel GmbH Karl-Benz Straße 3, 86825 Bad Wörishofen (D)

Importatore: Funghi Vitalia srl Via dei Magazzini 7,35016 Piazzola sul Brenta (PD)

Successivamente la purea ottenuta viene stesa nei cestelli (**Figura 10**) dell'essiccatore ad aria calda dove rimane immersa in un flusso d'aria ad una temperatura Max di 35° C fino alla riduzione dell'umidità residua a 7-10% ed alla solidificazione.



(Figura 10) Vassoi forati usati per l'essiccazione

In fase preliminare l'aggiunta delle spore è stata effettuata direttamente sulla purea di frutta stesa sulle piastre da essiccazione, ma non è risultata una scelta adeguata in quanto il prodotto ottenuto risultava molto eterogeneo. Si è proceduto quindi all'aggiunta delle spore prima della fase di frullatura dei frutti e con questa modalità il prodotto ottenuto è risultato perfettamente omogeneo.

3.2 Verifica della conservabilità delle sfoglie

Presso il laboratorio di patologia dell'Università degli Studi di Milano sono state effettuate delle analisi per:

- a) verificare che la polvere fungina non contenesse il fungo in condizioni vitali
- b) verificare l'eventuale contaminazione fungina della sfoglia di lampone tale e quale e addizionata di polvere fungina

- A) La polvere fungina costituita da shiitake e reishi rispettivamente è stata pesata (shiitake 47,3 mg; reishi 35,7 mg) e sospesa in 1.5 ml di acqua sterile in Eppendorf da 2 ml. Dopo agitazione su Vortex la sospensione ottenuta (1 ml) è stata inoculata su piastra Petri (9 cm Ø) contenenti PDA addizionato di antibiotici (PDAA).

B) Piccoli frammenti di sfoglie di lampone tale e quale (TQ), e addizionate con la polvere fungina, rispettivamente shiitake (S, 31,5 mg/ml) e reishi (R, 23,8 mg/ml) sono stati prelevati e inoculati in piastre Petri contenenti PDAA. Le piastre sono state lasciate a temperatura ambiente (20-22 °C) e osservate ad intervalli regolari. La prima lettura è stata effettuata dopo 4 gg.

3.3 Estrazione con solvente di spore e sfoglie

Le spore di reishi e shiitake sono state sottoposte ad estrazione utilizzando in sequenza diclorometano, metanolo ed acqua a temperatura ambiente a riflusso. Ogni estrazione è stata effettuata tre volte per la durata di 3 ore, il solvente organico è stato evaporato in vuoto mentre l'estratto acquoso congelato e liofilizzato.

L'estrazione delle sfoglie è stata condotta con metanolo acido. Le sfoglie sono state frantumate, tramite l'uso di un mortaio ed estratte a temperatura ambiente mantenendo il campione in agitazione magnetica e utilizzando come solvente MeOH acidificato allo 0,01% con HCl. Il solvente viene acidificato per ottenere la denaturazione delle pareti cellulari del vegetale e favorire la fuoriuscita dei pigmenti di antocianine presenti nelle bacche in quanto nella maggior parte dei frutti e dei vegetali i pigmenti antocianidinici sono localizzati nelle parti cellulari vicino alla superficie. Si sono realizzate delle filtrazioni successive con filtro a pieghe, aggiungendo ogni volta del solvente fresco al campione fino alla perdita del colore caratteristico. Per eliminare ogni traccia di solvente l'estratto grezzo è stato evaporato in vuoto mediante evaporatore rotante (Rotavapor R110, Buchi) ed essiccato in pompa per lungo tempo sino a peso costante. Gli estratti ottenuti sono stati conservati in palloni alla temperatura di 4 °C.

3.4 Analisi estratti grezzi ottenuti dalle spore

Gli estratti grezzi (diclorometano e metanolo) sono stati analizzati mediante TLC e spettroscopia ^1H NMR., mentre l'estratto acquoso è stato analizzato mediante spettroscopia NMR in stato solido.

3.5 Purificazione dell'estratto integrale di sfoglie mediante SPE

Solid-phase extraction o SPE rappresenta il metodo utilizzato per purificare gli estratti integrali metanolici ottenuti, questo perché frequentemente le analisi

quantitative e qualitative delle antocianine sono complicate dalla presenza di altri composti che creano interferenza con le misurazioni; la purificazione risulta essere quindi necessaria per la caratterizzazione delle antocianine stesse. L'analisi viene effettuata mediante delle mini colonne, chiamate cartucce (**Figura 11**) impaccate di silice, a fase inversa (*retain hydrophobic organic compound*) allo scopo di separare i diversi costituenti del campione grazie all'eluizione del prodotto con solventi diversi: è una metodologia basata sul principio della separazione dei composti mediante l'affinità con solventi con diversa polarità.

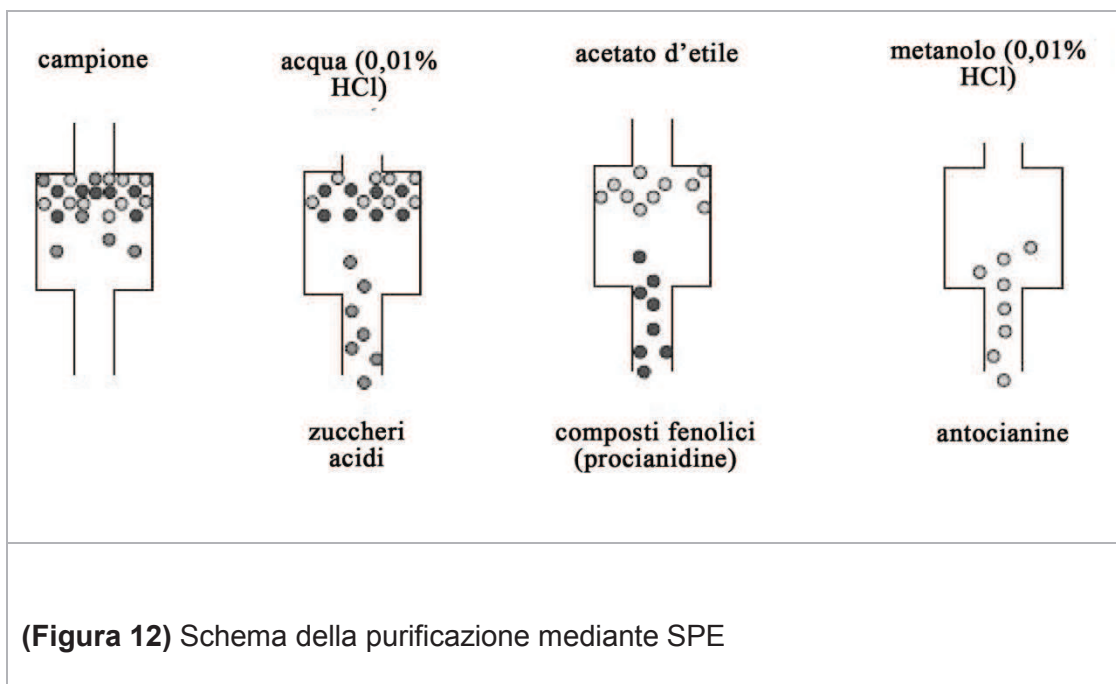
La cartuccia, denominata *733408 Octadecyl spe**, è condizionata con due volumi di MeOH e tre di H₂O deionizzata e acidificata allo 0,01% di HCl.



(Figura 11) SPE, a destra cartuccia SPE

Si inizia quindi caricando nel serbatoio 100 mg pesati esattamente di estratto, preventivamente sciolto nella minor quantità possibile di H₂O deionizzata, trattenuto dal filtro della cartuccia. Si procede con la prima eluizione con tre volumi di H₂O deionizzata e acidificata allo 0,01% di HCl con lo scopo di eliminare i composti polari non assorbiti quali zuccheri e acidi organici; si pulisce con tre volumi di AcOEt per consentire la rimozione della frazione fenolica. In ultimo si eluisce con MeOH acidificato allo 0,01% di HCl per eluire le antocianine. (**Figura 12**)

Si ottengono tre diverse frazioni: la frazione acquosa, la prima ad essere eluita, la frazione fenolica, e la frazione antocianica, caratterizzata da una colorazione rosso-scuro, quest'ultima è stata evaporata in vuoto.



Le frazioni antocianiche purificate delle tre sfoglie sono state analizzate mediante TLC e HPLC. Le lastre eluite con una miscela eluente costituita da AcOEt/ H₂O/HCOOH secondo il rapporto 8/2/1,5 in luce visibile rilevano le antocianine con due caratteristiche bande di colore rosso.

Per queste analisi sono state usate lastre di silice 60 F₂₅₄ dello spessore di 0,25 mm.

3.6 Analisi HPLC delle frazioni antocianiche

A partire dalle frazioni antocianiche purificate mediante SPE si sono condotte della analisi mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni o HPLC utilizzando uno strumento *VARIAN SD200* dotato di una pompa binaria con iniettore *Rheodyne* e di un rivelatore UV-VIS gestito dalla *Chemstation Galaxy*.

Le analisi sono state effettuate diluendo in acqua campioni per ottenere una concentrazione di 1mg/ml e successivamente filtrati utilizzando un filtro di *nyoln* 0,45 μ . Le condizioni utilizzate sono: colonna a fase inversa, *C18 Varian 5 μ m*, rivelatore ad una lunghezza d'onda (λ) di 520nm e una miscela eluente a gradiente.

La miscela è stata ottenuta utilizzando ACN (solvente B) e H₂O deionizzata acidificato allo 0,1% di TFA (solvente A) con un flusso pari a 0,8 ml/min e con un

gradiente strutturato come segue: il solvente B passa dal 5% a t0 al 12% in 12 min, raggiunge il 20% dopo 30 min, l'analisi termina a 50 min con una percentuale di B pari al 35%. **(Tabella 1)**

CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE		CONDIZIONI DI ELUIZIONE		
Conc. Campione	1mg/ml	t (min)	A (H ₂ O)	B (ACN)
Flusso	0,8ml/min	0	95%	5%
Pressione iniziale	63-65 bar	12	88%	12%
λ	520	30	80%	20%
		50	65%	35%

(Tabella 1) Condizioni operative delle analisi HPLC sulla frazione antocianinica

3.7 Analisi spettrofotometriche

Le analisi spettrofotometriche sono state ottenute utilizzando lo spettrofotometro *UV/VIS Perkin Elmer Lambda 25*

Con questa tecnica sono state eseguite la quantificazione delle antocianine presenti nelle sfoglie di lamponi e la valutazione dell'attività antiossidante.

3.7.1 Quantificazione antocianine con il metodo del pH differenziale

Le antocianine vanno incontro a modificazione reversibile della struttura con la variazione del pH che si manifesta con una variazione nello spettro di assorbanza. Il metodo del pH-differenziale è basato su questa reazione e permette di misurare le antocianine totali in modo rapido e accurato anche in presenza di composti interferenti.

Sono stati pesati 20 mg di campione e aggiunti a 10 ml di acqua distillata; per ogni campione sono state preparate due diluizioni: una con una soluzione tampone di potassio cloridrico 0,025 M a pH 1, corretto con acido cloridrico, e l'altra con una soluzione tampone di sodio acetato 0,4M a pH 4,5, anch'essa corretta con acido cloridrico. Ciascun campione è stato diluito con un appropriato fattore di diluizione in

modo che l'assorbanza rilevata sia inferiore a 1,2. Le soluzioni sono state lasciate equilibrare per 15 minuti, passato tale termine si è proceduto con la lettura spettrofotometrica a due lunghezze d'onda, 520 nm e 700 nm.

Come bianco è stata utilizzata acqua distillata.

È importante eseguire la lettura dell'assorbanza in un tempo compreso tra 15 minuti e un'ora dalla preparazione dei campioni (30)

Il contenuto di antocianine è stato calcolato come cianidina-3-O-glucoside (PM= 449,2 e $\epsilon= 26900$) e il risultato espresso come $\text{mg}_{\text{cy-3-gly}}/100 \text{ g}_{\text{FW}}$. Le analisi sono state eseguite in quadruplo.

L'assorbanza (A) del campione diluito è stata così calcolata:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH4.5}$$

Equazione 1 - Calcolo dell'assorbanza

$$TA\left(\frac{\text{mg}}{\text{l}}\right) = (A \times MW \times DF \times 1000) / \epsilon \times l$$

Equazione 2 - Antocianine totali in mg/l

$$TA\left(\frac{\text{mg}}{\text{g}_{\text{ex}}}\right) = \left[TA\left(\frac{\text{mg}}{\text{l}}\right) / 100 \right] / m_{\text{ex}} (\text{g})$$

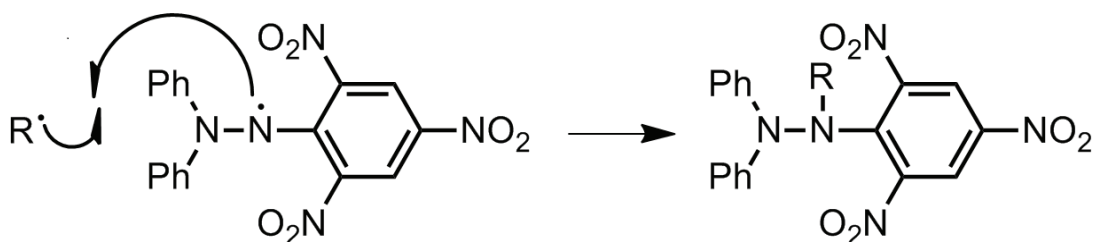
Equazione 3 - Antocianine totali in mg/g di estratto

3.7.2 Determinazione attività antiossidante

La determinazione dell'attività antiossidante, sugli estratti integrali delle sfoglie, è stata eseguita mediante il saggio del DPPH \cdot (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), metodo utilizzato per numerosi estratti di piante o composti puri.

Il DPPH \cdot è un radicale libero, cromoforo, stabile grazie alla delocalizzazione del radicale sulla molecola, si solubilizza in metanolo o etanolo e il suo valore di assorbanza caratteristico è a 519 nm.

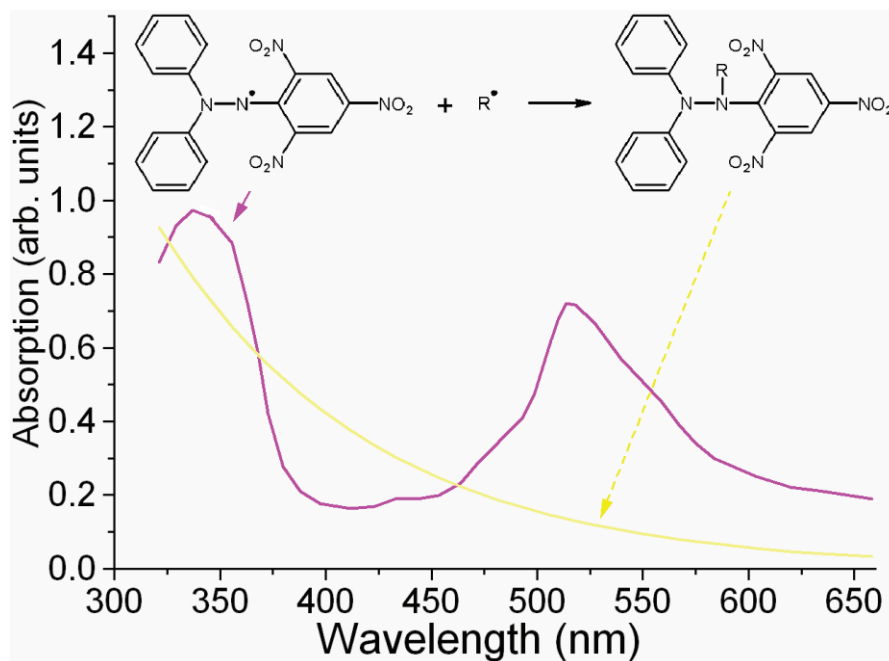
Quando la soluzione di DPPH· viene miscelata con una sostanza in grado di donare un atomo di idrogeno, lo accetta, e dà luogo alla forma ridotta della molecola con la perdita del caratteristico color viola e assumendo una colorazione gialla dovuta alla presenza del gruppo picrile. **(Figura 13)**



(Figura 13) Schema della reazione del DPPH·

Pertanto la capacità dell'antiossidante viene valutata in base alla perdita del colore, diminuzione dell'assorbanza del DPPH· in seguito alla reazione.

I campioni sono stati preparati aggiungendo a 1,5 ml di estratto diluito in metanolo in un *range* compreso tra 25 e 400 µg/ml, 1,5 ml di DPPH· 0,25M in metanolo. Dopo un tempo di mezz'ora in cui i campioni sono stati tenuti a temperatura ambiente e al riparo dalla luce vengono analizzati mediante lo spettrofotometro UV/VIS alla lunghezza d'onda di 519 nm. **(Figura 14)** Le analisi sono state eseguite su tre estratti metanolici delle sfoglie in doppio.



(Figura 14) Curva di assorbanza del DPPH· e DPPH

Come standard di riferimento per la costruzione della retta di taratura è stato utilizzato il Trolox, un analogo idrosolubile della vitamina E, in soluzione 1mM in metanolo (*range* di concentrazione da 0,01 a 0,20 mM).

I risultati vengono espressi in termini di inibizione Q della soluzione di DPPH·(definito come *quenching* o *inhibition*), EC_{50} value (*efficient concentration* definita anche IC_{50}) ovvero la concentrazione in mM della sostanza che causa la perdita del 50% dell'attività dell'ossidante: minore è il valore del parametro EC_{50} maggiore sarà l'attività antiossidante del campione.

$$Q = 100 \cdot \left(\frac{A_0 - A_c}{A_0} \right)$$

Equazione 1 – formula per calcolare l'inibizione percentuale

4. RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Sfoglie ottenute e test effettuati

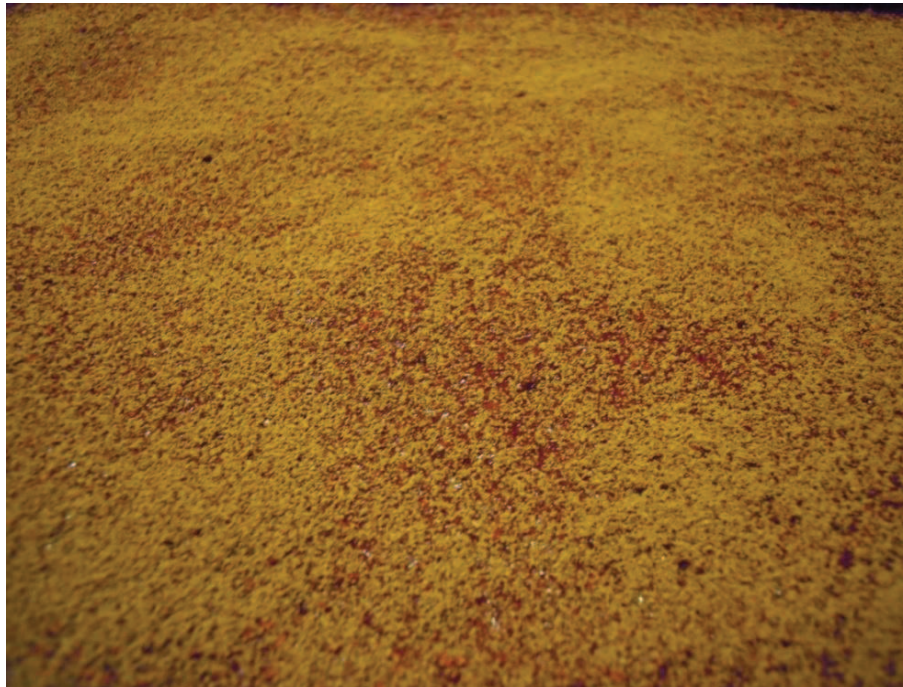
Nella preparazione delle sfoglie sono stati fatti due test: nel primo test le spore sono state aggiunte in un quantitativo dello 0,5% (in peso secco) distribuendole direttamente sulla superficie della sfoglia di lamponi, dopo parziale disidratazione con un'umidità residua intorno al 40%. Il metodo non è risultato adeguato perché la polvere di fungo viene assorbita dalla sfoglia in modo irregolare ed in parte rimane in superficie, non miscelandosi con la frutta. **(Figura 15)**

(Figura 15)

a-b Sfoglia di lamponi con spore di reishi.

c-d Sfoglia di lampone con spore di shiitake.

a



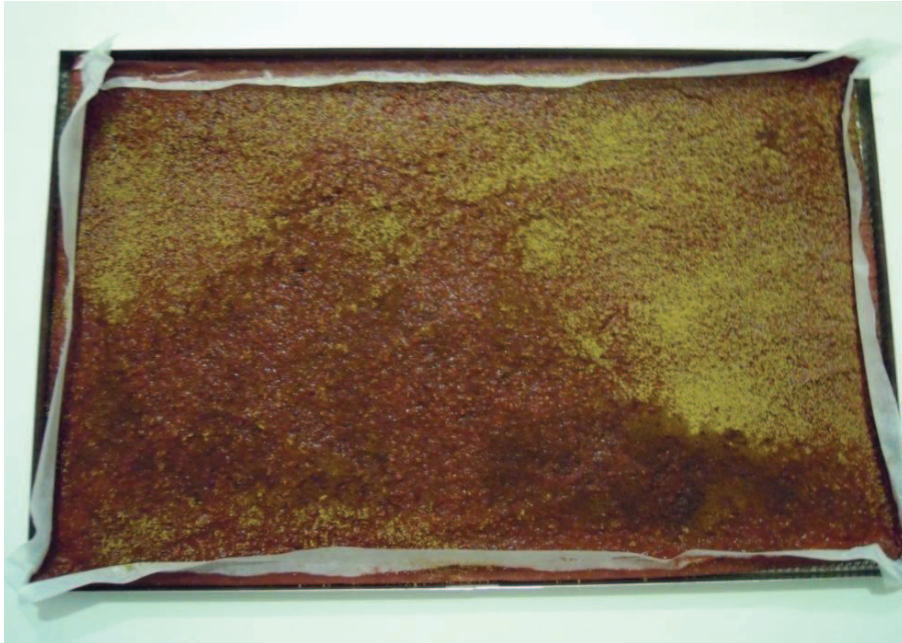
b



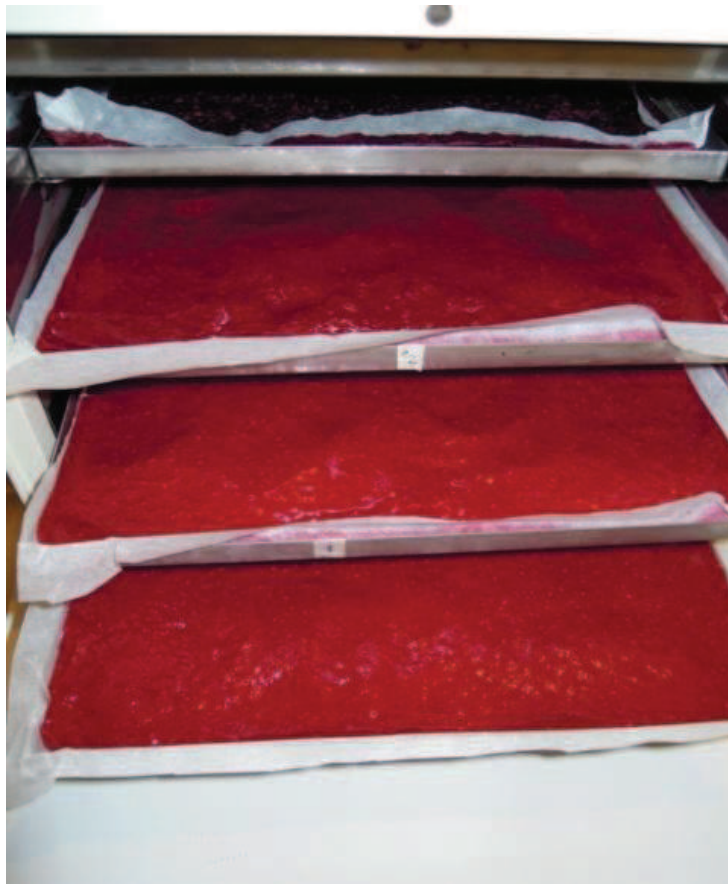
c



d



Per ovviare al problema della scarsa miscelazione fra la polvere di fungo e la purea è stato fatto un secondo test dove le spore sono state aggiunte in quantità dell' 1 % (in peso secco) miscelando frutta e polvere di fungo prima della stesura della sfoglia in modo da ottenere un prodotto omogeneo e visivamente apprezzabile. **(Figure 16 e 17)**



(Figura 16)

Dall'alto verso il basso abbiamo rispettivamente:

purea di lampone;

purea di lampone miscelata con reishi;

purea di lampone miscelata con shiitake.



(Figura 17) Sfoglie ottenute

L'azienda *Settimocielo* propone, per prodotti simili (Figura 7), un confezionamento in scatoline di plastica trasparenti, comode ma non funzionali. Sarebbe consigliabile conservare le sfoglie di lampone, ricche in pigmenti, lontano da fonti di luci utilizzando un packaging maggiormente protettivo.

4.2 Valutazioni sensoriali preliminari

Sono stati eseguiti degli assaggi preliminari per le tre sfoglie con un panel di 6 guidici non addestrati. (Tabella 2)

Le spore all'assaggio sono risultate molto amare e sgradevoli.

ATTRIBUTI	SFOGLIA lampone	SFOGLIA lampone + reishi 1%	SFOGLIA Lampone + shiitake 1%
Colore	gradito	gradito	gradito
Aroma	gradito	gradito	gradito
Aspetto	né gradito né sgradito	né gradito né sgradito	né gradito né sgradito
Consistenza	gradito	gradito	gradito
Gusto	leggermente astringente	si percepisce un retrogusto amaro in ritardo, leggermente astringente più delle sfoglie di solo lampone	leggermente astringente

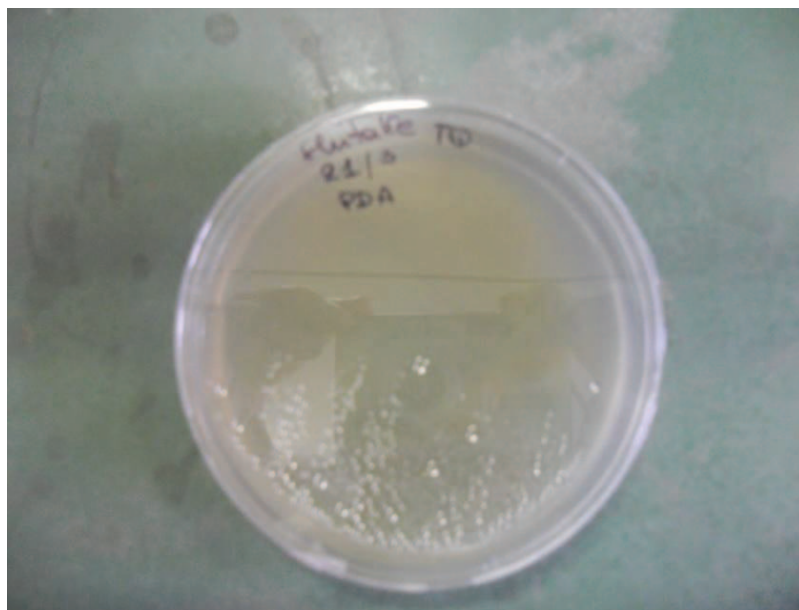
(Tabella 2) Risultati degli assaggi sensoriali preliminari

4.3 Verifica della conservabilità delle sfoglie

La piastra inoculata con la polvere fungina ottenuta da shiitake S (**Figura 18**) non presenta né crescita né contaminazioni da altri funghi, indicando che la polvere fungina non contiene spore o propaguli fungini vitali e che non vi è stata contaminazione, nonostante il materiale e il procedimento non possano essere considerati effettuati in condizioni sterili (pesata su bilancia, etc.).

La piastra inoculata con polvere fungina ottenuta da reishi (**Figura 19**) presenta una coltura diffusa fungina, probabilmente *Fusarium*, dovuta a contaminazione occasionale esterna. Nessuna crescita tuttavia è ascrivibile al fungo *Ganoderma lucidum*, che dovrebbe costituire il materiale inoculato.

Dunque in entrambi i casi si ipotizza che la polvere fungina non contenga propaguli vitali dei funghi di provenienza.



(Figura 18) Piastra inoculata con la polvere fungina ottenuta da shiitake



(Figura 19) Piastra inoculata con la polvere fungina ottenuta da reishi

I frammenti di sfoglie di lampone S e R inoculati in piastra Petri (**Figure 20 e 21**) non presentano sviluppo di colonie fungine, ancora una volta dimostrando che il fungo addizionato non è costituito da propaguli vitali e che la sfoglia di lampone ha una contaminazione fungina praticamente nulla. La piastra inoculata con sfoglia di lampone TQ presenta sviluppo di una colonia, anche in questo caso ipotizziamo *Fusarium*, dovuta a contaminazione occasionale, dal momento che la crescita non si sviluppa sul frammento ma in posizione adiacente e distale, indicando che la contaminazione non è della sfoglia, ma ambientale.



(Figura 20) Sfoglia di lampone con spore di shiitake inoculati in piastra Petri



(Figura 21) Sfoglia di lampone con spore di reishi inoculati in piastra Petri

Le sfoglie, che presentano un contenuto di umidità pari al 7% sono state ottenute con un protocollo che può considerarsi molto buono: assenza di contaminazioni fungine e aventi un buon grado di conservabilità. La polvere fungina aggiunta non sembra contenere propaguli fungini vitali, ipotizzando che sia costituita prevalentemente da chitina, mannoproteine (principali costituenti del tallo fungino) ed eventualmente altre biomolecole ascrivibili alla composizione chimica del tallo fungino in relazione al protocollo usato per la loro produzione.

4.4 Estrazioni con solvente delle spore

Le estrazioni consecutive con solventi a polarità crescente operate sulle spore dei funghi sono riassunte nella **(Tabella 3)**.

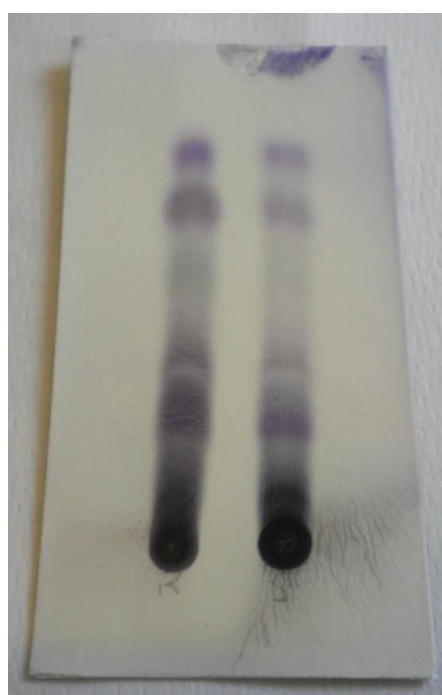
DESCRIZIONE DEL CAMPIONE, PESO CAMPIONE	NOME CAMPIONE	SOLVENTE	ESTRATTO INTEGRALE (mg)	RECUPERO (%)
Spore di reishi, 1.50 g	R1A	diclorometano	47.6	3.2
	R1B	etanolo	69.4	4.6
Spore reishi, 8.00g	R2A	Diclorometano	253.3	3.2
	R2B	Metanolo	610.4	7.6
	R3C	acqua	886.5	11.1
Spore di shiitake, 1.5 g	S1A	Diclorometano	19.0	1.2
	S1B	etanolo	142.0	9.5
Spore di shiitake, 8.00 g	S2A	diclorometano	86.4	1.1
	S2B	metanolo	1420	17.7
	S2C	acqua	504.8	6.3

(Tabella 3) Estrazioni condotte sulle spore

Le percentuali di recupero sono state calcolate come rapporto tra i grammi dell'estratto ottenuto dopo evaporazione in vuoto del solvente e i grammi del peso iniziale. L'acqua negli estratti acquosi è stata rimossa per liofilizzazione.

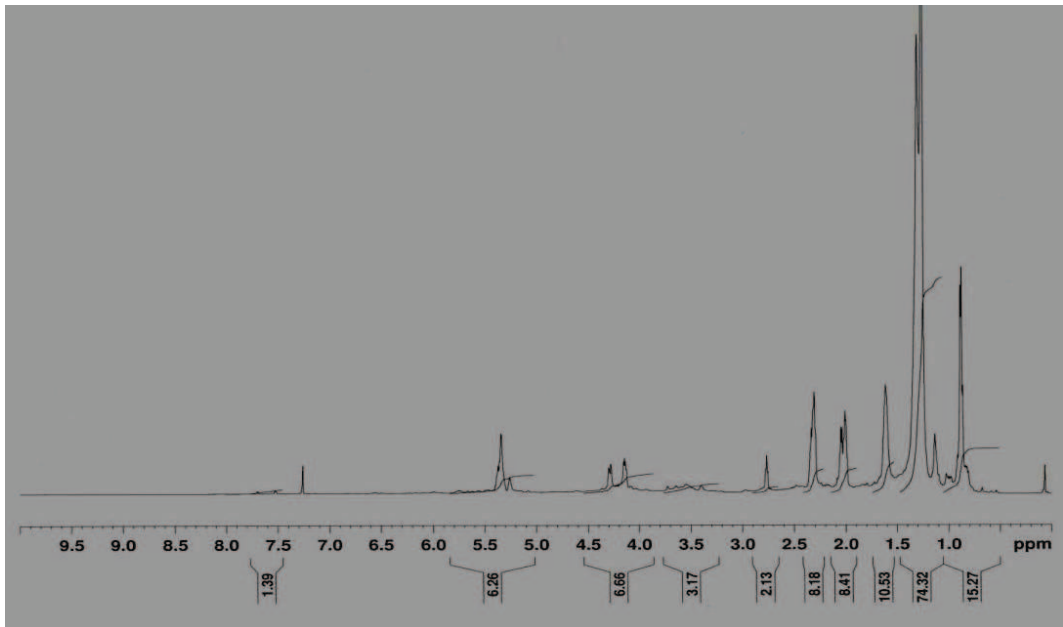
Gli estratti grezzi sono stati analizzati mediante TLC e spettroscopia ^1H NMR.

Da analisi TLC (eluente esano/acetone 8/2, colorante soluzione di vanillina contenente acido solforico) i due estratti in diclorometano (R2A e S2A) mostrano una miscela di componenti . **(Figura 22)**

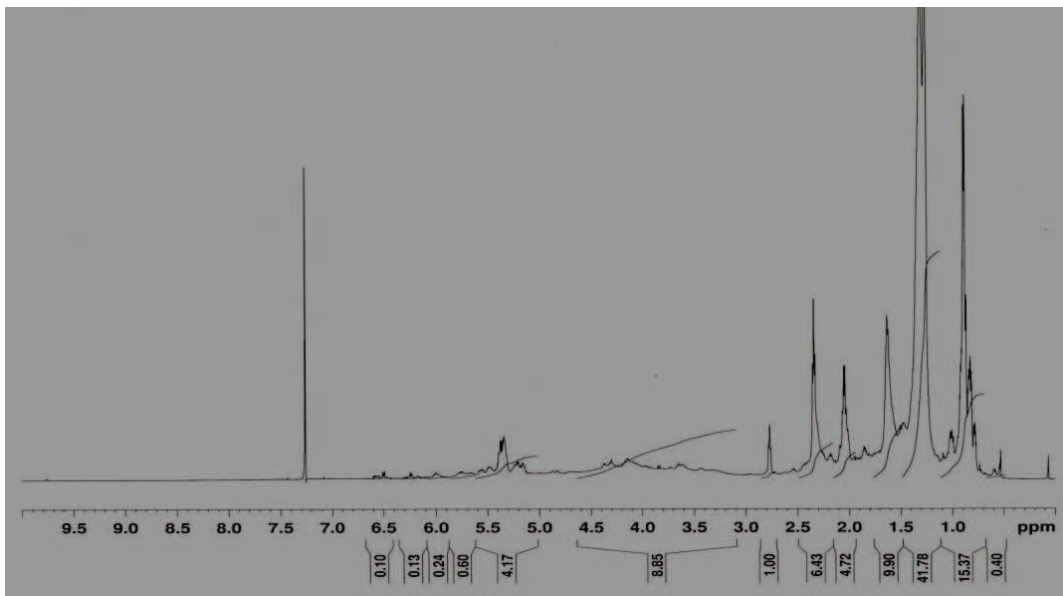


(Figura 22) Analisi TLC su estratti di reishi (a destra) e shiitake (a sinistra) in diclorometano.

Date le scarse quantità di materiale disponibile non è stato possibile separare i vari componenti della miscela. Gli estratti sono stati analizzati mediante spettroscopia NMR e gli spettri registrati confermerebbero il carattere triterpenico dei componenti presenti nell'estratto. **(Figure 23 e 24)** Gli NMR sono stati registrati con strumenti Bruker AMX-300 operante a 300 MHz e Bruker Avance operante a 600 MHz.

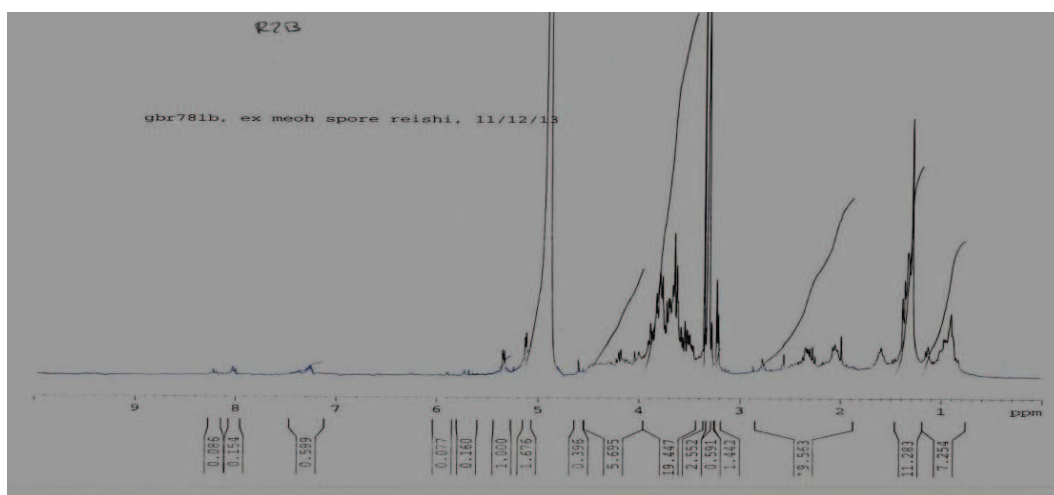


(Figura 23) Spettro ^1H NMR in CDCl_3 dell'estratto R2A

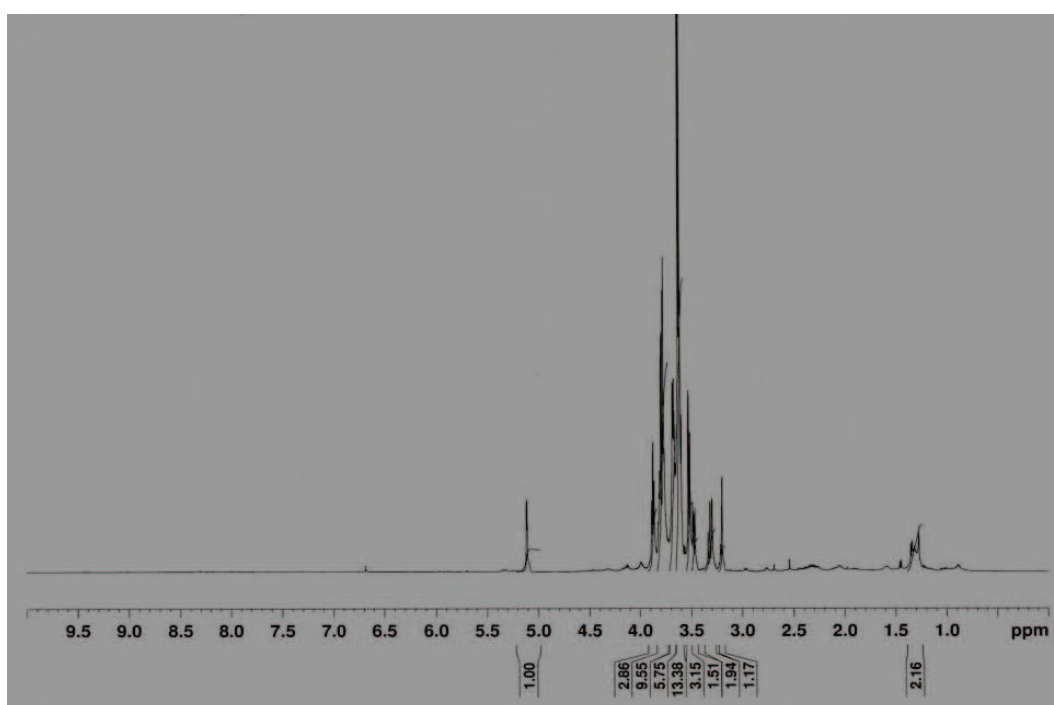


(Figura 24) Spettro ^1H NMR in CDCl_3 dell'estratto S2A

Gli estratti metanolici (R2B e S2B) mostrano nello spettro ^1H NMR segnali caratteristici di zuccheri (protoni anomerichi risuonanti a campi bassi oltre i 5 ppm e segnali multipletti tra 3.2 e 3.8 ppm) (**Figure 25 e 26**)

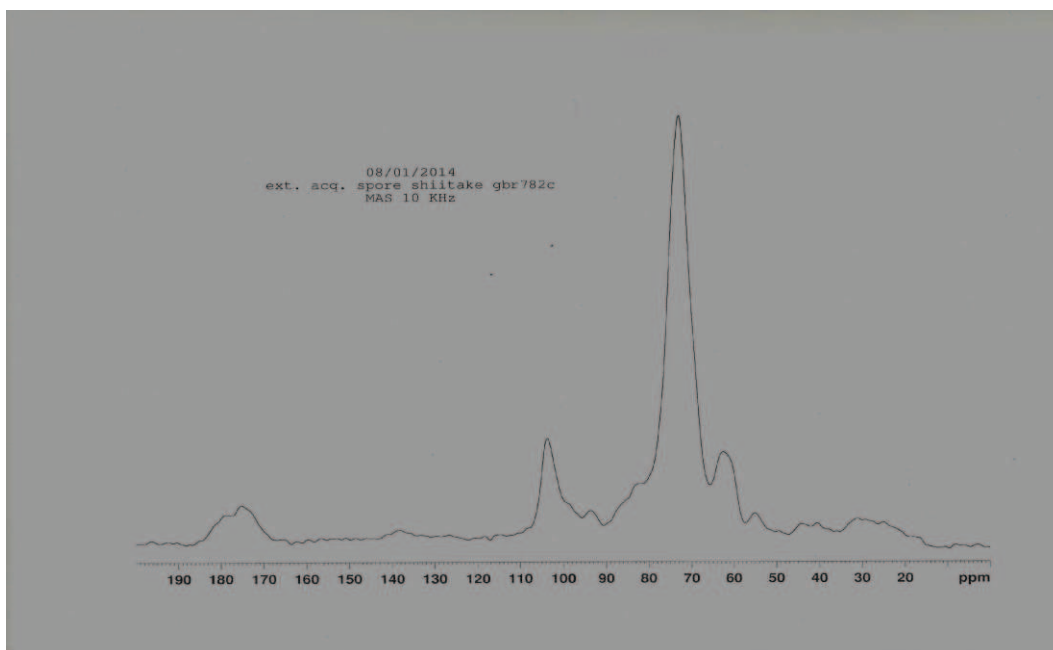


(**Figura 25**) Spettro ^1H NMR in CDCl_3 dell'estratto R2B



(**Figura 26**) Spettro ^1H NMR in CDCl_3 dell'estratto S2B

Gli estratti acquosi sono risultati poco solubili in D₂O e DMSO e pertanto non è stato possibile registrare spettri NMR in soluzione. Sono stati registrati gli spettri ¹³C NMR in stato solido (CP-MAS) sull'estratto solido; i segnali allargati nella zona tra 50 e 110 ppm sono in accordo con i carboni di strutture di β-glucani, altri segnali oltre i 170 ppm potrebbero essere ascrivibili a gruppi carbonilici di amminoacidi. **(Figura 27)**



(Figura 27) Spettro CP-MAS dell'estratto S2C

Lo spettro in stato solido dell'estratto acquoso delle spore di reishi (R3C) risulta simile a quello riportato per il campione 2SC.

I tre estratti delle spore sono stati saggiati in vitro con i recettori clonati del sapore amaro grazie ad una collaborazione con l'azienda AXXAM di Milano.

4.5 Estrazioni con solvente delle sfoglie

Nella **(Tabella 4)** riportata di seguito sono indicati i campioni che sono stati sottoposti all'estrazione con metanolo acido.

DESCRIZIONE DEL CAMPIONE	NOME CAMPIONE	PESO INIZIALE (g)	ESTRATTO INTEGRALE (g)	RECUPERO (%)
Estratto da sfoglie di lampone	L1	1.00	0.659	65.9
	L2	1.00	0.563	56.3
Estratto da sfoglie di lampone con 1% di spore di Reishi	LR1	1.00	0.638	63.8
Estratto da sfoglie di lampone con 1% di spore di Shitake	LS1	1.00	0.569	56.9

(Tabella 4) Estrazioni condotte sulle sfoglie

4.6 Purificazione SPE degli estratti delle sfoglie

Per ottenere dall'estratto integrale delle sfoglie le frazioni purificate si sono eseguite delle separazioni SPE successive ottenendo così la fase acquosa, contenente zuccheri semplici e acidi, non oggetti di studio, la fase fenolica e quella antocianica.

Di seguito viene riportata la (Tabella 5) che mostra i risultati in termini di mg ottenuti e di recupero percentuale.

DESCRIZIONE DEL CAMPIONE	NOME CAMPIONE	ESTRATTO CARICATO (mg)	FRAZIONE FENOLICA (mg)	RECUPERO (%)	FRAZIONE ANTOCIANICA (mg)	RECUPERO (%)
Estratto di sfoglie di lampone	L1	52.0	2.2	4.2	3.4	6.5
Estratto di sfoglie di lampone e spore di reishi	LR1	61.0	2.1	3.4	4.2	6.9
Estratto di sfoglie di lampone e spore di Shiitake	LS1	60.0	2.1	3.5	13.6	22.6

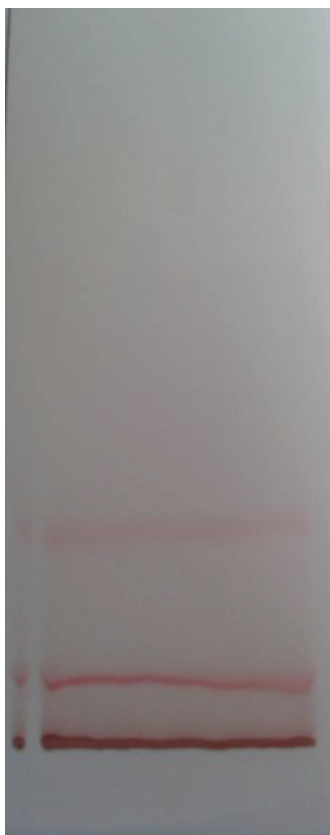
(Tabella 5) Risultati ottenuti dalla separazione SPE

Avendo effettuato una sola estrazione per campione non si possono fare grandi commenti, si può solo osservare che le percentuali di recupero delle frazioni fenoliche sono confrontabili mentre per le frazioni antocianiche si nota un'anomalia nel campione LS1 per il quale si è ottenuta una percentuale di recupero maggiore.

4.7 Analisi TLC e HPLC delle frazioni antocianiche

Dalla separazione SPE si sono ottenute tre frazioni purificate: fase acquosa, fase fenolica e un'antocianica. Sono state analizzate tramite TLC e HPLC le sole frazioni antocianiche degli estratti delle sfoglie di lampone, lampone e reishi e lampone e shiitake.

Da analisi TLC (**Figura 28**) risultano evidenti due macchie rosse in luce visibile e una sulla linea di deposizione con Rf rispettivamente di 0,12 e 0,35 con miscela eluente AcOEt/ H₂O/HCOOH 8/2/1,5.

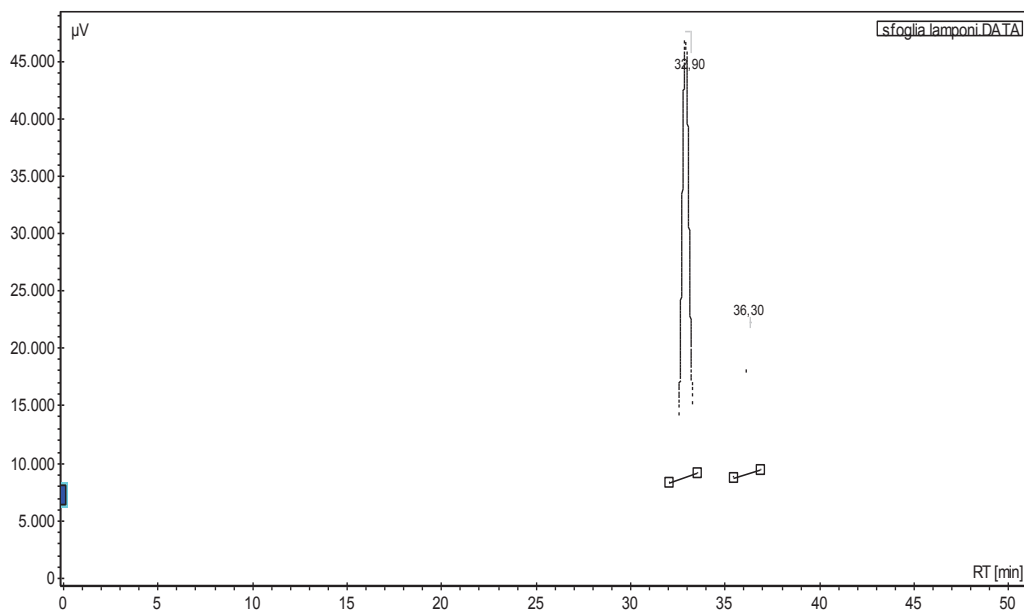


(Figura 28) TLC frazione antocianica delle sfoglie di lampone

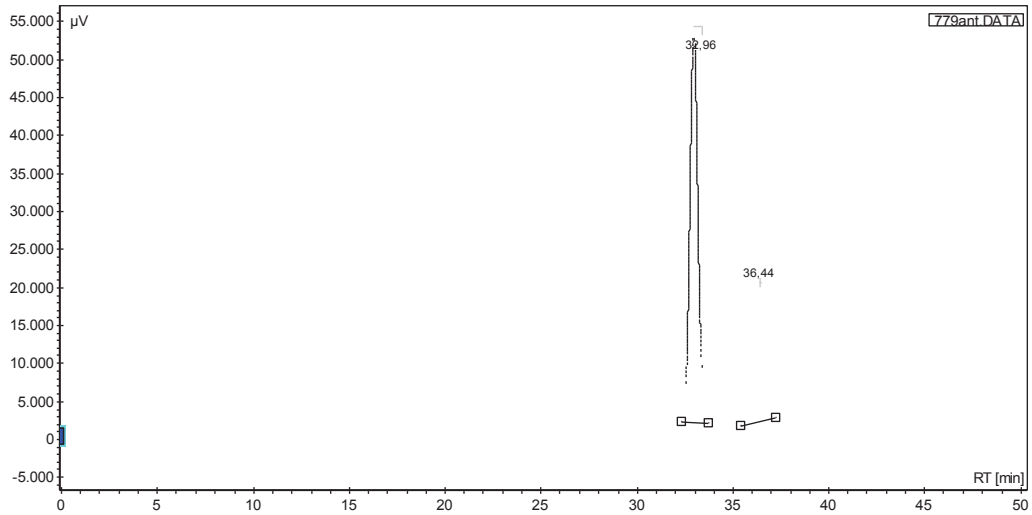
E' stata tentata una separazione dei componenti mediante TLC preparativa con lo scopo di caratterizzarne la struttura ma purtroppo le quantità ottenute e la purezza raggiunta non ha permesso una chiara interpretazione dei dati NMR per il prodotto principale.

I tracciati cromatografici hplc delle frazioni antocianiche provenienti dagli estratti di sfoglie di lampone rilevano la presenza di due picchi principali con tempi di ritenzione di 32.90 e 36.44 minuti in rapporto 70/30. **(Figure 29)** Il secondo picco (Tr 36.44 min) corrisponde alla cianidina-3-glucoside come si evince dall'analisi del campione standard e del campione fortificato. **(Figure 30 e 31)**

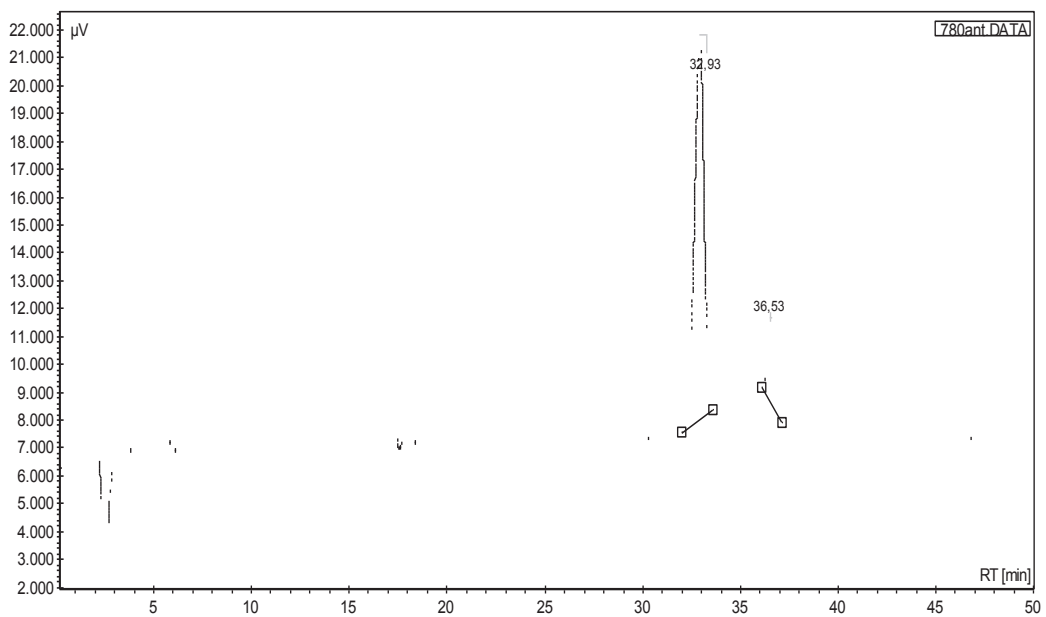
La numerazione dei picchi deriva dall' *R_f* che li caratterizza in TLC a fase diretta, con l'HPLC si è usata una fase inversa, pertanto i picchi risultano invertiti nell'ordine di eluizione.



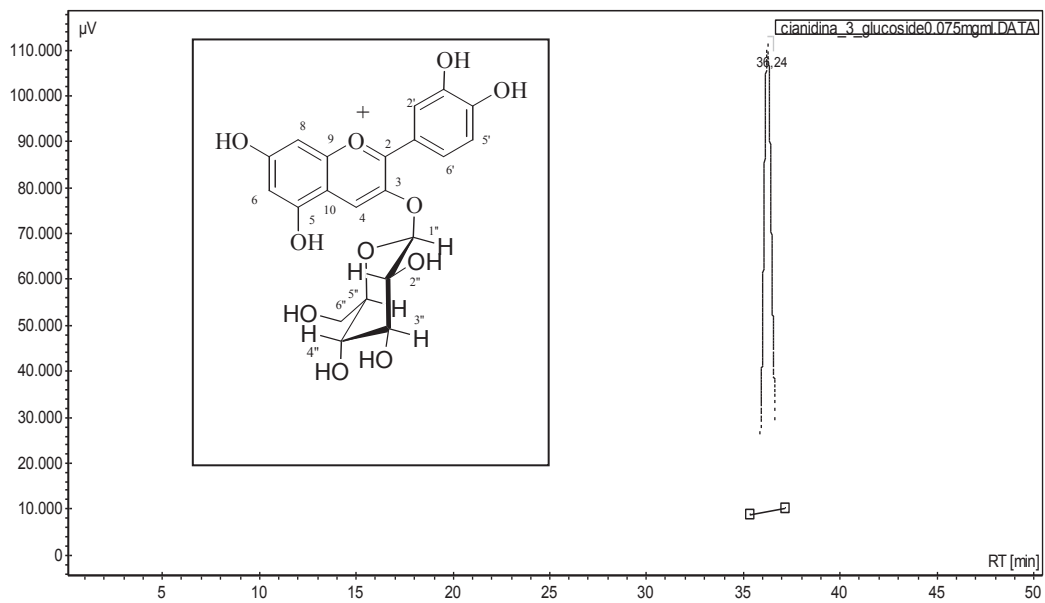
(Figure 29) Cromatogramma della frazione antocianica da sfoglie di lampone



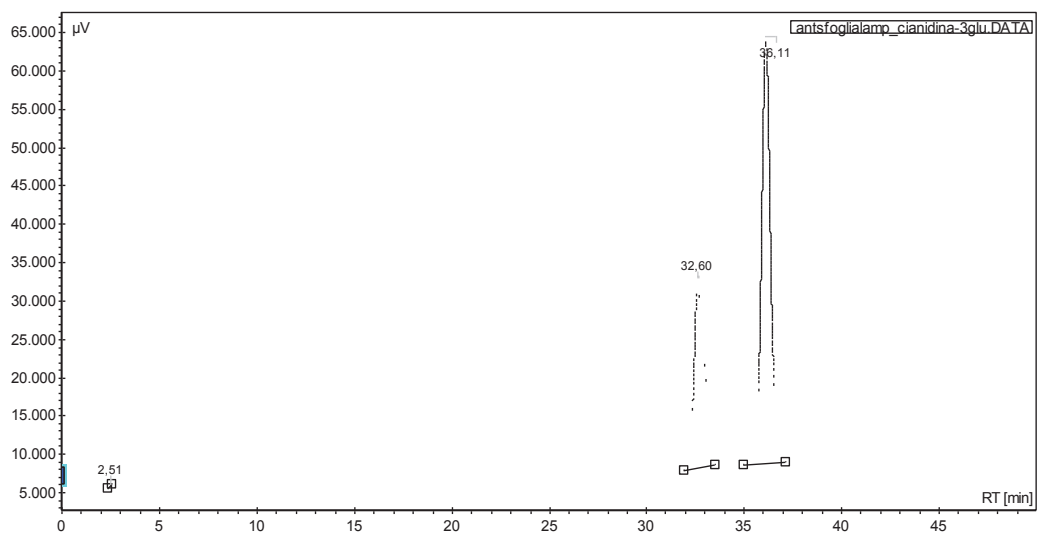
(Figura 30) cromatogramma frazione antocianica da sfoglie di lampone addizionate di spore di reishi



(Figura 31) cromatogramma frazione antocianica da sfoglie di lampone addizionate di spore di shiitake



(Figura 32) Cromatogramma cy-3-glu



(Figura 33) Cromatogramma campione fortificato (frazione antocianica sfoglie lampone + cy-3-glu)

4.8 Analisi spettrofotometriche

Le analisi spettrofotometriche sono state utilizzate per due sperimentazioni: quantificazione delle antocianine monometriche totali (metodo del pH differenziale) e per la determinazione della capacità antiossidante delle sfoglie di lampone.

4.8.1 Metodo del pH differenziale

Il metodo del pH differenziale è la metodologia maggiormente utilizzata per la quantificazione delle antocianine in bacche e frutti.

In **(Tabella 6)** sono riportati i risultati ottenuti utilizzando le formule descritte nella sezione dei materiali e metodi ottenendo un *range* tra 0.14-0.74 mg/ g sfoglia per la quantificazione delle antocianine totali nel prodotto alimentare.

I valori vengono espressi in mg di antocianidina-3-O-glucoside equivalenti per g di sfoglia.

CAMPIONE	ASSORBANZA	TA mg/l	TA mg/g ESTRATTO	TA mg/g sfoglia
L1, estratto di sfoglie di lampone	0.0751	3.76	1.84	1.22
	0.0219	1.10	0.54	0.35
	0.0237	1.19	0.58	0.38
	0.0447	1.49	0.73	0.48
	0.0341	1.14	0.56	0.37
	0.0394	1.32	0.65	0.43
	0.0278	0.93	0.46	0.30
	0.0317	1.06	0.52	0.34
	0.0474	1.58	0.78	0.51

TA= antocianine totali

(Tabella 6) Risultati relativi al metodo del pH differenziale

Per quanto riguarda le sfoglie di lampone è stato ottenuto un valore di antocianine totali di 0.44 ± 0.30 mg/g sfoglia, non è stato possibile confrontare questo dato con il contenuto di antocianine totali nelle bacche iniziali. Da un lavoro di tesi precedente (³¹) svolto su bacche di sambuco, matrice ad alto contenuto di antociani, si era notato che la diminuzione del contenuto in antocianine a seguito del processo termico non era elevato.

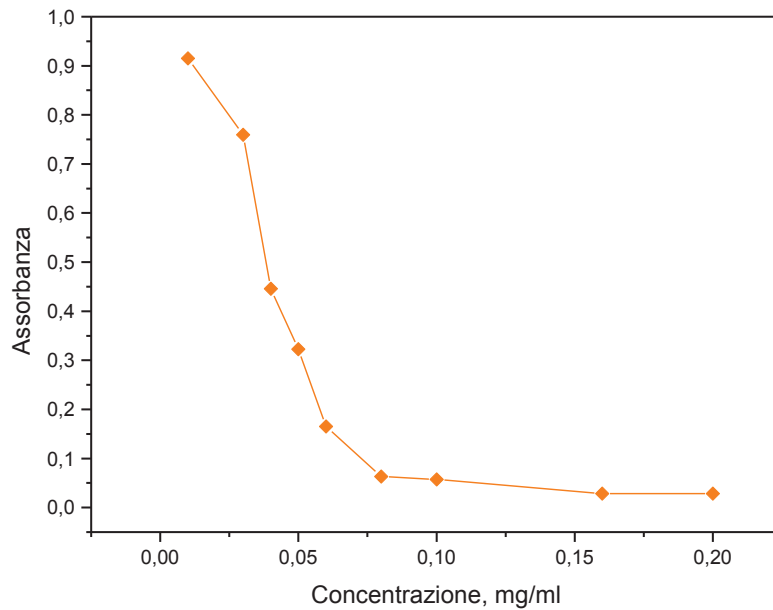
4.8.2 Attività antiossidante

L'attività antiossidante dei prodotti alimentari in studio è stata valutata con il metodo del DPPH', che prevede l'uso del Trolox, equivalente idrosolubile della vitamina E, come standard di riferimento.

Come si può notare dalla **(Figura 34)** all'aumentare della concentrazione dello standard diminuisce il valore dell'assorbanza, questo è dovuto al fatto che con questa analisi si va a valutare la capacità dell'antiossidante di ridurre il DPPH radicalico con il conseguente scolorimento.

[mg/ml]	ASSORBANZA MEDIA	DEVIAZIONE STANDARD	IC ₅₀ % RELATIVA	INIBIZIONE %
0,01	0,9152	0,0022	20,61	20,10
0,03	0,7593	0,0032	34,56	33,71
0,04	0,4457	0,0007	62,63	61,08
0,05	0,3226	0,0013	73,65	71,83
0,06	0,1654	0,0026	87,723	85,56
0,08	0,0632	0,0008	96,879	94,48
0,1	0,0574	0,0002	97,39	94,99
0,16	0,0283	0,0011	99,9	97,53
0,2	0,0283	0,0006	100	97,53

(Tabella 7) Risultati relativi all'assorbanza e all'inibizione relativa % del Trolox in funzione della concentrazione



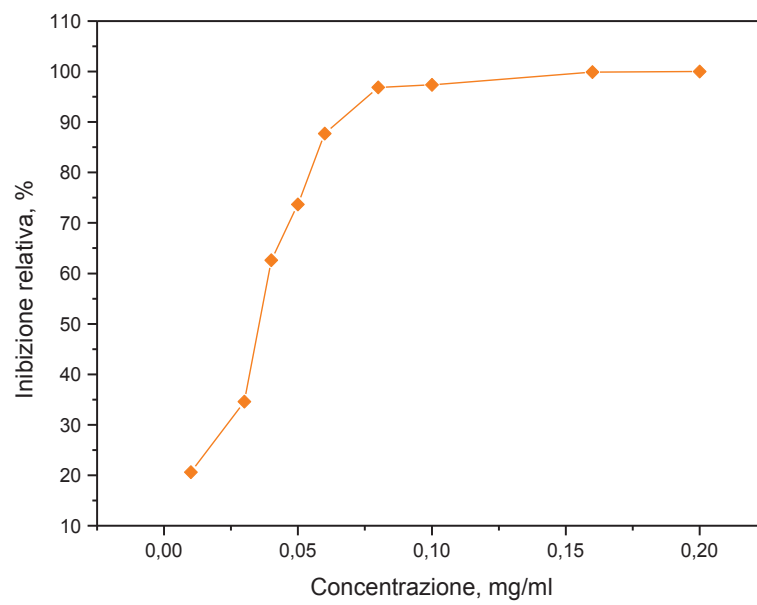
(Figura 34) Relazione tra la concentrazione di Trolox e l'assorbanza rilevata

In seguito è stato calcolato IC_{50} o inibizione percentuale **(Figura 35)**, ovvero la concentrazione di Trolox richiesta per inibire del 50% l'attività del radicale. L'inibizione è detta relativa perché è valutata in funzione del massimo di ossidazione del composto. In letteratura viene riportato il valore di IC_{50} per il Trolox pari a 0,05 mg/ml congruo ai risultati ottenuti con la presente sperimentazione ³². Il valore di IC_{50} del Trolox del seguente lavoro è di 0,04 mg/ml.

Il valore di IC_{50} viene determinato con la seguente formula:

$$Q = 100 \cdot \left(\frac{A_0 - A_c}{A_0} \right)$$

Equazione 1 - Formula per calcolare l'inibizione percentuale

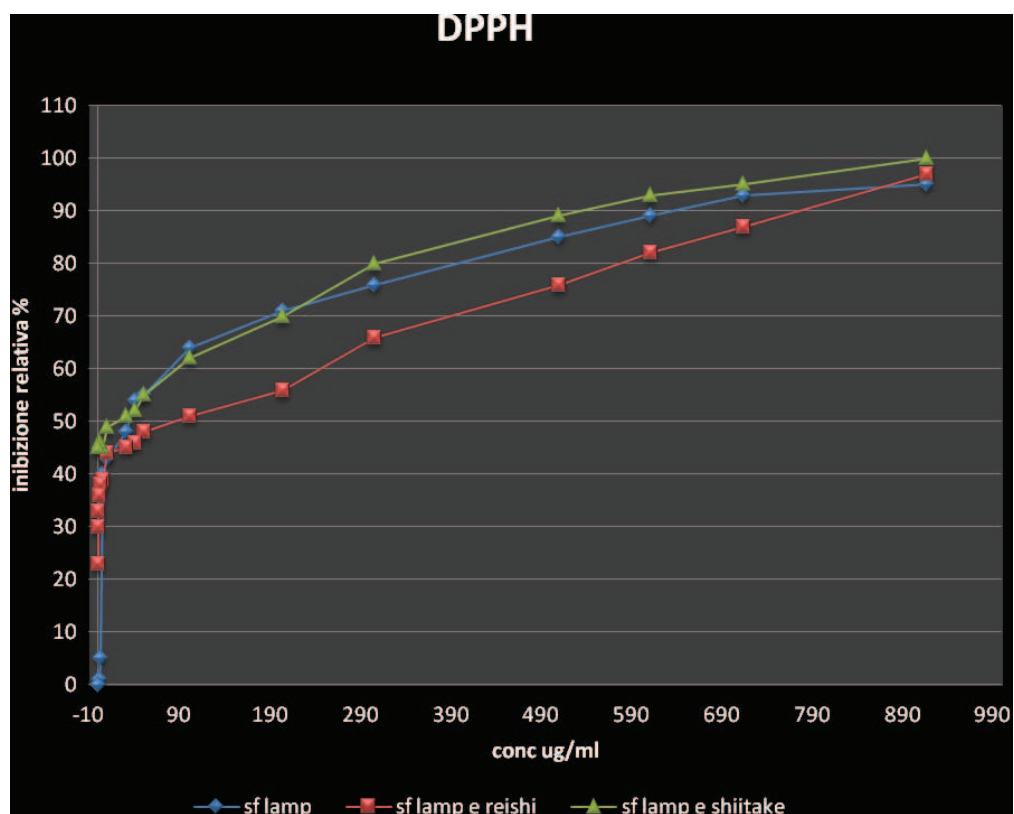


(Figura 35) Inibizione relativa % del Trolox

CAMPIONE	conc ug/ml	ASSORBANZA MEDIA	INIBIZIONE %
Sfoglie lampone	918	0,068	95
	714	0,096	93
	612	0,168	89
	510	0,213	85
	306	0,347	76
	204	0,420	71
	102	0,528	64
	51	0,654	55
	41	0,643	54
	31	0,654	48
	10	0,773	47
	5,1	0,882	40
	2	1,485	5
	1	1,534	1
	0,5	1,462	0
	0,31	1,451	0
	0,2	1,464	0
Sfoglie lampone + reishi	860	0,328	97
	770	0,323	87
	560	0,257	82
	420	0,340	76
	280	0,489	66
	168	0,625	56
	112	0,694	51
	84	0,771	48
	67	0,807	46
	59	0,868	45
	42	0,879	44
	28	0,907	39
	14	0,906	38
	5,6	0,952	36
	2,8	0,994	33
1,14	1,092	30	
0,57	1,110	23	
Sfoglie lampone + shiitake	573	0,097	100
	430	0,158	95
	286	0,291	93
	172	0,422	89
	115	0,538	80
	57	0,634	70
	29	0,675	62
	14	0,693	55
	5,7	0,723	52
	2,9	0,778	51
	1,1	0,769	49
	0,6	0,773	45
0,3	0,775	46	

(Tabella 8) Risultati relativi all'attività antiossidante dei campioni di sfoglie di lampone, lampone + reishi, lampone + shiitake.

Nel grafico (Figura 36) sono raffigurate le relazioni tra la concentrazione del composto alimentare d'interesse con l'inibizione percentuale relativa con lo scopo di individuare la concentrazione alla quale si ottiene il 50% di inibizione del valore iniziale di DPPH'.



(Figura 36) Inibizione relativa % di campioni di sfoglie di lampone, sfoglie di lampone e reishi, sfoglie di lampone e shiitake

CAMPIONE	IC ₅₀ [µg/ml]
Sfoglie di lampone	32
Sfoglie di lampone + reishi	102
Sfoglie di lampone + shiitake	14

(Tabella 9) Risultati relativi alla determinazione dell'attività antiossidante

5. CONCLUSIONI

La curiosità riguardo alle molte proprietà annoverate ai funghi reishi e shiitake, nonché le numerose leggende tramandate dalla cultura cinese e giapponese in merito agli effetti benefici e medicamentosi di questi miceti, ci hanno spinti a realizzare questo lavoro di tesi.

La tradizione cinese suggerisce di consumare questi funghi sotto forma di tisane, che risultano avere un gusto così pessimo da rendere difficile l'assunzione alla maggior parte delle persone. In alternativa alle tisane abbiamo individuato un prodotto che permetta di assumere in modo gradevole questi funghi, realizzando le sfoglie di frutta di lampone con l'aggiunta di spore di reishi e shiitake.

Il primo test ha visto la realizzazione di sfoglie di succo di lampone con l'aggiunta delle spore direttamente sulla purea di frutta, ma non è risultata una scelta adeguata in quanto il prodotto ottenuto risultava molto eterogeneo. Nel secondo test le spore sono state aggiunte prima della fase di frullatura dei frutti e con questa modalità il prodotto ottenuto è risultato perfettamente omogeneo. Le sfoglie realizzate sono state sottoposte ad assaggi sensoriali sperimentali, dove è emerso che sono risultate abbastanza gradite per quanto riguarda colore, aroma, aspetto, consistenza, gusto (quest'ultimo leggermente astringente e amaro nelle sfoglie con l'aggiunta di *Ganoderma*). Essendo riusciti nell'intento di realizzare un nuovo prodotto alimentare gradito al consumatore, rispetto alle classiche tisane, ci siamo preoccupati di verificare la conservabilità delle sfoglie. Sono stati fatti dei test di laboratorio dove è emerso che le sfoglie ottenute non presentano contaminazioni fungine e hanno un buon grado di conservabilità, inoltre, la polvere fungina aggiunta non sembra contenere propaguli fungini vitali.

La nostra ricerca si è articolata con altre analisi di laboratorio al fine di verificare il profilo fitochimico nelle spore e nelle sfoglie, nonché le proprietà antiossidanti di quest'ultime.

L'estrazione con solventi a polarità crescente effettuata sulle spore ci ha permesso di ottenere tre estratti. Gli estratti grezzi (diclorometano e metanolo) sono stati analizzati mediante TLC e spettroscopia ^1H NMR, mentre l'estratto acquoso è stato analizzato mediante spettroscopia NMR in stato solido. Gli estratti in diclorometano e metanolo hanno evidenziato rispettivamente la presenza di triterpeni,

probabilmente una miscela di acidi triterpenici noti come acidi ganoderici, e zuccheri, mentre l'estratto acquoso ha confermato la presenza dei β -glucani. Queste analisi sulle spore hanno confermato la presenza di β -glucani e di triterpeni, composti che sembrano avere un ruolo importante per quanto concerne l'immunomodulazione e l'attività antiinfiammatoria. Per quanto riguarda i saggi di attività biologica verso i recettori clonati dell'amaro T2R, i grezzi delle spore hanno dato risultati poco attendibili caratterizzati da segnali di attivazioni cellulari aspecifiche. Sarebbe interessante in futuro purificare e caratterizzare strutturalmente i componenti presenti nella miscela dei triterpeni e saggiare *in vitro* con i recettori dell'amaro i singoli acidi ganoderici che sono citati in letteratura come composti amari.

Le sfoglie sono state estratte con metanolo acido e gli estratti sono stati purificati mediante tecnologia SPE (Solid Phase Extration), per separare le antocianine da zuccheri, fenoli e acidi organici. Abbiamo analizzato le frazioni antocianiche mediante TLC e HPLC riscontrando la presenza della cianidina-3-glucoside e di un altro componente antocianico. La quantificazione delle antocianine monometriche totali come cianidina-3-glucoside equivalente (metodo del pH differenziale), eseguita sull'estratto integrale delle sfoglie, ha rilevato un contenuto di 0.44 ± 0.3 mg/g di antocianine. Non è stato possibile effettuare un confronto diretto con le antocianine totali nei frutti di partenza; in un lavoro di tesi precedente sulla preparazione di sfoglie di sambuco era risultato evidente che il trattamento termico non comprometteva la qualità del prodotto.

In via del tutto preliminare sono state valutate le attività antiossidanti delle tre sfoglie mediante saggio con DPPH, i risultati ottenuti mostrano valori di IC50 compresi tra 14 e 102 μ g/ml. Queste determinazioni si riferiscono a saggi effettuati in doppio su un unico campione di estratto e andrebbero riconfermate.

Le analisi effettuate sulle sfoglie alimentari sono state in grado di fornire dei dati oggettivi che possono essere un punto di partenza per alcune considerazioni. È stato realizzato un prodotto alimentare con un buon grado di conservabilità, inoltre, il gusto risulta gradevole, ma migliorabile per le sfoglie con il reishi, risultate leggermente astringenti, per esempio con aggiunta di altri frutti.

Le sfoglie alimentari ideate possono essere una valida proposta per il consumo dei funghi reishi e shiitake, costituendo un prodotto valido ed alternativo alle classiche tisane dal gusto sgradevole.

La tecnologia di produzione risulta essere molto semplice e veloce, con l'inconveniente che l'acquisto delle spore è relativamente costoso e la possibilità di coltivare i funghi, per ora, pare remota, in quanto servono condizioni particolari e ben monitorate; si potrebbero tentare dei test di coltivazione al fine di poter coltivare con successo questi miceti, cosa che per altro viene già fatta in Italia. Infine, sarebbe interessante individuare le specie di *Ganoderma* e shiitake che crescono spontaneamente nei boschi limitrofi all'azienda agricola *Settimocielo*, al fine di utilizzarle direttamente richiamando l'immagine del luogo di produzione, magari completando il tutto con dei percorsi guidati alla scoperta di questi funghi.

Bibliografia

-
- ¹ Lelley JI., 2012. Antivirale und antibakterielle Wirkung von Medizinalpilzen. 27 Schweizerische Jahrestagung für Phytotherapie; Baden,Switzerland.
- ² Sullivan R, Smith JE, Rowan N, 2006. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine. *Perspectives in biology and medicine.* 49(2):159-70.
- ³ Lindequist U, Niedermeyer THJ, Jülich WD, sep. 2005. The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM.* 2(3):285-99.
- ⁴ Smith JE, Rowan NJ, Sullivan R, 2002. Medicinal mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. University of Strathclyde.
- ⁵ McCloud TG., 2010. High throughput extraction of plant, marine and fungal specimens for preservation of biologically active molecules. *Molecules.* 15(7):4526-63.
- ⁶ Dott. Ivo Bianchi, 2012. Prefazione. In: Frank - Daniel Schulten (ed.) REISHI il fungo dell'immortalità. Edizioni il punto d'incontro. Via Zamenhof 685, 36100 Vicenza 12-13.
- ⁷ Niedermeyer THJ, Jülich WD, 2005. Evidence-based complementary and alternative medicine. In: Lindequist U. The Pharmacological Potential of Mushrooms eCAM 285-99.
- ⁸ Patel S, Goyal A., mar 2012. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech* 1-15.
- ⁹ Jin X, Ruiz Beguerie J, Sze DM, Chan GC., 2012. *Ganoderma lucidum* (Reishi mushroom) for cancer treatment. *Cochrane database of systematic reviews* 6:CD007731. PubMed PMID: 22696372.
- ¹⁰ Dott.ssa Stefania Cazzavillan, aprile 2007. I β -glucani: struttura e meccanismo d'azione. International mychoterapy institute. 16-19.
- ¹¹ Reishi, il *Ganoderma lucidum*, un fungo dalle grandi potenzialità. Infof@rma. Indirizzo: www.farmaciasangallo.it. Visitato gennaio 2014.

-
- ¹² Vetter J, hajdu C, Gyorfi J, Mazlaver P., 2005. Mineral composition of the cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Acta alimentaria* 34: 441-51.
- ¹³ Sasaki T, Takasuka N., 1976. Further study of the structure of lentinan, an antitumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Carbohydrate Res* 47: 99-104.
- ¹⁴ Feofilova EP, Gornova IB, Memorskaya AS, Garibova LV., 1998. Lipid composition of *Lentinula edodes* fruiting bodies and sub-merged mycelium. *Mycrobiology* 67: 540-44.
- ¹⁵ Chang R., 1996. Functional properties of edible mushrooms. *Nutr Rev* 54: 91-93
- ¹⁶ Hatvani N., 2001. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *Int J Antimicrobial Agents* 17: 71-74.
- ¹⁷ Landanyi A, Timar J, lapis K., 1993. Effect of lentinan on macrophage cytotoxicity against metastatic tumor-cells. *Cancer Immunol Immun* 36: 123-26
- ¹⁸ Shiitake (*Lentinula edodes*) fungo medicinale per il sistema immunitario. Mappa del sito, funghi medicinali. Indirizzo: www.lucaavoledo.it. Visitato gennaio 2014.
- ¹⁹ Broi Alice, AA 2011/2012. Isolamento di Polifenoli Amari da *Muscarum comosum* come Agonisti Specifici dei Recettori T2R e TRP. Tesi di Laurea in Farmacia, Università degli studi di Milano.
- ²⁰ Pesenti Erick, AA 2012/2013. Isolamento di Cumarine Amare da *Ruta graveolens* L. Tesi di Laurea Magistrale in Alimentazione e Nutrizione Umana, Università degli studi di Milano.
- ²¹ Meyerhof W., et altri., 2010. The Molecular Receptive Ranges of Human TAS2R Bitter Taste Receptors. *Chemical Senses* 35 (2): 157-170.
- ²² Zhang C.H, Lifshitz L.M., Uy K.F., Ikebe M., Fogarty K., ZhuGe R., 2013. The Cellular and Molecular Basis of Bitter Tastant-Induced Bronchodilation. *PLOS Biology* 11(3).
- ²³ Deshpande D.A. et altri., 2010. Bitter Taste receptors on Airway Smooth Muscle Bronchodilate by Localized Calcium Signaling and Reverse Obstruction. *Nature Medicine* 16(11): 1299-1305.

-
- ²⁴ Lee R.J., Cohen N.A., 2013. The Emerging Role of the Bitter Taste Receptor T2R38 in Upper Respiratory Infection and Chronic Rhinosinusitis. *American Journal of Rhinology & Allergy* 27(4): 283-286.
- ²⁵ Singh N., Vrontakis M., Parkinson F., Chelikani P., 2011. Functional Bitter Taste Receptors are Expressed in Brain Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 406:146- 151.
- ²⁶ Chen M., Wu V., Reeve J.R., Rozengurt E., 2006. Bitter Stimuli Induce Ca²⁺ Signaling and CCK Release in Enteroendocrinus STC-1 cells: Role of L-Type Voltage-Sensitive Ca²⁺ Channels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 291: C726-C739.
- ²⁷ Gledinning J., Yiin Y.M., Ackroff K., Sclafani A., 2008. Intra-gastric Infusion of Denatonium Conditions Flavor Aversion and Gastric Emptying in Rodents. *Physiology & Behavior* 93: 757-765.
- ²⁸ Foster S. et al., 2013. Expression, Regulation and Putative Nutrient-Sensing Function of Taste GPCRs in the Heart. *PLoS ONE* 8(5).
- ²⁹ Lund T.C. et al., 2013. Bone Marrow Stromal and Vascular Smooth Muscle Cells Have Chemosensory Capacity via Bitter Taste Receptor Expression. *PLoS ONE* 8(3).
- ³⁰ Giusti, M.M. and Wrolstad R.E., 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-VIS Spectroscopy current protocols. Contributed in *Food Analytical Chemistry*, F1.2.1_F1.2.13.
- ³¹ Aresi A., AA 2011/2012. Composti bioattivi polifenolici in bacche e in sfoglie sperimentali di frutta essicata di *Sambucus nigra* (L.). Tesi di laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari, Università degli studi di Milano.
- ³² Li, X.; Wu, X. and Huang L., 2009. Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of radix angelicae sinensis (Danggui). *Molecules*, 14, 5349-5361.

Ringraziamenti

Ricordo ancora il primo giorno che andai a Edolo per vedere l'Università e la casa dove avrei trascorso il primo anno. Grazie a Cape, che già studiava a Edolo, conobbi subito i suoi compagni di corso, con i quali legai forse anche più dei miei futuri compagni universitari. Era solo luglio e mancava ancora un bel po' prima dell'inizio delle lezioni, eppure li mi sentivo già a casa e non vedevo l'ora di iniziare. Non mi sbagliavo, Edolo fra alti e bassi è stata un'esperienza meravigliosa. Parlo di alti e bassi perché di certo non mancarono momenti poco piacevoli, fra esami un po' ostici e "problemi" di convivenza. Molte sono le persone da ringraziare e che in un modo o nell'altro hanno contribuito ad arrivare dove sono e alla mia crescita personale.

In primis ringrazio la mia famiglia che mi è sempre stata vicina e mi ha permesso di dedicarmi completamente allo studio. Un grazie ad Alberto, a Gigliola e alla prof. Assante, che mi hanno seguita in questo lavoro di tesi. In particolare vorrei ringraziare Alberto per l'idea di questo tirocinio e per l'impegno che mette nel proprio lavoro. Grazie a Gigliola, che con molta pazienza e puntigliosità mi ha seguita in tutto il lavoro fatto. Grazie alla prof. Assante che si è resa disponibile a fare le analisi preliminari sulla conservabilità, permettendoci di proseguire con il resto del lavoro. Ringrazio i miei coinquilini Cape, Viviana, Federica e Fabiola, insieme abbiamo condiviso molto, instaurando, in alcuni casi, dei veri e propri rapporti di amicizia che persistono tutt'ora. Sempre presenti Michela e Francesca, inseparabili amiche d'infanzia. Un grazie ai miei compagni di corso e in particolare a chi mi ha fatto compagnia con gli ultimi esami. Infine, ma non meno importante, grazie a Mattia.