



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

Dottorato di Ricerca in Tossicologia

TOSSICOLOGIA DEGLI ALIMENTI E DELL'AMBIENTE

XXVIII Ciclo

Studio delle caratteristiche nutraceutiche e salutistiche degli oli di oliva extravergine e delle olive da tavola CV Tonda di Cagliari, possibile utilizzo di comuni cibi da tavola nella modulazione del microbioma orale umano

Settore scientifico disciplinare di afferenza: CHIM/10

Presentata da

Dott.ssa Martina Mundula

Coordinatore Dottorato

Prof. Gaetano Di Chiara

Tutor

Prof. Alberto Angioni

Esame finale anno accademico 2014 –2015

INDICE

Introduzione	pag. 3
---------------------	--------

Capitolo 1. Studio delle caratteristiche nutraceutiche e salutistiche dei principali prodotti di trasformazione delle olive

Parte prima: *Determinazione della componente nutraceutica dell'olio d'oliva extravergine monocultivar*

1.1.1 Introduzione	pag. 5
1.1.2 Materiali e Metodi	pag. 7
1.1.3 Risultati e Discussione	pag. 12
1.1.4 Conclusioni	pag. 20

Parte seconda: *Valutazione delle variazioni delle caratteristiche chimiche, microbiologiche, organolettiche e della struttura delle olive da tavola CV Tonda di Cagliari, a seguito di modifiche del processo tecnologico di lavorazione. Utilizzo di un singolo ceppo selezionato e di una miscela arricchita.*

1.2.1 Introduzione	pag. 21
1.2.2 Materiali e Metodi	pag. 24
1.2.3 Risultati e Discussione	pag. 30
1.2.4 Conclusioni	pag. 40

Capitolo 2 Studi sul Microbioma orale

Parte prima: *Effetto antimicrobico ed antibiofilm verso i batteri patogeni del cavo orale, di alimenti comuni della dieta Mediterranea*

2.1.1. Introduzione	pag. 41
2.1.2 Materiali e Metodi	pag. 53
2.1.3 Risultati e Discussione	pag. 60
2.1.4 Conclusioni	pag. 63

Parte seconda: *Studio degli effetti antimicrobici ed antibiofilm degli estratti di *Lentinula edodes* verso i batteri patogeni del cavo orale*

2.2.1 Introduzione	pag. 64
2.2.2 Materiali e Metodi	pag. 69
2.2.3 Risultati e Discussione	pag. 76
2.2.4. Conclusioni	pag. 83

Bibliografia	pag. 84
---------------------	---------

Introduzione

Lo studio delle proprietà nutraceutiche e salutistiche degli alimenti costituisce al giorno d'oggi uno dei maggiori interessi dei consumatori e di riflesso dei produttori e del mondo scientifico. La ricerca di prodotti sani o in grado di migliorare la salute e prevenire le malattie sta lentamente riportando i consumatori ad un rispetto della natura e dei suoi ritmi, alla ricerca di prodotti genuini, alla cosiddetta filiera corta che permette di trovare i prodotti alla maturazione ideale e quindi con tutte le proprietà che li fanno passare da semplici alimenti ad Alimenti Funzionali.

Fra questi l'olivo pianta sacra nel passato, da dei frutti che se ben lavorati producono olio di oliva extravergine e olive da tavola le cui proprietà salutistiche sono ben note e sfruttate nella dieta mediterranea. Dieta che ha la sua base nei prodotti tipici del bacino del Mediterraneo che non essendo più solo cibi, possono essere sfruttati per modificare la risposta ad alcune patologie come quelle del microbioma orale umano.

La capacità antiossidante e le proprietà benefiche contro le malattie degenerative indotte da stress ossidativo, dell'olio extravergine di oliva è dovuta alla sua particolare composizione in acidi grassi e alla importante concentrazione di composti fenolici, nonché al contenuto in Vitamina E [1, 2].

Il contenuto fenolico delle olive e dei loro prodotti di trasformazione può essere influenzato da diversi fattori: varietà (tipo di cultivar utilizzata), metodi di lavorazione, condizioni pedologiche, climatiche e processi tecnologici. Nelle olive da tavola le caratteristiche funzionali e antiossidanti sono fortemente influenzate dal processo

fermentativo mediato da starter microbici. La tipologia dell'inoculo può quindi incidere in maniera importante sulle caratteristiche finali del prodotto.

Le caratteristiche salutistiche dei prodotti alimentari sono molteplici, in particolare alcuni alimenti presentano composti ad attività antimicrobica, che si possono manifestare a diversi livelli. Una patologia molto diffusa sono le malattie del cavo orale legate allo sviluppo incontrollato di popolazioni microbiche dannose. Per questi motivi, la valutazione degli effetti antimicrobici ed antibiofilm di alcuni comuni alimenti tipici della dieta Mediterranea (*Allium sativum* L.; *Allium cepa* L.; *Ocimum basilicum*, L.; *Petroselinum crispum*) e di prodotti naturali quali gli estratti del fungo *Lentinula edodes* rappresentano un importante argomento di studio all'interno di una rinnovata filosofia di vita più naturale ed ecocompatibile.

Capitolo 1. Studio delle caratteristiche nutraceutiche e salutistiche dei principali prodotti di trasformazione delle olive

Parte prima: Determinazione della componente nutraceutica dell'olio d'oliva extravergine monocultivar

1.1.1. Introduzione

L'Olivo (*Olea europea L.*) è un albero appartenente alla famiglia delle *Oleaceae*, distribuito in tutta l'area del Mediterraneo, soprattutto in Italia e Spagna. È una specie presente in tutte le Regioni italiane con una prevalenza dell'85% al Sud e nelle isole (Figura1).



Figura 1. Distribuzione delle colture di Olive nel 2014 (fonte: <http://faostat3.fao.org>)

L'olio extra vergine è un prodotto ottenuto a temperatura ambiente per estrazione dai frutti dell'olivo dopo macinazione e gramolatura. Le caratteristiche dell'olio d'oliva sono regolamentate a livello comunitario (Reg CEE n° 2568/91) che stabilisce i corretti parametri fisici, chimici e organolettici, nonché i metodi analitici da utilizzare per la loro determinazione.

L'olio di oliva rappresenta solo il 3,5% della produzione mondiale di oli vegetali e il 15% degli oli liquidi. La sua importanza nei Paesi produttori è legata all'aspetto economico ma anche a quello sociale. In tutto il mondo è aumentata la sua importanza in virtù delle sue proprietà nutritive e salutistiche, senza dimenticare le caratteristiche organolettiche. Le principali proprietà nutraceutiche sono legate alla particolare composizione in acidi grassi. Tra gli acidi grassi l'acido oleico è uno degli acidi grassi più digeribili, ha la capacità di stimolare la secrezione pancreatica, il suo punto di fusione, inferiore alla temperatura del corpo, determina una velocità massima di idrolisi della lipasi pancreatica e una elevata velocità di assorbimento attraverso la mucosa intestinale che aumentano il trasporto di vitamine liposolubili attraverso le cellule della parete intestinale. Inoltre la particolare composizione della frazione insaponificabile, che gli conferisce interessanti proprietà antiossidanti, lo identifica come uno dei responsabili nella diminuzione delle malattie cardiovascolari nell'area del Mediterraneo [3].

Le caratteristiche salutistiche degli oli possono essere legate fra i vari parametri alla propensione della cultivar ad accumulare composti ad attività antiossidante. Per questo motivo sono stati analizzati oli extra vergine di oliva monocultivar, in modo da definire il loro profilo antiossidante per via della composizione in tocoferoli e polifenoli.

1.1.2. Materiali e Metodi

Campioni

Gli oli extravergine di oliva sono stati prelevati direttamente in frantoio, dopo la preparazione ed inviati nel laboratorio. Sono stati analizzati 53 oli monocultivar da 18 cultivar diverse: 10 Bosana, 6 Tonda Iblea, 5 Nera di Oliena, 4 Frantoio, 4 Itrana e 4 Coratina, 3 Semidana, 3 Moraiolo e 3 Correggiolo, 2 Tonda di Cagliari e 2 Ogliastrina, 1 Leccio del Corno, 1 Ravere, 1 Ogliarola del Brandano, 1 Nera di Gonnos, 1 Maiorchina e 1 Nera di Villacidro. Gli oli erano tutti della categoria merceologica extra vergine, ottenuti da olive in condizioni ottimali e non attaccate da parassiti. Per la trasformazione è stato utilizzato un processo di estrazione standard in tutti i campioni: macina metallica con frangitore a martello, gramola orizzontale e centrifugazione a due stadi.

Reagenti e reattivi

Gli standard analitici tirosolo, 3-hydroxytyrosol, luteolina 7 glucoside, luteolina, oleuropeina, verbascoside, acido p-cumarico, acido siringico, acido gallico e acido vanillico, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Gli standard madre analitici (≈ 1000 mg/L) sono stati preparati in metanolo. Le soluzioni standard di lavoro a 100 mg/L sono state ottenute dalla diluizione degli standard madre in metanolo. La curva di taratura è stata preparata utilizzando cinque punti, diluendo opportunamente la soluzione madre in metanolo. L'Acido siringico è stato usato come standard interno.

Folin-Ciocalteu, carbonato di sodio, idrossido di potassio, Trolox, DPPH e ABTS sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Metanolo, etile acetato, acetonitrile ed esano erano solventi di grado analitico acquistati da Merck (Darmstadt, Germany). Cloroformio, persolfato di potassio sono stati presi da Carlo Erba (Milano, Italia).

È stata utilizzata acqua ad elevata purezza con conducibilità $< 18,2 \text{ M}\Omega$, ottenuta con un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Determinazione dei composti fenolici dell'olio d'oliva.

Estrazione della frazione fenolica

Sono stati prelevati 10 g di olio d'oliva, pesati in una provetta da 40 ml con tappo a vite; dopo l'aggiunta di 20 ml di $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:20 v/v) le provette sono state agitate per 3 minuti in vortex e 30 minuti in un agitatore rotante (Falc Instruments, Bergamo, Italia). La soluzione estratta, è stata centrifugata per 30 minuti a 4000 rpm.

Da questa soluzione, 1 ml della fase organica è stato portato a secco con un delicato flusso di azoto, i residui sono stati ripresi con 1 ml di H_3PO_4 0,22 M/ $\text{ACN}/\text{CH}_3\text{OH}$ (80:10:10).

Analisi dei fenoli in HPLC

Per l'analisi dei polifenoli è stato usato un HPLC Agilent 1100 accoppiato con un Thermo Finnigan DAD CHROMQUEST UV 6000, la colonna utilizzata è stata una VARIAN POLARIS 5 (C18 A - 300 x 4,6 mm). È stato impiegato un gradiente di eluizione binario: (A) H_3PO_4 0,22 M e (B) $\text{ACN}/\text{CH}_3\text{OH}$ (1/1,v/v), con il seguente

programma: T = 0 96% A; T = 40 50% A; T = 45 40% A; T = 60 0% A (10 minuti), post-time di stabilizzazione di 15 minuti. Il volume di iniezione era di 20 μ l, e la velocità di flusso di 1ml/min. Le lunghezze d'onda di monitoraggio per l'analisi UV erano 280 e 360 nm, corrispondenti all'assorbanza media massima della diverse famiglie di fenoli.

Analisi dei fenoli totali in spettrofotometria

100 μ l di estratto in MeOH/H₂O precedentemente preparato o dello standard (acido gallico), sono stati messi in un matraccio tarato da 10 ml, addizionati di 500 μ l di soluzione di Folin-Ciocalteu, la miscela è stata quindi agitata per 5 minuti a temperatura ambiente (18°C). Successivamente sono stati aggiunti 3 ml di soluzione di carbonato di sodio al 20% in acqua (p/v) e addizionata acqua MilliQ fino al volume finale di 10 ml. I campioni sono stati incubati per 80 minuti a temperatura ambiente (18°C) e centrifugati a 4000 rpm per 10 minuti. L'Analisi quantitativa è stata effettuata con uno spettrofotometro Varian Cary50 utilizzando cuvette al quarzo di 1 cm, la lunghezza d'onda impostata era di λ 725 nm. È stato applicato il metodo dello standard esterno utilizzando l'acido gallico come standard di riferimento, correlando l'assorbanza (Abs) alla concentrazione. Il grafico di calibrazione è stato costruito con concentrazioni tra 400 e 8000 mg/Kg ed i risultati sono stati espressi come mg/Kg di equivalenti di acido gallico.

Determinazione della capacità antiossidante

Test del DPPH

L'analisi spettrofotometrica del DPPH è stata effettuata secondo il metodo di Brand-Williams 1995 [4] opportunamente modificato.

Sono stati pesati 5 g di olio di oliva in una provetta da 15 ml con tappo a vite ed estratti con 5 ml di metanolo. Le provette sono state agitate per 1 minuto al vortex e 20 minuti in un agitatore rotante (Falc Instruments, Bergamo, Italia). La soluzione è stata centrifugata per 25 minuti a 4000 rpm.

20 µl dell'estratto o standard (Trolox) sono stati aggiunti a 3 ml di una soluzione di DPPH in metanolo (40 µM). Dopo 60 minuti di incubazione a temperatura ambiente e al buio, le soluzioni sono state analizzate con uno spettrofotometro Cary50 a λ 517 nm. L'analisi quantitativa è stata effettuata con il metodo dello standard esterno utilizzando il Trolox come standard di riferimento e correlando l'assorbanza (Abs) alla concentrazione. I risultati sono stati espressi come mmol/Kg di TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*).

ABTS test

Il saggio ABTS è stato effettuato secondo il metodo di Re et al. [5] opportunamente modificato. Il reattivo ABTS è stato preparato miscelando 20 ml di soluzione acquosa di ABTS 2 mM e 200 µl di persolfato di potassio. Dopo 12 ore di incubazione per la formazione dei radicali di ABTS, la soluzione è stata diluita con metanolo (1:20 v/v) per arrivare ad un'assorbanza di $0,70 \pm 0,02$ a λ 734 nm a 30°C di temperatura.

20 µl di estratto (preparato come per la prova del DPPH) o standard (Trolox) sono stati trasferiti in cuvette monouso da 1 cm a cui sono stati aggiunti 2 ml di ABTS. Dopo 1 minuto di incubazione i campioni sono stati analizzati a λ 734 nm contro un bianco preparato con 20 µl di metanolo più 2 ml di ABTS. Le analisi quantitative sono state effettuate con il metodo dello standard esterno utilizzando il Trolox come standard di riferimento, correlando l'assorbanza alla concentrazione. I risultati sono stati espressi come mmol/Kg di TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*).

Vitamina E

La vitamina E è stata determinata secondo il metodo di Pirisi et al. [6]. Brevemente: 20 µl di olio di oliva sono stati diluiti con 200 µl di cloroformio e 780 µl di miscela eluente (MeOH / CH₃CN, 1/1, v/v). È stato utilizzato un HPLC Merck Hithachi LaChrom costituito da un rilevatore a fluorescenza L-7485, un autocampionatore L-7200, e una pompa quaternaria L-7100. È stata effettuata una eluizione isocratica utilizzando metanolo/acetonitrile (1/1 v/v). La colonna utilizzata era una Spherisorb ODS2 (460x25 mm 5 µ Waters, Milano, Italia). Il volume di iniezione era di 20 µl, e la velocità del flusso di 1 ml/min.

L'analisi quantitativa è stata effettuata a λ_{ecc} 295nm e λ_{emi} 330nm, correlando l'area del picco alla concentrazione, e esprimendo i dati come mg/Kg di α -tocoferolo.

1.1.3. Risultati e Discussione

Fenoli

Il metodo cromatografico ha consentito una buona separazione dei composti studiati (figure 2 e 3). Il 95% della composizione fenolica degli oli di oliva è rappresentata da 17 composti dei quali 14 sono stati chiaramente identificati. L'analisi quantitativa è stata fatta con il metodo dello standard interno esprimendo la concentrazione dei fenoli come acido sirringico. Gli oli d'oliva delle stesse cultivar hanno mostrato una composizione fenolica simile con RSD% inferiore al 20% (Tabella 1). Le maggiori differenze tra le cultivar hanno riguardato oleuropeina e i suoi glicosidi, il tirosolo e il 3OH-tirosolo (Tabella1). Al fine di discriminare tra le diverse cultivar, è stata eseguita una analisi multivariata. L'Analisi delle componenti principali (PCA) ha mostrato una chiara separazione dei gruppi per tutte le cultivar, i dati sono stati confermati da analisi PLS-DA (Figura 4). Inoltre i dati analizzati (in PCA e PLS-DA) considerando come dato fisso la zona di provenienza invece della cultivar, hanno mostrato gruppi distinti con i campioni raggruppati per provenienza, fatta eccezione per i campioni di Itrana in provincia di Latina e di un campione di Cima di Mola in provincia di Bari (Figura 5).

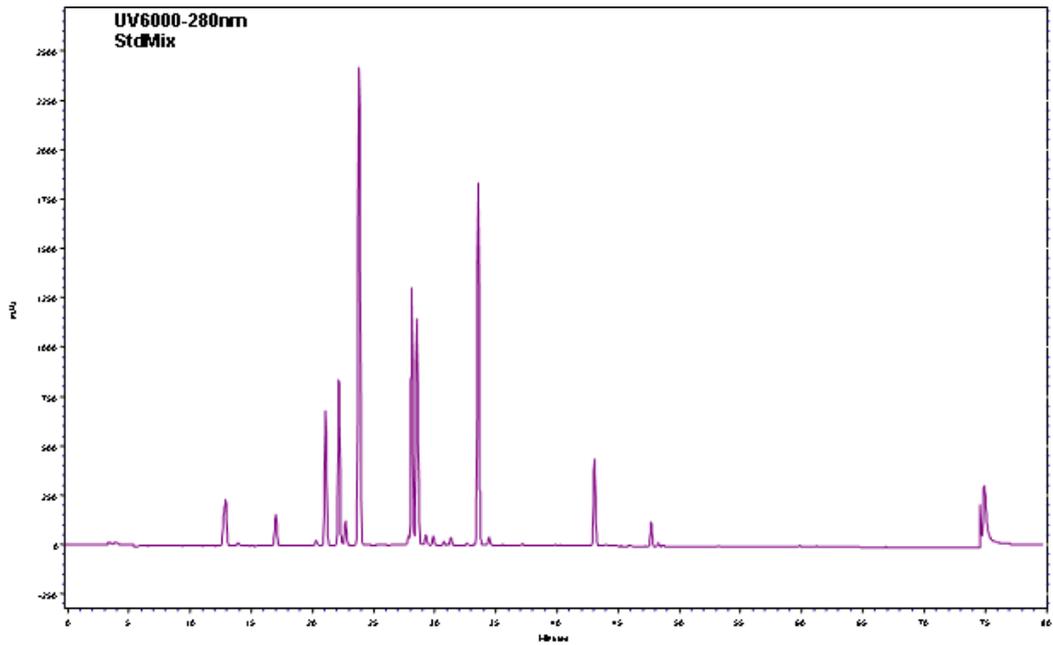


Figura 2. Cromatogramma HPLC a λ 280 nm di uno standard analitico a 25 mg/L, dei fenoli solitamente identificati nell'olio d'oliva.

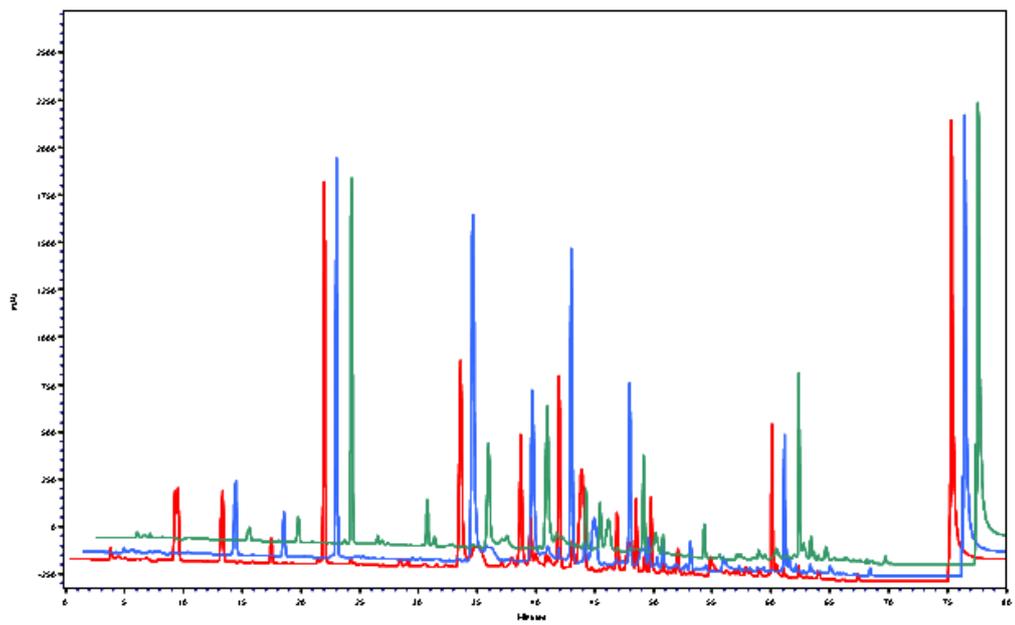


Figura 3. Cromatogrammi HPLC della frazione fenolica estratta con MeOH/H₂O, di tre oli extravergine di oliva analizzati.

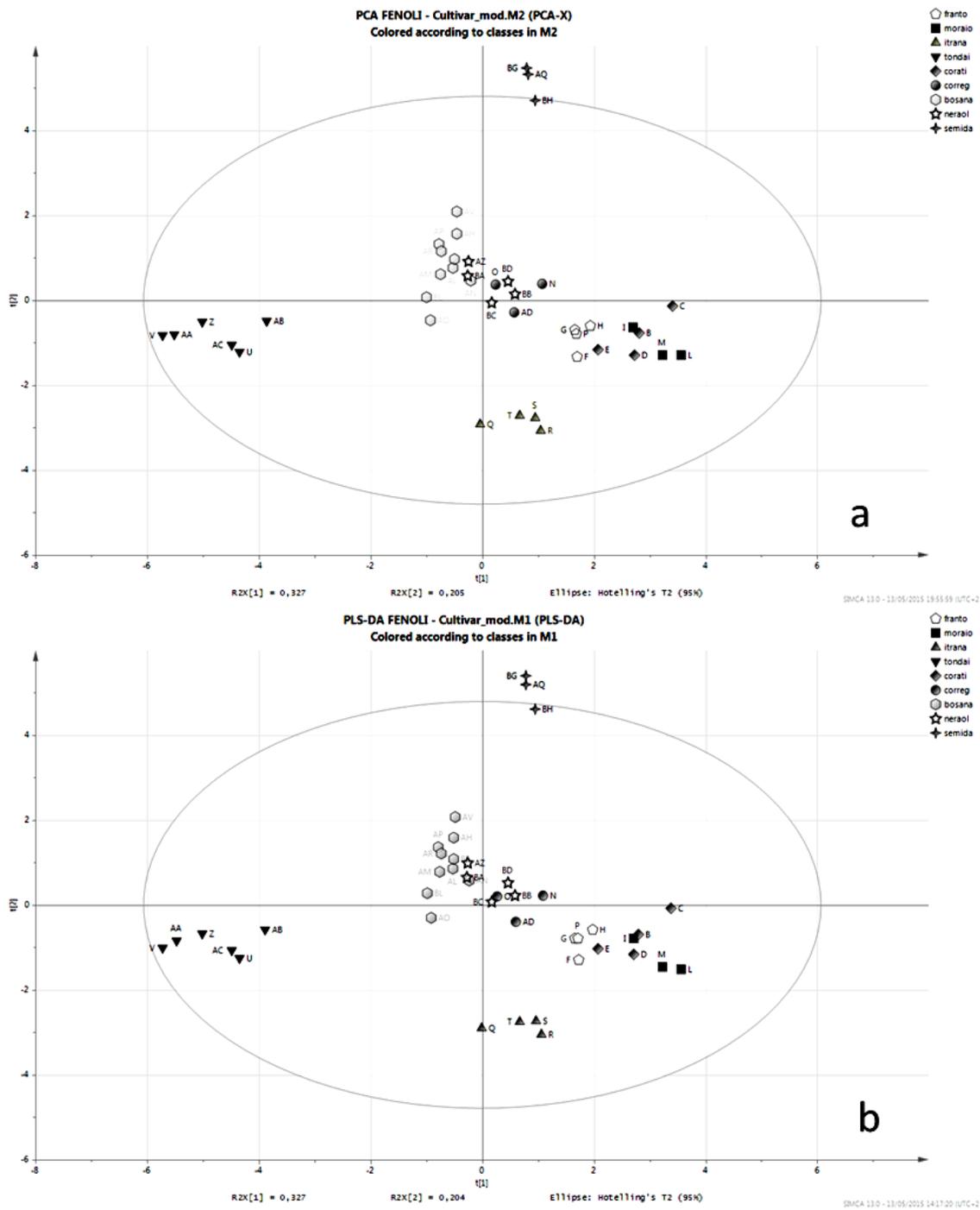


Figura 4. Elaborazioni PCA (a) e PLS-DA (b) dei dati relativi alle analisi effettuate sui campioni degli oli extravergine di oliva rispetto alla cultivar.

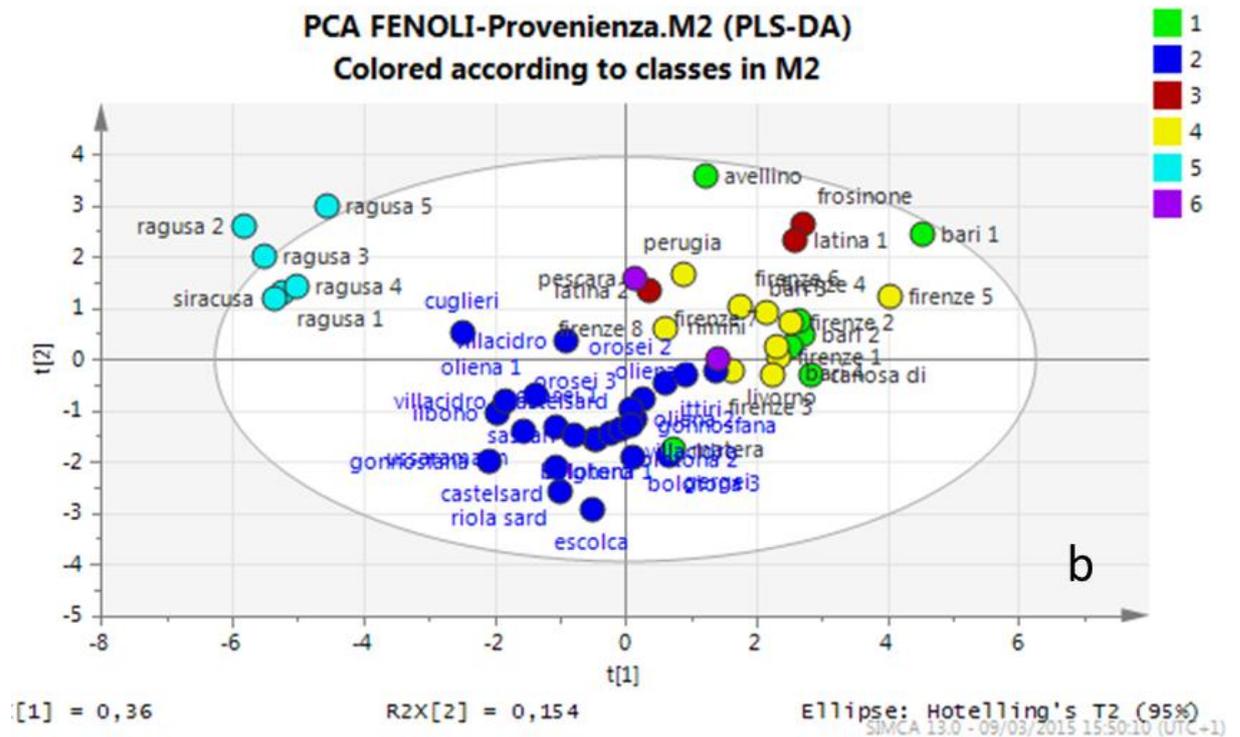
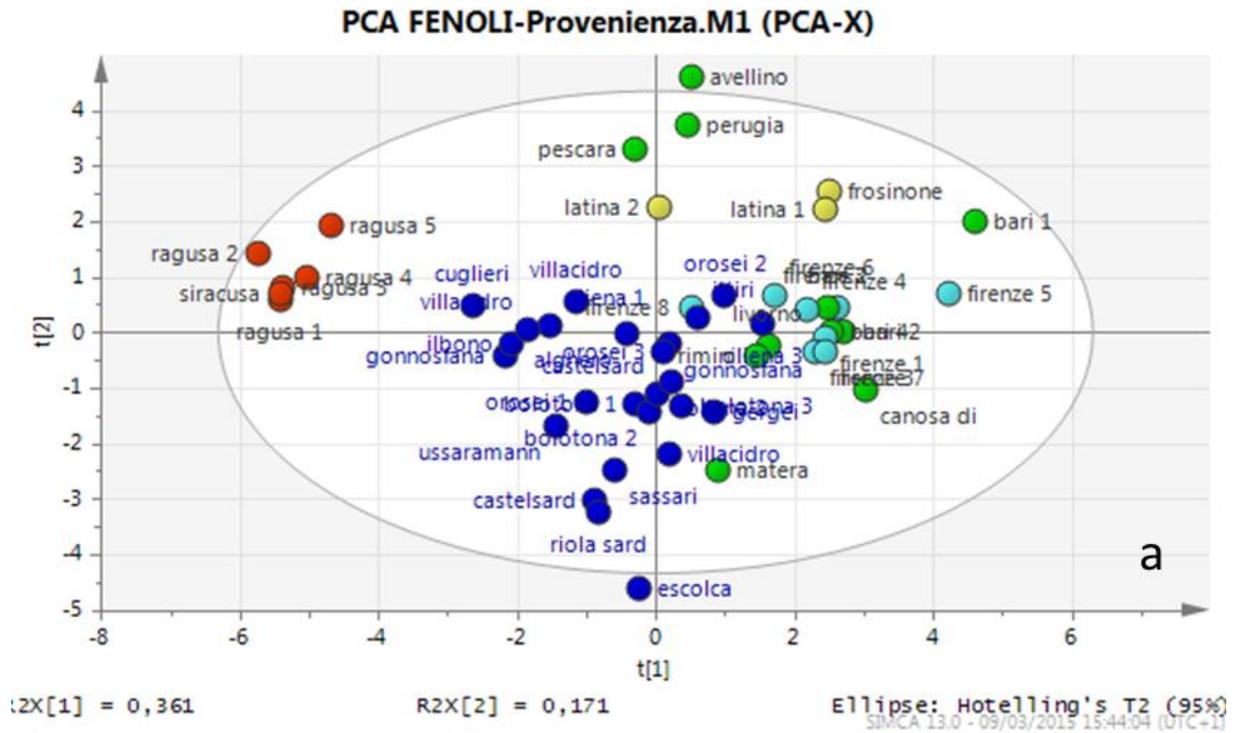


Figura 5. Elaborazioni PCA (a) e PLS-DA (b) dei dati relativi alle analisi effettuate sui campioni degli oli extravergine di oliva rispetto alla provenienza.

Tabella 1. Valori medi (mg/kg \pm RSD% di acido siringico) dei singoli fenoli determinati negli oli extravergine monocultivar analizzati.

	Frantoio	Moraiolo	Itrana	Tonda iblea	Coratina	Correggiolo	Bosana	Tonda di Cagliari	Nera di Oliena	Ogliastrina	Semidana
3OH-Tirosolo	0,69 \pm 16,4	1,44 \pm 16,5	1,56 \pm 20,0	0,13 \pm 19,8	0,70 \pm 15,4	0,63 \pm 8,7	0,23 \pm 16,7	0,35 \pm 10,6	0,53 \pm 18,8	0,26 \pm 0,1	0,67 \pm 10,2
Tirosolo	0,37 \pm 16,7	0,52 \pm 17,2	0,55 \pm 17,4	0,17 \pm 12,3	0,50 \pm 15,9	0,29 \pm 6,6	0,18 \pm 16,7	0,15 \pm 11,4	0,19 \pm 16,1	0,10 \pm 16,4	0,27 \pm 10,2
Ac. vanillico	0,03 \pm 19,7	0,03 \pm 14,7	0,03 \pm 16,2	0,02 \pm 18,7	0,02 \pm 18,3	0,03 \pm 8,6	0,03 \pm 19,3	0,03 \pm 10,3	0,03 \pm 13,1	0,02 \pm 16,5	0,02 \pm 16,3
Vanillina	0,03 \pm 18,4	0,03 \pm 14,3	0,03 \pm 19,3	0,05 \pm 16,3	0,01 \pm 19,2	0,04 \pm 8,4	0,02 \pm 16,7	0,03 \pm 16,9	0,02 \pm 17,4	0,00 \pm 7,8	0,02 \pm 8,2
Ac. p-cumarico	0,01 \pm 18,1	0,01 \pm 16,0	0,01 \pm 19,5	0,18 \pm 18,7	0,02 \pm 17,1	0,02 \pm 19,6	0,03 \pm 17,0	0,03 \pm 16,4	0,04 \pm 17,7	0,03 \pm 6,9	0,03 \pm 18,7
Ac. ferulico	0,04 \pm 11,7	0,05 \pm 6,5	0,04 \pm 18,7	0,07 \pm 15,1	0,01 \pm 18,4	0,06 \pm 9,4	0,03 \pm 18,1	0,02 \pm 11,9	0,03 \pm 13,2	0,01 \pm 11,4	0,02 \pm 8,8
Verbascoside	0,01 \pm 71,3	0,02 \pm 2,0	0,01 \pm 15,5	0,02 \pm 9,9	0,01 \pm 16,8	0,02 \pm 15,8	0,02 \pm 18,4	0,02 \pm 15,5	0,02 \pm 17,5	0,02 \pm 13,3	0,03 \pm 0,4
Luteolina 7-G	0,01 \pm 9,4	0,01 \pm 13,0	0,01 \pm 4,3	0,01 \pm 19,2	0,01 \pm 10,3	0,01 \pm 8,4	0,01 \pm 17,0	0,01 \pm 0,6	0,01 \pm 4,5	0,01 \pm 4,3	0,01 \pm 14,9
Ac. OH-cinnamico	1,05 \pm 15,5	1,25 \pm 2,3	0,64 \pm 19,2	0,85 \pm 18,0	0,87 \pm 16,3	1,27 \pm 9,4	1,02 \pm 19,6	0,99 \pm 19,8	0,91 \pm 16,3	0,78 \pm 14,2	2,16 \pm 7,2
Oleuropeina	0,98 \pm 13,8	2,72 \pm 14,1	0,47 \pm 15,2	0,10 \pm 19,4	1,41 \pm 18,5	1,30 \pm 15,5	0,54 \pm 18,4	0,35 \pm 16,2	0,83 \pm 17,2	0,14 \pm 19,4	0,19 \pm 9,8
Oleurop der	0,92 \pm 15,5	0,57 \pm 12,8	0,30 \pm 19,8	0,05 \pm 18,2	0,40 \pm 6,3	0,75 \pm 17,0	0,21 \pm 16,7	0,38 \pm 13,4	0,28 \pm 16,9	0,20 \pm 6,0	0,28 \pm 17,5
Ligstrode der	0,42 \pm 9,6	0,49 \pm 17,3	0,21 \pm 18,2	0,28 \pm 13,1	0,42 \pm 11,2	0,51 \pm 19,2	0,37 \pm 17,4	0,60 \pm 19,6	0,47 \pm 10,6	0,47 \pm 19,9	1,42 \pm 9,5
Luteolina	0,20 \pm 10,7	0,17 \pm 13,7	0,12 \pm 14,3	0,28 \pm 19,6	0,12 \pm 19,1	0,24 \pm 2,9	0,23 \pm 16,1	0,23 \pm 12,3	0,21 \pm 19,1	0,28 \pm 8,3	0,18 \pm 2,1
Oleurop der	1,39 \pm 17,8	1,34 \pm 13,1	0,57 \pm 18,7	0,34 \pm 19,1	1,09 \pm 4,9	1,00 \pm 9,9	0,98 \pm 18,4	1,95 \pm 9,7	0,90 \pm 13,1	0,41 \pm 8,8	0,85 \pm 3,5
CH ₃ luteolina	0,32 \pm 16,6	0,26 \pm 11,5	0,19 \pm 18,9	0,25 \pm 9,2	0,48 \pm 18,3	0,38 \pm 10,4	0,34 \pm 18,6	0,28 \pm 9,6	0,36 \pm 16,0	0,29 \pm 4,9	0,81 \pm 14,9
Apigenina	0,17 \pm 19,5	0,14 \pm 16,1	0,21 \pm 16,3	0,14 \pm 17,3	0,12 \pm 17,3	0,16 \pm 13,0	0,21 \pm 19,6	0,22 \pm 19,2	0,24 \pm 11,7	0,31 \pm 14,9	0,15 \pm 7,6
Luteolina	0,15 \pm 13,1	0,09 \pm 10,0	0,18 \pm 17,0	0,22 \pm 8,9	0,08 \pm 16,7	0,10 \pm 13,8	0,19 \pm 18,4	0,17 \pm 10,0	0,17 \pm 14,0	0,23 \pm 12,8	0,18 \pm 13,9

Fenoli totali

I dati ottenuti hanno mostrato elevati valori di fenoli totali (TP) per tutti i campioni, inoltre i dati sono risultati molto variabili con valori tra 197,7 e 897 con un valore medio di 499 ± 30 mg/Kg (Tabella 2). Il maggiore numero di campioni ha mostrato valori compresi tra 300 e 500 mg/Kg (48%) seguito da campioni con valori superiori a 500 mg/Kg (42%) e infine da quello con valori al di sotto di 300 mg/Kg (10%)(Figura 6).

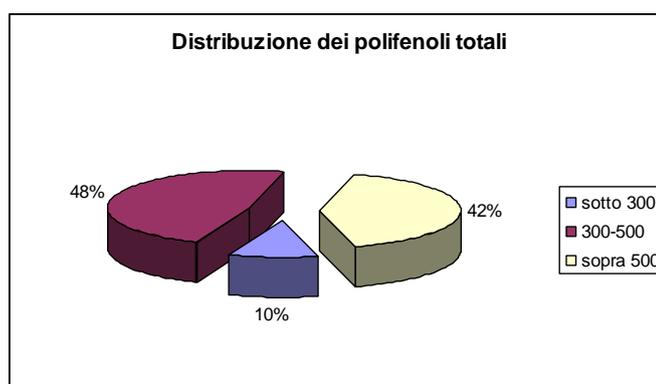


Figura 6. Distribuzione dei polifenoli totali nei campioni di olio extravergine analizzati.

Tabella 2. Contenuto in polifenoli totali (mg/kg), Vitamina E (mg/kg), DPPH e ABTS (mmol/L TEAC).

Campione	Polifenoli totali	DPPH	ABTS	Vitamina E
	mg/kg	mMol/L TEAC		mg/kg
frantoio A	499,6	4,084	2,891	279,1
frantoio B	487,4	3,683	3,003	269,5
frantoio C	535,8	3,919	3,144	253,4
frantoio D	546,1	3,942	3,272	350,5
cima di mola 100%	670,8	4,545	3,702	564,6
moraiole 100%	407,2	1,602	1,267	307,8
moraiole 100%	349,2	1,850	2,023	598,7
moraiole 100%	590,9	3,265	2,693	616,8
itrana A	404,1	2,274	1,779	490,2
itrana B	255,4	0,179	0,120	411,3
itrana C	317,6	1,950	1,834	537,5
itrana D	245,0	0,932	0,620	316,3
tonda iblea A	197,7	0,009	0,206	276,9
tonda iblea B	470,0	3,516	2,321	414,3
tonda iblea C	618,5	4,102	3,189	228,7
tonda iblea D	377,0	1,150	1,225	445,0
tonda iblea E	397,7	4,191	3,491	310,0
tonda iblea F	371,2	2,074	2,084	472,8
coratina A	507,1	2,577	2,239	410,4
coratina B	342,9	0,671	0,662	316,3
coratina C	495,1	3,922	2,807	281,0
coratina D	403,4	2,636	1,654	363,9
correggiolo 100%	641,2	4,762	3,851	280,7
correggiolo 100%	558,7	4,196	3,205	279,4
correggiolo 100%	289,0	-0,096	0,130	307,7
leccio del corno 100%	249,3	4,049	3,387	241,5
ravere 100%	258,2	1,048	0,850	326,3
ogliarola del bradano 100%	482,6	3,817	3,184	163,0

Campione	Polifenoli totali	DPPH	ABTS	Vitamina E
	mg/kg	mMol/L TEAC		mg/kg
bosana	486	0,874	0,834	997
bosana	839	1,729	1,730	924
bosana	627	1,481	1,273	1208
bosana	476	1,397	1,578	1195
bosana	598	1,686	1,341	1073
bosana	544	1,157	1,093	355
bosana	491	1,714	1,147	341
bosana	548	1,361	1,092	234
bosana	742	3,192	2,417	1184
bosana	897	3,060	2,343	371
tonda di cagliari	425	0,878	0,565	1047
tonda di cagliari	891	3,784	3,152	479
nera di gonnos	464	0,125	0,435	1287
nera di oliena	589	2,179	2,736	846
nera di oliena	761	2,834	2,862	800
nera di oliena	755	3,001	2,426	267
nera di oliena	642	2,541	2,130	275
nera di oliena	882	3,042	2,397	221
ogliastrina	531	1,268	1,224	331
ogliastrina	702	2,130	1,769	307
semidana	595	1,474	1,297	428
semidana	406	0,608	0,788	288
semidana	537	0,924	0,937	321
maiorchina	457	0,615	0,455	359
nera di villacidro	427	0,914	0,863	337

Vitamina E

L'analisi della vitamina E ha mostrato valori compresi tra 163 e 1287 mg/L. Il maggior numero di composti ha mostrato valori di concentrazione simili a quelli che solitamente si trovano nell'olio extravergine, da 300 a 500mg/L (49%), seguiti da campioni sotto a 300mg/L (26%), e quelli con valori da 500 a 800mg/L. Il gruppo con valori lontani dalla norma (>800 mg/L) è stato di circa il 15% (Figura 7).

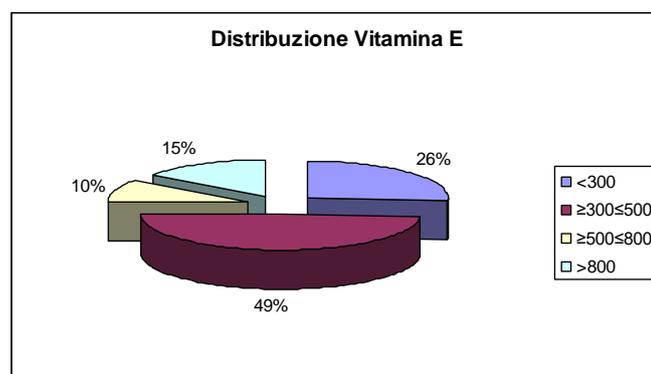


Figura 7. Distribuzione della concentrazione di vitamina E nei campioni di olio extravergine analizzati.

Test del DPPH

La fase idrofilica è stata utilizzata per valutare la capacità antiossidante dell'olio extravergine di oliva.

I valori della capacità antiossidante variano tra -0,096 e 4,912 mmol/L TEAC con valori medi di $2,183 \pm 62\%$ mmol/L TEAC (Tabella 2). Il 38% degli oli è rappresentato da valori inferiori a 1,5mmol/L TEAC, seguito da campioni con valori tra 1,5 e 3,0mmol/L TEAC (32%) e quelli con valori superiori a 3,0mmol/L TEAC (30%) (Figura 8).

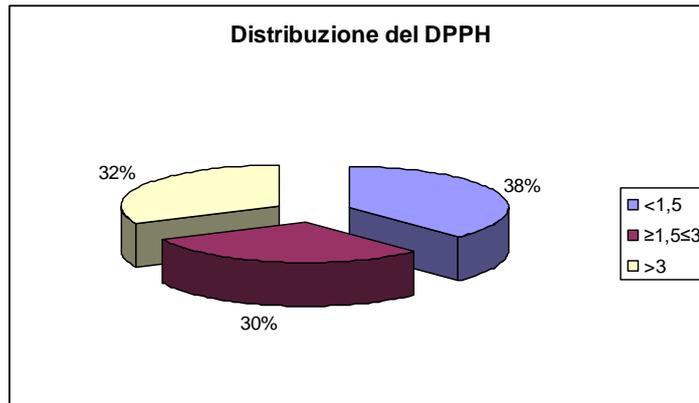


Figura 8. Distribuzione della capacità antiossidante mediante DPPH nei campioni di olio extravergine analizzati.

ABTS.

I valori dell'ABTS hanno mostrato un comportamento simile a quelli dell' analisi del DPPH, con dati che vanno da 0,120 a 3,851, e un valore medio di $1,823 \pm 54\%$ (Tabella 2). Il 36% dei campioni ha mostrato valori inferiori a 1,3mmol/L TEAC, seguito da campioni che variano da 1,3 al 2,3 mmol/L TEAC (33%), e campioni oltre i 2,3 mmol/L TEAC (31%) (Figura 9).

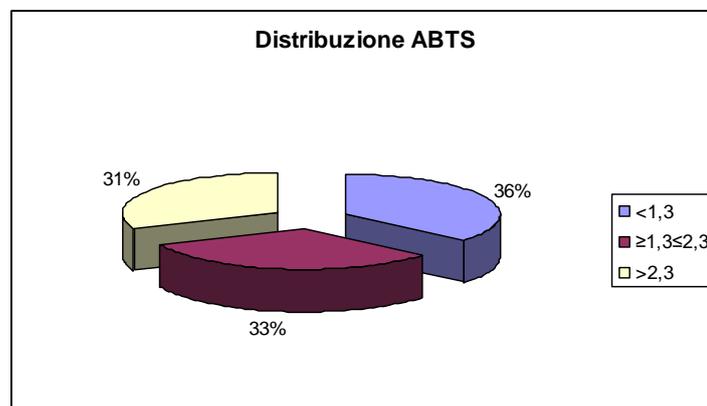


Figura 9. Distribuzione della capacità antiossidante mediante ABTS nei campioni di olio extravergine analizzati.

1.1.4. Conclusioni

Gli oli d'oliva analizzati hanno mostrato ottime caratteristiche qualitative. Gli alti livelli di polifenoli e vitamina E ne consigliano un uso costante nella dieta .

In particolare dai dati ottenuti possiamo mettere in relazione gli alti valori della concentrazione dei polifenoli totali con la capacità antiossidante misurata attraverso i test del DPPH e l'ABTS che hanno mostrato un andamento simile e risultati paragonabili.

Le cultivar con i valori medi più alti di polifenoli sono state: Frantoio, Bosana, Tonda di Cagliari, Nera di Oliena, Ogliastrina e Semidiana mentre solo due cultivar (Leccio del corno e Ravere) hanno mostrato valori sotto la media. Anche l'analisi della Vitamina E ha evidenziato valori molto alti nelle cultivar Bosana, Nera di Gonnos e Tonda di Cagliari.

È stata osservata una correlazione tra gli alti valori di polifenoli e Vitamina E (presenti in molte cultivar) con valori medio alti di DPPH espressa in mmol/L TEAC.

Lo studio statistico PCA e PLS-DA dei dati ottenuti dall'analisi effettuate sugli oli ha permesso di mettere in evidenza che oli con la stessa origine botanica tendevano ad aggregarsi e differenziarsi nettamente fra di loro e che gli stessi oli analizzati per provenienza manifestavano un sufficiente raggruppamento per località anche se con differenze statistiche meno apprezzabili.

Parte seconda: Valutazione delle variazioni delle caratteristiche chimiche, microbiologiche, organolettiche e della struttura delle olive da tavola CV Tonda di Cagliari, a seguito di modifiche del processo tecnologico di lavorazione. Utilizzo di un singolo ceppo selezionato e di una miscela arricchita.

1.2.1. Introduzione

Le olive da tavola sono ottenute dai frutti della *Olea europea L.* immersi direttamente in salamoia, nella quale subiscono una fermentazione completa o parziale [7], soprattutto a causa del metabolismo microbico [8]. Il prodotto può essere conservato con o senza l'aggiunta di agenti acidificanti. Le principali variabili che influenzano il processo di fermentazione sono sia intrinseche, come ad esempio la cultivar stessa [9] o il microbiota indigeno presente sulla superficie della frutta [10], sia tecnologiche: la concentrazione del sale nella salamoia, la temperatura di lavorazione e le pratiche igieniche [10]. Il trattamento è finalizzato alla deamarizzazione del frutto attraverso:

- ✓ La diffusione dal frutto alla salamoia di composti amari come l'oleuropeina, presente nel frutto nella sua forma glicosilata
- ✓ L'idrolisi enzimatica dell'oleuropeina, effettuata dal microbiota con β -glicosidasi e l'attività dell'esterasi [10, 11].

Inoltre, caratteristiche quali sapore e aroma sono notevolmente migliorate dal processo di fermentazione. La conservazione del prodotto durante il trattamento è dovuta allo sviluppo di acidità, ad una conseguente diminuzione del pH e alla attività batteriostatica del cloruro di sodio (cioè diminuzione del aw – activity water, con aumento della pressione osmotica). All'inizio della fermentazione, si potrebbe avere

deterioramento o addirittura sviluppo di specie patogene, che di solito soccombono rapidamente a lieviti e LAB (batteri lattici), essendo queste più sensibili alla concentrazione di sale e alla acidificazione della salamoia. La crescita dei LAB nelle olive fermentate naturalmente dipende in gran parte dalle condizioni di lavorazione [12]. I lieviti possono esercitare sia un ruolo positivo che negativo, a seconda delle specie coinvolte [13].

Uno dei principali svantaggi della fermentazione spontanea è il tempo di lavorazione lento, legato al processo di deamarizzazione, come di solito osservato nelle produzioni tradizionali di Tonda di Cagliari, può durare fino a 12/14 mesi. Allo stato attuale, vi è un interesse crescente per lo sviluppo di colture starter con caratteristiche desiderabili. Questo argomento è stato recentemente trattato da Corsetti, et al. [14].

Negli studi citati, sono stati utilizzati singoli o doppi ceppi per le colture starter, mentre non sono segnalati esempi sull'uso di mix di colture complesse di LAB, nello stesso starter. Tuttavia, l'esperienza ha dimostrato che lo slopping-back (cioè inoculazione della materia prima con una piccola quantità di un lotto precedentemente fermentato con successo) accelera la fase iniziale della fermentazione, con conseguente promozione dei cambiamenti desiderabili durante tutto il processo. Il risultato è un processo complesso più prevedibile e un prodotto con caratteristiche migliorate [14].

Questa strategia potrebbe essere ancora migliorata con successo e attuata, selezionando lattobacilli mesofili autoctoni presenti durante il processo di fermentazione e aggiungendoli alle popolazioni indigene. In questo modo, il numero

iniziale di microrganismi desiderati può essere aumentato, garantendo un processo più affidabile e più veloce di fermentazione spontanea [15]. La selezione dell'inoculo arricchito (SIE) rappresenta un passo avanti nell'uso di LAB starter nella trasformazione delle olive da tavola su scala industriale. Un complesso di isolati autoctoni, provenienti dal successo di fermentazioni spontanee sono stati sottoposti a una selezione naturale. Pertanto, risultano essere più adatti alle condizioni specifiche durante la fermentazione della salamoia (pH), aw, concentrazione di nutrienti e di composti antimicrobici, temperatura, microflora competitiva [15]. Lo scopo di questa sperimentazione è stato quello di valutare le prestazioni tecnologiche, durante la lavorazione delle olive da tavola, di due colture starter: uno starter con un unico ceppo LAB (SSL) e selezionando un inoculo arricchito (SIE), costituito da un numero indefinito di ceppi, come controllo è stata presa la fermentazione naturale (NF). Il profilo di fermentazione è stato tracciato monitorando la conta microbica, il pH, l'acidità titolabile e lo sviluppo di acidità volatile. Il profilo fenolico, la capacità antiossidante, analisi strumentali della struttura e valutazioni sensoriali sono state effettuate per definire l'impatto delle tecnologie impiegate sulle caratteristiche qualitative durante la lavorazione e nei prodotti finali.

1.2.2. Materiali e metodi

Campioni

Le olive della varietà Tonda di Cagliari provenienti da un oliveto soggetto ad irrigazione, nel sud della Sardegna (Italia), sono state raccolte meccanicamente, nell'ultima decade di ottobre 2013, nella fase di maturazione verde-giallo. I frutti sono stati selezionati scartando quelli difettosi, calibrati (diametro frutta 17-20 mm), accuratamente lavati in acqua di rubinetto, sotto continua agitazione, e messi a gocciolare per rimuovere l'acqua, quindi trasferiti al laboratorio. Le olive sono state collocate in vasche di plastica igienizzate che avevano una capacità di 60 kg di olive e 40 L di salamoia (7% di NaCl, mantenuta costante durante tutto il processo).

È stato utilizzato un disegno sperimentale con 3 repliche e 3 ripetizioni. Sono state valutate tre differenti condizioni di fermentazione:

- ✓ 3 vasche sono state inoculate con un unico ceppo di *Lactobacillus plantarum* (SSL);
- ✓ 3 vasche inoculate con un mix di culture indefinite di ceppi di *Lactobacillus pentosus* (SIE), isolato da precedenti fermentazioni avvenute con successo;
- ✓ 3 vasche con fermentazione naturale (NF), come controllo.

Successivamente, le vasche sperimentali sono state trasferite in una camera climatizzata. La temperatura è stata fissata a 27°C fino a raggiungimento di valori di pH stabili, per tutti i lotti, successivamente la temperatura è stata impostata a 24°C e mantenuta costante per il resto dell'esperimento.

Origine delle colture starter e preparazione degli inoculi

La coltura starter SSL, costituita da un unico ceppo appartenente alla specie *Lb. plantarum*, Cocolin et al.[17], è stato fornito dall'Università di Torino.

La coltura starter SIE (una miscela indefinita di ceppi appartenenti alla specie *Lb. pentosus*) è stata ottenuta inoculando in terreno liquido FH medium [18] tutte le colonie cresciute su FH agar, seminato per effettuare i conteggi dei lattobacilli mesofili formati da precedenti fermentazioni naturali delle olive. Le culture in brodo, così ottenute, sono state concentrate e congelate a -80°C fino al momento dell'uso. Entrambe le colture SSL e SIE congelate sono state riattivate in terreno liquido MRS. Un'aliquota di 0,5 ml di ogni coltura in brodo, cresciuta durante la notte, a 37°C, è stata seminata su piastre con 120 mm di agar MRS, incubate in condizioni anaerobiche, a 37°C, per 24 ore.

Un totale di 45 capsule petri per coltura starter sono state preparate secondo le indicazioni di Cocolin et al.[17]. Le colonie cresciute sono state raccolte lavando la superficie delle piastre con 4 ml di PBS (Soluzione tampone fosfato). Il volume totale raccolto è stato diviso in 3 aliquote da 60 ml da utilizzare per inoculare ciascuna delle 3 vasche.

Analisi fisico-chimiche

Le analisi del pH e dell'acidità titolata (espressa in grammi di acido lattico per 100 ml di salamoia) delle olive in salamoia, sono state effettuate con metodi di laboratorio standard. L'acidità volatile (espressa in grammi di acido lattico per 100 ml di salamoia) è stata effettuata come segue: 10 ml di soluzione salina sono stati messi in un pallone con l'aggiunta di 1 g di acido tartarico. Successivamente, gli acidi volatili sono stati distillati sotto corrente di vapore mediante un apparecchio di distillazione, vaporizzando acqua distillata de-carbonizzata. Il distillato è stato raccolto (250 ml) e titolato con NaOH 0,1N, usando la fenolftaleina come indicatore. Il cloruro di sodio in salamoia è stato determinato secondo il metodo di Mohr, brevemente: 1 ml di soluzione salina è stata diluita con 50 ml di acqua distillata, aggiungendo K_2CrO_4 come indicatore, titolando fino a viraggio del colore con $AgNO_3$ 0,1 N.

Determinazione dei composti fenolici dell'olio d'oliva.

Il contenuto fenolico è stato determinato con la metodica utilizzata precedentemente per l'analisi degli oli d'oliva parzialmente modificata per adeguarla alla matrice nella preparazione del campione. La parte analitica della determinazione dei fenoli non presenta variazioni.

Preparazione del campione

10g di olive omogeneizzate sono state messe in una provetta con tappo a vite, con 20 ml di una soluzione CH_3OH/H_2O (80/20 v/v). Dopo 30 minuti di agitazione, la

soluzione è stata centrifugata a 4000 rpm per 10 minuti. La fase metanolo-acqua (estratto fenolico) è stata raccolta e diluita (1/2).

Test del DPPH

Gli estratti fenolici sono stati ottenuti da 5 g di olive denocciolate. Le olive sono state omogeneizzate, aggiunte a 10 ml di metanolo e vigorosamente agitate per 20 minuti.

Poi, la miscela è stata centrifu

gata a 4000 rpm per 25 minuti. La capacità di radical scavenging - DPPH degli estratti fenolici è stata espressa in Trolox equivalenti (TE), ad esempio mmol TE/kg, e quantificato contro una curva di calibrazione di Trolox ($r = 0.99$).

Analisi microbiologiche

Sono stati raccolti campioni di salamoia non inoculate, preparate appropriate diluizioni in base dieci e seminati, in duplicato, su terreno FH agar, incubati a 37°C per 72 ore in anaerobiosi, per l' enumerazione dei lattobacilli mesofili, su MEA agar (Microbiol, Uta Cagliari), incubati a 25°C, in aerobiosi, per lieviti e muffe, su VRBGA (Microbiol), incubate a 37°C per 18 e 24 h, in aerobiosi per Enterobacteriaceae. Inoltre, la concentrazione di lattobacilli mesofili inoculati in salamoia (SSL e SIE) è stata verificata con FH agar. Dopo 1, 3, 7, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 150 giorni di olive in salamoia, 135 g di campioni di olive e 90 ml di salamoia fermentata, tenendo conto delle rapporto olive:salamoia (3:2) nelle vasche sperimentali, sono stati raccolti e omogeneizzati per 10 minuti con un frullatore BagMixer a pala (Interscience

Corporation, Saint Nom, Francia). Le conte microbiche sono state eseguite, in duplicato, su i terreni di crescita sopra citati. Le analisi sono state effettuate su 3 vasche per ogni prova sperimentale (SSL, SIE e NF) e espressi come media CFU/ml.

Analisi della struttura

Le analisi della struttura (TPA) sono state effettuate con un analizzatore di struttura TA-XTplus (Stable Microsystems, Surrey, UK), collegati con una cella di carico di 30kg. È stato utilizzato il software Exponent (vers. 6.1.3.0) per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati delle strutture. La TPA è stata condotta su 15 frutti per ogni replica (45 frutti per ogni condizione di fermentazione). Il lato longitudinale delle olive è stato compresso del 15% con un cilindro di alluminio P/40. La velocità di prova è stato fissato a 1mm/s, il tempo tra le compressioni è stato di 2s, forza grilletto 0,05N. Il software ha calcolato i seguenti parametri: durezza, adesività, coesione, gommosità, masticabilità ed elasticità secondo Szczesniak [19] e Friedman et al. [20].

Analisi sensoriali

Le analisi sensoriali sono state eseguite secondo *Quantitative Descriptive Analysis* [21], usando 8 degustatori formati appositamente [22]. La formazione consisteva in una preparazione teorica, esercizi di valutazione sensoriale generale e descrizione di attributi sensoriali delle olive da tavola naturali [16]. I degustatori sono stati addestrati a riconoscere il descrittore amaro, utilizzando degli standard di riferimento (soluzioni acquose di caffeina), per riuscire a identificare le sensazioni in una scala non

strutturata di 10 cm, per la cui tarature sono state utilizzate anche le olive commerciali e la pasta di olive. I campioni sono stati preparati e serviti secondo il metodo IOC per l'analisi sensoriale delle olive da tavola [23]. I campioni sono stati presentati in un ordine casuale e valutati dal QDA tre volte (ripetizioni), per un massimo di due sessioni con due campioni ciascuno al giorno. Per stabilire il raggiungimento di un livello di amarezza commerciale, i campioni sono stati valutati dal degustatore insieme con standard commerciali di polpa di olive della stessa varietà (olive "Tonda di Cagliari" naturalmente trasformate). I campioni sono stati considerati come deamarizzati quando non sono state trovate differenze significative tra campioni sperimentali e commerciali di riferimento.

Analisi statistica

La ripetibilità dei panel sensoriali dei degustatori e la capacità di discriminazione del campione sono stati monitorati con il software *PanelCheck* (<http://www.panelcheck.com>), che ha eseguito la *three way-ANOVA* per ciascun degustatore, campione, effetto del replicato, replica dell'interazione del degustatore e del prodotto replicato. I dati sperimentali sono stati sottoposti ad analisi della varianza e test di Tukey ($P < 0.05$) attraverso il pacchetto software Minitab® (versione 17.1.0, Minitab Inc., Coventry, Regno Unito), al fine di stabilire eventuali differenze statistiche tra prove SSL, SIE e NF.

1.2.3. Risultati e Discussione

Analisi fisico-chimiche

I campioni SSL e SIE hanno mostrato lievi differenze statistiche per l'acidità titolabile e il pH durante il processo di fermentazione, mentre erano significativamente differenti i campioni NF, che hanno mostrato un alto pH durante l'intero processo di fermentazione (Figura 10.) e valori di acidità titolabile inferiori (Figura 11). Campioni SIE e SSL sono stati sottoposti ad un rapido calo del pH che ha raggiunto valori <4 in 12 giorni, mentre i campioni NF hanno raggiunto pH 4,3 dopo 45 giorni e questi valori sono stati mantenuti costanti fino alla fine delle osservazioni. L'abbassamento di pH <4.0 e l'aumento di acidità sono essenziali per la conservazione del prodotto ed evitare la proliferazione di batteri dannosi [24]. Inoltre, i campioni NF hanno mostrato un alto rapporto tra acidità volatile e titolabile (1,78) alla fine del periodo di campionamento. I dati hanno mostrato che i campioni inoculati con SIE o SSL hanno raggiunto valori di pH di sicurezza in tempi brevi, soprattutto a causa della conversione degli zuccheri in acidi organici. Inoltre, la diffusione di alcuni fenoli acidi e l'idrolisi dell'oleuropeina, con produzione di acido elenolico, può contribuire all'abbassamento del pH e all'aumento dell'acidità titolabile [25]. Tuttavia, l'inoculo starter di LAB, data la stessa quantità di composti nutritivi disponibili per la proliferazione microbica, sembra essere il principale responsabile delle differenze osservate tra i campioni nei parametri fisico-chimici.

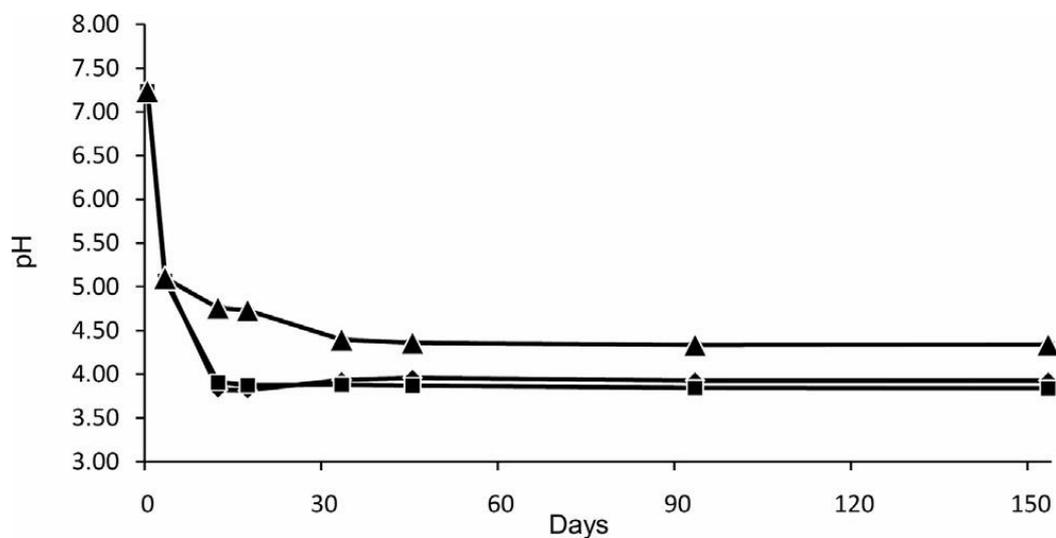


Figura 10. Evoluzione del pH durante la fermentazione. Gli intervalli di confidenza sono mostrati come barre verticali (n = 3, P = 0,05). SIE(quadrato); SSL(rombo);NF(triangolo).

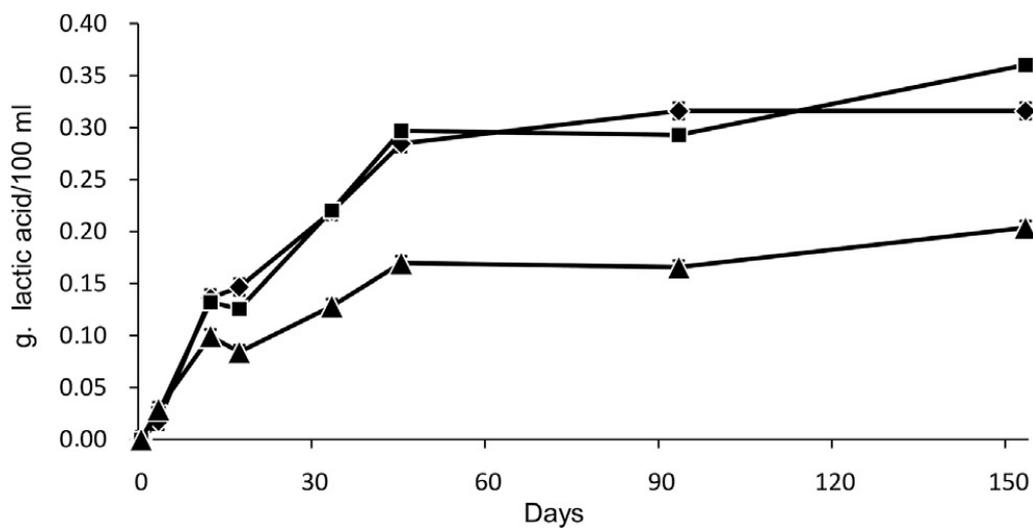


Figura 11. Evoluzione dell'acidità titolata durante la fermentazione. Gli intervalli di confidenza sono mostrati come barre verticali (n = 3, P = 0,05). SIE(quadrato); SSL(rombo);NF(triangolo).

Evoluzione dei composti fenolici

Secondo la Tabella 3, le principali classi di composti fenolici presenti nelle olive sono acidi fenolici, alcoli fenolici, flavonoidi e secoiridoidi. L'idrossitirosolo e il tirosolo sono stati i più abbondanti alcoli fenolici nelle olive. Il verbascoside, un derivato dell'acido idrossicinnamico è stato trovato nei campioni, con il flavonoide luteolina-7-glucoside, l'oleuropeina secoiridoidi e il flavone apigenina. Questi risultati sono simili a quelli ottenuti da estratti di altre cultivar di olivo [26]. Pochissimi studi hanno riportato l'evoluzione di composti fenolici presenti negli estratti della polpa durante la lavorazione delle olive da tavola naturale. Cardoso ed i suoi collaboratori [27] hanno quantificato i principali composti fenolici estratti in MeOH dalla polpa dell'oliva, l'idrossitirosolo è risultato essere il più abbondante. Marsilio et al. [28] hanno riferito la composizione fenolica delle olive da tavola di tipo greco della varietà "Ascolana tenera" naturalmente fermentato e inoculato con una coltura starter di *L. plantarum*. L'Oleuropeina e l'idrossitirosolo erano i fenoli più abbondanti nelle olive non lavorate. L'Oleuropeina durante la maturazione e la lavorazione subisce idrolisi e produce diverse semplici molecole come l'idrossitirosolo e oleuropeina aglicone. Le olive hanno mostrato una perdita nel contenuto di fenoli totali durante la fermentazione, a causa della diffusione di questi composti nella salamoia, ma il loro contenuto non è variato in modo significativo tra i campioni durante l'esperimento (Tabella 3). La più alta diminuzione della concentrazione è stata osservata per la luteolina-7-glucoside. D'altra parte, al termine del periodo di campionamento (156 giorni), c'erano differenze

significative per l'idrossitirosolo e l'oleuropeina contenute nei campioni. NF ha mostrato i livelli più bassi di idrossitirosolo e più alti livelli di oleuropeina. Questo potrebbe essere probabilmente a causa del maggior grado di idrolisi enzimatica, effettuata da batteri lattici con β -glicosidasi e dell'attività esterasica, sui campioni SIE e SSL. Questo fatto ha avuto implicazioni nella appetibilità delle olive trasformate, come indicato di seguito nella sezione analisi sensoriale. Inoltre, una maggiore ritenzione di idrossitirosolo nei campioni SIE e SSL è auspicabile poiché questo composto è uno dei principali composti antiossidanti biodisponibili, con attività antiradicalica, presenti nelle olive, come mostrato in vitro ed in vivo[29-31].

Tabella 3. Concentrazione dei polifenoli totali e dei principali composti fenolici individuati negli estratti di polpa.

Estratto polpa di olive	Campioni	Composti fenolici (mg/Kg)							
		Giorni	Fenoli totali	OHTirosolo	Tirosolo	Verbascoside	Luteolina-7 glucoside	Apigenina	Oleuropeina
	non trasformati	0	3611,68	609,28	26,11	57,74	969,65	33,77	218,00
	SSL	23	2411,7a	101,78a	6,52a	20,94a	15,26a	4,65a	22,23a
	SIE		2166,43a	78,36b	4,62b	38,33b	10,29a	3,23ab	45,06b
	NF		2174,53a	61,84c	5,09b	37,00b	25,88b	4,49b	49,63b
	SSL	78	2345,08a	109,11a	8,01a	17,55a	25,04a	4,40a	5,13a
	SIE		1984,71a	91,44ab	5,33ab	35,49a	17,74ab	3,70a	44,10c
	NF		2192,67a	83,87b	5,01b	21,62b	19,45b	4,33a	24,53b
	SSL	107	2434,25a	114,84a	6,31ab	16,78a	22,66a	5,74a	5,94a
	SIE		2177,66a	107,63a	7,20a	25,57ab	23,55b	5,40a	23,02b
	NF		2506,61a	75,75b	4,57b	14,83b	20,65a	3,04b	15,85b
	SSL	156	2408,42a	110,05a	4,99a	12,34a	6,89a	3,76a	2,35a
	SIE		1998,08a	92,61b	8,69b	16,66b	6,89a	5,18a	5,34a
	NF		2158,33a	80,91c	5,58a	3,82c	18,18b	3,96a	18,82b

Lettere diverse al pedice dei valori delle medie ottenuti nel medesimo tempo di campionamento indicano una differenza statisticamente significativa (n = 3, P = 0.05).

Test del DPPH

La capacità antiossidante totale e la sua evoluzione durante i 150 giorni in salamoia è riportata nella Figura 12. La perdita della capacità antiossidante (TEAC) durante la lavorazione delle olive da tavola naturali potrebbe essere parzialmente correlata con la perdita di polifenoli totali [32], anche se gli antiossidanti specifici potrebbero favorire la TEAC negli estratti ottenuti. Il TEAC è stato significativamente superiore negli estratti dei frutti ottenuti da campioni inoculati LAB rispetto a quelli a fermentazione naturale. I campioni SIE hanno mostrato i valori più elevati di TEAC rispetto agli altri campioni. L'attività di *radical scavenging* delle specie chimiche reattive è legata ai composti antiossidanti presenti nell'estratto. Anche se nessuna chiara correlazione è stata trovata tra fenoli totali e TEAC, vale la pena di notare che sia i campioni SIE che i campioni SSL hanno mostrato maggiore quantità di idrossitirosolo durante la lavorazione e al termine della fermentazione, rispetto ai campioni NF. L'idrossitirosolo ha mostrato un ampio spettro di proprietà biologiche a causa della sua forte attività antiossidante e di *radical scavenging* [33]. Owen et al. [34] hanno esaminato il potenziale antiossidante dei fenoli purificati dal pericarpo dell'oliva e hanno scoperto che l'idrossitirosolo era il composto con maggiore attività di *radical scavenging*. La molecola è indicata come uno dei composti più attivi contro il peroxy, altri radicali liberi e i composti reattivi dell'azoto [29] nelle olive. Il maggior contenuto di idrossitirosolo nei campioni inoculati da LAB potrebbe parzialmente spiegare la maggiore capacità antiossidante mostrata dagli estratti ottenuti. Altri fenoli presenti negli estratti potrebbero esercitare attività antiossidante.

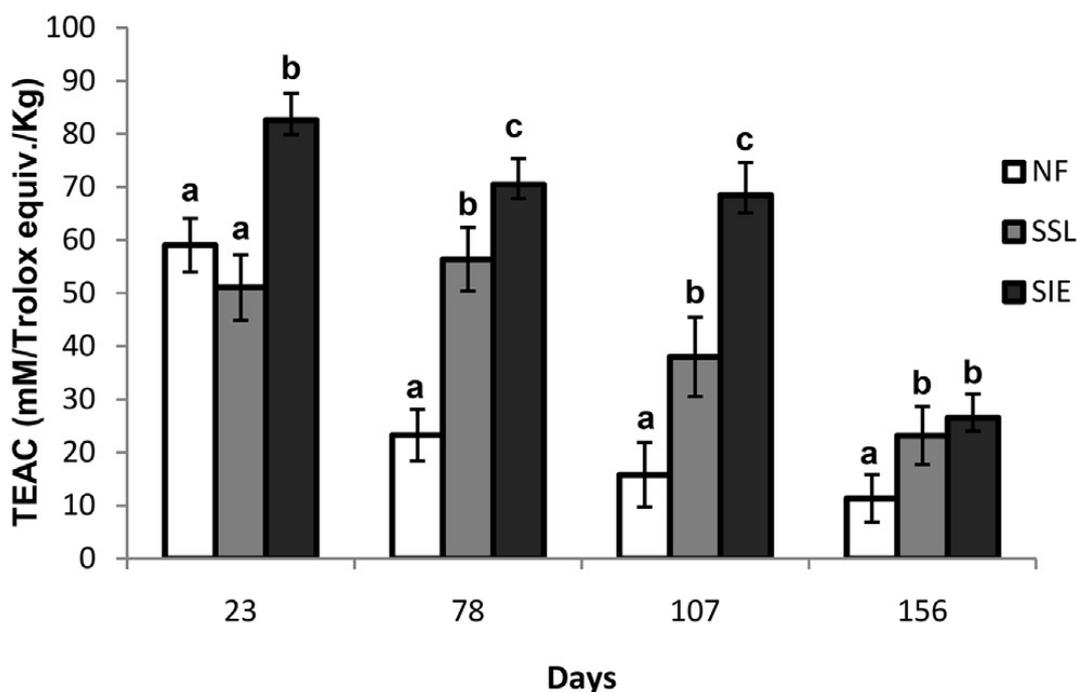


Figura 12. Attività antiossidante espressa in TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) durante il trattamento. Gli intervalli di confidenza sono mostrati come barre verticali. Lettere diverse dei valori delle medie ottenuti nel medesimo tempo di campionamento indicano una differenza statisticamente significativa ($n = 3$, $P = 0.05$). SIE: Grigio scuro; SSL: Grigio; NF: Bianco.

Analisi microbiologiche

Le salamoie non inoculate hanno mostrato un livello molto basso di contaminazione (<100CFU/ml), principalmente lieviti, mentre non sono stati rilevati lattobacilli mesofili e Enterobacteriaceae. Le concentrazioni dei fermenti lattici nelle salamoie SSL e SIE, subito dopo l'inoculo, erano rispettivamente 6,82 e 7,25 log CFU/ml, la conta dei mesofili è diminuita dopo 24 h (4,43 e 5,12 log CFU/ml rispettivamente). I lieviti erano sempre rilevabili durante la fermentazione, anche se il loro numero è diminuito durante i primi 7 giorni della salamoia (da 3 a 1 log CFU/ml), probabilmente a causa della loro difficoltà di adattamento alle condizioni della salamoia. I conteggi dei lieviti non hanno mostrato differenze significative tra i campioni, raggiungendo 5

log CFU/ml a 30 giorni e mantenendo quel livello fino alla fine dell'esperimento. La muffa non è stata rilevata in nessun campione. Durante la fase iniziale della fermentazione, i campioni SIE hanno evidenziato una maggiore quantità di lattobacilli mesofili rispetto ai campioni SSL (Figura 13).

I conteggi medi dei livelli di lattobacilli nei campioni SSL hanno raggiunto lo stesso log CFU/ml dei campioni SIE (6,66 e 6,84, rispettivamente) dopo 15 giorni di fermentazione. Nelle vasche NF, i lattobacilli mesofili non sono stati rilevati fino a 30 giorni (1,65 log CFU / ml) e hanno raggiunto la concentrazione massima (6,05 log CFU / ml) dopo 90 giorni, rimanendo costante fino alla fine dell'esperimento. Gli alti conteggi di lattobacilli mesofili nei campioni SIE durante i primi giorni in salamoia, potrebbe suggerire una maggiore capacità di questo starter ad adattarsi alle condizioni del substrato rispetto allo starter SSL.

Questo potrebbe essere perché SSL è una coltura prodotta da un solo *Lb. plantarum* non indigeno, mentre SIE è un mix di ceppi autoctoni di *Lb. Pentosu*, probabilmente con diverse caratteristiche tecnologiche e fisiologiche, che possono alternarsi nello sviluppo durante la fermentazione.

Inoltre, la coltura starter di SIE ha dimostrato di essere più efficace nel contrastare lo sviluppo di Enterobacteriaceae rispetto a SSL e alla microflora naturalmente presente nelle vasche NF. Enterobacteriaceae non sono stati rilevati in campioni SIE fino al 10° giorno in salamoia, mentre nei campioni SSL e NF non erano rilevabili fino al 30° giorno.

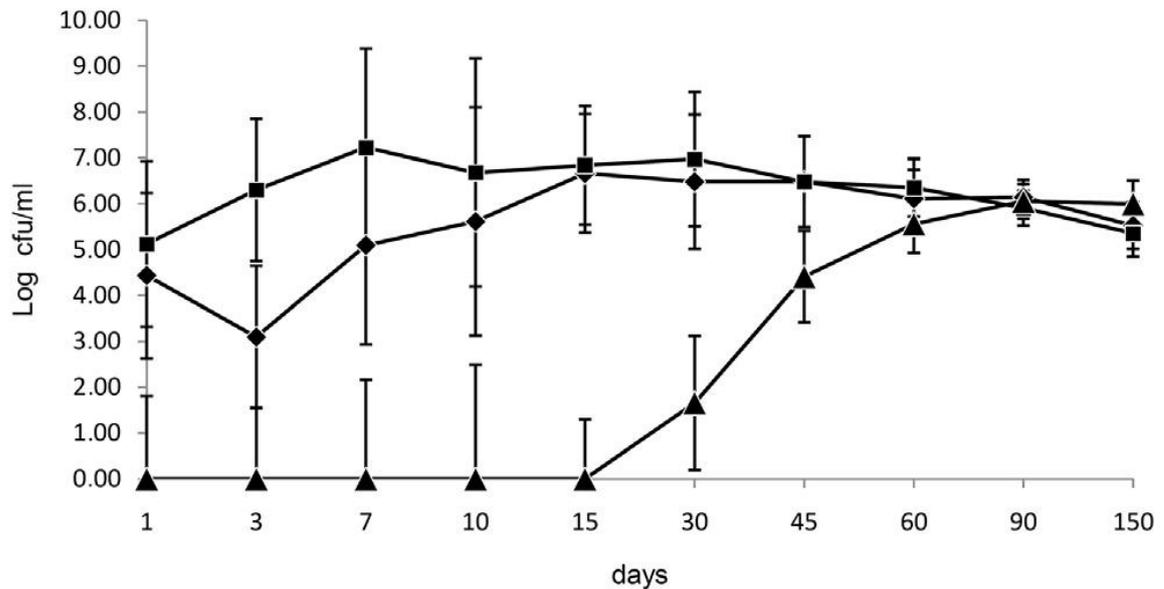


Figura 13. Crescita dei lattobacilli mesofili durante la fermentazione. Gli intervalli di confidenza sono mostrati come barre verticali (n = 3, P = 0,05) SIE(quadrato); SSL(rombo);NF(triangolo).

Analisi della struttura

I risultati del TPA test non hanno mostrato differenze tra i campioni per i parametri di "Durezza" e "adesività" (Tabella 4). L'analisi statistica ha evidenziato un effetto significativo del tempo di conservazione su tutti i parametri TPA, ad eccezione di "adesività" e "resilienza". La "durezza" è stata misurata come la forza massima al primo morso mentre l'"adesività" è stata misurata come il picco negativo registrato alla fine della prima compressione e l'atteggiamento del campione ad aderire alla sonda. I campioni NF hanno mostrato valori significativamente più elevati di "coesione", "Elasticità" e "resilienza" alla fine delle osservazioni, se comparati ai campioni SIE ed SSL. La "Coazione" tiene conto della forza dei legami chimici che compongono la polpa di olive, "elasticità" e "resilienza", spiegano la mantenuta elasticità del prodotto. Tra i campioni inoculati, i campioni SIE hanno mantenuto

l'elasticità più elevata e i campioni di SSL la coesione. Gli stessi risultati sono stati osservati per "gommosità" (il prodotto di "durezza" e "coesione") e "masticabilità" (il prodotto di "gommosità" ed "elasticità"). Fadda et al.[32] hanno riportato una diminuzione della "durezza" durante la salatura di "Tonda di Cagliari ", questo è in accordo con i nostri risultati. Gli stessi autori hanno riportato una diminuzione di elasticità, coesione e dei parametri correlati (masticabilità e gommosità). Modifiche della struttura possono essere attribuite all'idrolisi dei polisaccaridi delle pareti cellulari pectiche [35] e la conseguente perdita di coerenza strutturale dei tessuti durante la salamoia delle olive, come osservato da Servili et al. [36].

Tabella 4. Struttura dei campioni inoculati con SIE e SSL e ottenuti da NF.

Campioni	Giorni	Parametri TPA						
		Durezza(g)	Adesività (g sec)	Elasticità	Coesione	Gommosità	Masticabilità (g/mm)	Resilienza
SSL	23	2397,72a	0,84a	0,52a	0,43a	1034,48a	541,39a	0,23a
SIE	23	2321,27a	0,60a	0,57b	0,48b	1110,99ab	629,58b	0,26b
NF	23	2292,31a	0,39a	0,61c	0,53c	1215,94b	737,38c	0,29c
SSL	78	2136,20a	0,67a	0,55a	0,462a	988,16a	550,69a	0,24a
SIE	78	2027,41a	0,33a	0,57a	0,49b	990,43a	577,31a	0,26a
NF	78	2009,42a	0,52a	0,64b	0,58c	1150,62b	722,61b	0,32b
SSL	107	2294,01a	0,65a	0,58b	0,45a	1027,10a	593,86a	0,24a
SIE	107	2441,42a	0,81a	0,63a	0,51b	1227,12a	778,28a	0,28a
NF	107	2467,26a	0,51a	0,64a	0,54c	1316,85b	840,22b	0,29b
SSL	156	2046,75a	0,43a	0,56a	0,45a	918,7a	511,85a	0,24a
SIE	156	2057,8a	0,43a	0,58a	0,49b	998,26ab	589,49ab	0,26b
NF	156	2009,45a	0,57a	0,60b	0,55c	1100,44c	665,14b	0,30c

Lettere diverse al pedice dei valori delle medie ottenuti nel medesimo tempo di campionamento indicano una differenza statisticamente significativa (n = 3, P = 0.05).

Analisi sensoriali

I campioni SSL e SIE sono risultati deamarizzati (cioè non sono risultati significativamente diversi dai campioni commerciali deamarizzati) alla fine del periodo di campionamento (156 giorni), mentre i campioni NF hanno mantenuto un

più alto grado di amaro, risultando significativamente diversi dallo standard commerciale ($P < 0,05$).

I campioni NF sono risultati deamarizzati dopo 12 mesi. Le differenze tra i campioni possono essere spiegate dall'attività della β -glicosidasi e dall'esterasi dei batteri inoculati. Come mostrato da analisi microbiologiche, i batteri inoculati hanno rapidamente colonizzato il substrato, diventando il gruppo batterico predominante, metabolizzando i carboidrati disponibili, con un abbassamento del pH e degradando l'oleuropeina ad idrossitirosolo e altri prodotti. I campioni NF hanno mostrato un numero molto basso di LAB a 30 giorni, con conseguente basso sviluppo dell'acidità. Come risultato, i campioni hanno conservato quantità elevate di oleuropeina, come affermato dalle analisi all'HPLC, rispetto ad i campioni inoculati, risultando più amari alla fine del processo di fermentazione e prolungando così il tempo di elaborazione.

1.2.4. Conclusioni

Il *Lb. plantarum* starter (SSL) e la coltura mista del ceppo *Lb. pentosus* (SIE) sono stati utilizzati con successo per guidare il processo di fermentazione delle olive naturali. SIE è risultato più efficiente a soppiantare per deterioramento il microbiota (Enterobacteriaceae) rispetto a SSL e NF. Entrambi gli starter erano in grado di abbassare il pH ai livelli sicurezza in un tempo più breve rispetto a NF che ha guidato una fermentazione portando a più alti livelli di pH finale e bassa acidità titolata. Le olive trattate con colture starter hanno mantenuto una maggiore quantità di idrossitirosolo e una maggiore capacità antiossidante, alla fine del trattamento.

Le analisi della texture hanno mostrato che i campioni NF conservavano una maggiore coesione ed elasticità rispetto ai campioni inoculati. Tuttavia, i campioni SIE hanno mostrato una struttura più soda ed elastica, rispetto alla struttura di SSL. Gli starter microbici sono stati efficienti nella deamarizzazione delle olive in 5 mesi, mentre i campioni NF non erano ancora deamarizzati alla fine il periodo di campionamento. L'applicazione di starter LAB è molto attraente per l'industria, riducendo i costi energetici (ad esempio), i tempi della fermentazione, il rischio di deterioramento, il miglioramento nel controllo del processo, la standardizzazione del prodotto, le caratteristiche di sicurezza e una maggiore conservabilità. Il mercato manca di starter commerciali sviluppati per le olive da tavola naturali. L'uso di colture SIE autoctone potrebbe rappresentare una efficace alternativa ai LAB starter commerciali a livello industriale e potrebbe fornire il materiale di base per la selezione di un complesso microbico di avviamento con caratteristiche tecnologiche positive.

Capitolo 2 Studi sul Microbioma orale

Parte prima: Effetto antimicrobico ed antibiofilm verso i batteri patogeni del cavo orale, di alimenti comuni della dieta Mediterranea

2.1.1. Introduzione

Il corpo umano è caratterizzato dalla presenza di miliardi di microrganismi ed è costantemente esposto ad essi attraverso l'ambiente circostante; la maggior parte non hanno effetti negativi per la salute mentre altri possono provocare danni all'organismo e per questo sono detti patogeni. Nell'uomo ogni organo differisce per caratteristiche fisico-chimiche favorendo alcuni microrganismi rispetto ad altri; ad esempio la pelle favorisce la crescita di batteri gram-positivi come lo *Staphylococcus aureus* mentre nella cavità orale troviamo specie appartenenti al genere *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* ecc. Gli organi in cui si riscontra la maggior presenza dei microrganismi, dunque, sono quelli più esposti all'ambiente esterno come la pelle, il tratto respiratorio ed intestinale e la cavità orale.

Nella bocca si trovano più di 750 specie di batteri, molti sono fondamentali nel mantenimento delle normali funzionalità dei tessuti a cui sono associati, un certo numero di questi sono responsabili di diverse malattie proprie della cavità orale e sistemiche [37].

Nella cavità orale, carie e malattie parodontali sono considerate un grave problema di salute in molti Paesi industrializzati. Secondo una stima dell'OMS [38], in tutto il mondo, il 60-90% dei bambini in età scolare e quasi il 100% degli adulti hanno carie

mentre il 15-20% degli adulti tra i 35 e i 44 anni soffre di parodontopatie che sono legate alla formazione di placca e biofilm dentale. Inoltre tra marzo ed aprile del 2015 si è tenuto il “*Word Congress 2015 — Dental care and oral health for healthy longevity in an aging society*” organizzato dalla *Japan Dental Association* in associazione con il *World Health Organization* per creare un piano d'azione per la promozione, la diagnosi precoce e la prevenzione delle malattie del cavo orale. Molte malattie della bocca sono dovute alla formazione di biofilm e placca sulla superficie dei denti.

Le malattie causate da microrganismi facenti parte del biofilm sono difficili da trattare perché non vengono riconosciuti dal sistema immunitario e dunque sono meno suscettibili agli antimicrobici.

Il biofilm dentale contiene numerosi microrganismi, soprattutto specie batteriche ma anche lieviti, protozoi e virus [39]. Si ha quindi la necessità di individuare sostanze naturali in grado di diminuire l'attività di alcuni batteri dannosi per la salute e che allo stesso tempo non danneggino la normale flora batterica della bocca. Alcuni di questi batteri sono responsabili di infezioni orali e malattie sistemiche, come l'endocardite batterica, la polmonite di aspirazione e l'osteomielite.

Lo scopo di questa ricerca è studiare il rapporto tra alimentazione e modulazione del microbioma orale, ovvero se un'alimentazione equilibrata può contenere i patogeni orali (comunque presenti come commensali) attenuandone i fattori di patogenicità.

In particolare questo studio ha cercato di valutare l'attività antibatterica di estratti naturali presenti in alimenti tipici della dieta Mediterranea, così da sviluppare un

modello sperimentale in grado di determinare quali alimenti, potrebbero essere utilizzati per il loro potere battericida e la capacità di inibire la formazione di biofilm.

Formazione del biofilm sulla placca

Il biofilm è un rivestimento sottile formato da associazioni batteriche e da una matrice amorfa autoprodotta composta da polisaccaridi e proteine. Lo sviluppo dei biofilm avviene in diverse fasi:

- ✓ *Trasporto ed adsorbimento*: inizialmente i batteri vengono trasportati e rimangono sospesi sopra la superficie alla quale andranno ad aderire;
- ✓ *Adesione*: I primi batteri iniziano ad aderire alla superficie che può essere sia di natura abiotica (minerali, resti di organismi morti) che biotica (piante, altri microbi e animali). Questa fase è influenzata dal passaggio dalla forma planctonica a quella sessile, che rappresenta per molti batteri la “*condicio sine qua non*” della patogenicità, caratterizzata dalla produzione di specifiche tossine e dalla refrattarietà agli antimicrobici [40];
- ✓ *Colonizzazione*: in questa fase alla prima colonia si legano altri microrganismi;
- ✓ *Coadesione*: tramite moltiplicazione, nascono altre microcolonie;
- ✓ *Crescita e maturazione*: si viene a creare un sistema di scambio di prodotti metabolici, di fattori di resistenza e virulenza, la placca inizia ad

agire come un organismo unico. Gli anaerobi aumentano ed i batteri sono ora in gran parte protetti da fagociti e da battericidi portati in loco;

- ✓ *Distacco*: alcuni microrganismi si distaccano e vanno ad infettare altri siti [41].

Il biofilm della placca orale è formato da diverse specie batteriche appartenenti ai lactobacilli e agli streptococchi [42] e ciò provoca l'insorgenza delle malattie del cavo orale (dette malattie parodontali).

Grazie a tecniche più sofisticate di microscopia, come la microscopia confocale a scansione laser e la microscopia con eccitazione a due fotoni, è stato possibile l'esame dei biofilm nelle loro condizioni naturali [43].

Recenti studi molecolari sulla formazione di biofilm orale hanno preso in considerazione la formazione di colonie di diverse specie batteriche implicate nella formazione di biofilm sopragengivale e sotto-gengivale [44].

La formazione del biofilm orale avviene attraverso le stesse fasi precedentemente descritte. I denti vengono in contatto con un ambiente liquido salivare in cui si trovano macromolecole di varia natura, detriti organici e batteri.

Si ha da prima l'adesione dei batteri, streptococchi ed actinomiceti (*Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces viscosus*) in grado di riconoscere alcuni recettori, di natura proteica e polisaccaridica, presenti sulla superficie del dente. L'adesione dei batteri sul microambiente dentale è mediata da molecole di superficie dei batteri, in grado di legarsi ad un recettore o ad un substrato, denominate nel loro complesso adesina e

fimbrie (appendici proteiche di 2° tipo che si proiettano al di fuori degli involucri cellulari) e porta alla formazione di un biofilm.

Altre specie batteriche aderiscono alla superficie di questi batteri mediante il meccanismo di co-aggregazione come nel caso del *Fusobacterium nucleatum* il quale è in grado di aderire ad altri batteri sia gram positivi che negativi.

Dopo l'adesione da parte dei primi batteri si ha il processo di moltiplicazione che dipende dalle condizioni fisico-chimiche dell'ambiente, ed ha come fattore limitante i nutrienti; si ha poi formazione di micro-colonie e dunque del biofilm. Con l'estensione delle colonie si viene a formare nelle parti più profonde un ambiente sempre più anossico e povero di nutrienti di origine salivare e alimentare, questo ambiente favorisce l'adesione di altri batteri quali: *Porphyromonas gingivalis* implicato nelle malattie parodontali [45] e del tratto intestinale superiore e nel colon [43], *Capnocytophaga gingivalis* e *Actinomyces israelii* (Figura 14).

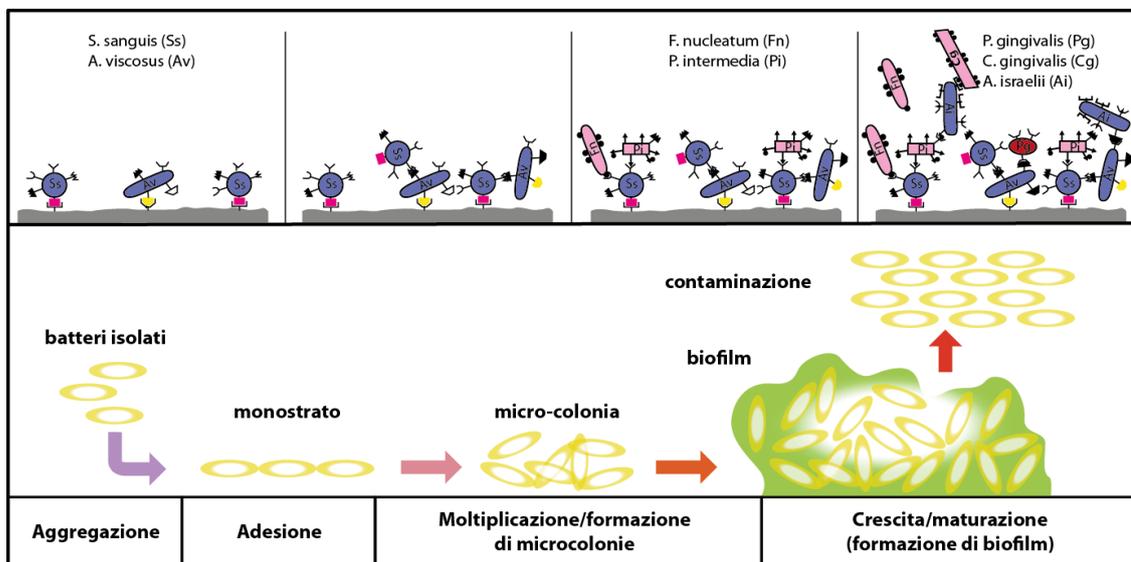


Figura 14. Formazione del biofilm dentale.

Malattie da Biofilm del cavo orale

Un accumulo di biofilm nella cavità orale può portare all'insorgere di diverse patologie:

- ✓ carie,
- ✓ gengivite,
- ✓ parodontite,
- ✓ alitosi e candidosi.

La carie dentaria

La carie è il risultato dell'accumulo di placca dentale e dei prodotti acidi che in essa si formano [46]. È una delle malattie più comuni nella popolazione [47-52] e colpisce principalmente i bambini, infatti, si ha una prevalenza della patologia di circa il 22% all'età di 4 anni e di circa il 44% a 12 anni [53, 54]. La sua formazione porta ad una distruzione localizzata dei tessuti duri del dente ad opera di microrganismi endogeni come *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus spp* [55, 56]; avviene all'interno del biofilm batterico che si forma sulla superficie del dente in prossimità degli interstizi gengivali dove le particelle di cibo possono essere trattenute. I fattori implicati nella formazione della carie sono descritti nel diagramma elaborato da Keyes nel 1962, ritenuti oggi ancora validi (Figura 15).

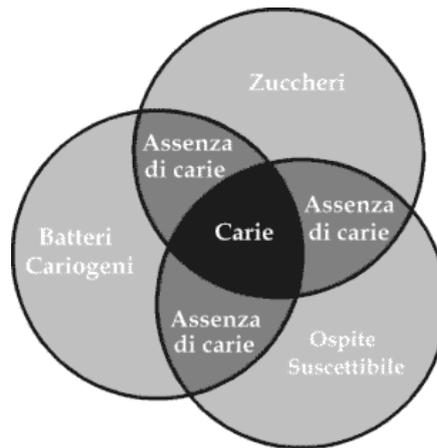


Figura 15. Cariogramma di Keyes

Alitosi

L'*alitosi* viene definita come un odore sgradevole dell'aria emessa dal cavo orale [57]. I principali batteri coinvolti sono Gram-negativi, anaerobi e proteolitici, localizzati in zone prive di ossigeno in cui trovano condizioni favorevoli per la loro proliferazione. Nell'80-90% dei casi sono implicati i batteri che si trovano sul dorso della lingua, i principali sono: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsyntensis*, *Treponema denticola* e *Prevotella intermedia*, sono tutti batteri anaerobi e patogeni parodontali [58]. La sua origine nel' 85-90% dei casi può avere cause extraorali come disordini gastrointestinali del tratto superiore e dell'apparato respiratorio, disfunzioni renali, diabete ecc. [59]. L'*alitosi* è provocata dalla presenza nell'aria espirata di composti volatili con cattivo odore, principalmente solforati (VSC), prodotti nel cavo orale da microrganismi in grado di metabolizzare residui alimentari e cellulari [60-62], in particolare il solfuro di idrogeno (H₂S), il metilmercaptano o metantiolo (CH₃SH), gli acidi grassi a catena alifatica corta come l'acido butirrico, l'acido valerico, l'acido

isovalerico e l'acido propionico ed anche composti diamminici, poliamminici ed indolici come lo scatolo, la metilamina, la putrescina e la cadaverina [60, 61]. L'alitosi può essere classificata in:

Alitosi transitoria: è un disturbo temporaneo, le cause possono essere ricondotte a cattive abitudini alimentari, fumo o disordini ormonali (pubertà, periodo mestruale), digiuno prolungato; in questo caso basta eliminare le cause e l'alitosi scompare.

Alitosi persistente: è causata da malattie sistemiche come reflusso gastroesofageo, gastriti, diabete, insufficienza renale cronica, malattie epatiche, sinusiti, tonsilliti, infezioni orofaringee e le più gravi neoplasie gastroesofagee e laringo-tracheo-polmonari [63].

Alitofobia: detta anche alitosi immaginaria è una condizione psicopatologica in cui il paziente lamenta la presenza persistente di cattivo odore dell'alito, che non è invece rilevata né riferita da altri [62, 64]

Candida

La candidosi è causata da un'infezione batterica ad opera della *Candida albicans*, un fungo normalmente presente nella mucosa del cavo orale. Quando questo fungo prolifera troppo può dare origine a biofilm microbico anomalo. Alcuni trattamenti che potrebbero funzionare molto bene su una singola cellula possono essere dei completi fallimenti contro una popolazione microbica ben radicata come nel biofilm [65].

Malattie Parodontali

Altre malattie del cavo orale sono le malattie parodontali: gengivite e parodontite.

Con il termine di “*malattia parodontale*” ci si riferisce ad un gruppo di condizioni patologiche del parodonto [37], queste sono delle patologie ad eziologia infiammatoria che colpiscono il parodonto superficiale (gengivite) o il parodonto profondo (parodontiti) [66]. Secondo l’OMS, il 70% della popolazione italiana è affetta da una malattia parodontale, da lieve nell’80% dei casi a grave (5-20%).

La gengivite si sviluppa con l’accumulo della placca e colpisce il parodonto più superficiale, è una malattia reversibile in quanto una volta eliminata la placca batterica regredisce fino alla completa ripresa dei tessuti colpiti. La gravità e la durata della gengivite sono implicate a fattori sistemici quali: diabete, scompensi ormonali, oltre a terapie mediche e malnutrizione. Si riconosce un’eziologia multifattoriale soprattutto batterica con l’interazione di tre cofattori principali: suscettibilità dell’ospite, fattori ambientali e comportamentali [67, 68].

La Parodontite, indotta da placca batterica colpisce l’apparato di sostegno del dente (parodonto profondo) e provoca la distruzione irreversibile dei tessuti. In Italia, secondo il Ministero della Salute, si ha un’alta incidenza di malattie parodontali, comprendenti anche la gengivite, avvicinandosi al 60%, di cui una parte notevole (10-14%) nelle forme gravi o avanzate, queste percentuali aumentano drasticamente nelle fasce di età 35-44 anni. La prevenzione della gengivite, pertanto, consente un’efficace opera di prevenzione della parodontite [69].

Dal 1999 l'*American Academy of Periodontology*, ha accettato la classificazione in cronica e aggressiva di questa malattia. Nel 1998 Socransky e colleghi [70] hanno descritto i biofilm orali assegnando loro dei colori in base alla loro composizione, arancione per i complessi costituiti in prevalenza da batteri saprofiti e rosso per quelli formati in prevalenza specie rilevabili nella maggior parte dei casi di malattia grave. I batteri più frequentemente associati alle parodontiti facenti parte della serie rossa di Socransky sono *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e l'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* che è stato isolato nel 97% dei casi di parodontite aggressiva. Il principale fattore responsabile rimane la placca batterica nella quale risiedono microrganismi patogeni anche se non è sempre correlata all'insorgere della parodontite.

La parodontite è una malattia multifattoriale per cui bisogna considerare anche altri fattori quali:

- ✓ *Genetica*: presenza di malattie sistemiche (malattie cardiovascolari, diabete, patologie polmonari, complicanze della gravidanza), immunodeficienze, sindromi;
- ✓ *Abitudini*: igiene orale, fumo, alcol, alimentazione;
- ✓ *Ambiente*: famiglia, educazione, impiego, cultura, fattori socio economici;
- ✓ *Stress*: e problemi psichici influenzano il sistema immunitario (Figura 16).

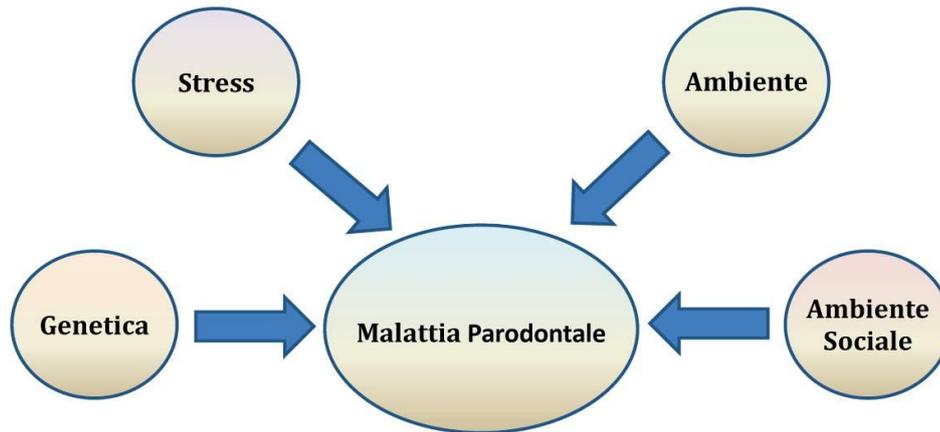


Figura 16. Diagramma dei fattori di rischio della malattia parodontale

La parodontite può essere causa di gravi infezioni sistemiche quali ad esempio ascessi cerebrali [71, 72], infezioni polmonari [73, 74], infezioni cardiache o di protesi endovascolari od ortopediche. Inoltre è stato dimostrato che infezioni derivanti da batteri parodontopatogeni sono in grado di penetrare nei tessuti gengivali e per via ematica o respiratoria, diffondersi ed insediarsi in organi lontani dal cavo orale provocando un' infezione [75].

In relazione al tipo di disturbo o malattia da biofilm si possono usare diversi approcci terapeutici. Primo fra tutti, l'approccio meccanico che, nel caso del biofilm dentale, prevede la rimozione del biofilm con terapie ad ultrasuoni o scaling sottogengivale, mentre per il biofilm linguale è sufficiente effettuare uno spazzolamento.

All'approccio meccanico viene, normalmente, associata una terapia antimicrobica mediante l'utilizzo di sostanze antimicrobiche come collutori e/o antibiotici. Lo scopo della terapia sul biofilm è quella di eliminare i batteri patogeni e le tossine in modo da favorire la formazione di biofilm non patogeno.

Oggi una nuova terapia è quella che vede l'utilizzo dei probiotici, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il termine probiotico è riservato a quei microrganismi che si dimostrano in grado, una volta ingeriti in adeguate quantità, di esercitare funzioni benefiche per l'organismo [77].

2.1.2. Materiali e Metodi

Estratti acquosi

In questa tesi è stato condotto uno studio sulla capacità antimicrobica di alcuni alimenti tipici della dieta Mediterranea quali: aglio (*Allium sativum* L.), cipolla (*Allium cepa* L.) (bianca e rossa), basilico (*Ocimum basilicum*, L.) e prezzemolo (*Petroselinum crispum*, A. W. Hill).

La polpa di ognuno di questi alimenti è stata finemente macinata ed utilizzata per l'estrazione liquido/solido in acqua MilliQ (rapporto di 1:2 peso/volume). Gli estratti così ottenuti sono stati portati a secco mediante evaporazione dell'acqua a 100°C per 24 h così da valutare la concentrazione effettiva degli estratti.

Ceppi microbici utilizzati per la sperimentazione

Sono stati utilizzati ceppi di microorganismi a crescita sia aerobia sia anaerobi facoltativi:

1. *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853, già descritto in letteratura per la sua refrattarietà ai disinfettanti clinici in particolare se i ceppi sono presenti in uno stato di biofilm;
2. *Escherichia coli*: è stato utilizzato il ceppo di collezione ATCC 7075;
3. *Bacillus subtilis*: batterio Gram positivo sporigeno, nonostante non abbia alcuna corrispondenza con infezioni umane tanto meno con quelle odontoiatriche, viene utilizzato da diversi autori perché in grado di formare

endospore che consentono al batterio di resistere a condizioni di vita proibitive [78].

4. *Staphylococcus aureus*: ATCC 6538, responsabile di diverse infezioni suppurative nell'uomo, viene spesso isolato nel cavo orale in portatori di protesi. Per la notevole attività catalasica viene utilizzato da diversi autori come indicatore biologico di resistenza nei composti a base di perossidi [78].
5. *Enterococcus faecalis* in grado di formare biofilm in vitro e resistere a diversi disinfettanti, responsabile di infezioni orali endodontiche [79].

Le prove di sensibilità e la modalità di coltura dei ceppi sono state eseguite secondo le procedure standard del NCLL *Committee for Clinical Laboratory Standards* (<http://www.clsi.org>) e consultando il testo di Koneman del 1996 [80].

Ogni ceppo batterico è stato coltivato su un terreno di crescita specifico (Muller Hinton Agar per i primi quattro ceppi ed Agar sangue Columbia, in CO₂ al 5% per *E. faecalis*) fino alla fase di crescita esponenziale.

Test di Kirby-Bauer

Il test di Kirby-Bauer o metodo di diffusione su agar, è un metodo veloce di screening per valutare l'attività antimicrobica di una sostanza.

In pozzetti con diametro di 80 mm sono stati depositi 50 µl di estratto acquoso, precedentemente sterilizzato per filtrazione con filtro Millipore 0,22 µm (Figura 17).

Dopo incubazione a 37°C per 24 ore sono stati valutati gli aloni di inibizione.

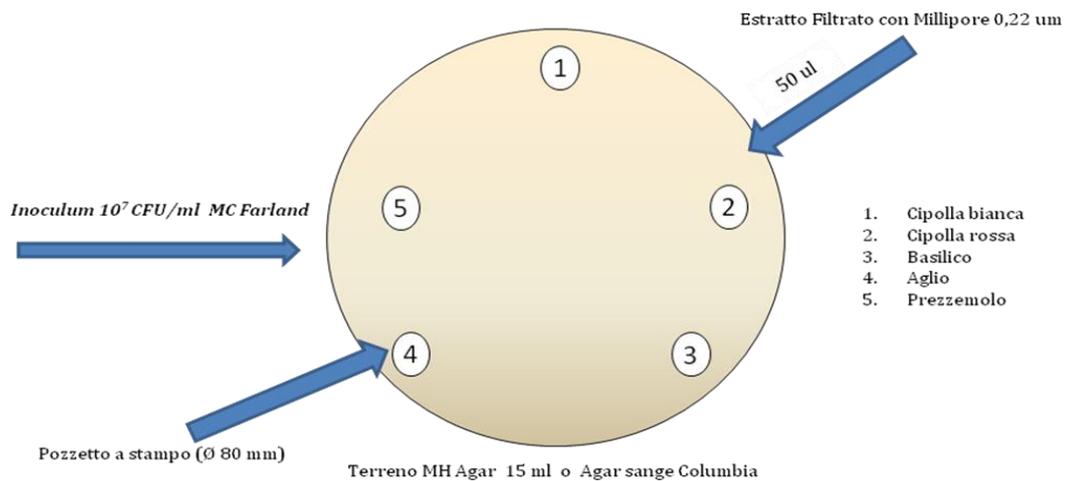


Figura 17. Schema del test di Kirby-Bauer

Misura dell'attività antimicrobica

Per tutti i ceppi citati, sono state saggiate diluzioni scalari degli estratti che hanno presentato attività, su una sospensione batterica con concentrazione pari a 10^6 CFU/ml. Dopo 18 h di incubazione a 37°C , in terreno Muller Hilton Broth è stata valutata la presenza/assenza della crescita microbica sulla base della torbidità/limpidezza del mezzo di crescita.

Mediante questa tecnica, la sensibilità dei microrganismi nei confronti degli estratti naturali è stata espressa come la più alta diluizione (cioè la più bassa concentrazione) della sostanza in grado di inibire completamente la crescita del microrganismo stesso (MIC = minima concentrazione inibente). Dalle sospensioni in cui si è osservata completa inibizione della crescita sono state allestite delle subculture in terreno agarizzato (Muller Hilton agar), per valutare l'eventuale vitalità residua del microrganismo (MBC). Il test è stato svolto in triplo e sono state allestite tante piastre con terreno agarizzato quanti i ceppi da saggiare; ogni piastra è stata suddivisa in un

numero di parti corrispondenti alle diluizioni della MIC in cui l'estratto mostrava attività antibatterica.

Quindi per ciascuna formulazione é stata valutata la concentrazione minima inibente (MIC) e la concentrazione minima battericida (MBC)(Figura 18).

MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) o concentrazione minima inibente: rappresenta la concentrazione minima del preparato (diluizione più elevata) in grado di inibire la crescita batterica.

MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) o concentrazione minima battericida (o CMB in italiano): rappresenta la più bassa concentrazione della formulazione.

Lo schema operativo con il quale si è proceduto alla valutazione della MIC e del MBC è il seguente: una provetta contenente 5 ml di terreno di coltura è stata inoculata con una quantità nota di cellule (10^6 CFU/ml) del microrganismo in esame (*inoculum*).

Successivamente sono state preparate diluizioni 1:100 del terreno liquido con aggiunta dell'*inoculum* precedentemente preparato (es. in 30 ml di terreno sono stati aggiunti 300 µl di sospensione batterica).

Sono state allestite delle diluizioni in terreno nutritivo in micropiastre (piastre multiwells da 24 pozzetti a fondo piatto)(Figura 19), che hanno seguito lo schema di diluizione [$D = 1/10 * 1/2^x$], dove D = diluizione e X rappresenta un numero intero tra 0 e 5. Sono state così ottenute sei diluizioni, per ognuna di queste sono stati preparati tre replicati. Contemporaneamente sono stati eseguiti due controlli, un controllo positivo (CP) contenente il terreno di coltura più il ceppo in modo da valutare la crescita in assenza dell'estratto e un controllo negativo (CN) contenente solo il terreno di coltura

per valutare eventuali contaminazioni presenti sul terreno stesso (Figura 19). L'attività antibatterica è stata stimata dopo 24 e 48 ore di incubazione controllando la crescita batterica visibile (torbidità); l'assenza di torbidità visibile del terreno di coltura indica un'inibizione completa della crescita microbica.

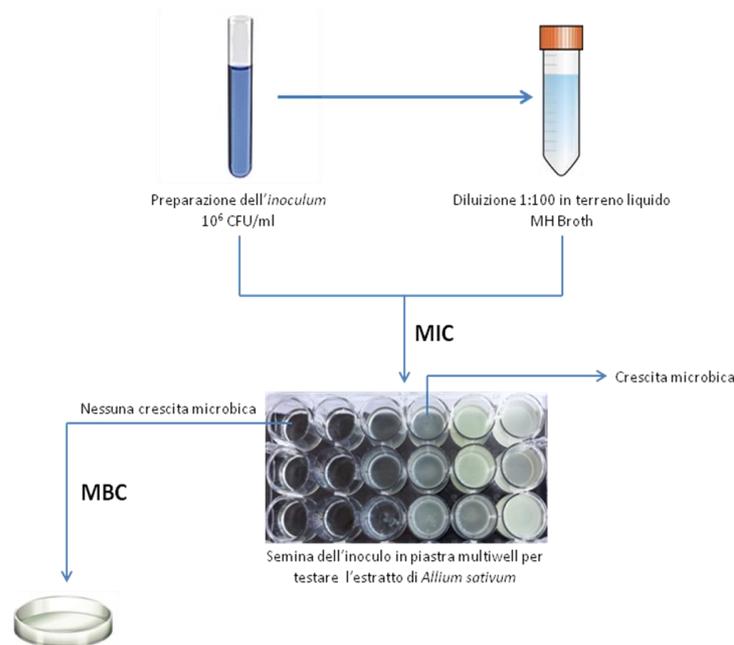


Figura 18. Schema operativo utilizzato per la valutazione della MIC e della MBC degli estratti acquosi di *Allium sativum*.

La MBC, è stata valutata allestendo subculture dalle diluizioni della MIC, che non hanno mostrato crescita o bassa attività batterica, in terreno fresco agarizzato (Figura 18). All'analisi della MIC ha fatto seguito, dopo un'incubazione di una settimana a 37°C , la determinazione della *minimum biofilm inhibit formation concentration* (MBIFC).

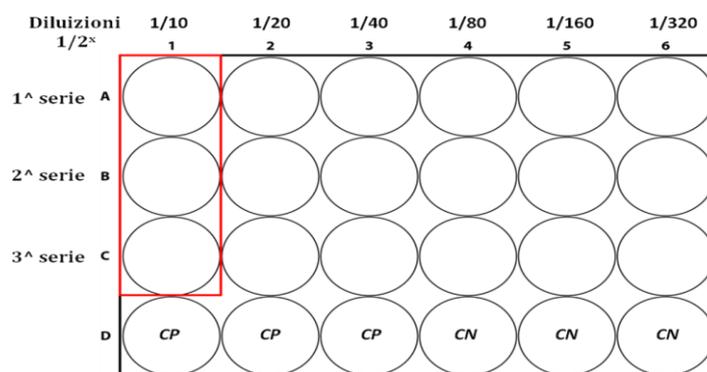


Figura 19. Schema della piastra multiwell da 24pozzetti utilizzata per la valutazione della MIC, CP(controllo positivo); CN(controllo negativo).

Saggio del biofilm

La misura del biofilm si basa sulla capacità dei batteri di riuscire a formare biofilm su superfici solide. In questa tesi si è cercato di valutare l'attività di estratti naturali in acqua su alcuni patogeni.

La **MBIFC** (*Minimum Biofilm inhibit formation Concentration*) rappresenta la più bassa concentrazione di disinfettante (diluizione più elevata) in grado di inibire la strutturazione a biofilm di un microorganismo patogeno [83].

Questi esperimenti sono stati eseguiti su piastre da 24 pozzetti di polistirene a fondo piatto utilizzate per la valutazione della MIC. Le piastre sono state svuotate utilizzando una micropipetta e successivamente risciacquate per tre volte con un 1 ml di soluzione fisiologica al 0,9% NaCl. I batteri aderenti alle superfici delle piastre sono stati incubati per 10 minuti con 1 ml di soluzione allo 0,1% (p/v) di cristal violetto (metilrosanilinio cloruro) per permetterne la colorazione. Dopo un secondo risciacquo eseguito per tre volte con un 1 ml di soluzione fisiologica al 0,9% NaCl è stato, quindi, aggiunto 1 ml di acido acetico glaciale al 30% che ha permesso la risospensione del

colorante adeso al biofilm. Successivamente, 300 μ l delle soluzioni presenti nei pozzetti sono state prelevate e trasferite in una piastra multiwell da 96 pozzetti per l'analisi spettrofotometrica secondo lo schema della Figura 20. L'assorbanza valutata a $\lambda=450\text{nm}$ è direttamente proporzionale al biofilm iniziale.

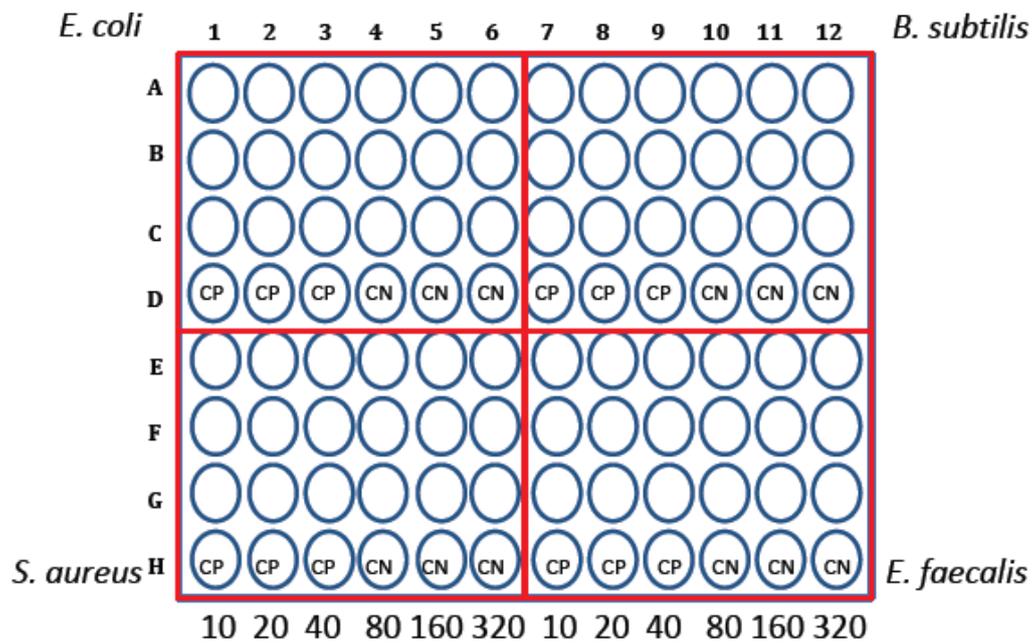


Figura 20. Schema piastra multiwell dopo colorazione biofilm. CN (controllo negativo); CP (controllo positivo).

2.1.3. Risultati e Discussione

Test di Kirby Bauer

Di tutti gli estratti acquosi testati, l'unico ad aver evidenziato una buona attività antibatterica è stato l'aglio mentre gli altri alimenti hanno mostrato aloni di inibizione abbastanza contenuti. Gli esperimenti eseguiti con il test di Kirby Bauer hanno mostrato una buona attività inibente dell'aglio su 4 dei 5 ceppi studiati (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*) (Tabella 5).

Tabella 5. Diametro (mm) d'inibizione nei confronti dei batteri studiati utilizzando il test di Kirby Bauer.

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Allium cepa</i> (bianca)	0	1	0	1	0
<i>Allium cepa</i> [84]	0	1	0	1	0
<i>Ocimum basilicum</i>	0	1	0	3	0
<i>Allium sativum</i>	0	18	19	18	15
<i>Petroselinum crispum</i>	0	2	0	3	0

Questi primi risultati hanno determinato la scelta dell'utilizzo del solo estratto di aglio per i successivi esperimenti.

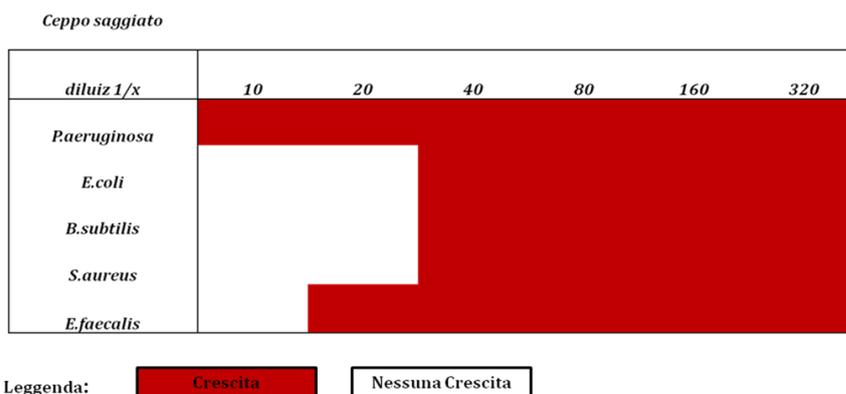
Attività dell'estratto acquoso di Allium sativum in terreno liquido

Valutazione della MIC

I valori medi della MIC dell'aglio, sono stati ottenuti con la metodica già descritta nel capitolo dei materiali e metodi. Dopo 48 ore di incubazione a 37°C, l'estratto di aglio ha mostrato attività antimicrobica verso *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* (MIC di 0,82 mg/ml), *E. faecalis* (MIC di 1,64 mg/ml).

Il test in terreno liquido ha mostrato un profilo di attività per la maggior parte dei ceppi Saggiati, fatta eccezione per la *P. aeruginosa* (Tabella 6).

Tabella 6. Profilo MIC dei 5 ceppi sottoposti a diluizioni con l'estratto di *Allium sativum*.

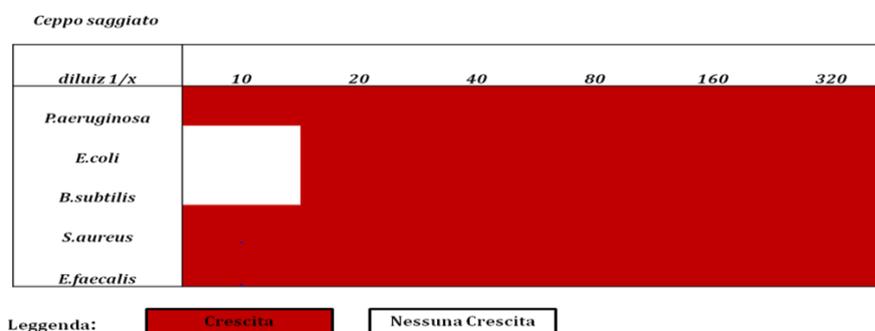


Valutazione della MBC

La MBC, *Minimum Bactericidal Concentration* è stata valutata allestendo delle subculture dalle diluizioni della MIC che non hanno mostrato crescita, in terreno fresco agarizzato.

Valori di MBC di 1/10 (1,64mg/ml) sono stati riscontrati per i ceppi *E. coli* e *B. subtilis*, gli altri organismi saggiati hanno mostrato un potere battericida inferiore a 1/10, come mostrato in Tabella 7.

Tabella 7. Schema del profilo della CMB per i 5 ceppi sottoposti a diluizioni con l'estratto di *Allium sativum*.



Analisi del biofilm

In questa tesi oltre ai parametri che valutano l'attività antibatterica su patogeni in forma sospesa (planctonica), è stata valutata la (MBIFC): *Minimum Biofilm inhibit formation Concentration*. Le piastre multiwell da 24 utilizzate per la valutazione della MIC e della MBC sono state incubate per 7 giorni, per dare il tempo al biofilm di formarsi sul fondo dei pozzetti. Dopo aver svuotato i pozzetti ed effettuato un lavaggio con soluzione fisiologica al 0,9% di NaCl e colorazione con cristal violetto, le sospensioni sono state trasferite in una piastra multiwell da 96 pozzetti (Figura 20). L'analisi dei grafici (Figura 21) ha messo in evidenza un aspetto particolarmente interessante in *E. coli* e *S. aureus*, valori elevati di estratto inducono maggiore biofilm.

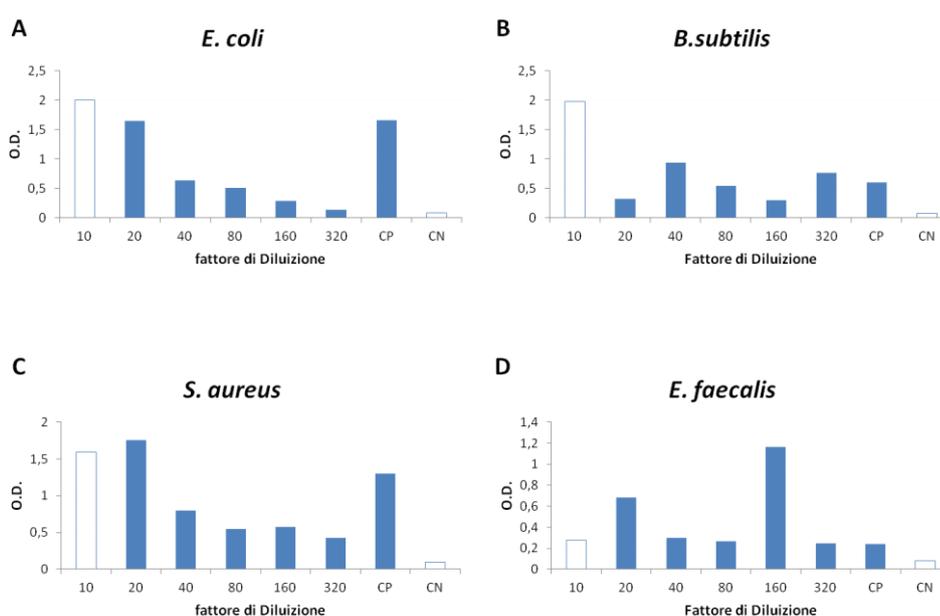


Figura 21. Istogrammi della quantificazione del biofilm in a) *E. coli*, b) *B. subtilis*, c) *S. aureus*, d) *E. faecalis*. O.D. (densità ottica), CP (controllo positivo), CN (controllo negativo).

2.1.4. Conclusioni

Il test in terreno liquido ha mostrato un profilo di attività per la maggior parte dei ceppi saggiati, fatta eccezione per la *P. aeruginosa*.

I risultati ottenuti dal saggio del biofilm hanno mostrato un andamento opposto a quello atteso, infatti ad un aumento dell'estratto è stato osservato un aumento di biofilm. Questo fatto è chiaramente in contrasto con l'azione antimicrobica dell'estratto stesso ma può rappresentare invece un modo diverso di intendere l'effetto antimicrobico. Alcuni patogeni in condizioni normali, hanno un'attività fisiologica essenziale, per esempio la produzione di batteriocine verso altri patogeni o la trasformazione di prodotti alimentari in sostanze digeribili. Lo spostamento commensale-patogeno avviene per squilibrio dell'ospite (es. variazione delle abitudini alimentari, immunodeficienza). Pertanto, gli alimenti da noi studiati potrebbero indurre una maggiore attività nel commensalismo (maggiore biofilm fisiologico) riducendo la patogenicità.

Parte seconda: Studio degli effetti antimicrobici ed antibiofilm degli estratti di Lentinula edodes verso i batteri patogeni del cavo orale.

2.2.1. Introduzione

La relazione tra dieta e salute ha portato alla promozione dei così detti alimenti funzionali che possono migliorare la salute. Alcune pubblicazioni hanno messo in evidenza come alcuni alimenti possano contrastare lo sviluppo di gengiviti e carie usando specie batteriche associate a queste malattie [85].

Un alimento particolarmente interessante per le sue proprietà cliniche è il *Lentinula edodes* (fungo shiitake). Oggi questo fungo é facilmente reperibile sul mercato come integratore in capsule o polvere.

In Italia il decreto ministeriale del 9 luglio 2012 – “Disciplina dell’impiego degli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali” include un elenco di numerosi alimenti che dovrebbero portare benefici alla salute tra cui anche il *Lentinula edodes*.

In questa sperimentazione si è voluto valutare l’attività antibatterica degli estratti acquosi del *Lentinula edodes* verso i batteri responsabili delle malattie del cavo orale, come ad esempio: carie, gengivite, parodontite, alitosi e candidosi che sono tutte legate alla formazione di biofilm. Fino ad oggi sono stati condotti pochi studi sugli effetti che questo fungo può avere sulle principali malattie orali [86-88].

Alimenti funzionali

Il concetto di alimento funzionale ebbe origine in Giappone negli anni '80, le autorità sanitarie di questo Paese riconobbero la necessità di migliorare la qualità della vita a causa dell'incremento nel numero di anziani causato dall'aumento dell'aspettativa di vita, in modo da poter controllare i costi sanitari. In Europa l'interesse intorno agli alimenti funzionali è aumentato in quanto è stata riconosciuta la capacità di alcuni di essi di ridurre il rischio di alcune malattie. In tal senso l'Unione Europea ha realizzato un piano d'azione attraverso la Commissione Europea sulla *Functional Food Science in Europe* [89].

Una caratteristica essenziale è che gli alimenti funzionali devono raggiungere i loro effetti in quantità normalmente consumate in una dieta [90].

In alcune Nazioni, come Stati Uniti e Giappone, esiste una precisa legislazione in materia di etichettatura, infatti in Giappone, ad esempio, gli alimenti funzionali sono riconosciuti e commercializzati con la sigla FOSHU [90] e le proprietà funzionali sono comprovate da indagini scientifiche su la popolazione.

Nell'Unione Europea, non esiste una legislazione armonica sugli health claims, il che significa che vengono regolamentati solo a livello nazionale. La legislazione europea in materia di etichettatura vieta di attribuire a qualsiasi alimento la proprietà di prevenire, trattare o curare una malattia dell'uomo o di fare riferimento a tali proprietà.

Gli Stati membri dell'Unione Europea hanno applicato varie interpretazioni della legislazione esistente in materia di etichettatura. Allo stesso tempo, vi è ampio consenso sul fatto che gli health claims debbano essere correttamente formulati per

tutelare il consumatore, promuovere il commercio e favorire la ricerca accademica e l'innovazione nell'industria alimentare [89]. L' UE sostiene lo sviluppo di due tipi di health claims per gli alimenti funzionali:

TIPO A: claim correlati al “miglioramento di una funzione biologica” in riferimento a specifiche attività fisiologiche, psicologiche e biologiche che vanno oltre il loro ruolo accertato nella crescita, nello sviluppo e in altre normali funzioni dell'organismo.

Questo tipo di dicitura non fa riferimento ad una malattia o ad uno stato patologico, per esempio alcuni oligosaccaridi non digeribili migliorano la crescita di una determinata flora batterica nell'intestino; la caffeina può migliorare l'efficienza cognitiva.

TIPO B: claim correlati alla “riduzione del rischio di malattia” che si riferiscono al consumo di un alimento o di un componente alimentare che potrebbe contribuire alla riduzione del rischio di una data malattia o ad uno stato patologico grazie a specifici nutrienti o non nutrienti in esso contenuti (per esempio il folato può ridurre, in una donna le probabilità di avere un figlio con difetti del midollo spinale e un apporto sufficiente di calcio può contribuire a ridurre il rischio di osteoporosi in età avanzata) [89].

Un alimento funzionale può essere:

- ✓ un alimento a cui è stato aggiunto una componente funzionale;
- ✓ un alimento integro naturale;
- ✓ un alimento da cui è stato eliminato un elemento con metodi tecnologici e biotecnologici

- ✓ un alimento in cui è stata modificata la natura di uno o più componenti, la biodisponibilità di uno o più elementi o una qualsiasi combinazione di queste possibilità [63].

Esempi di alimenti funzionali sono yogurt, aglio, legumi, noci, broccoli e salmone.

Lentinula erodes (Shiitake)

Il *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler 1976, comunemente conosciuto come fungo Shiitake (Basidiomicete appartenente alla famiglia Tricholomataceae) è da sempre utilizzato come alimento in Cina e in Giappone e nella medicina tradizionale soprattutto quella cinese (www.cancer.org). Cresce per lo più in Asia e Australia, prediligendo come substrati tronchi morti di alberi come il *Quercus sp.*, *Caprinus sp.* e il *Castanea sp.*(Figura 22)

Il nome shiitake deriva dall'unione delle due parole giapponesi “Shii” e “take” che significano rispettivamente quercia e fungo.

L'utilizzo dei funghi a scopo terapeutico ha dato origine ad un nuovo ambito di ricerca la micoterapia. Sono però ancora pochi gli studi scientifici che riguardano l'utilizzo dei funghi nell'applicazione clinica e spesso riguardano solo analisi in vitro.

Questo fungo è venduto come integratore da solo o in associazione con i funghi Reishi e Maiatake, è in grado di stimolare il sistema immunitario [91] portando ad un aumento degli anticorpi che agisce da barriera contro infezioni batteriche e virali.

I principi attivi contenuti nel fungo Shiitake sono: Amminoacidi essenziali (Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Trionina, Valina), minerali (in maggioranza potassio, fosforo, calcio e magnesio), vitamine del gruppo B quali Tiamina (vit. B1), Riboflavina (vit. B2), Niacina (vit. B3) e principi attivi che comprendono: la lentinina, responsabile del sapore del fungo, il lentiniano β -D-glucano, un polisaccaride formato da lunghe catene di molecole di glucosio unite tra loro da legami β , tra il C1 e il C3, a questa lunga catena lineare si possono trovare catene laterali con legame β 1,6 o 1,4.

Il fungo Shiitake ha mostrato effetti contro la formazione di carie [88], effetti antigengivite [86] e sulla composizione della placca dentale [87]. In tutti questi studi è stata rilevata la capacità del fungo nel ridurre la formazione di biofilm dentale.



Figura 22. Immagine del *Lentinula edodes* (fungo shiitake)

2.2.2. Materiali e Metodi

Estratti acquosi di Lentinula edodes

È stato utilizzato lo Shiitake essiccato, fornito dalla Miconet (Pavia, <http://www.miconet.it/contatti.html>).

Il micelio di *Lentinula edodes* è stato coltivato in vitro su piastre Petri e successivamente trasferito su un nuovo substrato nutritivo rappresentato da cariossidi di grano precedentemente sterilizzate, detto “spawn”, a 121°C per 30 minuti.

Lo spawn è stato incubato a 25°C per 15 giorni, in modo da permettere al fungo di svilupparsi. Successivamente è stato inoculato in sacchetti termoresistenti contenenti trucioli di faggio e paglia, precedentemente sterilizzati in autoclave a 121°C per 45 minuti. I sacchetti sono stati messi in incubazione ad una temperatura di 25°C fino alla completa colonizzazione da parte del micelio di ogni sacchetto.

La coltura è stata messa in un luogo umido con temperatura compresa tra i 19°C e i 23°C affinché dal micelio si potessero sviluppare gli sporofori, la cui raccolta è stata effettuata manualmente. Gli sporofori sono stati utilizzati per l'estrazione in fase acquosa utilizzando il metodo di estrazione liquido/solido con H₂O MilliQ (rapporto di 1:8 peso/volume). Gli estratti sono stati conservati a -20°C fino all'utilizzo.

Ceppi microbici utilizzati per la sperimentazione

In questo lavoro sono stati utilizzati microrganismi a crescita aerobia o anaerobi facoltativi, isolabili come contaminanti nello studio odontoiatrico o come patogeni orali.

1. *Klebsiella pneumoniae*: rappresenta il principale microorganismo opportunisto responsabile di infezioni nosocomiali e diversi autori riportano biofilm persistenti di *K. pneumoniae* nei sistemi idrici [92]. Per valutare l'effettiva resistenza ai preparati è stato utilizzato un isolato clinico (LIC2).
2. *Candida albicans*: è stato utilizzato un ceppo proveniente dalla collezione American Type Culture Collection ATCC. La *C. albicans* è responsabile di gravi infezioni orali, in particolare nei soggetti anziani o immunodepressi [78].
3. *Streptococcus intermedius*: è stato utilizzato il ceppo di collezione DSMZ 20573 proveniente dalla German Collection of Microorganisms and Cell Culture (DSMZ, <http://www.dsmz.de/>).
4. *Streptococcus salivarius*, ceppo K12. rappresenta un nuovo probiotico orale, il ceppo è stato ottenuto seminando in agar Muller Hinton una capsula di probiotico liofilizzato, Bactoblis®.

Inoltre sono stati testati gli stessi ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*; *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, utilizzati per i test su gli estratti acquosi di aglio.

Sia per la coltura dei ceppi che per le prove di sensibilità sono state utilizzate le procedure standard del NCCL *Committee for Clinical Laboratory Standards* (<http://www.clsi.org>) e quelle riportate da Koneman *et al.*[80].

I ceppi batterici sono stati coltivati su piastra contenente il terreno di coltura adatto, (Mueller Hinton agar) ed incubati a 37°C (*S. intermedius* in CO₂ al 5%) fino alla fase di crescita esponenziale. I ceppi di *Candida spp.* sono stati coltivati su un terreno di coltura per i lieviti Sabouraud agar o Sabouraud Broth, a 37°C in aerobiosi.

Test di Kirby-Bauer

L'attività antimicrobica è stata valutata mediante il test di diffusione su agar di Kirby-Bauer. 50 µl dell'estratto di Shiitake, precedentemente filtrati con Millipore 0,22 µm, sono stati inseriti all'interno di un pozzetto su piastra costituita da terreno agarizzato sul quale è stato posto il batterio (Figura 23). Dopo un'incubazione di 24 ore è stato valutato l'alone di inibizione della crescita batterica. Il terreno di coltura era Agar Muller Hinton per gli schizomiceti e Agar Sabouraud per la candida.

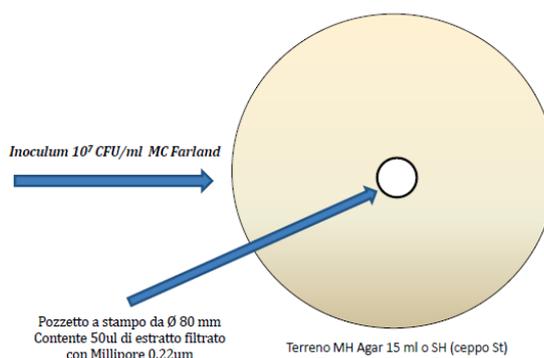


Figura 23. Schema del test di Kirby-Bauer utilizzato per testare gli estratti acquosi di Shiitake.

Misura dell'attività antimicrobica

L'attività antibatterica di ognuno dei ceppi presi in esame è stata valutata in terreno liquido in modo da avere una stima della MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) e della MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*). Per ogni ceppo preso in esame sono stati preparati gli inoculum microbici: sospensione Mc Farland, in MH Broth (batteri 2×10^6 CFU/ml) Sab Broth (miceti 2×10^5 CFU/ml). Il terreno di coltura è stato diluito 1/100 con le sospensioni batteriche, in piastra multiwell da 96 pozzetti sono state eseguite diluizioni seriali con l'estratto di shiitake secondo lo schema di diluizione $[D=1/2^X]$, dove D= diluizione ed X è un numero intero tra 0 e 6.

Sono stati predisposti anche due controlli, uno positivo (CP) contenente il terreno con il ceppo ma non l'estratto acquoso di Shiitake, in modo da valutare la crescita batterica senza l'estratto, ed un controllo negativo (CN) contenente solo il terreno di coltura per valutare eventuali contaminazioni sul terreno stesso. Gli esperimenti sono stati effettuati in doppio (Figura 24). Dopo un'incubazione di 48 h a 37°C, in terreno Muller Hinton Broth, è stata valutata la crescita microbica in base alla torbidità/limpidezza del mezzo di crescita, tramite lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 620 nm (SLT-Spectra II™, SLT Instruments, Germany). Dalle sospensioni che hanno mostrato una completa inibizione della crescita è stata prelevata una aliquota, la quale è stata seminata in terreno agarizzato (Muller Hinton agar, Microbiol, Uta, Cagliari) per valutare l'eventuale vitalità residua del microorganismo (MCB = *Minimum Bactericidal Concentration*).

Per ciascuna formulazione é stata valutata la concentrazione minima inibente (MIC), e la concentrazione minima battericida (MBC). In queste stesse piastre dopo 7 giorni è stata determinata la *Minimum Biofilm inhibit formation Concentration (MBIFC)*

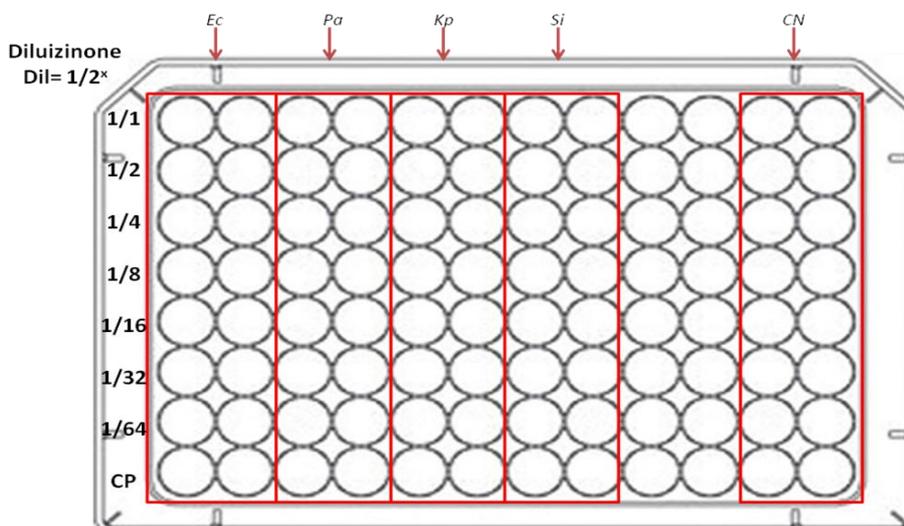


Figura 24. Schema della distribuzione dei ceppi e delle diluizioni dell'estratto nella piastra multiwell da 96 pozzetti. *Ec*(*Escherechia coli*), *Pa*(*P. aeruginosa*), *Kp*(*K. pneumoniae*), *Si*(*S. intermedius*), CN(controllo negativo) CP(controllo positivo).

Saggio del Biofilm

La ***MBIFC*** (*Minimum Biofilm inhibit formation Concentration*) è la più bassa concentrazione di disinfettante (diluizione più elevata) in grado di inibire la strutturazione a biofilm. Le piastre utilizzate per la valutazione della MIC sono state incubate per 7 giorni a 37°C, per permettere ai batteri di formare un biofilm maturo sul fondo del pozzetto, in questo modo è stato possibile valutare il *Minimum Biofilm inhibit formation Concentration (MBIFC)* o biofilm.

La valutazione della MBIFC è stata eseguita utilizzando la metodica precedentemente descritta.

L'analisi del biofilm per *S. intermedius* e *S. salivarius* K12 è stata studiata utilizzando piastre multiwell da 6 pozzetti fondi removibili (vetrino copri-oggetto). (Figura 25).

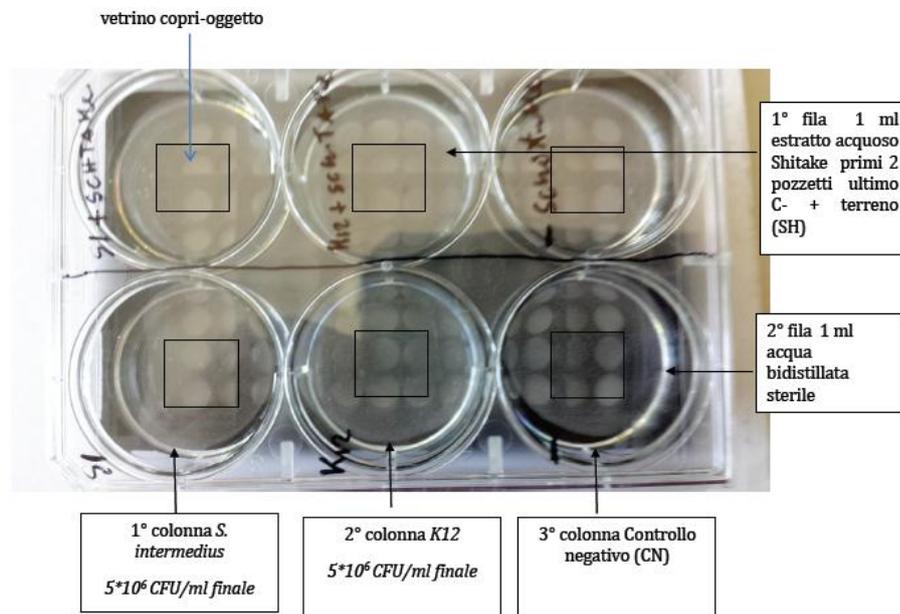


Figura 25. Schema dell'esperimento biofilm piastra a 6 pozzetti.

In tutti i 6 pozzetti sono stati messi 1 ml di terreno HSM (Human Saliva Medium) e 1ml di acqua con glucosio 5 g/L, filtrata con millipore 0,45 μm .

Nei 4 pozzetti delle prime 2 colonne è stato aggiunto l'*inoculum*: 100 μl di SH Broth sterile, titolo finale $5 \cdot 10^6$ CFU/ml, mentre nella 3° colonna (controlli negativi) sono stati posti 100 μl di ciascuna sospensione batterica in SH broth/glicerolo a titolo $1 \cdot 10^8$ CFU/ml.

Nella prima fila è stato aggiunto 1ml dell'estratto acquoso di shiitake filtrato con millipore 0,45 μm , mentre nella seconda fila è stato aggiunto 1 ml di acqua bi-distillata filtrata.

Dopo 24 ore, sono stati prelevati 100 μ l di soluzione da ciascun pozzetto per l'analisi spettrofotometrica in piastre multiwell da 96 secondo lo schema (Figura 26). La misura del biofilm è stata eseguita con lettura allo spettrofotometro a λ 450 nm.

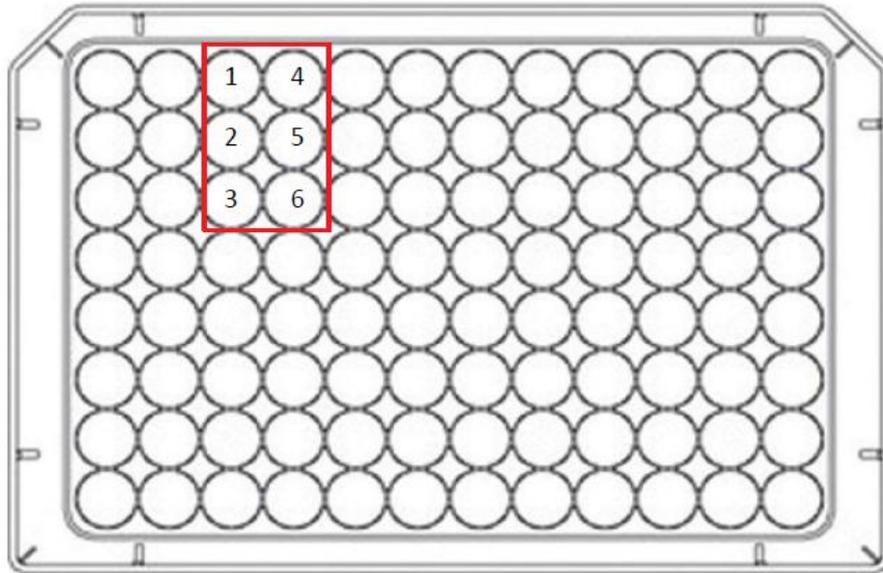


Figura 26. Disposizione dei campioni provenienti dalla piastra a 6 pozzetti nella multiwell da 96. 1) *S. intermedius*/ H_2O , 2) *K12*/ H_2O , 3) *CN*/ H_2O , 4) *S.intemedius*/*Shiitake*, 5) *K12*/*Shiitake*, 6) *CN*/ H_2O .

A fine esperimento è stato possibile effettuare la valutazione della MBIFC mediante colorazione di Gram del biofilm maturo sul fondo del pozzetto trattenuto da un vetrino copri-oggetto messo precedentemente. Gli esperimenti sono stati effettuati in triplo.

2.2.3. Risultati e Discussione

Test di Kirby-Bauer

L'estratto acquoso del fungo Shiitake con il test Kirby-Bauer non ha mostrato una buona attività antibatterica, gli aloni di inibizione quando presenti erano molto ridotti (Figura 27).



Figura 27. Attività dell'estratto acquoso in *Staphylococcus aureus*.

Questo esperimento non ha permesso di capire se le molecole presenti nell'estratto acquoso fossero attive nei confronti dei microorganismi testati oppure se non fossero in grado di muoversi nel terreno di coltura utilizzato nelle piastre. Gli unici microorganismi che mostravano degli aloni di inibizione misurabili erano rappresentati dai batteri Gram positivi *S. aureus* e *B. subtilis*.

Attività dell'estratto acquoso di Lentinula edodes in terreno liquido

Valutazione della MIC

Gli esperimenti con il terreno di coltura liquido hanno mostrato attività antimicrobica solo verso *S. aureus* e *B. subtilis*, permettendo di calcolare le MIC alle diluizioni, rispettivamente, di 1/1 (1,39 mg/ml) e 1/2 (0,69 mg/ml) (Tabella 8). L'estratto acquoso di Shiitake non ha presentato attività nei confronti dei batteri Gram negativi studiati, questo è dovuto probabilmente ad una diversa struttura della parete cellulare, infatti la presenza della membrana liposaccaridica potrebbe ostacolare l'ingresso dei composti attivi nel citoplasma batterico. Nonostante questa ipotesi è stata messa in evidenza anche un'attività antibatterica selettiva solo per alcuni batteri Gram positivi, in particolare il ceppo non patogeno *S. salivarius K12* (Gram positivo), utilizzato come probiotico orale, non ha mostrato sensibilità all'estratto di shiitake.

Tabella 8. Profilo delle MIC dei ceppi sottoposti a diverse diluizioni di estratto di *Lentinula edodes*.

Ceppo saggiato

diluiz 1/x	1	2	4	8	16	32	64
<i>Paeruginosa</i>	Crescita						
<i>E.coli</i>	Crescita						
<i>B.subtilis</i>	Crescita						
<i>S.aureus</i>	Crescita						
<i>E.faecalis</i>	Crescita						
<i>S. salivarius K12</i>	Crescita						

Leggenda: Crescita Nessuna Crescita

Valutazione della MBC

La MBC è stata valutata seminando 10 µl delle sospensioni, dalle piastre multiwell da 96, dopo 24 ore a 37°C, in terreno solido (agar Muller Hilton). L'assenza di sviluppo dopo altre 24 ore a 37°C indica un'azione battericida dell'estratto verso il microrganismo in esame. Lo studio della CMB in questo caso non ha mostrato alcuna azione battericida.

Analisi del Biofilm

La massa del biofilm ha mostrato un diverso profilo di attività del fungo a seconda della specie batterica esaminata:

B. subtilis (batterio sporigeno) nonostante mostrasse la MIC più alta non ha evidenziato nessuna sensibilità all'estratto acquoso nella formazione del biofilm. Le spore batteriche prodotte sono con molta probabilità insensibili all'estratto, permettendo lo sviluppo del biofilm in tutti i pozzetti.

Escherechia coli e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativi) mostrano un iniziale aumento di biofilm paragonabile al CP nel test con la più alta concentrazione di estratto acquoso di Shiitake. In tutte le altre diluizioni si è avuto una netta diminuzione della produzione di biofilm per entrambi i batteri. Il comportamento dei due batteri è risultato comunque differente con produzioni di biofilm nettamente minori per la *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 28 e 29). L'andamento mostrato non permette di giungere a delle conclusioni scientificamente valide per questi due batteri, con un'inibizione che lavora in modo inversamente proporzionale alla concentrazione.

Lo *Staphylococcus aureus* (Gram positivo) ha mostrato un andamento dell'inibizione dose dipendente (Figura 30), si può infatti osservare un aumento crescente della massa del biofilm man mano che procede la diluizione del campione. Questo indicherebbe che i principi attivi dell'estratto di Shiitake hanno un differente comportamento tra Gram positivi e Gram negativi.

Lo *S. salivarius* è risultato insensibile all'estratto acquoso.

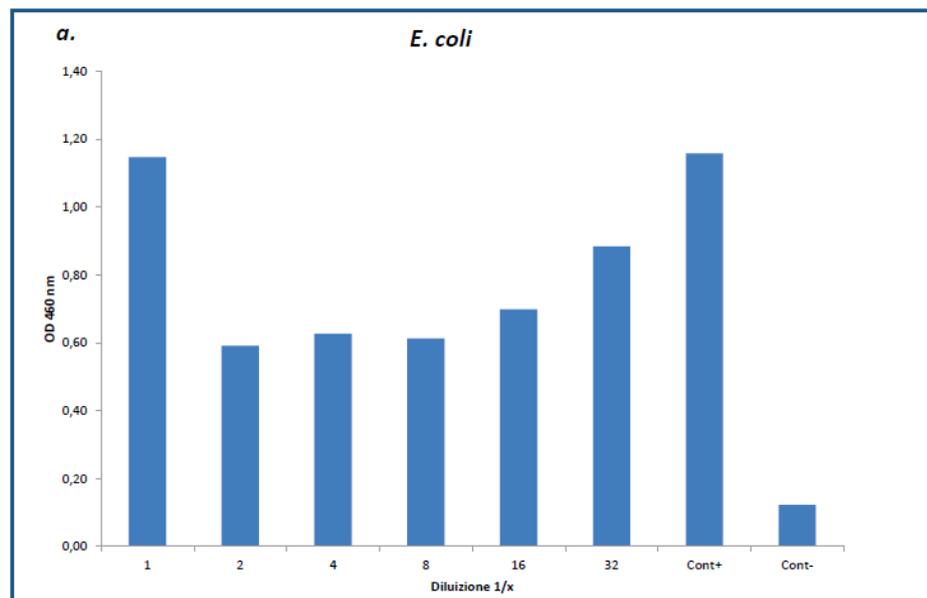


Figura 28. Profilo dell'attività anti-biofilm dell' estratto acquoso di *Lentinula edodes* verso alcuni ceppi Gram positivo.

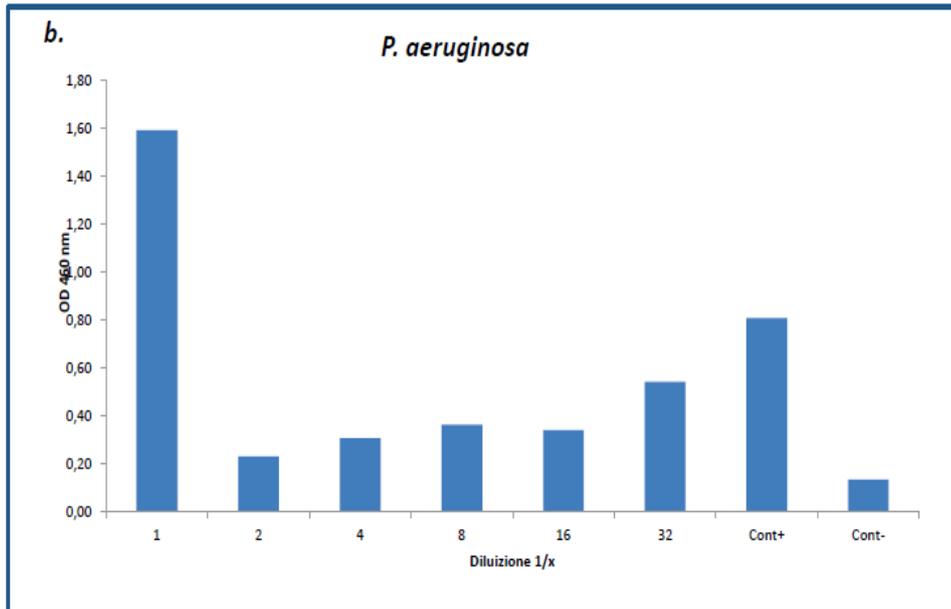


Figura 29. Profilo dell'attività anti-biofilm dell' estratto acquoso di *Lentinula edodes* verso alcuni ceppi Gram positivo.

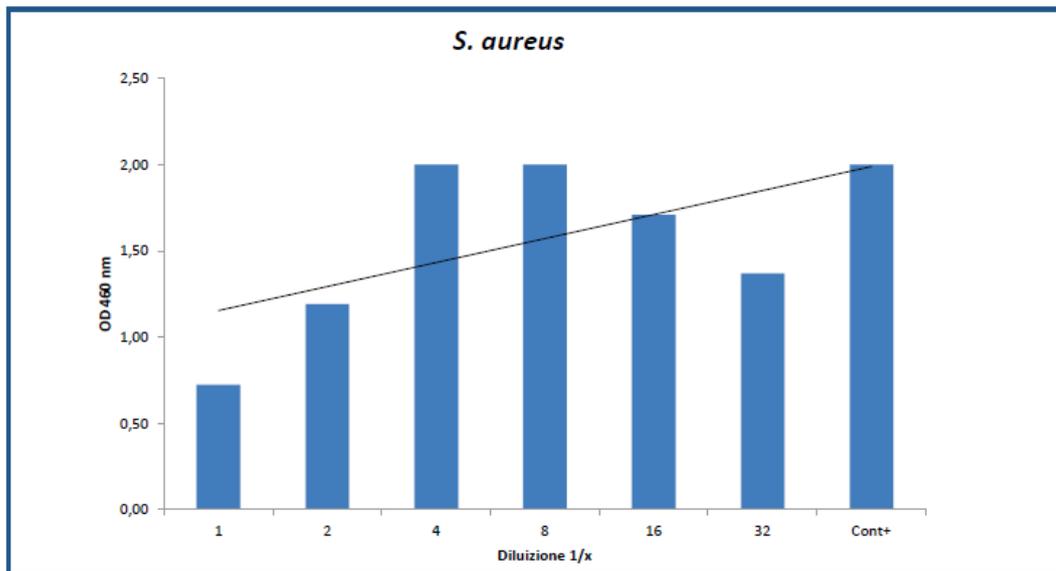


Figura 30 . Profilo dell'attività anti-biofilm dell' estratto acquoso di Shiitake verso *S. aureus*, Gram positivo.

Valutazione del comportamento dell'estratto acquoso di Shiitake nel sistema S. salivarius/S. intermedius

Il *S. salivarius* è un probiotico già in uso nelle patologie orali, il suo utilizzo combinato con estratti di Shiitake potrebbe migliorarne la performance. L'esperimento condotto combinando il probiotico *S. salivarius* ai principi attivi presenti nell'estratto acquoso dello Shiitake confrontati con un esperimento in parallelo con lo *Streptococcus intermedius* (patogeno orale) ha mostrato comportamenti nettamente differenti tra i due ceppi.

Dall'analisi spettrofotometrica della soluzione del biofilm risulta che l'estratto acquoso di Shiitake potenzia il biofilm del probiotico e al contrario inibisce quello del patogeno (Figura 31).

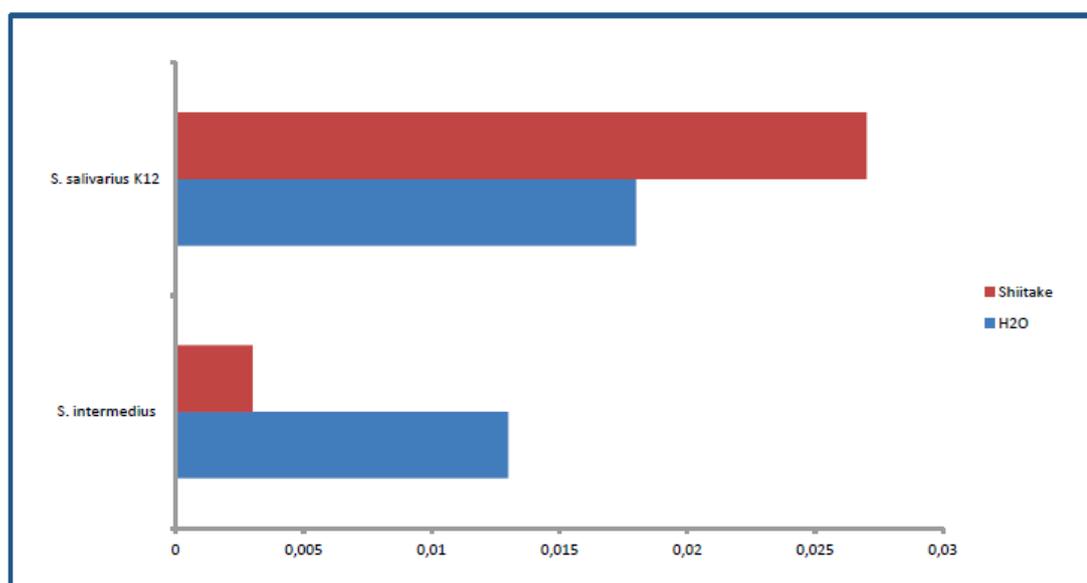


Figura 31. Attività dell'estratto acquoso del fungo Shiitake su due specie di Streptococco (*S.salivarius* e *S. intermedius*), media di tre risultati (dev standard +- 0.005 ABS).

L'osservazione della piastra a 6 pozzetti e dei vetrini copri oggetto posti sul fondo dei pozzetti, conferma una maggiore produzione di biofilm nei campioni di *S. salivarius* (Figure 32 e 33).

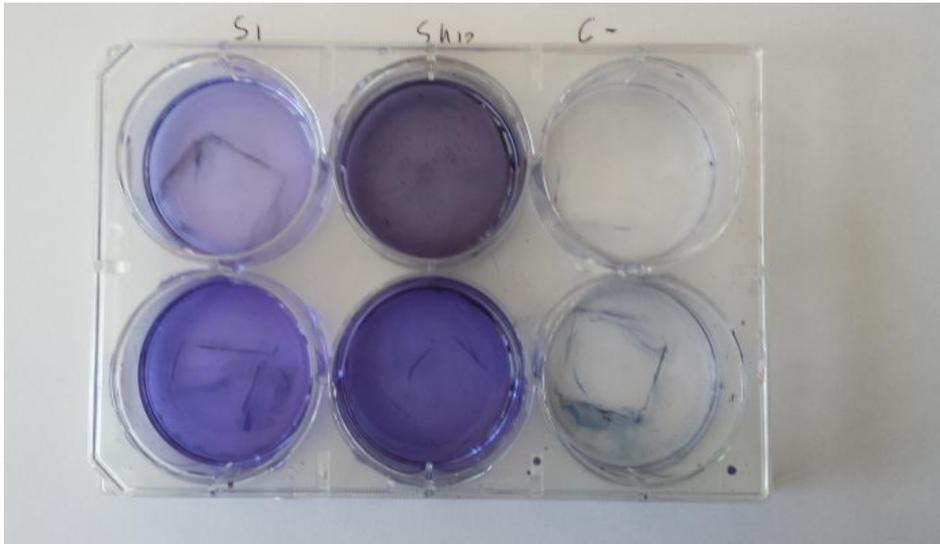


Figura 32. Massa del biofilm degli *Streptococcus spp.*, visione della micropiastra intera

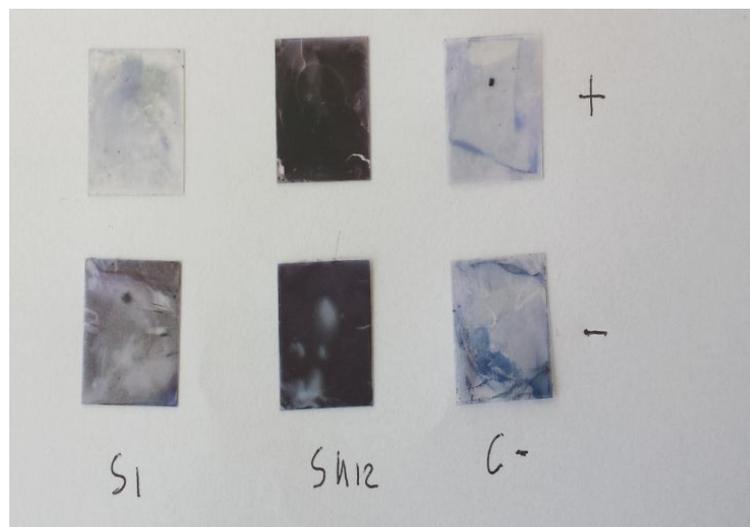


Figura 33. Vetrino copri-oggetto posto sul fondo della piastra dove era presente il biofilm

2.2.4. Conclusioni

L'estratto acquoso di Shiitake non ha mostrato attività antimicrobica rilevante per i ceppi saggiati. Gli esperimenti hanno messo in evidenza un diverso comportamento tra Gram positivi e Gram negativi, mostrando attività antibatterica solo verso alcuni Gram positivi. Questo potrebbe essere spiegato dalla diversa struttura della parete cellulare ed essere legato alla quantità di solvente e ad una parziale insolubilità dei componenti attivi.

Il dato più importante è rappresentato dai valori dell'assorbanza del biofilm su micropiastra. L'estratto acquoso di Shiitake non solo non inibisce ma addirittura potenzia il biofilm del probiotico *S. salivarius* K12, mentre inibisce quello del *S. intermedius*. Questa informazione risulta essere di grande importanza nel momento in cui si vuole intervenire nel trattamento della malattia parodontale. In questa situazione è fondamentale spostare l'equilibrio batterico all'interno del cavo orale, per cui un'azione combinata del probiotico *S. salivarius* K12 con un estratto acquoso o delle compresse solubili orali di *Lentinula edodes* potrebbe portare all'inibizione della produzione di biofilm patogeno e alla formazione di un biofilm positivo. Il fungo *Lentinula edodes* si configura quindi, per quanto detto prima, come un alimento funzionale ossia un alimento in grado di favorire ed aiutare l'organismo a guarire da una determinata patologia.

Bibliografia

1. Trincherò A, R.-E.M.T., Poerio A., Reggiani A., Tosini M.R., and L.G. Tugnoli V., *Alterazioni lipidiche in tessuti renali neoplastici*. Progr. Nutr. , 2003. **5**: p. 221-227.
2. Cercaci L., P.G., Poerio A., Rodríguez-Estrada M.T., Lercker G., *Composition of total sterols (4-desmethyl-sterols) in extravirgin olive oils obtained with different extraction technologies and their influence on the oil oxidative stability*. Food Chem. , (2007). **102** p. 66-76.
3. Martínez-González, M.A., et al., *Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score*. Eur J Nutr, 2002. **41**(4): p. 153-60.
4. W. Brand-Williams, M.E.C., and C. Berset, , *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT-Food Science and Technology, 1995. **28**(1): p. 25-30.
5. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radic Biol Med, 1999. **26**(9-10): p. 1231-7.
6. Pirisi, F.M., et al., *Photolysis of alpha-Tocopherol in Olive Oils and Model Systems*. J Agric Food Chem, 1998. **46**(2): p. 4529-4533.
7. *Trade standard applying to table olives.*, I.O.C. (IOC), Editor. 2004: Madrid, Spain: IOC.

8. Romero-Castro, R., et al., *Refractory bleeding after endoscopic sphincterotomy: a new indication for recombinant factor VII therapy?* Am J Gastroenterol, 2004. **99**(10): p. 2063-5.
9. Medina, E., Gori, C., Servili, M., de Castro, A., Romero, C., & Brenes, M. , *Main variables affecting the lactic acid fermentation of table olives.* International Journal of Food Science & Technology, 2010. **45**: p. 1291-1296.
10. Nychas, G.J., et al., *Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine.* Lett Appl Microbiol, 2002. **34**(3): p. 173-7.
11. Garrido-Fernandez, A., Fernandez Díaz, M. J., & Adams, M. R. , *Table olives: Production and processing.* 1997: London: Chapman & Hall.
12. Abriouel, H., et al., *Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives.* Int J Food Microbiol, 2011. **144**(3): p. 487-96.
13. Arroyo-Lopez, F.N., et al., *Yeasts in table olive processing: desirable or spoilage microorganisms?* Int J Food Microbiol, 2012. **160**(1): p. 42-9.
14. Corsetti, A., et al., *Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies.* Front Microbiol, 2012. **3**: p. 248.
15. Aponte, M., et al., *Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive fermentation.* Food Microbiol, 2012. **30**(1): p. 8-16.
16. Sensoriali., S.a.I.d.S., *Olive da Tavola. In Atlante sensoriale dei prodotti alimentari., in Milano: Tecniche nuove.* 2012.

17. Cocolin, L., et al., *NaOH-debittering induces changes in bacterial ecology during table olives fermentation*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69074.
18. Isolini, D., Grand, M., & Glättli, H. , *Selektivmedien zum Nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen*. Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung, 1990. **19**: p. 57-59.
19. Szczesniak, A.S., *Classification of textural characteristics*. Journal of Food Science, 1963. **28** p. 385-389.
20. Friedman, H.H., Whitney, J. E., & Szczesniak, A. S. , *The texturometer -A new instrument for objective texture measurement*. Journal of Food Science, 1963. **28**: p. 390-396.
21. Lawless, H.T., & Heymann, H. , *Sensory evaluation of food e principles and practices*. 2010, 2nd ed.: New York: Springer (Chapter 10-Descriptive analysis).
22. 8586:2012, I., *Sensory analysis e general guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors* S.I.O.f.S. Geneva, Editor. 2012.
23. (IOC), I.O.C., *Method e Sensory analysis of table olives.*, S.I. Madrid, Editor. 2011.
24. Lanza, B., *Abnormal fermentations in table-olive processing: microbial origin and sensory evaluation*. Front Microbiol, 2013. **4**: p. 91.
25. Kiai, H.H., A, *Chemical composition changes in four green olive cultivars during spontaneous fermentation*. LWT e Food Science and Technology, 2014. **57**: p. 663-670.

26. Silva, S., Gomes, L., Leit~ao, F., Coelho, A. V., & Vilas Boas, L. , *Phenolic compounds and antioxidant activity of Olea europaea L. fruits and leaves*. Food Science and Technology International, 2006. **12(5)**, : p. 385-396.
27. Cardoso, S.M., Guyo, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J. A., Renard, C. M. G. C.,Coimbra, M. A. , *Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry*. . Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005. **85**: p. 21-32.
28. Marsilio, V., Seghetti, L., Iannucci, E., Russi, F., Lanza, B., & Felicioni, M. , *Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (Olea europaea L cv Ascolana tenera) processing*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005. **85** p. 1084-1090.
29. Deiana, M., et al., *Protective effect of hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol on H₂O₂ induced lipid peroxidation in renal tubular epithelial cells*. Food Chem Toxicol, 2008. **46(9)**: p. 2984-90.
30. D'Angelo, S., et al., *Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells*. Free Radic Biol Med, 2005. **38(7)**: p. 908-19.
31. Visioli, F., et al., *Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **278(3)**: p. 797-9.

32. Fadda, C., Del Caro, A., Sanguinetti, A. M., & Piga, A. , *Texture and antioxidant evolution of naturally green table olives as affected by different sodium chloride brine concentrations*. *Grasas y Aceites*, 2014. **65**(1).
33. Fernandez-Bolanos, J.G., Lopez, O., Lopez-García, M. A., & Maset, A. , *Properties of hydroxytyrosol and its derivatives*, ed. I.D.D. Boskou. Vol. Olive oil constituents, quality, health properties and bioconversions 2012: Rijeka: InTech Europe.
34. Owen, R.W., et al., *Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes*. *Food Chem Toxicol*, 2003. **41**(5): p. 703-17.
35. Coimbra, M.A., Waldron, K. W., Delgadillo, I., & Selvendran, R. R. , *Effect of processing on cell wall polysaccharides of green table olives*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996. **44**: p. 2394-2401.
36. Servili, M., et al., *Influence of the decrease in oxygen during malaxation of olive paste on the composition of volatiles and phenolic compounds in virgin olive oil*. *J Agric Food Chem*, 2008. **56**(21): p. 10048-55.
37. Jenkinson, H.F. and R.J. Lamont, *Oral microbial communities in sickness and in health*. *Trends Microbiol*, 2005. **13**(12): p. 589-95.
38. Organization, W.-W.H. *Oral health*. 2012; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/>
39. Wilkins, E., *La pratica clinica dell'igienista dentale*, ed. II. 2010: Piccin.

40. Bortolaia C. and S. L., *I biofilm del cavo orale. Formazione, sviluppo e implicazioni nell'insorgenza delle malattie correlate all'accumulo di placca batterica*, in *Minerva Stomatologica*. 2002 Maggio. p. 187-92.
41. Wolf, H.F., Rateitschak, Klaus H. , *Parodontologia*. 2005: Elsevier – Masson. .
42. Newman, M.G.D., Takei, H., *Carranza's Clinical Periodontology*. 2014.
43. Africa, C.W., J. Nel, and M. Stemmet, *Anaerobes and bacterial vaginosis in pregnancy: virulence factors contributing to vaginal colonisation*. *Int J Environ Res Public Health*, 2014. **11**(7): p. 6979-7000.
44. NIH, N.I.o.D.a.C.R.; Available from: <http://www.nidcr.nih.gov>.
45. Naito, M., et al., *Determination of the genome sequence of Porphyromonas gingivalis strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in P. gingivalis*. *DNA Res*, 2008. **15**(4): p. 215-25.
46. Madigan, M.T.M., J.M. ; Brock, J.P. , *Microbiologia ambientale, biomedica e industriale*. Vol. II. 2003.
47. Tinanoff, N., M.J. Kanellis, and C.M. Vargas, *Current understanding of the epidemiology mechanisms, and prevention of dental caries in preschool children*. *Pediatr Dent*, 2002. **24**(6): p. 543-51.
48. Marthaler, T.M., *Changes in dental caries 1953-2003*. *Caries Res*, 2004. **38**(3): p. 173-81.
49. Whelton, H., *Overview of the impact of changing global patterns of dental caries experience on caries clinical trials*. *J Dent Res*, 2004. **83 Spec No C**: p. C29-34.

50. Hugoson, A., et al., *Oral health of individuals aged 3-80 years in Jonkoping, Sweden during 30 years (1973-2003). II. Review of clinical and radiographic findings.* Swed Dent J, 2005. **29**(4): p. 139-55.
51. Nunn, J.H., *The burden of oral ill health for children.* Arch Dis Child, 2006. **91**(3): p. 251-3.
52. Selwitz, R.H., A.I. Ismail, and N.B. Pitts, *Dental caries.* Lancet, 2007. **369**(9555): p. 51-9.
53. Strohmenger, L.C., G.; Castiglia, P.; Reali, D.; Montagne, M.T.; Minelli, L.; Majori, S.; Cagetti, M.G.; Senna, A.; Pizzocri, J., *Indagine epidemiologica nazionale sulle condizioni dentoparodontali dei bambini di 4 e 12 anni.* Doctor Os., 2006. **17**: p. 853-866.
54. Campus, G., et al., *Changing trend of caries from 1989 to 2004 among 12-year old Sardinian children.* BMC Public Health, 2007. **7**: p. 28.
55. Fejerskov, O., *Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care.* Caries Res, 2004. **38**(3): p. 182-91.
56. Caufield, P.W. and A.L. Griffen, *Dental caries. An infectious and transmissible disease.* Pediatr Clin North Am, 2000. **47**(5): p. 1001-19, v.
57. Armstrong, B.L., M.L. Sensat, and J.L. Stoltenberg, *Halitosis: a review of current literature.* J Dent Hyg, 2010. **84**(2): p. 65-74.
58. Faveri, M., et al., *Microbiota of the dorsum of the tongue after plaque accumulation: an experimental study in humans.* J Periodontol, 2006. **77**(9): p. 1539-46.

59. van den Broek, A.M., L. Feenstra, and C. de Baat, *A review of the current literature on aetiology and measurement methods of halitosis*. J Dent, 2007. **35**(8): p. 627-35.
60. Tonzetich, J., *Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis*. J Periodontol, 1977. **48**(1): p. 13-20.
61. Kleinberg, I., *Oral biology development at Stony Brook and its implications*. N Y State Dent J, 1990. **56**(5): p. 21-3.
62. van Steenberghe, D., *Breath malodor*. Curr Opin Periodontol, 1997. **4**: p. 137-43.
63. Casacca, S., *Utilizzo di estratti di Lentinula edodes (Shiitake), quale modulante nelle infezioni da biofilm nel cavo orale* 2014, Università degli Studi di Cagliari.
64. Eli, I., et al., *The complaint of oral malodor: possible psychopathological aspects*. Psychosom Med, 1996. **58**(2): p. 156-9.
65. Uppuluri, P., A.K. Chaturvedi, and J.L. Lopez-Ribot, *Design of a simple model of Candida albicans biofilms formed under conditions of flow: development, architecture, and drug resistance*. Mycopathologia, 2009. **168**(3): p. 101-9.
66. Caruso, F.C., G. Mazza, C., *Parodontologia*. 2011: Edizioni Martina.
67. Anerud, A., et al., *The natural history of periodontal disease in man. Changes in gingival health and oral hygiene before 40 years of age*. J Periodontal Res, 1979. **14**(6): p. 526-40.

68. Loe, H., et al., *Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age.* J Clin Periodontol, 1986. **13**(5): p. 431-45.
69. Garmyn, P.V.S., D. Quirynen, M. , *Efficacy of plaque control in the maintenance of gingival health: plaque control in primary and secondary prevention.* Lang N.P. Proceeding of the European Workshop on Mechanical Plaque Control. Chicago: Quintessence Publishing. , 1998: p. 107-120.
70. Socransky, S.S., et al., *Microbial complexes in subgingival plaque.* J Clin Periodontol, 1998. **25**(2): p. 134-44.
71. Ewald, C., S. Kuhn, and R. Kalff, *Pyogenic infections of the central nervous system secondary to dental affections--a report of six cases.* Neurosurg Rev, 2006. **29**(2): p. 163-6; discussion 166-7.
72. Marques da Silva, R., et al., *Characterization of Streptococcus constellatus strains recovered from a brain abscess and periodontal pockets in an immunocompromised patient.* J Periodontol, 2004. **75**(12): p. 1720-3.
73. Latronica, R.J. and R. Shukes, *Septic emboli and pulmonary abscess secondary to odontogenic infection.* J Oral Surg, 1973. **31**(11): p. 844-7.
74. De Soyza, A., B. Higgins, and K. Gould, *An unusual case of pulmonary abscess.* J Infect, 2000. **41**(1): p. 114.
75. Sandros, J., et al., *Porphyromonas gingivalis invades human pocket epithelium in vitro.* J Periodontal Res, 1994. **29**(1): p. 62-9.

76. Molecular Ecology Resources Primer Development, C., et al., *Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 October 2012-30 November 2012*. Mol Ecol Resour, 2013. **13**(2): p. 341-3.
77. Salute, M.d. 2013; Available from: http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?id=1426&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=integratori.
78. Orru, G., et al., *Evaluation of antimicrobial-antibiofilm activity of a hydrogen peroxide decontaminating system used in dental unit water lines*. Open Dent J, 2010. **4**: p. 140-6.
79. Denotti G, P.R., Montaldo C, Erriu M, Pilia F, Piras A, et al., *In vitro evaluation of Enterococcus faecalis adhesion on various endodontic medicaments*. . Open Dent J., 2009. **3**: p. 4.
80. Koneman, E.W.A., Janda William, M., *Introduzione alla microbiologia diagnostica*. 1996: Delfino.
81. Cardoso, S.M., et al., *Metabolic control and therapeutic profile of patients with diabetes in Portuguese primary care (TEDDI CP)*. Prim Care Diabetes, 2015. **9**(3): p. 172-8.
82. Gleick, P.H., et al., *Climate change and the integrity of science*. Science, 2010. **328**(5979): p. 689-90.
83. Sepandj, F., et al., *Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis*. Perit Dial Int, 2004. **24**(1): p. 65-7.

84. Airoidi, M., et al., *Serum thyroid hormone changes in head and neck cancer patients treated with microwave hyperthermia on lymph node metastasis*. *Cancer*, 1990. **65**(4): p. 901-7.
85. Spratt, D.A., et al., *Evaluation of plant and fungal extracts for their potential antigingivitis and anticaries activity*. *J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 510198.
86. Ciric, L., et al., *In vitro assessment of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) extract for its antigingivitis activity*. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: p. 507908.
87. Zaura, E., et al., *The effects of fractions from shiitake mushroom on composition and cariogenicity of dental plaque microcosms in an in vitro caries model*. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: p. 135034.
88. Lingstrom, P., et al., *The anticaries effect of a food extract (shiitake) in a short-term clinical study*. *J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 217164.
89. Eufic.org. *Alimenti Funzionali*. Available from: <http://www.eufic.org/article/it/expid/basics-alimenti-funzionali>.
90. Contor, L., *Functional Food Science in Europe*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2001. **11**(4 Suppl): p. 20-3.
91. Yamamoto, Y., et al., *Immunopotentiating activity of the water-soluble lignin rich fraction prepared from LEM--the extract of the solid culture medium of *Lentinus edodes* mycelia*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997. **61**(11): p. 1909-12.
92. Barreto, S., M. Zambrano, and M. Araque, *[Phenotypic variations of susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* strains of nosocomial origin and their association with biofilm formation]*. *Invest Clin*, 2009. **50**(2): p. 221-9.

Desidero ringraziare Prof. Alberto Angioni ed il Prof. Germano Orrù per l'aiuto ed il sostegno datomi durante la stesura della tesi con i loro suggerimenti, critiche ed osservazioni. Ringrazio inoltre la a Prof.ssa Paola Rossi, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Lazzaro Spallanzani" - Università degli Studi di Pavia, senza di lei la parte funghi-batteri non sarebbe stata possibile.

Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia, in particolare a mia madre, mio padre ed a Nicola per la pazienza ed il sostegno morale datomi negli ultimi tre anni. Dedico questa tesi a tutte le persone che hanno creduto in me e mi hanno sostenuta fino alla fine ed anche a coloro che pur non potendo più essere presenti fisicamente so che mi saranno comunque vicine.

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Tossicologia dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2014/2015 - XVIII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".