



Foto di Graniel7

Attualmente si conoscono tre varietà di cacao, leggermente diverse tra loro per il profilo fitochimico.

## **Semi di cacao estratti titolati e cioccolato Comparazione fitochimica e indagini in vitro e in silico della farmacocinetica e del potenziale salutistico**

*Il cacao è un valido alimento salutistico, non solo nella già ben nota forma del cioccolato, ma anche sotto forma di estratto titolato e di materia prima organica, derivati anch'essi presenti sul mercato e utilizzati. La ricerca presentata in questo estratto di tesi conferma che, tra i cioccolati, il fondente ad alta percentuale di pasta di cacao è un ottimo alleato per la nostra salute ed è decisamente migliore rispetto alla materia prima grezza.*

**\* Silvia Pastore**

**S**ulla base dell'elevato contenuto in molecole antiossidanti, negli ultimi anni la ricerca sta approfondendo le proprietà salutistiche del cacao e del suo principale prodotto di lavorazione, il cioccolato, un alimento dal fascino indiscutibile e vera e propria forma d'arte dell'ultimo secolo.

Una vasta letteratura nazionale e internazionale e le ricerche condotte negli ultimi decenni su cacao, cioccolato e salute, hanno portato la comunità scientifica a ritenere questo derivato vegetale un importante complemento alimentare, fonte di bioattivi estremamente interessanti per la salute umana.

La pianta del cacao, appartenente alla famiglia delle Sterculiaceae e al genere *Theobroma*, *Theobroma cacao* L., è un piccolo albero originario dell'America tropicale (Maugini, 1994). La sua coltivazione oggi è diffusa, alle stesse latitudini, anche in altri continenti, primo tra tutti quello africano, di cui soltanto la Costa d'Avorio vanta circa il 40% della produzione mondiale (<http://www.fao.org>).

La pianta, dalle peculiari caratteristiche ornamentali, produce delle infiorescenze e poi dei frutti, chiamati carbosse, direttamen-

te sul tronco e sui rami principali; tali frutti, di un colore che varia dal giallo al bruno-rossiccio, contengono numerosi semi avvolti in una polpa mucillaginosa (da 20 a 60 per ogni carbossa) denominati fave di cacao. La droga di *T. cacao* è costituita dalle fave di cacao opportunamente fatte fermentare ed essiccate; essa, però, non è iscritta nella F.U., dove invece è riportato un altro derivato della pianta, il burro di cacao, usato come eccipiente in farmacia e nei prodotti cosmetici (Ignesti *et.al.*, 1999).

Attualmente si conoscono tre varietà di cacao, leggermente diverse tra loro per il profilo fitochimico e dunque per le caratteristiche organolettiche che sviluppano con la lavorazione: la varietà Criollo, di una qualità eccellente, che costituisce la produzione più pregiata e più limitata, rappresentando soltanto il 3% della produzione mondiale; la Forastero, caratterizzata da un gusto piuttosto amaro e acidulo, che è la varietà più coltivata al mondo (rappresenta l'85% della produzione), ma di gran lunga la meno pregiata; la varietà Trinitario, un ibrido delle due precedenti, che presenta invece caratteristiche organolettiche intermedie e costituisce il 10-15% delle coltivazioni (Cuatrecasas, 1964).

### La lavorazione

Il processo di lavorazione cui vengono sottoposte le carbossa del cacao è piuttosto articolato e si compone di molteplici passaggi che possiamo raggruppare in tre fasi. Nella prima fase di lavorazione, di natura agricola, i passaggi di raccolta, fermentazione, frantumazione ed essiccamento portano all'ottenimento delle fave di cacao essiccate che costituiscono la materia prima grezza; nella seconda, di tipo industriale, la materia prima grezza va incontro ai passaggi di tostatura, macinatura, spremitura e alcalinizzazione, che portano a ottenere i prodotti semi-lavorati costituiti da cacao liquor (altrimenti detto massa o pasta di cacao), burro di cacao e polvere di cacao; nella terza fase, ancora di tipo industriale, i prodotti semi-lavorati precedentemente ottenuti vengono ulteriormente processati e attraverso i passaggi di miscelazione, raffinazione, concaggio, temperaggio e modellaggio si arriva a ottenere il cioccolato, il derivato senz'altro più noto e più apprezzato del cacao, e altri prodotti di confetteria (Ditchfield *et al.*, 2023).

Il processo di lavorazione, costituito per la maggior parte da procedimenti di natura fisica, è importante per la definizione delle caratteristiche organolettiche del cioccolato, dei profumi, degli aromi e dei sapori e per la riduzione dell'amarrezza e dell'astringenza tipiche delle fave grezze, ma, d'altro canto, ha il limite di portare contemporaneamente a una considerevole diminuzione dei principi attivi in esse contenuti (Goya *et. al.*, 2022).

**La composizione chimica**  
Da un punto di vista fitochimico i semi di cacao sono costituiti per una quota che va dal 40 al 50% del loro peso da lipidi: una miscela di gliceridi esterificati con l'acido stearico, oleico, linoleico, palmitico che costituisce il burro di cacao; la frazione proteica rappresenta circa il 20% e quella glucidica dal 10 al 19% del peso della fava fermentata ed essiccata (tra



Con Cistus Incarnus che favorisce la funzionalità delle vie respiratorie

SENZA GLUTINE

20 cps

Peso netto 16,5 g



## Infezioni virali? Riparti veloce e in modo naturale



[www.avdreform.it](http://www.avdreform.it)

Prodotto e distribuito da: A.V.D. Reform Srl, B.go S. Biagio 9 - PARMA tel. 0521 628498



CAMPIONI ANALIZZATI	POLIFENOLI TOTALI
cioccolato al 100% di contenuto di cacao	2 %
ciocc. biologico al 98% di contenuto di cacao	2 %
ciocc. biologico all'85% di contenuto di cacao	2 %
ciocc. all'85% di contenuto di cacao	1 %
ciocc. al 75% di contenuto di cacao	1 %
ciocc. biologico al 70% di contenuto di cacao	2 %
ciocc. al 70% di contenuto di cacao	1 %
ciocc. al 60% di contenuto di cacao	1 %
ciocc. al 50% di contenuto di cacao	1 %
ciocc. Modica artigianale al 50% di cont. di cacao	1 %
fave di cacao intere del Costarica	3 %
granella di cacao del Costarica	4 %
granella di cacao del West Africa	3 %
estratto di cacao tit. 8-10% in polif. e 5% in teobr.	10 %
estratto di cacao tit. all'8-10% in polifenoli	2 %
estratto di cacao tit. al 60% in polifenoli	45 %

Tab. 1 - Contenuto di polifenoli per ciascun campione.

i glucidi presenti troviamo cellulosa, oligo- e polisaccaridi come galattani, pentosani, poligalatturonidi, saccarosio, stachiosio) (Ditchfield *et al.*, 2023).

I principi attivi cui è legata l'attività farmacologica del cacao possono essere suddivisi in due classi principali di molecole: gli alcaloidi e i polifenoli. Del primo gruppo, che costituisce circa il 3% della droga secca, fanno parte gli alcaloidi xantinici, rappresentati principalmente dalla teobromina, gli alcaloidi tetraidroisochinolinici salsolina e salsolinolo, e le tetraidro-*-carboline* (Ditchfield *et al.*, 2023; Cabras *et al.*, 2004).

Del gruppo dei polifenoli (che costituisce il 12-18% della materia prima secca) fanno parte le procianidine (58%), le catechine monomeriche e oligomeriche (37%), le antocianine (glicosidi della cianidina), i flavonoli (glicosidi della quercetina) (4%) e la clovamide e suoi derivati (Bordiga *et al.*, 2015). Completa la composizione fitochimica del cacao una buona pletera di micronutrienti, tra vitamine e sostanze minerali, tra cui spiccano le vit. C, A, E, alcu-

ne del gruppo B, potassio, fosforo, rame, ferro, zinco e magnesio (Montagna *et al.*, 2019).

I due gruppi di polifenoli più rappresentativi nel cacao sono i flavan-3-oli o catechine monomeriche, principalmente (+)-catechina ed (-)-epicatechina, due stereoisomeri della stessa struttura chimica rappresentata dal flavan-3-olo e le procianidine o polifenoli condensati, forme oligomeriche e polimeriche dei flavan-3-oli. A tali principi attivi e in particolare ai flavan-3-oli sono attribuite le attività farmacologiche più studiate del cacao e i molteplici effetti benefici che esso esplica sulla salute umana (Martin and Ramos, 2017).

Una vasta letteratura ha mostrato l'associazione tra il consumo di cacao e il decremento del rischio di numerose patologie grazie alle importanti attività biologiche esplicate da questi principi attivi (antiossidante, antinfiammatoria, di regolazione del metabolismo gluco-lipidico) (Martin and Ramos, 2021). Tra gli effetti farmacologici maggiormente indagati ricordiamo quelli promossi sul sistema cardiovascolare, sul metabolismo glucidico e lipidico, sul microbiota intestinale, sul sistema nervoso centrale, sul sistema immunitario, sul tono dell'umore e i livelli di energia, sulla pelle (Jaramillo-Flores, 2019; Montagna *et al.*, 2019).

Un'attenzione particolare merita il recente studio condotto dal COSMOS Research Group e pubblicato nel 2022, che costituisce il primo trial clinico su vasta scala e a lungo termine che ha voluto testare gli effetti di una somministrazione di un estratto di cacao (contenente 500mg di flavanoli di cui 80mg di (-)-epicatechina) sull'incidenza delle malattie cardiovascolari. Lo studio clinico, svolto su un campione di oltre 21.000 soggetti over 60 per un periodo di 5 anni, ha riportato il significativo risultato di riduzione delle morti per eventi cardio-

vascolari del 27% (Sesso *et al.*, 2022; Rist *et al.*, 2022).

Sulla base di queste recenti acquisizioni e vista la scarsità di dati circa l'effetto matrice dei diversi prodotti a base di cacao, la tesi svolta si è proposta di effettuare inizialmente una comparazione fitochimica su prodotti commerciali di cacao, semi, estratti di semi di cacao e cioccolato a diverso tenore di cacao, poi un approfondimento *in vitro* e *in silico* sulla farmacocinetica dei flavanoli nei diversi prodotti, comprendente digestione simulata mediante protocollo INFOGEST, microfluidica per la simulazione dell'assorbimento intestinale e predizioni di metabolismo mediante tool SwissADME. Il lavoro è stato accompagnato da una comparazione tra l'attività anti-radicalica pre- e post-digestione di cacao semi, estratto di cacao e cioccolato e si è concluso con una valutazione bioinformatica di predizione dei target e dei signalling collegati ai costituenti biodisponibili del cacao e suoi derivati.

I campioni su cui sono state effettuate le analisi sono stati i seguenti.

Dieci tipi di cioccolato a diversa percentuale di pasta di cacao:

- 1) cioccolato al 100% di contenuto di cacao
- 2) cioccolato biologico al 98% di contenuto di cacao
- 3) cioccolato biologico all'85% di contenuto di cacao
- 4) cioccolato all'85% di contenuto di cacao
- 5) cioccolato al 75% di contenuto di cacao
- 6) cioccolato biologico al 70% di contenuto di cacao
- 7) cioccolato al 70% di contenuto di cacao
- 8) cioccolato al 60% di contenuto di cacao
- 9) cioccolato al 50% di contenuto di cacao
- 10) cioccolato di Modica artigianale al 50% di contenuto di cacao.

Tre materie prime grezze:

- 1) fave di cacao intere del Costa-rica
- 2) granella di cacao del Costa-rica
- 3) granella di cacao del West Africa.

Tre estratti secchi titolati:

- 1) estratto di cacao titolato all'8-10% in polifenoli e 5% in teobromina
- 2) estratto di cacao titolato all'8-10% in polifenoli
- 3) estratto di cacao titolato al 60% in polifenoli.

Le analisi fitochimiche svolte nella fase iniziale del lavoro hanno voluto determinare in ciascun campione il contenuto di polifenoli totali e di flavan-3-oli, rispettivamente con il saggio di Folin-Ciocalteu e con il saggio

colorimetrico di una soluzione di vanillina in ambiente acido.

I risultati hanno evidenziato che il tenore dei principi attivi aumenta all'aumentare del contenuto di massa di cacao presente nel campione di cioccolato e subisce un sostanziale decremento dovuto al processo di lavorazione, come emerge dal confronto dei dati relativi alle materie prime grezze e dei cioccolati.

Inoltre è stato possibile notare come il contenuto di attivi risenta presumibilmente in maniera importante sia dell'effetto matrice vegetale, presente nella materia prima grezza e nei cioccolati (frazione lipidica e componente fibrosa sequestrante gli attivi), sia del processo estrattivo, sicuramente ottimizzabile, in quanto la quantificazione dei principi attivi nelle materie grezze è risultata estremamente inferiore

rispetto ai dati di letteratura. L'analisi degli estratti secchi titolati invece ne ha fatto emergere soltanto uno su tre, che è risultato conforme a quanto dichiarato dal produttore, di ottima qualità, molto concentrato e privo dell'effetto matrice.

Da queste analisi preliminari si sono potuti evidenziare tre campioni, uno per categoria, risultati i più interessanti in termini di concentrazione di attivi presenti, sui quali sono state svolte tutte le analisi successive: il cioccolato biologico al 98% di pasta di cacao, la granella proveniente dal Costa-rica e l'estratto secco titolato all'8-10% in polifenoli e al 5% in teobromina.

Per approfondire l'analisi del profilo fitochimico dei tre campioni di cacao selezionati è stata eseguita l'analisi mediante l'utilizzo dell'HPLC-DAD al fine di identificare la frazione polifenolica.



Foto di jackmac34

I principi attivi cui è legata l'attività farmacologica del cacao possono essere suddivisi in due classi principali di molecole: gli alcaloidi e i polifenoli.

Fig. 1  
L'apparecchio MIVO®  
(Multi In Vitro  
Organ), usato  
per i test in  
laboratorio.



I cromatogrammi registrati a 280 nm mostrano in generale pochi picchi e poco significativi; leggermente più interessante l'analisi dell'estratto secco titolato, in cui oltre al picco della teobromina, visibile anche negli altri due campioni, si riesce a identificare l'epigallocatechina gallato, una probabile epicatechina gallato non confermata per assenza di standard e un'altra catechina anch'essa non identificabile con certezza. Dall'analisi è stato possibile però effettuare il calcolo delle catechine monomeriche totali espresse come (-)-epicatechina, che mette in luce come l'estratto secco titolato risulti contenerne il quantitativo maggiore, mentre negli altri due campioni, in cui l'effetto matrice è ben più marcato, risulta decisamente inferiore. In tutti e tre i campioni, comunque, ciò che emerge è che la quantità di composti polifenolici in forma monomerica è molto bassa, a conferma del dato che la maggior parte di questi attivi nel cacao e nei suoi derivati esiste in forma oligomerica e polimerica. L'attività antiradicalica, determinata con il saggio del radicale DPPH, mostra un'attività molto interessante per l'estratto secco titolato, come ha evidenziato l'IC<sub>50</sub> ottenuta e che mostra una inibizione del 50% del radicale a concentrazioni piuttosto basse; tra granella e cioccolato, quest'ultimo mostra un'attività di *radical scavenger* ben maggiore rispetto alla materia prima grezza, dato questo che suggerisce che nonostante il processo di lavorazione

porti a una significativa riduzione dei principi attivi, nel complesso l'attività antiossidante viene ben conservata.

In uno step successivo è stata effettuata una prova di bioaccessibilità simulata con un protocollo di digestione *in vitro* INFOGEST per verificare se e quanti flavan-3-oli, durante le due fasi digestive, gastrica e intestinale, fossero in grado di degradarsi dalla forma polimerica o oligomerica alla forma dimerica o monomerica, diventando così maggiormente disponibili per l'assorbimento intestinale. I risultati ottenuti hanno mostrato una buona stabilità dei principi attivi contenuti nel cioccolato e nella materia prima grezza a entrambi i tipi di digestione: in questi due derivati del cacao l'effetto protettivo che su di essi esercita la matrice vegetale fibrosa e lipidica, nei confronti dell'attacco enzimatico, dell'acidità e dell'alcalinità della soluzione, gioca senza dubbio un ruolo importante. Tale situazione non si verifica per l'estratto secco titolato, in cui l'azione protettiva della matrice è assente e pertanto esso presenta la minore stabilità digestiva tra i tre campioni analizzati.

Per valutare invece la biodisponibilità dei campioni, ovvero la capacità di oltrepassare la barriera intestinale e raggiungere il circolo sistemico, è stato svolto uno studio di microfluidica *in vitro* mediante apparecchio MIVO®. Il dispositivo Multi In Vitro Organ, o MIVO® è una camera di coltu-

ra cellulare in grado di ospitare membrane bio-mimetiche o tessuti viventi in condizioni fisiologiche. Lo strumento fornisce una circolazione fluidica multipla per la coltura dei tessuti in condizioni più affidabili rispetto al classico modello statico *in vitro*.

Nel nostro esperimento abbiamo usato la circolazione a singolo flusso: il tessuto di interfaccia separa la camera donatrice, in cui è presente l'estratto, da quella ricevente, in cui è presente il mezzo liquido tenuto in movimento; il liquido è in grado di fluire nella camera ricevente a una velocità capillare grazie al movimento generato da una pompa peristaltica, mentre nella camera del donatore l'ambiente biologico è statico.

L'analisi consente di simulare nel nostro caso l'assorbimento passivo delle biomolecole attraverso una membrana biomimetica selezionata dall'azienda, la quale permette il monitoraggio di una possibile diffusione intestinale. Dai prelievi fatti dopo 6h di azione è emerso che solo una bassissima quantità di flavan-3-oli riesce a oltrepassare la suddetta membrana biomimetica e a raggiungere il circolo; la maggior parte delle molecole restano intrappolate sulla membrana (sull'epitelio *in vivo*, e non è possibile stimare con questa metodica tutti quei processi di diffusione facilitata o di trasporto attivo enzimatico che avvengono a livello cellulare) e diventa substrato per l'attività metabolica del microbiota intestinale. Il dato pertanto conferma, come noto dalla letteratura, che il 90-95% dei polifenoli del cacao viene metabolizzato nel colon ad opera del microbiota residente.

Gli studi di farmacocinetica *in silico* sono stati effettuati con il software SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) che fornisce una serie di dati sulla dimensione, la struttura, la solubilità e

le proprietà farmacocinetiche delle componenti attive delle molecole ricercate, permettendo di effettuare una predizione dell'assorbimento intestinale e della loro eventuale diffusione spontanea attraverso la barriera ematoencefalica.

I dati ottenuti confermano lo scarso assorbimento dei principali attivi del cacao a livello gastro-intestinale e la loro diversa permeazione attraverso la barriera emato-encefalica che, secondo le predizioni computazionali, solamente i metaboliti attivi secondari valerolatttonici riescono a oltrepassare. Si può peraltro notare che la farmacocinetica di tutti i derivati del cacao è abbastanza simile. Nel modello dell'uovo sodo, che riassume graficamente le caratteristiche di queste molecole, vengono riportate a livello dell'albume quelle in grado di oltrepassare la barriera intestinale e nel tuorlo quelle che invece oltrepassano la barriera emato-encefalica.

L'approccio di *network pharmacology* con cui abbiamo voluto concludere lo studio ha previsto l'utilizzo in un primo momento del database GeneCards (<http://www.genecards.org>), tool bioinformatico che indaga le molecole di interesse associando dati provenienti dalla letteratura a un algoritmo di predizione dei target basato sulle caratteristiche chimico-fisiche delle molecole, restituendo un punteggio di affidabilità della predizione. Da questa preliminare analisi è emerso con grande interesse come tali predizioni, relative ai target dei costituenti nativi del cacao e loro metaboliti, insistono sull'attività a livello centrale, coinvolgendo il metabolismo di catecolamine, fattori neurotrofici, mediatori vascolari, metalloproteasi, mediatori infiammatori, che contribuiscono a supportare il ruolo neuroprotettivo del cacao.

L'interattoma restituitoci dal database utilizzato in seconda bat-

tuta, GeneRecommender (<http://www.generecommender.com>), una piattaforma genomica che riceve come input un geneset di interesse e restituisce in output altri geni che possono costituire nuovi target, mostra tutte le interazioni molecolari direttamente correlate ai geni di input legati alla neuroinfiammazione, impostata come filtro di ricerca, che sono stati immessi nel sistema di ricerca. Si possono così comprendere le molteplici vie biochimiche e target molecolari che gli attivi del cacao coinvolgono per mediare la risposta neuroprotettiva, indirizzando la ricerca su nuovi e interessanti focus con notevole ottimizzazione delle risorse analitiche. Molto interessante il coinvolgimento emerso da parte dei metaboliti secondari valerolatttonici, -valerolactone e acido 5-fenilvalerico, sulla degradazione della proteina -amiloidica tramite enzima ApoE.

A conclusione di questo lavoro ci siamo posti un ultimo quesito desunto dai dati ottenuti. Se è vero che la farmacocinetica dei principi attivi del cacao è piuttosto simile nei diversi prodotti che lo contengono e se è vero quindi che l'azione antiossidante e la plausibilità di arrivare ai target biologici deputati alla neuroprotezione dipendono dalla quantità dei flavanoli presenti nell'alimento assunto, dobbiamo di conseguenza porci dubbi sulla sicurezza differenziale tra i prodotti in termini di concentrazioni efficaci e tossicità?

Per dare una risposta a tale quesito è stato eseguito un saggio di vitalità cellulare sulla linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y, sottoposta al trattamento con tre diverse concentrazioni di ognuno dei tre campioni selezionati a 24 h e per quanto riguarda l'estratto secco titolato di cacao anche a 4 h.

I risultati ottenuti mostrano che a concentrazioni da cui è possibile

attenderci una risposta biologica e che rappresenta la massima raggiungibile *in vivo* (nanogrammi, massimo 1 Qg/ml), ma anche a concentrazioni di un ordine di grandezza superiore, non emerge nessuna tossicità per nessuno dei prodotti di cacao. In dettaglio, si può notare che sia nel trattamento a tempi brevi (4 h) che lunghi (24 h), a tutte le concentrazioni testate e per tutte le tipologie di derivati del cacao, non si riscontra tossicità, anzi in molti casi la vitalità cellulare risulta leggermente aumentata.

### Conclusioni

In questo studio sono stati approfonditi diversi aspetti della bioattività del cacao e del cioccolato e la comparazione tra i diversi campioni analizzati ha permesso varie considerazioni sulle proprietà salutistiche dei diversi prodotti alimentari ottenuti dal cacao.

Lo screening condotto ha voluto mettere in evidenza i prodotti qualitativamente migliori, più interessanti dal punto di vista salutistico e dunque più utili come integratori dietetici, perché a più alto tenore in flavan-3-oli.

Passare dal prodotto grezzo al cioccolato, come emerge dal confronto di tutti i cioccolati con le materie prime grezze analizzate, determina in linea generale una diminuzione quantitativa del contenuto totale di polifenoli dovuto al processo di lavorazione; il contenuto di polifenoli è proporzionale al contenuto di pasta di cacao dei campioni, che nel caso dei cioccolati si trova a essere estratta dalla matrice grezza e rimescolata agli altri ingredienti che andranno a formare il prodotto finito, nel caso delle materie prime grezze si trova intrappolata all'interno di una matrice, che comprende anche una componente fibrosa e una frazione lipidica che ostacolano l'accesso ai principi attivi.

Nei cioccolati fondenti a più alta



La coltivazione del cacao oggi è diffusa, alle stesse latitudini, anche in altri continenti, primo tra tutti quello africano, di cui soltanto la Costa d'Avorio vanta circa il 40% della produzione mondiale.

percentuale di pasta di cacao, in generale, viene mantenuta una buona concentrazione di polifenoli e di flavan-3-oli, mentre negli estratti secchi titolati la standardizzazione e purificazione dei principi attivi ne favorisce la maggiore concentrazione e bio-disponibilità.

Questa tesi ha voluto porre l'accento sull'importanza del cacao come alimento salutistico, non solo nella già ben nota forma del cioccolato, ma anche sotto forma di estratto di cacao titolato e di materia prima organica, derivati anch'essi presenti sul mercato e utilizzati. La ricerca svolta ci conferma che, tra i cioccolati, il fondente ad alta percentuale di pasta di cacao è un ottimo alleato per la nostra salute e decisamente migliore rispetto alla materia prima grezza, che possiamo trovare intera o in granello, ma di cui comunque riusciamo a beneficiare solo parzialmente del complesso polifenolico in essa contenuto. Gli estratti secchi titolati di cacao invece, se di buona qualità, rappresentano una valida alternativa e una fonte concentrata di attivi, oggi molto

attenzione e quindi sempre più presenti sul mercato, dove sono scelti per ottimizzare la formulazione di una crescente varietà di integratori alimentari.

**\* UNIVERSITÀ DI SIENA - Tesi di laurea in Biologia molecolare, sanitaria e della nutrizione di Silvia Pastore, Dip. Scienze Biomolecolari**

**D.ssa Federica Vaccaro - Università degli Studi di Siena - Dip. di Scienze Fisiche, della Terra e dell'Ambiente**

**Prof. Alexander Bertuccioli - Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo" - Dip. Scienze Biomolecolari**

**Prof. Marco Biagi - Università di Parma - Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco**

## Bibliografia

- 1 - Bordiga M, Locatelli M, Travaglia F, Coisnon J.D, Mazza G, Arlorio M. (2015) *Evaluation of the effect of processing on cocoa polyphenols: antiradical activity, anthocyanins and procyanidins profiling from raw beans to chocolate*. Int. J. Food Sci. Technol., 50(3):840-848.
- 2 - Cabras P, Martelli A. (2004) *Chimica degli alimenti nutrienti, alimenti di origine vegetale, di origine animale, integratori alimentari, bevande, sostanze indesiderabili*. Edizione Piccin, 291-293-301-316-317.

- 3 - Cuatrecasas J. (1964) *Cacao and Its Allies, a Taxonomic Revision of the Genus Theobroma*. Systematic Plant Studies, 379-614.
- 4 - Ditchfield C, Kushida M.M, Mazalli M.R, Sobral P.J.A. (2023) *Can Chocolate Be Classified as an Ultra-Processed Food? A Short Review on Processing and Health Aspects to Help Answer This Question*. Foods, 16;12(16):3070.
- 5 - Goya L, Kongor J.E, de Pascual-Teresa S. (2022) *From Cocoa to Chocolate: Effect of Processing on Flavanols and Methylxanthines and Their Mechanisms of Action*. Int. J. Mol. Sci., 18;23(22):14365.
- 6 - Ignesti G, Maleci L, Medica A, Pirisino R. (1999) *Piante medicinali: botanica, chimica, farmacologia, tossicologia*. Pitagora Editrice Bologna, 41.
- 7 - Jaramillo Flores M.E. (2019) *Cocoa Flavanols: Natural Agents with Attenuating Effects on Metabolic Syndrome Risk Factors*. Nutrients, 30;11(4):751.
- 8 - Martin M.A, Ramos S. (2017) *Health beneficial effects of cocoa phenolic compounds: a mini-review*. Curr. Opin. Food Sci., 14:20-25.
- 9 - Martin M.A, Ramos S. (2021) *Impact of cocoa flavanols on human health*. Food Chem. Toxicol., 151:112121.
- 10 - Maugini E, Maleci Bini L, Mariotti Lippi M. (2014) *Botanica Farmaceutica*. IX Ed., Piccin Ed.
- 11 - Montagna M.T, Diella G, Triggiano F, Caponio G.R, De Giglio O, Caggiano G, Di Ciaula A, Portincasa P. (2019) *Chocolate, "Food of the Gods": History, Science, and Human Health*. Int. J. Environ. Res. Public Health, 6;16(24):4960.
- 12 - Rist P.M, Sesso H.D, Johnson L.G, Aragaki A.K, Wang L, Rautiainen S, Hazra A, Tobias D.K, LeBoff M.S, Schroeter H, Friedenberg G, Copeland T, Clar A, Tinker L.F, Hunt R.P, Bassuk S.S, Sarkissian A, Smith D.C, Pereira E, Carrick W.R, Wion E.S, Schoenberg J, Anderson G.L, Manson J.E, COSMOS Research Group. (2022) *Design and baseline characteristics of participants in the COcoa Supplement and Multivitamin Outcomes Study (COSMOS)*. Contemp. Clin. Trials, 116:106728.
- 13 - Sesso H.D, Manson J.E, Aragaki A.K, Rist P.M, Johnson L.G, Friedenberg G, Copeland T, Clar A, Mora S, Moorthy M.V, Sarkissian A, Carrick W.R, Anderson G.L, COSMOS Research Group. (2022) *Effect of cocoa flavanol supplementation for the prevention of cardiovascular disease events: the COcoa Supplement and Multivitamin Outcomes Study (COSMOS) randomized clinical trial*. Am. J. Clin. Nutr., 115(6):1490-1500

## Sitografia

- 1 - <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QLC>
- 2 - <http://www.swissadme.ch>
- 3 - <http://www.genecards.org>
- 4 - <http://www.generecommender.com>