

D. VISCARDI, C. MIGLIORI,
L.F. DI CESARE

Qualità alimentare e nutraceutica di linee di cavolfiore “violetto di Catania”

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 11, N. 2, 110-117, 2009

TITLE
Alimentary and nutraceutical
quality of “violetto di Catania”
cauliflower genotypes

KEY WORDS
Isothiocyanates, sulforaphane,
volatile substances, vitamin C,
total anthocyanins, GC/MS and
HPLC analysis

PAROLE CHIAVE
Isotiocianati, sulforafane,
sostanze volatili, vitamina C,
antociani totali, analisi GC/MS,
analisi HPLC

¹CRA-IAA, Unità di Ricerca per i
Processi dell'Industria Agro-
Alimentare, Milano

* Ricerca finanziata dal Ministero delle
Politiche Agricole Alimentari e Forestali
con fondi C.I.P.E. (Delibera 17/2003)

Indirizzo per corrispondenza:
Dr. Luigi Di Cesare
E-mail: luigi.dicesare@entecra.it

Summary

Content of the volatile characteristic substances, isothiocyanates, vitamin C and total anthocyanins were determined in 4 genotypes of cauliflower “violetto di Catania” (BR13S3, BR15S1, CV33S1, CV99S2B) to evaluate the alimentary and nutraceutical quality. The volatile characteristic substances were extracted and concentrated from freeze-dried samples by a microwave-resin-solvent method and the obtained extracts were quali-quantitatively analysed by GC/MS. Isothiocyanates, obtained by myrosinase enzyme from correlative glucosinolates, were quali-quantitatively analysed by GC/MS. Vitamin C, extracted from freeze-dried samples by distillate water + metaphosphoric acid (6%), was then quantified by HPLC analysis. Total anthocyanins, extracted from freeze-dried samples by methanol + HCl, were quantified by spectrophotometric analysis at 528 nm. For the alimentary quality, CV33S1 had the highest content in volatile characteristic substances (24.66 mg/100 g d.m.); while in the other genotypes, the values ranged between 10.57 and 11.83 mg/100 g d.m. For the nutraceutical quality, among isothiocyanates, the values of sulforaphane ranged between 2.21 and 2.42 $\mu\text{mol/g}$ d.m. for the CV33S1, CV99S2B and BR13S3 genotypes; while the value of 1.10 $\mu\text{mol/g}$ d.m. was noted in BR15S1 genotype. Vitamin C had the highest value (50 mg/100 g w.w.) in CV99S2B, decreased up to 31.60 mg/100 g w.w. in the CV33S1 genotype, while lower values, ranging between 25.20 and 18.80 mg/100 g w.w., were ascertained in BR13S3 and BR15S1 genotypes respectively. Total anthocyanins had the highest concentration (40 mg/100 g w.w.) in BR13S3, decreased up to 20.57 mg/100 g w.w. in CV99S2B; while lower values, between 17.04 and 14.57 mg/100 g w.w., were noted in the BR15S1 and CV33S1 genotypes respectively.

Riassunto

Il contenuto in sostanze volatili caratteristiche, isotiocianati, vitamina C ed antociani totali è stato determinato in 4 genotipi di cavolfiore “violetto di Catania” (BR13S3, BR15S1, CV33S1, CV99S2B), per valutare la qualità alimentare e nutraceutica. Le sostanze volatili caratteristiche sono state estratte e concentrate con un metodo combinato microonde-resina-

solvente da campioni liofilizzati e gli estratti analizzati quali-quantitativamente per via GC/MS. Nei campioni liofilizzati, gli isotiocianati ottenuti per idrolisi con mirosinasi dai corrispondenti glucosinolati, sono stati estratti con solvente ed analizzati quali-quantitativamente per via GC/MS. La vitamina C, estratta con acqua dist. stabilizzata con acido metafosforico (6%) da campioni liofilizzati, è stata quantificata per via HPLC. Gli antociani totali, estratti con CH₃OH acidificato con HCl da campioni liofilizzati, sono stati quantificati per via spettrofotometrica a 528 nm. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che, per la qualità alimentare, il genotipo CV33S1 presenta il più alto contenuto in sostanze volatili caratteristiche, con valori di 24.66 mg/100 g s.s.; mentre negli altri genotipi i valori oscillano tra 10.57 e 11.83 mg/100 g ss. Per la qualità nutraceutica, tra gli isotiocianati, i valori del sulforafane oscillano tra 2.21 e 2.42 μmoli/g s.s. per i genotipi CV33S1, CV99S2B e BR13S3; mentre valori di 1.10 μmoli/g s.s. vengono osservati nella linea BR15S1. La vitamina C ha il valore più elevato di 50 mg/100 g p.f. nella CV99S2B, scende a 31.60 mg/100 g p.f. nella CV33S1; mentre valori più bassi oscillanti tra 25.20 e 18.80 mg/100 g p.f. vengono rilevati rispettivamente nelle linee BR13S3 e BR15S1. Gli antociani totali hanno la più elevata concentrazione di 40.36 mg/100 g p.f. nella linea BR13S3, si dimezzano a 20.57 mg/100 g p.f. nella linea CV99S2B; mentre valori più bassi, compresi tra 17.04 e 14.51 mg/100 g p.f. vengono notati rispettivamente nelle linee BR15S1 e CV33S1.

Introduzione

Le piante commestibili contengono una grande quantità di metaboliti minori, alcuni dei quali hanno la capacità di indurre la sintesi degli enzimi della fase II, inibitori della tumorigenesi in tessuti animali (1). Studi epidemiologici, condotti su animali di laboratorio, hanno dimostrato che diete ricche di frutta e verdura si associano con una riduzione del rischio di svi-

luppo di cancro (2, 3) e si presuppone che i loro metaboliti siano in parte responsabili di questo comportamento.

Le Brassicaceae o Crucifere, come cavolfiore, broccolo, cavolo-capuccio, cavolino di Brussel etc, sono ricche di metaboliti e tra questi i glucosinolati e/o i loro prodotti di idrolisi (isotiocianati), capaci di attivare gli enzimi della fase II (4) e che possono pertanto giocare uno speciale ruolo nell'espleta-

mento di questa protezione (5, 6). Le sostanze responsabili di questa capacità induttiva sono gli isotiocianati ed in particolare il sulforafane o 4-metilsulfanylbutil NCS (7-9). Il sulforafane, come gli altri isotiocianati, viene liberato per idrolisi con gli enzimi mirosinasi dalla glucorafanina o dagli altri glucosinolati. Normalmente nelle cellule intatte delle Brassicaceae, le mirosinasi sono separate dai glucosinolati e le reazioni di idrolisi

non hanno luogo. Ciò accade quando le cellule perdono la loro integrità, causa schiacciamento o triturazione dei tessuti vegetali (10). Gli isotiocianati, a differenza dei glucosinolati, sono molecole poco stabili al calore ed ai cambiamenti di pH e si degradano in solfuri (R-(S)₂-R), tiocianati (R-S-CN) e nitrili (R-CN), composti molto volatili che vengono normalmente liberati durante la cottura delle Brassicaceae e sono responsabili dell'odore caratteristico di questa famiglia (11).

Pertanto da un punto di vista salutistico, nella determinazione degli isotiocianati ed in particolare del sulforafane, si devono impiegare procedure, la cui esecuzione avviene a temperatura ambiente (12); mentre, per la quantificazione delle sostanze volatili, l'uso di alte temperature nella fase estrattiva dalla matrice vegetale, favorisce il recupero dei componenti responsabili dell'aroma (11).

Da un punto di vista salutistico, la mondatura e la cottura delle Brassicaceae devono essere effettuate in modo tale che nell'intestino giunga la maggior quantità di glucosinolati, cosicché la loro idrolisi, ad opera delle mirosinasi batteriche, possa liberare una buona quantità di isotiocianati, disponibili per l'assorbimento da parte della mucosa intestinale (12).

Nelle Brassicaceae, oltre ai glucosinolati e/o loro prodotti di degra-

dazione (isotiocianati), vengono riscontrate altre sostanze nutraceutiche come la vitamina C e gli antociani (cavolfiore viola). La vitamina C o acido ascorbico è un nutriente essenziale per la maggior parte dei primati e per gli altri mammiferi come porcellino d'India e pipistrello e per alcune specie di uccelli e pesci (13). Il primo prodotto della sua ossidazione è l'acido deidroascorbico, che è ancora biologicamente attivo in quanto nel nostro organismo viene nuovamente ridotto ad acido ascorbico (14). La vitamina C, oltre alle ben note influenze su vari metabolismi cellulari (15-23), come antiossidante può ridurre il rischio di arteriosclerosi, malattie cardiovascolari ed alcune forme di cancro (24).

Nelle Brassicaceae, il contenuto in vitamina C si aggira intorno ai 90 mg/100 g p.f. nei broccoli, scende di poco (80 mg/100 g p.f.) nel cavolino di Brussel; mentre valori compresi tra 30-40 mg/100 g p.f. vengono riscontrati nel cavolo-cappuccio e cavolfiore (25-27).

Gli antociani sono dei pigmenti vacuolari solubili in acqua, che possono apparire rosso porpora o blu in base al pH. Essi appartengono alla classe di molecole chiamate flavonoidi e si riscontrano nei tessuti delle piante superiori, incluse foglie, stami, radici, fiori e frutti (28-30). Essi sono costituiti da un glicone (zucchero) e dall'a-

glicone, chiamato antocianidina. In natura sono presenti diversi tipi di antocianine e tra queste le sei più importanti: pelargonidina, cianidina, delphinidina, penidina, petunidina e malvidina. Comunque in questi ultimi anni sono state individuate più di 400 differenti antocianine (31). Gli antociani, pur non essendo indispensabili per la nutrizione umana, esercitano un'azione positiva sull'intero organismo grazie alle loro spiccate attività antiossidanti. Oltre alle loro ben conosciute proprietà contro la fragilità capillare, antinfiammatorie, antiaggregante piastrinico ed all'azione antiedemigena, gli antociani hanno un'azione scavenger sui radicali liberi e sono ritenuti importanti per la protezione dagli agenti cancerogeni e per rallentare l'ineluttabile fenomeno biologico dell'invecchiamento cellulare (32-35). Nelle Brassicaceae pigmentate, gli antociani sono stati chiamati rubrobrassicine, caratterizzate dalla cianidina esterificata con acido sinapico (36). Inizialmente, usando la cromatografia su carta, alcuni autori hanno riscontrato che l'antocianina era costituita dalla cianidina e D-glucosio nel rapporto 1:3 e la sua struttura identificata come cianidina-3-sulfoside-5-glucoside esterificata non solo con acido sinapico, ma anche con ferulico e cinnamico (37-41). Recentemente, mediante analisi

HPLC dei cavolfiori rossi, sono state separate 15 antocianine di cui 11 caratterizzate (42).

Normalmente il contenuto in antociani totali nel "violetto di Catania" oscilla tra 20-40 mg/100 g p.f., in funzione del genotipo, trattamenti colturali e condizioni pedoclimatiche (43).

Scopo della presente ricerca è stato quello di valutare le sostanze aromatiche (qualità alimentare), isotiocianati, vitamina C ed antociani (qualità nutraceutica) in 4 genotipi di cavolfiore "violetto di Catania", per individuare quelli più importanti da un punto di vista alimentare e salutistico.

Materiali e metodi

Materiale di partenza

Per le prove sono stati utilizzati 4 genotipi di cavolfiore "violetto di Catania", denominati BR13S3, BR15S1, CV33S1, CV99S2B, provenienti dai campi sperimentali del DOFATA- Università degli Studi di Catania. I campioni sono stati mondati e le rosette ottenute immediatamente liofilizzate. I liofilizzati sono stati ridotti in polvere in un mulino a coltelli refrigerato a 0°C ed i campioni, raccolti in buste di polietilene, conservati a -80°C prima dell'analisi. Esse sono state effettuate in triplo.

Estrazione-concentrazione ed analisi delle sostanze volatili

Le sostanze volatili contenute nei campioni, sono state estratte e concentrate mediante un metodo combinato microonde-resina-solvente e gli estratti ottenuti, analizzati quali-quantitativamente per via GC/MS. Le procedure di estrazione-concentrazione ed analisi delle sostanze volatili sono state descritte in una nota precedente (11).

Determinazione degli isotiocianati

Gli isotiocianati, separati dai rispettivi glucosinolati mediante mirosinasi esogena, sono stati estratti dalla matrice vegetale con diclorometano ed analizzati quali-quantitativamente per via GC/MS. Le procedure di idrolisi enzimatica, estrazione ed analisi sono state descritte in una nota precedente (12).

Determinazione della vitamina C

L'acido ascorbico è stato determinato per via HPLC, come descritto in una nota precedente (44).

Determinazione degli antociani totali

Sono stati determinati spettrofotometricamente a $\lambda=528$ nm, secondo il metodo di Swain e Hills (45).

Residuo secco

Il residuo secco è stato determinato in una stufa da laboratorio, mantenuta a 80°C, fino a peso costante (46).

Analisi statistica

Per valutare la differenza dei parametri aromatico-nutraceutici tra i vari campioni è stato impiegato il test di Tukey. I valori medi sono stati considerati statisticamente differenti per $p \leq 0.05$.

Risultati e discussione

Qualità alimentare

Nella tabella 1 vengono riportati i componenti volatili solforati-azotati e le rispettive concentrazioni (mg/100 g s.s.) nelle 4 linee di "violetto di Catania", identificando 8 solfuri, 2 tiocianati ed 1 nitrile.

La maggior parte di questi composti viene riscontrata in tutti i genotipi ad eccezione del disolfuro metile e del solfuro metil-metilsulfonile che non sono presenti nel genotipo BR15S1. Il trisolfuro dimetile è il componente più rappresentativo nelle 4 linee, raggiungendo la massima concentrazione nel genotipo CV33S1. Il disolfuro dimetile e tetrasolfuro dimetile hanno valori al di sopra di 1 mg/100 g s.s. in tutte le linee, ad

Tabella 1 - Contenuto in sostanze volatili (mg/100 g s.s.) in 4 genotipi di cavolfiore “violetto di Catania”. L'analisi statistica è stata effettuata comparando i valori delle sostanze volatili nello stesso genotipo (lettere minuscole) e i valori delle stesse sostanze volatili di genotipi diversi (lettere maiuscole). A lettere diverse corrispondono differenze statisticamente significative ($p \leq 0.05$)

Composti volatili (mg/100 g s.s.)	BR13S3	BR15S1	CV33S1	CV99S2B
disolfuro dimetile (S)	1,77 f AB	1,97 g B	2,71 e C	1,56 f A
disolfuro metiletile (S)	0,10 d B	0,00 a A	0,19 b D	0,16 a C
disolfuro dietile (S)	0,16 e A	0,32 e C	0,19 b B	0,18 d b
trisolfuro dimetile (S)	7,03 g A	6,98 h A	14,38 g B	7,83 g AB
4-(metiltio)butanonitrile (Tio)	0,04 b A	0,04 b A	0,21 bc C	0,12 c B
disolfuro metil(metiltio)metile (S)	0,08 c A	0,20 d B	0,35 d C	0,08 b A
5-(metiltio)pentanonitrile (Tio)	0,03 a A	0,06 c B	0,21 bc C	0,31 e D
tetrasolfuro dimetile (S)	1,67 f B	0,73 f A	5,88 f D	1,42 f C
benzenopropanonitrile (N)	0,03 a A	0,22 d D	0,07 a C	0,05 a B
solfo metile, metilsulfonilmetile (S)	0,04 b B	0,00 a A	0,28 c C	0,05 a B
pentasolfuro dimetile (S)	0,03 a A	0,06 c B	0,20 bc D	0,11 c C
Totale	10,95 A	10,56 A	24,66 B	11,83 A

S= Solfuri; Tio= Tiocianati; N= Nitrili

eccezione del tetrasolfuro dimetile nella linea BR15S1. Tutti gli altri composti hanno valori abbondantemente al di sotto di 1 mg/100 g s.s. in tutti i genotipi. Nella figura 1 viene diagrammata la distribuzione delle tre classi più rappresentative dell'aroma di questa specie: solfuri, tiocianati e nitrili. I solfuri sono nettamente predominanti sulle altre classi ed incidono sulle caratteristiche organolettiche dei vegetali. La concentrazione più elevata in sostanze volatili solforate-azotate viene evidenziata nella CV33S1, con valori di 24.66 mg/100 g s.s.; mentre tutti gli altri genotipi hanno valori più bassi e vicini tra loro ed oscillano tra 10.57 e 11.83 mg/100 g s.s.

Qualità nutraceutica

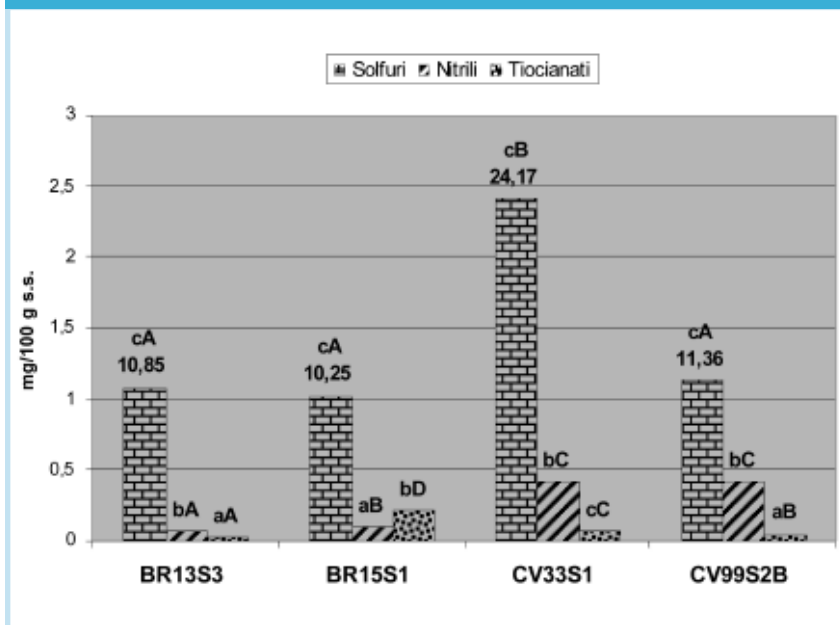
Nella tabella 2 vengono riportati i valori dei parametri nutraceutici

dei 4 genotipi. Il sulforafane, o 4 metilsulfonilbutil NCS, ha valori compresi tra 2 e 2.5 $\mu\text{mol/g}$ s.s. per le linee CV33S1, CV99S2B e BR13S3; mentre nella linea BR15S1 il valore di questo isotiocianato si dimezza. L'importanza del sulforafane risiede nella capacità, molto più elevata rispetto agli altri isotiocianati, di attivare gli enzimi della fase II [glutazione transferasi, epossido idrolasi, NAD(P)H-chinone reductasi e glucoronil transferasi] che accelerano la detossificazione dagli elettroliti e dalle forme reattive dell' O_2 , proteggendo in questo modo le cellule contro la mutagenesi e neoplasie (47). La determinazione per via GC/MS del sulforafane, prodotto per idrolisi enzimatica dalla glucorafanina (glucosinolato), effettuata con il metodo da noi messo a punto, permette di conoscere la potenziale quantità di

sulforafane che verrebbe liberata dalla glucorafanina.

Siccome, la quantità di sulforafane necessaria per esplicitare l'attività antitumorale ed antimutagenica non è nota, come non lo è quella che viene realmente assorbita nel lume intestinale, è bene segnalare i contenuti del sulforafane nelle 4 linee di “violetto di Catania”, anche se essi sono più bassi rispetto a quelli rilevati nel cavolfiore “Romanesco” e nel broccolo con le stesse procedure, ma superiori a quelli riscontrati nel cavolfiore bianco ed altre Brassicaceae (12). Oltre al sulforafane, nelle 4 linee di “violetto di Catania”, usando la stessa procedura analitica, sono stati identificati e quantificati altri isotiocianati. L'isobutil NCS, 3-butenil NCS e 2-metilbutil NCS, anche se in tracce, vengono identificati in tutti i genotipi, ad eccezione dell'isobutil NCS non pre-

Figura 1 - Distribuzione dei solfuri, tiocianati e nitrili nei 4 genotipi di cavolfiore "violetto di Catania". L'analisi statistica dei dati è stata effettuata comparando i valori delle classi di sostanze volatili nello stesso genotipo (lettere minuscole) e i valori delle stesse classi in genotipi diversi (lettere maiuscole). A lettere diverse corrispondono differenze statisticamente significative ($p \leq 0.05$). I valori dei solfuri, posti in testa agli istogrammi corrispondenti, sono stati divisi per dieci, per ragioni grafiche



sente nella linea BR13S3. Il 3-(metiltio)propil NCS è stato trovato in tracce nella linea BR13S3, mentre non è stato identificato nel genotipo CV33S1. Il 4-(metiltio)butil NCS è quantificabile in tutti i genotipi ed ha valori più alti nelle linee BR15S1 e CV99S2B. Il 2-fenilettil NCS presenta valori più elevati nella linea BR15S1 e CV99S2B. Il 3-metilsulfinilpropil NCS ha valori quasi simili nelle linee BR13S3, BR15S1 e CV99S2B e superiori nella CV33S1. Dopo il sulforafane, il 3-metilsulfinilpropil NCS è l'isotiocianato più rappresentato in tutte le linee. Il 3-indolilmetil NCS ha valori elevati nella linea BR13S3, intorno a $0.09 \mu\text{moli/g s.s.}$, mentre

Tabella 2 - Contenuto in sostanze nutraceutiche nelle 4 linee di cavolfiore "violetto di Catania". L'analisi statistica è stata effettuata comparando i valori delle sostanze volatili nello stesso genotipo (lettere minuscole) e i valori delle stesse sostanze volatili in genotipi diversi (lettere maiuscole). A lettere diverse corrispondono differenze statisticamente significative ($p \leq 0.05$)

Isotiocianati ($\mu\text{moli/g s.s.}$)	BR13S3	BR15S1	CV33S1	CV99S2B	Glucosinolati corrispondenti
isobutil NCS	-	tracce	tracce	tracce	-
3-butenil NCS	tracce	tracce	tracce	tracce	gluconapina
2-metilbutil NCS	tracce	tracce	tracce	tracce	-
3-(metiltio)propil NCS	tracce	0,12 c B	-	0,01 a A	glucoibervirina
4-(metiltio)butil NCS	0,07 b A	0,19 d D	0,06 b A	0,15 c C	glucoerucina
2-fenilettil NCS	0,02 a A	0,07 b B	0,02 a A	tracce	gluconasturtina
3-metilsulfinilpropil NCS	0,58 d A	0,53 e A	1,25 d B	0,54 d A	glucoiberina
4-metilsulfinilbutil NCS o sulforafane	2,42 e A	1,10 f B	2,09 e A	2,21 e A	glucorafanina
3-indolilmetil NCS	0,12 c C	0,05 a A	0,09 c B	0,09 b B	glucobrassicina
Vitamina C (mg/100 g p.f.)	25,20 B	18,85 A	31,64 C	50,00 D	
Antociani totali (mg/100 g p.f.)	40,36 D	17,94 B	14,51 A	20,57 C	

scende a 0.05 $\mu\text{mol/g}$ s.s. nella linea BR15S1. Per la maggior parte di questi isotiocianati, non è stata ancora dimostrata una diretta attività sugli enzimi di detossificazione della fase II, ma è bene riportare le loro composizioni nelle linee di "violetto di Catania", che possono essere utili per differenziare tra loro le varietà, in attesa di un loro dimostrabile effetto antitumorale.

Inoltre, con la procedura messa a punto, non vengono identificati il 3-butenil-2-idrossi NCS, ottenuto per idrolisi dalla progoina e l'N-metossi-3-indolilmetil NCS, il 4-idrossi-3-indolilmetil NCS, 4-metossi-3-indolilmetil NCS, ottenuti per idrolisi con mirosinasi rispettivamente dalla neoglucobrassicina, 4-idrossiglucobrassicina e 4-metossiglucobrassicina.

La vitamina C ha il valore più elevato nella CV99S2B (50 mg/100 g p.f.), mentre nella CV33S1, i valori in acido ascorbico scendono a 31.64 mg/100 g p.f., nella BR15S3 a 25.20 mg/100 g p.f. Valori ancora più bassi (18.58 mg/100 g p.f.) vengono osservati nella linea BR15S1.

Il "violetto di Catania", rispetto alle altre Brassicaceae, ha un valore nutrizionale aggiunto non trascurabile, rappresentato dagli antociani, che dislocati nella parte superficiale dei corimbi, impartiscono una intensa colorazione violacea a questa cultivar. Agli antociani viene riconosciuta un'attività antiradicalica

ed antiossidante. Gli antociani totali hanno la più elevata concentrazione, pari a 40.36 mg/100 g p.f., nella linea BR13S3, si dimezza nel genotipo CV99S2B, mentre valori ancora più bassi (17.94 e 14.51 mg/100 g p.f.) vengono osservati rispettivamente nei genotipi BR15S1 e CV33S1.

Conclusioni

La valutazione dei parametri aromatico-nutraceutici permette di esprimere un giudizio sulle potenzialità organolettiche e nutritive delle linee di "violetto di Catania" allo stato fresco. In queste condizioni possiamo desumere che, per quanto concerne la qualità alimentare, la linea CV33S1 è quella dotata di un più intenso odore caratteristico per il maggior contenuto in sostanze solforate-azotate; mentre le linee BR13S3 e CV99S2B sono da prendere in considerazione per la qualità nutraceutica, grazie ad un maggiore equilibrio dei parametri biochimici scelti.

Bibliografia

1. Talalay P, Fahey JW, Holtzclaw WD, Prestera T, Zhang Y. *Toxicol Lett* 1995; 82/83: 173-9.
2. Talalay P, De Long MJ, Prochaska HJ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 8261-5.
3. Steinmetz KA, Potter JD. *Vegetables,*

fruit, and cancer prevention a review. *J Am Diet Association* 1996; 96: 1027-39.

4. Prochaska HJ, Santamaria AB, Talalay P. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2394-8.
5. Verhoeven DTH, Goldbohm RA, van Poppel G, Verhagen H, van den Brandt PA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 733-48.
6. Verhoeven DTH, Verhagen H, Goldbohm RA, van den Brandt PA, van Poppel G. *Chem-Biol Interact* 1997; 103: 79-129.
7. Maheo K, Morel F, Langouet S, et al. Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat Hepatocytes. *Cancer Res* 1997; 57: 3649-52.
8. Barcelo S, Gardiner JM, Gescher A, Chipman JK. CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane. *Carcinogenesis* 1996; 17: 277-82.
9. Fahey JW, Talalay P. Antioxidant function of sulforaphane: a potent inducer of phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 973-9.
10. Spencer ME. Daxembichler. Gas chromatography-mass spectrometry of nitriles, isothiocyanates and oxazolidone thiones derived from cruciferous glucinolates. *J Sci Food Agric* 1980; 31: 359-67.
11. Di Cesare LF, Viscardi D, Genna A, Ferrari V. Influenza della cottura e dell'acido citrico sui componenti volatili ed antocianine nel cavolfiore. *Industrie Alimentari* 2005; XLIV: 26-33.
12. Di Cesare LF, Migliori C, Viscardi D, Ferrari V. Influence of heat treatment on sulforaphane in italian brassica cultivar. *Progr Nutr* 2009; 11 (2): 100-9.
13. McCluskey, S. Elwood. Which vertebrates make vitamin C? *Origins* 1985; 12 (2): 96-100.
14. Lee SK, Kader AA. Preharvest and po-

- stharvest factors influencing vitamin C content in horticultural crops. *Postharvest Biol Technol* 2000; 20: 207-20.
15. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, disease and potential for therapy. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 403-34.
 16. Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1135S-1140S.
 17. Kivirikko KI, Myllylä R. Post-translational processing of procollagens. *Ann NY Acad Sci* 1985; 460: 187-201.
 18. McGee W. Medical Encyclopedia: Ascorbic Acid (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002404.htm>)
 19. Rebouche CJ. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *Am J Clin Nutr* 1991; 54 (6 Suppl): 1147S-1152S.
 20. Dunn WA, Rettura G, Seifter E, Englard S. Carnitine biosynthesis from gamma-butyrobetaine and from exogenous protein-bound 6-N-trimethyl-L-lysine by the perfused guinea pig liver. Effect of ascorbate deficiency on the in situ activity of gamma-butyrobetaine hydroxylase. *J Biol Chem* 1984; 259 (17): 10764-10770.
 21. Levine M, Dhariwal KR, Washko P, et al. Ascorbic acid and reaction kinetics in situ: a new approach to vitamin requirement. *J Nutr. Sci Vitaminol (Tokyo)* 1992; Spec No: 169-172.
 22. Kaufman S. Dopamine-beta-hydroxylase. *J Psychiatr Res* 1974; 11: 303-16.
 23. Eipper BA, Milgram SL, Husten EJ, Yun HY, Mains RE. Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase: a multifunctional protein with catalytic, processing and routine domains. *Protein Sci* 1993; 2: 489-97.
 24. Harris JR. Ascorbic acid: Biochemistry and Biochemical cell Biology. *Subcellular Biochemistry* 1996; vol. 25, Plenum Press, New York, USA, 464.
 25. National nutrient Database. Nutrient Data laboratory of the US Agricultural Research Service. 2007-03-07.
 26. Vitamin C Food Data Chart. Healthy Eating Club. 2007-03-07.
 27. Clark S. Comparing Milk: Human, Cow, Goat & Commercial Infant formula (<http://www.saanendoa.com/compare.html>). Washington State University, 2007. Retrived on 2007-02-28.
 28. Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanins in some cultivar of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 2004; 29: 7846-56.
 29. Siriwoharn T, Wrostdal RE, Finn CE, Perreira CB. Influence of cultivar, maturing, sampling on blackberry (*Rubus L. Hybrids*) anthocyanins, polyphenolics and antioxidant properties. *J Agric Chem* 2004; 26: 8021-30.
 30. Muñoz-Espada AC, Wood KV, Bordenon B, Watkins BA. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton and Marechal Foch graper and wines. *J Agric Food Chem* 2004; 3: 6779-86.
 31. Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 2003; 64 (5): 923-33.
 32. Wada L, Ou B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberrries. *J Agric Food Chem* 2002; 5: 3495-500.
 33. Hou D. Potential mechanism of cancer chemopreventions of anthocyanins. *Cur. Mol Med* 2003; 3 (2): 149-59.
 34. Karlsen A, Retterstøl L, Laake P, et al. Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy-adults. *J Nutr* 2007; 137 (8): 1951-4.
 35. Neto CC. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51 (6): 652-4.
 36. Chemielewska I. Untersuchugen uber das Rotkfarbstoffe. *Roc Chem* 1993; 13: 725 (ZA 1936, I, 2361).
 37. Chemielewska I, Smardzewska I, Kulesza J. Red coloring matter of cabbage (*Brassica oleracea*). III *Rocz Chem* 1938; 18: 176 (CA 33, 2561).
 38. Stroh HH. Uber die Anthocyane des Rorkohls. I. Zur Konstitution des rubrobrassinchlorid. *Z. Naturforsch Teil B* 1959; 699 (CA 54, 15555b).
 39. Metche M. Anthocyanin pigments in some vegetables. *Brasserie* 1967; 22: 69 (CA 67, 29853).
 40. Tanchev SS, Timberlake CF. The anthocyanins of red cabbage (*Brassica oleracea*). *Phytichemistry* 1969; 5: 1825.
 41. Lanzarini G, Morselli L. Gli antociani del cavolo rosso. *Ind Conserve* 1974; 49:16 (CA 81, 623441).
 42. Idaka E. Acylyed anthocyanins from plants and elucidation of their structures. *Japanese Patent* 1988; 63; 113: 078 (CA 110, 8589).
 43. Michael Eskin NA. Biochemistry of foods. Biochemical changes in raw food: fruits and vegetables. Ed. Michael Eskin; Second edition, 1990: 115-9.
 44. Di Cesare LF, Viscardi D, Forni E, Migliori C, Ferrari V. Influenza della cottura su alcune sostanze nutraceutiche del cavolfiore. In *Ricerche e innovazioni nell'industria alimentare.*; Chirriotti Editori, 2005, vol. VII: 770.
 45. Swain T, Hills WE. The phenolic constituent of *Prunus domestica*. 1: the quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 1959; 10: 63-68.
 46. AOAC, No 22018. In *Official methods of analysis*, 13th ed.; Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, 1975.
 47. Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94 (19): 10367-72.