

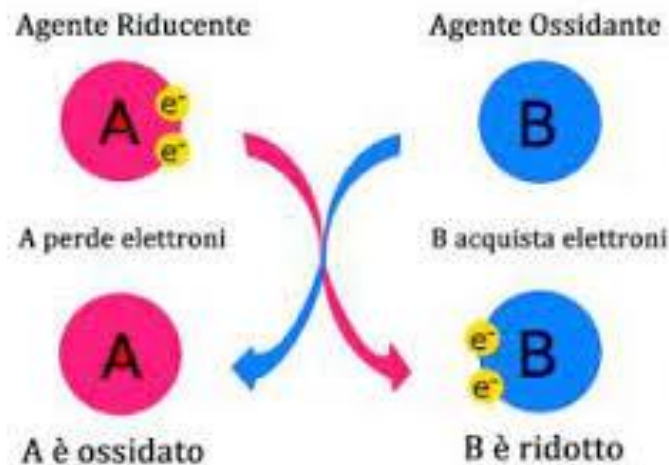
# Gli antiossidanti

- La chimica degli antiossidanti
  - Antiossidanti idrofili
  - Antiossidanti lipofili
- Metodi per la misura della attività antiossidante
- Alimenti ricchi di antiossidanti
- Utilizzo degli antiossidanti per la valorizzazione degli alimenti

- Perché qualcosa possa agire come antiossidante deve esserci un' OSSIDAZIONE potenziale o in corso

- Un ossidante può agire solo se è in presenza di un substrato (o reagente) riducente
- Il riducente perde elettroni (si ossida) e l'ossidante acquista elettroni (si riduce)

## Le Reazioni di Ossidoriduzione



### Ad esempio

La fotosintesi è una reazione redox

Il metabolismo si basa su reazioni redox

La formazione di ruggine è una reazione redox

Nella pila avvengono reazioni redox

L'invecchiamento cellulare comporta reazioni redox

## Reazioni redox (I)

Un agente riducente è un donatore di  $e^-$



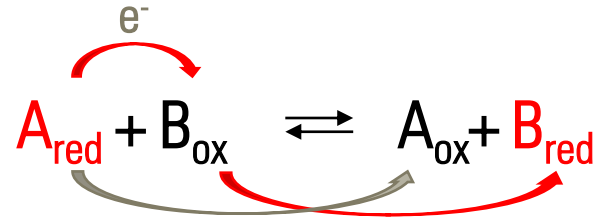
Un ossidante è un accettore di  $e^-$



**IMPORTANTE:** le due semireazioni non possono essere osservate sperimentalmente in maniera isolata

Per ogni reazione in cui viene donato un  $e^-$  deve esserci sempre un accettore di  $e^-$

## Reazioni redox (II)



*La specie ridotta (con un eccesso di elettroni) dona elettroni alla specie ossidata (con difetto di elettroni).  
La specie che ha donato elettroni diviene ossidata e quella che li ha accettati diviene ridotta.*

*Il processo può essere invertito (spontaneamente o fornendo energia)*

## Lo stress ossidativo e le reazioni radicaliche

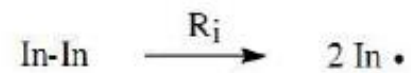
Lo stress ossidativo è il termine usato per indicare lo squilibrio tra specie reattive dell'ossigeno e meccanismi di difesa antiossidante.

In condizioni fisiologiche, le specie reattive dell'ossigeno svolgono un ruolo fondamentale nella segnalazione intracellulare, nelle risposte immunologiche fisiologiche e nell'espressione genica. I metaboliti reattivi dell'ossigeno possono essere generati in eccesso da molte fonti.

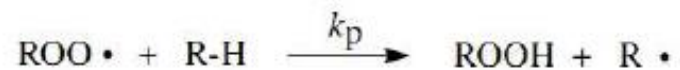
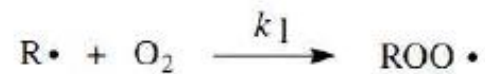
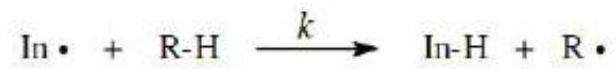
La fonte più importante è la perdita di elettroni dalla catena di trasporto degli elettroni mitocondriale per generare il radicale superossido ( $O_2^{\bullet -}$ ).

# Le reazioni radicaliche

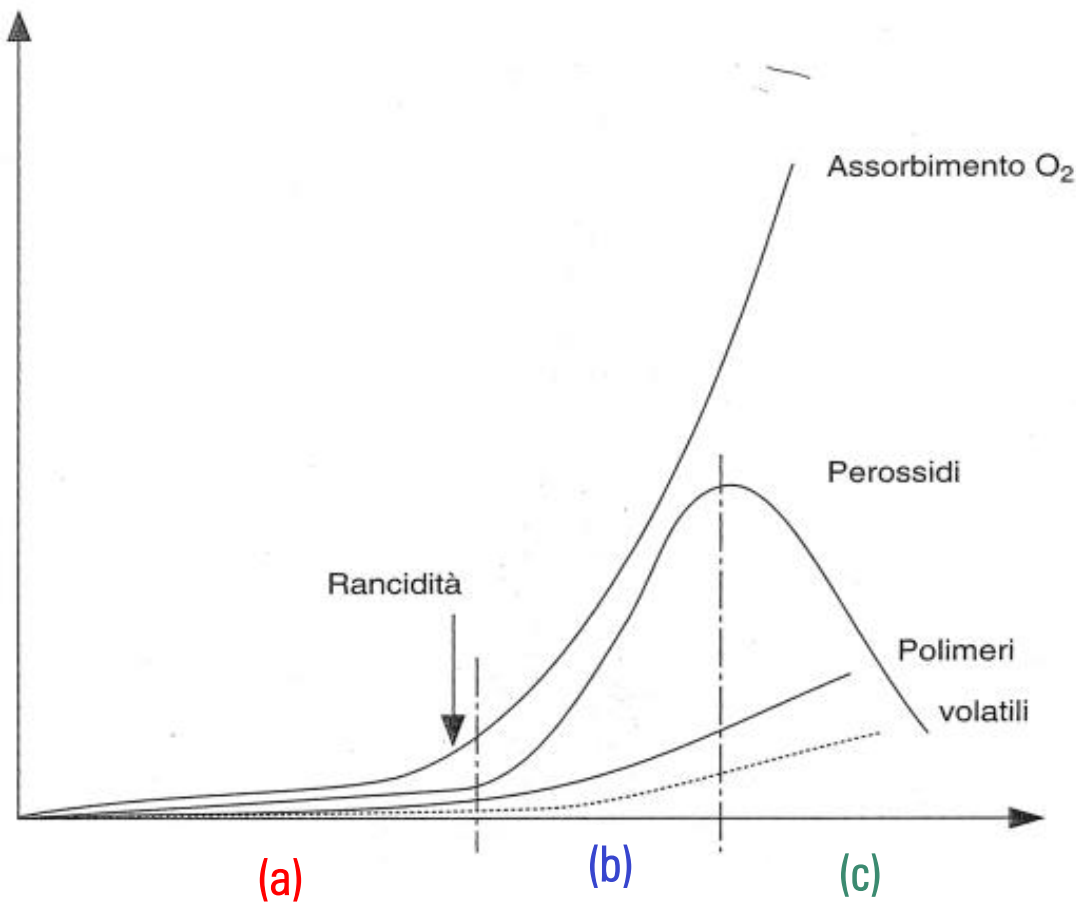
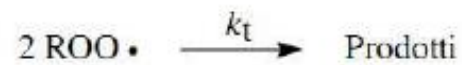
Iniziazione (a)



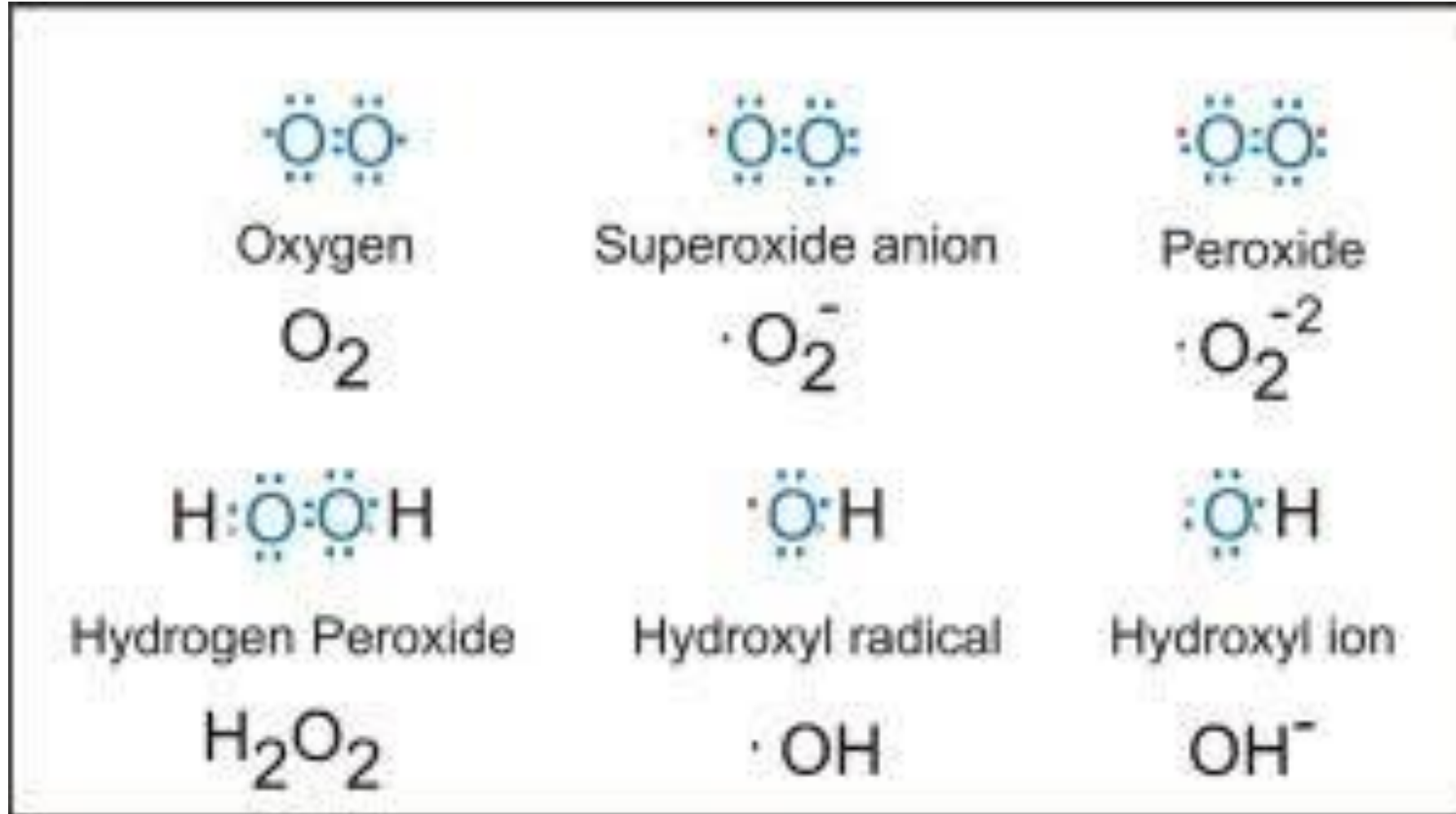
Propagazione (b)



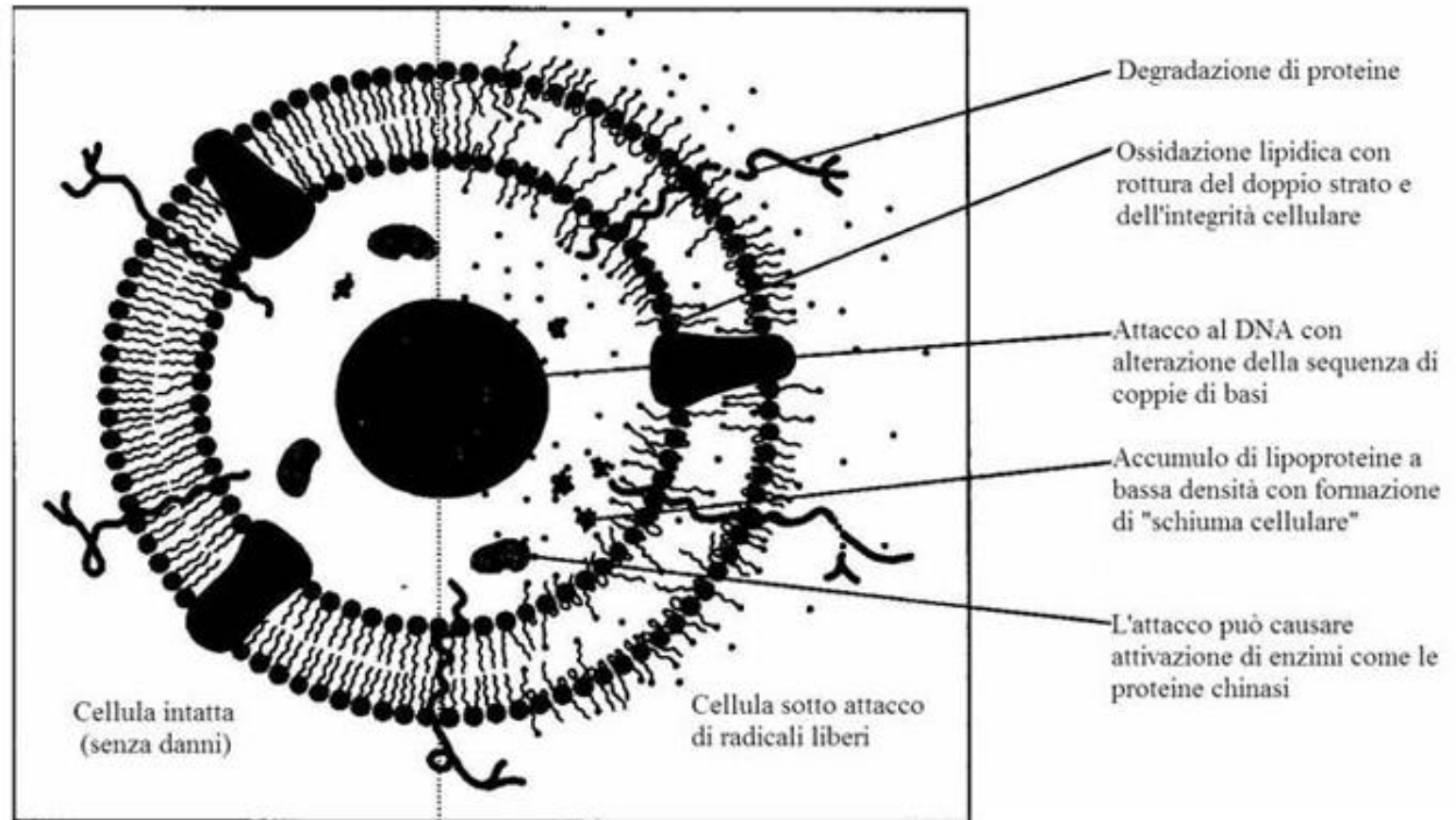
Terminazione (c)



# L'Ossigeno e le specie reattive dell'ossigeno



I metaboliti reattivi dell'ossigeno, come il radicale superossido e il radicale idrossile, essendo molecole altamente instabili con elettroni spaiati, reagiscono con gli acidi grassi polinsaturi della membrana cellulare per formare perossidi lipidici, ossidano e reticolano le proteine inclusi gli enzimi, o ossidano il DNA, con il potenziale di produrre un evento dannoso o addirittura letale.



*Fig.1 A sinistra è mostrata una cellula integra, a destra la stessa sotto attacco di radicali liberi.*



Le **difese cellulari** contro i radicali liberi e le specie reattive dell'ossigeno includono enzimi, come **catalasi**, **glutazione perossidasi (GPx)** e **superossido dismutasi**, nonché meccanismi antiossidanti non enzimatici, ad esempio glutazione (GSH).

Lo stress ossidativo si verifica quando **l'omeostasi redox** è inclinata verso uno sbilanciamento dei radicali liberi, a causa della loro sovrapproduzione o delle carenze nella difesa antiossidante. Lo stress ossidativo è stato implicato nella patogenesi di numerose malattie, come il diabete mellito, malattie cardiovascolari, tumori, e disturbi neurodegenerativi e psichiatrici.



- Importanza delle reazioni redox nel campo degli alimenti

OSSIDAZIONE di substrati costituenti gli alimenti

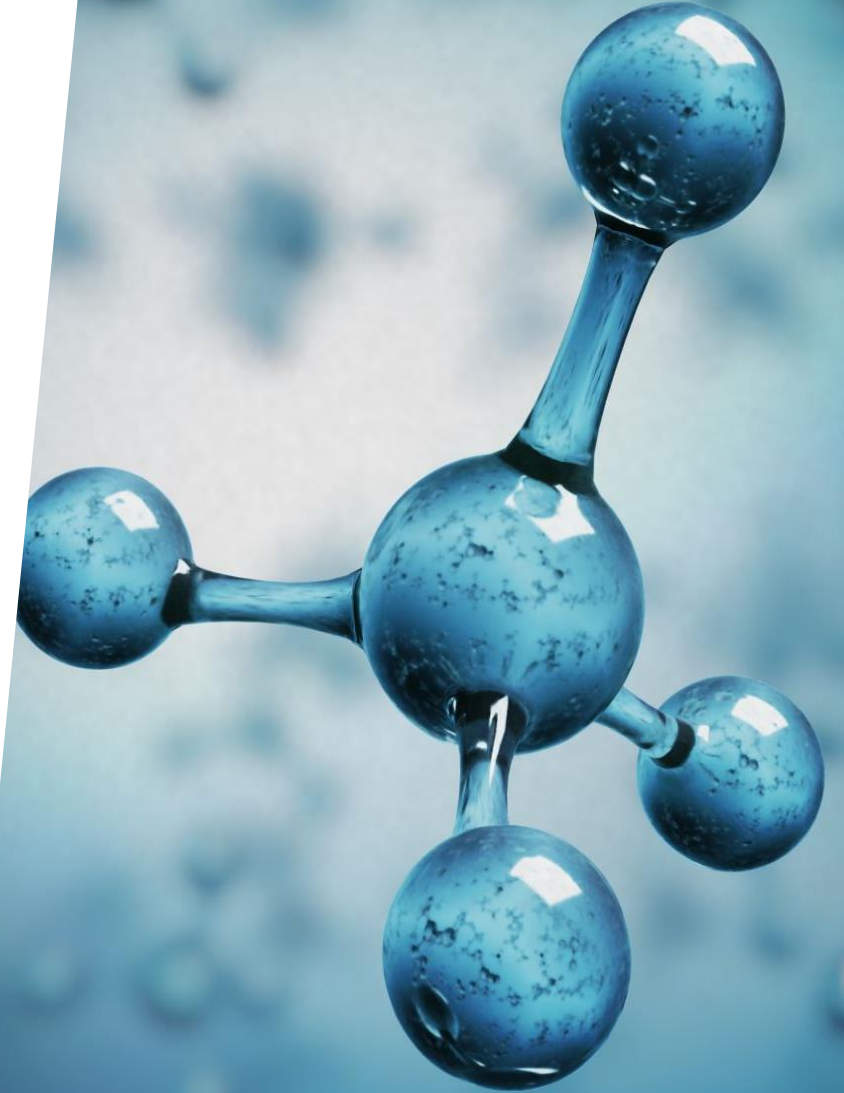
- Spoilage ossidativo degli alimenti
- Irrancidimento (acidi grassi), imbrunimento (polifenoli)

ANTIOSSIDANTI

Protezione degli alimenti dalle reazioni di ossidazione (Shelf Life)

Effetti nutraceutici sull'uomo

Valorizzazione commerciale dell'alimento



<b>Alimento</b>	<b>Fitochimici</b>	<b>Possibile Azione</b>
Aglio, cipolla, erba cipollina, porro	Solfuri diallilici	Funzioni antitumorali
Crucifere: Broccoli, cavolfiore, cavolo, kale, cavoletti di Bruxelles, rapa, bok choy, kohlrabi	Indoli, glucosinolati, Isotiocianati/tiocianati, tioli, indoli, glucosinolati, Isotiocianati/tiocianati, tioli	Stimolazione della produzione di enzimi che degradano gli agenti cancerogeni
Solanacee: pomodori, peperone	Carotenoidi (Licopene)	Classe di carotenoidi protettivi nei confronti del cancro alla prostata ed altri tipi di cancro
Umbrellifere: carote, sedano, prezzemolo, pastinaca,	Carotenoidi, Ftalidi, Poliacetileni	Funzioni antitumorali
Piante composite (carciofo)	Silimarina (flavolignani)	Epatoprotettore
Arance, limoni, pompelmo	Carotenoidi, monoterpene (limonene)	Può detossificare molecole promotrici del cancro
Altri frutti (uva, ciliegie, fragole, mele, anguria, melagrana)	Acido ellagico, fenoli, flavonoidi (quercetina)	Funzioni antitumorali
Grani, semi: Grano, fagioli, soia, orzo, avena, lino, brown rice inibitori delle proteasi	Flavonoidi (isoflavoni) acido fitico Saponine	Bloccano i recettori per gli ormoni che promuovono il cancro
Erbe, spezie (ginger, menta, rosmarino, timo, origano, salvia, basilico, tumeric, cumino, finocchio)	Gingerols Flavonoidi Monoterpene (limonene)	Aiutano l'attività di enzimi protettivi
Radici di Licorizia tea verde	Saponine triterpenoidiche Catechine	Antiossidanti correlati alla bassa incidenza di tumori all'apparato gastrointestinale

# La chimica degli antiossidanti: AO idrofili

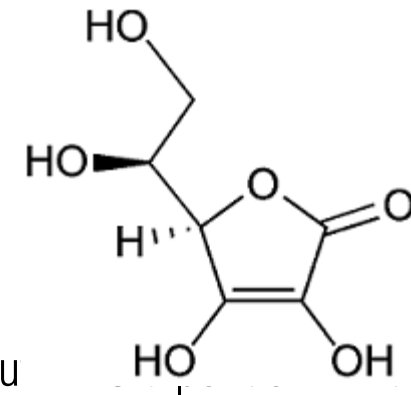
L'acido ascorbico agisce attraverso:

Azione di scavenger delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Inibizione enzimatica (AA come cofattore essenziale per le diossigenasi  $\alpha$ -chetoglu  
controllo del **fattore inducibile dall'ipossia (HIF) -1**, un fattore di trascrizione che regola molti geni responsabili della crescita del tumore e dell'infiammazione. **L'inibizione** dipendente dalla vitamina C del percorso HIF può spiegare l'effetto osservato **in studi in vitro** dell'azione di AA nel controllare la progressione del tumore, le infezioni e l'infiammazione.

Ruolo della vitamina C nella formazione di addotti covalenti con **metaboliti secondari elettrofili** (*elettrofili come ossidanti in quanto avidi di elettroni*)

Azione riducente dell'acido ascorbico →



## Acido Ascorbico AZIONE RIDUCENTE

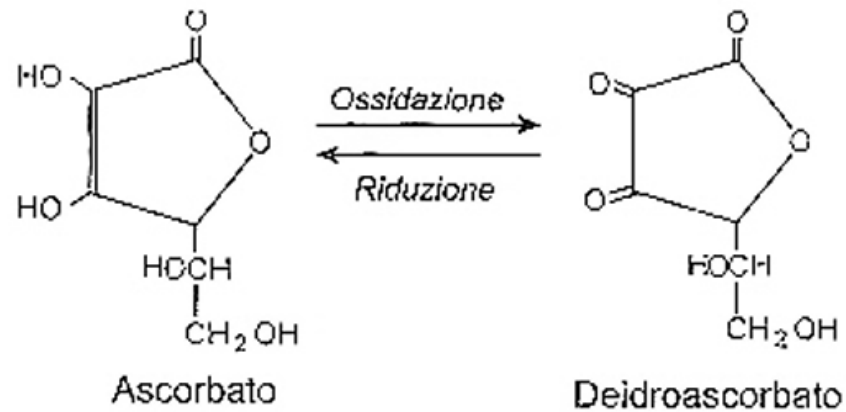


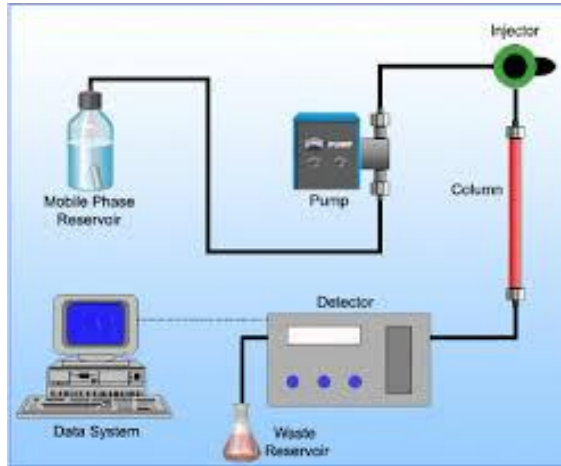
Fig. 1 - Interconversione fra ascorbato e deidroascorbato.

Questo meccanismo d'azione è alla base della azione di conservante dell'acido ascorbico negli alimenti

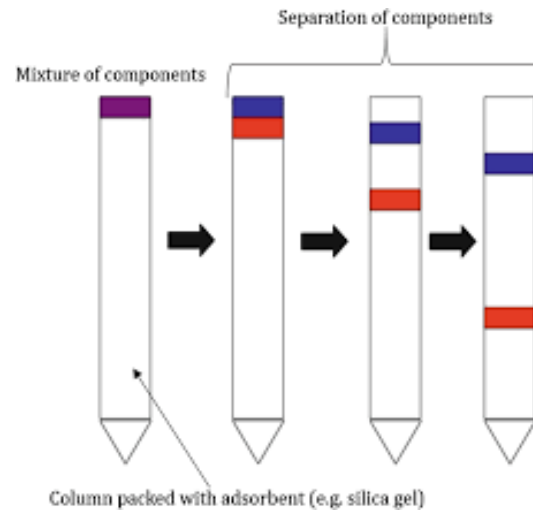
## Additivi alimentari

- E 300 ACIDO ASCORBICO
- E301 SODIO L-ASCORBATO
- E302 CALCIO L-ASCORBATO
- E303 ACIDO DIACETIL-5,6-L-ASCORBICO
- E304 ASCORBILE PALMITATO → indica un ESTERE FORMATO DALL'UNIONE DELL'ACIDO ASCORBICO CON UN ACIDO GRASSO (PALMITICO O STEARICO)

# Metodi di Analisi: cromatografia



## Strumentazione



## Principio

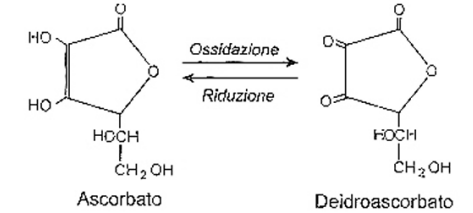
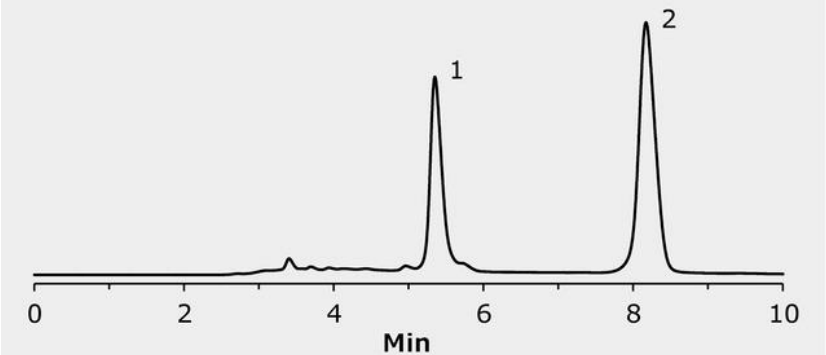


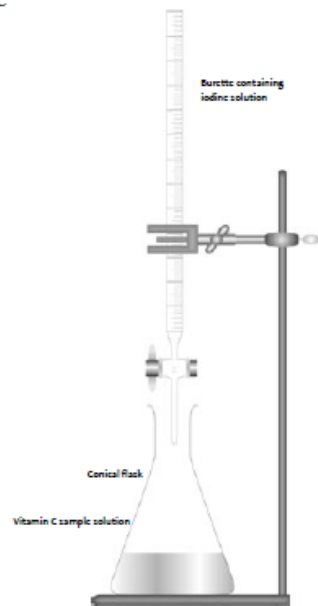
Fig. 1 - Interconversione fra ascorbato e deidroascorbato.

1. Dehydroascorbic acid
2. Ascorbic acid (vitamin C)



## Risultato

# Metodi di Analisi: titolazione iodometrica



Strumentazione

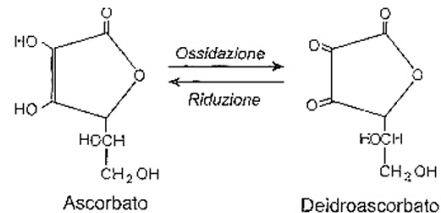
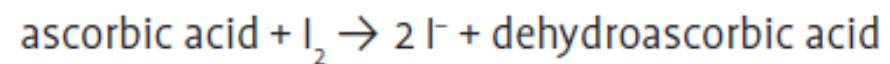


Fig. 1 - Interconversione fra ascorbato e deidroascorbato.



Principio

Succo arancia commerciale



Succo arancia fresco



Risultato

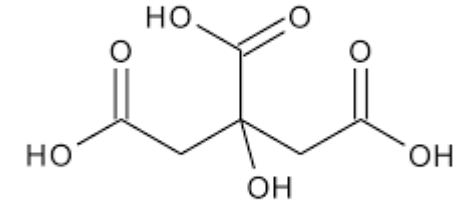
# La chimica degli antiossidanti: AO idrofili

L'acido citrico agisce attraverso:

L'acido citrico agisce sotto forma di citrato riducendo la perossidazione lipidica e limitando l'infiammazione

In vitro, il citrato ha migliorato la funzione endoteliale riducendo i marker infiammatori

Inoltre, è stato dimostrato che l'acido citrico riduce il danno epatocellulare provocato nei ratti dal tetracloruro di carbonio.



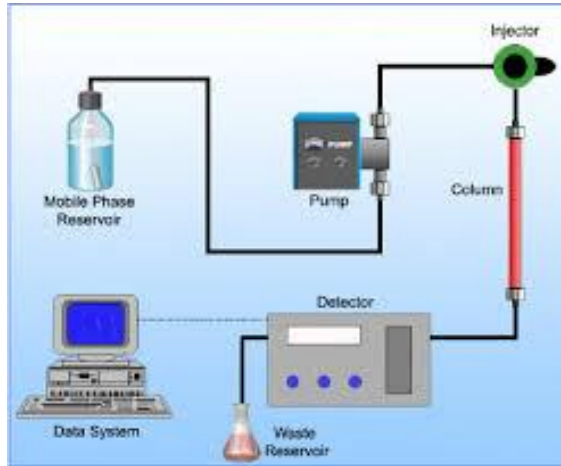
Acido citrico (acido 2-idrossi-1,2,3-propan-tricarbossilico)

Additivo alimentare

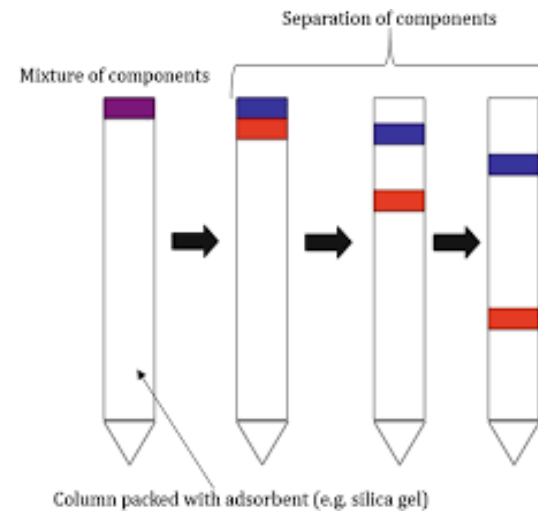
E330 acido citrico



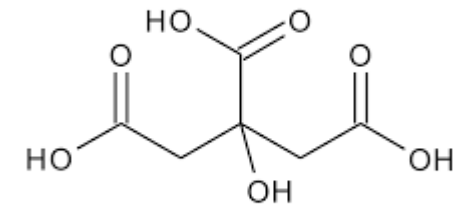
# Metodi di Analisi: cromatografia



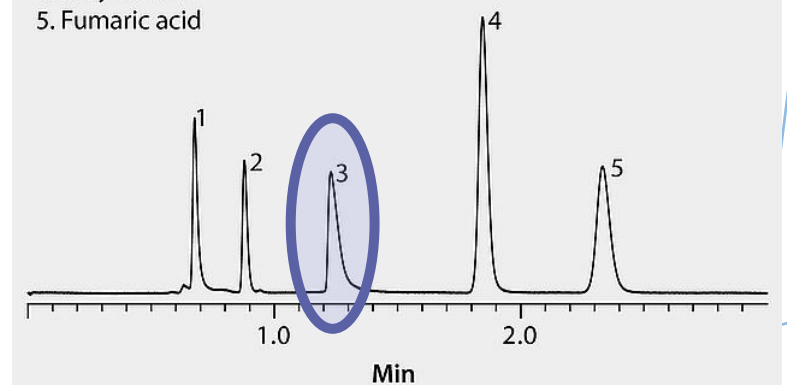
Strumentazione



Principio

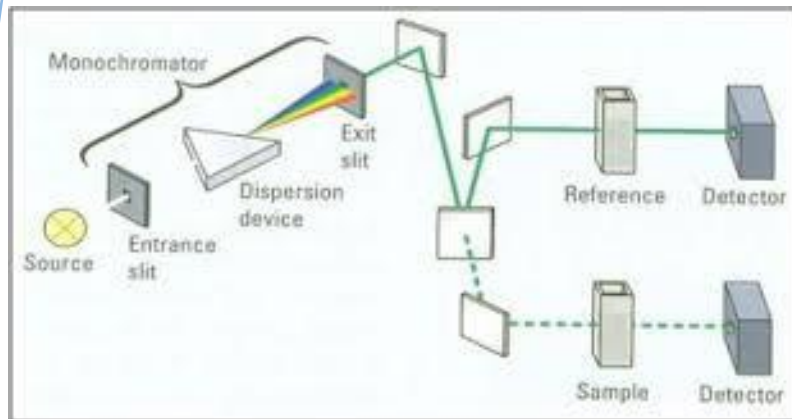


1. L-Tartaric acid
2. Lactic acid
3. Citric acid
4. Acrylic acid
5. Fumaric acid



Risultato

# Metodi di Analisi: spettrofotometria



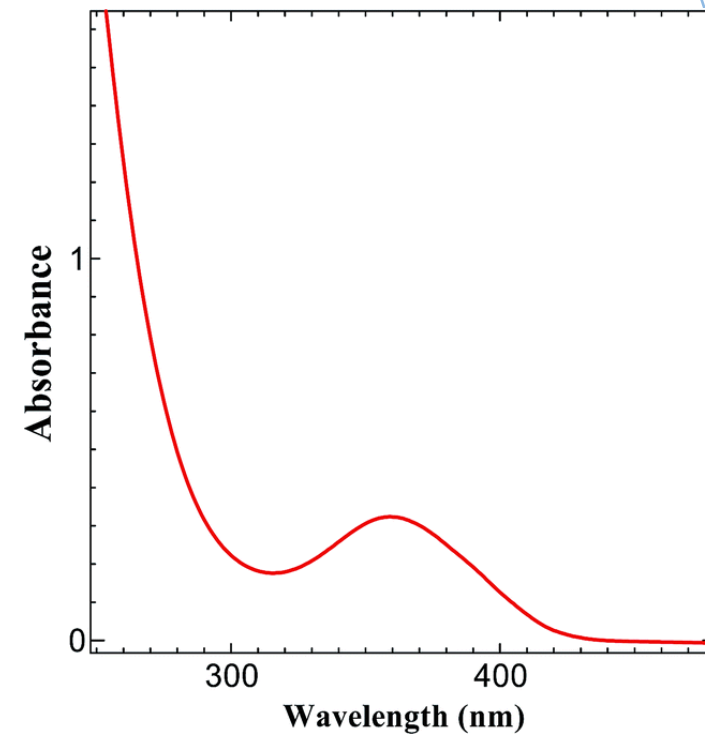
## Strumentazione

$A$   
 $\epsilon$   
 $c$   
 $l$

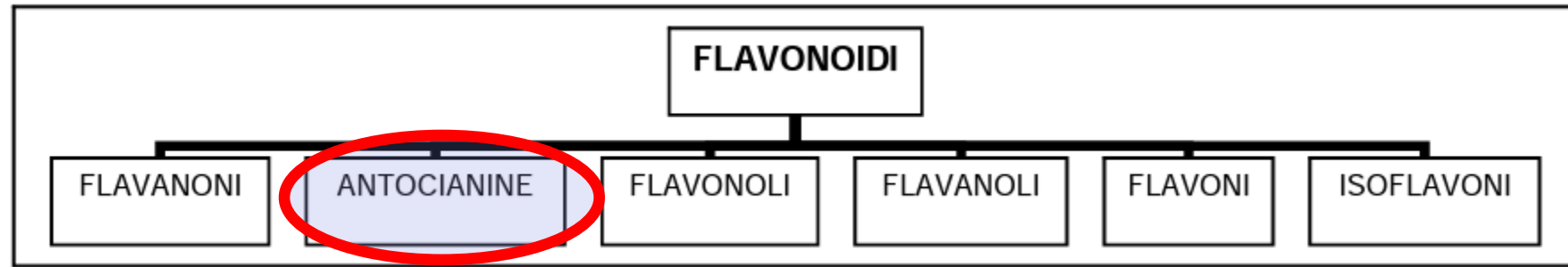
Absorbance  
Molar absorption coefficient  
Molar concentration  
optical path length

$M^{-1}cm^{-1}$   
 $M$   
 $cm$

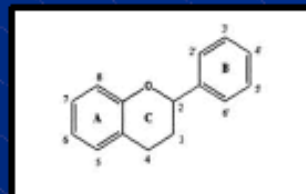
## Principio



Risultato



# FLAVONOIDI



Colorazione fiori/frutti/foglie

Attività antimicrobica  
(costitutiva o inducibile)  
ed antivirale

Inibizione spore dei patogeni  
Agenti antifungini

Proteggono la pianta da  
insetti ed erbivori

Attività antiossidante

Protezione verso gli UV-B

Inibiscono l'ossidazione delle LDL

Attività antiossidante  
(inclusa la stabilizzazione  
delle membrane attraverso  
la diminuzione della  
fluidità)

"French paradox"

Attività anti-infiammatoria

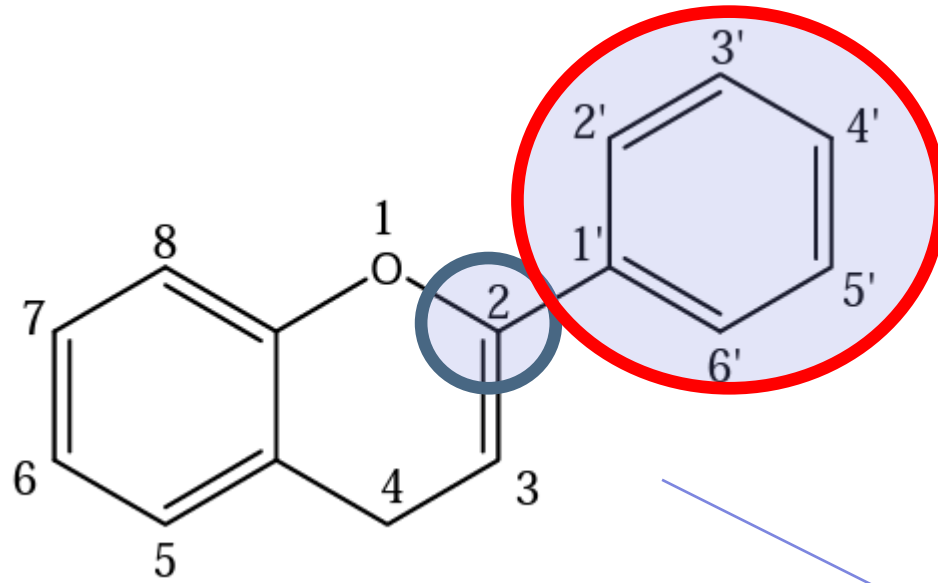
Attività vascolare esercitata su  
piastrine e monociti

Agenti antispasmodici ed  
antibatterici

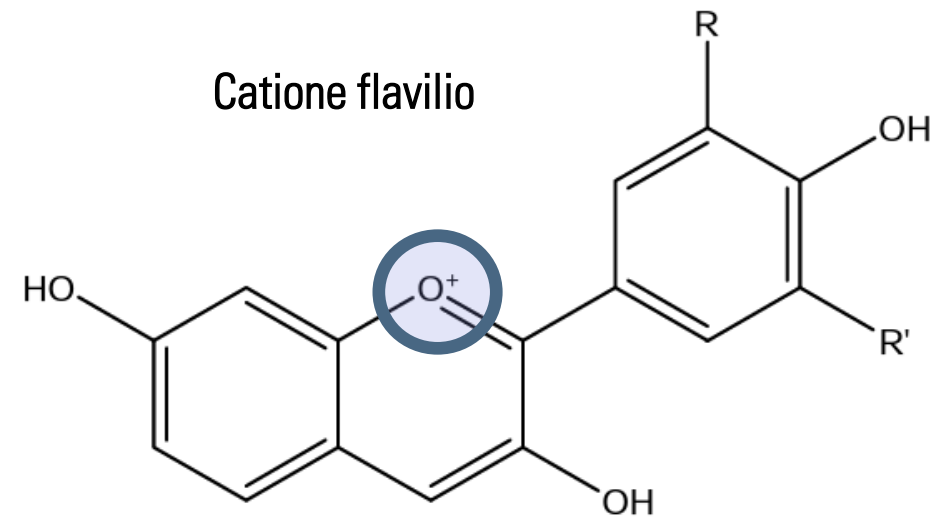
## Produzione dei flavonoidi in risposta a patogeni della pianta

Patogeni	Flavonoidi prodotti
<i>Phytophthora vignae</i>	Kievitone
Virus del tabacco	Kievitone
Microflora seminale	Kievitone
<i>Phytophthora vignae</i>	Daidzeina
<i>Phytophthora vignae</i>	Cumestrololo
<i>Colletotrichum nindemuthianum</i>	Vignafurano
Virus del tabacco	Faseollina
Virus del tabacco	Faseollidina
<i>Colletotrichum nindemuthianum</i>	2'-O-metilfaseollidinisoflavano
<i>Colletotrichum nindemuthianum</i>	Medicarpina

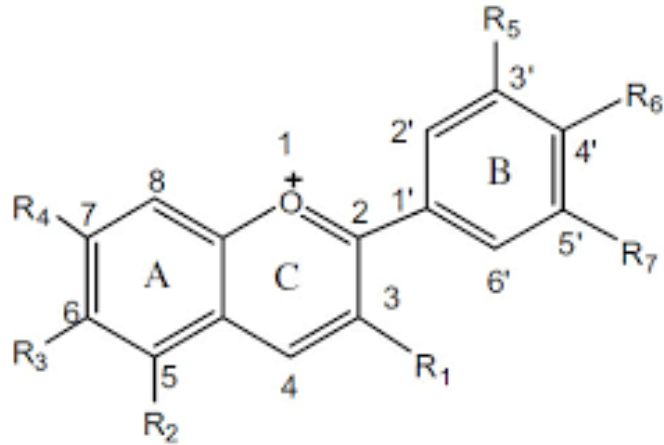
## 2-fenilcromano STRUTTURA BASE DEI FLAVONOIDI



Dai flavonoidi agli antociani



## Struttura base delle **antocianine**



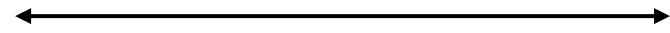
Le **antocianine**, una famiglia di molte centinaia di molecole, sono responsabili di gran parte della colorazione rossa, rosa, blu, malva, violetto e magenta che possiamo osservare nei petali dei fiori, come la malva o le petunie, nella frutta come l'uva, i mirtilli o le fragole, e nella verdura, come nella cipolla rossa o nel cavolo rosso.

Derivano dalle antocianidine, legate ad almeno un residuo zuccherino

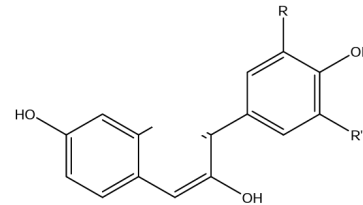
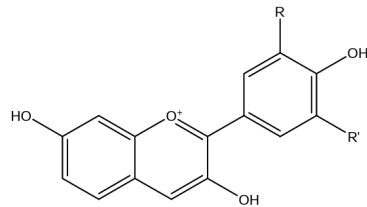
## Estratto di cavolo rosso in funzione del pH



pH 2



pH 12



La gradualità dei colori è data dalla presenza delle diverse forme in miscela a rapporti variabili

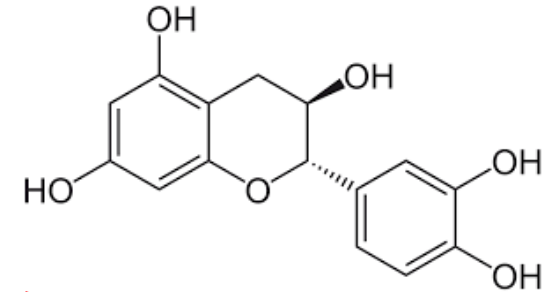
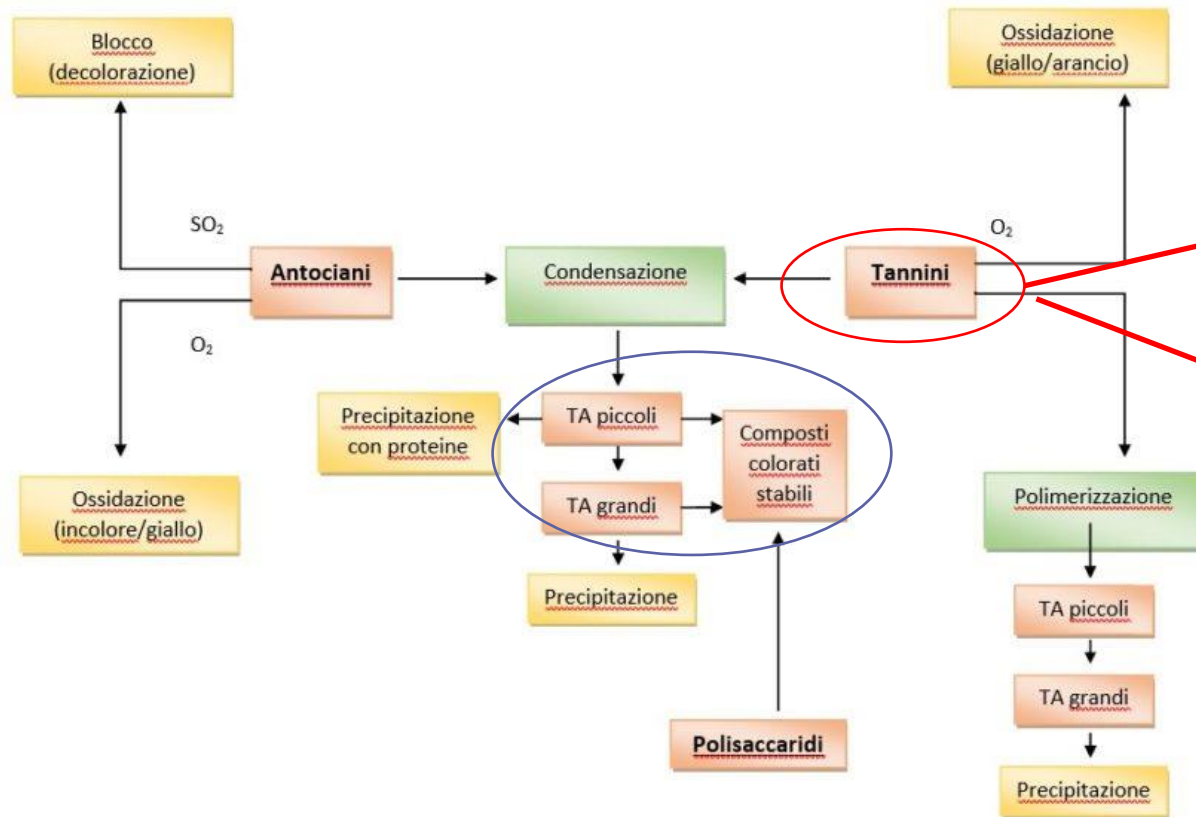


# Equilibri della cianidina

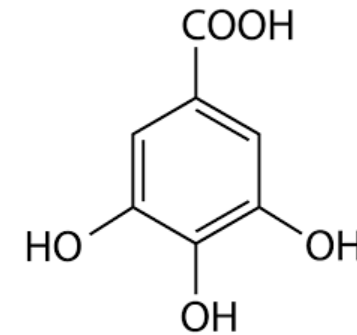


# Stabilizzazione del colore degli antociani

La stabilizzazione avviene attraverso meccanismi di condensazione con i Tannini



polimeri



## Flavonoidi presenti negli alimenti

Composto	Alimenti	Composto	Alimenti
enina	uva nera , vino rosso	epicatechina	uva nera, vino rosso
rutina	cipolla, mela, uva, broccoli, tè	naringenina	buccia degli agrumi
miricetina	uva,	taxifolina	agrumi
resveratrolo	uva nera, vino	tangeretina	agrumi
cianidina	uva, lamponi, fragole	tirosolo	olivo
delfinidina	melanzane	epigallocatechina	tè
quercetina	cipolla, mela, uva, broccoli, tè	luteolina	limone, olive, sedano
kemferolo	indivia, broccoli, tè	crisina	buccia della frutta
		apigenina	sedano, prezzemolo

## PRINCIPALI FUNZIONI

Flavonoidi antiossidanti sono presenti nella frutta, nei vegetali nel tè e nel vino ed hanno la capacità di inibire l'ossidazione delle proteine a bassa densità (LDL).



In studi in vitro con costituenti fenolici del vino rosso è stato trovato che essi inibivano l'ossidazione catalizzata dal rame delle LDL.

## Attività antiossidante degli antociani

Le **antocianine**, grazie alla loro struttura chimica, sono potenti **antiossidanti**: neutralizzano i **radicali liberi** e le **molecole ossidanti** prodotte dal metabolismo cellulare, esercitando quindi una serie di effetti benefici e protettivi sulla salute di cellule, tessuti e dell'organismo intero

**studi in vitro** e su modelli animali che evidenziano il ruolo delle fito-molecole nella protezione cardiaca e cardiovascolare, e dei meccanismi molecolari in cui sono coinvolti. Le antocianine infatti regolano diverse vie biochimiche coinvolte nello sviluppo e nell'eziologia delle malattie cardiovascolari.

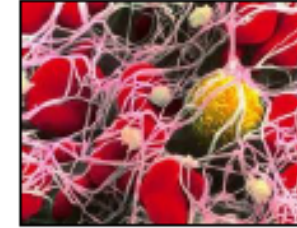
studi epidemiologici **pluriennali** su coorti specifiche (donne in post-menopausa), hanno dimostrato come **una dieta ricca in flavonoidi, e in particolare antocianine, riduce il rischio di morte per malattie cardiovascolari**

## Fenoli e UVA

<b>CLASSI</b>	<b>Sostanze più comuni</b>	<b>Localizzazione nella bacca</b>	<b>Concentrazione (mg/Kg peso fresco bacca)</b>
<b>Acido cinnammico</b>	Cumarico, caffeico, esteri dell'acido tartarico	Mesocarpo, pericarpo	0,02-0,1
<b>stilbeni</b>	resveratrolo	pericarpo	0,005-0,02
<b>flavonoli</b>	Quercitina, mirecitina	pericarpo	0,2-0,5
<b>antocianine</b>	Cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina, malvidina, (glucosidi)	Pericarpo (uva rossa)	1-5
<b>proantocianidine</b>	Catechina, galocatechina, epicatechina, epigallocatechina (presenti come monomeri o polimeri)	Pericarpo e tegumenti del seme (solo catechina e epicatechina)	4-7 (semi) 2-6(pericarpo, più elevato nell'uva rossa)

## PRINCIPALI FUNZIONI

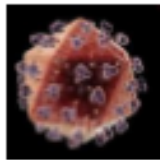
**Inibiscono l'aggregazione piastrinica (effetto antitrombotico)**



**Promuovono la vasodilatazione (effetto ipotensivo e antiritmico)**



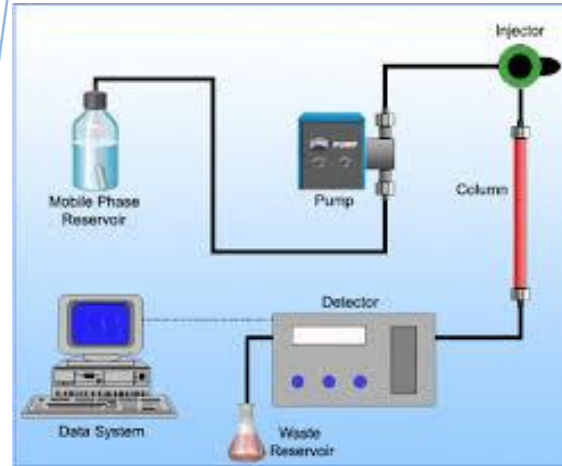
**Modificano la sintesi degli eicosanoidi (effetti anti-ipertensivi e anti-infiammatori)**



**Attività antivirale soprattutto nei confronti del virus responsabile dell'immunodeficienza umana (HIV) responsabile dell'AIDS.**



# Metodi di Analisi: cromatografia

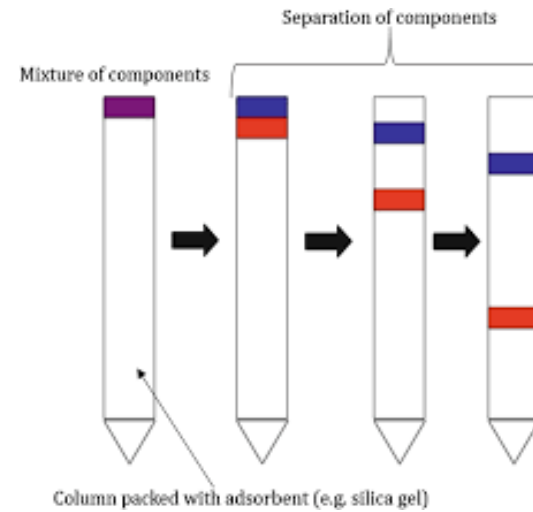


Strumentazione

Method OIV-MA-AS315-11

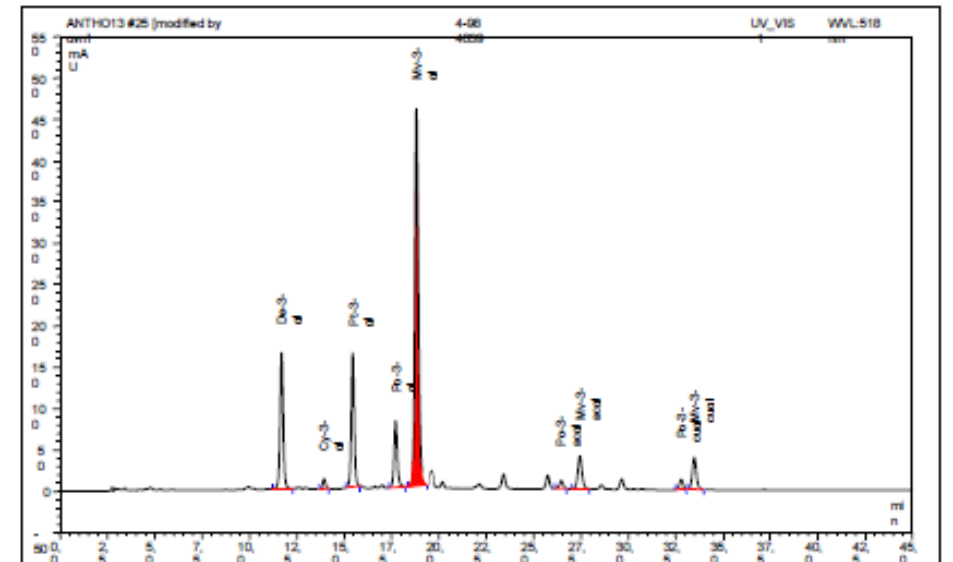
Type II method

## HPLC-Determination of nine major anthocyanins in red and rosé wine



Principio

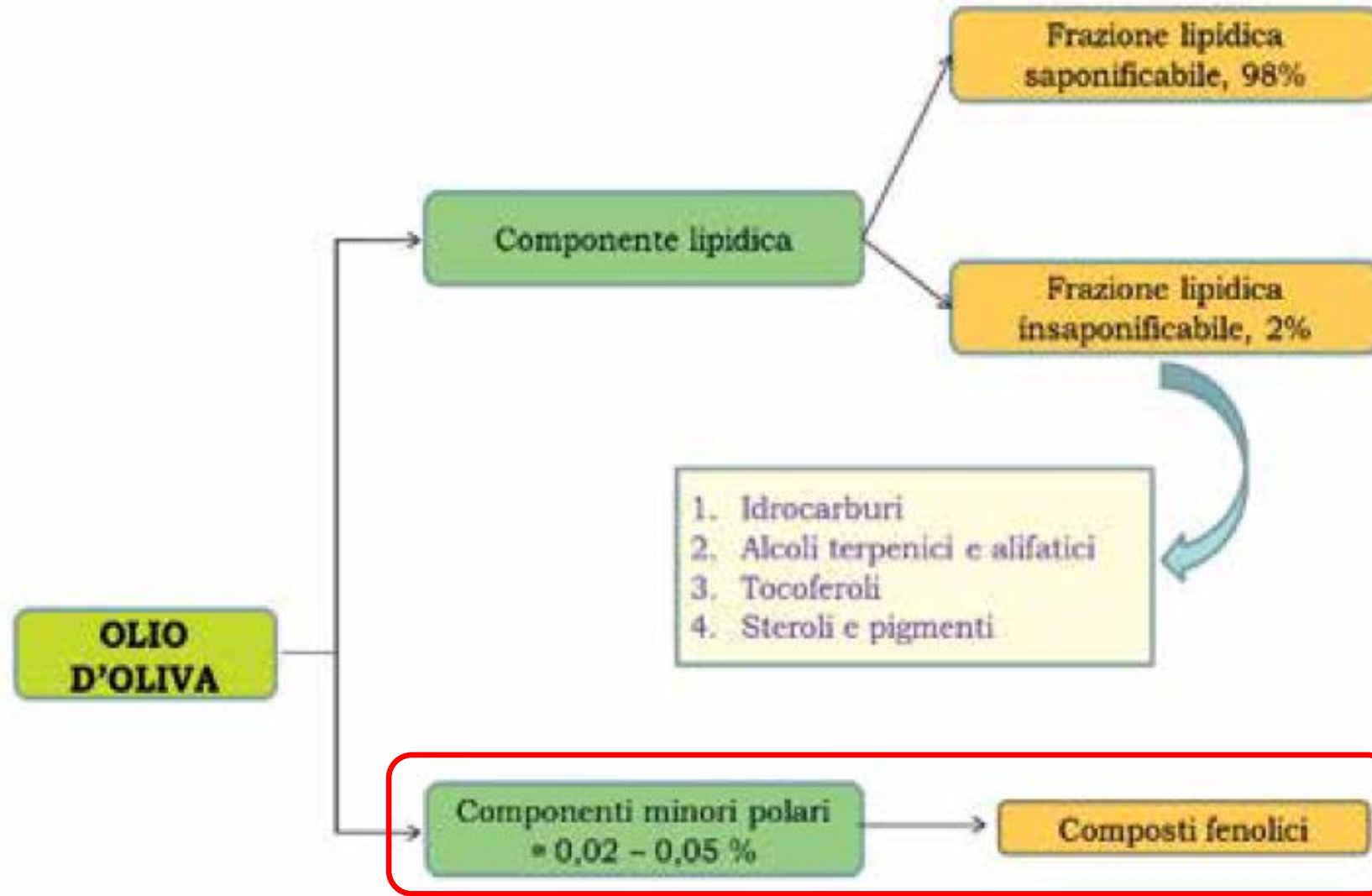
Figure 1: Separation of 9 anthocyanins in red wine



Risultato



# I COMPOSTI FENOLICI DELL'OLIO DI OLIVA



# COMPOSIZIONE CHIMICA DELL'OLIO DI OLIVA

Frazione saponificabile 98-99%

## Trigliceridi

Acidi grassi monoinsaturi  
*oleico 55,4-83%*



Acidi grassi saturi:  
*palmitico 5,7-8%, stearico 0,5-4%, altri*

Acidi grassi polinsaturi:  
*linoleico 3,5-20%, linolenico 0,1-0,85%*

Frazione insaponificabile 1-2%

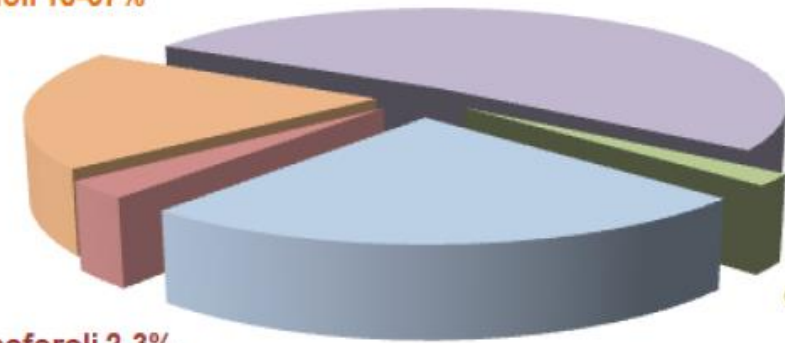
Polifenoli 18-37%

Tocoferoli 2-3%

Alcoli 20-35%

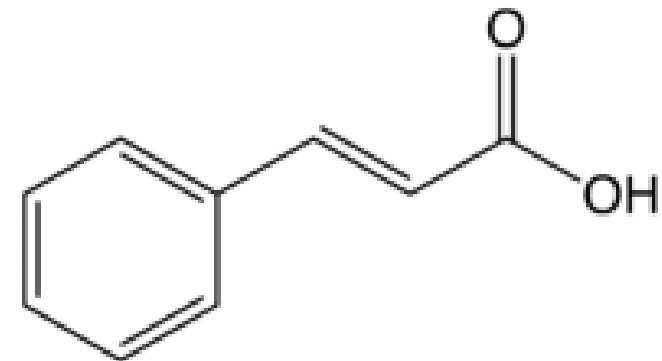
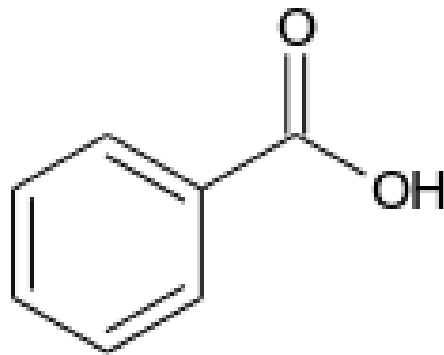
Idrocarburi 50-60%

Steroli  
e comp.colorati  
2-3%



I composti fenolici e polifenolici dell'olio d'oliva possono essere classificati in **fenil-acidi, secoiridoidi, fenil-alcoli, flavonoidi e lignani.**

I fenil-acidi presenti nell'olio d'oliva derivano dall'acido benzoico e cinnamico.

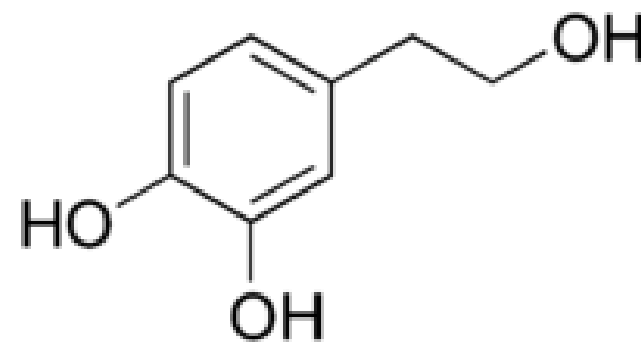
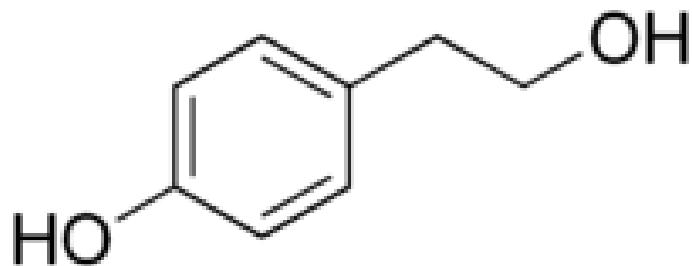


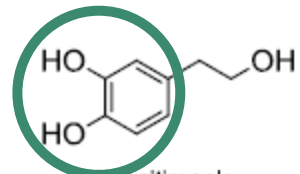
A questi composti appartengono l'**acido caffeico, vanillico, siringico, para-cumarico, orto-cumarico, protocatechico, sinapico e para-idrossibenzoico**

Oltre agli acidi fenolici la famiglia dei composti fenolici e polifenolici, caratteristici **dell'olio d'oliva**, comprende composti semplici come il **tirosolo** e l'**idrossitirosolo** e composti più complessi come i derivati secoiridoidi.

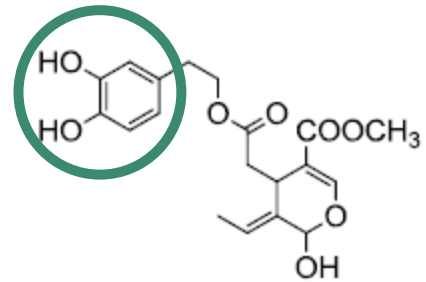
In particolare per questa classe di composti, l'oleaceina e l'oleuropeina aglicone sono derivati dell'idrossitirosolo mentre l'oleocantale e ligstroside aglicone sono derivati del tirosolo

#### FUNZIONALITA FENOLICA SEMPLICE O ORTODIFENOLICA

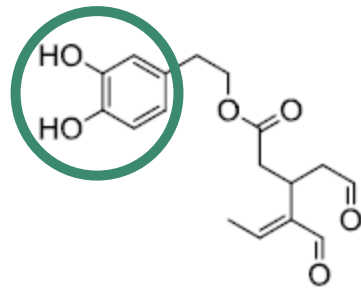




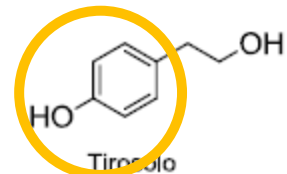
Tirosolo



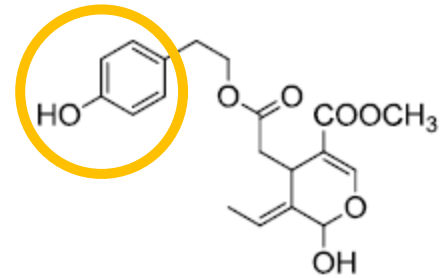
Oleuropeina aglicone



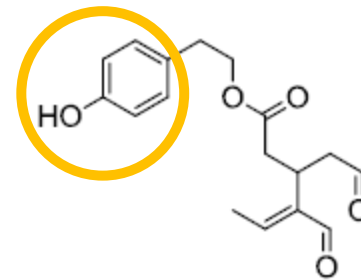
Oleaceina



Tirosolo



Ligstroside aglicone



Oleocantale

## ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE DELLE FORTE ORTO E NON ORTO

**La forma ORTO presenta maggiore suscettibilità all'ossidazione** → ovvero maggiore capacità antiossidante (caratteristica postiva per un'antiossidante)...MA

Questi fenoli sono rappresentano la prima linea di difesa allo stress ossidativo

«consumati» prima  
meno stabili al calore

**Le forme NON-ORTO minor suscettibilità** → minore capacità antiossidante → maggiore stabilità

Ricadute applicative del diverso profilo fenolico in oli diversi

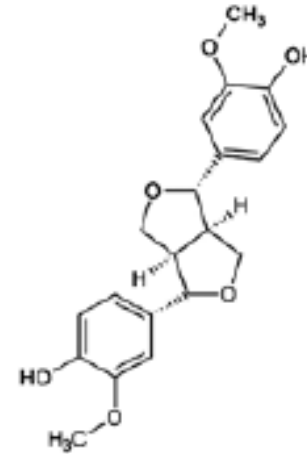
## La produzione dei **fenil-alcoli**

Le concentrazioni dei fenil-alcoli sono generalmente basse nell'olio appena franto e tendono ad aumentare durante lo stoccaggio grazie all'idrolisi operata dalla beta-glucosidasi (contenuta nel frutto) dei secoiridoidi che li contengono nella loro struttura; ovvero oleuropeina e ligstroside a dare i corrispondenti derivati **agliconici** oleaceina, oleocantale, oleuropeina aglicone e ligstroside aglicone.

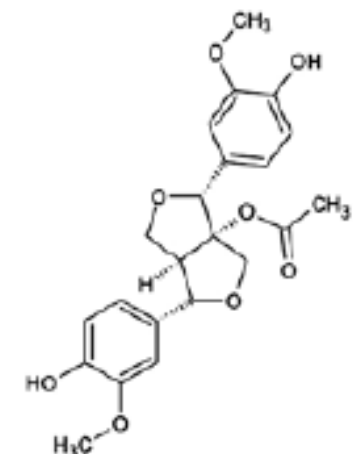
I **lignani** sono una classe di composti fenolici presenti negli oli d'oliva; dopo i secoiridoidi rappresentano la classe più abbondante di composti fenolici.

l'interesse verso questa classe di composti fenolici sta crescendo fortemente, principalmente grazie alla vasta gamma di **potenzialità terapeutiche** che sono state evidenziate in numerosi lavori scientifici

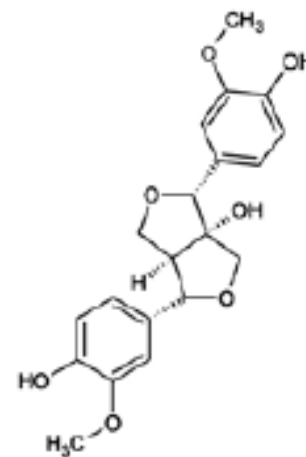
ruolo come **marker di qualità per gli oli vergini di oliva**, e in particolare nella **lotta alle frodi** riguardanti l'aggiunta illecita di oli raffinati a oli extravergini (STABILITA' TERMICA-DEODORAZIONE)



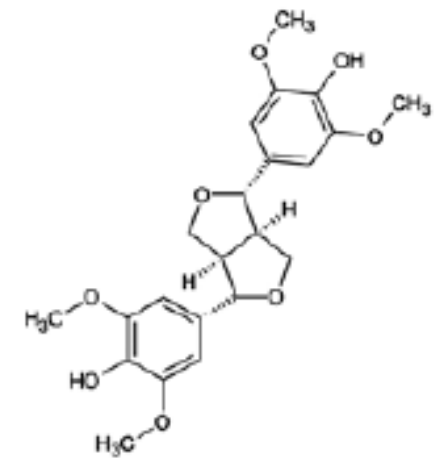
(+)-pinoresinolo



(+)-1-acetossipinoresinolo



(+)-1-idrossipinoresinolo



(+)-siringaresinolo



La concentrazione dei lignani negli oli può dipendere da molti fattori, fra cui:

- varietà di olive (cultivar);
- area di coltivazione;
- clima;
- tipo di raccolta;
- grado di maturazione, anche se in maniera non significativa;
- eventuale denocciolatura;
- tecniche di produzione;
- trasporto e stoccaggio;
  
- **Non dipende dalla temperatura**

<b>Cultivar</b>	<b>(+)-pinoresinolo (mg/kg)</b>	<b>(+)-1-acetossipinoresinolo (mg/kg)</b>
<b>Arbequina</b>	2.8 - 46.2	5.1 - 77.3
<b>Brisighella</b>	12.4	23.4
<b>Chemlali Stax</b>	1.7	6.2
<b>Coratina</b>	8.4	41.1
<b>Cornicabra</b>	4.4 - 74.5	1.2 - 4.9
<b>Empeltre</b>	11.7 - 19.0	31.5 - 40.0
<b>Frantoio</b>	4.2 - 55.1	40.7 - 82.0
<b>Hojiblanca</b>	7.0 - 53.2	3.4 - 78.2
<b>Lechín de Granada</b>	3.5	0.9
<b>Lechín de Sevilla</b>	0.6	26.8
<b>Picual</b>	6.9 - 36	0.2 - 4.9
<b>Picudo</b>	4.5 - 31.2	0.6 - 12.5
<b>Riviera ligure</b>	8.8	27.1
<b>Sariulak</b>	45.3 - 109.3	54.3 - 123.5
<b>Tuscia</b>	8.9	15.7

**Tabella 2. Range di valori di concentrazione di (+)-pinoresinolo e (+)-1-acetossipinoresinolo in diverse cvs**

## Lignani in cultivar italiane

COMPOSTI FENOLICI	(+)-1-ACETOSSIPINORESINOLO	(+)-1-PINORESINOLO
<b>CULTIVAR ITALIANE</b>		
Carolea	69,3 ± 0,8	96,6 ± 0,9
frantoio	58,7 ± 0,9	66,7 ± 0,9
Coratina	59,8 ± 0,6	66,5 ± 0,8
Moraiolo	31,0 ± 0,3	52,6 ± 0,6
Canino	26,4 ± 0,2	137,0 ± 1,0
Cerasuola	26,7 ± 0,1	166,1 ± 1,1
Biancolilla	42,2 ± 0,1	107,0 ± 0,6
Nocellara	31,9 ± 0,1	123,0 ± 0,7
<b>CULTIVAR SPAGNOLE</b>		
Cornicabra	9,8 ± 0,2	124,2 ± 0,4
Hojiblanca	21,8 ± 0,2	61,4 ± 0,4

## fenoli in cultivar italiane

Derivati dei secoiridoidi  
derivati da oleuropeina e da  
ligstroside aglicone

COMPOSTI FENOLICI	CORATINA	MORAIOLO	FRANTOIO	CAROLEA	LECCINO
3,4-DHPEA-EA	2,0 ± 0,3	2,1 ± 1,8	1,4 ± 1,4	2,7 ± 2,0	7,9 ± 1,1
p-HPEA	0,9 ± 1,0	0,9 ± 0,7	0,8 ± 0,9	0,7 ± 1,1	12,3 ± 1,6
3,4-DHPEA-EDA	382,4 ± 138,2	340,0 ± 26,2	154,0 ± 26,1	268,0 ± 11,4	67,6 ± 15,5
p-HPEA-EDA	193,2 ± 65,2	99,8 ± 61,2	89,8 ± 7,9	189,6 ± 89,7	12,5 ± 6,2
3,4-DHPEA-EA	177,5 ± 92,6	157,1 ± 84,5	84,1 ± 1,0	134,5 ± 56,3	47,2 ± 15
polifenoli totali	755,9 ± 153,1	599,9 ± 67,1	330,1 ± 27,3	595,5 ± 106,5	147,5 ± 22,5

## Come si ottiene un olio ricco di polifenoli?

### *Fattori agronomici*

ambiente di coltivazione,

la cultivar

la difesa da parassiti

Irrigazione/stress idrico

periodo di raccolta



### *Fattori tecnologici*

frangitura

conservazione

Infatti, considerando la stessa "cultivar", la concentrazione fenolica nell'olio d'oliva proveniente da **uliveti irrigati può essere del 50% inferiore** a quella osservata negli oliveti non irrigui. Alcune norme applicate alla gestione dell'irrigazione, come esporre gli uliveti a giorni **di stress idrico prima della raccolta**, possono comportare un incremento del contenuto fenolico.

COMPOSTI FENOLICI	IRRIGATO	IRRIGATO CON DEFICIT	NON IRRIGATO
3,4-DHPEA*	2,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,9 <sup>a</sup>
p-HPEA	7,7 ± 0,8 <sup>a</sup>	7,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,4 <sup>b</sup>
3-4 DHPEA-EDA	130,1 ± 25,9 <sup>a</sup>	291,7 ± 40,3 <sup>b</sup>	318,5 ± 39,1 <sup>b</sup>
p-HPEA-EDA	80,2 ± 11,8 <sup>a</sup>	128,2 ± 25,6 <sup>b</sup>	129,9 ± 24,1 <sup>b</sup>
(+)-1-acetossipinoresinolo	4,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	6,0 ± 2,6 <sup>a</sup>
(+)-pinoresinolo	44,8 ± 6,7 <sup>a</sup>	49,7 ± 5,6 <sup>a</sup>	47,2 ± 7,9 <sup>a</sup>
3-4 DHPEA-EA	114,1 ± 19,2 <sup>a</sup>	139,6 ± 20,1 <sup>a</sup>	185,5 ± 23,0 <sup>b</sup>

# PERIODO DI RACCOLTA

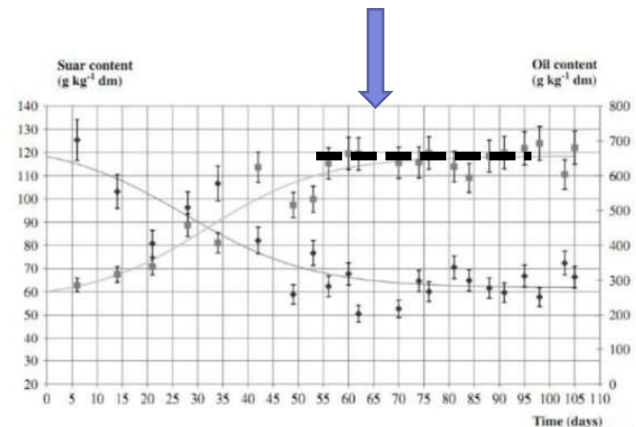
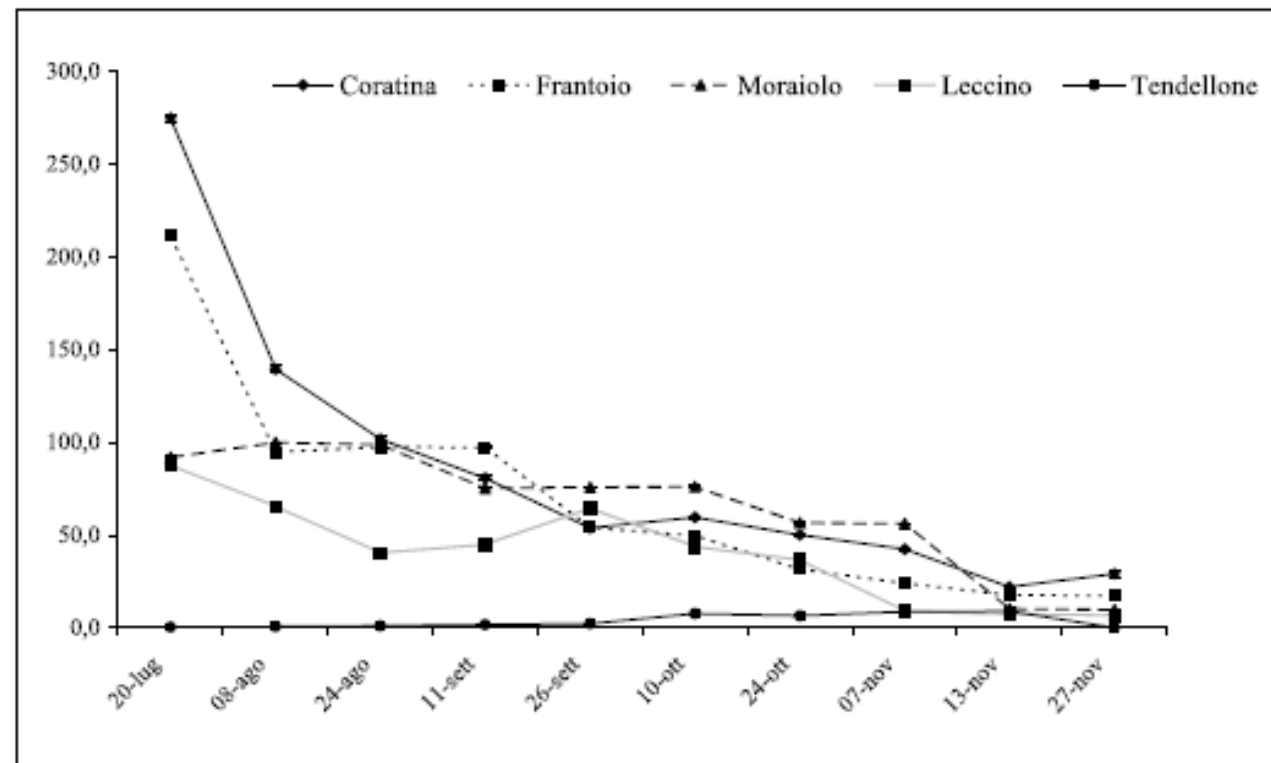


Figura 1. Variazione del contenuto in olio e zuccheri di olive cv *Frantoio* raccolte una volta a settimana dall'inizio di settembre agli inizi di dicembre azienda sita a Bagno a Ripoli, Firenze. Entrambi i dati sono espressi in  $g \cdot kg^{-1}$  di sostanza secca

Tabella 1. Determinazione degli stadi di maturazione.

Stadi di maturazione	di	Epitelio	Polpa	Nocciolo
Acerbo	Verde	Verde	Verde	Verde
Acerbo	Bruno	Verde	Verde	Verde
Giustamente maturo	Bruno	Bruno	Verde	Verde
Giustamente maturo	Nero	Bruno	Bruno	Bruno
Maturo	Nero	Nero	Bruno	Bruno
Maturo	Nero	Nero	Nero	Nero



## Dalla Chimica alla Nutraceutica...


Recentemente l'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare), secondo il Regolamento CE 1924/2006, ha approvato un "health claim" con il quale si riconoscono specifici effetti salutistici dell'olio d'oliva riferiti a composti fenolici e polifenolici quali tirosolo, idrossitirosolo e oleuropeina:

**"i polifenoli dell'olio d'oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo; questa indicazione può essere impiegata solo per l'olio d'oliva che contiene almeno 5 mg di idrossitirosolo e suoi derivati (ad esempio complesso oleuropeina e tirosolo) per 20 g di olio d'oliva" (dose giornaliera raccomandata)**

## Claim nutrizionali consentiti dal regolamento comunitario

Regolamento UE n. 432/2012 della Commissione europea del 16 maggio 2012 ha definito un elenco di health claims consentiti.

I claims devono essere comprensibili per il consumatore e devono dimostrare, sulla base di prove scientifiche, il valore nutrizionale o benefico dell'alimento.

Elenco dei claim salutistici autorizzati per l'olio d'oliva 			
Tipo di claim	Sostanza nutritiva, sostanza di altro tipo, alimento o categoria di alimenti	Claim	Condizione d'uso
Salutistico di tipo funzionale (art. 13.1)	Polifenoli dell'olio di oliva	I polifenoli dell'olio di oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo	Affinché siano assunti 5 mg di fenoli bioattivi in 20 g di olio d'oliva è necessario che la concentrazione di bio-fenoli nel prodotto sia $\geq 250$ mg/kg (polifenoli totali almeno $\geq 300$ mg/kg) fino al termine minimo di conservazione, periodo entro il quale gli oli di oliva vergini mantengono le loro proprietà specifiche in adeguate condizioni di conservazione. Essendo molecole che vanno incontro a reazioni di ossidazioni, il contenuto iniziale di bio-fenoli, per garantire la validità del claim per almeno 18 mesi dalla data di imbottigliamento, dovrebbe essere almeno pari al doppio della quantità minima necessaria.
Salutistico di tipo funzionale (art. 13.1)	Vitamina E	FORTE DI VITAMINA E La vitamina E contribuisce alla protezione delle cellule dallo stress ossidativo	Ciò significa che considerata la razione di 20 g/die e la percentuale del 15% dell'RDA, è necessario che la concentrazione di vitamina E nel prodotto sia $\geq 90$ mg/kg. Essendo una molecola che va incontro a reazioni di ossidazioni, il contenuto iniziale di Vitamina E, per garantire la validità del claim per almeno 18 mesi dalla data di imbottigliamento, dovrebbe essere almeno pari al doppio della quantità minima necessaria.
Salutistico di tipo funzionale (art. 13.1)	Acido oleico	RICCO DI ACIDI GRASSI INSATURI* La sostituzione nella dieta dei grassi saturi con grassi insaturi contribuisce al mantenimento di livelli normali di colesterolo nel sangue. L'acido oleico è un grasso insaturo	Si applica se almeno il 70% degli acidi grassi presenti nel prodotto derivano da grassi insaturi e a condizione che gli stessi apportino oltre il 20% del valore energetico del prodotto.
Salutistico per la riduzione del rischio di malattia (art. 14)	Acidi grassi monoinsaturi e/o polinsaturi	RICCO DI GRASSI INSATURI * È stato dimostrato che, sostituendo grassi saturi con grassi insaturi nell'alimentazione si abbassa/riduce il colesterolo nel sangue. Il colesterolo alto è un fattore di rischio per lo sviluppo di patologie cardiache coronariche.	Si applica se almeno il 70% degli acidi grassi presenti nel prodotto derivano da grassi insaturi e a condizione che i grassi insaturi apportino oltre il 20% del valore energetico del prodotto.

\*I claim sugli acidi grassi possono essere applicati anche agli oli di oliva e di sansa di oliva

## La misura IN-VITRO DELL'ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

L'attività antiossidante totale dipende 1) dalla varietà chimica presente e 2) dagli effetti sinergistici tra le differenti molecole presenti

Per misurare l'attività antiossidante di una o più molecole si deve disporre di un metodo che misuri una reattività

Metodo per **attività** antiossidante  $\neq$  analisi chimica

Caratteristiche generali

ricomprendere l'attività sviluppata da quante più specie chimiche possibili  
privo di interferenze da ossigeno atmosferico  
rapido e basso costo

Quindi.... un metodo per l'attività antiossidante descrive un parametro funzionale del campione piuttosto che descrivere la sua composizione chimica!

Ovvero: la correlazione tra concentrazione analitica delle molecole ad attività antiossidante non necessariamente rispecchia l'attività antiossidante misurata



## Metodo ORAC

Il metodo ORAC, acronimo di "Oxygen Radical Absorbance Capacity", è uno dei metodi maggiormente impiegati e descritti in letteratura per la valutazione della capacità antiossidante, espressa come capacità di scavenging delle molecole antiossidanti nei confronti del radicale alchilperossido  $\text{ROO}\cdot$ .

Il principio del test ORAC è quello di misurare il decadimento dell'intensità di fluorescenza di una molecola target, in seguito alla formazione di radicali  $\text{ROO}\cdot$ , ottenuti tramite la decomposizione termica di un azocomposto organico.

I radicali alchilperossilici si attaccano sulla struttura molecolare del composto fluorescente, determinando un effetto di **spegnimento o "quenching"** di fluorescenza, che viene monitorato nel tempo.

# Metodo ORAC

Il radicale **alchilperossido spegne** la fluorescenza

Gli **antiossidanti RITARDANO** questo spegnimento

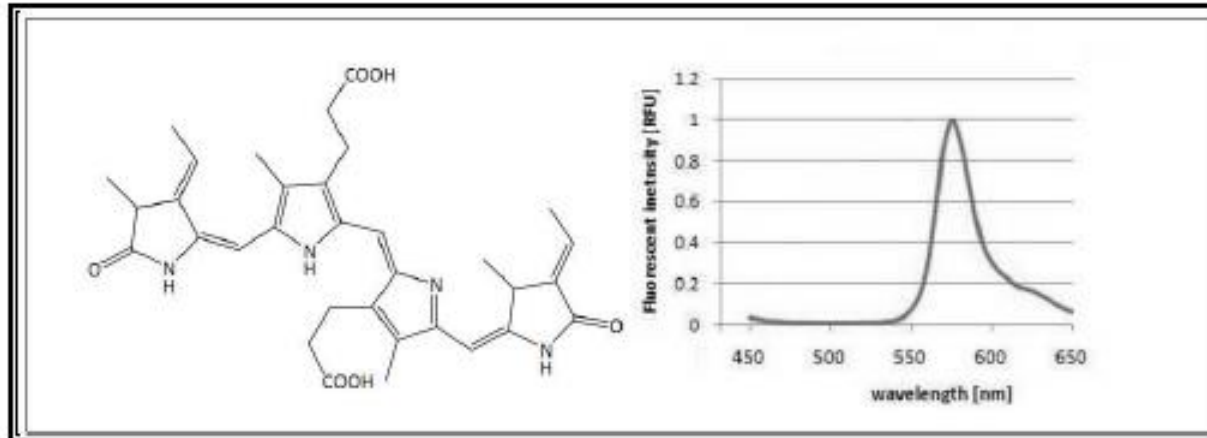


Figura 2.1: struttura molecolare e spettro di emissione della  $\beta$ -ficoeritrina.

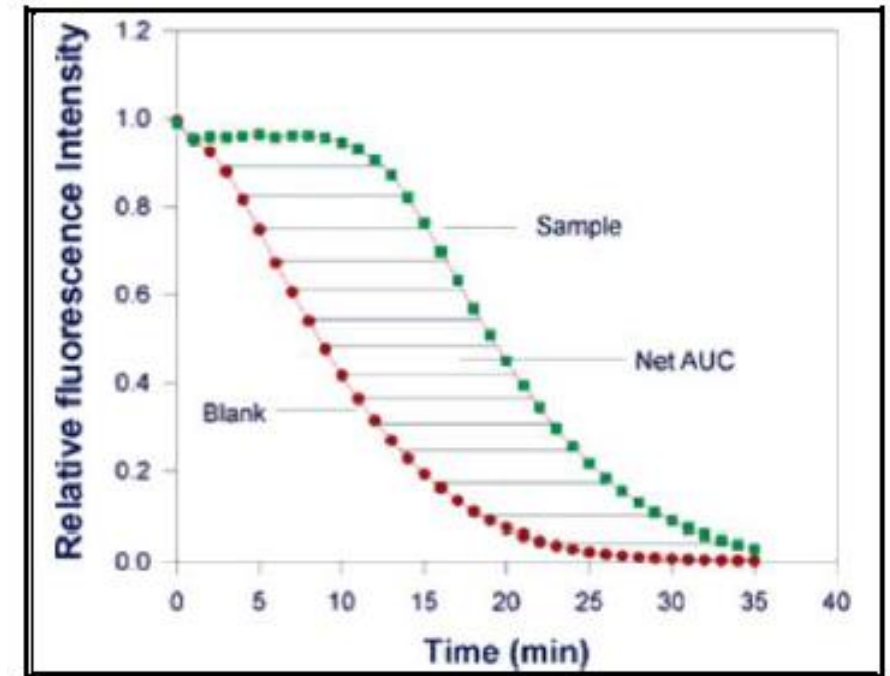


Figura 2.5: Perdita di Fluorescenza nell'analisi ORAC[19].

## METODO DPPH

Tra i saggi spettrofotometrici impiegati per la determinazione dell'AOC, viene molto sfruttato, soprattutto a livello di routine, il saggio DPPH. Il DPPH(2,2'-Difenil-1- picrilidrazile) è un **radicale stabile organico azotato**,

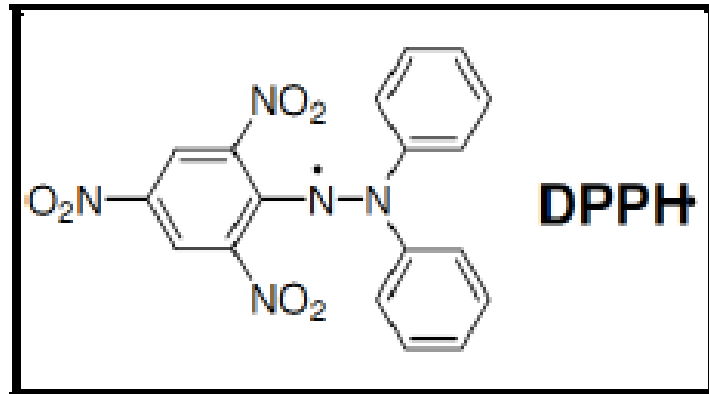


Figura 2.13 Struttura molecolare del radicale DPPH.

Può essere misurato per via spettrofotometrica

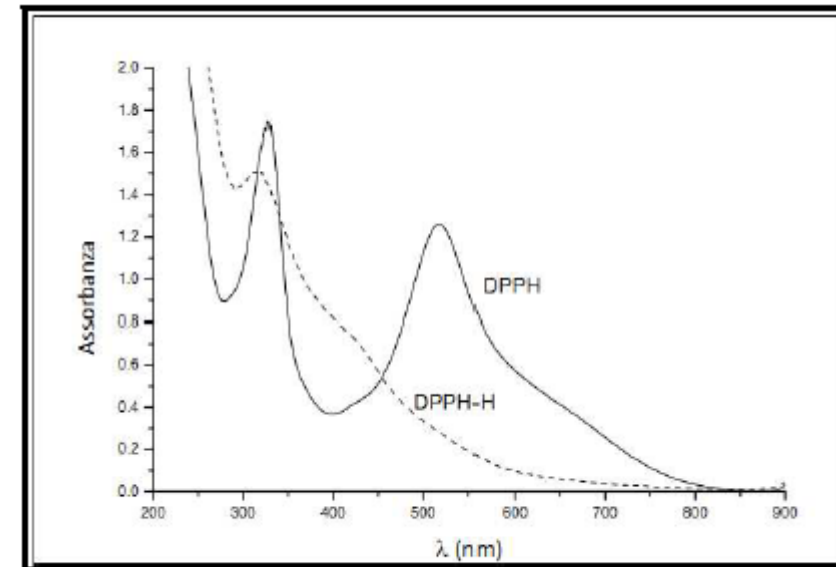


Figura 2.14 Spettro di assorbimento del DPPH radicalico e non.

## Principio del metodo DDPH

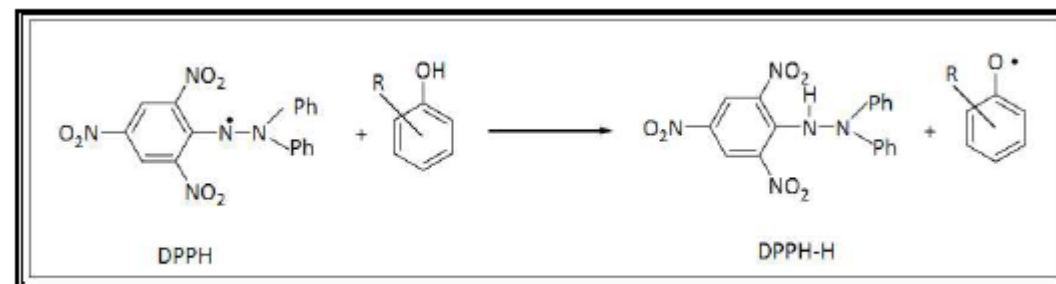


Figura 2.15 Meccanismo di reazione per il DPPH.

- In presenza di una specie antiossidante il radicale viene «spento» e non genera più segnale
- La quantità di spegnimento dipende dalla capacità delle diverse molecole di reagire con l'elettrone spaiato

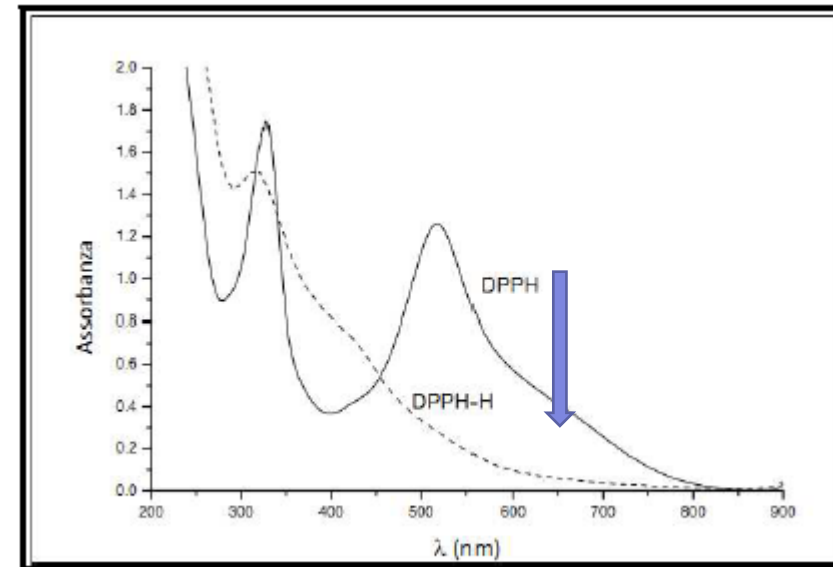
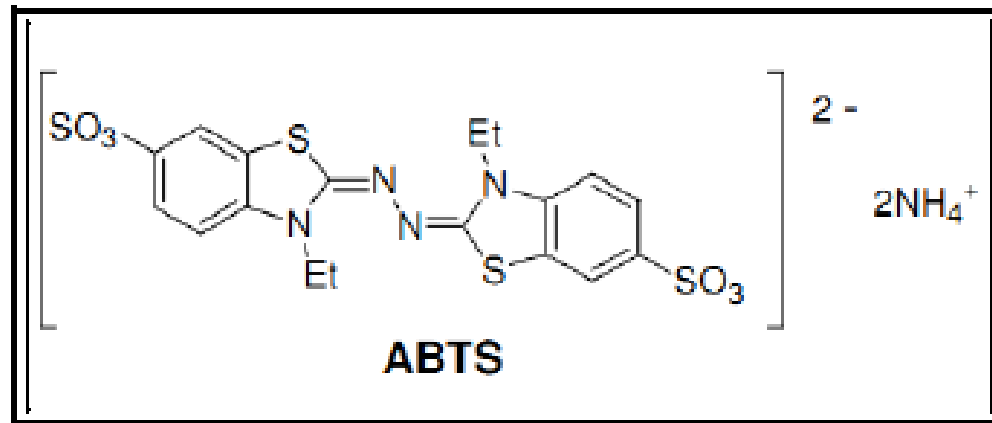


Figura 2.14 Spettro di assorbimento del DPPH radicalico e non.

## METODO ABTS

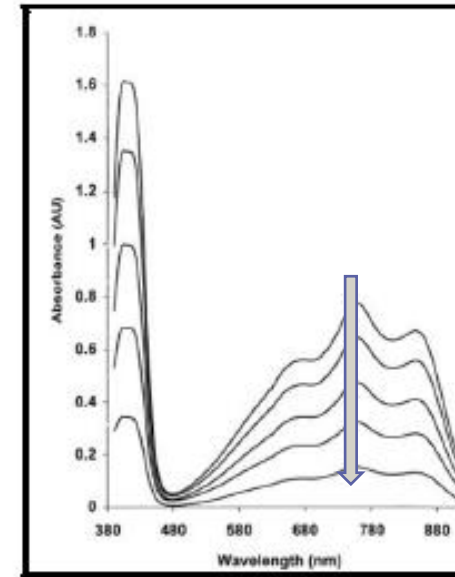
Test spettrofotometrico valuta la capacità antiossidante attraverso l'abilità di rimozione radicalica da parte del catione radicalico ABTS<sup>•+</sup> (acronimo di acido 2,2'-azinobis(3-eilbenzotiazoline-6- solfonico)).

Tale radicale, viene generato attraverso una reazione di ossidazione del composto incolore ABTS con il persolfato di sodio o di potassio



Il catione radicalico così generato è molto stabile nel tempo, ed è caratterizzato da una intensa colorazione blu-verde (con massimi di assorbimento localizzati a 415, 645, 734 e 815 nm)

in seguito all'aggiunta di uno o più antiossidanti nell'ambiente di reazione, questi cedono uno o più atomi di idrogeno al radicale cationico, determinando così un decremento del valore iniziale dell'assorbanza valutato alla  $\lambda_{max}$ .



$\lambda_{max}$  417 nm  
 $\lambda_{max}$  645 nm  
 $\lambda_{max}$  734 nm  
 $\lambda_{max}$  815 nm

Figura 2.10 Spettro di assorbimento del radicale  $ABTS^+$  [31].

Il metodo viene calibrato con una molecola di riferimento detta trolox.

L'attività di un campione viene espressa come «TROLOX EQUIVALENTI»



Figura 2.12 Kit Randox® per il saggio ABTS.

## Saggio colorimetrico basato su nanoparticelle d'oro

Caratteristiche analitiche desiderate del dosaggio:

- a) lavorare in solvente acquoso-organico
- b) applicazione su matrice alimentare grassa,
- c) senza estrazione c)
- d) veloce, facile da usare, economico e rispettoso dell'ambiente (minimo uso di solventi)

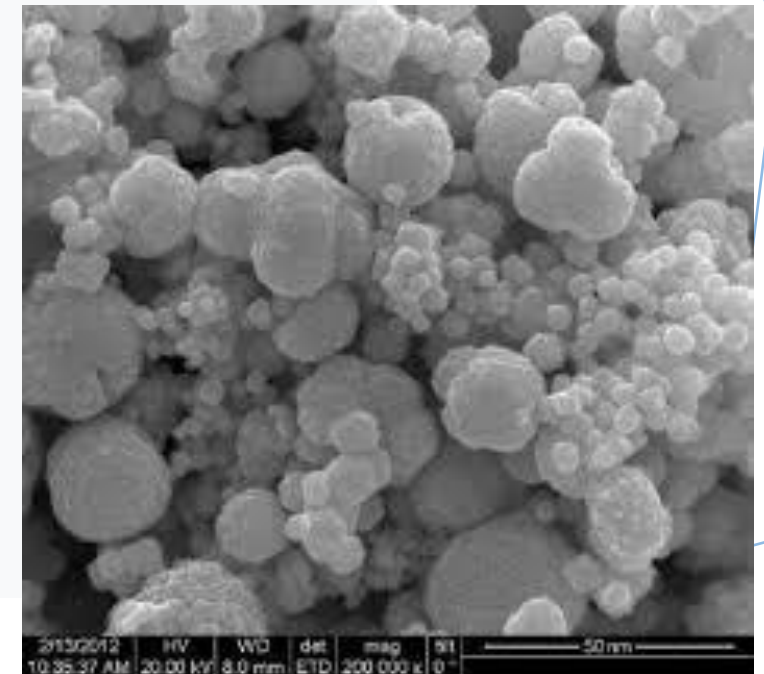


Perché i nanomateriali?

I nanomateriali sono ampiamente utilizzati in vari campi della chimica analitica  
In particolare, le nanoparticelle d'oro (AuNP) mostrano:

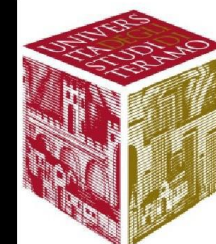
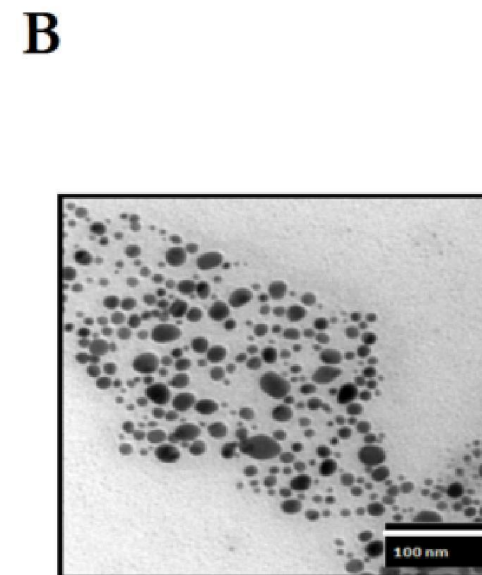
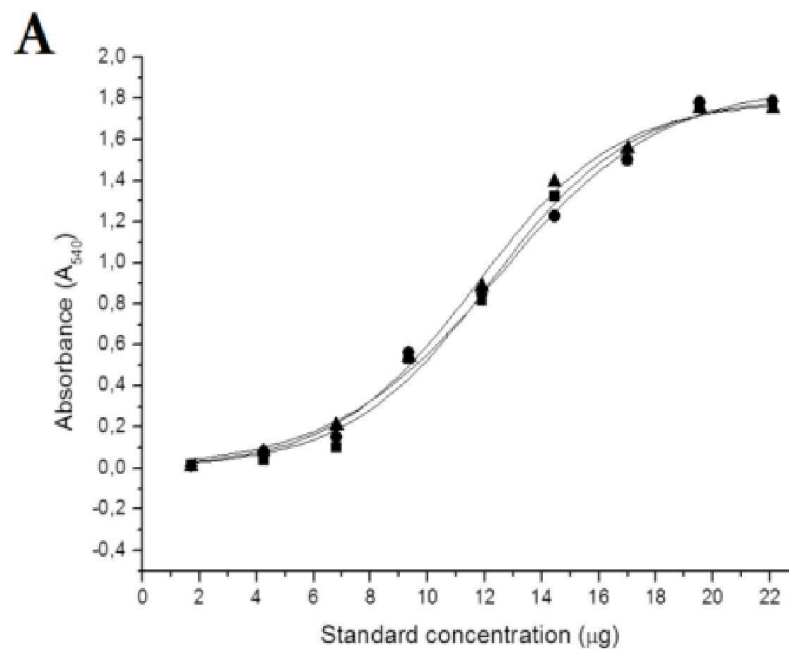
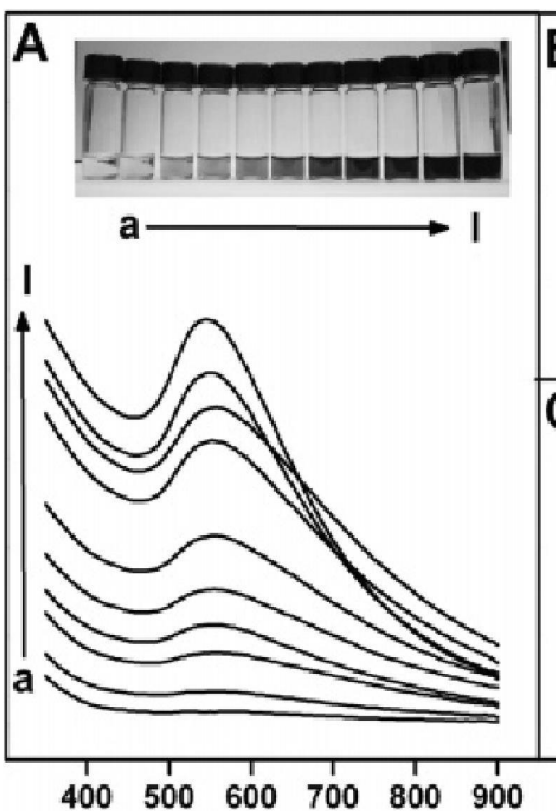
proprietà catalitiche, stabilità –  
prodotto da vari tipi di sintesi con differenti diametro –  
sono facilmente funzionalizzabili (con diverse molecole) –

**mostrato proprietà ottiche uniche**



## Principio chimico del metodo

I polifenoli sono in grado di guidare la sintesi di AuNP (diametro  $\leq 25$  nm), riducendo Au(III) a Au<sup>0</sup> attraverso un meccanismo di riduzione





# Applicazione del metodo in solvente organico

Permette di lavorare con alimenti ricchi di grassi  
senza estrazione o con minima purificazione del campione

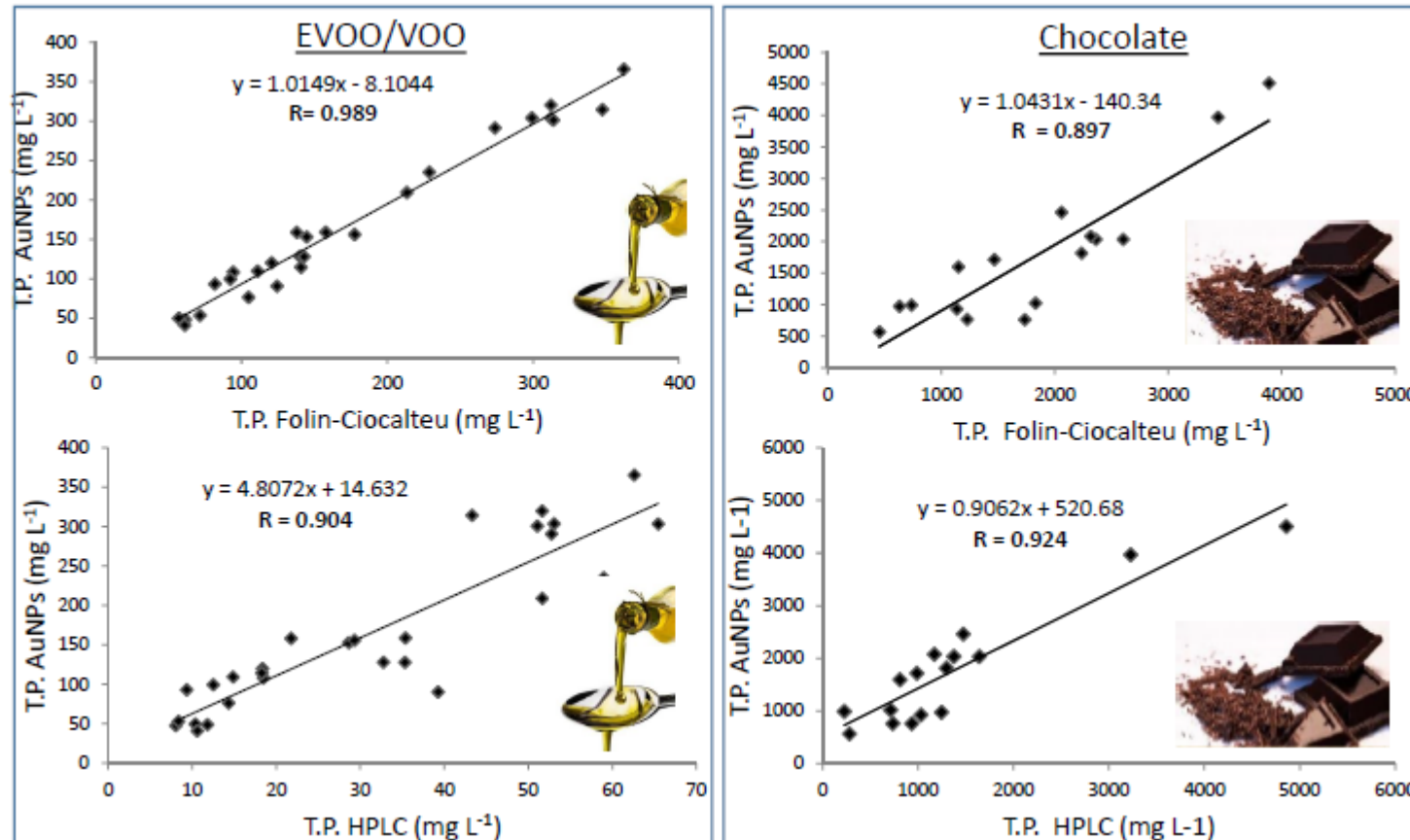
## Gold Nanoparticles-based Extraction-Free Colorimetric Assay in Organic Media: An Optical Index for Determination of Total Polyphenols in Fat-Rich Samples

Flavio Della Pelle,<sup>†,‡</sup> María Cristina González,<sup>‡</sup> Manuel Sergi,<sup>†</sup> Michele Del Carlo,<sup>†</sup> Dario Compagnone,<sup>\*,†</sup> and Alberto Escarpa<sup>\*,‡</sup>

<sup>†</sup>Faculty of Bioscience and Technology for Food, Agriculture and Environment, University of Teramo, 64023 Teramo, Italy

<sup>‡</sup>Department of Analytical Chemistry, Physical Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Biology, Environmental Sciences and Chemistry, University of Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Supporting Information



## Selective Voltammetric Analysis of *o*-Diphenols from Olive Oil Using $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ as Electrochemical Mediator

M. Del Carlo,<sup>a\*</sup> A. Amine,<sup>b</sup> M. Haddam,<sup>b</sup> F. della Pelle,<sup>a</sup> G. C. Fusella,<sup>a</sup> D. Compagnone<sup>a\*</sup>

### ELECTROANALYSIS

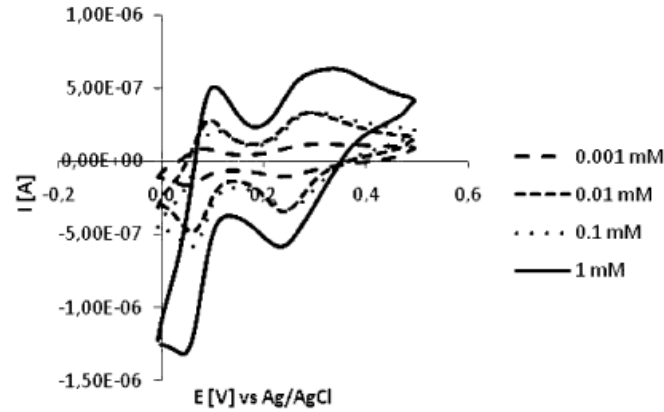


Fig. 1. Carbon paste electrode response to different concentration of  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ .

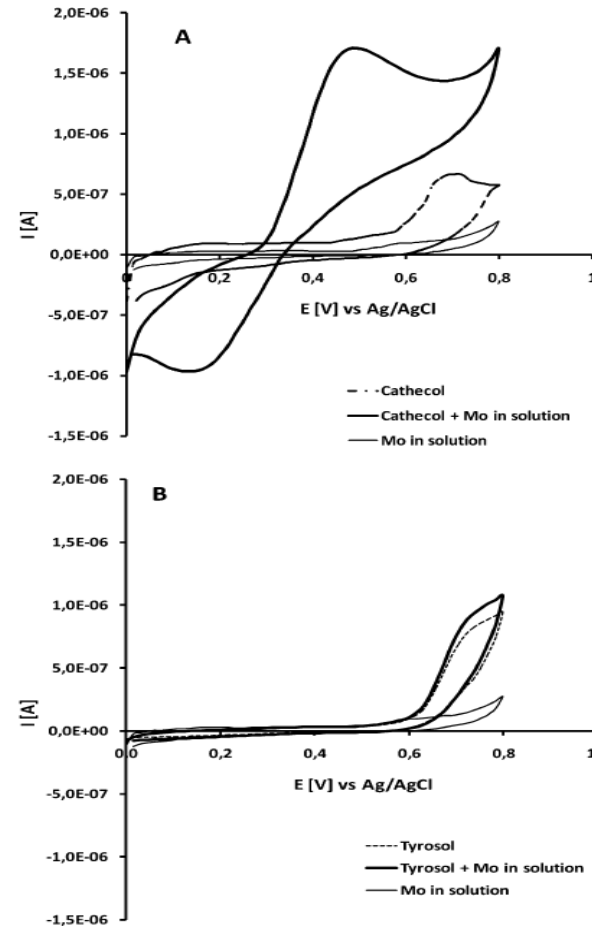


Fig. 2. Cyclic voltammograms of 50  $\mu\text{M}$  catechol (A) and 50  $\mu\text{M}$  tyrosol (B) with carbon paste electrode, the scan rate was 50 mV/s.

## Elettrochimica diretta per la misura dell'attività antiossidante

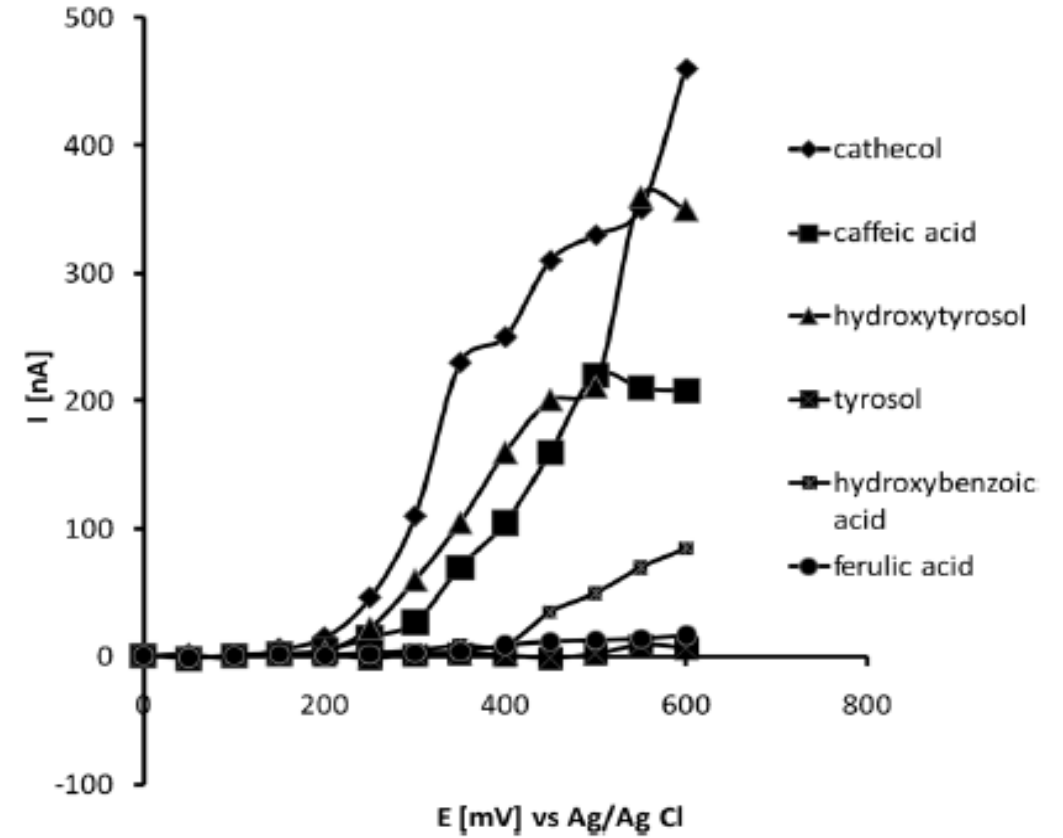


Fig. 5. Hydrodynamic voltammogram of catechol, caffeic acid, hydroxytyrosol, tyrosol, hydroxybenzoic acid, ferulic acid. Comparison of the electrochemical behavior in presence of  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ .

# Metodo selettivo per gli orto-diphenoli

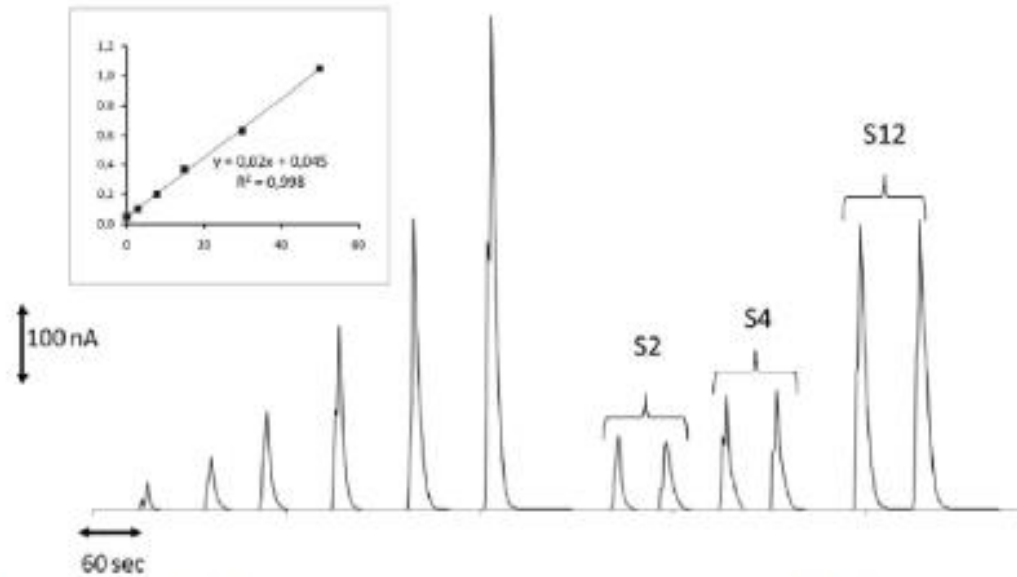
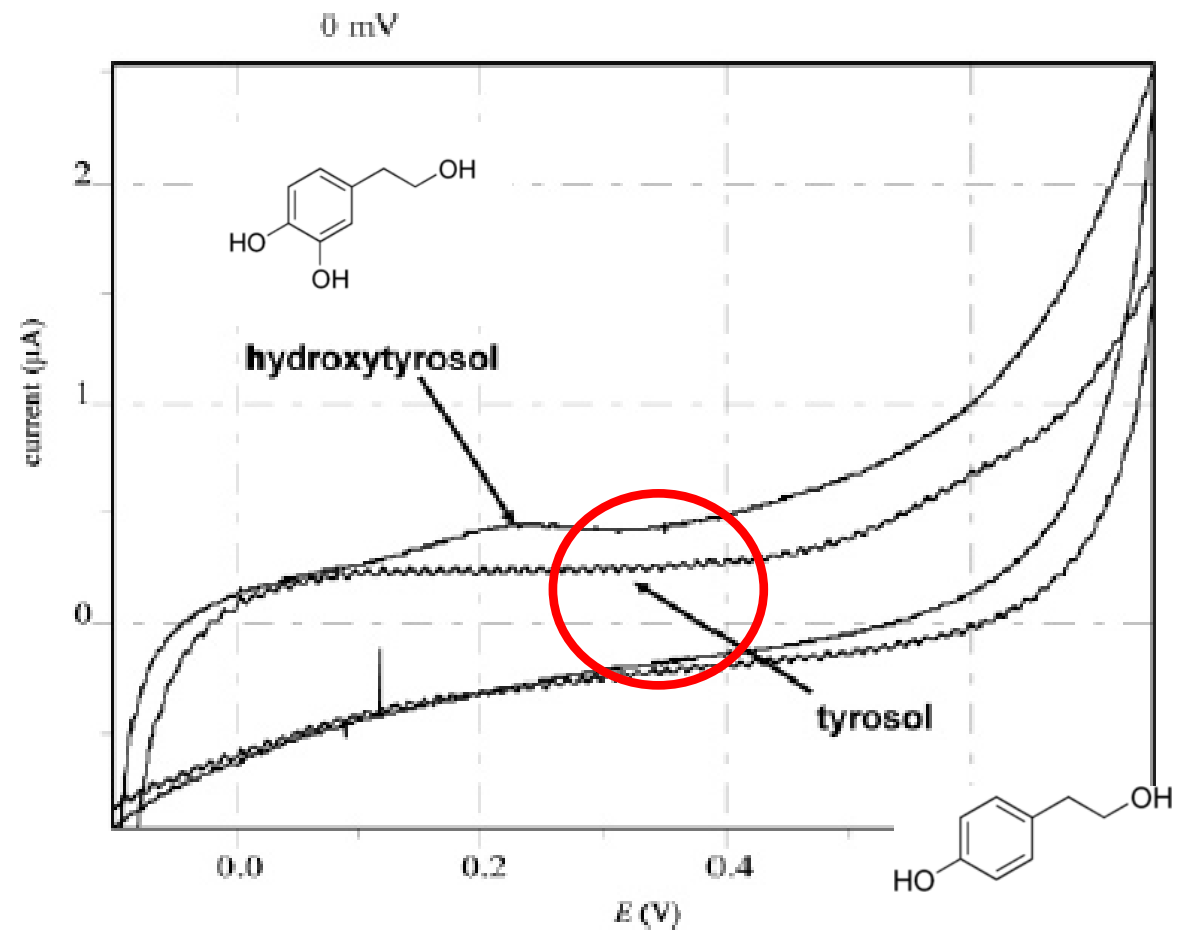
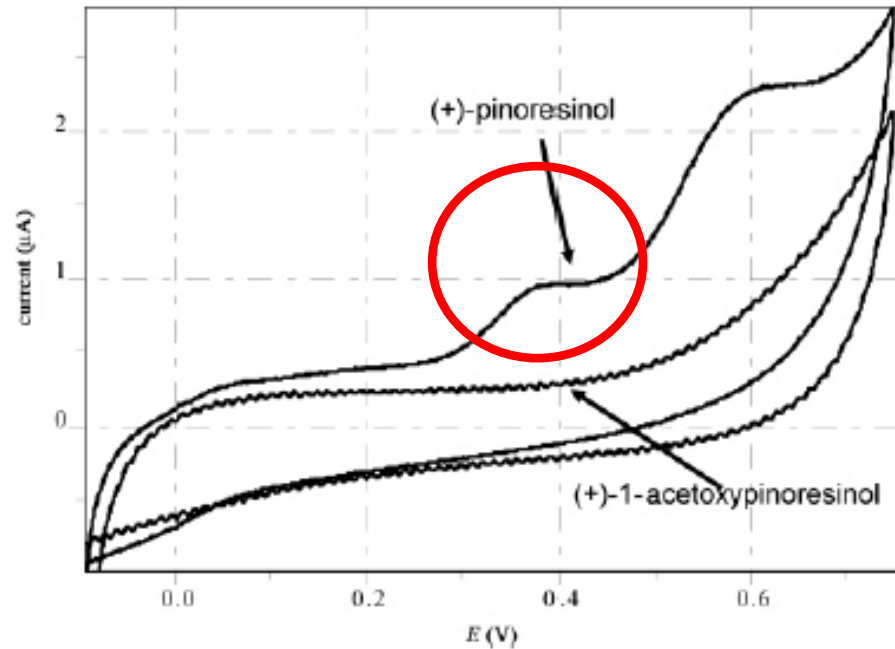


Fig. 7. Typical amperometric flow injection analysis records of catechol standards and two replicates of selected samples (S2, S4 and S12). In the inset the calibration curve of catechol is shown (concentration range 0.2–50 ppm), the current is recorded as  $\mu\text{A}$ .

Table 1. Comparison between the spectrophotometric and the amperometric method for the detection of *o*-diphenols in SPE extracts. All samples were measured in triplicate with a maximum  $CV < 8\%$ .

Sample ID	Catechol equivalent ( $\text{mg L}^{-1}$ )	
	Spectrophotometric	Amperometric
S1	10.0	4.3
S2	9.4	5.0
S3	35.0	16.0
S4	68.0	30.0
S5	18.0	12.0
S6	34.4	17.2
S7	12.9	4.2
S8	37.0	23.0
S9	68.2	36.0
S10	21.2	10.0
S11	45.5	21.0
S12	34.7	13.0
S13	12.8	12.0

# ELETTROCHIMICA DIRETTA PER VALUTARE LA CAPACITA' ANTIOSSIDANTE DEI POLIFENOLI



JOURNAL OF  
AGRICULTURAL AND  
FOOD CHEMISTRY

Evaluation of the Antioxidant Capacity of Individual Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil

A. CARRASCO-PANCORBO,<sup>†</sup> L. CERRETANI,<sup>\*,‡</sup> A. BENDINI,<sup>‡</sup>  
A. SEGURA-CARRETERO,<sup>†</sup> M. DEL CARLO,<sup>§</sup> T. GALLINA-TOSCHI,<sup>‡</sup> G. LERCKER,<sup>‡</sup>  
D. COMPAGNONE,<sup>§</sup> AND A. FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ<sup>†</sup>

# Frazionamento e Analisi

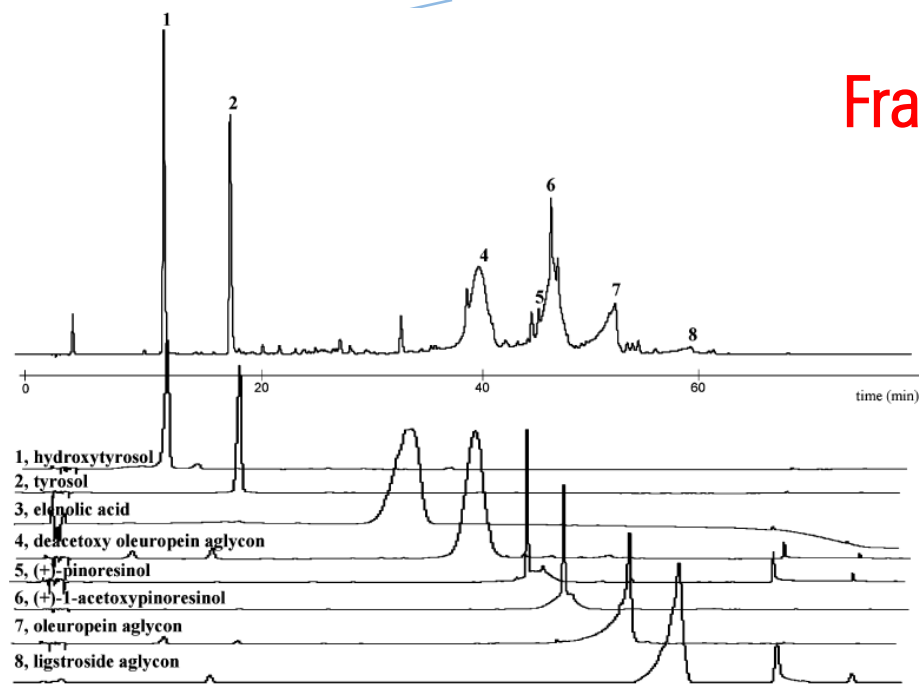
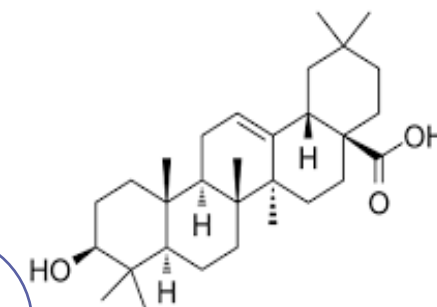
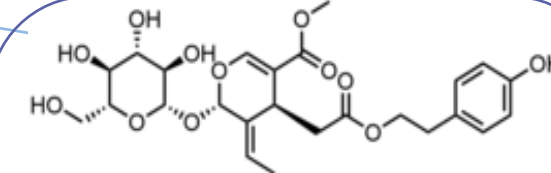


Table 5. Plateau Potential Regions ( $E_{ox}$ ) Evaluated by Hydrodynamic Voltammetry (HV)<sup>a</sup>

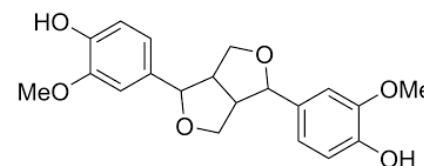
	$E_{ox}$ (HV) mV vs Ag/AgCl	AOP classification
hydroxytyrosol	0.12–0.17	1
tyrosol	0.35	6
elenolic acid	inactive	7
deacetoxy oleuropein aglycon	0.15–0.30	4
(+)-pinoresinol	0.15–0.22–0.30	3
(+)-1-acetoxypinoresinol	0.22	5
oleuropein aglycon	0.15–0.20–0.30–0.40	2
ligstroside aglycon	inactive	7

<sup>a</sup> The AOP classification is based on the lower oxidation potential.

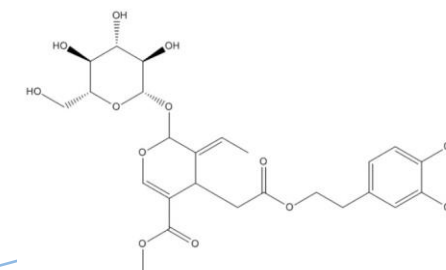
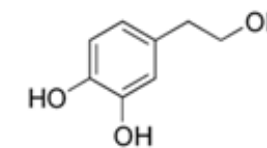
Inattive



mediamente attive

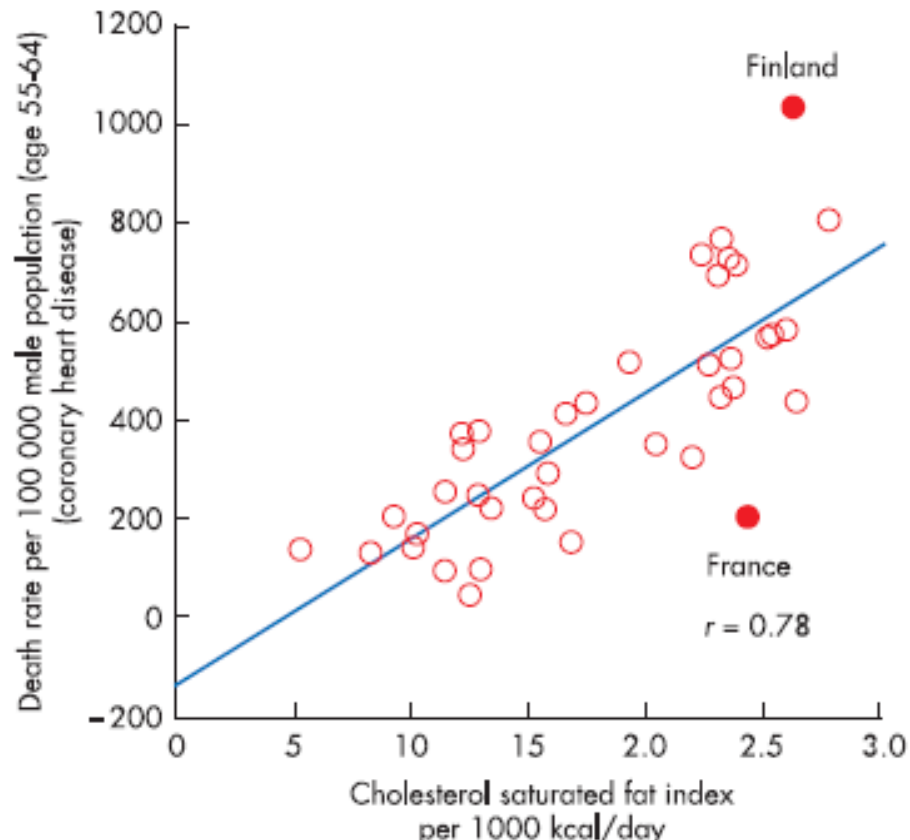


Attive



## Il Paradosso Francese

Il paradosso francese è l'osservazione di bassi tassi di mortalità per malattia coronarica (CHD) nonostante elevato apporto di colesterolo alimentare e grassi saturi.



I diversi effetti di vino, birra e alcolici sono stati esaminati. Alcune ricerche hanno dimostrato che il consumo di vino è stato associato a una diminuzione del 24–31% nella mortalità per tutte le cause; bere vino da poco a moderato porta a una minore mortalità da malattie cardiovascolari rispetto a un consumo equivalente di birra o liquori.

## Antiossidanti lipofili

Gli antiossidanti lipofili come **tocoferoli** e **carotenoidi** sono antiossidanti altamente efficaci in grado di proteggere le **membrane cellulari dall'ossidazione dei lipidi**.

Questi **antiossidanti lipofili** sono anche **nutrienti importanti** che stanno ricevendo una crescente attenzione per le loro proprietà antiossidanti oltre che per quelle **fotoprotettive**.

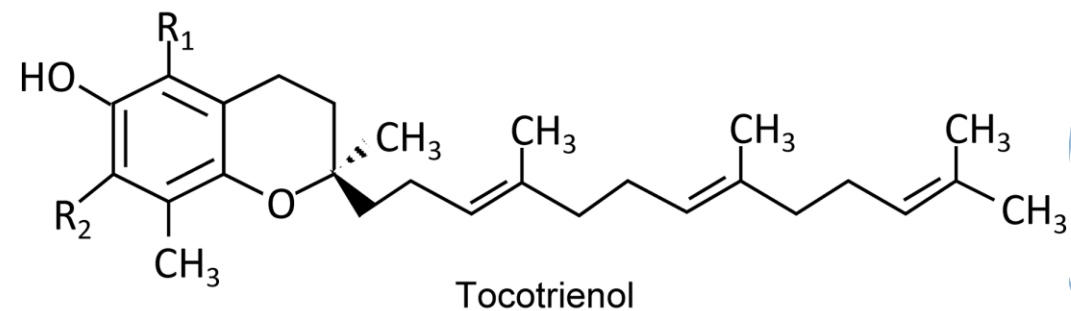
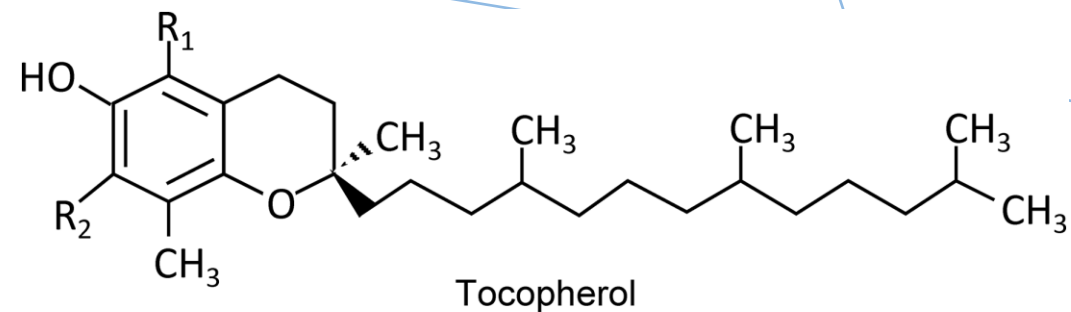


# TOCOFEROLI

Sono molecole **anfipatiche** con l'anello polare del cromanolo e la catena laterale idrofobica satura. La struttura generale dei tocoferoli è mostrata nella Figura 1. I quattro omologhi,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferolo, differiscono nel numero e nella posizione dei gruppi metilici nell'anello aromatico

La vitamina E è una sostanza liposolubile di derivazione vegetale la cui struttura molecolare è costituita da un anello di cromanolo con una catena laterale situata in posizione C2. La vitamina E si riferisce a un gruppo di otto diversi composti:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferoli e i corrispondenti quattro tocotrienoli.

I quattro tocoferoli hanno una catena laterale di fitile saturo, mentre i tocotrienoli hanno una catena laterale isoprenilica insatura contenente tre doppi legami in C3', C7' e C11'.



	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
R <sub>1</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H
R <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H



# Fonti di Tocoferoli

Semi e frutti sono tra le migliori fonti di vitamina E.  
Anche le verdure a foglia verde sono fonti importanti.

I tocoferoli e i tocotrienoli possono essere estratti e purificati o concentrati da oli vegetali e altri materiali vegetali superiori.

Gli integratori alimentari sono un'altra fonte di vitamina E. La maggior parte degli integratori di vitamina E contiene quantità sostanzialmente più elevate di vitamina E rispetto agli alimenti.

La vitamina E negli integratori alimentari e negli alimenti fortificati è spesso esterificata per prolungarne la durata di conservazione proteggendo le sue proprietà antiossidanti.

mg/100g di prodotto

Oil	$\alpha$ T	$\beta$ T	$\gamma$ T	$\delta$ T	$\alpha$ T3	$\beta$ T3	$\gamma$ T3	$\delta$ T3
Corn	18–25	1	44–75	2–3	1	0	1–2	<1
Olive	11–17	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1
Palm	6–42	<1	<1	<1	5–26	<1	11–36	3–8
Rapeseed	18–24	<1	37–51	<1	0	0	0	0
Rice bran	1–15	0–2	0–8	0–2	0–13	0–2	1–23	0–2
Soybean	9–12	1	61–69	23–26	0	0	0	0
Sunflower	32–59	0–2	1–4	<1	<1	0	0	0
Wheat germ	151–192	31–65	0–52	<1	2–3	0–8	0–1	<1

## Funzioni dei TOCOFEROLI

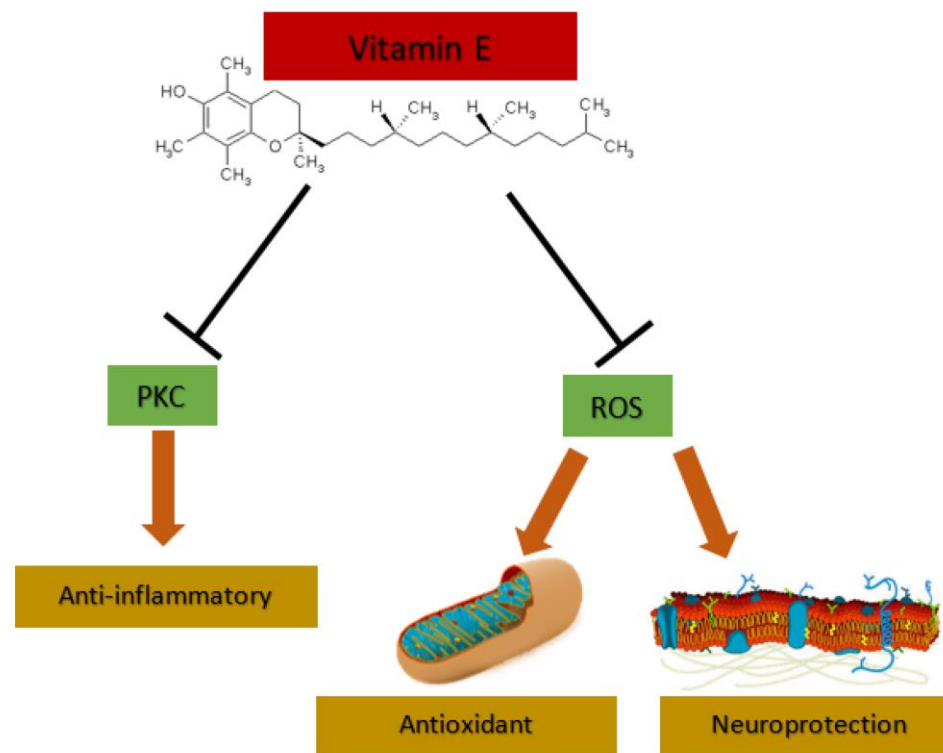
antiossidante eliminando i radicali liberi, in particolare i radicali perossilici e ossigeno singolo,

stabilizzazione della membrana formando complessi con molecole destabilizzanti in modo da prevenire disturbi dell'equilibrio anfipatico la struttura,

regolatore fisiologico dell'attività enzimatica, segnalazione cellulare, proliferazione cellulare ed espressione genica, che non è direttamente correlata all'azione antiossidante,

inibizione della coagulazione piastrinica,

prevenzione di malattie inclusi disturbi neurologici, cardiovascolari malattie, danni agli occhi e alla pelle legati all'età e infertilità

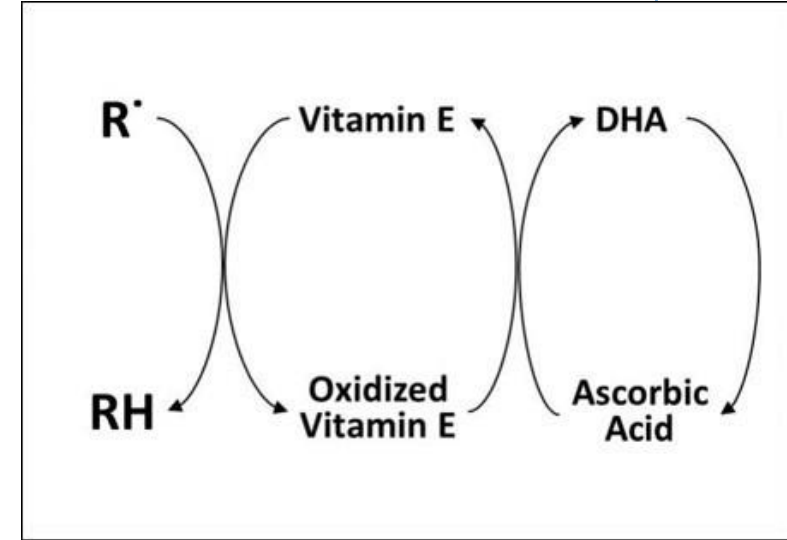


## Funzioni dei TOCOPFEROLI

Tra queste funzioni, il ruolo della vitamina E come antiossidante contro la perossidazione lipidica mediata dai radicali liberi è stato dimostrato e sembra che questa sia la funzione fisiologica più importante di questa vitamina.

La vitamina E inibisce anche l'ossidazione dell'aria di alimenti, oli e materiali industriali per prolungarne la durata.

Effetto sinergico a **livello chimico** di VitE e VitC



## STABILITA'

La vitamina E è stabile a temperatura ambiente, ma è facilmente ossidabile ad alta temperatura, alla luce o in un mezzo alcalino.

La frittura è uno dei metodi più comuni di preparazione del cibo e durante il processo di frittura, di solito tra 160-190 ° C, la vitamina E viene ossidata per dare miscele complicate di prodotti tra cui tocored (5,6-tocoferilione) e dimeri che si presume essere formato da una ricombinazione dei radicali tocoferossilici.

L' $\alpha$ -tocoferolo viene ossidato a radicale  $\alpha$ -tocoferossile da ioni di metalli di transizione come gli ioni ferrici ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e gli ioni rameici ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

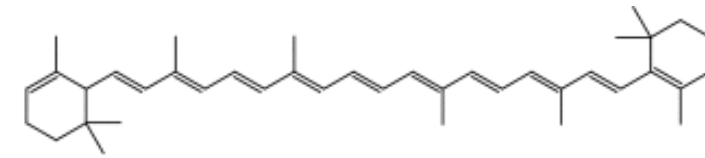
# Carotenoidi

I carotenoidi sono molecole isoprenoidi a 40 atomi di carbonio che producono la pigmentazione rossa, gialla e arancione che si trova in natura.

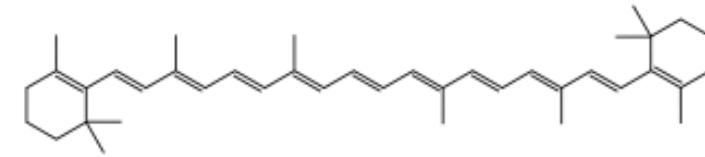
I carotenoidi svolgono un ruolo essenziale nella cattura della luce e nella fotoprotezione nelle piante.

Nell'uomo, i carotenoidi della provitamina A, come il beta-carotene, vengono convertiti in vitamina A, che è fondamentale per mantenere una vista sana, la risposta immunitaria e la comunicazione e la differenziazione cellulare.

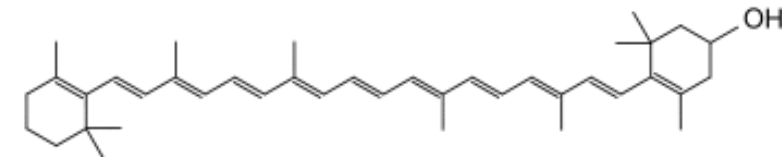
I carotenoidi, inclusi licopene e luteina, sono stati associati a una maggiore attività antiossidante.



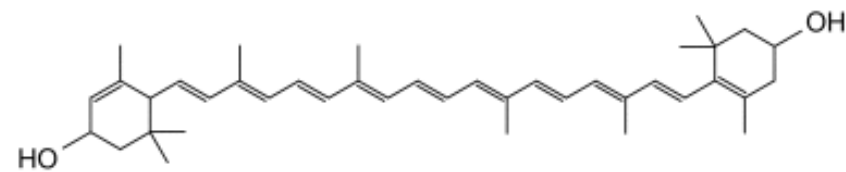
$\alpha$ -carotene



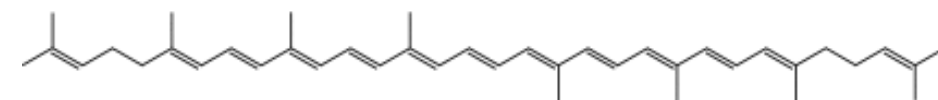
$\beta$ -carotene



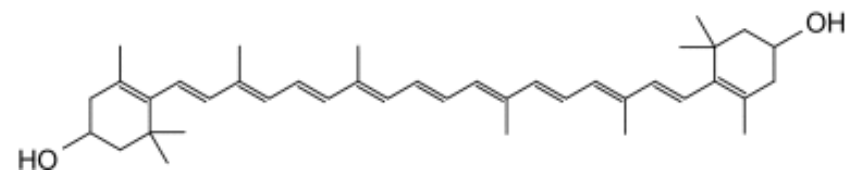
$\beta$ -cryptoxanthin



lutein



lycopene

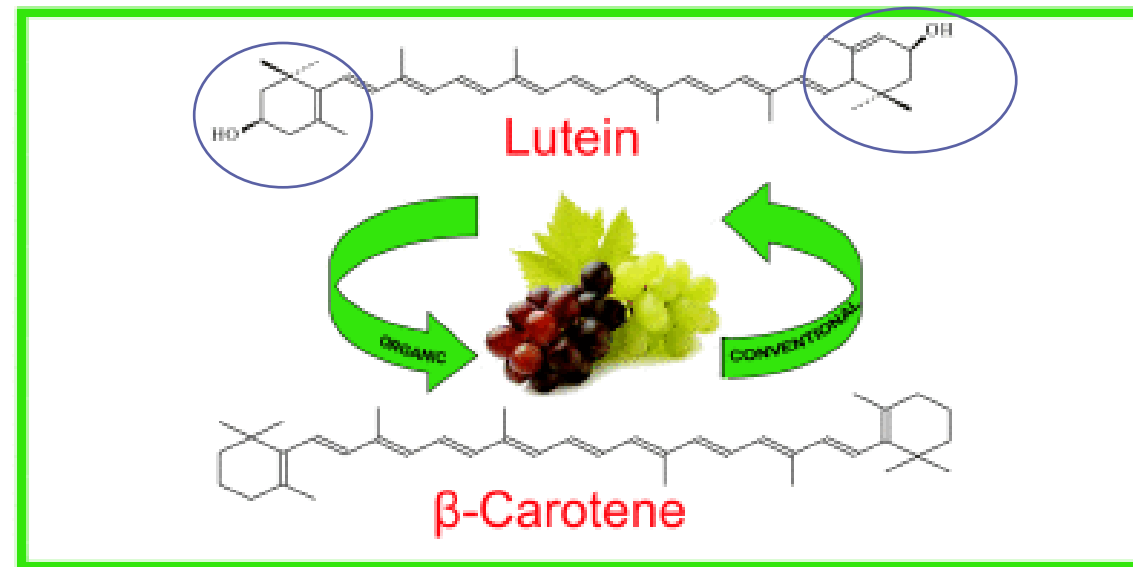


zeaxanthin

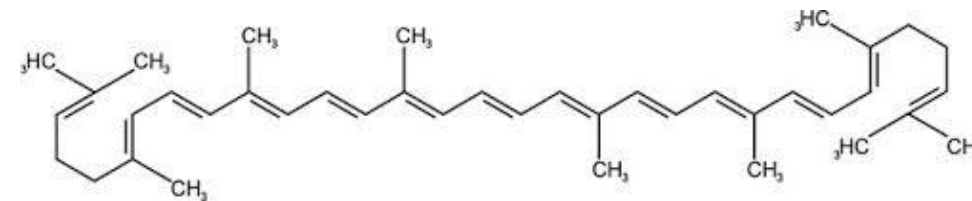
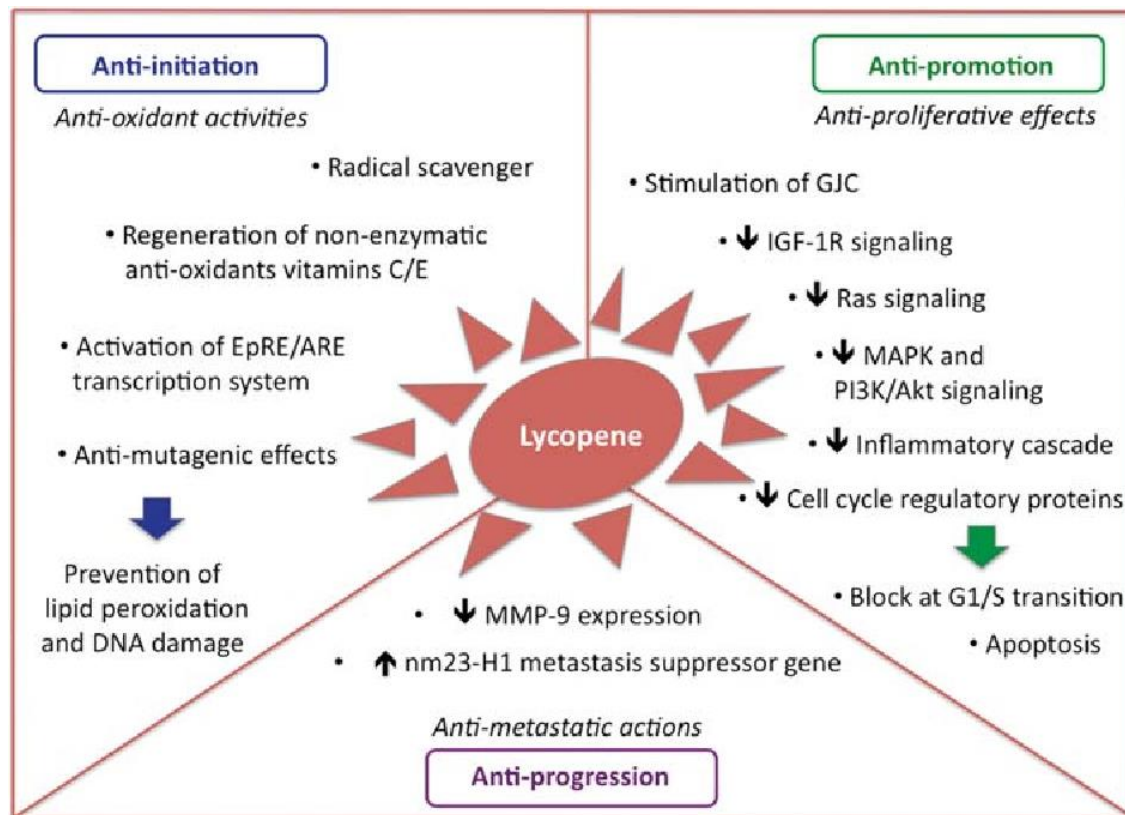
## Sistemi antiossidanti lipofili

I carotenoidi agiscono come efficaci antiossidanti nei tessuti, attraverso la loro capacità di **INIBIRE** la propagazione della reazione radicalica soprattutto attraverso la loro reazione con il **radicale superossido**.

In base alla loro **polarità** si localizzano negli strati più interni delle membrane biologiche o verso gli strati più esterni.



# Il licopene



## Alimenti ricchi di licopene:



# Alimenti che contengono carotenoidi

## Alimenti che contengono **betacarotene**:



Carote 33954 mcg\*

Paprika 26162 mcg\*

Peperoncino 1500 mcg\*



Peperoni 14884 mcg\*

Zucca 6940 mcg\*

Spinaci 5626 mcg\*



Lattuga 5226 mcg\*

Barbabietola 3794 mcg\*

Albicocche 1094 mcg\*

Valori x 100 g di alimento \* microgrammi