

DETERMINAZIONE DEI POLIFENOLI TOTALI

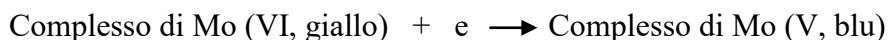
Il Metodo di Folin-Ciocalteau

La determinazione dei polifenoli totali, espressi come mg di acido gallico/100 g di prodotto, è stata condotta sulla base del metodo di Folin - Ciocalteau (Singleton e Rossi, 1965).

Tale metodo nasce nel 1927 per la determinazione dei residui dell'amminoacido tirosina (un derivato fenolico) nelle proteine. Successivamente il metodo è stato adottato per la determinazione dei composti fenolici nel vino (Singleton et al., 1999). Oggi il metodo di Folin - Ciocalteau è il più utilizzato per le determinazioni dei composti fenolici negli alimenti perché semplice, economico ed affidabile (Prior et al., 2005). Il reagente di Folin – Ciocalteau (FC) è un complesso di acidi eteropoli, fosfomolibdico e fosfotungstico. Esso non è specifico per i composti fenolici in quanto può essere ridotto da molti composti non fenolici (ad esempio la vitamina C o il Cu (I), etc.). I fenoli reagiscono con il reattivo solo in condizioni basiche, in seguito all'aggiunta di carbonato di sodio fino a pH 10. La dissociazione di un protone fenolico porta alla formazione di un anione fenolato che riduce il reattivo FC. Questo supporta il concetto che la reazione avvenga secondo un meccanismo di trasferimento di elettroni (Prior et al., 2005).

La chimica di reazione dei molibdati e tungstati è molto complessa.

Gli isopolifosfotungstati sono incolori nello stato di valenza del metallo completamente ossidato 6+, mentre gli analoghi composti del molibdeno sono gialli. Questi formano eteropolifosfotungstati-molibdati e, in soluzione acida, esistono sotto forma di complessi ottaedrici idratati degli ossidi di metallo, coordinati attorno ad un fosfato centrale. Sequenze di riduzioni reversibili di uno o due elettroni portano alla formazione di specie blu , come $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$ aventi il massimo assorbimento a 760 nm.



L'intensità del colore formato (assorbanza) viene poi letta mediante spettrofotometro UV-VIS. **Il valore di assorbanza è proporzionale alla quantità di polifenoli.**

È importante tenere in considerazione le interferenze nel campione, che possono essere causate da:

- ◆ OSSIDANTI che competono con il reattivo FC;
- ◆ ZUCCHERI: interferiscono solo il loro livello è alto o se ci si trova a temperature elevate;

- ◆ ACIDO ASCORBICO: è un enediolo che reagisce prontamente col reattivo FC. Inoltre, esso ha un effetto amplificativi sulla quantità di reattivo che reagisce con i fenoli presenti, attraverso la riduzione dei chinoni che si formano dall'ossidazione dei fenolati;
- ◆ SOLFITI e BIOSSIDO DI ZOLFO: reagiscono da soli con il reattivo FC, ma alcuni studiosi hanno dimostrato che il solfito può amplificare la reazione con i fenoli, in seguito anche in questo caso a riduzione dei chinoni e conseguente rigenerazione di fenoli ossidabili. Tale reazione, però, può essere corretta addizionando una sufficiente quantità di acetaldeide per fissare il solfito presente.

Il saggio dei fenoli totali con il reattivo FC ha dunque i seguenti vantaggi:

- il reattivo FC è commercialmente disponibile e la procedura è standardizzata;
- è un saggio accettato e praticato di routine sugli ossidanti alimentari nei laboratori di ricerca;

è stata proposta una grande quantità di dati comparabili.

DETERMINAZIONE POLIFENOLI TOTALI: PREPARAZIONE DELLO STANDARD DI ACIDO GALLICO.

50 mg di standard di acido gallico sono stati posti in matraccio da 100 ml e portati a volume con acqua distillata. Il matraccio è stato posto nel bagnetto a ultrasuoni per far solubilizzare l'acido gallico. È stata ottenuta, così, la soluzione madre (496 mg/l) dalla quale sono state ricavate le "figlie" prelevando, rispettivamente:

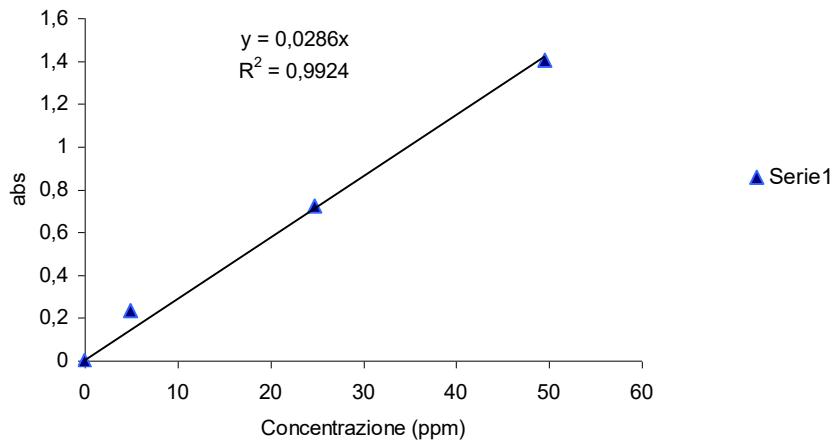
- 1 ml portato poi a 100 ml con acqua distillata (5.00 mg/l);
- 5 ml portati a 100 ml con acqua distillata (25 mg/l);
- 10 ml portati a 100 ml con acqua distillata (50 mg/l).

Per ogni soluzione "figlia" preleviamo 25 ml e aggiungiamo 5 ml di reattivo FC: la soluzione diventerà verde-giallastra.

Aggiungiamo, quindi, 10 ml di Na₂CO₃ al 20% (per creare l'ambiente alcalino) e la soluzione si colorerà di blu scuro.

La lettura spettrofotometrica alla λ di 700 nm è stata effettuata dopo 2 ore dall'aggiunta dei reattivi, con uno spettrofotometro.

La retta di taratura è stata costruita sulla base delle tre soluzioni di standard di acido gallico alle concentrazioni: 5, 25, 50 e sulla base dei relativi valori di assorbanza ottenuti.



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

5 ml dell'estratto metanolico, precedentemente preparato, sono stati posti in un matraccio da 20 ml. È stato aggiunto 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteau (Sigma-Aldrich), che reagendo con le sostanze fenoliche dà colorazione giallo fluorescente-verde.

Dopo un paio di minuti sono stati aggiunti 2 ml di Na_2CO_3 al 20%, che crea l'ambiente basico e dà colorazione blu intenso. Infine, si è portato a volume con acqua distillata.

Dopo 2 ore dall'aggiunta dei reattivi è stata effettuata la lettura a 700 nm, utilizzando uno spettrofotometro.

La procedura seguita per il calcolo dei polifenoli totali è la seguente:

$$\text{ppm (mg/l)} : 1000 \text{ (ml)} = A \text{ (mg)} : V \text{ (ml)}$$

$$A \text{ (mg)} = \text{ppm} \times (V/1000);$$

$$A \text{ (mg)} \times FD = B \text{ (mg)}$$

dove:

- $V \text{ (ml)}$ = volume finale dell'estratto di polpa/buccia
- ppm (mg/l) determinati col metodo di Folin-Ciocalteau mediante retta di taratura con standard di acido gallico
- Fattore di Diluizione (FD) = 8 (diluizioni effettuate con acqua distillata)

I quantitativi di B (mg) di polifenoli estratti da P (g) di polpa/buccia sono stati rapportati a 100 g di campione. $(B \text{ (mg)} / P \text{ (g)}) \times 100 = PF \text{ totali (mg/100g)}$