



Università
Ca'Foscari
Venezia

**Scuola Dottorale di Ateneo
Graduate School**

**Dottorato di ricerca
in Scienze Chimiche
Ciclo XXVIII
Anno di discussione 2016**

Strutture molecolari ad azione antiossidante

**SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE DI AFFERENZA: BIO/10
Tesi di Dottorato di Michela Sicari, matricola 805146**

Coordinatore del Dottorato

Prof. Maurizio Selva

Tutore del Dottorando

Prof. Roberto Stevanato

Co-tutore del Dottorando

Prof. Vittorio Lucchini

Indice

Indice	pag. 1
Acronimi ed abbreviazioni utilizzati	pag. 3
1. Introduzione	pag. 5
1.1. Scopo della tesi.....	pag. 5
1.2. Perossidazione lipidica.....	pag. 6
1.3. Antiossidanti.....	pag. 8
2. Materiali e Metodi	pag. 15
2.1. Materiali	pag. 15
2.1.1. Reagenti.....	pag. 15
2.1.2. Strumentazione.....	pag. 15
2.2. Metodi.....	pag. 16
2.2.1. Misure spettrofotometriche.....	pag. 16
2.2.2. Misure di consumo di ossigeno	pag. 17
2.2.3. Preparazione della dispersione micellare e misura del consumo di ossigeno	pag. 18
2.3. Affidabilità della misura sperimentale del consumo di ossigeno	pag. 18
2.4. Campioni di olio alimentare analizzati.....	pag. 21
3. Valutazione critica delle principali metodiche analitiche proposte per la determinazione delle proprietà antiossidanti	pag. 22
3.1. Misura delle proprietà antiossidanti di campioni di alimenti con differenti saggi e correlazione dei risultati ottenuti.....	pag. 29
4. Perossidazione lipidica: meccanismo ed inibizione	pag. 32
4.1. Inibizione della perossidazione lipidica	pag. 32
4.2. Meccanismi di perossidazione lipidica e della sua inibizione	pag. 38
5. Perossidazione lipidica: l'approccio cinetico	pag. 41
5.1. Relazione fra velocità di consumo di ossigeno e concentrazione di antiossidante	pag. 41
5.2. Strategia basata su considerazioni cinetiche	pag. 43
5.3. Strategia empirica	pag. 44
5.4. Individuazione della traccia ossigrafica di riferimento	pag. 46
5.5. Significato chimico dei coreagenti ABIP, SDS e LH	pag. 49
5.6. Significato chimico dei coefficienti k_A e k_0	pag. 52

5.7. Potere inibitorio degli antiossidanti in relazione alla loro lipofilicità e idrofilicità	pag. 52
5.8. Confronto con altre procedure	pag. 56
5.9. Conclusioni	pag. 57
6. Analisi critica dei parametri che descrivono la traccia ossigrafica	pag. 58
6.1. Pendenze e velocità iniziali.....	pag. 58
6.2. "Lag time".....	pag. 58
6.3. Andamenti concavo e convesso	pag. 58
6.3.1. <i>Concavità e convessità</i>	pag. 59
6.3.2. <i>"Chain-breaking" e "retarder"</i>	pag. 60
6.3.3. <i>Antiossidanti lipofili e idrofili</i>	pag. 60
6.4. Relazione fra il parametro "zero time" e la concentrazione di antiossidante.....	pag. 61
7. Acido ascorbico	pag. 64
7.1. Proprietà antiossidanti e pro-ossidanti dell'acido ascorbico.....	pag. 64
7.2. Tocoferolo rigenerato da acido ascorbico	pag. 69
8. Determinazione delle proprietà antiossidanti di oli alimentari di origine vegetale	pag. 76
8.1. Introduzione	pag. 76
8.2. Descrizione del campione reale.....	pag. 76
8.3. Applicazione del modello cinetico al campione reale.....	pag. 80
8.4. Misura del potere di inibizione degli antiossidanti negli estratti di olio	pag. 81
8.5. Misura del potere di inibizione degli antiossidanti nei campioni tal quali	pag. 84
8.6. Studio cinetico dei processi di trasferimento e di degradazione.....	pag. 91
8.7. Criteri per una rapida stima del potere inibente dei complessi di antiossidanti presenti in oli di oliva e di semi.....	pag. 93
8.8. Traduzione della forza del complesso di antiossidanti in equivalenti di antiossidante di scelta.....	pag. 99
8.9. Descrizione del meccanismo di trasferimento degli antiossidanti e ragioni della sua efficacia.....	pag. 101
9. Scala delle proprietà antiossidanti di una serie di polifenoli	pag. 105
Conclusioni	pag. 109
Riferimenti Bibliografici.....	pag. 110

Acronimi ed abbreviazioni utilizzati

- AAPH: 2,2'-azobis(2-amidinopropano)diidrocloreuro
- ABIP: 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propano]
- ABTS: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-solfonato)
- AGE: Acidi Grassi Essenziali
- AOH: Antiossidante
- CAPE: Feniletilestere dell'acido caffeico
- CAT: Catalasi
- CE: Catechina Equivalente
- DMAC: 1,1-dimetilallilcaffeoato
- DNPH: 2,4-dinitrofenilidrazina
- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilidrazile
- EDTA: Acido etilendiamminotetraacetico
- ESR: Electron Spin Resonance – Risonanza elettronica di spin
- FC: Folin-Ciocalteu
- FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power – Potere antiossidante nella riduzione del ferro
- GSH: Glutazione
- GSH-Px: Glutazione Perossidasi
- GSSG: Glutazione Ossidato
- HRP: HorseRadish Peroxidase – Perossidasi di rafano
- LDL: Low Density Lipoprotein – Lipoproteine a bassa densità
- LH: Acido Linoleico
- PE: Metodo Enzimatico
- PNR: Prodotti Non Radicalici
- OEVO: Olio ExtraVergine di Oliva
- ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity – Capacità di assorbimento dei radicali dell'ossigeno
- RNS: Reactive Nitrogen Species – Specie reattive dell'azoto
- ROS: Reactive Oxygen Species – Specie reattive dell'ossigeno
- SDS: Sodio Dodecil Solfato
- SOD: Superossido dismutasi
- ST: Tempo di Sonicazione

TPC: Total Polyphenolic Content – Contenuto totale di polifenoli

TRAP: Total Radical-trapping Antioxidant Parameter – Parametro antiossidante totale nel bloccare i radicali

TPTZ: 2,4,6-tripiridil-s-triazina

ZT: Zero Time

Introduzione

1.1. Scopo della tesi

Negli ultimi anni si è assistito ad un continuo aumento dell'interesse nei confronti della funzione antiossidante di molti composti naturali presenti negli alimenti: numerosi studi e lavori scientifici hanno dimostrato come alcuni antiossidanti, quali ad esempio i composti fenolici contenuti in molti prodotti alimentari e bevande – frutta, verdura, vino rosso, olio di oliva, tè, caffè e cacao – evidenzino proprietà antinfiammatorie, antimutagene, antitumorali e siano pertanto associati ad un effetto di protezione sulla salute umana contro cancro, malattie cardiovascolari e disfunzioni neurologiche legate all'invecchiamento (Kris-Etherton *et al.*, 2002; Manach *et al.*, 2005; Roginsky & Lissi, 2005; Goupy *et al.*, 2007; San Miguel *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2013). Gli antiossidanti risultano infatti estremamente efficaci nel contrastare i fenomeni ossidativi, tanto da spingere numerosi studiosi, anche dei più prestigiosi laboratori di ricerca a livello mondiale, a porsi l'obiettivo di comprendere i meccanismi di funzionamento, a livello molecolare, dell'azione antiossidante di tali composti e di come sfruttare questa importante caratteristica nei principali campi di applicazione:

- a) nutrizionale, farmacologico e medico, per la prevenzione di malattie legate a dieta sbilanciata ed invecchiamento cellulare (Fang *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005; Karadag *et al.*, 2009; Perez-Lopez *et al.*, 2009);
- b) dell'industria alimentare, per la conservazione dei cibi con prodotti naturali in sostituzione agli additivi sintetici (Pokorny *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2005);
- c) chimico e industriale, per preservare materie prime e prodotti manifatturieri dall'invecchiamento ossidativo (Huang *et al.*, 2005).

In particolare, per quanto riguarda il precedente punto a), è noto che le ROS (specie reattive dell'ossigeno) interagendo con DNA, proteine e membrane lipidiche, possano indurre danni gravi (Esterbauer & Ramos, 1996; Wang *et al.*, 1996; Halliwell & Gutteridge, 1999; Marnett, 2000); in particolare le ROS sono coinvolte negli stadi di iniziazione, promozione e progressione del cancro (Valko *et al.*, 2006); svolgono un ruolo importante nello sviluppo delle malattie cardiovascolari quali danni ischemici, arteriosclerosi, ipertensione, cardiomiopatie, malattie cardiache congenite e infarto; possono inoltre essere causa di disordini neurologici quali le malattie di Alzheimer e Parkinson (Fang *et al.*, 2002; Laguerre *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007). L'insieme di tutti questi fattori e meccanismi deleteri, che possono gravemente inficiare la salute dell'uomo, passa sotto il nome di "stress ossidativo" (Valko *et al.*, 2006).

Il più importante meccanismo di difesa contro i radicali liberi, e quindi le ROS, è rappresentato dall'attività antiossidante dei componenti fenolici di frutta e verdura, da sempre alimenti fondamentali della dieta dell'uomo, in grado di preservare il corretto equilibrio ossidanti/antiossidanti, impedendo in tal modo la sovrapproduzione delle ROS (Esterbauer *et al.*, 1991; Ness & Powels, 1997; Eastwood, 1999). Da qui la promozione a patrimonio immateriale dell'umanità, da parte dell'UNESCO, della Dieta Mediterranea (Saulle & La Torre, 2010) che, prevedendo abbondanza di consumo di frutta e verdura rispetto ad altre tipologie di alimenti (grassi saturi, proteine animali, farine e cereali raffinati, ecc.), riduce l'incidenza di malattie cardiovascolari e cerebrali, infarto, cancro, ed altre patologie legate all'invecchiamento (Willet, 2001; Juranic

& Ziza, 2005; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Significativo è, a questo proposito, l'episodio scientifico del "French Paradox" (Richard, 1987).

Ne consegue che risulta di notevole importanza:

- 1) la comprensione dei meccanismi chimici e chimico-fisici legati all'azione antiossidante di particolari gruppi funzionali o strutture molecolari, in relazione anche alla loro idro/lipofilicità, e quindi la definizione più precisa di "potere antiossidante";
- 2) l'analisi critica delle principali metodiche in uso per la quantificazione di tale attività;
- 3) l'individuazione di un metodo analitico efficace per la determinazione del potere antiossidante, che, nella sperimentazione *in vitro*, si avvicini quanto più possibile ai processi che avvengono *in vivo*;
- 4) l'elaborazione di un metodo per la definizione di un nuovo parametro, avente per quanto possibile valore universale, di valutazione della capacità degli antiossidanti di contrastare la perossidazione lipidica, nonché la messa a punto di un protocollo di riferimento di facile esecuzione, elevata riproducibilità ed affidabilità che fornisca indicazioni precise e univoche dell'effetto antiossidante;
- 5) la misura dell'azione di inibizione della perossidazione lipidica da parte di alcuni antiossidanti puri attraverso il nuovo protocollo sviluppato e quindi la creazione di una scala di potere antiossidante delle molecole/principi attivi maggiormente presenti nella dieta;
- 6) la determinazione, mediante tale metodica, del potere antiossidante di composti e prodotti alimentari di largo consumo, soprattutto quelli che per la loro natura lipofila (ad esempio gli oli vegetali) sono più difficili da trattare.

Va sottolineata, soprattutto per quanto riguarda il precedente punto 3), la difficoltà di poter interpretare mediante una misura analitica, che per necessità di cose deve risultare rapida, efficace, sensibile, riproducibile e dai limitati costi di attuazione, un processo chimico-biologico che avviene in sistemi complessi macro e supramolecolari, attraverso, come si vedrà di seguito, sequenze di reazioni radicaliche non del tutto note e comunque riportate in modo schematico e semplificato.

Scopo del lavoro di tesi di dottorato è stato quello di approfondire le tematiche sopra esposte, al fine ultimo di portare un contributo di chiarezza alla definizione di antiossidante, nonché alla sua misura fondata su basi meccanicistiche.

Metodiche e risultati del lavoro di tesi verranno in parte condivisi con il gruppo di ricerca diretto dalla Prof.ssa Mozetic Vodopivec presso la "School for Viticulture and Enology & Wine Research Centre" dell'Università di Nova Gorica, che, in particolare, ha messo a punto una procedura per l'estrazione della parte fenolica (e quindi antiossidante) degli oli di oliva, al fine di valutare l'affidabilità delle tecniche impiegate dai due gruppi di ricerca.

1.2. Perossidazione lipidica

La perossidazione lipidica è uno dei meccanismi radicalici a catena più rilevanti dal punto di vista biologico e medico: numerosi studi e lavori scientifici degli ultimi anni hanno dimostrato, infatti, come un aumento della concentrazione dei prodotti finali della perossidazione lipidica risulti essere la prova universalmente accettata del coinvolgimento dei radicali liberi in numerose gravi patologie (Halliwell & Chirico, 1993; Karten

et al., 1997; Spiteller, 2001; Arlt *et al.*, 2002; Nair *et al.*, 2007; Suntres, 2011; Barrera, 2012), dato che lo stress ossidativo comporta il danneggiamento di molte macromolecole biologiche, quali proteine e DNA (Halliwell & Chirico, 1993), nonché di strutture supramolecolari come le membrane cellulari (Porter *et al.*, 1995).

La perossidazione lipidica è un fenomeno piuttosto complesso che coinvolge in particolare gli acidi grassi insaturi: si basa sulla degradazione ossidativa di tali composti organici, attraverso un processo autocatalitico (De Beer *et al.*, 2002). Per effetto del calore, delle radiazioni ultraviolette, di particolari sostanze chimiche contenute in farmaci, droghe, alimenti o nell'aria inquinata (Gurr *et al.*, 2002; Laguerre *et al.*, 2007; Schnitzer *et al.*, 2007), avviene l'attivazione di specie radicaliche che, reagendo con l'ossigeno, provocano la formazione di idroperossidi (Mihaljevic *et al.*, 2011), con produzione di radicali lipidici, i quali a loro volta reagiscono con l'ossigeno iniziando una catena radicalica che può svilupparsi per un elevato numero di cicli prima di esaurirsi per la combinazione di due specie radicaliche (Frankel, 1984; De Beer *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2002).

Il meccanismo di perossidazione lipidica consta di una serie di reazioni a catena che può essere schematicamente suddivisa in tre fasi: iniziazione, propagazione e terminazione (Antolovich *et al.*, 2002; Gurr *et al.*, 2002; Laguerre *et al.*, 2007).

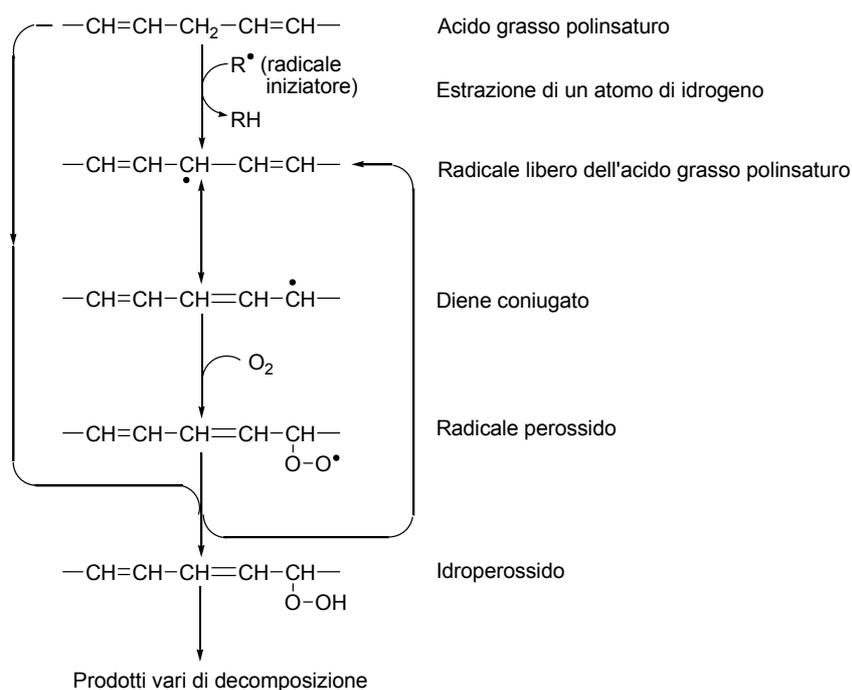


Figura 1.1. Sequenza di stadi della perossidazione lipidica.

In particolare, con riferimento allo schema di Figura 1.1, la sequenza di reazioni viene innescata da un radicale iniziatore R• che, estraendo un atomo di idrogeno allilico dalla catena di un acido grasso polinsaturo, porta alla formazione di un radicale lipidico (stadio di iniziazione). Tale radicale risulta facile a formarsi perché stabilizzato per risonanza (Figura 1.2).

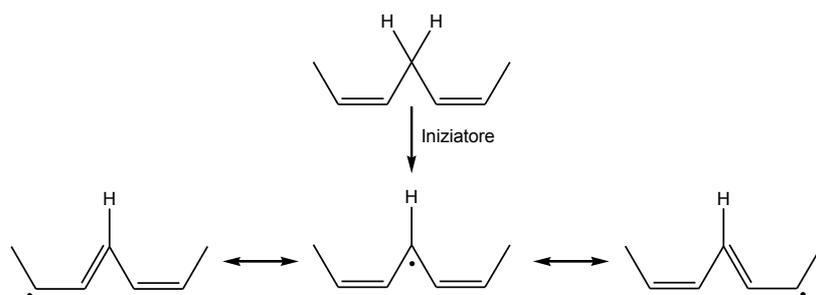


Figura 1.2. Reazione di iniziazione e formazione di un radicale lipidico, stabilizzato per risonanza.

Successivamente, il radicale lipidico, reagendo velocemente con l'ossigeno molecolare, porta alla formazione di un radicale perossido (stadio di propagazione), che a sua volta può estrarre un atomo di idrogeno da un'altra molecola di acido grasso insaturo contenente un idrogeno allilico, formando un idroperossido ed un altro radicale lipidico. Quest'ultimo reagendo con l'ossigeno, rigenera un nuovo radicale perossido, il quale proseguirà poi il ciclo di reazioni (Frankel, 1984; Antolovich *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005; Laguerre *et al.*, 2007).

La reazione di propagazione può pertanto ripetersi indefinitamente (De Beer *et al.*, 2002) attraverso la formazione di una catena radicalica che si autosostiene e prosegue ad una velocità elevata, come dimostrato dal marcato aumento di idroperossidi formati (Velasco & Dobarganes, 2002; Laguerre *et al.*, 2007).

Le reazioni terminano (stadio di terminazione):

- i) quando le specie radicaliche interagiscono tra loro per formare composti non radicalici inattivi (Antolovich *et al.*, 2002);
- ii) per il consumo di tutto l'ossigeno molecolare a disposizione;
- iii) quando le specie radicaliche reagiscono con molecole eventualmente presenti producendo radicali più stabili per motivi di risonanza. Queste sostanze, definite antiossidanti (AOH), fungono quindi di fatto da inibitori della perossidazione lipidica (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005; Laguerre *et al.*, 2007).

1.3. Antiossidanti

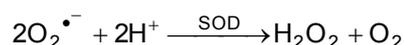
Gli antiossidanti si possono definire come quelle sostanze in grado di ritardare significativamente o prevenire l'ossidazione di substrati ossidabili (Antolovich *et al.*, 2002) e l'attività antiossidante rappresenta quindi la capacità di una molecola di inibire la degradazione ossidativa, come la perossidazione lipidica appena illustrata, intervenendo principalmente nello stadio di propagazione, donando atomi di idrogeno ai radicali perossidi in alternativa al lipide, con conseguente formazione di radicali liberi (AO[•]) molto meno reattivi perché stabilizzati dalla delocalizzazione dell'elettrone spaiato (Roginsky & Lissi, 2005).

Definire in maniera univoca una classificazione delle sostanze antiossidanti sembra non essere un'operazione semplice, data l'elevata quantità di fattori coinvolti (Huang *et al.*, 2005; Fabris *et al.*, 2008); tuttavia non sono mancati in passato numerosi tentativi in tal senso, che hanno tenuto conto di volta in volta dell'origine di tali sostanze (naturali o sintetiche), della loro natura (enzimatiche o non enzimatiche), delle caratteristiche chimico-fisiche (idrofile o lipofile), della struttura (flavonoidi, tocoferoli, stilbeni, ecc.) e della loro modalità di azione (Vertuani *et al.*, 2004; Laguerre *et al.*, 2007).

In particolare, sulla base di quest'ultimo criterio, gli antiossidanti possono essere suddivisi in due classi: "preventivi" e "chain-breaking" (Laguerre *et al.*, 2007).

Gli antiossidanti preventivi bloccano la prima formazione dei radicali rimuovendo gli iniziatori responsabili dell'avvio dell'ossidazione ed ostacolando così la fase di iniziazione: ne fanno parte, ad esempio, composti quali:

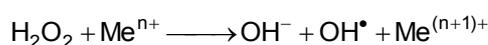
- l'enzima superossido dismutasi (SOD) che catalizza la reazione di dismutazione del radicale superossido, importante iniziatore di catena radicalica, secondo la reazione (Laguerre *et al.*, 2007; Suntres, 2011):



- l'enzima catalasi (CAT) che a sua volta dismuta il perossido di idrogeno, formatosi dalla precedente reazione come da altre reazioni biologiche, in acqua e ossigeno (Laguerre *et al.*, 2007; Suntres, 2011):



- gli agenti chelanti, che complessando gli ioni metallici, come ferro e rame, abili ad agire come catalizzatori ossidoriduttivi, impediscono loro di cedere o acquisire un elettrone (Bindoli & Cavallini, 1980; Laguerre *et al.*, 2007), inibendone di fatto la partecipazione alla reazione di Fenton che produce l'estremamente reattivo e pericoloso radicale ossidrilico OH[•] (Halliwell, 2012):



- i carotenoidi che trasformano l'ossigeno singoletto in tripletto, assorbendo la relativa energia nella struttura molecolare a legami coniugati e successivamente dissipandola sotto forma di calore (Laguerre *et al.*, 2007).

Gli antiossidanti "chain-breaking", ossia interruttori di catena, presentano strutture che permettono di donare facilmente un atomo di idrogeno, trasformandosi a loro volta in radicali liberi molto meno reattivi, rallentando o, nei casi di maggiore efficacia, interrompendo la fase di propagazione delle reazioni radicaliche, secondo la seguente reazione:



dove AOH è l'antiossidante, LOO[•] il radicale perossido, LOOH l'idroperossido, prodotto finale della reazione radicalica, e AO[•] il radicale derivato dall'antiossidante stabilizzato per risonanza. In questa seconda classe si possono inserire i composti fenolici mono- o poli-ossidrilati, come ad esempio tocoferoli, flavonoidi, stilbeni, acidi e alcoli fenolici, ecc., che sono divisi in diverse classi a seconda della loro struttura chimica (D'Archivio *et al.*, 2007; Laguerre *et al.*, 2007), così come sotto schematicamente specificato (Figura 1.4).

Teoricamente l'efficacia antiossidante di un fenoloderivato dipende dalla sua capacità di cedere un atomo H, la quale è correlata all'energia di dissociazione omolitica del legame O-H (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998; Laguerre *et al.*, 2007). In realtà, però, esistono altri requisiti fondamentali affinché tali composti svolgano attività antiossidante: essi devono, innanzitutto, riuscire a reagire con i radicali liberi ad una velocità notevolmente maggiore di quella fra radicali stessi e substrato (Wright *et al.*, 2001); devono poi possedere

una posizione adatta e una buona mobilità verso i siti di produzione di radicali perossidi, perché questi possano essere facilmente intercettati (Laguette *et al.*, 2007); devono, infine, formare un nuovo radicale stabile e quindi scarsamente reattivo, per effetto della delocalizzazione dell'elettrone spaiato sull'anello aromatico (Figura 1.3) oppure per la difficile accessibilità del radicale stericamente impedito, come ad esempio nel caso del BHT che presenta una capacità antiossidante molto superiore a quella del fenolo (Momo *et al.*, 2003), in modo che non reagisca a sua volta con altri acidi grassi insaturi (Rice-Evans *et al.*, 1997; Capella *et al.*, 1997; Sanchez-Moreno *et al.*, 1998; Laguette *et al.*, 2007). Da tutto ciò si evince come i polifenoli presentino differenti proprietà antiossidanti secondo una sorta di gerarchia fra i composti, che dipende principalmente dalla loro struttura chimica (Rice-Evans *et al.*, 1997).

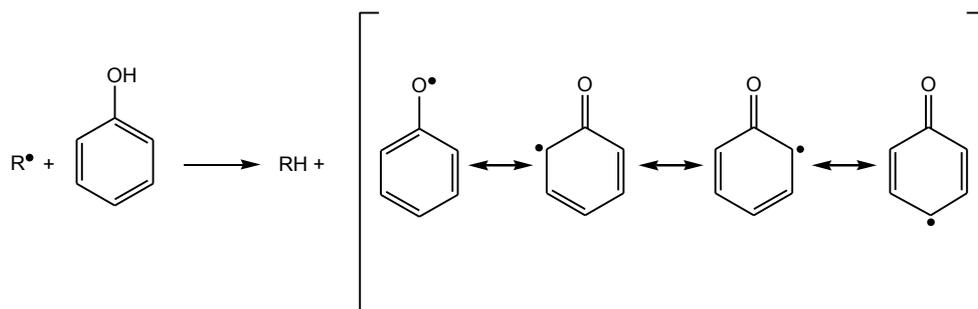


Figura 1.3. Reazione tra un radicale R^\bullet ed un generico fenolo con formazione del radicale fenossile, stabilizzato per risonanza (Gregoris, 2010).

In Figura 1.4 vengono riportate le formule di struttura delle principali classi di polifenoli diffusamente presenti negli alimenti che presentano caratteristiche antiossidanti e, quindi, con importanti ricadute salutistiche.

I tocoferoli rappresentano un'importante classe di otto composti – gli alfa-, beta-, gamma-, delta-tocoferoli ed i corrispondenti tocotrienoli – compresi nel termine generico di vitamina E (Burton & Ingold, 1981; Cunha *et al.*, 2006), che contengono un anello 6-cromanolo e una lunga catena laterale fitilica, caratterizzata da elevata idrofobicità (Cunha *et al.*, 2006): sono presenti naturalmente negli oli vegetali e vengono considerati come i principali agenti antiossidanti presenti nei lipidi e negli oli e grassi vegetali (Vertuani *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2006). Data la loro idrofobicità, i tocoferoli si associano alle membrane cellulari, ai lipidi di riserva ed alle lipoproteine nel sangue e, proprio grazie a questa liposolubilità, rappresentano alcuni dei più potenti antiossidanti: il loro meccanismo di azione prevede la neutralizzazione dei radicali liberi, proteggendo, di conseguenza, gli acidi grassi insaturi dall'ossidazione e prevenendo il danno ossidativo (Lehninger, 1979; Bindoli & Cavallini, 1980; Pokorny *et al.*, 2001; Gurr *et al.*, 2002; Cabras & Martelli, 2004; Cunha *et al.*, 2006).

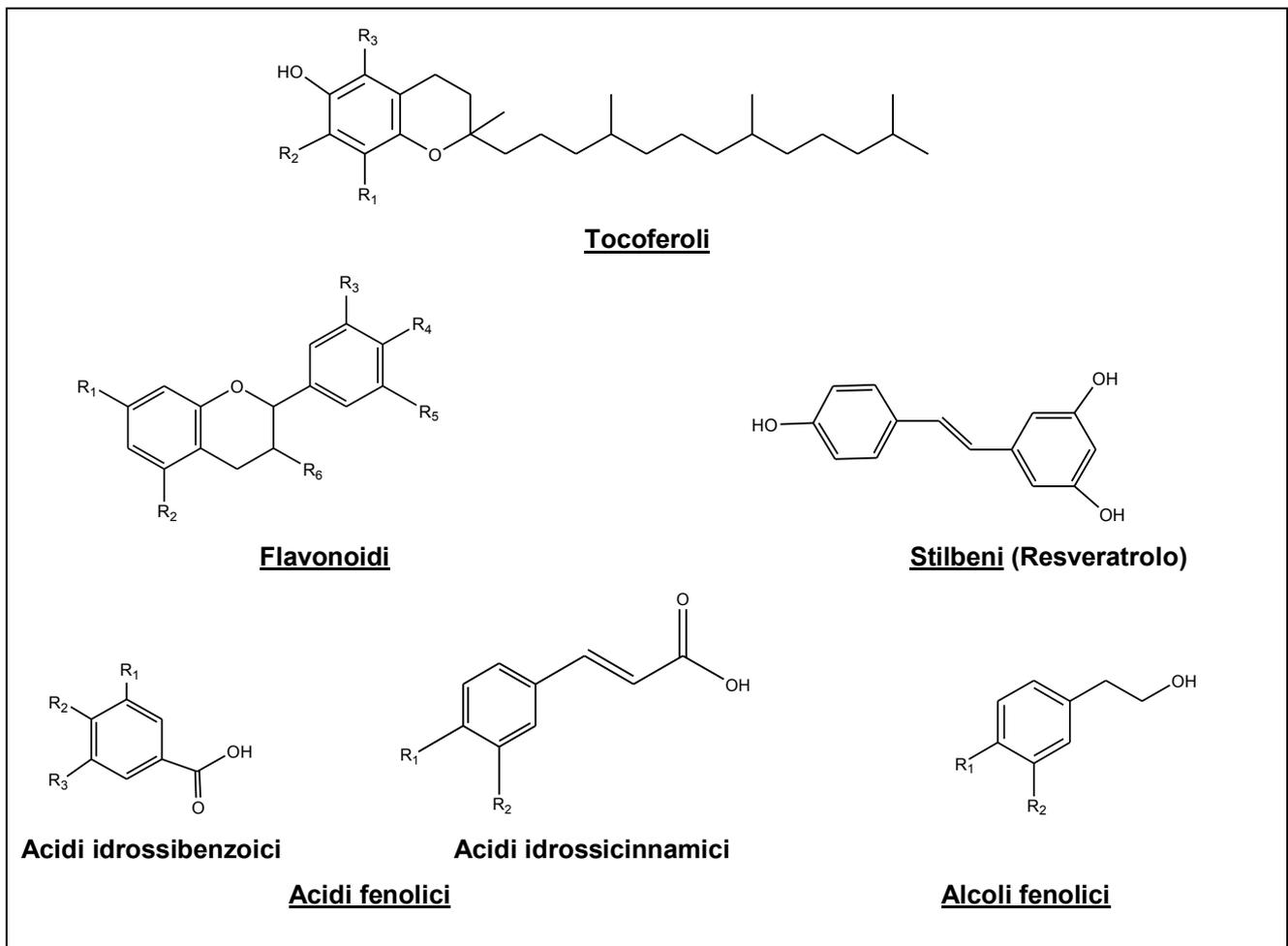


Figura 1.4. Formule di struttura delle principali classi di polifenoli. I residui R sono generalmente gruppi ossidrilici.

I flavonoidi costituiscono i polifenoli più abbondanti nelle piante. Strutturalmente sono caratterizzati da due anelli benzenici (indicati con A e B, vedi Figura 1.5) collegati da una catena lineare di tre atomi di carbonio, che può formare un anello piranico (anello C) chiuso con uno degli anelli benzenici (D'Archivio *et al.*, 2007).

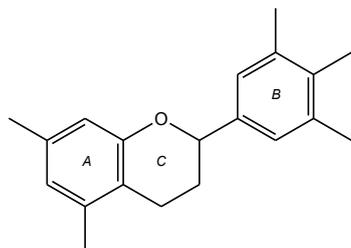
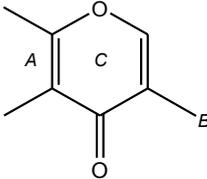
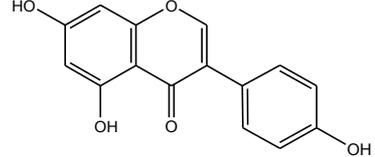
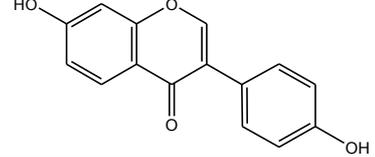
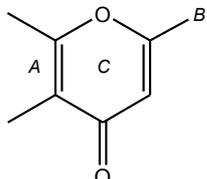
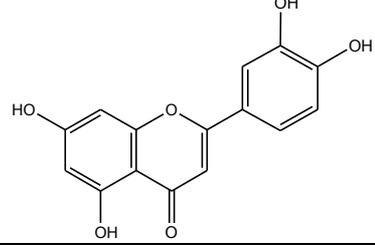
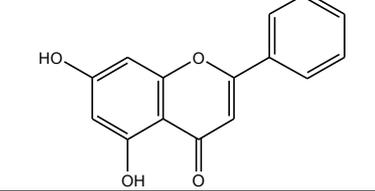
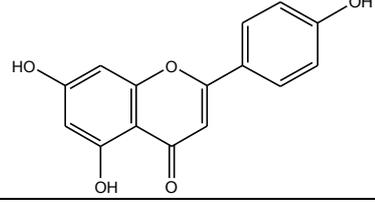
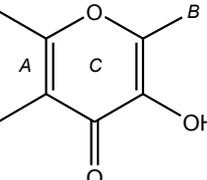
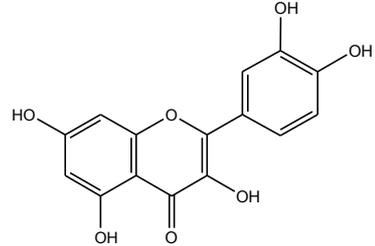
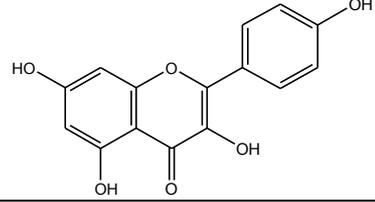
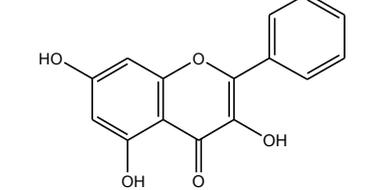
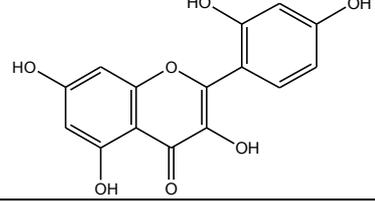


Figura 1.5. Formula di struttura di un generico flavonoide.

Sono stati identificati più di 4000 singoli flavonoidi, divisi nelle sei sottoclassi di flavonoli, flavoni, flavanoni, isoflavoni, antocianine e flavanoli, così come riportato in Figura 1.6, a seconda dello stato di ossidazione dell'anello centrale (D'Archivio *et al.*, 2007); sono abbondantemente presenti nei vegetali o in loro derivati (broccoli, cipolla, mela, melanzane, cioccolato, agrumi, soia, tè, uva, ecc.) (Carratù & Sanzini, 2005).

 <p>Isoflavoni</p>		Genisteina
		Daidzeina
 <p>Flavoni</p>		Luteolina
		Crisina
		Apigenina
 <p>Flavonoli</p>		Quercetina
		Canferolo
		Galangina
		Morina

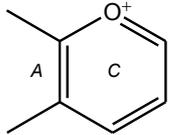
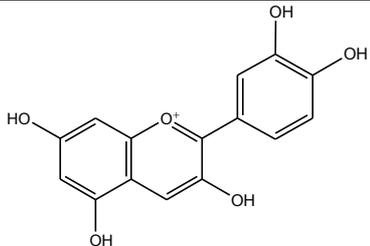
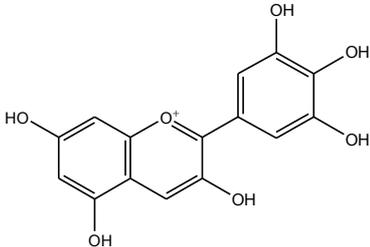
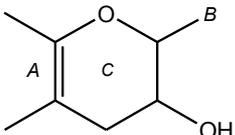
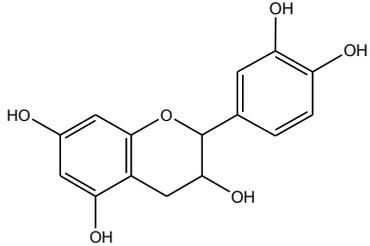
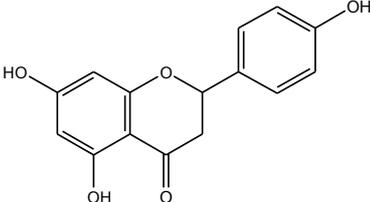
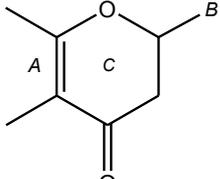
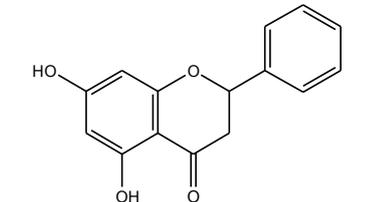
 Antocianine		Cianidina
		Delfinidina
 Flavanoli		Catechina
		Naringenina
 Flavanoni		Pinocembrina

Figura 1.6. Sottoclassi dei flavonoidi.

Il resveratrolo appartiene alla famiglia degli stilbeni che vengono assunti quotidianamente con la dieta; è una fitoalessina (dal greco *φυτον* che significa “pianta” e *αλεξειν* che significa “proteggere”) naturale sintetizzata da diverse specie vegetali in risposta a condizioni di stress di tipo abiotico e biotico determinate, ad esempio, dall’esposizione ai raggi ultravioletti o da infezioni fungine (Gerogiannaki-Christopoulou *et al.*, 2006; D’Archivio *et al.*, 2007; Borriello *et al.*, 2010); esiste in due forme isomeriche, *cis*- e *trans*-, entrambe presenti nel materiale vegetale. In linea di massima, però, l’isomero *trans*- risulta più abbondante, chimicamente più stabile – se protetto dalla luce ed a valori di pH non troppo elevati (Alarcon de la Lastra & Villegas, 2007) – e biologicamente più attivo (Caruso *et al.*, 2004) rispetto a quello *cis*- (Filip *et al.*, 2003). Questo stilbene si trova naturalmente in diversi prodotti alimentari di origine vegetale, quali uva, more e frutti di bosco in generale, prugne, arachidi e nelle radici e nei gambi della pianta *Polygonum cuspidatum* (o *Japanese knotweed*, o Caprifoglio giapponese), utilizzata nella medicina tradizionale cinese e giapponese (Caruso *et al.*, 2004; Alarcon de la Lastra & Villegas, 2007; D’Archivio *et al.*, 2007; Borriello *et al.*, 2010). Si trova nel vino rosso ed in quantità molto minore nel bianco (Alarcon de la Lastra & Villegas, 2007).

La piceide o polidatina (Figura 1.7) è un derivato glicosilato del resveratrolo, dove uno dei due ossidrilici in meta risulta legato con legame glicosidico ad una molecola di glucosio. La piceide risulta molto più idrofilica del resveratrolo a motivo del residuo glucosidico ricco di gruppi ossidrilici (Fabris *et al.*, 2008).

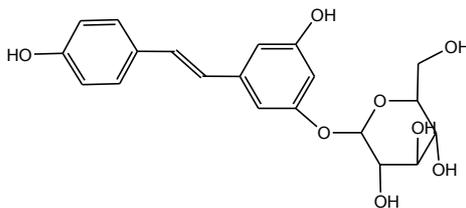


Figura 1.7. Piceide o polidatina.

Gli acidi fenolici si possono suddividere in due sottoclassi: gli acidi idrossibenzoici, derivati dell'acido benzoico e gli acidi idrossicinnamici, derivati dell'acido cinnamico. Gli acidi idrossibenzoici si trovano molto raramente nelle piante commestibili dagli esseri umani e pertanto non assumono un grande interesse nutrizionale. Uno dei polifenoli rappresentativi di questa categoria è l'acido gallico (Figura 1.8), contenuto nel tè (D'Archivio *et al.*, 2007).

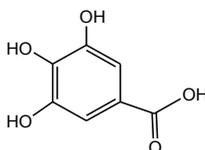


Figura 1.8. Acido gallico.

Gli acidi idrossicinnamici sono contenuti nei cereali ed in alcuni tipi di frutta (ad esempio kiwi): il più comune è l'acido caffeico (Figura 1.9), presente ad alte concentrazioni nel caffè (D'Archivio *et al.*, 2007).

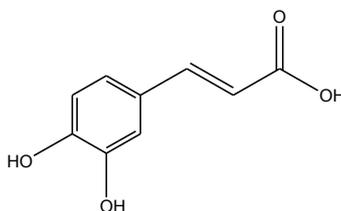


Figura 1.9. Acido caffeico.

Tirosolo e idrossitirosolo (Figura 1.10) sono i principali alcoli fenolici, contenuti maggiormente nell'olio di oliva, ma rintracciabili anche nel vino rosso (per quanto concerne tirosolo e idrossitirosolo), nel vino bianco e birra (esclusivamente per il tirosolo) (D'Archivio *et al.*, 2007).

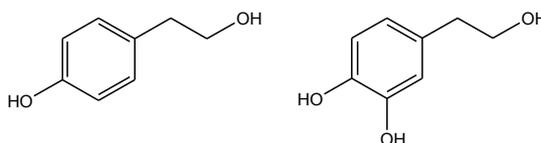


Figura 1.10. Tirosolo (a sinistra) e idrossitirosolo (a destra).

Materiali e metodi

2.1. Materiali

2.1.1. Reagenti

Sono stati utilizzati reagenti al massimo grado di purezza ottenibile commercialmente.

Il tocoferolo, il pentametilcromanolo, il trolox, il lauril gallato, il pirogallolo, l'acido gallico, il BHT, l'acido ascorbico, l'acido linoleico e tutti i flavonoidi utilizzati nel presente lavoro di ricerca sono stati forniti dalla Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) rappresentata in Italia dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Il resveratrolo e la piceide sono stati gentilmente donati dalla GLURES S.r.l., *spin off* accademico dell'Università Ca' Foscari di Venezia. Sali, tamponi e solventi sono stati acquistati dalla ditta Carlo Erba (Milano, Italia), mentre il sodio dodecil solfato (SDS) è stato fornito dalla ditta Biorad Laboratories (Richmond, California). L'iniziatore radicalico 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propano] (ABIP) è stato fornito dalla ditta Wako Chemicals (Neuss, Germania).

Reagenti e composti chimici sono stati conservati in freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ o in frigo a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, in funzione della loro stabilità alla temperatura.

Sono stati inoltre utilizzati oli alimentari di oliva e di semi, presenti in commercio o forniti direttamente dalle ditte produttrici, e scelti sulla base della zona di origine e del prezzo commerciale (Tabella 2.1). Sono stati conservati al fresco e al buio, come da indicazione dell'etichetta.

Le soluzioni di iniziatore radicalico in tampone sodio fosfato e di antiossidanti in etanolo assoluto sono state preparate giornalmente e durante l'uso conservate in frigo ad una temperatura di circa $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le soluzioni tampone sono state conservate in frigo a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e rinnovate ogni 15 giorni, mentre la dispersione micellare di SDS contenente l'acido linoleico, a motivo della facilità di ossidazione di quest'ultimo, è stata invece rinnovata ogni giorno.

Il pH del tampone è stato monitorato giornalmente ed eventualmente corretto al valore originale.

Tutte le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua di grado di purezza Milli-Q.

2.1.2. Strumentazione

Per condurre gli esperimenti sono state utilizzate le seguenti strumentazioni:

- Potenziostato Amel 559;
- Potenziostato assemblato dal Sig. Roberto Zuliani del Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi dell'Università Ca' Foscari di Venezia, secondo le indicazioni del richiedente gruppo di ricerca;
- Spettrofotometro UV-Visibile UV-1800 Shimadzu;
- Spettrofotometro UV-Visibile Lambda 35 Perkin Elmer;
- Sonicatore Vibra-Cell 50 (50 W, 20 kHz) Sonics & Materials;

- Sonicatore Labsonic® (100 W, 30 kHz) Sartorius;
- Termostato Haake D1 con precisione di ± 0.5 °C;
- Centrifuga Hermle Z 252 MK Labnet;
- Centrifuga Heraeus Megafuge 16R Thermo Fisher Scientific.

Le misure spettrofotometriche sono state effettuate utilizzando una cella termostatabile in quarzo Hellma (Milano, Italia), di cammino ottico da 1 cm.

Le misure di consumo di ossigeno sono state effettuate mediante un microelettrodo ad ossigeno MI-730 (Microelectrodes, Inc.), inserito in una cella ossigrafica in vetro, termostata, costruita per questo scopo su preciso disegno del richiedente dal Sig. Italo Ongaro di questa Università. La cella è dotata di una piccola ancorotta magnetica per l'agitazione.

Il volume della cella è stato misurato in 2.3 mL, mediante pesata della cella in modalità operativa (quindi munita di magnete e con l'elettrodo) dapprima vuota e quindi riempita di acqua distillata di grado Milli-Q.

2.2. Metodi

2.2.1. Misure spettrofotometriche

Il saggio Folin-Ciocalteu per la determinazione della capacità riducente totale della soluzione antiossidante è stato condotto come segue: ad una aliquota di 20 μL di soluzione campione venivano aggiunti in successione 150 μL di reagente di Folin, 600 μL di una soluzione Na_2CO_3 al 15%, ed acqua distillata sino al volume finale di 3000 μL . Dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente, l'incremento di assorbanza, dovuto alla reazione, era misurato a 784 nm ed il risultato espresso come concentrazione millimolare equivalente del polifenolo catechina che, secondo una retta di calibrazione precedentemente messa a punto, comportava uguale incremento di assorbanza.

Si è adottato un valore di assorbanza molare ϵ_{784} di $17800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, riportato in letteratura e verificato mediante una serie di prove preliminari a concentrazione nota di catechina.

Il saggio DPPH prevede che a 700 μL di campione, inseriti in una cella spettrofotometrica da 1 mL, si aggiungano 250 μL di soluzione etanolica di DPPH 0.5 M e 50 μL di etanolo. Si lascia incubare per 60 minuti, quindi viene misurata la diminuzione di assorbanza a 518 nm dovuta alla reazione, contro un bianco costituito da 250 μL di DPPH 0.5 mM e 750 μL di etanolo. Il risultato viene espresso come concentrazione millimolare equivalente del polifenolo catechina che, secondo una retta di calibrazione precedentemente messa a punto, comportava uguale incremento di assorbanza.

Il saggio enzimatico, messo a punto dal nostro gruppo di ricerca (Stevanato *et al.*, 2004), è stato così condotto: in una cella spettrofotometrica da 3 mL si sono inseriti 2900 μL di una soluzione tampone di fosfato di potassio 0.1 M, pH 8.0, contenenti 4-amminofenazone 3 mM, H_2O_2 2 mM e l'enzima "HorseRadish Peroxidase" (HRP) 0.33 μM . Quindi si sono aggiunti 100 μL di campione, si è lasciato in incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti (tempo necessario per il completamento della reazione) e successivamente si è misurato l'incremento di assorbanza a 500 nm. Anche in questo caso il risultato è stato espresso come concentrazione millimolare equivalente del polifenolo catechina che, secondo una retta di calibrazione precedentemente messa a punto, comportava uguale incremento di assorbanza. Si è adottato

un valore di assorbanza molare ϵ_{500} di $5900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, verificato mediante una serie di prove preliminari a concentrazione nota di catechina.

2.2.2. Misure di consumo di ossigeno

Tra le diverse varianti del saggio di inibizione della perossidazione lipidica viene scelto il metodo di misura del consumo di ossigeno conseguente il processo perossidativo.

In particolare, tale metodica prevede di operare, in condizioni controllate, in un sistema micellare modello costituito da micelle di sodio dodecil solfato (SDS) contenenti acido linoleico (LH); il processo perossidativo è innescato dall'iniziatore radicalico 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propano] (ABIP) (Figura 2.1), un azo-composto la cui decomposizione comporta una produzione costante di radicali liberi. La reazione ossidativa comporta un consumo di ossigeno che viene rilevato da un elettrodo ad ossigeno, l'elettrodo di Clark (Clark *et al.*, 1953). L'aggiunta di molecole ad azione antiossidante provoca un rallentamento della velocità di consumo di ossigeno che, come più dettagliatamente descritto nei capitoli a seguire, rappresenta una misura delle proprietà antiossidanti della molecola in esame (Antolovich *et al.*, 2002; Laguerre *et al.*, 2007; Fabris *et al.*, 2008).

Se non diversamente specificato, le condizioni operative generali adottate, frutto di verifica di quanto riportato in bibliografia e di diverse prove preliminari, sono le seguenti: tampone sodio fosfato 50 mM, pH 7.4, SDS 50 mM, LH 10 mM, ABIP 4 mM, T 37 °C. La concentrazione di antiossidante è variabile e viene di volta in volta specificata.

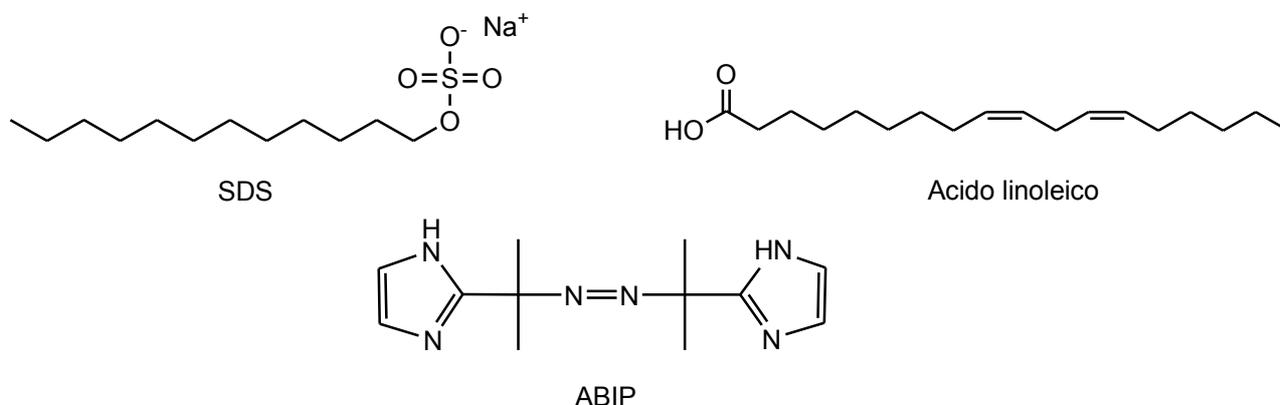


Figura 2.1. Formula di struttura di sodio dodecil solfato (SDS), acido linoleico (LH) e 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propano] (ABIP).

Come già accennato, il consumo di ossigeno viene monitorato mediante elettrodo di Clark, sensore costituito da un catodo di platino, posto in un cilindro isolante su cui viene avvolto l'anodo di argento, il tutto contenuto in un altro cilindro in acrilico, contenente una soluzione di cloruro di potassio (KCl), dotato di membrana in Teflon permeabile all'ossigeno, che permette di escludere le altre specie presenti in soluzione (Figura 2.2).



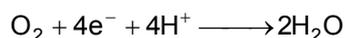
Figura 2.2. Microelettrodo ad ossigeno MI-730 (Microelectrodes, Inc.).

Mediante un potenziostato, il catodo di platino e l'anodo di argento vengono polarizzati in modo che il catodo venga mantenuto ad un potenziale di -800 mV rispetto all'anodo (potenziale di riduzione dell'ossigeno molecolare) e collegati tramite la soluzione di KCl.

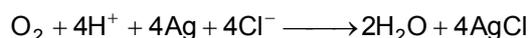
In queste condizioni, all'anodo avviene la seguente reazione:



Simultaneamente al catodo, l'ossigeno che diffonde attraverso la membrana viene ridotto nella reazione:



con la seguente reazione globale:



Il passaggio di corrente, prodotto dalla reazione di ossidoriduzione, viene rilevato attraverso un microamperometro di precisione: l'intensità di corrente che viene misurata è proporzionale alla concentrazione di ossigeno presente in soluzione. Il dato sperimentale viene misurato ad ogni secondo e registrato mediante un sistema di acquisizione dati che utilizza una scheda Aquitek CM con convertitore analogico digitale a 16 bit e software di controllo, visualizzazione e memorizzazione in linguaggio LabView, il tutto assemblato e messo a punto dal Sig. Roberto Zuliani di questa Università. La concentrazione dell'ossigeno molecolare presente in soluzione è stata espressa in unità arbitrarie, $[\text{O}_2]_{\text{au}}$ (Rigo *et al.*, 2000; Zennaro *et al.*, 2007).

2.2.3. Preparazione della dispersione micellare e misura del consumo di ossigeno

La dispersione micellare di SDS/LH in acqua è formata da una soluzione di tampone sodio fosfato 50 mM, pH 7.4, alla quale vengono aggiunti sodio dodecil solfato (SDS) 50 mM e acido linoleico (LH) 10 mM, mantenuta in costante agitazione a 37 °C per tutta la notte, al fine di permettere l'omogenea formazione delle micelle contenenti acido linoleico. La dispersione viene successivamente posta nella cella ossigrafica termostata, aperta e mantenuta in costante agitazione per 30 minuti, affinché venga raggiunto l'equilibrio termico (37 °C) e nella dispersione sia garantita una concentrazione di ossigeno disciolto in equilibrio con l'ossigeno atmosferico (indicativamente 0.22 mM). La cella di misura viene quindi ermeticamente chiusa, avendo l'accortezza che non vi siano intrappolate bolle d'aria, e di seguito viene iniettato l'iniziatore radicalico ABIP che, decomponendosi termicamente con velocità costante, innesca il processo di perossidazione dell'acido linoleico, associato al consumo di ossigeno rilevato dall'elettrodo di Clark. L'eventuale presenza di antiossidante, aggiunto prima dell'iniziatore radicalico, rallenta la cinetica di perossidazione lipidica, fino alla sua completa scomparsa.

2.3. Affidabilità della misura sperimentale del consumo di ossigeno

Da quanto esposto in precedenza, riguardo la valutazione dell'attività di inibizione della perossidazione lipidica, ne deriva che, per una misura cinetica corretta del processo, risulta indispensabile operare con una cella impermeabile alle intrusioni di ossigeno atmosferico. La Figura 2.3 riporta l'immagine fotografica della cella ossigrafica termostatabile, progettata e costruita allo scopo nel nostro laboratorio, con particolare

attenzione alla impermeabilizzazione della stessa alle infiltrazioni di aria dall'esterno, attuata mediante un sistema di sigilli "o-ring". La cella viene munita di sbarretta per l'agitazione magnetica e l'elettrodo posizionato alla corretta profondità. La cella viene quindi riempita con la dispersione micellare, avendo cura di evitare la formazione di bolle d'aria. Nella stessa figura si mostra la modalità, a prova di infiltrazione di ossigeno, per completare il riempimento e per introdurre gli altri reagenti; fra essi, quando necessario, l'antiossidante (AOH) in soluzione di etanolo assoluto. L'operazione avviene mediante una siringa spinta attraverso un coperchio forato provvisto di setto di nylon a tenuta, munito di un ago per favorire l'uscita dell'eccesso di liquido. Con la stessa modalità si aggiunge, come ultimo reagente, il generatore di radicali ABIP in soluzione acquosa tamponata. L'ago e la siringa vengono quindi tolti e la cella viene definitivamente sigillata con un ultimo "o-ring" interposto fra il coperchio forato ed un secondo coperchio esterno.

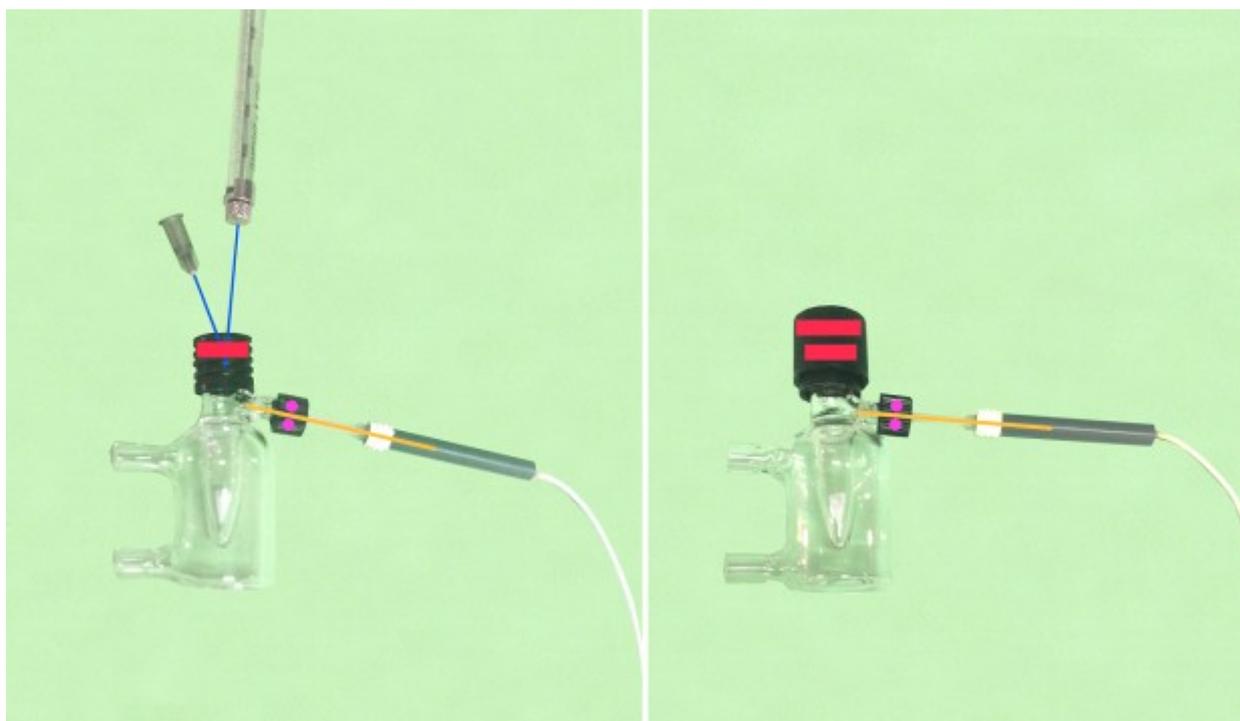


Figura 2.3. A sinistra: immagine della cella ossigrafica in fase di iniezione dell'iniziatore radicalico ABIP. A destra: cella chiusa in fase di misura. Codici colori: giallo, elettrodo di Clark; rosso, setto di nylon; blu, siringa ed ago di sicurezza; magenta, "o-ring".

Gli accorgimenti apportati alla cella e le attente condizioni operative adottate assicurano l'assenza di bolle d'aria all'interno della cella e la massima riduzione della diffusione di ossigeno atmosferico durante le misure. Si è voluto comunque verificare l'ermeticità della cella alla diffusione dell'ossigeno atmosferico nel corso delle prove, misurando l'andamento di concentrazione di ossigeno per tempi molto lunghi (oltre 60 ore) ed a concentrazioni basse di LH e ABIP. Come risulta dalla Figura 2.4, quando il generatore di radicali ABIP è completamente esaurito (punto più basso della curva) è ancora presente una certa quantità di ossigeno che aumenta in modo molto lento, riportandosi ai valori iniziali di corrente elettrica, corrispondenti alle concentrazioni iniziali di ossigeno disciolto, nell'arco di circa 64 ore complessive.

La maggior parte degli esperimenti riportati in questo lavoro di tesi non supera le 0.8 ore. Il rapporto fra i tempi porta ad una stima dell'ossigeno diffuso durante l'esperimento non superiore all'1.2%. L'errore dovuto alle inevitabili infiltrazioni di ossigeno atmosferico risulta quindi essere trascurabile, poiché al di sotto dell'incertezza sperimentale derivante da tutte le operazioni di misura (pesate, misura dei volumi, diluizioni, ecc.).

Per periodi temporali più lunghi di misura del consumo di ossigeno, la non perfetta impermeabilità della cella ossigrafica costituisce un parametro di cui bisogna tenere conto.

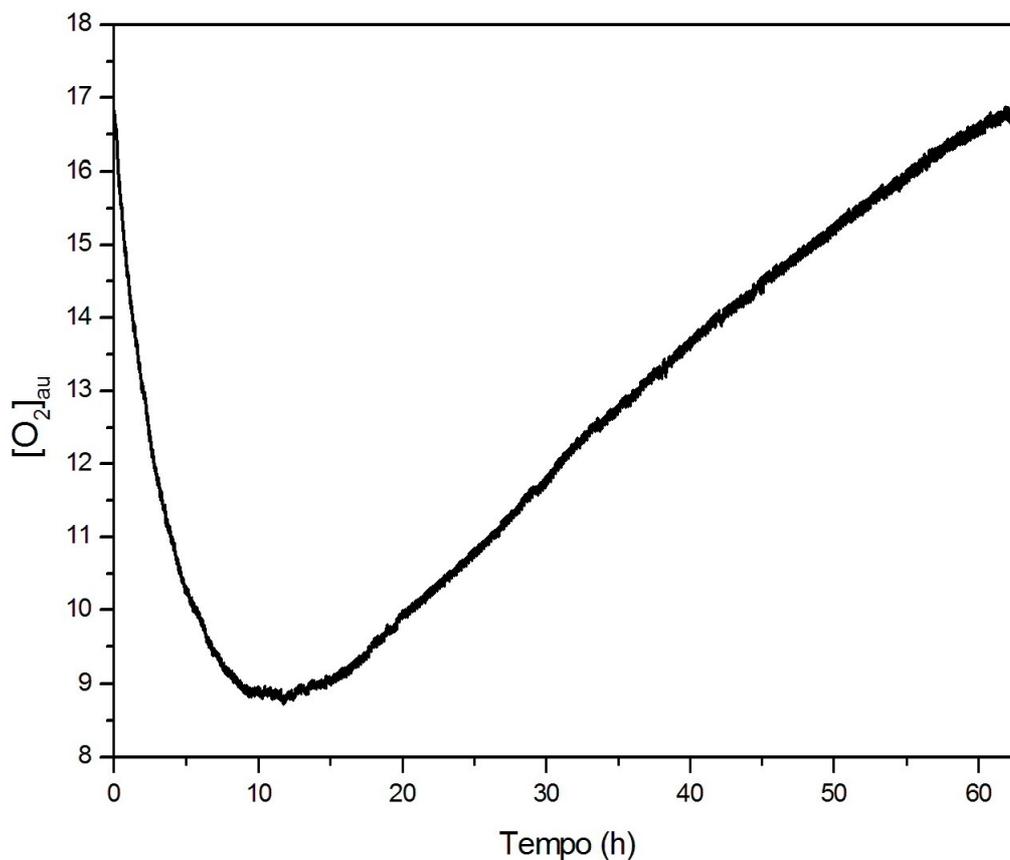


Figura 2.4. Verifica della permeabilità della cella ossigrafica all'ossigeno atmosferico. La misura ossigrafica relativa ad un tipico esperimento di perossidazione lipidica, a basse concentrazioni di LH e ABIP, si è lasciata protrarre sino a quando si è registrata una corrente uguale al valore al tempo zero. Tale tempo è risultato di poco superiore alle 60 ore complessive. Condizioni sperimentali: SDS 50 mM, LH 1 mM, ABIP 0.5 mM a 37 °C. La concentrazione dell'ossigeno molecolare presente in soluzione è stata espressa in unità arbitrarie $[O_2]_{au}$.

2.4. Campioni di olio alimentare analizzati

In Tabella 2.1 sono riportati i campioni di olio presi in considerazione, oggetto degli approfondimenti riportati nel Capitolo 8. Si tratta di olio extravergine di oliva (OEVO), raffinato, e di semi diversi con l'indicazione delle zone di origine, quando specificato, o di imbottigliamento e del costo commerciale. I campioni per i quali non si riporta il prezzo sono stati forniti direttamente dalle ditte produttrici.

Tabella 2.1. Oli di origine vegetale analizzati. Le denominazioni utilizzate seguono le indicazioni riportate sulle etichette commerciali dei prodotti. Si riportano i valori di densità sperimentalmente misurati a 25 ± 1 °C. OEVO: olio extravergine di oliva. (a): campioni forniti direttamente dal produttore.

Campione	Olio	Zona d'origine ^o o di imbottigliamento ⁱ	Prezzo (€/litro)	Densità (g/mL)
22	OEVO DOP	Sardegna ^o	4.67	0.91
23	OEVO DOP	Sicilia ^o	11.99	0.91
24	OEVO DOP	Puglia ^o	8.53	0.91
25	OEVO DOP	Veneto ^o	19.80	0.91
26	OEVO DOP	Liguria ^o	15.67	0.91
27	OEVO DOP	Umbria ^o	13.32	0.91
28	OEVO comunitario	Umbria ⁱ	3.98	0.91
29	OEVO comunitario	Lombardia ⁱ	4.89	0.91
30	OEVO comunitario	Umbria ⁱ	2.99	0.91
32	Olio di oliva raffinato	Toscana ⁱ	2.89	0.91
33	Olio di oliva raffinato	Lombardia ⁱ	4.56	0.91
36	OEVO italiano	Sicilia ^o	(a)	0.91
37	Olio di semi di girasole	Veneto ⁱ	(a)	0.91
38	Olio di semi di canapa	Veneto ⁱ	(a)	0.92
39	Olio di semi di canapa	Veneto ⁱ	(a)	0.92
40	Olio di semi di arachide	Emilia-Romagna ⁱ	2.49	0.89
41	Olio di semi di mais	Emilia-Romagna ⁱ	4.44	0.89
42	Olio di semi di vinacciolo	Lombardia ⁱ	3.75	0.89
43	Olio di semi vari	Campania ⁱ	2.12	0.89

Valutazione critica delle principali metodiche analitiche proposte per la determinazione delle proprietà antiossidanti

In letteratura vengono riportate diverse metodiche analitiche per la valutazione del “potere antiossidante” di una molecola o composto; si basano su principi e modelli chimici differenti ed utilizzano tecniche di misura principalmente spettrofotometriche ed elettrochimiche. Differiscono tra loro in termini di meccanismi e condizioni di reazione, specie ossidante e substrato ossidabile ed espressione dei risultati (Huang *et al.*, 2005; Roginsky & Lissi, 2005; Magalhaes *et al.*, 2008; Karadag *et al.*, 2009) proponendo differenti scale di valore antiossidante, spesso notevolmente discordi, sia quantitativamente che qualitativamente (Antolovich *et al.*, 2002; Gregoris *et al.*, 2013), e comunque correlate ad una molecola antiossidante presa come riferimento.

Tali metodiche possono essere suddivise nelle seguenti classi:

- misura dell'abilità della molecola esaminata di agire da trappola (“scavenger”) nei confronti:
 - di specifiche ROS e RNS (specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, rispettivamente) prodotte allo scopo;
 - di radicali liberi stabili di natura non biologica, quindi non presenti in natura e caratterizzati da una buona stabilità;
- misura di parametri che possono essere correlati al potere antiossidante, come ad esempio:
 - la complessiva capacità riducente del campione;
 - la quantificazione dei polifenoli, che rappresentano la quasi totalità delle molecole con proprietà antiossidanti, o di alcune tipologie degli stessi (come ad esempio i flavonoidi), oppure la quantificazione dell'acido ascorbico, altra particolare molecola con proprietà antiossidanti (Magalhaes *et al.*, 2008).

Sfortunatamente, come sopra anticipato, tutti i metodi riportati in letteratura presentano dei limiti perché determinano, della molecola in esame, un parametro chimico-fisico in qualche modo collegato alle sue caratteristiche antiossidanti.

Infatti, l'azione antiossidante che avviene *in vivo* è un processo intricato, che comprende la capacità di una molecola di inserirsi in un sistema biologico complesso ed agire in una sequenza articolata di reazioni radicaliche a catena, solo parzialmente note, rallentando o annullando la velocità di tali reazioni secondo il seguente schema semplificato (Figura 3.1):

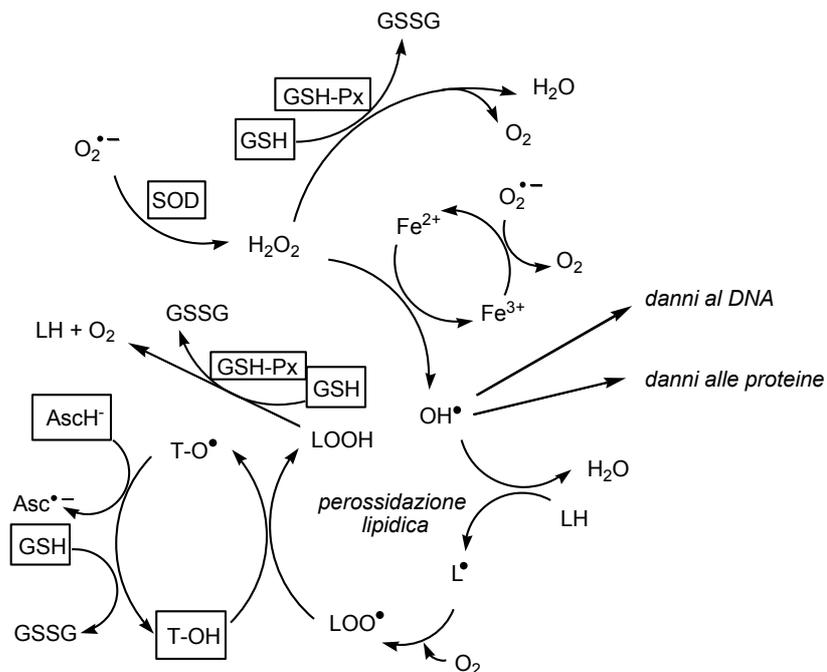
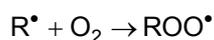


Figura 3.1. Schematizzazione della complessa serie di reazioni che avvengono nell'organismo, attraverso le quali viene mantenuto il corretto equilibrio pro-ossidanti/antiossidanti. SOD: superossido dismutasi; GSH: glutatione; GSH-Px: glutatione perossidasi; GSSG: glutatione ossidato; LH: lipide; LOOH: lipide idroperossido; T-OH: tocoferolo (vitamina E); AscH⁻: ascorbato (vitamina C) (Gregoris, 2010).

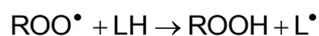
a) Capacità di "scavenging" contro specifiche ROS/RNS

Si tratta di un metodo accurato che bene simula *in vitro* i processi che avvengono *in vivo*, nel quale radicali perossidi (ROO[•]), che si formano nei processi ossidativi di campioni biologici ed alimenti, reagiscono in modo competitivo (reazioni parallele) con la molecola "target", che viene modificata, oppure con la molecola con proprietà antiossidanti (AOH), secondo il seguente schema (Magalhaes *et al.*, 2008):

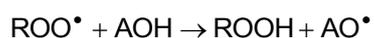
- un azo-composto termolabile (R-N=N-R) decomponendosi forma un radicale centrato sul carbonio (R[•]), il quale a sua volta reagisce velocemente con l'ossigeno per dare un flusso costante di radicale ROO[•]:



- il radicale perossido strappa un radicale H[•] da una molecola "target" ossidabile (LH):



- o, alternativamente, da una molecola con proprietà antiossidanti (AOH):



In pratica la presenza dell'antiossidante inibisce o ritarda l'ossidazione radicalica della molecola "target", indotta dal radicale perossido, in modo dipendente dal rapporto delle costanti di velocità delle reazioni competitive.

La velocità di ossidazione della molecola "target" può essere misurata secondo modalità differenti, così come differenti possono essere le molecole "target" ed i generatori di radicali perossidi (Magalhaes *et al.*, 2008).

Di seguito si riportano i principali di questi saggi.

➤ *Saggio ORAC (“Oxygen Radical Absorbance Capacity”)*

Si basa sulla misura della diminuzione nel tempo della fluorescenza di una molecola “target” fluorescente (ad esempio fluoresceina) sotto un flusso costante e controllato di radicale perossido, generato per decomposizione termica di un azo-composto. La velocità della decomposizione spontanea della fluoresceina è rallentata/inibita dalla presenza di antiossidanti “chain-breaking”. La reazione viene seguita per 30 minuti e la quantificazione della capacità antiossidante è data dalla differenza fra l’area sottesa alla curva, che rappresenta l’ossidazione della fluoresceina, in assenza ed in presenza di antiossidante (Magalhaes *et al.*, 2008; Lopez-Alarcon & Denicola, 2013) e viene generalmente espressa in Trolox equivalenti (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico), ovvero la concentrazione di una soluzione di Trolox con una capacità antiossidante equivalente a quella trovata per la soluzione testata (Magalhaes *et al.*, 2008).

Questo metodo, frequentemente usato, può essere applicato sia ad antiossidanti che presentano il così detto “lag time” sia a quelli che ne sono privi. I punti di debolezza del metodo sono principalmente dovuti: i) ai lunghi tempi di misura; ii) alla conseguente probabilità che la reazione sia influenzata anche dai prodotti di ossidazione secondari delle reazioni lente; iii) al fatto che il deterioramento della molecola “target” e la protezione antiossidante siano lontane chimicamente e concettualmente da quello che avviene in un substrato biologico (Frankel & Meyer, 2000; Magalhaes *et al.*, 2008).

➤ *Saggio TRAP (“Total Radical-trapping Antioxidant Parameter”)*

E’ stato sviluppato per la determinazione delle proprietà antiossidanti del plasma umano. Il metodo si basa sulla misura del tempo nel quale il consumo di ossigeno viene inibito dal plasma (che agisce da “target”) durante un processo perossidativo condotto da un flusso controllato di ROO^{*}, generato dalla decomposizione di un azo-composto (Wayner *et al.*, 1985).

Nella versione originale del saggio TRAP veniva misurato il consumo di ossigeno mediante un elettrodo ad ossigeno, in assenza ed in presenza di antiossidante; nelle versioni più recenti viene privilegiata la metodica spettrofluorimetrica, utilizzando la β-ficoeritrina come “target” fluorescente e l’abilità del plasma di prevenire o rallentare l’ossidazione del “target” viene determinata mediante misure di intensità di fluorescenza (Magalhaes *et al.*, 2008). La quantificazione è basata sulla durata del “lag time” durante il quale l’ossidazione è inibita dall’antiossidante. Questa procedura rappresenta un limite del metodo in quanto non tutti gli antiossidanti presentano il “lag time”; inoltre manca un criterio univoco per stabilire il punto finale e questo rende difficile confrontare i risultati ottenuti da differenti laboratori od operatori.

Peraltro, come il precedente, anche questo metodo, per modalità esecutive e specie chimiche coinvolte, non è in grado di mimare ciò che avviene nei substrati biologici (Magalhaes *et al.*, 2008).

b) Saggio della perossidazione lipidica

L’ossidazione dell’acido linoleico o delle LDL (“Low Density Lipoprotein”) viene indotta in presenza di ossigeno da Cu (II) o un azo-composto. Se la reazione viene condotta in solvente organico, la progressione dell’auto-ossidazione può essere monitorata per via spettrofotometrica misurando l’assorbanza a 234 nm, lunghezza d’onda di massimo assorbimento del perossido lipidico formatosi. Se invece la reazione viene

condotta in micelle disperse in soluzione acquosa, che meglio mimano fenomeni che avvengono *in vivo*, la cinetica di consumo di ossigeno non può essere monitorata spettrofotometricamente, a motivo dell'assorbimento dell'acqua nell'UV (Huang *et al.*, 2005), ma amperometricamente usando l'elettrodo di Clark. In questo caso viene misurata la velocità di consumo di ossigeno in assenza ed in presenza di antiossidante ed i risultati vengono generalmente espressi in termini di IC_{50} , ovvero la concentrazione di antiossidante che dimezza la velocità di consumo di ossigeno e quindi la perossidazione lipidica (Rossetto *et al.*, 2002). Comparato con gli altri saggi, questo metodo meglio riproduce *in vitro* la perossidazione lipidica così come avviene *in vivo*, includendo come "target" l'uso dell'acido linoleico, largamente presente nelle membrane biologiche e quindi oggetto di naturale perossidazione (Niki, 2010).

Inoltre va considerato un aspetto fondamentale, spesso trascurato in letteratura: i metodi per la determinazione delle proprietà antiossidanti di un composto devono tenere in considerazione la sua lipofilità, ovvero la capacità del composto stesso di trasferirsi dal mezzo acquoso, dove generalmente si trova disciolto o disperso, al mezzo lipidico, dove avvengono i fenomeni perossidativi più gravi (Pryor *et al.*, 1988).

c) Saggio della capacità di sequestro ("scavenging") di radicali stabili non-biologici

La diffusione di questo metodo è dovuta alla sua semplicità e rapidità di esecuzione; inoltre sono metodi che non richiedono una molecola "target" (soggetta a perossidazione) in quanto i soli componenti della reazione sono la specie radicalica e la molecola antiossidante (Antolovich *et al.*, 2002). Oltre a quelli specificatamente riportati per ciascuna metodica, il lato debole generale di questa tipologia di saggi consiste nella già citata diversità chimica e meccanicistica con quanto avviene nei sistemi biologici.

➤ Saggio dell'ABTS (2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-solfonato])

Il metodo prevede la formazione del radicale catione cromoforo ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-solfonato]), che presenta massimi di assorbimento a 414, 645, 734 e 815 nm.

Il metodo originale è basato sulla generazione del radicale ferrilmioglobina che reagisce con l'ABTS per formare il radicale catione ABTS^{•+}. In questa prima versione del metodo, il campione di antiossidante viene aggiunto prima della generazione del radicale catione in modo tale che l'ABTS^{•+} appena generato venga immediatamente consumato dall'antiossidante. Il tempo durante il quale non si registra un netto incremento di assorbanza dovuto all'accumulo di ABTS^{•+} viene preso come misura della capacità antiossidante del campione (Miller *et al.*, 1993). L'ordine di aggiunta dei reagenti alla soluzione è stato oggetto di discussione per la possibile reazione spuria fra la molecola antiossidante e l'acqua ossigenata usata per produrre la ferrilmioglobina. E' stata quindi proposta una variante al metodo nella quale il campione di antiossidante viene introdotto dopo la generazione del radicale catione ABTS^{•+} e viene registrata la differenza dei valori di assorbanza prima e dopo l'aggiunta della soluzione di antiossidante.

Sono state altresì proposte metodiche alternative nella produzione di ABTS^{•+}, nella misura del tempo di reazione e nella lunghezza d'onda di misura dell'assorbanza. Ad esempio, l'ABTS^{•+} può essere generato con biossido di manganese, AAPH o persolfato di potassio; si è proposto il valore di 734 nm di lunghezza d'onda di misura per minimizzare l'errore dovuto a possibili torbidità della soluzione.

I risultati sono generalmente espressi come equivalenti di Trolox.

Il saggio è semplice e applicabile ad analisi di routine. L'azione "scavenging" con il metodo dell'ABTS può essere attuata a differenti valori di pH permettendo quindi di verificare il variare del potere antiossidante di una molecola al variare del pH; inoltre la solubilità di ABTS^{•+} in acqua e solventi organici permette l'analisi con la stessa metodica di antiossidanti idrofili e lipofili.

I lati deboli della metodica sono dovuti alla necessità di preparare al momento *in situ* il radicale catione e la dipendenza del risultato dal tempo di incubazione, parametro correlato alla differente cinetica di reazione dei diversi antiossidanti (Magalhaes *et al.*, 2008).

➤ *Saggio del DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile)*

E' basato sulla capacità dell'antiossidante di ridurre il radicale libero stabile DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile) alla corrispondente idrazina (DPPH-H) (Blois, 1958). La reazione comporta un cambio di colore dal porpora del DPPH al giallo pallido di DPPH-H, che può essere monitorato spettrofotometricamente (Fauconneau *et al.*, 1997) o anche mediante risonanza elettronica di spin (ESR) (Calliste *et al.*, 2001; Izuta *et al.*, 2009). Recentemente è stata sviluppata una variante al metodo basata sulla riduzione amperometrica del DPPH all'elettrodo di carbone vetroso; la misura della corrente registrata è proporzionale alla concentrazione di DPPH (Milardovic *et al.*, 2006).

Questo metodo risente del pH e del solvente; inoltre alcune molecole antiossidanti di grandi dimensioni, che reagiscono rapidamente con i radicali perossidi, non possono essere quantificate con questo saggio per motivi di impedimento sterico. Un ulteriore svantaggio deriva dal fatto che il radicale DPPH è un radicale stabile dell'azoto che non ha quindi similarità con gli altamente reattivi e transienti radicali perossidi coinvolti nella perossidazione lipidica. Inoltre sembra che alcune reazioni fra DPPH e polifenoli siano di equilibrio (Huang *et al.*, 2005). Il saggio è comunque molto utilizzato per la facilità di esecuzione, nella versione spettrofotometrica, e per la disponibilità commerciale del radicale libero stabile DPPH (Magalhaes *et al.*, 2008).

d) Saggi di valutazione della capacità riducente totale

Anche questa rappresenta una classe di saggi molto in uso, soprattutto il saggio Folin-Ciocalteu adottato dalla Comunità Europea per la determinazione del contenuto totale di polifenoli (TPC) nei vini.

➤ *Saggio di Folin-Ciocalteu (FC)*

La metodica è basata sull'ossidazione chimica dei composti fenolici ad opera di una soluzione ossidante, chiamata reagente di Folin, costituita da acido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) che si riducono ad una soluzione di ossidi di colore blu (W_8O_{23} e Mo_8O_{23}). L'analisi viene condotta spettrofotometricamente (Singleton & Rossi, 1965).

Questo metodo, seppure abbastanza semplice nella procedura, non è specifico per i composti fenolici, dato che alcune specie interferenti come ammine aromatiche e acido ascorbico possono ridurre il reagente di Folin, sovrastimando così il contenuto reale di polifenoli. Per tale motivo non può essere applicato per la determinazione del valore di TPC, a meno che il campione non venga soggetto a laboriosi pretrattamenti per la rimozione degli interferenti; per tale ragione viene recentemente proposto per la misura di una generica capacità riducente totale (Stevanato *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005). Il metodo è comunque diffusamente

utilizzato per la sua semplicità e riproducibilità; i reagenti sono disponibili commercialmente e la misura dell'assorbanza ad alte lunghezze d'onda minimizza le interferenze delle matrici alimentari. Le limitazioni, oltre a quanto sopra riportato, concernono il lungo tempo di analisi (circa 2 ore) e l'impossibilità di applicarlo ad antiossidanti lipofili (Magalhaes *et al.*, 2008).

➤ Saggio FRAP ("Ferric Reducing Antioxidant Power")

Il saggio FRAP ("Ferric Reducing Antioxidant Power") misura l'abilità di un antiossidante di ridurre il ferro (III) complessato con 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) $[\text{Fe(III)-(TPTZ)}_2]^{3+}$ a ferro (II) $[\text{Fe(II)-(TPTZ)}_2]^{2+}$, intensamente colorato di blu in mezzo acido. La capacità riducente viene calcolata monitorando l'aumento di assorbanza a 593 nm, assumendo una soluzione standard di antiossidante, generalmente acido ascorbico, come riferimento.

Il saggio non è molto utilizzato per le sue molte limitazioni:

- il valore della capacità riducente può essere influenzato da altre sostanze con potenziale di riduzione inferiore a quello della coppia redox Fe(II)/Fe(III);
- vi possono essere antiossidanti che riducono lentamente il Fe(III) complessato rispetto al tempo consigliato di analisi (generalmente 4 minuti) e che quindi vengono sottostimati;
- gli antiossidanti che agiscono solamente come "chain-breaking", che sono quelli più efficaci, non possono essere quantificati;
- la concomitante produzione di Fe(II), noto pro-ossidante (vedasi a questo proposito la reazione di Fenton riportata nel precedente Paragrafo 1.3), può portare alla produzione di addizionali specie radicaliche dell'ossigeno (Magalhaes *et al.*, 2008).

➤ Saggi elettrochimici

La capacità riducente totale può essere misurata elettrochimicamente, ad esempio tramite la metodica della voltammetria ciclica. La capacità riducente è misurata attraverso tre parametri: i) il potenziale di ossidazione, che indica la specifica capacità riducente del campione; ii) la corrente anodica di picco e iii) l'area sottostante la curva anodica, che sono correlate alla concentrazione della specie riducente presente nel campione.

Matrici complesse, come ad esempio campioni biologici o di alimenti, spesso presentano più di un singolo componente che può essere ossidato all'elettrodo, ovvero donare un elettrone attorno al medesimo valore di potenziale: in questo caso l'area sottesa alla curva anodica risulta il parametro preferibile per la quantificazione del potere antiossidante totale.

La tecnica basata su misure elettrochimiche presenta i seguenti vantaggi: a) il voltammogramma è ottenibile sia in ambiente acquoso che organico; b) non sono necessarie preventive reazioni chimiche; c) possono essere analizzati campioni intensamente colorati o torbidi (caso frequente nei campioni biologici ed alimentari), situazioni non facilmente risolvibili per via spettrofotometrica.

La maggiore limitazione di questa tecnica sta nel fatto che l'elettrodo di misura deve essere pulito con frequenza per rimuovere i residui di campione dalla superficie sensibile e mantenerne in tal modo costanti le prestazioni (Magalhaes *et al.*, 2008).

e) Saggi di determinazione di individuali categorie di antiossidanti

A seconda del metodo, possono essere specifici per un'ampia classe di composti, come ad esempio di quelli che contengono una struttura fenolica, o di specifici gruppi o strutture funzionali delle molecole.

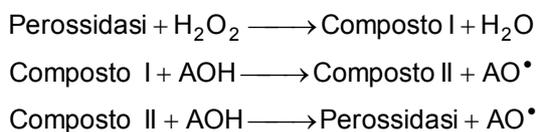
➤ Metodo enzimatico (PE) per la determinazione del contenuto totale di polifenoli

Il nostro gruppo di ricerca (Stevanato *et al.*, 2004) ha proposto un nuovo saggio enzimatico che misura il contenuto totale di polifenoli (TPC) presenti in alimenti (tè e vino). Questo metodo, che successivamente è stato applicato con successo anche per creare una possibile scala di potere antiossidante di composti puri, prende ispirazione dalla nota reazione di Trinder, catalizzata dall'enzima perossidasi (HRP), che coinvolge in modo specifico strutture fenoliche secondo la seguente reazione:



In pratica il fenolo (o i polifenoli) subisce una reazione di condensazione perossidativa con l'incolore 4-amminofenazone, per effetto dell'idrogeno perossido e con l'azione catalizzatrice della perossidasi, per dare un prodotto fortemente colorato e quindi determinabile spettrofotometricamente.

Il metodo enzimatico (PE) è quindi una misura del contenuto totale di polifenoli a motivo della assoluta specificità dell'enzima perossidasi per le strutture fenoliche e dell'abilità dei gruppi -OH fenolici di subire l'ossidazione monoelettronica formando radicali fenossili, come avviene quando i polifenoli svolgono la loro azione antiossidante, così come sotto specificato (Stevanato *et al.*, 2009):



dove Composto I e Composto II rappresentano due distinte strutture ossidate dell'enzima e AO[•] il radicale fenossile.

Sebbene il meccanismo preciso del metodo PE sia ancora incerto, la differenza di risposta fra composti fenolici è probabilmente dovuta alla differente nucleofilicità dei corrispondenti radicali fenossili e quindi alla relazione struttura-reattività di tali composti. Questa considerazione spiegherebbe anche i differenti risultati che si ottengono applicando i metodi PE e FC (Ma & Cheung, 2007). E' da considerare, inoltre, che il coefficiente di estinzione molare del composto colorato che si forma dalla reazione di condensazione perossidativa varia, seppure non in modo macroscopico, al variare della struttura del polifenolo.

Questo saggio è stato considerato più appropriato e di più facile applicazione rispetto ai due altri metodi più in voga Folin-Ciocalteu (FC) e DPPH. L'analisi è veloce ed i risultati non sono inficiati dalla presenza di sostanze, come acido ascorbico, acido citrico e solfiti che invece agiscono da interferenti in modo significativo nel metodo Folin-Ciocalteu (Ma & Cheung, 2007; Stevanato *et al.*, 2009).

➤ Determinazione del contenuto totale di flavonoidi

- Metodo del cloruro di alluminio

Questo metodo (Smirnova & Pervykh, 1998) permette la determinazione del contenuto totale dei soli flavonoidi. Il principio di base si fonda sul fatto che l'alluminio cloruro ($AlCl_3$) forma complessi con i gruppi orto-di-ossidrilici, il gruppo cheto C4 ed i gruppi ossidrilici C3 o C5. In ambiente acido il complesso con i gruppi orto-di-ossidrilici è labile mentre risultano più stabili i complessi fra il cheto gruppo C4 e gli ossidrilici C3 o C5 (Smirnova & Pervykh, 1998).

La formazione del complesso è associata ad uno shift della banda di assorbimento UV, così che la lunghezza d'onda di massimo assorbimento ed il relativo coefficiente di estinzione molare dipendono dal flavonoide investigato. Un ulteriore punto debole del metodo consiste nel fatto che è adatto ad identificare solamente alcune sottoclassi dei flavonoidi, ovvero i flavoni (flavonoidi che contengono un carbonile C4) e flavonoli (flavoni che contengono un ossidrilico C3), i quali contengono la struttura necessaria per la formazione dei complessi con l'alluminio (Chang *et al.*, 2002). Pertanto l'uso di questo metodo per la determinazione dei flavonoidi porta ad una sottostima del contenuto dei flavonoidi stessi, dato che alcune sottoclassi non vengono determinate.

- *Saggio del DNPH (2,4-dinitrofenilidrazina)*

Il metodo si basa sulla reazione fra 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) e composti carbonilici (chetoni o aldeidi) per formare 2,4-dinitrofenilidrazone, che presenta un massimo di assorbimento a 495 nm. La metodica quindi è applicabile solamente a flavonoidi che contengono un gruppo carbonilico e, come nel metodo precedentemente discusso, presenta il grande limite di non poter determinare le altre sottoclassi di flavonoidi (Chang *et al.*, 2002).

3.1. Misura delle proprietà antiossidanti di campioni di alimenti con differenti saggi e correlazione dei risultati ottenuti

Con l'eccezione di specifiche ricerche rivolte soprattutto allo studio della correlazione fra struttura chimica e caratteristiche antiossidanti, nella maggior parte dei casi i saggi per la determinazione delle proprietà antiossidanti vengono effettuati per ragioni applicative a campioni reali di alimenti. Per quanto sopra esposto, si è voluto completare la valutazione critica dei differenti saggi per la determinazione del potere antiossidante di composti con la misura, applicando alcuni dei differenti metodi citati, delle proprietà antiossidanti di campioni di frutta brasiliana, ottenuti mediante una collaborazione con l'Istituto di Bioscienze del Campus Universitario di Botucatu (Brasile).

Nel lavoro, pubblicato su "BioMed Research International" [Gregoris, E., Pereira Lima, G. P., Fabris, S., Bertelle, M., Sicari, M., & Stevanato, R. (2013). Antioxidant properties of brazilian tropical fruits by correlation between different assays. *BioMed Research International*, 2013, 1-8], si sono determinate le proprietà antiossidanti di 17 differenti frutti, alcuni dei quali poco noti ed investigati, misurandone il contenuto totale di antocianine, acido ascorbico e acido idrossicinnamico, ed applicando le quattro differenti metodiche analitiche di Folin-Ciocalteu, DPPH, enzimatica e di inibizione della perossidazione lipidica. Le serie di dati ottenute applicando le quattro differenti metodiche per la determinazione del potere antiossidante sono state quindi messe a confronto per evidenziare le possibili correlazioni.

Dalla Figura 3.2, dove vengono riportati i grafici delle correlazioni che hanno dato un minimo di risultato, si nota chiaramente la scarsissima correlazione, a conferma che le metodiche analitiche impiegate misurano

ciascuna un parametro che è certamente legato alle proprietà antiossidanti della molecola investigata, ma che non presenta relazione lineare con i risultati ottenuti applicando le altre metodiche. Peraltro la questione è stata ampiamente dibattuta in letteratura, anche se nessuna proposta alternativa, che si avvicini a quanto avviene *in vivo*, e che si basi su un modello meccanicistico razionale e condiviso, è stata sino ad oggi avanzata.

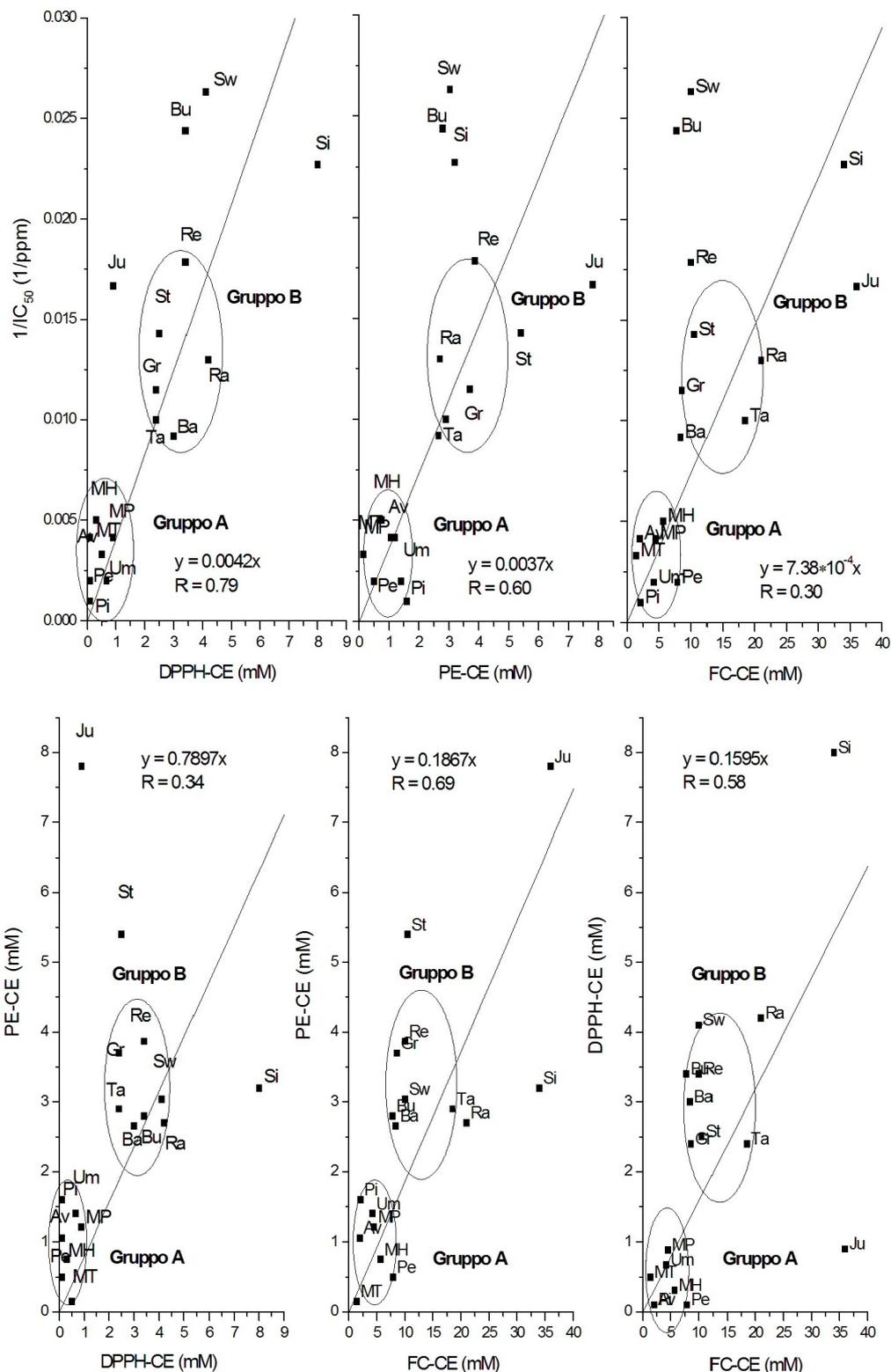


Figura 3.2. Correlazioni fra misure di attività antiossidanti di frutti brasiliani applicando le quattro differenti metodiche di inibizione della perossidazione lipidica, DPPH, enzimatica, Folin-Ciocalteu. I dati sperimentali sono espressi in concentrazione mM di catechina equivalente (CE), mentre il dato di inibizione della perossidazione lipidica è riportato come il reciproco della concentrazione di antiossidante che dimezza la velocità di consumo di ossigeno (1/IC₅₀).

Si continuano ad utilizzare metodiche che sfruttano condizioni di ossidazione accelerata con il coinvolgimento, come innesco, di un iniziatore radicalico chimicamente indotto, o di un parametro fisico come ad esempio l'esposizione alla luce o la temperatura, oppure con l'aggiunta di catalizzatori metallici (di transizione) e con l'impiego di sistemi modello che in genere non riproducono situazioni reali di rilevanza biologica (Antolovich *et al.*, 2002); mentre nella selezione di un metodo di analisi, in particolare di reazioni biologiche o di matrici complesse quali sono la generalità degli alimenti, le condizioni sperimentali di analisi, il substrato, i componenti presenti nella cella di misura e le loro concentrazioni dovrebbero in realtà simulare il più possibile il sistema reale o *in vivo* (Karadag *et al.*, 2009).

Si conferma quindi, così come affermato nel paragrafo *Scopo della tesi*, la necessità di individuare una metodica analitica efficace per tale determinazione che: i) nella sperimentazione *in vitro*, si avvicini quanto più possibile ai processi che avvengono *in vivo*; ii) misuri dei parametri che abbiano significato meccanicistico; iii) permetta di creare una scala di potere antiossidante delle molecole/principi attivi più diffusi nella dieta.

In quest'ottica, nella prosecuzione del progetto di tesi, si è deciso di focalizzare l'attenzione sul saggio della perossidazione lipidica in quanto appare il sistema *in vitro* che più si avvicina a quanto avviene *in vivo* (Rhayem *et al.*, 2008), per le seguenti ragioni:

- si misura il consumo di ossigeno coinvolto nella reazione di perossidazione lipidica, reazione che *in vivo* comporta comprovati danni gravi alla salute (Halliwell & Chirico, 1993; Spiteller, 1998, 2001 e 2007; Barrera, 2012);
- il "target" della reazione di perossidazione *in vitro* è l'acido linoleico, un acido grasso polinsaturo presente in forma esterificata negli organismi (soprattutto nelle membrane cellulari) ma anche in molti alimenti (per esempio gli oli di origine vegetale e negli alimenti loro derivati) (Lodish *et al.*, 1995; Nelson & Cox, 2014);
- la misura avviene per via elettrochimica, con l'utilizzo dell'elettrodo ad ossigeno di Clark, con l'esclusione quindi di reagenti estranei al processo perossidativo;
- l'ambiente di reazione è acquoso, nel quale sono disperse micelle di SDS drogate con acido linoleico, che bene mimano per struttura molecolare e supramolecolare le membrane cellulari (Barclay *et al.*, 1984; Dai *et al.*, 2009; Mihaljevic *et al.*, 2011);
- nel mezzo di reazione vengono aggiunte le molecole con supposte proprietà antiossidanti, sia idrofile che lipofile, senza alcun cambiamento nelle condizioni sperimentali, oppure matrici alimentari tal quali, di cui, come riportato nel Capitolo 8, verrà determinato il potere antiossidante senza laboriose e poco affidabili estrazioni con solventi.

Perossidazione lipidica: meccanismo ed inibizione

4.1. Inibizione della perossidazione lipidica

La capacità di sequestrare specie radicaliche altamente reattive verso l'ossigeno molecolare può considerarsi la caratteristica che meglio definisce un antiossidante.

Al fine di confrontare l'effetto nei confronti della perossidazione lipidica di una serie di molecole, note in letteratura per le loro caratteristiche antiossidanti, si sono effettuate delle misure, alle condizioni sperimentali precedentemente riportate, di nove specie antiossidanti dalle differenti caratteristiche chimico-fisiche, riportate in Figura 4.1, a differenti concentrazioni nell'intervallo compreso fra $0.5 \cdot 10^{-3}$ e $5 \cdot 10^{-3}$ mM.

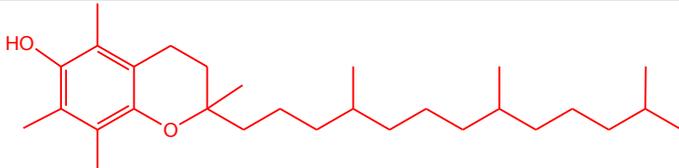
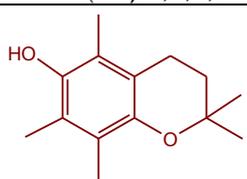
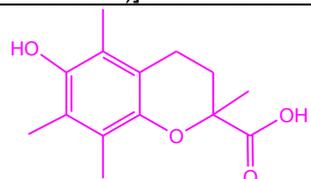
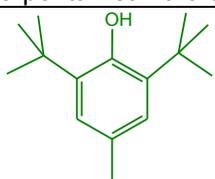
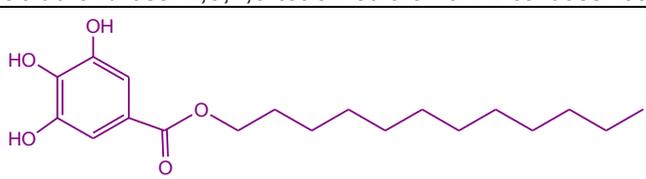
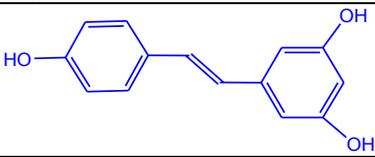
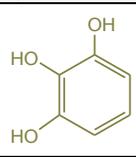
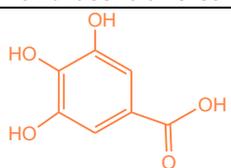
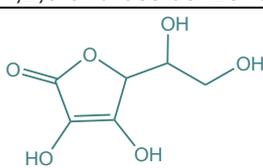
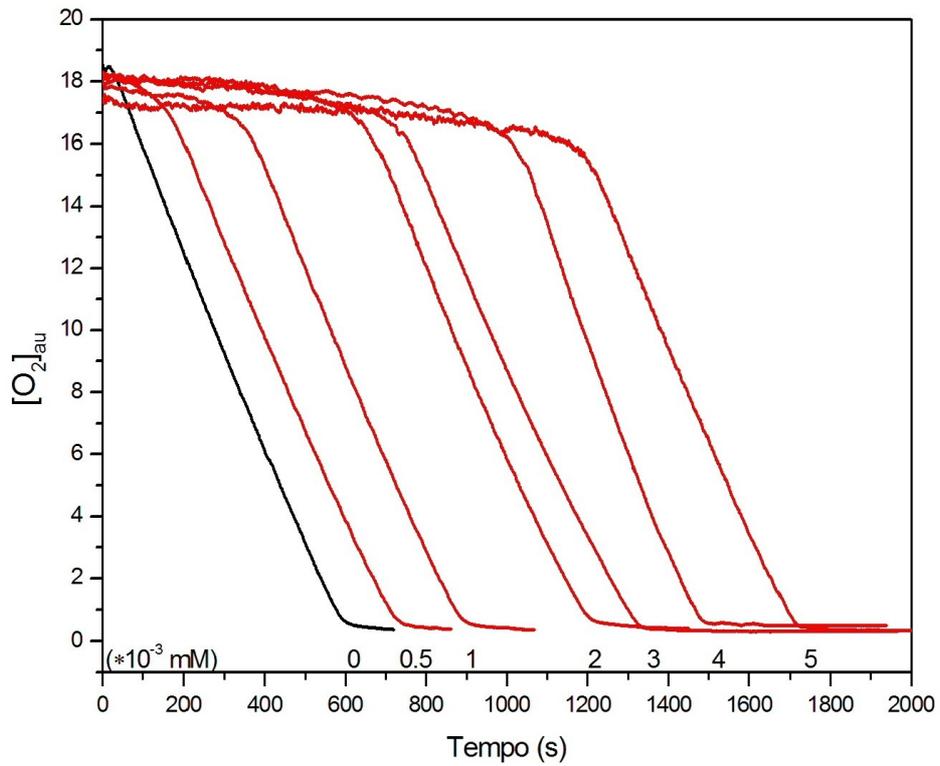
	
AOH: tocoferolo	
(2R)-2,5,7,8-tetrametil-2-[(4R,8R)-(4,8,12-trimetiltridecil)]-6-cromanolo	
	
AOH: pentametilcromanolo	AOH: trolox
2,2,5,7,8-pentametill-6-cromanolo	acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico
	
AOH: BHT	AOH: lauril gallato
2,6-di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenolo	dodecil 3,4,5-triidrossibenzoato
	
AOH: resveratrolo	AOH: pirogallolo
3,5,4'-triidrossi- <i>trans</i> -stilbene	1,2,3-triidrossibenzene
	
AOH: acido gallico	AOH: acido ascorbico
acido 3,4,5-triidrossibenzoico	(5R)-[(1S)-1,2-diidrossietil]-3,4-diidrossifuran-2(5H)-one

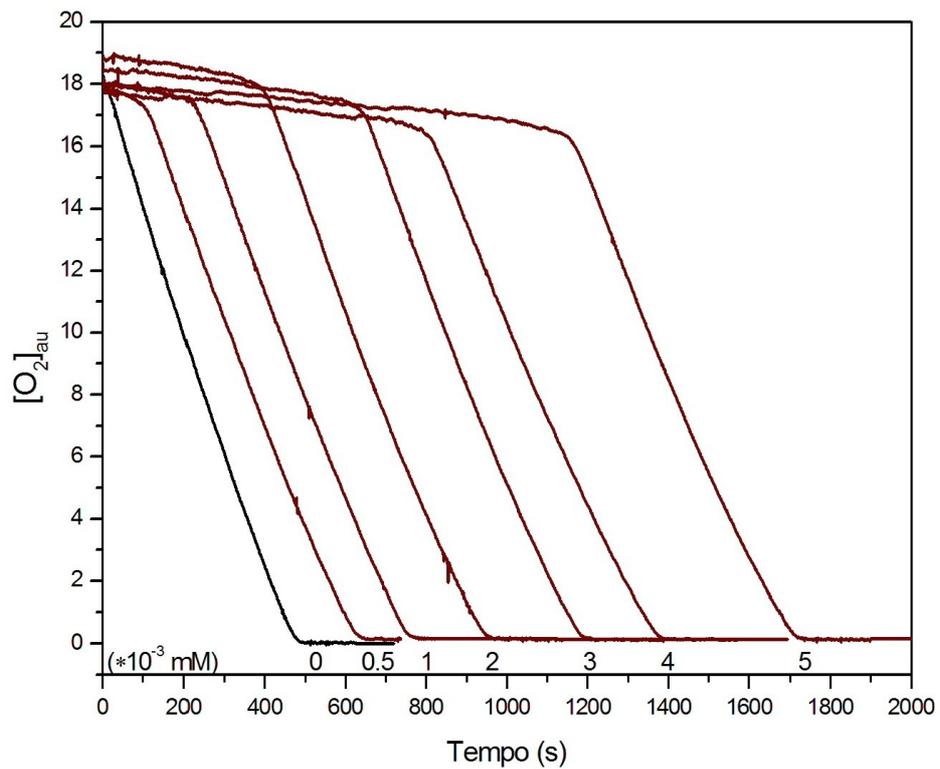
Figura 4.1. Formule di struttura, denominazione corrente e nomenclatura IUPAC delle nove molecole antiossidanti investigate. Per una migliore facilità di lettura delle tracce ossigrafiche, ciascun antiossidante viene rappresentato con un proprio colore caratteristico secondo il seguente codice colore: **Tocoferolo**, rosso; **Pentametilcromanolo**, vino; **Trolox**, magenta; **BHT**, verde oliva; **Lauril gallato**, viola; **Resveratrolo**, blu; **Pirogallolo**, giallo scuro; **Acido ascorbico**, ciano scuro; **Acido gallico**, arancio.

Le tracce ossigrafiche ottenute per la serie di antiossidanti investigati sono mostrate nelle Figure 4.2a-i.

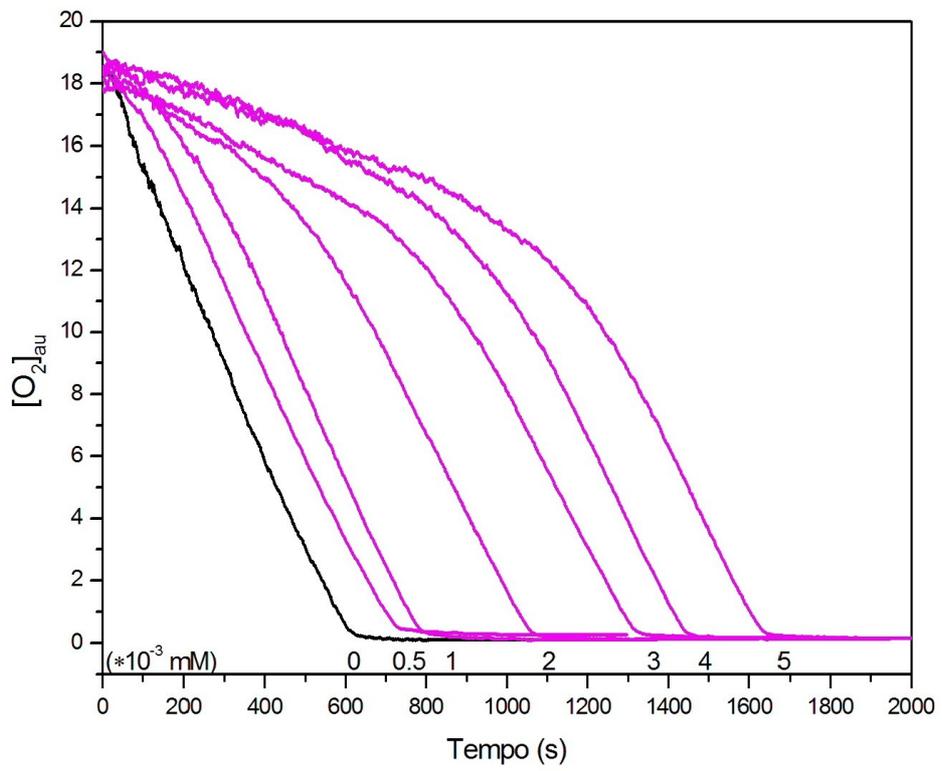
a) Tocoferolo



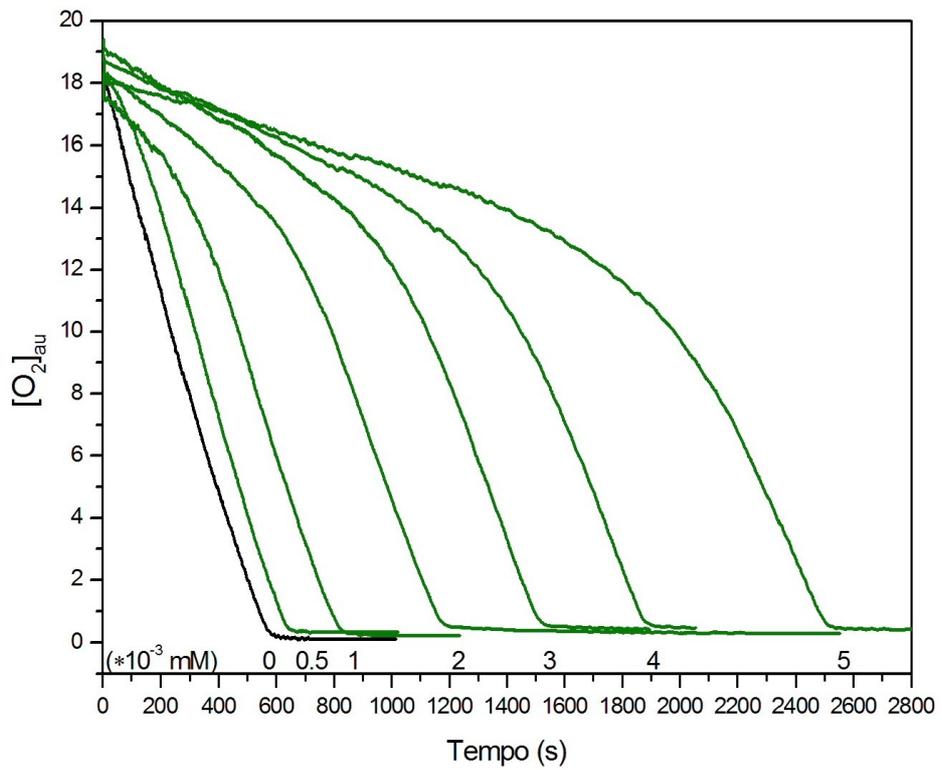
b) Pentametilcromanolo



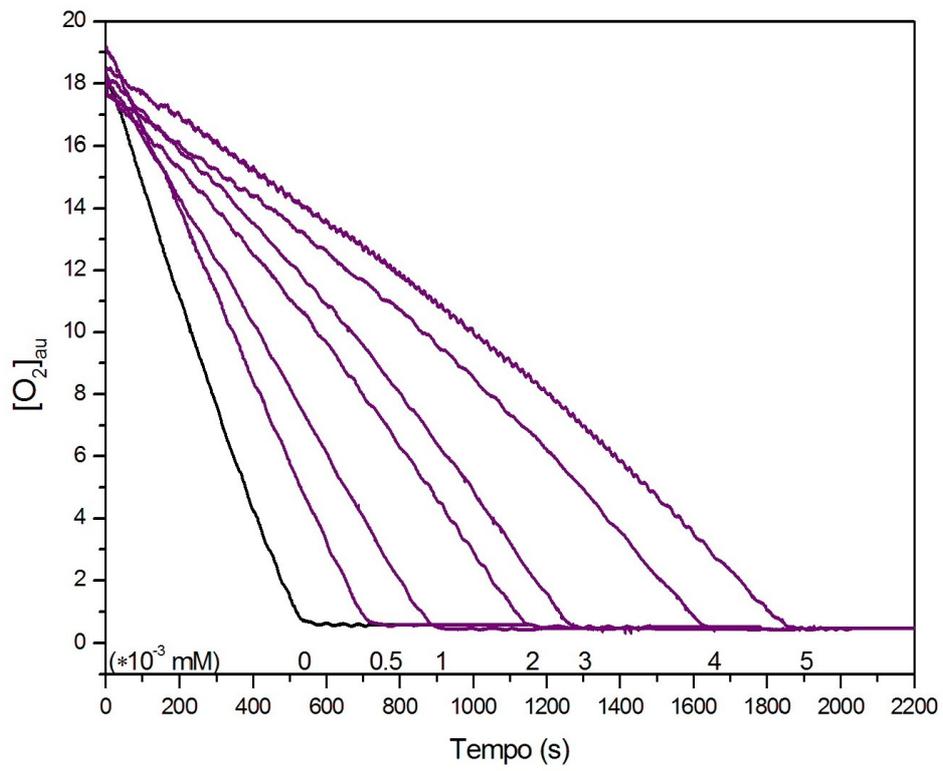
c) Trolox



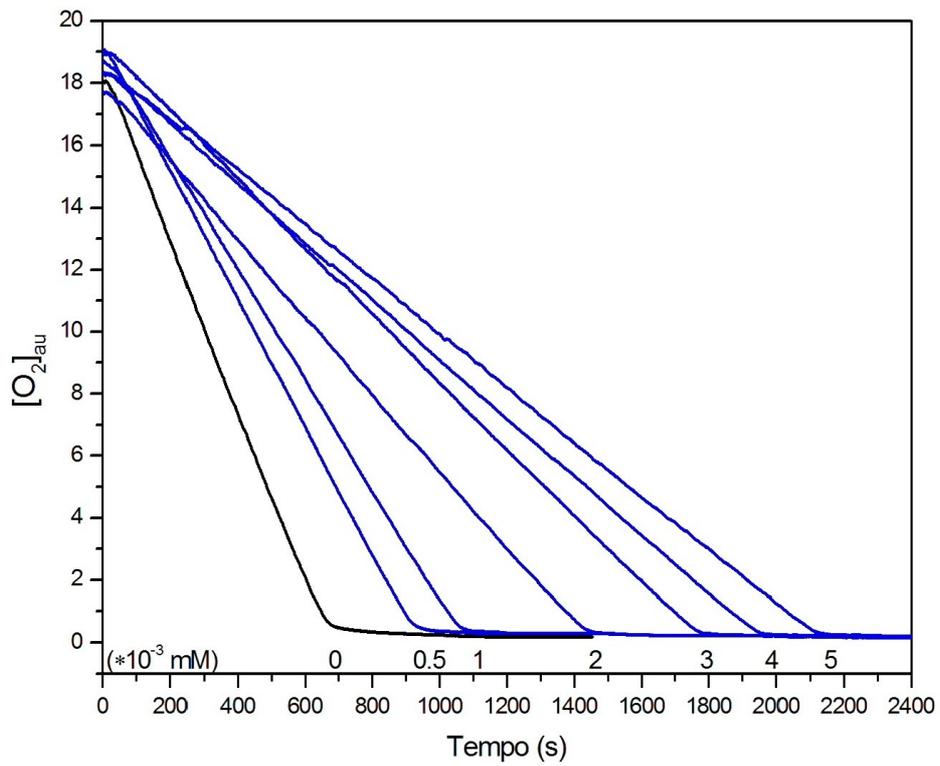
d) BHT



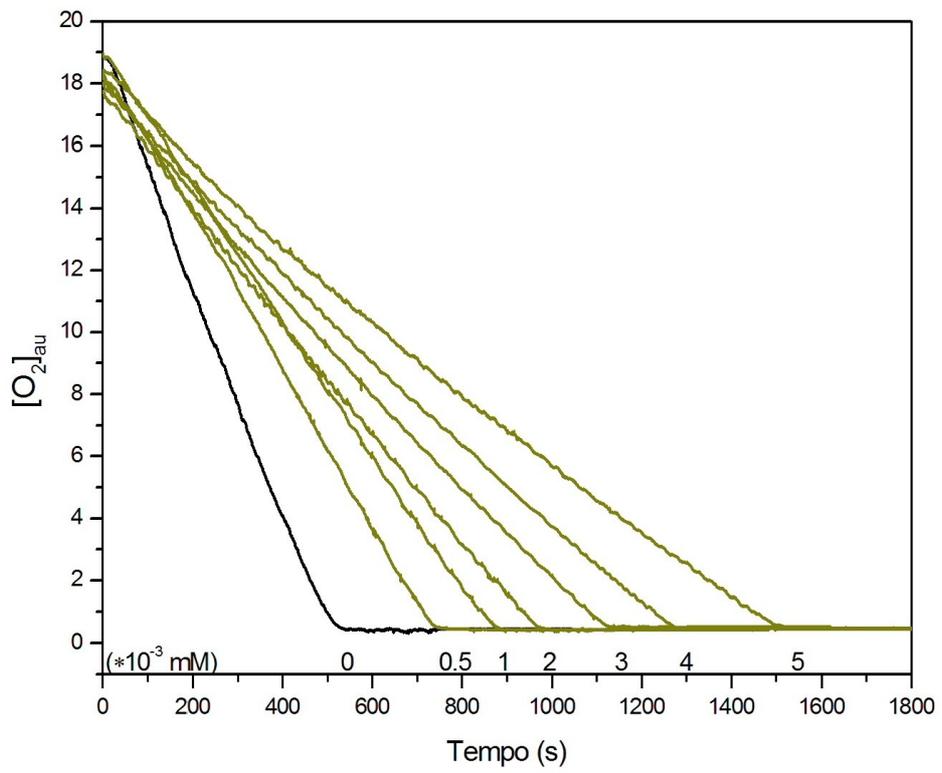
e) Lauril gallato



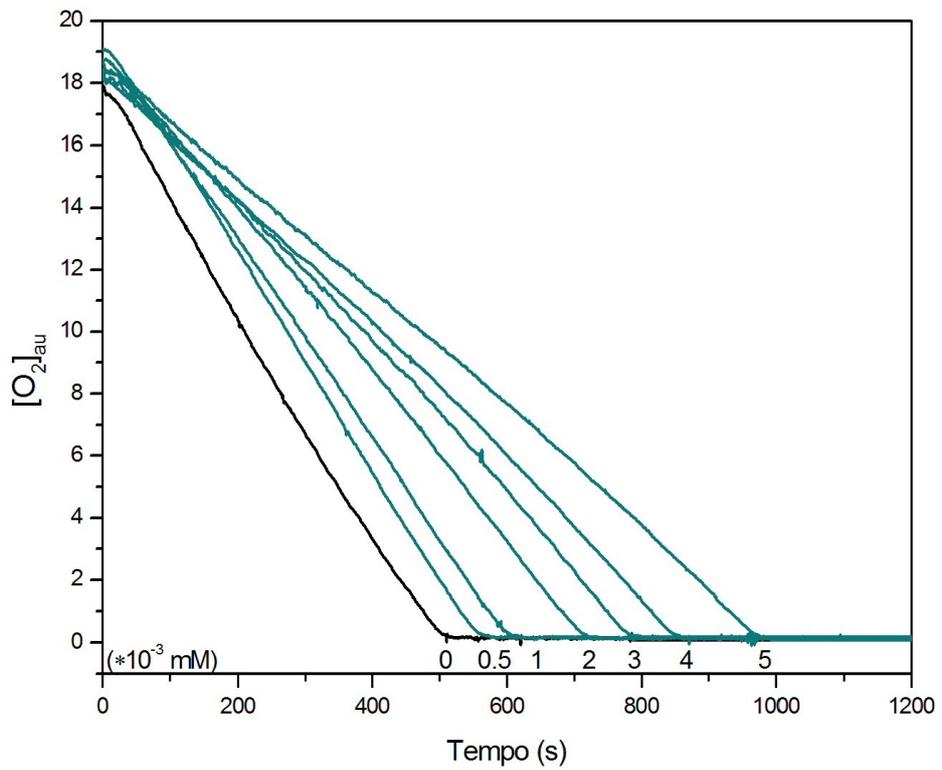
f) Resveratrolo



g) Pirogallolo



h) Acido ascorbico



i) Acido gallico

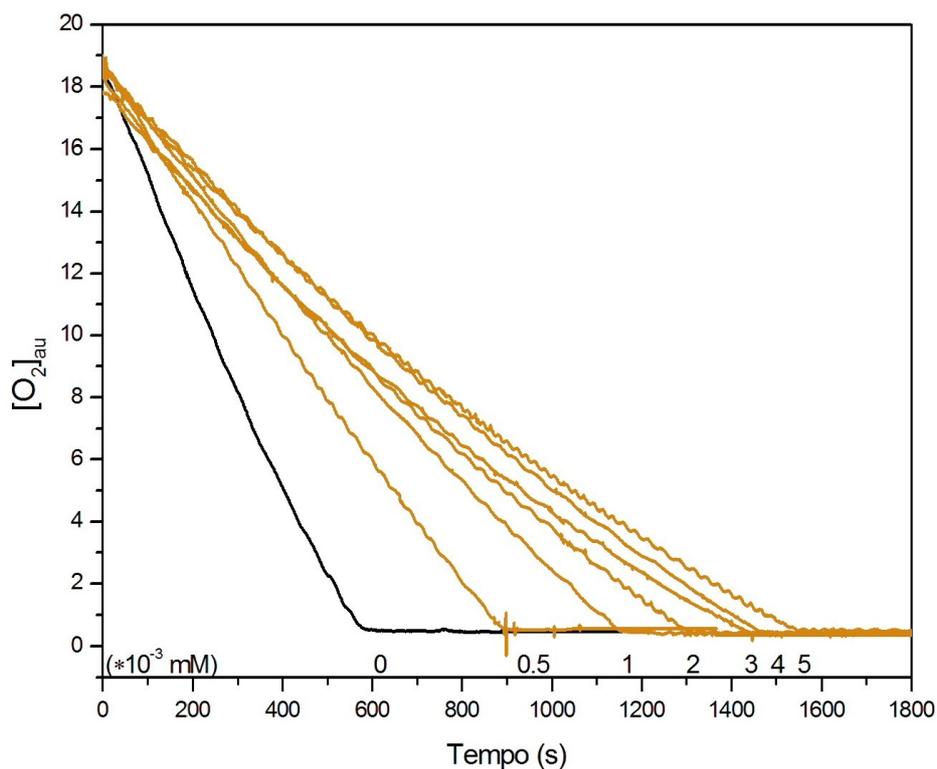


Figura 4.2a-i. Tracce ossigrafiche registrate con l'elettrodo di Clark, in assenza (nero) ed in presenza (colore) di antiossidante ai valori di concentrazione indicati. Condizioni sperimentali e significato della grandezza in ordinata $[O_2]_{au}$ sono descritti nel testo.

I parametri che si possono derivare dall'esame e dalla elaborazione delle tracce ossigrafiche, dettagliati in Figura 4.3, sono:

- pendenze e velocità iniziali (Burton & Ingold, 1981; Pryor *et al.*, 1985; Denisov & Khudyakov, 1987; Pryor *et al.*, 1988 e 1993; Bowry & Ingold, 1999; Yu *et al.*, 1999; Bedard *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2005; Krumova *et al.*, 2012);
- "lag time" (Niki *et al.*, 1984);
- andamenti concavo e convesso (Laguerre *et al.*, 2007);
- "zero time".

I primi tre parametri sono stati presentati e discussi in letteratura; l'ultimo viene introdotto ed analizzato in questa tesi. Nel Capitolo 5 si discute del primo parametro e della elaborazione dei dati ricavati dalla misura delle velocità iniziali. Gli altri parametri sono discussi nel Capitolo 6.

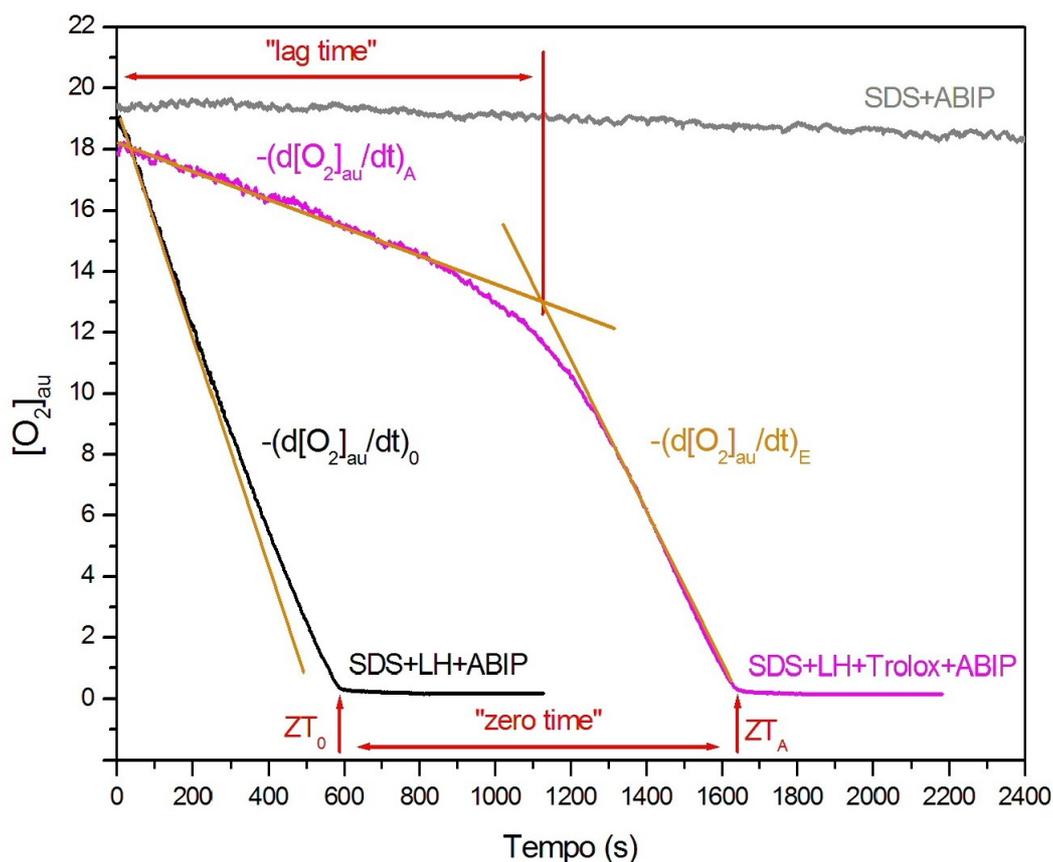


Figura 4.3. Tracce ossigrafiche registrate: con micelle di solo SDS ed iniziatore radicalico ABIP; con la presenza anche di acido linoleico (LH); con l'ulteriore presenza dell'antiossidante Trolox. Sono evidenziati i differenti parametri che verranno presi in esame nei capitoli successivi.

4.2. Meccanismi di perossidazione lipidica e della sua inibizione

L'andamento delle tracce ossigrafiche ed i parametri relativi vengono associati al complesso di meccanismi illustrato nello Schema 4.1. Altri schemi, che in genere presentano una scelta parziale di reazioni, sono stati proposti in letteratura (Burton & Ingold, 1981; Pryor *et al.*, 1985; Denisov & Khudyakov, 1987; Pryor *et al.*, 1988 e 1993; Bowry & Ingold, 1999; Yu *et al.*, 1999; Bedard *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2005; Krumova *et al.*, 2012) per razionalizzare l'azione del generatore di radicali (InNNIn) e la capacità di contrasto dell'antiossidante (AOH).

Le lettere (a), (b), (c) e (d) designano gli stadi di iniziazione, propagazione, inibizione e terminazione. Le reazioni che descrivono uno stadio sono indicate dalla lettera corrispondente seguita da un numero progressivo.

Il sistema di reazioni descritto nello Schema 4.1 avviene nelle due fasi distinte acquosa e lipidica, quest'ultima nel "core" alifatico delle micelle di sodio dodecil solfato. Tutte le specie sono potenzialmente presenti in entrambe le fasi, con l'eccezione dell'acido linoleico (LH), e dei suoi derivati L^{*}, LOO^{*} e LOOH radicalici e non radicalici, che, come ampiamente riportato in letteratura (Barclay *et al.*, 1985; Pryor *et al.*, 1985), sono permanentemente confinati nella fase micellare per la loro natura decisamente idrofobica. In questa stessa fase avvengono pertanto le reazioni in cui sono coinvolti. Nel Paragrafo 5.5 si descrivono esperimenti e considerazioni che validano questo assunto.

(a) Iniziazione	
a1	$\text{InNNIn} \xrightarrow{k_1} 2\text{In}^\bullet + \text{N}_2$
a2	$\text{In}^\bullet + \text{O}_2 \xrightarrow{k_2} \text{InOO}^\bullet$
a3	$\text{InOO}^\bullet + \text{LH} \xrightarrow{k_3} \text{InOOH} + \text{L}^\bullet$
a4	$\text{In}^\bullet + \text{LH} \xrightarrow{k_4} \text{InH} + \text{L}^\bullet$
(b) Propagazione	
b1	$\text{L}^\bullet + \text{O}_2 \xrightarrow{k_5} \text{LOO}^\bullet$
b2	$\text{LOO}^\bullet + \text{LH} \xrightarrow{k_6} \text{LOOH} + \text{L}^\bullet$
(c) Inibizione ad opera di AOH	
c1	$\text{In}^\bullet + \text{AOH} \xrightarrow{k_7} \text{InH} + \text{AO}^\bullet$
c2	$\text{InOO}^\bullet + \text{AOH} \xrightarrow{k_8} \text{InOOH} + \text{AO}^\bullet$
c3	$\text{L}^\bullet + \text{AOH} \xrightarrow{k_9} \text{LH} + \text{AO}^\bullet$
c4	$\text{LOO}^\bullet + \text{AOH} \xrightarrow{k_{10}} \text{LOOH} + \text{AO}^\bullet$
(d) Terminazione (PNR: Prodotti Non Radicalici)	
d1	$\text{AO}^\bullet + \text{AO}^\bullet \longrightarrow \text{PNR}$
	$\text{LOO}^\bullet + \text{LOO}^\bullet \longrightarrow \text{PNR}$
	$\text{InOO}^\bullet + \text{InOO}^\bullet \longrightarrow \text{PNR}$
	$\text{InOO}^\bullet + \text{LOO}^\bullet \longrightarrow \text{PNR}$
	$\text{LOO}^\bullet + \text{AO}^\bullet \longrightarrow \text{PNR}$
	$\text{InOO}^\bullet + \text{AO}^\bullet \longrightarrow \text{PNR}$

Schema 4.1. Meccanismi di perossidazione radicalica dell'acido linoleico (LH) e di inibizione ad opera dell'antiossidante (AOH). Gli stadi sono definiti da lettere, mentre le singole reazioni all'interno di ogni stadio sono definite da numeri.

Nello stadio di iniziazione (a), la reazione *a1* concerne la decomposizione termica dell'iniziatore radicalico (InNNIn), nel caso specifico ABIP, generando il radicale In[•]. In letteratura sono stati proposti molti differenti iniziatori radicalici, accompagnati da considerazioni concernenti il meccanismo di azione e la velocità di generazione dei radicali (Pryor *et al.*, 1988 e 1993; Bowry & Ingold, 1999; Yu *et al.*, 1999; Zennaro *et al.*, 2007). Alla luce dell'equazione proposta nel Capitolo 5, la scelta dell'iniziatore radicalico e le potenzialità di azione risultano irrilevanti.

La reazione *a3*, che genera il radicale L[•], dà inizio allo stadio di propagazione (b), in cui le specie L[•] e LOO[•] vengono continuamente consumate e rigenerate. Poiché la specie LH e le specie derivate sono presenti in tutte le reazioni che descrivono lo stadio di propagazione (b), questo stesso stadio è rigorosamente confinato nella fase lipidica.

Nello stadio di inibizione (c) si considerano tutte le reazioni di inibizione dell'antiossidante (AOH) con i radicali In[•], InOO[•], L[•] e LOO[•].

Si assume, in accordo con quanto riportato in letteratura (Barclay *et al.*, 1985; Denisov & Khudyakov, 1987; Bowry & Ingold, 1999; Bedard *et al.*, 2001), che i radicali In[•] e L[•], generati nello stadio di iniziazione e nello stadio di propagazione, reagiscano con l'ossigeno in maniera "esplosiva", secondo le reazioni *a2* e *b1*,

rendendo trascurabili le reazioni competitive, a_4 con LH, c_1 e c_3 con AOH, almeno per il tempo in cui l'ossigeno è presente.

Questo assunto non pregiudica l'azione dell'antiossidante (AOH). Non risulta necessario, infatti, postulare che le reazioni c_1 e c_3 siano dello stesso ordine di grandezza delle reazioni a_2 e b_1 . Per un'efficace azione di inibizione è sufficiente l'azione di AOH sul radicale InOO^* , reazione c_2 , per la quale l'antiossidante viene descritto come "retarder" (Laguerre *et al.*, 2007), oppure l'azione sul radicale LOO^* , reazione c_4 , per la quale viene descritto come "chain-breaker". Le reazioni di InOO^* e LOO^* con l'ossigeno non sono mai state descritte. Queste considerazioni verranno dettagliate e validate nel Paragrafo 6.3.2.

Le reazioni dello stadio di terminazione (d) sono reazioni fra radicali, che avvengono con costante di velocità molto alta, ma che richiedono l'incontro fra specie che sono mantenute a concentrazione minima in forza delle reazioni con ossigeno o AOH. Solo il radicale AO^* può arrivare a concentrazioni relativamente elevate; tuttavia l'incontro descritto dalla reazione d_1 rimane altamente improbabile all'inizio del decorso della reazione, periodo nel quale si misurano le velocità iniziali utilizzate nel Capitolo 5.

Le reazioni che, a vario titolo, sono state considerate irrilevanti sono marcate nello Schema 4.1 con colore grigio.

Perossidazione lipidica: l'approccio cinetico

Il sistema di equazioni differenziali, che descrive il complesso delle equazioni chimiche riportate nello Schema 4.1, non è integrabile per via analitica, a parte l'equazione differenziale che definisce l'equazione chimica *a1*, l'unica in cui le variabili sono solo 2 e quindi separabili.

Di conseguenza, diviene necessario ricorrere alla valutazione di un parametro empirico che, per dare un significato quantitativo all'andamento delle tracce ossigrafiche, sia basato sulla determinazione delle velocità iniziali determinate in assenza (pedice 0) o in presenza (pedice A) di antiossidante (AOH) a differenti concentrazioni, indicate come $-(d[O_2]_{au}/dt)_0$ e $-(d[O_2]_{au}/dt)_A$ rispettivamente. Esse sono determinate attraverso la stima della migliore retta che passa per i primi punti delle tracce ossigrafiche sperimentali.

Dato che l'aggiunta dell'ultimo reagente, l'iniziatore radicalico ABIP, provoca una perturbazione temporanea del sistema e quindi delle tracce ossigrafiche, le misure sono state effettuate con un ritardo di 20 secondi per permettere al sistema di recuperare. Le rette di determinazione delle pendenze sono state pertanto tracciate sulle tracce comprese fra 20 e 180 punti (ogni punto rappresenta 1 secondo); solo nel caso di tracce ossigrafiche molto piatte (come nel caso di antiossidanti molto forti come tocoferolo, pentametilmromanolo, trolox e BHT), le migliori rette sono tracciate su un intervallo compreso fra 20 e il valore massimo di 1200 punti.

5.1. Relazione fra velocità di consumo di ossigeno e concentrazione di antiossidante

Una relazione fra $-(d[O_2]/dt)_A$ ed il rapporto $[LH]/[AOH]$ è stata inizialmente proposta in letteratura (Burton & Ingold, 1981) e frequentemente utilizzata in seguito, ma solo per determinazioni ad una singola concentrazione di AOH (Niki *et al.*, 1984; Pryor *et al.*, 1988; Yu *et al.*, 1999):

$$-(d[O_2]/dt)_A = R \frac{k_0}{k_A} \frac{[LH]}{[AOH]} \quad (5.1)$$

dove R è la velocità di scomparsa dell'iniziatore radicalico:

$$R = -(d[\ln NN \ln] / dt) = k_1 [\ln NN \ln]$$

L'equazione (5.1) richiede la conversione della risposta $[O_2]_{au}$ del convertitore amperometrico in concentrazioni reali $[O_2]$. Questa conversione necessita della determinazione indipendente della concentrazione di ossigeno all'inizio dell'esperimento (Burton & Ingold, 1981; Pryor *et al.*, 1985). Inoltre la velocità R deve essere parimenti misurata in un ulteriore esperimento indipendente (Burton & Ingold, 1981).

I valori riportati nel presente lavoro sono il risultato di determinazioni fatte a concentrazioni costanti di SDS, LH a ABIP, ma a concentrazioni variabili di AOH. Per tutti gli antiossidanti, sono state effettuate misure alle concentrazioni di 0.5, 1, 2, 3, 4, $5 \cdot 10^{-3}$ mM ed ogni misura è stata ripetuta 3 volte. Le misure sono rappresentate come media e deviazione standard.

Quando questi dati sono diagrammati secondo l'equazione (5.1), si perviene alla rappresentazione mostrata in Figura 5.1: non si osserva alcuna correlazione anche minimamente lineare, piuttosto sono rintracciabili andamenti asintotici; inoltre risultati da antiossidanti diversi mostrano un non accettabile grado di sovrapposizione.

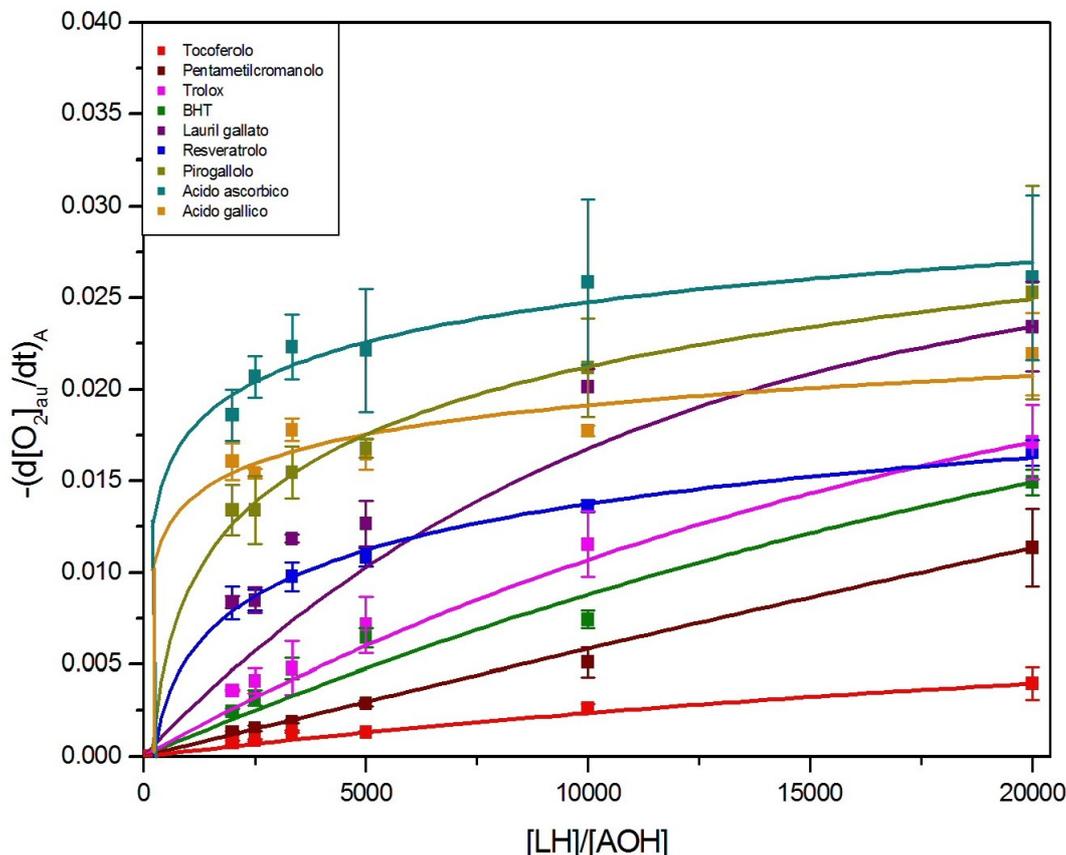


Figura 5.1. Andamento delle velocità di consumo di ossigeno $-(d[O_2]_{au}/dt)_A$ con i rapporti $[LH]/[AOH]$, come da equazione (5.1) per la serie di antiossidanti presi in esame. Ogni punto rappresenta la media di 3 misure, con deviazioni standard. Le curve sono mostrate solo come aiuto visivo.

Risultati più accettabili si riescono ad ottenere quando la variabile indipendente (ascissa) e la variabile dipendente (ordinata) sono convertite nei loro reciproci, analogamente a come si opera con il diagramma di Lineweaver-Burk, adottato per la determinazione di parametri cinetici enzimatici (Lineweaver & Burk, 1934), ovvero quando l'equazione (5.1) viene trasformata nel suo reciproco:

$$-1/(d[O_2]_{au} / dt)_A = \frac{1}{R} \frac{k_A}{k_0} \frac{[AOH]}{[LH]} \quad (5.2)$$

I risultati riportati in Figura 5.2 evidenziano andamenti caratterizzati da un accettabile grado di correlazione lineare. Le pendenze sono legate alle grandezze $[O_2]_{au}$ rappresentate da valori arbitrari, e sono pertanto prive di un significato quantitativo; tuttavia si può pervenire ad una sequenza qualitativa del potere inibente dei diversi antiossidanti nei confronti della perossidazione lipidica. Le intercette inoltre appaiono convergere verso un valore comune abbastanza definito.

Il confronto fra Figura 5.1 e Figura 5.2 evidenzia un sicuro miglioramento nella presentazione dei dati, e lascia intravedere la possibilità di giungere a conclusioni più affidabili. Diventa pertanto desiderabile la

ricerca di una equazione di maggiore valenza, che possa venire derivata da considerazioni cinetiche (teoriche) o anche solo empiriche.

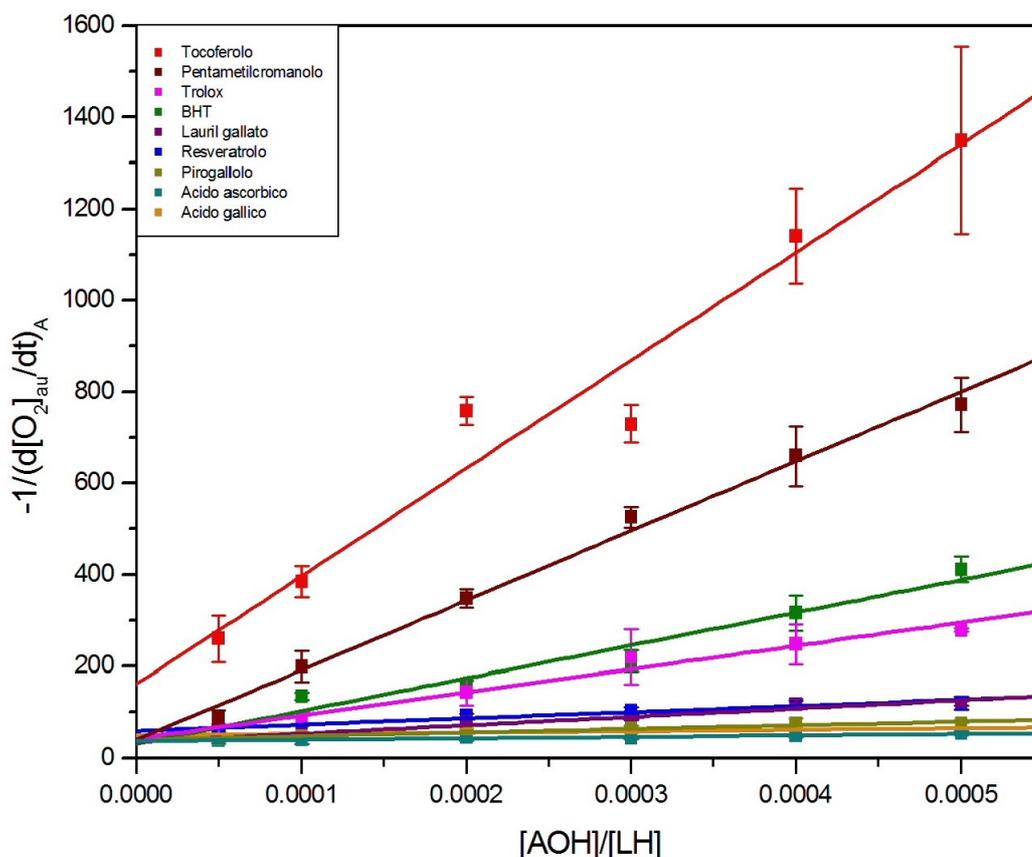


Figura 5.2 Correlazione dei valori $-1/(d[O_2]_{au}/dt)_A$ con i rapporti $[AOH]/[LH]$.

5.2. Strategia basata su considerazioni cinetiche

Il sistema di equazioni differenziali associato al sistema di reazioni descritto nello Schema 4.1, o ad altri sistemi di reazioni, non è suscettibile di integrazione analitica. Si potrebbe ricorrere pertanto all'approssimazione "steady state", applicata alle specie radicaliche presenti come intermedi (Yu *et al.*, 1999; Zennaro *et al.*, 2007), ma questa strategia risulta opinabile anche se applicata ad una sola specie (Volk *et al.*, 1977; Steinfeld *et al.*, 1989), e può diventare assolutamente fuorviante quando vi sono coinvolte 2 o più specie (Giddings & Shin, 1962; Steinfeld *et al.*, 1989). Sono state presentate in letteratura relazioni, derivate da un trattamento "steady state", che pervengono ad equazioni suscettibili di una corrispondenza con i risultati sperimentali (Yu *et al.*, 1999; Zennaro *et al.*, 2007). Tuttavia queste relazioni sono derivate da una selezione limitata delle equazioni chimiche dello Schema 4.1, in assenza di una giustificazione razionale per la scelta.

Inoltre, l'applicazione dell'approssimazione "steady state" a 4 specie radicaliche porta a contraddizioni insanabili, come ampiamente verificato seguendo approcci differenti e come esplicitamente riportato in letteratura (Steinfeld *et al.*, 1989).

Il trattamento delle equazioni "integrate" derivate dall'approssimazione è rigoroso; la contraddizione nasce dunque dalla considerazione delle stesse equazioni "integrate", che descrivono situazioni false o comunque reciprocamente incompatibili.

5.3. Strategia empirica

Considerando i risultati emersi dal precedente trattamento cinetico, in questo lavoro viene fatto affidamento ad una diversa strategia, basata sul concetto empirico di reazioni competitive (Erben-Russ *et al.*, 1987; Tubaro *et al.*, 1996 e 1999). La velocità iniziale misurata per la scomparsa dell'ossigeno in presenza dell'antiossidante (AOH) viene posta in correlazione con la velocità iniziale misurata in assenza di AOH, corretta per il rapporto fra la reattività di LH e la somma delle reattività di LH e AOH:

$$-(d[O_2]_{au}/dt)_A = -(d[O_2]_{au}/dt)_0 \frac{k_0[LH]}{k_0[LH] + k_A[AOH]}$$

L'espressione viene riformulata, con definizione del rapporto ρ , come segue:

$$\rho = \frac{-(d[O_2]_{au}/dt)_0}{-(d[O_2]_{au}/dt)_A} = \frac{k_0[LH] + k_A[AOH]}{k_0[LH]} = 1 + \frac{k_A}{k_0} \frac{[AOH]}{[LH]} = 1 + \alpha [AOH] \quad (5.3)$$

dove

$$\alpha = \frac{k_A}{k_0[LH]}$$

Le velocità iniziali fanno riferimento ad un valore di [LH] che viene mantenuto costante per tutti gli esperimenti descritti nel presente lavoro. Questo valore può pertanto venire trasferito sotto la definizione di pendenza, indicata ora dal simbolo α , che acquista quindi la dimensione di mM^{-1} .

Per queste equazioni, il rapporto ρ correla linearmente con [AOH]/[LH] o con [AOH], e l'intercetta sull'asse delle ordinate risulta prossima al valore 1. Tutti gli esperimenti condotti sull'intera serie di antiossidanti sono in linea con l'equazione (5.3), come risulta dalle Figure 5.3a-b. Le pendenze α e le deviazioni standard sono riportate in Tabella 5.1.

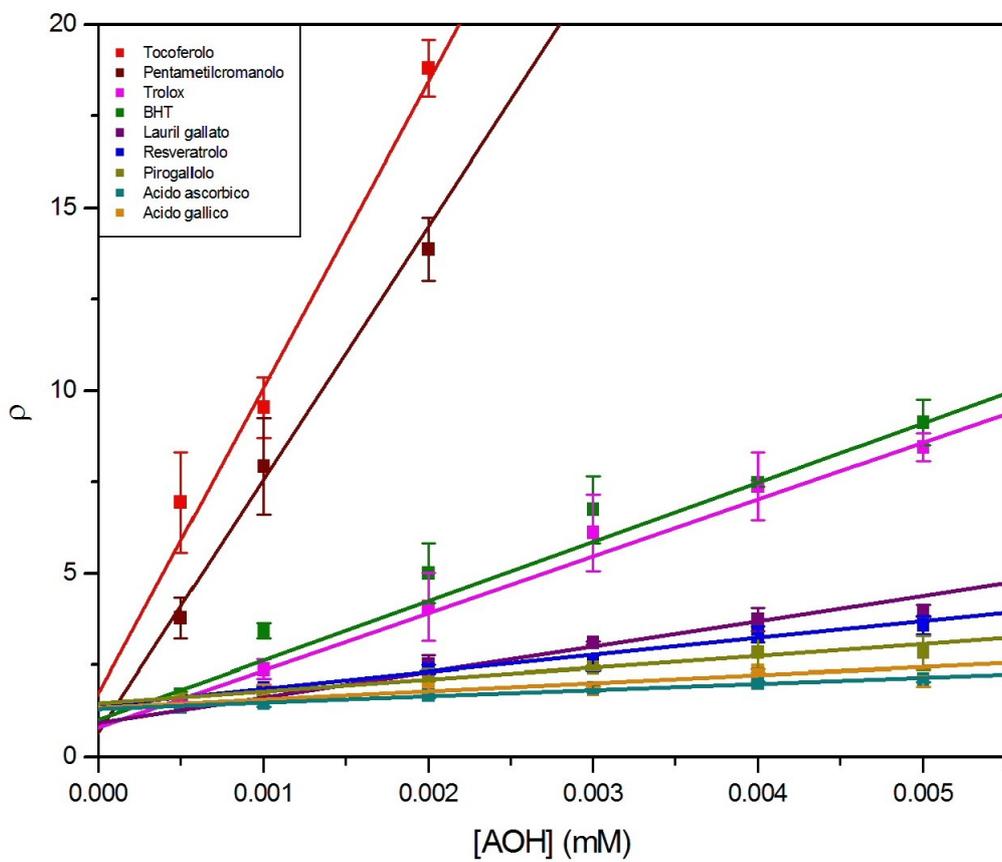
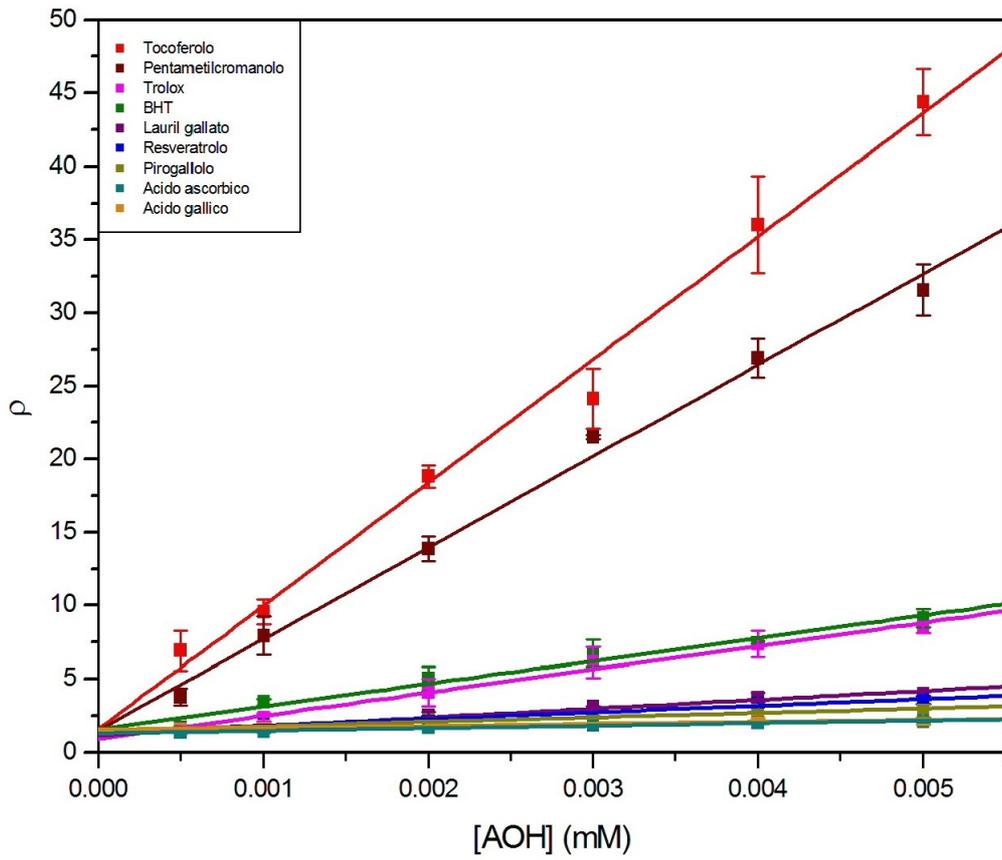


Figura 5.3a-b. Correlazione del parametro ρ con le concentrazioni di AOH, variate nell'intervallo fra $0.5 \cdot 10^{-3}$ e $5 \cdot 10^{-3}$ mM. Le pendenze $\alpha = k_A/k_0[LH]$ sono riportate in Tabella 5.1. Figura 5.3b. Dettaglio di Figura 5.3a.

Tabella 5.1. Antiossidanti (AOH) investigati e loro poteri di inibizione, ottenuti applicando l'equazione (5.3), alle condizioni sperimentali riportate in *Materiali e Metodi*.

	AOH	α (mM ⁻¹)
1	Tocoferolo	8400±300
2	Pentametilcromanolo	6200±200
3	Trolox	1600±100
4	BHT	1500±100
5	Lauril gallato	610±30
6	Resveratrolo	450±30
7	Pirogallolo	300±40
8	Acido ascorbico	175±15
9	Acido gallico	130±30

I vantaggi offerti dall'utilizzo dall'equazione (5.3), rispetto alle precedenti riportate in letteratura, sono evidenti.

Nell'asse delle ordinate viene riportato il rapporto adimensionale ρ tra due velocità iniziali di consumo di ossigeno ricavate dalle misure sperimentali. Inoltre tale relazione prescinde dalla conoscenza della concentrazione iniziale di ossigeno $[O_2]_{au}$, vale a dire il valore di corrente ad inizio esperimento, con l'unica condizione che la coppia di misure in assenza ed in presenza di inibitore debba essere condotta esattamente alle stesse condizioni sperimentali. Per questo motivo, la cella ossigrafica, riempita con la dispersione micellare, e nel caso con la soluzione di antiossidante (AOH), viene lasciata aperta, sotto agitazione, ed in contatto con l'atmosfera per almeno 30 minuti, al fine di avere la garanzia della saturazione di ossigeno nella soluzione di misura. Le due misure differiscono così solo per la presenza di AOH, che però è presente in concentrazione talmente bassa da non alterare fisicamente la concentrazione iniziale di ossigeno. Le tracce ossigrafiche pertanto possono essere espresse in unità arbitrarie $[O_2]_{au}$ e non diventa indispensabile la determinazione della concentrazione di ossigeno in soluzione all'inizio delle misure sperimentali.

L'equazione (5.3) risulta inoltre indipendente dalla natura e dalle modalità operative dell'iniziatore radicalico (InNNIn), mentre al contrario le equazioni (5.1) o (5.2) necessitano della conoscenza di questi parametri sperimentali (Burton & Ingold, 1981; Pryor *et al.*, 1988). Si darà nel Paragrafo 5.5 una dimostrazione sperimentale di questa asserzione.

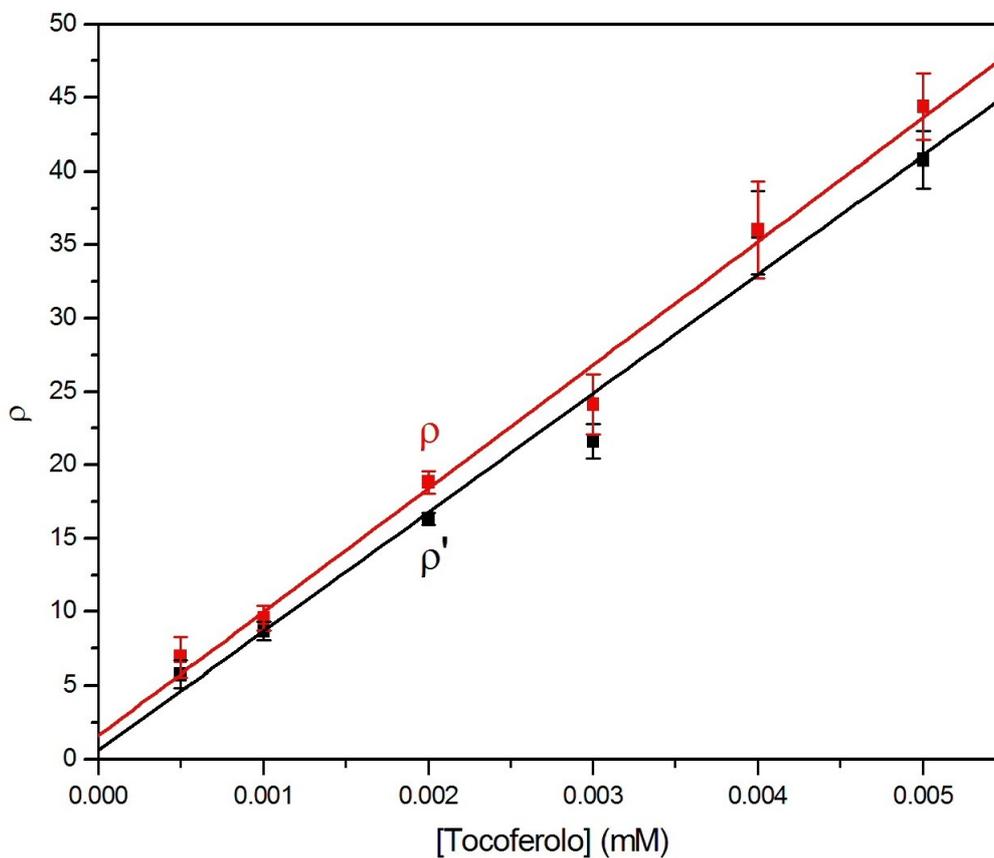
5.4. Individuazione della traccia ossigrafica di riferimento

Le Figure 4.2a-i individuano due andamenti delle tracce ossigrafiche, che sono stati classificati (Laguerre *et al.*, 2007) come convesso (per gli antiossidanti più forti) e concavo (per quelli più deboli). Questi andamenti sono cumulativamente rappresentati anche nella Figura 6.1. Per gli antiossidanti più forti si possono notare pendenze diverse fra la situazione in cui l'antiossidante è ancora operativo e la successiva situazione in cui l'antiossidante è esaurito. Come riportato in Figura 4.3, la prima pendenza viene definita come $-(d[O_2]_{au}/dt)_A$, mentre la seconda come $-(d[O_2]_{au}/dt)_E$. In alcuni lavori (Pryor *et al.*, 1985), e per qualche antiossidante, questa seconda pendenza è stata ritenuta dello stesso valore della pendenza $-(d[O_2]_{au}/dt)_0$ misurata in assenza di antiossidante. Si può pertanto postulare che il rapporto ρ possa venire determinato (come ρ'), con una sola misura:

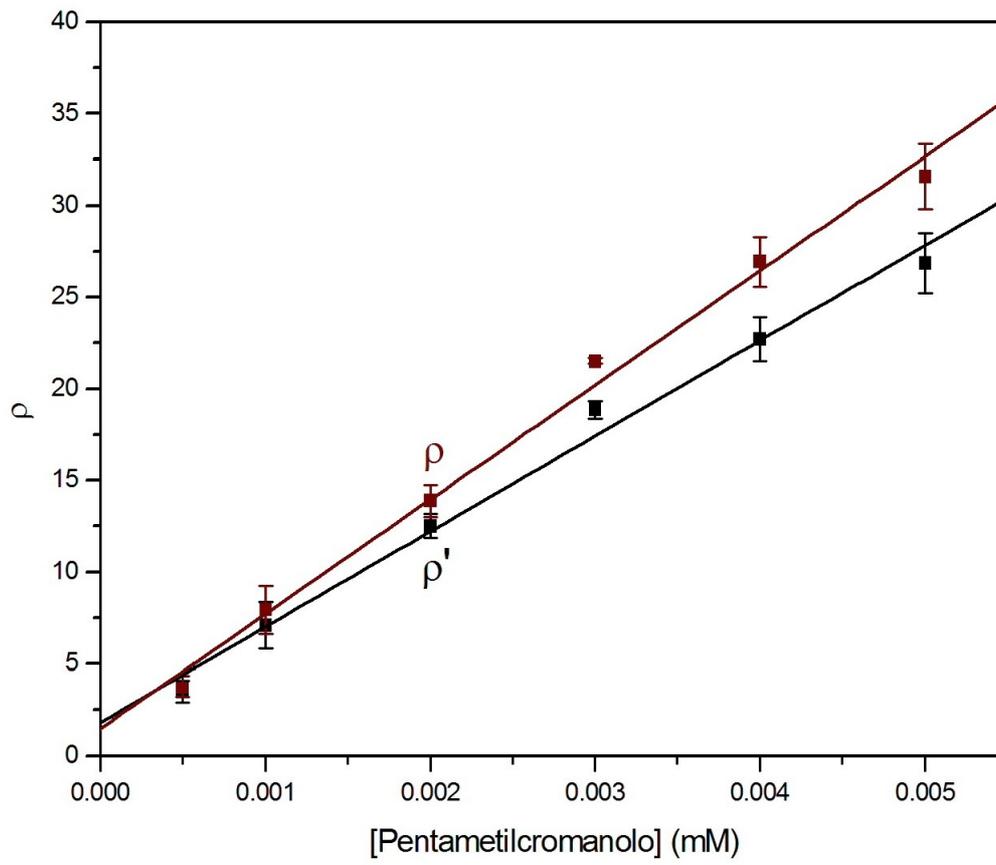
$$\rho' = \frac{-(d[O_2]_{au}/dt)_E}{-(d[O_2]_{au}/dt)_A}$$

La pendenza $-(d[O_2]_{au}/dt)_E$ risulta facilmente individuabile per gli antiossidanti tocoferolo e pentametilcromanolo, e di più incerta definizione per trolox e BHT. In tutti i casi comunque non può essere considerata come velocità iniziale alla concentrazione iniziale di ossigeno, in quanto una definita quantità ne viene comunque consumata nel tratto in cui l'antiossidante opera, anche nel caso degli antiossidanti più potenti. La non equivalenza fra $-(d[O_2]_{au}/dt)_E$ e $-(d[O_2]_{au}/dt)_0$ viene graficamente rappresentata nelle Figure 5.4a-d. In esse la traccia in nero e la traccia in colore rappresentano rispettivamente i dati di ρ' e di ρ e le relative interpolazioni lineari. Anche nel caso degli antiossidanti più potenti sono rilevabili differenze non accettabili. Di conseguenza in questo lavoro di tesi, per ragioni di necessità e soprattutto di uniformità, nella definizione del rapporto ρ , vengono utilizzati solo i valori $-(d[O_2]_{au}/dt)_0$, ricavati dalle tracce ossigrafiche registrate in assenza di antiossidante.

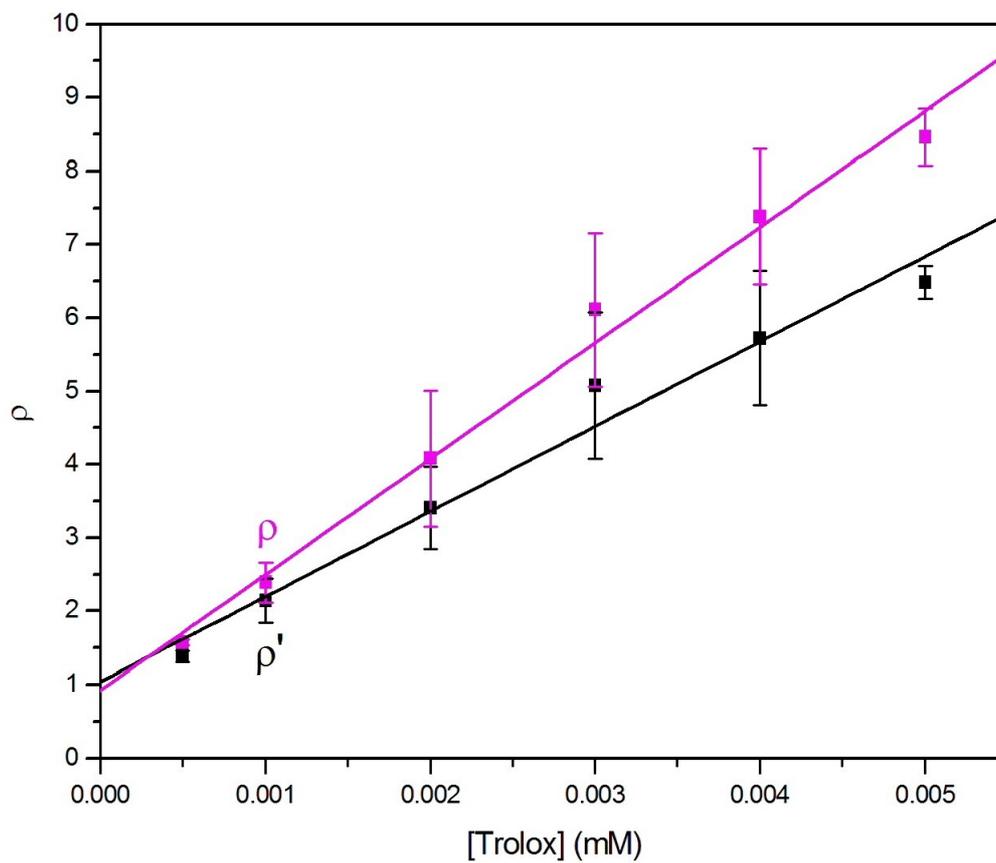
a) Tocoferolo



b) Pentametilcromanol



c) Trolox



d) BHT

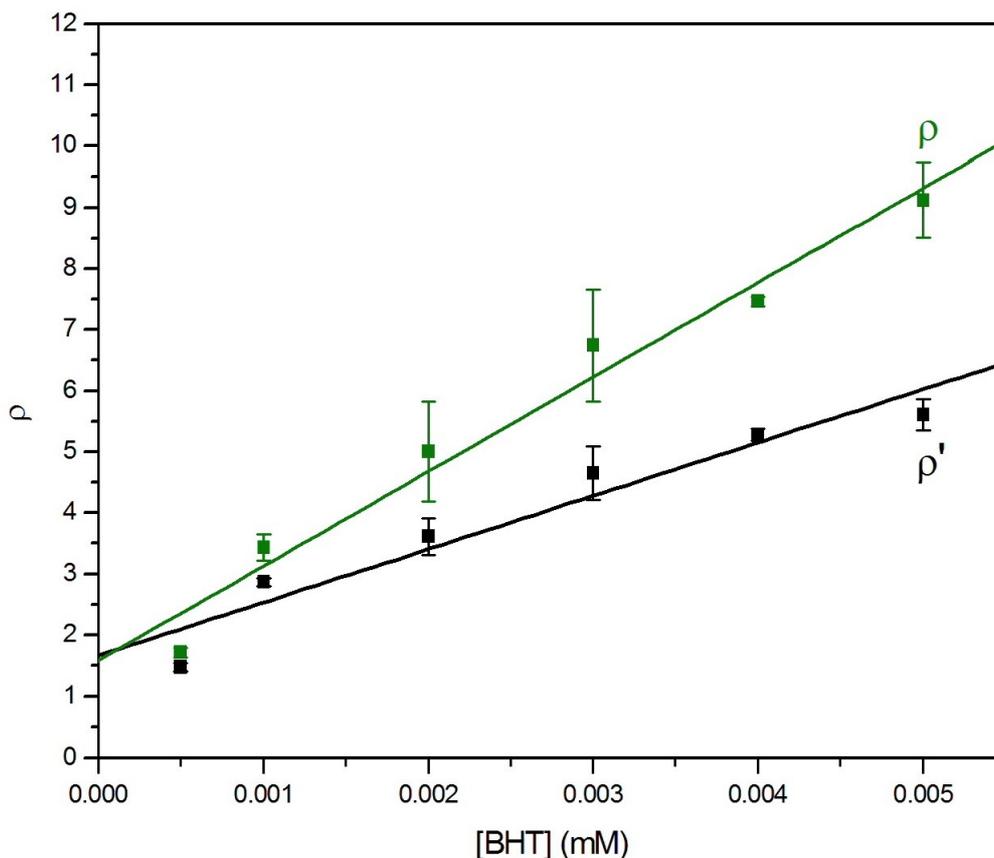


Figura 5.4a-d. Dipendenza dei valori dei parametri ρ e ρ' dalla concentrazione di differenti antiossidanti, alle usuali condizioni sperimentali. Per il significato dei valori ρ e ρ' si veda il testo.

5.5. Significato chimico dei coreagenti ABIP, SDS e LH

Nei formalismi dell'equazione (5.3), la concentrazione di LH appare esplicitamente, mentre vi mancano le concentrazioni di SDS e ABIP. Resta comunque desiderabile accertare il ruolo svolto da questi composti e come le loro concentrazioni influiscano sulle variazioni delle velocità di scomparsa dell'ossigeno. Inoltre rimane da stabilire l'esatto significato della concentrazione di LH, vale a dire se essa vada riferita all'intero volume della cella ossigrafica, oppure al volume della sola fase lipidica presente, ovvero il volume reale delle micelle di SDS.

L'indipendenza delle pendenze dalla concentrazione di ABIP, postulato dal formalismo dell'equazione (5.3), viene ora confermato dalla Figura 5.5, dove si riscontra che per gli antiossidanti investigati, che sono sufficientemente rappresentativi dell'universo degli antiossidanti per le loro differenti caratteristiche chimiche, i valori del parametro α sono chiaramente indipendenti dalle concentrazioni di ABIP nell'intervallo fra 2 e 4 mM.

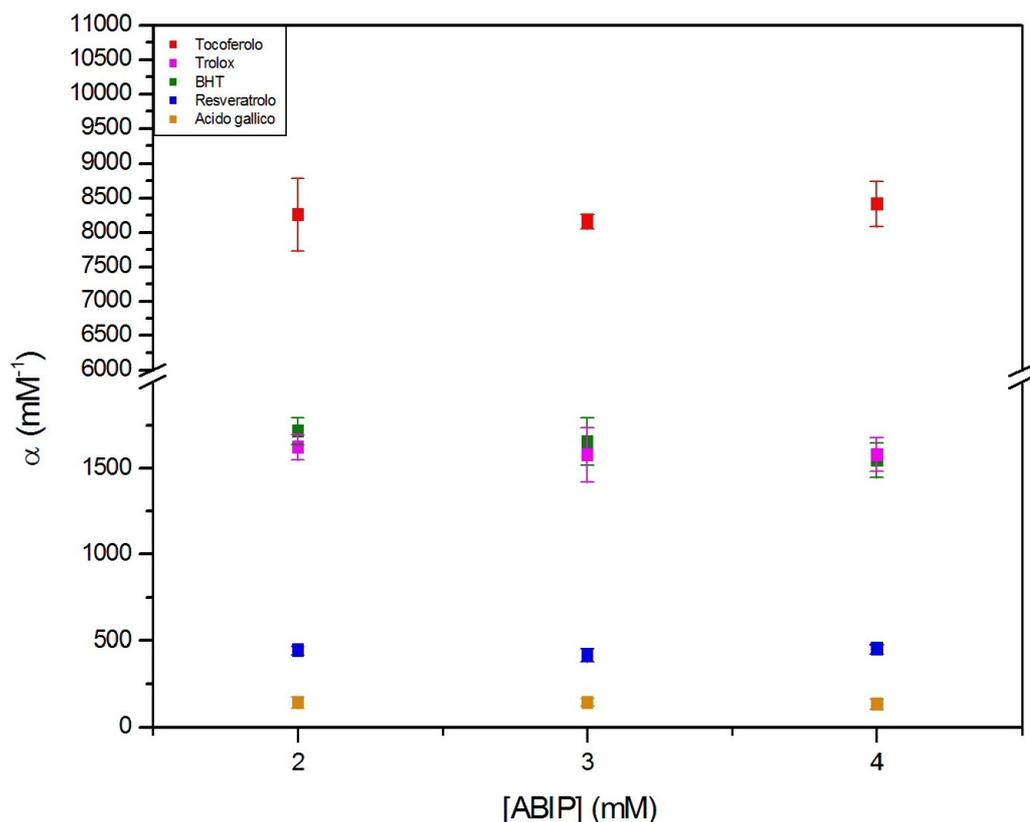


Figura 5.5. Correlazioni del parametro α con la concentrazione di ABIP, nell'intervallo compreso fra 2 e 4 mM, per una serie di antiossidanti.

Misure condotte a concentrazioni diverse di LH o di SDS hanno condotto a risultati non facilmente interpretabili. Tuttavia si perviene ad un valore costante dei valori di pendenza α quando viene mantenuto costante il rapporto $[LH]/[SDS]$, come risulta da Figura 5.6 per i precedenti antiossidanti investigati.

Da questo risultato si possono trarre tre conclusioni importanti:

- 1) l'antiossidante (AOH) compete per l'ossigeno contro una concentrazione costante di acido linoleico (LH), quale è quella presente nelle micelle, per rapporti costanti di $[LH]/[SDS]$;
- 2) l'acido linoleico (LH) e i suoi derivati L^* , LOO^* e $LOOH$ sono presenti nella fase lipidica micellare e vi operano in maniera esclusiva. Questo dato rappresenta una conferma sperimentale di ipotesi speculative presenti in letteratura (Barclay *et al.*, 1985; Pryor *et al.*, 1985);
- 3) la sostanziale costanza del valore del parametro α per valori costanti dei rapporti $[LH]/[SDS]$ vale sia per antiossidanti forti, in genere considerati lipofili, che per antiossidanti deboli, considerati idrofili (Pryor *et al.*, 1985 e 1988). È certamente vero che per antiossidanti forti lipofili il processo di inibizione coinvolge soprattutto la reazione *c4* nello Schema 4.1 – attacco di AOH su LOO^* in un'azione di "chain-breaking" (Laguerre *et al.*, 2007) sullo stadio (b) di propagazione, che ha luogo nella fase lipidica. La costanza del valore di α anche nel caso di antiossidanti deboli idrofili può significare che la reazione *c4* rimanga più importante della reazione *c2* – attacco di AOH su $InOO^*$, in un'azione come "retarder" (Laguerre *et al.*, 2007) sullo stadio (a) di iniziazione, che può avere luogo sia in fase lipidica che in fase acquosa.

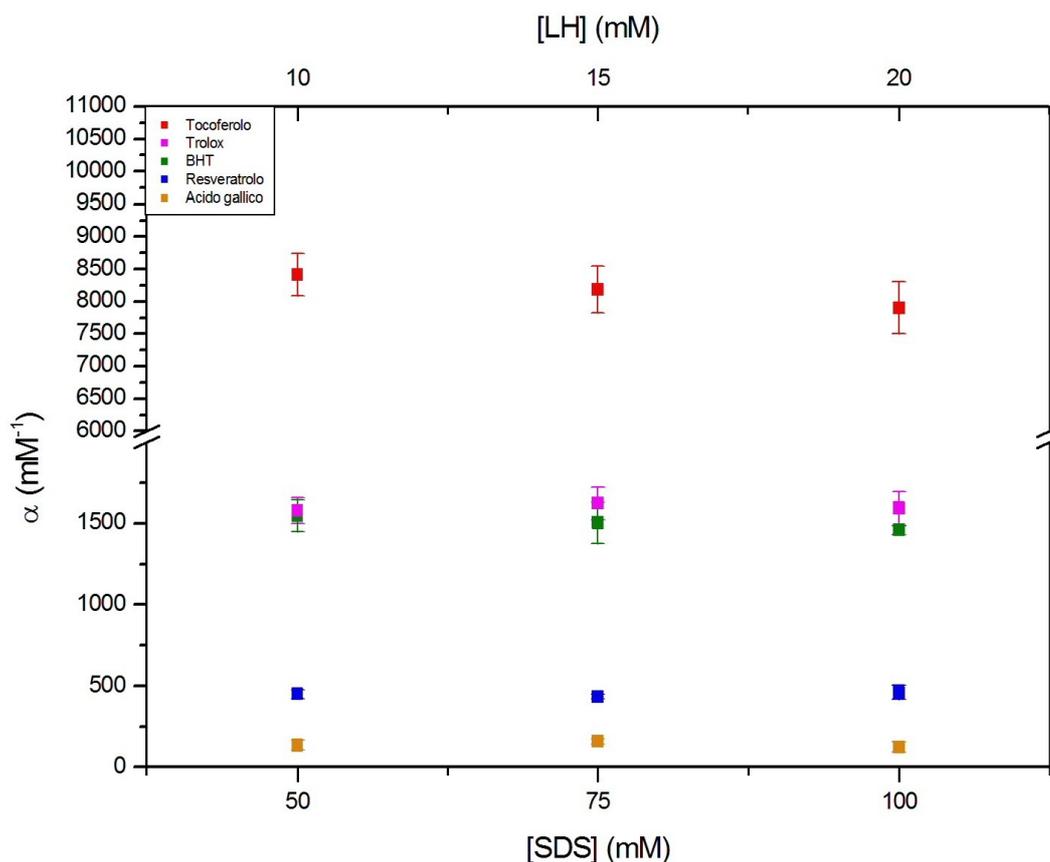


Figura 5.6. Dipendenza del parametro α da valori differenti di concentrazione di LH e SDS, mantenendo costante il rapporto $[LH]/[SDS]$.

L'ottenimento di risultati non immediatamente razionalizzabili quando i rapporti $[LH]/[SDS]$ vengono cambiati merita un ultimo commento. Molti diversi fattori sono certamente coinvolti nella formazione del complesso micellare SDS/LH; questi fattori rimangono nascosti, e quindi non descrivibili, quando il rapporto $[LH]/[SDS]$ resta costante, ma possono intervenire in maniera non chiaramente definita quando il rapporto varia.

Uno di questi fattori è la morfologia del complesso micellare. Per una concentrazione di SDS 50 mM e per un "aggregation number" di 50 (Bales *et al.*, 1998; Berret, 2005; Qi *et al.*, 2007), che significa che necessitano 50 molecole di SDS per formare una micella, la concentrazione micellare è 1 mM. Quindi per una concentrazione di acido linoleico (LH) 10 mM, ogni singola micella ospita 10 molecole di LH. Ne risulta che l'acido linoleico (LH) contribuisce in maniera critica alla struttura dell'unità micellare e questa situazione viene resa ancora più complicata dal fatto che, mentre la catena alifatica della molecola di SDS è lineare, la catena di LH è angolata a motivo della doppia insaturazione.

È possibile pertanto presumere che differenti concentrazioni di SDS e LH, mantenute allo stesso rapporto $[LH]/[SDS]$, diano origine ad un numero diverso di complessi supramolecolari SDS/LH, tuttavia caratterizzati dalla stessa morfologia. Quindi l'antiossidante (AOH), che opera all'interno di questo complesso a costante rapporto $[LH]/[SDS]$, risente dello stesso intorno.

5.6. Significato chimico dei coefficienti k_A e k_0

Ai coefficienti k_A e k_0 dell'equazione (5.3) può venire attribuito un significato chimico quando vengono associati a quelle reazioni nello Schema 4.1, dove LH (reazioni a3 e b2) e AOH (reazioni c2 e c4) operano come reagenti:

$$\rho = \frac{-(d[O_2]_{au}/dt)_0}{-(d[O_2]_{au}/dt)_A} = 1 + \frac{k_A}{k_0} \frac{[AOH]}{[LH]} = 1 + \left(\frac{k_8[InOO^*]_A + k_{10}[LOO^*]_A}{k_3[InOO^*]_0 + k_6[LOO^*]_0} \right) \frac{[AOH]}{[LH]} \quad (5.4)$$

Nell'equazione (5.4) appaiono i contributi delle reazioni che implicano il radicale $InOO^*$, che hanno luogo sia nella fase lipidica che in quella acquosa, ed i contributi delle reazioni con il radicale LOO^* , che avvengono unicamente nella fase lipidica. L'analisi condotta nel precedente Paragrafo 5.5 suggerisce che queste seconde reazioni siano predominanti rispetto alle prime, non solo nel caso di antiossidanti lipofili, ma anche nel caso di antiossidanti considerati idrofili. Questi ultimi antiossidanti sono principalmente presenti nella fase idrofila, ma anche nella fase lipofila, sia pure in quantità meno rilevante. Nella prima fase operano come inibitori "retarder" a livello dello stadio (a) di iniziazione, nella seconda come inibitori "chain-breaking" a livello dello stadio (b) di propagazione. In questa seconda veste di "chain-breaker" presentano una efficacia molto maggiore, tale da oscurare, nonostante la loro bassa lipofilità, la loro veste di "retarder". Questa grande efficacia è in definitiva legata alla stessa efficacia dello stadio di propagazione (b).

5.7. Potere inibitorio degli antiossidanti in relazione alla loro lipofilità e idrofilicità

Due diverse fenomenologie sono state frequentemente proposte per razionalizzare le differenze di capacità inibitoria degli antiossidanti (AOH) in funzione delle loro asserite caratteristiche di lipofilità o idrofilicità (Barclay *et al.*, 1985; Frankel, 1996; Bales *et al.*, 1998; Frankel & Meyer, 2000). Una fenomenologia di natura termodinamica, descritta da un coefficiente K_R di ripartizione dell'antiossidante fra fase lipidica e fase acquosa (Castle & Perkins, 1986; Eastwood, 1999; Privat *et al.*, 2002; Fabris *et al.*, 2008; Brittes *et al.*, 2010; Gregoris & Stevanato, 2010; Ohlow *et al.*, 2012; Losada-Barreiro *et al.*, 2015). Una fenomenologia di natura cinetica, associata ad una costante k_T che quantifica la velocità di trasferimento dell'antiossidante dalla fase acquosa alla fase lipidica attraverso la membrana micellare (Bolt & Turro, 1981; Barclay *et al.*, 1985; Castle & Perkins, 1986; Pryor *et al.*, 1985; Losada-Barreiro *et al.*, 2015).

L'analisi condotta nel Paragrafo 5.6 porta a considerare k_{10} come la costante cinetica più rilevante nell'equazione (5.4). Pertanto questa costante resta quella che maggiormente risente di questi contributi fenomenologici. Possiamo porre:

$$k_{10} = k_T K_R k'_{10}$$

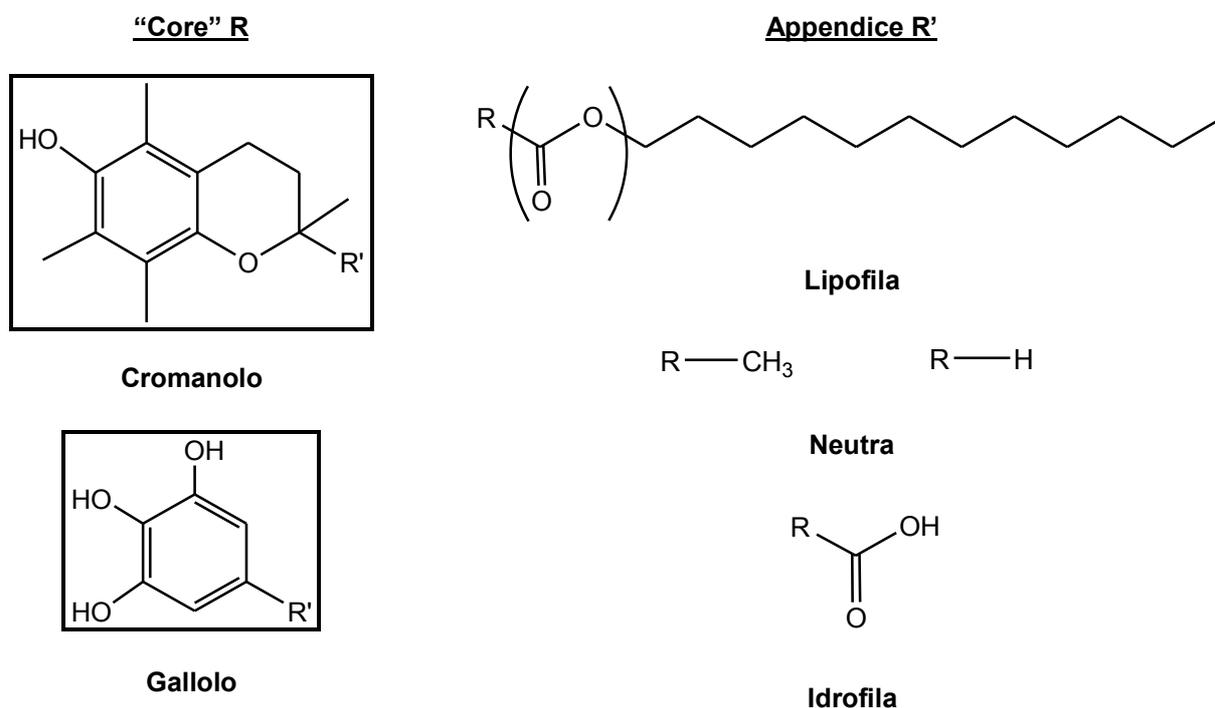
dove k'_{10} descrive la forza intrinseca dell'antiossidante.

Antiossidanti forti sono tali non solo per virtù propria, ma anche perché associati ad alti valori di lipofilità, cioè ad un alto valore della costante di ripartizione K_R ; pertanto la costante cinetica k_T di trasferimento diventa irrilevante e può venire posta pari a 1. Gli antiossidanti deboli sono tali per loro caratteristiche intrinseche, ma anche perché sottoposti a costanti di ripartizione e di trasferimento sfavorevoli.

Va tuttavia rimarcato che queste restano considerazioni speculative, in quanto si riportano in letteratura misure di costanti di ripartizione K_R che tentano di avvicinarsi ai sistemi reali e pertanto il trasferimento attraverso la membrana micellare resta rappresentato solo in maniera descrittiva, con definizioni quantitative approssimative.

Nella serie di antiossidanti investigati è possibile operare alcune selezioni, e nell'ambito di ognuna di esse si può operare una distinzione semiquantitativa fra il contributo intrinseco k'_{10} ed il contributo per trasferimento e ripartizione $k_T K_R$. Nell'antiossidante R-R' si procede, come illustrato nella Tabella 5.2, alla definizione del "core" fenolico R e dell'appendice R', con diverse caratteristiche di filicità.

Tabella 5.2. Definizione di "core" e "appendice" per alcuni antiossidanti investigati.



Nella triade tocoferolo/pentametilcromanolo/trolox, il "core" R è rappresentato dalla comune unità cromanolica (Burton & Ingold, 1981; Krumova *et al.*, 2012; Ohlow *et al.*, 2012), mentre le appendici sono rispettivamente lipofila, neutra e idrofila. Gli andamenti di p con la concentrazione di antiossidante per questa selezione sono illustrati in Figura 5.7, ed i valori di potere inibente α , sono evidenziati in colore rosso in Tabella 5.1.

Tocoferolo e pentametilcromanolo presentano il massimo potere inibente, che sembra essere associato principalmente alle caratteristiche del "core" (Doba *et al.*, 1984; Krumova *et al.*, 2012; Ohlow *et al.*, 2012), talché la presenza o meno di una appendice lipofila sembra marginale. Solo la presenza di una appendice idrofila, come nell'antiossidante trolox, porta ad un coefficiente di ripartizione non favorevole e ad un abbassamento del potere inibente, che resta comunque il terzo nella serie (si veda Tabella 5.1).

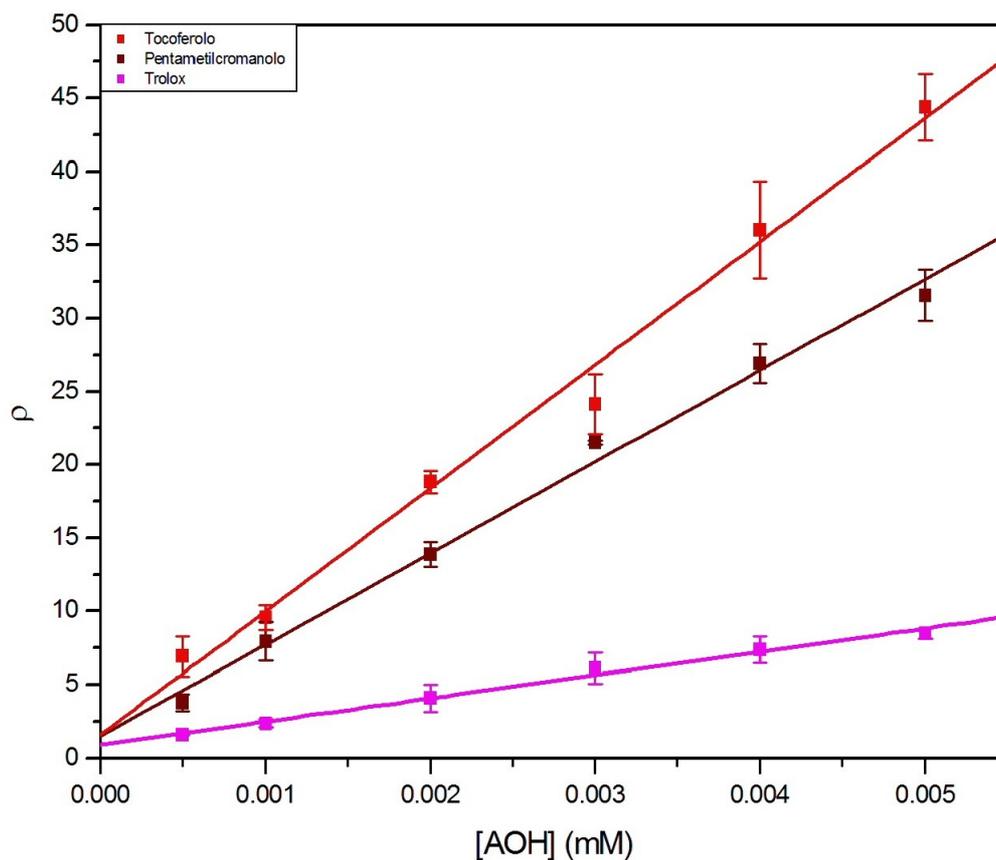


Figura 5.7. Dipendenza di ρ con le concentrazioni di AOH, variate nell'intervallo fra $0.5 \cdot 10^{-3}$ e $5 \cdot 10^{-3}$ mM, per tocoferolo, pentametilcromanolo e trolox. I valori di pendenza α delle rette sono riportati in rosso in Tabella 5.1.

Nella triade lauril gallato/pirogallolo/acido gallico, il “core” comune è rappresentato dal gruppo benzene-1,2,3-triolo, con appendici rispettivamente lipofila, assente e idrofila. Gli andamenti di ρ con la concentrazione di antiossidante per questa selezione sono illustrati in Figura 5.8, ed i valori del parametro α sono evidenziati in colore blu in Tabella 5.1. Il “core” presenta un modesto potere intrinseco inibente, che pone i composti verso la fine della sequenza in Tabella 5.1, e che rende la natura dell’appendice relativamente importante.

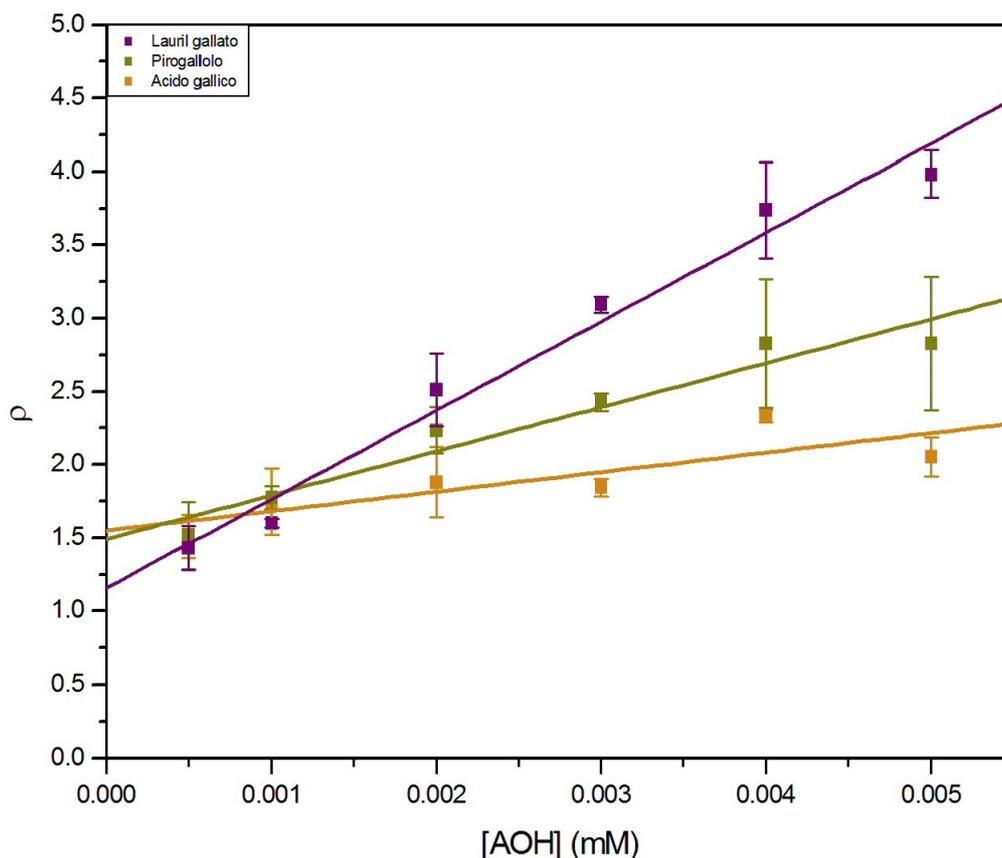


Figura 5.8. Dipendenza di ρ con le concentrazioni di AOH, variate nell'intervallo fra $0.5 \cdot 10^{-3}$ e $5 \cdot 10^{-3}$ mM, per lauril gallato, pirogallolo ed acido gallico. I valori di pendenza α delle rette sono riportati in blu in Tabella 5.1.

L'elevato valore di potere inibente intrinseco (k'_{10}) del "core" cromanolico può essere spiegato dalla stabilità del radicale AO^{\bullet} , per delocalizzazione dell'elettrone radicalico, così come illustrato nei mesomeri di risonanza in Figura 5.9. La delocalizzazione implica la distruzione dell'anello aromatico, con conseguente diminuzione del contributo alla stabilizzazione; l'ultimo mesomero è descritto da una struttura *para*-chinoide, con l'elettrone localizzato su un lontano carbonio terziario, che può fornire un contributo relativamente alto alla stabilizzazione.

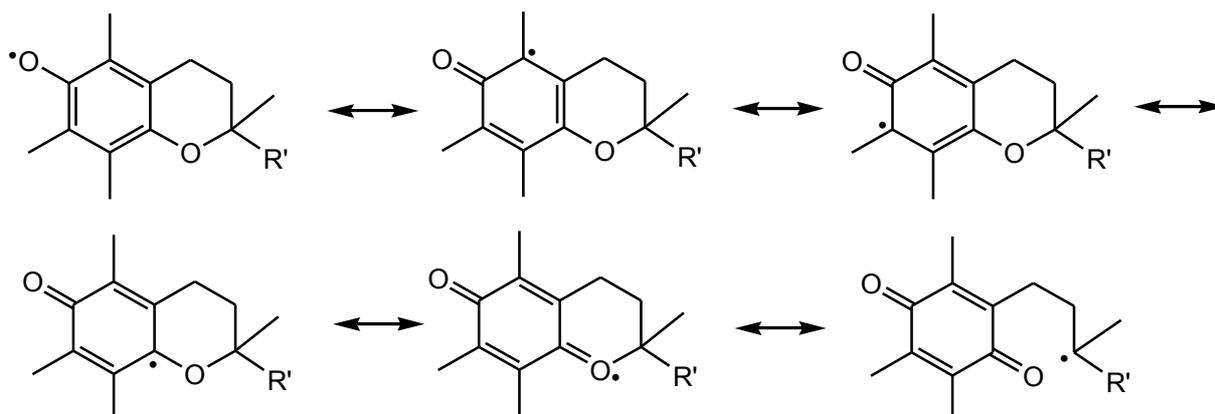


Figura 5.9. Strutture di risonanza del radicale AO^{\bullet} cromanolico.

I mesomeri di risonanza del radicale AO^{\bullet} benzene-1,2,3-triolo, rappresentati in Figura 5.10, evidenziano che anche in questo caso la delocalizzazione comporta la distruzione dell'anello aromatico ed un contributo basso alla stabilizzazione, non compensato dalla presenza di mesomeri capaci di un contributo elevato.

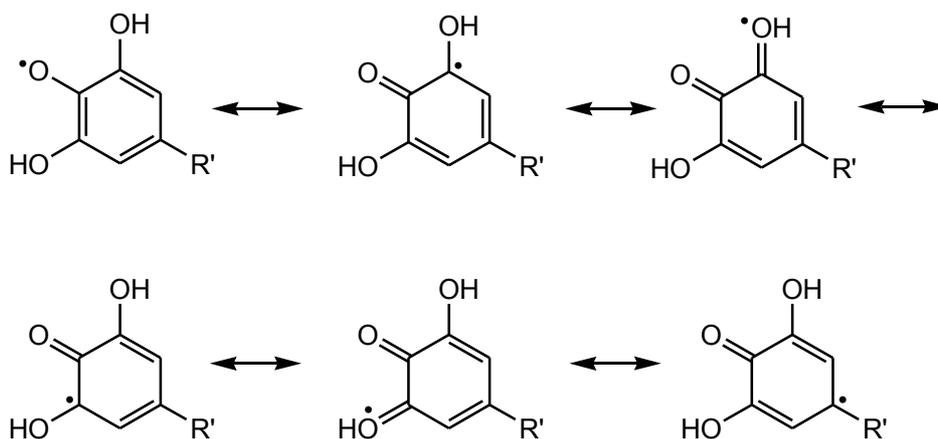


Figura 5.10. Strutture di risonanza del radicale AO* benzene-1,2,3-triolico.

5.8. Confronto con altre procedure

Una procedura (Rigo *et al.*, 2000; Zennaro *et al.*, 2007; Fabris *et al.*, 2008) di raccolta ed elaborazione delle tracce ossigrafiche prevede inizialmente la stessa tecnica adottata in questo lavoro per la registrazione della traccia in assenza di antiossidante. La velocità iniziale rimane descritta da $-(d[O_2]_{au}/dt)_0$. Dopo un determinato intervallo, e prima che la traccia si azzeri, si procede alla immissione di AOH, alla concentrazione voluta. Si definisce così la nuova velocità "iniziale" $-(d[O_2]_{au}/dt)_A$ e si procede al calcolo del rapporto (Fabris *et al.*, 2008):

$$P_{inh} \% = \frac{-(d[O_2]_{au}/dt)_0 - (-(d[O_2]_{au}/dt)_A)}{-(d[O_2]_{au}/dt)_0} * 100 \quad (5.5)$$

Come sempre, le due velocità sono rilevate con la retta migliore tracciata attraverso un conveniente numero di punti all'inizio dell'esperimento e dopo l'aggiunta dell'antiossidante (AOH). Ovviamente, la concentrazione "iniziale" di ossigeno (in unità arbitrarie), cui fa riferimento la velocità misurata dopo l'aggiunta di AOH, è minore della concentrazione di ossigeno cui fa riferimento la velocità misurata all'inizio dell'esperimento. Questo fatto è chiaramente rilevabile sulla stessa traccia ossigrafica misurata in assenza di AOH, che presenta pendenze variabili e decrescenti, come da Figura 4.3. In effetti le pendenze rilevabili all'inizio e subito dopo il sopracitato intervallo, associate alle velocità con pedice 0 e pedice A rispettivamente, determinano valori non nulli dell'equazione (5.3).

Equazioni simili all'equazione (5.3) sono state proposte (Bors *et al.*, 1984; Tubaro *et al.*, 1996, 1998 e 1999; Huang *et al.*, 2005; Lopez-Alarcon *et al.*, 2007; Takashima *et al.*, 2012) e parimenti derivate dal concetto di cinetiche competitive. In questi lavori, tuttavia, la scomparsa di ossigeno non viene direttamente osservata da un apparecchio rilevatore sensibile a queste specie (come l'elettrodo di Clark in questo lavoro, o un trasduttore di pressione come in Burton & Ingold, 1981), ma indirettamente attraverso le risposte, mediante misure spettrofotometriche UV-Vis o di fluorescenza, condotte su specie che contrastano l'acido linoleico, necessariamente un antiossidante di riferimento, AOH_{rif}. In questi lavori vengono effettuati due o più esperimenti, sempre in presenza di AOH_{rif}, ed in assenza (pedice 0) o presenza (pedice A) dell'antiossidante indagato:

$$\rho = \frac{-(d[O_2]_{au}/dt)_0}{-(d[O_2]_{au}/dt)_A} = \frac{k_0[AOH_{rif}] + k_A[AOH]}{k_0[AOH_{rif}]} = 1 + \frac{k_A}{k_0} \frac{[AOH]}{[AOH_{rif}]}$$

Pertanto si ricavano pendenze k_A/k_0 che misurano il potere inibente di AOH relativamente a quello di AOH_{rif} . Molte scale relative del potere di inibizione degli antiossidanti vengono così proposte, in cui il riferimento AOH_{rif} è rispettivamente la crocina (Bors *et al.*, 1984; Huang *et al.*, 2005; Tubaro *et al.*, 1996, 1998 e 1999), la c-ficocianina (Lopez-Alarcon *et al.*, 2007), il pirogallolo rosso (Takashima *et al.*, 2012).

Al contrario, l'equazione (5.3) e gli andamenti lineari evidenziati nelle Figure 5.3a-b definiscono una scala di inibizione assoluta, in cui ogni antiossidante è confrontato con una situazione in cui lo stesso è assente.

La forma funzionale dell'equazione (5.3) è simile a quella dell'equazione di Stern-Volmer, che descrive l'estinzione di fluorescenza condotta mediante una sostanza appropriata (Li *et al.*, 2000).

Il rapporto ρ è stato anche utilizzato in forma inversa; in questo caso i dati sperimentali devono essere correlati su una funzione esponenziale (Rossetto *et al.*, 2005).

5.9. Conclusioni

Lo scopo di questo capitolo era la definizione di una scala assoluta, capace di stabilire un ordine per una serie di antiossidanti (AOH) a seconda delle loro capacità di inibire la perossidazione lipidica. La funzione proposta, nella forma data dall'equazione (5.3), offre i vantaggi seguenti:

- a) la funzione è lineare, cosicché la capacità inibente è semplicemente ricavata dalla pendenza;
- b) le intercette convergono ad un valore approssimativamente prossimo a 1. Questo fatto non implica alcun significato dal punto di vista chimico, ma offre tuttavia un criterio per valutare l'accuratezza delle misure e la validità dell'approccio empirico utilizzato;
- c) la funzione viene descritta dal rapporto ρ di situazioni in cui l'antiossidante è assente o presente: la scala rappresentata dalle pendenze è quindi assoluta. Altre funzioni con simile formalismo sono state proposte, in cui l'antiossidante in misura è però confrontato con un antiossidante di riferimento;
- d) si deve porre attenzione affinché le due situazioni sperimentali siano condotte con la stessa concentrazione iniziale di ossigeno, ancorché non sia necessario conoscerne l'entità. Pertanto le risposte del convertitore amperometrico possono rimanere espresse in unità arbitrarie, e la conversione in concentrazioni autentiche di ossigeno non si rende necessaria.

Analisi critica dei parametri che descrivono la traccia ossigrafica

Si descrivono di seguito i parametri associati alla traccia ossigrafica (andamento del consumo di ossigeno nel tempo) di cui alla Figura 4.3.

6.1. Pendenze e velocità iniziali

Questo parametro e le considerazioni in merito sono state trattate nel precedente Capitolo 5.

6.2. “Lag time”

Il “lag time”, termine che può essere tradotto come “tempo di ritardo”, ossia l’intervallo di tempo in cui opera l’inibitore (Pryor *et al.*, 1985; Rossetto *et al.*, 2002), viene rilevato dalla traccia ossigrafica con le modalità illustrate graficamente in Figura 4.3. In particolare, il “lag time” viene definito come il lasso di tempo che intercorre dal momento dell’aggiunta dell’inibitore fino all’esaurimento del suo effetto, motivo per cui viene presentato in letteratura come parametro empirico di misura della capacità antiossidante dell’inibitore in esame (Niki *et al.*, 1984).

Il “lag time” continua finché l’antiossidante non viene totalmente “sacrificato”; successivamente l’entità del consumo di ossigeno cresce notevolmente fino a raggiungere velocità paragonabili a quelle in condizioni di mancata inibizione. Tale parametro, che può essere visto come una sorta di “tempo di protezione”, può essere quindi correlato alla concentrazione di antiossidante (Pryor *et al.*, 1988; Rossetto *et al.*, 2002 e 2005) e permette una stima del potere inibente di AOH in termini della grandezza espressa in ascissa (tempo, nel caso specifico secondi), e pertanto indipendente dalle unità arbitrarie, espresse dal convertitore amperometrico (per l’elettrodo di Clark) o da un qualsiasi altro trasduttore, della concentrazione di ossigeno.

Di fatto il “lag time” può venire rilevato però solo per tracce ossigrafiche con andamento convesso, e quindi per antiossidanti relativamente forti, con precisione abbastanza sicura per i più forti fra essi, come tocoferolo (Goupy *et al.*, 2007) e pentametilcromanolo, in maniera meno precisa per trolox e BHT, mentre rimane in sostanza non determinabile, o comunque con precisione non accettabile, per il lauril gallato. Inoltre per gli antiossidanti che presentano tracce ossigrafiche con andamento concavo non è nemmeno possibile definire il “lag time”.

Un parametro, sempre associato alla grandezza “tempo” in ascissa, che può al contrario venire rilevato con precisione accettabile per tutti gli antiossidanti investigati, è lo “zero time”. Il parametro è descritto graficamente sempre in Figura 4.3 e verrà illustrato più avanti nel presente capitolo.

6.3. Andamenti concavo e convesso

Il significato dell’andamento concavo o convesso delle tracce ossigrafiche, ovvero dell’andamento nel tempo del consumo di ossigeno, risulta immediatamente deducibile dalle curve rappresentate in Figura 6.1, che illustrano la serie di antiossidanti presi in esame in questo lavoro di tesi, misurate alla stessa concentrazione di $5 \cdot 10^{-3}$ mM.

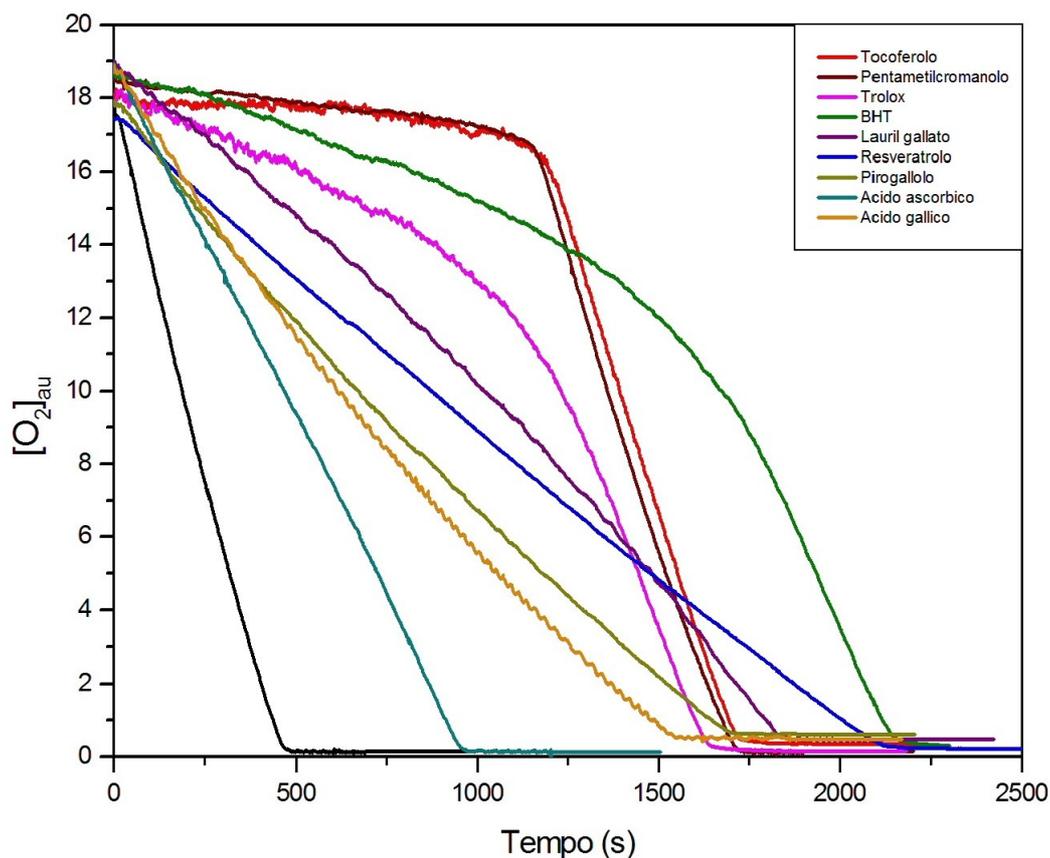


Figura 6.1. Tracce ossigrafiche (in colore) per la serie di antiossidanti investigati, alla concentrazione di $5 \cdot 10^{-3}$ mM, ed in assenza di antiossidante (traccia nera).

Le capacità, ovvero la forza, di inibizione da parte degli antiossidanti del processo di perossidazione lipidica, sono state variamente associate all'andamento concavo o convesso delle tracce ossigrafiche (Laguerre *et al.*, 2007), alla loro lipofilità o idrofilicità (Barclay *et al.*, 1985; Frankel, 1996; Frankel & Meyer, 2000), alla loro modalità di azione, se “retarder” o “chain-breaking” (Laguerre *et al.*, 2007). Gli antiossidanti forti, che presentano una traccia ossigrafica con andamento convesso, sono considerati lipofili, e la loro azione è descritta come “chain-breaking”. Gli antiossidanti deboli hanno tracce ossigrafiche con andamento concavo, sono considerati idrofili, e sono, per la loro azione, definiti come “retarder”. Queste associazioni sono in buona misura arbitrarie.

6.3.1. Concavità e convessità

In un sistema biologico l'efficacia di un antiossidante non può misurarsi dalla sua capacità di impedire l'ossidazione lipidica competendo per il consumo di ossigeno. L'ossigeno così consumato viene rapidamente ripristinato dall'ossigeno atmosferico, verso il quale la membrana biologica non è certamente impermeabile. Pertanto un antiossidante efficace opera intercettando quei substrati che consumano ossigeno, preservando la presenza di quest'ultimo.

Tale capacità viene documentata nella presente indagine condotta *in vitro*, come evidenziato dalla Figura 6.1. Antiossidanti efficaci, come tocoferolo e pentametilcromanolo, permettono di mantenere in buona misura la concentrazione iniziale di ossigeno per tutto il periodo in cui operano; questa propensione diminuisce in antiossidanti progressivamente meno efficaci, ma rimane riscontrabile anche per gli

antiossidanti più deboli: si osserva comunque un ritardo nel consumo di ossigeno (tracce colorate) rispetto alla situazione di antiossidante assente (traccia nera).

Le pendenze iniziali delle tracce ossigrafiche vanno da pendenze basse (quasi parallele all'asse delle ascisse) a pendenze elevate, solo di poco inferiori alla pendenza rilevata in assenza di antiossidante. L'azione di un antiossidante è sacrificale (Karadag *et al.*, 2009) e l'ossidazione lipidica riprende ad antiossidante esaurito, fino a consumo totale dell'ossigeno; questo avviene ad un tempo che risulta essere soprattutto funzione della quantità di antiossidante, piuttosto che della natura di esso (si vedano le considerazioni dettagliate al Paragrafo 6.4). Tali fatti comportano l'andamento delle curve mostrato in Figura 6.1.

La distinzione fra andamenti concavo e convesso, cui vengono associate le diverse caratteristiche di lipofilicità e idrofilicità e le diverse modalità di azione (Laguerre *et al.*, 2007), risulta pertanto irrilevante.

6.3.2. "Chain-breaking" e "retarder"

La Figura 4.3 evidenzia l'efficacia della presenza dell'acido linoleico (LH) nel sistema di misura, e quindi la valenza dello stadio di propagazione (b) nello Schema 4.1 (si confrontino, a tal proposito, la traccia in colore grigio, sola presenza di SDS e ABIP, con la traccia in colore nero, presenza di SDS, LH e ABIP).

Un antiossidante è tanto efficace quanto più opera come inibitore a livello dello stadio di propagazione ("chain-breaking"), per attacco sui "propagatori", il radicale LOO^{\bullet} (reazione c4 con costante k_{10}) o L^{\bullet} (reazione c3 con costante k_9). L'inibizione a livello dello stadio di iniziazione avviene per attacco sul radicale $InOO^{\bullet}$ (reazione c2 con costante k_8) o sul radicale In^{\bullet} (reazione c1 con costante k_7). Le costanti k_7 , k_8 , k_9 e k_{10} possono essere simili. Ciò nondimeno l'azione di "chain-breaking" resta, per sua stessa natura, molto più efficace. L'azione di "chain-breaking", associata ad antiossidanti forti, opera su specie (L^{\bullet} e LOO^{\bullet}) rigorosamente confinate nelle micelle SDS/LH, ed avviene esclusivamente in questa stessa matrice. L'azione come "retarder", associata ad antiossidanti più deboli, opera su specie (In^{\bullet} e $InOO^{\bullet}$) presenti sia nella matrice lipidica SDS/LH che nella matrice acquosa.

6.3.3. Antiossidanti lipofili e idrofili

Negli esperimenti illustrati in Figura 5.6, i rapporti $[LH]/[SDS]$ rimangono costanti, variando unicamente in ascissa il numero dei complessi micellari SDS/LH. L'antiossidante che opera in un complesso reagisce alle condizioni che vi ritrova, in particolare alla concentrazione di acido linoleico (LH), uguale per tutti i complessi, mentre resta indifferente al numero degli stessi. Questo è certamente valido e verificato in Figura 5.6 dalla costanza del parametro α per gli antiossidanti lipofili più forti.

Lo stesso andamento, la costanza della pendenza α , è peraltro verificato anche per gli antiossidanti più deboli. Questi ossidanti sono bensì considerati idrofili, ma certamente non sono totalmente lipofobi. La loro azione come "retarder" nella matrice acquosa dovrebbe contribuire al parametro α , con evidenza manifestata in Figura 5.6. Questo fatto però non viene osservato.

Se ne conclude pertanto che la valenza dell'azione di "chain-breaking", reazione c4 con costante k_{10} , rimane superiore rispetto all'azione "retarder", reazione c2 con costante k_8 , anche in presenza nella seguente definizione:

$$k_{10} = k_T K_R k'_{10}$$

di una costante di ripartizione K_R sfavorevole (si veda Paragrafo 5.7 per maggiori dettagli).

6.4. Relazione fra il parametro “zero time” e la concentrazione di antiossidante

Come precedentemente accennato, un’accettabile alternativa al “lag time”, proposta nel presente lavoro, potrebbe essere il parametro empirico “zero time” (ZT), definito come il tempo il cui, a partire dall’introduzione del generatore di radicali, la traccia ossigrafica raggiunge il valore 0, vale a dire il tempo in cui l’ossigeno nella cella ossigrafica viene completamente consumato.

Si distinguono ZT_0 e ZT_A come i tempi di consumo totale di ossigeno rispettivamente in assenza ed in presenza di antiossidante.

La differenza

$$ZT_{\Delta} = ZT_A - ZT_0$$

misura pertanto il ritardo nella scomparsa di ossigeno in seguito all’azione dell’antiossidante. Questa definizione viene graficamente rappresentata in Figura 6.2, dove si riportano i valori di ZT_{Δ} contro i valori [AOH].

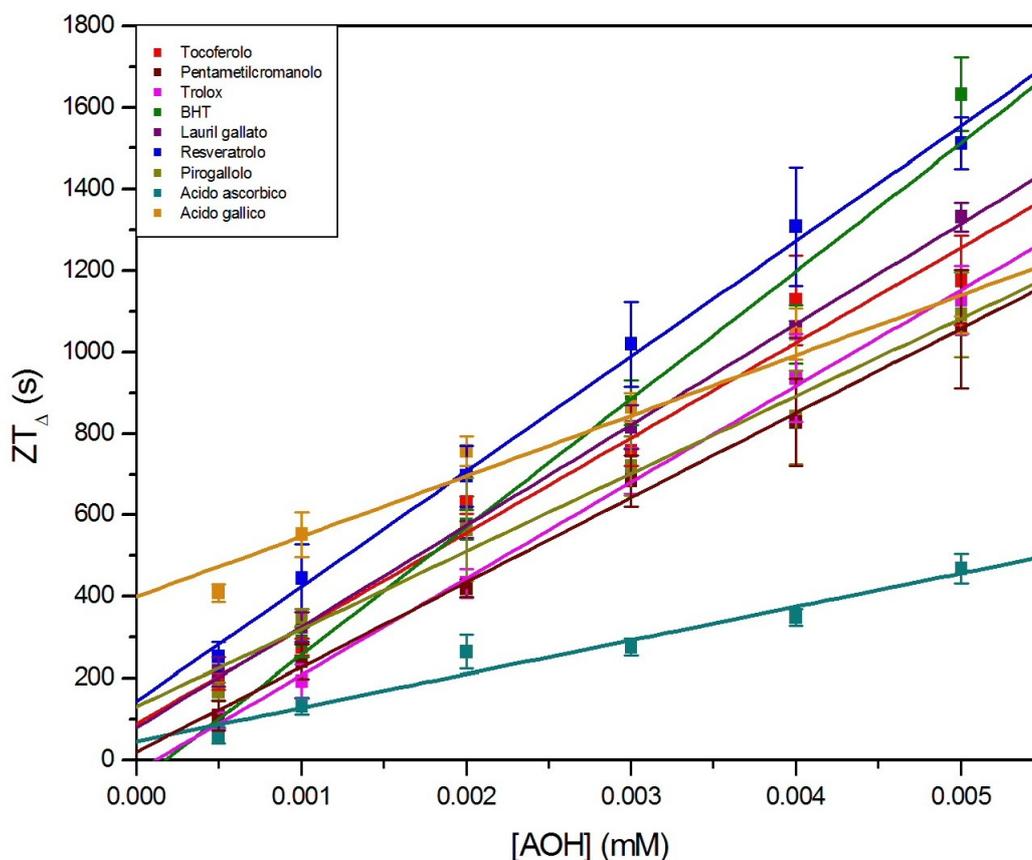


Figura 6.2. Andamento del valore di ZT_{Δ} in funzione della concentrazione di antiossidante.

Le tracce ossigrafiche di uno stesso campione di antiossidante (AOH) ad una data concentrazione sono state sistematicamente rilevate tre volte: il punto in cui la traccia ossigrafica si annulla (ZT_A) presenta un certo grado di variabilità e lo stesso vale per le misure fatte in assenza di antiossidante (ZT_0), di

conseguenza anche la differenza ZT_{Δ} presenta una misura di variabilità. Risultano, per ogni antiossidante (AOH), correlazioni lineari, che sono caratterizzate, nella maggior parte dei casi, da pendenze simili e da intercette prossime a 0. L'acido ascorbico presenta una pendenza decisamente minore, che va attribuita al fatto che la specie, come riportato in letteratura (Wills, 1996; Yen *et al.*, 2002; Laguerre *et al.*, 2007) e come descritto al Capitolo 7, sembra potere agire anche come pro-ossidante, che, accelerando il consumo di ossigeno, comporta un abbassamento del valore di ZT_{Δ} .

L'andamento dell'acido gallico risulta pure anomalo, con intercetta decisamente superiore al valore 0. Una anomalia nel comportamento inibitore di questa specie è stata già descritta in letteratura (Aruoma *et al.*, 1993; Yen *et al.*, 2002).

Le pendenze nei casi degli antiossidanti BHT e resveratrolo sono maggiori, restando tuttavia molto simili a quelle dei rimanenti antiossidanti.

Gli altri antiossidanti mostrano pendenze simili ed intercette prossime al valore zero, pure essendo caratterizzati da valori di capacità di inibizione (parametro α) molto diversi: alta per tocoferolo e pentametilcromanolo, intermedia per trolox, e bassa per lauril gallato e pirogallolo. Queste specie pertanto sono state scelte per la derivazione di una accettabile interpolazione lineare fra i valori ZT_{Δ} e le concentrazioni di antiossidante. La correlazione viene evidenziata dalla traccia nera in Figura 6.2a.

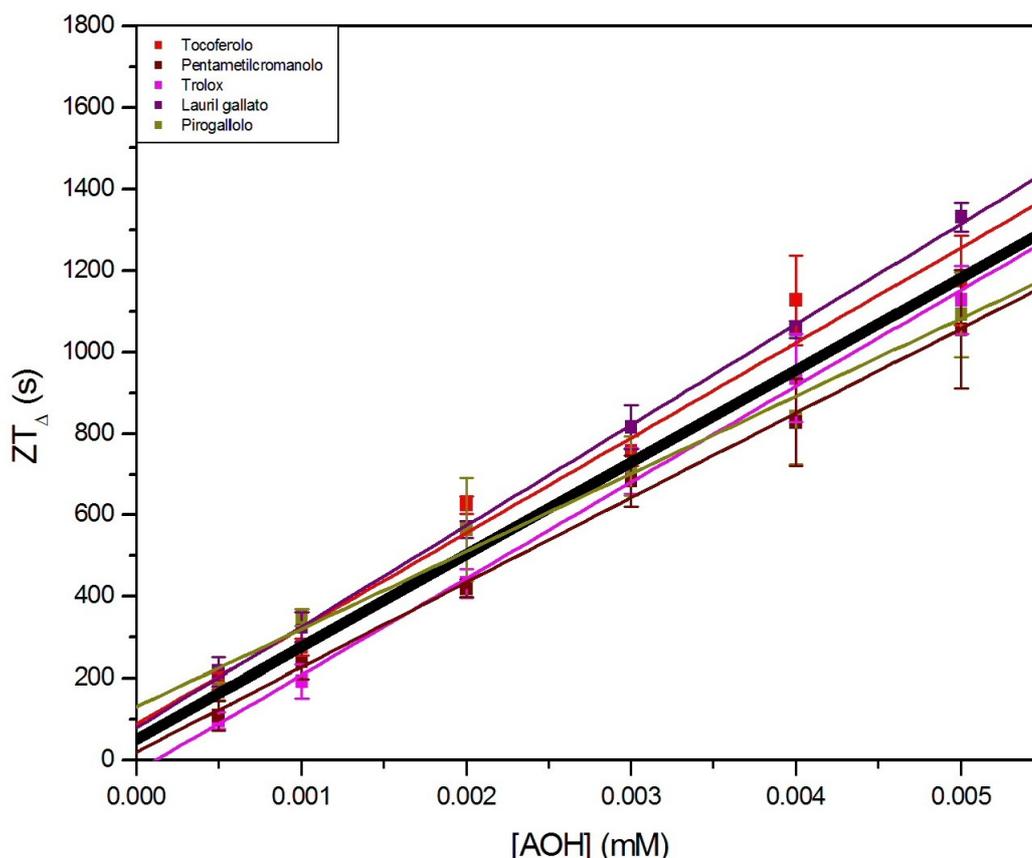


Figura 6.2a. Interpolazione lineare (in colore nero) fra i valori di ZT_{Δ} e le concentrazioni [AOH] degli antiossidanti selezionati. L'equazione della retta in colore nero risulta $ZT_{\Delta} = 223128*[AOH]+57.59$.

Si può affermare quindi con buona sicurezza che i valori di ZT_{Δ} dipendono soprattutto dalla concentrazione di antiossidante ed in misura minore, e sempre con le eccezioni sopra menzionate, dalla sua natura. Questa relazione è strettamente legata alla modalità autosacrificale (Gunstone, 2006; Karadag *et al.*, 2009) con cui

opera ogni antiossidante, per la quale il contrasto al consumo di ossigeno vale per il solo periodo in cui sono presenti gli antiossidanti (si veda il Paragrafo 6.3.1).

I parametri della retta di colore nero evidenziata in Figura 6.2a sono:

$$ZT_{\Delta} = 223128 * [AOH] + 57.59 \quad (6.1)$$

Questa correlazione verrà utilizzata in applicazioni pratiche come, ad esempio, nella misura del potere antiossidante in campioni di oli di oliva e di semi (Capitolo 8) in cui il parametro $\Sigma_i[AOH_i]$, che descrive le concentrazioni del complesso di antiossidanti che vi opera, non è in genere conosciuto né facilmente determinabile.

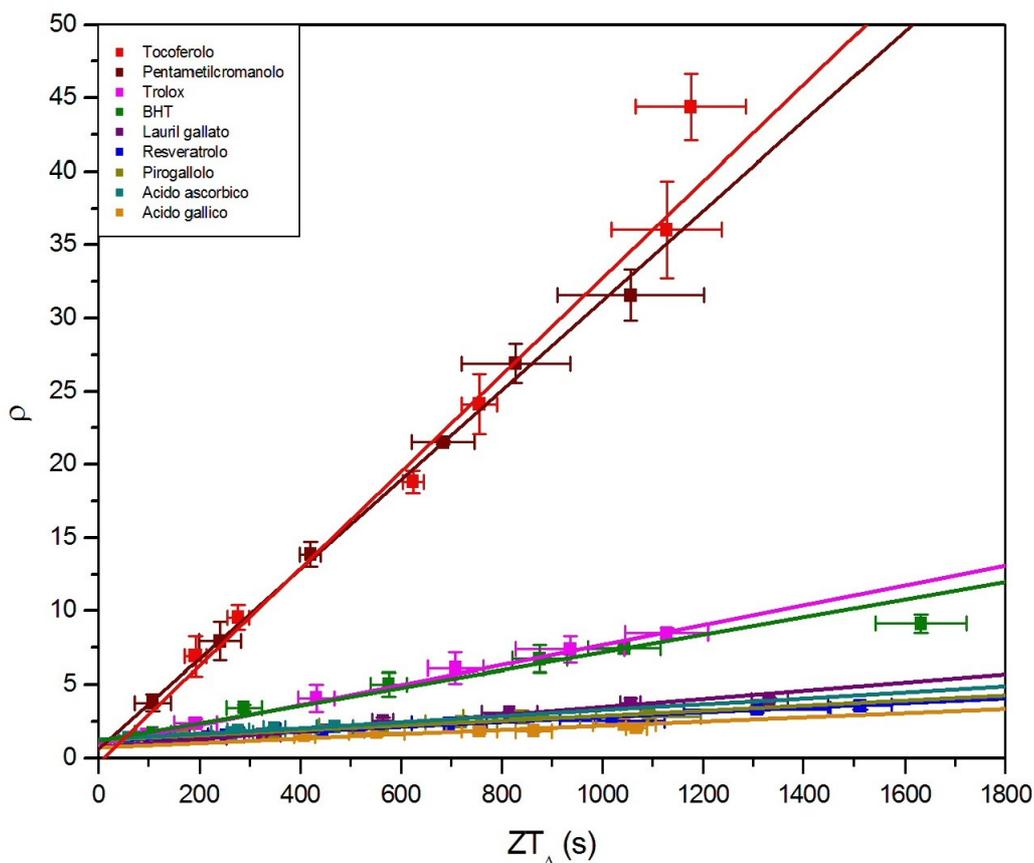


Figura 6.3. Correlazione fra i valori di ρ e ZT_{Δ} .

I valori di ZT_{Δ} sono pertanto degli accettabili succedanei dei valori di $[AOH]$ (o di $\Sigma_i[AOH_i]$, si veda Capitolo 8), come dimostrato in Figura 6.3, dove, per la serie di inibitori investigati, i valori di ρ vengono correlati con i valori di ZT_{Δ} , piuttosto che con i valori di $[AOH]$. Si può notare come gli andamenti di Figura 6.3 sostanzialmente riproducano gli andamenti delle Figure 5.3a-b: tocoferolo e pentametilcromanolo presentano maggiori proprietà antiossidanti, seguiti da trolox e BHT e, infine, lauril gallato, resveratrolo, pirogallolo, acido ascorbico e acido gallico sono caratterizzati da un più basso potere antiossidante.

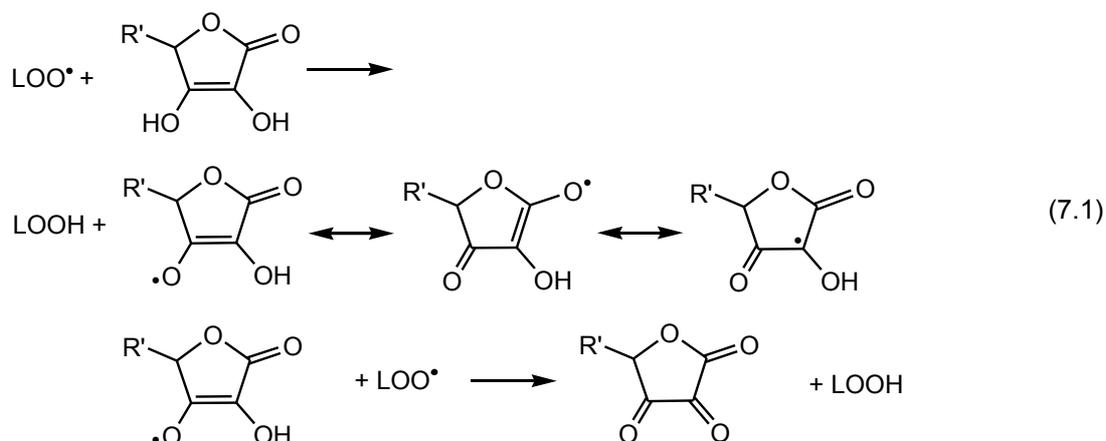
Acido ascorbico

7.1. Proprietà antiossidanti e pro-ossidanti dell'acido ascorbico

L'acido L-ascorbico (Vitamina C) è un composto organico idrosolubile caratterizzato da proprietà antiossidanti, indispensabile per la vita degli organismi viventi ma non sintetizzabile dagli stessi, per cui deve necessariamente essere assunto con la dieta. Il ruolo della vitamina C nel metabolismo non è ancora completamente definito; certamente la molecola presenta proprietà antiossidanti ed è coinvolta nell'idrossilazione della prolina e della lisina nella molecola di collagene. Carenze di vitamina C comportano lo scorbuto, una malattia caratterizzata dalla degenerazione generalizzata del tessuto connettivo, che si evidenzia attraverso piccole emorragie ed insufficienza cardiaca. La malattia era diffusa nelle popolazioni delle regioni desertiche, ma anche negli equipaggi delle navi nei periodi delle lunghe esplorazioni via mare. La prima circumnavigazione del globo, compiuta da Magellano negli anni 1519-1522, si concluse infatti con la perdita di più dell'80% dell'equipaggio a causa proprio dello scorbuto (Nelson & Cox, 2014).

Questa molecola è largamente diffusa in natura, principalmente negli alimenti di origine vegetale, quali, ad esempio, agrumi, kiwi, peperoni, pomodori e ortaggi a foglia verde (Padayatty *et al.*, 2003).

L'acido ascorbico è facilmente ossidabile in presenza di ossigeno e metalli e passa dalla forma ridotta (acido ascorbico) a quella ossidata (acido deidroascorbico) in equilibrio reciproco e con processo reversibile (Arrigoni & De Tullio, 2002; Hacisevki, 2009). A pH fisiologico, si trova come anione ascorbato e le sue funzioni biologiche sono collegate al suo forte potere riducente, in grado di ridurre e di conseguenza neutralizzare sostanze ossidanti, come le specie reattive dell'ossigeno (ad esempio il perossido di idrogeno) (Padayatty *et al.*, 2003; Hacisevki, 2009). L'acido ascorbico svolge la sua azione antiossidante attraverso diversi meccanismi; in particolare blocca ed inibisce l'azione di radicali liberi, convertendosi in un radicale stabilizzato per risonanza (Lu *et al.*, 2010). Nell'esplicare la sua azione riducente verso molti sistemi biologici, l'acido ascorbico si ossida, in due successive tappe, dapprima a radicale ascorbico e quindi ad acido deidroascorbico (Hacisevki, 2009), secondo le seguenti reazioni:



Tuttavia gli antiossidanti, che sono in definitiva molecole con proprietà riducenti, possono in certe condizioni esercitare anche azione pro-ossidante, in relazione alla struttura, all'ambiente chimico ed alle condizioni di prova. Per tale motivo, l'acido ascorbico presenta paradossalmente attività pro-ossidante quando viene

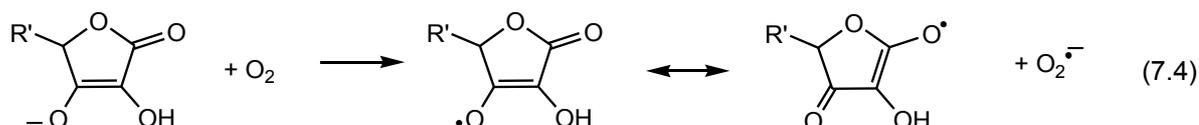
coinvolto ad esempio nella riduzione di metalli, come ferro e rame, secondo la reazione (7.2) (Pisoschi *et al.*, 2014):



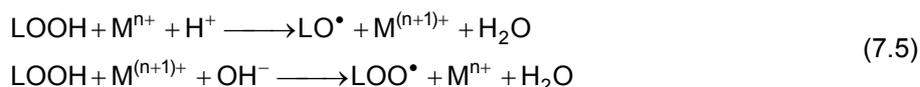
Gli ioni metallici possono essere così ridotti, ossidati (reazione 7.3) e nuovamente ridotti, all'interno di un ciclo di redox che genera specie reattive dell'ossigeno (Pisoschi *et al.*, 2014) e radicali liberi, attraverso, ad esempio, la già citata reazione di Fenton (Capitolo 1) (Stohs & Bagchi, 1995; Carr & Frei, 1999).



Viene inoltre descritta (Scarpa *et al.*, 1983) la generazione dello ione superossido $\text{O}_2^{\bullet -}$, un importante radicale libero, anche durante l'auto-ossidazione dell'acido ascorbico, secondo la reazione (7.4):



Oltre a tutte le suddette reazioni, gli ioni metallici, principalmente ferro e rame, possono interagire con i lipidi idroperossidi, inducendo la formazione di radicali lipidici, coinvolti nella perossidazione lipidica, secondo la reazione (7.5) (Buettner, 1993; Antolovich *et al.*, 2002):



Sulla base delle considerazioni fatte, deriverebbe pertanto la necessità di cercare di eliminare, o comunque di inattivare, i metalli eventualmente presenti. Nel caso specifico di questo lavoro di ricerca, si è preferito invece non attuare le possibili metodiche di riduzione drastica delle tracce di ioni metallici presenti, ad esempio, nelle soluzioni tampone (Buettner & Jurkiewicz, 1996), in modo tale da potere verificare il comportamento dell'acido ascorbico in un ambiente il più vicino possibile ai sistemi biologici, dove i sopracitati metalli sono presenti, al fine di avere un quadro completo della stabilità all'ossidazione dei sistemi e dell'effetto protettivo dei diversi inibitori in un sistema vicino al reale.

Prove sperimentali preliminari, condotte secondo la consueta metodica ed alle consuete condizioni sperimentali, in sola presenza di acido ascorbico ed assenza di iniziatore radicalico, evidenziano un significativo consumo di ossigeno in seguito all'innescò della reazione di perossidazione lipidica da parte dell'acido ascorbico stesso, con intensità correlata alla sua concentrazione. Si confermerebbero in tal modo le caratteristiche pro-ossidanti della Vitamina C (Figura 7.1).

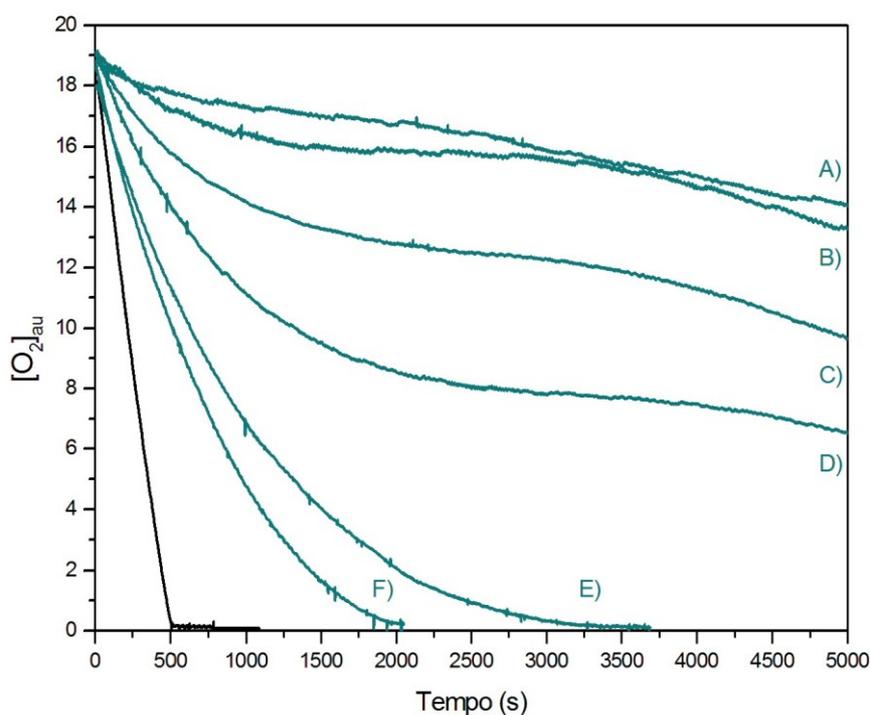


Figura 7.1. Andamento della concentrazione di ossigeno registrata nella cella caricata con SDS 50 mM, LH 10 mM:
 - in presenza di ABIP 4 mM ed in assenza di acido ascorbico (traccia nera);
 - in assenza di ABIP e presenza di acido ascorbico a concentrazioni crescenti A) 10^{-3} , B) $5 \cdot 10^{-3}$, C) $10 \cdot 10^{-3}$, D) $20 \cdot 10^{-3}$, E) $40 \cdot 10^{-3}$ e F) $50 \cdot 10^{-3}$ mM (tracce ciano scuro).

La conferma che il consumo di ossigeno sia dovuto alla perossidazione lipidica si evince anche dalla Figura 7.2, che evidenzia come, pure in assenza di iniziatore radicalico, l'acido ascorbico promuova un notevole consumo di ossigeno (traccia B), mentre misure analoghe effettuate in assenza di acido linoleico, alle medesime condizioni sperimentali, mostrino un consumo di ossigeno insignificante (traccia A).

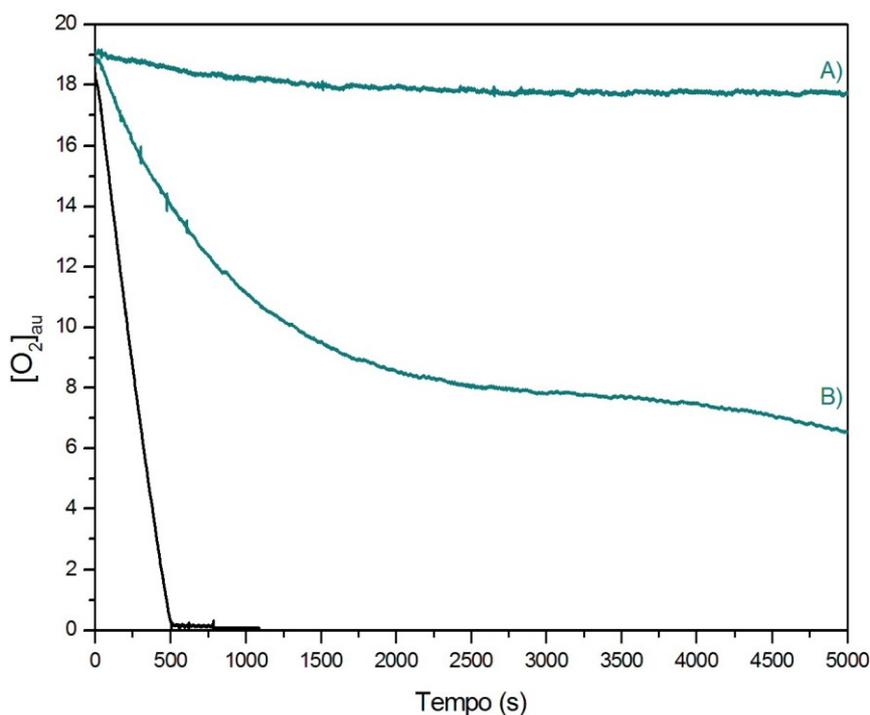
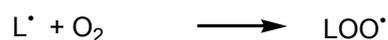
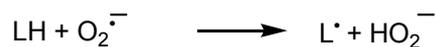
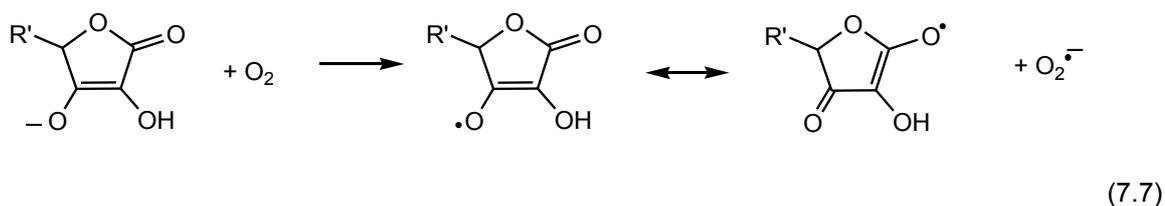
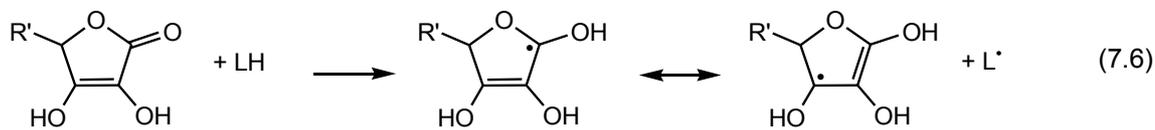


Figura 7.2. Variazioni delle tracce ossigrafiche nella cella caricata con SDS 50 mM, LH 10 mM, ABIP 4 mM ed in assenza di acido ascorbico (traccia nera); A) in assenza di ABIP e di LH e presenza di acido ascorbico $20 \cdot 10^{-3}$ mM; B) in assenza di ABIP ed in presenza di LH 10 mM e di acido ascorbico $20 \cdot 10^{-3}$ mM.

Sembrerebbe, quindi, che l'acido ascorbico operi unicamente in presenza di un substrato altamente ossidabile, come l'acido linoleico polinsaturo, con una risposta moltiplicata dal ciclo di propagazione ed eventualmente attenuata dalla presenza di un antiossidante (si veda Figura 7.5 nel caso dell'inibitore tocoferolo).

Secondo quanto precedentemente esposto, vengono proposte di seguito alcune reazioni, teoricamente possibili, di iniziazione della perossidazione lipidica ad opera dell'acido ascorbico:



La reazione (7.7) nello specifico mostra come, in seguito alla reazione di ossidazione dell'acido ascorbico, si generi l'anione superossido (Scarpa *et al.*, 1983), che successivamente reagisce con l'acido linoleico, promuovendo il processo perossidativo, associato al consumo di ossigeno.

Dai risultati a disposizione sembrerebbe pertanto che l'acido ascorbico, alle condizioni sperimentali impiegate, agisca come promotore della reazione perossidativa, ricoprendo il ruolo di iniziatore radicalico, piuttosto che di inibitore: nella seguente Figura 7.3 si confrontano tracciati ossigrafici acquisiti mediante l'intervento del solo iniziatore radicalico (a differenti concentrazioni) da un lato, del solo acido ascorbico dall'altro.

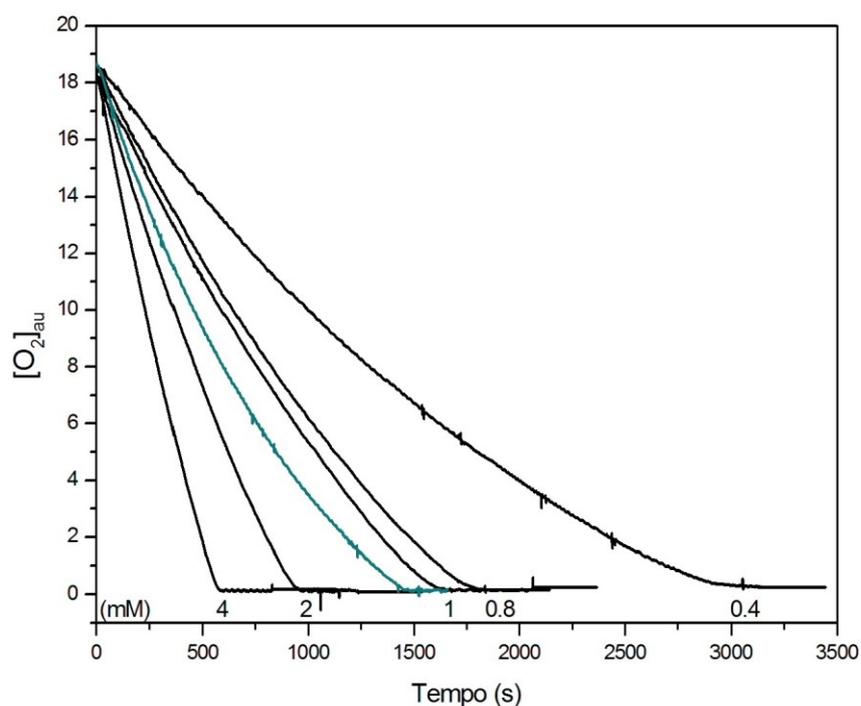


Figura 7.3. Consumo di ossigeno conseguente il processo di perossidazione lipidica per azione dell'iniziatore radicalico ABIP a differenti concentrazioni (tracce nere), oppure dell'acido ascorbico alla concentrazione di $50 \cdot 10^{-3}$ mM (traccia ciano scuro).

La Figura 7.4, che riporta i risultati ottenuti da alcuni esperimenti di perossidazione lipidica condotti in assenza ed in presenza dell'agente chelante EDTA (acido etilendiamminotetraacetico), in grado di sequestrare lo ione metallico riducendone l'attività catalitica (Buettner & Jurkiewicz, 1996), conferma il fondamentale ruolo catalitico delle tracce di ioni metallici presenti nelle soluzioni di misura.

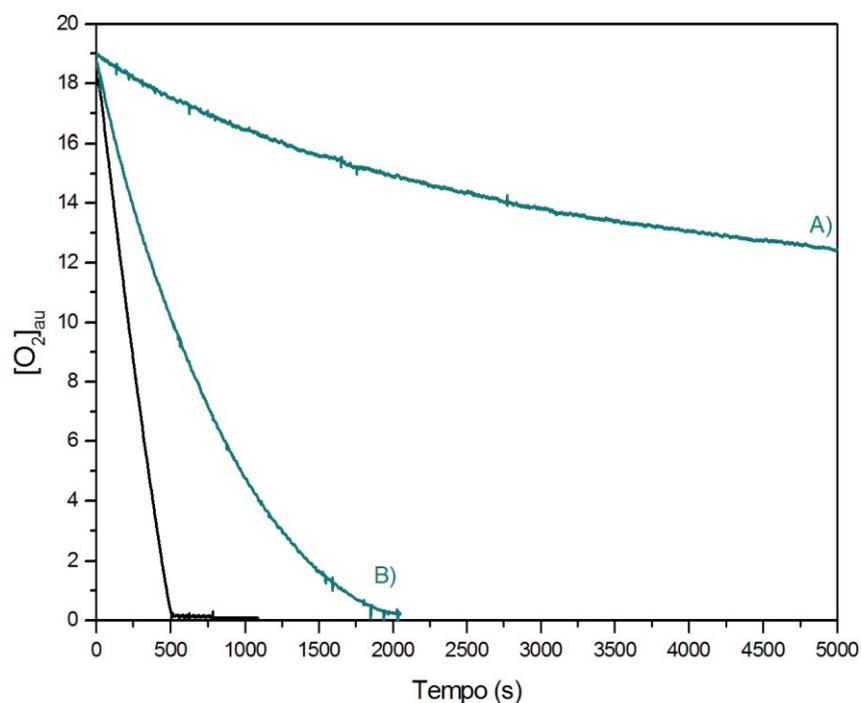


Figura 7.4. Consumo di ossigeno conseguente il processo di perossidazione lipidica nella cella caricata con SDS 50 mM, LH 10 mM, acido ascorbico $50 \cdot 10^{-3}$ mM, in assenza ed in presenza di EDTA $50 \cdot 10^{-3}$ mM, tracce B) ed A) rispettivamente. Traccia nera: SDS 50 mM, LH 10 mM, ABIP 4 mM.

Se effettivamente l'acido ascorbico agisce da iniziatore della reazione radicalica, e quindi del processo perossidativo, l'aggiunta di un antiossidante, nello specifico il tocoferolo, dovrebbe comportare l'inibizione del processo perossidativo, con un'efficacia correlata alla concentrazione. I risultati riportati in Figura 7.5 confermano l'ipotesi.

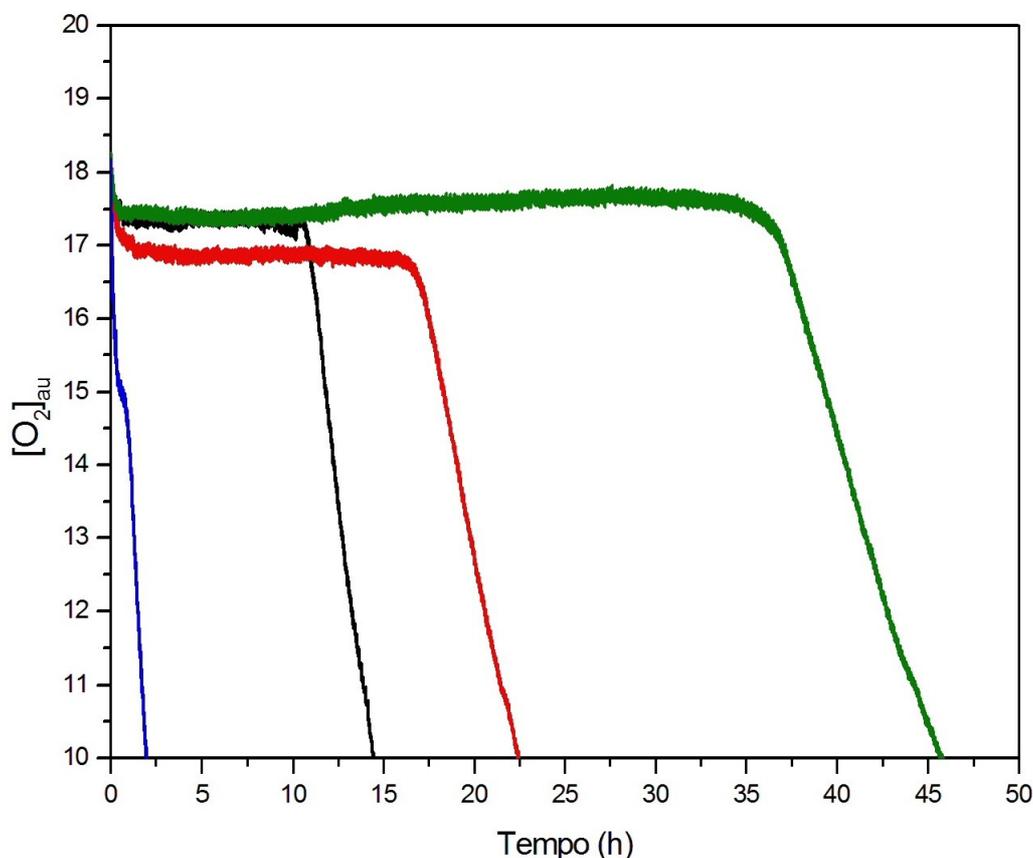


Figura 7.5. Consumo di ossigeno conseguente il processo di perossidazione lipidica nella cella caricata con SDS 50 mM, LH 10 mM, acido ascorbico $5 \cdot 10^{-3}$ mM (traccia blu) ed in presenza di tocoferolo $1, 2, 3 \cdot 10^{-3}$ mM (tracce nera, rossa e verde rispettivamente).

7.2. Tocoferolo rigenerato da acido ascorbico

Il più potente “chain-breaker” naturale attualmente noto è sicuramente il tocoferolo (Burton & Ingold, 1981; Laguerre *et al.*, 2007): esso obbedisce alla relazione (5.3) presentando, per una costante concentrazione di LH, un valore del parametro α molto più rilevante di quello di tutti gli altri inibitori analizzati (Tabella 5.1 e Figure 5.3a-b).

Come evidenziato in precedenza (Paragrafo 6.3.1), gli inibitori agiscono in maniera sacrificale (Karadag *et al.*, 2009), ed il loro contrasto al consumo di ossigeno vale per il solo periodo in cui sono presenti (Gunstone, 2006). La permanenza di ossigeno nel sistema, inoltre, descritta dal parametro “zero time”, è in linea di massima la stessa per tutti gli inibitori e dipende non tanto dalla loro natura, quanto dalla loro concentrazione (Paragrafo 6.4).

Da quanto sopra esposto deriva l'interrogativo sul perché il tocoferolo operi così efficacemente.

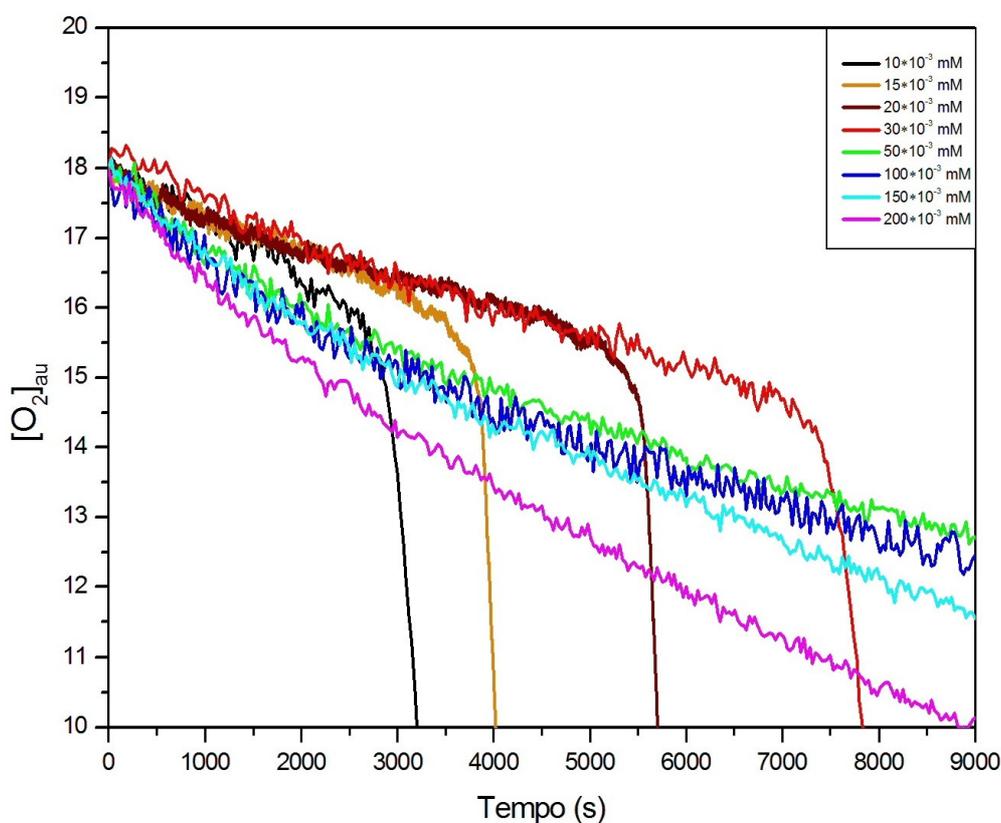
Nel processo di perossidazione lipidica, l'efficacia di un inibitore viene misurata dal suo potere di “chain-breaking”, vale a dire dal contrasto all'ossidazione di L^{\cdot} a LOO^{\cdot} ed alla successiva rigenerazione di L^{\cdot} (reazioni *b1* e *b2* nello Schema 4.1). Tale contrasto non può avvenire attraverso il mero consumo, da parte

dell'antiossidante, di ossigeno, la cui concentrazione di saturazione viene, nei sistemi biologici, immediatamente ripristinata per scambio attraverso la membrana. Il sistema ottimale vede piuttosto il mantenimento della concentrazione di saturazione di ossigeno e l'attacco sacrificale dell'antiossidante (AOH) a LOO^{\bullet} (reazione c4).

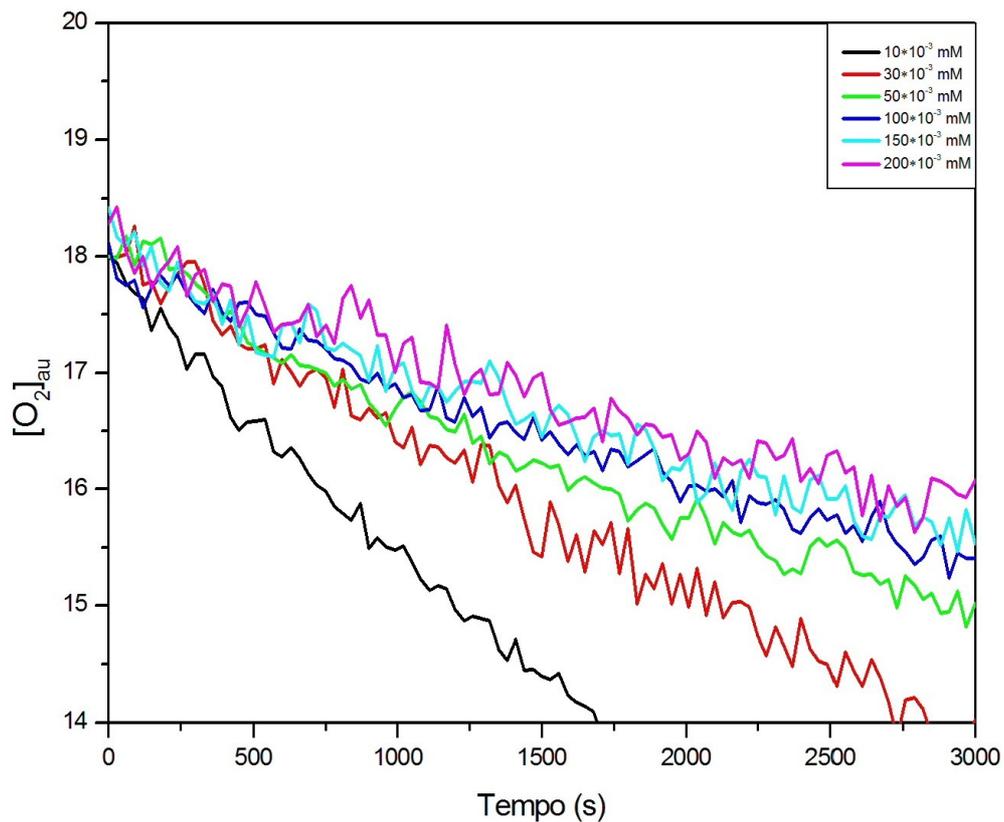
Per conservare questa situazione, non è utile una maggiore concentrazione di tocoferolo: come riportato in letteratura (Burton *et al.*, 1985; Bowry *et al.*, 1992; Bowry & Stocker, 1993; Bowry & Ingold, 1999; Bedard *et al.*, 2001), ad alte concentrazioni di tocoferolo si instaurano reazioni parassite da parte del radicale AO^{\bullet} che vedono sia il consumo diretto di ossigeno (Burton *et al.*, 1985), sia la rigenerazione del radicale L^{\bullet} e quindi il ripristino della propagazione (b) (Burton *et al.*, 1985; Bowry *et al.*, 1992; Bowry & Stocker, 1993; Bowry & Ingold, 1999; Bedard *et al.*, 2001).

Nelle seguenti Figure 7.6a-c vengono riportati gli andamenti sperimentali ottenuti per alte concentrazioni di tocoferolo, BHT e resveratrolo rispettivamente, il cui confronto permette di rilevare una importante differenza qualitativa: le velocità iniziali presentano nel caso di BHT e resveratrolo un andamento monotono, che permane, anche se attenuato, fino alle concentrazioni massime di inibitore (AOH), mentre nel caso del tocoferolo alcune tracce ossigrafiche si incrociano, rivelando un andamento non monotono.

a) Tocoferolo



b) BHT



c) Resveratrolo

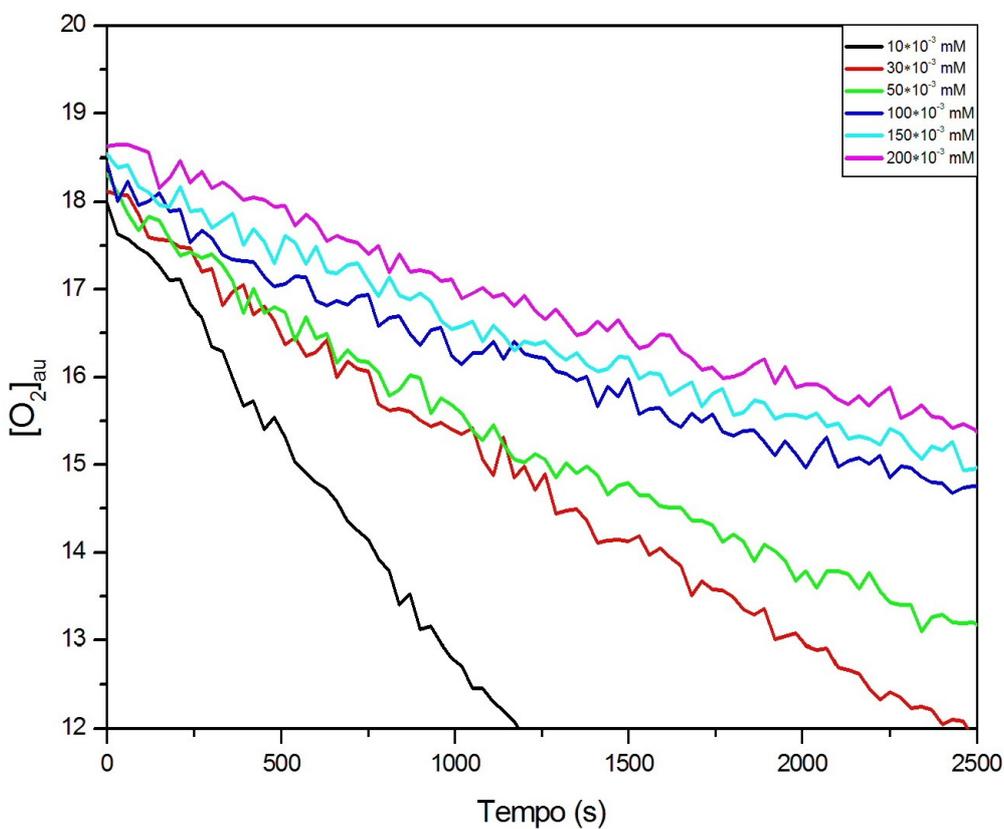


Figura 7.6a-c. Variazioni di consumo di ossigeno per concentrazioni rispettivamente di tocoferolo, BHT e resveratrolo variabili da 10 a 200×10^{-3} mM.

Questi andamenti sono rappresentati quantitativamente in Figura 7.7, dove sono diagrammati i valori ρ contro le concentrazioni [AOH], sia per basse che per alte concentrazioni di inibitore (da 0.5 a $5 \cdot 10^{-3}$ mM, quindi da $10 \cdot 10^{-3}$ a 0.2 mM).

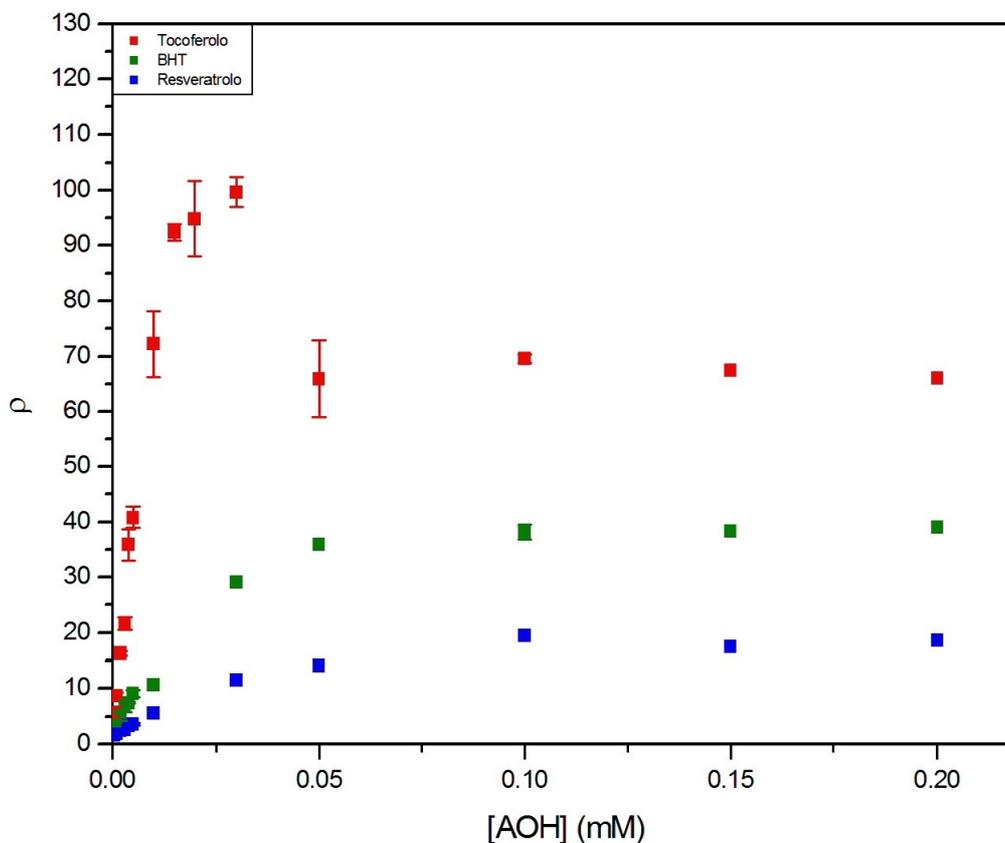


Figura 7.7. Andamento dei valori ρ in presenza degli antiossidanti tocoferolo, BHT e resveratrolo, per concentrazioni di AOH da 0.5 a $5 \cdot 10^{-3}$ mM e da $10 \cdot 10^{-3}$ a 0.2 mM.

Come illustrato in Figura 7.7, mentre BHT e resveratrolo mostrano un comportamento monotono di tipo asintotico, con incremento e quindi sostanziale stabilizzazione ad un certo valore dell'ordinata, il tocoferolo presenta un comportamento non monotono, con inversione della tendenza a partire dalla concentrazione di $30 \cdot 10^{-3}$ mM, confermando pertanto quanto proposto in letteratura (Burton *et al.*, 1985; Bowry *et al.*, 1992; Bowry & Stocker, 1993; Frankel, 1996; Kontush *et al.*, 1996; Bowry & Ingold, 1999; Bedard *et al.*, 2001; Laguerre *et al.*, 2007), ossia l'azione pro-ossidante del tocoferolo ad alte concentrazioni (Porter *et al.*, 1995; Frankel, 2005; Yildiz, 2010; Da Silveira Vargas *et al.*, 2014).

Di conseguenza risulta preferibile la riduzione (rigenerazione) del tocoferolo ossidato (esaurito) e l'acido ascorbico adempie validamente a questo compito (Niki *et al.*, 1984; Frankel, 1996; Laguerre *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2008).

Dai risultati ottenuti, l'acido ascorbico appare agire come un cattivo antiossidante nel sistema micellare modello adottato: la Tabella 5.1 e le Figure 5.3a-b mostrano come esso sia, assieme all'acido gallico, l'inibitore meno efficace. Tuttavia la sua aggiunta, in quantità variabili, a campioni in cui il tocoferolo viene mantenuto a concentrazione costante, rivela tracce ossigrafiche caratterizzate da:

- allungamento dei "lag time" e degli "zero time" (Figure 7.8 e 7.9);

- mantenimento della velocità iniziale, che resta eguale a quella misurata, per la stessa concentrazione di tocoferolo in assenza di acido ascorbico: il tocoferolo viene rigenerato e mantenuto ad una concentrazione che non può superare la concentrazione iniziale (Figura 7.10).

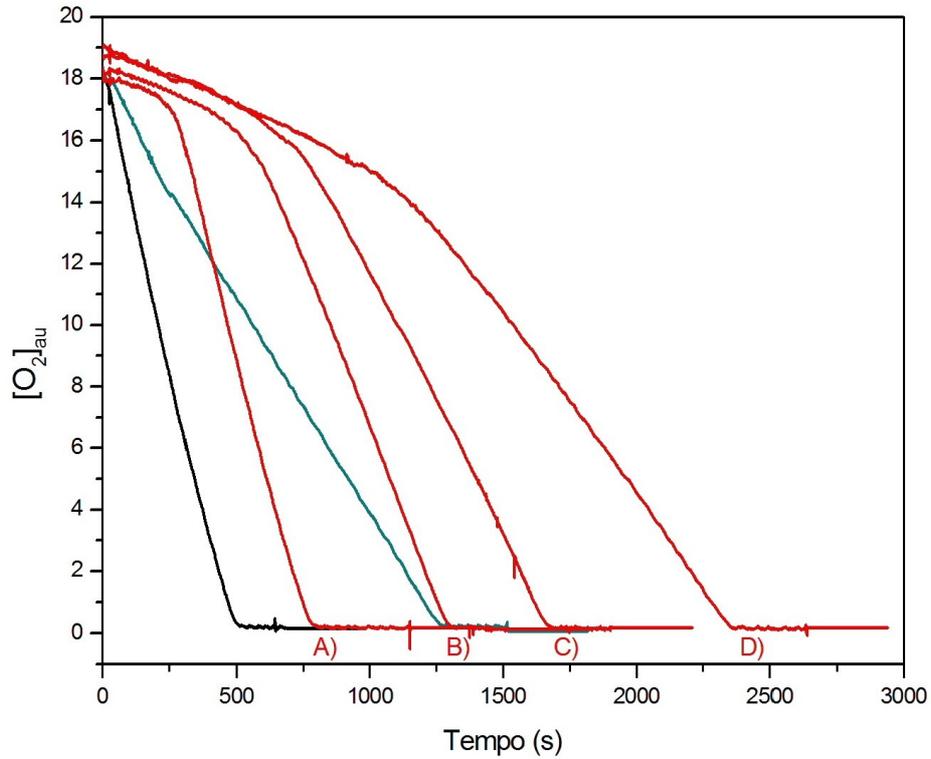


Figura 7.8. Consumo di ossigeno in presenza di ABIP 4 mM ed in assenza di tocoferolo e di acido ascorbico (traccia nera); con ABIP 4 mM e con acido ascorbico 10^{-2} mM ed in assenza di tocoferolo (traccia ciano scuro); con ABIP 4 mM e con tocoferolo 10^{-3} mM ed acido ascorbico a concentrazioni crescenti: A) 0, B) $5 \cdot 10^{-3}$, C) $10 \cdot 10^{-3}$, D) $20 \cdot 10^{-3}$ mM (tracce rosse).

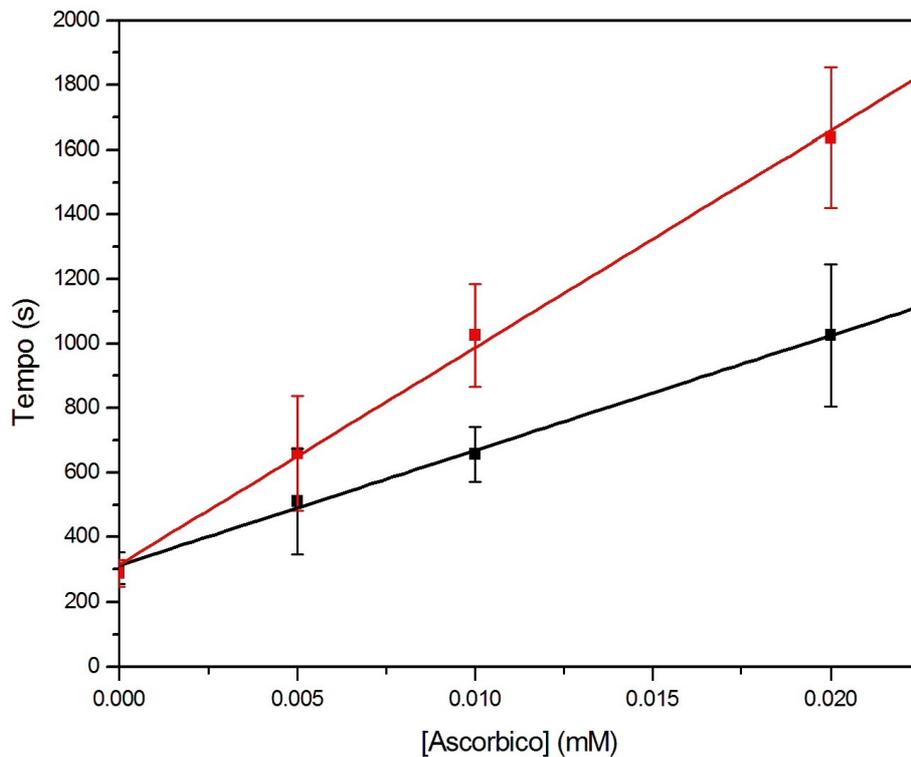


Figura 7.9. Andamento del "lag time" (linea nera) e dello "zero time" (linea rossa) del tocoferolo a concentrazioni crescenti di acido ascorbico.

Dalla Figura 7.10 risulta l'invariabilità del parametro ρ , e quindi del valore di velocità iniziale di consumo di ossigeno, pure aumentando la concentrazione di acido ascorbico nell'intervallo $0-20 \cdot 10^{-3}$ mM e ad una concentrazione di tocoferolo costante di 10^{-3} mM.

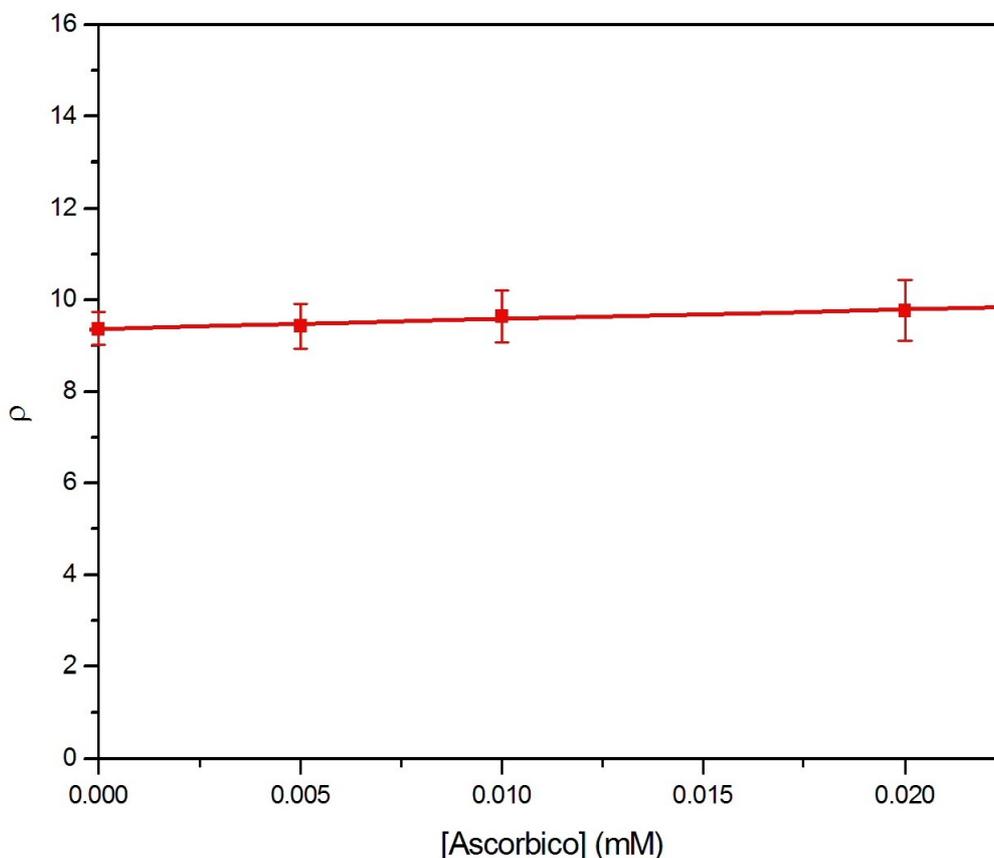
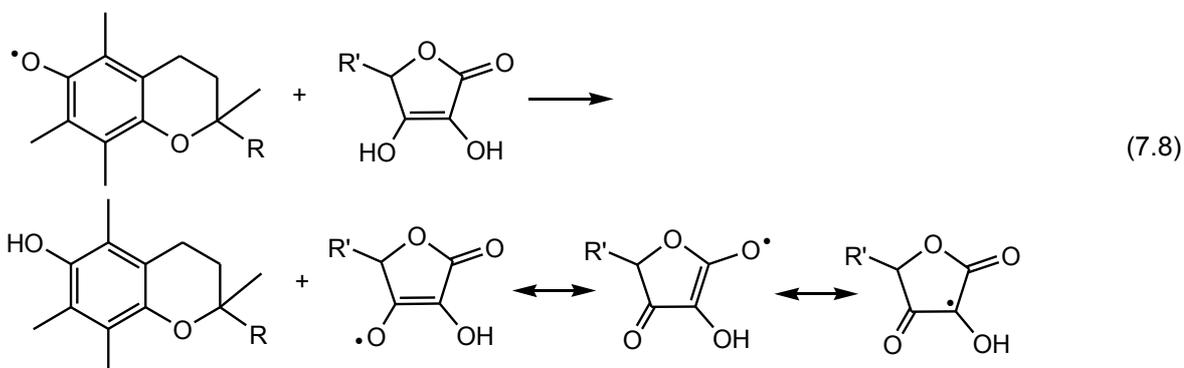


Figura 7.10. Andamento del parametro ρ $(-d[O_2]_{au}/dt)_0 / (-d[O_2]_{au}/dt)_A$ in funzione della concentrazione di acido ascorbico nell'intervallo $0-20 \cdot 10^{-3}$ mM, per una concentrazione costante di tocoferolo 10^{-3} mM. La retta viene tracciata solamente come "guida".

L'acido ascorbico svolge quindi anche un'azione di "rigenerazione" del tocoferolo: in Figura 7.5, si assiste pertanto ad un bilanciamento tra "consumo" e successivo "ripristino" del tocoferolo, che garantisce un mantenimento prolungato nel tempo della concentrazione di ossigeno all'interno della cella ossigifera.

Di seguito si riporta la possibile sequenza di reazioni a giustificazione del processo di rigenerazione:



L'intervento dell'acido ascorbico permette quindi di potenziare notevolmente la capacità antiossidante del tocoferolo. La veloce rigenerazione del tocoferolo, infatti, conferisce un significato preciso agli alti valori del

parametro α ed un vantaggio all'intero processo di inibizione: più velocemente questo inibitore viene consumato, più aumenta, per unità di tempo, il numero di cicli in cui si riforma e torna ad operare.

Il fenomeno merita senz'altro ulteriori approfondimenti, che però richiedono notevole impegno sperimentale e teorico. Non bisogna infatti dimenticare che al sistema del processo di perossidazione lipidica, già di per sé complesso e non risolvibile matematicamente, con introduzione del parametro "acido ascorbico" si aggiunge una serie di ulteriori reazioni chimiche tutt'altro che semplici e razionalizzabili nel loro insieme, di cui si dà di seguito traccia, sicuramente non esaustiva:

- 1) riduzione degli ioni metallici presenti in tracce nella soluzione ad opera dell'acido ascorbico;
- 2) gli ioni metallici così ridotti nello step 1) si riossidano a spese dell'ossigeno formando il radical-anione superossido;
- 3) il radical-anione superossido formato nello step 2) può strappare un elettrone dall'acido linoleico (LH) formando il radicale lipidico L^{*} e quindi innescando la reazione di perossidazione lipidica;
- 4) il superossido formatosi nello step 2) può ridursi a spese del tocoferolo formando acqua ossigenata;
- 5) l'acqua ossigenata può a sua volta reagire col metallo ridotto per creare il radicale ossidrilico (reazione di Fenton);
- 6) il radicale ossidrilico può innescare la reazione di perossidazione lipidica strappando un atomo di idrogeno (un elettrone ed un protone) dall'acido linoleico (LH);
- 7) il tocoferolo può bloccare il radicale perossido della perossidazione lipidica formatosi nello step 3);
- 8) l'acido ascorbico può ridurre il tocoferolo ossidato per effetto degli steps 4) e 7);
- 9) l'acqua ossigenata può ossidare l'acido ascorbico.

In conclusione, i risultati ottenuti in questo capitolo potrebbero suggerire la possibilità di studiare, almeno nel sistema micellare impiegato e con le condizioni sperimentali utilizzate, il processo di inibizione della perossidazione lipidica *in vitro*, utilizzando, per quanto riguarda sia l'iniziatore radicalico che l'inibitore, composti organici normalmente presenti in natura, in modo da riprodurre, per quanto possibile, condizioni ancora più vicine a quelle *in vivo*.

Determinazione delle proprietà antiossidanti di oli alimentari di origine vegetale

8.1. Introduzione

Le metodiche di analisi e di valutazione dei dati sperimentali elaborati nel presente lavoro di tesi sono state applicate all'analisi di campioni reali di natura alimentare, nello specifico oli di origine vegetale, con lo scopo di stimarne le proprietà antiossidanti. Si sono scelti gli oli perché rappresentano un caso problematico di determinazione delle proprietà antiossidanti a motivo della natura lipidica della matrice.

L'attenzione si è principalmente focalizzata sull'olio extravergine di oliva (OEVO), tenendo conto dell'origine delle olive (OEVO italiano, OEVO regionale o locale DOP, OEVO comunitario), della fascia di prezzo, e confrontando i risultati ottenuti con oli di semi di differente sorgente (girasole, arachide, mais, vinacciolo, canapa, semi vari).

8.2. Descrizione del campione reale

Negli ultimi anni si è assistito ad un considerevole aumento degli studi scientifici che accertano le proprietà benefiche dell'olio di oliva nell'alimentazione mediterranea: i componenti dell'olio di oliva, infatti, sembrano avere effetti protettivi sulla salute dell'uomo e di conseguenza costituiscono oggetto di ricerca per definirne il contributo nella prevenzione e riduzione delle malattie cronicodegenerative (Tuck & Hayball, 2002; Waterman & Lockwood, 2007; Frankel, 2011).

Il valore biologico e terapeutico dell'olio di oliva viene generalmente attribuito alla presenza di acidi grassi insaturi e di composti minori, quali idrocarburi, steroli, fenoli di vario tipo (Stark & Madar, 2002; Covas *et al.*, 2006): gli effetti di queste sostanze, documentati dalla letteratura scientifica, sono tali da conferire all'olio di oliva l'appellativo di "nutraceutico", o alimento funzionale, ossia a metà strada tra alimento e medicinale (Stark & Madar, 2002; Caramia, 2004).

L'olio di oliva è un grasso vegetale, liquido a temperatura ambiente, che si ricava dal frutto dell'albero di olivo, *Olea europaea* L. (Capella *et al.*, 1997; Baccouri *et al.*, 2008).

Dal punto di vista dei costituenti chimici, l'olio di oliva è formato da (Caramia, 2004):

- 98-99% da una miscela di gliceridi (esteri del glicerolo con acidi grassi), definita "frazione saponificabile";
- 1-2% da un complesso di "composti minori" che formano la "frazione insaponificabile".

I componenti della prima frazione, con qualche eccezione di ordine quantitativo, sono pressoché uguali in tutti gli oli di oliva, mentre quelli della seconda subiscono variazioni sia qualitative che quantitative molto importanti tali da comportare una netta differenziazione organolettica, nutrizionale, dietetica e merceologica (Cabras & Martelli, 2004; Caramia, 2004).

Con "frazione saponificabile" si intende la componente formata da sostanze che, se trattate con alcali concentrati, per idrolisi alcalina (reazione di saponificazione, Figura 8.1), danno origine ai saponi, cioè i sali alcalini degli acidi grassi (Cabras & Martelli, 2004).

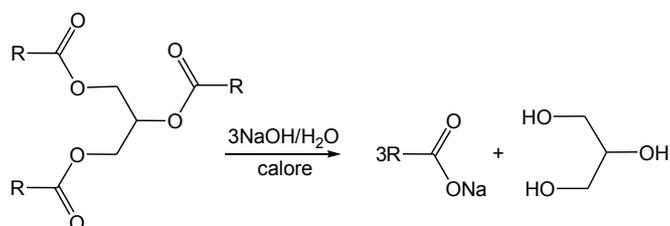


Figura 8.1. Reazione di idrolisi di un trigliceride, dove R indica una generica catena idrocarburica.

I costituenti principali della frazione saponificabile sono i trigliceridi (tre acidi grassi legati alla molecola di glicerolo, Figura 8.2), in minore percentuale sono presenti anche i digliceridi (due acidi grassi legati al glicerolo) e i monogliceridi (un solo acido grasso legato al glicerolo), pochissimi sono invece gli acidi grassi liberi, cioè non esterificati con il glicerolo, che rappresentano l'acidità dell'olio¹.

La composizione in acidi grassi varia soprattutto in base alle condizioni climatiche ed agronomiche in cui si trova l'olivo; muta, cioè, in relazione alla varietà dello stesso (cultivar), al grado di maturazione delle olive, al clima ed al periodo della raccolta (Velasco & Dobarganes, 2002; Cabras & Martelli, 2004; Hashempour *et al.*, 2010).

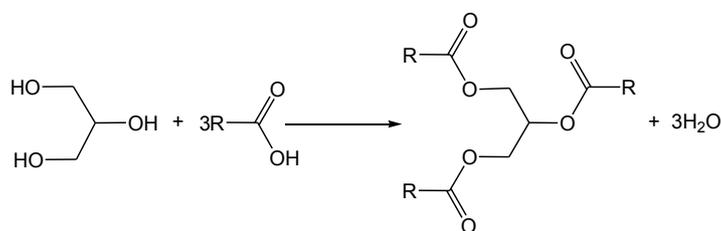


Figura 8.2. Formazione di un trigliceride mediante esterificazione del glicerolo con tre acidi grassi.

Gli esteri degli acidi grassi insaturi² (con doppi legami tra gli atomi di carbonio³ lungo le catene lineari alifatiche degli acidi carbossilici) – principalmente acido oleico, linoleico e linolenico – rappresentano una frazione maggioritaria rispetto ai saturi (senza doppi legami) – acido palmitico e stearico – (Tabella 8.1).

Tabella 8.1. Composizione principale in acidi grassi nell'olio di oliva.

Acido grasso	Nome sistematico	Simbolo	Quantità ⁴ (%)
Palmitico	<i>n</i> -esadecanoico	C16:0	7.5-20
Stearico	<i>n</i> -ottadecanoico	C18:0	0.5-5
Oleico	<i>cis</i> -9-ottadecanoico	C18:1 Δ ⁹	55-83
Linoleico	<i>cis, cis</i> -9,12-ottadecadienoico	C18:2 Δ ^{9,12}	3.5-21
Linolenico	<i>cis, cis, cis</i> -9,12,15-ottadecantrienoico	C18:3 Δ ^{9,12,15}	0-1.5

¹ Il grado di acidità è un parametro che misura gli acidi grassi liberi negli oli; viene espresso convenzionalmente in grammi di acido oleico libero in 100 grammi di olio e permette una classificazione degli oli di oliva dal punto di vista merceologico, come previsto dal Regolamento (CEE) n. 2568/91.

² Gli acidi grassi insaturi si suddividono in monoinsaturi, caratterizzati da un solo doppio legame, e in polinsaturi, contraddistinti da due o più doppi legami (Moran *et al.*, 1996; Caramia, 2004).

³ Secondo la nomenclatura IUPAC, la posizione dei doppi legami è indicata dal simbolo Δⁿ, in cui l'apice *n* indica l'atomo di carbonio con numerazione più bassa, a partire dal gruppo carbossilico, coinvolto in ogni doppio legame (Moran *et al.*, 1996).

⁴ Per le quantità si fa riferimento al *Codex Alimentarius*.

L'acido oleico, il principale tra gli acidi grassi nell'olio di oliva, presenta 18 atomi di carbonio ed un solo doppio legame (monoinsaturo) che interessa il nono atomo di carbonio (partendo dal gruppo metilico terminale) e pertanto l'acido oleico viene definito un "omega 9" (Figura 8.3) (Moran *et al.*, 1996).

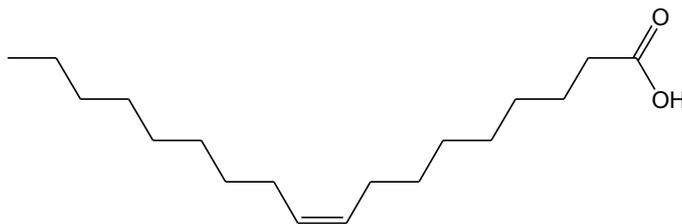


Figura 8.3. Formula di struttura dell'acido oleico.

Numerosi studi epidemiologici sottolineano il ruolo importante dell'olio di oliva nella prevenzione delle patologie cardiovascolari, soprattutto per l'alto livello di tale acido moninsaturo che mantiene bassi e riduce i livelli di colesterolo totale e di colesterolo cosiddetto "cattivo", cioè legato alle lipoproteine a bassa densità LDL ("Low Density Lipoprotein") (Stark & Madar, 2002).

L'acido linoleico è un acido grasso polinsaturo caratterizzato dall'aver due doppi legami, il primo dei quali interessa il sesto atomo di carbonio (partendo sempre dal gruppo metilico terminale) e di conseguenza l'acido linoleico è un "omega 6" (Figura 8.4).

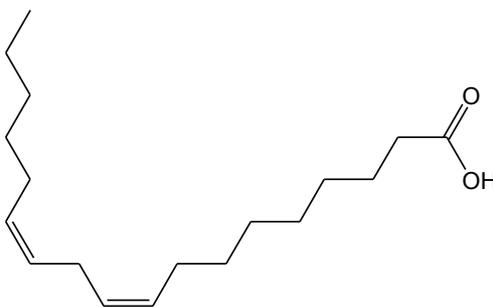


Figura 8.4. Formula di struttura dell'acido linoleico.

L'acido linolenico è un altro acido grasso polinsaturo, distinto dal precedente per i tre doppi legami nella stessa catena molecolare (Figura 8.5), il primo dei quali interessa il terzo atomo di carbonio ("omega 3"). L'acido linoleico e l'acido linolenico vengono definiti "acidi grassi essenziali" (AGE), importanti per il corretto funzionamento dell'organismo umano che non riesce a biosintetizzarli e che, di conseguenza, devono essere assunti tramite la dieta (Moran *et al.*, 1996).

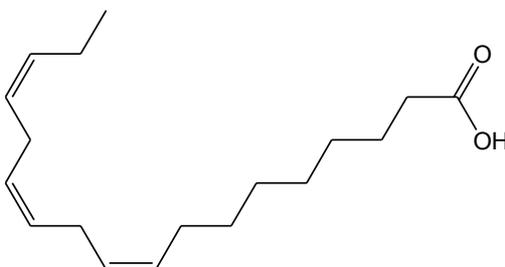


Figura 8.5. Formula di struttura dell'acido linolenico.

Gli acidi palmitico e stearico presentano rispettivamente 16 e 18 atomi di carbonio (Figure 8.6 e 8.7).

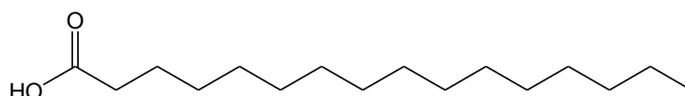


Figura 8.6. Formula di struttura dell'acido palmitico.

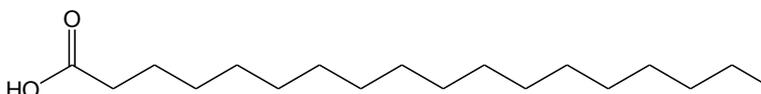


Figura 8.7. Formula di struttura dell'acido stearico.

La "frazione insaponificabile" è costituita dalle sostanze che non subiscono alcuna alterazione se sottoposte all'azione di alcali concentrati e comprende oltre 230 componenti diverse (Servili & Montedoro, 2002; Caramia, 2004). Molti fattori possono influenzare la composizione chimica di tale frazione, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo: tipo di cultivar, ambiente (suolo, clima), tecniche agronomiche (irrigazione, fertilizzazione) e di coltivazione (raccolta, maturazione), procedure di estrazione e raffinazione nonché le condizioni di stoccaggio (Visioli *et al.*, 1998; Aparicio & Luna, 2002; Bianco *et al.*, 2006; Alonso-Salces *et al.*, 2010; Tura *et al.*, 2013).

Le sostanze che compongono la frazione insaponificabile sono caratterizzate da proprietà antiossidanti ed anti-infiammatorie (Covas *et al.*, 2006) e sono principalmente rappresentate da (Owen *et al.*, 2000a):

- alcoli alifatici e triterpenici (Covas *et al.*, 2006; Sakouhi *et al.*, 2010);
- steroli, la cui analisi contribuisce a identificare la varietà di olive utilizzata per estrarre l'olio (Perona *et al.*, 2006), ed in particolare fitosteroli, tra i quali il più importante è il β -sitosterolo (Sakouhi *et al.*, 2010) che limita l'assorbimento del colesterolo a livello intestinale (Mattson *et al.*, 1982);
- idrocarburi, costituiti prevalentemente dallo squalene, precursore nella sintesi del colesterolo e degli ormoni steroidei (Covas *et al.*, 2006); studi scientifici inoltre evidenziano l'attività inibitoria dello squalene sulle cellule tumorali (Newmark, 1997);
- componenti volatili (Aparicio & Luna, 2002);
- componenti colorati, quali clorofille e carotenoidi, che conferiscono all'olio di oliva la caratteristica colorazione giallo-verde (le clorofille, in particolare, determinano il colore verde mentre i carotenoidi quello giallo) (Gandul-Rojas *et al.*, 2000; Schoefs, 2002; Giuffrida *et al.*, 2007);
- composti fenolici (fenoli lipofili e idrofili): mentre i fenoli lipofili, maggiormente rappresentati dai tocoferoli ed in particolare α -tocoferolo, presentano la caratteristica di trovarsi sia nell'olio d'oliva che in tutti gli altri oli di origine vegetale, alcuni fenoli idrofili sono propriamente tipici dell'olio di oliva (Servili & Montedoro, 2002). I fenoli idrofili si dividono principalmente in acidi fenolici, alcoli fenolici, flavonoidi e secoiridoidi (Servili & Montedoro, 2002; Covas *et al.*, 2006). Tali composti fenolici svolgono un'attività di tipo antiossidante, prevenendo ed inibendo le reazioni di ossidazione lipidica e proteggendo quindi l'olio di oliva dalle alterazioni (il cosiddetto irrancidimento) (Psomiadou & Tsimidou, 2002). Numerosi studi scientifici (*in vivo* e *in vitro*) riconoscono, inoltre, il ruolo importante dei composti fenolici contenuti nell'olio di oliva nella prevenzione e riduzione di molte malattie cronico-degenerative come quelle cardiovascolari e il cancro (Servili *et al.*, 2009).

8.3. Applicazione del modello cinetico al campione reale

Diversi sistemi di indagine sono stati proposti ed utilizzati in letteratura per la determinazione del potere antiossidante offerto dal complesso di inibitori presenti nelle varie tipologie di oli di oliva (Garcia *et al.*, 2006; Bendini *et al.*, 2007; Frankel, 2010).

Generalmente tali procedure non vengono direttamente condotte sul campione di olio tal quale ma sulla frazione insaponificabile ottenuta mediante tecniche di separazione ed arricchimento (Montedoro *et al.*, 1992; Ryan & Robards, 1998; Owen *et al.*, 2000b; Kiritsakis *et al.*, 2002; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005; El Riachy *et al.*, 2011; Sarolic *et al.*, 2015), dato che nella maggior parte delle metodiche analitiche di misura delle proprietà antiossidanti, ad esempio in quelle spettrofotometriche più comuni, per via dei rapporti ponderali, i segnali che sono riferimento delle specie antiossidanti risultano ampiamente alterati o nascosti dai segnali dei gliceridi.

La separazione avviene per ripartizione delle specie antiossidanti fra fase idrofobica, costituita da olio generalmente dissolto in esano, e fase idrofila, costituita da metanolo o da miscela acqua/metanolo (Gutfinger, 1981; Owen *et al.*, 2000b; Baiano *et al.*, 2009; Fuentes *et al.*, 2012; Jerman Klen & Mozetic Vodopivec, 2012); chiaramente sono separabili i soli antiossidanti di natura idrofila, che devono venire caratterizzati anche quantitativamente, e dei quali occorrerebbe conoscere i singoli valori di potenzialità inibente (Owen *et al.*, 2000b; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005).

La metodica basata sulla determinazione della traccia ossigrafica in assenza ed in presenza di antiossidante, descritta in questo lavoro di tesi, rappresenta una tecnica trasparente alla matrice oleosa, e pertanto potenzialmente applicabile alla determinazione in campioni oleosi tal quali.

Nel caso specifico, la relazione (5.3) può venire facilmente estesa a situazioni, come quelle presenti nei campioni di olio tal quale, in cui la natura e le concentrazioni degli antiossidanti non sono conosciute e quindi su matrici reali che contengono diversi antiossidanti a concentrazioni differenti.

Si esplicita [AOH] come "moli (n)/volume (V)" della cella (2.3 mL):

$$\rho = \frac{-(d[O_2]_{au}/dt)_0}{-(d[O_2]_{au}/dt)_A} = 1 + \frac{k_A}{k_0[LH]} [AOH] = 1 + \frac{k_A}{k_0[LH]V} n$$

ove con $n = \sum_i [AOH_i]v$, espresso in moli, vengono indicate le moli totali degli antiossidanti (AOH_i) inseriti nella cella ossigrafica con il volume (v) in mL di estratto o di olio tal quale.

L'equazione può essere quindi scritta come:

$$\rho = \frac{-(d[O_2]_{au}/dt)_0}{-(d[O_2]_{au}/dt)_A} = 1 + \frac{k_A}{k_0[LH]V} n = 1 + \frac{k_A}{k_0} \frac{\sum_i [AOH_i]}{[LH]V} v = 1 + \beta v \quad (8.1)$$

dove

$$\beta = \frac{k_A}{k_0} \frac{\sum_i [AOH_i]}{[LH]V}$$

In questa espressione il parametro β ha dimensioni di "volume⁻¹".

La stessa equazione (8.1) può venire applicata ai campioni di estratto dei fenoli idrofili, misurando, attraverso il valore di β , il potere complessivo di inibizione della miscela di antiossidanti idrofili, senza la necessità di

determinarne la natura e le concentrazioni. In effetti, negli estratti gli antiossidanti sono presenti in soluzione acqua/metanolo o metanolo, e l'introduzione di queste matrici nella cella ossigrafica, dove il sistema chimico di misura è parimenti presente principalmente in soluzione acquosa, non presenta alcuna difficoltà. Molto meno agevole risulta la misura dei campioni oleosi tal quali, essendo la loro matrice e la matrice acquosa della cella mutuamente insolubili.

8.4. Misura del potere di inibizione degli antiossidanti negli estratti di olio

In collaborazione con il gruppo di ricerca diretto dalla Prof.ssa Mozetic Vodopivec presso la "School for Viticulture and Enology & Wine Research Centre" dell'Università di Nova Gorica, viene verificata la possibilità di applicare il metodo descritto precedentemente e la relazione (8.1) allo studio degli oli di oliva.

Gli scopi sono molteplici: i) verificare la possibilità di stabilire un protocollo univoco per la determinazione degli antiossidanti nelle matrici oleose; ii) comprenderne la funzione protettiva nella conservazione dell'alimento; iii) individuarne l'azione nutraceutica per la salute umana.

Un requisito importante per questa indagine è la certezza che tutti i fenoli presenti nell'olio vengano estratti per poter successivamente procedere alla determinazione della loro capacità antiossidante in fase acquosa. Durante il periodo di stage presso il gruppo di ricerca della Prof.ssa Mozetic Vodopivec si sono confrontate pertanto la metodica di estrazione riportata in letteratura, denominata in questo lavoro metodica di estrazione 1), utilizzata per alcune prove preliminari, e la metodica sviluppata dal gruppo di ricerca di Nova Gorica, denominata metodica di estrazione 2).

Nella metodica di estrazione 1), 2.5 g di olio vengono sciolti in 5 mL di *n*-esano; la componente fenolica viene quindi estratta con una miscela metanolo/acqua (60:40, vol/vol) con agitazione mediante vortex (3 mL *2), le fasi separate per centrifugazione (3500 rpm per 10 minuti) e gli estratti metanolici così ottenuti conservati a -18 °C fino all'analisi (Fuentes *et al.*, 2012). A titolo di confronto, nel caso dell'olio 36⁵ è stata eseguita una seconda estrazione con un numero diverso di passaggi (1 mL *6): il risultato (ossia il valore della pendenza β) non varia, come riportato più avanti.

Nella metodica di estrazione 2) sviluppata a Nova Gorica, 10 g di olio vengono sciolti in 10 mL di *n*-esano, il tutto sonicato (3*10 minuti) con metanolo puro (5 mL), le fasi separate per centrifugazione (9000 rpm, 3 minuti), gli estratti metanolici uniti e successivamente "sgrassati" a freddo (20 minuti, -80 °C) con solidificazione della parte lipidica, portati a volume (25 mL) con metanolo e conservati a -25 °C fino all'analisi (Jerman Klen & Mozetic Vodopivec, 2012).

In entrambe le estrazioni, il campione da analizzare risulta sciolto in metanolo. Al fine di verificare l'eventuale influenza di questo solvente sul sistema SDS/LH e quindi sulla risposta del segnale ossigrafico, si sono effettuate delle prove in bianco del processo di perossidazione lipidica, in assenza (traccia di colore rosso) ed in presenza (traccia nera) di metanolo. Dal confronto delle tracce ossigrafiche (Figura 8.8), si osserva come la presenza di metanolo, alle condizioni sperimentali adottate, non modifichi sostanzialmente la velocità di scomparsa dell'ossigeno.

⁵ Qui, e nel prosieguo del lavoro, ad ogni numero è associato un preciso campione di olio (si veda Tabella 2.1).

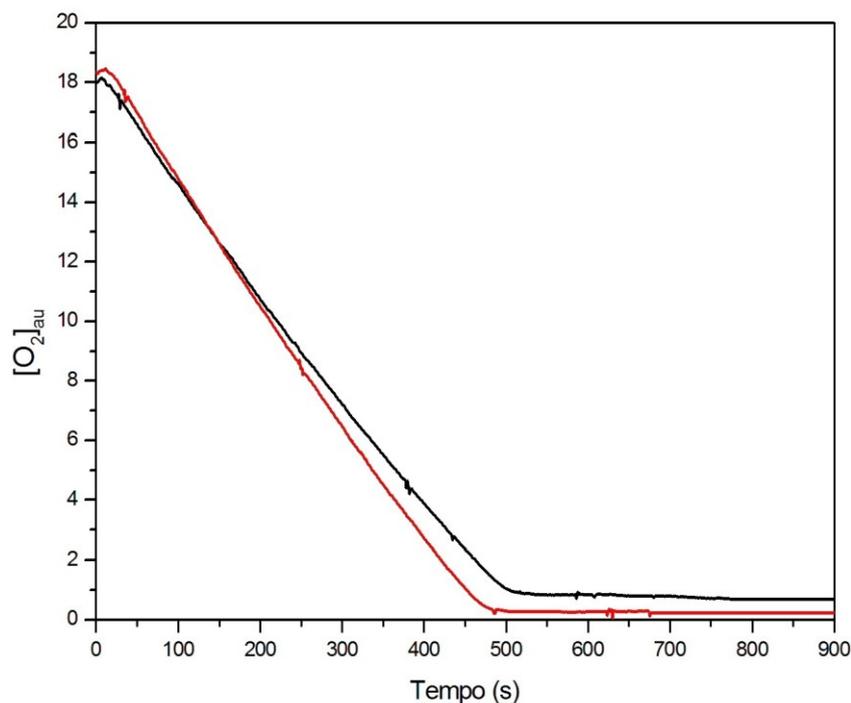


Figura 8.8. Valutazione dell'effetto del solvente metanolo sul sistema SDS/LH utilizzato nelle misure sperimentali. Il grafico illustra il consumo di ossigeno nel tempo in assenza (traccia rossa) ed in presenza (traccia nera) di metanolo.

Come precedentemente accennato, si sono quindi effettuate ripetute misurazioni su distinti estratti del campione di olio 36, ottenuti variando il numero di estrazioni (da due a sei passaggi), secondo la procedura di estrazione 1) sopra descritta (Figura 8.9). Anche in questo caso non si osservano differenze degne di nota, concludendo così che le due tecniche di estrazione siano parimenti efficaci.

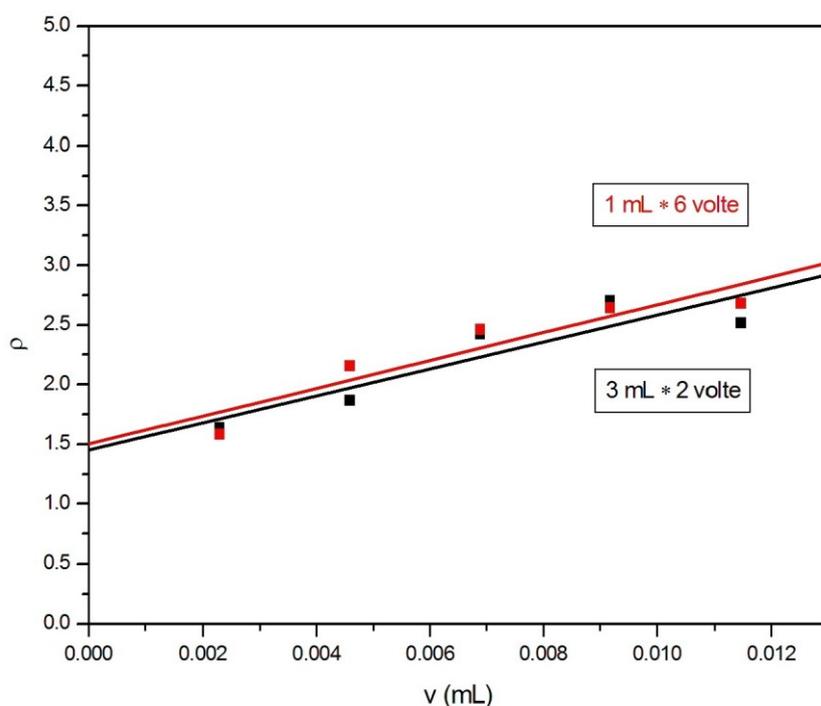


Figura 8.9. Confronto dei risultati ottenuti variando il numero di estrazioni (da due a sei passaggi). Il grafico riporta il rapporto p delle velocità di consumo di ossigeno nei due casi a differenti volumi di estratto polifenolico. I valori sull'asse delle ascisse sono normalizzati secondo il fattore di diluizione ottenuto considerando il volume di olio ed il volume complessivo dell'estratto finale. L'olio utilizzato per il presente esperimento è il campione numero 36.

Si riportano nella Tabella 8.2 e nella Figura 8.10 i risultati di inibizione della perossidazione lipidica degli estratti fenolici, ottenuti attraverso le due diverse modalità di estrazione 1) e 2) precedentemente illustrate, di una serie di oli di oliva (extravergine e raffinato).

I campioni analizzati presentano valori di inibizione della perossidazione lipidica, ossia di pendenza β , secondo l'equazione (8.1), compresi tra 17 e 220 mL⁻¹ (Tabella 8.2).

Come si può osservare dalla Figura 8.10, l'andamento dei dati sperimentali rispetta l'equazione (8.1): i valori di p correlano linearmente con le aggiunte in mL degli estratti, le pendenze β , con dimensioni mL⁻¹, forniscono una scala per i valori di inibizione degli stessi, mentre le intercette, attorno al valore 1, danno una misura della valenza dei dati sperimentali.

Tabella 8.2. Valori di pendenza β , equazione (8.1), e relative deviazioni standard, degli estratti ottenuti con i due diversi metodi di estrazione 1) e 2). OEVO: olio extravergine di oliva.

Campione	Olio e metodica di estrazione	Abbreviazione	β (mL ⁻¹)
23	OEVO DOP metodica di estrazione 1)	23_1)	190±10
23	OEVO DOP metodica di estrazione 2)	23_2)	220±15
25	OEVO DOP metodica di estrazione 1)	25_1)	73±9
25	OEVO DOP metodica di estrazione 2)	25_2)	78±9
32	Olio di oliva raffinato metodica di estrazione 1)	32_1)	17±2
32	Olio di oliva raffinato metodica di estrazione 2)	32_2)	22±5

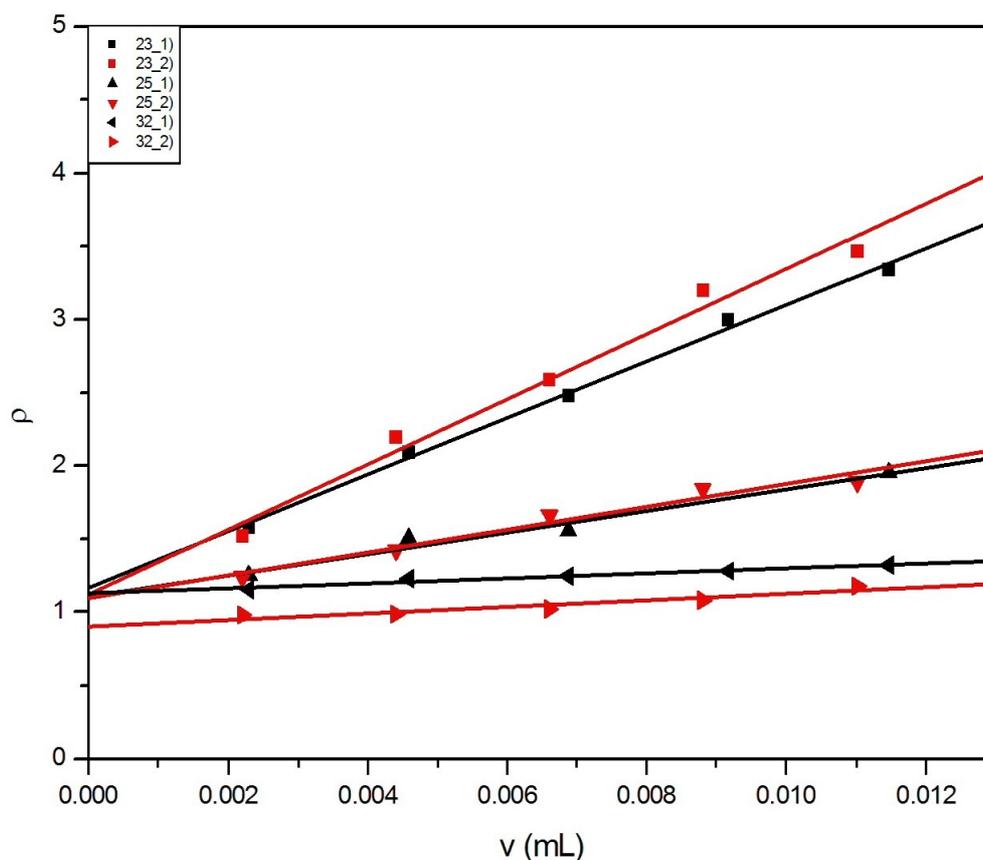


Figura 8.10. Misure di capacità inibente degli estratti, isolati con le due diverse tecniche 1) e 2), condotte su diversi campioni di olio. Per il collegamento fra numero del campione e tipo di olio vedasi Tabelle 2.1 e 8.2.

Il confronto fra gli estratti inoltre permette le seguenti conclusioni:

- le due differenti modalità di estrazione 1) e 2) si equivalgono ai fini della determinazione ossigrafica delle proprietà antiossidanti di matrici complesse;
- il metodo di valutazione messo a punto permette una distinzione netta ed accurata fra gli estratti di oli di diversa origine.

8.5. Misura del potere di inibizione degli antiossidanti nei campioni tal quali

Come già rilevato, le modalità dei processi di estrazione, qui applicate come altre riportate in letteratura (Aparicio *et al.*, 1999; Pirisi *et al.*, 2000; Cabrini *et al.*, 2001; Ninfali *et al.*, 2001; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005; Cecchi *et al.*, 2013; Tura *et al.*, 2013), permettono di valutare solo la miscela di antiossidanti di natura idrofila presente nell'estratto, mentre rimane non valutabile la miscela di antiossidanti di natura lipofila, che restano confinati nella matrice oleosa.

Per tale motivo si è voluto verificare la possibilità di determinare il potere inibente della matrice non alterata di antiossidanti di vari oli di oliva, ed eventualmente di altri oli vegetali, mediante l'applicazione di questo metodo di analisi su campioni tal quali, evitando quindi il selettivo metodo di estrazione.

Per effetto dell'alto grado di viscosità, le misure dei volumi (v) in mL degli oli tal quali, da aggiungere alla cella ossigrafica, sono soggette a rilevanti errori; si preferisce pertanto ricorrere a pesate, nell'ordine di mg, convertite in volume in base alla relazione:

$$\text{volume (mL)} = \frac{\text{peso (g)}}{\text{densità (g/mL)}}$$

Le relative densità sono state misurate 3 volte, in 3 diversi matracci, a 25 ± 1 °C e le medie riportate in Tabella 2.1.

La ricerca di un criterio affidabile di analisi di campioni tal quali ha richiesto però l'elaborazione di una complessa procedura.

In un primo tentativo, di cui si riporta un esempio in Figura 8.11, volumi crescenti di olio tal quale sono stati semplicemente aggiunti alla soluzione SDS/LH all'interno della cella ossigrafica. Nonostante i volumi estremamente piccoli di olio, il sistema non risulta omogeneo: la fase acqua/SDS e oleosa formano due fasi visivamente separate, con la fase oleosa che tende a raccogliersi nella parte superiore del reattore, e quindi con risultati casuali e non riproducibili.

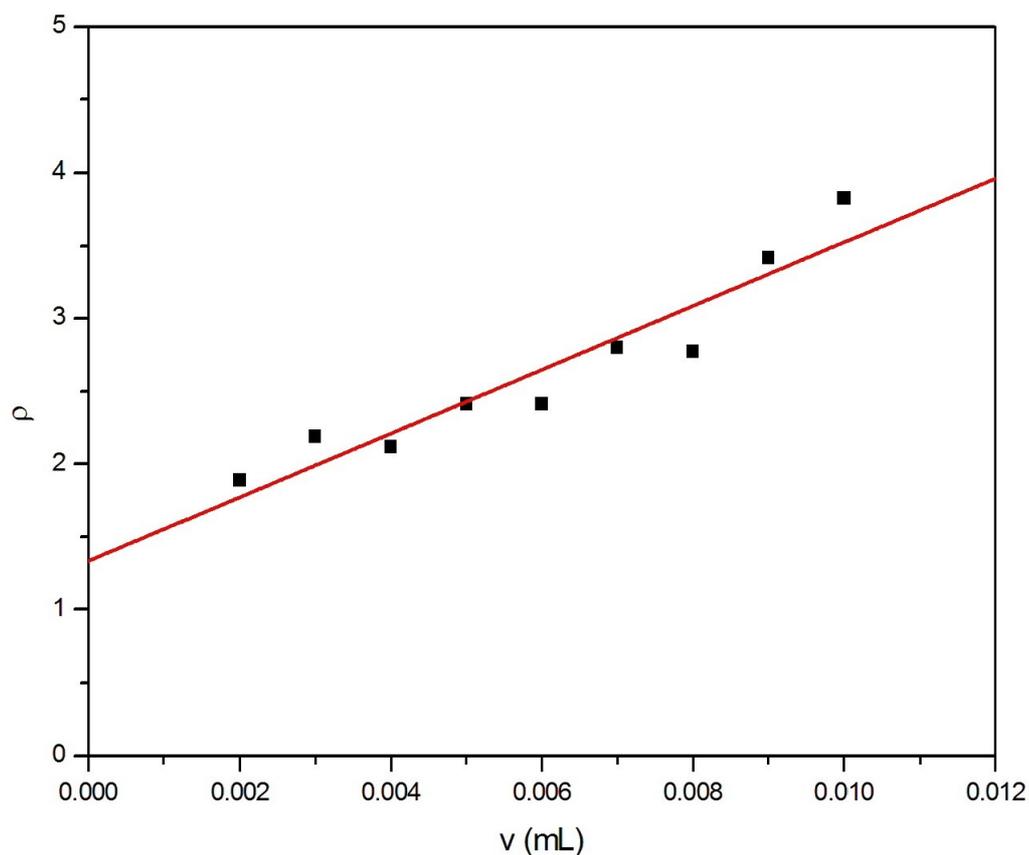


Figura 8.11. Valori di ρ in funzione di volumi crescenti di olio 23 tal quale (non previamente soggetto a processi di estrazione).

Benché i dati presentino un qualche andamento lineare, con intercetta non lontana dal valore 1, si ritiene questa pratica sostanzialmente non affidabile.

Risultati decisamente migliori sono ottenuti quando la miscela di acqua/SDS e volume desiderato di olio viene sottoposta, prima dell'introduzione nella cella di reazione, ad un processo di sonicazione, di durata variabile, che provoca la formazione di un'emulsione, che può persistere per alcuni giorni.

Tale miscela sonicata viene introdotta senza problemi nella cella di misura, secondo la consueta procedura; viene aggiunto l'iniziatore radicalico, il sistema sigillato dall'atmosfera e si procede infine alla misura del consumo di ossigeno.

Tuttavia tale procedura risulta affidabile solo in via approssimativa, come fra breve dimostrato.

Preventivamente a queste misure, sono stati eseguiti dei bianchi, di cui si riporta un esempio in Figura 8.12, per escludere, come effettivamente poi verificato, che la sonicazione, per il tempo necessario a creare l'emulsione, modifichi il sistema micellare utilizzato.

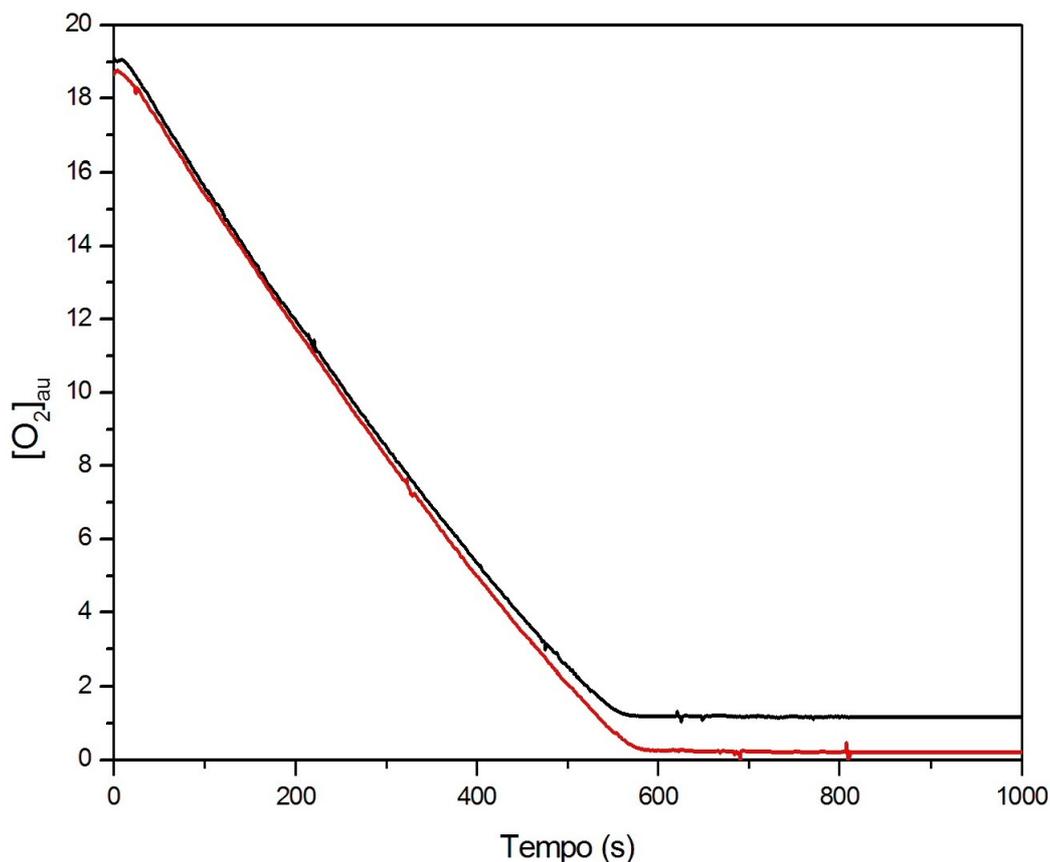
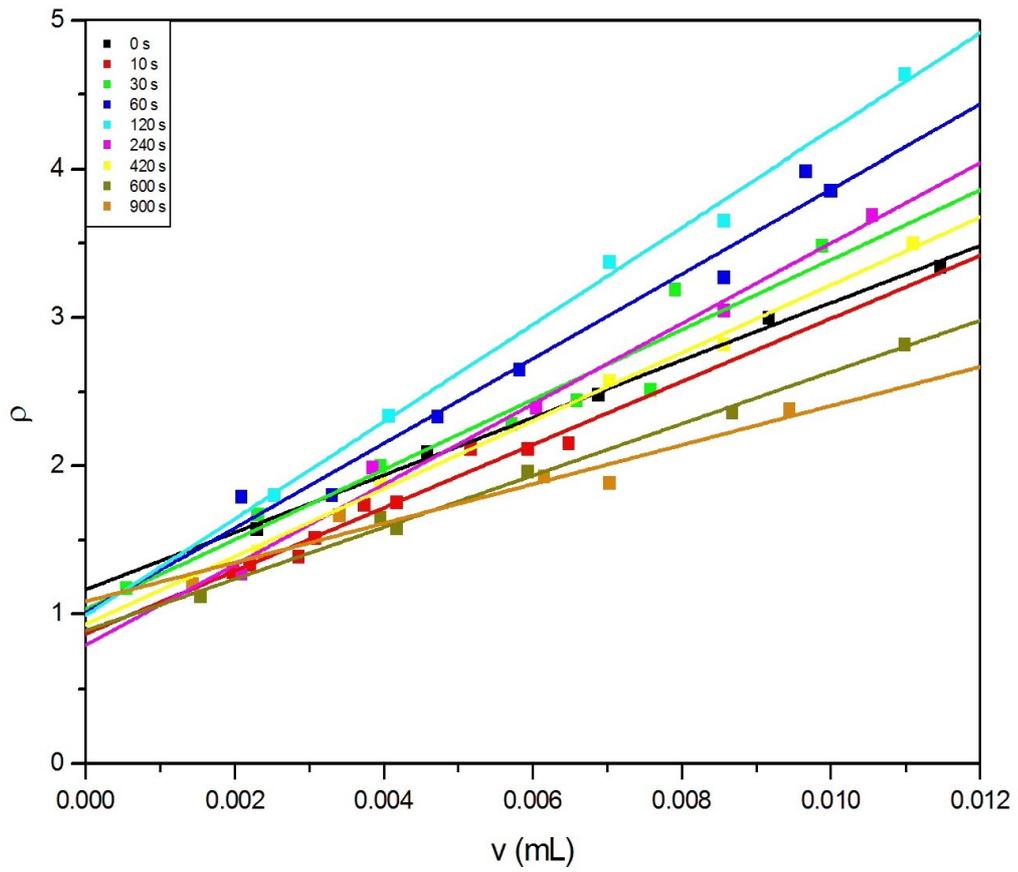


Figura 8.12. Effetto della sonicazione (in nero) sul sistema micellare di misura ossigrafica del consumo di ossigeno.

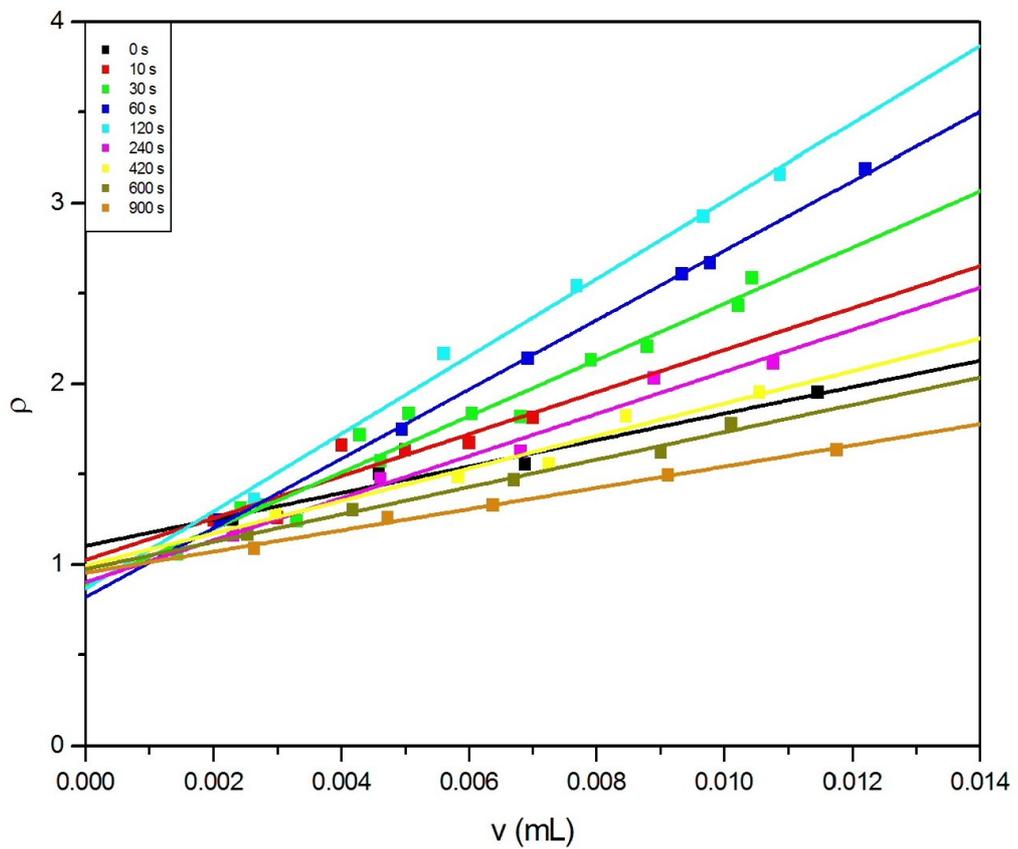
Successivamente sono state effettuate misure su due campioni di olio di oliva, 23 e 25, e, per confronto, anche su un campione di olio di semi, 37, in cui le due fasi costituite dal volume scelto di acqua/SDS e quello di olio vengono previamente sonicate per tempi di sonicazione (ST) fino a 900 secondi. Il volume scelto di olio viene introdotto tal quale, non diluito in *n*-esano, e pertanto il fattore di diluizione è pari a 1.

Campioni con rapporti diversi fra volumi di olio (fra 0.5 e $12 \cdot 10^{-3}$ mL) e volume di acqua/SDS (2.3 mL) sono stati sonicati per lo stesso tempo di sonicazione (ST) e sottoposti a misura. Per ogni serie di campioni con lo stesso ST, si osserva il pieno rispetto dell'equazione (8.1), con andamento lineare fra p e volumi di olio e determinazione precisa della pendenza β (Figure 8.13a-c). Si sono aggiunti i valori trovati per gli estratti con la metodica di estrazione 1), che possono venire riferiti ad un tempo di sonicazione (ST) pari a zero.

a) Olio 23



b) Olio 25



c) Olio 37

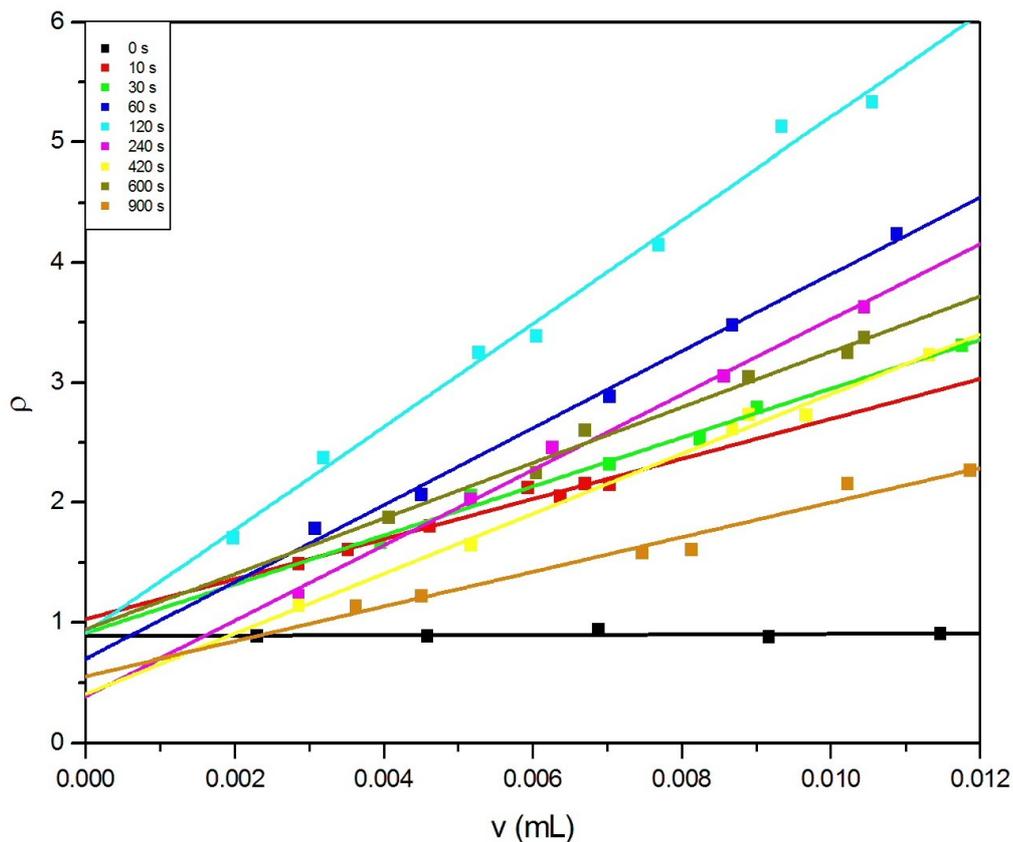


Figura 8.13a-c. Valori di ρ in funzione di volumi crescenti di oli di origine vegetale tal quali, per differenti tempi di sonicazione (ST).

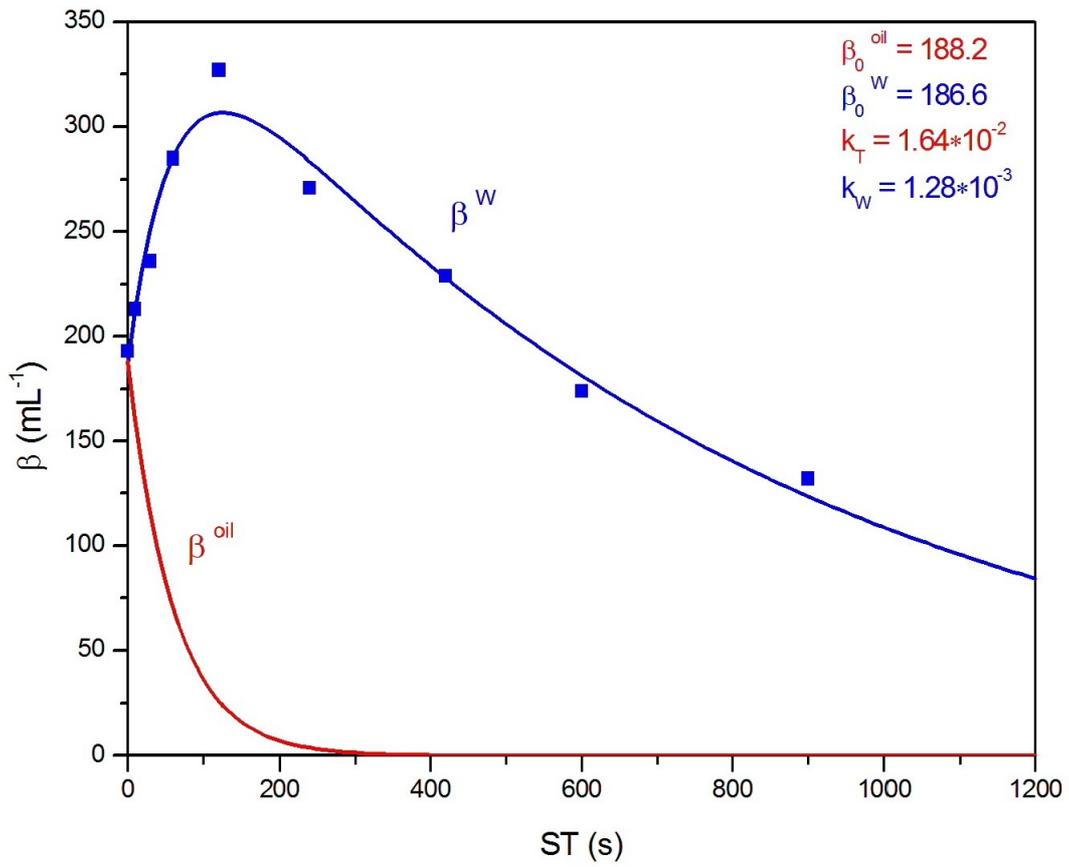
Si riportano nelle Figure 8.14a-c gli andamenti delle pendenze β in funzione del tempo di sonicazione (ST) per gli oli di oliva 23 e 25 e per l'olio di semi di girasole 37 rispettivamente.

Si sono aggiunti, anche in questo caso, i valori ottenuti dagli estratti effettuati con la metodica 1), ai quali, si ricorda, è stato assegnato il valore ST pari a zero. In Tabella 8.3 sono riportati tutti i valori di β ai differenti tempi di sonicazione (ST), con le relative deviazioni standard.

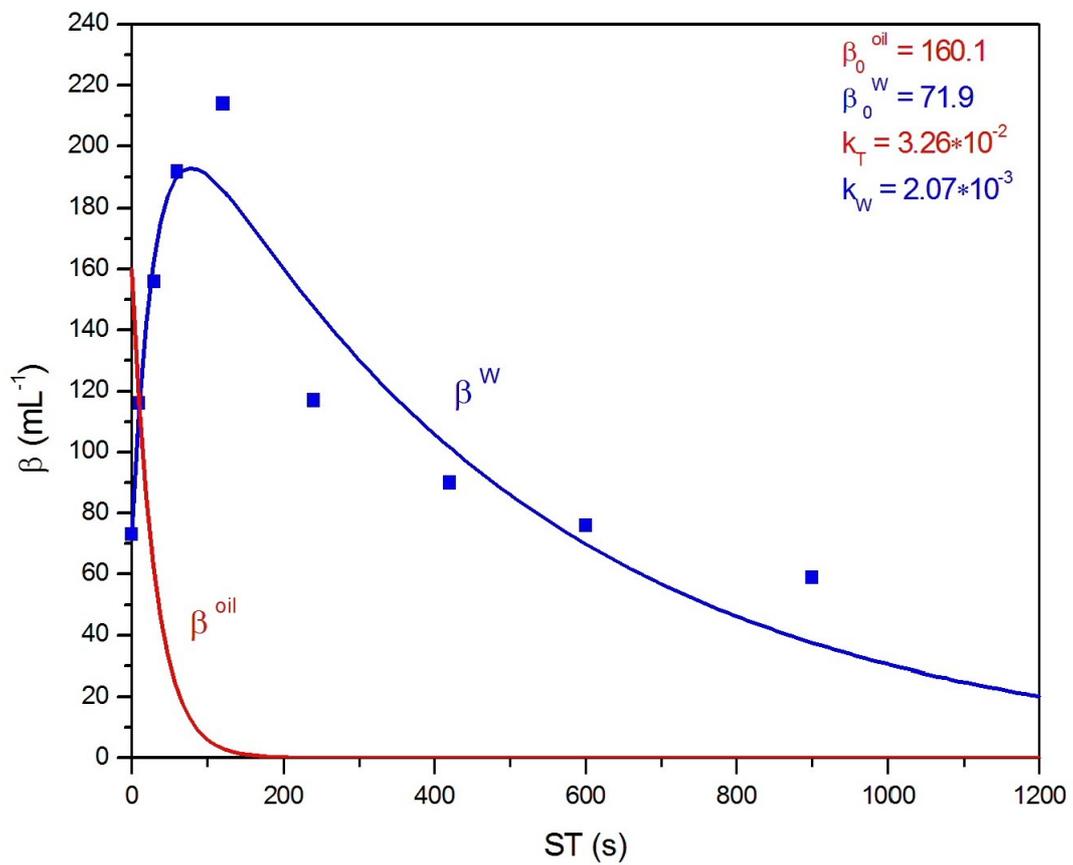
Tabella 8.3. Valori di pendenza β (mL^{-1}), e relative deviazioni standard, di diversi oli di origine vegetale per differenti tempi di sonicazione (ST). Per il collegamento fra numero del campione e tipo di olio vedasi Tabella 2.1.

Campione \ ST (s)	0	10	30	60	120	240	420	600	900
	β (mL^{-1})								
23	190±10	220±15	240±25	285±20	325±15	270±15	230±10	175±5	130±20
25	73±9	115±25	155±10	190±3	215±10	120±10	90±13	76±5	59±3
37	1±4	165±15	205±10	320±15	430±20	315±15	250±10	230±15	145±15

a) Olio 23



b) Olio 25



c) Olio 37

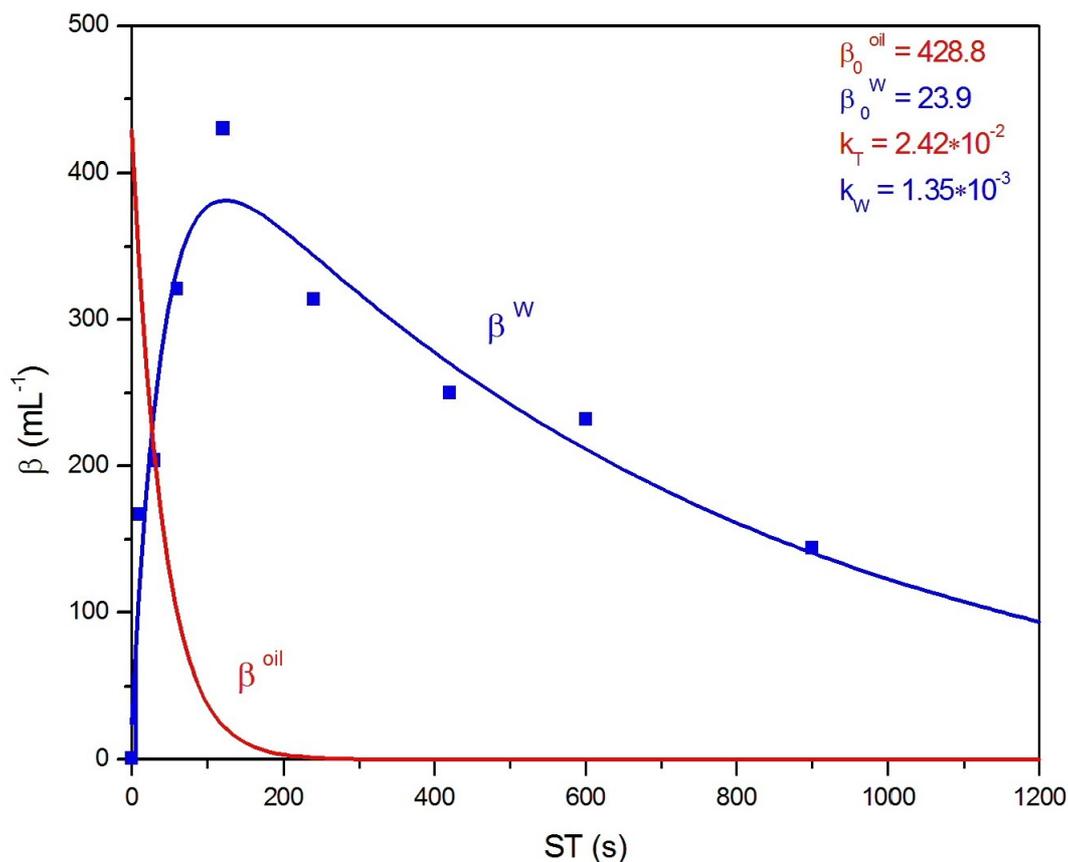


Figura 8.14a-c. Cinetica del trasferimento mediante sonicazione dalla matrice oleosa alla matrice micellare degli antiossidanti lipofili, costante k_T . Al tempo di sonicazione 0 si ha la misura degli antiossidanti idrofili trasferiti dalla matrice oleosa alla matrice acquosa al momento della preparazione del campione. La sonicazione provoca una degradazione, costante k_W , delle molecole antiossidanti idrofile e lipofile in una misura, al tempo di trasferimento totale (120 secondi), non superiore al 10% (si veda Paragrafo 8.6). Le tracce in rosso derivano dall'equazione 8.2, quelle in blu dall'equazione 8.3. Per il collegamento fra numero del campione e tipo di olio vedasi Tabella 2.1.

Dall'esame delle Figure 8.14a-c e di Tabella 8.3 si evince quanto segue:

- anche con un limitato tempo di sonicazione (ST) di 10 secondi la pendenza β (valore di inibizione) risulta superiore alla pendenza rilevata sull'estratto. La sonicazione pertanto permette il passaggio nell'ambiente di misura di parte di quegli antiossidanti (lipofili) rimasti confinati nella matrice oleosa durante il processo di estrazione. Si deve ammettere che il tempo di preparazione del campione, che precede il processo di sonicazione, sia sufficiente per il passaggio integrale degli antiossidanti idrofili alla fase acqua/SDS;
- il passaggio nelle micelle di SDS degli antiossidanti lipofili procede sostanzialmente linearmente con il tempo di sonicazione sino ad un valore massimo del parametro β per un tempo di sonicazione (ST) di 120 secondi circa;
- tempi ulteriori di sonicazione conducono ad una diminuzione della pendenza β , anche a valori inferiori a quelli rilevati in assenza di sonicazione.

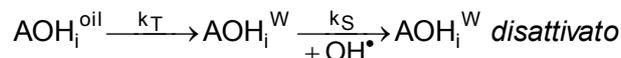
Quest'ultimo evento non è inatteso. Il trattamento di sonicazione in soluzioni acquose, infatti, genera il radicale OH^\bullet , che interagisce e disattiva gli antiossidanti che posseggono un gruppo fenolico, come già riportato in letteratura (Riesz *et al.*, 1985; Barati *et al.*, 2006; Villeneuve *et al.*, 2009; Milne *et al.*, 2013).

L'effetto e lo schema delle reazioni vengono rappresentati rispettivamente nelle Figure 8.14a-c e 8.15. L'esame di Figura 8.14c permette le seguenti ulteriori considerazioni: il valore del parametro β misurato subito dopo il mescolamento di acqua, SDS ed olio è minimo, suggerendo la mancanza di trasferimento di antiossidanti idrofili dalla matrice oleosa a quella acquosa. Questa circostanza può venire variamente spiegata, ad esempio, ammettendo l'assenza di antiossidanti idrofili nella matrice naturale (Quiles *et al.*, 2002), ma più realisticamente considerando che, trattandosi di un olio di semi, la sua produzione prevede l'estrazione con solventi e successivi processi di purificazione e rettificazione condotti anche a temperature elevate (70-80 °C) (Cabras & Martelli, 2004). Questi trattamenti possono ridurre il trasferimento, dalla matrice naturale all'estratto, delle molecole con proprietà antiossidanti o provocare la degradazione (Kostadinovic-Velickovska & Mitrev, 2013).

8.6. Studio cinetico dei processi di trasferimento e di degradazione

Nella Figura 8.15 vengono ipotizzati e descritti i meccanismi fisici e chimici di trasferimento e di degradazione degli antiossidanti presenti nelle matrici oleose. Il processo totale può venire rappresentato come il sistema di due reazioni consecutive: la prima illustra il trasferimento, con costante di velocità k_T , della miscela di antiossidanti, descritti dalla grandezza $\Sigma_i [AOH_i]^{oil}$, dalla fase olio alla fase acqua/SDS; nella seconda il radicale OH^\bullet viene generato con costante di velocità k_R per effetto del processo di sonicazione, lo stesso reagisce quindi con il sistema di antiossidanti $\Sigma_i [AOH_i]^W$, presenti in fase acqua/SDS, con costante di velocità k_S .

Tale processo può venire pertanto descritto dal seguente sistema di reazioni consecutive:



in cui l'intermedio AOH_i^W è presente in quantità iniziale non nulla. La soluzione analitica delle corrispondenti equazioni differenziali è immediata (Steinfeld *et al.*, 1989).

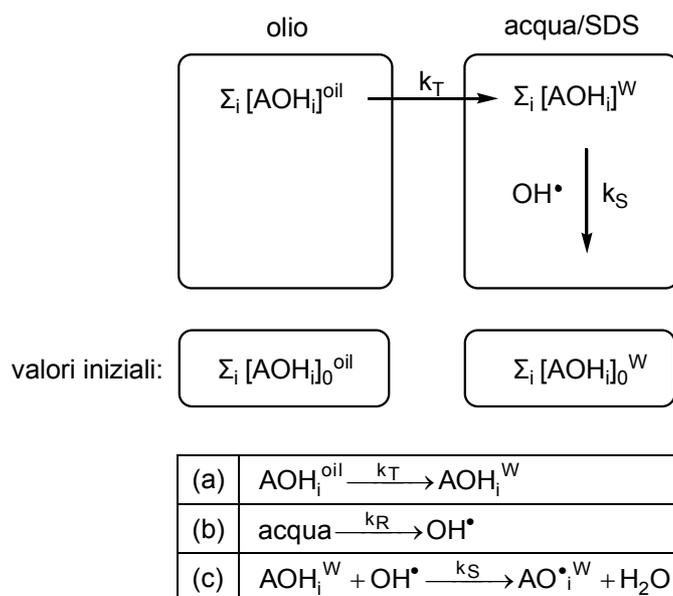


Figura 8.15. Processi fisici e chimici di trasferimento e di degradazione degli antiossidanti presenti nelle matrici oleose.

La reazione (a) è descritta dall'equazione differenziale:

$$\frac{d\Sigma_i[\text{AOH}_i]^{\text{oil}}}{dST} = -k_T \Sigma_i[\text{AOH}_i]^{\text{oil}}$$

in cui ST rappresenta il tempo di sonicazione.

L'equazione si integra come:

$$\Sigma_i[\text{AOH}_i]^{\text{oil}} = \Sigma_i[\text{AOH}_i]_0^{\text{oil}} \exp(-k_T ST) \quad (8.2)$$

La reazione (b) è descritta dall'equazione differenziale:

$$\frac{d[\text{OH}^*]}{dST} = k_R[\text{acqua}] - k_S[\text{OH}^*]\Sigma_i[\text{AOH}_i]^W$$

mentre nella descrizione della reazione (c):

$$\frac{d\Sigma_i[\text{AOH}_i]^W}{dST} = k_T \Sigma_i[\text{AOH}_i]^{\text{oil}} - k_S[\text{OH}^*]\Sigma_i[\text{AOH}_i]^W = k_T \Sigma_i[\text{AOH}_i]^{\text{oil}} - k_W \Sigma_i[\text{AOH}_i]^W$$

si può porre:

$$k_W = k_S[\text{OH}^*]$$

poiché la concentrazione del radicale ossidrilico, generato per sonicazione da una quantità in forte eccesso di acqua, e immediatamente consumato, può essere considerata costante per tutta la durata del processo.

L'introduzione dell'equazione (8.2) porta a:

$$\frac{d\Sigma_i[\text{AOH}_i]^W}{dST} + k_W \Sigma_i[\text{AOH}_i]^W = k_T \Sigma_i[\text{AOH}_i]_0^{\text{oil}} \exp(-k_T ST)$$

Questa equazione differenziale può venire risolta con metodi standard, ottenendo la dipendenza di $\Sigma_i[\text{AOH}_i]^W$ da ST:

$$\Sigma_i[\text{AOH}_i]^W = \Sigma_i[\text{AOH}_i]_0^W \exp(-k_W ST) + \Sigma_i[\text{AOH}_i]_0^{\text{oil}} \frac{k_T}{k_W - k_T} (\exp(-k_T ST) - \exp(-k_W ST)) \quad (8.3)$$

La conversione delle grandezze $\Sigma_i[\text{AOH}_i]$ in valori di pendenza β è immediata.

Nell'espressione (8.1) della pendenza β , i valori k_A , k_0 , $[\text{LH}]$ e V sono costanti per uno stesso antiossidante o per la stessa miscela di antiossidanti. Pertanto:

$$\beta = \frac{k_A}{k_0} \frac{\Sigma_i[\text{AOH}_i]^W}{[\text{LH}]V} = C \Sigma_i[\text{AOH}_i]^W$$

Moltiplicando per il coefficiente C i due membri dell'espressione (8.2):

$$C \Sigma_i[\text{AOH}_i]^{\text{oil}} = C \Sigma_i[\text{AOH}_i]_0^{\text{oil}} \exp(-k_T ST)$$

si ottiene:

$$\beta^{\text{oil}} = \beta_0^{\text{oil}} \exp(-k_T ST) \quad (8.2a)$$

Analogamente, per l'espressione (8.3):

$$C\Sigma_i[\text{AOH}_i]^W = C\Sigma_i[\text{AOH}_i]_0^W \exp(-k_W ST) + C\Sigma_i[\text{AOH}_i]_0^{\text{oil}} \frac{k_T}{k_W - k_T} (\exp(-k_T ST) - \exp(-k_W ST))$$

$$\beta^W = \beta_0^W \exp(-k_W ST) + \beta_0^{\text{oil}} \frac{k_T}{k_W - k_T} (\exp(-k_T ST) - \exp(-k_W ST)) \quad (8.3a)$$

I valori sperimentali di pendenza β presentati nelle Figure 8.14a-c sono misurati nell'ambiente acqua/SDS e sono pertanto riferibili come β^W . Essi vengono interpolati sull'equazione (8.3a) mediante la procedura di "simplex search" (Nelder & Mead, 1965). La procedura rinviene i valori dei parametri β_0^{oil} , β_0^W , k_T , k_W (parametri ottimizzati), che, per il criterio dei minimi quadrati, producono la curva di interpolazione migliore, come visivamente mostrato nelle suddette Figure 8.14a-c. I valori di questi parametri sono stati ottimizzati per interpolazione su dati sperimentali, ed è pertanto possibile condurre alcune considerazioni su di essi. Ad esempio, risulta che il trasferimento degli antiossidanti lipofili dal sistema olio al sistema acqua/SDS (costante k_T) sia circa 15 volte più veloce della degradazione della totalità degli antiossidanti (costante k_W). I valori massimi sperimentali di β^W , rilevati per un tempo di sonicazione (ST) di 120 secondi, sono da considerarsi inferiori per un fattore non più grande del 10% rispetto ai valori presunti in assenza di processo di degradazione.

Si ritiene pertanto che il valore sperimentale di β^W rilevato per un ST di 120 secondi sia sufficientemente affidabile per essere utilizzato e discusso per la serie di esperimenti, condotti su altri oli di oliva e su oli di semi, descritta nel Paragrafo 8.7.

Alcuni dei parametri ottimizzati nel processo di interpolazione dei dati sperimentali sull'equazione (8.3a), che descrive β^W , permettono la determinazione anche dell'equazione (8.2a), che descrive gli andamenti funzionali della grandezza β^{oil} , così come illustrati dalle tracce nelle Figure 8.14a-c. Questi andamenti tuttavia non sono vincolati ad alcuna misura sperimentale diretta di β^{oil} , e sono pertanto da esaminare con cautela.

Le tracce di β^{oil} suggeriscono che il complesso di antiossidanti lipofili possa venire integralmente trasferito dalla fase olio, e suggeriscono inoltre un valore di tempo di sonicazione (ST) in cui il trasferimento è completo. Entrambi i suggerimenti sono speculativi.

I valori dei poteri inibenti, β_0^W e β_0^{oil} , stimati prima dell'inizio del processo di sonicazione, hanno valenze diverse: mentre β_0^W è ancorato ad un valore sperimentale, β_0^{oil} rimane un dato speculativo. La loro somma, $\beta_0^W + \beta_0^{\text{oil}}$, non può pertanto venire presa in considerazione come indice del potere inibente del complesso di antiossidanti nel campione in esame.

8.7. Criteri per una rapida stima del potere inibente dei complessi di antiossidanti presenti in oli di oliva e di semi

Le analisi condotte nel precedente Paragrafo 8.6 individuano in 120 secondi il tempo ottimale di sonicazione per i due campioni di olio di oliva investigati, 23 e 25, e per il campione di olio di semi, 37. Si può ritenere pertanto che per questo tempo di sonicazione si abbia il massimo trasferimento degli antiossidanti lipofili dalla matrice olio alla matrice acqua/SDS, accompagnato da una degradazione dei composti fenolici ad opera del radicale OH^* ancora trascurabile (inferiore al 10%). Per questo motivo, viene stabilito di condurre le analisi su altri oli di oliva e di semi adottando sistematicamente questo tempo di sonicazione.

Viene esaminata quindi la serie di oli di oliva e di semi elencata in Tabella 8.4. I rapporti ρ in funzione dei volumi crescenti dei suddetti oli vengono riportati in Figura 8.16 ed i relativi valori di pendenza β , secondo l'equazione (8.1), sempre in Tabella 8.4.

Tabella 8.4. Valori di pendenza β , secondo l'equazione (8.1), e relative deviazioni standard per diversi oli di origine vegetale (ad ogni numero è associato un preciso campione di olio, vedasi Tabella 2.1).

Campione	Olio	β (mL ⁻¹)
23	OEVO DOP	325±15
25	OEVO DOP	215±10
30	OEVO comunitario	380±30
32	Olio di oliva raffinato	120±20
37	Olio di semi di girasole	430±20
38	Olio di semi di canapa	850±55
39	Olio di semi di canapa	300±20

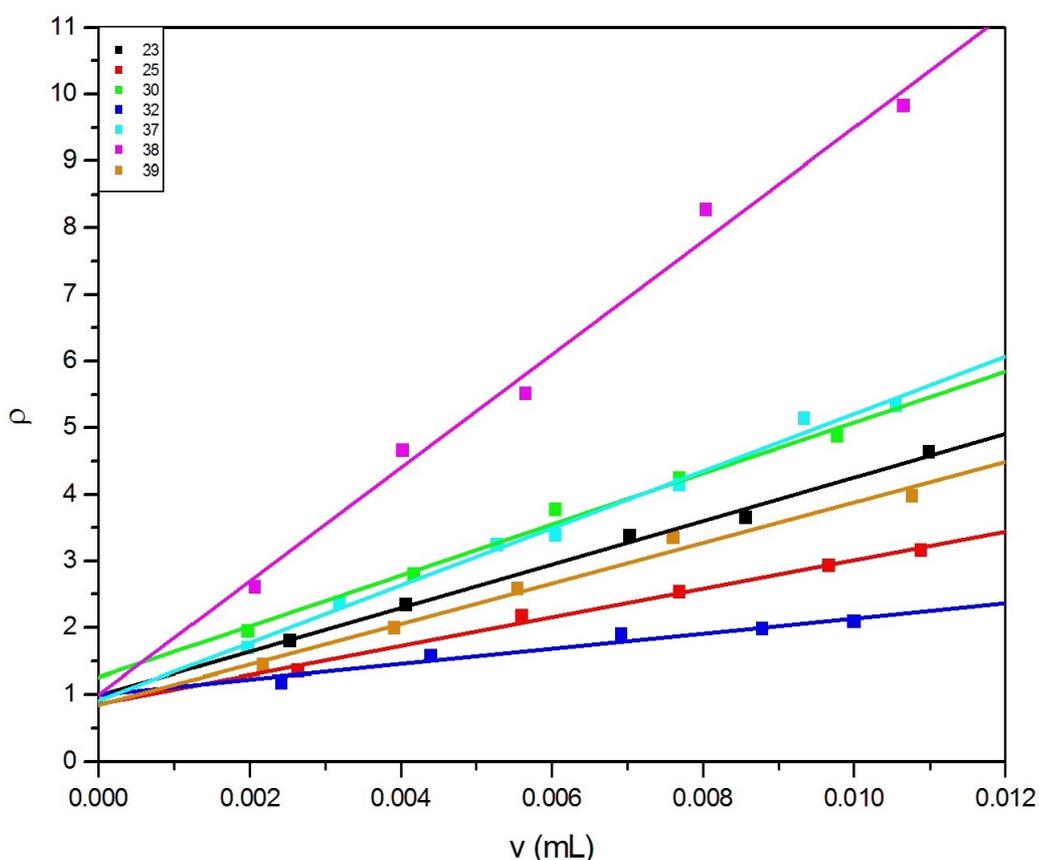


Figura 8.16. Rapporti $\rho = -(\frac{d[O_2]_{au}}{dt})_v / -(\frac{d[O_2]_{au}}{dt})_A$ in funzione di volumi crescenti di oli di origine vegetale per un tempo di sonicazione di 120 secondi. Per il collegamento fra numero del campione e tipo di olio vedasi Tabelle 2.1 e 8.4.

I risultati presentati in Tabella 8.4 e Figura 8.16 testimoniano nuovamente la convalida dell'equazione (8.1), ossia l'andamento lineare fra ρ e volumi di olio, con intercetta pari a 1, e stima della pendenza β ; la procedura proposta, inoltre, consente, anche in questo caso, una distinzione fra i differenti oli, correlabile sostanzialmente alle proprietà organolettiche diverse a conferma dell'eterogeneità fra le matrici oleose considerate.

Di conseguenza viene applicato tale metodo ad ulteriori oli di origine vegetale, sia di oliva che di semi (Tabella 2.1). Vengono preparati campioni alle seguenti condizioni, identiche per tutti: sonicazione per 120

secondi di un amalgama costituito da 2.3 mL di acqua/SDS/LH (alle usuali concentrazioni) e $11 \cdot 10^{-3}$ mL di olio (misurati per pesata e convertiti in volume attraverso i valori di densità riportati in Tabella 2.1).

Gli andamenti di consumo di ossigeno sono mostrati in Figura 8.17. I valori di p e di ZT_{Δ} sono riportati in Tabella 8.5.

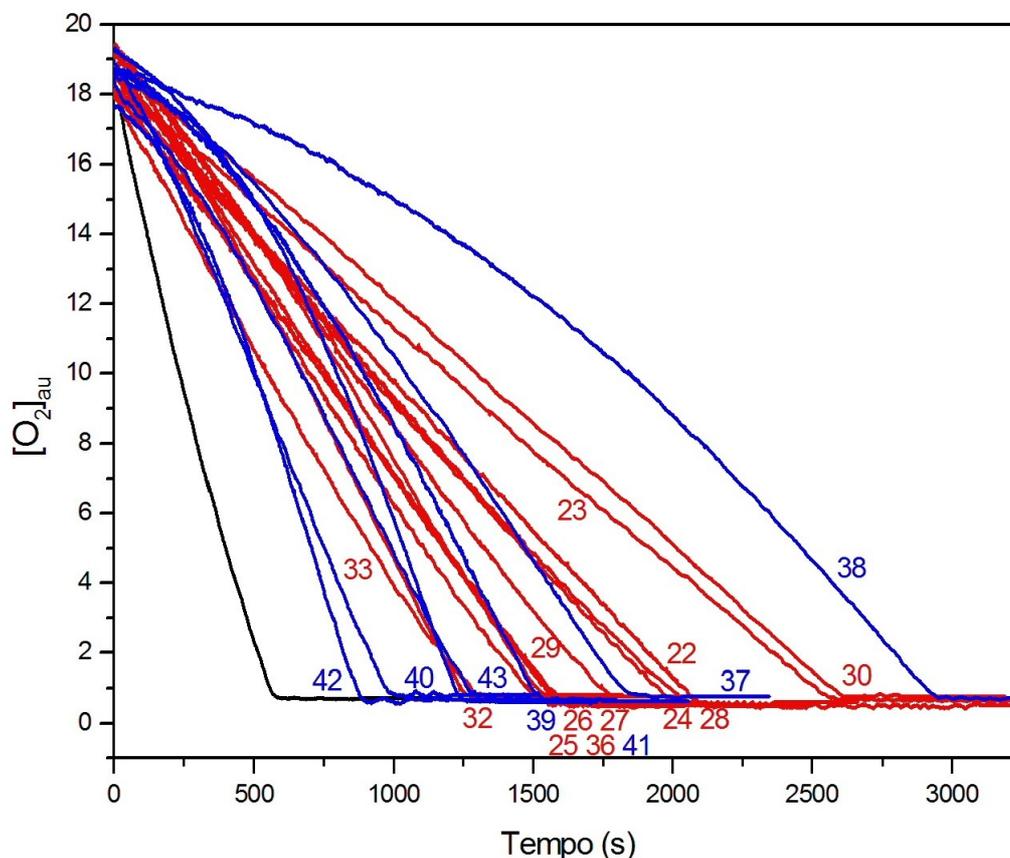


Figura 8.17. Tracce ossigrafiche di differenti oli di origine vegetale (in rosso di oliva, in blu di semi). La traccia nera è il risultato della misura in assenza di olio. Per il collegamento fra numero del campione e tipo di olio vedasi Tabella 2.1.

La relazione (6.1) si trasforma in:

$$ZT_{\Delta} = 223128 * \Sigma_i[AOH_i] + 57.59$$

La relazione permette la traduzione dei dati di ZT_{Δ} in dati di $\Sigma_i[AOH_i]$, che vengono pure riportati in Tabella 8.5. Quindi, come da Figura 8.19, si possono diagrammare i dati di p in funzione di $\Sigma_i[AOH_i]$.

I valori di p sono misurabili sia per antiossidanti esattamente conosciuti per natura e quantità, sia per campioni di olio in cui operano complessi di antiossidanti di natura e quantità indefinite, e possono pertanto venire correlati con concentrazioni definite di antiossidanti $[AOH]$ solo nel primo caso. Per entrambe le tipologie sono tuttavia determinabili i valori del parametro ZT_{Δ} , descritto nel Paragrafo 6.4, una ragionevole correlazione con una misura del complesso di antiossidanti, $\Sigma_i[AOH_i]$, operanti nel campione di olio. Diventa di conseguenza possibile una correlazione fra p e $\Sigma_i[AOH_i]$, che viene utilizzata per una più esauriente descrizione del sistema di inibitori presente negli oli.

L'esame di Figura 8.17 mostra come le tracce ossigrafiche degli oli di oliva non si incrocino; lo stesso vale per le tracce degli oli di semi. Al contrario, le tracce degli oli di oliva possono incrociarsi con quelle degli oli di semi, suggerendo che gli andamenti di p contro quelli di ZT_{Δ} (o $\Sigma_i[AOH_i]$) possano essere diversi per le due

diverse tipologie. Questo assunto viene confermato ed evidenziato nelle Figure 8.18 e 8.19, dove i valori di ρ sono posti in grafico in funzione di ZT_{Δ} e di $\Sigma_i[\text{AOH}_i]$ rispettivamente.

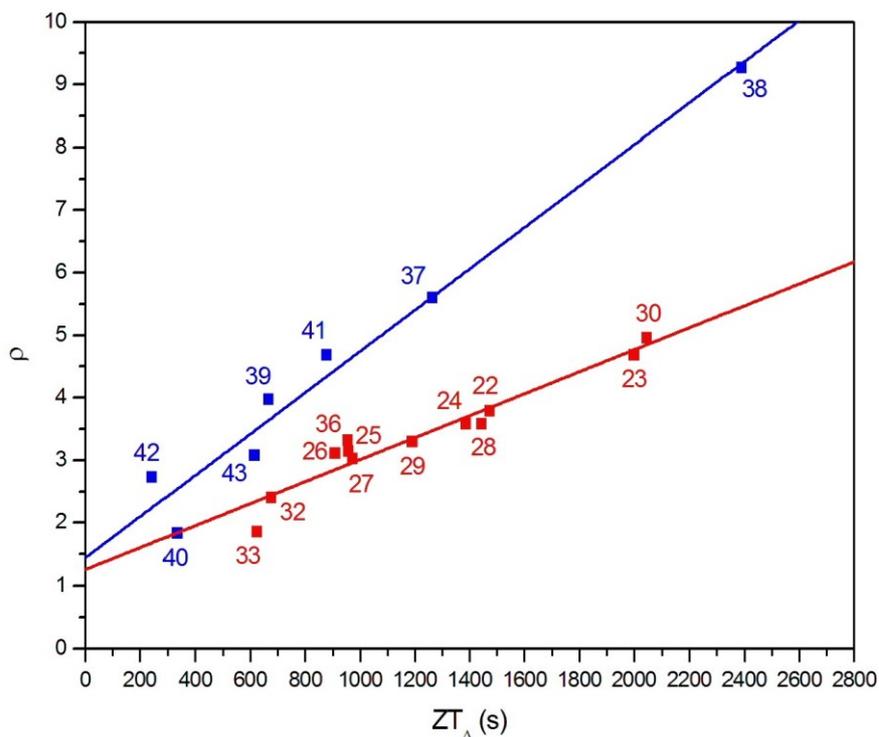


Figura 8.18. Correlazione fra i valori di ρ e di ZT_{Δ} per differenti oli di origine vegetale (in rosso di oliva, in blu di semi). Per il collegamento fra numero del campione e tipo di olio vedasi Tabella 2.1.

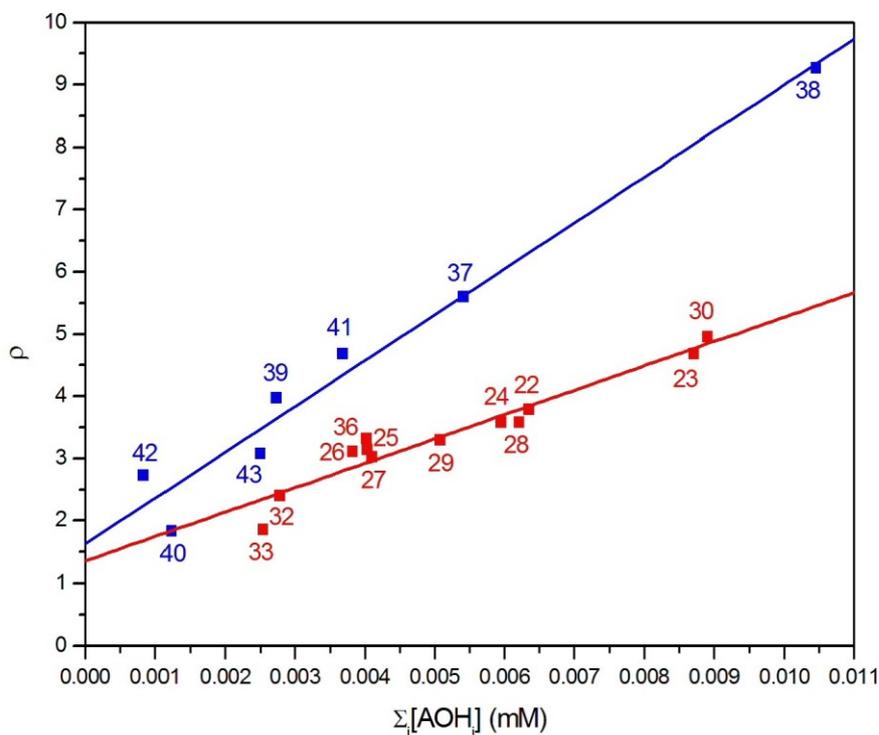


Figura 8.19. Correlazione fra i valori di ρ e di $\Sigma_i[\text{AOH}_i]$, per differenti oli di origine vegetale (in rosso di oliva, in blu di semi). Per il collegamento fra numero del campione e tipo di olio vedasi Tabella 2.1.

Nel caso degli oli di oliva, si osserva una correlazione lineare, con passaggio all'intercetta per un valore vicino a 1: questi fatti suggeriscono che anche questa correlazione possa venire descritta dall'equazione (5.3), opportunamente modificata:

$$\rho = \frac{-(d[O_2]_{au}/dt)_0}{-(d[O_2]_{au}/dt)_A} = 1 + \frac{k_A}{k_0[LH]} \Sigma_i[AOH_i]$$

In forza della buona correlazione lineare riscontrata, ne consegue che nella serie di campioni investigati la composizione del complesso di antiossidanti possa ritenersi la medesima, variando unicamente la quantità totale presente in ognuno di essi. Si potrebbe ipotizzare che la specie unica da cui si estrae l'olio (*Olea europaea* L.) generi il complesso di antiossidanti in composizione pressoché costante e che i diversi cultivar o i diversi metodi di estrazione e raffinazione influenzino praticamente solo la quantità totale (originale o residua) di esso, confermando quanto già riportato in letteratura (Montedoro *et al.*, 1992; Ramirez-Tortosa *et al.*, 1999; Tasioula-Margari & Okogeri, 2001; Servili & Montedoro, 2002; Brenes *et al.*, 2004; Del Carlo *et al.*, 2004; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005; Morello *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2006; Jerman Klen & Mozetic Vodopivec, 2012; Cecchi *et al.*, 2013; Sanchez de Medina *et al.*, 2015; Sarolic *et al.*, 2015).

Tabella 8.5. Valori di ZT_{Δ} , di $\Sigma_i[AOH_i]$ e di ρ per differenti oli di origine vegetale. Ad ogni numero è associato un preciso campione di olio. Per il collegamento fra numero del campione e tipo di olio vedasi Tabella 2.1.

^a Concentrazione nella cella ossigrafica.

^b Concentrazione nel campione di olio tal quale.

Campione	Olio	ZT_{Δ} (s)	$\Sigma_i[AOH_i]$ (*10 ⁻³ mM) ^a	ρ	Equivalenti di lauril gallato (mM) ^b	Equivalenti di trolox (mM) ^b
22	OEVO DOP	1474	6.35	3.79	0.90	0.37
23	OEVO DOP	2000	8.71	4.68	1.21	0.49
24	OEVO DOP	1385	5.95	3.58	0.83	0.35
25	OEVO DOP	957	4.03	3.15	0.68	0.29
26	OEVO DOP	909	3.82	3.11	0.67	0.29
27	OEVO DOP	973	4.10	3.03	0.64	0.28
28	OEVO comunitario	1443	6.21	3.58	0.83	0.35
29	OEVO comunitario	1191	5.08	3.30	0.73	0.31
30	OEVO comunitario	2045	8.91	4.96	1.30	0.53
32	Olio di oliva raffinato	677	2.78	2.41	0.43	0.19
33	Olio di oliva raffinato	624	2.54	1.86	0.24	0.12
36	OEVO italiano	955	4.02	3.32	0.74	0.31
37	Olio di semi di girasole	1264	5.41	5.60	1.52	0.61
38	Olio di semi di canapa	2390	10.45	9.27	2.78	1.09
39	Olio di semi di canapa	667	2.73	3.98	0.97	0.40
40	Olio di semi di arachide	333	1.23	1.84	0.23	0.12
41	Olio di semi di mais	878	3.68	4.68	1.21	0.49
42	Olio di semi di vinacciolo	243	0.83	2.73	0.54	0.24
43	Olio di semi vari	615	2.50	3.08	0.66	0.28

Il campione di oli di semi è più limitato ed è rappresentato da: olio di semi di girasole (*Helianthus annuus* L.) ad alto oleico, di arachide (*Arachis hypogaea* L.), di mais (*Zea mays* L.), di vinacciolo (*Vitis vinifera* L.), di semi vari (costituito da olio di semi di soia, *Glycine max* (L.) Merr., e olio di semi di girasole) e due campioni di olio di canapa (*Cannabis sativa* L.) ottenuti con due diversi metodi, uno per estrazione con CO₂ supercritica, 38, e l'altro per spremitura a freddo, 39. Sebbene il numero di oli di semi sia limitato, si osserva comunque, come nel caso degli oli di oliva, una correlazione lineare, con l'intercetta sulle ordinate vicina al valore 1.

Risulta quindi possibile avanzare alcune considerazioni:

- i valori di ρ sono, a parità di valore di $\Sigma_i[\text{AOH}_i]$, sistematicamente più alti nella serie di oli di semi che nella serie di oli di oliva, viceversa i valori di $\Sigma_i[\text{AOH}_i]$, a parità di valori di ρ , sono sistematicamente più bassi nella serie di oli di semi che nella serie di oli di oliva: questo fatto indica una diversa composizione degli antiossidanti con maggiore potere inibente, maggiormente presente negli oli di semi. Queste considerazioni sono generalmente confermate da dati di letteratura, dove si possono confrontare le composizioni degli antiossidanti in oli di oliva e di semi (Cabrin *et al.*, 2001; Fruhwirth *et al.*, 2003; Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2008; Elisia *et al.*, 2013);
- il confronto fra i due diversi modi di estrazione per l'olio di canapa è significativo. La lavorazione con CO_2 supercritica permette forse un'estrazione più efficace della matrice oleosa, ma certamente un'estrazione ancora più valida del complesso di sostanze antiossidanti (Da Porto *et al.*, 2012a e 2012b; Tomita *et al.*, 2013; Aladic *et al.*, 2014).

In conclusione di questo paragrafo, si desidera rimarcare il significato dei parametri ρ e ZT_{Δ} che sono dedotti dall'esame delle tracce ossigrafiche: il parametro ZT_{Δ} si rapporta ad una stima quantitativa del complesso di antiossidanti, che si può definire come $\Sigma_i[\text{AOH}_i]$, mentre il parametro ρ fornisce una stima qualitativa delle proprietà antiossidanti, intese come capacità di inibizione della perossidazione lipidica. E' possibile pervenire a queste stime anche senza la conoscenza della natura, dell'abbondanza relativa e del potere inibente dei singoli componenti il complesso.

Si vuole infine fare qualche considerazione sui tempi di analisi: a differenza di come operato nel corso di questo lavoro di dottorato, dove si sono svolte innumerevoli misure in triplicato ed alle più disparate condizioni sperimentali, che per semplicità e concretezza si sono in parte omesse nella tesi, per la determinazione delle proprietà antiossidanti di un singolo campione di olio tal quale bastano le registrazioni di due tracce ossigrafiche (misura delle velocità di consumo di ossigeno), condotte in assenza ed in presenza del campione. La prima traccia inoltre può servire anche per le analisi di altri campioni di olio, condotte nella stessa sessione di lavoro.

Per contro, il sistema classico di analisi di matrici di oli ampiamente citato in letteratura (Samaniego Sanchez *et al.*, 2007; Baiano *et al.*, 2009; Cardinali *et al.*, 2010) prevede fino a 5 passaggi: 1) estrazione della componente idrofila del complesso di antiossidanti, 2) reazione di una frazione dell'estratto con opportuno reagente, seguita da 3) determinazione quantitativa del contenuto di molecole antiossidanti, 4) valutazione dell'attività antiossidante per reazione di una seconda frazione con un opportuno reagente, seguita 5) da determinazione qualitativa.

Inoltre, la frazione di antiossidanti lipofili, rimasta imprigionata nella matrice oleosa a causa delle modalità di estrazione adottate, rimane ignorata da questa sequenza di operazioni e, di conseguenza, il valore della capacità antiossidante del campione risulta ampiamente sottostimato.

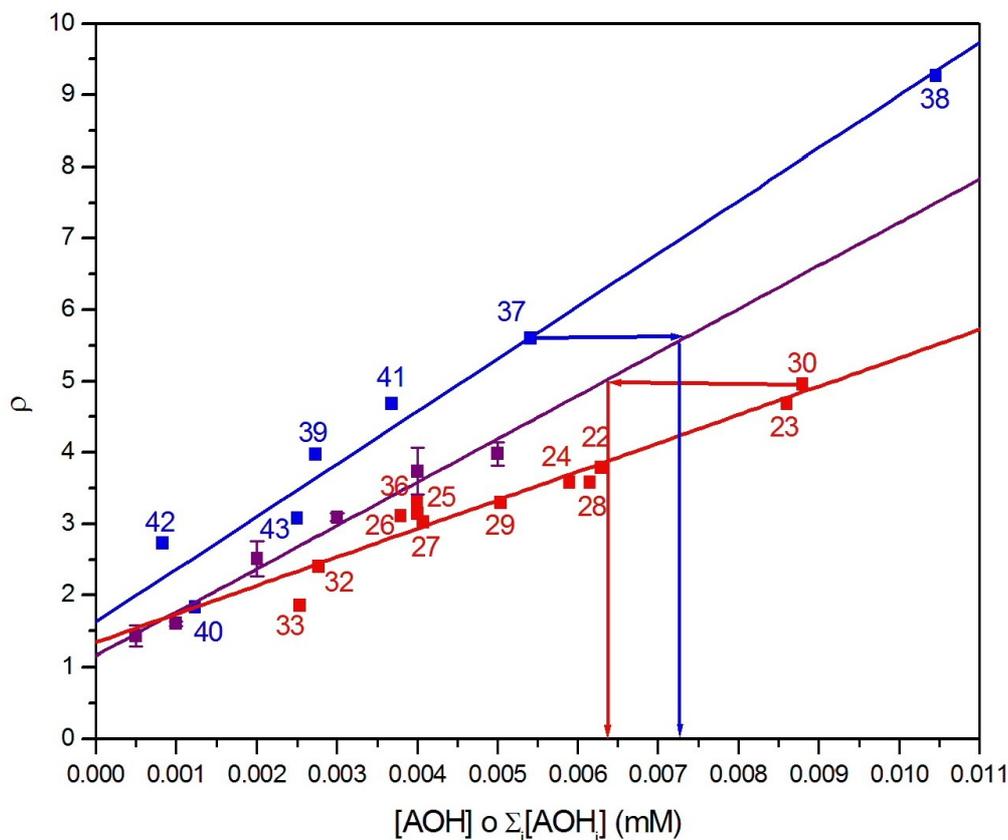
8.8. Traduzione della forza del complesso di antiossidanti in equivalenti di antiossidante di scelta

La determinazione dei valori di ZT_{Δ} sia per molecole di antiossidante che per campioni di oli permette di formulare la forza del complesso $\Sigma_i[AOH_i]$ presente in questi ultimi in termini di concentrazioni mM di antiossidante di riferimento. Diversi antiossidanti di riferimento sono stati proposti e descritti in letteratura (Pirisi *et al.*, 2000; Del Carlo *et al.*, 2004; Cardinali *et al.*, 2010; Frankel, 2010; Jerman Klen & Mozetic Vodopivec, 2011 e 2012). In questi lavori si postula che il potere inibente del complesso di antiossidanti nel campione investigato possa essere descritto come il potere dell'antiossidante di riferimento ad una data concentrazione.

Nelle Figure 8.20a-b vengono diagrammati i valori di ρ contro i valori di $\Sigma_i[AOH_i]$ per le serie di oli di oliva e di semi investigati in questo capitolo, assieme ai valori di ρ contro $[AOH]$ di due antiossidanti scelti come riferimento, rispettivamente lauril gallato e trolox.

La determinazione della concentrazione di riferimento risulta immediata: il valore di ρ del campione di olio considerato viene riportato sulla retta che descrive l'antiossidante, e si risale da quel punto alla concentrazione, espressa in mM, così come illustrato nelle figure stesse.

a)



b)

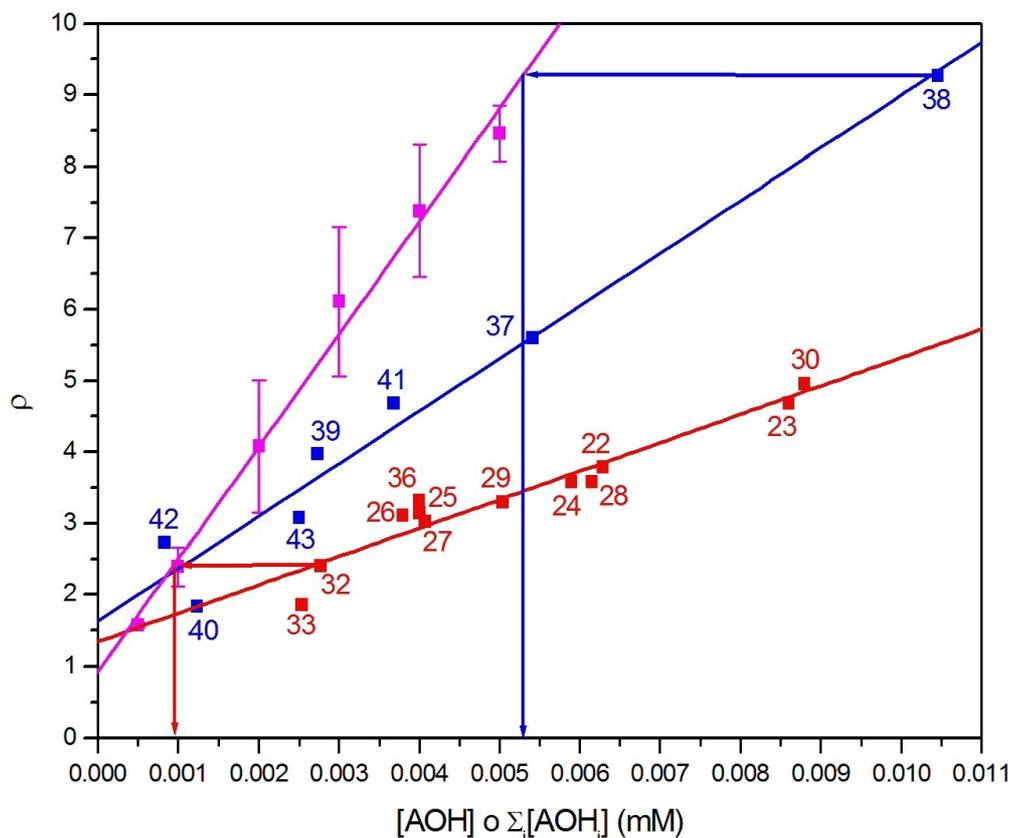


Figura 8.20a-b. Determinazione grafica degli equivalenti di a) lauril gallato, b) trolox del complesso di antiossidanti presente negli oli di origine vegetale analizzati. Per il collegamento fra numero del campione e tipo di olio vedasi Tabella 2.1.

Il seguente procedimento analitico permette una determinazione più precisa.

Dalle equazioni:

$$\rho = 610 \cdot [\text{AOH}] + 1.16 \quad \text{per il lauril gallato e}$$

$$\rho = 1600 \cdot [\text{AOH}] + 0.92 \quad \text{per il trolox}$$

dove, come rappresentato nelle Figure 8.20a-b, il parametro ρ concerne gli oli di oliva o di semi, e i dati numerici riguardano gli antiossidanti di riferimento lauril gallato o trolox, si ricavano i valori di equivalenti di concentrazione di antiossidante di riferimento [AOH].

Il campione di olio, di volume $11 \cdot 10^{-3}$ mL, immesso nella cella, di volume 2.3 mL, subisce un fattore di diluizione pari a 209; i valori di [AOH] moltiplicati per questo fattore producono il valore di concentrazione equivalente (espressa in mM) dell'antiossidante di riferimento.

I valori ottenuti per la serie di oli investigati, per le due molecole antiossidanti di riferimento, sono riportati in Tabella 8.5.

8.9. Descrizione del meccanismo di trasferimento degli antiossidanti e ragioni della sua efficacia

Come già esposto in precedenza, i processi di estrazione della componente antiossidante presente negli oli avvengono per trasferimento dalla fase lipidica (olio in *n*-esano) a quella acquosa (metanolo o metanolo/acqua). Negli estratti passano pertanto esclusivamente gli antiossidanti, ed altre sostanze, di natura idrofila. Come evidenziato in Tabella 8.2 e Figura 8.10, il processo di sonicazione, adottato nella metodica di estrazione 2) sviluppata dal gruppo di ricerca di Nova Gorica, non sembra in grado di incrementare tale trasferimento: una rilevante frazione di antiossidanti, e probabilmente la totalità degli antiossidanti di natura lipofila, rimane così confinata negli oli.

La differenza fondamentale rispetto ai sistemi binari di estrazione risulta essere, nelle due fasi di olio e di acqua/SDS sottoposte a sonicazione, l'aggiunta di SDS. Si genera un sistema ternario, in cui due fasi lipidiche, "fase SDS" e "fase olio", coesistono con una fase acquosa, "fase acqua". La "fase SDS" e la "fase acqua" sono, alla data condizione di pH leggermente basico, mutuamente miscibili, mentre la "fase olio" rimane non miscibile con le prime.

In linea di principio, questa situazione supera le limitazioni delle fasi binarie, permettendo, oltre al passaggio da olio ad acqua degli antiossidanti idrofili, anche il passaggio da olio a "fase SDS" degli antiossidanti lipofili. Le modalità di passaggio e di ripartizione fra le fasi sono diverse. Tra "fase acqua" e "fase olio" un antiossidante si ripartisce in forza della sua lipofilità o idrofilicità. Le caratteristiche di lipofilità di un antiossidante verso la "fase olio" o la "fase SDS" sono presumibilmente simili, e pertanto la specie si ripartisce secondo il rapporto fra i volumi delle fasi (criterio di massa).

Si presenta qui di seguito una stima del volume della "fase SDS" in una soluzione acquosa con SDS 50 mM (contenente LH 10 mM): si distingue nella molecola di SDS un volume lipidico (per confronto con una molecola di dodecano) ed un volume idro-assimilabile (per confronto con una molecola di sodio bisolfato); mentre si considera la molecola di LH integralmente lipidica.

Si perviene, per un volume di 2.3 mL (il volume della cella di misura), ad un volume lipidico pari a $35 \cdot 10^{-3}$ mL, che va confrontato con il volume della massima aggiunta di olio, pari a $12 \cdot 10^{-3}$ mL. I dettagli del calcolo sono riportati in Tabella 8.6. Il volume lipidico nel sistema acqua/SDS/LH risulta non sufficientemente superiore al volume della massima aggiunta di olio per una efficace azione del criterio di massa.

Si propone pertanto un nuovo criterio, basato sul fatto che la matrice lipidica SDS/LH sia dispersa nella matrice acqua in forma di micelle. Pur rappresentando due fasi distinte e con diverse caratteristiche, si può considerare la prima matrice come "solubilizzata" nella seconda.

Il sistema sottoposto a sonicazione presenta un volume totale di poco superiore a 2.3 mL, dovuto alla matrice acqua/SDS, cui si aggiunge il volume massimo di olio di $12 \cdot 10^{-3}$ mL. Per una concentrazione di SDS pari a 50 mM e per un numero di aggregazione pari a 50 (Bales *et al.*, 1998; Berret, 2005; Qi *et al.*, 2007), si può stimare una concentrazione micellare pari a 1 mM.

Tabella 8.6. Stima del volume della “fase SDS/LH”.

	Massa molare ⁶ (g/mol)	Densità ⁶ (g/mL)	Volume molare = massa molare/densità (mL/mol)
Acqua	18.02	1	18.02
SDS	288.38	1.01	285.52
Dodecano	170.34	0.75	227.12
Sodio bisolfato	120.06	2.74	43.82
Acido linoleico	280.45	0.90	311.61

(a) Il volume lipidico di SDS è descritto dal dodecano, mentre il volume idro-assimilabile da sodio bisolfato. La somma dei volumi molari è 270.94 mL/mol, valore accettabilmente vicino al volume molare di SDS. Percentuale di volume molare lipidico: 83.83. Percentuale di volume idro-assimilabile: 16.17.
Nel calcolo del volume molare, l'acido linoleico viene interamente considerato di natura lipidica.

(b) Sistema acqua + SDS
 (1) volume di SDS: 50 mM in 1000 mL: $50 \cdot 10^{-3} \cdot 285.52 = 14.28$
 (2) volume residuo acqua: $1000 - 14.28 = 985.72$
 (3) SDS lipidico: $14.28 \cdot 83.83/100 = 11.97$; SDS idro-assimilabile: $14.28 \cdot 16.17/100 = 2.31$
 (4) volume lipidico: 11.97 in 1000 mL; volume idro e assimilabile: $985.72 + 2.31 = 988.03$ in 1000 mL
 (5) volume lipidico in cella di 2.3 mL: $11.97 \cdot 2.3/1000 = 28 \cdot 10^{-3}$ mL
 (6) massima aggiunta di olio: $12 \cdot 10^{-3}$ mL

(c) Sistema acqua + SDS + acido linoleico
 (1) volume di SDS: 50 mM in 1000 mL: $50 \cdot 10^{-3} \cdot 285.52 = 14.28$
 (2) volume di acido linoleico: 10 mM in 1000 mL: $10 \cdot 10^{-3} \cdot 311.61 = 3.12$
 (3) volume residuo acqua: $1000 - 14.28 - 3.12 = 982.60$
 (4) SDS lipidico: $14.28 \cdot 83.83/100 = 11.97$; SDS idro-assimilabile: $14.28 \cdot 16.17/100 = 2.31$
 (5) volume lipidico: $11.97 + 3.12 = 15.09$ in 1000 mL; volume idro e assimilabile: $982.60 + 2.31 = 984.91$ in 1000 mL
 (6) volume lipidico nella cella di 2.3 mL: $15.09 \cdot 2.3/1000 = 35 \cdot 10^{-3}$ mL
 (7) massima aggiunta di olio: $12 \cdot 10^{-3}$ mL

Da dati di letteratura, la quantità di specie fenoliche negli oli di oliva varia da 50 a 1000 mg/kg (Montedoro *et al.*, 1992; Baiano *et al.*, 2009), corrispondente a 55 e 1099 mg/L (assumendo una densità di 0.91 g/mL, media delle densità riportate in Tabella 2.1).

Per un peso molecolare, utilizzato come esempio nel caso specifico, di 240.08 g (media dei pesi molecolari degli antiossidanti elencati in Figura 4.1, si veda Tabella 8.7, essenzialmente approssimabile alla media dei pesi molecolari degli antiossidanti presenti nell'olio di oliva, Bendini *et al.*, 2007), si giunge a concentrazioni minima e massima di 0.23 e 4.58 mM, rispettivamente.

Tabella 8.7. Pesi molecolari degli antiossidanti analizzati.

Antiossidante	Peso molecolare (g/mol)
Tocoferolo	430.71
Pentametilcromanolo	220.31
Trolox	250.29
BHT	220.35
Lauril gallato	338.44
Resveratrolo	228.25
Pirogallolo	126.11
Acido ascorbico	176.12
Acido gallico	170.12
<i>Valore medio = 240.08</i>	

⁶ Si utilizzando i dati di massa molare e di densità reperiti su PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Le concentrazioni massime sottoposte al processo di sonicazione della dispersione vanno corrette per un fattore di diluizione pari o minore di $12 \cdot 10^{-3} / 2.3 = 5.2 \cdot 10^{-3}$, pervenendo così a valori minimo o massimo di $1.2 \cdot 10^{-3}$ e $24 \cdot 10^{-3}$ mM. Questi valori, di tre o due ordini di grandezza inferiori al valore di concentrazione micellare, validano il meccanismo per il trasporto dalla fase olio qui di seguito descritto.

Il passaggio critico del meccanismo è illustrato in Figura 8.21. Le micelle di SDS sono strutture termodinamicamente stabili, tenute assemblate dalla idrofobicità della coda dodecanica e dalla idrofilicità della testa solfatica, ma cineticamente labili (Cornils & Herrmann, 2004). La corteccia idrofila può aprirsi e chiudersi, ed in effetti questo è un processo proposto per il trasferimento da e per l'interno lipidico (Hauenstein *et al.*, 1983). Quando la micella si accosta alla microgoccia di olio, l'interazione fra le teste idrofile ed il solvente acqua viene a mancare lungo la superficie di attacco, la corteccia si apre e l'interno lipidico entra in contatto con la superficie della stessa microgoccia. Quindi il trasferimento degli antiossidanti lipofili può avvenire senza passaggio attraverso il sovente polare. L'allontanamento della micella, che eventualmente trattiene l'antiossidante, ripristina la corteccia.

Le micelle che trattengono l'antiossidante restano una frazione minima del totale, variabile fra lo 0.1 e l'1% a processo completato. Questa frazione definisce anche la frequenza con cui le micelle con antiossidante attaccano nuovamente la goccia, con eventuale cessione, rispetto alla frequenza di attacco delle micelle "vergini", con eventuale cattura dell'antiossidante. Il meccanismo proposto è efficace, come evidenziato dalle Figure 8.14a-c.

Si vuole inoltre rimarcare come l'efficacia vada associata alla presenza di tre fasi, "fase olio", "fase acqua" e "fase SDS", ma soprattutto al fatto che la terza fase sia dispersa (non solubilizzata) nella seconda in forma minuta (ossia sottoforma di micelle).

Il meccanismo sembra essere sufficientemente esaustivo, ma resta complesso e lento. In effetti, in regime di sonicazione, mentre il trasferimento di antiossidanti idrofili dalla "fase olio" alla "fase acqua" risulta istantaneo, il trasferimento ottimale di antiossidanti lipofili alla "fase SDS" richiede il tempo relativamente lungo di 120 secondi, alle condizioni sperimentali adottate.

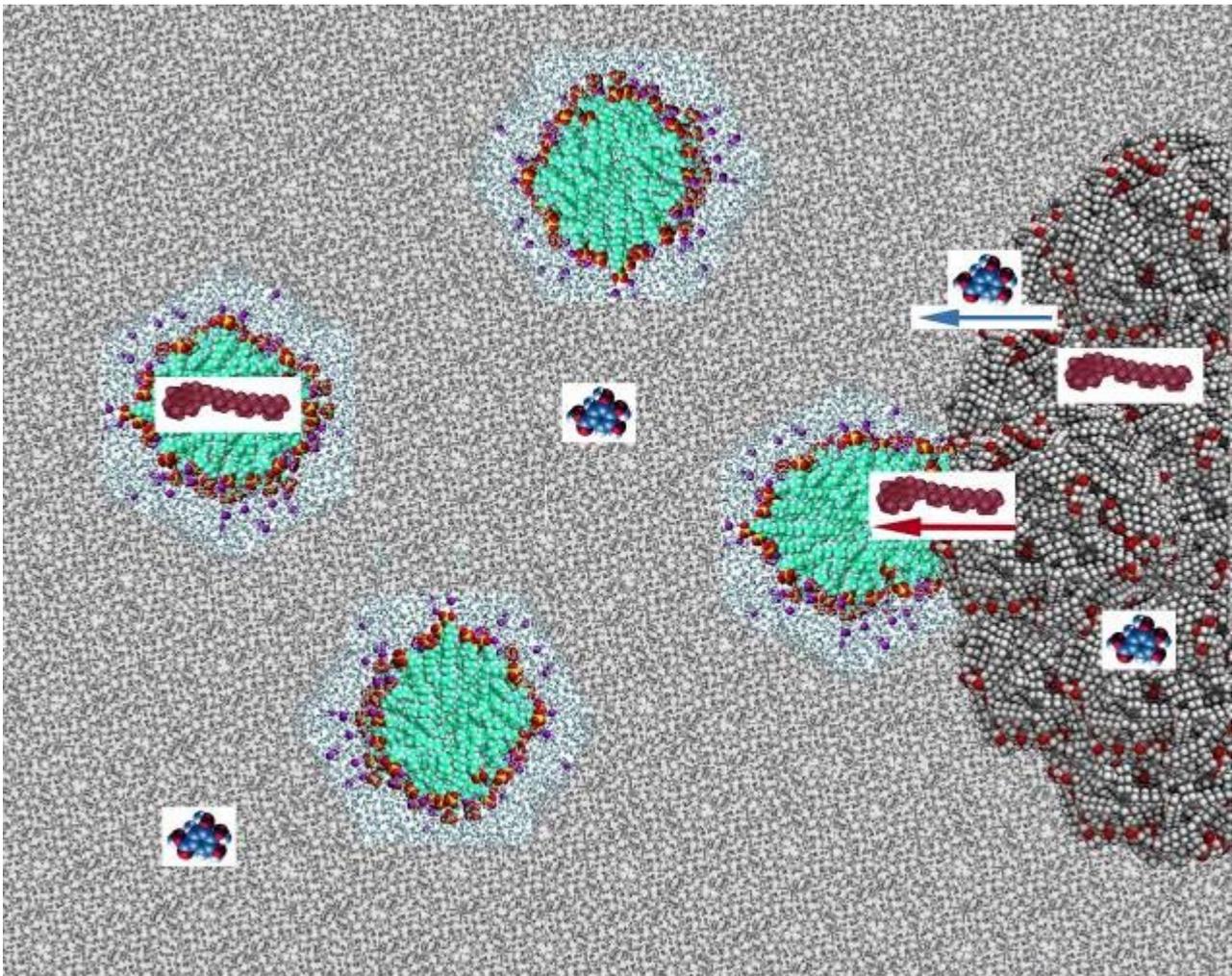


Figura 8.21. Modello del sistema acqua/micelle/olio, in cui si illustra il trasferimento di un antiossidante idrofilo (nell'esempio: acido gallico in colore blu) dalla fase olio alla fase acqua, e di un analogo lipofilo (nell'esempio: tocoferolo, colore rosso) dalla fase olio alla fase micella.

Scala delle proprietà antiossidanti di una serie di polifenoli

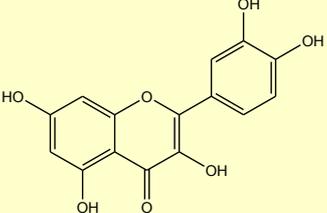
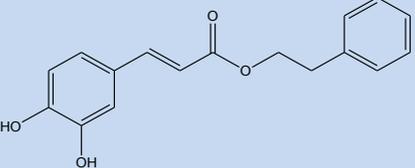
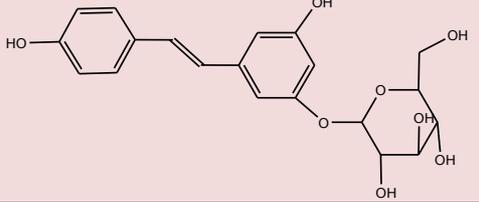
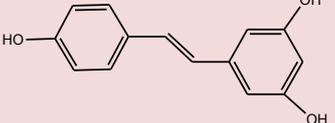
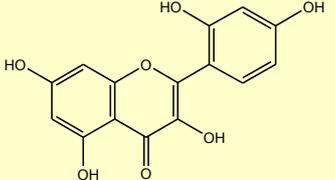
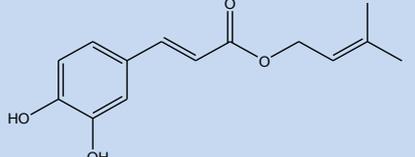
A conclusione di questo lavoro di tesi, applicando concetti e risultati sino qui maturati, si è determinato il potere antiossidante di 25 polifenoli, oltre all'acido ascorbico, per lo più di origine naturale, appartenenti a categorie differenti di composti chimici e disponibili in commercio.

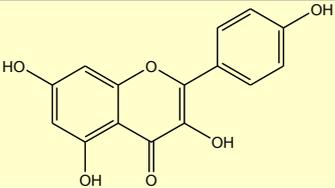
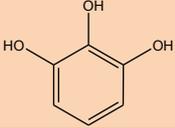
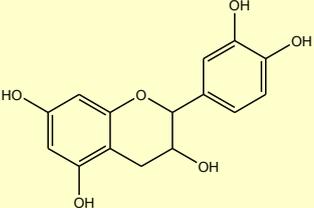
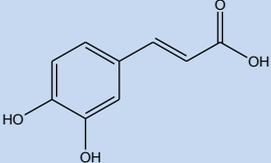
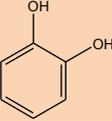
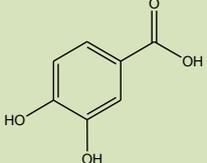
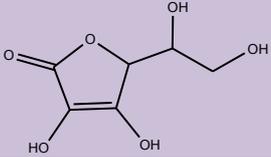
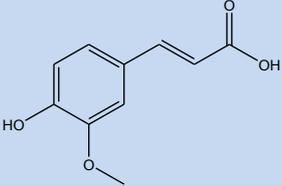
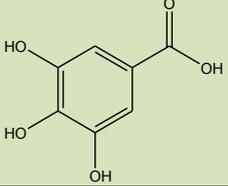
I risultati, espressi mediante il parametro α , sono riportati in Tabella 9.1, dove tutte le molecole analizzate sono state suddivise in quattro classi di capacità antiossidante in relazione ai risultati di pendenza α ottenuti sperimentalmente (quarta colonna).

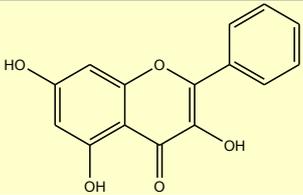
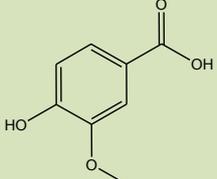
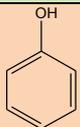
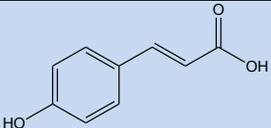
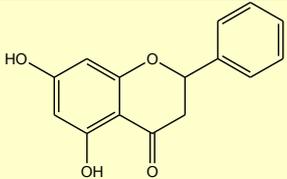
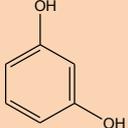
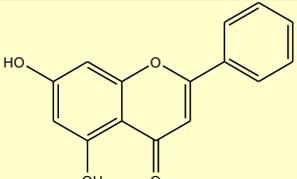
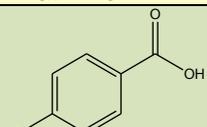
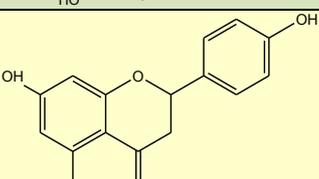
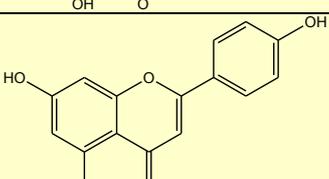
Tabella 9.1. Valore di capacità antiossidante (parametro α) di 25 polifenoli e dell'acido ascorbico.

CAPE: feniletilestere dell'acido caffeico; DMAC: 1,1-dimetilallilcaffeoato.

Acidi fenolici, verde; Acidi caffeici, azzurro; Fenolo e derivati, arancione; Flavonoidi, giallo; Stilbeni, rosa; Acido ascorbico, viola.

AOH	Formula	α (mM ⁻¹)	Capacità antiossidante
Quercetina		570±70	++++
CAPE		515±75	
Piceide		475±95	
Resveratrolo		450±30	
Morina		435±60	
DMAC		410±40	

AOH	Formula	α (mM^{-1})	Capacità antiossidante
Canferolo		360±25	+++
Pirogallolo		300±40	
Catechina		320±15	
Acido caffeico		315±5	
Catecolo		310±20	
Idrochinone		235±25	
Acido 3,4-diidrossibenzoico		215±75	
Acido ascorbico		175±15	
Acido ferulico		175±10	
Acido gallico		130±30	

AOH	Formula	α (mM ⁻¹)	Capacità antiossidante
Galangina		87±45	++
Acido vanillico		29±15	+
Fenolo		23±15	
Acido p-cumarico		21±10	
Pinocembrina		19±9	
Resorcinolo		13±8	
Crisina		9±6	
Acido p-idrossibenzoico		9±1	
Naringenina		6±4	
Apigenina		4±1	

Dall'esame dei dati sono possibili le seguenti conclusioni:

- a) la capacità antiossidante di polifenoli anche della medesima classe di composti (per esempio flavonoidi) può variare anche di due ordini di grandezza (vedasi ad esempio quercetina e apigenina), confermando l'importanza della struttura molecolare ed, in particolare, della capacità di delocalizzazione dell'elettrone libero conseguente la "reazione antiossidante";
- b) come diretta conseguenza del punto a), non appare corretta la relazione fra "contenuto di polifenoli" e "capacità antiossidante" talvolta riportata in letteratura e frequentemente in ambito commerciale;
- c) polifenoli di classi totalmente differenti possono avere valori di capacità antiossidante molto vicini e comunque molto elevati (vedasi come esempio quercetina, un flavonoide, con CAPE, un estere dell'acido caffeico e piceide, uno stilbene);
- d) in relazione alla loro capacità antiossidante, quercetina, CAPE e piceide, tre polifenoli di classi notevolmente differenti (un flavonoide, un derivato dell'acido caffeico ed uno stilbene) sono sicuramente eccellenti molecole antiossidanti; crisina, apigenina e naringenina, tre flavonoidi naturali, possono invece considerarsi mediocri antiossidanti;
- e) il tocoferolo (Vitamina E) presenta straordinarie proprietà antiossidanti ($\alpha = 8400$, Tabella 5.1), circa 15 volte superiori rispetto ai migliori antiossidanti riportati in Tabella 9.1. Questa sua particolare caratteristica, associata al relativamente basso valore del parametro α dell'acido ascorbico ($\alpha = 175$), che non è un polifenolo, costituisce una ulteriore conferma di quanto già discusso nel Paragrafo 7.2, ovvero del ruolo sacrificale della Vitamina C, idrosolubile, tesa a mantenere allo stato ridotto la Vitamina E (liposolubile), cui è demandata la funzione di principale antiossidante nelle strutture lipidiche.

Conclusioni

In letteratura vengono riportate diverse metodiche *in vitro*, principalmente spettrofotometriche ed elettrochimiche, per la quantificazione del “potere antiossidante” di una molecola o di un prodotto, che tuttavia danno risultati contraddittori e talvolta fortemente discordanti.

Per contribuire ad approfondire queste tematiche, il presente progetto di ricerca è nato con lo scopo di analizzare lo studio del comportamento di quelle sostanze comunemente definite “antiossidanti”, anche attraverso un’analisi critica dell’affidabilità e del reale significato dei più comuni metodi analitici, al fine di definire una scala di efficacia empirica e possibilmente matematicamente rapportata ai meccanismi noti della perossidazione lipidica.

Questo processo, verificato *in vivo*, è riproducibile *in vitro* su sistemi micellari modello, e pertanto il risultato della misura sperimentale della sua inibizione ad opera di una serie di molecole sufficientemente rappresentativa di tutte le strutture chimiche con supposte “proprietà antiossidanti”, interpretato in termini meccanicistici, seppure empirici ma suffragati dalla coerenza con il dato sperimentale, rappresenta un valore del loro reale potere antiossidante e, in definitiva, permette la creazione di una scala assoluta di potere antiossidante delle diverse molecole in esame.

La seconda fase del progetto concerne il passaggio dagli aspetti meramente teorici a quelli applicativi con:

- i) la creazione di una scala assoluta di proprietà antiossidanti di un’ampia serie di molecole con supposte proprietà antiossidanti;
- ii) la messa a punto di metodiche applicative complementari al metodo sperimentale di inibizione della perossidazione lipidica, per la determinazione delle proprietà antiossidanti di prodotti alimentari e degli oli di origine vegetale in particolare, matrici particolarmente problematiche a motivo della loro natura lipofila.

Il metodo così sviluppato permette sia di interpretare correttamente i dati sperimentali sia di ottenere, per i composti puri ed i sistemi complessi analizzati, valori più affidabili di capacità antiossidante e pertanto una discriminazione in base a tale potenziale antiossidante, mettendo in luce aspetti particolarmente interessanti, come i fenomeni di sinergia ed il relativo potenziamento nell’efficienza antiossidante (per esempio tra Vitamina E e Vitamina C) e definendo, specialmente per quanto concerne gli oli vegetali alimentari, la loro stabilità all’ossidazione (dovuta alla presenza sia di fenoli idrofili che lipofili), quindi la relativa qualità organolettica e nutrizionale.

Riferimenti bibliografici

“Food Chemistry” citation style

- Aladic, K., Jokic, S., Moslavac, T., Tomas, S., Vidovic, S., Vladic, J., & Subaric, D. (2014). Cold pressing and supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal*, *28*, 481-490.
- Alarcon de la Lastra, C., & Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, *35*, 1156-1160.
- Alonso-Salces, R. M., Heberger, K., Holland, M. V., Moreno-Rojas, J. M., Mariani, C., Bellan, G., Reniero, F., & Guillou, C. (2010). Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry*, *118*, 956-965.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, *127*, 183-198.
- Aparicio, R., & Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *104*, 614-627.
- Aparicio, R., Roda, L., Albi, M. A., & Gutierrez, F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 4150-4155.
- Arlt, S., Beisiegel, U., & Kontush, A. (2002). Lipid peroxidation in neurodegeneration: new insights into Alzheimer's disease. *Current Opinion in Lipidology*, *13*, 289-294.
- Arrigoni, O., & De Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1569*, 1-9.
- Aruoma, O. I., Murcia, A., Butler, J., & Halliwell, B. (1993). Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*, 1880-1885.
- Baccouri, B., Zarrouk, W., Baccouri, O., Guerfel, M., Nouairi, I., Krichene, D., Daoud, D., & Zarrouk, M. (2008). Composition, quality and oxidative stability of virgin olive oils from some selected wild olives (*Olea europaea* L. subsp. *Oleaster*). *Grasas Y Aceites*, *59*, 346-351.
- Baiano, A., Gambacorta, G., Terracone, C., Previtali, M. A., Lamacchia, C., & La Notte, E. (2009). Changes in phenolic content and antioxidant activity of Italian extra-virgin olive oils during storage. *Journal of Food Science*, *74*, C177-C183.
- Bales, B. L., Messina, L., Vidal, A., Peric, M., & Nascimento, O. R. (1998). Precision relative aggregation number determinations of SDS micelles using a spin probe. A model of micelle surface hydration. *Journal of Physical Chemistry B*, *102*, 10347-10358.
- Barati, A. H., Mokhtari-Dizaji, M., Mozdarani, H., Bathaei, S. Z., & Hassan, Z. M. (2006). Free hydroxyl radical dosimetry by using 1 MHz low level ultrasound waves. *Iranian Journal of Radiation Research*, *3*, 163-169.
- Barclay, L. R. C., Locke, S. J., & MacNeil, J. M. (1985). Autoxidation in micelles. Synergism of vitamin C with lipid-soluble vitamin E and water-soluble Trolox. *Canadian Journal of Chemistry*, *63*, 366-374.

- Barclay, L. R. C., Locke, S. J., MacNeil, J. M., VanKessel, J., Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1984). Autoxidation of micelles and model membranes. Quantitative kinetic measurements can be made by using either water-soluble or lipid-soluble initiators with water-soluble or lipid-soluble chain-breaking antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, *106*, 2479-2481.
- Barrera, G. (2012). Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*, *2012*, 1-21.
- Bedard, L., Young, M. J., Hall, D., Paul, T., & Ingold, K. U. (2001). Quantitative studies on the peroxidation of human low-density lipoprotein initiated by superoxide and by charged and neutral alkylperoxyl radicals. *Journal of the American Chemical Society*, *123*, 12439-12448.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gomez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., & Lercker, G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, *12*, 1679-1719.
- Berret, J.-F. (2005). Evidence of overcharging in the complexation between oppositely charged polymers and surfactants. *Journal of Chemical Physics*, *123*, 1-35.
- Bianco, A., Serilli, A. M., & Melchioni, C. (2006). Molecular composition and quality/taste of olive oil: monoterpenes and natural phenols. *Archive for Organic Chemistry*, *2007*, 146-156.
- Bindoli, A., & Cavallini, L. (1980). *I radicali liberi – Aspetti biochimici e medici*. Padova: Piccin.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, *181*, 1199-1200.
- Bolt, J. D., & Turro, N. J. (1981). Measurement of the rates of detergent exchange between micelles and the aqueous phase using phosphorescent labeled detergents. *Journal of Physical Chemistry*, *85*, 4029-4033.
- Borriello, A., Cucciolla, V., Della Ragione, F., & Galletti, P. (2010). Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, *20*, 618-625.
- Bors, W., Michel, C., & Saran, M. (1984). Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, *796*, 312-319.
- Bowry, V. W., & Ingold, K. U. (1999). The unexpected role of vitamin E (α -tocopherol) in the peroxidation of human low-density lipoprotein. *Accounts of Chemical Research*, *32*, 27-34.
- Bowry, V. W., Ingold, K. U., & Stocker, R. (1992). Vitamin E in human low-density lipoprotein. *Biochemical Journal*, *288*, 341-344.
- Bowry, V. W., & Stocker, R. (1993). Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. *Journal of the American Chemical Society*, *115*, 6029-6044.
- Brenes, M., Romero, C., Garcia, A., Hidalgo, F. J., & Ruiz-Mendez, M. V. (2004). Phenolic compounds in olive oils intended for refining: formation of 4-ethylphenol during olive paste storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 8177-8181.

- Brittes, J., Lucio, M., Nunes, C., Lima, J. L. F. C., & Reis, S. (2010). Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. *Chemistry and Physics of Lipids*, *163*, 747-754.
- Buettner, G. R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *300*, 535-543.
- Buettner, G. R., & Jurkiewicz, B. A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation Research*, *145*, 532-541.
- Burton, G. W., Doba, T., Gabe, E. J., Hughes, L., Lee, F. L., Prasad, L., & Ingold, K. U. (1985). Autoxidation of biological molecules. 4. Maximizing the antioxidant activity of phenols. *Journal of the American Chemical Society*, *107*, 7053-7065.
- Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1981). Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *Journal of the American Chemical Society*, *103*, 6472-6477.
- Cabras, P., & Martelli, A. (2004). *Chimica degli alimenti*. Padova: Piccin-Nuova Libreria.
- Cabrini, L., Barzanti, V., Cipollone, M., Fiorentini, D., Grossi, G., Tolomelli, B., Zambonin, L., & Landi, L. (2001). Antioxidants and total peroxy radical-trapping ability of olive and seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 6026-6032.
- Calliste, C.-A., Trouillas, P., Allais, D.-P., Simon, A., & Duroux, J.-L. (2001). Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 3321-3327.
- Capella, P., Fedeli, E., Bonaga, G., & Lercker, G. (1997). *Manuale degli oli e dei grassi*. Milano: Tecniche Nuove.
- Caramia, G. (2004). L'olio extra vergine d'oliva. Dalla leggenda al razionale scientifico degli aspetti nutraceutici. *Pediatria Medica e Chirurgica (Medical and Surgical Pediatrics)*, *26*, 433-447.
- Cardinali, A., Cicco, N., Linsalata, V., Minervini, F., Pati, S., Pieralice, M., Tursi, N., & Lattanzio, V. (2010). Biological activity of high molecular weight phenolics from olive mill wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 8585-8590.
- Carr, A., & Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *13*, 1007-1024.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T., Lercker, G., Compagnone, D., & Fernandez-Gutierrez, A. (2005). Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 8918-8925.
- Carratù, B., & Sanzini, E. (2005). Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, *41*, 7-16.

- Caruso, F., Tanski, J., Villegas-Estrada, A., & Rossi, M. (2004). Structural basis for antioxidant activity of trans-resveratrol: ab initio calculations and crystal and molecular structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 7279-7285.
- Castle, L., & Perkins, M. J. (1986). Inhibition kinetics of chain-breaking phenolic antioxidants in SDS micelles. Evidence that intermicellar diffusion rates may be rate-limiting for hydrophobic inhibitors such as α -tocopherol. *Journal of the American Chemical Society*, *108*, 6381-6382.
- Cecchi, L., Migliorini, M., Cherubini, C., Giusti, M., Zanoni, B., Innocenti, M., & Mulinacci, N. (2013). Phenolic profiles, oil amount and sugar content during olive ripening of three typical Tuscan cultivars to detect the best harvesting time for oil production. *Food Research International*, *54*, 1876-1884.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, *10*, 178-182.
- Clark, L. C., Jr., Wolf, R., Granger, D., & Taylor, Z. (1953). Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *Journal of Applied Physiology*, *6*, 189-193.
- Commission Regulation (EEC), n. 2568/1991. On the characteristics of olive oil and olive residue oil and the relevant methods of analysis. *Official Journal of European Union Community*, *L248*, 1-82.
- Cornils, B., & Herrmann, W. A. (2004). *Aqueous-phase organometallic catalysis: concepts and applications*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Covas, M.-I., Ruiz-Gutierrez, V., de la Torre, R., Kafatos, A., Lamuela-Raventos, R. M., Osada, J., Owen, R. W., & Visioli, F. (2006). Minor components of olive oil: evidence to date of health benefits in humans. *Nutrition Reviews*, *64*, S20-S30.
- Cunha, S. C., Amaral, J. S., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2006). Quantification of tocopherols and tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 3351-3356.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, *43*, 348-361.
- Da Porto, C., Decorti, D., & Tubaro, F. (2012a). Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*, *36*, 401-404.
- Da Porto, C., Voinovich, D., Decorti, D., & Natolino, A. (2012b). Response surface optimization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) oil yield and oxidation stability by supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, *68*, 45-51.
- Da Silveira Vargas, F., Soares, D. G., Ribeiro, A. P. D., Hebling, J., & De Souza Costa, C. A. (2014). Protective effect of α -tocopherol isomer from vitamin E against the H_2O_2 induced toxicity on dental pulp cells. *BioMed Research International*, *2014*, 1-5.
- Dai, F., Chen, W.-F., & Zhou, B. (2008). Antioxidant synergism of green tea polyphenols with α -tocopherol and L-ascorbic acid in SDS micelles. *Biochimie*, *90*, 1499-1505.

- Dai, F., Chen, W.-F., Zhou, B., Yang, L., & Lui, Z.-L. (2009). Antioxidative effects of curcumin and its analogues against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. *Phytotherapy Research*, 23, 1220-1228.
- De Beer, D., Joubert, E., Geldenblom, W. C. A., & Manley, M. (2002). Phenolic compounds: a review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. *South African Journal Enology and Viticulture*, 23, 48-61.
- Del Carlo, M., Sacchetti, G., Di Mattia, C., Compagnone, D., Mastrocola, D., Liberatore, L., & Cichelli, A. (2004). Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4072-4079.
- Denisov, E. T., & Khudyakov, I. V. (1987). Mechanisms of action and reactivities of the free radicals of inhibitors. *Chemical Reviews*, 87, 1313-1357.
- Doba, T., Burton, G. W., Ingold, K. U., & Matsuo, M. (1984). α -tocopheroxyl decay: lack of effect of oxygen. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 461-462.
- Eastwood, M. A. (1999). Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease? *QJM*, 92, 527-530.
- El Riachy, M., Priego-Capote, F., Leon, L., Rallo, L., & Luque de Castro, M. D. (2011). Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: hydrophilic phenols: a key factor for virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 678-691.
- Elisia, I., Young, J. W., Yuan, Y. V., & Kitts, D. D. (2013). Association between tocopherol isoform composition and lipid oxidation in selected multiple edible oils. *Food Research International*, 52, 508-514.
- Erben-Russ, M., Michel, C., Bors, W., & Saran, M. (1987). Absolute rate constants of alkoxy radical reactions in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry*, 91, 2362-2365.
- Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G., & Waeg, G. (1991). Role of vitamin E in preventing the oxidation of low density lipoprotein. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 314S-321S.
- Esterbauer, H. & Ramos, P. (1996). Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 127, 31-64.
- Fabris, S., Momo, F., Ravagnan, G., & Stevanato, G. (2008). Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophysical Chemistry*, 135, 76-83.
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.
- Fauconneau, B., Waffo-Teguo, P., Huguët, F., Barrier, L., Decendit, A., & Merillon, J.-M. (1997). Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sciences*, 61, 2103-2110.
- Filip, V., Plockova, M., Smidrkal, J., Spickova, Z., Melzoch, K., & Schmidt, S. (2003). Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chemistry*, 83, 585-593.
- Frankel, E. N. (1984). Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 1908-1917.

- Frankel, E. N. (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*, *57*, 51-55.
- Frankel, E. N. (2005). *Lipid oxidation*. Bridgwater: The Oily Press.
- Frankel, E. N. (2010). Chemistry of extra virgin olive oil: adulteration, oxidative stability, and antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 5991-6006.
- Frankel, E. N. (2011). Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 785-792.
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 1925-1941.
- Fruhwrth, G. O., Wenzl, T., El-Toukhy, R., Wagner, F. S., & Hermetter, A. (2003). Fluorescence screening of antioxidant capacity in pumpkin seed oils and other natural oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *105*, 266-274.
- Fuentes, E., Baez, M. E., Bravo, M., Cid, C., & Labra, F. (2012). Determination of total phenolic content in olive oil samples by UV-visible spectrometry and multivariate calibration. *Food Analytical Methods*, *5*, 1311-1319.
- Gandul-Rojas, B., Cepero, M. R.-L., & Minguéz-Mosquera, M. I. (2000). Use of chlorophyll and carotenoid pigment composition to determine authenticity of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *77*, 853-858.
- Garcia, A., Ruiz-Mendez, M. V., Romero, C., & Brenes, M. (2006). Effect of refining on the phenolic composition of crude olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *83*, 159-164.
- Gerogiannaki-Christopoulou, M., Athanasopoulos, P., Kyriakidis, N., Gerogiannaki, I. A., & Spanos, M. (2006). Trans-resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. *Food Control*, *17*, 700-706.
- Giddings, J. C., & Shin, H. K. (1962). Departure from the steady state in chain reactions with two or more radicals. *Journal of Chemical Physics*, *36*, 640-649.
- Giuffrida, D., Salvo, F., Salvo, A., La Pera, L., & Dugo, G. (2007). Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. *Food Chemistry*, *101*, 833-837.
- Goupy, P., Vulcain, E., Caris-Veyrat, C., & Dangles, O. (2007). Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: mechanism of action and synergism. *Free Radical Biology and Medicine*, *43*, 933-946.
- Gregoris, E. (2010). Misura delle proprietà antiossidanti di prodotti tipici dell'agroalimentare; progettazione e messa a punto di biosensori. *Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche*. Università Ca' Foscari di Venezia.
- Gregoris, E., Pereira Lima, G. P., Fabris, S., Bertelle, M., Sicari, M., & Stevanato, R. (2013). Antioxidant properties of Brazilian tropical fruits by correlation between different assays. *BioMed Research International*, *2013*, 1-8.
- Gregoris, E., & Stevanato, R. (2010). Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity

of Venetian propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 76-82.

Gunstone, F. D. (2006). *Modifying lipids for use in food*. Abington: Woodhead Publishing.

Gurr, M. I., Harwood, J. L., & Frayn, K. N. (2002). *Lipid biochemistry – An introduction*. Oxford: Blackwell Science.

Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58, 966-968.

Hacisevki, A. (2009). An overview of ascorbic acid biochemistry. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara*, 38, 233-255.

Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70, 257-265.

Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715S-725S.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press.

Hashempour, A., Ghazvini, R. F., Bakhshi, D., & Sanam, S. A. (2010). Fatty acids composition and pigments changing of virgin olive oil (*Olea europea* L.) in five cultivars grown in Iran. *Australian Journal of Crop Science*, 4, 258-263.

Hauenstein, B. L., Dressick, W. J., Buell, S. L., Demas, J. N., & DeGraff, B. A. (1983). A new probe of solvent accessibility of bound photosensitizers. 1. Ruthenium(II) and osmium(II) photosensitizers in sodium lauryl sulfate micelles. *Journal of the American Chemical Society*, 105, 4251-4255.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

Izuta, H., Narahara, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., Kondo, S., & Hara, H. (2009). 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of bee products and their constituents determined by ESR. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32, 1947-1951.

Jerman Klen, T., & Mozetic Vodopivec, B. (2011). Ultrasonic extraction of phenols from olive mill wastewater: comparison with conventional methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12725-12731.

Jerman Klen, T., & Mozetic Vodopivec, B. (2012). Optimisation of olive oil phenol extraction conditions using a high-power probe ultrasonication. *Food Chemistry*, 134, 2481-2488.

Juranic, Z., Ziza, K. Z. (2005). Biological activity of berry: from antioxidant capacity to anticancer effects. *BioFactors*, 23, 207-211.

Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41-60.

Karten, B., Beisiegel, U., Gercken, G., & Kontush, A. (1997). Mechanisms of lipid peroxidation in human blood plasma: a kinetic approach. *Chemistry and Physics of Lipids*, 88, 83-96.

- Kiritsakis, A., Kanavouras, A., & Kiritsakis, K. (2002). Chemical analysis, quality control and packaging issues of olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 628-638.
- Kontush, A., Finckh, B., Karten, B., Kohlschutter, A., & Beisiegel, U. (1996). Antioxidant and prooxidant activity of α -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 37, 1436-1448.
- Kostadinovic-Velickovska, S., & Mitrev, S. (2013). Characterization of fatty acid profile, polyphenolic content and antioxidant activity of cold pressed and refined edible oils from Macedonia. *Journal of Food Chemistry and Nutrition*, 1, 16-21.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E., & Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 113, 71S-88S.
- Krumova, K., Friedland, S., & Cosa, G. (2012). How lipid unsaturation, peroxy radical partitioning, and chromanol lipophilic tail affect the antioxidant activity of α -tocopherol: direct visualization via high-throughput fluorescence studies conducted with fluorogenic α -tocopherol analogues. *Journal of the American Chemical Society*, 134, 10102-10113.
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.
- Lehninger, A. L. (1979). *Biochimica*. Bologna: Zanichelli.
- Li, Q.-T., Yeo, M. H., & Tan, B. K. (2000). Lipid peroxidation in small and large phospholipid unilamellar vesicles induced by water-soluble free radical sources. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273, 72-76.
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constant. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658-666.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., & Darnell, J. (1995). *Molecular cell biology*. New York: Scientific American Books.
- Lopez-Alarcon, C., Aspee, A., & Lissi, E. (2007). Antioxidant reactivity evaluated by competitive kinetics: influence of the target molecule concentration. *Food Chemistry*, 104, 1430-1435.
- Lopez-Alarcon, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.
- Losada-Barreiro, S., Sanchez-Paz, V., & Bravo-Diaz, C. (2015). Transfer of antioxidants at the interfaces of model food emulsions: distributions and thermodynamic parameters. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13, 876-885.
- Lu, J.-M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, 840-860.

- Ma, Y.-T., & Cheung, P. C. K. (2007). Spectrophotometric determination of phenolic compounds by enzymatic and chemical methods – A comparison of structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 4222-4228.
- Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, *613*, 1-19.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, *81*, 230S-242S.
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, *21*, 361-370.
- Mattson, F. H., Grundy, S. M., & Crouse, J. R. (1982). Optimizing the effect of plant sterols on cholesterol absorption in man. *American Journal of Clinical Nutrition*, *35*, 697-700.
- Mihaljevic, B., Tartaro, I., Ferreri, C., & Chatgililoglu, C. (2011). Linoleic acid peroxidation vs. isomerization: a biomimetic model of free radical reactivity in the presence of thiols. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *9*, 3541-3548.
- Milardovic, S., Ivekovic, D., & Grabaric, B. S. (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, *68*, 175-180.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, *84*, 407-412.
- Milne, L., Stewart, I., & Bremner, D. H. (2013). Comparison of hydroxyl radical formation in aqueous solutions at different ultrasound frequencies and powers using the salicylic acid dosimeter. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*, 984-989.
- Momo, F., Fabris, S., Wisniewska, A., Fiore, C., Bindoli, A., Scutari, G., & Stevanato, R. (2003). Correlation between fluidising effects on phospholipid membranes and mitochondrial respiration of propofol and p-nitrosophenol homologues. *Biophysical Chemistry*, *103*, 213-222.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., & Miniati, E. (1992). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*, 1571-1576.
- Morales, P., Ferreira, I. C. F. R., Carvalho, A. M., Fernandez-Ruiz, V., Sanchez-Mata, M. C., Camara, M., Morales, R., & Tardio, J. (2013). Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *115*, 176-185.
- Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Horton, H. R., Ochs, R. S., & Rawn, J. D. (1996). *Biochimica*. Milano: McGraw-Hill.
- Morello, J.-R., Vuorela, S., Romero, M.-P., Motilva, M.-J., & Heinonen, M. (2005). Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the Arbequina cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 2002-2008.

- Nair, U., Bartsch, H., & Nair, J. (2007). Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 43, 1109-1120.
- Nelder, J. A., & Mead, R. (1965). A simplex method for function minimization. *Computer Journal*, 7, 308-313.
- Nelder, J. A., & Mead, R. (1965). *Computer Journal*, 7, 308-313. Descritto in Nash, J. C. *Compact numerical methods for computers*. Bristol: Adam Hilger.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2014). *I principi di biochimica di Lehninger*. Bologna: Zanichelli.
- Ness, A. R., & Powles, J. W. (1997). Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *International Journal of Epidemiology*, 26, 1-13.
- Newmark, H. L. (1997). Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 6, 1101-1103.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 503-515.
- Niki, E., Saito, T., Kawakami, A., & Kamiya, Y. (1984). Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 4177-4182.
- Ninfali, P., Aluigi, G., Bacchiocca, M., & Magnani, M. (2001). Antioxidant capacity of extra-virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 243-247.
- Ohlow, M. J., Granold, M., Schreckenberger, M., & Moosmann, B. (2012). Is the chromanol head group of vitamin E nature's final truth on chain-breaking antioxidants? *FEBS Letters*, 586, 711-716.
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000a). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36, 1235-1247.
- Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000b). Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 647-659.
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K., & Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22, 18-35.
- Perez-Lopez, F. R., Chedraui, P., Haya, J., & Cuadros, J. L. (2009). Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas*, 64, 67-79.
- Perona, J. S., Cabello-Moruno, R., & Ruiz-Gutierrez, V. (2006). The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 429-445.
- Pirisi, F. M., Cabras, P., Cao Falqui, C., Migliorini, M., & Muggelli, M. (2000). Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1191-1196.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Serban, A. I., & Fafaneata, C. (2014). Electrochemical methods for ascorbic acid

determination. *Electrochimica Acta*, 121, 443-460.

- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food – Practical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Porter, N. A., Caldwell, S. E., & Mills, K. A. (1995). Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30, 277-290.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Privat, C., Telo, J. P., Bernardes-Genisson, V., Vieira, A., Souhard, J.-P., & Nepveu, F. (2002). Antioxidant properties of trans- ϵ -viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1213-1217.
- Pryor, W. A., Cornicelli, J. A., Devall, L. J., Tait, B., Trivedi, B. K., Witiak, D. T., & Wut, M. (1993). A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *Journal of Organic Chemistry*, 58, 3521-3532.
- Pryor, W. A., Kaufman, M. J., & Church, D. F. (1985). Autoxidation of micelle-solubilized linoleic acid. Relative inhibitory efficiencies of ascorbate and ascorbyl palmitate. *Journal of Organic Chemistry*, 50, 281-283.
- Pryor, W. A., Strickland, T., & Church, D. F. (1988). Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous sodium dodecyl sulfate micelle solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 110, 2224-2229.
- Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 716-721.
- Qi, L., Chapel, J.-P., Castaing, J.-C., Fresnais, J., & Berret, J.-F. (2007). Stability and adsorption properties of electrostatic complexes: design of hybrid nanostructures for coating applications. *Langmuir*, 23, 11996-11998.
- Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, M. C., Gomez, J. A., Huertas, J. R., & Mataix, J. (2002). Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. *Food Chemistry*, 76, 461-468.
- Ramirez-Tortosa, M. C., Urbano, G., Lopez-Jurado, M., Nestares, T., Gomez, M. C., Mir, A., Ros, E., Mataix, J., & Gil, A. (1999). Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *Journal of Nutrition*, 129, 2177-2183.
- Rhayem, Y., Therond, P., Camont, L., Couturier, M., Beaudeau, J.-L., Legrand, A., Daniel, J., Gardes-Albert, M., & Bonnefont-Rousselot, D. (2008). Chain-breaking activity of resveratrol and piceatannol in a linoleate micellar model. *Chemistry and Physics of Lipids*, 155, 48-56.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trend in Plant Science*, 2, 152-159.

- Richard, J. L. (1987). Coronary risk factors. The French paradox. *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux*, *80*, 17-21.
- Riesz, P., Berdahl, D., & Christman, C. L. (1985). Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions. *Environmental Health Perspectives*, *64*, 233-252.
- Rigo, A., Vianello, F., Clementi, G., Rossetto, M., Scarpa, M., Vrhovsek, U., & Mattivi, F. (2000). Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 1996-2002.
- Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, *92*, 235-254.
- Rossetto, M., Lante, A., Vanzani, P., Spettoli, P., Scarpa, M., & Rigo, A. (2005). Red chicories as potent scavengers of highly reactive radicals: a study on their phenolic composition and peroxy radical trapping capacity and efficiency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 8169-8175.
- Rossetto, M., Vanzani, P., Mattivi, F., Lunelli, M., Scarpa, M., & Rigo, A. (2002). Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *408*, 239-245.
- Ryan, D., & Robards, K. (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst*, *123*, 31R-44R.
- Sakouhi, F., Absalon, C., Flamini, G., Cioni, P. L., Kallel, H., & Boukhchina, S. (2010). Lipid components of olive oil from Tunisian Cv. Sayali: characterization and authenticity. *Comptes Rendus – Biologies*, *333*, 642-648.
- Samaniego Sanchez, C., Troncoso Gonzalez, A. M., Garcia-Parrilla, M. C., Quesada Granados, J. J., Lopez Garcia de la Serrana, H., & Lopez Martinez, M. C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, *593*, 103-107.
- San Miguel, S. M., Opperman, L. A., Allen, E. P., Zielinski, J., & Svoboda, K. K. H. (2012). Bioactive polyphenol antioxidants protect oral fibroblasts from ROS-inducing agents. *Archives of Oral Biology*, *57*, 1657-1667.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *76*, 270-276.
- Sanchez de Medina, V., Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2015). Characterization of monovarietal virgin olive oils by phenols profiling. *Talanta*, *132*, 424-432.
- Sarolic, M., Gugic, M., Friganovic, E., Tuberoso, C. I. G., & Jerkovic, I. (2015). Phytochemicals and other characteristics of Croatian monovarietal extra virgin olive oils from Oblica, Lastovka and Levantinka varieties. *Molecules*, *20*, 4395-4409.
- Saulle, R., & La Torre, G. (2010). The Mediterranean diet, recognized by UNESCO as a cultural heritage of humanity. *Italian Journal of Public Health*, *7*, 414-415.
- Scarpa, M., Stevanato, R., Viglino, P., & Rigo, A. (1983). Superoxide ion as active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecular oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, *258*, 6695-6697.

- Schnitzer, E., Pinchuk, I., & Lichtenberg, D. (2007). Peroxidation of liposomal lipids. *European Biophysics Journal*, 36, 499-515.
- Schoefs, B. (2002). Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 361-371.
- Servili, M., Esposito, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F., Selvaggini, R., & Montedoro, G. F. (2009). Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*, 17, 76-84.
- Servili, M., & Montedoro, G. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 602-613.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A., Jr. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Smirnova, L. P., & Pervykh, L. N. (1998). Quantitative determination of the total content of flavonoids in the flowers of immortelle *Helichrysum arenarium*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 32, 321-324.
- Spiteller, G. (1998). Linoleic acid peroxidation – the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein – and its relationship to chronic diseases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 95, 105-162.
- Spiteller, G. (2001). Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Experimental Gerontology*, 36, 1425-1457.
- Spiteller, G. (2007). The important role of lipid peroxidation processes in aging and age dependent diseases. *Molecular Biotechnology*, 37, 5-12.
- Stark, A. H., & Madar, Z. (2002). Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutrition Reviews*, 60, 170-176.
- Steinfeld, J. I., Francisco, J. S., & Hase, W. L. (1989). *Chemical kinetics and dynamics*. Englewood Cliffs: Prentice Hall.
- Stevanato, R., Fabris, S., Bertelle, M., Gregoris, E., & Momo, F. (2009). Phenolic content and antioxidant properties of fermenting musts and fruit and vegetable fresh juices. *Acta Alimentaria*, 38, 193-203.
- Stevanato, R., Fabris S., & Momo F. (2004). New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6287-6293.
- Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 321-336.
- Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7449-7454.
- Suntres, Z. E. (2011). Liposomal antioxidants for protection against oxidant-induced damage. *Journal of Toxicology*, 2011, 1-16.
- Szydłowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., & Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76, 899-905.

- Takashima, M., Horie, M., Shichiri, M., Hagihara, Y., Yoshida, Y., & Niki, E. (2012). Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: a rational basis and practical application. *Free Radical Biology and Medicine*, *52*, 1242-1252.
- Tasioula-Margari, M., & Okogeri, O. (2001). Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. *Food Chemistry*, *74*, 377-383.
- Tomita, K., Machmudah, S., Quitain, A. T., Sasaki, M., Fukuzato, R., & Goto, M. (2013). Extraction and solubility evaluation of functional seed oil in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, *79*, 109-113.
- Tubaro, F., Ghiselli, A., Rapuzzi, P., Maiorino, M., & Ursini, F. (1998). Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radical Biology and Medicine*, *24*, 1228-1234.
- Tubaro, F., Micossi, E., & Ursini, F. (1996). The antioxidant capacity of complex mixtures by kinetic analysis of crocin bleaching inhibition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *73*, 173-179.
- Tubaro, F., Rapuzzi, P., & Ursini, F. (1999). Kinetic analysis of antioxidant capacity of wine. *BioFactors*, *9*, 37-47.
- Tuck, K. L., & Hayball, P. J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*, 636-644.
- Tura, D., Failla, O., Bassi, D., Attilio, C., & Serraiocco, A. (2013). Regional and cultivar comparison of Italian single cultivar olive oils according to flavor profiling. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *115*, 196-210.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *39*, 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, *160*, 1-40.
- Velasco, J., & Dobarganes, C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *104*, 661-676.
- Vertuani, S., Angusti, A., & Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, *10*, 1677-1694.
- Villeneuve, L., Alberti, L., Steghens, J.-P., Lancelin, J.-M., & Mestas, J.-L. (2009). Assay of hydroxyl radicals generated by focused ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, *16*, 339-344.
- Visioli, F., Bellomo, G., & Galli, C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *247*, 60-64.
- Volk, L., Richardson, W., Lau, K. H., Hall, M., & Lin, S. H. (1977). Steady state and equilibrium approximations in reaction kinetics. *Journal of Chemical Education*, *54*, 95-97.
- Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 701-705.

- Waterman, E., & Lockwood, B. (2007). Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative Medicine Review*, 12, 331-342.
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., & Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, 187, 33-37.
- Willet, W. C. (2001). *Eat, drink, and be healthy: the Harvard medical school guide to healthy eating*. New York: McGraw-Hill.
- Wills, E. D. (1966). Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochemical Journal*, 99, 667-676.
- Wright, J. S., Johnson, E. R., & DiLabio, G. A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 1173-1183.
- Yen, G.-C., Duh, P.-D., & Tsai, H.-L. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*, 79, 307-313.
- Yildiz, F. (2010). *Advances in food biochemistry*. New York: CRC Press, Taylor & Francis.
- Yu, W., Liu, Z.-Q., & Liu, Z.-L. (1999). Antioxidant effect of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of linoleic acid in micelles. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 969-974.
- Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J. A., & Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 675-683.
- Zennaro, L., Rossetto, M., Vanzani, P., De Marco, V., Scarpa, M., Battistin, L., & Rigo, A. (2007). A method to evaluate capacity and efficiency of water soluble antioxidants as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462, 38-46