



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE**

GLI ANTIOSSIDANTI ALIMENTARI BHA E BHT

Prof. Relatore: Fernando Formaggio

Laureanda: Elena Maran

1225395

Anno accademico: 2021/2022

INDICE:

1. INTRODUZIONE	1
2 ANTIOSSIDANTI BHA E BHT	3
2.1. Sintesi	3
2.1.1 Sintesi del BHA	3
2.1.2 Sintesi del BHT.....	3
2.2. Meccanismo d'azione	4
2.2.1 Meccanismo d'azione combinato	9
2.3. Metaboliti	10
2.3.1 Metaboliti del BHA	10
2.3.2. Metaboliti del BHT	10
2.4. ANALISI	12
3. CONFRONTO CON GLI ANTIOSSIDANTI NATURALI	14
4. CONCLUSIONI	16
APPENDICE 1	18
BIBLIOGRAFIA	20
Ringraziamenti	22

1. INTRODUZIONE

La conservazione degli alimenti è da sempre una tematica importante nella vita quotidiana dell'uomo perché essa permette i commerci e di avere scorte alimentari nei periodi dell'anno meno prosperi.

È da sempre che l'uomo cerca nuove soluzioni per conservare gli alimenti. Gli Egizi conservavano la carne sotto sale e macerata nel succo di limone ed inoltre essiccavano la frutta. Gli antichi greci usavano principalmente il sale per la carne e il pesce, il miele per la frutta e l'aceto per mascherare il gusto dei cibi deperiti. Usavano anche l'affumicatura e l'essiccazione. Spesso cospargevano la carne con l'olio o degli unguenti per evitare che l'aria potesse farla deperire. Gli antichi romani invece usavano la salamoia per verdura, pesce, molluschi e frutta per commercializzarli senza che si deperissero. Per la carne si usava l'affumicatura, perché la salatura era molto costosa e non sempre dava risultati eccellenti. Le spezie erano importanti per mascherare il gusto e l'odore degli alimenti andati a male, ma essendo molto costose solo le persone benestanti potevano permetterselo. Nel medioevo non si sperimentarono altri modi per conservare gli alimenti, in quanto i metodi che possedevano erano consolidati e funzionavano adeguatamente (salamoia, sotto sale, miele, grasso animale e olio) (enciclopedia Treccani).

Ad oggi nel mondo dei conservanti esistono molte categorie: antiossidanti che prevengono l'ossidazione dei lipidi, antimicotici che bloccano la proliferazione di muffe e batteri e agenti anti-imbrunimento. Gli additivi alimentari sono regolati da normative che variano da paese a paese. In Italia si fa riferimento alla normativa europea numero 231 del 2012, secondo la quale i conservanti sono catalogati con un numero preceduto dalla lettera E e devono essere sempre indicati nell'etichetta.

Innanzitutto, definiamo il termine antiossidante: è una sostanza capace di impedire o rallentare l'ossidazione dei composti facilmente ossidabili. Gli antiossidanti a loro volta si dividono in due classi: gli antiossidanti sintetici e gli antiossidanti naturali. I primi sono di sintesi e sono stati studiati appositamente per evitare l'ossidazione dei lipidi, i secondi invece si trovano in natura e sono normalmente contenuti nella frutta e nella verdura. Tra gli antiossidanti sintetici si trovano il BHA (terz-butildrossianisolo, E320), il BHT (terz-butildrossitoluene E321), il TBHQ (terz-butildrossichinone, E319), il palmitato di ascorbile (E304) e il gallato di propile (E310) (figura 1). Antiossidanti naturali sono invece le vitamine A (caroteni) ed E (tocoferoli), che sono liposolubili, e la vitamina C che è idrosolubile (figura 2).

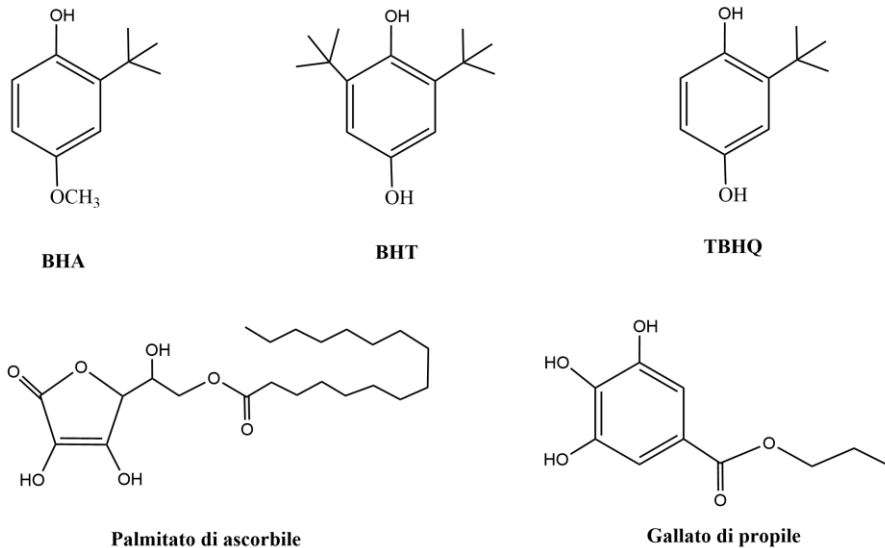


Figura 1 Strutture molecolari di BHA, BHT, TBHQ, palmitato di ascorbile e gallato di propile

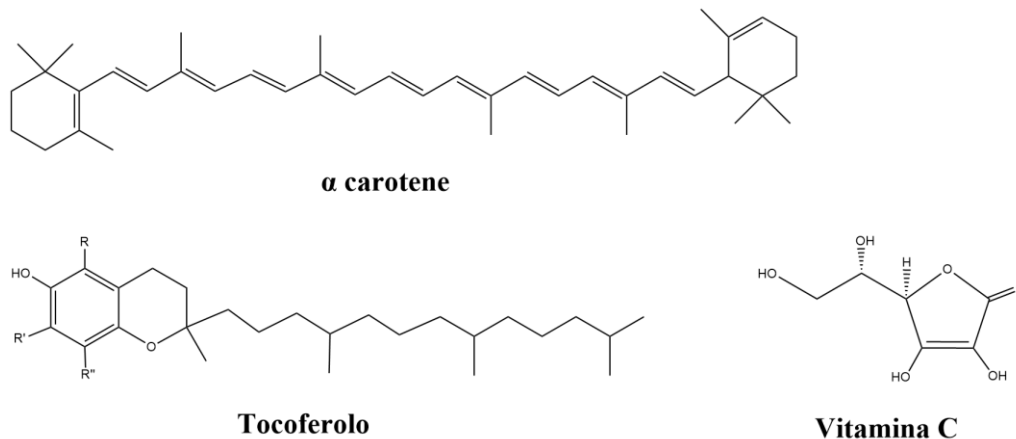


Figura 2 Strutture molecolari di caroteni, tocoferoli e vitamina C

Gli antiossidanti più usati sono: i solfiti nei vini e nella carne, la vitamina C (o acido ascorbico) negli alimenti freschi come i succhi di frutta, la vitamina E (o tocoferoli), i carotenoidi (di colore giallo, arancione, rosso), la vitamina A (o retinolo), che si trova in alcuni alimenti animali oppure può derivare dal β -carotene, e poi la classe dei polifenoli.

Gli antiossidanti possono essere molto delicati ed essere deteriorati dalla luce UV e dal calore. Sono pure sensibili all'ossidazione, ad acidi e a basi quando non sono all'interno degli alimenti. Per esempio, la vitamina C si deteriora molto velocemente all'aria, mentre la vitamina A è molto sensibile alla luce. Queste caratteristiche variano da antiossidante a antiossidante, ma tipicamente risultano più stabili gli antiossidanti sintetici, a patto che non si usino ambienti fortemente acidi o basici o elevate temperature.

In questo elaborato mi sono concentrata sull'analisi del BHA e del BHT.

2. ANTIOSSIDANTI BHA E BHT

2.1. Sintesi

2.1.1 Sintesi del BHA

Il BHA può essere preparato dal 4-metossifenolo e dall'alcol terz-butilico a 150°C usando un catalizzatore a base di silice o ossido di alluminio, figura 3 (EFSA Journal, 2011).

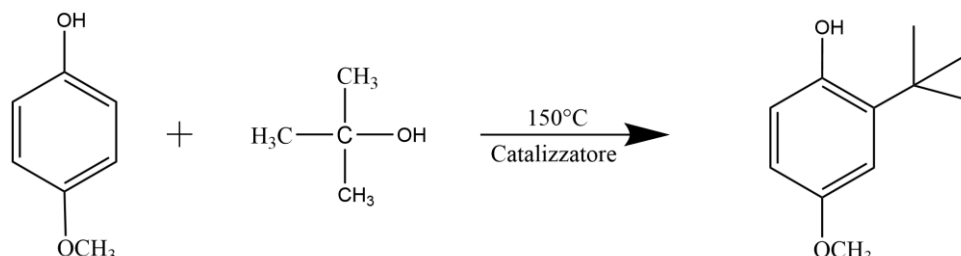


Figura 3 Sintesi del BHA con un catalizzatore

Ma si può partire anche dalla metilazione dell'idrochinone: si genera un intermedio che dà una miscela di 2-terz-butil-4-idrossianisolo e 3-terz-butil-4-idrossianisolo quando trattato con alcol terz-butilico e acido fosforico, figura 4 (EFSA Journal, 2011).

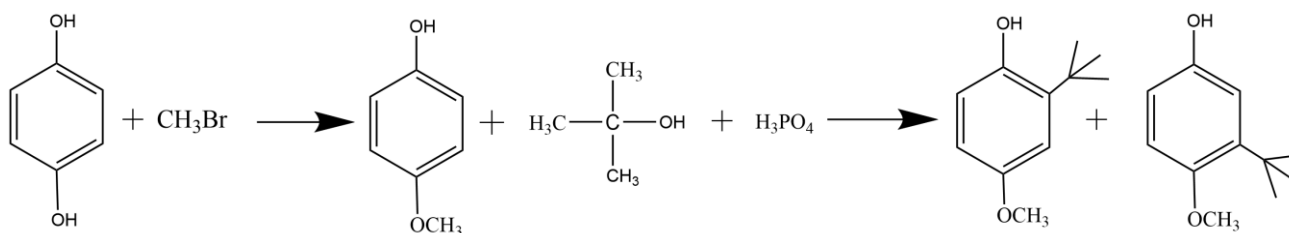


Figura 4 Sintesi del BHA a partire dall'idrochinone

Un'altra via sintetica che parte dall'idrochinone prevede la sua tert-butilazione e la successiva metilazione con dimetilsolfato e idrossido di sodio. Anche in questo caso si ottiene una miscela dei due isomeri del BHA, figura 5 (EFSA Journal, 2011).

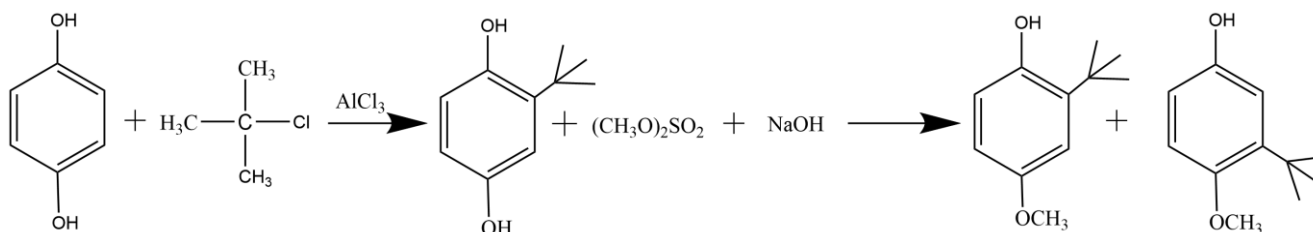


Figura 5 Sintesi alternativa del BHA a partire dall'idrochinone.

2.1.2 Sintesi del BHT

Il BHT è preparato con un processo a più stadi dalla reazione del p-cresolo (4-metilfenolo) con isobutilene di elevata purezza (2-metilpropene) utilizzando una catalisi acida (figura 6) (EFSA Journal, 2012). Dopo la neutralizzazione con l'aggiunta di carbonato di sodio, il BHT viene cristallizzato con isopropanolo.

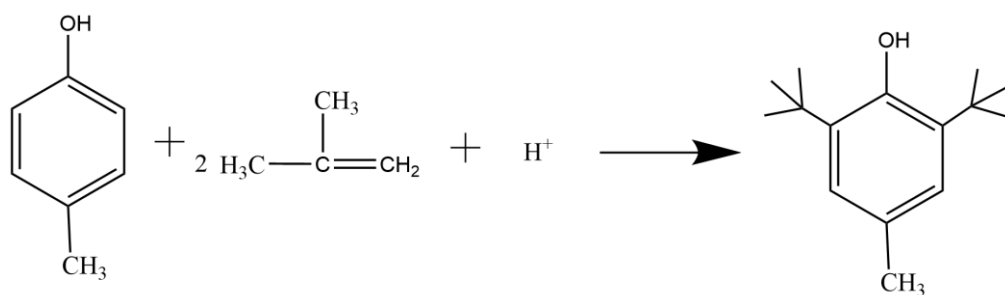
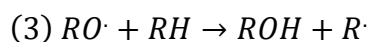
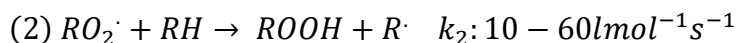
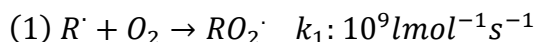


Figura 6 Sintesi BHT

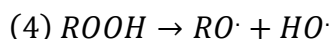
2.2. Meccanismo d'azione

Le specie reattive radicaliche sono radicali liberi localizzati sull'ossigeno (Yehye, 2015). Esistono in diverse forme come gli idrossidi ($\text{HO}\cdot$), i superossidi ($\text{O}_2\cdot^-$), i perossidi ($\text{ROO}\cdot$), gli alcossili ($\text{RO}\cdot$) e gli ossidi nitrici ($\text{NO}\cdot$) (Yehye, 2015). Le specie reattive radicaliche possono ossidare i prodotti alimentari e degradare, ad esempio, grassi ed oli. Queste reazioni avvengono naturalmente nel tempo, ossia quando i prodotti vengono stoccati, ma possono essere favorite dal riscaldamento (Yehye, 2015).

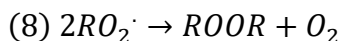
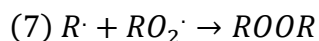
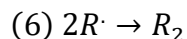
I perossidi e i radicali liberi ossidrilici che si formano durante gli stadi di propagazione e di scissione radicalica delle catene sono elencati di seguito (Belitz, 2009; Gutierrez-del-Rio, 2021):



Dalla rottura omolitica della catena si hanno:



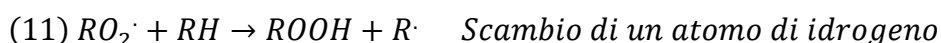
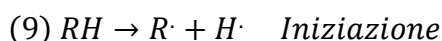
Si hanno anche reazioni di terminazione che generano prodotti stabili:



La prevenzione o il ritardo di questi processi di ossidazione è essenziale per l'industria alimentare e per tutta la catena di qualità degli alimenti coinvolta (Yehye, 2015). Sono usati molti metodi per l'inibizione dell'ossidazione, come ad esempio la prevenzione dell'ingresso di ossigeno, le basse temperature, l'inattivazione degli enzimi che catalizzano l'ossidazione, la riduzione della pressione di ossigeno, e l'uso di un confezionamento adeguato (Yehye, 2015). Un altro metodo per la protezione contro l'ossidazione dei lipidi è l'utilizzo di specifici additivi, che inibiscono o eliminano le reazioni di decomposizione (Yehye, 2015) attraverso l'interruzione della propagazione dei radicali liberi grazie a uno o più meccanismi: (1) trasformando le specie che iniziano la perossidazione degli acidi

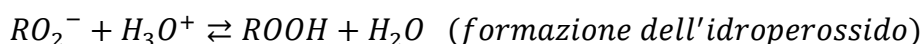
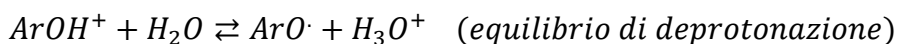
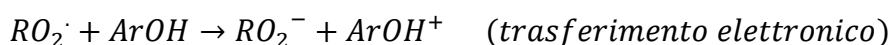
grassi in composti non radicalici, privi di reattività; (2) chelando ioni metallici, in particolare Fe^{2+} , che altrimenti possono catalizzare processi ossidativi, che formano in special modo radicali idrossidi, e possono decomporre gli idroperossidi attraverso la reazione di Fenton (appendice 1); (3) catturando $\bullet O_2^-$ e prevenendo la formazione di perossidi; (4) frenando le reazioni di autossidazione a catena; (5) riducendo la concentrazione di O_2 localizzato (Yehye, 2015). Gli antiossidanti più efficaci sono quelli che interrompono le reazioni radicaliche libere a catena (Yehye, 2015). Spesso contengono anelli aromatici o fenolici che donano atomi di idrogeno ai radicali liberi diventando a loro volta radicali (Yehye, 2015). Ci sono due vie nell'ossidazione nelle quali gli antiossidanti possono giocare un ruolo preventivo.

Il primo meccanismo è il trasferimento di un atomo di H, l'importante caso dell'ossidazione dei lipidi (Yehye, 2015; Mishra, 2021; Gutierrez-del-Rio, 2021). Una volta che il radicale R è stato formato (9), gli stadi (10) e (11) danno una reazione a catena, producendo da molte molecole lipidiche (R-H) idroperossidi lipidici (ROOH) (Yehye, 2015). La reazione (10) è molto veloce (circa $10^9 M^{-1}s^{-1}$), mentre la (11) è più lenta ($10^1 M^{-1}s^{-1}$). Il ruolo dell'antiossidante ArOH è quello di interrompere la reazione a catena secondo lo stadio (12).



Per essere efficace, il radicale $ArO\cdot$ deve essere un radicale libero relativamente stabile, così da reagire lentamente con il substrato RH ma rapidamente con $ROO\cdot$, da cui il termine "antiossidanti a rottura di catena" (Yehye, 2015; Gutierrez-del-Rio, 2021).

Il secondo possibile meccanismo con cui un antiossidante può deattivare i radicali liberi è il trasferimento di elettroni (Yehye, 2015; Mishra, 2021). In questo caso, si forma per primo il radicale catione che è seguito da una rapida e reversibile deprotonazione in soluzione, mostrato nello schema seguente:



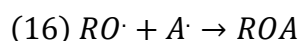
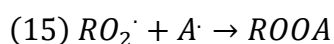
L'efficacia di un antiossidante può essere valutata da un esame comparativo utilizzando un "fattore antiossidante" (AF):

$$AF = \frac{I_A}{I_0}$$

dove I_A è il periodo di induzione dell'ossidazione di un grasso o un olio in presenza di antiossidante e I_0 è il periodo di induzione dell'ossidazione di un grasso o un olio senza antiossidante (Belitz, 2009). L'efficacia dell'antiossidante aumenta all'aumentare del valore AF.

Gli antiossidanti fenolici formano una classe importante di composti che servono per inibire l'ossidazione con un'importanza sia commerciale sia biologica. La variazione di struttura degli antiossidanti fenolici può giocare un ruolo importante nelle proprietà fisiche, che comportano differenze nelle loro attività antiossidanti. Il BHA e il BHT sono fenoli ingombrati per la presenza del gruppo terz-butilico e sono estremamente efficaci come antiossidanti primari (Yehye, 2015).

Gli antiossidanti che contengono un gruppo fenolico sono i più importanti nell'evitare l'ossidazione nel cibo (Belitz, 2009). Nella reazione 13 e 14 si formano dei radicali che sono stabilizzati da un sistema di risonanza aromatico. A differenza dei perossidi e dei radicali liberi, non sono in grado di astrarre un atomo di idrogeno da una catena insatura di acido grasso e di conseguenza non possono iniziare l'ossidazione dei lipidi (Belitz, 2009; Gutierrez-del-Rio, 2021). I prodotti formati dalla reazione 15 e 16 sono relativamente stabili, di conseguenza l'autossidazione radicalica delle catene si interrompe prima perché coinvolge meno atomi.



Lo schema mostra che una molecola di antiossidante si combina con due radicali. Perciò la massima stechiometria raggiungibile ha fattore $n=2$ (Belitz, 2009). In pratica, il fattore n ha un valore compreso tra 1 e 2 in base all'antiossidante usato. Gli antiossidanti, oltre al loro principale ruolo come inibitori di radicali, possono anche ridurre parzialmente la quantità di idroperossidi.

Il BHA in commercio è una miscela di due isomeri, il 2-terz-butil-4-idrossianisolo e il 3-terz-butil-4-idrossianisolo (figura 7). Il secondo isomero è considerato un miglior antiossidante rispetto al primo (Yehye, 2015).

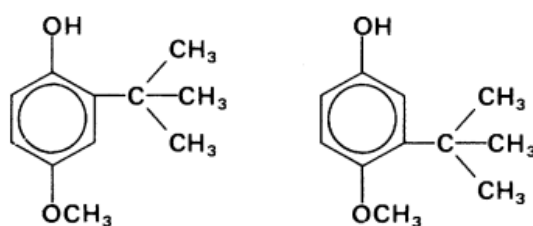


Figura 7. Struttura di 2- e 3-terz-butil-4-idrossianisolo (BHA), isomeri presenti nel prodotto commerciale.

È un antiossidante liposolubile usato ampiamente in oli sfusi e in emulsioni di olio in acqua, come ad esempio la soia e l'olio di palma nei cereali e nei prodotti dolciari (Yehye, 2015). È anche ottimo nella cottura in forno grazie alla sua stabilità al calore e all'alcalinità, anche se il suo utilizzo nella frittura è limitato a causa della sua volatilità (Yehye, 2015). Inoltre, il BHA possiede attività antimicrobica ed è conosciuto come co-antiossidante (CoAH) nella rigenerazione di altri antiossidanti con il BHT e l' α -tocoferolo (Yehye, 2015).

Tuttavia, il BHA si degrada nel tempo durante la frittura. Il principale prodotto di decomposizione è il tert-butilidrochinone (TBHQ) che può essere ossidato a tert-

butilbenzochinone (TBBQ) (figura 8) (EFSA Journal, 2011). Il BHA può anche essere fotodegradato con un meccanismo che coinvolge la produzione di specie reattive dell'ossigeno (EFSA Journal, 2011).

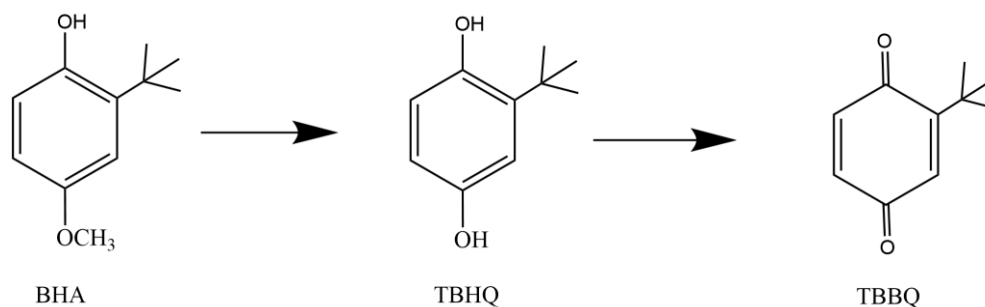


Figura 8 Decomposizione BHA

Il BHT (figura 9) è un solido cristallino con proprietà simili al BHA. È utilizzabile nei processi termici ma non è stabile come il BHA (Yehye, 2015).

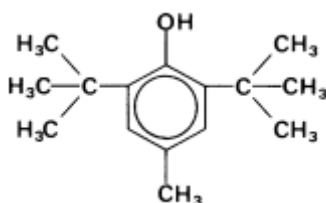


Figura 9 2,6-di-terz-butil-p-idrossitoluene (BHT)

L'attività antiossidante di questa molecola ad alte temperature, come nelle condizioni di frittura, può differire notevolmente da quella sviluppata a temperature moderate o basse, come durante la conservazione (Nieva-Echevarría, 2015). Diversi autori hanno riportato una rapida perdita di BHT ad alte temperature (> 140 °C) e hanno notato una minore attività antiossidante. Questo fatto è stato attribuito non solo alla volatilizzazione del composto, ma anche alla sua trasformazione in composti secondari. Questi risultati sono in accordo con la minore attività antiossidante osservata a 70 °C per BHT-OOH (2,6-di-terz-butil-4-metil-4-idroperossi-2,5-cicloesandien-1-one), BHT-CHO (3,5-di-terz-butil-4-idrossibenzaldeide) BHT-Q (2,6-di-terz-butil-2,5-cicloesadien-1-one) rispetto al composto madre BHT (Nieva-Echevarría, 2015).

Durante la frittura, il principale prodotto di ossidazione del BHT è l'HBHT (2,6-di-terz-butil-4-idroperossi-4-metilcicloesa-2,5-dien-1-one) (figura 10) (EFSA Journal, 2012). Una seconda via di decomposizione porta alla formazione di radicali alcossili intermedi che a loro volta reagiscono per formare prevalentemente MHCD (2,6-di-terz-butil-4-idrossi-4-metilcicloesa-2,5-dione) (figura 10) (EFSA Journal, 2012). Anche il BHT è sensibile alla fotoirradiazione con luce visibile e a tracce di metalli pesanti (EFSA Journal, 2012).

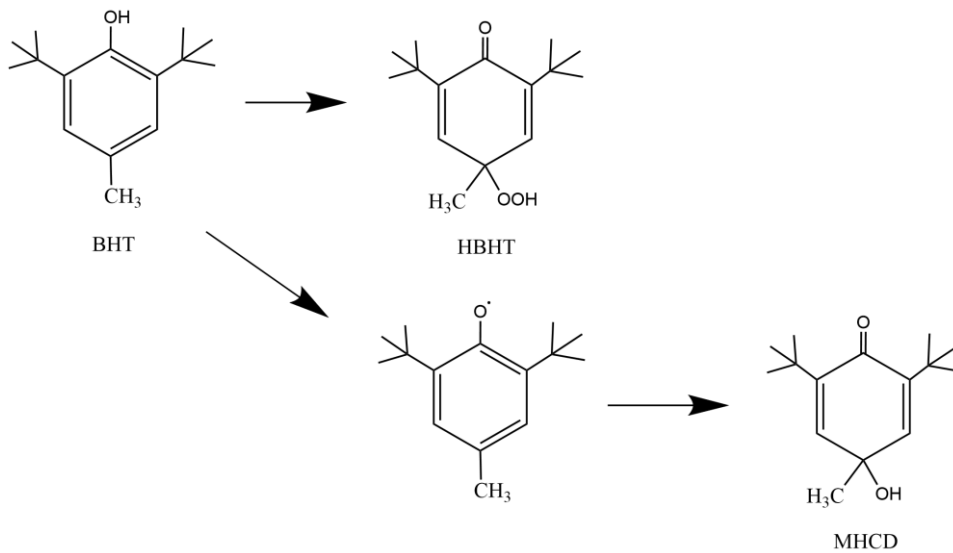


Figura 10 Percorsi di decomposizione del BHT

Il BHT esercita anche effetti pro-ossidanti in determinate condizioni, anche se le informazioni disponibili sono limitate (Nieva-Echevarría, 2015). Ad un'elevata velocità di aerazione, il BHT può reagire con l'ossigeno molecolare piuttosto che con le specie reattive dell'ossigeno presenti, dando origine al radicale BHT-fenossile e all'anione superossido. Le vie di reazione proposte per l'attività pro-ossidante del BHT sono riassunte nella figura 11 (Nieva-Echevarría, 2015). Inoltre, il radicale fenolico stesso può subire un ciclo redox che può essere un fattore critico a seconda del riduttore coinvolto. Tuttavia, il radicale BHT-fenossile è considerato relativamente stabile (Nieva-Echevarría, 2015).

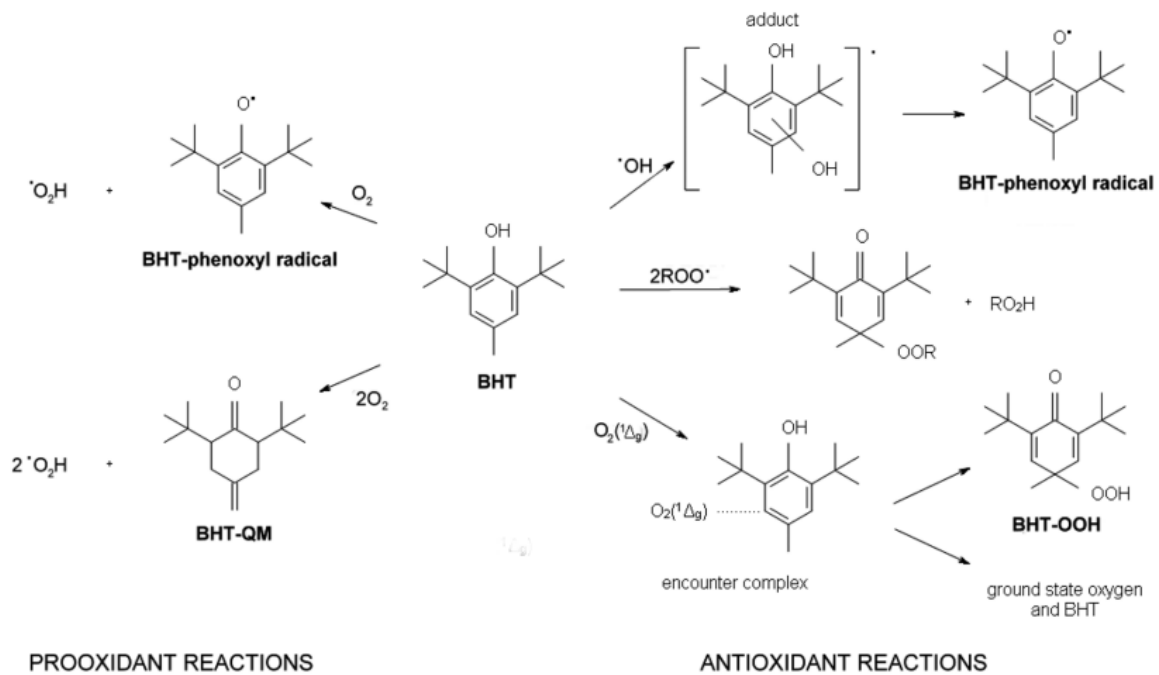


Figura 11 Reazioni dell'attività pro-ossidante del BHT

Inoltre, occorre tenere conto della potenziale reattività dei metaboliti derivati dal BHT; infatti, non solo il BHT, ma anche i suoi metaboliti, come il BHT-Q e il BHT-QM (2,6-di-terz-butil-4-metilen-2,5-cicloesadien-1-one), possono agire come pro-ossidanti (Nieva-

Echevarría, 2015). È necessario compiere uno sforzo particolare per comprendere appieno l'attività antiossidante-proossidante del BHT, le vie di reazione che subisce, le condizioni necessarie perché ciò avvenga e la potenziale reattività di tutti i metaboliti generati come risultato dell'attività del BHT, al fine di evitare reazioni indesiderate, sia negli alimenti che nei sistemi biologici (Nieva-Echevarría, 2015).

2.2.1 Meccanismo d'azione combinato

La miscela di BHA e di BHT a una data concentrazione totale è più efficace nel prolungare la vita del grasso o dell'olio rispetto ai due antiossidanti da soli alla stessa concentrazione usata (Belitz,2009). Per spiegare ciò, si suggerisce che il BHA reagendo con un radicale perossido produca un radicale fenossico (I) illustrato in figura 12:

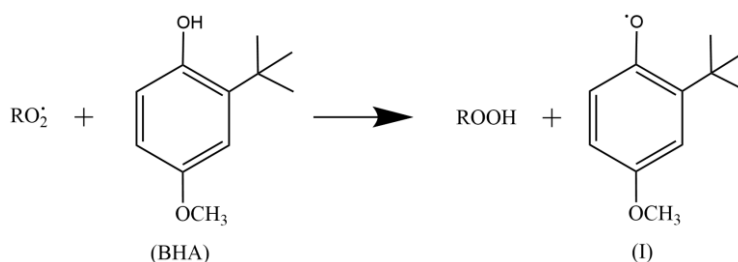


Figura 12 Formazione del radicale fenossico (I)

Il radicale fenossico (I) rigenera la molecola iniziale per interazione con il BHT, formando il radicale fenossico (II) (fig. 13), che reagisce ulteriormente con un altro radicale perossido (fig. 14).

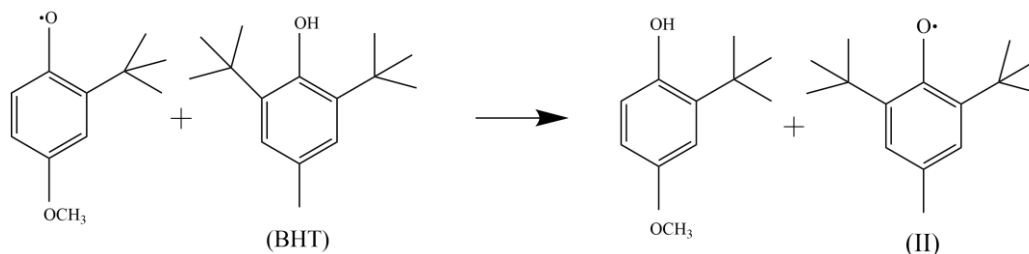


Figura 13 Formazione del radicale fenossico (II)

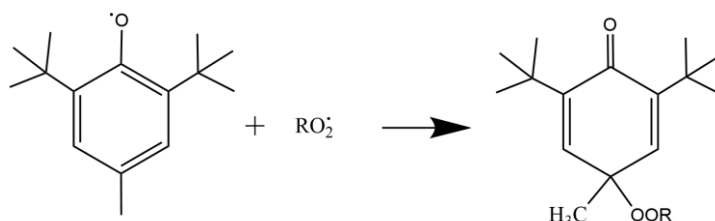


Figura 14 Seconda via di formazione del radicale fenossico (II)

2.3. Metaboliti

2.3.1. Metaboliti del BHA

I principali metaboliti identificati del BHA sono glucuronidi, solfati e fenoli liberi, mentre il TBHQ (terz-butilidrochinone), prodotto per orto demetilazione, è il più rilevante (figura 15) (EFSA Journal, 2011). Le proporzioni dei diversi metaboliti variano nelle diverse specie e anche per i diversi livelli di dosaggio. Il TBHQ è un antiossidante autorizzato nell'UE, da solo o in combinazione con altri antiossidanti, come gallati, BHA e BHT (Direttiva n. 95/2/CE) (EFSA Journal, 2011).

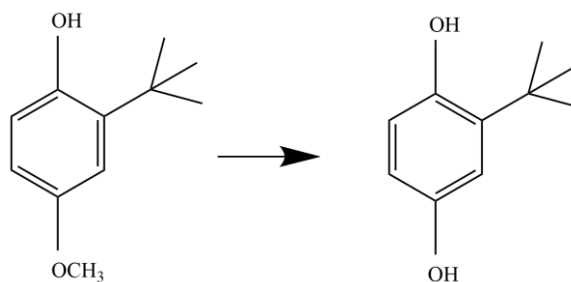


Figura 15 Formazione del TBHQ

L'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'escrezione (ADME) del BHA sono stati studiati nei ratti, nei conigli, nei cani, nelle scimmie e nell'uomo (EFSA Journal, 2011). Nel complesso, gli studi dimostrano che per l'uomo il BHA viene rapidamente assorbito dal tratto gastrointestinale (GI), metabolizzato ed eliminato sotto forma di metaboliti, principalmente attraverso le urine e le feci.

2.3.2. Metaboliti del BHT

Il BHT subisce processi di biotrasformazione non solo negli alimenti e negli ambienti naturali, come l'aria, la polvere, il suolo o l'acqua ma anche negli organismi viventi (Nieva-Echevarría, 2015). Il metabolismo del BHT è molto complesso ed è stato studiato in diverse specie animali, come i ratti, topi, conigli, polli, scimmie, cani e anche nell'uomo. Si forma un gran numero di metaboliti intermedi la cui natura e concentrazione dipende dalle condizioni ambientali e dalle specie animali (figura 16) (Nieva-Echevarría, 2015).

A differenza di altri antiossidanti sintetici, il BHT è un potente induttore del sistema delle monoossigenasi microsomiali e la sua principale via di degradazione è l'ossidazione catalizzata dal citocromo P450 (Nieva-Echevarría, 2015). Come si può osservare nella figura 16, il suo metabolismo avviene attraverso due vie principali: l'ossidazione dei sostituenti alchilici e dell'anello benzenico. Per quanto riguarda l'ossidazione dei sostituenti alchilici, il BHT può presentare un'ossidazione nel gruppo p-metilico e in uno o entrambi i gruppi tert-butilici; tuttavia, nessuno dei due processi è mutuamente esclusivo. Sono state segnalate differenze metaboliche tra le specie: mentre l'ossidazione del gruppo p-metile è la via metabolica principale per ratti, conigli e scimmie, l'ossidazione dei gruppi tert-butilici predomina nell'uomo e nel topo. Quando si verifica l'ossidazione del gruppo p-metilico, il BHT-COOH (acido 3,5-di-terz-butil-4-idrossibenzoico) è considerato il metabolita principale e può essere generato attraverso l'aldeide corrispondente (BHT-CHO) e l'alcol (BHT-CH₂OH); l'ossidazione del BHT-CHO può anche dare origine al BHT-Q. Inoltre, l'ulteriore metabolismo del BHT-COOH nel fegato può provocare la decarbossilazione a DBP (2,6-di-terz-butil-4-fenolo), seguita dalla formazione di BHQ (2,6-di-terz-butil-1,4-

benzodiolo) e BHT-Q. Quando avviene l'ossidazione dei gruppi tert-butilici, si possono formare BHT-OH(t) (3-terz-butil-2-idrossi- $\beta,\beta,5$ -trimetilbenzoetano) e il suo derivato BHT-OH(t)QM (2-terz-butil-6-(2-idrossi-terz-butil)-4-metilene-2,5-cicloesandien-1-one). Per quanto riguarda la seconda via di ossidazione quella dell'anello aromatico del BHT, questa può portare alla formazione, tra gli altri, di BHT-Q e di BHT-OOH; a sua volta, quest'ultimo può generare BHT-QM. Di quest'ultimo metabolita non ci sono ancora prove della sua generazione nell'uomo (EFSA 2012).

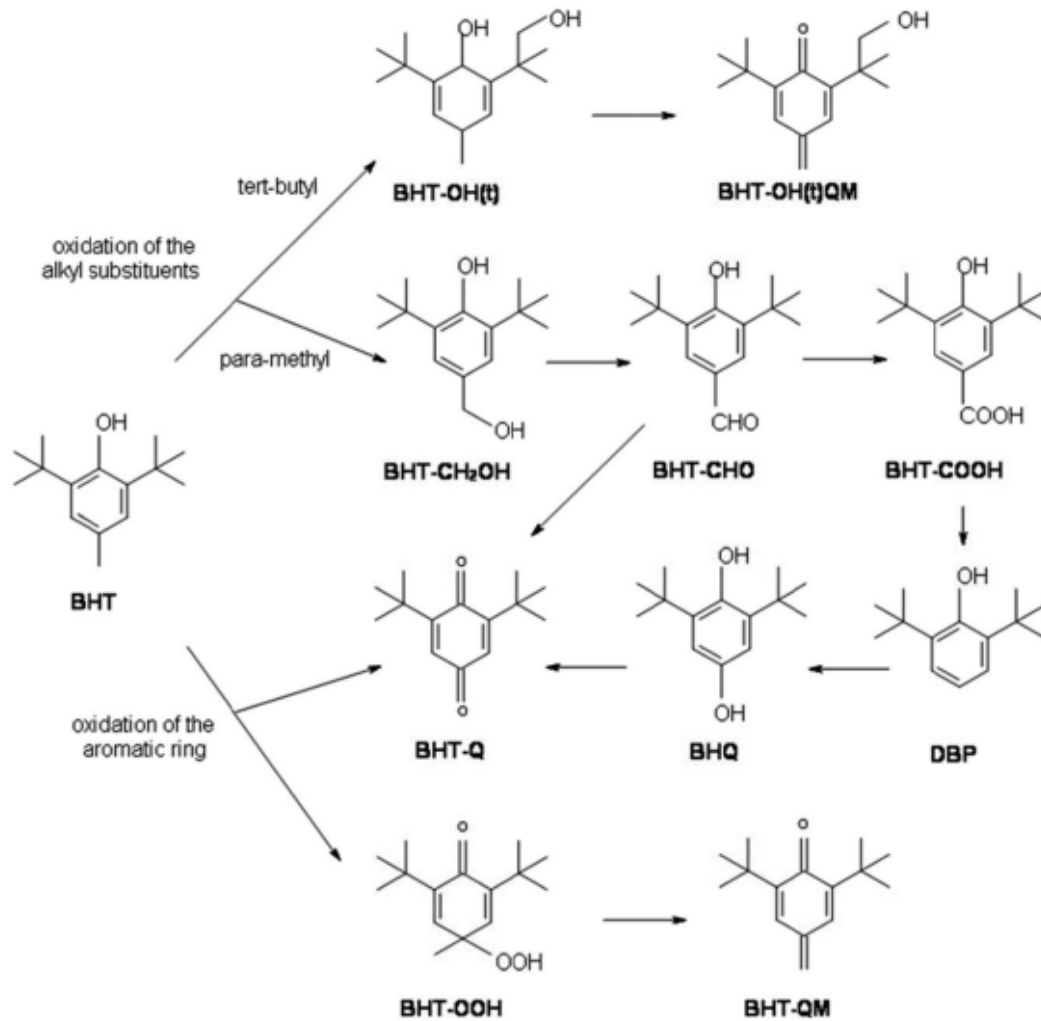


Figura 16 Metabolismo del BHT

Nell'uomo, il 50% del BHT è espulso nelle prime 24 ore dopo una singola dose orale di 40 mg/kg di peso corporeo (Nieva-Echevarría, 2015). In uno altro studio sull'uomo sono stati trovati i metaboliti urinari BHT-COOH ("acido") e benzoil-glicina (acido ippurico) dopo due dosi orali separate di 100 mg di BHT, mentre in un terzo studio il BHT-COOH e il suo estere glucuronide (BHT-CHO) sono stati gli unici metaboliti principali identificati nelle urine dopo una dose orale di 1,0 g (EFSA Journal, 2012).

Il BHT viene rapidamente assorbito dal tratto gastrointestinale e distribuito nell'organismo (EFSA Journal, 2012). Dopo l'assorbimento, il BHT si distribuisce generalmente nel fegato e nel grasso corporeo. L'escrezione avviene principalmente attraverso le urine e le feci.

A causa dell'uso diffuso del BHT negli alimenti e in molti altri prodotti, negli ultimi 70 anni, e della conseguente esposizione umana a lungo termine, sono stati condotti numerosi studi di tossicità per valutarne la sicurezza (Nieva-Echevarría, 2015). Il fatto che la maggior parte di questi studi sia stata condotta utilizzando diverse specie animali rende difficile l'estrapolazione dei risultati sull'uomo, perché i metaboliti generati potrebbero essere diversi e le condizioni di esposizione potrebbero non imitare quelle che si verificano nell'uomo. Nel 1987, l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro ha valutato il BHT e lo ha classificato nel gruppo 3 delle sostanze cancerogene (non classificabile come cancerogeno per l'uomo), insieme ad altre sostanze come alcuni idrocarburi policiclici aromatici (IPA) (Nieva-Echevarría, 2015).

2.4. Analisi

I metodi basati sulla cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) sembrano essere i più utilizzati per l'analisi del BHA negli alimenti, ma è stato riportato anche un metodo spettrofluorimetrico (EFSA Journal, 2011), che si basa sulla determinazione dell'emissione del BHA a 368 nm quando viene eccitato a 267 nm (figura 17, **a** e **b**) (Cruces-Blanco, 1999).

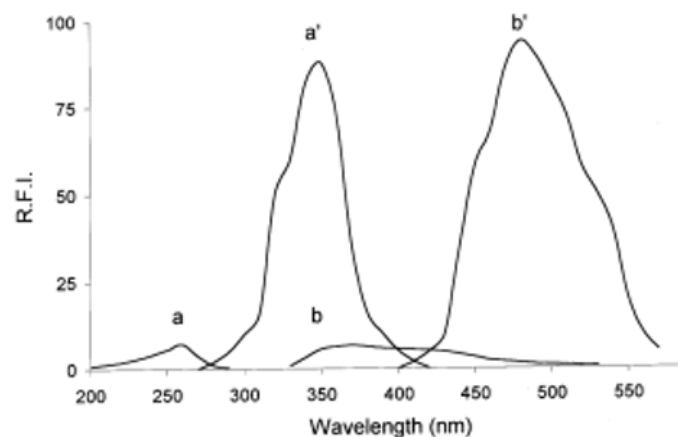


Figura 17 Spettro di eccitazione e emissione del BHA

Per aumentare l'intensità della fluorescenza del BHA, si fa reagire il fenolato del BHA con il cloruro di dansile (figura 18). Il composto derivato è decisamente più fluorescente (figura 17, curve **a'** e **b'**). Questo metodo fluorimetrico, rapido e sensibile, è adatto alla determinazione del BHA negli alimenti sia in assenza che in presenza di composti che normalmente lo accompagnano, come il BHT o il gallato di propile (Cruces-Blanco, 1999).

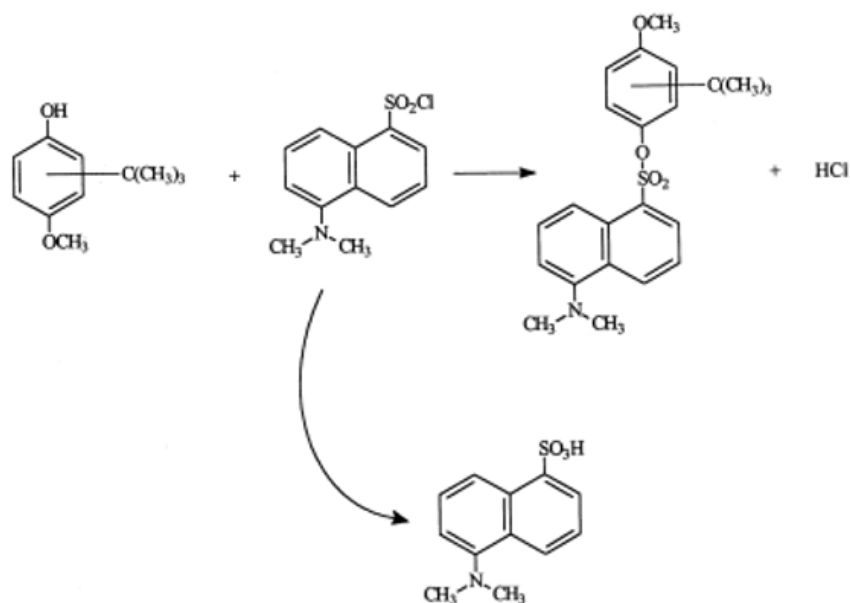


Figura 18 Reazione tra il BHA e il cloruro di densile

Invece il BHT può essere rilevato mediante gascromatografia con un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) (EFSA Journal, 2012). In letteratura sono presenti diversi altri metodi, tra cui l'HPLC, la gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) e un metodo spettroscopico diretto all'infrarosso con trasformata di Fourier (FTIR) (EFSA Journal, 2012).

Il metodo colorimetrico per rilevare il BHT nei dolci e nell'olio vegetale prevede di sottoporre il campione a distillazione in corrente di vapore per estrarre il BHT, che viene poi assorbito in metanolo. La soluzione risultante di colore rosso-arancione, viene poi estratta con cloroformio e misurata a 520 nm (Wang, 2021).

3. CONFRONTO CON GLI ANTIOSSIDANTI NATURALI

Gli antiossidanti naturali sono per lo più molto più polari di quelli sintetici, ad eccezione dei caroteni, dei tocoferoli e dei loro esteri (Pokorny, 2007). Pertanto, gli antiossidanti fenolici naturali di solito non sono sufficientemente solubili nella fase lipidica, il che limita la loro efficacia nei lipidi sfusi (Pokorny, 2007). Un'altra differenza sta nella concentrazione utilizzata: gli antiossidanti sintetici hanno una concentrazione consentita dalla legge di 0,02% sulla base lipidica, invece gli antiossidanti naturali possono essere usati in concentrazioni maggiori (0,1-0,5% o più) perché, non essendo sostanze pure al 100%, possiedono una frazione attiva inferiore (Pokorny, 2007).

L'attività antiossidante dipende da molti fattori. Un antiossidante attivo in particolari condizioni può essere meno attivo in condizioni diverse. Pertanto, non è possibile stabilire a priori quale tipo di antiossidante sia più attivo (Pokorny, 2007). Gli antiossidanti naturali sono in genere meno attivi, sono specifici per un certo substrato e la loro attività dipende molto dai sinergizzanti presenti sia nella preparazione dell'composto antiossidante sia nell'alimento stabilizzato. Sia gli antiossidanti sintetici che quelli naturali possiedono una certa tossicità (molto bassa), per cui concentrazioni troppo elevate di antiossidanti sono indesiderate, indipendentemente dall'origine (Pokorny, 2007).

I vantaggi e gli svantaggi degli antiossidanti naturali sono elencati nella Tabella 1 (Pokorny, 2007). Gli antiossidanti naturali possono anche agire come coloranti (ad esempio, flavonoidi, tannini condensati o antociani), come agenti di conservazione (la maggior parte degli antiossidanti fenolici ha proprietà battericide) e alcuni possono conferire caratteristiche sensoriali favorevoli all'alimento stabilizzato (ad esempio, sapore, odore, consistenza o colore) (Pokorny, 2007).

Tabella 1 Vantaggi e svantaggi degli antiossidanti naturali

Vantaggi	Svantaggi
Prontamente accettati dai consumatori	Composizione e attività variabili
Larga lista di antiossidanti disponibili	Presenza di altre sostanze
Accettati dalle autorità sanitarie	Spesso non sono disponibili i reali rischi di sicurezza
Possono essere sostituiti da componenti alimentari	Inferiore attività antiossidante
Possono essere etichettati come aromi	Dovrebbero essere aggiunti in quantità maggiori
Effetto positivo nelle proprietà sensoriali	Effetto negativo nelle proprietà sensoriali
Agiscono da agenti di conservazione	La maggior parte non è prontamente disponibile

Un esempio di antiossidante naturale è l'estratto di rosmarino che contiene tre maggiori componenti: l'acido carnosico, il carnosolo e l'acido rosmarinico (Xie, 2017). Per quanto riguarda l'estrazione è importante considerare che i composti volatili del rosmarino possono avere un effetto negativo in quanto possono interferire con il profilo aromatico dell'alimento. Inoltre il rosmarino presenta delle fluttuazioni nella composizione chimica durante l'anno, di conseguenza non è facile ottenere un prodotto con caratteristiche costanti nel tempo. Infine, è bene rimuovere i componenti cerosi per evitare sedimenti e aumentare la disperdibilità dell'estratto (Xie,2017).

Il metodo più popolare e comune per ottenere un estratto di rosmarino disponibile in commercio è l'estrazione con solvente (Xie, 2017). I solventi per uso alimentare, come acqua, metanolo, etanolo, esano e acetone, sono spesso utilizzati per scopi diversi. Applicando il calore e il vuoto, i solventi possono essere rimossi a un livello consentito da diverse normative (di solito < 50 ppm). Questo processo rimuove parzialmente anche i composti volatili aromatici (Xie,2017). È bene tenere presente che i principali componenti dell'estratto hanno una diversa stabilità quando sono estratti con solventi diversi e che sono tutti termicamente degradabili ad alta temperatura (180°C). In base al solvente scelto si ottiene un estratto più oleoso e liposolubile se si usa un solvente apolare, mentre sarà una pasta viscosa e completamente solida nel caso di un solvente polare. In questo secondo caso l'estratto sarà più idrofilo, poter scegliere la consistenza e la polarità aumenta la sua versatilità (Xie,2017). Lo svantaggio dell'estrazione con solventi è che non è rispettosa dei consumatori e dell'ambiente. Solventi più ecologici o altri metodi di estrazione devono essere sviluppati per soddisfare la crescente domanda del pubblico.

Un altro metodo di estrazione si basa sull'anidride carbonica supercritica (CO₂) (Xie, 2017). È un solvente non organico e non soffre del problema dei residui di solvente. Si lavora a temperature più basse rispetto all'estrazione con solventi e quindi non ci sono i problemi di degradazione termica dei composti. L'unico svantaggio è l'impossibilità di estrarre i componenti più polari, come l'acido rosmarinico (Xie,2017).

Simile alla CO₂ supercritica, l'acqua subcritica è un'altra opzione di solvente verde per l'estrazione di composti antiossidanti dalla pianta di rosmarino (Xie, 2017). L'acqua subcritica è lo stato liquido ad alta pressione dell'acqua surriscaldata mantenuta a una temperatura superiore al punto di ebollizione e inferiore a 374°C. In queste condizioni, la costante dielettrica dell'acqua diminuisce e l'acqua si comporta come un solvente meno polare (dell'acqua) al variare della temperatura. Ciò consente di manipolare con flessibilità la polarità del solvente e di ottenere l'estrazione di più composti target.

Il metodo della spremitura ad aria è diventato più popolare negli ultimi anni, in quanto il prodotto può essere etichettato come estratto senza solventi a un costo inferiore. Consiste nel mescolare il rosmarino secco macinato con olio pari al 50% del suo peso e una piccola quantità di acqua. Viene mescolato a temperatura moderata e poi inviato alla filtrazione in pressa (80-120 bar) (Xie,2017). I trigliceridi a catena media (MCT) si sono rivelati il miglior olio, poiché forniscono una viscosità molto bassa.

Per garantire le massime prestazioni antiossidanti, un principio è quello di aggiungere l'antiossidante durante la produzione degli alimenti il più presto possibile, addirittura già alle materie prime. La soppressione dell'ossidazione lipidica nella fase iniziale potrebbe ritardare notevolmente il processo complessivo (Xie,2017).

Essendo un antiossidante naturale, il confronto tra il rosmarino e gli antiossidanti sintetici (BHA, BHT e TBHQ) è inevitabile (Xie, 2017). In generale, il costo è più elevato quando si applicano antiossidanti naturali per eguagliare le qualità degli antiossidanti sintetici (Xie,2017).

4. CONCLUSIONI

Il BHA e il BHT sono due antiossidanti sintetici molto usati nell'industria alimentare. Il loro meccanismo d'azione consiste nel bloccare i radicali liberi che si formano dall'ossidazione dei lipidi. Inoltre è stato dimostrato un loro effetto sinergico positivo quando usati in coppia.

La biotrasformazione del BHA e del BHT è molto complessa. Entrambi i composti vengono assorbiti dal tratto gastrointestinale e sono espulsi per la maggior parte con le urine e le feci. Per il BHA la dose giornaliera accettabile è di 0,5 mg/kg di peso corporeo al giorno, senza superare la dose di 1,0 mg/kg, mentre il NOAEL (No Observed Adverse Effect Level, dose massima assumibile senza che si osservino effetti tossici) è di 100 mg/kg. Per il BHT la dose giornaliera accettabile è di 0,25 mg/kg, mentre il NOAEL è di 25 mg/kg.

Per quanto riguarda l'allergia o l'intolleranza alimentare del BHA e del BHT non si possono trarre conclusioni sulla base dei dati disponibili. Occasionalmente sono stati segnalati segni di dermatite da contatto dopo esposizione cutanea al BHT e reazioni allergiche dopo l'assunzione orale di una miscela di BHT e BHA (EFSA Journal, 2012). Alcuni test sostengono che il BHA è coinvolto nelle reazioni allergiche agli alimenti, ma il meccanismo fisiologico non è chiaro e i più esposti sono comunque i soggetti con allergie alimentari. I sintomi descritti sono orticaria e possibile iperattività. Da questi documenti non si può trarre nulla di conclusivo (EFSA Journal, 2011). I rapporti limitati non consentono di trarre conclusioni sulla sensibilizzazione al BHT in seguito all'assunzione orale (EFSA Journal, 2012).

Gli antiossidanti naturali sono una valida alternativa anche se sono molto più costosi e hanno un'efficacia generalmente minore di quelli sintetici. Un esempio è l'estratto di rosmarino che è molto versatile. Combinato con altri ingredienti naturali mostra un effetto sinergico che potrebbe migliorare ulteriormente le prestazioni antiossidanti. L'estratto di rosmarino offre una valida alternativa ai produttori e ai consumatori che richiedono prodotti privi di ingredienti sintetici e senza capacità antiossidanti compromesse.

APPENDICE 1:

Reazione di Fenton è la reazione dell'anione radicale superossido con il perossido di idrogeno, avviene all'avvio dell'autossidazione degli acidi grassi e in particolare di un complesso di Fe.

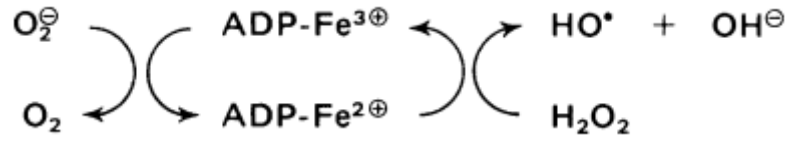


Figura 2 Reazione di Fenton

BIBLIOGRAFIA

Belitz H.-D.; Grosch W.; Schieberle P., *Food Chemistry*, IV ed. Inglese, Springer-Verlag, Berlino, **2009**, 192, 215-219

Cruces-Blanco C., Carretero A. S.; Boyle E. M.; Gutiérrez A. F., The use of dansyl chloride in the spectrofluorimetric determination of the synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole in foodstuffs, *Talanta*, **1999**, *50*, 1099-1108

Enciclopedia Treccani, conservazione degli alimenti:

<https://www.treccani.it/enciclopedia/conservazione-degli-alimenti>, accesso in rete 24/08/2022

European Food Safety Authority (EFSA), Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole – BHA (E 320) as a food additive, **2011**, Parma, Italia

European Food Safety Authority (EFSA), Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive, **2012**, Parma, Italia

Gutierrez-del-Rio I.; Lopez-Ibanez S.; Magadan-Corpas P.; Fernandez-Calleja L.; Perez-Valero A.; Tunon-Granda M.; Miguelez E. M.; Villar C. J.; Lombo F. , Terpenoids and Polyphenols as Natural Antioxidant Agents in Food Preservation, *Antioxidants*, **2021**, *10*

Yehye A. W., Noorsaadah Abdul Rahman; Ariffin A.; Sharifah Bee Abd Hamid; Alhadi A. A., Kadir F. A.; Yaeghoobi M., Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review, *European journal of medical chemistry*, **2015**, *101*, 295-312

Mishra S. K. (Mishra, Sumit Kumar); Belur P. D. (Belur, Prasanna D.); Iyyaswami R. (Iyyaswami, Regupathi), Use of antioxidants for enhancing oxidative stability of bulk edible oils: a review, *International journal of food science and technology*, **2021**, *56*, 1-12

Nieva-Echevarría B.; Manzanos M. J.; Goicoechea E.; Guillén M. D., 2,6-Di-Tert-Butyl-Hydroxytoluene and Its Metabolites in Foods, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **2015**, *14*, 67-80

Pokorný J., Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants?, *European journal of lipid science and technology*, **2007**, *109*, 629-642

Wang W.; Xiong P.; Zhang H.; Zhu Q.; Liao C.; Jiang G., Analysis, occurrence, toxicity and environmental health risks of synthetic phenolic antioxidants: A review, *Environmental Research*, **2021**, *201*, N. 111531

Xie J.; VanAlstyne P.; Uhlir A.; Yang X., A review on rosemary as a natural antioxidation solution, *European journal of lipid science and technology*, **2017**, *119*, N. 1600439

Ringraziamenti

A mamma,

Per avermi lasciato libera di fare le mie scelte anche se alcune volte mi hanno portata a sbagliare ed esserci sempre stata per darmi un consiglio.

A papà,

Per essere sempre stato pronto ad aiutarmi anche quando non volevo l'aiuto di nessuno e per avermi supportato nel seguire i miei sogni.

A mia sorella Sofia,

Per avermi dimostrato che essere sicuri di sé è essenziale in alcune situazioni e per avermi aiutata e sostenuta quando pensavo di non farcela.

A mio nonno,

Per avermi insegnato che i risultati si ottengono con la pazienza e l'impegno, e per aver sempre creduto in me prima ancora che lo facessi io. Per aver condiviso con me la passione per la chimica fin dall'inizio.

A mia nonna,

Per essere sempre dalla mia parte, per avertermi sostenuto nei momenti di difficoltà e per avermi sempre ripetuto che ce l'avrei fatta perché credevi in me anche quando io non lo facevo.

A mio nonno Mario e a mia nonna Franca,

Per gli insegnamenti che mi avete dato e anche se non ci siete so che mi avete sostenuto in ogni momento.

A Gaia,

Per avermi sostenuta e consigliata, per esserci sempre stata nei momenti importanti e per avermi dimostrato che essere dolci non vuol dire essere deboli.

Agli amici,

con cui ho passato bei momenti.

A tutte le persone che ci sono sempre state o sono state di passaggio e che mi hanno insegnato qualcosa in questo percorso.

Grazie