



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI AGRARIA

Dipartimento di BIOTECNOLOGIE AGRARIE

TESI DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

IMPIEGO DI ESTRATTI NATURALI PER IL CONTROLLO
DELL'IRRANCIDIMENTO OSSIDATIVO

Relatore:

Prof. *ANNA LANTE*

Correlatore:

Dott. FEDERICO ZOCCA

Laureando:

LUCA GREGGIO

Matricola n. 540209

ANNO ACCADEMICO 2008- 2009

RIASSUNTO

L'irrancidimento ossidativo costituisce un problema fondamentale durante la produzione, la distribuzione, lo stoccaggio e il consumo degli alimenti che presentano una componente lipidica. Questa reazione indesiderata diminuisce la qualità, la stabilità, la salubrità e il valore nutrizionale degli alimenti. In questa tesi sono stati analizzati i comportamenti di alcuni estratti naturali contenenti sostanze antiossidanti su due oli destinati all'uso alimentare, allo scopo di ritardare l'irrancidimento ossidativo. Quest'ultimo si ricollega alla combinazione dell'ossigeno con la molecola degli acidi grassi mediante un fenomeno autocatalitico, che si compone di tre fasi (iniziazione, propagazione, terminazione), denominato autossidazione. I fattori che influenzano la reazione sono la presenza dell'ossigeno, il grado di insaturazione dell'olio, la presenza di metalli, l'irraggiamento e in particolare la luce UV. Gli antiossidanti possono ritardare la fase di iniziatazione e/o interrompere la fase di propagazione attraverso vari meccanismi di azione. Gli antiossidanti naturali presentano meno rischi per la salute del consumatore rispetto ad alcuni antiossidanti sintetici e possono rappresentare una valida alternativa agli additivi artificiali. Nella tesi, la stabilità ossidativa degli oli di semi analizzati, con e senza antiossidanti, è stata valutata con il metodo Rancimat; i risultati sono stati commentati in relazione al tempo di induzione (IP) e agli indici di attività antiossidante (AAI) ottenuti nelle condizioni di prova.

ABSTRACT

The oxidative rancidity is a fundamental problem during the production, distribution, storage and consumption of foods that have a lipid component. This adverse reaction reduces the quality, stability, safety and nutritional value of foods. In this dissertation were analyzed the behavior of some natural extracts containing antioxidants on two oils for food use, in order to delay the oxidative rancidity. The last one is linked to the combination of oxygen with the fatty acid molecule on a autocatalytic phenomenon, which consists of three phases (initiation, propagation, termination), called autoxidation. The factors influencing the reaction are the presence of oxygen, the degree of unsaturation of the oil, the presence of metals, irradiation and particularly the UV light. The antioxidants may retard the stage of initiation and/or stopping the propagation, through different mechanisms of action. The natural antioxidants present less risk to the health of the consumer compared to some synthetic antioxidants and may represent a viable alternative to artificial additives. The oxidative stability of oil seeds analyzed in this work, with and without antioxidants, was assessed with the Rancimat method and the results have been commented on the time of induction (IP) and the antioxidant activity index (AAI) obtained in test conditions.

INDICE

RIASSUNTO

ABSTRACT

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1 : I LIPIDI E L'IRRANCIDIMENTO OSSIDATIVO

1.1 – I lipidi e gli acidi grassi	11
1.2 – Teoria dell'ossidazione lipidica	17
1.2.1 – Iniziazione	19
1.2.2 – Propagazione	20
1.2.3 – Terminazione	21
1.3 – I prodotti dell'ossidazione	22

CAPITOLO 2 : GLI ANTIOSSIDANTI

2.1 – Introduzione agli antiossidanti	27
2.1.1 – Antiossidanti di tipo 1	27
2.1.2 – Antiossidanti di tipo 2	30
2.1.2.1 – Agenti chelanti i metalli	31
2.1.2.2 – Disattivatori dell'ossigeno singoletto	32
2.1.2.3 – Detossificazione dalle specie reattive dell'ossigeno	33
2.1.3 – Antiossidanti di tipo 3	34
2.1.4 – Agenti pro-ossidanti	34
2.2 – Componenti essenziali per l'accertamento dell'attività antiossidante	35
2.2.1 – Le sostanze antiossidanti: effetti sinergici, antagonisti ed interpretazione dei risultati	36
2.2.2 – I substrati ossidabili	38

2.2.3 – I mezzi	39
2.2.4 – Le condizioni ossidative	40
2.3 – Composti antiossidanti degli estratti vegetali	42

CAPITOLO 3 : SISTEMI DI MISURAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE NELLE MATRICI LIPIDICHE

3.1 – Metodiche utilizzate	47
3.1.1 – Esaurimento dell'ossigeno	47
3.1.2 – Perdita di substrato	48
3.1.3 – Valutazioni sulla misurazione dei prodotti primari e secondari dell'ossidazione	49
3.1.4. – Sistemi di misurazione dei prodotti primari dell'ossidazione	50
3.1.4.1 – Misurazione iodometrica degli idroperossidi	50
3.1.4.2 – Misurazione dei dieni coniugati tramite UV	53
3.1.5 – Sistemi di misurazione dei prodotti secondari dell'ossidazione	55
3.1.5.1 – Test dell'acido tiobarbiturico (TBA)	55
3.1.5.2 – Misurazione delle aldeidi con il test p-anisidina	56
3.1.5.3 – Misurazione cromatografica dei composti volatili	57
3.1.6 – Il metodo Rancimat	60

CAPITOLO 4 : COMPOSIZIONE E CARATTERISTICHE DEGLI OLI ANALIZZATI

4.1 – Generalità sugli oli di semi	63
4.2 – Olio di semi di soia	63
4.2.1 – Materia prima	63
4.2.2 – Produzione	64
4.2.3 – Caratteristiche chimico – fisiche	66
4.2.4 – Impiego dell'olio di soia	69
4.3 – Olio di semi di mais	70
4.3.1 – Materia prima	70

4.3.2 – Produzione	71
4.3.3 – Caratteristiche chimico – fisiche	72
4.3.4 – Impiego dell’olio di mais	75
4.4 – Legislazione relativa agli oli di semi	76

CAPITOLO 5 : MATERIALI E METODI

5.1 – Campioni utilizzati nelle prove sperimentali	77
5.2 – Preparazione degli estratti naturali	77
5.3 – Misurazione dei polifenoli totali degli estratti naturali	78
5.4 – Misurazione dell’irrancidimento ossidativo con il metodo Rancimat	79

CAPITOLO 6 : RISULTATI E DISCUSSIONE

83

CAPITOLO 7 : CONCLUSIONI

97

BIBLIOGRAFIA

99

INTRODUZIONE

I substrati maggiormente interessati dall'irrancidimento ossidativo sono quelli contenenti un'alta percentuale di acidi grassi insaturi; questo fenomeno riguarda non solo i prodotti agroalimentari ma anche i cosmetici e i sistemi biologici. Oltre ad alterare il sapore e la qualità nutrizionale delle derrate alimentari l'ossidazione dei lipidi può portare alla formazione di composti tossici per la salute del consumatore e causare alcune patologie quali l'arteriosclerosi e altre malattie a sfondo degenerativo come l'Alzheimer, il cancro, le infiammazioni, l'invecchiamento (M. Laguerre et al., 2007).

Da oltre cinquant'anni allo scopo di evitare o ridurre questo processo di autoossidazione, vengono utilizzati negli alimenti sostanze con proprietà antiossidanti. Molte di queste molecole sono di origine sintetica, come il BHT (butil-idrossi-toluene), il BHA (butil-idrossi-anisolo), il PG (propilgallato) e il loro impiego segue ferree restrizioni dettate dalla legislazione alimentare, visto il loro possibile effetto dannoso sulla salute umana. Secondo alcuni studi questi additivi posseggono un effetto carcinogeno, stimolando la sintesi di DNA, possono causare ingrossamenti del fegato ed influenzare l'azione degli enzimi epatici (S.M. Allam Samah, 2007).

Questi potenziali pericoli per la salute umana hanno incentivato lo studio dell'utilizzo di antiossidanti naturali in sostituzione a quelli di sintesi. L'attività antiossidante di estratti naturali è collegata al loro contenuto in composti fitochimici come la clorofilla, gli acidi e alcoli fenolici, i flavonoidi, i tocoferoli e i carotenoidi (Samah S.M. Allam, 2007).

In base a questi presupposti l'obiettivo di questo lavoro è stato lo studio dell'attività antiossidante di estratti naturali di salvia, rosmarino, radicchio e foglie di olivo.

L'efficacia antiossidante, espressa come AAI (indice di attività antiossidante), è stata valutata, utilizzando il Rancimat, in relazione al tipo di estratto e alla matrice lipidica utilizzata, olio di semi di soia e di mais.

CAPITOLO 1

I LIPIDI E L'IRRANCIDIMENTO OSSIDATIVO

1.1 I lipidi e gli acidi grassi

I lipidi costituiscono un gruppo eterogeneo di composti definiti, non dalla loro struttura, come nel caso dei carboidrati, ma dal fatto che sono solubili nei solventi apolari (etere, cloroformio) e relativamente insolubili in acqua. (E.P. Solomon et al., 2006).

I grassi e gli oli presenti in natura sono composti derivati dagli acidi grassi. Gli acidi grassi sono acidi carbossilici con una catena idrocarburica composta da 4 a 36 atomi di carbonio. In alcuni acidi grassi questa catena è completamente satura (non contiene doppi legami) e non è ramificata, in altri sono presenti uno o più doppi legami. Una nomenclatura semplificata di questi composti specifica la lunghezza della catena e il numero dei doppi legami, separati da due punti. La posizione dei doppi legami viene specificata con una soprascritta che segue il simbolo Δ (delta). Gli acidi grassi più comuni sono quelli a numero di atomi di carbonio pari e una catena non ramificata composta da 12 a 24 atomi di carbonio.

Tabella 1.1 Acidi grassi presenti in natura

Scheletro carbonioso*	Nome sistematico**	Nome comune
12:0	Acido n-dodecanoico	Acido laurico
14:0	Acido n-tetradecanoico	Acido miristico
16:0	Acido n-esadecanoico	Acido palmitico
18:0	Acido n-ottadecanoico	Acido stearico
20:0	Acido n-eicosanoico	Acido arachidico
24:0	Acido n-tetraecosanoico	Acido lignocerico
16:1(Δ^9)	Acido cis-9-esadecenoico	Acido palmitoleico
18:1(Δ^9)	Acido cis-9-ottadecenoico	Acido oleico
18:2($\Delta^{9,12}$)	Acido cis-,cis-9,12-ottadecadienoico	Acido linoleico
18:3($\Delta^{9,12,15}$)	Acido cis-,cis-,cis-9-12-15-ottadecatrienoico	Acido linolenico
20:4($\Delta^{5,8,11,14}$)	Acido cis-,cis-,cis-,cis-5,8,11,14-icosatetraenoico	Acido arachidonico

*La numerazione degli atomi di carbonio inizia dall'atomo di carbonio del gruppo carbossilico.

**Il prefisso n- indica la struttura normale non ramificata. *Cis* indica la posizione del doppio legame.

Come indicato nella Tabella 1.1, nella maggior parte degli acidi grassi monoinsaturi il doppio legame si trova tra gli atomi di carbonio C9 -C10 (Δ^9), mentre i doppi legami degli acidi grassi polinsaturi si trovano in genere nelle posizioni Δ^{12} e Δ^{15} . I doppi legami di quasi tutti gli acidi grassi presenti in natura si trovano nella configurazione *cis*.

Le proprietà fisiche degli acidi grassi e dei composti che li contengono sono molto influenzate dalla lunghezza della catena idrocarburica e dal numero di doppi legami presenti nella molecola. Le catene idrocarburiche non polari sono responsabili della poca solubilità degli acidi grassi in acqua. Quanto più lunga è la catena acilica e limitato è il numero di doppi legami, tanto più bassa è la sua solubilità in acqua (D.L. Nelson, M.M. Cox, 2003).

La posizione dei doppi legami è prevalentemente isolata; può diventare coniugata nel caso di un rialzo termico e durante un processo d'irrancidimento ossidativo. La presenza di doppi legami determina la possibile formazione d'isomeri di posizione e geometrici. Nei primi si ha una diversa posizione del doppio legame, come nel caso dell'acido oleico e del veccenico, entrambi monoinsaturi a 18 carboni, ma uno con il doppio legame in posizione 9, l'altro in 11 (P. Cappelli, V. Vannucchi, 1997).

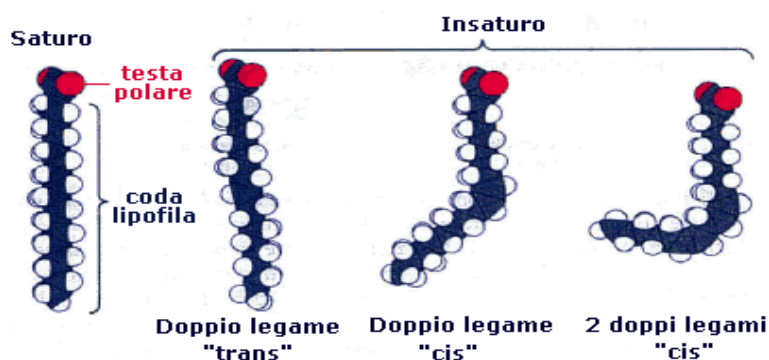
Acido oleico o *cis*-9-octadecenoico
 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$

Acido veccenico o *cis*-11-octadecenoico
 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_9-\text{COOH}$

Gli isomeri geometrici invece sono caratterizzati da un diverso orientamento dei carboni interessati al doppio legame. Durante i processi di idrogenazione artificiale degli acidi grassi o nei processi di raffinazione degli oli vegetali, i doppi legami possono subire un riarrangiamento che li porta dalla configurazione

cis, alla *trans*. Quest'ultimi sono tecnicamente insaturi, ma presentano molte delle proprietà degli acidi grassi saturi. Poiché la configurazione *trans* non produce una piega in corrispondenza del doppio legame, gli acidi grassi *trans* sono più solidi a temperatura ambiente e come gli acidi grassi saturi, aumentano il rischio di malattie cardiovascolari (E.P. Solomon et al., 2006).

Figura 1.1. Acidi grassi saturi ed insaturi

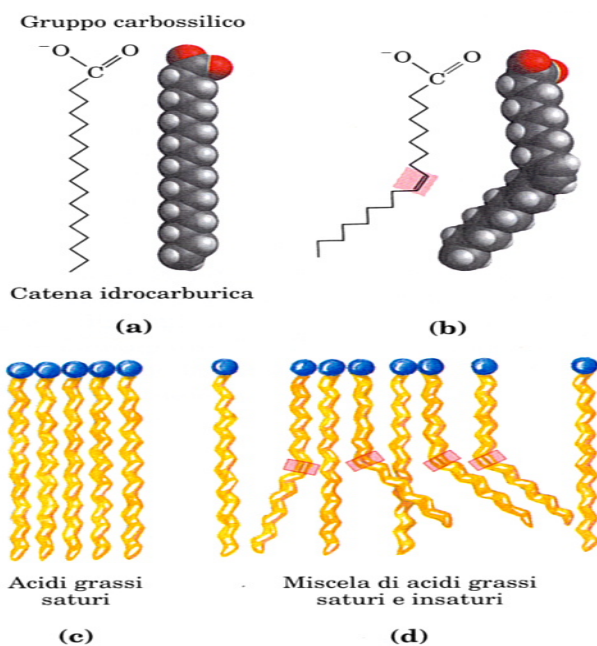


Il grasso che si ottiene ha caratteristiche fisiche simili ai grassi saturi e quindi hanno un punto di fusione più elevato rispetto ai grassi *cis* con pari grado di insaturazione.

A temperatura ambiente (25 °C), gli acidi grassi saturi da 12:0 a 24:0 hanno una consistenza cerosa, mentre gli acidi grassi insaturi con la stessa lunghezza sono oleosi. Questa differenza è dovuta ad un diverso grado di impacchettamento delle molecole contenute nei grassi. Nei composti completamente saturi, la rotazione libera attorno ad ogni legame carbonio-carbonio conferisce alla catena idrocarburica una grande flessibilità; la conformazione più stabile è quella completamente estesa, in cui vengono minimizzate le interferenze steriche tra atomi vicini. Queste molecole si possono impacchettare così strettamente da costituire strutture ordinate quasi cristalline nelle quali gli atomi delle loro lunghe catene generano contatti di van der Waals con quelli delle catene vicine. Negli acidi grassi insaturi il doppio legame *cis* produce un ripiegamento nella catena idrocarburica. Gli acidi grassi con uno o più ripiegamenti non possono unirsi così

saldamente, come accade agli acidi grassi saturi, per cui le loro interazioni con le altre molecole sono deboli. (D.L. Nelson, M.M. Cox, 2003).

Figura 1.2 Impacchettamento degli acidi grassi in aggregati stabili

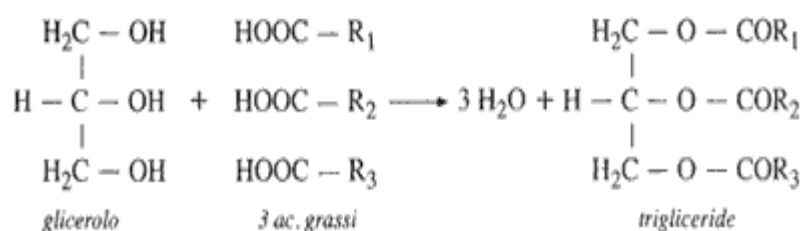


La composizione in acidi grassi dei grassi alimentari riveste una notevole importanza dal punto di vista tecnologico, analitico e nutrizionale. Per quanto riguarda il profilo tecnologico, essa è il fattore fondamentale per una buona conservazione del prodotto. La facilità con cui il grasso subisce il processo di irrancidimento ossidativo, dipende in larga misura dal suo grado di insaturazione, e in particolare dal tenore in acido linolenico (C 18: 3). Di conseguenza, ne resta condizionato il comportamento del grasso alle diverse operazioni cui viene sottoposto per la preparazione degli alimenti, come la cottura e la frittura. Tuttavia, la composizione dei grassi non è importante solo per la loro conservabilità, ma ha notevoli riflessi sulle condizioni da adottare nei processi di raffinazione e nei trasporti. Infatti, oli molto insaturi, presentano il rischio di una sensibile polimerizzazione nei trattamenti a temperature elevate, mentre quelli costituiti da acidi grassi saturi avranno punti di solidificazione superiori alla temperatura ambiente.

Sotto il profilo nutrizionale, si ricorda che le più recenti indicazioni parlano di un rapporto ottimale tra acidi saturi/acidi insaturi di 1.5 e un contenuto in acido linoleico di circa il 15 %. Inoltre il Ministero della Sanità limita il contenuto in acido erucico in oli alimentari al 5 %, in quanto si è dimostrato essere potenzialmente pericoloso per gli organismi animali.

Infine, si deve considerare che la determinazione della composizione degli acidi grassi è, assieme a quella di alcuni componenti minori, uno dei mezzi più validi per il riconoscimento di un olio o di una miscela di oli (P.Capella et al., 1997).

I lipidi più semplici e abbondanti costruiti a partire dagli acidi grassi sono i triacilgliceroli, chiamati anche trigliceridi, grassi o grassi neutri. I trigliceridi sono composti da tre acidi grassi, ognuno legato con un legame estere a uno dei gruppi ossidrilici della molecola di glicerolo.

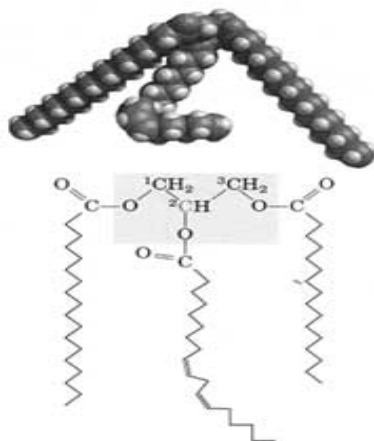


Poiché i gruppi ossidrilici polari del glicerolo e i gruppi carbossilici polari degli acidi grassi sono uniti con un legame estere, i trigliceridi sono molecole apolari, idrofobiche ed insolubili in acqua (D.L. Nelson, M.M. Cox, 2003). Al contrario, i monogliceridi e i digliceridi sono molecole polari (elettricamente non neutre) e se immerse in acqua hanno la capacità di aggregarsi in micelle; questa caratteristica conferisce ai mono e digliceridi degli acidi grassi proprietà tensioattive ed emulsionanti.

La maggior parte dei grassi naturali, come quelli presenti negli oli vegetali, è costituita da miscele complesse di triacilgliceroli semplici e misti, con i gruppi acidi (“acile” = OCOR) rispettivamente uguali e diversi (D.L. Nelson, M.M. Cox, 2003). Inoltre la disposizione degli acidi grassi nei lipidi vegetali non avviene casualmente dal momento che la posizione 2 (centrale) del trigliceride è

preferibilmente occupata da acidi grassi insaturi. Trovare più del 2% di acidi grassi saturi in questa posizione denota l'origine sintetica del grasso.

Figura 1.3 Un tracilglicerolo misto (1-Stearil,2-linoleil,3-palmitil glicerolo)



Oltre ai trigliceridi tutti i grassi naturali, di origine sia vegetale che animale, contengono, quantità generalmente piuttosto piccole (1-2%), di un gruppo di sostanze che viene designato con il nome complessivo di componenti minori. Essi vengono distinti in due categorie:

- i componenti minori saponificabili tra cui le cere, i fosfolipidi, gli sfingolipidi;
- i componenti minori insaponificabili dove si trovano gli idrocarburi saturi, gli idrocarburi insaturi e polinsaturi, i tocoferoli e i tocotrienoli, gli alcoli alifatici superiori, gli steroli, i metilsteroli, gli alcoli di e triterpenici, alcuni composti fenolici chiamati complessivamente “componenti minori polari” oltre alle vitamine liposolubili A, D, K, E, alcuni pigmenti come carotenoidi, clorofilla e gli ubiquinoni. (P.Capella et al., 1997).

1.2 Teoria dell'ossidazione lipidica

Nella tecnologia delle sostanze grasse in genere si individuano tre tipi di irrancidimenti, anche se in modo improprio: l'irrancidimento idrolitico, l'irrancidimento chetonico e l'irrancidimento ossidativo. Quest'ultimo si ricollega alla reazione dell'ossigeno con gli acidi grassi ed è responsabile della genesi di composti di neoformazione che sfociano nella produzione delle sensazioni organolettiche caratteristiche della rancidità, con sviluppo di odori e sapori sgradevoli; nella catena di tali composti taluni sono accertati come potenzialmente dannosi alla salute umana.

Gli aspetti macroscopici dell'autossidazione si manifestano con fenomeni di aumento della viscosità dell'olio, sino a formare per alcuni oli detti "siccativi" (lino, tung, oiticica) film permanenti; ciò avviene con sviluppo di calore che può giungere fino all'autocombustione. Successivamente, a più lunga scadenza, si sviluppano i tipici odori di rancido (P. Capella et al., 1997).

L'ossidazione lipidica è un complesso fenomeno indotto dall'ossigeno in presenza di alcuni iniziatori come il calore, i radicali liberi, la luce (in particolare la luce ultravioletta), pigmenti fotosensibilizzatori e ioni metallici. La reazione si svolge attraverso tre possibili percorsi:

- Catena di autossidazione non enzimatica mediata da radicali liberi;
- Fotossidazione non enzimatica e non radicalica;
- Ossidazione enzimatica.

I primi due tipi di ossidazione consistono in una combinazione di reazioni che coinvolgono rispettivamente l'ossigeno allo stato tripletto $^3\text{O}_2$, che può essere considerato allo stato fondamentale biradicale $\bullet\text{O}\text{O}\bullet$, e l'ossigeno allo stato singoletto $^1\text{O}_2$, che corrisponde ad uno stato eccitato della molecola. L'origine dell'ossigeno allo stato singoletto è spesso collegata all'impatto fotonico dei raggi UV in presenza di pigmenti fotosensibilizzatori. Secondo Frankel ne esistono di due tipi: riboflavina (tipo 1), clorofilla ed eritrosina (tipo 2). Nella fotossidazione, il fotosensibilizzatore allo stato tripletto assorbe un fotone e passa allo stato

singoletto; esso interagisce con l'ossigeno molecolare che attraverso un meccanismo di trasferimento di energia viene convertito nella forma eccitata $^1\text{O}_2$.



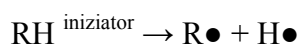
L'ossigeno allo stato singoletto formatosi, può così legarsi ai doppi legami degli acidi grassi portando alla formazione degli idroperossidi, i quali si scindono in radicali liberi, promotori della reazione di autossidazione.

Il processo di autossidazione si compone di tre fasi: iniziazione, propagazione, terminazione.

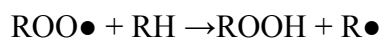
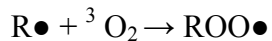
Figura 1.4 Autossidazione degli acidi grassi insaturi

Iniziazione

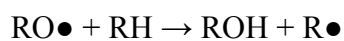
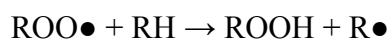
Iniziazione \rightarrow radicali liberi



Propagazione, fase monomolecolare



Propagazione, fase bimolecolare

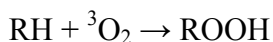


Terminazione

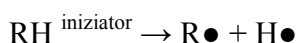


1.2.1. Iniziazione

La fase di iniziazione comporta la rottura dell'idrogeno in posizione α relativo al doppio legame dell'acido grasso (RH).

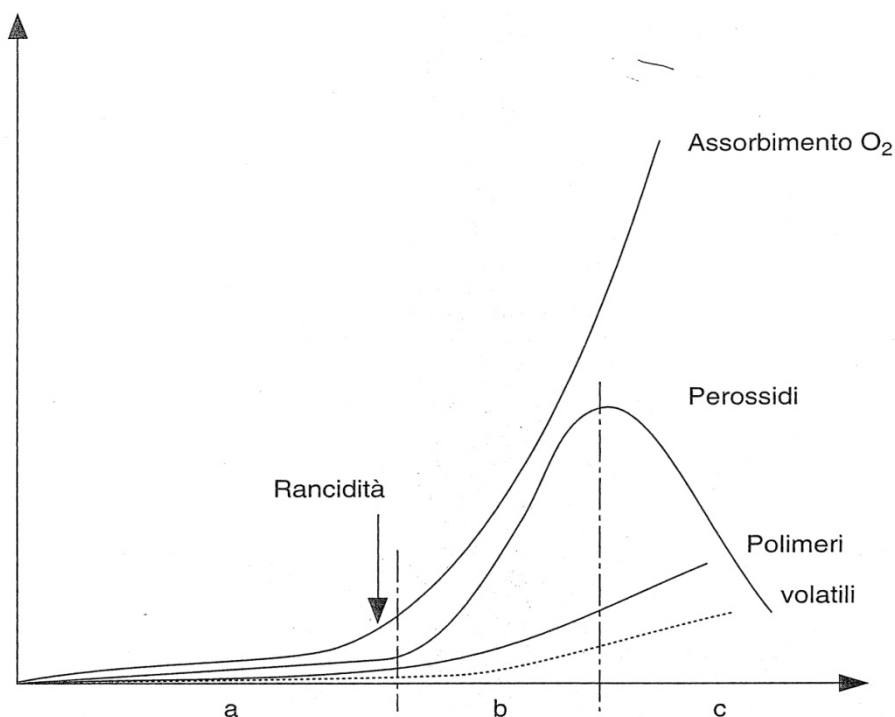


È piuttosto inverosimile che la suddetta reazione possa avvenire spontaneamente con l'ossigeno tripletto poiché la reazione ha una energia di attivazione molto elevata (da 35 a 65 Kcal/mole) (M. Laguerre et al., 2007). La reazione deve quindi essere mediata da fattori esterni come il calore, le radiazioni ionizzanti o un impatto fotonico nello spettro dell'ultravioletto, ma anche attraverso agenti chimici come gli ioni metallici, radicali liberi e metallo proteine.



Il risultato è la formazione del radicale libero $\text{R}\bullet$, dove il punto (\bullet) indica l'elettrone spaiato ed R la restante parte della molecola. I radicali liberi sono molecole molto instabili e molto reattive che tendono a stabilizzarsi sottraendo un idrogeno da un'altra specie chimica. Il processo di ossidazione rimane lento durante questa fase. Alla fine del periodo di iniziazione, il processo di ossidazione accelera improvvisamente, il consumo di ossigeno si fa elevato e la concentrazione dei perossidi aumenta considerevolmente. L'ossidazione lipidica è principalmente promossa da vari tipi di radicali: il radicale idrossile ($\bullet\text{OH}$), il radicale idroperossido ($\text{HOO}\bullet$), i radicali lipidici alcossi ($\text{RO}\bullet$) e perossidi ($\text{ROO}\bullet$).

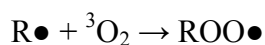
Figura 1.5 Andamento dei principali parametri relativi all'ossidazione delle sostanze grasse.



In ascissa il tempo, in ordinata l'incremento dei singoli sviluppi. Caratterizzazione dei vari periodi: a) induzione (iniziazione); b) propagazione; c) terminazione.

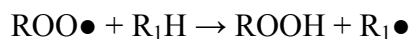
1.2.2 Propagazione

In condizioni aerobiche, il radicale libero $R\bullet$, formatosi durante la fase di iniziazione, reagisce molto rapidamente con l'ossigeno allo stato tripletto 3O_2 , per generare diverse specie di radicali tra cui i perossidi ($ROO\bullet$).



Questa reazione ha una bassa energia di attivazione e un andamento costante ed elevato, così la concentrazione dei radicali perossidi diviene molto più grande di quella dei radicali liberi, in tutti i sistemi di trasporto dell'ossigeno (M. Laguerre et al., 2007). Il radicale perossido sottrae un atomo di idrogeno da un'altra molecola di acido grasso insaturo per formare un idroperossido ROOH (prodotto

primario dell'ossidazione) e un altro radicale R● avviando quindi una reazione a catena.



Dopo la formazione dei primi idroperossidi, questi cominciano ad essere demoliti dando origine alla reazione a catena nella fase di propagazione monomolecolare. È infatti più rigoroso distinguere la fase di propagazione in due parti: la fase di propagazione monomolecolare e bimolecolare con quest'ultima che presenta una velocità molto maggiore e quindi una diversa cinetica avendo luogo quando la concentrazione degli idroperossidi raggiunge un valore critico. La decomposizione di un solo idroperossido avviene fin dal momento in cui si è ossidata dallo 0.5% all' 1% della sostanza grassa su base molare. Verosimilmente la maggior parte degli alimenti diventa inaccettabile in questo periodo. Ad un certo punto, la velocità di reazione diventa direttamente proporzionale alla concentrazione dei perossidi, il che porta alla decomposizione bimolecolare (P. Capella et al., 1997):



Questo processo generalmente viene chiamato “auto sostentamento” della catena di reazione dei radicali e determina un'alta velocità della reazione con un crescente numero di radicali alcossi e perossi che si accumulano nel substrato. La formazione di idroperossidi da acidi grassi insaturi è generalmente accompagnata dalla stabilizzazione dello stato dei radicali attraverso un riarrangiamento dei doppi legami che da origine a dieni e trieni coniugati. Il massimo livello di formazione dei perossidi segna l'inizio della fase di terminazione.

1.2.3 Terminazione

Il processo ossidativo continua con la trasformazione degli idroperossidi nei prodotti secondari (non radicalici) dell'ossidazione. Il principale meccanismo di decomposizione degli idroperossidi comporta la scissione del doppio legame adiacente il gruppo idroperossido, portando alla formazione di idrocarburi,

aldeidi, alcoli e chetoni volatili. Si possono formare anche altri composti secondari non volatili, tra cui aldeidi non volatili, triacilgliceroli ossidati e loro polimeri. Il tipo di prodotti ottenuti dalla ossidazione lipidica è determinata dalla decomposizione degli idroperossidi e dal tipo di scissione dei doppi legami nella catena degli acidi grassi. La reazione può anche terminare dopo la formazione dei polimeri; molti antiossidanti possono facilitare la terminazione della catena di ossidazione radicalica.

1.3 I prodotti dell'ossidazione

Il processo di autossidazione viene solitamente descritto in due fasi: la prima porta agli idroperossidi (prodotti primari), la seconda a prodotti di evoluzione degli idroperossidi (prodotti secondari); tuttavia è bene ricordare che nel reale svolgimento del processo le due fasi sono strettamente collegate e contemporanee.

Per quanto riguarda la formazione degli idroperossidi, la maggior parte degli studi è stata condotta su sistemi modello, come gli esteri metilici degli acidi grassi, data la difficoltà di operare sugli oli stessi. Le generalizzazioni dei risultati ottenuti, sono state applicate agli alimenti contenenti lipidi, ragionando per analogia; in taluni casi però, si è reso necessario considerare limitazioni considerevoli del sistema.

I risultati mostrano come l'oleato di metile subisce l'ossidazione per estrazione dell'idrogeno dal carbonio 8 o 11 con la formazione di due radicali allilici ibridi. L'attacco dell'ossigeno sui carboni dei radicali delocalizzati dà quattro idroperossidi, che posseggono sia la configurazione *cis* sia la *trans* per un totale di otto idroperossidi isomeri. Inoltre le quantità relative degli 8- e degli 11-idroperossidi, nei quali il doppio legame rimane nella posizione Δ^9 , e quelle dei 9- e 10- idroperossidi, nei quali il doppio legame si è spostato (Δ^{10} e Δ^8 rispettivamente), rimangono costanti al variare della temperatura e il loro rapporto è vicino a 1.

Il linoleato di metile porta, quasi esclusivamente, alla formazione di una miscela in parti uguali di 9- e 13- idroperossidi coniugati, che presentano il doppio legame

di neoformazione in posizione *trans*. L'estrazione dell'idrogeno dal carbonio 11, doppiamente allilico, è favorita e porta alla formazione di un radicale pentadienilico. L'addizione dell'ossigeno alle posizioni terminali 9 e 13 dà luogo a sistemi dienici coniugati ed origina i 9- e i 13- idroperossidi. Inoltre la miscela di idroperossidi contiene quattro diversi idroperossidi *cis-trans* e *trans-trans* tutti con il sistema dienico coniugato e la proporzione relativa agli isomeri *trans-trans* aumenta con la temperatura.

Il meccanismo di azione del linolenato di metile e dell'arachidonato di metile sono simili e si basano su quello del linoleato di metile. Esso prevede l'estrazione di un idrogeno dai carboni 11 e 14 con produzione di quattro radicali; il successivo attacco dell'ossigeno dà i corrispondenti idroperossidi nelle configurazioni *cis-trans* e *trans-trans*.

La maggior parte dei composti secondari ha origine da radicali alcossi e perossi che si formano nella fase di propagazione del processo di autossidazione e sono responsabili del tipico sapore ed odore di rancido, oltre che di possibili effetti dannosi per la salute del consumatore.



I prodotti derivati da radicali alcossi e perossi dall'oleato di metile sono riportati nella Tabelle 1.3 a. e 1.3 b.

Tabella 1.3 a. Principali prodotti della degradazione termossidativa dell'oleato di metile con punto di ebollizione inferiore a quello dell'oleato di metile.

1. n-eptano	10. 7-oxo-eptanoato di metile
2. n-ottano	11. decen-2-ale
3. eptanale	12. 7-idrossi-eptanoato di metile
4. 1-eptanolo	13. 8-oxo-ottanoato di metile
5. ottanale	14. undecenale
6. eptanoato di metile	15. 8-idrossi-ottanoato di metile
7. 1-ottanolo	16. 9-idrossi-nonanoato di metile
8. nonanolo	17. 10-oxo-decenoato di metile
9. ottanoato di metile	18. 11-idrossi-undecenoato di metile

Tabella 1.3 b. Principali prodotti della degradazione termossidativa dell'oleato di metile con punto di ebollizione superiore a quello dell'oleato di metile

1. epossidi: 2 isomeri
2. cheto-epossidi: 8 isomeri
3. idrossi-epossidi: 8 isomeri
4. idrossi-esteri: 8 isomeri
5. cheto-esteri: 4 isomeri
6. eossi-perossi: 8 isomeri
7. acido 9,10 diidrossistearico

La decomposizione termica degli idroperossidi dà origine a tutte le sostanze prodotte dall'oleato di metile perossidato. La natura delle sostanze identificate conferma la validità del meccanismo che prevede la rottura del gruppo idroperossidico con formazione di un radicale alcossi, il quale origina la maggior parte delle sostanze volatili elencate; l'origine di alcune sostanze identificate nella Tabella 1.2 a. può essere spiegata con l'intervento di un radicale perossido.

Tra i prodotti di evoluzione del linoleato di metile generalmente sono stati trovati aldeidi, n-alcoli ed esteri di acidi grassi a catena corta con meccanismi di formazione simili a quelli dell'oleato di metile, sia per gli idroperossidi del linoleato di metile sia per quelli del linolenato di metile.

Dalla ulteriore degradazione degli idroperossidi originari possono formarsi anche composti ossigenati ciclici denominati cicloperossidi-idroperossidi, mentre due possibili vie possono portare alla formazione di sostanze polimere; la prima, e più probabile nelle ossidazioni, è la combinazione di due radicali liberi nella fase di terminazione, la seconda è la polimerizzazione diretta di catene di acidi grassi ad alte temperature (frittura). Questi composti però non sono mai stati isolati a causa della loro instabilità (P. Capella et al., 1997).

CAPITOLO 2

GLI ANTIOSSIDANTI

2.1 Introduzione agli antiossidanti

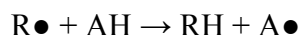
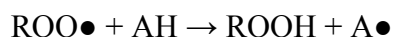
L'aggiunta di antiossidanti negli alimenti è diventata una pratica comune nella produzione alimentare per migliorare la stabilità ed estendere la shelf -life dei sistemi lipidici e dei prodotti contenenti lipidi (Samah S.M. Allam, 2007).

Il termine antiossidante si riferisce ad “una sostanza che, quando presente a basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato ossidabile, è in grado di eliminare o prevenire in modo significativo l'ossidazione di quel substrato” (M. Laguerre et al., 2007).

Gli antiossidanti ostacolano l'ossidazione principalmente in due modi: ritardando la fase di propagazione o proteggendo i lipidi dai promotori dell'ossidazione. Nel primo caso i cosiddetti “chain breaking antioxidants” intercettano il radicale promotore del processo ossidativo (ROO●) o partecipano indirettamente a stoppare la catena di propagazione radicalica. Nel secondo caso, gli antiossidanti denominati “preventive antioxidants” ostacolano la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) o bloccano le specie responsabili della fase di iniziazione ($O_2^-●$, 1O_2 , ecc.) (M. Laguerre et al., 2007). Scott nella sua classificazione, oltre alle due categorie già citate, individua anche una terza specie di “antiossidanti”, cioè dei fattori ambientali in grado di ostacolare la degradazione lipidica (P. Capella et al., 1997).

2.1.1 Antiossidanti di tipo 1

Nelle ossidazioni lipidiche, gli antiossidanti di tipo 1, noti anche come “chain – breaking antioxidants”, operano soprattutto come donatori di idrogeno, rompendo la catena di radicali, poiché formano radicali più stabili (P. Capella et al., 1997):



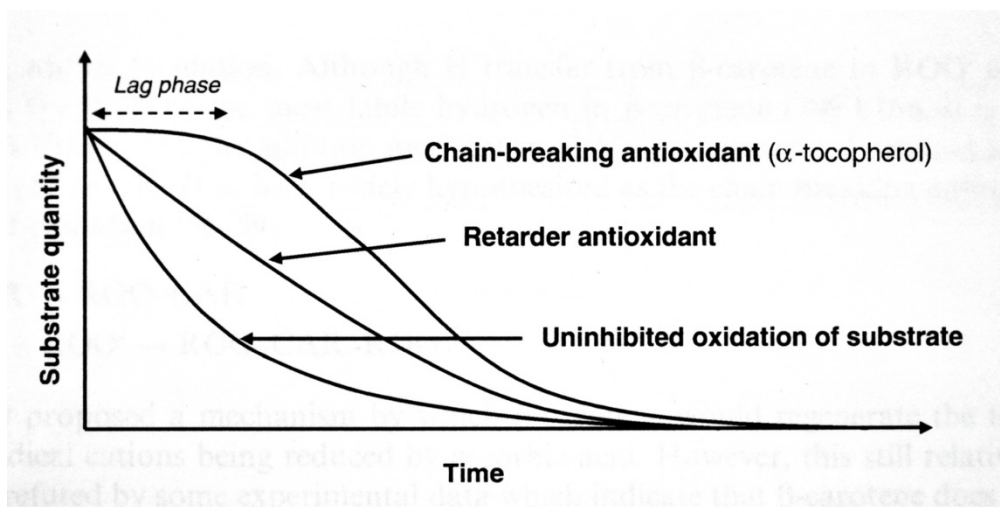
dove: AH = antiossidante

Appartengono a questa categoria, composti fenolici mono o poli- idrossilicati (tocoferoli, tocotrienoli, flavonoidi, acidi ed alcoli fenolici, stilbeni) con diversi sostituenti sugli anelli aromatici. Teoricamente, la capacità di un fenolo di donare un atomo di idrogeno può essere quantificata dall' energia omolitica di dissociazione del legame O – H (“bond dissociation energy” = BDE). La capacità di donare un idrogeno aumenta quando la BDE del fenolo diminuisce. Questo fattore non è l'unico che regola l'attività degli antiossidanti “inattivatori di radicali liberi”; il processo è retto da un sistema di controllo multifattoriale. Una idonea posizione e una buona mobilità verso i siti di produzione dei perossidi $\text{ROO}\bullet$, sono caratteristiche fondamentali per misurare l'efficacia dell'antiossidante come “chain breaking”. Inoltre, bisogna prendere in considerazione la reattività dei radicali derivati dagli antiossidanti, con gli acidi grassi insaturi del sistema lipidico in esame. Questo fatto è generalmente dettato dalla capacità dell'antiossidante di stabilizzare gli elettroni spaiati attraverso sistemi di delocalizzazione. Da questo punto di vista, la struttura aromatica del composto e la possibile presenza di gruppi voluminosi capaci di estendere questa delocalizzazione, aumenta la stabilità dei radicali fenolici; tuttavia ciò rende più difficile la reazione dell'antiossidante con il radicale perossido (M. Laguerre et al., 2007).

Il tipo di protezione fornito corrisponde ad un aumento del periodo di induzione in funzione di un rallentamento della velocità in questo periodo (P. Capella et al., 1997).

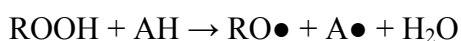
Analizzando la cinetica della reazione, gli antiossidanti di questa categoria, inducono una fase “lag” durante la quale il substrato non è sostanzialmente ossidato; questa fase continua fino a quando l'antiossidante non viene completamente consumato (tipico meccanismo di azione dei tocoferoli).

Figura 2.1 Azione degli antiossidanti di tipo 1 sulla ossidazione lipidica



Una volta che l'antiossidante è sparito, il tasso di ossidazione cresce visivamente fino a che raggiunge lo stesso livello della prova di ossidazione in condizioni di mancata inibizione. Al contrario, gli "antiossidanti ritardanti" riducono il tasso di ossidazione senza generare una fase "lag" distinta (M. Laguerre et al., 2007).

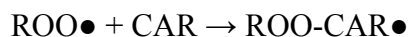
Una ulteriore deduzione che può essere tratta dallo studio della cinetica di reazione è che il tempo di protezione dovrebbe essere direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antiossidante. Questo è relativamente vero; infatti, aumentando la concentrazione dell'antiossidante aumenta l'incidenza della reazione:



e la protezione non ha più luogo. Un'altra limitazione dell'uso di antiossidanti di tipo 1, risiede nel tempo di aggiunta: se la concentrazione dei perossidi è troppo elevata, l'efficienza dell'antiossidante è virtualmente mascherata. Ciò significa che una volta che il prodotto è rancido, l'aggiunta di un antiossidante non può migliorarlo.

Il trasferimento di un atomo di idrogeno dall'antiossidante ai radicali liberi non è il solo meccanismo di azione di un "chain breaking antioxidant". Il β-carotene ostacola la formazione della catena ossidativa attraverso la formazione di un complesso. Sebbene il trasferimento dell'atomo di idrogeno dal β-carotene al

radicale perossido ROO● sia termodinamicamente possibile, il seguente meccanismo di addizione:



dove CAR = β -carotene

produce un composto non radicalico in grado di far terminare la reazione a catena (M. Laguerre et al., 2007).

Non esiste nessuna correlazione tra la qualità di conservazione di un olio, il tipo di sapori ed odori sgradevoli emanati ad un certo momento dell'ossidazione e i risultati dei vari test accelerati. Da un punto di vista della sicurezza alimentare, la domanda più frequente riguarda la possibilità di limitare l'utilizzo di antiossidanti, a favore di un maggior controllo dei fattori ambientali che possono favorire l'ossidazione nei processi di produzione e confezionamento.

La conclusione che può essere accettata come valida è che molti antiossidanti di tipo 1 danno una ottima protezione nel caso di oli e grassi insaturi, in particolare a bassa temperatura (si ricorda che l'azione dell'antiossidante dipende anche dalle condizioni di temperatura alle quali esercita la sua azione) aumentando la shelf – life del prodotto, anche se ulteriori studi sono necessari per valutare la loro efficacia in determinate condizioni ambientali (P. Capella et al., 1997).

2.1.2 Antiossidanti di tipo 2

Comprendono quelle sostanze che influiscono sulla velocità di iniziazione e controllano la fonte di produzione dei radicali liberi prima della fase di propagazione (P. Capella, 1997) . Sono denominati “preventive antioxidant” e posseggono diversi meccanismi di azione in ragione dell'ampio range di fattori di iniziazione disponibili.

I sistemi di azione più conosciuti riguardano la:

- chelazione dei metalli in tracce;
- disattivazione dell'ossigeno singoletto;

- detossificazione dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) attraverso sistemi enzimatici antiossidanti endogeni (M. Laguerre et al., 2007).

2.1.2.1 Agenti chelanti i metalli

Tra i più importanti antiossidanti per alimenti, vi sono gli agenti chelanti che si coordinano con i metalli in tracce rendendoli meno attivi. Le tracce di metalli presenti negli alimenti riducono l'energia di attivazione della fase di iniziazione favorendo in questo modo l'ossidazione del sistema lipidico. È quindi necessario che la tecnologia cerchi di eliminarli o di inattivarli, soprattutto nel caso degli oli utilizzati per il condimento sia a freddo sia a caldo.

L'attività catalitica degli ioni metallici è controllata dallo stadio più lento del ciclo di redox. Essa dipende non solo dalla struttura elettronica del metallo, ma anche dal sistema in cui sono dissolti e dai gruppi leganti attaccati al metallo. Leganti donatori Σ , come le ammine, stabilizzano lo stato ossidato, aumentando la velocità diretta dei radicali; i leganti accettori p (basi eterocicliche) invece, non solo stabilizzano la forma più lenta del ciclo di redox, ma aumentano la velocità di formazione dei radicali (P. Capella et al., 1997).

Alcuni agenti chelanti i metalli sono per esempio proteine come la transferrina, la ferritina, la lattoalbumina in grado di sequestrare il ferro, mentre l'albumina e la ceruloplasmina hanno una azione specifica per il rame. Sono noti per la loro capacità di legare i metalli anche i polifosfati, l'acido etilen-diammino-tetracetico (EDTA), l'acido citrico, gli acidi fenolici e i flavonoidi (M. Laguerre et al., 2007). In particolare, l'acido etilen-diammino-tetracetico, è usato come chelante di molti metalli e sembra essere un ottimo inibitore dell'ossidazione degli alimenti, in particolare quelli ad umidità intermedia o elevata. L'EDTA può essere aggiunto ai prodotti alimentari solo a bassi livelli (meno di 100 ppm sul secco). Lo stesso acido citrico trova applicazione come agente chelante negli oli e negli alimenti ad umidità intermedia, mentre l'acido ascorbico agisce principalmente negli alimenti secchi (P. Capella et al., 1997).

Nei flavonoidi, i punti di attacco degli ioni metallici si trovano in specifiche posizioni idrossiliche sugli anelli aromatici che compongono la loro struttura

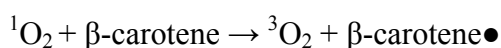
chimica, così che la glicosilazione in questi siti di ancoraggio, riduce il potere chelante di queste sostanze fenoliche (M. Laguerre et al., 2007).

Si ricorda infine, che gli agenti chelanti spesso non sono molto stabili a elevate temperature, quindi i test devono essere condotti alla normale temperatura di ossidazione (P. Capella et al., 1997).

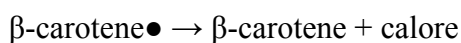
2.1.2.2 Disattivatori dell'ossigeno singoletto

I carotenoidi sono le molecole più efficienti nella disattivazione dell'ossigeno singoletto $^1\text{O}_2$. In natura sono presenti circa 600 specie di carotenoidi, molti dei quali posseggono 40 atomi di carbonio. Essi possono essere semplici catene idrocarburiche come i caroteni (licopene, β -carotene) o includere gruppi funzionali ossigenati, come le xantofille (astaxantina, luteina). Come molti antiossidanti, i carotenoidi, esercitano la loro attività antiossidante attraverso diversi ma molto complementari meccanismi di azione, per esempio agendo da "inattivatori di radicali liberi" (paragrafo 2.1.1) o per l'appunto da disattivatori dell'ossigeno singoletto $^1\text{O}_2$.

Quest'ultimo meccanismo di azione, prevede l'estinzione dell'ossigeno singoletto $^1\text{O}_2$, nell'ossigeno molecolare $^3\text{O}_2$.



L'eccesso di energia generata nello stato eccitato della molecola (β -carotene \bullet), viene dissipata attraverso interazioni con il solvente o con l'ambiente in cui opera.



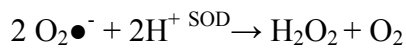
Il rigenerato β -carotene, attraverso questo meccanismo di dissipazione dell'energia, può così ricominciare un nuovo ciclo di disattivazione dell'ossigeno singoletto. È assodato che i carotenoidi possono estinguere circa 1000 molecole di $^1\text{O}_2$, prima di incorrere in reazioni di degradazione.

Infine, oltre ai carotenoidi anche i tocoferoli e i tioli possono agire da “ $^1\text{O}_2$ quenchers”, contribuendo a proteggere i sistemi biologici dai danni ossidativi (M. Laguerre et al., 2007).

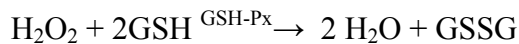
2.1.2.3 Detossificazione dalle specie reattive dell’ossigeno

La detossificazione dalle specie reattive dell’ossigeno (ROS), è principalmente mediata da sistemi enzimatici antiossidanti endogeni delle cellule eucariote.

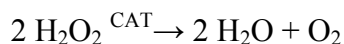
Per prima, la superossido dismutasi (SOD), un metallo enzima, catalizza la dismutazione dell’anione superossido $2 \text{O}_2\bullet^-$ in perossido di idrogeno H_2O_2 e ossigeno O_2 .



La glutatione perossidasi (GSH – Px), è un altro enzima, selenio dipendente, che possiede attività detossificante nei confronti di tre specie reattive come il perossido di idrogeno, gli idroperossidi e i perossi nitriti. In particolare, questa proteina accelera l’ossidazione del glutatione (GSH) da parte del perossido di idrogeno, che viene ridotto in acqua.



Il terzo enzima, è la catalasi (CAT), che presenta come unico substrato il perossido di idrogeno, che viene ridotto in acqua e ossigeno molecolare.



Questi diversi sistemi enzimatici, qui descritti singolarmente, in realtà hanno una stretta attività di cooperazione. Infatti dalla reazione di dismutazione, catalizzata dalla superossido dismutasi, si forma del perossido di idrogeno il quale viene ridotto in acqua grazie all’attività enzimatica esercitata dalla glutatione perossidasi o dalla catalasi (M. Laguerre et al., 2007).

2.1.3 Antiossidanti di tipo 3

Definire questa categoria con il nome di “antiossidanti” non è completamente corretto, perché essi non sono associati all’aggiunta di composti chimici per rallentare la velocità di ossidazione, ma piuttosto intervengono con il controllo di fattori tecnologici. La riduzione della pressione dell’ossigeno o altri fattori ambientali (“environmental factors”) come la temperatura e l’umidità sono in grado di rallentare la velocità dell’ossidazione lipidica (P. Capella et al., 1997).

2.1.4 Agenti pro-ossidanti

È molto importante capire i comportamenti come antiossidante o pro-ossidante delle sostanze bioattive in relazione alla loro struttura, al loro ambiente chimico e alle condizioni di prova.

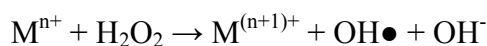
I flavonoidi possono avere effetto pro-ossidante in presenza di rame Cu^{2+} . Questa attività è stata dimostrata nei confronti di una proteina vegetale (β -ficoeritrina) in soluzione acquosa a 37°C in relazione diretta al percentuale di idrolisi della struttura aromatica delle sostanze fenoliche.

Inoltre, i flavonoidi più ossidanti in presenza di rame Cu^{2+} , sono maggiormente antiossidanti in presenza di:

- un radicale perossido (assenza di Cu^{2+});
- un sistema Fenton – simile ($\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$), in grado di generare un radicale idrossile.

I risultati ottenuti da diversi studi evidenziano come alcuni flavonoidi (quercitina, miricetina, canferolo) possono indurre l’ossidazione lipidica e danni al DNA in presenza di metalli di transizione. Allo stesso modo l’aggiunta di α – tocoferolo durante l’ossidazione delle micelle di palmitil-linoleil-fosfatidilcolina (PLPC) indotta dal Cu^{2+} , ha come conseguenza un forte incremento nell’accumulo di idroperossidi. L’attività pro-ossidante dell’ α -tocoferolo può essere collegata alla sua capacità di ridurre il Cu^{2+} in Cu^+ e alla conseguente produzione di un maggior quantitativo di radicali alcolici rispetto ai perossidi, con i primi molto più reattivi rispetto ai secondi nelle reazioni di sottrazione dell’atomo di idrogeno.

Per quanto riguarda l'acido ascorbico, è noto il fatto che esso agisce da pro-ossidante piuttosto che da antiossidante in presenza di ioni metallici di transizione. Questo perché l'acido ascorbico riduce gli ioni metallici ($\text{Me}^{(n+1)+} \rightarrow \text{Me}^{n+}$) e genera perossido di idrogeno attraverso l'autossidazione, che spinge verso la produzione di radicali idrossile con la reazione di Fenton.



dove ($\text{M} = \text{Cu}, \text{Fe}, \text{Co}$, e $n = 2$)

Infine, i carotenoidi hanno attività pro-ossidante solo in determinate condizioni di pressione ambientale. Essi esercitano attività antiossidante quando la pressione parziale dell'ossigeno è inferiore ai 150 Torr (normale pressione dell'ossigeno nell'ambiente). Al contrario, quando la pressione aumenta, il β -carotene perde la sua attività antiossidante e acquisisce un effetto pro-ossidante autocatalitico che aumenta con la sua concentrazione (M. Laguerre et al., 2007).

2.2 Componenti essenziali per l'accertamento dell'attività antiossidante

I metodi di accertamento *in vitro* dell'attività antiossidante si basano generalmente su quattro componenti:

- *un substrato ossidabile*, la cui degradazione ossidativa può essere monitorata attraverso analisi chimico-fisiche o sensoriali;
- *un mezzo*, nel quale le diverse componenti vengono in contatto;
- *le condizioni ossidative*, nei quali il substrato è ossidato;
- *una o più sostanze antiossidanti*, che vengono valutate in base alla loro capacità di proteggere il substrato ossidabile.

Gli esperimenti che possono essere condotti al fine di studiare l'attività antiossidante su una qualsiasi matrice soggetta all'ossidazione, sono essenzialmente di due tipi:

1. Il primo metodo, concerne la possibilità di testare *in situ*, la capacità di un antiossidante di proteggere un substrato naturale (alimentare e non) rimosso dal suo ambiente originario e soggetto a condizioni ossidative

naturali. Spesso per riuscire ad avere risultati in tempi brevi, l'alternativa più comune riguarda l'accertamento dell'efficacia dell'antiossidante su un substrato naturale in cui il fenomeno dell'ossidazione sia stato artificialmente accelerato (esempio: Rancimat test). Questo tipo di approccio è di frequente associato ad una metodica che prevede la quantificazione dei prodotti di ossidazione.

2. Il secondo metodo, riguarda la valutazione dell'attività antiossidante di una determinata molecola in un substrato ossidabile artificiale o definito attraverso una sostanza fluorescente e soggetto a condizioni ossidative accelerate. Questo approccio è spesso associato con una strategia di misurazione basata sulla perdita di substrato.

L'efficacia dell'attività antiossidante dipende da molti e variabili parametri: la polarità del mezzo, la temperatura, il tipo di substrato, le condizioni ossidative, lo stato fisico del substrato (solido, liquido, emulsione). Questo spiega le differenze che in alcuni casi si verificano tra diverse prove sperimentali; è quindi da tener ben presente il fatto che l'efficacia dell'antiossidante non può essere considerata universalmente applicabile per tutti i mezzi, condizioni di ossidazione o substrati (M. Laguerre et al., 2007).

2.2.1 Le sostanze antiossidanti: effetti sinergici, antagonisti ed interpretazione dei risultati

Nello studio delle sostanze antiossidanti il primo approfondimento va fatto sugli effetti non - lineari di sinergia ed antagonismo che possono risultare dal mixaggio delle suddette sostanze nel substrato. Il secondo aspetto riguarda le deviazioni di risultati che gli antiossidanti possono indurre quando viene analizzata la loro efficacia. Secondo la sua definizione la sinergia è “ il fenomeno, nel quale un numero di composti, quando presenti assieme nello stesso sistema, hanno un effetto *più* pronunciato rispetto a quello che ne deriverebbe da un semplice concetto di somma”. Il termine antagonismo può essere definito allo stesso modo sostituendo il termine *più* con *meno* (M. Laguerre et al., 2007).

Ci sono principalmente quattro tipologie di effetti sinergici:

1. La rigenerazione di antiossidanti molto attivi da forme meno attive può spiegare la sinergia notata tra α -tocoferolo e alcuni composti fenolici (epicatechina, catechina e quercitina) in una soluzione di linoleato di metile in un mezzo organico;
2. Le sinergie possono anche essere create attraverso le interazioni tra antiossidanti con diversi meccanismi di azione (estinguitori dell'ossigeno singoletto, inattivatori di radicali liberi). La presenza di agenti chelanti i metalli può ridurre la necessità di inattivatori di radicali liberi, che sono considerati gli antiossidanti più potenti;
3. In mezzi costituiti da più fasi, l'interazione degli antiossidanti con diverse polarità, che sono in questo modo distribuiti in diverse fasi o solventi, può indurre il fenomeno della sinergia (esempio: l'acido ascorbico può indurre la rigenerazione dell' α -tocoferolo);
4. Può infine esserci sinergia tra antiossidanti (acido caffeico, epigallocatechina gallato, Trolox) e sostanze prive di attività antiossidante in una emulsione in cui è presente albumina del siero bovino.

Risultati di antagonismo possono risultare qual'ora vengano cambiati i dati relativi alle condizioni di processo come dimostrato nell'esperimento di Peyrat-Maillard, dove l'utilizzo di un iniziatore azotato idrosolubile al posto di uno liposolubile (utilizzato nell'esperienza di P. Pedrielli e L.H. Skibsted, 2002) ha come conseguenza un effetto antagonista tra l' α -tocoferolo e alcuni acidi fenolici durante l'ossidazione in una soluzione acquosa di acido linoleico.

La presenza di fenomeni non lineari mostra la necessità di studiare le situazioni con approcci che rendano conto del comportamento generale ed individuale di queste sostanze nel sistema, per riuscire ad ottenere risultati attendibili.

Infine, nella stima delle proprietà antiossidanti di una miscela complessa, è fondamentale considerare le tecniche di misurazioni adottate e l'attività dei componenti non-antiossidanti come alcune proteine ed amminoacidi che possono

interferire sul risultato, falsando la veridicità dei dati ottenuti (M. Laguerre et al., 2007).

2.2.2 I substrati ossidabili

La scelta del substrato ossidabile deve tener conto dei fattori che possono influenzare la stima dell'attività antiossidante come:

- la variabilità delle condizioni e degli oli utilizzati;
- il contenuto in antiossidanti naturali (tocoferoli, tocotrienoli, carotenoidi) che possono competere con le sostanze testate;
- la presenza iniziale di composti di ossidazione e sostanze pro-ossidanti come metalli di transizione che possono influire negativamente sul consumo anticipato dell'antiossidante e sulla cinetica di ossidazione;
- la stabilità del substrato se si utilizzano matrici artificiali.

La scelta del substrato ossidabile da utilizzare nelle condizioni di prova dipende dallo scopo di utilizzo dell'antiossidante, che può spaziare dal fine terapeutico, a quello nutrizionale o di preservazione del substrato.

Inoltre è essenziale selezionare un substrato nel quale:

- si può avere un monitoraggio della degradazione ossidativa;
- si ha un'alta rappresentatività relativa alle condizioni nelle quali l'antiossidante esercita il suo effetto protettivo;
- si può avere un compromesso tra la rappresentatività e certe limitazioni di processo come il tempo e il costo di analisi, la fattibilità della prova, le condizioni di processo.

In particolare quando lo scopo della prova sperimentale è quello di accertare l'efficacia dell'attività antiossidante di una sostanza nel preservare un alimento, è meglio utilizzare un substrato derivato dall'alimento. È comunque possibile sviluppare un test specifico per ciascun alimento. Questo approccio è valido se l'analista pone la propria attenzione solamente su pochi cibi, ma non può essere considerato attendibile per misurare l'attività antiossidante di un ampio paniere di derrate.

I trigliceridi e i fosfolipidi rappresentano le migliori fonti di substrati ossidabili, data la loro grande rappresentatività nella dieta anche se pochi test li utilizzano, preferendo substrati costituiti da acido linoleico e dal suo estere metilico che garantiscono una maggiore facilità d'uso e una cinetica di ossidazione più rapida (M. Laguerre et al., 2007).

2.2.3 I mezzi

È noto il fatto che gli antiossidanti si comportano diversamente in mezzi con diverse polarità e fasi. Per questo motivo, non esiste né un mezzo universale in grado di solubilizzare tutti gli antiossidanti in modo neutrale né un singolo metodo per testare i composti antiossidanti.

Un mezzo omogeneo può essere ottenuto con una bassa concentrazione di lipidi dissolta in un solvente, o semplicemente con degli oli vegetali. Molti studi inerenti i metodi di misurazione dell'attività antiossidante su mezzi organici hanno evidenziato che i legami ad idrogeno del solvente possono indurre un improvviso cambiamento nella capacità antiossidante dei composti fenolici, e precisamente nell'abilità di cedere un atomo di idrogeno.

I legami ad idrogeno nel solvente influenzano anche il meccanismo di azione dell'antiossidante (peculiarità dimostrata nei flavonoidi), il quale può comportarsi da "chain-breaking" o da "retarder" a seconda delle caratteristiche del solvente, con conseguenze importanti sulla estensione della fase "lag".

I mezzi eterogenei sono principalmente di due tipi:

1. emulsione olio in acqua;
2. sospensione acquosa di liposomi o lipoproteine a bassa densità;

In questo genere di sistemi, l'ossidazione è influenzata da diversi fattori:

- il tipo di interfaccia e la sua microviscosità;
- le dimensioni e la distribuzione delle goccioline d'olio;
- la ripartizione e la diffusione dell'ossigeno lungo i siti di reazione;
- la posizione dell'antiossidante.

L'ossidazione lipidica in questi sistemi è generalmente più veloce rispetto al mezzo omogeneo d'olio e questo è dovuto ad un aumento dell'area di contatto superficiale. La posizione dell'antiossidante nelle emulsioni è critica per la reattività chimica, poiché questi composti sono più efficienti quando si trovano più vicini al sito di ossidazione. Questo fatto è illustrato dal "Paradosso polare di Porter" dove gli antiossidanti polari sono più attivi nelle soluzioni lipidiche rispetto agli antiossidanti apolari mentre quest'ultimi sono più efficienti in emulsione rispetto ai loro omologhi polari. Il suddetto paradosso si basa sulle proprietà di interfaccia degli antiossidanti, sulla loro ripartizione in mezzi costituiti da più fasi e sul fatto che l'ossidazione lipidica ha inizio nell'interfaccia del sistema. Perciò in un mezzo omogeneo d'olio l'ossidazione ha luogo nell'interfaccia aria – olio dove sono concentrati gli antiossidanti idrofilici, mentre nell'emulsione essa avviene nell'interfaccia olio – acqua dove sono presenti gli antiossidanti lipofilici.

Inoltre, anche le interazioni elettrostatiche esercitate dalla zona di interfaccia e precisamente dagli agenti attivi presenti (neutri, anioni o cationi), influiscono sulla efficacia dell'ossidazione e dell'antiossidazione in quanto sono direttamente collegate a legami tra ioni metallici e lipidi con conseguente incremento del tasso di ossidazione.

Si ricorda infine che l'ossidazione lipidica è influenzata dal valore di pH nell'emulsione olio in acqua e nei liposomi. Essa risulta essere generalmente più bassa a valori di pH elevati, di conseguenza il tasso di ossidazione cresce con l'abbassamento del valore di pH (M. Laguerre et al., 2007).

2.2.4 Le condizioni ossidative

Non esiste in ideale sistema accelerato di invecchiamento in grado di ricreare le condizioni nelle quali si trova ad operare un antiossidante.

La temperatura, è il fattore più influente quando si valuta l'entità del processo ossidativo e in particolare la decomposizione degli idroperossidi. L'efficacia antiossidante sembra essere inversamente proporzionale al calore, e questo può

essere dovuto alla volatilizzazione o alla degradazione termica degli antiossidanti instabili alle alte temperature. Una temperatura eccessiva può inoltre causare la polimerizzazione e la ciclizzazione del substrato lipidico, oltre a portare all'esaurimento dell'ossigeno poiché la solubilità di questa molecola diminuisce con il calore (M. Laguerre et al., 2007).

I radicali perossidi non sono reattivi come i radicali ossidrilici, e questo facilita la loro eliminazione da parte di alcuni antiossidanti; ciò significa che essi sono il primo riferimento per valutare l'attività antiradicalica.

A questo proposito sono noti dei sistemi in grado di favorire la generazione di radicali perossidi ROO● sulla matrice lipidica, come l'utilizzo di iniziatori azotati (idrofilici, lipofilici, anfifilici) o irradiazioni in etanolo.

Il grande interesse verso l'utilizzo di iniziatori azotati nei test *in vitro* si ricollega al loro semplice utilizzo e alla loro capacità di generare radicali perossidi ROO● in modo costante e ripetibile in condizioni moderate di temperatura. Essi hanno applicazione nello studio del fenomeno dell'ossidazione e della capacità antiossidante in matrici alimentari costituite da oli vegetali, emulsioni olio in acqua come le maionesi o alimenti di origine animale. L'efficacia degli iniziatori azotati è altamente influenzata da alcuni parametri chimico – fisici come la temperatura, il pH, il tipo di mezzo, la sua micro viscosità e l'influenza del solvente.

Al contrario dei metalli in tracce, gli iniziatori azotati non favoriscono la decomposizione degli idroperossidi in composti secondari dell'ossidazione; questo porta ad un accumulo artificiale di idroperossidi sul substrato a detrimento dei prodotti secondari di reazione e a una semplificazione del fenomeno naturale dell'ossidazione lipidica (M. Laguerre et al., 2007).

I radicali idrossilici ●OH costituiscono la specie più reattiva nei fenomeni di stress ossidativo a causa del loro elevato potere ossidante e dell'alto tasso di ossidazione di molti substrati organici. Data la loro grande instabilità, essi hanno un tratto di vita estremamente breve e di solito reagiscono direttamente nel sito di produzione.

Come per i perossidi, anche per i radicali idrossile esistono sistemi chimici (la reazione Haber – Weiss, il sistema Fenton e simili, la radiolisi dell'acqua) utilizzati nella ricerca scientifica, per favorirne la loro produzione e studiare l'attività antiossidante esercitata su queste molecole da parte di sostanze con azione antiradicalica (M. Laguerre et al., 2007).

2.3 Composti antiossidanti degli estratti vegetali

Salvia (*Salvia officinalis* L.)

La salvia (*Salvia officinalis* L.) è un'erba aromatica, appartenente alla famiglia delle *Labiatae*. Essa viene largamente utilizzata in gastronomia, ma come suggerisce il suo nome trova applicazione anche nella medicina popolare per i suoi effetti benefici per la salute (N.E. Durling et al., 2007).

Negli ultimi decenni, la salvia è diventata oggetto di studio per la capacità antiossidante dei suoi composti fenolici che costituiscono una valida alternativa al rosmarino per l'aumento della shelf-life di alcuni cibi e prodotti nutraceutici, oltre a trovare applicazione nelle preparazioni cosmetiche e farmaceutiche.

Gli acidi fenolici costituiscono la maggior parte dei componenti solubili in acqua della salvia. A parte alcuni acidi benzoici come l'acido 4-idrossibenzoico e l'acido vanillico, la frazione più consistente degli acidi fenolici è quella costituita dai derivati dell'acido caffeico che sono unici per la salvia eccetto per l'acido rosmarinico e litospermico.

I derivati dell'acido caffeico sono:

- *monomeri* : acido caffeico, acido ferulico;
- *dimeri*: acido rosmarinico che costituisce il composto fenolico maggiormente responsabile della attività antiossidante della salvia (M.E. Cuvelier et al., 1996);
- *trimeri*: acido salvianolico I , il metil-salvianolato I, acido salvianolico K, cumarina;
- *tetrameri*: acido salvianolico L, acido sagerinico (Y. Lu, L. Yeap Foo, 2002).

Tra i composti fenolici si ritrovano i diterpeni fenolici (tipici del rosmarino), come il carnosolo, l'acido carnosico, il rosmadiale, il rosmano, l'epi-rosmano, il metil-carnosato (M.E. Cuvelier et al., 1994) e i glicosidi fenolici tra cui i glicosidi dell'acido cumarico *cis* e *trans*, acidi fenolici esterificati con zuccheri, glicosidi fenolici dell'acetofenone, e glicosidi della neolignina.

La salvia contiene anche flavonoidi che contribuiscono ad aumentare l'attività antiossidante; i più rappresentativi sono:

- i flavoni di apigenina, luteolina, i loro derivati idrossilati oltre ai corrispondenti esteri metilici;
- i flavoni e gli idrossiflavoni glicosilati (Y. Lu, L. Yeap Foo, 2002).

Rosmarino (*Rosmarinus officinalis* L.)

Il rosmarino (*Rosmarinus officinalis* L.) appartiene alla stessa famiglia della salvia (*Labiatae*) e oltre ad essere utilizzato in cucina per aromatizzare i cibi, è conosciuto anche in ambito medico per la sua potente attività antiossidante, le sue proprietà antisettiche ed antimutagene. Il suo utilizzo nell'industria alimentare è promosso dalla crescente domanda dei consumatori che spingono verso l'impiego di sostanze naturali a scapito delle molecole di sintesi.

Grazie alle sue proprietà antiossidanti, il rosmarino è oggi ampiamente utilizzato come sostanza in grado di preservare gli alimenti, sia nella forma in polvere sia come estratto.

I composti responsabili delle proprietà antiossidanti di quest'erba aromatica sono:

- i diterpeni fenolici, come l'acido carnosico, il carnosolo, il rosmano, l'epi-rosmano, l'iso-rosmano, il rosmadiale, e il metil-carnosato;
- l'acido caffeico e i suoi derivati, tra cui l'acido rosmarinico;
- i flavonoidi (M.B. Perez et al., 2007).

Radicchio (*Cichorium intybus* L.)

Il radicchio (*Cichorium intybus*) è una pianta erbacea annuale appartenente alla famiglia delle *Compositae*. Questo vegetale presenta un buon sapore ed eccellenti proprietà salutistiche e nutrizionali. È un prodotto tipico delle regioni orientali del Nord Italia e presenta molte varietà. Esse vengono classificate in base all'epoca della raccolta (precoci e tardive) e alla morfologia della pianta (radicchi rossi e variegati).

Nelle prove sperimentali è stato utilizzato il Variegato di Chioggia, caratterizzato dalla presenza di foglie rotondeggianti, grandi, ondulate che si chiudono a formare il grumolo di forma sferica o leggermente allungata. La colorazione di fondo delle foglie è verde gialla e su di essa si formano screziature di colore variabile dal bianco al giallo fino al rosso.

I diversi radicchi hanno la caratteristica comune di possedere un buon quantitativo di composti fenolici in grado di agire come inattivatori di radicali liberi e quindi di esercitare una importante attività antiossidante; per queste prerogative e anche perché costituiscono un alimento popolare e a basso costo, il loro consumo è in continua ascesa non solo in Europa ma anche negli Stati Uniti.

I composti fenolici tipici del radicchio sono le antocianine, l'acido gallico, l'acido protocatechico, l'acido caffeico, l'acido cicorico e l'acido clorogenico. La loro concentrazione dipende dalla varietà di radicchio considerata, mentre le condizioni di crescita, intese come il tipo di terreno e fertilizzanti utilizzati, non influiscono di molto sulla composizione in polifenoli e sulla capacità antiossidante (M. Rossetto et al., 2005).

Foglie di olivo (*Olea europea* cv. *Grignano*)

Assieme all'olio di oliva, le foglie di olivo (*Olea europaea*) costituiscono un'ottima fonte di polifenoli con attività antiossidante.

I principali costituenti delle foglie di olivo sono:

- *i secoiridoidi* come l'oleuropeina (componente maggiore), lo ligustroside, la dimetil-oleuropeina e l'oleoside;

- *i flavonoidi* come l'apigenina, il camferolo, la luteolina;
- *i composti fenolici* come l'acido caffeico, l'acido ferulico, l'acido siringico, l'acido gallico, il tirosolo e l'idrossitirosolo.

Le foglie di olivo, vengono utilizzate, per le loro proprietà salutistiche, nella medicina popolare in alcuni paesi e isole che si affacciano sul Mediterraneo e la loro valorizzazione costituisce motivo di ricerca per il loro contenuto in sostanze antiossidanti da aggiungere all'olio di oliva raffinato (R. Briante et al., 2002; I. Mourtzinos et., 2007).

CAPITOLO 3

SISTEMI DI MISURAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE NELLE MATRICI LIPIDICHE

3.1 Metodiche utilizzate

I test utilizzati per misurare il potere antiossidante richiedono l'accertamento della estensione del processo ossidativo su una matrice lipidica, in presenza ed in assenza di un antiossidante o di un estratto vegetale. A questo proposito si rende necessario considerare gli indicatori più rappresentativi del suddetto fenomeno.

Le strategie di misurazione da adottare per valutare la capacità antiossidante di una molecola nei confronti di un substrato lipidico sono:

- esaurimento dell'ossigeno;
- perdita di substrato;
- misurazione dei composti primari e secondari dell'ossidazione lipidica;
- metodo Rancimat.

Inoltre, esistono anche metodi indiretti di misurazione dell'attività antiossidante, che non coinvolgono un substrato ossidabile, ma che testano la capacità di una molecola, di ridurre un radicale stabile artificiale o un metallo di transizione. Queste analisi sono il “*DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) Radical Scavenging Method*” e la “*FRAP (ferric-reducing antioxidant power) Assay*” (M. Laguerre et al., 2007).

3.1.1 Esaurimento dell'ossigeno

La durata della fase di iniziazione e la sua estensione in presenza di un antiossidante può essere misurata valutando i modelli di esaurimento dell'ossigeno. I metodi di misurazione possono essere:

- manometrici;
- gravimetrici, attraverso la stima dell'aumento di peso susseguente alla fissazione dell'ossigeno sugli acidi grassi insaturi;

- polarografici utilizzando l'elettrodo di Clark;
- cromatografici (cromatografia HS), prevede la misurazione dell'assorbimento dell'ossigeno attraverso un detector termocoduttimetro (M. Laguerre et al., 2007).

3.1.2 Perdita di substrato

Il monitoraggio della degradazione lipidica in un sistema naturale come un campione alimentare o biologico appare piuttosto complicato con questa tecnica di indagine. Questo a causa della difficoltà di individuare le potenziali biomolecole ossidabili in un sistema complesso, e alla presenza di sostanze interferenti che possono deviare i risultati dell'analisi. Considerando queste limitazioni, la strategia di misurazione basata sulla perdita di substrato, sembra più adatta per accertare l'estensione dell'ossidazione in un sistema modello (substrato singolo e caratterizzato, un mezzo semplice) o in una matrice contrassegnata con sostanze fluorescenti. I metodi che utilizzano questa strategia generalmente richiedono un sistema di misurazione spettrofotometrico in una regione di assorbimento variabile tra l'UV (ultra violetto) e il VIS (visibile).

Le strategie di misurazione più praticate in questo campo sono:

- *analisi dello scolorimento del β – carotene* : riguarda la perdita di colore di questo pigmento vegetale a 470 nm in seguito alla ossidazione del β – carotene per i prodotti di degradazione dell'acido linoleico. Diversi studi hanno dimostrato come l'utilizzo di antiossidanti e di estratti vegetali sia in grado di ritardare lo scolorimento del β – carotene. La tecnica di misurazione allo spettrofotometro può essere associata alla separazione cromatografica su lastrina TLC la quale consente l'identificazione delle sostanze antiossidanti contenute nella miscela costituita da β – carotene e acido linoleico nelle bande di color giallo. Questa tecnica di indagine è stata criticata per la variabilità dei dati ottenuti, spesso influenzati dalle condizioni ambientali.
- *Perdita di fluorescenza dell'acido cis – parinarico* : l'acido cis – parinarico è un acido grasso polinsaturo con quattro doppi legami

coniugati (acido 9-cis,11-trans,13-trans,15-cis,octadecatetraenoico). Questa struttura conferisce alla molecola grandi proprietà di fluorescenza ($\lambda_{\text{ex/em}} = 320/432 \text{ nm}$), ed alta sensibilità all'attacco da parte dei radicali liberi. La fluorescenza di questo acido grasso polinsaturo è irreversibilmente persa durante la sua ossidazione, così molti test (soprattutto nello studio della ossidazione lipidica a carico delle membrane biologiche) utilizzano questa molecola come substrato. Gli inconvenienti di questa tecnica sono riconducibili alla instabilità della molecola alle condizioni di prova (sensibilità all'aria, alla luce) e alla possibile interazione di altre molecole (flavonoidi) nella lettura spettrofotometrica (regione dell'UV).

- *Fluorescenza a base di citometria a flusso* : questo test trova applicazione in ambito medico per lo studio dell'ossidazione e dell'antiossidazione a carico delle membrane cellulari degli eritrociti evidenziate con una sostanza fluorescente ed analizzate con un citometro a flusso.
- *Perdita di fluorescenza del substrato ossidabile BODIPY*: C11-BODIPY è un substrato ossidabile che possiede una luminosa fluorescenza rossa, con un picco di emissione in una regione variabile tra i 591 e i 598 nm a seconda del solvente. Il suddetto substrato è altamente ossidabile dai radicali liberi e questo porta ad una sua graduale perdita di fluorescenza . Il principio del metodo è valutare la capacità degli antiossidanti di proteggere il substrato C11-BODIPY dall'attacco dei radicali perossidi generati da vari iniziatori azotati, ed analizzare i prodotti ottenuti in accordo ai loro spettri di fluorescenza.

(M. Laguerre et al., 2007)

3.1.3 Valutazioni sulla misurazione dei prodotti primari e secondari dell'ossidazione

Al contrario della strategia di misurazione basata sulla perdita di substrato, le metodiche di analisi basate sulla formazione dei prodotti di reazione primari e

secondari sono maggiormente adatte a tutti i tipi di sistemi, tra cui i modelli artificiali, i campioni biologici ed alimentari.

I prodotti primari e secondari sono composti generalmente instabili, con diverse masse molecolari e polarità. Questi fattori complicano la valutazione della estensione del processo ossidativo e dell'efficacia antiossidante; è quindi essenziale valutare la formazione di entrambi i prodotti per avere un quadro completo ed attendibile della situazione in atto.

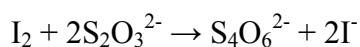
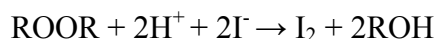
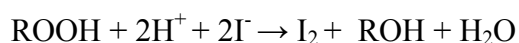
A questo proposito Decker et al. 2005, ricordano come in alcuni casi, l'aggiunzione di antiossidanti può aumentare il livello dei prodotti primari dell'ossidazione con la conseguente formazione di idroperossidi e diminuzione del livello dei prodotti secondari. La sola misurazione dei prodotti primari porterebbe ad un errore di valutazione circa la reale attività antiossidante esercitata dalle sostanze aggiunte al sistema. Allo stesso modo alcuni agenti pro-ossidanti possono essere valutati come sostanze antiossidanti se l'analisi dei prodotti di reazione non è globale (M. Laguerre et al., 2007).

3.1.4.1 Sistemi di misurazione dei prodotti primari dell'ossidazione

Gli idroperossidi sono considerati i prodotti primari dell'ossidazione in grado di fornire le informazioni più importanti sulla intensità della lipoperossidazione; alla loro formazione sono legati i sistemi dienici coniugati che vengono determinati con una analisi spettrofotometrica nella regione dell'ultravioletto.

3.1.4.1 Misurazione iodometrica degli idroperossidi

L'analisi iodometrica per quantificare il valore totale degli idroperossidi e di idrogeno perossido è un metodo standard e convenzionale e costituisce uno dei più radicati e comuni metodi per accertare l'ossidazione dei substrati lipidici. In un mezzo acido, gli idroperossidi e gli ROOR reagiscono con lo ione ioduro per generare iodio, che viene titolato con una soluzione di sodio tiosolfato, utilizzando come indicatore salda d'amido:



Il numero di perossidi (PV) è il quantitativo delle sostanze presenti nel campione, espresso in milliequivalenti di ossigeno attivo per Kg, che ossidano lo ioduro di potassio nelle condizioni di prova. Il valore dei perossidi raggiunge il picco durante la fase di propagazione e poi diminuisce durante la fase di terminazione quando la cinetica di decomposizione degli idroperossidi è più elevata di quella di formazione (M. Laguerre et al., 2007).

Il procedimento, descritto all'Allegato 3 del Reg. (CEE) n. 2568/91 della Commissione dell'11 luglio 1991, è il seguente:

pesare in un ditale di vetro da 3 ml, oppure in mancanza, in un pallone a collo e tappo smerigliato da 250 ml, una massa del campione conformemente alla seguente tabella e al numero di perossidi previsto.

Tabella 3.1 Relazione tra la quantità in g della sostanza grassa da analizzare e il n. di perossidi previsto.

Numero di perossidi previsto (meq)	Peso della sostanza da analizzare (g)
0 – 12	5.0 – 2.0
12 – 20	2.0 – 1.2
20 – 30	1.2 – 1.8
30 – 50	0.8 – 0.5
50 – 90	0.5 – 0.3

Stappare il pallone ed introdurre il ditale di vetro contenente la sostanza da analizzare. Aggiungere 10 ml di cloroformio. Sciogliere la sostanza da analizzare rapidamente, agitando. Aggiungere 15 ml di acido acetico, quindi 1 ml della soluzione di ioduro di potassio (soluzione acquosa satura). Ritappare rapidamente, agitare per 1 minuto e lasciare riposare per 5 minuti esatti al riparo dalla luce, ad una temperatura compresa tra i 15 e i 25 °C.

Aggiungere circa 75 ml di acqua distillata. Titolare lo iodio liberato con una soluzione di tiosolfato di sodio 0.01 N agitando vigorosamente, usando la soluzione di amido, come indicatore.

Eseguire due determinazioni sullo stesso campione di sostanza e in contemporanea una prova in bianco.

Il numero di perossidi (PV) espresso in milliequivalenti di ossigeno attivo per Kg, viene dato dalla formula:

$$PV = \frac{V * T}{m} * 1000$$

dove:

V = è il numero di ml della soluzione di tiosolfato di sodio usata per la prova;

T = è la normalità esatta della soluzione di tiosolfato di sodio usata;

m = è il peso in grammi della sostanza da analizzare.

Considerare come risultato la media aritmetica delle due determinazioni eseguite.

Un olio viene considerato commerciale quando il numero dei perossidi non supera il limite di 20; per gli oli extra vergine di oliva il limite è 10 (R. Biffoli, 1990).

Il metodo ha alcune limitazioni (M. Laguerre et al., 2007):

- il numero dei perossidi è indicativo solamente per i campioni nei quali il fenomeno dell'ossidazione non è allo stadio avanzato e che si trovano in condizioni di temperatura abbastanza miti per evitare la decomposizione degli idroperossidi;
- l'esposizione alla luce, l'assorbimento dello iodio da parte degli acidi grassi insaturi e la formazione dello iodio attraverso l'ossidazione dello ione ioduro in presenza dell'ossigeno atmosferico, possono dare dei fenomeni di interferenza nella stima dell'esatto valore di PV.
- è scarsamente applicabile in emulsioni, alimenti e mezzi biologici dove la presenza di acqua influisce negativamente sul risultato dell'analisi. Per le emulsioni possono essere implementate due strategie: (a) rompere l'emulsione aumentando la forza ionica o attraverso la centrifugazione ;

(b) estrarre una fase grassa liquida – liquida con una evaporazione per eliminare il solvente. Generalmente per evitare inconvenienti quali la generazione di un quantitativo superiore di idroperossidi attraverso l'estrazione della frazione lipidica in presenza di ossigeno, o la decomposizione dei perossidi per temperature troppo elevate utilizzate nella rimozione del solvente, si pratica l'estrazione a freddo dei lipidi con una miscela di metanolo – cloroformio o l'evaporazione del solvente sotto flusso di vapore.

3.1.4.2 Misurazione dei dieni coniugati tramite UV

L'esame spettrofotometrico nell'ultravioletto può fornire indicazioni sulla qualità di una sostanza grassa, sul suo stato di conservazione e sulle modificazioni indotte dai processi tecnologici. Questa analisi permette inoltre di identificare la frode della miscelazione di un olio rettificato all'olio di oliva vergine, sfruttando il fatto che gli oli naturali di pressione non contengono doppi legami coniugati che invece si formano durante la rettifica.

A questo proposito, gli assorbimenti alle lunghezze d'onda previste nel metodo, sono legati alla presenza di sistemi dienici e trienici coniugati. Nel 1931, Gillam et al., dimostrano che durante lo stoccaggio, le sostanze grasse hanno un picco di assorbimento di circa 230 – 235 nm; più del 90 % degli idroperossidi formati durante la lipoperossidazione hanno un sistema di dieni coniugati risultante dalla stabilizzazione dello stato radicalico per mezzo di un riarrangiamento dei doppi legami (M. Laguerre et al., 2007). Questi composti relativamente stabili, assorbono nella regione dell'ultravioletto (232 nm), a differenza dei gruppi carbossilici degli acidi grassi che presentano massimi di assorbimento tra i 175 e i 185 nm, cioè al di fuori della zona utilizzabile nello spettro UV che comincia a 200 nm.

Nella banda di assorbimento di 270 nm, si verifica invece l'esistenza dei trieni coniugati, con tre massimi a 262, 268 e 274 nm; questi sono riscontrabili solo negli oli rettificati.

I valori di tali assorbimenti sono espressi come estinzione specifica $E_{1\% 1\text{ cm}}$ (estinzione di una soluzione della sostanza grassa all' 1% nel solvente prescritto, in spessore di 1 cm) convenzionalmente indicata con K , (detto anche coefficiente di estinzione).

Il procedimento, descritto all'Allegato 9 del Reg. (CEE) n. 2568/91 della Commissione dell'11 luglio 1991, è il seguente:

il campione in esame deve essere perfettamente omogeneo ed esente da impurità. Gli oli liquidi a temperatura ambiente si filtrano su carta alla temperatura di circa 30 °C, i grassi concreti vengono omogeneizzati e filtrati a temperatura di non oltre 10°C alla temperatura di fusione.

Dal suddetto campione si pesano esattamente 0.25 g in un matraccio tarato da 25 ml, si porta a volume con isoottano e si omogeneizza. Con la soluzione ottenuta si riempie una vaschetta di quarzo prismatica, e si misurano allo spettrofotometro le estinzioni, alle lunghezze d'onda significative comprese tra i 232 e i 276 nm, usando come bianco il solvente.

Si riportano le estinzioni specifiche (coefficienti di estinzione) alle varie lunghezze d'onda calcolate come segue:

$$K_{\lambda} = E_{1\%}^{1\text{ cm}}(\lambda\text{ nm}) = \frac{E_{\lambda}}{c * s}$$

dove:

K_{λ} = estinzione specifica alla lunghezza d'onda λ ;

E_{λ} = estinzione misurata alla lunghezza d'onda λ ;

c = concentrazione della soluzione in g/100 ml;

s = spessore della vaschetta di quarzo prismatica in cm.

Nel 1993, Prior et al., utilizzano questa tecnica per valutare la capacità antiossidante di composti sintetici e naturali attraverso la misurazione del loro impatto sulla cinetica di formazione dei dieni coniugati nell'ossidazione di micelle di acido linoleico in mezzo acquoso indotta da un iniziatore azotato. A parte

alcuni vantaggi, gli autori riportano che questa strategia di misurazione, risulta essere più sensibile e meno precisa rispetto a quella basata sull'esaurimento dell'ossigeno (M. Laguerre et al., 2007).

3.1.5 Sistemi di misurazione dei prodotti secondari dell'ossidazione

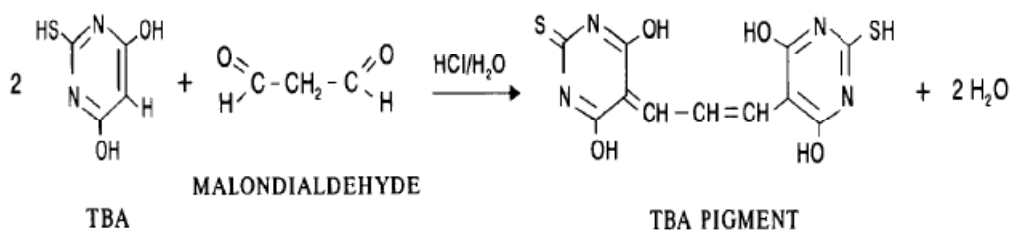
La strategia di misurazione basata sulla determinazione dei prodotti secondari dell'ossidazione, come quella incentrata sulla formazione dei prodotti primari, è adatta per studiare tutti i sistemi lipidici, comprese quelli isolati dal loro ambiente naturale come i microsomi o le lipoproteine a bassa densità. Di seguito vengono riportati i metodi di indagine più utilizzati nella ricerca e nella pratica industriale.

3.1.5.1 Test dell'acido tiobarbiturico (TBA)

Il test dell'acido tiobarbiturico (TBA), concerne la reazione dell'acido tiobarbiturico con l'aldeide malonica (MDA), prodotta dalla decomposizione degli idroperossidi nei sistemi lipidici, ed è legato alla formazione di un composto cromoforo di color rosso con un picco di assorbimento a 532 nm. L'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione dell'aldeide all'interno del campione. Questo complesso colorato risulta dalla reazione di condensazione di due moli dell'acido tiobarbiturico con una mole di aldeide malonica, sotto l'effetto congiunto del mezzo, della temperatura e del pH (Figura 3.1).

TBA è definito come la quantità di aldeide malonica (in mg) presente in 1 kg di sostanza grassa analizzata (M. Laguerre et al., 2007).

Figura 3.1 Reazione di condensazione tra TBA e MDA con formazione del pigmento TBA.



Le limitazioni di questo metodo sono (M. Laguerre et al., 2007):

- l'aldeide malonica si forma solo dalla catena degli acidi grassi con almeno 3 doppi legami, come l'acido linolenico (C 18: 3) portando all'esclusione dei prodotti della decomposizione perossidica dell'acido oleico (C 18: 1) e dell'acido linoleico (C 18 : 2);
- l'acido tiobarbiturico non è specifico per l'aldeide malonica perché può reagire anche con altre aldeidi, imbrunendo i prodotti di reazione, i prodotti di degradazione di proteine e zuccheri, amminoacidi ed acidi nucleici;
- il rischio di sottostimare il responso dell'analisi poiché l'aldeide malonica può formare, in condizioni *in vivo*, basi lineari o cicliche di Schiff, o legami incrociati con arginina e lisina dalle proteine;
- l'aldeide malonica non è presente in molti sistemi lipidici ossidati e spesso costituisce un prodotto dell'ossidazione secondario, scarsamente rappresentativo della degradazione in atto.

3.1.5.2 Misurazione delle aldeidi con il test p – anisidina

Questo metodo è uno dei più antichi per la misurazione dei prodotti secondari dell'ossidazione lipidica e trova applicazione nelle analisi di grassi animali e vegetali adatti per l'alimentazione, la cosmetica e vari usi industriali.

La determinazione del valore di anisidina (AnV) che rappresenta il livello di aldeidi non volatili (2- alchenali) presenti nelle sostanze grasse, si basa sulla reattività del gruppo carbonilico delle aldeidi con il gruppo amminico della p – anisidina, che porta alla formazione di una base di Schiff, la quale assorbe a 350 nm.



Il test fornisce utili indicazioni sui composti carbonilici, specialmente sulle α -aldeidi insature e altri prodotti ad alto peso molecolare della decomposizione lipidica come i dimeri dei trigliceridi. Le aldeidi rappresentate dal parametro AnV, spiegano alcune incongruenze che si possono osservare durante le analisi di

alcuni prodotti. Per esempio, un olio ottenuto raffinando una materia prima altamente ossidata, può presentare un alto valore di p-anisidina, un basso numero di perossidi e un odore di rancido impercettibile semplicemente a causa delle aldeidi non volatili che sono difficili da rimuovere con il processo tecnologico.

I risultati, sono interpretati in un modo relativamente empirico poiché ciascuna aldeide generatasi durante la degradazione lipidica genera uno specifico segnale. Il responso colorimetrico con la p-anisidina, varia in modo direttamente proporzionale al grado di insaturazione delle aldeidi. Di conseguenza, in condizione di concentrazioni identiche, le aldeidi polinsature conferiscono una intensità di colorazione maggiore rispetto a quelle monoinsature, che comunque sono più sensibili rispetto alle aldeidi sature.

Lo stato ossidativo di un grasso dovrebbe essere valutato considerando sia l'ossidazione primaria (valore dei perossidi o PV), sia l'ossidazione secondaria (valore di p-anisidina o AnV). Il valore dei perossidi indica lo stato di ossidazione corrente della sostanza grassa, mentre il valore di p-anisidina ne racconta la storia ossidativa. Studi effettuati sulle correlazioni tra il valore di p-anisidina, o tra il valore Totox (PV + AnV), e la qualità organolettica delle sostanze grasse, mostrano l'efficacia di questi test per misurare l'ossidazione in diversi sistemi lipidici (M. Laguerre et al., 2007).

3.1.5.3 Misurazione cromatografica dei composti volatili

La cromatografia può essere utilizzata per quantificare i composti volatili derivati principalmente dalla decomposizione degli idroperossidi in una matrice ossidata. La cromatografia è un metodo chimico – fisico di separazione, basato sul fatto che i vari componenti di una miscela tendono a ripartirsi in modo diverso tra due fasi, in funzione della loro affinità con ciascuna di esse. Mentre una fase rimane fissa (fase stazionaria), ed è generalmente un solido o un gel, un'altra fase liquida o gassosa (fase mobile), fluisce su di essa trascinando con sé in quantità maggiore i componenti che più risultano affini ad essa. Il passaggio della sostanza eluita viene registrato da un rivelatore posto in fondo all'apparecchio (GC, HPLC); i dati ottenuti vengono elaborati su un cromatogramma che rappresenta la quantità

di sostanza rilevata in funzione del tempo. L'altezza dei picchi rilevati nel grafico è proporzionale alla concentrazione dei composti presenti nella miscela eluita, i quali vengono identificati in base al tempo di ritenzione, definito come il tempo impiegato dall'eluente (ovvero la fase mobile) per trascinare via le singole sostanze dalla fase stazionaria.

Le principali molecole separate con questa tecnica, sono aldeidi, chetoni, acidi carbonilici a catena corta, idrocarburi. Alcune di questi composti sono altamente specifici della degradazione ossidativa di particolari famiglie degli acidi grassi polinsaturi. Il propanale, è il principale indicatore della ossidazione degli acidi grassi a 3 atomi di carbonio, mentre l'esnale (che costituisce il prodotto finale più frequente della degradazione ossidativa) e il pentanale indicano l'ossidazione degli acidi grassi appartenenti alle famiglia *n*-6.

La gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) consente inoltre di accertare la presenza di una ampia gamma di composti e per questo trova grande applicazione tra le metodiche analitiche innovative.

Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del rapporto massa/carica generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti. Tale miscela è ottenuta ionizzando le molecole del campione, principalmente facendo loro attraversare un fascio di elettroni ad energia nota. Le molecole così ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della natura chimica. L'abbondanza di ogni ione rispetto al rapporto massa/carica prende il nome di spettro di massa ed è tipico di ogni composto essendo correlato alla sua struttura chimica e alle condizioni di ionizzazione.

I metodi più utilizzati per recuperare gli indicatori volatili dell'ossidazione sono (M. Laguerre et al., 2007):

1. l'estrazione, e in particolare la distillazione a vapore simultanea (SDE). Il campione è disperso in acqua e riscaldato, con il solvente di estrazione contenuto in una beuta separata; in seguito viene distillato per diverse ore. Il sistema viene poi refrigerato e il solvente rimosso dalla beuta, portato a secco e concentrato tramite una lenta evaporazione. Questo metodo

consente di estrarre grandi quantità di composti volatili poiché essi posseggono una grande solubilità nel solvente organico. L'inconveniente dell'analisi sta nella fase di evaporazione del solvente, che può portare alla degradazione dei composti volatili;

2. le analisi dello spazio di testa (HS) tra cui l'analisi dello spazio di testa statico (SHS), l'analisi dello spazio di testa dinamico o "purge-and-trap" (DHS) e la microestrazione in fase solida dello spazio di testa (HS-SPME). Nella SHS, il campione è inserito in una vial ermetica. Molti composti volatili alla temperatura di analisi evaporano dalla frazione liquida o solida e passano nel gas dello spazio di testa. All'equilibrio, una aliquota del gas HS è raccolta e iniettata in colonna GC. Il metodo è rapido, esanele - specifico e adatto per la misurazione della lipoperossidazione nei campioni biologici. I vantaggi di questo metodo sono la facilità, la rapidità d'uso e l'economicità. Per contro, questa tecnica consente di quantificare solo una parte dei composti target dal momento che il recupero delle molecole volatili nello spazio di testa è parziale. L'innalzamento controllato della temperatura può migliorare le prestazioni del metodo.

Nella DHS, il campione è purificato in continuo da un gas inerte che consente di estrarre i composti volatili; lo stesso gas effluente, passa poi attraverso un polimero poroso (Tenax) che intrappola gli analiti volatili. Questa tecnica consente di recuperare una alta concentrazione di composti target che vengono così iniettati in colonna GC. I difetti di questo metodo sono la variabilità nel profilo della concentrazione dei composti volatili in rapporto alla disponibilità di ossigeno nella vial, la complessità e la dispendiosità della strumentazione e i tempi di analisi richiesti.

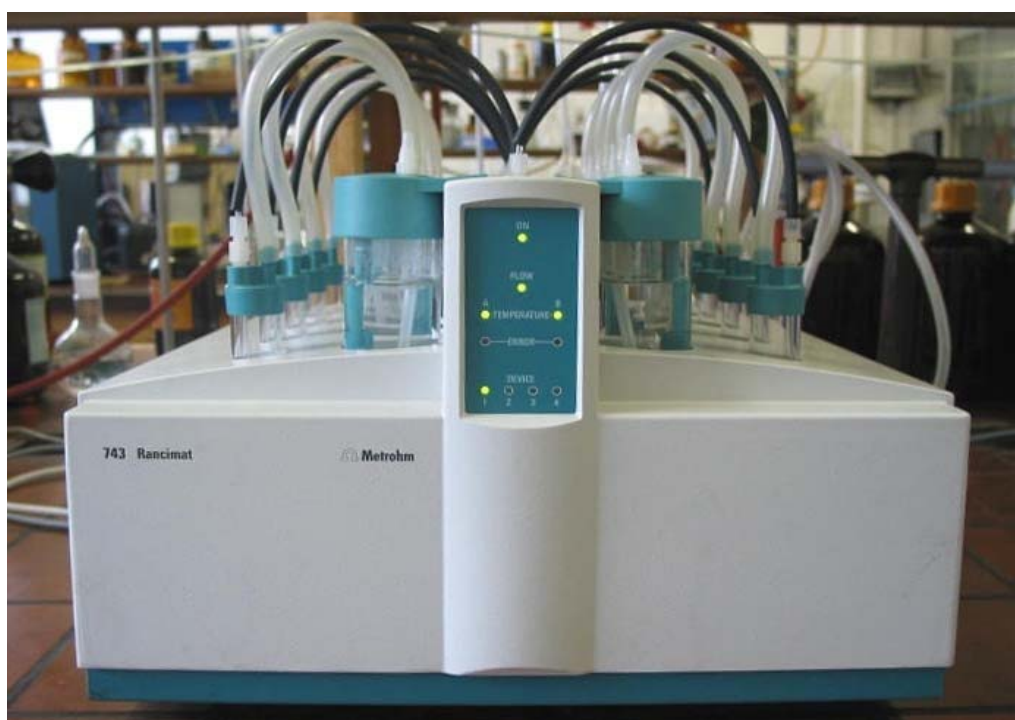
La SPME è un metodo di estrazione gas-solido che non richiede solventi, e che sfrutta le proprietà adsorbanti di un film polimerico, che riveste l'interno di fibre, messe in contatto con lo spazio di testa. La prima fase di equilibrio, consiste nella migrazione dei composti volatili dal campione allo spazio di testa fino al raggiungimento di un equilibrio, poi si ha la fase di adsorbimento quando è raggiunto un compromesso nelle sostanze

volatili, distribuite tra la fibra e lo spazio di testa e l'ultima fase di deadsorbimento termico quando la fibra è introdotta nell'iniettore GC e gli analiti penetrano in colonna. Questa tecnica è stata utilizzata per valutare l'ossidazione lipidica in presenza e in assenza di antiossidanti in prodotti carnei e in emulsioni vegetali; essa costituisce una metodica innovativa e semplice da utilizzare; l'inconveniente più importante consiste nella degradazione rapida della fibra e nei tempi lunghi per le repliche degli studi.

3.1.6 Il metodo Rancimat

Lo strumento Rancimat 743 (Metrohm, Svizzera), consente la determinazione della stabilità ossidativa (OSI) di oli e grassi animali e vegetali sottoposti a condizioni di stress ossidativo accelerato (Figura 3.2).

Figura 3.2 Rancimat 743 (Metrohm)



Nel metodo Rancimat, un flusso di aria purificata viene fatto passare attraverso il campione di olio raccolto all'interno di un contenitore sigillato e riscaldato alla temperatura desiderata in blocchi di alluminio termostataati.

Questo trattamento porta alla degradazione dell'olio, con la conseguente produzione di perossidi come prodotti primari del processo ossidativo. Dopo poco tempo, gli acidi grassi vengono completamente distrutti; i prodotti secondari dell'ossidazione che si vengono a formare includono acidi organici a basso peso molecolare e composti organici volatili. Questi, sono trasportati con il flusso d'aria in un secondo contenitore con acqua distillata, dove è presente un elettrodo, collegato al software del PC, che misura in continuo la conduttività in un range compreso tra 0 e 300 $\mu\text{s}/\text{cm}$.

Figura 3.2. Rancimat Control 743

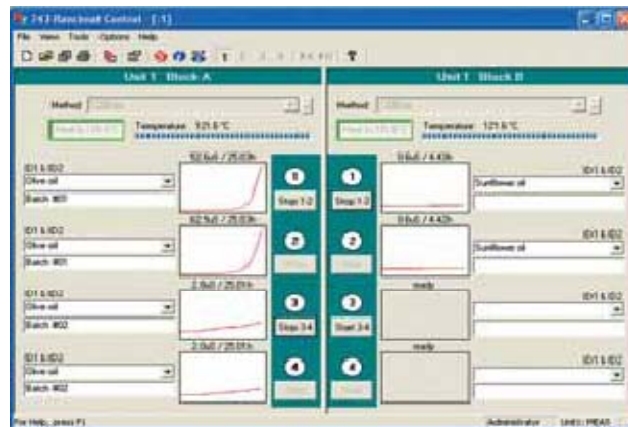
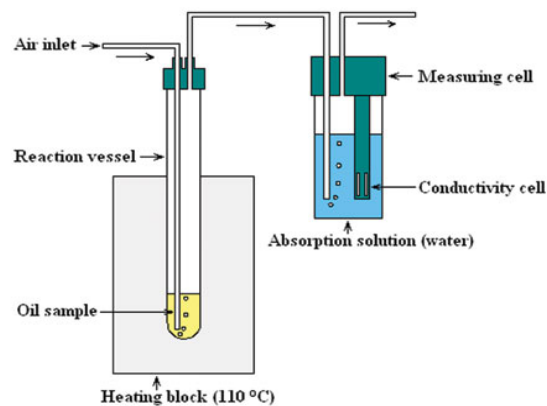


Figura 3.3 Rappresentazione schematica dell'analisi mediante Rancimat



La conducibilità della soluzione di assorbimento viene registrata in funzione del tempo trascorso; ne deriva una curva di ossidazione, dove il punto di flesso rappresenta il periodo di induzione (IP), definito come il tempo richiesto per produrre un significativo incremento della conduttività in seguito alla formazione dei composti volatili. Esso quindi si considera finito quando la conduttività inizia ad aumentare rapidamente e questo si lega alla dissociazione degli acidi carbossilici volatili in acqua.

Il metodo Rancimat viene utilizzato nella determinazione della stabilità ossidativa sia di oli tal quali sia di oli ai quali sono stati aggiunti antiossidanti sintetici o naturali al fine di aumentare il tempo di induzione e posticipare l'irrancidimento ossidativo.

CAPITOLO 4

COMPOSIZIONE E CARATTERISTICHE DEGLI OLI ANALIZZATI

4.1 Generalità sugli oli di semi

Oltre all'olivo, numerose altre specie vegetali hanno frutti (30%) o semi (70%) con un contenuto in olio tale da renderne conveniente l'estrazione. L'olio di semi può essere destinato all'industria alimentare, al consumo diretto, previa rettifica, ed anche all'industria cosmetica, farmaceutica, chimica. Il residuo dell'estrazione può venire impiegato in altri settori tra cui in prevalenza quello zootecnico (mangimi). Gli oli di semi sono caratterizzati da un elevato contenuto in acidi grassi insaturi, in particolare linoleico, e da qualità organolettiche gradevoli. È consigliabile utilizzarli crudi, come condimento, anche se rispetto all'olio di oliva, il sapore è meno soddisfacente. Non tutti sono adatti per friggere dato l'alto contenuto in acidi grassi polinsaturi (alterazioni del prodotto con formazione di perossidi e polimeri); in ogni caso è sempre da evitare l'uso ripetuto dello stesso olio (P. Cappelli, V. Vannucchi, 2000).

4.2 Olio di semi di soia (*Glycine max* Merr.)

4.2.1 Materia prima

La soia è una pianta annuale, appartiene alla famiglia delle *Leguminosae* ed è diffusa in Asia e Australia (zone di origine) ma è molto coltivata anche nelle Americhe e in Europa.

Negli ultimi 20 anni la produzione mondiale di soia è raddoppiata raggiungendo i 210 milioni di tonnellate; questo trend dovrebbe mantenersi anche per i prossimi anni in concomitanza con la crescita della popolazione mondiale. Il maggiore aumento lo ha registrato il Sud America con un notevole incremento della superficie adibita alla coltura di soia in Paesi come il Brasile, il Paraguay e la Bolivia (dati ufficiali WWF, 2007).

In Italia alla coltura di soia sono dedicati circa 148.000 ettari e solo al Nord, dal momento che nelle regioni meridionali dovrebbe essere irrigata.

La produzione di semi si aggira sui 15 – 25 q/ha (V. Sciancalepore, 1998); i semi leggermente reniformi, di color giallo, hanno una cicatrice chiamata ilario, che corrisponde al punto di unione dei vasi conduttori con il baccello. Essi possono essere conservati a lungo, con una umidità del 12 % circa, senza variazione del contenuto in acidi grassi liberi (P. Capella et al., 1997).

I semi presentano la composizione percentuale riportata nella Tabella 4.1 (V. Sciancalepore, 1998).

Tabella 4.1 Composizione percentuale dei semi di soia

Composto	Percentuale (%)
acqua	10-12
olio	18-22
sostanze azotate	38-42
estrattivi non azotati	26-30
fibra grezza	4-5
ceneri	4-5

4.2.2 Produzione

Secondo il Dipartimento dell'Agricoltura Statunitense il consumo mondiale di olio di semi di soia nell'anno 2000 è stato di 26.0 milioni di tonnellate.

La lavorazione dei semi prevede le seguenti fasi:

- pulitura (permette di allontanare tutte le sostanze organiche ed inorganiche che inquinano i semi);
- depellicolazione (consente di allontanare le pellicole che aderiscono al seme);
- macinazione (permette di aumentare la superficie di estrazione e rompere le cellule oleifere);

- riscaldamento-condizionamento (con questo processo si raggiunge nel seme un grado di umidità ottimale che consente una buona resa di estrazione);
- laminazione (mediante una forte compressione è possibile ridurre in lamelle molto fini il materiale da disoleare, favorendo l'estrazione con solvente)
- l'estrazione con solvente (esano). Essa viene eseguita per i semi poco oleosi e generalmente si effettua in impianti continui. Questa si realizza per immersione, percolazione, o sfruttando entrambi i principi. Nel primo caso la farina è immersa completamente nel solvente in controcorrente e l'estrazione avviene per diffusione, con tempi lunghi e rese limitate (circa il 15%). La percolazione si effettua invece in estrattori continui mobili, che vengono a contatto continuamente col solvente cadente a pioggia; i contenitori delle farine sono cesti o casse forate. In questo modo si estrae l'olio già libero dalle strutture cellulari; la resa può arrivare al 35%. Spesso i due metodi vengono abbinati; dapprima i semi macinati grossolanamente, sono sottoposti ad estrazione per percolazione; successivamente, allontanato il solvente, la farina è ridotta in lamine sottili e sottoposta nuovamente a estrazione per immersione. Esistono anche impianti discontinui che però sono utilizzati soprattutto per estrarre l'olio dalle sanse.

Le miscele ottenute vengono poi filtrate e il solvente (esano, e in alcuni casi benzina), allontanato negli impianti continui tramite preconcentramento, distillazione ed evaporazione sotto vuoto dei residui.

Si ottiene così un olio di colore giallo-rossastro, con odore e sapore che ricordano quello dei legumi crudi; comunque in seguito a rettifica (demucillaginazione, neutralizzazione, decolorazione, deodorazione, demargarinazione) questi scompaiono e l'olio assume caratteristiche organolettiche gradevoli. Importante risulta la fase di demucillaginazione, che consente di recuperare la lecitina (0.2%), un emulsionante alimentare.

Il seme di soia è caratterizzato da un elevato tenore proteico (40-50%), ricco in amminoacidi essenziali tra cui la lisina, la leucina, l'isoleucina, e la valina. Dai semi, come residuo dell'estrazione, si ottiene una farina che rappresenta la principale fonte proteica destinata alla alimentazione animale (suini, pollame). La farina può essere anche panificata, da sola, o miscelata a quella di frumento. Con essa si producono pane, pasta, biscotti, dolci in genere. Da essa si ricava anche un latte che presenta dal punto di vista nutrizionale, analogie con quello vaccino, con il vantaggio di non contenere lattosio e quindi di poter essere utilizzato da coloro che presentano intolleranza a questo disaccaride (P. Cappelli, V.Vannucchi, 2000).

4.2.3 Caratteristiche chimico – fisiche

Le principali caratteristiche chimico – fisiche e compositive dell'olio di semi di soia sono riassunte nelle seguenti Tabelle (P. Capella et al., 1997).

Tabella 4.2 Principali proprietà chimico – fisiche

Densità relativa (20°C)	0.919-0.925
Indice di rifrazione (n_D^{25})	1.4720-1.4760
Numero di saponificazione	189-195
Numero di iodio, Wijs	120-145
Insaponificabile (%)	Max. 1.5

Tabella 4.3 Composizione in acidi grassi

Acido grasso	Percentuale (%)
< 14:0	-
14:0 ac. miristico	Max 0.1
16:0 ac. palmitico	9.0-13.0
16:1 ac. palmitoleico	Max 0.3
18:0 ac. stearico	3.0-5.0
18:1 ac. oleico	17.0-30.0
18:2 ac. linoleico	48.0-58.0
18:3 ac. linolenico	5.0-10.0
20:0 ac. arachico	Max 1.0
20:1 ac. eicosenoico	Max 0.5
22:0 acido behenico	Max 0.5

L'olio di soia può ritenersi un olio completo poiché contiene entrambi gli acidi grassi essenziali, linoleico e linolenico; 20 g di olio di soia non raffinato soddisfano il fabbisogno giornaliero di entrambi i grassi essenziali. L'alto tenore in acidi grassi polinsaturi, in particolare linolenico, può determinare una alterazione del sapore, dovuta a processi ossidativi (reversione); per questi motivi, andrebbe conservato in frigorifero, in bottiglie opache.

Tra i componenti minori saponificabili, rilevante è il contenuto in fosfolipidi (circa il 3%), tra cui la lecitina (0.2%).

Le seguenti Tabelle riportano la composizione della frazione dell'insaponificabile*.

Tabella 4.4 Composizione dei tocoferoli

Composto	Concentrazione (ppm)	Percentuale (%)
α -tocoferolo	116	10.0
β -tocoferolo	34	2.9
γ -tocoferolo	737	63.4
δ -tocoferolo	275	23.7
	Totale 1.162	Totale 100.0

Tabella 4.5 Composizione degli alcoli triterpenici

RRT	Composto	Concentrazione (ppm)	Percentuale (%)
0.73	<i>non identificato</i>	8	0.9
1.06	<i>non identificato</i>	42	5.0
1.13	β -amirina	126	14.9
1.17	butirospermolo	139	16.5
1.23	cicloartenolo	158	19.9
1.32	<i>lupeolo</i>	235	27.8
1.38	24metilencicloartanolo	76	9.0
1.65	<i>non identificato</i>	17	2.0
	<i>altri</i>	34	4.0
		Totale 835	Totale 100.0

Tabella 4.6 Composizione dei metilsteroli

RRT	Composto	Concentrazione (ppm)	Percentuale (%)
0.95	obtusifoliolo	53	8.1
0.99	<i>non identificato</i>	13	2.0
1.13	gramisterolo	158	24.0
1.29	<i>non identificato</i>	6	0.9
1.36	<i>non identificato</i>	66	10.0
1.52	citrostadienolo	349	53.0
	<i>altri</i>	13	2.0
		Totale 658	Totale 100.0

Tabella 4.7 Composizione degli steroli

RRT	Composto	Concentrazione (ppm)	Percentuale (%)
0.83	campesterolo	720	20.1
0.88	stigmasterolo	720	20.1
1.00	β -sitosterolo	1908	52.8
1.03	Δ^5 -avenasterolo	108	3.0
1.12	Δ^7 -stigmastenolo	108	3.0
1.16	Δ^7 -avenasterolo	36	1.0
		Totale 3600	Totale 100.0

4.2.4 Impiego dell'olio di soia

L'olio di soia raffinato viene impiegato come olio da tavola, olio da frittura e nell'industria delle margarine.

L'olio di soia trova applicazione anche nell'industria chimica (preparazione resine, plastiche, lubrificanti, adesivi) e dei cosmetici. In questo ambito si

utilizzano diverse sostanze contenute nella soia. Gli acidi grassi polinsaturi, oltre ad essere particolarmente efficaci nell'abbassare il colesterolo, migliorano infatti il trofismo e l'elasticità della cute (azione emolliente). L'olio di soia risulta molto efficace nell'attenuare le smagliature, grazie agli isoflavoni, sostanze simili agli estrogeni, che stimolano le cellule cutanee a produrre collagene, elastina, acido ialuronico e a riparare i tessuti danneggiati. Dalla frazione dell'insaponificabile si ricavano sostanze (alcoli superiori, alcoli triterpenici, metilsteroli, steroli) che trovano applicazione in cosmetica perché conferiscono all'olio (utilizzato come eccipiente) proprietà emollienti, lenitive, seboregolatrici, elasticizzanti, antiinfiammatorie, foto protettive. A questa categoria appartengono anche le vitamine liposolubili A ed E. Per quanto riguarda la vitamina A, in cosmetica, si usa il suo precursore *retinolo*, che favorisce un aumento della elasticità e dello spessore della pelle, ha un effetto antirughe e consente la normalizzazione della cute fotodanneggiata. I tocoferoli (tra cui l'*α-tocoferolo* o vitamina E) invece, esercitano una azione antiossidante efficace sull'epidermide; essi proteggono i tessuti dai processi di invecchiamento, danneggiamento da stress ossidativo ed sono in grado di esplicare una azione idratante sulla pelle poiché creano un film protettivo che limita la perdita di acqua.

4.3 Olio di semi di mais (*Zea Mays L.*)

4.3.1 Materia prima

Il mais o *Zea Mays L.* è una pianta annuale appartenente alla famiglia delle *Graminaceae*, tribù delle *Maydeae*, originaria del Messico ed introdotta in Europa (Spagna) da Cristoforo Colombo nel 1493, dove trova applicazione prima come pianta ornamentale, poi da granella. In Italia la sua coltivazione risale al 1500 nelle province di Venezia e Rovigo e nel 1600 alimentava già un florido commercio.

A livello mondiale, la produzione media è di 590 milioni di tonnellate (766 milioni nel 2006), 40% dei quali provenienti dagli USA (maggior esportatore),

il 12% dall'Europa. In Italia le sono dedicati 1.087.000 ettari di cui il 77% al Nord, per evitare la pratica dell'irrigazione, con una produzione di 10.2 milioni di tonnellate e una resa media di 9.38 t/ha.

Il mais è destinato alla alimentazione animale (granella, erbaio), umana (farine), all'industria alimentare e non (amido, olio, proteine, fibra, bioetanolo).

La struttura e la composizione chimica della cariosside sono riportate nelle Tabelle 4.8 e 4.9.

Tabella 4.8 Parti percentuali della cariosside di mais

Parti della cariosside	Percentuale (%)
Pericarpo	7.5
Aleurone	7.1
Endosperma	73.9
Germe	11.5

Tabella 4.9 Composizione chimica della cariosside di mais

Composizione	Percentuale (%)
Acqua	7.23
Amido	64.78
Proteine	8.14
Cellulosa	1.8-3.5
Zuccheri	1.0-3.0
Olio	3.1-5.7
Minerali	1.1-3.9

La cariosside contiene il 5% circa di olio, di cui l'80 % è concentrato nel germe.

4.3.2 Produzione

L'olio di mais si ottiene combinando l'estrazione per pressione con l'estrazione con solventi. Il germe viene allontanato da seme con un procedimento di

degerminazione, che può avvenire in acqua o a secco. Successivamente i germi, essiccati, riscaldati e condizionati, sono ridotti in lamine sottili e sottoposti all'estrazione con solvente (gli impianti utilizzati sono gli stessi già citati nel paragrafo 4.2.2). La resa è di circa il 5% rispetto al peso della cariosside intera (P. Cappelli, V. Vannucchi, 2000).

L'olio grezzo è di color rosso-ambra scuro, ha una acidità inferiore al 3%, contiene quantità elevate di fosfolipidi e tracce di cere. L'olio raffinato, privo di cere e fosfolipidi, è uno degli oli di seme più pregiati per la sua stabilità all'ossidazione, nonostante il suo alto grado di insaturazione (P. Capella et al., 1997).

4.3.3 Caratteristiche chimico – fisiche

Le principali caratteristiche chimico – fisiche e compositive dell'olio di mais sono riassunte nelle seguenti Tabelle (P. Capella et al., 1997).

Tabella 4.10 Proprietà chimico – fisiche

Densità relativa (20°C)	0.918-0923
Indice di rifrazione (n_D^{25})	1.4700-1.4740
Numero di saponificazione	187-195
Numero di iodio, Wijs	110-130
Insaponificabile (%)	Max 2.5

Tabella 4.11 Composizione in acidi grassi

Acido grasso	Percentuale (%)
< 14:0	-
14:0 ac. miristico	Max 0.1
16:0 ac. palmitico	10.0-15.0
16:1 ac. palmitoleico	Max < 0.5
18:0 ac. stearico	1.5-3.0
18:1 ac. oleico	23.0-41.0
18:2 ac. linoleico	39.0-63.0
18:3 ac. linolenico	0.6-1.1
20:0 ac. arachico	0.2-0.7
20:1 ac. eicosenoico	0.2-0.5
22:0 ac. behenico	Max 0.2

L'olio di mais è molto valido dal punto di vista alimentare – dietetico. Come riportato in Tabella 4.11 contiene circa il 14% di grassi saturi, soprattutto acido palmitico, circa il 39% di acidi grassi monoinsaturi, quasi esclusivamente acido oleico e circa il 47% di acidi grassi polinsaturi, in particolare acido linoleico.

Come tutti gli oli di semi possiede attività lassativa e ipocolesterolemizzante. L'elevato contenuto in acidi polinsaturi determina proprietà anticolesteroliche. È consigliabile quindi che questi oli, siano presenti nell'alimentazione in rapporto 1:1 con l'olio di oliva.

Le seguenti Tabelle riportano la composizione della frazione dell'insaponificabile*.

Tabella 4.12 Composizione dei tocoferoli

Composto	Concentrazione (ppm)	Percentuale (%)
α -tocoferolo	134	22.2
β -tocoferolo	18	3.0
γ -tocoferolo	412	68.3
δ -tocoferolo	39	6.5
	Totale 603	Totale 100.0

Il quantitativo rilevante di tocoferoli, rappresentati dal γ -tocoferolo, cala notevolmente in seguito ai trattamenti di rettifica.

Tabella 4.13 Composizione degli alcoli triterpenici

RRT	Composto	Concentrazione (ppm)	Percentuale (%)
1.02	cicloartanolo	3	2.3
1.13	β -amirina	5	3.7
1.17	α -amirina	49	37.4
1.38	24metilencicloartanolo	69	52.7
1.50	<i>non identificato</i>	1	0.8
1.68	ciclobranolo	3	2.3
	<i>altri</i>	1	0.8
		Totale 131	Totale 100.0

Tabella 4.14 Composizione dei metilsteroli

RRT	Composto	Concentrazione (ppm)	Percentuale (%)
0.64	<i>non identificato</i>	1	0.8
0.91	<i>non identificato</i>	1	0.8
0.95	<i>obtusifoliolo</i>	39	30.7
1.13	gramisterolo	44	34.6
1.29	<i>non identificato</i>	1	0.8
1.36	<i>non identificato</i>	1	0.8
1.46	<i>non identificato</i>	1	0.8
1.68	citrostadienolo	39	30.7
		Totale 127	Totale 100.0

Tabella 4.15 Composizione degli steroli

RRT	Composto	Concentrazione (ppm)	Percentuale (%)
0.83	campesterolo	2691	23.0
0.88	stigmasterolo	702	6.0
1.00	β -sitosterolo	7722	66.0
1.03	Δ^5 -avenasterolo	468	4.0
1.12	Δ^7 -stigmastenolo	117	1.0
		Totale 11700	Totale 100.0

4.3.4 Impiego dell'olio di mais

L'olio di mais è impiegato come olio da tavola, da cucina, e nella fabbricazione delle margarine, in alcuni casi dopo essere stato parzialmente idrogenato.

Viene utilizzato anche per la preparazione di vernici e saponi. L'industria farmaceutica lo usa abitualmente come veicolo per molti preparati ad uso topico, cioè da applicare esternamente su una regione limitata del corpo.

In cosmetica, grazie anche al suo ottimo contenuto in sostanze insaponificabili, può essere utilizzato per preparazioni emollienti, che conferiscono morbidezza, elasticità e lucentezza all'epidermide oltre ad idratare pelli secche e senili.

Infine la vitamina E contenuta in questo olio, esplica un importantissimo fattore di protezione nei confronti dei fenomeni ossidativi a carico dei fosfolipidi di membrana, proteggendo i tessuti dall'invecchiamento.

* Nelle Tabelle relative alla composizione degli alcoli triterpenici e dei metilsteroli (determinate mediante GC), viene riportato il *tempo di ritenzione relativo* (RRT) di ogni singolo composto, calcolato sulla base del tempo di ritenzione del β -sitosterolo (30 minuti) posto uguale a 1.00. Gli RRT degli steroli sono gli stessi riportati dalla *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea*.

4.4 Legislazione relativa agli oli di semi

Gli oli di semi, secondo la vigente normativa tra cui la L 35/68, il DM 27/12/72 e il DM 18/12/75, devono:

- essere sottoposti a processo di rettifica;
- venir definiti “oli di semi di ...” con il nome della specie del seme oleaginoso, oppure “ oli di semi vari” nel caso in cui siano costituiti da una mescolanza di oli che derivano da diversi semi oleosi;
- avere una acidità libera totale non superiore allo 0.5%, calcolata come acido oleico;
- presentare buone caratteristiche organolettiche come il sapore e l'odore;
- non essere addizionati di coloranti;
- venir venduti in recipienti sigillati;
- non contenere più del 5% di acido erucico nel caso in cui la miscela sia formata anche da olio di colza (P. Cappelli, V. Vannucchi, 2000).

CAPITOLO 5

MATERIALI E METODI

5.1 Campioni utilizzati nelle prove sperimentali

- ❖ Oli di semi: olio di semi di soia (Zucchi), olio di semi di mais (Maya).
- ❖ Estratti vegetali: estratto di salvia (*Salvia officinalis L.*) in etanolo assoluto 96%, estratto di rosmarino (*Rosmarinus officinalis L.*) in etanolo assoluto 96%, estratto di radicchio (*Cichorium intybus L.*) in etanolo assoluto 96%, estratto di foglie di olivo (*Olea europea cv. Grignano*) in etanolo assoluto 96%.

5.2 Preparazione degli estratti naturali

La preparazione degli estratti naturali è stata eseguita attraverso la triturazione del materiale vegetale (foglie di salvia, foglie di rosmarino, radicchio, foglie di olivo) con azoto liquido (- 196°C), utilizzando un pestello e un mortaio fino ad ottenere una polvere fine. Si è proceduto poi, alla infusione del campione nel solvente (etanolo assoluto 96%), per un periodo di 24 ore. In seguito, l'infuso è stato centrifugato recuperando il surnatante e conservandolo al buio e ad una T°C di - 20 °C.

Gli estratti ottenuti erano i seguenti:

- estratto etanolico di salvia in rapporto 1: 3.75 (g di salvia/ml etanolo assoluto 96%);
- estratto etanolico di rosmarino in rapporto 1: 3.75 (g di rosmarino/ml etanolo assoluto 96%);
- estratto etanolico di radicchio in rapporto 1:1 (g di radicchio/ml etanolo assoluto 96%);
- estratto etanolico di foglie di olivo (cv. Grignano) in rapporto 1: 2 (g estratto di foglie di olivo/ml etanolo assoluto 96%).

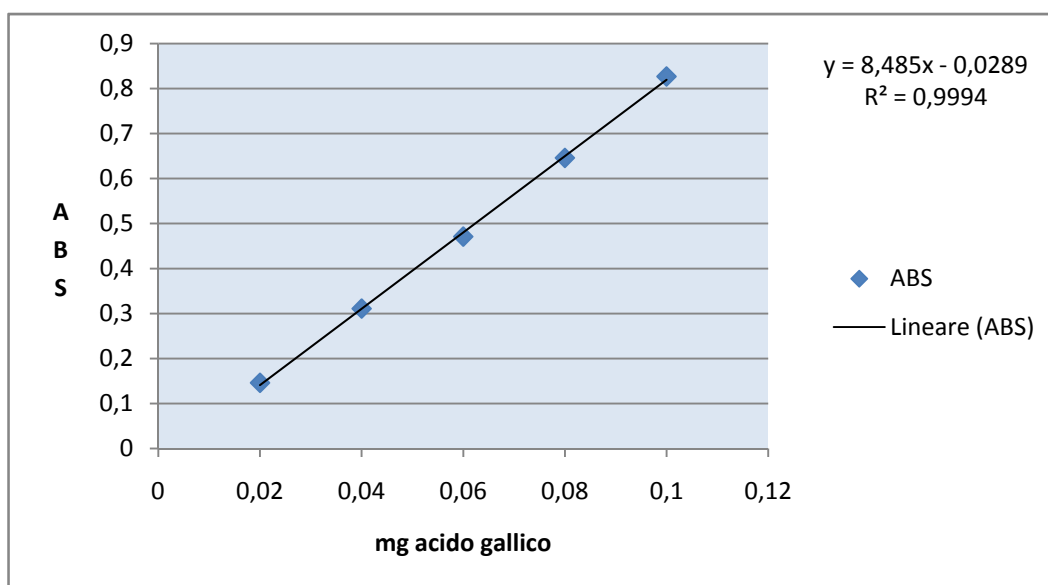
5.3 Misurazione dei polifenoli totali degli estratti naturali

Per la misurazione dei polifenoli totali degli estratti vegetali si è utilizzato il metodo di Azuma et al. (1999).

Il campione viene diluito con il solvente di estrazione (etanolo assoluto 96%) per un numero n di volte all'interno di una matraccio graduato da 10 ml. Ad 1 ml dell'estratto etanologico si aggiungono nell'ordine: 0.5 ml del reagente Folin – Ciocalteau diluito 2 volte con acqua distillata e 5 ml di Na_2CO_3 al 10 % in NaOH 1 M. La reazione, prevede l'ossidazione dei composti fenolici da parte del reattivo di Folin – Ciocalteau e si protrae per 30 minuti a temperatura ambiente. Il campione viene prima filtrato con filtro da $0.22 \mu\text{m}$ e poi analizzato, previa taratura dello spettrofotometro con il bianco, (1 ml di etanolo assoluto 96%, 0.5 ml di Folin – Ciocalteau e 5 ml di Na_2CO_3 al 10% in NaOH 1 M) ad una λ di 650 nm a 25°C . Le determinazioni sono state effettuate in triplo.

La concentrazione in polifenoli totali degli estratti vegetali è stata espressa come mg acido gallico/ml estratto etanologico, utilizzando una retta di taratura e prendendo come fenolo di riferimento l'acido gallico (Figura 5.1).

Figura 5.1 Retta di taratura dei polifenoli in soluzione etanolica



5.4 Misurazione dell'irrancidimento ossidativo con il metodo Rancimat

La determinazione dell'irrancidimento ossidativo sugli oli analizzati, è stata condotta con lo strumento Rancimat 743 (Metrohm, Svizzera).

I parametri fisici utilizzati nelle prove sperimentali con il metodo Rancimat, erano i seguenti:

- Temperatura blocco riscaldante (A e B) : 111.6°C
- Temperatura di correzione ΔT (differenza tra la T°C del blocco riscaldante e la T°C del contenitore con il campione) : 1.6 °C
- Temperatura target di analisi : 110 °C
- Flusso d'aria: 20 l/h.
- I recipienti di misurazione della stabilità ossidativa venivano caricati con 60 ml di acqua distillata (Figura 5.2).

Figura 5.2 Recipiente in policarbonato e corrispondente coperchio con annessa cella di conducibilità



I campioni sono stati preparati nel seguente modo:

- I 3 recipienti del bianco, contenevano 3 g olio + x ml di solvente etanolo assoluto 96% pari allo stesso volume utilizzato per i campioni con l'aggiunta di antiossidanti naturali;

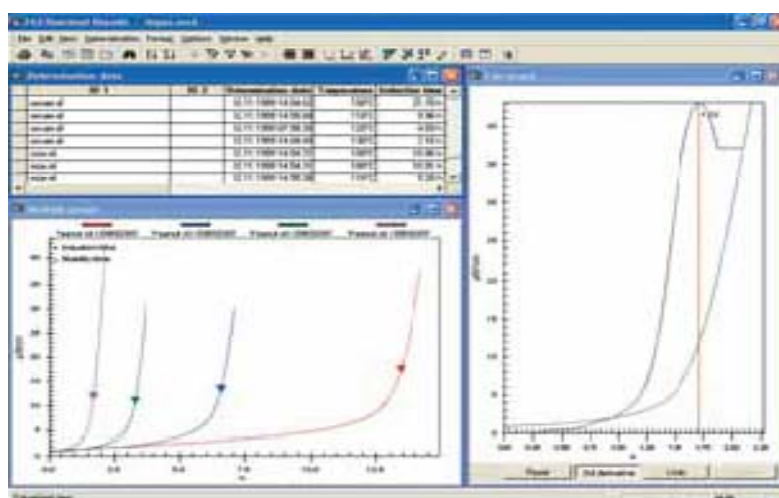
- I 3 recipienti contenenti i campioni di olio con l'aggiunta di antiossidanti naturali contenevano 3 g olio + x ml di estratto vegetale in etanolo assoluto 96% con una concentrazione in polifenoli totali pari a 0.4 mg acido gallico/ml estratto etanolic.

Figura 5.3 Recipienti di vetro borosilicato contenenti il campione



I risultati dell'irrancidimento ossidativo sono espressi attraverso il tempo di induzione, calcolato in automatico dal programma che gestisce lo strumento e determinato o attraverso il metodo dell'incrocio delle 2 tangenti alla curva o con la rappresentazione della seconda derivata (Figura 5.4).

Figura 5.4 Curve di ossidazione ottenute con il metodo Rancimat 743



Il valore di IP può essere definito come la misura della stabilità ossidativa del campione. Esso risulta utile per calcolare l'indice della attività antiossidante (AAI), definito anche fattore di protezione (PF), degli estratti naturali utilizzati sui campioni di olio, definito come il rapporto tra il tempo di induzione dell'olio con l'aggiunta di antiossidanti e il tempo di induzione dell'olio tal quale.

Dopo ogni determinazione, i componenti del Rancimat 743 venivano lavati a caldo con detergente polivalente esente da fosforo, risciacquati con acqua distillata, asciugati in stufa a 60°C e solo le componenti in vetro (recipienti contenenti i campioni e i capillari) passate in acetone per eliminare il grasso residuo.

CAPITOLO 6

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il metanolo è il solvente più comunemente impiegato nell'estrazione di sostanze antiossidanti ma nel nostro caso, in previsione di un possibile utilizzo industriale degli estratti (M. Suhaj, 2006) la scelta è ricaduta sull'etanolo (96%) vista la sua minore tossicità.

Per caratterizzare i diversi estratti è stato determinato il contenuto in polifenoli totali (Tabella 6.1). I risultati ottenuti dimostrano che l'estratto di foglie di olivo ha il maggiore contenuto in polifenoli totali, mentre il radicchio si attesta su valori più bassi. D'altra parte la bibliografia (M. Rossetto et al., 2005) riporta che il radicchio rosso è particolarmente ricco in antociani, una frazione che la metodica con il Folin-Ciocalteu non riesce a determinare.

Data l'elevata eterogeneità in sostanze antiossidanti contenute negli estratti e nell'ambito della medesima specie vegetale, si è scelto di verificare l'efficacia uniformando la quantità (0.4 mg) di polifenoli totali aggiunti agli oli.

Tabella 6.1 Polifenoli totali degli estratti vegetali testati negli oli di semi di soia e di mais.

Estratto vegetale	Polifenoli totali (mg ac.gallico/ml estratto etanolic)	mg di polifenoli totali aggiunti agli oli
salvia	2.10 ± 0.828	0.4
rosmarino	1.43 ± 0.578	0.4
radicchio	0.32 ± 0.002	0.4
foglie di olivo	9.94 ± 0.108	0.4

Nelle Tabelle 6.2, 6.3, 6.4 e 6.5 sono riportati i tempi di induzione (IP) dell'olio di semi di soia con e senza l'aggiunta degli estratti vegetali. L'efficacia dell'attività antiossidante esercitata dagli estratti utilizzati, è stata espressa attraverso i valori percentuali degli Incrementi dei tempi di induzione (IP) e con gli Indici di attività antiossidante (AAI).

Ad ogni Tabella sono associate le corrispondenti Figure 6.1, 6.2, 6.3 e 6.4 che rappresentano le curve di ossidazione ottenute con il Rancimat, da cui sono stati ricavati i rispettivi valori di IP ed AAI.

Olio di semi di soia

Tabella 6.2 Estratto etanologico di salvia.

Olio di soia senza estratto di salvia	IP (h)	Olio di soia con estratto di salvia	IP (h)	Incremento % dell' IP	AAI
Media \pm Dev. St.	6.06 \pm 0.288	Media \pm Dev. St.	8.24 \pm 0.218	35.97 %	1.36

Figura 6.1 Curve di ossidazione a confronto. Olio di semi di soia senza estratto di salvia (A); olio di semi di soia con estratto di salvia (B).

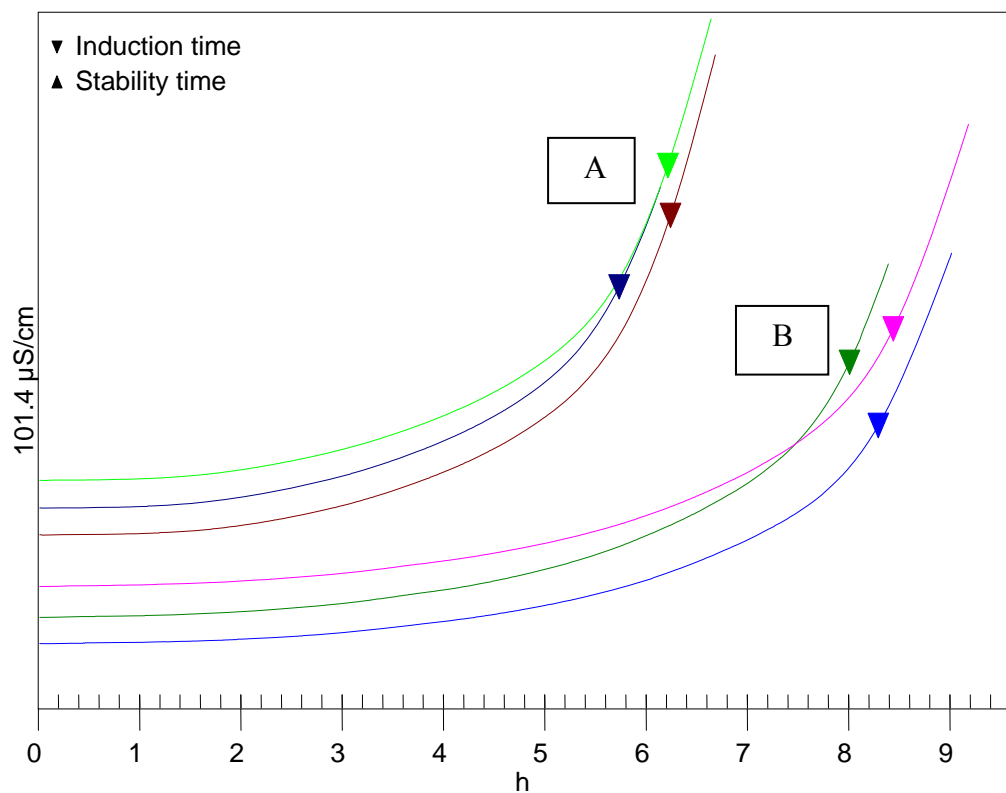


Tabella 6.3 Estratto etanolico di rosmarino.

Olio di soia senza estratto di rosmarino	IP (h)	Olio di soia con estratto di rosmarino	IP (h)	Incremento % dell' IP	AAI
Media ±	5.98 ±	Media ±	8.97 ±	50 %	1.5
Dev. St.	0.187	Dev. St.	0.051		

Figura 6.2 Curve di ossidazione a confronto. Olio di semi di soia senza estratto di rosmarino (A); olio di semi di soia con estratto di rosmarino (B).

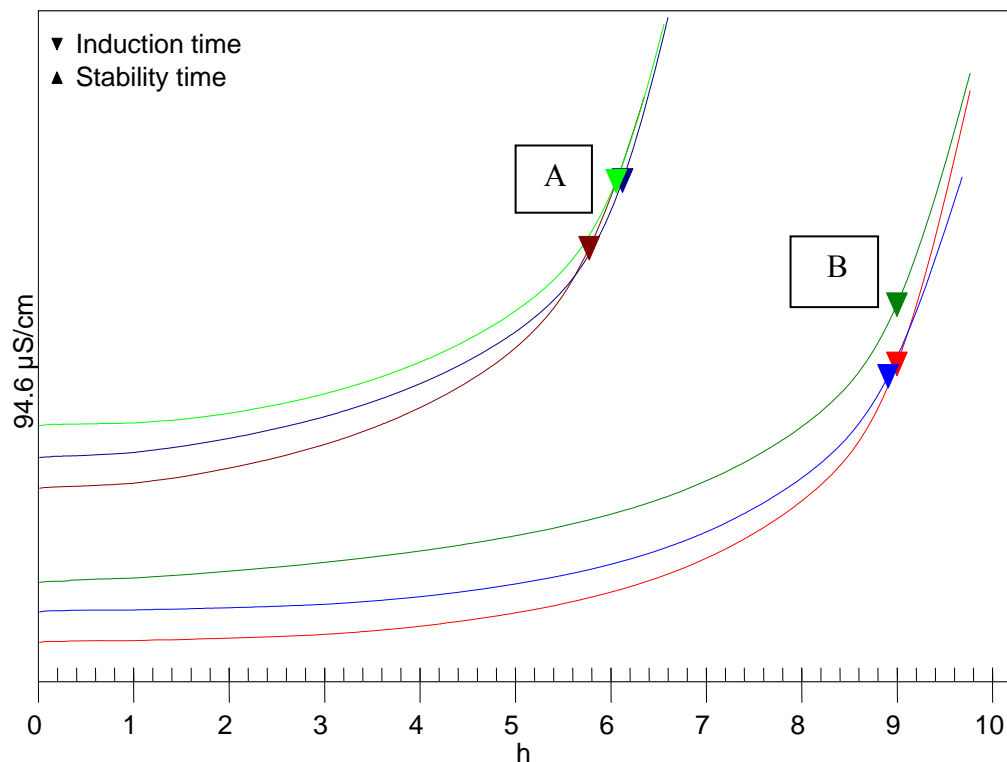


Tabella 6.4 Estratto etanolico di radicchio.

Olio di soia senza estratto di radicchio	IP (h)	Olio di soia con estratto di radicchio	IP (h)	Incremento % dell' IP	AAI
Media ±	5.89 ±	Media ±	6.5 ±	10.35 %	1.10
Dev. St.	0.243	Dev. St.	0.317		

Figura 6.3 Curve di ossidazione a confronto. Olio di semi di soia senza estratto di radicchio (A); olio di semi di soia con estratto di radicchio (B).

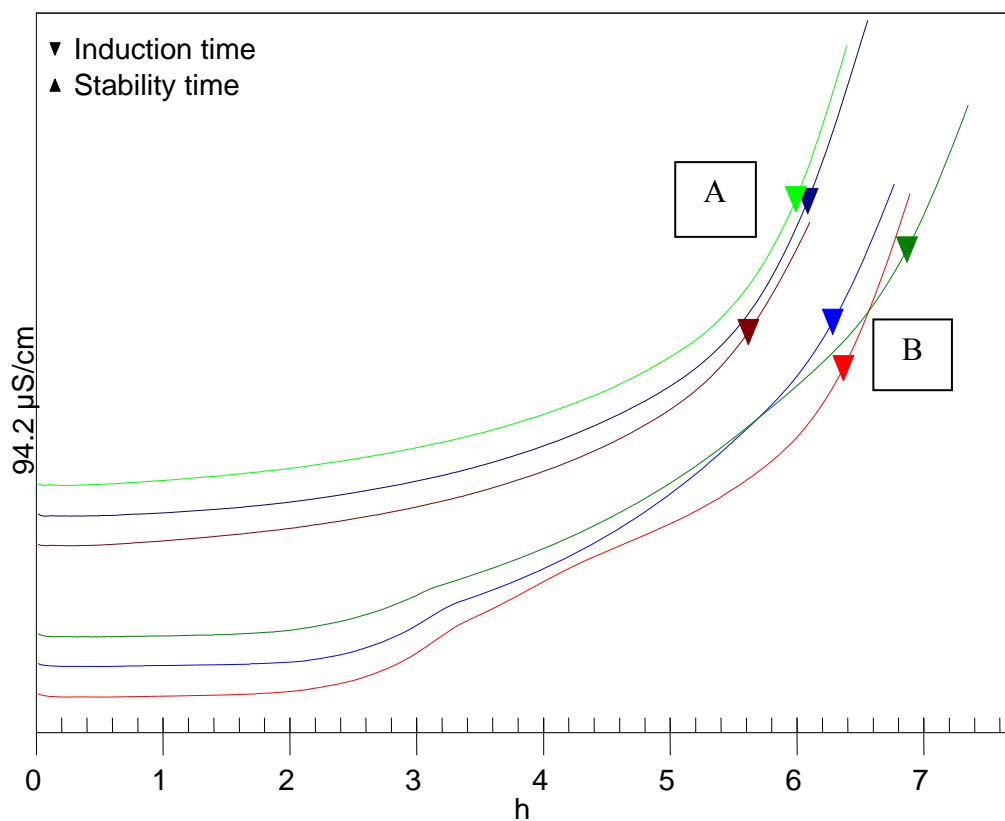
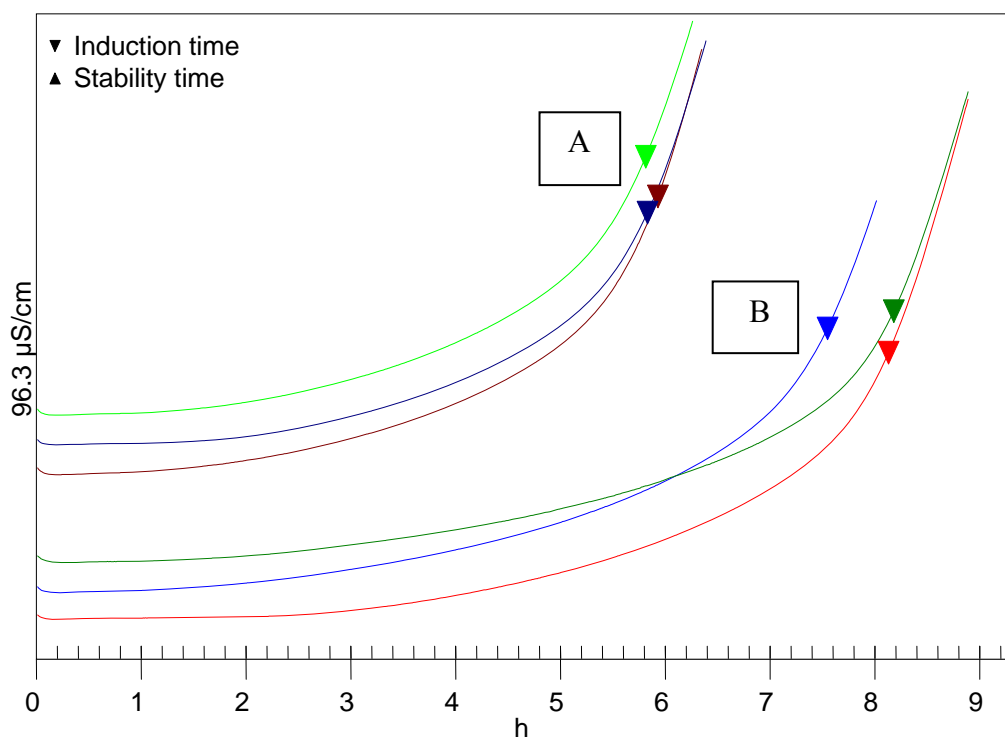


Tabella 6.5 Estratto etanolico di foglie di olivo.

Olio di soia senza estratto di foglie di olivo	IP (h)	Olio di soia con estratto di foglie di olivo	IP (h)	Incremento % dell' IP	AAI
Media ±	5.85 ±	Media ±	7.95 ±	35.89 %	1.35
Dev. St.	0.064	Dev. St.	0.35		

Figura 6.4 Curve di ossidazione a confronto. Olio di semi di soia senza estratto di foglie di olivo (A); olio di semi di soia con estratto di foglie di olivo (B).



Nelle Tabelle 6.6, 6.7, 6.8 e 6.9 sono riportati i valori dei tempi di induzione (IP), degli Incrementi % degli IP e gli Indici di attività antiossidante (AAI) dell'olio di semi di mais testato con i medesimi estratti vegetali. Le corrispondenti Figure 6.5, 6.6, 6.7 e 6.8 rappresentano le curve di ossidazione ottenute con il Rancimat.

Olio di semi di mais

Tabella 6.6 Estratto etanolico di salvia.

Olio di mais senza estratto di salvia	IP (h)	Olio di mais con estratto di salvia	IP (h)	Incremento % dell' IP	AAI
Media ±	9.73 ±	Media ±	10.71 ±	10.07 %	1.10
Dev. St.	0.32	Dev. St.	0.19		

Figura 6.5 Curve di ossidazione a confronto. Olio di semi di mais senza estratto di salvia (A); olio di semi di mais con estratto di salvia (B).

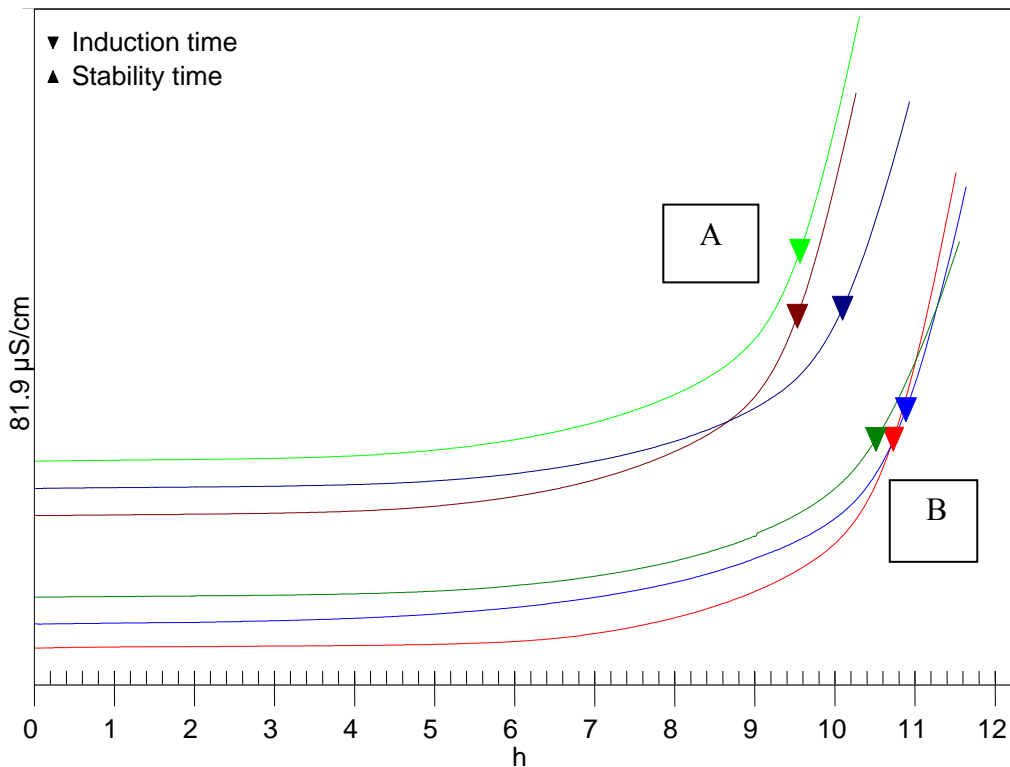


Tabella 6.7 Estratto etanolico di rosmarino.

Olio di mais senza estratto di rosmarino	IP (h)	Olio di mais con estratto di rosmarino	IP (h)	Incremento % dell' IP	AAI
Media \pm	9.75 \pm	Media \pm	12.21 \pm	25.23 %	1.25
Dev. St.	0.015	Dev. St.	0.264		

Figura 6.6 Curve di ossidazione a confronto. Olio di semi di mais senza estratto di rosmarino (A); olio di semi di mais con estratto di rosmarino (B).

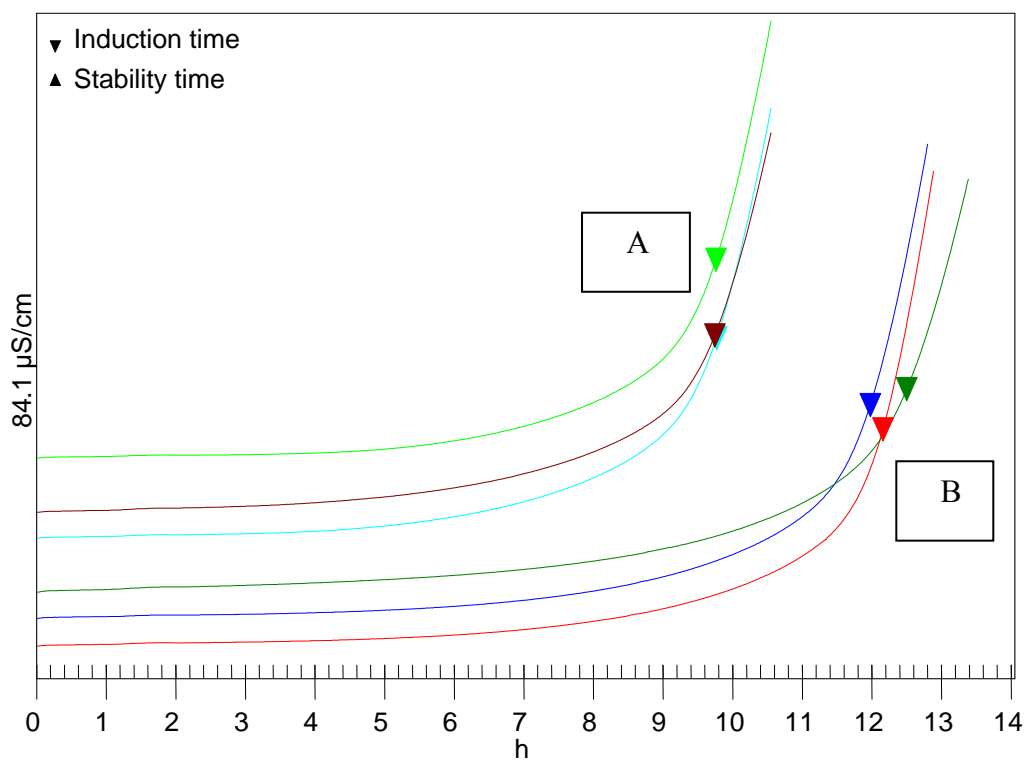


Tabella 6.8 Estratto etanolico di radicchio.

Olio di mais senza estratto di radicchio	IP (h)	Olio di mais con estratto di radicchio	IP (h)	Incremento % dell' IP	AAI
Media \pm	9.48 \pm	Media \pm	10.20 \pm	7.59 %	1.06
Dev. St.	0.336	Dev. St.	0.066		

Figura 6.7 Curve di ossidazione a confronto. Olio di semi di mais senza estratto di radicchio (A); olio di semi di mais con estratto di radicchio (B).

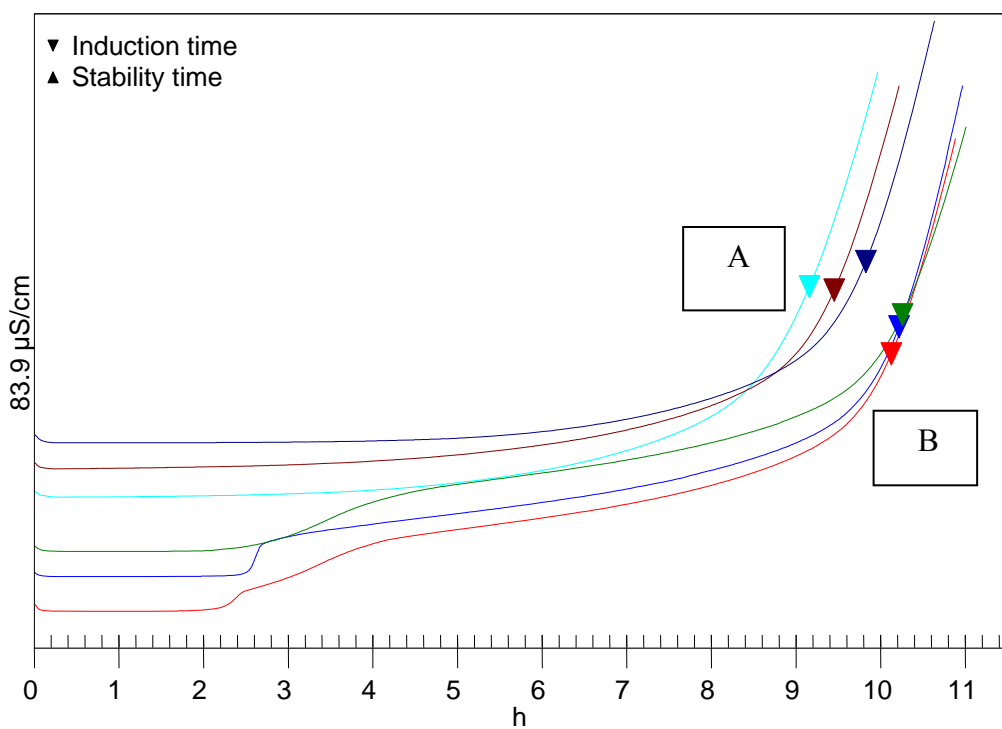
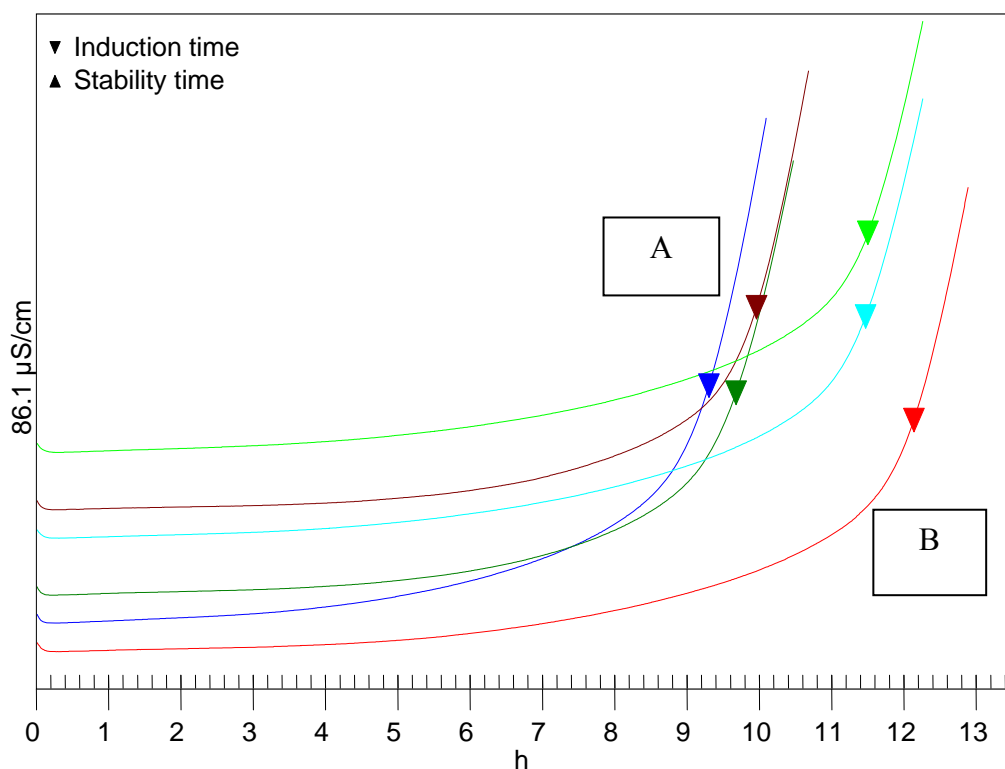


Tabella 6.9 Estratto etanologico di foglie di olivo.

Olio di mais senza estratto di foglie di olivo	IP (h)	Olio di mais con estratto di foglie di olivo	IP (h)	Incremento % dell' IP	AAI
Media ±	9.64 ±	Media ±	11.70 ±	21.36 %	1.21
Dev. St.	0.331	Dev. St.	0.378		

Figura 6.8 Curve di ossidazione a confronto. Olio di semi di mais senza estratto di foglie di olivo (A); olio di semi di mais con estratto di foglie di olivo (B).



Nella Tabella 6.10 sono comparati gli Incrementi dei tempi di induzione (IP) e gli Indici di attività antiossidante (AAI), ottenuti con i diversi estratti.

Tabella 6.10 Incrementi % di IP ed Indici di attività antiossidante (AAI), degli estratti naturali impiegati nell'olio di semi di soia (sfondo azzurro) e nell'olio di semi di mais (sfondo arancione).

Estratto vegetale	Incremento % dell' IP (olio di semi di soia)	AAI (olio di semi di soia)	Incremento % dell' IP (olio di semi di mais)	AAI (olio di semi di mais)
salvia	35.97%	1.36	10.07%	1.10
rosmarino	50%	1.5	25.23%	1.25
radicchio	10.35%	1.10	7.59%	1.06
foglie di olivo	35.89%	1.35	21.36%	1.21

La prima considerazione possibile è che gli oli addizionati con gli estratti vegetali hanno incrementato la loro stabilità ossidativa rispetto ai campioni tal quali.

I risultati ottenuti nelle prove sperimentali (Tabella 6.10), confermano quanto dimostrato nel 1995 da H.L. Madsen e G. Bertelsen, che evidenziarono l'elevata attività antiossidante di alcune spezie ed erbe aromatiche come il rosmarino e la salvia. I medesimi autori giustificano questo comportamento con la composizione degli estratti in diterpeni fenolici, tra cui l'acido carnosico, il carnosolo, il rosmannolo, l'epi-rosmannolo, il metil-carnosato e il rosmadiale.

Anche nel nostro caso, come avevano dimostrato Che-Man e Jaswir (2000), l'estratto di rosmarino ha dimostrato la maggiore attività antiossidante nei confronti di entrambi gli oli anche se l'attività è migliore utilizzando come matrice lipidica l'olio di soia.

La capacità e l'efficienza sono specifici per ogni antiossidante. Tra i diversi fattori che giocano un ruolo chiave ci sono sicuramente la temperatura e il flusso d'aria impostati nello strumento. In base a questi presupposti è fondamentale saper

scegliere gli antiossidanti più adatti alle condizioni operative. Lalas e Dourtoglu (2003) riportano che a 90°C e ad un flusso d'aria di 15 l/h, 0.4 mg/g olio di antiossidanti fenolici dell'estratto di rosmarino, sono in grado di incrementare la stabilità ossidativa dell'olio di soia. I nostri risultati sembrano dimostrare che l'estratto di rosmarino utilizzato nelle prove sperimentali, ha maggiore capacità ed efficienza. Infatti elevando la temperatura di 20°C e il flusso d'aria di 5 l/h si raggiunge una stabilità ossidativa simile riducendo del 67.5% (0.13 mg/g olio invece di 0.4 mg/g olio) la quantità di composti antiossidanti addizionati.

Nell'olio di soia, gli estratti più efficaci nel ritardare il periodo di induzione dopo quello di rosmarino, sono rispettivamente quelli di salvia e foglie di olivo, con valori di AAI molto simili. Nel caso dell'olio di mais invece, la differenza tra l'estratto di salvia e foglie di olivo era più marcata e a favore di quest'ultimo (Tabella 6.10); per questo motivo l'estratto di foglie di olivo può costituire una valida alternativa a quelli ottenuti da erbe aromatiche (F.N. Salta et al., 2007).

La diversa stabilità ossidativa espressa come Indici di attività antiossidante (AAI) non è solo da imputare alla differente composizione in sostanze fenoliche e terpeniche degli estratti naturali, ma dipende anche dalla stabilità termica (110°C) di queste sostanze e al modo con cui esse reagiscono con la matrice lipidica del mezzo.

La differente attività antiossidante degli estratti potrebbe essere dovuta anche alla diversa quantità di composti fenolici glicosilati presenti in soluzione.

Rice-Evans C.A. et al., (1997) riportano infatti come in alcuni flavonoidi, un'alterazione del riarrangiamento dei gruppi idrossile del fenolo e/o la loro glicosilazione, porti a un decremento dell'attività antiossidante della molecola stessa.

In entrambi gli oli di semi analizzati l'estratto di radicchio ha evidenziato una scarsa efficienza nel controllo dell'irrancidimento ossidativo; nonostante ciò, il possibile utilizzo degli estratti di radicchio e foglie di olivo come additivi antiossidanti nei sistemi lipidici, presenta rispetto agli estratti di salvia e rosmarino, un notevole vantaggio costituito dal fatto che non si verifica nei

prodotti una consistente alterazione dell'aroma (odore/gusto) data dalla presenza di oli essenziali (A. Lante et al., 2006).

CAPITOLO 7

CONCLUSIONI

La prima considerazione possibile è che tutti gli estratti vegetali testati, pur avendo un contenuto fenolico diverso, sono stati in grado di incrementare la stabilità ossidativa degli oli di mais e soia.

In particolare l'estratto di rosmarino ha dimostrato efficienza e capacità superiori rispetto ai risultati riportati in bibliografia. Essendo la stabilità ossidativa un parametro strettamente collegato alla temperatura e al flusso d'aria impostato nello strumento, i nostri risultati sembrano incoraggianti in quanto a 110°C e ad un flusso d'aria di 20 l/h, riducendo la concentrazione di antiossidanti, si ottengono gli stessi valori che altri autori riscontrano a 90°C e ad un flusso d'aria di 15 l/h.

L'estratto di foglie di olivo pur avendo una composizione fenolica alquanto differente rispetto a quella di salvia e rosmarino, può costituire una valida alternativa come fattore di protezione nella stabilità ossidativa di diverse tipologie di olio. Questo può essere particolarmente importante se si considera che sicuramente "marca" meno dal punto di vista sensoriale la matrice lipidica.

L'estratto di radicchio, a parità di concentrazione di polifenoli aggiunta ai due diversi oli, non ha dimostrato la stessa efficienza degli altri estratti, quindi una sua futura applicazione in questo ambito risulta meno probabile.

Dai risultati ottenuti si può concludere che alcuni antiossidanti naturali potrebbero "giocare" in futuro un ruolo fondamentale come fattori di stabilità ossidativa degli oli in sostituzione degli additivi sintetici frequentemente messi in discussione. Infine il campo di applicazione potrebbe essere esteso anche alle formulazioni cosmetiche costituite da matrici lipidiche.

BIBLIOGRAFIA

- Allam Samah S.M. Antioxidant efficiency of some common traditional Egyptian beverages. *La rivista italiana delle sostanze grasse* – vol. **84** (2007) 94-103.
- Biffoli R. Chimica degli alimenti. 1990 USES Edizioni scientifiche. Firenze.
- Briante R., Patumi M., Terenziani S., Bismuto E., Febbraio F., Nucci R. Olea europea L. Leaf Extract and Derivatives: Antioxidant Properties. *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 4934-4940.
- Capella P., Fedeli E., Bonaga G., Lercker G. Manuale degli oli e dei grassi. 1997 Tecniche Nuove Editore, Milano.
- Cappelli P., Vannucchi V. Chimica degli alimenti. 1997-2000 Zanichelli Editore, Bologna.
- Cuvelier M.E., Berset C., Richard H. Antioxidant Constituents in Sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food. Chem.* **42** (1994) 665-669.
- Durling N.E., Catchpole O.J., Grey J.B., Webby R.F., Mitchell K.A., Yeap Foo L., Perry N.B. Extracion of phenolic and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry* **101** (2007) 1434-1441.
- Laguerre L., Lecomte J., Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidant to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* **46** (2007) 244-282.
- Lante A., Lomolino G., Zocca F., Spettoli P. Stabilità dell'attività antiossidante di estratti aromatiche in funzione di pH e temperatura. *Ricerche ed innovazione nell'industria alimentare*. **Vol. 7** (2006), Ciseta, Chinotti Editori.

- Lu Y., Yeap Foo L. Polyphenolics of *Salvia* – a review. *Phytochemistry* **59** (2002) 117-140.
- Madsen H.L., Bertelsen G. Spices as antioxidants. *Trends in Food Science & Technology* **6** (1995) 271-277.
- Mourtzinou I., Salta F. Yannakopoulou K., Chiou A., Karathanos V.T. Encapsulation of Olive Leaf Extract in β -Cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.*, **55** (2007) 8088-8094.
- Nelson D.L., Cox M.M. Introduzione alla biochimica di Lehninger. 2003 Zanichelli editore S.p.A. Bologna.
- Perez M.B., Calderon N.L., Croci C.A. Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinu officinalis L.*). *Food Chemistry* **104** (2007) 585-592.
- Ramalho V.C., Jorge N. Antioxidant action of Rosemary extract in soybean oil submitted to thermoxidation. *Grasas Y Aceites*, **59(2)**, Abril-Junio, (2008) 128-131.
- Regolamento (CEE) n. 2568/91.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Elsevier Science Ltd*, vol. **2** (1997) 152-159.
- Rossetto M., Lante A., Vanzani P., Spettoli P., Scarpa M., Rigo A. Red Chicories as Potent Scavengers of Highly Reactive Radicals: A Study on Their Phenolic Composition and Peroxyl Radical Trapping Capacity and Efficiency *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 8169-8175.
- Salta F.N. Mylona A., Chiou A., Boskou G., Andrikopoulos N.K. Oxidative Stability of Edible Vegetable Oils Enriched in Polyphenols with Olive Leaf Extract. *Food Sci Tech Int.* **13 (6)** (2007) 413-421.

- Sciancalepore V. Industrie agrarie. 1998 Unione Tipografico-Editrice Torinese s.p.a. Torino.
- Solomon E.P., Berg L.R., Martin D.W. Elementi di Biologia. 2006 EdiSES s.r.l. Napoli.
- Suhaj M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19** (2006) 531-537.

Siti internet

- www.metrohm.com
- www.pharm.unito.it
- www.terredibologna.it