



Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

BIOTECNOLOGIE DEGLI ALIMENTI XXI CICLO

**Recupero di antiossidanti naturali dai sottoprodotti di
trasformazione dell'industria agroalimentare:
noccioli di oliva (*Olea europaea* L.)
gusci e perisperma di nocciole (*Corylus avellana* L.)
(AGR/15)**

Coordinatore: Prof. Marco Esti

Tutor: Dott.ssa Marina Contini

Dottorando: Simone Baccelloni

INDICE

1 INTRODUZIONE	4
1.1 L'ossidazione lipidica	4
1.2 I radicali liberi e le difese endogene	5
1.3 Gli antiossidanti	7
1.3.1 Meccanismo di azione degli antiossidanti	7
1.4 Gli antiossidanti più comuni in natura	11
1.4.1 Gli antiossidanti vitaminici	11
1.4.2 Gli antiossidanti fenolici	12
1.4.3 Attività degli antiossidanti naturali	22
1.5 Gli antiossidanti sintetici	25
1.6 Biodisponibilità e metabolismo dei composti fenolici	26
1.7 Ruolo salutistico ed effetti biologici degli antiossidanti	29
1.8 I composti fenolici negli alimenti di origine vegetale	31
1.8.1 Composti fenolici da sottoprodotti agro-industriali	32
1.8.1.1 Sottoprodotti dall'estrazione dell'olio di oliva	34
1.8.1.2 Sottoprodotti dell'industria di trasformazione della nocciola	35
1.9 Metodi di estrazione degli antiossidanti da matrici vegetali	36
2 OBIETTIVI DELLA TESI ED APPROCCIO DI RICERCA	38
3 MATERIALI E METODI	40
3.1 Campioni	40
3.2 Ottenimento degli estratti	40
3.3 Fenoli totali e fenoli tannici	41
3.4 Attività antiradicalica (Test DPPH)	42
3.4.1 Efficienza antiperossidica (Test AAPH)	44
3.5 Spettri UV	45
3.6 Capacità chelante il Ferro(II)	45
3.7 Potere riducente	46
3.8 Determinazione del potere antiossidante del plasma	46

3.9	Test di conservabilità	47
3.10	Analisi LC/ESI-MS	47
4	RISULTATI E DISCUSSIONE	49
4.1	I sottoprodotti della nocciola	50
4.1.1	Rese di estrazione e fenoli solubili	52
4.1.2	Attività antiossidante	57
4.1.2.1	Attività antiradicalica	58
4.1.2.2	Efficienza antiperossidica	63
4.1.3	Correlazioni tra fenoli totali ed attività antiossidante	68
4.1.4	Spettri UV degli estratti	69
4.1.5	Quantificazione dei tannini	71
4.2	I sottoprodotti dell'oliva	74
4.2.1	Rese di estrazione e fenoli solubili	75
4.2.2	Attività antiossidante	78
4.2.2.1	Attività antiradicalica	78
4.2.2.2	Efficienza antiperossidica	81
4.2.3	Spettri UV degli estratti e Tannini	83
4.3	Ulteriori proprietà e caratteristiche dell'estratto pellicolare di nocciola ottenuto con etanolo 80%	86
4.3.1	Potere riducente	87
4.3.2	Capacità chelante il Ferro(II)	90
4.3.3	Attività antiossidante <i>in vivo</i>	98
4.3.4	Test di conservabilità	100
4.3.5	Screening sulla componente fenolica	103
5	CONCLIONI	108
6	BIBLIOGRAFIA	110

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

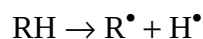
1.1 L'OSSIDAZIONE LIPIDICA

L'irrancidimento ossidativo, o autossidazione, è un fenomeno che interessa principalmente gli acidi grassi polinsaturi, costituenti fondamentali della struttura e garanti dell'integrità funzionale delle membrane biologiche. L'ossidazione lipidica può pertanto indurre *in vivo* imponenti danni biologici, oltre ad essere causa, negli alimenti, di odori e sapori sgradevoli.

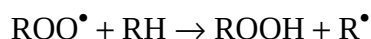
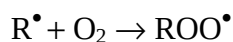
Il termine ossidazione indica un insieme specifico di reazioni derivanti dalla combinazione chimica dell'ossigeno con gli acidi grassi, sia liberi che esterificati.

Secondo la teoria più comunemente accettata (Rovellini et al., 1997) l'ossidazione dei lipidi avviene attraverso una serie di reazioni radicaliche a catena nelle quali è possibile distinguere tre stadi definiti di “*induzione*”, “*propagazione*” e “*terminazione*”.

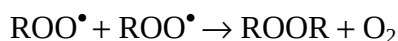
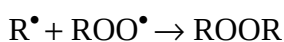
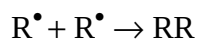
Nella fase di “*induzione*”, l'attivazione di una molecola di acido grasso (RH) porta alla formazione di un radicale alchilico (R[•]):



Quando la quantità dei radicali alchilici ha raggiunto una sufficiente concentrazione, si ha la fase di “*propagazione*”: per addizione di ossigeno su di un atomo di carbonio adiacente ad un doppio legame si forma il radicale perossidico (ROO[•]), che a sua volta, estraendo un idrogeno da una molecola intatta, produce un altro radicale ed un idroperossido (ROOH):



L'unione di radicali liberi tra loro, sottraendo gli stessi alla catena, determina la “*terminazione*” delle reazioni a catena:



Nella fase di “*induzione*” sia l'assorbimento di ossigeno che la formazione dei perossidi procedono lentamente; nella fase di “*propagazione*” l'assorbimento

dell'ossigeno ed il numero dei perossidi subiscono una profonda impennata; nella fase di “*terminazione*”, mentre l'assorbimento dell'ossigeno continua ad aumentare, il numero di perossidi inizia a decrescere.

Quando gli idroperossidi hanno raggiunto una concentrazione sufficiente, inizia una serie di reazioni ancora non del tutto chiarite che portano alla demolizione degli stessi ed alla formazione di sostanze a maggiore grado di ossidazione e minore peso molecolare (aldeidi, chetoni, alcoli, chetoacidi, ecc.), che costituiscono i prodotti secondari dell'irrancidimento e sono responsabili dello sgradevole aroma tipico dei grassi molto ossidati (Cappella et al., 1992).

1.2 I RADICALI LIBERI E LE DIFESE ENDOGENE

Nelle cellule del corpo umano, così come in ogni organismo aerobico, avvengono processi biochimici che consumano ossigeno per la generazione di energia. Dal processo di utilizzazione dell'ossigeno (ossidazione), si producono tuttavia dei prodotti di scarto potenzialmente dannosi: i radicali liberi.

Dal punto di vista chimico i radicali liberi sono molecole particolarmente instabili, in quanto presentano uno o più elettroni spaiati nell'orbitale più esterno. Questo induce i radicali liberi alla ricerca del proprio equilibrio chimico tramite acquisizione degli elettroni mancanti da altre molecole che, di conseguenza, diventano a loro volta instabili e cercano un altro elettrone da altre molecole, innescando così un meccanismo di instabilità a catena. L'alta reattività dei radicali liberi può causare reazioni spesso indesiderate e lesive per le cellule e, quindi, per i tessuti e per gli organi (Mitscher et al., 1997; Cestaro, 1994; Wisemann et al., 1996; Berliner et al., (1996).

Tra le molecole altamente reattive rientrano le “specie reattive dell'ossigeno” (ROS) come l'anione superossido, il radicale idrossilico, il radicale perossidico e l'ossido d'azoto, nonché specie non radicaliche, come il perossido d'idrogeno, l'ossigeno singoletto, l'acido ipocloroso e l'ozono. Il radicale idrossilico è il ROS più reattivo e dannoso nei sistemi biologici. Tale radicale è generato dalla reazione dello ione ferroso (Fe^{++}) con il perossido d'idrogeno. In questo processo, noto come reazione di Fenton, la quantità di radicale prodotto è direttamente proporzionale alla concentrazione di ferro o rame.

La produzione endogena di ROS ha luogo principalmente nei mitocondri, dove avvengono i processi ossidativi con trasporto di elettroni (respirazione cellulare) nei quali l'ossigeno funge da accettore finale di elettroni per la produzione di energia. L'ossigeno, quando svolge azione ossidante, viene esso stesso sottoposto ad una serie di riduzioni in cui sottrae elettroni ad altre molecole, dando luogo ad una serie di intermedi radicalici. I ROS sono prodotti anche dal metabolismo degli acidi grassi poliinsaturi a partire dall'acido arachidonico durante la produzione degli eicosanoidi (prostaglandine, trombossani e leucotrieni), molecole che svolgono importanti funzioni a livello dell'apparato vascolare. Un altro caso in cui la produzione di radicali liberi è considerata fisiologica ed utile all'organismo è quello che si realizza nei macrofagi, in cui il radicale superossido viene utilizzato come "killer" contro batteri e virus patogeni. Oltre ai meccanismi endogeni, i fattori che causano la produzione di radicali liberi sono: stress, diete sbilanciate, alcool, fumo, intenso esercizio fisico, inquinamento e raggi solari.

Un eccesso cellulare di ROS contribuisce ai processi di invecchiamento (Van Der Loo et al., 2003) ed è implicato nello sviluppo del cancro e di malattie croniche, neurodegenerative e cardiovascolari, quali ischemia sclerosi multipla, arteriosclerosi, cataratta, diabete, epatiti, morbo di Parkinson, Alzheimer, dermatiti e distrofia muscolare. (Halliwell et al., 1990; Ames et al., 1992; Cestaro, 1994; Chen et al., 1995; Stocker, 1999; Benzie, 2000).

Anche un'eccessiva e non regolata (patofisiologica) sintesi di ossido nitrico (NO) è considerata causa di molte malattie, alcune delle quali letali. La pericolosità dell'NO è dovuta alla formazione dell'anione perossinitrito (ONOO) o dell'acido idroperossinitroso (HOONO), altamente tossici, e che derivano da una reazione rapida di ricombinazione dell'anione superossido e dell'ossido nitrico. D'altra parte, l'NO è coinvolto in processi fisiologici fondamentali, quali l'azione vasodilatatrice, la trasmissione di segnali al sistema nervoso centrale e periferico, la risposta citotossica e citostatica del sistema immunitario (Geletii et al., 2002).

Si calcola che un organismo umano consumi 3.5 Kg di ossigeno al giorno, che portano ad una produzione annuale da parte dell'organismo di diversi chili di perossidi ed altri ROS. In condizioni normali il danno che i radicali liberi possono causare a DNA, proteine e lipidi è prevenuto dalla presenza meccanismi di difesa endogeni costituiti da enzimi (superossido dismutasi, glutazione perossidasi, catalasi), macro molecole

(albumina, ceruloplasmina, ferritina ed altre proteine), micro molecole (acido ascorbico, glutathione, acido urico, tocoferoli, carotenoidi, polifenoli), ormoni (estrogeni, angiotensina, melatonine, etc.). Ad esempio, i ROS sono trasformati in perossido d'idrogeno per azione di enzimi citoplasmatici e mitocondriali, come la superossido-dismutasi (SOD), la catalasi e il glutathione. Il perossido d'idrogeno, essendo esso stesso tossico e dannoso per le strutture cellulari, grazie alla catalasi ed alla glutathione perossidasi è scisso in ossigeno ed acqua.

Alcune proteine (es: albumina, ferritina e transferrina per il ferro; albumina, cerulo plasmina e metallotioneina per il rame), pur non agendo direttamente sui radicali, svolgono un'attività di prevenzione sul manifestarsi dei fenomeni ossidativi, per la formazione di complessi stabili con i metalli di transizione che fungono da catalizzatori (ferro e rame principalmente) (Geletii et al., 2002).

I sistemi endogeni, seppure attivi, possono non fornire una sufficiente protezione contro i ROS; in questi casi assumono particolare rilievo gli antiossidanti introdotti con la dieta.

Oltre a danneggiare le cellule ed a causare gravi malattie, i ROS sono responsabili dei processi di ossidazione negli alimenti, tra cui il principale è l'ossidazione lipidica. Tale processo riduce la shelf-life dei cibi, provocando alterazioni organolettiche e riduzioni del valore nutrizionale.

1.3 GLI ANTIOSSIDANTI

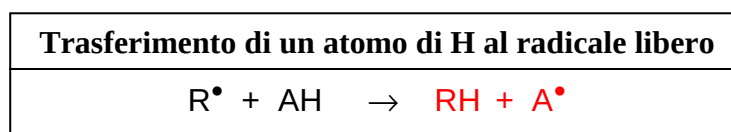
Con il termine “antiossidante” si definiscono tutte le sostanze in grado di contrastare i fenomeni ossidativi. La definizione più largamente usata è quella di Halliwell (1995), secondo la quale “gli antiossidanti” sono sostanze che, in basse concentrazioni rispetto al substrato ossidabile, sono in grado di ritardare o prevenire l'ossidazione del substrato stesso”.

1.3.1 MECCANISMO DI AZIONE DEGLI ANTIOSSIDANTI

In relazione al meccanismo d'azione, gli antiossidanti si possono distinguere in due tipologie:

Tipo I: “*Chain breaker*”. Agiscono da inattivatori di radicali liberi donando idrogeno o trasferendo un singolo elettrone alle specie radicaliche. Sono composti che, grazie al potenziale di riduzione negativo, sono in grado di fornire ai radicali liberi gli

elettroni di cui sono privi, ripristinando così l'equilibrio chimico del sistema in cui agiscono. La loro efficacia dipende dalla stabilità dei radicali nei quali si trasformano; pertanto, più efficiente è la delocalizzazione degli elettroni spaiati prodotti nella reazione con i radicali liberi, maggiore è il loro potere antiossidante. Gli antiossidanti di questo tipo possono disattivare le specie radicaliche tramite due meccanismi fondamentali: per trasferimento di un atomo di idrogeno (Hydrogen Atom Transfer: HAT) o per trasferimento di un singolo elettrone (Single Electron Transfer: SET). Il risultato finale è lo stesso, ma le cinetiche ed il potenziale delle reazioni sono diversi (Prior et al., 2005). In realtà questi meccanismi possono aver luogo anche contemporaneamente, ma sarà la struttura chimica dell'antiossidante, unitamente alle sue proprietà di solubilità, coefficiente di partizione e solvente, a determinare il meccanismo di azione prevalente. L'energia di dissociazione dei legami ed il potenziale di ionizzazione sono i due principali fattori che influiscono sul meccanismo e sull'efficienza dell'antiossidante (Wright et al., 2001). Gli antiossidanti "donatori di un atomo di idrogeno" agiscono secondo lo schema seguente:



Presupposto perché una sostanza funga da antiossidante è che una volta ossidata, la sua forma radicalica sia non reattiva o poco reattiva nei confronti delle altre molecole.

Le reazioni HAT sono indipendenti dal solvente e dal pH del mezzo e, generalmente, avvengono abbastanza rapidamente, concludendosi nel giro secondi o di qualche minuto. Viceversa, le reazioni SET, decorrono lentamente e sono pH-dipendenti. L'elettrone può essere donato al radicale libero (**Fig. 1, A**) o ad un metallo pro-ossidante (**Fig. 1, B**).

Appartengono a questo gruppo di antiossidanti il terz-butil-idrossianisolo (BHA), il diterz-butil-idrossitoluene (BHT), il terz-butil-idrossichinone (TBHQ), il propil-gallato (PG), i tocoferoli ed i composti fenolici.

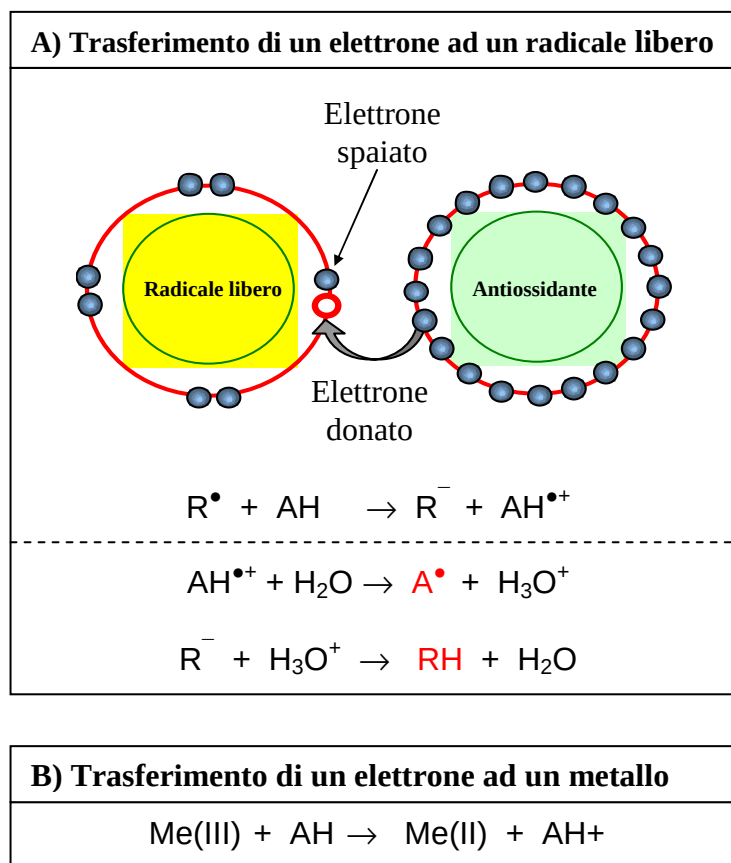
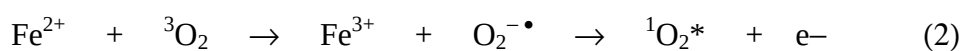
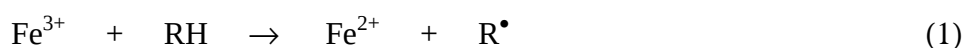


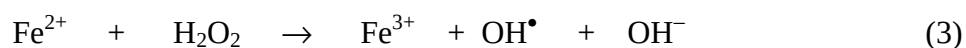
Figura 1. Schema di azione di un antiossidante donatore di elettroni (R = specie radicalica; AH= antiossidante; Me = metallo).

Tipo II: “**Metal scavenger**”. Prevengono la formazione di radicali liberi agendo da agenti chelanti dei metalli.

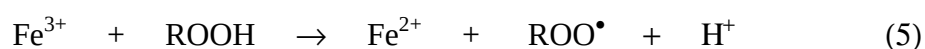
Ioni metallici quali ferro o rame sono potenti pro-ossidanti che accelerano l’energia di attivazione delle reazioni di iniziazione dell’ossidazione lipidica, generando radicali alchilici a partire da acidi grassi (1) o inducendo la formazione di ossigeno singoletto (molto più reattivo del normale ossigeno tripletto presente nell’aria che respiriamo) mediata dall’anione superossido (2):



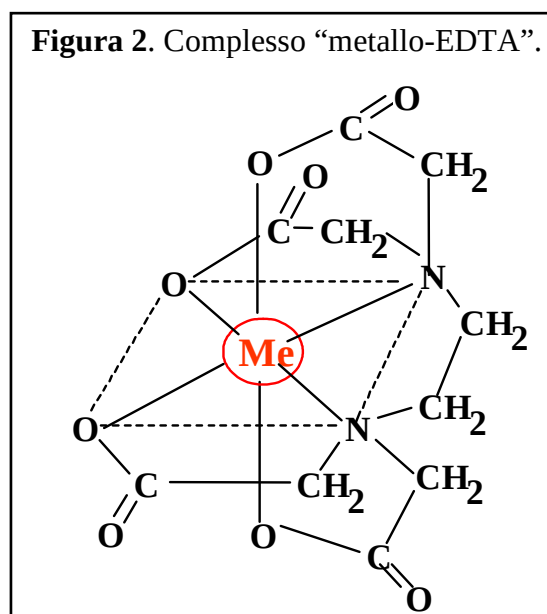
I metalli inoltre perpetuando l’ossidazione lipidica, producendo radicali liberi attraverso la reazione di Fenton (3). Tale reazione è la principale via di formazione di radicali alcossilici, che sono i più reattivi e pericolosi ROS dei sistemi biologici:



Altri radicali liberi formati dai metalli si producono dalla decomposizione degli idroperossidi lipidici (reazioni (4) e (5)), in cui il metallo interviene sia nella forma ridotta (Fe^{2+}) che in quella ossidata (Fe^{3+}); quest'ultima, tuttavia, è risultata produrre radicali con una velocità 10 volte più bassa (Miller, 1996).



Esempi di metal-scavenger sono l'acido etilen-diamminoeatracetico (EDTA) (**Fig. 2**), l'acido citrico, l'acido ascorbico ed alcuni amminoacidi.



In natura, i limiti tra le due classi di antiossidanti non sono così netti, in quanto alcune sostanze come i composti fenolici possono comportarsi contemporaneamente sia da *chain breaker* che da *metal scavenger* (Cuvelier, 1997).

1.4 GLI ANTIOSSIDANTI PIÙ COMUNI IN NATURA

La maggior parte degli antiossidanti che si conoscono appartengono al regno vegetale. Molte piante sintetizzano questi composti per soddisfare varie necessità fisiologiche: la difesa contro parassiti, agenti tossici, condizioni ambientali inadeguate, raggi ultravioletti; l'attrazione degli impollinatori (gli antociani e i flavonoidi sono responsabili della colorazione di fiori e foglie); il supporto strutturale (lignina e tannini); la regolazione mediante fitormoni (flavonoidi ed altre sostanze fenoliche semplici). Queste funzioni avvengono a spese del metabolismo primario delle piante (accrescimento e riproduzione) in quanto parte degli assimilati sono destinati allo svolgimento delle suddette attività (metabolismo secondario). Una funzione particolarmente importante del metabolismo secondario è la protezione da stress ossidativi, infatti le piante che hanno uno spiccato metabolismo secondario sono tendenzialmente più ricche in sostanze antiossidanti.

Gli antiossidanti naturali, ampiamente presenti in alimenti quali frutti e vegetali, ricadono essenzialmente in tre grandi gruppi: le vitamine, i composti fenolici e i carotenoidi. L'acido ascorbico ed i fenoli sono i più noti tra gli antiossidanti idrofili, i carotenoidi tra quelli lipofili (Halliwell, 1996). Anche alcuni minerali (selenio, rame e zinco) svolgono indirettamente funzioni antiossidanti, poiché partecipano alla regolazione di enzimi coinvolti nel meccanismo di difesa antiossidante.

1.4.1 GLI ANTIOSSIDANTI VITAMINICI

VITAMINA C

Comunemente nota come acido ascorbico (γ -lattone dell'acido 2-chetogulonico), è caratterizzata da uno spiccato potere riducente. Il suo prodotto di ossidazione è l'acido L-deidroascorbico. Le piante ed alcuni organismi animali sono in grado di sintetizzarla a partire dai glucidi, mentre l'uomo deve introdurla con gli alimenti. Nelle piante è coinvolta, insieme alla glutatione-perossidasi, nella detossificazione del perossido d'idrogeno nei cloroplasti. La vitamina C è il più potente antiossidante idrosolubile presente nel plasma sanguigno e agisce anche come rigeneratore di vitamina E (Niki et al., 1995) e di specie cationiche radicaliche di carotenoidi (Mortensen et al., 2001). È noto l'effetto sinergico delle vitamine E, C e del β -carotene come scavengers nei confronti di specie reattive dell'azoto (Böhm et al., 1998 a, b).

TOCOFEROLI (VITAMINA E)

Antiossidanti liposolubili prodotti dagli organismi fotosintetizzanti, appartenenti alla classe dei tocoli. Chimicamente, sono derivati del benzodiidropirano: presentano in posizione 6 un ossidrile e in posizione 2 un gruppo metilico e una catena isoprenoide a 16 atomi di carbonio. I tocoli sono distinti in tocoferoli (catena isoprenoide satura) e tocotrienoli (catena isoprenoide insatura). Ogni tocolo include quattro derivati (α , β , γ and δ) che si differenziano per la presenza di diversi sostituenti metilici sull'anello. Gli organismi animali ed i batteri non sono in grado di sintetizzarli e devono introdurli con gli alimenti (Hidalgo et al., 2006).

CAROTENOIDI

Molecole lipofile, molte delle quali derivanti dalla struttura isoprenica a 40 atomi di carbonio. Presentano quindi un sistema di doppi legami coniugati alle cui estremità sono presenti gruppi ciclici, che possono essere sostituiti da gruppi funzionali contenenti ossigeno. I carotenoidi si distinguono in caroteni, quando la loro struttura presenta solo atomi di carbonio e idrogeno, e xantofille, se possiedono anche funzioni ossigenate. Solo piante, funghi, batteri e alghe sono in grado di sintetizzarli.

1.4.2 GLI ANTIOSSIDANTI FENOLICI

Sono una classe di composti organici naturali caratterizzati dalla presenza di almeno un anello aromatico, mono o pluri-sostituito da gruppi ossidrilici. Una classificazione generale delle principali classi di composti fenolici prende in considerazione lo scheletro carbonioso che costituisce l'asse fondamentale per la differenziazione strutturale (**Tab. 1**).

Classi fenoliche	Struttura
Fenoli semplici, benzochinoni	C ₆
Acidi idrossibenzoici	C ₆ -C ₁
Acidi fenilacetici	C ₆ -C ₂
Acidi idrossicinnamici, fenilpropanoidi (cumarine, isocumarine, cromoni, cromeni)	C ₆ -C ₃
Naftochinoni	C ₆ -C ₄
Xantoni	C ₆ -C ₁ -C ₆
Stilbeni, antrachinoni	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoidi, isoflavonoidi	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignani, neolignani	(C ₆ -C ₃) ₆
Biflavonoidi	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Lignine	(C ₆ -C ₃) _n
Tannini condensati (proantocianidine)	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Tabella 1. Classi dei composti fenolici presenti nelle piante e scheletro carbonioso (Harborne, 1989).

Sulla base del peso molecolare dei composti menzionati, le sostanze fenoliche si possono distinguere in composti a basso, intermedio ed alto peso molecolare (**Tab. 2**).

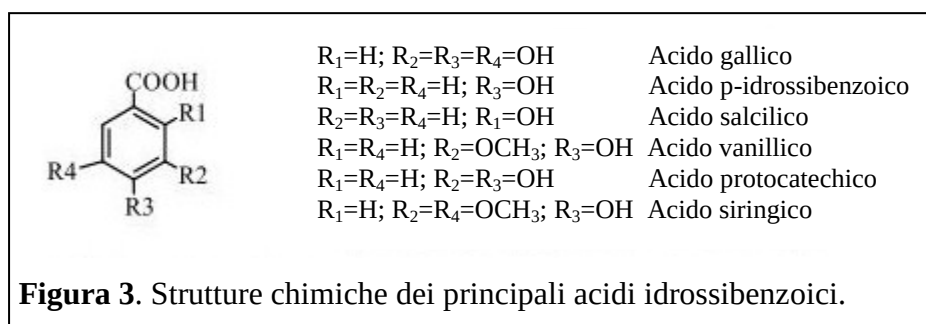
Peso molecolare	Struttura	Classe fenolica
Basso	C ₆ -C ₁ C ₆ -C ₃	Acidi idrossibenzoici Acidi idrossicinnamici
Intermedio	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidi
Alto	(C ₆ -C ₃) _n (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tannini idrolizzabili Tannini condensati

Tabella 2. Classificazione dei composti fenolici in base al peso molecolare.

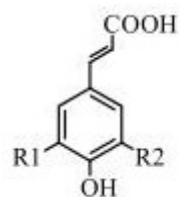
Di seguito sono brevemente descritte le singole classi di fenoli.

Fenoli semplici. Sono caratterizzati dalla presenza di un solo anello benzenico e pertanto rappresentano le strutture più semplici dei composti fenolici. Si trovano principalmente negli oli essenziali ricavati dalle piante. Un esempio è il timolo.

Acidi idrossibenzoici. Sono così chiamati per la struttura di base derivata dall'acido idrossibenzoico (**Fig. 3**). L'acido gallico e l'acido vanillico sono i composti idrossibenzoici maggiormente presenti e studiati per la loro distribuzione nel mondo vegetale. L'acido gallico è, insieme all'acido ellagico (**Fig. 4**) il monomero base dei tannini idrolizzabili.



Acidi Idrossicinnamici. Sono fenilpropanoidi derivanti dall'acido p-cumarico (o p-idrossicinnamico). Sono comuni in natura quattro varianti della loro formula di base C6-C3: acido caffeico, cumarico, ferulico e sinapico (**Fig. 5**). Si trovano nel regno vegetale legati chimicamente ad altri composti. Ad esempio, l'acido clorogenico (**Fig. 6**) deriva dall'esterificazione dell'acido caffeico con l'acido chinico. Gli acidi idrossicinnamici svolgono, nelle piante, azione antibiotica e varie funzioni connesse all'inibizione della crescita e della germinazione.



$R_1=R_2=H$	Acido p-cumarico
$R_1=OH; R_2=H$	Acido caffeico
$R_1=COH_3; R_2=H$	Acido ferulico
$R_1=R_2=OCH_3$	Acido sinapico

Figura 5. Strutture chimiche dei principali acidi idrossicinnamici.

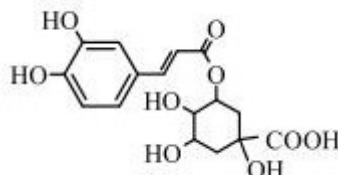


Figura 6. Struttura chimica dell'acido clorogenico.

Flavonoidi. Derivati del benzo- γ -pirone, sono formati da due anelli aromatici (A e B) e da un eterociclo di collegamento (**Fig. 7**).

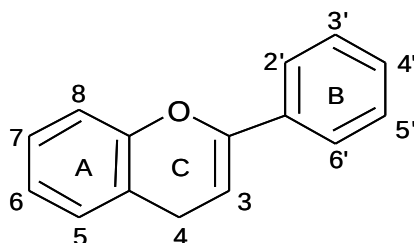


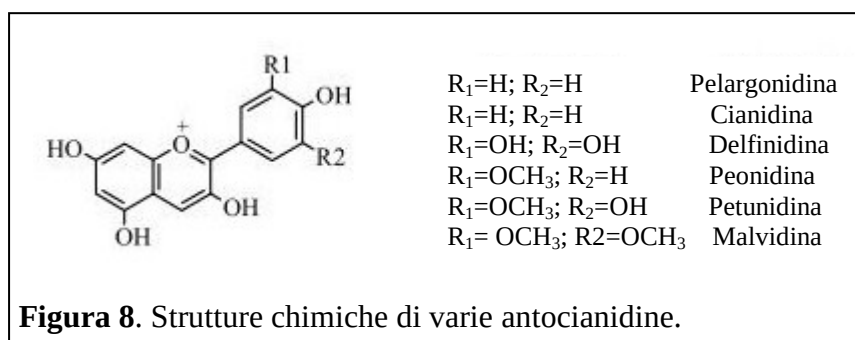
Figura 7. Scheletro base dei flavonoidi: a seconda della natura del grado di ossidazione dell'eterociclo ossigenato si distinguono le varie strutture dei composti facenti parte di questa classe.

In base al tipo di eterociclo, ai suoi sostituenti ed ai sostituenti degli anelli benzenici, i flavonoidi sono suddivisi in:

- Antocianidine
- Flavonoli
- Flavani

- Flavanoni
- Flavoni
- Isoflavoni
- Tannini idrolizzabili

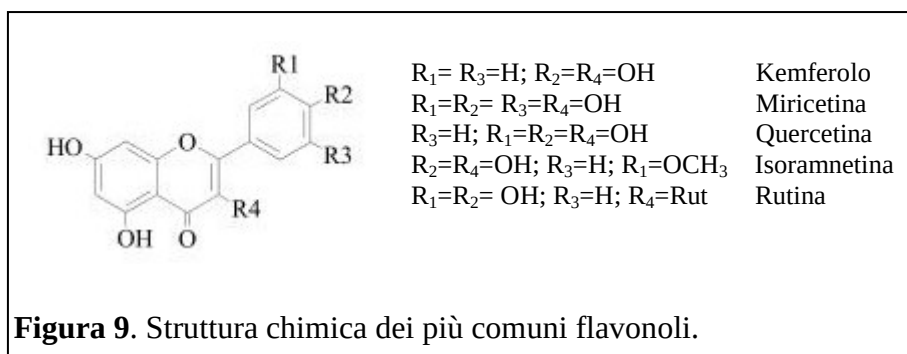
Le *antocianidine* sono caratterizzate da una carica positiva sull'ossigeno dell'eterociclo ossigenato e dal fatto che tutti gli atomi di carbonio sono insaturi. Sono i responsabili della pigmentazione di molti fiori e frutti, in quanto hanno la caratteristica di essere colorati in modo diverso a seconda del pH del mezzo in cui si trovano. Tra le antocianidine più comuni si ricorda la cianidina, la delfinidina, la peonidina, la pelargonidina, la petunidina e la malvidina. Le loro formule di struttura si differenziano per il tipo di sostituito legato alla struttura base (**Fig. 8**).



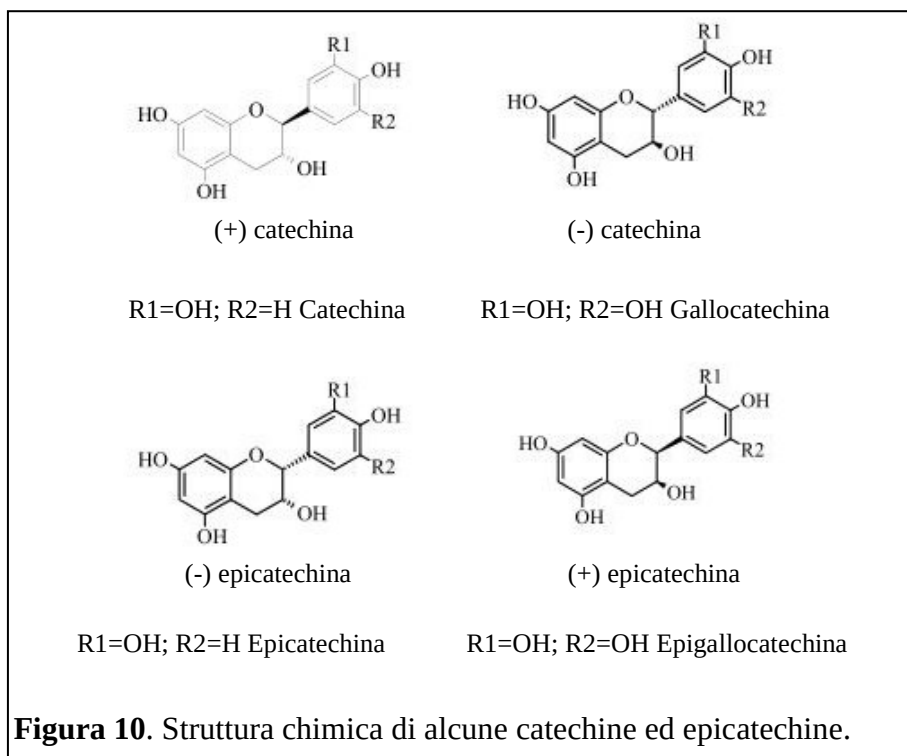
In natura si trovano quasi esclusivamente forme antocianiche, ovvero antocianidine legate con una o più molecole di zucchero (responsabile della loro stabilità e solubilità in acqua (Harborne, 1989)). L'idrossilazione dell'anello B tende ad abbassare la stabilità della molecola, al contrario di quanto avviene con la metilazione. Lo zucchero che frequentemente esterifica con gli agliconi è il glucosio, ma si possono trovare anche ramnosio, galattosio e arabinosio. L'esterificazione può riguardare uno, due o, raramente, tre funzioni alcoliche, generando così antociani mono-, di- o tri-glucoside. Inoltre, i glucosidi possono avere forme ancora più complesse, come quelle acilate, dove la molecola di zucchero viene, a sua volta, esterificata con un acido fenolico (es: acido p-cumarico).

I *flavonoli*, conosciuti anche come antoxantine, hanno formula $C_6-C_3-C_6$ e sono caratterizzati da un eterociclo di tipo γ -pirone. In molti casi sono glicosilati. Il legame glicosidico si forma sul gruppo ossidrilico in posizione 3. Le strutture monoglicosilate più diffuse sono, nell'ordine: 3-glucoside, 3-galattoside, 3-ramnoside e 3-glucoronide. Ne

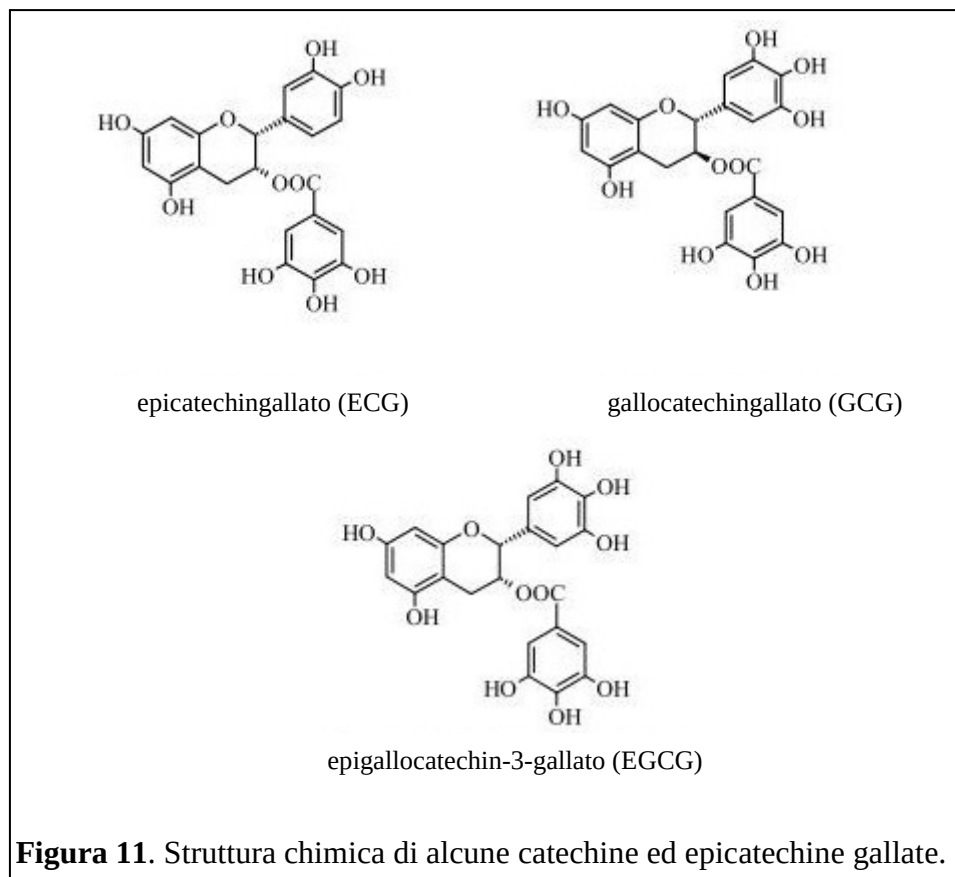
sono stati isolati più di 200 agliconi; tra questi, la quercetina, il kemferolo, la miricetina e l'isoramnetina sono i più diffusi (**Fig. 9**). Il kamferolo e la quercetina glicosilati sono i più abbondanti in natura, seguiti da rutina, quercetina 3-rutinoside e kemferolo 3-rutinoside.



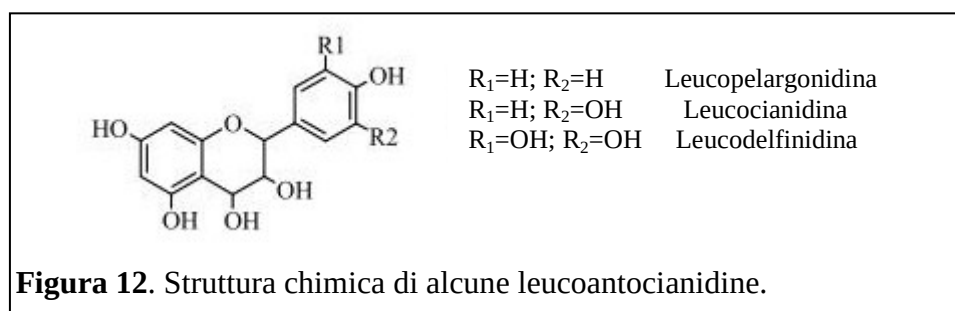
I *flavani* hanno formula $C_6-C_3-C_6$ con l'eterociclo rappresentato dal pirano. Si distinguono in flavan-3-oli o catechine e flavan-3,4-dioli o leucoantocianidine. A differenza degli antociani, le catechine non sono legate a molecole glucidiche e non hanno gruppi metossili come sostituenti dell'anello B. I flavan-3-oli costituiscono il gruppo di flavonoidi più diffusi nel mondo vegetale. Poiché gli atomi di carbonio in posizione 2 e 3 sono asimmetrici, presentano 4 forme otticamente attive e 2 forme racemiche dette catechine ed epicatechine (**Fig. 10**).



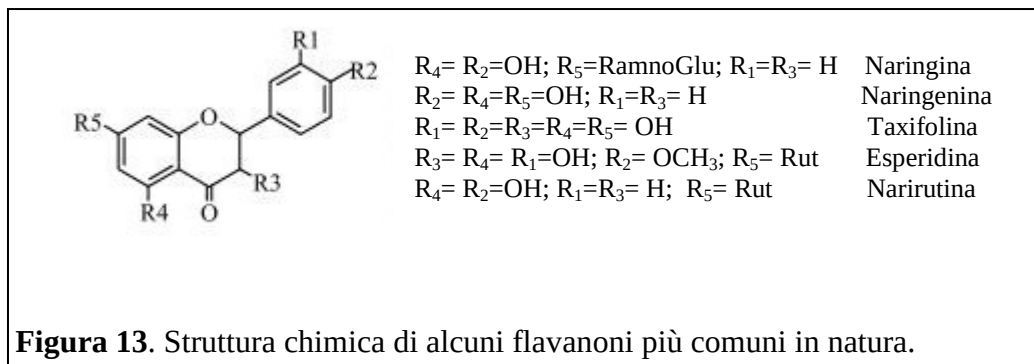
Le catechine possono combinarsi con molecole di acido gallico in posizione 3, dando origine ai catechin-gallati (**Fig. 11**).



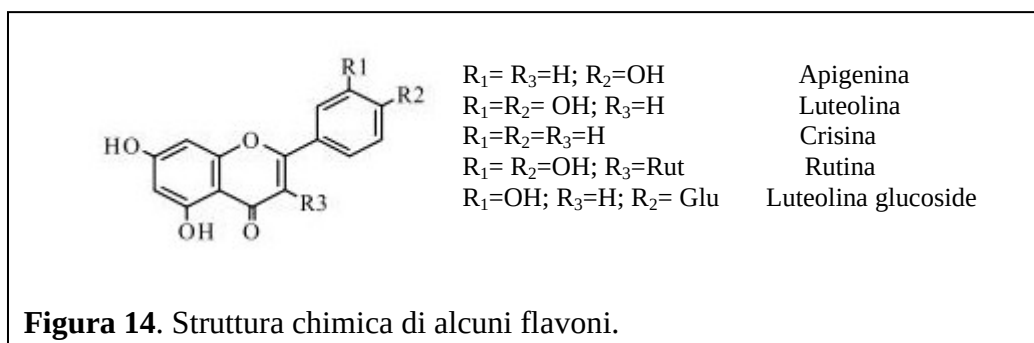
I *flavandioli* presentano due funzioni idrossiliche agli estremi 3 e 4 dell'eterociclo (**Fig. 12**). I monomeri ed i polimeri delle leucoantocianidine hanno la caratteristica, che li distingue dalle catechine, di trasformarsi in antocianidine rosse quando vengono scaldate in un mezzo acido, conseguentemente alla perdita d'acqua. La reazione non è però completa, in quanto solo il 20% delle leucoantocianidine presenti nel mezzo è soggetta a questo fenomeno; il restante 80% effettua una rapida condensazione, formando composti giallo-bruni insolubili chiamati flobafeni. Le catechine sottoposte allo stesso trattamento si trasformano totalmente in flobafeni.



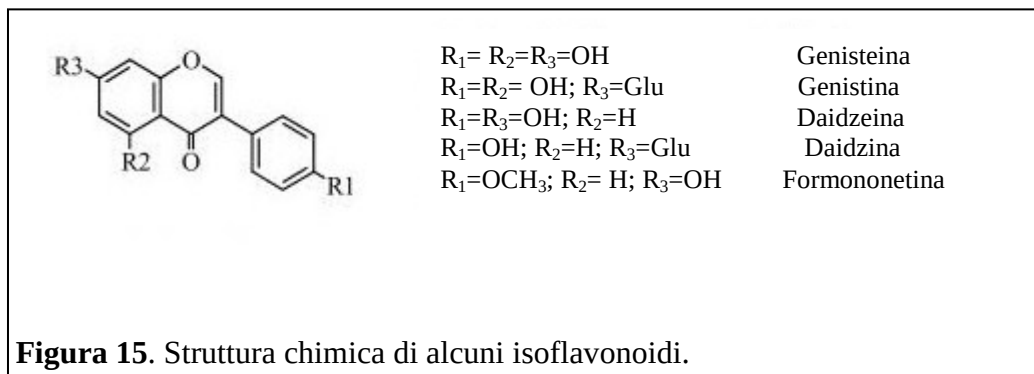
I *flavanoni* (**Fig. 13**) si ritrovano tipicamente negli agrumi, dove sono presenti sotto forma agliconica; negli altri vegetali sono molto meno comuni e prevalgono le forme glicosilate.



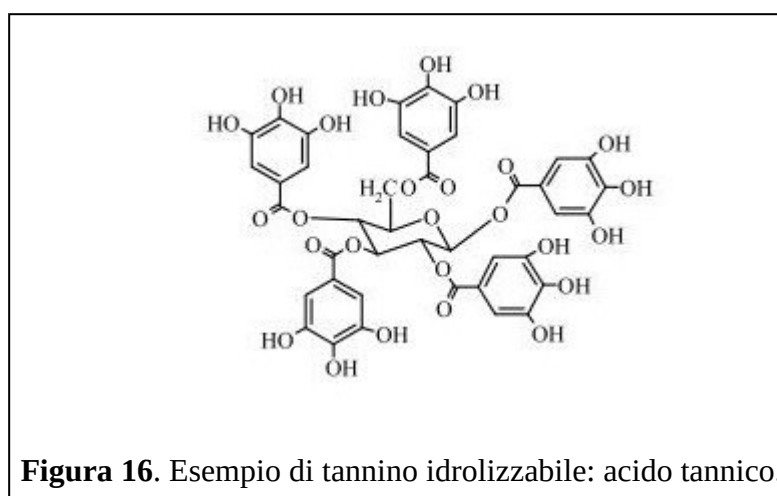
I *flavoni* costituiscono la classe fenolica meno rappresentata nel regno vegetale. bi-glucosilata della luteolina (**Fig. 14**) dove il glucosio si lega, oltre che in posizione 4', anche in posizione 7.



Gli *isoflavonoidi* sono tipici delle piante leguminose. La loro caratteristica è quella di avere legato l'anello B in posizione 3 e non in posizione 2 come gli altri flavonoidi (**Fig. 15**).



I *tannini* non rappresentano una vera e propria classe di composti, ma piuttosto un gruppo di composti fenolici, variamente combinati fra loro, caratterizzati da alto peso molecolare (compreso tra 500 e 3000 Da) e da proprietà colloidali (sono colloidali negativi). Tendono a legarsi con alcaloidi, gelatine e altre proteine, dando luogo a precipitati. Si distinguono due tipologie di tannini: idrolizzabili e condensati. I tannini idrolizzabili (**Fig. 16**) sono poliesteri che, per idrolisi acida o alcalina, liberano acido gallico ed il suo dimero (acido diidrossifenolico), che per lattonizzazione forma l'acido ellagico.



Tannini condensati o proantocianidine sono oligomeri (fino a dieci unità) o polimeri derivanti dalla condensazione o polimerizzazione ossidativa dei flavan-3-oli e dei 3,4 flavan-dioli, uniti con legami covalenti. Il nome “proantocianidine” deriva dal fatto che tali sostanze, se ossidate in ambiente fortemente acido, si trasformano in antocianidine. Le proantocianidine più diffuse sono le procianidine e le prodelfinidine. In generale, le proantocianidine si formano come prodotti secondari della sintesi dei flavan-3-oli nei tessuti delle piante. Durante il processo di formazione dei flavan-3-oli è necessaria la presenza di un substrato riducente come il NADPH. Per ciascun tessuto, il livello di NADPH condiziona l'equilibrio fra la sintesi dei diversi tipi di molecole. I tessuti nei quali si ritrova molto NADPH conterranno proantocianidine di tutte le dimensioni. Al contrario, dove la presenza di NADPH è limitata, si formeranno soprattutto oligomeri. Il grado di polimerizzazione dei tannini influenza la loro solubilità in mezzo acquoso: in genere sono solubili fino ad un peso molecolare di 7000 Da (circa 20 unità di flavan-3-oli per polimero).

Le procianidine (**Fig. 17**) sono costituite da (+)-catechina, (-)-epicatechina ed i rispettivi esteri gallici; le prodelfinidine invece hanno come unità monomeriche (+) – gallocatechina, (-)-epigallocatechina ed i rispettivi esteri gallici. Le procianidine dimere sono i tannini condensati più diffusi in natura; vengono chiamate B1, B2, B3 e B4 quelle caratterizzate da un legame C₄-C₈; B5, B6, B7, B8 e B9 quelle caratterizzate da un legame C₄-C₆, che comunque sono meno diffuse. Esistono, inoltre, delle formule trimere di procianidine, identificate come procianidine C.

Le prodelfinidine, contenendo unità monomeriche triidrossilate (gallocatechina, epigallocatechina e derivati gallici), risultano più polari e quindi posseggono un grado di solubilità in acqua maggiore.

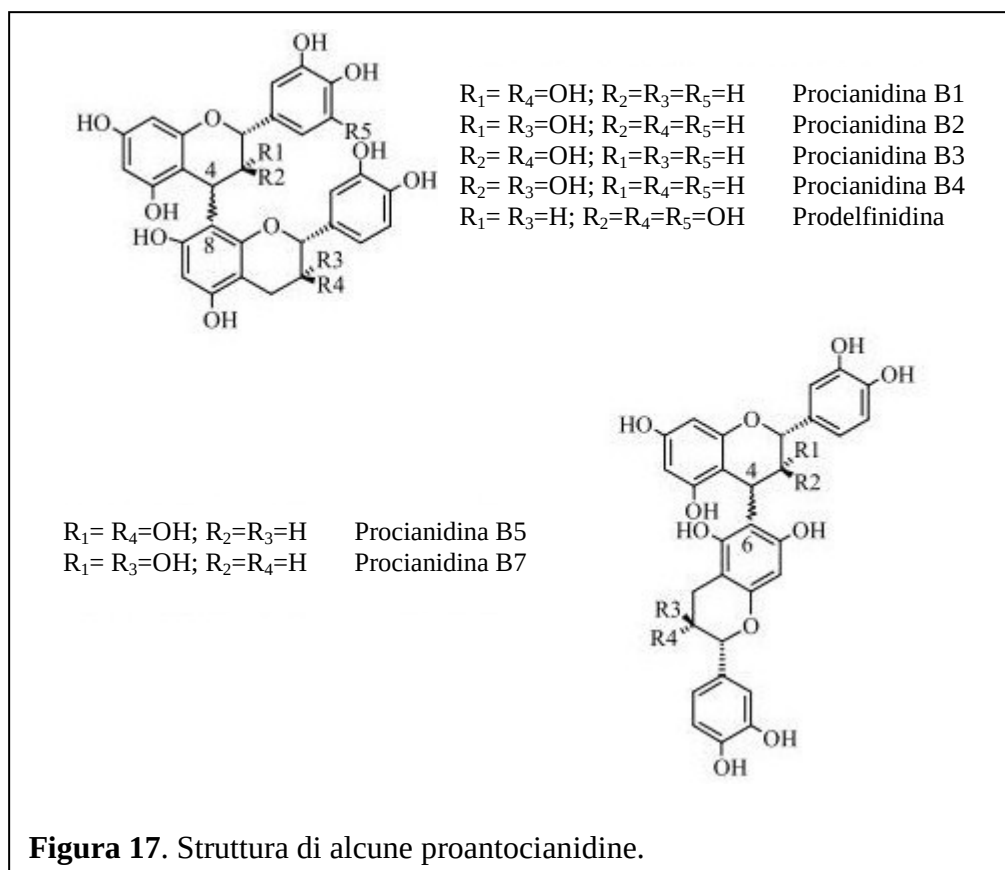


Figura 17. Struttura di alcune proantocianidine.

1.4.3 ATTIVITA' DEGLI ANTIOSSIDANTI NATURALI

ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DELLA VITAMINA C

Dal punto di vista delle funzioni biologiche, l'acido L-ascorbico agisce da cofattore enzimatico, da “*radical scavenger*”, nonché da donatore/accettore nel trasporto di elettroni nelle membrane plasmatiche.

ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DELLA VITAMINA E

Il meccanismo di azione predominante dei tocoferoli, come agenti antiossidanti, è la donazione di un atomo di idrogeno con formazione del tocoferossil-radical (Lampi et al., 2002).

ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEI CAROTENOIDI

I carotenoidi agiscono contro due tipi di ROS: l'ossigeno molecolare allo stato di singoletto ($^1\text{O}_2$) ed i radicali perossilici. Inoltre sono effettivi disattivatori di molecole coinvolte nella generazione di radicali liberi e ossigeno singoletto (Truscott, 1990; Young et al., 2001).

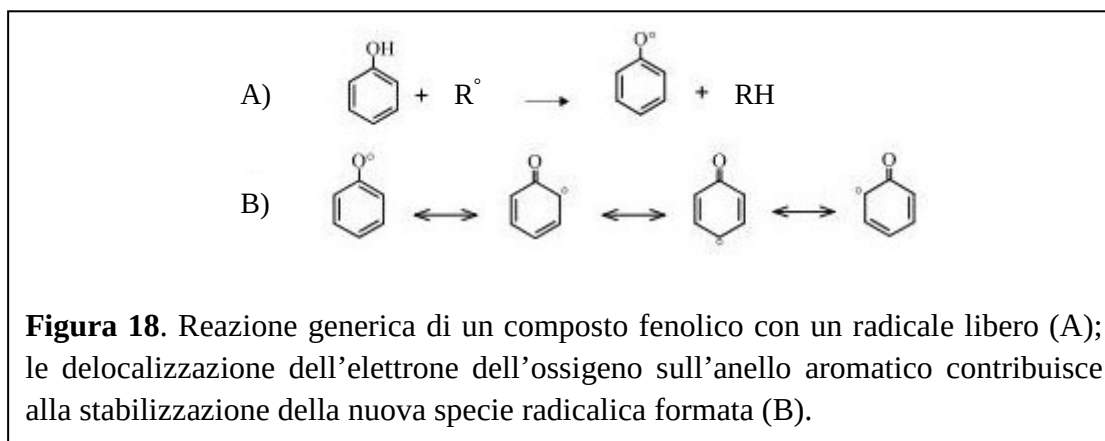
I carotenoidi agiscono contro l' O_2 con effetto “*quenching*” intervenendo sul trasferimento di energia tra le molecole. Infatti, i carotenoidi sono in grado di ricevere l'energia molecolare dell'ossigeno singoletto producendo ossigeno stabilizzato e caroteni eccitati allo stato di tripletto. Invece di generare ulteriori reazioni chimiche, i carotenoidi dissipano l'energia in eccesso nel mezzo in cui si trovano. Inoltre, poiché nel corso di questa reazione i carotenoidi non si modificano, si rendono nuovamente disponibili per altri cicli di “ O_2 -quenching” (Stahl et al., 2003). L'efficacia dei carotenoidi come quencher è relazionata al numero di doppi legami; pertanto, il β -carotene, la zeaxantina, la criptoxantina, l' α -carotene e, soprattutto, il licopene sono molecole particolarmente attive. Il licopene è un carotenoide a catena lineare dalla cui ciclizzazione, ad un estremo, si origina l' α -carotene, mentre per ciclizzazione su entrambe le estremità si ottiene il β -carotene. Nella mucosa intestinale degli animali, dal β -carotene, si forma per azione enzimatica la vitamina A (Lotti, 1985). Come detto in precedenza, i carotenoidi sono attivi anche contro i radicali perossilici: agendo come “spazzini” (scavenger) proteggono le membrane cellulari e le lipoproteine dai danni dell'ossidazione (Sies et al., 1995). E' tuttavia opportuno sottolineare che l'attività antiossidante dei carotenoidi dipende dalla presenza di altre specie antiossidanti, quali la vitamina E e C e dalla tensione

dell'ossigeno presente nel sistema (Young et al., 2001). A basse pressioni parziali di ossigeno, così come quelle che si riscontrano nei tessuti umani, il β -carotene inibisce l'ossidazione, mentre ad alte pressioni mostra effetti pro-ossidanti.

ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEI COMPOSTI FENOLICI

L'attività antiossidante dei polifenoli è legata all'elevato potenziale redox, che consente loro di agire come agenti riducenti, donatori di idrogeno e “spegnitori” (quencher) dell'ossigeno singoletto (Kahkonen et al., 1999). In aggiunta, possono agire come chelanti dei metalli (Rice-Evans et al., 1995). La loro attività antiossidante è considerata molto più grande di quella delle vitamine (Wang et al., 1996).

L'efficacia antiossidante dei composti fenolici è dovuta alla presenza di gruppi idrossilici legati alle strutture aromatiche ed alla geometria della molecola (**Fig. 18**). Condizione fondamentale affinché sia esplicata l'attività antiossidante dei composti fenolici è la formazione di radicali fenolici stabili, attraverso la delocalizzazione elettronica sulle strutture aromatiche ed alifatiche (Halliwell et al., 1990).



L'attività antiossidante dei flavonoidi ed il loro metabolismo *in vitro* dipendono anche dalla posizione dei gruppi funzionali nella struttura (Heim et al., 2002). La configurazione idrossilica dell'anello B è significativamente determinante per l'azione *scavenging* nei confronti dei ROS e degli RNS (specie reattive dell'azoto). Gli idrossili di tale anello cedono idrogeno, o un elettrone, ai radicali idrossilici, perossilici e perossinitriti, stabilizzandoli e trasformandosi a loro volta in un radicale flavonoide relativamente stabile.

Gli ossidrili presenti sull'anello A (**Fig. 7**) hanno un'attività antiossidante decisamente più blanda rispetto a quelli dell'anello B. Tuttavia, in alcuni isoflavonoidi i

gruppi ossidrilici presenti in posizione 5 contribuiscono ad aumentarne la capacità antiossidante ed hanno una spiccata abilità scavenging nei confronti dei radicali perossinitrito. Anche l'eterociclo contribuisce all'attività antiossidante con la presenza di un ossidrile libero in posizione 3, in quanto permette la coniugazione tra i due anelli aromatici A e B. Non è essenziale, ai fini dell'attività antiossidante, la presenza dell'eterociclo chiuso, dato che i calconi mostrano comunque una spiccata attività antiossidante.

L'angolo di torsione dell'anello B, rispetto al resto della molecola, condiziona le proprietà di *radical scavenger*. La planarità permette una migliore delocalizzazione elettronica e, di conseguenza, una maggior stabilità del radicale fenossilico dei flavonoidi.

La differente attività antiossidante, tra flavonoidi polioidrossilati e polimetossilati, è da attribuirsi fondamentalmente alle differenze di planarità e di idrofobicità delle molecole stesse. Ad esempio, la quercetina è uno dei più efficienti *scavenger* di radicali perossilici, ma le sue forme metilate e glicosilate sono molto meno potenti (Ioku et al., 1995). Sebbene il grado di metossilazione non predichi l'abilità *scavenging* di un flavonoide, l'anello B è particolarmente sensibile alla posizione del gruppo metossi. Se si alterna la configurazione 6'-OH/4'-OMe con la configurazione 6'-OMe/4'-OH, si annulla completamente l'attività *scavenging* nei confronti del radicale DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile) per alterazione della planarità della molecola.

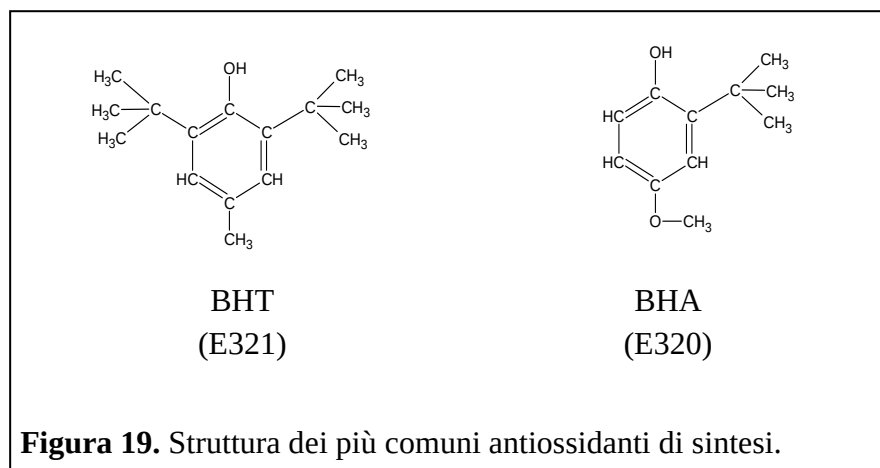
I flavonoidi assunti con la dieta sono parzialmente glicosilati in posizione 3 e 5. Gli agliconi sono degli antiossidanti più potenti dei loro corrispettivi glucosidi; infatti, come la metossilazione, la glicosilazione interferisce con la planarità della molecola e la capacità di delocalizzazione degli elettroni. Il rutinosio è l'unico zucchero che, legato al flavonoide, non ne riduce l'attività antiossidante.

Anche il grado di polimerizzazione influenza l'attività antiossidante. Le procianidine dimere e trimere sono più efficaci dei loro monomeri nell'azione contro l'anione superossido. Le procianidine tetramere sono più potenti dei trimeri, dimeri e monomeri nei confronti dello ione perossinitrito e superossido. Tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato che solo le procianidine dimere e trimere sono molto resistenti all'idrolisi acida dello stomaco e, quindi, assorbibili dall'organismo umano nella loro forma originale.

Le capacità chelanti dei flavonoidi e dei tannini contribuiscono all'attività antiossidante. I punti di attacco degli ioni metallici sono l'o-diidrossi nell'anello B nelle posizioni 3' e 4', e la struttura carbonilica in posizione 4 con l'ossidril in posizione 3. I flavonoidi inibiscono il danno ossidativo rimuovendo e neutralizzando gli ioni ferro negli epatociti. La chelazione dello ione bivalente non necessariamente neutralizza il flavonoide, che può mantenere la propria attività scavenger nei confronti dei ROS. Riassumendo, si può dire che i fenoli sono donatori effettivi di idrogeno; in particolare, sono risultati molto attivi i flavonoli come la quercetina (Rice-Evans et al., 1995), i flavanoli come gli esteri dei catechin-gallati del the verde e nero (Salah et al., 1995), le antocianine del vino (Frankel et al., 1993), ed i fenilpropanoidi (Castelluccio et al., 1995) quali l'acido clorogenico del succo di mela (Miller et al., 1995).

1.5 GLI ANTIOSSIDANTI SINTETICI

Gli antiossidanti di origine sintetica sono molecole prodotte in laboratorio e largamente impiegate nell'industria alimentare, cosmetica e farmaceutica per ritardare le reazioni di ossidazione lipidica. Tra questi, i più utilizzati sono il butilidrossianisolo (BHA) ed il butilidrossitoluolo (BHT) (**Fig. 19**), molecole fenoliche liposolubili che agiscono come antiossidanti primari particolarmente attivi.



In tabella 3 si riportano i quantitativi di BHA e di BHT comunemente impiegati per incrementare la shelf-life di alcuni prodotti alimentari (Rajalakshmi et al., 1996).

Prodotto	Livelli % di BHA	Livelli % di BHT
Grassi animali	0.001-0.01	0.001-0.01
Oli Vegetali	0.002-0.02	0.002-0.02
Prodotti da forno	0.01-0.04	0.01-0.04
Cereali	0.005-0.02	0.005-0.02
Purea di patate	0.001	0.001
Oli essenziali	0.01-0.1	0.01-0.1
Chewing gum	Fino a 0.1	0
Canditi	Fino a 0.1	Fino a 0.1

Tabella 3. Quantitativi di BHA e BHT in alcuni prodotti alimentari.

La messa in commercio di prodotti aggiunti di BHA e BHT risale al 1958, epoca alla quale erano stati considerati innocui e sicuri per la salute. Tuttavia, numerosi ricercatori hanno successivamente rilevato una potenziale tossicità e cancerogenicità di tali molecole, soprattutto ad elevate concentrazioni (Namiki, 1990; Shahidi et al., 1992; Chen et al., 1992; Madhavi et al., 1995). Ad esempio, Thompson et al. (1986) e Perianao et al. (1977) hanno dimostrato come elevati quantitativi di BHA (superiori a 200 ppm) provochino tumori nello stomaco di ratti, topi, criceti e pesci. I dubbi sulla potenziale tossicità di questi composti hanno portato a vietarne l'uso negli alimenti destinati alla prima infanzia, ma vengono molto utilizzati in prodotti ampiamente consumati anche da un pubblico di tenera età, quali ad esempio le gomme da masticare le patatine fritte.

L'elevato costo di ottenimento, la più bassa efficacia rispetto agli antiossidanti naturali e, soprattutto, il crescente rifiuto dei consumatori nei confronti dell'uso di additivi sintetici sulla cui innocuità non c'è certezza, stanno sollecitando l'identificazione di nuovi antiossidanti naturali, potenzialmente sicuri per la salute umana (Sherwin, 1990).

1.6 BIODISPONIBILITÀ E METABOLISMO DEI COMPOSTI FENOLICI

La biodisponibilità di un composto può essere definita in diversi modi. La definizione più comunemente accettata di biodisponibilità prevede l'assunzione che una

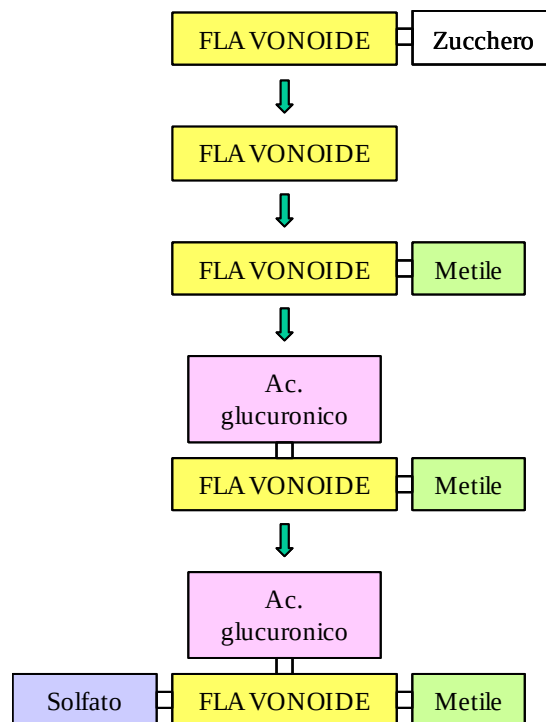
proporzione del nutriente ingerito sia digerita, assorbita e metabolizzata attraverso un normale pathway.

Per quanto concerne i composti fenolici, la loro considerevole variabilità strutturale (ne sono stati isolati oltre 6000, ed il loro numero è destinato ad incrementare) ne influenza fortemente la biodisponibilità, l'attività biologica e le interazioni con i recettori cellulari ed enzimatici, determinando un impatto sulla salute umana profondamente diversificato (Scalbert et al., 2000).

Il metabolismo generale dei più semplici composti fenolici è abbastanza noto (D'Archivio et al., 2007; Scalbert et al., 2000). Normalmente, gli agliconi come la quercetina sono idrofilici e vengono assorbiti dall'intestino tenue, diffondendo passivamente attraverso le membrane biologiche; tuttavia, gran parte dei polifenoli presenti in natura sono forme esterificate, glicosidate o polimerizzate. Le forme acilate sembrano passare come tali attraverso le membrane e sono pertanto assorbite senza deconiugazione o idrolisi. Eccezion fatta per le antocianine, che raggiungerebbero il plasma non modificate, i flavonoidi glicosidici prima dell'assorbimento vengono idrolizzati da glicosidasi endogene presenti nel tratto gastro-intestinale e/o prodotte dalla microflora del colon. Seguono profonde modificazioni enzimatiche: sono coniugati a glucuronide nelle cellule intestinali e, successivamente, possono essere metilati e/o sulfonati nel fegato (**Fig. 20**). I tannini idrolizzabili (gallotannini/ellagitannini) vengono idrolizzati, anche se non è chiaro se da parte di enzimi endogeni o per azione della microflora del colon.

La biodisponibilità ed il metabolismo dei tannini condensati (proantocianidine) sono invece ancora oscuri. Si ritiene che alcuni oligomeri (es. procianidina B1) siano assorbiti dall'organismo in maniera simile alle loro forme monomeriche. Alcuni studi evidenziano che la permeabilità cellulare dei tannini condensati sia funzione inversa del grado di polimerizzazione; inoltre, mentre dimeri, trimeri ed oligomeri verrebbero assorbiti più o meno facilmente, molecole più grandi (oltre 1000 Da) si ritiene siano impossibilitate ad entrare nel sistema circolatorio attraversando la barriera intestinale. Tali molecole, tuttavia, sopravviverebbero alla digestione gastro-intestinale (Rios et al., 2002) per essere metabolizzate dalla microflora del colon, come dimostrerebbero i risultati di esperimenti condotti *in vitro* incubando proantocianidine con microflora colonica umana (Deprez et al., 2000).

Figura 20. Modificazioni enzimatiche cui vanno incontro i flavonoidi nell'organismo umano.



In **Figura 21** sono schematizzate le possibili vie seguite nell'organismo umano dai composti fenolici assunti con la dieta.

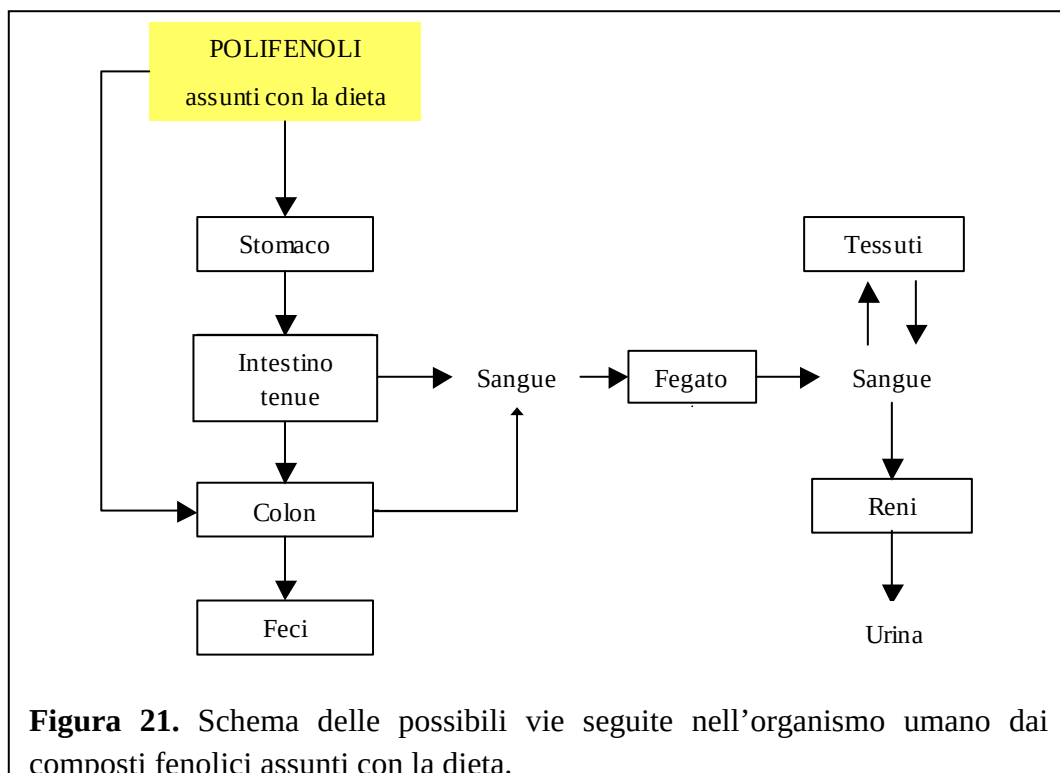


Figura 21. Schema delle possibili vie seguite nell'organismo umano dai composti fenolici assunti con la dieta.

1.7 RUOLO SALUTISTICO ED EFFETTI BIOLOGICI DEGLI ANTIOSSIDANTI

Diversi studi epidemiologici hanno indicato che il consumo frequente di antiossidanti naturali, essenzialmente introdotti nella dieta tramite frutta e vegetali, è associato ad un basso rischio di contrarre malattie cardiovascolari e cancro (Renaud et al., 1998; Temple, 2000).

Block et al. (2004) hanno osservato che la vitamina C può ridurre i livelli di proteina C-reattiva (CRP), un marker usato per monitorare l'infiammazione delle malattie cardiovascolari. E' noto che l'acido ascorbico è in grado di eliminare i radicali superossido e idrossilico e di rigenerare i tocoferoli (Davey et al., 2000). Gli effetti biologici dei tocoli sono dovuti al loro potere antiossidante, in modo specifico all'inibizione della perossidazione lipidica delle membrane biologiche. La vitamina E mostra effetti protettivi contro le malattie cardiovascolari e coronariche per l'azione inibente l'ossidazione del colesterolo LDL (Stampfer et al., 1995). Recenti studi hanno evidenziato che i tocotrienoli possono essere più efficienti dei tocoferoli nel prevenire sia le malattie cardiovascolari che il cancro (Theriault et al., 1999). Tutti i tocoli esibiscono attività antiossidante paragonabile, se non migliore, di quella dell' α -tocoferolo (Miller et al., 2000; Yoshida et al., 2003).

Nell'uomo è particolarmente significativo il ruolo svolto dagli α - e β -carotenoidi, che risultano coinvolti nella biosintesi di vitamina A (fattore essenziale per la riproduzione cellulare, il normale sviluppo dell'embrione e del feto e per le funzioni visive (Zile, 1998)). Vari studi epidemiologici hanno dimostrato che una dieta ricca in carotenoidi è correlata ad una diminuzione del rischio di contrarre vari tipi di disordini degenerativi, inclusi alcuni tipi di cancro, malattie cardiovascolari e danni fotossidativi (Mayne, 1996; Stahl et al., 2001). In particolare, il basso livello di β -carotene nell'organismo è associato ad un alto rischio di cancro, così come ad una maggiore possibilità di infarto in soggetti fumatori (Rice-Evans et al., 1997). Viceversa, eccessive concentrazioni di β -carotene nella dieta sembrano avere un effetto pro-ossidante (Palozza, 1998).

Oltre che contrastare i radicali liberi, i composti fenolici svolgono numerose attività biologiche come la protezione dei capillari sanguigni, l'azione antinfiammatoria, antibatterica, immuno-stimolante, antiallergica, antivirale, estrogenica ed

anticancerogena (Robards et al., 1997; Cook et al., 1996; Czechtot, 2000; Hollman et al., 1996; Kuntz et al., 1999). E' stata inoltre dimostrata la loro azione inibente nei confronti di alcuni enzimi, quali la fosfolipasi A2, la cicloossigenasi, la glutatione riduttasi e la xantina ossidasi (Havsteen, 2002). Havsteen (2002) ha inoltre osservato che i polifenoli posseggono attività antivirali nei confronti dell'HIV, dell'Herpes simplex, di vari virus influenzali e del Rhinovirus. La relazione tra attività antiossidante (determinata con spettroscopia a risonanza di spin elettronico, ESR), attività vasodilatatrice e contenuto polifenolico è stata studiata *ex vivo*, saggiando diversi vini su dei conigli adulti. Il contenuto totale di polifenoli è risultato fortemente correlato con l'attività antiossidante e vasodilatatoria. All'interno delle varie classi di composti fenolici, la maggiore attività antiossidante è stata manifestata dall'acido gallico, dal resveratrolo e dalla (+)-catechina.

I flavonoidi, più che gli acidi fenolici, hanno un notevole effetto protettivo nei confronti delle LDL (low density lipoprotein). Tale fenomeno è stato ampiamente studiato, in quanto si ritiene strettamente connesso con le fasi iniziali nel processo di aterosclerosi. Questo è dovuto sia all'azione diretta dei polifenoli come scavenger di radicali, sia alla rigenerazione della vitamina E nelle LDL a partire da un radicale α -chromanossi (Davey et al., 2000; Zhu et al., 2000). Uno studio condotto da Chen et al. (1995) ha rivelato che l'epigallocatechingallato (EGCG) inibisce la crescita delle cellule del cancro del colon-rettale. E' stata valutata l'azione antiossidante dell'EGCG su un fenomeno degenerativo dei macrofagi nel peritoneo di ratto, che porta alla liberazione extracellulare di ROS ed intermedi azotati reattivi: a diverse concentrazioni, l'EGCG blocca la produzione di ossido nitrico da parte dei macrofagi, inibisce la liberazione extracellulare di ROS ed agisce sottraendo l'anione superossido.

L'epicatechina, ed il suo principale metabolita in vivo (epicatechina-3'-metossi), sono state comparate in uno studio sull'attività protettiva nei confronti della morte cellulare indotta da stress ossidativo su colture di fibroblasti umani trattati con perossido di idrogeno. Valutando la funzionalità mitocondriale ed i danni alle membrane, è stata evidenziata un'azione protettiva dell'epicatechina-3'-metossi simile a quella dell'epicatechina (Spencer et al., 2001).

In generale si può affermare che gli antiossidanti fenolici possono agire sinergicamente nel ridurre i ROS. Ad esempio, l'attività combinata della quercetina, o

delle catechine, con l' α -tocoferolo è molto superiore alla somma dei singoli contributi, così come la combinazione di α -tocoferoli, o vitamina C, e polifenoli.

Infine, anche ai lignani sono state attribuite proprietà antiossidanti ed effetti anticancerogeni. In particolare, i lignani sono risultati in grado di ridurre la produzione di ROS in alcuni tipi di cellule tumorali e del sistema immunitario (Cassidy, 1996).

Le numerose proprietà salutistiche ormai ampiamente accreditate dalla letteratura scientifica a carico di alcuni flavonoidi ha fatto fiorire negli ultimi anni la messa in commercio di prodotti cosmetici e farmaceutici contenenti come sostanze attive singoli componenti (es. rutina o quercetina) o, più frequentemente, preparati fenolici vegetali di diversa origine. Per esempio, gli estratti fenolici ottenuti dalle foglie di *Ginkgo biloba* sono il fitofarmaco più largamente venduto in Europa, utilizzato per trattare i sintomi dei primi stadi della malattia di Alzheimer, problemi di memoria e carenze vascolari (Malesev et al., 2007).

1.8 I COMPOSTI FENOLICI DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE

Il contenuto delle sostanze fenoliche nelle piante dipende da una serie di fattori intrinseci (genere, specie e cultivar) ed estrinseci (agronomico, ambientale, ecc.) (Rapisarda et al., 1999).

In uno studio in cui sono stati analizzati 92 alimenti vegetali, la concentrazione totale di polifenoli, espressa come mg di acido gallico equivalenti (AGE) / g di sostanza secca, variava da circa 0,5 nelle carote e nei piselli a più di 50 nel mirtillo (Kahkonen et al., 1999). Tuttavia, i dati relativi alle quantità rilevabili in letteratura risultano spesso discordanti, a causa delle metodiche analitiche utilizzate che si diversificano per strumentazione, procedimento estrattivo, specificità e sensibilità. Oltre a ciò, è da considerare che la presenza e la disponibilità dei composti fenolici è anche funzione del trattamento eventualmente subito dall'alimento, sia esso domestico, artigianale o industriale (Carratù et al., 2005). Si rilevano quindi molte differenze riguardo al contenuto fenolico di differenti frutti e ortaggi riportate da vari Autori.

Anche alcune bevande come succhi di frutta, the e vini sono delle importanti risorse di composti fenolici nella dieta umana. In **Tabella 4** vengono riportati i valori dei contenuti fenolici di alcuni alimenti di origine vegetale.

Frutta	contenuto fenolico tot.	Autore	Vegetali e bevande	contenuto fenolico tot.	Autore
Mela	296,3 ± 6,4 ^a	Sun et al. 2002	Broccoli	101,6 ± 1,24 ^a	Chu et al. 2002
Banana	90,4 ± 3,2 ^a	Sun et al. 2002	Cavoli	54,6 ± 7,0 ^a	Chu et al. 2002
Mango	56,0 ± 2,1 ^a	Luximon et al., 2003	Carote	56,4 ± 5,1 ^a	Chu et al. 2002
Papaya	57,6 ± 4,1 ^a	Luximon et al., 2003	Cocomero	19,5 ± 1,6 ^a	Chu et al. 2002
Ananas	94,3 ± 1,5 ^a	Sun et al. 2002	Menta	399,8 ± 3,2 ^b	Kaur et al. 2002
Fragola	160,0 ± 1,2 ^a	Sun et al. 2002	Spinace	91,0 ± 8,5 ^a	Chu et al. 2002
Pesca	84,6 ± 0,7 ^a	Sun et al. 2002	Cipolla	76,3 ± 1,9 ^a	Chu et al. 2002
Uva rossa	201,0 ± 2,9 ^a	Sun et al. 2002	Suc. mela	339 ± 43 ^a	Gardner et al. 2000
Prugna	184,0 ± 85,5 ^a	Donovan et al. 1998	Suc. ananas	358 ± 3 ^a	Gardner et al. 2000
			Suc. arancia	755 ± 18 ^a	Gardner et al. 2000
			Tea nero	154,9 ^c	Lakenbrink et al. 2000
			Tea verde	117,3 ^c	Samman et al. 2001
			Caffè	150 ^c	Lakenbrink et al. 2000
			Vino rosso ita.	3314 - 4177 ^d	Minussi et al. 2003
			Vino bianco ita.	191 - 296 ^d	Sanchez et al. 1999

a= mg acido gallico equivalente / 100 g di sostanza fresca
b= mg catechine equivalenti / 100 g di sostanza fresca
c= mg di acido gallico equivalente / g di estratto secco
d= mg di acido gallico equivalente / L

Tabella 4. Contenuto fenolico di alcuni frutti, vegetali e bevande.

1.8.1 COMPOSTI FENOLICI DA SOTTOPRODOTTI AGRO-INDUSTRIALI

La tecnologia di trasformazione dei vegetali in alimenti porta alla produzione di numerosi sottoprodotti che rappresentano una ricca risorsa di composti bioattivi, inclusi composti fenolici (Schieber et al., 2001). La disponibilità di composti fenolici nei residui industriali e dell'agricoltura, la loro estrazione e la loro attività antiossidante rappresentano l'oggetto di molti studi in corso (Moure et al., 2001).

Composti fenolici con attività antiossidante sono stati identificati in numerosi sottoprodotti provenienti dall'agricoltura, come ad esempio nelle pule di riso (Osawa et al., 1989) e di grano saraceno (Watanabe et al., 1997) o nei gusci di mandorla (Takeoka et al., 2002; Siriwardhana et al., 2002; Wijeratne et al., 2006) e di pistacchio (Goli et al., 2005), bucce e semi vari (Shrikhande, 2000; Jayaprakasha et al., 2001; Amarowicz et al., 2005). Vari autori (Anderson et al., 2002) hanno rilevato che il contenuto totale di acido cinnamico nella pula dell'avena svedese è maggiore rispetto a quello del cereale stesso (23,6 contro 3,6 mg/Kg di sostanza secca).

L'industria degli agrumi produce un largo quantitativo di residui, costituiti da bucce e semi che rappresentano quasi il 50% in peso della frutta totale (Bocco et al., 1998). I sottoprodotti dell'industria degli agrumi, se utilizzati in modo ottimale, potrebbero rappresentare un'ottima risorsa di composti fenolici; le bucce, in particolare,

sono risultate possedere un più alto contenuto fenolico rispetto alla frazione commestibile (Gorinstein et al., 2001).

Anche le bucce di altri frutti sono risultate più ricche in composti fenolici rispetto alle parti commestibili. Per esempio, le bucce di mele, pere, pesche, pesche noci gialle e bianche possiedono circa il doppio dei fenoli totali presenti nella polpa (Gorinstein et al., 2002; Gil et al., 2002). La polpa della banana (*Musa cavendish*) contiene circa il 25% in meno dei fenoli presenti nella buccia (Someya et al., 2002). Li et al., (2005) hanno riportato che il contenuto fenolico delle bucce di melagrana, è risultato pari a 249,4 mg/g, contro i circa 25 mg/g della polpa.

Vinaccioli e bucce che residuano dalla lavorazione dell'uva destinata alla produzione di vino rappresentano una ricca risorsa di composti fenolici, in particolare proantocianidine mono-, oligo- e polimeriche (Shrikhande et al., 2000).

Importante fonte di composti fenolici sono anche le bucce ed i semi di pomodoro: George et al. (2004), studiando 12 cultivar di pomodoro, hanno calcolato che il contenuto fenolico della polpa (espresso come mg di catechine / 100 g di prodotto fresco) si attesta in un range che va dai 9,2 ai 27 mg / 100 g, contro un valore che oscilla da un minimo di 10,4 ad un massimo di 40 mg / 100 g delle bucce. Risultati simili sono stati riportati da Toor e Savage (2005).

I semi e i loro residui di lavorazione potrebbero rappresentare una importante risorsa di antiossidanti, come riportato da studi effettuati sul tamarindo (Watanabe et al., 1997), sesamo (Shahidi et al., 1995), lino (Oomah et al., 1995), girasole (Kubicka et al., 1999; De Leonardis et al., 2005), legumi (Amarowicz et al., 2004), mandorla (Siriwardhana et al., 2002), vinaccioli (Ylmaz et al., 2006), mango (Puravankara et al., 2000), arachide (Yen et al., 2005), ecc. Particolarmente ricca in composti dotati di attività antiossidante, in genere più del seme stesso, è risultata la porzione esterna dei semi (Moure et al., 2001; Shaidi et al., 1995). Composti attivi sono stati ritrovati nella crusca di grano (Onyencho et al., 1992), nelle pellicole di arachidi (Yen et al., 2005), fave (Duh et al., 1997), grano saraceno (Watanabe et al., 1997), avena (Peterson, 2001), nonché nei rivestimenti dei semi di fagiolo (Tsuda et al., 1994) e di mandorla (Siriwardhana et al., 2002).

1.8.1.1 I SOTTOPRODOTTI DELL'ESTRAZIONE DELL'OLIO DI OLIVA

La produzione mondiale di olio di oliva è di circa 2,5 milioni di tonnellate l'anno e l'80% circa è di origine europea. I principali paesi produttori sono Spagna, Italia e Grecia ed i sistemi di estrazione dell'olio più diffusi sono: per pressione, in continuo a tre fasi ed in continuo a due fasi. Resa e qualità commerciale dell'olio prodotto mediante i tre sistemi di estrazione sono praticamente equivalenti, mentre cambiano significativamente i sottoprodotti ed i consumi di acqua nel corso del processo (IMPEL, 2005).

Il recupero di fenoli dai sottoprodotti di lavorazione delle olive viene guardato con grande interesse non solo dall'industria alimentare, ma anche da altri settori quali farmaceutico, chimico e cosmetico. Al momento, il mercato di tali sostanze (pure o sotto forma di estratti) è ancora in fase nascente, ma evidenzia interessanti prospettive di crescita (De Leonardis et al., 2006).

Elevate quantità di composti fenolici, soprattutto idrossitirosolo, si possono ricavare dai sottoprodotti dell'industria olearia (Fernandez et al., 2002). L'attenzione si è focalizzata soprattutto sulle acque di vegetazione, che rappresentano potenzialmente la maggiore risorsa di composti fenolici, anche in considerazione del fatto che la produzione annua supera i 7 milioni di tonnellate (Ranalli et al., 2003). Il contenuto fenolico delle acque di vegetazione, come riportato dai dati reperibili in letteratura, fluttua dall'1,0% all'1,8% a seconda della varietà delle cultivar e dei processi di estrazione. I maggiori componenti fenolici nelle acque di vegetazione sono idrossitirosolo, tirosolo, oleuropeina ed una varietà di acidi idrossicinamici (Obied et al., 2005).

Il nocciolo di oliva, comprensivo di un tegumento legnoso esterno (guscio) e di una mandorla interna (seme), è un sottoprodotto solido di scarso valore commerciale, proveniente da una tecnologia emergente che prevede l'operazione di snocciolatura delle olive come fase di lavorazione precedente all'estrazione dell'olio dalla sola polpa. Il nocciolo rappresenta, a seconda delle diverse cultivar, circa il 15-20% in peso della drupa, mentre la mandorla ne costituisce circa il 2-4%.

L'estrazione di olio da olive snocciolate consente di ottenere un prodotto più gradevole all'assaggio (Lacertosa et al., 2003), con più elevati contenuti in polifenoli e

tocoferoli e quindi più resistente ai processi di irrancidimento ossidativo (Frega et al., 1997).

Tra i composti fenolici individuati nel seme si rilevano componenti appartenenti alla classe dei secoiridoidi caratteristici dell'oliva (Maestro-Duràn et al., 1994; Lo Scalzo et al., 1994), nonché il nuzenide, che risulta assente nella polpa (Maestro-Duràn et al., 1994). Studi sistematici condotti sulla natura dei composti fenolici del nocciolo di oliva sono comunque assenti.

Attualmente il nocciolo di oliva ha scarso valore commerciale, essendo considerato solo un prodotto di scarto. Il guscio è normalmente utilizzato come combustibile (Lacertosa et al., 2003), mentre per il seme non si hanno ancora proposte di utilizzo.

1.8.1.2 I SOTTOPRODOTTI DELL'INDUSTRIA DI TRASFORMAZIONE DELLA NOCCIOLA

La nocciola (*Corylus avellana* L.) è un prodotto largamente impiegato nell'industria alimentare. La sua produzione mondiale si attesta intorno alle 700000t/anno ed è coltivata in molti paesi tra cui la Turchia, l'Italia, la Spagna e gli Stati Uniti. La Turchia copre generalmente il 70% del mercato mondiale, seguita dall'Italia che, con una produzione di frutto in guscio pari a 120000 t/anno, ne rappresenta circa il 20%. In Italia l'industria della nocciola è concentrata in quattro regioni: Campania (37% della produzione italiana), Lazio (35%), Piemonte (14%) e Sicilia (13%). Il mercato della nocciola rappresenta dunque un'importante fonte di reddito per l'economia agricola italiana.

La nocciola viene utilizzata dall'industria pasticceria e dolciaria sotto varie forme (tostata o naturale; intera oppure tritata, tagliata in scaglie, macinata in pasta), spesso in combinazione con il cioccolato. Il frutto è rivestito da un guscio duro e legnoso; il seme costituisce la porzione edibile. La mandorla del seme è ricoperta da una pellicola scura (perisperma), la cui facilità di distacco varia in relazione alla cultivar. Tale pellicola ha un gusto amaro-astringente ed è comunemente rimossa tramite un processo noto come "sbiancamento", che consiste nello spazzolare la mandorla, previamente riscaldata, fino ad ottenere un prodotto il più possibile spellato e pulito. Gusci e residui di spellatura sono dunque i sottoprodotti dell'industria di lavorazione della nocciola, provenienti rispettivamente dalle operazioni di sgusciatura e di rimozione della pellicola che riveste il

seme. I residui pellicolari, rappresentano il 3-4% della mandorla sgusciata. Questi residui sono principalmente sfruttati come combustibile o per la produzione di compost, ma il loro valore potrebbe risultare notevolmente incrementato se si riuscissero a proporre nuove e più proficue utilizzazioni industriali, che contribuirebbero a ridurre i costi dell'industria di trasformazione di questo prodotto.

Alcune ricerche preliminari hanno rilevato che le sostanze fenoliche della nocciola sono localizzate quasi esclusivamente nella pellicola del seme (Senter et al., 1983), che ne è risultata particolarmente ricca (Bignami, 2002; Bignami, 2005). I composti fenolici della nocciola sono risultati dotati di attività antiossidante (Yurttas et al., 2000; Andreoni, 1997). Una recente ricerca ha messo in risalto che la nocciola ed i suoi sottoprodotti sono potenzialmente dotati di importanti effetti benefici sul miglioramento della salute umana e sulla riduzione dei rischi di malattie (Alasalvar et al., 2006). Queste evidenze hanno suggerito l'ipotesi che il sottoprodotto proveniente dall'operazione di spelatura del seme possa essere utilizzato come risorsa di antiossidanti naturali (Andreoni, 1997; Travaglia et al., 2005; Alasalvar et al., 2006; Shahidi et al., 2007). Non è stato tuttavia condotto alcuno studio mirato all'identificazione dei composti fenolici della pellicola di nocciola e le sostanze responsabili dell'attività antiossidante risultano a tutt'oggi sconosciute.

1.9 METODI DI ESTRAZIONE DEGLI ANTIOSSIDANTI DA MATRICI VEGETALI

La tecnica più frequentemente utilizzata per ottenere estratti grezzi di antiossidanti da matrici di origine vegetale è l'estrazione con solventi. Vengono impiegate diverse combinazioni di solventi tra cui i più comuni sono acqua, etanolo, metanolo, acetone e acetato di etile, usati puri o in miscela (Amin et al., 2006).

La diversità strutturale dei composti fenolici estraibili influenza sia i rendimenti di estrazione sia l'attività degli estratti in relazione al solvente impiegato (Marinova et al., 1997). Ad esempio, molti glicosidi fenolici sono molto solubili in acqua, mentre i corrispondenti agliconi sono meno solubili, come pure i corrispondenti eteri ed esteri. Con poche eccezioni (resorcinolo e floroglucinolo), la solubilità in acqua degli agliconi fenolici aumenta con l'aumentare del numero degli ossidrili presenti sull'anello benzenico. Se non presenti in forma coniugata, glicosidica od esterificata, alcuni

composti fenolici sono normalmente solubili in solventi organici polari (Pietta, 2000). I fenoli con pochi gruppi ossidrilici sono solubili in metanolo, etanolo, cloroformio, etere ed etilacetato. Fenoli con una o più catene alifatiche laterali richiedono solventi meno polari per la loro estrazione. Essi sono, inoltre, solubili in sodio idrossido e carbonato di sodio (gli acidi fenolici sono solubili anche in bicarbonato di sodio), ma in ambiente alcalino viene favorita la loro ossidazione. (Pietta, 2000).

Anche i protocolli di estrazione utilizzati per l'estrazione dei composti fenolici sono alquanto differenziati e prevedono condizioni variabili da temperatura ambiente fino all'ebollizione o al riflusso. Poiché l'efficacia antiossidante è legata alla natura dei composti estratti ed al tipo di solvente di estrazione impiegato, ne deriva la necessità di sperimentare e selezionare, per ogni specifica matrice vegetale, il solvente e le condizioni più adatte a massimizzare la resa di estrazione e l'attività antiossidante degli estratti ottenuti.

CAPITOLO 2

OBIETTIVI DELLA TESI ED APPROCCIO DI RICERCA

Il cresciuto interesse sviluppatosi negli ultimi anni nei confronti dell'impiego di antiossidanti naturali in sostituzione di quelli di sintesi, potenzialmente dannosi per la salute, ha spinto numerosi ricercatori a sperimentare l'utilizzazione di sottoprodotti vegetali, in special modo residui a basso costo dell'industria agricola, quali risorse per la produzione di nuovi antiossidanti.

I composti fenolici sono i maggiori componenti ad attività antiossidante presenti nelle piante; molti di essi potrebbero essere sfruttati non solo come agenti antiossidanti, ma anche come potenti nutraceutici.

L'obiettivo principale di questa tesi di dottorato è stato quello di verificare la possibilità di impiegare i sottoprodotti di lavorazione della nocciola (gusci e perisperma) e di denocciolatura delle olive (endocarpo e mandorla) quali materie prime per l'ottenimento di estratti fenolici vegetali ad elevata attività antiossidante, da proporre all'industria alimentare e/o farmaceutica.

In accordo con quanto descritto ed approvato nel progetto di tesi di dottorato presentato nel Novembre 2006, l'attività svolta durante i tre anni di attività di ricerca si è concentrata nello sviluppo dei tre obiettivi realizzativi di seguito riportati:

OR1) Ottimizzazione delle variabili di estrazione degli antiossidanti dai due sottoprodotti, al fine di ottenere estratti grezzi ad elevato contenuto fenolico totale.

OR2) Verifica e quantificazione dell'attività antiossidante degli estratti

OR3) Approfondimento delle caratteristiche antiossidanti, delle proprietà e della composizione chimica dell'estratto fenolico che, sulla base dei risultati ottenuti, presentava le migliori potenzialità applicative.

Per raggiungere questi obiettivi, lo studio si è sviluppato in due distinte fasi di ricerca:

- Screening sui sottoprodotti dell'oliva e della nocciola: messa a punto di una procedura di estrazione per macerazione a freddo in presenza di diversi solventi; valutazione della capacità estraente dei solventi utilizzati, valutazione delle concentrazioni fenoliche totali e tanniche, in relazione al solvente di estrazione; valutazione dell'attività antiradicalica e dell'efficienza antiperossidica degli estratti, in

relazione al solvente di estrazione e confronto con antiossidanti puri naturali e di sintesi; acquisizione degli spettri all'UV degli estratti grezzi.

- Approfondimento sulle caratteristiche dell'estratto fenolico con migliori potenzialità applicative (estratto pellicolare di nocciola ottenuto con etanolo acquoso all'80%): determinazione del potere riducente e confronto con antiossidanti puri e di sintesi; valutazione della capacità chelante e confronto con antiossidanti puri e di sintesi; verifica della biodisponibilità e dell'attività antiossidante *in vivo*; controllo della stabilità alla conservazione a diverse temperature; screening LC/ESI-MS sulle componenti fenoliche.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONI

I sottoprodotti di lavorazione della nocciola, gentilmente forniti dalla “Stelliferi & Itavex” (Viterbo, Italia), erano costituiti dai gusci (**Gn**) e dagli scarti pellicolari provenienti sia dalla pelatura di nocciole intere tostate (**Pn**), sia dalla successiva operazione di granellatura (**Pg**). Questi sottoprodotti rappresentavano il rifiuto giornaliero della tostatura industriale delle nocciole, effettuata su diverse varietà (Tonda Gentile Romana, Tonda di Giffoni, Tonda Gentile delle Langhe; Turkish Tombul), a temperature di tostatura variabili tra i 135 e 170 C°, per tempi variabili tra i 15 e i 40 minuti.

Lo studio sui sottoprodotti di nocciola è stato condotto con il contributo finanziario della fondazione CA.RI.VIT. di Viterbo.

I noccioli dell’oliva, comprensivi di un tegumento legnoso esterno e di una mandorla interna, costituivano i residui di un processo industriale di estrazione di olio da paste denocciolate della cultivar Coratina, ottenute nell’ambito di uno studio sulla qualità dell’olio d’oliva finanziato dal Mi.P.A.A.F. (D.M. 573/7303/04).

A causa della diversa struttura dei componenti del nocciolo di oliva, si è optato per condurre la ricerca sulle due frazioni (mandorla (**Ma**) e endocarpo legnoso (**El**)), separate manualmente.

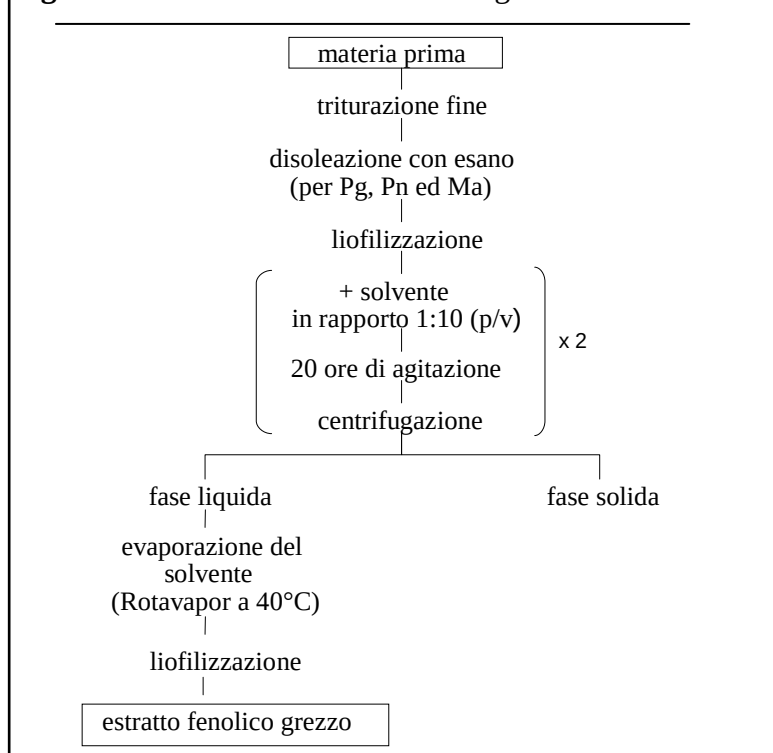
3.2 OTTENIMENTO DEGLI ESTRATTI

I campioni Pg, Pn ed Ma sono stati preventivamente sgrassati con esano al Soxhlet per 8 ore. Gli estratti fenolici sono stati ottenuti per macerazione a temperatura ambiente dei campioni macinati (rapporto solido/liquido 1:10; 20h x 2;) (**Fig. 22**), in presenza di miscele acquose all’80% di metanolo, etanolo ed acetone (sottoprodotti della nocciola) e di metanolo, etanolo, acetato di etile e miscele idroalcoliche all’80% di metanolo ed etanolo (sottoprodotti di oliva). In **Tabella 5** si riportano le sigle identificative dei solventi impiegati.

Solvente	Sigla
Metanolo-acqua (80:20)	M80
Etanolo-acqua (80:20)	E80
Acetone-acqua (80:20)	A80
Acetato di etile	AE
Metanolo	M
Etanolo	E

Tabella 5. Solventi e sigle utilizzate.

Figura 22. Schema di ottenimento degli estratti fenolici.



L'estrazione è stata condotta al buio in vial da 40 ml chiuse, in due step. Ogni step prevedeva 20 ore di macerazione, in presenza di solvente. Al termine del tempo fissato, il campione è stato centrifugato (15 minuti, 4000 rpm) ed il surnatante filtrato (Whatman GF/F 0.7µm). Il solvente è stato allontanato al Rotavapor (40°C). L'acqua residua è stata rimossa per liofilizzazione. In **Figura 22** si riporta lo schema del procedimento di estrazione adottato.

3.3 FENOLI TOTALI E FENOLI TANNICI

I fenoli totali sono stati determinati con il reagente di Folin-Ciocalteu secondo la metodica utilizzata da Singleton & Rossi (1965).

In breve, a 100 µl di campione opportunamente diluito sono stati aggiunti 1 ml di reagente Folin-Ciocalteu diluito 1:10 con acqua. Dopo 3 minuti esatti, sono stati aggiunti 900 µl di Na₂CO₃ al 7,5% ed il tutto è stato lasciato riposare al buio per 90 minuti. La lettura dell'assorbanza a 725 nm è stata effettuata contro un bianco ottenuto utilizzando 100 µl di metanolo al posto del campione.

La concentrazione di fenoli totali dei campioni è stata espressa in acido gallico equivalenti (AGE), acido tannico equivalenti (ATE) o catechina equivalenti (CE), sulla base di rette di taratura ottenute utilizzando concentrazioni crescenti di ogni composto (ac gallico e catechina: 3 – 25 µg; acido tannico: 2-10 µg).

I tannini sono stati stimati indirettamente dopo essere stati assorbiti su Polivinilpirrolidone insolubile (PVP), misurando il contenuto fenolico residuo nel restante surnatante (Makkar, 2000).

3.4 ATTIVITA' ANTIRADICALICA (Test DPPH)

L'attività antiradicalica nei confronti del radicale stabile 1,1-difenil-2-picrilidrazile (DPPH) è stata valutata misurando la variazione di assorbanza a 515 nm dopo 180 min di reazione (tempo necessario per raggiungere lo stadio stazionario) condotta al buio a 25°C, secondo il metodo riportato da Brand-Williams et al. (1995), leggermente modificato.

Il DPPH a concentrazione (0.06 mM) è stato preparato giornalmente diluendo 1:10 una soluzione contenente 0.0118 g di DPPH in 50 ml di MeOH. La concentrazione del DPPH è stata corretta in maniera che l'assorbanza iniziale a 515 nm di 3 ml di DPPH, aggiunti a 400 µl di MeOH, risultasse compresa tra 0.716 e 0.720. La concentrazione esatta di DPPH in cuvetta è stata ricavata in base al valore di assorbimento molare riportato in letteratura (12500 M⁻¹ cm⁻¹) (Arnao , 2000).

Il test è stato condotto miscelando in cuvetta 3 ml della soluzione di DPPH e 0.4 ml di quantità crescenti di estratto grezzo diluito in MeOH. Le cuvette sono state tappate e, dopo 180 minuti di reazione a temperatura ambiente, è stata registrata l'assorbanza a 515 nm, contro un bianco di MeOH puro. Il controllo è stato preparato usando 0.4 ml di metanolo al posto del campione.

La percentuale di DPPH residuo è stata calcolata utilizzando la formula:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{residuo}} = (\text{DPPH}_{\text{camp}} / \text{DPPH}_{\text{contr}}) \times 100$$

Dove $\text{DPPH}_{\text{camp}}$ = Concentrazione di DPPH in presenza di campione e $\text{DPPH}_{\text{contr}}$ = Concentrazione di DPPH del controllo, dopo 180 min.

L'attività antiradicalica è stata espressa in IC_{50} (concentrazione efficiente), che rappresenta la concentrazione di campione in cuvetta (μg di estratto/mg di DPPH o μg di AGE/mg di DPPH) necessaria a ridurre del 50% la quantità iniziale di DPPH radicalica. Di conseguenza, minore è il valore di IC_{50} e maggiore è l'attività antiradicalica (e dunque l'efficacia antiossidante) del campione testato. Nel caso degli antiossidanti di riferimento, il valore di IC_{50} è stato espresso in μg di composto/mg di DPPH. L'efficienza antiradicalica (EA) è stata calcolata come l'inverso di IC_{50} ; maggiore è il valore di EA e maggiore è la capacità antiossidante del campione.

Il valore di IC_{50} è stato estrapolato da una curva dose-risposta costruita plottando i valori di $\%\text{DPPH}_{\text{residuo}}$ vs la concentrazione del campione. Per ogni estratto o antiossidante puro sono state testate almeno cinque diverse concentrazioni. L'attività antiradicalica degli antiossidanti puri butilidrossitoluolo (BHT), butilidrossianisolo (BHA), α -tocoferolo e 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-acido carbossilico (Trolox), solubilizzati in MeOH, è stata ottenuta testando concentrazioni fino a un massimo di 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Trolox e BHT), 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (BHA) e 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (α -tocoferolo) in cuvetta.

La regressione applicata ai dati sperimentali per estrapolare il valore di IC_{50} è stata di tipo lineare nel range testato (da 30% a 70% di DPPH residuo), con valori di r^2 pari o superiori a 0.99.

L'attività antiradicalica degli estratti è stata espressa anche in termini di Capacità Antiossidante Standard Equivalente (CASE), definita come la quantità (μg) di antiossidante di riferimento (BHA, BHT, Trolox e α -tocoferolo) avente la stessa capacità antiradicalica (50% di DPPH scavenging) di un microgrammo di campione. I valori di CASE sono stati calcolati come segue:

$$\text{CASE} = \text{IC}_{50(\text{Rif})} / \text{IC}_{50(\text{Camp})}$$

Dove $\text{IC}_{50(\text{Rif})}$ è il valore di IC_{50} dell'antiossidante di riferimento, mentre $\text{IC}_{50(\text{Camp})}$ è il valore di IC_{50} dell'estratto, espresso come μg di estratto crudo/mg di DPPH oppure come μg di AGE/mg di DPPH.

3.5 EFFICIENZA ANTIPEROSSIDICA (Test AAPH)

L'efficienza antiperosidica degli estratti è stata valutata seguendo l'ossidazione dell'acido linoleico indotta dal 2,2'-azobis-(2-amidinonopropano)idrocloreuro (AAPH), secondo il metodo riportato da Liegeois et al. (2000).

Una dispersione di acido linoleico (~16 mM) è stata preparata in tampone borato 0.05M (pH 9.0) contenente Tween 20[®] come emulsionante e idrossido di sodio come agente chiarificante, seguendo la procedura descritta da Surrey (1964) ed i suggerimenti di Liegeois et al. (2000). La dispersione di acido linoleico è stata distribuita in aliquote da 0.5 ml, conservate a -20°C fino al momento dell'uso; il grado di ossidazione delle sospensioni è stato controllato prima dell'impiego, scartando quelle che esibivano un valore di autoossidazione superiore al 3%. La soluzione di AAPH (40mM) è stata preparata in tampone fosfato (0.05 M, pH 7.4) e conservata in aliquote a -20°C, fino al momento dell'uso.

Per condurre il test, in una cuvetta di quarzo termostata a 37°C contenente 2810 µl di tampone fosfato (0.05M, pH 7.4) sono stati mescolati 30 µl della sospensione di acido linoleico e 10 µl di estratto grezzo, sciolto in MeOH a concentrazioni crescenti. Nei saggi condotti con gli antiossidanti di riferimento, sono stati utilizzati 10 µl di BHA, BHT, Trolox o α -tocoferolo, in soluzione metanolica a concentrazioni crescenti. L'ossidazione dell'acido linoleico è stata fatta partire aggiungendo 150 µl della soluzione di AAPH. Parallelamente, è stato preparato un controllo (sostituendo il campione con 10 µl di metanolo) ed un bianco di AAPH (utilizzando 2810 µl di tampone fosfato, 10 µl di metanolo e 150 µl della soluzione di AAPH). Tutte le cuvette sono state immediatamente incubate a 37°C e la velocità di ossidazione è stata monitorata ad intervalli regolari, registrando l'incremento di assorbanza a 234 nm causato dagli idroperossidi dienici. Poiché l'AAPH si decompone lentamente con il passare del tempo ed i suoi prodotti incrementano l'assorbimento a 234 nm, l'assorbanza di un bianco costituito da solo AAPH è stata di volta in volta sottratta alle letture registrate per campioni.

L'assorbanza a 232 nm è stata plottata in funzione del tempo ed il tempo di inibizione (T_{inib}) calcolato come punto di intersezione tra le tangenti alle curve che rappresentano le fasi di inibizione e propagazione ossidativa. Il potere antiossidante è stato espresso come velocità di inibizione (V_{inib} , min $conc^{-1}$), che rappresenta la pendenza

della retta costruita plottando il T_{inib} (min) v/s la concentrazione di campione (r^2 ottenuto: ≥ 0.99).

Nel caso degli estratti, V_{inib} è stata espressa sia in min per mg L^{-1} di estratto secco che in min per mg L^{-1} di AGE in cuvetta. Nel caso degli standard di riferimento, V_{inib} è stata espressa in min per mg L^{-1} di antiossidante puro. Più alto è il valore di V_{inib} , maggiore è l'efficienza antiperossidica del campione.

3.6 SPETTRI UV

Gli spettri UV degli estratti grezzi e dei composti fenolici standard sono stati acquisiti in un range di 200-400 nm, usando uno spettrofotometro UV/VIS Perkin-Elmer Lambda. I campioni di estratto sono stati analizzati previo dissolvimento in etanolo, alla concentrazione di 26 μg di AGE/ml. Gli standard sono stati testati alla concentrazione di 15 $\mu\text{g/ml}$ di etanolo.

3.7 CAPACITA' CHELANTE IL FERRO

La capacità di chelare il ferro è stata misurata mediante test di inibizione della formazione del complesso Fe(II)-ferrozina, utilizzando il metodo di Decker e Welch (1990), leggermente modificato.

In provette da 5 ml sono stati inseriti 2.8 ml di soluzione metanolica contenente estratto grezzo o antiossidanti puri a differenti concentrazioni. A questi sono stati aggiunti 150 μl di H_2O e 100 μl di FeCl_2 0.6 mM. Il preparato è stato agitato per 30 secondi e lasciato a riposo per 15 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 150 μl di Ferrozina 5 mM ed il tutto è stato agitato nuovamente per 30 secondi. Dopo un'attesa di 10 minuti, la soluzione è stata inserita in cuvette dal percorso ottico di 1 cm e sono stati acquisiti gli spettri da 400 a 800 nm. Per il bianco è stata sostituita la ferrozina con un equivalente contenuto di H_2O .

La capacità chelante è stata calcolata in base alla seguente formula:

$$\text{Capacità chelante \%} = \frac{\text{DO}_1 - (\text{DO}_2 - \text{DO}_3)}{\text{DO}_1} \times 100$$

Dove:

DO_1 = DO del complesso Fe(II)-Ferrozina, privo di campione

DO_2 = DO del complesso Fe(II)-Ferrozina, dopo l'aggiunta del campione

DO_3 = DO del campione + Fe(II), senza ferrozina

3.8 POTERE RIDUCENTE

Il potere riducente è stato determinato utilizzando il metodo descritto da Oyazu (1986).

In provette da 25 ml sono stati inseriti 1 ml di soluzione metanolica contenente il campione o gli antiossidanti di riferimento a differenti concentrazioni. Successivamente sono stati aggiunti 2.5 ml di tampone fosfato (0.2M, pH 6.6) e 2.5 ml di Ferricianuro di Potassio [$K_3Fe(CN)_6$] all'1%. Le provette sono state incubate per 20 minuti a 50°C e raffreddate rapidamente in ghiaccio. Sono stati quindi aggiunti 2.5 ml di TCA al 10% ed il tutto è stato centrifugato 10 minuti a 5000 rpm. A 2.5 ml di surnatante sono stati aggiunti 2.5 ml di H_2O e 0.5 ml di Cloruro Ferrico ($FeCl_3 \times 6H_2O$) allo 0.1%. Dopo un attesa di 10 minuti è stata letta l'assorbanza a 700 nm. Il bianco è stato preparato utilizzando metanolo puro al posto del campione. Maggiori valori di assorbanza della miscela di reazione indicano maggiore potere riducente.

3.9 DETERMINAZIONE DEL POTENZIALE ANTIOSSIDANTE DEL PLASMA

La capacità antiossidante totale del plasma (FRAP test) è stata misurata su ratti alimentati con una dose singola di estratto pellicolare di nocciola.

Sono stati utilizzati ratti maschi Sprague-Dawley (Charles River) del peso di 140 ± 10 g. Gli animali erano tabulati in gabbie singole, in stanze dalla temperatura e luce controllate (22 ± 1 °C; cicli alterni di 12 ore buio/luce). La sperimentazione è stata condotta presso i laboratori del Dipartimento di Ecologia e di Sviluppo Sostenibile dell'Università della Tuscia di Viterbo; il trattamento dei ratti era approvato dalla "Animal Care and Ethics Committee" dell'INRAN di Roma (Italy).

I ratti hanno ricevuto un biscotto inumidito con 1 ml di soluzione acquosa contenente 10 mg di estratto pellicolare di nocciola (pari a 71.4 mg/Kg corporeo); i ratti di controllo hanno ricevuto il biscotto tal quale. Dopo 90 e 180 min dalla completa

ingestione del biscotto, gli animali sono stati sacrificati. Il sangue dei ratti, posto in tubi eparinizzati, è stato centrifugato (15 min, 2000 g) a 4°C; il plasma ottenuto è stato impiegato per la determinazione della capacità antiossidante, seguendo il metodo di Benzie e Strain (1996).

Un quantitativo pari a 160 µl di reagente FRAP preparato giornalmente (25 ml di tampone acetato (0.3M, pH 3.6); 2.5 ml di 2-4-6 trpyridil-s-triazine (TPTZ) 10 mM in HCl; 2.5 ml di FeCl₃ x 6 H₂O 40 mM) è stato mescolato con 10 µl di plasma diluito 1:2 con tampone acetato. Dopo 30 minuti di incubazione a 37°C, è stata misurata l'assorbanza a 595 nm. Il FRAP del plasma, espresso come µmoli di Fe(II) equivalenti/litro, è stato ricavato sulla base di una curva di taratura costruita utilizzando uno standard di Fe SO₄ x 7H₂O a concentrazioni crescenti.

3.10 TEST DI CONSERVABILITA'

Le prove di conservabilità degli estratti sono state condotte su una serie di soluzioni etanoliche (10 mg/ml) di estratto pellicolare di nocciola e di α-tocoferolo, mantenute al buio per 6 mesi a -18°C, 4°C e temperatura ambiente (circa 22°C). Le soluzioni (1 ml) erano poste all'interno di eppendorf chiuse della capacità di 1.5 ml. Per ogni campione sono state preparate più eppendorf, in maniera che ai tempi fissati le analisi fossero condotte su recipienti mai aperti.

Periodicamente, sui campioni di estratto e di α-tocoferolo si è proceduto all'analisi dell'attività antiradicalica (test DPPH); sui campioni di estratto è stato determinato anche il contenuto fenolico totale.

3.11 ANALISI LC/ESI-MS

L'analisi LC/ESI-MS è stata condotta presso i laboratori del dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Sapienza di Roma, secondo il metodo riportato da Cavaliere et al. (2008). E' stato utilizzato un HPLC Agilent seryes 1200 (Agilent Technologies, Waldhrom, Germania) munito di due colonne a fase inversa montate in serie (Zorbax Eclipse Plus G8; 100 x 2.1 mm; Agilent Technologie Santa Clara, CA, USA). Il flusso operativo è stato settato di 0.3 ml/min e la temperatura di esercizio 70°C. Gli eluenti utilizzati sono stati: A = acqua, B = acetonitrile/metanolo 50:50 (v/v); entrambi gli elementi sono stati aggiunti di acido formico allo 0.1%.

L'eluizione dei composti è iniziata con un gradiente lineare di B (da 10 a 25% in 15 min), poi portato al 100% in 2 minuti. Dopo 5 minuti di condizioni isocratiche con l'eluente B, il tenore di B è stato portato al 10% e la colonna riequilibrata in B per 5 minuti. Il campione analizzato, solubilizzato in metanolo, è stato preventivamente filtrato su filtro PTFE da 0.45 μm ed iniettato (1 μl) senza ulteriori purificazioni. Per l'identificazione dei componenti è stato impiegato uno strumento Agilent QqQ, equipaggiato con un sistema di ionizzazione elettro-spray (ESI). Per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati è stato utilizzato un software Agilent (Mass Hunter Workstation) versione B.01.00.

L'identificazione dei componenti è stata condotta mediante LC/MS/MS operando in modi di ionizzazione sia positivi che negativi; il voltaggio dell'ago ESI era settato rispettivamente a -4000V e +4000V. La temperatura di sorgente era settata a 100°C; la temperatura del gas di nebulizzazione a 350°C; il flusso del gas a 10L/min; la pressione del nebulizzatore a 40 psi. L'azoto (2 bar) è stato usato come nebulizzatore e gas di collisione. Il frammentatore era settato nel range di 100-300 (unità arbitrarie) e lo ione prodotto scansionato tra 100 e 1400 m/z. Come ioni precursori sono stati selezionati (M-H)⁺ e (M-H)⁻. L'identificazione è stata condotta sulla base dei tempi di ritenzione e degli spettri ottenuti analizzando standard puri. Nel caso dei composti per i quali non si dispone di standard puri, l'identificazione è stata condotta confrontando i loro spettri MS/MS con quelli di spettri disponibili in letteratura. Per la quantificazione, la sorgente PSI operava in modalità positiva. Gli spettri MS sono stati registrati nel range M/z 200-1400.

Analisi statistica

Tutte le misurazioni sono state effettuate almeno in triplicato ed i risultati sono riportati come media $\pm$ d.s. I dati sperimentali sono stati elaborati attraverso l'analisi della varianza (ANOVA). La significatività tra medie ($p \leq 0,05$) è stata determinata utilizzando il test di Tukey, utilizzando il pacchetto SPSS 13.0 per Windows.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo lavoro di dottorato è stata verificata la possibilità di impiegare i residui di lavorazione della nocciola (gusci e perisperma) e di denocciolatura delle olive (endocarpo e mandorla) quali materie prime per l'ottenimento di nuovi antiossidanti fenolici naturali.

La prima fase dello studio ha riguardato in particolare le seguenti attività:

- messa a punto di un protocollo di estrazione per macerazione a temperatura ambiente
- valutazione della capacità estraente di diverse miscele solvente
- verifica delle rese di estrazione
- quantificazione delle concentrazioni fenoliche degli estratti grezzi
- valutazione dell'attività antiradicalica ed antiperoossidica degli estratti grezzi
- confronto tra l'attività antiossidante degli estratti grezzi con quello degli antiossidanti naturali (α -tocoferolo) e di sintesi (BHA, BHT) attualmente impiegati dall'industria alimentare/cosmetica/farmaceutica o utilizzati in test di confronto (Trolox)
- quantificazione della componente tannica
- caratterizzazione di base (screening dell'assorbimento all'UV) degli estratti grezzi.

Con l'intento di valutare più a fondo le caratteristiche e le potenzialità applicative dell'estratto fenolico che ha dato i risultati più interessanti, nella seconda fase dello studio è stata focalizzata l'attenzione sul prodotto ottenuto con EtOH 80% dalle pellicole di nocciole tostate, previa accurata rimozione dei frammenti endospermacei. Su tale estratto sono state pertanto determinate:

- l'attività chelante il Fe(II)
- il potere riducente
- l'attività antiossidante *in vivo* mediante test condotti su ratti
- la stabilità nel corso della conservazione a diverse temperature
- valutazione qualitativa della frazione fenolica (LC/ESI-MS)

4.1 I SOTTOPRODOTTI DELLA NOCCIOLA

I sottoprodotti dell'industria di trasformazione della nocciola oggetto di studio della ricerca sono stati gusci e residui pellicolari. Recentissimi studi, condotti indipendentemente da questo lavoro di dottorato da un gruppo di ricercatori turco-canadesi (Shahidi et al., 2007), hanno rilevato che tali sottoprodotti sono in grado di fornire estratti grezzi più ricchi in fenoli totali e con una capacità antiossidante più elevata, rispetto ad altri materiali di scarto provenienti dal frutto in questione.



Figura 23. La nocciola (*Corylus avellana* L.).

I gusci (campioni Gn) costituivano il prodotto duro e legnoso rimosso dalla parte edibile della nocciola in fase di sgusciatura.



Figura 24. Gusci di nocciola (sottoprodotto industriale di sgusciatura).

Le pellicole rappresentavano il prodotto di scarto dell'operazione industriale denominata "sbiancamento", caratterizzata da un'abrasione dei semi sgusciati appena tostati, seguita da un allontanamento mediante aspirazione dei frammenti di perisperma che li rivestiva. La facilità di distacco e quindi l'efficienza dell'operazione di rimozione del perisperma è cultivar-dipendente. In alcune varietà, come ad esempio la "Tonda Gentile Romana" o "Barcellona", l'allontanamento delle pellicole è molto difficoltosa e pertanto lo sbiancamento non avviene mai in maniera completa.

Per ottenere formulati di nocciole tritate, i semi subiscono un ulteriore processo noto come "schiacciamento" o "granellatura", nel corso del quale le pellicole residue aderenti alla superficie dell'endosperma, sfuggite all'operazione precedente, vengono ulteriormente rimosse dalle nocciole granellate. Questa operazione porta all'ottenimento di un sottoprodotto arricchito di piccoli frammenti di endosperma, che avendo densità simile a quella delle pellicole, inevitabilmente vengono aspirati assieme al materiale di scarto. Di conseguenza, rispetto al sottoprodotto pellicolare ottenuto dalla lavorazione delle nocciole intere, quello che residua dalla granellatura risulta caratterizzato da una superiore presenza di materiale estraneo endospermaceo.

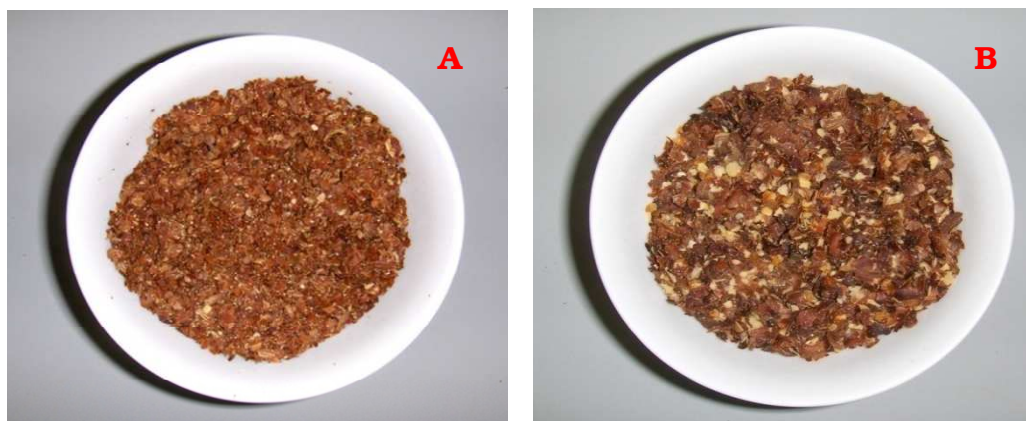


Figura 25. Sottoprodotto industriale di pelatura delle nocciole intera **(A)** e residuo pellicolare di granellatura **(B)**.

Al fine di indagare l'effetto della presenza dei frammenti di endosperma nei residui pellicolari di nocciola, nel corso di questa ricerca sono stati studiati sia i sottoprodotti pellicolari provenienti dallo sbiancamento delle nocciole intere tostate (campioni Pn), sia quelli ottenuti dalla successiva operazione di granellatura (campioni Pg).

4.1.1 RESE DI ESTRAZIONE E FENOLI SOLUBILI

È noto che la quantità di sostanze estraibili nel corso di una estrazione con solventi dipende sia dalla peculiarità della materia prima vegetale che dal solvente impiegato (Marinova et al., 1997; Moure et al., 2000; Kim et al., 1994). Da un attento esame delle fonti bibliografiche è emerso che le soluzioni acquose al 70-80% di metanolo, etanolo o acetone sono le più utilizzate (Moure et al., 2001; Naczki et al., 2006) e quindi le più promettenti per il recupero dei composti fenolici da sottoprodotti quali le pellicole di rivestimento delle sementi (Kahkonen et al., 1999; Yu et al., 2005). Per tale motivo è stato deciso di utilizzare e di confrontare l'efficienza di soluzioni acquose contenenti l'80 % (v/v) di metanolo, etanolo e acetone, per ottenere estratti fenolici grezzi dai gusci e dal perisperma delle nocciole, mediante lenta macerazione a temperatura ambiente.

In **Tabella 6** sono riportati i rendimenti di estrazione (espressi come percentuale di sostanza secca), nonché i fenoli estraibili ed i contenuti fenolici degli estratti, ottenuti utilizzando i tre solventi selezionati. I risultati si riferiscono al campione t.q. nel caso dei gusci ed al campione sgrassato nel caso dei residui pellicolari.

Dall'esame dei dati, visibili in **Tabella 6** e **Figura 26**, appare evidente come le quantità di composti estraibili contenute nei tre sottoprodotti oggetto di studio siano risultate alquanto differenti. Gn ha fornito le più basse rese di estrazione (2.7-2.8%), che sono apparse indipendenti dal solvente impiegato. Tali rese sono risultate circa 7-8 volte inferiori a quelle di Pg e 10 volte più basse di Pn. Una notevole quantità di estratto è stata ricavata dai campioni pellicolari, in special modo Pn (resa massima 32.6 %, ottenuta con la miscela acetonica). Per entrambi i sottoprodotti Pn e Pg, non sono state riscontrate differenze significative ($p < 0.05$) impiegando metanolo o etanolo, mentre il solvente acetone ha fornito rese leggermente più elevate.

Mediante estrazione a caldo (80°C, in condizioni di riflusso) con etanolo 80%, Shahidi et al. (2007) hanno ottenuto dai gusci sgrassati di nocciola rendimenti simili a quelli rilevati nel corso di questo studio (2.5% contro il 2.7-2.8 %). Tuttavia, nella presente ricerca sono state ottenute, dai residui pellicolari di nocciole intere, rese in estratto notevolmente superiori (32.6%, contro il 10.35% riportato dai succitati Autori), pur impiegando lo stesso solvente di estrazione (etanolo 80%).

I fenoli totali solubili (**Tabella 6 e Figura 27 (1)**) sono risultati legati sia al tipo di campione che al solvente impiegato per l'estrazione. Nelle condizioni adottate, su tutti i tre sottoprodotti la miscela acetonica ha rivelato migliore capacità estraente nei confronti dei composti fenolici. L'acetone acquoso si è in effetti dimostrato un buon solvente dei fenoli su molte matrici vegetali, specie se ricche in tannini (Makkar, 2000).

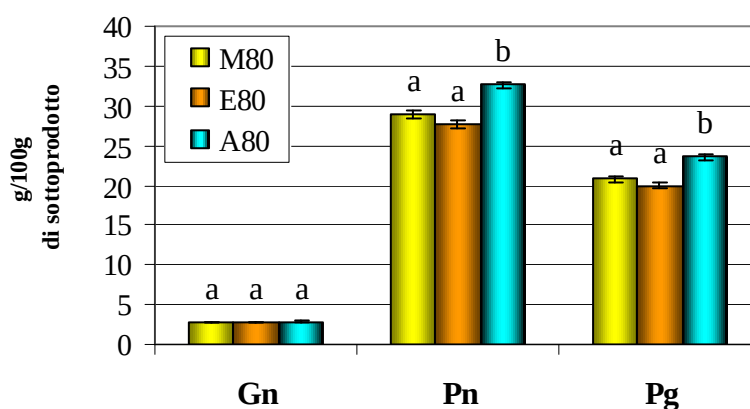
Tabella 6. Solidi Solubili totali (SS), Fenoli Solubili totali (FS) e Fenoli Totali dell'estratto (FT), ottenuti dai sottoprodotti della nocciola in relazione al solvente impiegato.

Campione ^a	Solvente ^b	SS (g/100g)	FS (mg AGE ^c /g)	FT (mg AGE ^c /g)
Gn	M80	2.7 ± 0.05 a	1.5 ± 0.04 a	56.6 ± 1.7 a
Gn	E80	2.7 ± 0.07 a	1.6 ± 0.05 a	59.6 ± 1.0 a
Gn	A80	2.8 ± 0.10 a	2.1 ± 0.03 b	72.2 ± 2.0 b
Pn	M80	28.9 ± 0.32 a	123.4 ± 2.1 a	426.7 ± 4.6 a
Pn	E80	27.8 ± 0.48 a	139.6 ± 2.9 b	502.3 ± 9.9 b
Pn	A80	32.6 ± 0.32 b	152.2 ± 3.0 c	466.8 ± 7.8 c
Pg	M80	20.8 ± 0.30 a	20.3 ± 0.26 a	97.7 ± 1.7 a
Pg	E80	20.0 ± 0.41 a	34.9 ± 0.64 b	174.5 ± 2.2 b
Pg	A80	23.5 ± 0.29 b	48.5 ± 0.86 c	206.1 ± 3.7 c

^aGn: guscio liofilizzato; Pn: pellicola di nocciola intera, sgrassata e liofilizzata; Pg: pellicola di nocciola granellata, sgrassata e liofilizzata. ^bM80, metanolo 80%; E80, etanolo 80%; A80, acetone 80%. ^c Acido Gallico Equivalenti.

Media ± d.s. (n≥3). Lettere diverse all'interno di ogni gruppo di campioni identificano differenze significative (p≤0.05).

Figura 26. Rese di estrazione ottenute con diversi solventi dai sottoprodotti di lavorazione della nocciola.



Lettere diverse all'interno dello stesso gruppo di campioni identificano differenze significative (p≤0.05).

Dai gusci sono state ottenute poche sostanze fenoliche (max 2.1 mg di AGE/g di residuo, ricavate con la miscela acetonica), mentre Pg si è dimostrato un'eccellente fonte di fenoli estraibili (123-152 mg di AGE/g di campione sgrassato, a seconda del solvente).

I quantitativi dei fenoli estraibili da Pn sono risultati da 3 a 6 volte superiori a quelli di Pg. Nel caso di entrambi i sottoprodotti pellicolari, il potere solvente nei confronti dei composti fenolici è cresciuto nell'ordine: metanolo < etanolo < acetone **Tabella 6 e Figura 27 (1).**

Il solvente ottimale per l'estrazione dei composti fenolici dovrebbe soddisfare i seguenti criteri: capacità di estrarre la massima quantità di fenoli e capacità di estrarre la minima quantità di sostanze estranee non-fenoliche. In pratica, il solvente ottimale è quello che fornisce il più alto rapporto tra fenoli totali estraibili e composti totali estraibili. Queste condizioni sono state soddisfatte nel caso di entrambi i campioni Gn e Pg dalla miscela acetonica. Su Pn, invece, l'etanolo è apparso più efficiente. Infatti, seppure l'acetone sia stato in grado di estrarre più composti fenolici anche da questo sottoprodotto, le sostanze estranee non-fenoliche solubilizzate sono aumentate in maniera più che proporzionale. In definitiva, non è stata rilevata alcuna relazione tra quantità di composti totali estraibili e fenoli estraibili. Per quanto riguarda gli altri solventi, sui gusci l'efficienza estrattiva del metanolo e dell'etanolo è risultata simile, mentre su Pn e Pg la miscela metanolica è apparsa in assoluto la meno idonea.

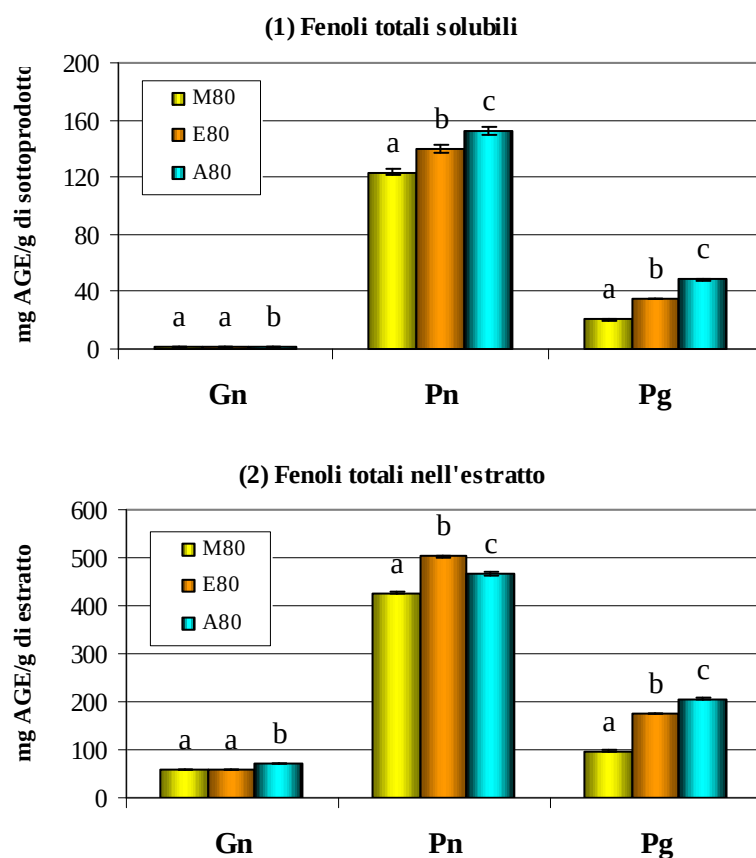
Nelle condizioni adottate, il solvente più adatto nel caso dei gusci di nocciola è stato dunque l'acetone 80%, che ha fornito la più alta resa in sostanza secca ed inoltre, solubilizzando più fenoli e meno sostanze estranee, ha consentito di ottenere l'estratto più ricco in composti fenolici (72 mg di AGE/g di estratto). Su questo sottoprodotto, metanolo 80% ed etanolo 80% sono risultati inefficaci.

Sul sottoprodotto pellicolare che residua dalla tostatura delle nocciole intere, invece, la miscela acetone/acqua (80:20) ha dato la massima resa ed estratto più fenoli, ma il solvente che ha consentito di ottenere l'estratto crudo più concentrato in composti fenolici è stato l'etanolo 80% (502.3 mg di AGE/g di estratto); tra i solventi testati, il metanolo 80% è apparso il meno efficiente.

La presenza di frammenti di nocciola nel residuo pellicolare (campione Pg) ha modificato i risultati. Il solvente più efficiente è risultato l'acetone 80% (fenoli totali nell'estratto: 206.1 mg di AGE/g; massimi valori degli altri parametri testati). La miscela

etanolica all'80% ha solubilizzato meno fenoli e dato una concentrazione di composti fenolici nell'estratto lievemente minore (174.5 mg di AGE/g); anche in questo caso, il metanolo all'80% è risultato il meno efficace.

Figura 27. Fenoli totali solubilizzati dai sottoprodotti di nocciola in relazione al solvente impiegato (1) e fenoli totali nei corrispondenti estratti (2).



Lettere diverse all'interno dello stesso gruppo di campioni identificano differenze significative ($p \leq 0.05$).

I differenti contenuti in fenoli estraibili dei campioni Pg e Pn, nonché le diverse risposte in relazione ai solventi testati, sono evidentemente legati alla natura dei due sottoprodotti. Pn è costituito essenzialmente da residui pellicolari, con rari frammenti di endosperma (**Figura 27 (1)**), mentre Pg si presenta molto ricco di endosperma finemente frantumato (**Figura 27 (2)**). Appare evidente che la presenza di frammenti di nocciola è detrimento ai fini dell'ottenimento di un estratto fenolico efficientemente concentrato. Tali frammenti, infatti, non solo non hanno apportato un contributo fenolico (come ci si potrebbe aspettare sulla base di precedenti evidenze, che hanno rilevato come il

contenuto fenolico dell'endosperma di nocciola sia insignificante, se comparato con quello del perisperma (Bignami et al., 2005), ma hanno arricchito la materia prima di solidi solubili non fenolici. Dunque, nell'ipotesi di uno sfruttamento industriale dei sottoprodotti di nocciola al fine di ricavarne concentrati fenolici naturali, i risultati di questa ricerca suggeriscono di operare su una materia prima pellicolare da cui siano stati preventivamente allontanati gli elementi estranei endospermacei. Disponendo di un prodotto pellicolare ripulito, è possibile optare per una macerazione condotta con etanolo acquoso in alternativa all'acetone, a scapito di un leggero calo di resa ma con il duplice vantaggio di una superiore sicurezza d'uso ed una maggiore purezza fenolica degli estratti.

Considerando le inevitabili variazioni sperimentali, il contenuto fenolico degli estratti etanolic di Pg ottenuti in questo lavoro (502.3 mg di AGE/g, pari a 588.2 mg di CE/g) è risultato estremamente simile a quello recentemente riportato da Shahidi et al. (2007). Utilizzando etanolo acquoso 80 % a caldo (80°C) per tempi brevi (2 x 30 min), tali Autori hanno infatti ottenuto dai residui pellicolari sgrassati di nocciola un estratto con 577.7 mg /g di fenoli totali, espressi in CE. Quindi, la procedura adottata in questo lavoro di dottorato (lenta macerazione a temperatura ambiente) sembrerebbe efficiente al pari dell'estrazione a caldo, per quanto concerne il tenore fenolico degli estratti. Tuttavia, le rese in estratto ottenute nel presente studio sono risultate sorprendentemente molto più alte (circa 3 volte superiori) rispetto a quelle riportate da Shahidi et al. (2007). Al contrario, per quanto concerne i gusci di nocciola, nonostante le rese di estrazione ottenute nell'ambito di questo lavoro siano in accordo con quelle riportate dai succitati Autori, la concentrazione fenolica degli estratti rilevata nel loro studio è risultata circa 2.5 volte più alta di quella massima riscontrata in questo lavoro di dottorato. Si possono postulare una serie di ipotesi per giustificare tali discrepanze. Così come per le pellicole, anche sui gusci di nocciola (preventivamente sgrassati) Shahidi et al. (2007) hanno impiegato come solvente etanolo 80% a caldo. E' possibile che la fase di sgrassatura dei gusci (by-passata nel presente studio) sia invece uno *step* essenziale. E' anche possibile che l'estrazione a caldo, rispetto ad una estrazione *soft* a freddo, sia in grado di allontanare più composti fenolici e meno sostanze interferenti da una matrice legnosa come i gusci, ma che al contrario risulti più efficace nel caso di una matrice essenzialmente fibrosa come quella delle pellicole di nocciola. In aggiunta, differenze

genotipiche/ambientali/culturali oltre che di processo e/o di stato di conservazione, potrebbero aver contribuito a differenziare le materie prime utilizzate per le ricerche.

In uno studio molto recente, condotto da Stévig et al. (2007), è stata utilizzata una macerazione a freddo (20-22°C) per tempi brevi (30-150 min) per estrarre composti fenolici dai gusci di nocciola. In tale lavoro è stata valutata l'efficienza di differenti miscele acquose etanoliche e metanoliche, verificando semplicemente i quantitativi dei fenoli totali solubili (che sono variati da un minimo di 1.37 ad un massimo di 6.70 mg di AGE/g di gusci). I valori ottenuti nell'ambito del presente studio (1.5-2.1 mg di AGE/g) si sono posizionati nel range più basso ottenuto dai succitati Autori.

Il contenuto fenolico del campione Pn estratto con etanolo, con 502.3 mg GAE/g, è risultato estremamente più alto rispetto a quello degli estratti che si possono generalmente ricavare dagli alimenti vegetali (aventi concentrazioni fenoliche comprese tra 0.5 a 50 mg di AGE/g di estratto (Kähkönen et al., 1999)) e comunque superiore a quello di estratti ricavati da similari prodotti di scarto, quali perisperma di mandorla, arachide e castagna. Negli estratti di pellicole di mandorla, Siriwardhana et al. (2002) hanno trovato 87.8 mg di CE/g; i fenoli totali di estratti ottenuti dal perisperma di arachide e castagna sono stati quantificati tra 150 e 240 mg AGE/g, rispettivamente (Nepote et al., 2002; Kamath et al., 2007). Quindi, i sottoprodotti di lavorazione pellicolari della nocciola rappresentano indubbiamente una fonte di composti fenolici estraibili eccezionalmente ricca.

4.1.2 ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

Numerosi metodi analitici sono utilizzati per valutare l'attività antiossidante *in vitro* delle piante e dei loro derivati, che divergono gli uni dagli altri per tipo di marcatori, condizioni di reazione, cinetica, quantificazione e substrati impiegati. Di conseguenza, è difficile confrontare i risultati ottenuti con differenti approcci analitici. Inoltre, le relazioni tra i risultati forniti dai diversi test di attività antiossidante sono risultate dipendere non solo dal metodo, ma anche dalla natura degli antiossidanti analizzati. Per questi motivi è importante di valutare l'attività antiossidante di uno specifico substrato utilizzando almeno due differenti approcci analitici (Schlesier et al., 2002).

In questo lavoro di dottorato, il test del DPPH è stato selezionato perché è uno dei più accurati e sensibili, largamente impiegato per caratterizzare il potenziale antiossidante di materiali vegetali e dei loro estratti (Buenger et al., 2006). Tale metodo valuta la capacità di un campione di agire da scavenging nei confronti del radicale stabile cromogeno DPPH (la cui presenza, sotto forma radicalica, colora di blu la miscela di reazione), seguendone la scomparsa attraverso la valutazione della diminuzione di assorbanza nella zona di massimo assorbimento (515 nm).

Il secondo metodo selezionato valuta la capacità di *scavenging* di un antiossidante nei confronti dei radicali liberi perossidici, generati dall'ossidazione dell'acido linoleico accelerata con AAPH. E' un metodo utile e affidabile per valutare l'efficienza di un antiossidante (Liegiois et al., 2000), in quanto i radicali perossidici sono le forme radicaliche predominanti che si formano nel corso dell'ossidazione dei lipidi, sia in matrici alimentari che nei sistemi biologici.

4.1.2.1 ATTIVITA' ANTIRADICALICA (TEST DPPH)

I valori di IC_{50} (concentrazione del campione necessaria dimezzare il 50% di radicale DPPH) sono riportati in **Tabella 7**. Il valore di IC_{50} è stato espresso sia in μg di estratto grezzo/mg di DPPH, indicativo del potere antiradicalico posseduto dalla massa di estratto grezzo, sia in μg di AGE/mg di DPPH, che fornisce un'indicazione sul potere antiossidante della massa fenolica contenuta negli estratti. Minore è il valore di IC_{50} e maggiore è l'efficacia antiossidante del campione testato.

Tutti gli estratti ottenuti dai sottoprodotti di nocciola hanno manifestato capacità *scavenging* nei confronti del radicale DPPH. Esprimendo i risultati di IC_{50} come μg di estratto/mg di DPPH, la più elevata attività antiradicalica si è avuta a carico degli estratti più ricchi in fenoli totali (estratto acetone nel caso di Pg e di Gn; estratto etanolo nel caso di Pn). Quando i valori di IC_{50} sono stati espressi come μg di AGE /mg di DPPH, le differenze tra i campioni Pg non sono risultate statisticamente significative ($p < 0.05$), suggerendo che i tre solventi impiegati hanno estratto composti fenolici aventi simile attività anti-DPPH. Per quanto concerne i campioni Gn e Pn, invece, i risultati hanno mostrato che il solvente che ha fornito sia la più alta concentrazione fenolica degli estratti, sia la migliore attività antiradicalica (miscela acetone per Gn e miscela etanolo per Pn) è stato in grado di solubilizzare composti fenolici con una attività

antiossidante lievemente più elevata. Infatti, la massa fenolica (espressa in AGE) richiesta dagli estratti acetonicici Gn ed etanolicci Pn per neutralizzare il 50 % dal radicale DPPH è risultata minore di quella richiesta dai corrispondenti estratti ottenuti con gli altri solventi.

Tabella 7. Attività antiradicalica (test DPPH) e antiperossidica (test AAPH) degli estratti ottenuti dai sottoprodotti di nocciola con diversi solventi.

Estratto ^d	Solv. ^e	Test DPPH (IC ₅₀) ^a		Test AAPH (V _{inib}) ^b	
		µg di estratto mg ⁻¹ DPPH	µg di AGE ^c mg ⁻¹ DPPH	min L mg ⁻¹ di estratto	min L mg ⁻¹ di AGE ^c
Gn	M80	2319 ± 51 a	131 ± 3.2 a	6.9 ± 0.1 a	115.9 ± 1.7 a
Gn	E80	2288 ± 47 a	136 ± 3.6 a	7.0 ± 0.1 a	115.1 ± 1.5 a
Gn	A80	1634 ± 36 b	118 ± 2.6 b	7.9 ± 0.2 b	113.1 ± 2.3 a
Pn	M80	141 ± 2.5 a	68 ± 1.2 a	33.3 ± 0.9 a	78.1 ± 1.7 a
Pn	E80	123 ± 2.0 b	62 ± 1.0 b	37.7 ± 0.6 b	77.9 ± 1.2 a
Pn	A80	143 ± 3.1 a	67 ± 1.4 a	36.8 ± 0.7 b	80.9 ± 1.6 a
Pg	M80	674 ± 12.9 a	66 ± 1.3 a	8.0 ± 0.1 a	80.1 ± 1.1 a
Pg	E80	370 ± 4.7 b	65 ± 0.8 a	13.8 ± 0.2 b	78.2 ± 0.9 a
Pg	A80	310 ± 4.9 c	64 ± 1.0 a	16.5 ± 0.2 c	80.0 ± 1.1 a
Trolox		151 ± 2.4		52.1 ± 0.9	
α-tocof.		307 ± 5.8		50.0 ± 1.1	
BHA		134 ± 2.7		99.4 ± 1.1	
BHT		195 ± 3.5		77.2 ± 1.4	

^aMinore IC₅₀, maggiore attività antiossidante. ^bMaggiore V_{inib}, maggiore attività antiossidante. ^cAcido Gallico Equivalenti. ^dGn, guscio; Pn, pellicola di nocciola intera; Pg, pellicola di nocciola granellata. ^eM80, metanolo 80%; E80, etanolo 80%; A80, acetone 80%.

Media ± d.s. (n ≥ 3). Lettere diverse all'interno di ogni gruppo di campioni identificano differenze significative (p ≤ 0.05).

In **Figura 28** i risultati del test DPPH eseguito sugli estratti possono essere visibilmente confrontati con quelli ottenuti analizzando gli antiossidanti puri di riferimento. Nella figura, l'attività antiossidante è riportata come efficienza antiradicalica (EA), che essendo l'inverso di IC₅₀ consente una lettura più immediata dei dati. Valori più elevati di EA indicano una superiore efficacia antiradicalica dei campioni. In **Figura 28 (1) e 28 (3)** l'EA è espressa in mg di DPPH per mg di estratto (o di antiossidante di riferimento); in **Figura 28 (2)** in mg di DPPH per mg di AGE presente negli estratti.

Appare evidente (**Figura 28 (1)**) la debole attività antiradicalica degli estratti di guscio rispetto a quelli pellicolari e, per quanto concerne il confronto tra questi ultimi, la superiore attività antiossidante dei campioni Pn rispetto ai Pg. I valori di EA degli estratti Pn (variabili da 7.1 a 8.1 mg di DPPH / mg di estratto crudo) sono risultati infatti almeno

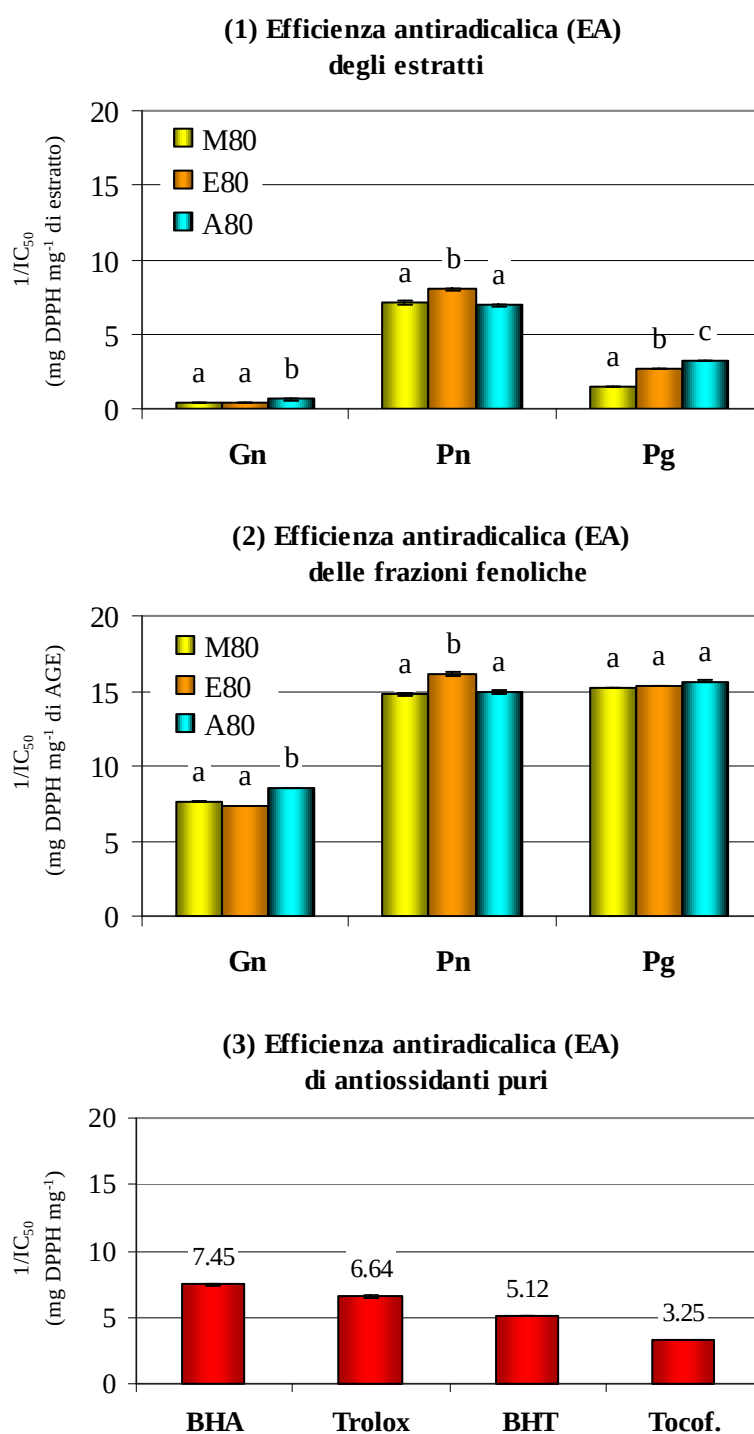
il doppio di quelli del migliore campione Pg (EA=3.2, estratto acetónico) e circa 12-13 volte più alti del migliore campione Gn (EA=0.6, estratto acetónico).

Quando l'efficienza antiradicalica è misurata in termini di unità di massa fenolica (**Figura 28 (2)**), emerge l'elevato potere antiossidante posseduto dai composti fenolici contenuti in Pn e Pg. Da notare che, nonostante la massa fenolica estratta da Gn abbia mostrato un potere antiossidante molto più basso rispetto a quello dei residui pellicolari, a confronto con gli standard di riferimento è apparsa molto attiva, in quanto la sua EA è risultata simile a quella del BHA e superiore a quella di tutti gli altri antiossidanti puri testati (**Figura 28(3)**). Evidentemente lo scarso potere antiossidante mostrato dagli estratti di guscio è dovuto alla debole purezza fenolica che ha caratterizzato questi estratti. Di converso, tutti i composti fenolici dei campioni ricavati dai sottoprodotti pellicolari si sono rivelati più efficaci degli antiossidanti di riferimento testati.

Il confronto con gli standard di riferimento può essere efficacemente valutato calcolando capacità antiossidante standard equivalente (CASE), che rappresenta la quantità (μg) di antiossidante di riferimento (BHA, BHT, Trolox e α -tocoferolo) avente la stessa efficienza antiradicalica (50% di DPPH *scavenging*) di un microgrammo di campione (**Tabella 7**). Valori di CASE vicini ad 1 indicano che, a parità di concentrazione in peso, l'attività antiradicalica del campione e dello standard di riferimento sono analoghe; tanto più il valore di CASE è superiore ad uno, tanto migliore è l'attività antiossidante del campione rispetto a quella dello standard, e viceversa.

E' evidente che nessuno degli estratti ricavati dai gusci ha mostrato un significativo potere antiossidante rispetto agli standard testati (CASE variabili da un minimo di 0.06 ad un massimo di 0.19). Al contrario, l'estratto Pg ottenuto con acetone ha esibito la stessa capacità antiradicalica dell' α -tocoferolo (che tra tutti gli standard ha fornito il più basso valore di EA) e circa la metà di quella del BHA, BHT e Trolox. Ancor più efficienti sono risultati i campioni Pn (in special modo l'estratto etanólico), che hanno mostrato una capacità antiossidante almeno pari a quella del BHA e del Trolox e nettamente superiore a quella del BHT e dell' α -tocoferolo. Tale risultato starebbe ad indicare che l'estratto crudo ottenuto dai sottoprodotti pellicolari di nocciola potrebbe essere utilizzato efficacemente senza ulteriore arricchimenti/purificazioni.

Figura 28. Efficienza antiradicalica (EA) degli estratti ottenuti dai sottoprodotti di nocciola con diversi solventi (1), della frazione fenolica contenuta negli estratti (2) e di antiossidanti puri di riferimento (3).



Lettere diverse all'interno dello stesso gruppo di campioni identificano differenze significative ($p \leq 0.05$).

Il confronto con gli antiossidanti di riferimento valutato sulla base dei fenoli totali degli estratti (espressi in AGE) piuttosto che sulla base della massa di estratto crudo ci consente di quantificare la capacità anti-DPPH della massa fenolica rispetto a quella dell'antiossidante di riferimento (**Tabella 8**). Tutti i campioni Gn hanno manifestato valori di CASE (espressi in μg di antiossidante / μg di AGE) ≥ 1 , mentre un microgrammo di fenoli contenuti negli estratti Pn ha esibito un'abilità antiradicalica equivalente a quella di circa 2 μg di BHA (o di Trolox), circa 3 μg di BHT e 4.5 μg di α -tocoferolo. I valori di CASE dei fenoli contenuti in Pg sono risultati simili a quelli ottenuti a carico di Pn. Tali risultati indicano che l'abilità antiradicalica della frazione fenolica estraibile dai sottoprodotti pellicolari di nocciola è eccellente, se comparata con quella dei più diffusi antiossidanti commerciali di sintesi (BHA, BHT) e naturali (α -tocoferolo). Queste considerazioni autorizzano ad ipotizzare che una eventuale purificazione degli estratti crudi pellicolari potrebbe portare ad ottenere antiossidanti fenolici naturali estremamente potenti.

I dati di attività antiradicalica (IC_{50}) ottenuti nell'ambito della presente ricerca non sono direttamente confrontabili con quelli riportati da Shahidi et al. (2007), i quali hanno studiato estratti fenolici di pellicole e gusci di nocciola ottenuti con etanolo-acqua 80 % a caldo. Tali Autori hanno infatti valutato l'attività anti-DPPH dei loro estratti e di un antiossidante di riferimento (catechina) testando solamente due concentrazioni (50 e 100 ppm), ottenendo quasi il 100% di attività *scavenging* sia per i sottoprodotti di nocciola, sia per la catechina di riferimento. Tali concentrazioni erano dunque troppo elevate per consentire un efficiente confronto, in quanto al di fuori del range di linearità del metodo (Villano et al., 2005). E' infatti consigliabile che la massima concentrazione di campione nella miscela di reazione non ecceda il 70% di attività *scavenging* nei confronti del DPPH (Buenger et al., 2006).

Tabella 8. Capacità antiossidante standard (BHA, BHT, Trolox e α -tocoferolo) equivalente degli estratti ottenuti dai sottoprodotti di nocciola, in relazione al solvente impiegato.

Estratto ^a	Solvente ^b	BHA		Trolox		BHT		α -Tocoferolo	
		$\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$ di estratto	$\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$ di AGE ^c	$\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$ di estratto	$\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$ di AGE ^c	$\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$ di estratto	$\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$ di AGE ^c	$\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$ di estratto	$\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$ di AGE ^c
Gn	M	0.06	1.03	0.06	1.15	0.08	1.50	0.13	2.35
Gn	E	0.06	0.99	0.07	1.10	0.09	1.43	0.13	2.25
Gn	A	0.08	1.14	0.09	1.28	0.12	1.66	0.19	2.61
Pn	M	0.95	1.98	1.07	2.22	1.38	2.88	2.18	4.54
Pn	E	1.09	2.17	1.22	2.43	1.58	3.15	2.49	4.96
Pn	A	0.94	2.01	1.05	2.26	1.36	2.92	2.15	4.60
Pg	M	0.20	2.04	0.22	2.29	0.29	2.97	0.46	4.67
Pg	E	0.36	2.06	0.41	2.31	0.53	2.99	0.83	4.71
Pg	A	0.43	2.10	0.49	2.36	0.63	3.05	0.99	4.81

^aGn, guscio; Pn, pellicola di nocciola intera; Pg, pellicola di nocciola granellata. ^bM80, metanolo 80%; E80, etanolo 80%; A80, acetone 80%. ^cAcido Gallico Equivalenti. Media $\pm$ d.s. (n $\geq$ 3). Lettere diverse all'interno di ogni gruppo di campioni identificano differenze significative (p $\leq$ 0.05).

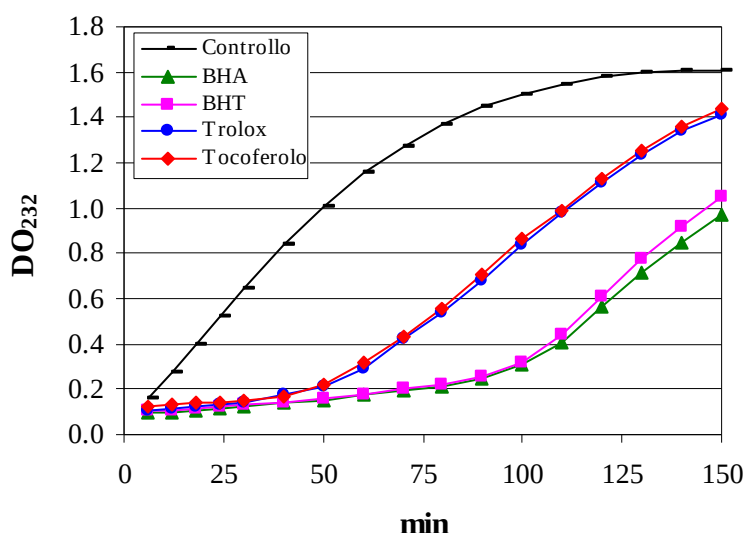
4.1.2.2 EFFICIENZA ANTIPEROSSIDICA

Il saggio valuta l'attività chain-breaking di un antiossidante nei confronti dell'ossidazione dell'acido linoleico accelerata con AAPH. Il metodo consente di quantificare in maniera dinamica la diminuzione dei dieni coniugati (che assorbono a 232 nm) in presenza di un antiossidante in grado di neutralizzare i radicali perossidici di neo-formazione.

In **Figura 29** sono visibili le curve registrate a carico degli antiossidanti di riferimento (BHA, BHT, Trolox e α -tocoferolo), mentre in **Figura 30** si possono osservare, a titolo di esempio, le curve ottenute utilizzando gli estratti etanoliche ricavati dai tre sottoprodotti di nocciola oggetto di studio.

In **Tabella 7** sono riportati i valori di velocità di inibizione (V_{inib}) ottenuti, espressi in min L mg^{-1} di estratto o di AGE (si rammenta che più alto è il valore di V_{inib} , maggiore è l'attività antiossidante manifestata dai campioni). Una visione immediata dei risultati si ha osservando la **Figura 31**.

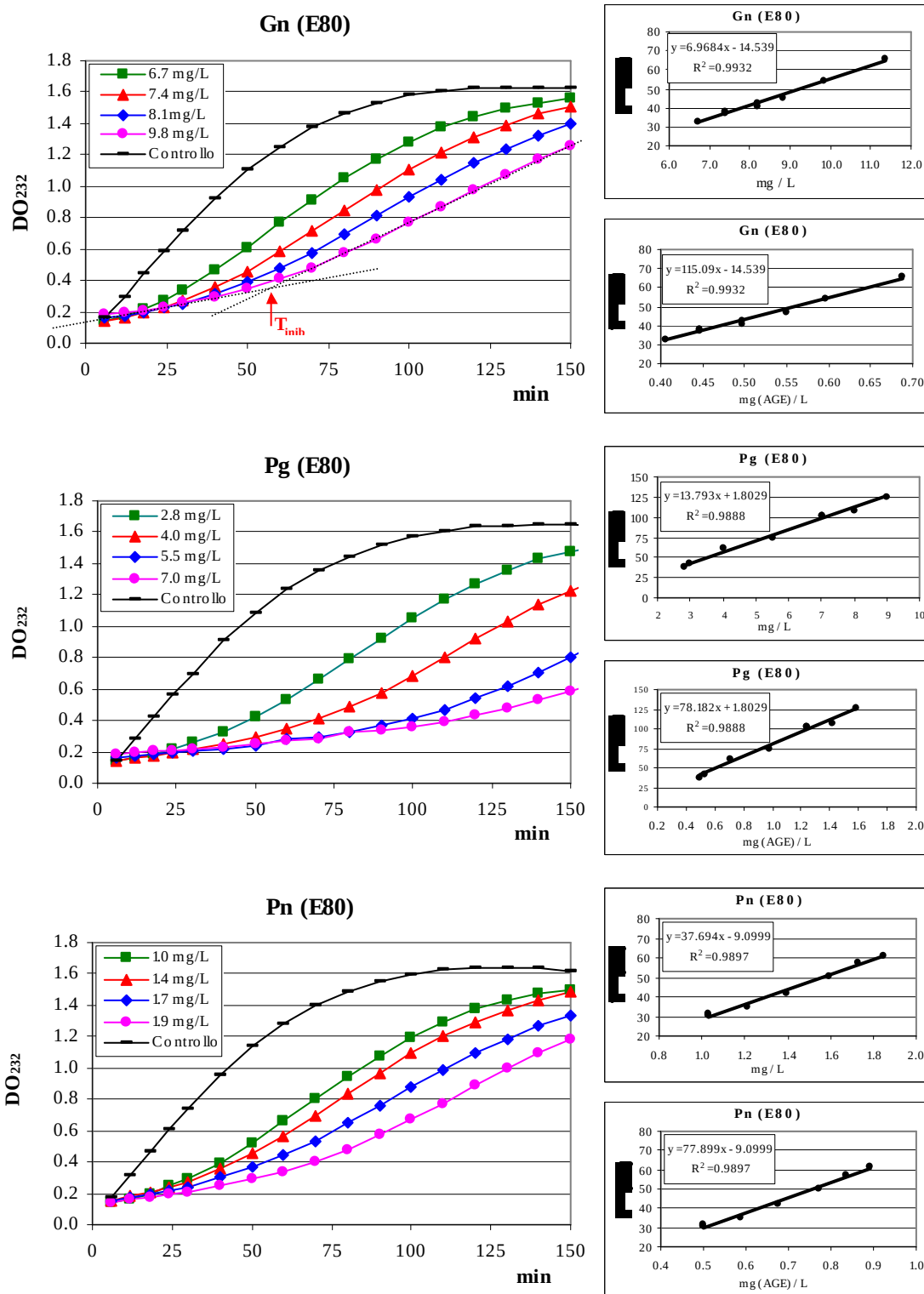
Figura 29. Curve di ossidazione dell'acido linoleico (test AAPH) in presenza di 1 mg/ml di BHA, BHT, Trolox e α -Tocoferolo.



L'analisi statistica ha evidenziato differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni testati, mettendo in risalto che l'attività antiperossidica (valutata in relazione alla massa di estratto aggiunta alla miscela di reazione) è risultata minima per Gn, intermedia per Pg e massima per Pn. Tali risultati sono in accordo con quelli rilevati da Shaihdi et al. (2007), che utilizzando il test β -carotene-acido linoleico hanno osservato un'attività dell'estratto pellicolare di nocciola migliore rispetto a quella dei gusci.

Per quanto riguarda le miscele solventi, in tutti i casi gli estratti metanolici sono risultati i meno attivi nel rallentare l'ossidazione dell'acido linoleico. I più efficienti estratti di Gn e Pg sono stati quelli ottenuti con la miscela acetonica, mentre nel caso di Pn gli estratti ricavati con acetone ed etanolo sono risultati egualmente efficienti e, in assoluto, i più attivi. Tali risultati, eccezion fatta per l'estratto acetone ed etanolo di Pg, sono in accordo con quelli precedentemente ottenuti utilizzando il DPPH-test. Si può tuttavia notare che, valutando l'attività antiossidante con il test AAPH, le differenze di attività tra i tre sottoprodotti (Gn, Pg e Pn) appaiono decisamente meno pronunciate rispetto a quelle messe in risalto dal test DPPH.

Figura 30. Curve di ossidazione dell'acido linoleico (test AAPH) in presenza di quantitativi crescenti di estratti fenolici, ottenuti dai sottoprodotti pellicolari di nocciola impiegando etanolo 80% come solvente.



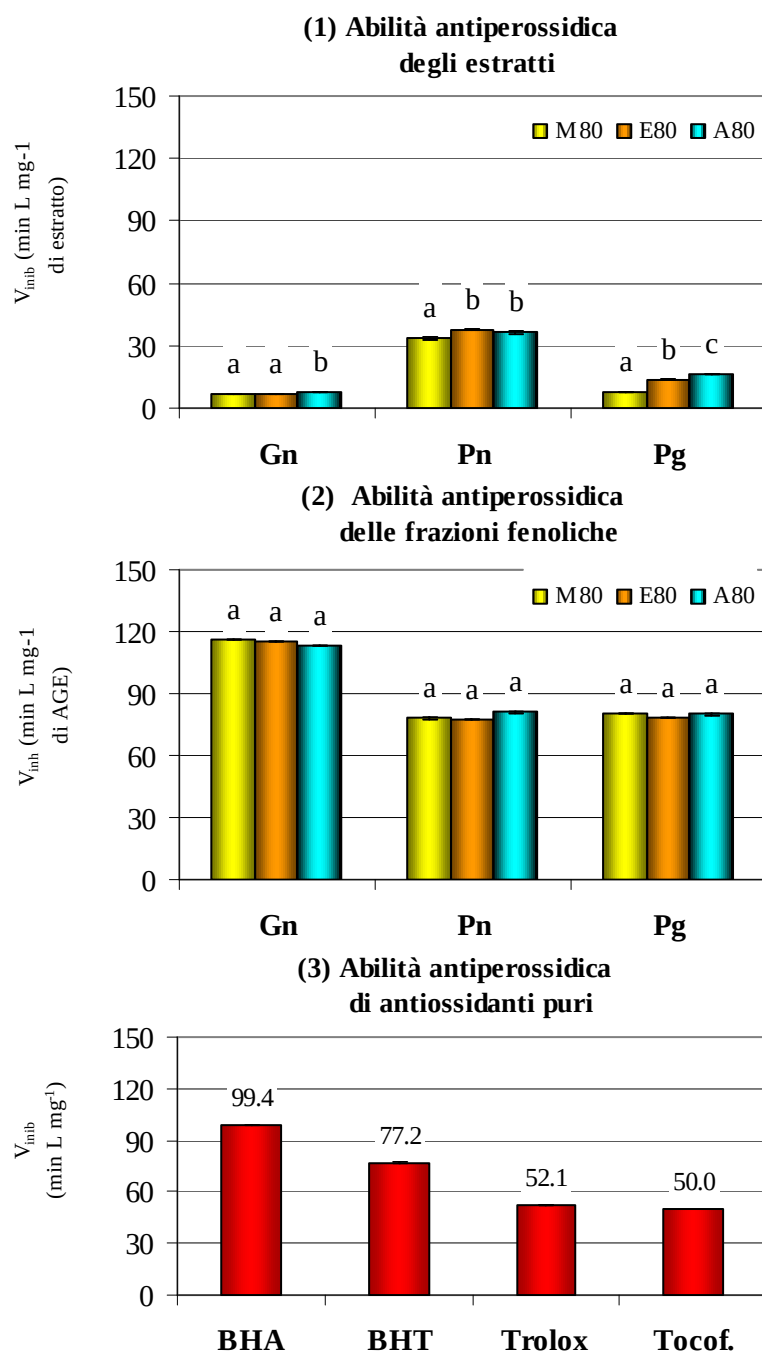
Non è stata evidenziata alcuna differenza significativa ($p < 0.5$) tra estratti della stessa natura esprimendo i risultati in min L mg^{-1} di AGE. Ciò starebbe ad indicare che, da un dato sottoprodotto di nocciola, le tre miscele solventi testate nell'ambito del presente studio sono state in grado di estrarre composti fenolici con analoghe proprietà antiperossidiche.

In confronto ai prodotti pellicolari e agli antiossidanti puri, gli estratti crudi Gn hanno rivelato una capacità antiperossidica molto limitata. Tale evidenza sembrerebbe legata alla scarsa concentrazione fenolica di questi estratti, in quanto esprimendo i risultati in min/mg L^{-1} di AGE, l'attività protettiva della frazione fenolica di Gn nei confronti della perossidazione dell'acido linoleico è risultata superiore a quella della componente fenolica di Pn e Pg e migliore di quella manifestata dagli antiossidanti puri testati. Da notare come, nel valutare l'attività antiradicalica con il test DPPH, si era ottenuto un risultato opposto, in quanto la frazione fenolica dei campioni Pg e Pn era risultata più attiva di quella dei campioni Gn.

Il confronto tra l'efficienza antiperossidica dei campioni e quella degli antiossidanti di riferimento è visibile graficamente in **Fig. 31**, dove si può notare come tutti gli estratti crudi, e in special modo i campioni Gn, abbiano manifestato un'attività inferiore rispetto a quella degli standard puri. Negli campioni ad attività antiperossidica più elevata (estratti Pn, ottenuti con etanolo o acetone) sono stati misurati valori di V_{inib} 1.3 e 1.4 volte minori di quelli rispettivamente dell' α -tocoferolo e del Trolox, ed oltre 2 volte più bassi di quelli del BHA.

Risultati diversi sono stati ottenuti esprimendo la velocità di inibizione sulla base della massa fenolica (min L mg^{-1} di AGE) anziché della massa di estratto (min L mg^{-1} di estratto). Osservando la **Fig. 31 (2) e (3)**, è evidente che i composti fenolici del guscio hanno manifestato un'attività protettiva nei confronti dell'acido linoleico più elevata di quella di tutti gli standard testati. Inoltre, anche se le frazioni fenoliche di Pg e Pn sono risultate meno attive di quelle di Gn, sono apparse comunque molto efficienti nel confronto con gli antiossidanti puri, risultando simili al BHT e migliori sia del Trolox che dell' α -tocoferolo.

Figura 31. Efficienza antiperossidica (test AAPH) degli estratti ottenuti dai sottoprodotti di nocciola (1), della frazione fenolica contenuta negli estratti (2) e di antiossidanti puri di riferimento (3).

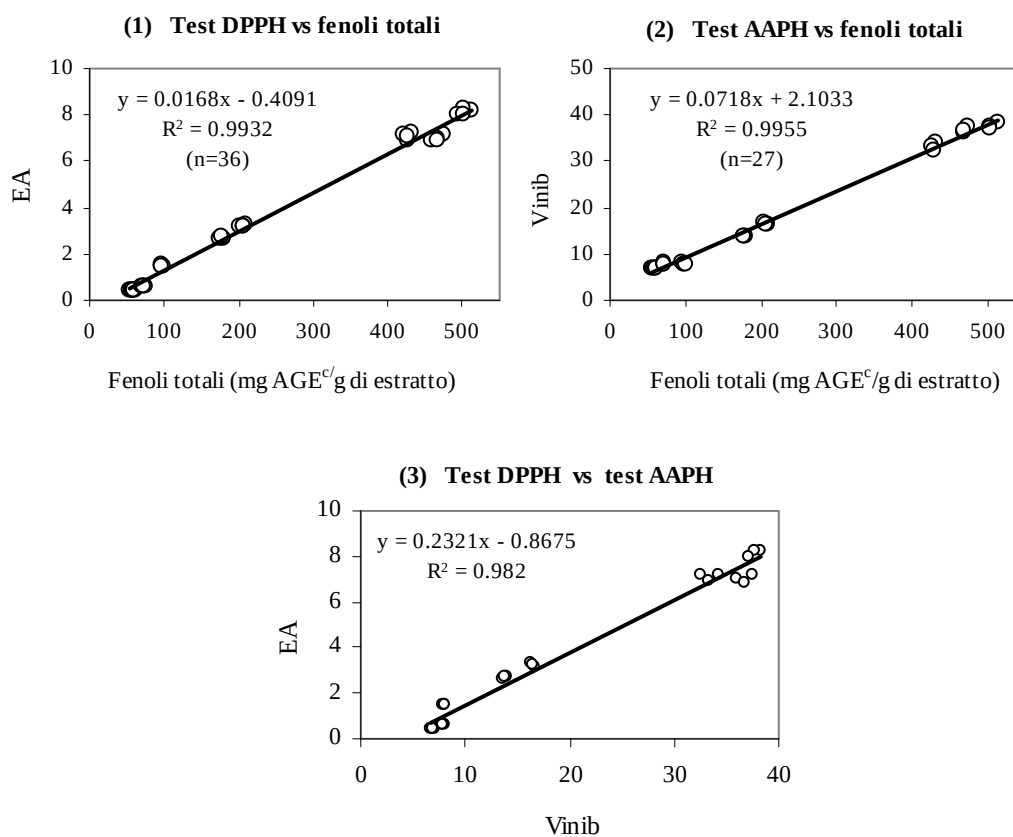


Lettere diverse all'interno dello stesso gruppo di campioni identificano differenze significative ($p \leq 0.05$).

4.1.3 CORRELAZIONI TRA FENOLI TOTALI ED ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

L'attività antiossidante degli estratti crudi di nocciola è risultata strettamente legata al contenuto fenolico. È stata rilevata infatti una correlazione positiva altamente significativa tra i parametri di attività antiossidante studiati e la concentrazione fenolica degli estratti (abilità antiradicalica vs contenuto fenolico: $r^2=0.993$; efficienza antiperossidica vs contenuto fenolico: $r^2 = 0.995$) (**Fig. 32**). Tali correlazioni indicano che l'attività antiossidante misurata è principalmente attribuibile ai composti fenolici presenti negli estratti, e che la determinazione del contenuto fenolico fornisce una buona stima dell'attività antiossidante degli estratti stessi.

Figura 32. Correlazioni tra fenoli totali e risultati dei test di attività antiossidante (efficienza antiradicalica (EA)^a vs fenoli totali, (1); abilità antiperossidica (V_{inib})^b vs fenoli totali, (2)) e relazione tra efficienza antiradicalica^a ed abilità antiperossidica^b (3).



^amg DPPH mg⁻¹ di estratto; ^bmin L mg⁻¹ di estratto; ^cacido gallico equivalenti.

Nella correlazione tra abilità antiradicalica e fenoli totali, l'intercetta con l'ascissa è maggiore di zero; questo significa che c'è un valore-soglia di contenuto fenolico (circa 24 mg AGE/g) sotto il quale non si osserva abilità antiradicalica. Al contrario, l'intercetta positiva con l'asse y rilevata nella correlazione tra efficienza antiperossidica e fenoli totali starebbe ad indicare che una porzione dell'attività antiossidante misurata è dovuta ad altre sostanze attive non-fenoliche. Fibra solubile e/o melanoidine formate durante la tostatura della nocciola potrebbero essere responsabili di tale attività. Simili risultati sono stati ottenuti da Llorac et al. (2003), analizzando la dipendenza dell'attività antiradicalica e antiperossidica con il contenuto fenolico di estratti ottenuti dai sottoprodotti del cavolfiore.

Quando i valori di EA sono stati plottati contro quelli di V_{inib} , è stata ottenuta una correlazione positiva ($r^2=0.982$) che segnala l'esistenza di una relazione diretta tra i due metodi analitici utilizzati in questa ricerca per valutare l'attività antiossidante degli estratti studiati.

4.1.4 SPETTRI UV DEGLI ESTRATTI

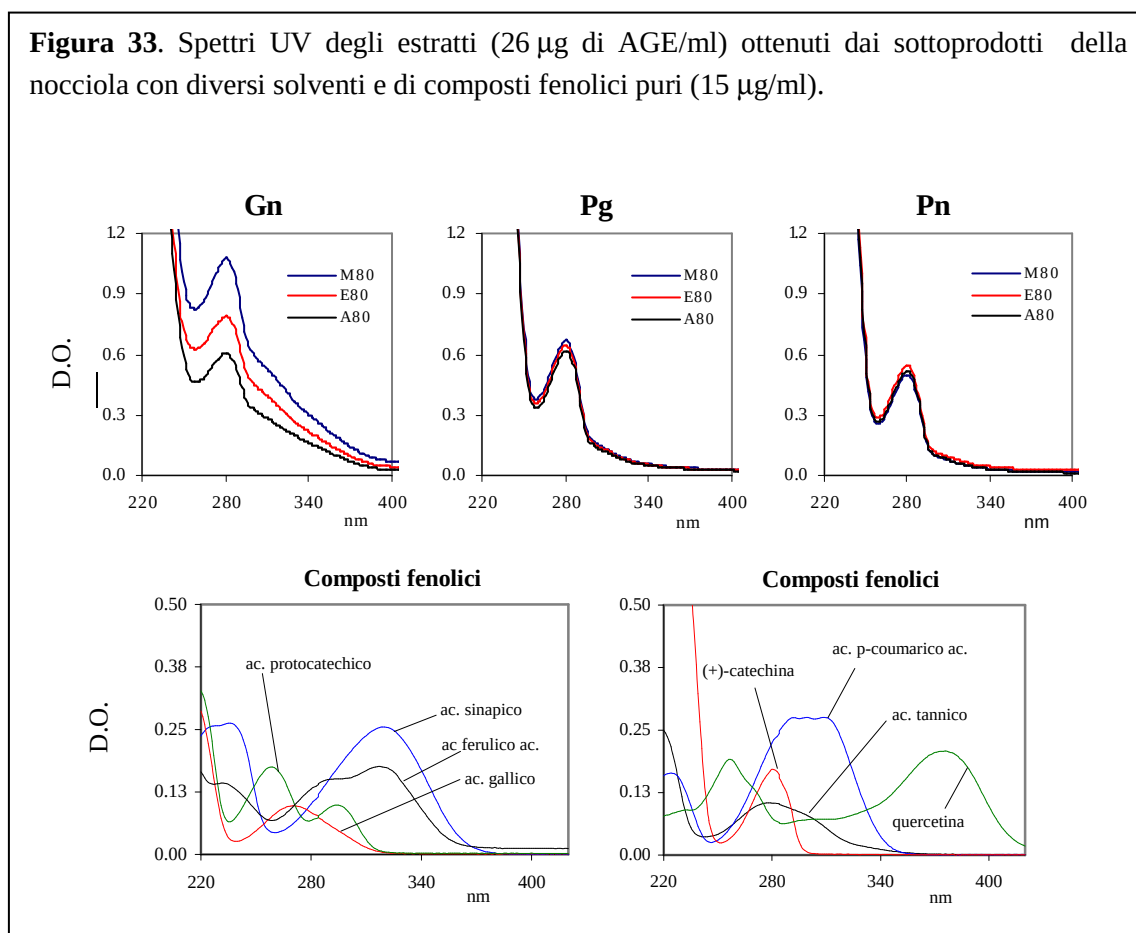
Per avere un'indicazione di massima circa la natura dei composti fenolici presenti negli estratti, ne sono stati registrati gli spettri UV a lunghezze d'onda comprese tra 220 e 400 nm. Come ci si poteva aspettare, il confronto tra campioni diluiti per lo stesso fattore di diluizione ha rivelato un basso assorbimento per Gn, medio per Pg ed elevato per Pn. I campioni sono stati allora portati tutti alla stessa concentrazione fenolica (26µg AGE/ml) e testati di nuovo. Gli spettri ottenuti sono visibili in **Fig. 33**.

Tutti gli estratti hanno mostrato un unico picco con un massimo a 280-281 nm. Spettri molto simili, caratterizzati dallo stesso massimo a 280 nm, sono stati ottenuti da Alasalvar et al. (2006) analizzando estratti fenolici ricavati dal seme di nocciola (provvisto di pericarpo), nonché a carico della frazione tannica di un estratto fenolico ricavato dalla mandorla, purificata mediante cromatografia su colonna Sephadex LH-20 (Amarowicz et al., 2005).

Alla stessa concentrazione fenolica, gli spettri di diversi campioni Pg, così come quelli dei campioni Pn, sono risultati quasi completamente sovrapponibili, indipendentemente dal solvente di estrazione. Al contrario, un progressivo aumento dell'assorbimento di fondo è stato osservato nei campioni Gn, ottenuti rispettivamente con acetone, etanolo e metanolo. L'assorbimento di fondo potrebbe essere dovuto alla

presenza di quantità crescenti di UV-assorbenti diversi dai composti fenolici, quali aminoacidi/peptidi contenenti anelli aromatici o prodotti dell'ossidazione lipidica. Un aumento progressivo dell'assorbimento di fondo è stato anche osservato paragonando i tre estratti di nocciola di diversa origine ($Gn > Pg > Pn$).

Figura 33. Spettri UV degli estratti (26 µg di AGE/ml) ottenuti dai sottoprodotti della nocciola con diversi solventi e di composti fenolici puri (15 µg/ml).



Eccezion fatta per qualche frammentaria informazione circa il profilo dei fenoli semplici (acidi fenolici e flavan-3-oli), a tutt'oggi si sa veramente poco sulla natura dei composti fenolici presenti nei gusci e nelle pellicole di nocciola. In **Fig. 33** si riportano gli spettri dei principali flavonoidi monomerici (catechina e quercetina) ed acidi fenolici (protocatechico, sinapico, gallico, p-cumarico e ferulico) rilevati da vari Autori nella nocciola e nei suoi sottoprodotti (Senter et al., 1983; Travaglia et al. (2005); Alasalvar et al., 2006; Shahidi et al., 2007). Tra tutti questi composti, soltanto l'acido gallico e la catechina hanno mostrato un unico picco con un massimo di assorbimento nei dintorni di 280 nm (277 e 280 nm, rispettivamente). Come è noto, acido gallico e catechina sono componenti, rispettivamente, dei tannini idrolizzabili (gallotannini) e condensati

(proantocianidine). L'acido gallico è stato identificato come il principale acido fenolico negli estratti idrolizzati di pellicola e guscio di nocciola (Shahidi et al., 2007). Lo spettro UV dell'acido tannico commerciale (**Fig. 33**) mostra anch'esso un massimo di assorbimento a 280 nm. L'assenza di una banda di assorbimento nei dintorni di 320 nm negli spettri denota che la concentrazione di acidi fenolici quali ferulico, p-cumarico e sinapico, se presenti, è comunque molto bassa.

Tali considerazioni lasciano supporre che gli estratti fenolici ottenuti dai sottoprodotti di nocciola siano caratterizzati dalla presenza di flavan-3-oli (catechine monometriche o polimeriche), nonché acido gallico libero e/o esterificato (gallotannini). In particolare la componente polimerica tannica (tannini condensati e/o idrolizzabili) potrebbe essere rappresentata ad elevati livelli.

4.1.5 QUANTIFICAZIONE DEI TANNINI

Per verificare l'ipotesi della presenza di componenti tanniche negli estratti, è stata condotta la determinazione dei tannini precipitabili il polivinilpirrolidone insolubile (PVP), efficiente agente legante i tannini (Loomis et al., 1966; Makkar, 2000).

I risultati delle analisi hanno confermato la presenza di un elevato contenuto di tannini negli estratti fenolici ricavati dai residui di nocciola. Come ipotizzato anche da Shahidi et al. (2007), i tannini si sono rivelati la principale componente fenolica degli estratti ricavati sia dai gusci che dalle pellicole, rappresentando il 60-65% dei fenoli totali (**Tabella 9 e Figura 34**).

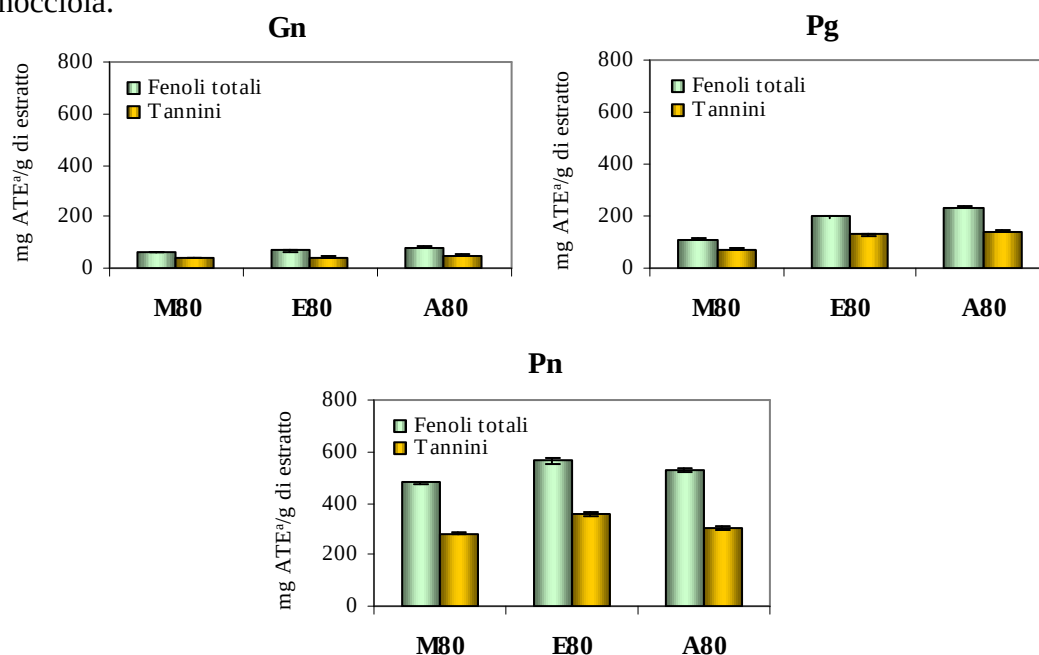
Tabella 9. Fenoli totali e Tannini Totali degli estratti ottenuti dai sottoprodotti della nocciola.

Estratto	Solvente	Fenoli totali (mg ATE ^a /g)	Tannini totali (mg ATE ^a /g)	Tannini / Fenoli tot
Gn	M80	63.6 ± 2.0 a	40.4 ± 1.5 a	0.64
Gn	E80	67.1 ± 1.1 a	42.0 ± 1.4 a	0.63
Gn	A80	81.2 ± 2.3 b	48.6 ± 1.3 b	0.60
Pn	M80	480.1 ± 5.2 a	283.5 ± 4.6 a	0.59
Pn	E80	565.3 ± 11.1 b	357.8 ± 9.7 b	0.63
Pn	A80	525.3 ± 8.7 c	304.3 ± 7.9 c	0.58
Pg	M80	110.0 ± 2.0 a	71.5 ± 2.3 a	0.65
Pg	E80	196.4 ± 2.4 b	127.5 ± 2.7 b	0.65
Pg	A80	232.0 ± 4.2 c	141.3 ± 2.4 c	0.61

^aAcido tannico equivalenti.

Media ± d.s. (n≥3). Lettere diverse all'interno di ogni gruppo di campioni identificano differenze significative (p≤0.05).

Figura 34. Fenoli totali e tannini totali negli estratti ottenuti dai sottoprodotti di nocciola.



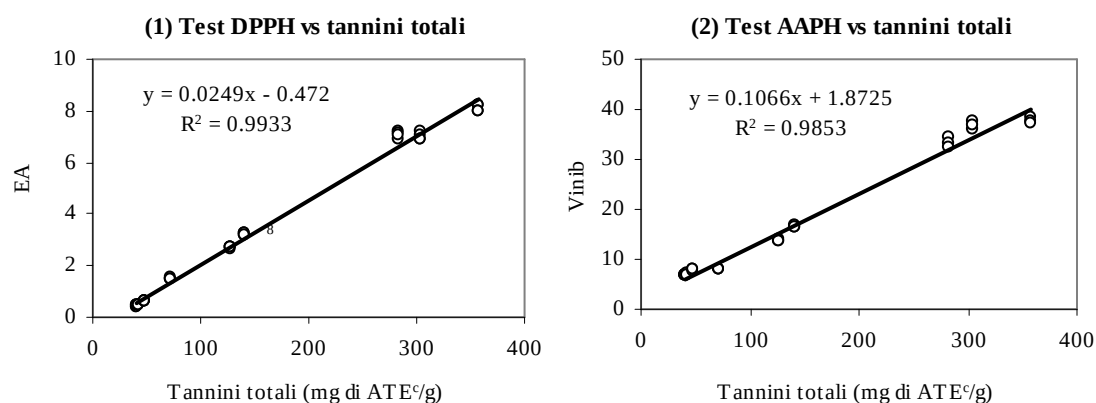
^aAcido tannico equivalenti.

In linea generale, la più alta quantità di tannini è stata trovata negli estratti con il più elevato contenuto in fenoli totali (ovvero: estratti etanolici di Pn; estratti acetonicici di Pg e Gn). Dunque, un'importante quota dell'attività antiossidante rilevata a carico dei campioni potrebbe essere legata alla presenza di questi composti polimerici. In effetti, l'analisi statistica ha evidenziato correlazioni positive altamente significative tra tannini totali e attività antiossidante (tannini vs DPPH-test, $r^2 = 0.993$; tannini vs AAPH-test, $r^2=0.985$ (**Fig. 35**)).

Storicamente i tannini sono considerati antinutrienti, ma il riconoscimento di nuove proprietà biologiche ha portato ad un ripensamento della comunità scientifica circa il ruolo che tali composti polifenolici potrebbero esercitare sulla salute umana. Le proprietà antiossidanti sia *in vitro* che *in vivo* delle proantocianidine sono ormai documentate (Bravo, 1998; Fine, 2000). E' stato rilevato che i tannini idrolizzati e condensabili sono antiossidanti più potenti delle forme monometriche e dei piccoli composti fenolici (Hagerman et al., 1998) e che potrebbero svolgere un ruolo unico nel metabolismo digestivo umano, sia come preservanti di altri antiossidanti biologici, sia come elementi protettivi di nutrienti (lipidi, proteine e carboidrati) dai danni ossidativi. Le proantocianidine hanno inoltre dimostrato di possedere attività anti-infiammatoria,

anti-allergica e vasodilatatoria (Fine, 2000). Altri effetti fisiologici riportati a carico dei tannini sono la capacità di accelerare i processi di coagulazione del sangue, ridurre la pressione sanguigna, diminuire i livelli di lipidi nel siero e modulare le risposte immunitarie (Chung et al., 1998). Molte molecole tanniche sono state riconosciute attive nei confronti di alcuni mutageni (Liviero et al., 1993); poiché la gran parte degli agenti cancerogenici e/o mutageni producono radicali liberi per interazione con le macromolecole cellulari, il potenziale anticancerogenico/antimutageno dei tannini si ritiene sia dovuto alle loro proprietà antiossidanti (Chung et al., 1998). La ben documentata attività dei tannini nei confronti di lieviti, batteri e virus potrebbe agire come meccanismo di difesa naturale contro le infezioni microbiche ed essere sfruttata per incrementare la shelf-life di alcuni alimenti (Chung et al., 1998). La ben documentata attività dei tannini nei confronti di lieviti, batteri e virus potrebbe agire come meccanismo di difesa naturale contro le infezioni microbiche ed essere sfruttata per incrementare la shelf-life di alcuni alimenti (Chung et al., 1998).

Figura 35. Correlazioni tra fenoli totali e tannini totali: (1), efficienza antiradicalica (EA)^a vs tannini totali; (2), abilità antiperossidica (V_{inib})^b vs tannini totali.



^amg DPPH mg⁻¹di estratto; ^bmin L mg⁻¹di estratto; ^cAcido tannico equivalenti.

4.2 I SOTTOPRODOTTI DELL'OLIVA

L'innovazione tecnologica nel campo dell'estrazione meccanica dell'olio vergine di oliva vede tra i punti più interessanti le fasi tecnologiche di frangitura e gramolatura sulle quali agire per migliorare la qualità salutistica e sensoriale dell'olio, aspetto strettamente connesso alla presenza di alcune classi di composti chimici come le sostanze fenoliche e i volatili (Servili et al., 2006). La particolare distribuzione delle attività enzimatiche endogene della drupa lascia intravedere la possibilità di attivare gli enzimi endogeni del frutto in forma differenziata, intervenendo selettivamente, in fase di frangitura, sulle varie parti costitutive del frutto. Si basa su questo concetto il processo di denocciolatura delle olive che, eliminando la mandorla, riduce l'attività perossidasi nelle paste e quindi limita l'ossidazione delle sostanze fenoliche dell'olio.

Da questa tecnologia emergente si ottengono come prodotti di scarto i noccioli di oliva (**Fig. 36**), che sono stati oggetto della presente ricerca previa separazione dell'endocarpo legnoso (El; **Fig.37 A**) dalla mandorla (Ma; **Fig 37 B**).



Figura 36. Noccioli di oliva (*Olea Europaea L.*)

Nel caso della mandorla si è resa necessaria una sgrassatura al Soxhlet con esano, preventiva all'estrazione per allontanare la cospicua frazione oleosa risultata pari al 17,5% in peso della mandorla t.q. (**Tab. 10**).

I solventi di estrazione impiegati sono stati Metanolo 80% (M80), Etanolo 80% (E80), Metanolo (M), Etanolo (E), ed Acetato di Etile (AE).



Figura 37. Endocarpo legnoso dell'oliva (**A**) e mandorla interna sgrassata e tritata (**B**)

Il contenuto in H₂O, determinato per differenza di peso prima e dopo liofilizzazione, è risultato pari al 37,5% per il seme ed al 17,0% per il guscio (**Tab. 10**).

Tabella 10. Tenori in acqua ed olio dei prodotti analizzati.

campione	H ₂ O %	olio %	Sost. liofilizzata sgrassata %
Seme t.q	37,49	17,47	45,04
Seme liofilizzato		27,94	72,06
Guscio t.q	17,01		

4.2.1 RESE DI ESTRAZIONE E FENOLI SOLUBILI

In **Tabella 11** e **Figura 38** sono riportati i rendimenti di estrazione (espressi come percentuale in sostanza secca); in **Tabella 11** e **Figura 39** sono visibili i risultati ottenuti riguardo i fenoli estraibili ed i contenuti fenolici degli estratti. I dati si riferiscono al campione t.q. nel caso dell'endocarpo legnoso (El) ed al campione sgrassato nel caso della mandorla (Ma).

Per quanto concerne la mandorla, il solvente che ha consentito il maggiore recupero in solidi solubili è stato il metanolo (33.3 g di estratto grezzo/100 g di sottoprodotto); le miscele di tipo idro-alcologico, quali metanolo 80% ed etanolo 80% hanno estratto quantitativi di solidi solubili leggermente più bassi (circa il 30g/100g), non significativamente differenti tra loro. Risultati inferiori in termini di resa hanno dato l'etanolo (E) e, soprattutto, l'acetato di etile (AE), la cui capacità estrattiva è risultata di gran lunga la meno efficiente (11.6 g di estratto grezzo/100 g di campione).

Nel caso dell'endocarpo legnoso (El), non si è ottenuta una significativa differenza in termini di resa di estrazione fra quattro dei cinque solventi testati (M, M80, E80 ed AE), che hanno fornito quantitativi di estratto grezzo compresi tra 3.6 e 3.9 g/100 g di campione. Leggermente inferiore, ma non significativamente diversa da quella dell'AE, è risultata la capacità estrattiva dell'EtOH (resa in estratto: 2.7%).

Tabella 11. Solidi Solubili totali (SS), Fenoli Solubili totali (FS) e Fenoli Totali dell'estratto (FT), ottenuti dai sottoprodotti dell'oliva in relazione al solvente impiegato.

Campione ^a	Solvente ^b	SS (g/100g)	FS (mg AGE ^c /g)	FT (mg AGE ^c /g)
Ma	M80	29.9±0.17 b	13.5±0.47 a	45.3±1.3 a
Ma	E80	29.5±0.55 b	13.4±0.32 a	45.4±0.2 a
Ma	M	33.3±0.50 a	12.5±0.15 a	37.7±1.0 b
Ma	E	25.3±0.03 c	8.0±0.08 b	31.7±0.3 c
Ma	AE	11.6±0.37 d	1.4±0.05 c	12.0±0.8 d
El	M80	3.7±0.16 a	3.1±0.03 a	83.4±2.5 a
El	E80	3.9±0.08 a	3.0±0.07 a	79.3±1.8 a
El	M	3.9±0.01 a	3.1±0.26 a	81.6±2.6 a
El	E	2.7±0.26 b	1.9±0.16 b	68.2±0.8 b
El	AE	3.6±0.28 ab	0.4±0.02 c	13.0±0.1 c

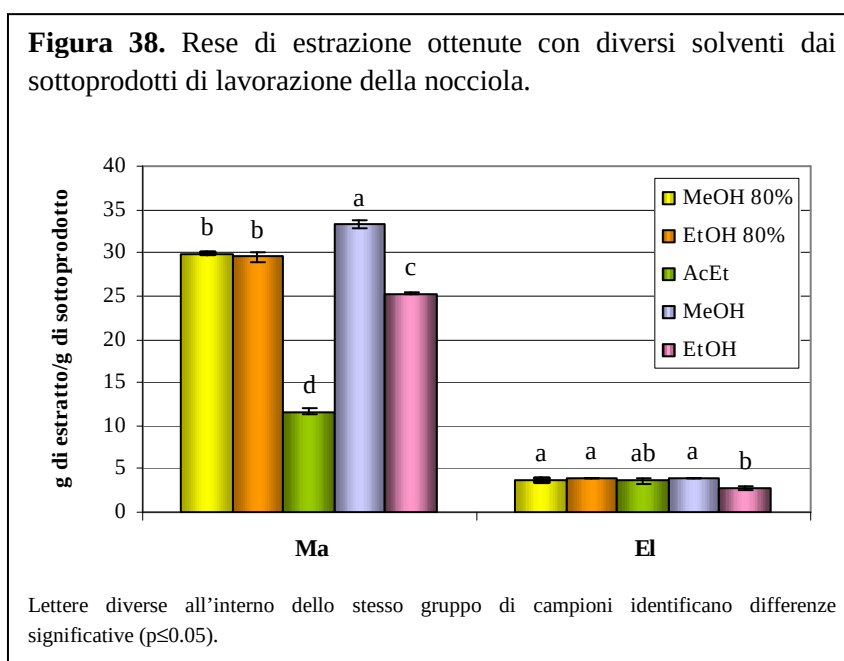
^aMa, sgrassato e liofilizzato; El, liofilizzato. ^bM80, Metanolo 80%; E80, Etanolo 80%; M, Metanolo; E, Etanolo; AE, Acetato di Etile. ^cAcido Gallico Equivalenti.

Media ± d.s. (n≥3). Lettere diverse all'interno di ogni gruppo di campioni identificano differenze significative (p≤0.05).

Per quanto riguarda la capacità estrattiva nei confronti dei fenoli, sul campione Ma il maggior recupero di composti fenolici si è ottenuto utilizzando M80, E80 e M (fenoli solubilizzati: circa l'1.35% del campione secco). Particolarmente inefficiente è risultato l'acetato di etile, che ha estratto quantitativi fenolici circa 10 volte inferiori. Un

risultato analogo è stato ottenuto con i gusci, anche se il contenuto fenolico del campione originario è risultato molto più modesto (circa lo 0,3%).

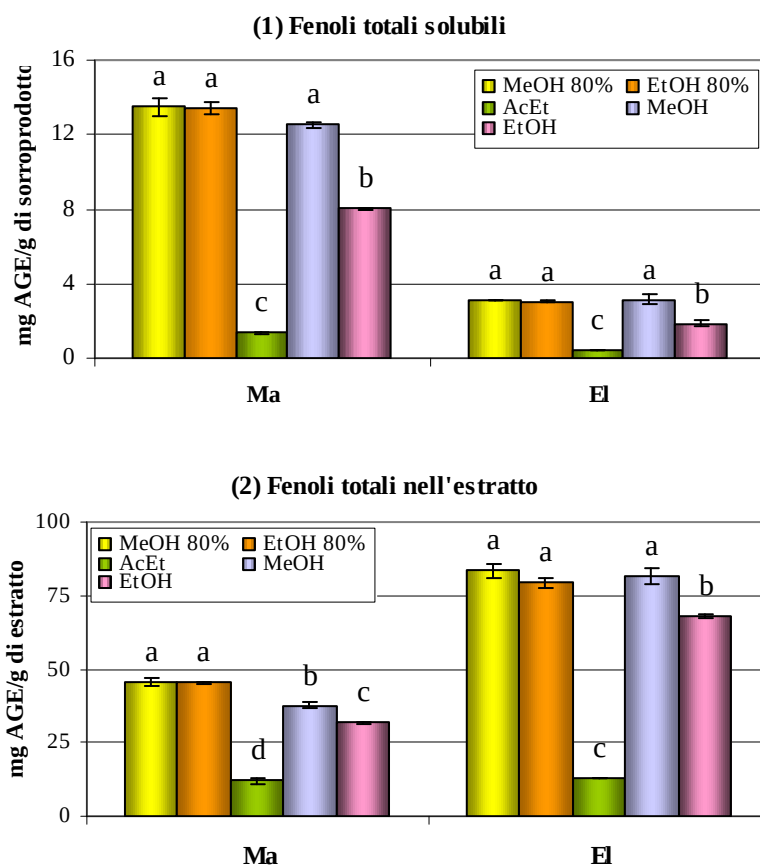
In termini di concentrazione fenolica degli estratti, i solventi più efficienti sul campione di endocarpo sono risultati M80, E80 e M, che hanno fornito estratti grezzi contenenti circa 80 mg di AGE per grammo di estratto. Nel caso di Ma, invece, gli estratti con maggior contenuto fenolico (circa 45 mg di AGE per grammo di estratto grezzo) sono stati ottenuti con le due miscele idroalcoliche (E80 e M80); gli altri solventi hanno fornito quantitativi significativamente inferiori, pari circa 37 mg di AGE/g nel caso del metanolo, 31 mg per l'etanolo e 13 mg per l'acetato di etile.



Dai dati ottenuti si evince che, nonostante il seme di oliva è risultato possedere un contenuto fenolico almeno 4 volte superiore a quello del guscio, gli estratti ottenibili dai gusci nelle condizioni adottate sono risultati circa il doppio più concentrati in composti fenolici.

Come solvente, sulla mandorla di oliva potrebbe essere impiegato indifferentemente metanolo o etanolo all'80%, che hanno fornito le massime rese in estratto e la massima concentrazione fenolica degli estratti; sull'endocarpo si potrebbe utilizzare, in alternativa ai succitati solventi, anche il metanolo puro. Non è assolutamente consigliabile, sia per la mandorla che per l'endocarpo di oliva, utilizzare acetato di etile.

Figura 39. Fenoli totali solubilizzati dai sottoprodotti dell'oliva in relazione al solvente impiegato (1) e fenoli totali nei corrispondenti estratti (2).



Lettere diverse all'interno dello stesso gruppo di campioni identificano differenze significative ($p \leq 0.05$).

4.2.2 ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

4.2.2.1 ATTIVITA' ANTIRADICALICA (TEST DPPH)

I risultati del test DPPH sono visibili in **Tabella 12** e **Figura 40**, in cui i dati sono espressi in IC_{50} (μg di estratto o di AGE / mg di DPPH). Si ricorda che maggiore è il valore di IC_{50} , minore è l'attività antiossidante.

Tutti gli estratti ottenuti hanno manifestato attività *scavenging* nei confronti del radicale stabile DPPH, che tuttavia è risultata nettamente inferiore rispetto a quella degli antiossidanti puri testati.

Tabella 12. Attività antiradicalica (test DPPH) e antiperossidica (test AAPH) degli estratti ottenuti dai sottoprodotti di oliva con diversi solventi.

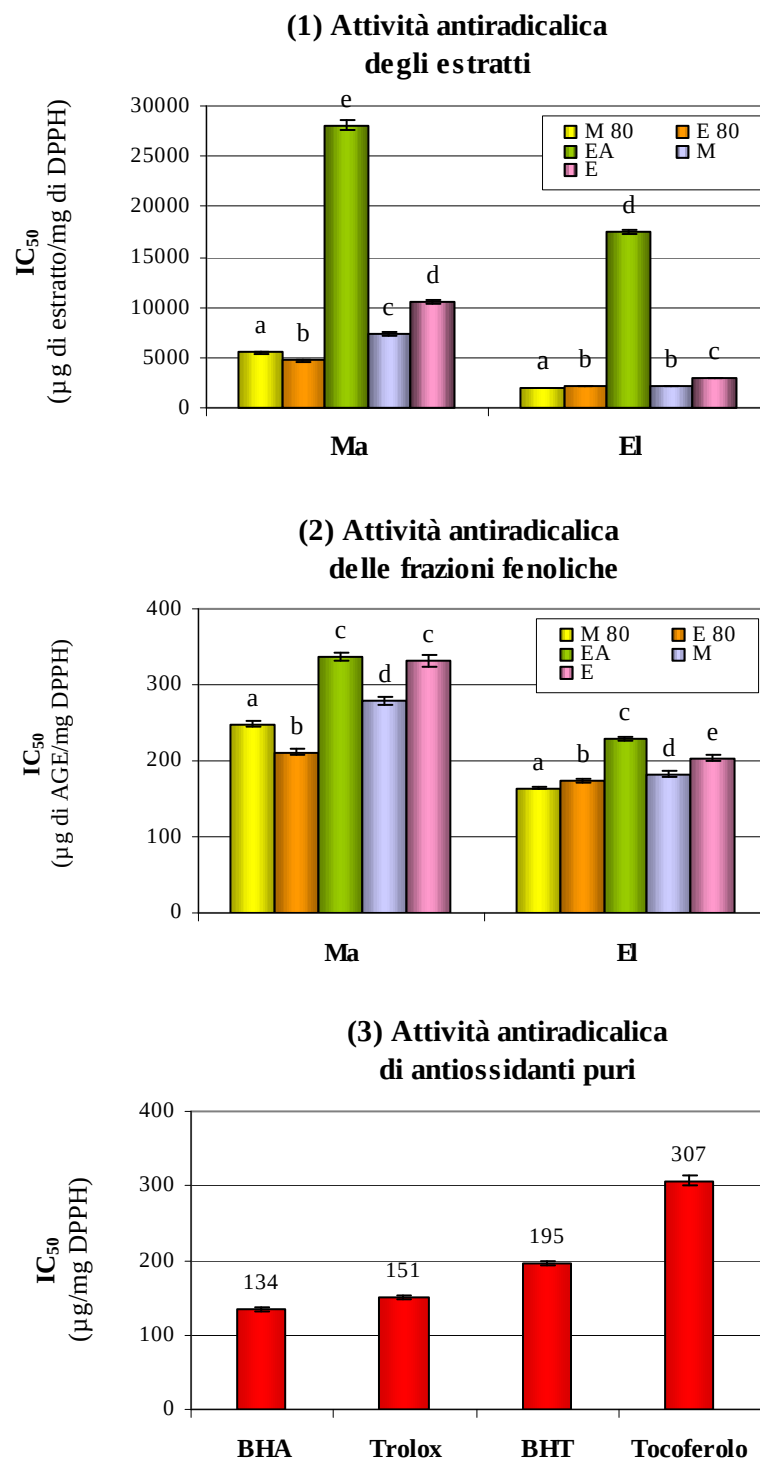
Estratto ^d	Solv. ^e	Test DPPH (IC ₅₀) ^a		Test AAPH (V _{inib}) ^b	
		µg di estratto mg ⁻¹ DPPH	µg di AGE ^c mg ⁻¹ DPPH	min L mg ⁻¹ di estratto	min L mg ⁻¹ di AGE ^c
Ma	M80	5473±107 a	248±3.8 a	1.35±0.03 a	29.8±0.7 a
Ma	E80	4670±89 b	212±3.4 b	1.33±0.03 a	29.2±0.1 a
Ma	M	7398±178 c	279±6.0 c	0.61±0.01 b	16.1±0.3 b
Ma	E	10467±229 d	332±7.3 d	0.51±0.01 c	16.2±0.4 b
Ma	AE	28103±41.5 e	337±5.0 d	n.d.	n.d.
El	M80	1963±25 a	164±1.8 a	11.30±0.22 a	131.8±2.6a
El	E80	2200±39 b	174±2.9 b	10.70±0.23 b	131.7±2.8a
El	M	2242±41 b	183±4.0 c	8.31±0.16 c	103.7±1.9b
El	E	2989±57 c	204±3.8 d	6.26±0.15 d	91.7±2.2c
El	AE	17564±21.2 d	229±2.7 e	n.d.	n.d.
Trolox		151 ± 2.4		52.1 ± 0.9	
α-tocof.		307 ± 5.8		50.0 ± 1.1	
BHA		134 ± 2.7		99.4 ± 1.1	
BHT		195 ± 3.5		77.2 ± 1.4	

^aMinore IC₅₀, maggiore attività antiossidante. ^bMaggiore V_{inib}, maggiore attività antiossidante. ^cAcido Gallico Equivalenti. ^dMa, sgrassato e liofilizzato; El, liofilizzato. ^eM80, Metanolo 80%; E80, Etanolo 80%; M, Metanolo; E, Etanolo; AE, Acetato di Etile. Media ± d.s. (n ≥ 3). Lettere diverse all'interno di ogni gruppo di campioni identificano differenze significative (p ≤ 0.05).

Per quel che riguarda gli estratti Ma, la migliore attività antiradicalica si è avuta adoperando come solvente E80 (IC₅₀: 4670 µg di estratto grezzo/mg di DPPH); lievemente inferiore è risultata la capacità antiossidante dell'estratto ottenuto con M80 (IC₅₀: 5473 mg/mg DPPH). Gli estratti ricavati con E ed M hanno manifestato attività antiradicalica nettamente più bassa, mentre l'attività antiossidante degli estratti ottenuti con AE è stata particolarmente modesta, di gran lunga inferiore a quella degli estratti ottenuti con gli altri solventi.

L'attività antiradicalica in assoluto più elevata, per quel che riguarda l'endocarpo, è risultata posseduta dagli estratti ottenuti con M80 (IC₅₀ pari a quasi 2 mg di estratto grezzo/mg di DPPH); E80 ed M hanno fornito estratti con un'attività leggermente inferiore ed equivalente (IC₅₀ = 2.2 mg di estratto/mg di DPPH).

Figura 40. Attività antiradicalica (IC_{50}) degli estratti ottenuti dai sottoprodotti di oliva (1), della frazione fenolica contenuta negli estratti (2) e di antiossidanti puri di riferimento (3).



Lettere diverse all'interno dello stesso gruppo di campioni identificano differenze significative ($p \leq 0.05$).

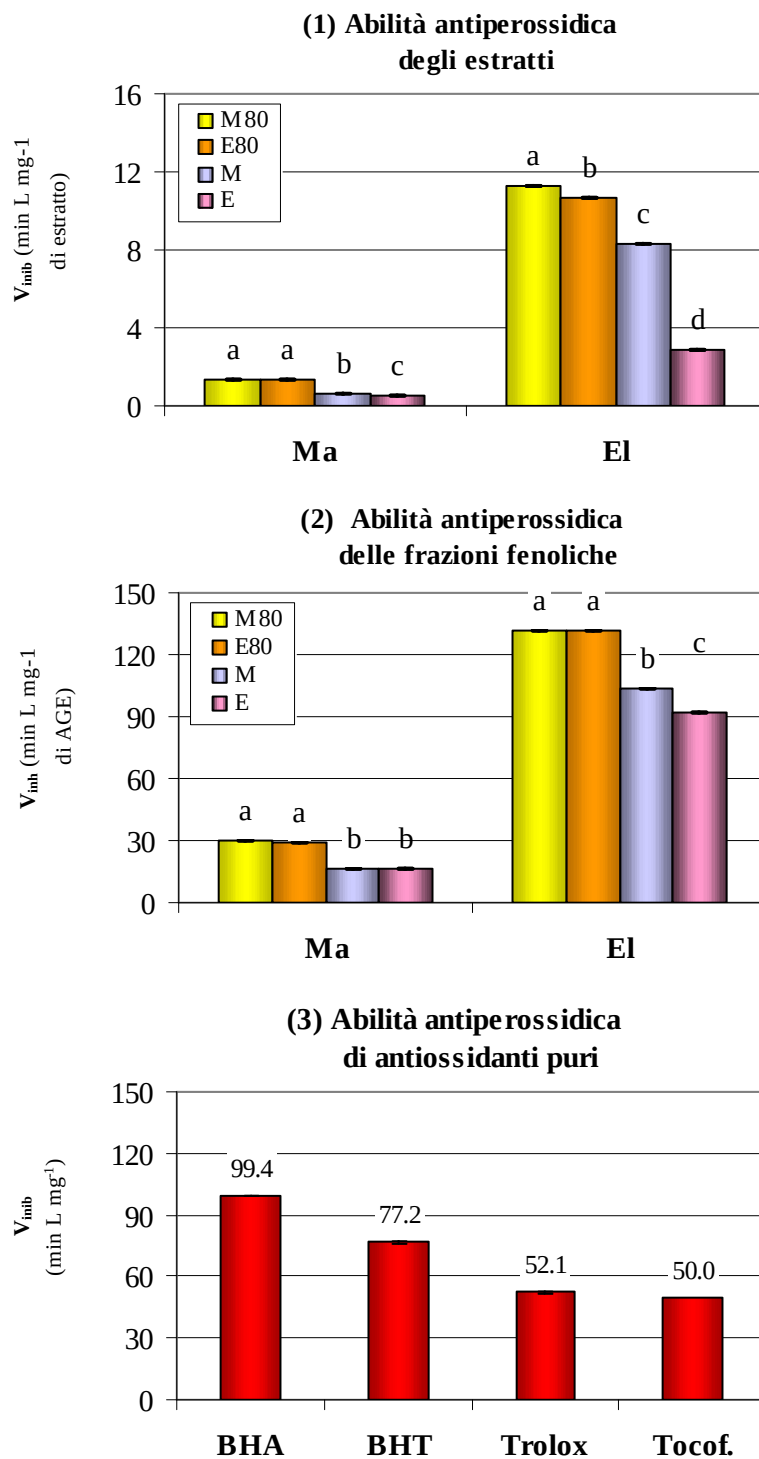
Anche se l'attività antiossidante degli estratti crudi ottenuti dai sottoprodotti di oliva si è rivelata nel complesso estremamente scarsa, l'efficienza dei composti fenolici in essi contenuti è apparsa discreta (**Fig. 40 (2)**). Infatti, i fenoli degli estratti crudi che hanno mostrato migliore attività antiossidante (per la mandorla, estratto ottenuto con E80; per l'endocarpo, estratto ricavato con M80), hanno rivelato una attività *scavenging* migliore di quella dell' α -tocoferolo e non molto dissimile rispetto a quella degli altri standard testati, come si può osservare dal confronto delle Figure **40 (2)** e **40(3)**.

4.2.2.2 EFFICIENZA ANTIPEROSSIDICA (TEST AAPH)

Tutti gli estratti grezzi ottenuti dalla mandorla di oliva hanno manifestato una attività protettiva verso l'ossidazione dell'acido linoleico molto debole, se confrontata con quella degli antiossidanti di riferimento testati (**Tab. 12**). Infatti, gli estratti grezzi Ma più efficienti, ottenuti con M80 ed E80, hanno mostrato un'attività antiperoossidica pari a circa 1/40 di quella del Trolox e dell' α -tocoferolo e circa 1/60-1/75 di quella, rispettivamente, del BHA e del BHT. Tale risultato è probabilmente legato alla notevole presenza di impurezze che ha caratterizzato in generale gli estratti di mandorla, tutti a concentrazione fenolica alquanto bassa.

L'attività antiperoossidica degli estratti ricavati dall'endocarpo dell'oliva, seppure scarsa, è risultata migliore di quella degli estratti di mandorla. I composti fenolici dell'endocarpo si sono rivelati particolarmente efficienti, manifestando un'attività antiossidante superiore a quella di tutti gli standard puri analizzati (velocità di inibizione: 1.3, 1.7, 2.5 e 2.6 volte superiore a quella, rispettivamente, del BHA, BHT, trolox e α -tocoferolo). Pertanto, la superiore attività antiperoossidica manifestata dagli estratti di endocarpo appare legata non solo alla superiore concentrazione fenolica, ma anche ad una maggiore capacità antiossidante della componente fenolica in essi contenuta.

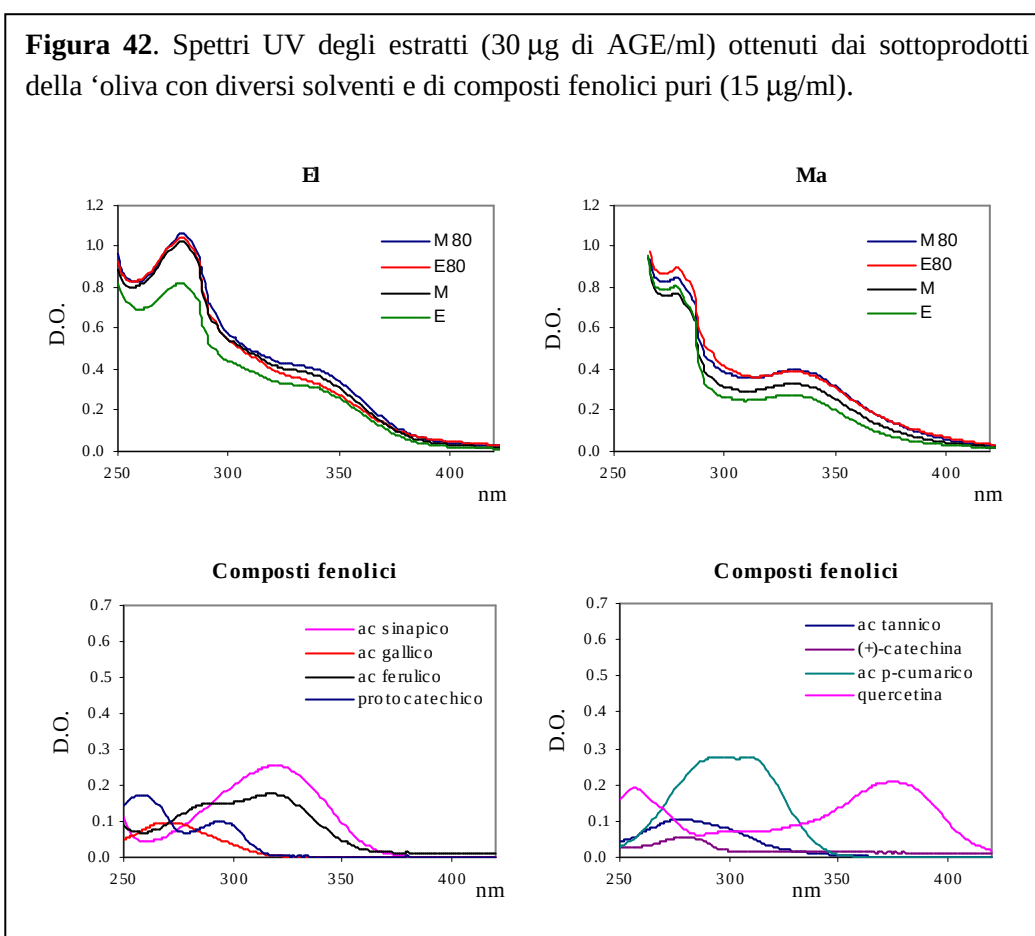
Figura 41. Efficienza antiperossidica (test AAPH) degli estratti ottenuti dai sottoprodotti di oliva (1), della frazione fenolica contenuta negli estratti (2) e di antiossidanti puri di riferimento (3).



Lettere diverse all'interno dello stesso gruppo di campioni identificano differenze significative ($p \leq 0.05$).

4.2.3 SPETTRI UV DEGLI ESTRATTI E TANNINI TOTALI

Come si può osservare in **Figura 42**, a parità di concentrazione fenolica (30 µg di AGE/ml) gli spettri UV degli estratti ottenuti dalla stessa materia prima con i diversi solventi sono risultati sostanzialmente simili. Tutti gli spettri hanno manifestato un picco nei dintorni di 279-280 nm (caratteristico delle funzioni fenoliche ed, in particolare, di quelle tanniche) ed una gobba vicino a 330-350 nm, in cui assorbono i derivati dell'acido cinnamico (quali ad esempio gli acidi p-cumarico, ferulico e sinapico (**Fig. 42**) e, tipicamente, i flavonoidi (Rice-Evans et al., 1995).



È stata rilevata una discreta presenza di composti tannici negli estratti di endocarpo (variabile, a seconda del solvente utilizzato, da 13 a 15 mg di ATE/g di estratto, pari al 16-21% dei fenoli totali). La componente tannica degli estratti ottenuti dalla mandorla è risultata modesta (1-2 mg di ATE/g di estratto, pari al 3-5% dei fenoli

totali). In **Tabella 13** si riportano i contenuti in tannici degli estratti ottenuti da entrambi i sottoprodotti, in relazione ai solventi utilizzati.

Tabella 13. Fenoli totali e Tannini Totali degli estratti ottenuti dai sottoprodotti dell'oliva.

Estratto	Solvente	Fenoli totali (mg ATE ^a /g)	Tannini totali (mg ATE ^a /g)	Tannini / Fenoli tot
Ma	M80	52.1 ± 1.5 a	2.3 ± 0.07 b	0.04
Ma	E80	51.2 ± 0.2 a	2.2 ± 0.07 c	0.04
Ma	M	41.6 ± 1.1 b	1.25 ± 0.05 a	0.03
Ma	E	35.4 ± 0.3 c	1.20 ± 0.04 c	0.03
El	M80	91.9 ± 2.8 a	13.0 ± 0.3 a	0.14
El	E80	90.7 ± 2.1 a	13.2 ± 0.4 a	0.15
El	M	93.9 ± 3.0 a	15.1 ± 0.5 b	0.16
El	E	76.2 ± 0.9 b	14.4 ± 0.3 a	0.19

^aAcido tannico equivalenti.

Media ± d.s. (n≥3). Lettere diverse all'interno di ogni gruppo di campioni identificano differenze significative (p≤0.05).

In sintesi, dalla sperimentazione condotta sui sottoprodotti dell'oliva è risultato quanto Segue:

- *Mandorla di oliva.* Le rese massime in estratto grezzo sono state di circa il 30%. Il contenuto fenolico degli estratti grezzi è risultato, nel migliore dei casi, intorno ai 45 mg di AGE/g. I solventi più adatti si sono dimostrati l'etanolo 80% ed il metanolo 80%, che pur dando rese di estrazione leggermente inferiori a quelle del metanolo puro, hanno fornito estratti grezzi con il più elevato patrimonio fenolico ed i migliori risultati in termini di attività antiossidante.
- *Endocarpo di oliva.* Le due miscele idroalcoliche (MeOH 80% e EtOH 80%) ed il metanolo puro, indifferentemente, hanno consentito di ottenere le rese più elevate (circa il 4 %) e gli estratti più ricchi di fenoli totali (80 mg di AGE/g). La miglior attività antiossidante, invece, è stata manifestata dagli estratti crudi ottenuti con Metanolo 80%. La componente fenolica dell'endocarpo è risultata possedere un'attività antiradicalica ed antiperossidica migliore rispetto a quella dei fenoli estraibili dalla mandorla.
- Il contenuto fenolico degli estratti grezzi ottenuti utilizzando i sottoprodotti di oliva è risultato in linea con quello rilevato in estratti di altri frutti e semi (Soong

e Barlow, 2002), che hanno manifestato anch'essi una debole attività antiossidante. Al fine di ricavare efficienti preparati ad attività antiossidante dalla mandorla e dall'endocarpo di oliva, sarebbe dunque necessario procedere ad ulteriori stadi di arricchimento e purificazione degli estratti ottenuti con solventi. Tuttavia, considerando le deboli rese di estrazione e la scarsa concentrazione fenolica degli estratti grezzi, tale evenienza appare a nostro avviso di scarso interesse commerciale.

4.3 ULTERIORI PROPRIETÀ E CARATTERISTICHE DELL'ESTRATTO PELLICOLARE DI NOCCIOLA OTTENUTO CON ETANOLO 80%.

La prima fase della ricerca ha dimostrato che i sottoprodotti pellicolari della nocciola sono stati in grado di fornire, con elevate rese, estratti fenolici eccezionalmente ricchi, dotati di ottima attività antiradicalica e buona attività antiperoossidica. È inoltre emerso che la notevole presenza di frammenti di endosperma nel sottoprodotto pellicolare ha portato ad estratti meno ricchi in fenoli totali e con una capacità antiossidante ridotta.

Per questi motivi, gli ulteriori studi finalizzati ad approfondire le proprietà e le caratteristiche degli estratti fenolici che avessero mostrato le migliori potenzialità applicative sono stati condotti sottoponendo ad estrazione con etanolo 80% i sottoprodotti pellicolari di provenienza dallo sbiancamento delle nocciole intere, effettuando preventivamente un'accurata rimozione manuale di tutti gli elementi estranei (costituiti, nello specifico, da minuti frammenti di endosperma rimossi dagli aspiratori industriali assieme al materiale di scarto).

Dopo alcuni tentativi, la tecnica di macerazione a temperatura ambiente è stata affinata e ridotta ad unico *step* di 20 ore, accorciando così notevolmente i tempi di ottenimento dell'estratto grezzo. Con questa nuova procedura, il quantitativo massimo di residuo pellicolare lavorato, ripulito dai frammenti di endosperma e sgrassato, ha raggiunto circa i 100 grammi. Come solvente è stato utilizzato etanolo acquoso all'80%, che fra tutti i solventi testati ha fornito i risultati migliori sia in termini di resa che di attività antiossidante degli estratti. In questo modo si è riusciti ad ottenere, con una resa di estrazione vicina al 32%, un estratto pellicolare di nocciola dal contenuto fenolico notevolmente più elevato (743,5 mg di AGE/g) rispetto a quello ottenuto nella prima fase dello studio (circa 500 mg di AGE/g) (**Tabella 14**).

Tabella 14. Caratteristiche principali del residuo pellicolare

Percentuale di olio nel residuo pellicolare (%)	10.3 ± 0.1
Resa di estrazione (% del campione sgrassato)	31.7 ± 0.7
Contenuto fenolico dell'estratto (mg AGE/g)	743.5 ± 7.8

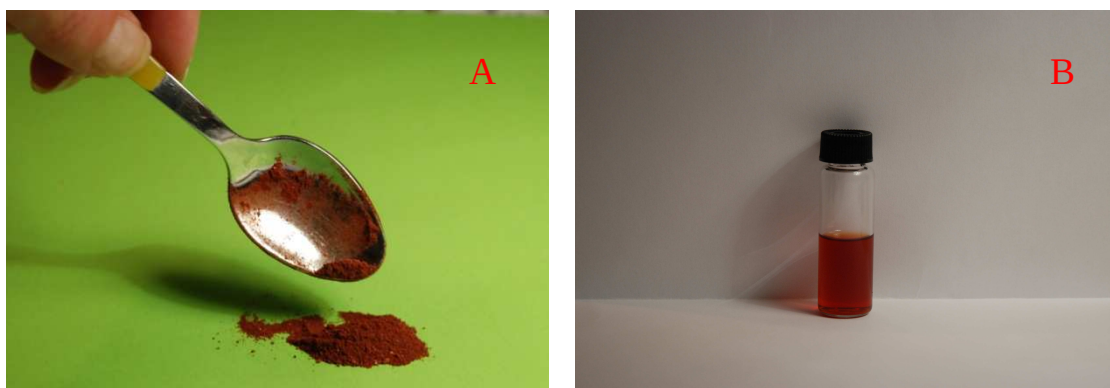


Figura 43. Estratto ottenuto dalle pellicole di nocciola: liofilizzato (**A**) e sciolto in etanolo (**B**).

4.3.1 POTERE RIDUCENTE

La valutazione della capacità di donare elettroni o atomi di idrogeno in una reazione di ossido-riduzione rappresenta un indicatore significativo della potenziale attività di un antiossidante, in quanto è legata alla possibilità di convertire i radicali liberi generati dalle reazioni ossidative in prodotti non reattivi (azione *chain-breaking*). Generalmente tutti i composti appartenenti alla classe dei flavonoidi vengono considerati degli ottimi riducenti (Cren et al., 2002).

Il potere riducente di un antiossidante puro o in miscela può essere misurato seguendo la riduzione diretta del complesso Fe^{+3} /ferricianuro alla forma ferrosa (Fe^{+2}). La successiva aggiunta di Fe^{+3} libero ai prodotti di reazione porta alla formazione di un intenso complesso blu, noto come “Perl’s Prussian Blue” ($\text{Fe}_4^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN}^-)]^3$) che può essere monitorato a 700 nm (Chung et al., 2002). Maggiori valori di assorbanza a della miscela di reazione indicano pertanto un maggior potere riducente.

Il test ha dimostrato che l’estratto pellicolare di nocciola è stato in grado di donare elettroni e, quindi di agire come riducente. In **Figura 44** sono riportati i grafici dei risultati ottenuti analizzando l’estratto pellicolare di nocciola e gli antiossidanti di riferimento (BHA, BHT, Trolox, α -Tocoferolo ed acido ascorbico).

In tutti i casi, i valori dell’assorbanza a 700 sono cresciuti linearmente con l’aumentare della concentrazione, ma il diverso valore dei coefficienti angolari (massimo per l’acido ascorbico, minimo per l’ α -tocoferolo) ha fatto sì che i risultati assumessero un significato leggermente differenziato a seconda della concentrazione, come osservato

anche da altri Autori (Bamdad et al., 2006). In **Figura 45** si riportano i valori del potere riducente alle concentrazioni rappresentative di 0.05, 0.10 e 0.15 mg/ml di estratto pellicolare di nocciola, posti a confronto con quelli ottenuti analizzando gli antiossidanti puri, a pari concentrazioni.

L'analisi statistica ha evidenziato come alla concentrazione più bassa (0.05 mg/ml) il potere riducente dell'estratto sia risultato equivalente a quello del BHA e dell'acido ascorbico. Gli altri standard hanno mostrato una minore capacità riducente (nell'ordine: BHT > Trolox > α -tocoferolo). Da notare come, a tale concentrazione, il potere riducente degli estratti di nocciola sia risultato oltre 3 volte superiore a quello dell' α -tocoferolo, che tra tutti i composti di riferimento ha manifestato la minore capacità di donare elettroni, nelle condizioni del saggio.

Figura 44. Potere riducente dell'estratto pellicolare di nocciola e degli antiossidanti di riferimento, in funzione della concentrazione.

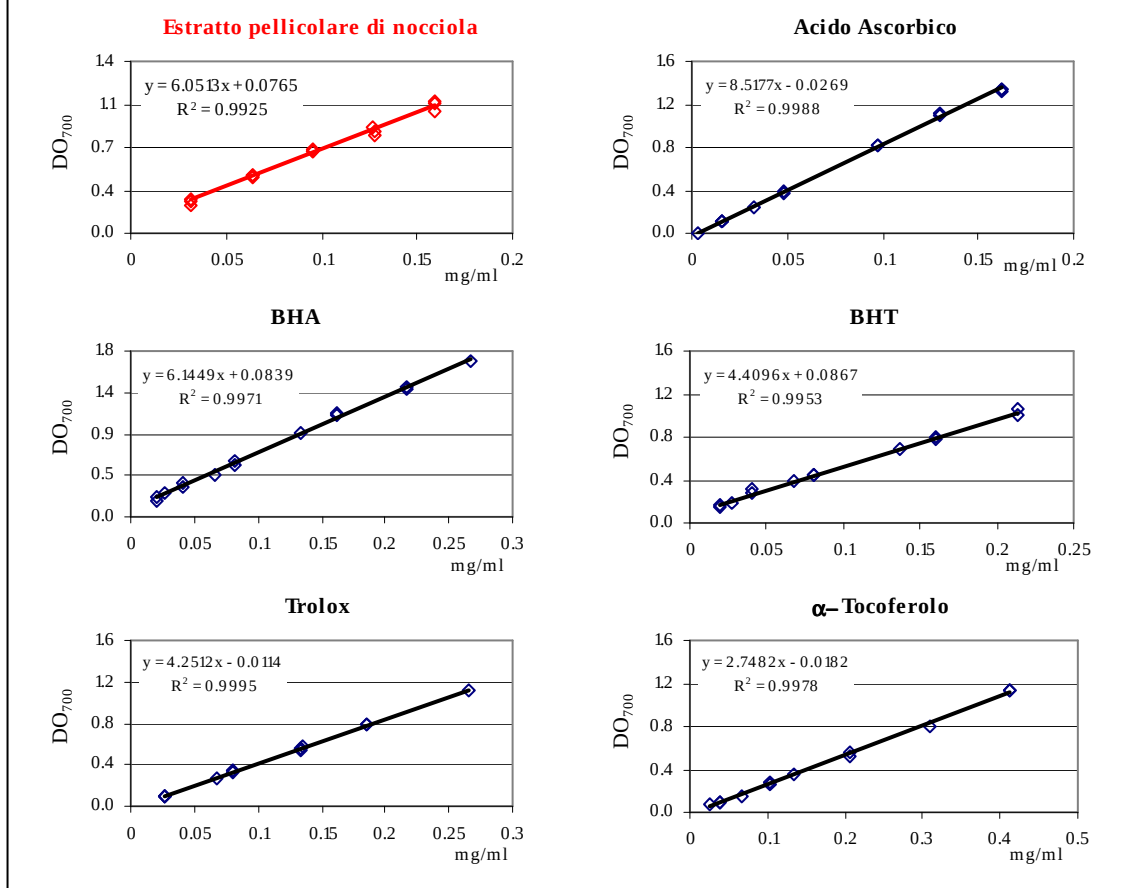
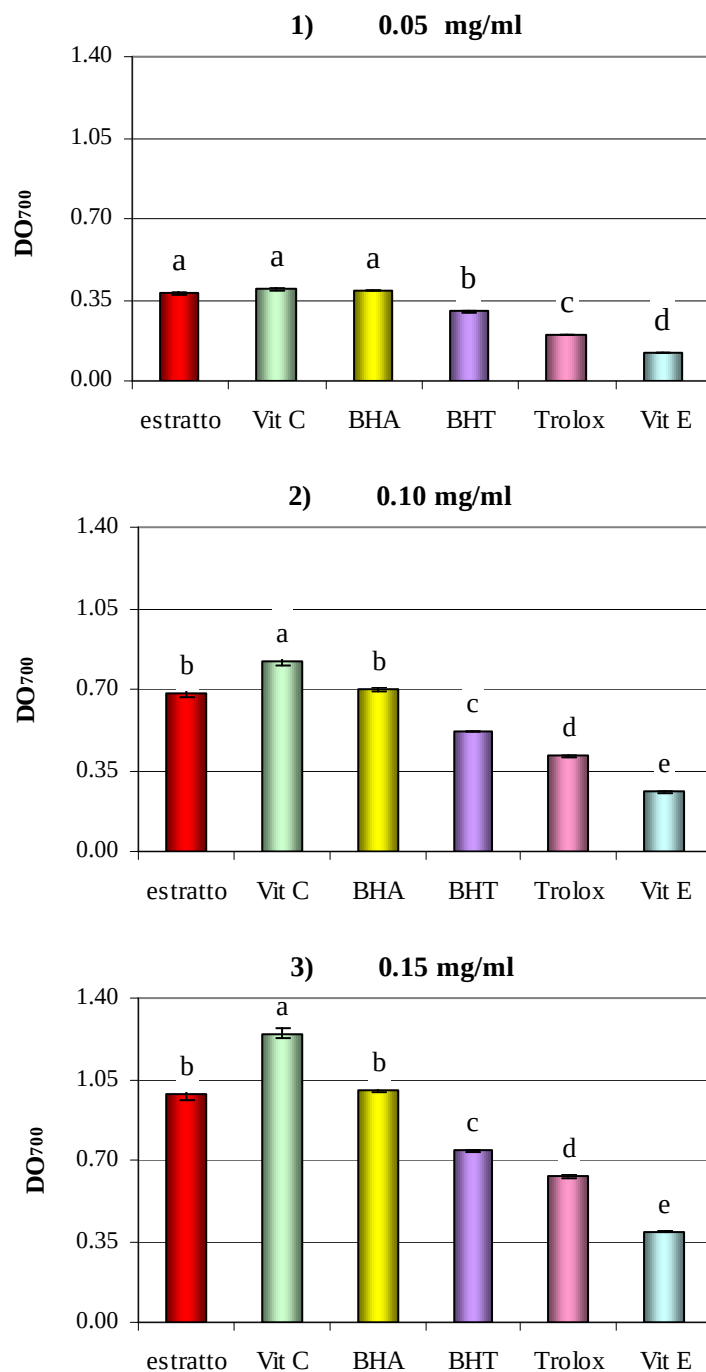


Figura 45. Potere riducente dell'estratto pellicolare di nocciola e degli antiossidanti di riferimento, a parità di concentrazione.



Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0.05$).

Prendendo in esame le concentrazioni più alte (0.10 e 0.15 mg/ml), emerge significativamente l'elevata attività dell'acido ascorbico, che è risultata tra tutte la migliore in assoluto (si ricorda che l'acido ascorbico è noto per essere un ottimo agente riducente il Fe^{+3} (Niki, 1991)). L'estratto pellicolare ha dato comunque ottimi risultati, in quanto il suo potere riducente si è mantenuto analogo a quello del BHA e superiore a quello di tutti gli altri antiossidanti di riferimento. Da notare come, anche alla concentrazione più elevata (0.15 mg/ml), le maggiori differenze tra estratto pellicolare e composti puri si sono avute a carico dell' α -tocoferolo, la cui efficienza antiossidante in qualità di donatore di elettroni è risultata oltre 2.5 volte più scarsa di quella dell'estratto.

4.3.2 CAPACITA' CHELANTE IL FERRO (II)

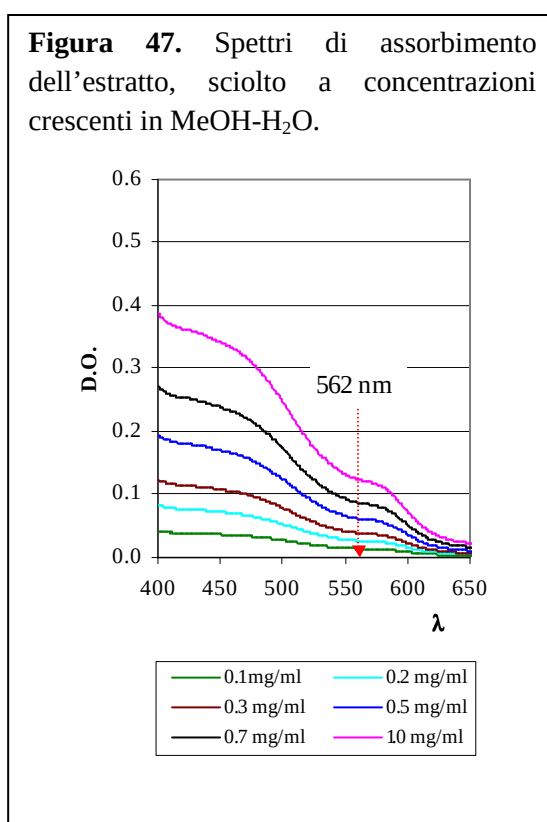
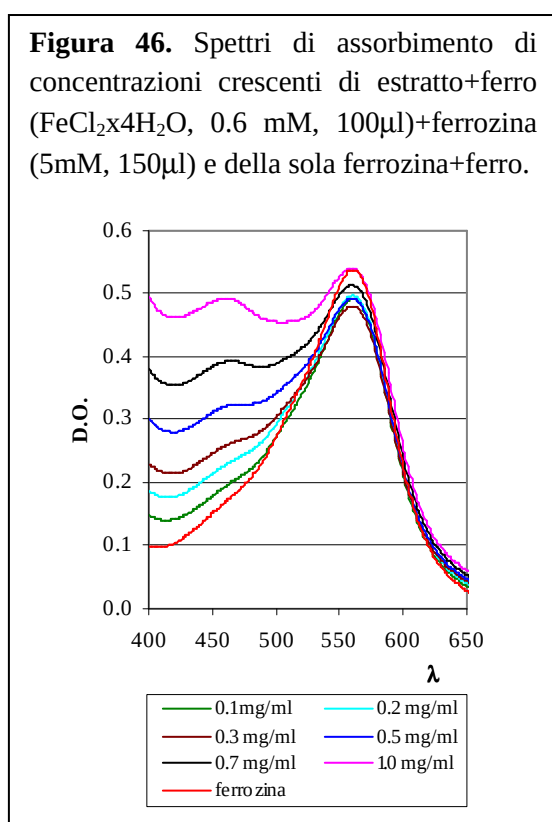
La chelazione viene definita come l'incorporazione di un metallo-ione in una struttura eterociclica ad anello. Si formano così dei complessi, in cui il metallo-ione è coniugato con legami covalenti di coordinazione a molecole neutre e/o negative (leganti), le quali posseggono almeno un paio di elettroni non condivisi capaci di formare il legame.

La capacità chelante i metalli è una misura che valuta l'efficienza di un insieme di componenti o di un antiossidante puro di chelare stabilmente i metalli di transizione; sottraendoli al sistema, l'antiossidante *metal-scavenging* evita la formazione di radicali liberi, che accelerano e perpetuano la catena delle reazioni ossidative (Halliwell, 1991). Data l'alta reattività, il ferro è il più potente pro-ossidante tra i metalli di transizione (Halliwell et al., 1984).

Il metodo più utilizzato per valutare l'efficienza di un antiossidante di chelare il Fe^{+2} è quello di Decker et al. (1990), che sfrutta la capacità della ferrozina (FZ) di formare complessi stabili con il Fe^{+2} . In presenza di agenti chelanti, parte del ferro contenuto alla miscela test è sottratto alla formazione del complesso [Fe-FZ], caratterizzato da un colore rosso violaceo che assorbe a 562. Pertanto, maggiore è l'attività chelante di un campione, minore è l'assorbimento a 562 nm che si registra aggiungendo FZ ad una miscela contenente Fe^{+2} e antiossidante.

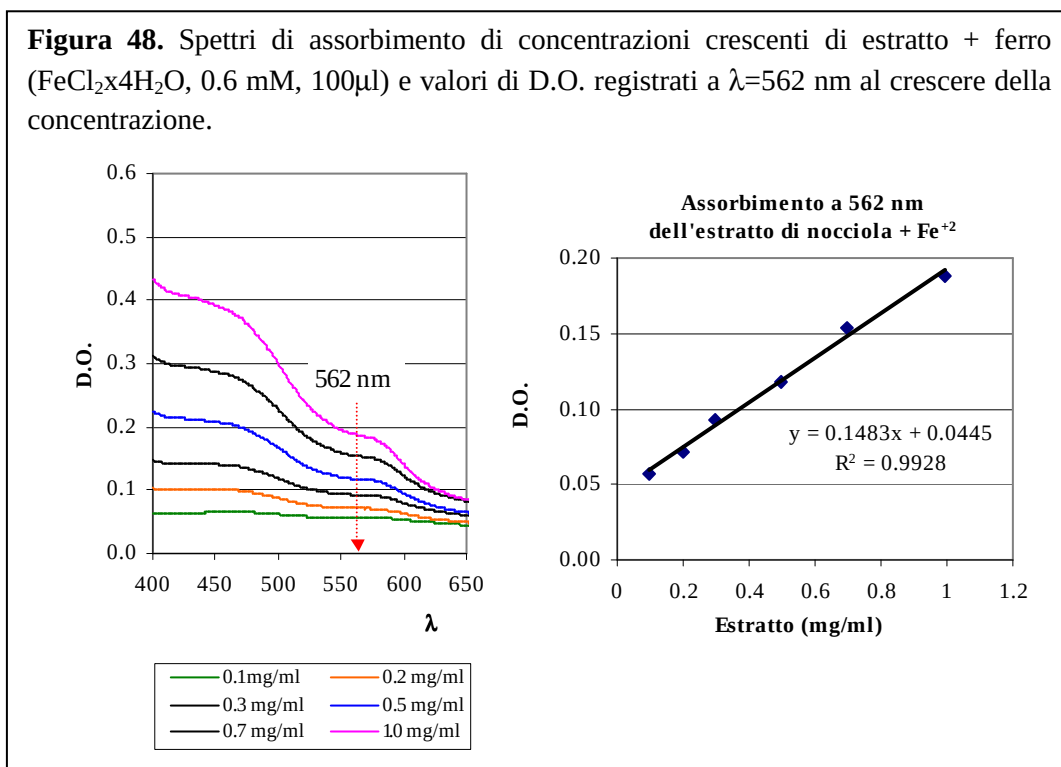
Il metodo originario (Decker et al. (1990) prevede di calcolare la capacità chelante in ferro come percentuale di scolorimento della una soluzione di Fe e FZ dopo l'aggiunta di campione. Gli spettri ottenuti, visibili il **Figura 46**, mostrano un risultato apparentemente paradossale, in quanto l'assorbimento a 562 nm di campioni contenenti

quantitativi fissi di Fe^{+2} e FZ, anziché diminuire, aumentava al crescere della concentrazione. In effetti il campione di estratto pellicolare di nocciola, sciolto nel solo solvente di reazione (metanolo acquoso), presentava un colore rossastro che poteva incrementare i valori di assorbanza a 562 nm. La conferma di tale ipotesi si è avuta verificando la D.O. di soluzioni preparate con concentrazioni crescenti di estratto sciolto in MeOH acquoso, i cui spettri sono visibili in **Figura 47**. L'estratto di nocciola mostrava effettivamente a 562 nm un discreto assorbimento, che incrementava al crescere della concentrazione (DO_{562} alla massima concentrazione testata (1.0 mg/ml): 0.123).



In un primo momento si è pensato che fosse sufficiente sottrarre al calcolo dei risultati l'assorbimento di fondo del campione, in maniera da annullare l'effetto dovuto alla presenza di agenti cromogeni interferenti. Tuttavia, nel momento in cui si andava ad aggiungere il ferro alla soluzione contenente il solo campione, si otteneva un evidente e repentino cambiamento di colore della massa, che da rosso-mattone diventava grigiastro. In letteratura si rileva che i complessi metallo-flavonoidi sono spesso colorati (Malesev et al., 2007).

In **Figura 48** si possono osservare gli spettri registrati a carico dei campioni aggiunti di solo Fe^{+2} . Nella stessa figura è riportato anche il grafico ottenuto plottando i valori di concentrazione degli estratti (aggiunti di ferro) vs la D.O. registrata a 562 nm, da cui emerge chiaramente che la crescita di assorbanza in funzione della concentrazione di estratto è risultata di tipo lineare.



Per verificare se l'incremento di assorbanza registrato aggiungendo ferro al campione fosse dovuto alla formazione di complessi [Fe^{+2} -antiossidanti], sono stati acquisiti gli spettri di soluzioni estratto+ferro dopo aggiunta di EDTA. L'EDTA è un chelante del ferro così potente che riesce a distruggere non solo i complessi [Fe^{+2} -ferrozina] (**Fig. 49**), ma anche i complessi che la ferrozina forma con i composti fenolici (Tang et al., 2002).

Dal confronto degli spettri riportati in **Figura 47**, **48** ed **50** è emerso che, se alle soluzioni contenenti estratto+ferro (**Fig. 48**) si aggiungeva EDTA (**Fig. 50**), gli assorbimenti tornavano a valori pressoché analoghi a quelli caratteristici del campione privo di ferro (**Fig. 47**). Tali risultati hanno dimostrato che, nell'estratto di nocciola, il Fe^{+2} si è complessato formando cromofori che interferiscono nella valutazione

quantitativa del saggio. Aumenti di assorbimento a 562 nm dovuti alla formazione di complessi si sono avuti anche aggiungendo quantità crescenti di ferro ad una quota fissa di estratto (**Fig 51**).

Figura 49. Spettri di assorbimento di concentrazioni crescenti di EDTA+ferro ($\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0.6 mM, 100 μl)+ferrozina (5mM, 150 μl) e della sola ferrozina+ferro.

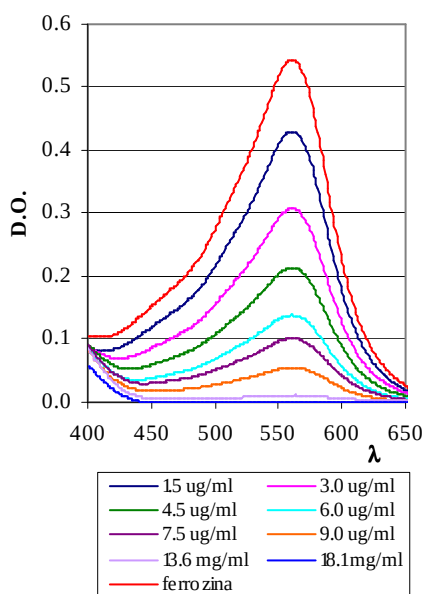


Figura 50. Spettri di assorbimento di concentrazioni crescenti di estratto+ferro ($\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0.6 mM, 100 μl)+EDTA (30 $\mu\text{g/ml}$).

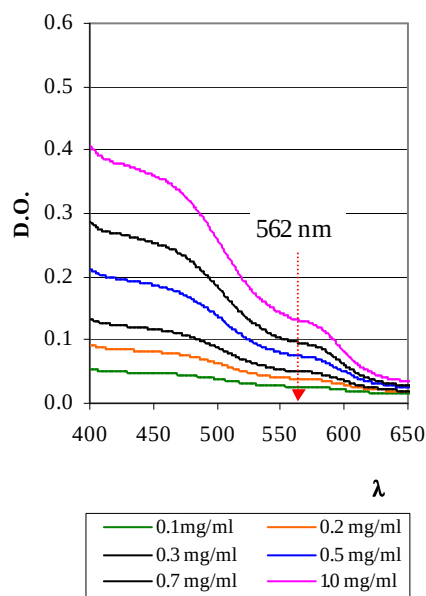
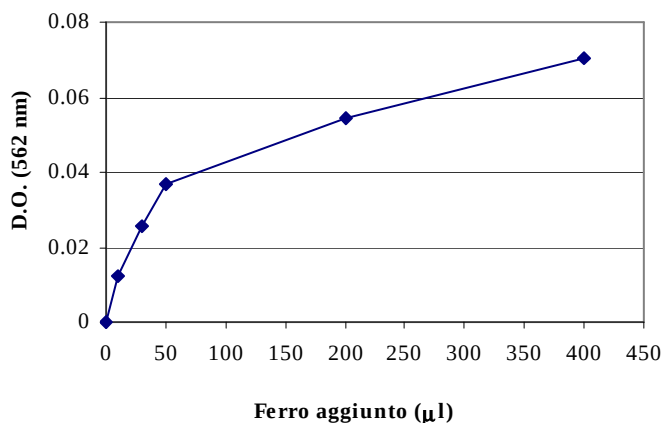


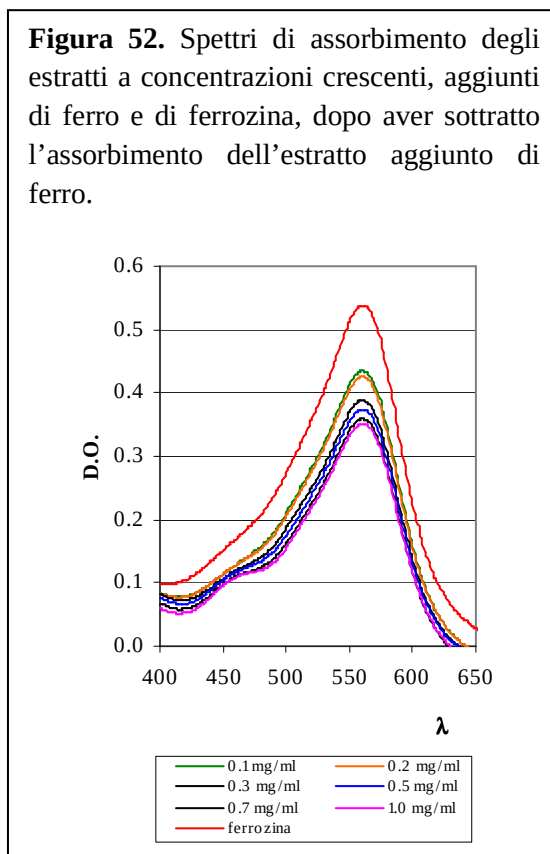
Figura 51. Assorbimento a 562 nm di quantitativi fissi di estratto (0.6 mg/ml) aggiunto di $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (0.6 mM) in quantità crescenti.



Dai risultati delle prove condotte emerge pertanto che:

- a) l'estratto pellicolare di nocciola possiede capacità chelanti il Fe^{+2} , con cui forma complessi cromofori che assorbono nel visibile;
- b) il saggio della ferrozina, ampiamente utilizzato in letteratura, può portare a risultati quantitativamente errati nel caso in cui i composti ad attività chelante presenti nel campione formino essi stessi dei complessi cromofori con il ferro, che assorbono alla lunghezza d'onda di lavoro (562 nm). Pertanto, condurre l'analisi senza effettuare un bianco-campione (come comunemente si procede) può essere causa di alterazione grossolana dei risultati.
- c) Il bianco-campione non può essere costituito dal solo campione privo degli altri reagenti (come riportato ad es. da Hinneburg et al., 2006), ma deve essere preparato impiegando soluzioni di campione+ferro, in maniera da tener conto della presenza nella miscela di reazione di eventuali complessi di chelazione cromofori, il cui assorbimento va sottratto nel calcolo utilizzato per determinare i risultati del saggio.

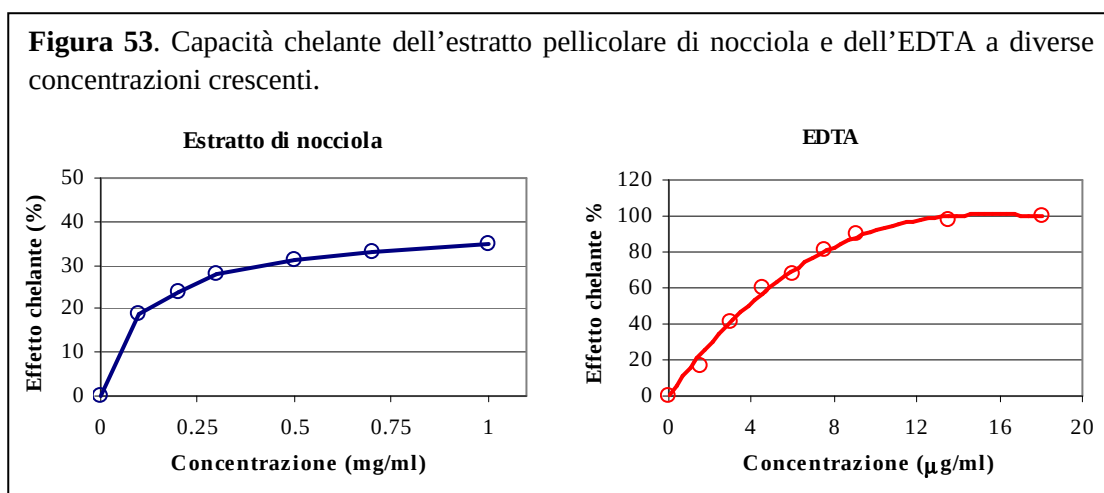
In (**Fig. 52**) si riportano gli spettri ottenuti sottraendo, alle soluzioni contenenti campione+ferro+FZ, l'assorbimento del campione+ferro (ovvero: spettri visibili in **Figura 46**, sottratti degli spettri visibili in **Figura 48**).



Dalla **Figura 52** risulta evidente come l'estratto pellicolare di nocciola sia stato in grado di interferire nella formazione dei complessi tra ferro e ferrozina, dimostrando capacità chelanti il Fe^{+3} .

I valori della capacità chelante % manifestati da concentrazioni crescenti di estratto pellicolare di nocciola e di EDTA sono riportati in **Figura 53**. Alla concentrazione di 1 mg/ml, l'estratto è stato in grado di chelare il 35% del ferro complessabile con la ferrozina. Dall'andamento della curva si denoterebbe una incapacità da parte dell'estratto pellicolare di giungere al 100% di inibizione. Un simile andamento asintotico al di sotto del 100% è stato rilevato anche a carico di altri estratti fenolici vegetali, come ad esempio quelli ricavati da Singh et al. (2004), con bucce di patate.

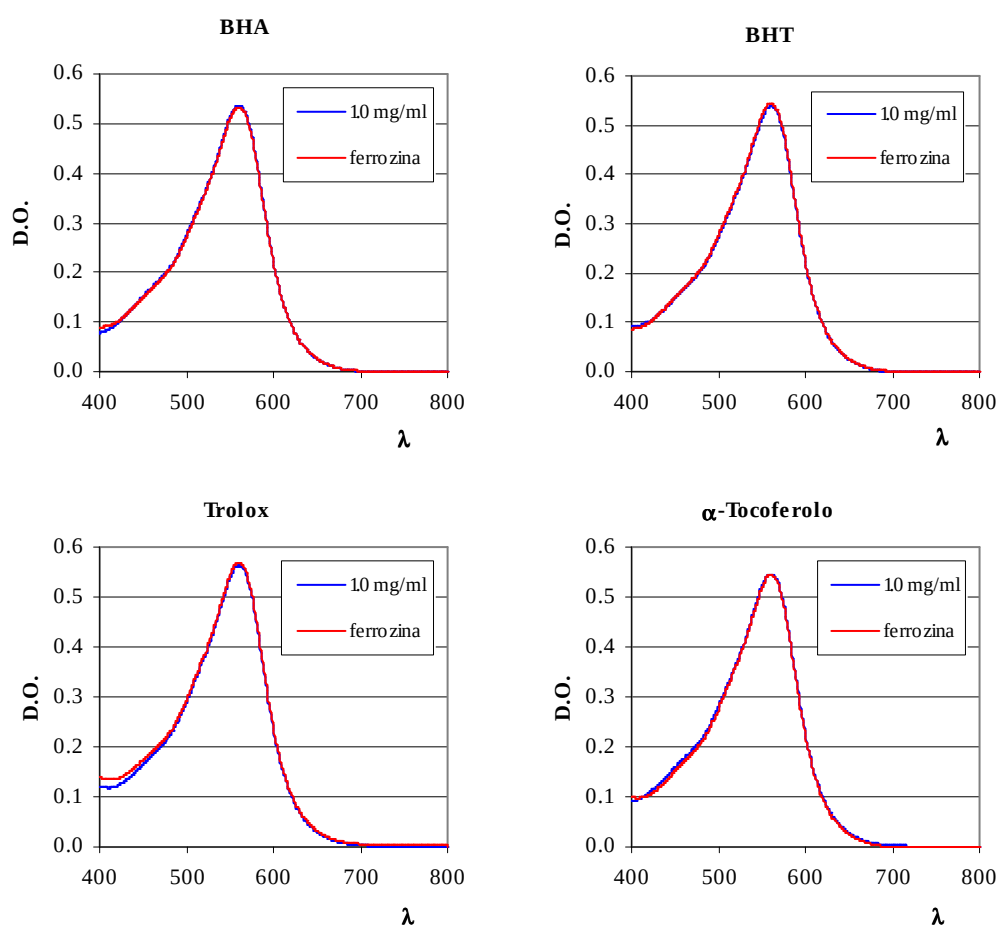
Per ottenere un pari effetto chelante del 35%, nelle condizioni di saggio, sono stati sufficienti 0.0024 mg/ml di EDTA, ovvero quantitativi oltre 400 volte più bassi rispetto a quelli necessari impiegando l'estratto pellicolare di nocciola. Si rammenta che L'EDTA è un chelante del ferro particolarmente potente (Tang et al., 2002), rispetto al quale gli estratti fenolici naturali si sono spesso manifestati molto meno efficienti (Le et al., 2007; Yen et al., 2005). BHA, BHT, Trolox e α -tocoferolo, saggiati fino alla concentrazione di 1 mg/ml, non hanno manifestato alcuna capacità chelante. La mancata interferenza di questi composti nella formazione dei complessi ferro-ferrozina è visibile in (**Fig. 54**).



La capacità chelante dimostrata dall'estratto pellicolare di nocciola contribuisce a rendere le sue caratteristiche antiossidanti ancora più efficienti, in quanto oltre a fungere

da spegnitore di radicali liberi (azione *radical-scavenging*) è evidentemente in grado di immobilizzare metalli pro-ossidanti (azione *metal-chelating*), rendendoli inefficaci. Da notare che la formazione di complessi con il ferro non blocca l'attività riducente dei flavonoidi ma, al contrario, la potenzia. Infatti, i complessi metallo-flavonoide hanno manifestato attività *radical-scavenging* considerevolmente più elevata dei flavonoidi liberi, sia *in vivo* che *in vitro* (Mira et al., 2002; Anafas'ev et al., 2001).

Figura 54. Spettri di BHA, BHT, Trolox e α -Tocoferolo (1 mg/ml), aggiunti di ferro ($\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0.6 mM, 100 μl) e di ferrozina (5mM, 150 μl), nei confronti del controllo (ferrozina+ferro).



La capacità dei flavonoidi e dei tannini di chelare i metalli è ampiamente dimostrata (Rice-Evans, 1995; Andrade et al., 2006; Khokhar et al., 2003). E' stato rilevato che le proprietà chelanti sono legate alla presenza di siti potenziali di attacco, quali i gruppi ossidrilici in posizione *orto* dell'anello B, i due *meta*-ossidrilici localizzati

nell'anello A ed il gruppo carbossilico dell'anello C. Tra questi, la struttura catecolica (caratteristica di flavonoidi quali catechina e quercetina) sembra essere il sito più reattivo (Mira et al., 2002). L'importanza della struttura molecolare nell'influenzare l'efficienza chelante è stata messa in risalto anche da Khokhar et al. (2003), i quali hanno osservato come un gran numero di gruppi ossidrilici sulla molecola fenolica ne incrementi la capacità di legare il ferro.

Data l'elevata quantità di tannini posseduta dagli estratti pellicolari di nocciola, è probabile che questi giochino un ruolo chiave nel determinare la capacità chelante osservata. I tannini condensati più comuni (polimeri di catechine/epicatechine) sono in effetti caratterizzati da una notevole presenza di *orto*-difenoli catecolici; i tannini idrolizzabili, d'altro canto, sono poliesteri (a volte polimerizzati) degli acidi gallico o ellagico, aventi tre ossidrili fenolici vicinali nella loro struttura molecolare.

Gli antiossidanti *metal-scavenging* sono guardati con interesse dall'industria alimentare, in quanto i cibi sono spesso contaminati con ioni di metalli di transizione introdotti nel corso dei processi di trasformazione. Anche dal punto di vista biologico, la capacità di un antiossidante di sottrarre ioni metallici alla reazione di Fenton rappresenterebbe un'importante prerogativa di un antiossidante, in quanto aiuterebbe a preservare l'organismo dall'accumulo di radicali alcossilici, particolarmente dannosi. Tuttavia, non è ancora chiaro se la chelazione metallica sia effettivamente un'attività antiossidante rilevante *in vivo*, in quanto nei sistemi biologici gran parte dei metalli di transizione sono legati a proteine, e quindi non disponibili alla chelazione.

Dal punto di vista nutrizionale, l'attività *metal-scavenging* è invece guardata con sospetto, in quanto un'elevata capacità di chelare i metalli potrebbe avere un impatto negativo sulla qualità nutrizionale di un alimento, riducendo la biodisponibilità di micronutrienti essenziali come ferro e zinco. Tuttavia, gli effetti dietetici di molecole chelanti assunte con la dieta non sono a tutt'oggi ancora del tutto noti. Ad esempio, in uno studio condotto utilizzando fagioli a basso ed alto tenore di acido fitico (composto con forte attività chelante), sorprendentemente non è stata trovata alcuna relazione tra biodisponibilità del ferro e livelli di acido fitico o proantocianidine (Welch et al., 2000). D'altronde, i composti fenolici contenuti nell'estratto pellicolare di nocciola sono risultati dotati di capacità sequestranti il ferro non molto spiccate, se confrontate con quelle di molecole potentemente chelanti quali l'EDTA.

4.3.3 ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE *IN-VIVO*

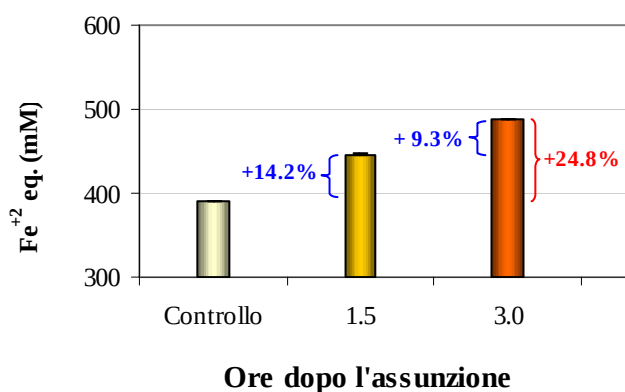
Numerosi studi hanno messo in risalto che i polifenoli presenti nelle piante sono i più abbondanti antiossidanti della nostra dieta, che proteggendo i costituenti cellulari dai danni ossidativi, limitano i rischi di varie malattie degenerative associate allo stress ossidativo (D'Archivio et al., 2007). Tuttavia, data l'enorme variabilità strutturale delle frazioni fenoliche trovate in natura, è spesso impossibile riconoscere le componenti biologicamente attive all'interno di un dato cocktail di fitochimici fenolici, anche perché i singoli composti, modulandosi gli uni con gli altri, possono dar luogo ad effetti sinergici che ne potenziano l'attività.

L'obiettivo degli studi di biodisponibilità è quello di determinare quali sono i composti assorbiti, quali sono i loro metaboliti circolanti nel plasma e quali di questi sono biologicamente attivi. Tuttavia, a causa dell'oggettiva difficoltà di misurare l'attività di singoli antiossidanti e dei loro metaboliti, nonché le interazioni tra componenti di miscele complesse, per accertarne la biodisponibilità sono stati sviluppati dei metodi indiretti, che valutano l'impatto globale degli antiossidanti sul siero o sul plasma. Tra questi, i più utilizzati sono i saggi TEAC (Miller et al., 1996), ORAC (Cao et al., 1993) e FRAP (Benzie et al., 1996). Quest'ultimo fornisce una misura della capacità antiossidante totale del plasma, determinata dall'insieme dei sistemi riducenti non enzimatici (Cao et al., 1998) che sono in grado di ridurre lo ione ferrico (Fe^{+3}) a ferroso (Fe^{+2}), formando nella miscela di reazione un complesso blu [Fe^{+2} -TPTZ] che va ad incrementare l'assorbimento a 539 nm.

Dai risultati di questo studio, è emerso chiaramente che l'estratto pellicolare di nocciola ha manifestato un'elevata attività antiossidante contro vari sistemi antiossidanti *in vitro*. Questi test costituiscono un'importante prova dell'attività antiossidante per eventuali applicazioni nell'industria alimentare, ma non sono sufficienti a provare l'efficacia sui sistemi biologici. Infatti, non sempre i test *in vitro* riflettono gli effetti *in vivo*, sia perché la biodisponibilità delle molecole fenoliche differisce fortemente in relazione alla loro struttura chimica, sia perché i composti attivi che raggiungono il sangue e i tessuti possono essere diversi dalle forme native studiate *in vitro*, trasformate dall'organismo in metaboliti difficili da identificare (Kroon et al., 2004; Manach et al., 2004).

Per valutare gli effetti dell'assunzione di estratto pellicolare di nocciola sui sistemi biologici, sono stati condotti esperimenti con ratti cui è stata fornita una singola dose di estratto, pari a 71.4 mg/Kg corporeo, aggiunta ad un comune biscotto. I risultati del FRAP-test (**Figura 55**) mostrano che, dopo 1.5 ore dall'assunzione, il potenziale antiossidante del plasma nei ratti che hanno ricevuto l'estratto è incrementato del 14.2 % rispetto al controllo che ha assunto il biscotto privo di estratto. A distanza di 3 ore dall'assunzione, la capacità antiossidante del plasma nei ratti ha subito un ulteriore incremento del 9.3%, pari ad un aumento globale, rispetto al controllo misurato a 1.5 ore, di circa il 25 %. Simili risultati sono stati ottenuti da Busserolles et al. (2006), che hanno rilevato incrementi dei valori del FRAP nel plasma di ratti cui erano stati somministrati estratti vegetali di semi di uva, di corteccia di pino e di corteccia di pino arricchiti in proantocianidine altamente polimerizzate, ma utilizzando dosi di estratto molto più elevate (500 mg/Kg di peso corporeo) di quelle impiegate nella presente ricerca. Si rammenta che anche l'estratto di nocciola utilizzato in questo studio di dottorato è caratterizzato da un alto tenore in polimeri tannici, pari a circa il 63% della componente fenolica totale.

Figura 55. Influenza dell'estratto pellicolare di nocciola sulla capacità antiossidante del plasma di ratti dopo 1.5 e 3.0 ore dall'assunzione.



I risultati dei test *in vivo* hanno chiaramente dimostrato che nell'estratto pellicolare di nocciola sono contenuti composti ad attività antiossidante che, come tali o sotto forma di metaboliti, hanno raggiunto il circolo sanguigno, ove sono stati in grado di

incrementare il potenziale redox del plasma nei ratti. Il test *in vivo* ha anche evidenziato, nei ratti, un pronto assorbimento ed una rapida attività biologica degli antiossidanti presenti nell'estratto pellicolare, che hanno implementato le naturali difese del plasma dagli stress ossidativi già dopo 1.5 ore dall'assunzione, tempo oltre il quale il loro effetto non è esaurito, ma è apparso in piena crescita.

Si può pertanto affermare che gli antiossidanti contenuti negli estratti crudi ottenuti dalle pellicole di nocciola si sono rivelati biodisponibili e prontamente attivi.

4.3.4 TEST DI CONSERVABILITA'

Per valutare la stabilità a lungo termine, caratteristica importante ai fini di una qualsiasi utilizzazione industriale, è stata seguita l'evoluzione fenoli totali e dell'attività antiradicalica nel corso della conservazione a temperatura refrigerata (4°C e -18°C) ed a temperatura ambiente (circa 22°C) dell'estratto pellicolare di nocciola, solubilizzato in etanolo e mantenuto fino a sei mesi in recipiente chiuso ed al buio.

Per quanto concerne i fenoli totali (**Tab. 15** e **Fig. 56**), i risultati delle prove non hanno evidenziato differenze significative tra i campioni mantenuti a -18°C e 4°C ($p < 0.05$). Ad entrambe le temperature, infatti, la concentrazione fenolica è rimasta inalterata fino al 3° mese, mentre è calata di circa l'8% al sesto mese di osservazione. I campioni mantenuti a temperatura ambiente hanno invece manifestato un calo progressivo, molto lieve nel corso dei primi tre mesi (2.9%) e successivamente più consistente (circa il 10% del valore iniziale, dopo sei mesi di conservazione).

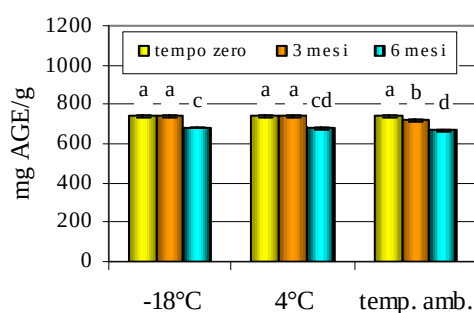
Da notare che, al termine dei sei mesi di conservazione, le differenze tra i campioni tenuti a temperatura ambiente ed a 4°C non sono risultate statisticamente significative ($p < 0.05$).

Tabella 15. Fenoli totali dell'estratto pellicolare di nocciola nel corso della conservazione.

Tempo (mesi)	Temperatura (°C)	Fenoli totali (mg AGE/g)	Riduzione %
0	-	743.5 ± 7.8 a	
3	-18	742.9 ± 8.8 a	-
	4	745.1 ± 9.0 a	-
	temp. amb.	721.8 ± 6.9 b	2.9
6	-18	686.1 ± 5.1 a	7.7
	4	684.0 ± 9.1 ab	8.0
	temp. amb.	666.7 ± 7.5 b	10.3

Media ± d.s. (n=4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$).

Figura 56. Fenoli totali dell'estratto pellicolare di nocciola nel corso della conservazione.



L'evoluzione dell'attività antiradicalica dell'estratto nel corso della conservazione è stata confrontata con quella dell' α -tocoferolo, antiossidante naturale noto per la buona stabilità alla conservazione (BIBL). I dati ottenuti sono riportati in **Tab. 16**, **Fig. 57** e **Fig. 58**.

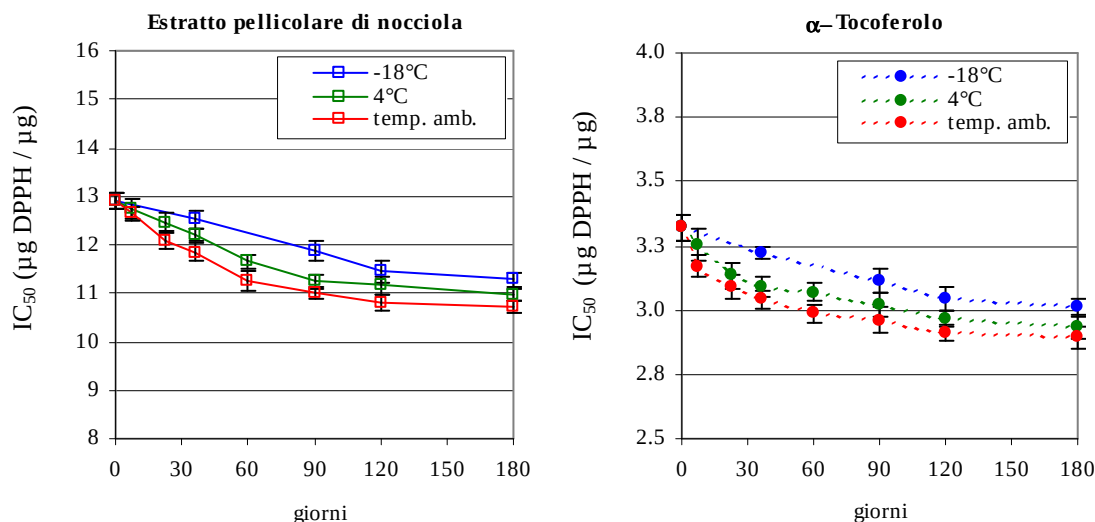
α-Tocoferolo				Estratto			
Tempo (giorni)	Temperatura (C°)	EA (mg DPPH/mg)	riduzione %	Tempo (giorni)	Temperatura (C°)	EA (mg DPPH/mg)	riduzione %
zero		3.32 $\pm$ 0.05		zero		12.89 $\pm$ 0.17	
7	-18°C	nd	nd	7	-18°C	nd	nd
	4°C	3.26 $\pm$ 0.06	2.0 $\pm$ 1.9		4°C	12.74 $\pm$ 0.20	1.2 $\pm$ 1.9
	temp. amb.	3.17 $\pm$ 0.04	4.5 $\pm$ 1.3		temp. amb.	12.64 $\pm$ 0.13	1.9 $\pm$ 1.3
23	-18°C	nd	nd	23	-18°C	nd	nd
	4°C	3.13 $\pm$ 0.05	5.6 $\pm$ 1.6		4°C	12.47 $\pm$ 0.19	3.2 $\pm$ 1.6
	temp. amb.	3.09 $\pm$ 0.05	7.0 $\pm$ 1.4		temp. amb.	12.08 $\pm$ 0.16	6.3 $\pm$ 1.4
36	-18°C	3.22 $\pm$ 0.02	3.0 $\pm$ 0.7	36	-18°C	12.53 $\pm$ 0.19	2.8 $\pm$ 0.7
	4°C	3.09 $\pm$ 0.04	6.9 $\pm$ 1.2		4°C	12.21 $\pm$ 0.14	5.3 $\pm$ 1.2
	temp. amb.	3.04 $\pm$ 0.03	8.4 $\pm$ 1.0		temp. amb.	11.86 $\pm$ 0.18	8.0 $\pm$ 1.0
60	-18°C	nd	nd	60	-18°C	nd	nd
	4°C	3.07 $\pm$ 0.03	7.6 $\pm$ 1.0		4°C	11.67 $\pm$ 0.15	9.5 $\pm$ 1.0
	temp. amb.	2.99 $\pm$ 0.03	10.0 $\pm$ 1.0		temp. amb.	11.25 $\pm$ 0.20	12.7 $\pm$ 1.0
90	-18°C	3.11 $\pm$ 0.05	6.2 $\pm$ 1.5	90	-18°C	11.88 $\pm$ 0.21	7.8 $\pm$ 1.5
	4°C	3.02 $\pm$ 0.05	9.0 $\pm$ 1.4		4°C	11.25 $\pm$ 0.13	12.7 $\pm$ 1.4
	temp. amb.	2.96 $\pm$ 0.05	10.8 $\pm$ 1.5		temp. amb.	11.01 $\pm$ 0.12	14.6 $\pm$ 1.5
120	-18°C	3.05 $\pm$ 0.05	8.3 $\pm$ 1.4	120	-18°C	11.46 $\pm$ 0.22	11.0 $\pm$ 1.4
	4°C	2.96 $\pm$ 0.03	10.7 $\pm$ 0.9		4°C	11.18 $\pm$ 0.18	13.3 $\pm$ 0.9
	temp. amb.	2.91 $\pm$ 0.03	12.3 $\pm$ 0.9		temp. amb.	10.81 $\pm$ 0.16	16.1 $\pm$ 0.9
180	-18°C	3.01 $\pm$ 0.03	9.3 $\pm$ 1.0	180	-18°C	11.29 $\pm$ 0.14	12.4 $\pm$ 1.0
	4°C	2.94 $\pm$ 0.04	11.6 $\pm$ 1.3		4°C	10.97 $\pm$ 0.13	14.9 $\pm$ 1.3
	temp. amb.	2.90 $\pm$ 0.04	12.8 $\pm$ 1.3		temp. amb.	10.73 $\pm$ 0.12	16.8 $\pm$ 1.3

Tabella 16. Evoluzione dell'efficienza antiradicalica (EA) nel corso della conservazione dell'estratto pellicolare di nocciola e dell' α -tocoferolo.

Nel corso del tempo, tutti i campioni hanno manifestato un calo di attività antiossidante tanto maggiore quanto maggiore era la temperatura di conservazione. La diminuzione di attività antiradicalica in funzione del tempo è stata rapida nelle fasi iniziali, per poi rallentare nel corso degli ultimi due mesi di osservazione, probabilmente per effetto limitante della sempre più ridotta concentrazione di ossigeno disponibile.

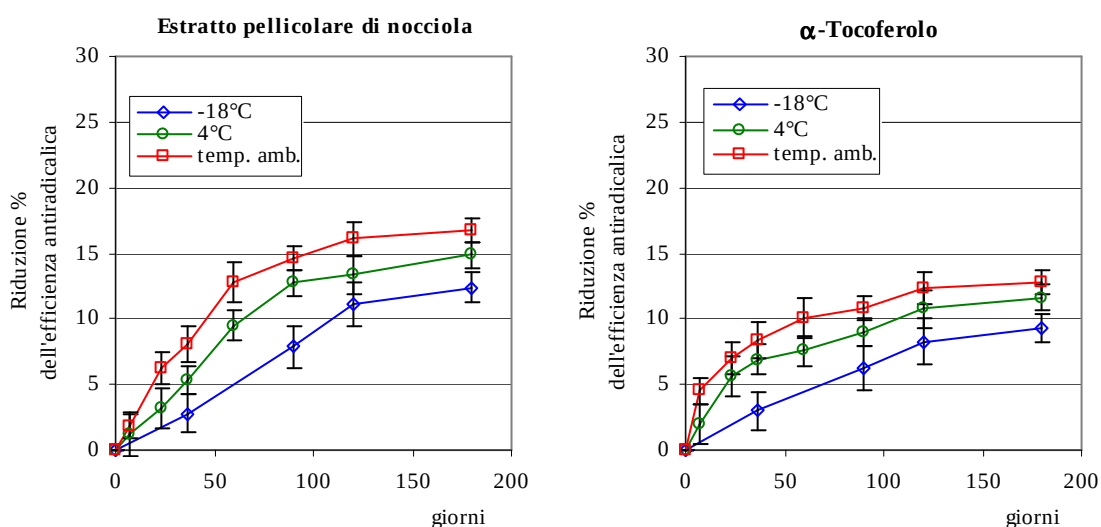
L' α -tocoferolo ha mostrato una buona stabilità: dopo sei mesi di mantenimento nelle peggiori condizioni (temperatura ambiente), ha mostrato un calo di attività antiossidante di appena il 13%.

Figura 57. Evoluzione dell'attività antiradicalia degli estratti pellicolari di nocciola e dell' α -tocoferolo nel corso della conservazione.



Nonostante la perdita registrata a carico del corrispondente campione di estratto sia stata leggermente più sostenuta (circa il 17%), a parità di concentrazione i livelli di attività antiradicalica (EA) dell'estratto si sono mantenuti in ogni caso estremamente elevati, superiori di quasi 4 volte di quelli dell' α -tocoferolo (**Fig. 58**).

Fig 58. Riduzione % dell'efficienza antiradicalica (EA) degli estratti pellicolari di nocciola e dell' α -tocoferolo nel corso della conservazione.



Sei mesi di conservazione a -18°C hanno provocato un calo di attività antiossidante piuttosto contenuto in entrambi i campioni (α -tocoferolo: 9%; estratto: 12%); nel caso della conservazione a 4°C, il decremento osservato è risultato intermedio (α -tocoferolo: 12%; estratto: 15%) (**Fig. 58**).

Il confronto con i dati rilevabili in letteratura a carico di altri estratti naturali non è agevole, a causa della diversità delle condizioni sperimentali adottate dai vari autori. Nilsson et al. (2005) hanno rilevato un'ottima stabilità degli estratti acquosi di fragola conservati per 5 mesi a -20°C, ma un calo di attività riducente (FRAP-test) del 40% dopo due settimane di conservazione a 4°C ed una riduzione del 30% dopo appena quattro giorni di mantenimento a temperatura ambiente. Estratti di foglie e gemme di ribes ottenuti con tampone glicina (0.2M HCl, pH 3 con glicina) hanno mantenuto appena il 17 e l'11 % della capacità antiossidante iniziale dopo 75 giorni di conservazione a 4°C in forma liofilizzata o liquida, rispettivamente (Tabart et al., 2007); al contrario, gli estratti ottenuti dalla stessa matrice con miscela acetonica (70% acetone, 2% di ac. acetico) hanno manifestato nei primi giorni di conservazione a 4°C un forte (200%) e inspiegabile incremento della capacità antiradicalica (DPPH-test), che pur riducendosi nel corso dei successivi 65 giorni di osservazione, si è mantenuta 1.5 volte più alta del valore iniziale (Tabart et al., 2007). Gli stessi Autori hanno anche rilevato che a 20°C e 4°C la stabilità gli estratti conservati in forma liofilizzata è risultata migliore di quella dei corrispettivi estratti mantenuti in forma liquida. Lun Su et al. (2003) hanno osservato una bassa stabilità a temperatura ambiente, pH-dipendente, delle catechine del the verde: dopo un mese di incubazione nelle migliori condizioni (basso pH = 4.0) hanno mostrato all'HPLC una riduzione quantitativa del 78%.

I risultati delle prove di stabilità hanno dimostrato che l'estratto di pellicola di nocciola può essere mantenuto a temperatura ambiente per alcuni mesi, conservando una capacità antiradicalica estremamente elevata.

4.3.5 SCREENING SULLA COMPONENTE FENOLICA

Da un approfondito esame della letteratura scientifica, è emerso che le caratteristiche chimiche delle frazioni fenoliche contenute nella nocciola e nei suoi sottoprodotti sono note solo in minima parte. I pochi dati bibliografici reperibili, non sempre in pieno accordo tra loro, appaiono alquanto frammentari. Non è stato in effetti

condotto alcuno studio sistematico mirato a valutare compiutamente le varie componenti fenoliche che caratterizzano le differenti parti botaniche (guscio/pericarpo/endosperma) della nocciola. Nel caso dei sottoprodotti pellicolari e delle nocciole tostate, inoltre, la problematica si complica per il fatto che, nel corso dei trattamenti termici industriali, sicuramente si verificano profonde modificazioni a carico delle molecole fenoliche native, indubbiamente molto difficili da valutare. Nell'ambito di questo studio di dottorato è comunque apparso evidente che, nonostante i processi termici stressanti che hanno subito (o forse proprio grazie ad essi), le cospicue frazioni fenoliche recuperabili dai sottoprodotti pellicolari hanno manifestato spiccate proprietà antiossidanti. Kim et al. (2006) hanno constatato che il trattamento termico di semi di uva a temperature elevate (150°C) per tempi relativamente lunghi (40 min) provoca un aumento dell'attività antiossidante dei rispettivi estratti fenolici. Recentemente, Travaglia et al. (2008) hanno riscontrato che l'attività antiradicalica e chelante delle pellicole di nocciole è incrementata con la severità del grado di tostatura subito.

In **Tabella 17** si riporta uno schema riassuntivo dei dati bibliografici disponibili relativamente alla composizione fenolica delle pellicole di nocciola e dei loro estratti. Si tratta in tutto di cinque lavori, di cui il primo risale al 1983; è stato condotto a Senter et al. sulla porzione pellicolare di nocciola separata manualmente dal seme (l'Autore non spiega se previa tostatura) e l'analisi HPLC si riferisce solo agli acidi fenolici ottenuti dopo idrolisi acida dell'estratto fenolico. Tre lavori (Coisson et al., 2003; Travaglia et al., 2005; Travaglia et al., 2008) sono stati effettuati dallo stesso gruppo di ricerca, sulle pellicole delle nocciole piemontesi. In due di questi lavori, tali Autori hanno condotto solamente un'analisi qualitativa. Infine, anche nel recente lavoro di Shahidi et al. (2007) sono stati quantificati solo gli acidi fenolici, ottenuti questa volta dopo idrolisi basica.

Nonostante non si osservi pieno accordo tra gli Autori, quello che sembra accertato è che gli acidi fenolici della pellicola di nocciola sono costituiti da derivati dell'acido benzoico, quali gallico (rilevato da tutti gli Autori), p-idrossibenzoico, protocatechico, vanillico (sulla cui presenza non c'è pieno accordo), nonché derivati dell'acido cinnamico, quali caffeico, clorogenico, p-cumarico, ferulico, sinapico (anche sulla presenza di tutti questi acidi fenolici, l'accordo tra Autori non è totale). Ciò che risulta chiaro, comunque, analizzando i dati dei due Autori che hanno condotto l'analisi quantitativa (Coisson et al., 2003; Shahidi et al., 2007), è che gli acidi fenolici

rappresentano nel complesso solo quota estremamente piccola della componente fenolica totale, per un totale, a seconda degli Autori, di 0.9 o 1.2 1.5 mg/g di estratto fenolico. Si ritiene pertanto poco probabile che l'elevata attività antiossidante manifestata dagli estratti pellicolari sia imputabile in maniera significativa a tale frazione.

Tabella 17. Composti fenolici rilevati nelle pellicole di nocciola da vari Autori.

		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
		dopo idrolisi acida	tq	tq	dopo idrolisi basica	tq
		µg/g di estratto	µg/g di estratto	analisi qualitativa	µg/g di estratto	picchi maggiori all' HPLC
Acidi fenolici	ac. p-OH benzoico	tr	453.6			
	ac. caffeico	tr			tr	
	ac. clorogenico		49.4			
	ac. p-cumarico		6.9		231	
	ac. ferulico	assente	assente		124	
	ac. gallico	tr	472.4	√	387	√
	ac. protocatechico	0.36	183.5	√		√
	ac. sinapico				124	
	ac. vanillico	tr	11.3			
flavanoli	(+) catechina		993.2	√		√
	(-) epicatechina		342.2	√		√
flavonoli	miricetina		91.2	√		
	quercetina		52.2	√		
	kampferolo		66.3	√		
proantocianidine	oligomeri (fino a pentameri)					√
	polimeri (fino a dodecameri)					√
Totale			2722		990	

(1) Senter et al., 1983 ; (2) Coisson et al., 2003 ; (3) Travaglia et al., 2005 ; (4) Shahidi et al., 2007 ; (5) Travaglia et al., 2008.

I flavanoli catechina ed epicatechina rappresenterebbero, secondo Coisson et al. (2003), la frazione predominante, rilevata (solo qualitativamente) anche da Travaglia et al. (2005); tali Autori hanno anche quantificato tre flavanoli (miricetina, quercetina e kampferolo), per un totale di flavonoli + flavanoli di poco superiore a 1.5 mg/g di estratto

fenolico. Anche queste frazioni, dunque, appaiono rappresentare solo una minima quota dei composti fenolici presenti negli estratti pellicolari.

Tabella 18. Composti fenolici rilevati dall'analisi LC/ESI-MS nell'estratto pellicolare di nocciola .

STILBENI	m/z	FLAVAN-3-OLI	m/z
Resveratrolo	229	Catechina	291
Resveratrolo glucoside (piceide)	391	Epicatechina	291
Resveratrolo dimero	455	Epigallocatechina	307
Resveratrolo dimero glucoside	617	Procianidina dimero (epigallocatechina e gallocatechina)	443
Resveratrolo tetramero	907	Epigallocatechinagallata (EGCG)	459
		Procianidina B1	579
		Procianidina B2	579
		Altri dimeri (somma)	579
		Dimero gallato	731
		Procianidina trimeri (somma)	867
		Procianidina trimero gallato	1019
		Procianidina tetrametri (somma)	1155

ANTOCIANIDINE/ANTOCIANI	m/z	FLAVONOLI	m/z
Cianidina	287	Quercetina	303
Peonidina	301	Isoramnetina	317
Delfinidina	303	Miricetina	319
Petunidina	317	Kaempferolo-3-glucoside e galactoside	449
Malvidina	331	Quercetina glucoside	465
Cianidina-3-O-glucoside	449	Isoramnitina-3-glucoside	479
Peonidina-3-O-glucoside	463	Quercetina glucoronide	479
Delfinidina-3-O-glucoside	465	Isoramnitina glucoronide	501
Petunidina-3-O-glucoside	479	Quercetin-3-(6"acetyl) glucoside	517
Malvidina-3-O-glucoside	493	Kaempferolo rutinoside	595
Peonidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	505	Rutina	611
Malvidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	535		
Cianidina-3-O-cumaril glucoside	595		
Peonidina-3-O-(6-O-cumaril) glucoside	609		
Cyanidina-3,5-O-diglucoside	611		
Delphinidin-3-O-cumaril glucoside	611		
Malvidina-3-O-(6-O-cumaril) glucoside	639		
Malvidina 3,5-O-diglucoside	655		
Malvina	655		
Malvidina-3-O-(6-O-cafeill)glucoside	655		
Delphinidina-3-O-cumaril glucoside-acido piruvico	679		

FLAVONI	m/z
Luteolina	287
Luteolina 3,7 diglucoside	611

In un recentissimo studio, Travaglia et al. (2008) hanno rilevato per primi la presenza di proantocianidine oligomere (fino a pentameri) e polimere (fino a decameri), ma nel loro lavoro non si fa riferimento a dati quantitativi, mentre si nota all'HPLC la presenza picchi di natura sconosciuta.

In questo lavoro di dottorato, nell'ultima parte dello studio si è voluto operare uno screening approfondito, seppure essenzialmente qualitativo, sulla frazione fenolica dell'estratto pellicolare di nocciola, puntando l'attenzione alla ricerca di componenti la cui presenza finora non è stata indagata. A tale proposito è stata condotta un'analisi LC/ESI-MS sul prodotto tal quale, previa solubilizzazione in metanolo. In **Tab. 18** si riporta l'elenco dei composti fenolici cercati, tra cui una nutrita serie di antociani/antocianidine, di cui si poteva supporre la presenza data la colorazione rossastra dell'estratto. Si è ricercata anche la presenza di stilbeni e di alcuni flavoni quali luteina e luteina-3,7-diglucoside. Inoltre, si è verificata la presenza di flavanoli oltre la catechina e l'epicatechina e di una serie di flavonoli agliconi e glicosidici. Il tutto per un totale di 51 composti fenolici.

Di tutti i composti cercati, l'analisi LC/ESI-MS ha rilevato la presenza di soli 7 componenti, quali catechina, epicatechina (la prima prevalente sulla seconda), procianidina B1, due dimeri un trimero ed un tetramero procianidinici oltre a tracce di quercetina. Il totale di tutti questi composti ha raggiunto appena gli 8 mg/g di estratto, a dimostrazione che, nonostante lo sforzo, le frazioni rappresentative della frazione fenolica contenuta negli estratti pellicolari di nocciola non sono state ancora evidenziate. Al di là della componente tannica altamente polimerizzata, per la quale oggettivamente esistono a tutt'oggi delle difficoltà analitiche, resta il mistero circa la quota non tannica, probabilmente rappresentata da flavonoidi poco comuni e quindi di difficile identificazione.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

La ricerca condotta nell'ambito della presente tesi di dottorato si è preposta di verificare la possibilità di impiegare i sottoprodotti di lavorazione della nocciola (gusci e perisperma) e di denocciolatura delle olive (endocarpo e mandorla) quali materie prime per l'ottenimento di estratti fenolici vegetali ad elevata attività antiossidante, da proporre all'industria alimentare e/o farmaceutica.

Dalla sperimentazione condotta su tali residui, sottoposti a lenta macerazione in presenza di solventi selezionati, in sintesi sono stati ottenuti i risultati di seguito riportati.

Sottoprodotti dell'oliva.

Per quanto riguarda la mandorla di oliva, i solventi più adatti si sono rivelati etanolo e metanolo all'80%, che pur dando rese di estrazione leggermente inferiori a quelle del metanolo puro (29-30% della massa sgrassata, contro il 33%), hanno fornito estratti grezzi con il più elevato contenuto fenolico (45 mg di AGE/g di estratto) ed i migliori risultati in termini di attività antiossidante. Anche per quanto concerne l'endocarpo legnoso, le due miscele idroalcoliche hanno consentito di ottenere, con una resa di circa il 4%, gli estratti più ricchi di fenoli totali (circa 80 mg di AGE/g di estratto) e ad attività antiossidante più elevata. A causa della scarsa purezza fenolica, gli estratti crudi ottenuti sia dall'endocarpo che dalla mandorla di oliva hanno tuttavia manifestato nel complesso un'attività antiossidante alquanto scadente. Al fine di ricavare efficienti preparati ad attività antiossidante da questi sottoprodotti, sarebbe dunque necessario procedere ad ulteriori stadi di arricchimento e purificazione degli estratti ottenuti con solventi. Tuttavia, considerando il limitato tenore fenolico della materia prima e le deboli rese di estrazione, tale evenienza appare di scarso interesse commerciale.

Sottoprodotti della nocciola.

I gusci di nocciola hanno fornito basse rese di estrazione (2.7-2.8%) ed estratti poveri di sostanze fenoliche (60-70 mg di AGE/g di estratto). Tra i solventi testati, i migliori risultati si sono ottenuti utilizzando acetone acquoso all'80%, che a parità di rese ha solubilizzato più fenoli. In confronto ai prodotti pellicolari e agli antiossidanti puri, gli estratti crudi dei gusci hanno rivelato una capacità antiossidante molto limitata. Anche

nel caso di questo sottoprodotto, quindi, non si prevede un proficuo impiego come materia prima per l'ottenimento di concentrati fenolici naturali.

I residui pellicolari di nocciola, in particolar modo quelli privati dei frammenti di endosperma, hanno invece fornito alte rese di estrazione (30-32%) ed estratti grezzi particolarmente concentrati in fenoli totali (fino a 743 mg di AGE /g di estratto), dalle ottime proprietà antiossidanti. La frazione fenolica è risultata caratterizzata da una cospicua componente tannica (circa il 60%). Tra i solventi testati, l'etanolo acquoso all'80% è risultato il più efficiente.

Dalla valutazione dell'attività antiossidante *in vitro*, a carico degli estratti ottenuti dal perisperma delle nocciole sono emerse ottime proprietà riducenti ed eccellenti attività *radical-scavenging*, generalmente superiori a quelle rilevate nei più comuni antiossidanti di sintesi e naturali utilizzati dall'industria. L'estratto è risultato inoltre dotato di attività chelante nei confronti del ferro.

Gli studi condotti *in-vivo* hanno rivelato un'evidente attività biologica dell'estratto pellicolare, che è stato in grado di migliorare il potenziale antiossidante del plasma nei ratti che se ne sono alimentati.

Le prove di stoccaggio hanno dimostrato che l'estratto pellicolare di nocciola può essere conservato a temperatura ambiente per diversi mesi, mantenendo la sua capacità antiossidante a livelli elevati.

Tale sottoprodotto costituisce dunque la più promettente tra le materie prime testate, dimostrando di essere un'ottima fonte per l'ottenimento di concentrati fenolici naturali ad attività antiossidante particolarmente potente.

Sulla scorta dei risultati di questo lavoro di dottorato, si può ipotizzare che il preparato fenolico estratto dalle pellicole di nocciola potrebbe trovare ampie applicazioni da parte dell'industria alimentare (additivo naturale per l'industria di trasformazione), cosmetica (in pillole o aggiunto in formulazioni cosmetiche varie) e farmaceutica (ingrediente per integratori alimentari).

CAPITOLO 6

BIBLIOGRAFIA

- Alasalvar, C., Karamac, M., Amarowicz, R., Shahidi, F. Antioxidant and antiradical activity in extracts of hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and in hazelnut green leafy cover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4826-4832, (2006).
- Anafas'ev I. B., Ostrakhovitch E. A., Mikhal E. V., Ibragimova G. A., Korkina G. *Biochem. Pharmacol.* 61: 677-683, (2001).
- Andrade R. G., Ginani J. S., Lopes G. K. B., Dutra F., Alonso A., Hermes-Lima M. Tannic acid inhibit in vitro iron-dependent free radical formation. *Biochimie* 88: 1287-1296, (2006).
- Amarowicz, R., Troszyńska, A., Shahidi, F. Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. *Journal of Food Lipids*, 12: 344-358, (2005).
- Amarowicz R., Troszynska A., Barylko-Pikielna, Shahidi F. Polyphenolics extracts from legume seeds: correlations between total antioxidant activity, total phenolics content, tannins content and astringency. *Journal of Food Lipids* 11: 278-286, (2004).
- Ames B. N., Shigenaga M. K. Oxidants are a major contributor to aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663: 85-96, (1992).
- Amin I., Mukhrizah F. Antioxidant capacity of methanolic and water extracts prepared from food-processing by-products. *J. Sci. Food Agric.* 86: 778-784 (2006).
- Anderson A., Dimberg L. H., Lipids and antioxidants in groats and hulls of Swedish oats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 606-614, (2002).
- Andreoni A. Hazenult phenolic substances as natural antioxidants. Proceedings of the Fourth Int. Symp. Hazenult, *Acta Hort.* 445: 217-221 (1997).
- Arnao, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using cromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology*, 11: 419-421, (2000).
- Bambdad F., Kadivar M., Keramat j. Evaluation of phenolic content and antioxidant activity of Iranian caraway in comparison with clove and BHT using model systems and vegetable oil. *International Journal of Food Science and Technology* 41: 20-27, (2006).

- Benzie I. F. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur. Journ. of Nutr.* 39: 53–61, (2000).
- Benzie F. F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochem* 239: 70-76, (1996).
- Berliner J. A., Heinecke J. W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, 20: 770-777, (1996).
- Bignami, C., Cristofori, V., Troso D. Kernel quality and composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. Proceedings of the VIth International Congress on Hazelnut, *Acta Horticulturae*, 686: 477-484, (2005).
- Bignami C. Dinamica della composizione del seme di tre cultivar di nocciolo (*Corylus avellana* L.) durante lo sviluppo del frutto” Atti del 2° Convegno Nazionale sul Nocciolo. Giffoni V.P Ottobre (2002).
- Block G., Jensen C., Dietrich M., Norkus E. P., Hudes M., Packer L. Plasma C-reactive protein concentrations in active and passive smokers: Influence of antioxidant supplementation. *Journal of the American College of Nutrition.* 23(2): 141–147, (2004).
- Bocco A. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peels and seed extracts. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2123-2129 (1998).
- Böhm F., Edge R., Lange L., Truscott T. G. Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 44: 211–21, (1998 b).
- Böhm, F., Edge, R., McGarvey D. J., Truscott, T. G. Beta-carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NOx. *FEBS Lett.* 436: 387–389, (1998 a).
- Brand-Williams W., Cuvelier, M. E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 28(1): 25-30, (1995).
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutritional Revue*, 56: 317-333, (1998).
- Briante R. Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the Mediterranean diet. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6975-6981 (2003).
- Buenger, J., Ackermann, H., Jentzsch, A., Mehling, A., Pfltzner, I., Reiffen, K. A., Schroeder, K. R., Wollenber, U. An interlaboratory comparison of methods used to

- assess antioxidant potentials. *International Journal of Cosmetic Science*, 28: 135-146, (2006).
- Busserolles J., Gueux E., Balasin'ska B., Piriou Y., Rock E., Rayssiguier Y., Mazur A. International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Vol. 76, 1: 22-27, (2006).
- Cao G., Alessio H., M., Cutler R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biological Medicine* 14: 303-311, (1993).
- Cao G., Prior R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 44: 1309-1315, (1998).
- Cappella P., Lercker G. La chimica dei lipidi: cinetica dell'autossidazione. *Riv. Ital. Sost. Grasse* vol. LXIX, (1992).
- Carratù B., Sanzini E. Sostanze biologicamente attive negli alimenti di origine vegetale. *Ann Ist Super Sanità* 41(1): 7-16, (2005).
- Cassidy A. Physiological effects of phytoestrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc. Symp. On Physiologically Active Substances in Plant Foods (Non-Nutrive Nutrient)*; Cambridge University Press: London, (1996).
- Castelluccio C., Paganga G., Melikian N., Bhaktiar C., Bolwell G. P., Pridham J., Sampson J., Rice-Evans C. A. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Letters* 368: 188-192, (1995).
- Cavaliere C., Foglia P., Gubbiotti R., Sacchetti P., Sampieri R., Laganà G. Rapid-resolution liquid chromatography/mass spectrometry for determination and quantification of polyphenols in grape berries. *Rapid communication in mass spectrometry*. 22: 3089-3099, (2008).
- Cestaro B. Per una vita inossidabile. *Etas Libri-RCS Medicina*. (1994).
- Chen C. H., Pearson A. M., Gray J. I. Effects of synthetic antioxidants (BHT, BHA and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry*. 43: 177-183, (1992).
- Chen C. H., Fischer A., Reagan J. D., Yan L. J., Ames B. N. Oxidative damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92: 4337-4341, (1995).
- Chu Y. F., Sun J., Wu X., Liu R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6910-6916, (2002).

- Chung Y. C., Chang C. T., Chao W. W., Lin C. F. Chou S. T. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50: 2454-2458, (2002).
- Chung K.-T., Wong T. Y., Wei C.-I, Huang Y.-W., Lin Y. Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in food Science and Nutrition*, 38: 421-464 (1998).
- Cook N. C., Samman S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7: 66–76, (1996).
- Cottier H., Hodler J., Kraft R. Oxidative stress: pathogenetic mechanisms. *Forsch Komplementärmed*, 2: 233–239, (1995).
- Cren-Olive C., Wierenlesky J. M., Maas E., Roland C. Catechin and epicatechin deprotonation followed by CNMR. *Tetrahedron Letters*, 43: 4545-4549, (2002).
- Cuvelier E. Molécules antioxydantes relations structure-activité. *Publiée lors des 16èmes Journées Internationales Huiles Essentielles de DIGNE les BAINS*, 201-211, (1997).
- Czeczot H. Biological activities of flavonoids-A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 950(4): 3–13, (2000).
- Davey M. W., van Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N. Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 825–860, (2000).
- Decker, E.A. and Welch, B. 1990. Role of ferritina as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.* 38: 74-677, (1990).
- De Leonardis, A., Macciola, V., Di Domenico, N. A first pilot study to produce a food antioxidant from sunflower seed shells (*Helianthus annuus*). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107: 220-227, (2005).
- De Leonardis A., Macciola V. Natura e proprietà antiossidanti di fenoli estratti da un olio extra-vergine di oliva e suoi sottoprodotti. *Ingredienti alimentari* 26: 6-14, (2006).
- Deprez S., Brezillon C., Rabot S., Philippe C., Mila I., Lapierre C., Scalbert A. Polymeric proanthocyanidins are catalized in human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *Journal of Nutrition*, 130: 2733-2736, (2000).
- D'Archivio M., Filesì C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella M. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. 43: 348-361, (2007).

- Donovan J. L., Meyer A. S., Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1247-1252, (1998).
- Duh Y. G., Yen H. P. Antioxidative activity of three herbal ater extracts. *Food Chemistry* 60: 639-645, (1997).
- Fernàndez-Bolanos J., Rodrìguez G., Heredia A. Production in large quantities of highly purified Hydroxityrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or Alperujo. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6804-6811 (2002).
- Frankel E. N., Kanner J., German J. B., Parks E., Kinsella J. E. Inhibition of oxidation of human low density lipoproteins by phenolic substances in red wine. *Lancet* 43: 454-457, (1993).
- Fine A. M., Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and pharmaceutical applications. *Alternative Medicine Review*. 5: 144-151, (2000).
- Gardner P. T., White T. A., Duthie G. G. The relative contribution of vitamine C, carotenids and phenolics to the antioxidants potential of fruit Juices. *Food Chem.* 68: 471-474, (2000).
- Geletii Y. V., Balavoine G. G. A., Efimov O. N., Kulikova V. S. The Determination of Total Concentration and Activity of Antioxidants in Foodstuffs. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 28 (6): 501–514, (2002).
- George B., Kaur C., Khurdiya D. S. Antioxidants in tomato as a function of genotype. *Food Chemistry*. 84: 45-51, (2004).
- Gil M., Hess-Pierce B., Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum culticars from California. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 50: 4976-4982, (2002).
- Goli A., Barzegar M. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio hull extracts. *Food Chemistry*. 92: 521-525, (2005).
- Gorinstein M., Martin B., Park J. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*. 74: 309-315, (2001).
- Gorinstein M., Martin B., Park J. Comparative content of some phytochemicals in Spanish Apples, peaches and pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82: 1166-1170, (2002).

- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., Sakariah, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*. 73: 285-290, (2001).
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., Riechel, T. L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 1887-1892, (1998).
- Halliwell B. Antioxidant characterization – methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 49 (10): 1341-1348, (1995).
- Halliwell B. Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*. 53: 715S–724S (1993).
- Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition* 16: 33–50, (1996).
- Halliwell B., Gutteridge J. M. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal* 219: 1-4, (1984).
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85, (1990).
- Harborne J. B. Plant phenolics in Methods in plant biochemistry. *Academic Press Harcourt Brace Jovanovich*, vol. 1, XII, London. (1989).
- Havsteen B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 96: 67-202, (2002).
- Heim K., Tagliaferro A. R. e Bobilya D. J. Flavonoid antioxidant: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13: 572-584, (2002).
- Hidalgo A., Brandolini A., Pompei C., Piscozzi R. Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.). *J. of Cereal Science* 44: 182–193, (2006).
- Hollman P. C. H., Hertog M. G. L., Katan M. B. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*. 57(1): 43–46, (1996).
- Hsu Chin-Lin. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chem.* 83: 85-92, (2003).
- Ioku K., Tsushida T., Takei Y., Nakatani N., Terao J. Antioxidant activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1234: 99-104, (1995).

- IMPEL: Olive oil project. <http://ec.europa.eu/environment/impel/index.htm> (2005).
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vourela, J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 3954-3962, (1999).
- Kamath, V., Rajini, P. S. The efficacy of cashew (*Anacardium occidentale* L) skin extract as a free radical scavenger. *Food Chemistry*. 103: 428-433, (2007).
- Kaur C., Kapoor H. C. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*. 37: 153-161, (2002).
- Kim, S. Y., Kim, J. H., Kim, S. K., Oh, M. J., Jung, M. Y. Antioxidant activity of selected oriental herb extracts. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 71: 633-640, (1994).
- Kim S.-Y., Jeong S.-M., Park W.-P., Nam K. C., Ahn D. U., Lee S.-C. Effect of heating condition of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food Chemistry* 97: 472-479, (2006).
- Khokhar S., Apenten R. K. O., Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. *Food Chemistry* 81: 133-140, (2003).
- Kroon P. A., Clifford M. N., Crozier A., Day A. J., Donovan J. L. Manach C., Williamson G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*?. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80: 15-21, (2004).
- Kubicka E., Jedrychowski L., Amarowicz R. Effect of phenolic compounds extracted from sunflower seeds on native lipooxygenase activity. *Grasas y Aceites*. 50: 127-130, (1999).
- Kuntz S., Wenzel U., Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*. 38(3): 133-142, (1999).
- Jayaprakasha G. K. Antioxidant activity of grape seed *Vitis vinifera* extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem*. 73: 285-290 (2001).
- Lacertosa G., Cellini F., Tramontano E., Acito E., Merendino A. Confronto fra oli extravergine tradizionali e da drupe denocciolate. *L'informatore agrario*. 36: 61-64, (2003).

- Lakenbrink C., Maiwald B., Engelhardt U. H. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2848-2852, (2000).
- Lampi A. M., Kamal-Eldin A., Piironen V. Tocopherols and tocotrienols from oil and cereal grains. In: J. Shi, G. Mazza, M. LeMaguer, (Eds.) *Functional food—Biochemical and processing aspects*. Boca Raton, FL: CRC Press LLC, (2002).
- Le K., Chiu F., Ng K. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry* 105: 353-363, (2007).
- Li Y., Guo C. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extracts in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*. doi:10.1016/j.foodchem.2005.02.033. (2005).
- Liegeois, C., Lermusieau, G., & Collin, S. Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 1129-1134, (2000).
- Liviero L., Puglisi P., Morazzoni P., Bombardelli E. Antimutagenic activity of proanthocyanidins from *Vitis Vinifera*. *Fitoterapia*. 65: 203-209 (1993).
- Llorach, R., Espin, J. C., Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F. Valorization of Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) by-products as a source of antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 51: 2181-2187, (2003).
- Loomis, W, D., Battaile, J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*, 5: 423-438, (1966).
- Lo Scalzo R., Scarpati M. L., Verze gnassi B., Vita G. Olea Europea chemicals repellent to *Dacus oleae* females. *J. Chem. Ecol.* 20(8): 1813-1823, (1994).
- Lotti G. Principi di chimica e biochimica vegetale. *ETS Editrice, Pisa*. (1985).
- Lun Sun Y., Kwok Leung L., Huang Y., Chen Z.-Y. Stability of teaflavins and catechins. *Food Chem.* 83: 189-195, (2003).
- Luximon-Ramma A., Bahouron T., Crozier A. Antioxidant action and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83: 496-502, (2003).
- Madhavi D. L., Salunkhe D. K., Food Antioxidants. Dekker, New York, (1995).

- Maestro-Duràn R., Lèon-Cabello R., Gutierrez R., Fiestas P. A., Roncero V. Glùcosidos fenòlicos amargos de las semillas del olivo. Instituto de la Grasa, *Grasas y Aceites*. 45(5): 332-336, (1994).
- Makkar, H. P. S. Quantification of tannins in tree foliage. A laboratory manual. Ed. H. P. S. Makkar. FAO/IAEA Working Document, Vienna (Austria), (2000).
- Malesev D., Kuntic V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of Serbal Chemistry Society* 72: 921-939, (2007).
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. Polyphenols: food source and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79: 727-247, (2004).
- Marinova, E. M., & Yanishlieva, N. V. Antioxidant activity of extracts from selected species of the family Laminaceae in sunflower oil. *Food Chemistry*. 58: 245-248, (1997).
- Mayne S. T. Beta-carotenoids, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J*. 10: 690-701, (1996).
- Miller N. J., Diplock A. T., Rice-Evans C.A. Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. *J. Agric. Food Chem*. 43: 1794-1801, (1995).
- Miller N. J., Rice-Evans C. A. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*. 2: 161-168, (1996).
- Miller H. E., Rigelhof F., Marquart L., Prakash A., Kanter M. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *Journal of the American College of Nutrition*. 19: 312S–319S, (2000).
- Miller D. D. Mineral. In: Fannema, O. R. (Ed.), *Food Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 618-649.
- Minussi G., Rossi F., Bologna B., Cordi F., Rotilio L. Phenolic compounds and antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*. 82: 409-416, (2003).
- Mira L., Fernandez T. M., Santos M., Roche R., Florenico H. M., Jennings K. R. interaction of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Rad. Res*. 36: 1199-1224, (2002).
- Mitscher L. A., Young M., Shankel D., Dou J. H., Steele L., Pillai S. P. Chemoprotection: A review of the Potential Therapeutic Antioxidant Properties of

- Green Tea (*Camelia sinensis*) and Certain its Constituents. *Med. Res. Rev.* 17: 327-365, (1997).
- Mortensen A., Skibsted L. H., Truscott T. G. The Interaction of Dietary Carotenoids with Radical Species. *Arch. Biochem. Biophys.* 385: 13–19, (2001).
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., Lema, J. M. Evaluation .of extracts from *Genuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural & Food Chemistry.* 48: 3890-3897, (2000).
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., Parajó, J. C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry.* 72: 145-171, (2001).
- Naczki, M., Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis.* 41: 1523-1542, . (2006).
- Namiki M. Antioxidant/antimutagens in food. *CRC Crit Rev Food Sci. Nut.* 29: 273-300 (1990).
- Nepote, V., Grosso, N. R., Guzman, C. A. Extraction of antioxidant components from peanut skins. *Grasas y Aceites.* 54: 391-395, (2002).
- Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Amer. J. Nutr.* 54: 1119S-1124S, (1991).
- Niki E., Noguchi N., Tsuchihashi H., Gotoh N. Interaction among vitamin C., vitamin E., and beta-carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1322S-1326S, (1995).
- Nilsson J., Piaai D., Onning G., Persson C., Nilsson A., Akesson B. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to asses the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetable. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 239-246, (2005).
- Obied H. K., Allen S. M., Robards K., Bedgood D. R., Prenzler P. D., Stockmann R. Bioactivity and analisis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53: 823-837, (2005).
- Oomah B. D., Mazza G. Phenolic acids in flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 43: 2016-2019, (1995).
- Onyeneho, S. N., Hettiarachchy, N. S. Antioxidant activity of durum wheat bran, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 40: 1496-1500, (1992).

- Osawa T., Namiki M. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. Identification of isovitexin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37: 316-319, (1989).
- Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *J Nutr*. 44: 307-315. (1986).
- Palozza P. Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. *Nutr. Rev*. 56: 257-265. (1998).
- Peterson M. D. Oat antioxidant. *Journal of Cereal Science*. 33: 115-129, (2001).
- Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63: 1035-1042, (2000).
- Puravankara F., Sharma A. Effects of antioxidant principles isolated from mango seeds kernels on oxidative stability of buffalo ghee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 522-526, (2000).
- Prior R. L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem*. 53 (10): 4290-4302, (2005).
- Rajalakshmi S., Narasimhan S. in Food Antioxidants, Madhavi D. L., Deshpante S. S., Salunkhe D.K. Eds. Cap. 3 Marcel Dekker, USA, (1996).
- Ranalli A., Lucera L., Contento S. Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil mill wastewater. *Journal of Agricultural and food Chemistry* 51(26), 7636-7641, (2003).
- Rapisarda P., Tomaino A., Lo Cascio A. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 4718-4723, (1999).
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med*. 26: 1231-1237, (1999).
- Re R. Antioxidant/antimutagens in food. *CRC Crit Rev Food Sci. Nut*. 29: 273-300 (1990).
- Renaud S. C., Gueguen R., Schenker J., Houtaud A. Alcohol and mortality in middle aged men from eastern France. *Epidemiology*. 9: 184-188, (1998).

- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Bolwell P. G., Bramley P. M., Phridham J. B. The relative antioxidant activity of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*. 22: 375-383, (1995).
- Rice-Evans C. A., Sampson J., Bramley P. M., Holloway D. E. Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo*. *Free Radical Research*. 26: 381–398, (1997).
- Rios L. Y., Bennett R. N., Lazarus S. A., Remesy C., Scalbert A., Williamson G. Cocoa Procyanidins are stable during gastric transit in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 76: 1106-1110, (2002).
- Robards K., Antolovich M. Analytical chemistry of fruits bioflavonoids A review. *Analyst*. 122: 11R-34R, (1997).
- Rovellini P., Cortesi N., Fedeli E. Ossidazione dei lipidi. *Riv. Ital. Sost. Grasse* vol. LXXIV, (1997).
- Salah N., Miller N. J., Paganga G. G., Tijburg L., Rice-Evans C.A. Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys*. 322: 339-346, (1995).
- Samman S., Sandstrom B., Toft M., Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 607-612, (2001).
- Sanchez-Moreno C. Larrauri J. A. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic compounds. *Food Research International*. 32: 407-412, (1999).
- Scalbert A. Williamson G. Dietary Intake Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*. 130: 2073S-2085S, (2000).
- Schieber A., Slintzing F. C. By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends in Food Science and Technology*. 12: 401-413, (2001).
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*. 36: 177-187, (2002).
- Senter, S. D., Horvat, R. J., & Forbus, W. R. Comparative GLC-MS analysis of phenolic acids of selected tree nuts. *Journal of Food Science*, 48, 798-799, (1983).
- Servili M., Esposto S., Selvaggini R., Urbani S., Taticchi A., Montedoro G. F. Effetto del processo della denocciolatura sulla qualità degli oli vergini di oliva e dei prodotti

- secondari dell'estrazione meccanica. Atti del Seminario dell'Istituto Sperimentale per l'elaiotecnica. Prodotto Valorolio. Città di Sant'Angelo 21 Settembre 2006
- Sies H., Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1315S – 1321S, (1995).
- Shahidi F., Wanasundara P. D. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 67-103, (1992).
- Shahidi F., Naczk M. Food Phenolics sources chemistry effects applications. *Technomic Publishing Company, USA*, 109-114, 171-191, 235-273, 281-313, (1995).
- Shahidi, F., Alasalvar, C., & Liyana-Pathirana, C. M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and in hazelnut byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 1212-1220, (2007).
- Sherwin E. R., Antioxidants. In A. L. Branen, P. M. Davidson & S. Salminen. Food Antioxidants. New York: Marcel Dekker Inc.(1990).
- Shrikhande A. J. Wine by-products with health beneficts. *Food Res. Int.* 33: 469-474, (2000).
- Singh N., Rajini P. S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chemistry* 85: 611-616 (2004).
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158, (1965).
- Siriwardhana S. S. K. W., Shahidi F., Antiradical activity of extracts of almond and its by-products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 79: 903-908, (2002).
- Someya S., Okubo K. Antioxidant compounds of bananas. *Food Chemistry*, 88, 411-417, (2002).
- Soong Y-Y, Barlow P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem* 88; 411-417, (2004).
- Spencer J. O., Schroeter H., Shenoy B., Srai S. K., Debnam E., Rice-Evans C. Epicatechin is the primary bioavailable form of procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 285: 593-593, (2001).
- Stahl W., Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24: 345-351, (2003).

- Stahl W., Sies H. Protection against solar radiation—protective properties of antioxidants. In: *Giacomoni, P.U. (Ed.), Sun Protection in Man. Elsevier Science BV.* 561-572, (2001).
- Stampfer M. J., Rimm, E. B. Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition.* 62: 1365–1369, (1995).
- Stévigni, C., Rolle, R., Valentini, N., Zeppa, G. Optimization of extraction of phenolic content from hazelnut shell using response surface methodology. *Journal of the Science of Food Agriculture.* 87: 2817-2822, (2007).
- Stocker R. Dietary and pharmacological antioxidants in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 10: 589–597, (1999).
- Siriwardhana S. S. K W., Shahidi F. Antiradical activity of extracts of Almond and its by-products. *Journ. Of the Am. Oil Chem. Society.* 79: 903-908, (2002).
- Sun J., Chu Y. F., Wu X., Liu R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50: 7449-7454, (2002).
- Surrey K. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiol.* 39: 65-70, (1964).
- Tabart J., Kevers C., Sipel A., Pincemail J., Defraigne J.-O., J. Dommes. Optimisation o extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and stability during storage. *Food Chem.* 105: 1268-1275, (2007).
- Takeoka G., Dao, L. T. Antioxidant constituents oh almond hulls. *Journal of Agricultural & Food Chemistry.* 51: 496-501, (2002).
- Tang S.Z., Kerry J.P., Sheehan D., Buckley D.J. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry,* 76: 45-51, (2002).
- Temple N. J. Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research* 20: 449–459, (2000).
- Theriault A., Chao J. T., Wang Q., Gapor A., Adeli K. Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. *Clinical Biochemistry.* 32: 309–319, (1999).
- Thompson D. C., Trush M. A. Sch.Hyg. Public Health, Johns Hopkins Univ., Baltimore, MD, USA. *Food and Chemical Toxicology.* 24(10-11): 1189-1195, (1986).

- Toor L., Savage P. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Research International*. 33: 461-467, (2005).
- Travaglia, F., Coisson J. D., Arlorio M., Locatelli M., Bordiga M., Bennett R. N., Stévigny C., Martelli A. Proanthocyanidin content and total antioxidant capacity of Tonda Gentile delle Langhe (TGL) hazelnut seed skin. *7th International Congress on Hazelnut*. Viterbo, Italy, 23– 27 Giugno, (2008).
- Travaglia, F., Locatelli, M., Stévigny, C., Coisson, J. D., Benedett, R., Arlorio, M., Martelli, A. Chemical characterization and antioxidant activity of polyphenolic fraction from *Corylus avellana* L seeds husk. *Proceedings of the VIIth CISETA, Cernobbio (CO)*, 786-791, (2005).
- Truscott T. G. The photophysics and photochemistry of the carotenoids. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 6: 359-371, (1990).
- Tsuda T., Ohshima K., Kawa kishi S., Oswa T. Antioxidant pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.* 42: 248-251, (1994).
- Van Der Loo B., Bachschmid M., Spitzer V., Brey L., Ullrich V., Luscher T. F. Decreased plasma and tissue levels of vitamin C in rat model of aging: implications for antioxidative defense. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 303: 483-487, (2003).
- Villaño, D., Fernández-Pachón, S., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2005). Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analytica Chimica Acta*. 538: 391-398.
- Vismanatrlan P., Sriram V. *J. Agric Food Chem.* 48: 2802, (2000).
- Wang H., Cao R. L., Prior J. Total Antioxidant Capacity of Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 701-705, (1996).
- Watanabe M., Ohsita Y. Antioxidant compounds from buckwheat hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 1039-1044, (1997).
- Wisemann H., Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progressive to cancer. *Biochem. Journ.* 313: 17-29, (1996).
- Wijeratne S. S. K., Amarowicz R., Shahidi F. “Antioxidant activity of almonds and their by-products il food model systems”. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83: 223-230, (2006).

- Wright J. S., Johnson E. R., DiLabio G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 1173-1183, (2001).
- Yen, W.-J., Chang, L.-W., Duh, P.-D. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie.* 38: 193-200, (2005).
- Yilmaz, Y. Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science and Technology.* 17: 64-71, (2006).
- Yoshida Y., Niki E., Noguchi N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and Physics of Lipids* 123: 63–75, (2003).
- Young A. J., Lowe G. M. (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 385: 20-27. (2001).
- Yu, J., Ahmedna, M., & Goktepe, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chemistry.* 90: 199-206, (2005).
- Yurttas, H. C., Schafer, H. W., & Warthesen, J. J. Antioxidant activity of nontocopherol hazelnut (*Corylus spp.*) phenolics. *Food Chemistry and Toxicology.* 65: 276-280, (2000).
- Zhu Q. Y., Huang Y., Chen Z. Y. Interaction between flavonoids and N-tocopherol in human low density lipoprotein. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 11: 14–21, (2000).
- Zile M. H. Vitamin A and embryonic development: an overview. *The Journal of Nutrition.* 128: 455S–458S, (1998).

ABSTRACT (ITALIANO)

In questo lavoro di dottorato è stata verificata la possibilità di impiegare i residui di lavorazione della nocciola (gusci e perisperma) e di denocciolatura delle olive (endocarpo e mandorla) quali materie prime per l'ottenimento di nuovi antiossidanti fenolici naturali. La prima fase dello studio ha riguardato la messa a punto di una procedura di estrazione per macerazione a freddo in presenza di diversi solventi. Sono state valutate le rese di estrazione e, sugli estratti grezzi ottenuti, sono stati determinati i fenoli totali e tannici, l'attività antiradicalica e antiperoossidica (test DPPH e AAPH) e gli spettri all'UV. Tra i sottoprodotti testati, i residui pellicolari di nocciola hanno fornito la più elevata resa di estrazione ed estratti grezzi con un tenore fenolico eccezionalmente elevato ed attività antiossidante particolarmente potente (simile o superiore a quella del BHA, BHT, Trolox e α -tocoferolo). Lo studio è quindi proseguito concentrando l'attenzione sugli estratti ottenuti dalla macerazione con EtOH 80% dei residui pellicolari di nocciole tostate, con l'intento di valutarne più a fondo le caratteristiche e le potenzialità applicative. È stata pertanto determinata l'attività chelante il Fe^{II} e quella riducente il Fe^{III} , nonché l'attività antiossidante *in vivo* mediante test condotti su cavie. Sono state inoltre effettuate prove di stabilità dell'estratto nel corso della conservazione a diverse temperature (-18°C, 4°C, temperatura ambiente).

ABSTRACT (INGLESE)

This doctorate study concerns the possibility of using the by-products of hazelnut processing (shell and perisperm) and olive destoning (endocarp and seed) as raw materials for obtaining new natural phenolic antioxidants. The first phase of the study concerned the optimisation of cold extraction in different solvents, by evaluating: extraction yields, total phenols and tannins of the extracts, antiradical and antiperoxyl activity (DPPH and AAPH test); UV spectra. Among the by-products tested, the hazelnut skin residue supplied the highest extraction yield plus raw extracts with the richest phenolic content provided with the strongest antioxidant activity (similar or superior to BHA, BHT, Trolox and α -Tocopherol). Research activity continued by concentrating on the extracts obtained through maceration with 80% ethanol from hazelnut skin residue, discreet in order to effect a careful study of their characteristics and practical potential. Fe^{II} chelating and Fe^{III} reducing activities were determined, as well as the *in vivo* antioxidant activity by tests carried out on rats. Stability of the hazelnut skin phenolic extract during storage at different temperatures (-18°C, 4°C, and room temperature) were also effected.