

**UNIVERSITÀ CA' FOSCARI DI VENEZIA**

in cotutela con

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO" (BRASILE)**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE, XXIII CICLO**

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE E TECNOLOGIE**

**(A. A. 2010)**

**MISURA DELLE PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI  
DI PRODOTTI TIPICI DELL'AGROALIMENTARE;  
PROGETTAZIONE E MESSA A PUNTO DI  
BIOSENSORI**

**SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE DI AFFERENZA: BIO/10**

**TESI DI DOTTORATO DI ELENA GREGORIS, MATRICOLA 955483**

Direttore della Scuola di Dottorato:

Prof. PAOLO UGO

Tutori del dottorando:

Prof. ROBERTO STEVANATO

Profa. GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA



# INTRODUZIONE

La presente tesi fa parte di un progetto finanziato dal Ministero dell'Università e della Ricerca, con una borsa di studio aggiuntiva, legata alla tematica: "Valorizzazione dei prodotti tipici dell'agroalimentare e sicurezza alimentare attraverso nuovi sistemi di caratterizzazione e garanzia di qualità", per un dottorato in cotutela tra l'Università Ca' Foscari di Venezia e l'Universidade Estadual Paulista (UNESP), di San Paolo, in Brasile. Il progetto prevede in particolare la misura delle proprietà antiossidanti di prodotti tipici dell'agroalimentare e la progettazione e messa a punto di biosensori.

Gli obiettivi di questo progetto sono: i) la determinazione del contenuto di antiossidanti di prodotti tipici della dieta mediterranea utilizzando differenti metodiche di misura; ii) lo studio delle modificazioni delle proprietà di membrana causate da molecole contenute negli alimenti. In questa tesi si studia il potere antiossidante di frutta, tipico componente della dieta mediterranea e del propoli che, pur non essendo un alimento, è sempre più utilizzato come additivo alimentare o rimedio naturale, per le sue proprietà antibatteriche, antivirali e antiossidanti.

In generale, per la valutazione del potere antiossidante di alimenti, vengono utilizzati vari metodi *in vitro*, che si basano su principi chimici differenti ed utilizzano tecniche di determinazione variabili (spettrofotometriche, elettrochimiche, ecc). Scopo di questo studio è anche quello di effettuare una valutazione critica su idoneità, affidabilità e applicabilità dei metodi più estesamente utilizzati, riportati in letteratura. Lo studio delle proprietà chelanti degli antiossidanti naturali e la determinazione della perossidazione lipidica tramite formazione di doppi legami, previsti nel piano di lavoro iniziale, non vengono affrontati, in quanto si è ritenuto molto più utile studiare la correlazione tra la struttura chimica di molecole naturali contenute negli alimenti con il loro potere antiossidante e, alla luce di ciò, indagare più approfonditamente i meccanismi chimico-fisici che stanno alla base dei diversi metodi di misura.

Il periodo trascorso presso l'Istituto di Bioscienze dell'Università Statale di San Paolo (ottobre 2009-aprile 2010) ha permesso di integrare i risultati del lavoro effettuato su alimenti locali con quelli ottenuti applicando gli stessi metodi su prodotti tropicali. L'importanza di questa indagine risiede nel fatto che il potere antiossidante di alcuni dei frutti tropicali presi in esame non è mai stato finora analizzato, a causa della scarsa diffusione di tali alimenti all'interno del Paese.

Nell'ottica di poter utilizzare la tecnica dei biosensori per la determinazione del potere antiossidante negli alimenti, si è proceduto alla progettazione e messa a punto di un biosensore amperometrico. I metodi discussi nella Parte I, infatti, sono largamente utilizzati, ma richiedono strumentazione adatta, manualità specializzata e tempi di analisi in alcuni casi lunghi; la tecnologia dei biosensori permette invece di ottenere risultati in tempi più brevi, limitando le procedure operative di preparazione del campione. Il progetto, nel suo complesso, ha come obiettivo finale la messa a punto di un biosensore per la determinazione dei polifenoli direttamente nella matrice alimentare. Nell'ambito del lavoro di questo periodo di tesi si è

svolta la prima fase del progetto; ovvero la costruzione di un biosensore amperometrico basato sull'enzima laccasi, mettendo a punto la tecnica di immobilizzazione dell'enzima su una superficie d'oro, identificando le condizioni operative ottimali e verificando il corretto funzionamento del sistema con un polifenolo standard.

# SOMMARIO

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>SOMMARIO</b>	<b>3</b>
<b>LISTA DEGLI ACRONIMI</b>	<b>9</b>

## **PARTE I. MISURA DELLE PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI DI PRODOTTI TIPICI DELL'AGROALIMENTARE**

<b>1 - Gli antiossidanti -</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Introduzione</b>	<b>13</b>
1.1.1 Lo stress ossidativo e le specie reattive dell'ossigeno	13
1.1.2 Formazione e reattività dei ROS	14
1.1.3 Mutazioni del DNA ad opera dei ROS	15
1.1.4 La perossidazione lipidica	15
1.1.5 Effetto dei ROS sulla salute umana	18
1.1.6 Le radiazioni ultraviolette	19
1.1.7 I metalli di transizione	20
1.1.8 Il <i>French paradox</i> e la dieta mediterranea	21
<b>1.2 Classificazione degli antiossidanti</b>	<b>22</b>
1.2.1 Antiossidanti endogeni	23
1.2.2 Antiossidanti esogeni	24
1.2.2.1 Vitamine	24
1.2.2.2 Antiossidanti non vitaminici	25
<b>1.3 I polifenoli</b>	<b>27</b>
1.3.1 I flavonoidi	29
1.3.2 Acidi fenolici	32
1.3.3 Alcoli fenolici	32
1.3.4 Stilbeni	33
1.3.5 Lignani	33
<b>1.4 Metodi in vitro per lo studio chimico-fisico degli antiossidanti</b>	<b>34</b>
1.4.1 Capacità di scavenger nei confronti di ROS o RNS	34
1.4.1.1 Metodo ORAC	35
1.4.1.2 Metodo TRAP	35
1.4.1.3 Inibizione della perossidazione lipidica	36
1.4.1.4 Capacità di scavenger nei confronti di altri ROS/RNS	36
1.4.2 Capacità di scavenger nei confronti di radicali non biologici stabili	37
1.4.2.1 Metodo ABTS	37
1.4.2.2 Metodo DPPH	39
1.4.3 Altri metodi per la determinazione del potere antiossidante	40
1.4.3.1 Metodo Folin-Ciocalteu	40
1.4.3.2 Saggio FRAP	41
1.4.3.3 metodi elettrochimici	42
1.4.4 Determinazione di singole categorie di antiossidanti	43

1.4.4.1	Metodo enzimatico per la determinazione del contenuto di polifenoli totali	43
1.4.4.2	Metodo dell'alluminio cloruro per la determinazione dei flavonoidi	44
1.4.4.3	Metodo della DNPH per la determinazione dei flavonoidi	45
1.4.4.4	Metodo della DNPH per la determinazione dell'acido ascorbico	46
<b>1.5</b>	<b>Studio delle interazioni di membrana</b>	<b>46</b>
1.5.1	Coefficiente di ripartizione	47
1.5.2	Studio delle interazioni di membrana tramite calorimetria differenziale a scansione (DSC)	48
1.5.3	Studio delle interazioni di membrana tramite risonanza di spin elettronico (ESR) – tecnica dello <i>spin labelling</i>	49
<b>2</b>	<b>- Materiali e metodi nell'analisi delle proprietà antiossidanti -</b>	<b>53</b>
<b>2.1</b>	<b>Materiali</b>	<b>53</b>
<b>2.2</b>	<b>Strumentazione</b>	<b>53</b>
2.2.1	Misure UV-VIS	53
2.2.2	Misure di consumo di ossigeno	53
2.2.3	Misure DSC	54
2.2.4	Misure ESR	54
2.2.5	Analisi HPLC-MS	54
<b>2.3</b>	<b>Metodologie applicate</b>	<b>54</b>
2.3.1	Inibizione della perossidazione lipidica (IPL) in micelle di SDS	55
2.3.2	Metodo Folin-Ciocalteu (FC)	56
2.3.3	Metodo DPPH	56
2.3.4	Metodo enzimatico	56
2.3.5	Metodo ABTS	57
2.3.6	Metodo alluminio cloruro	57
2.3.7	Metodo DNPH per i flavonoidi	57
2.3.8	Metodo DNPH per l'acido ascorbico	57
2.3.9	Preparazione liposomi per misure di interazione di membrana	58
2.3.10	Determinazione del coefficiente di ripartizione liposomi/acqua	59
2.3.10.1	Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua	59
2.3.10.2	Coefficiente di ripartizione liposomi/acqua	59
2.3.11	Studio di interazioni di membrana tramite DSC	59
2.3.12	Studio di interazioni di membrana tramite ESR	59
<b>3</b>	<b>- Proprietà antiossidanti del propoli -</b>	<b>61</b>
<b>3.1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>61</b>
3.1.1	Natura chimica del propoli e composizione	61
3.1.2	Proprietà farmacologiche e tossicità	62
<b>3.2</b>	<b>Propoli veneto</b>	<b>62</b>
3.2.1	Campioni di propoli	63
3.2.2	Risultati	64
3.2.2.1	Spettri UV/VIS	64
3.2.2.2	Potere antiossidante	65
3.2.2.3	Studio di modificazioni di membrana	68
3.2.2.4	Analisi HPLC/MS	73
<b>3.3</b>	<b>Propoli brasiliano e confronto con il propoli europeo</b>	<b>75</b>
3.3.1.1	Composizione	76

3.3.1.2	Proprietà	77
3.3.2	Campioni di propoli	77
3.3.3	Risultati	78
3.3.3.1	Spettri UV/VIS	78
3.3.3.2	Potere antiossidante	80
3.3.3.3	Analisi HPLC/MS	83
<b>3.4</b>	<b>Propoli come protettivo solare?</b>	<b>87</b>
3.4.1	Il fattore di protezione totale (SPF)	88
3.4.2	Risultati	89
<b>4</b>	<b><i>- Proprietà antiossidanti di frutta tropicale -</i></b>	<b>93</b>
<b>4.1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>93</b>
4.1.1	Caratteristiche dei frutti analizzati	93
4.1.1.1	Avocado	94
4.1.1.2	Carambola	94
4.1.1.3	Graviola	94
4.1.1.4	Jurubeba	95
4.1.1.5	Mango	95
4.1.1.6	Pequi	95
4.1.1.7	Pitaya	95
4.1.1.8	Siriguella	96
4.1.1.9	Tamarindo	96
4.1.1.10	Umbu	96
4.1.2	Stato dell'arte sulle proprietà antiossidanti	99
<b>4.2</b>	<b>Risultati</b>	<b>99</b>
4.2.1	Campioni di frutta	99
4.2.2	Potere antiossidante	99
4.2.3	Contenuto di acido ascorbico	102
4.2.4	Confronto dei risultati con frutta comune italiana	104
<b>5</b>	<b><i>- Proprietà antiossidanti dei polifenoli -</i></b>	<b>109</b>
<b>5.1</b>	<b>Effetto della struttura chimica dei polifenoli sugli spettri UV/VIS</b>	<b>111</b>
<b>5.2</b>	<b>Determinazione del potere antiossidante</b>	<b>115</b>
<b>5.3</b>	<b>Effetto della struttura chimica dei flavonoidi sul potere antiossidante</b>	<b>116</b>
5.3.1	Stato dell'arte	118
5.3.2	Valutazione dei risultati ottenuti	119
5.3.2.1	Ossidrile in posizione 3 dell'anello C	119
5.3.2.2	Gruppo catecolico sull'anello B	120
5.3.2.3	Importanza del doppio legame C2=C3	121
5.3.2.4	Ossidrile in C4' sull'anello B	122
5.3.2.5	La planarità della molecola	124
5.3.2.6	Conclusioni	125
<b>6</b>	<b><i>- Affidabilità dei metodi spettrofotometrici per la misura del potere antiossidante -</i></b>	<b>127</b>
<b>6.1</b>	<b>Metodi Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS ed enzimatico</b>	<b>128</b>
6.1.1	Metodo Folin-Ciocalteu	128
6.1.2	Metodi DPPH e ABTS	129
6.1.3	Metodo enzimatico	131

6.1.4	Conclusioni	132
<b>6.2</b>	<b>Metodi dell'alluminio cloruro e DNPH</b>	<b>133</b>
6.2.1	Metodo dell'alluminio cloruro	133
6.2.2	Metodo DNPH	135
6.2.3	Conclusioni	136

## **PARTE II. PROGETTAZIONE E MESSA A PUNTO DI BIOSENSORI**

<b>7</b>	<b>- I biosensori -</b>	<b>139</b>
<b>7.1</b>	<b>Origini dei biosensori</b>	<b>139</b>
<b>7.2</b>	<b>Classificazione dei biosensori</b>	<b>142</b>
7.2.1	Generazioni di biosensori	142
7.2.1.1	Prima generazione	142
7.2.1.2	Seconda generazione	142
7.2.1.3	Terza generazione	143
7.2.2	Elementi di riconoscimento molecolare	143
7.2.2.1	Biosensori a bioaffinità	144
7.2.2.2	Biosensori biocatalitici	144
7.2.3	Trasduzione	144
7.2.3.1	Biosensori elettrochimici	144
7.2.3.2	Biosensori ottici	145
7.2.3.3	Biosensori termici	145
7.2.3.4	Biosensori piezoelettrici	145
<b>7.3</b>	<b>Immobilizzazione dell'elemento biologico</b>	<b>145</b>
7.3.1	Adsorbimento	146
7.3.2	Microincapsulamento	146
7.3.3	Intrappolamento	146
7.3.4	Reticolazione	146
7.3.5	Formazione legami covalenti	146
<b>7.4</b>	<b>Biosensori elettrochimici</b>	<b>147</b>
7.4.1	Biosensori potenziometrici	148
7.4.2	Biosensori voltammetrici/amperometrici	148
<b>7.5</b>	<b>Biosensori per la determinazione dei polifenoli</b>	<b>150</b>
<b>8</b>	<b>- Materiali e metodi nella progettazione di biosensori -</b>	<b>153</b>
<b>8.1</b>	<b>Materiali</b>	<b>153</b>
<b>8.2</b>	<b>Strumentazione</b>	<b>153</b>
8.2.1	Misure elettrochimiche	153
8.2.2	Misure UV/VIS	155
<b>8.3</b>	<b>Metodologie applicate</b>	<b>155</b>
8.3.1	Trattamenti pre-immobilizzazione	155
8.3.2	Immobilizzazione enzima	155
8.3.2.1	Prima prova di immobilizzazione con EDC e NHS	155
8.3.2.2	Seconda prova di immobilizzazione con EDC e NHS	155
8.3.2.3	Immobilizzazione con chitosano e glutaraldeide	155

<b>9</b>	<b>- Progettazione di un biosensore per la determinazione dei polifenoli -</b>	<b>157</b>
<b>9.1</b>	<b>Prove preliminari in assenza di enzima</b>	<b>157</b>
9.1.1	Scelta potenziale di lavoro e trattamento pre-immobilizzazione	158
9.1.2	Valutazione condizioni sperimentali	160
9.1.2.1	Scelta soluzione tampone	160
9.1.2.2	Valutazione attività laccasi	161
9.1.2.3	Valutazione finale risposta strumentale	163
<b>9.2</b>	<b>Immobilizzazione laccasi</b>	<b>164</b>
9.2.1	Formazione legami covalenti con EDC e NHS	164
9.2.2	Reticolazione con chitosano e glutaraldeide	165
9.2.3	Concentrazione ottimale dell'enzima	167
<b>9.3</b>	<b>Misure con il biosensore</b>	<b>168</b>
9.3.1	Verifica del pH di lavoro	168
9.3.2	Valutazioni finali	169
9.3.2.1	Conclusione	171

## **CONCLUSIONE**

<b>CONCLUSIONE</b>	<b>175</b>
--------------------	------------

## **ALLEGATI E RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

<b>ALLEGATI</b>	<b>179</b>
-----------------	------------

<i>Allegato 1 - Tabella componenti propoli</i>	<i>179</i>
<i>Allegato 2 - Tabella componenti propoli europeo</i>	<i>186</i>
<i>Allegato 3. Tabella componenti propoli brasiliano</i>	<i>188</i>

<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b>	<b>191</b>
----------------------------------	------------

<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>199</b>
-----------------------	------------



# LISTA DEGLI ACRONIMI

ABIP: 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propano]

ABTS: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotazolin-6-solfonato)

BQ: Benzoquinone

CAPE: Fenetilestere dell'acido caffeico o fenetilcaffeoato

CAT: Catalasi

CE: Catechina Equivalente

CYS: Cisteammia

DCF1: 2,6-diclorofenolo-indofenolo

DMAC: 1,1-dimetilallilcaffeoato

DMPC: Dimiristoilfosfatidilcolina

DNPH: 2,4-dinitrofenilidrazina

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilidrazile

DSC: *Differential Scanning Calorimetry/Calorimeter* – Calorimetria/Calorimetro a scansione differenziale

DSPC: Distearilfosfatidilcolina

EDC: N-etil-N'-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide

ESR: *Electron Spin Resonance* - Risonanza di spin elettronico

FC: Folin-Ciocalteu

FRAP: *Ferric Reducing Antioxidant Power* – Potere antiossidante nella riduzione del ferro

GSH: glutatione

GSH-P<sub>x</sub>: Glutatione per ossidasi

GSSG: glutatione dimero

HEPES: Acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinil-etansolfonico

HPLC-MS: *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* – Cromatografia Liquida ad alta prestazione-spettrometria di massa

HQ: Idrochinone

HRP: *HorseRadish Peroxidase* – Perossidasi da rafano

IPL: Inibizione della Perossidazione Lipidica

LA: Acido linoleico

LDL: *Low Density Lipoprotein* - Lipoproteina a bassa densità

MES: Acido N-morfolinetansolfonico  
MPA: Acido 3-mercaptopropionico  
NE: Naringenina Equivalente  
NHS: N-idrossisuccinimide  
ORAC: *Oxygen Radical Absorbance Capacity* - Capacità di assorbimento dei radicali dell'ossigeno  
PC: *planar catechin* – Derivato della catechina planare  
RDS: Deviazione Standard Relativa  
RNS: *Reactive Nitrogen Species*- Specie reattive dell'azoto  
ROS: *Reactive Oxygen Species*- Specie reattive dell'ossigeno  
QE: Quercetina Equivalente  
SASL: *Stearic Acid Spin Label* – Acido stearico con etichetta di spin  
SDS: Sodiiododecilsolfato  
SOD: Superossido dismutasi  
TPC: *Total Polyphenolic Content* – Contenuto di polifenoli totali  
TRAP: *Total Radical-trapping Antioxidant Parameter* - Parametro antiossidante totale nel bloccare i radicali

**PARTE I.**

**MISURA DELLE PROPRIETÀ  
ANTIOSSIDANTI DI  
PRODOTTI TIPICI  
DELL'AGROALIMENTARE**



# 1 - Gli antiossidanti -

---

## 1.1 Introduzione

Gli antiossidanti cominciarono ad essere studiati verso la fine del diciannovesimo secolo, con l'identificazione di un gruppo di composti, non meglio classificati, caratterizzati dalla capacità di ossidarsi più facilmente rispetto ad altre specie presenti. Fu solo successivamente che biologi e chimici realizzarono l'importanza degli antiossidanti per la salute umana, con le prime pubblicazioni, durante gli anni Sessanta, su vitamine e flavonoidi, e con le successive ricerche su acido ascorbico e sulla relazione tra antiossidanti e cancro [1]. Oggi le sostanze antiossidanti sono considerate indispensabili per il corretto funzionamento dell'organismo e vengono utilizzate anche come integratori alimentari per la loro azione protettiva nei confronti di tumori e patologie cardiovascolari; sono inoltre comprese in formulazioni cosmetiche per la loro azione anti-invecchiamento.

### 1.1.1 LO STRESS OSSIDATIVO E LE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO

Le cause della pericolosità dell'ossigeno sono rimaste ignote fino alla pubblicazione della teoria dei radicali liberi di Gershman [2], che attribuì la tossicità dell'ossigeno alle sue forme ridotte.

Tabella 1.1. Alcune specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS).

ROS			RNS		
$O_2^{\bullet-}$	$^1O_2$	$OH^{\bullet}$	$NO^{\bullet}$	$ONOO^-$	$^{\bullet}NO_2$
$H_2O_2$	$HOO^{\bullet}$	$ROO^{\bullet}$	$NO^-$	$NO^+$	$NO_2^+$
HBrO	HClO	$O_3$	$HNO_2$	$N_2O_4$	$N_2O_3$

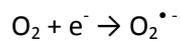
Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) (Tabella 1.1) sono prodotti del normale metabolismo cellulare e svolgono un duplice ruolo, benefico e deleterio, a seconda della loro concentrazione e localizzazione nell'organismo. Gli effetti positivi dei ROS si osservano a concentrazione bassa o moderata: queste specie sono inoltre coinvolte nella difesa nei confronti di agenti infettivi e nella trasduzione di segnali cellulari [3].

Gli effetti dannosi di ROS e RNS si osservano quando si incorre nello "stress ossidativo": una modificazione nel delicato equilibrio ossidanti/antiossidanti, che si verifica quando si ha una sovrapproduzione di ROS/RNS o una deficienza di antiossidanti. I ROS reagiscono con lipidi, proteine e DNA, modificandoli e così inibendo le loro normali funzioni.

### 1.1.2 FORMAZIONE E REATTIVITÀ DEI ROS

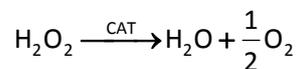
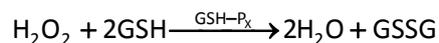
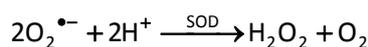
La concentrazione dei ROS, normalmente generati attraverso il metabolismo cellulare, può essere incrementata da agenti esterni: radiazioni ionizzanti, inquinanti a base di composti clorurati, ioni metallici e barbiturati possono direttamente o indirettamente generare specie reattive dell'ossigeno all'interno delle cellule [4]. Le radiazioni ultraviolette sono potenti iniziatori della formazione dei ROS, in particolare di ossigeno singoletto ( $^1\text{O}_2$ ) [5]. Tra le cause dell'eccessiva concentrazione di ROS nell'organismo ci può essere anche il fumo di sigaretta, costituito da una complessa miscela di composti chimici, tra cui agenti cancerogeni, ROS e radicali liberi [6].

L'anione superossido  $\text{O}_2^{\bullet-}$  viene considerato il ROS "primario", da cui, mediante reazioni con altre molecole, si possono generare i ROS "secondari" [3]. Le maggiori fonti di anione superossido, in circostanze normali, sono le catene di trasporto elettronico, che possono favorire il trasferimento di un elettrone all'ossigeno molecolare.



All'interno della cellula, la maggior concentrazione di ROS è nel mitocondrio, responsabile della produzione di energia e della respirazione cellulare: in condizioni fisiologiche, dall'1 al 3% delle molecole di ossigeno presenti nel mitocondrio sono convertite in superossido, durante il trasferimento elettronico della catena respiratoria. Un altro organello in cui si può avere produzione di ROS è il reticolo endoplasmatico, dove il citocromo P-450 catalizza l'ossidazione di agenti xenobiotici allo scopo di trasformarli in molecole meno tossiche, utilizzando ossigeno come agente ossidante. Infine nelle membrane la NADPH ossidasi catalizza l'ossidazione di NADH o NADPH con contemporanea riduzione dell'ossigeno [7].

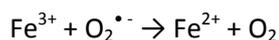
I ROS secondari si possono poi generare per successive reazioni, così come schematizzato di seguito. L'enzima superossido dismutasi (SOD) catalizza la riduzione dell'anione superossido a perossido di idrogeno. La SOD opera in coniugazione con gli enzimi catalasi (CAT) e glutatione perossidasi (GSH-P<sub>x</sub>) che procedono alla riduzione del perossido di idrogeno ad acqua ed ossigeno.



GSH: glutatione; GSSG: glutatione dimero.

In condizioni di stress, la presenza dell'anione superossido può indurre il rilascio di ioni di ferro (II) da alcuni enzimi; tali ioni possono partecipare alla reazione di Fenton con il perossido di idrogeno, producendo il radicale ossidrilico  $\text{OH}^\bullet$ . L'anione superossido agisce inoltre riducendo il  $\text{Fe}^{3+}$  e rendendo il  $\text{Fe}^{2+}$  nuovamente disponibile per la reazione di Fenton; viene favorita dunque un'ulteriore produzione di  $\text{OH}^\bullet$ , attraverso un meccanismo a catena. La reazione complessiva è chiamata reazione di Haber-Weiss [3].

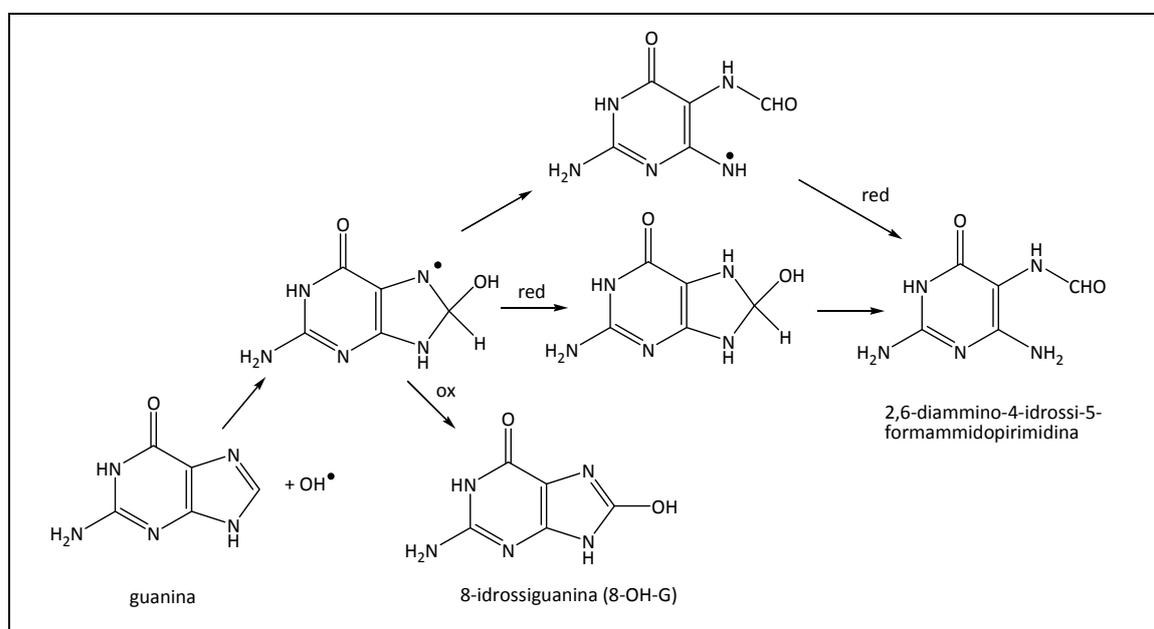




Il radicale  $\text{OH}^\bullet$  è molto reattivo; ha un tempo di vita di  $10^{-9}$  s: quando si forma esso reagisce istantaneamente provocando dei danni rilevanti ad importanti molecole biologiche, come proteine, lipidi e DNA. Nelle proteine, ad esempio, l'ossidazione di residui cisteinici può portare alla formazione di legami disolfuro che provocano un'alterazione nella struttura terziaria della proteina con la conseguente inibizione della sua funzione biologica [3].

### 1.1.3 MUTAZIONI DEL DNA AD OPERA DEI ROS

Danni rilevanti si osservano quando i ROS reagiscono con il DNA. Il radicale ossidrilico, in particolare, può reagire facilmente con tutti i componenti della molecola del DNA danneggiando le basi azotate sia purine che pirimidone, e la struttura del deossiribosio. Le modificazioni accertate sono la formazione di 8-idrossiguanina (8-OH-G) e 2,6-diammino-4-idrossi-5-formamidopirimidina [3], che si producono per interazione del radicale ossidrilico con la guanina, secondo il seguente schema di reazione.



8-OH-G è spesso utilizzato come *biomarker* per la valutazione dello stress ossidativo [4].

### 1.1.4 LA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

Le membrane biologiche sono strutture diffusissime in natura. Sebbene possano differire per composizione chimica e caratteristiche fisiche, la loro struttura fondamentale è sempre la medesima: esse sono foglietti di 6-10 nm di spessore formati da un doppio strato lipidico, a cui sono associate alcune proteine. La funzione primaria delle membrane biologiche è quella di creare una separazione fisica tra compartimenti (cellula o organelli subcellulari con ambiente esterno); a ciò sono legati anche fenomeni di passaggio (o non passaggio) di nutrienti attraverso la membrana, dovuti ad alcune specifiche proteine immobilizzate nel doppio strato lipidico. Alcune membrane possono anche svolgere funzioni di riconoscimento, se vi sono recettori per molecole specifiche sulla loro superficie, o di catalisi, se alcune proteine di membrana hanno una funzione enzimatica [8].

Lo scheletro della membrana è costituito da un doppio strato di fosfolipidi, molecole anfipatiche caratterizzate da una parte idrosolubile ed una liposolubile. Per loro natura, in soluzione acquosa, i fosfolipidi tendono a formare micelle o doppi strati lipidici, disponendosi cioè in strutture che minimizzino il contatto tra la parte idrofobica e l'acqua [8].

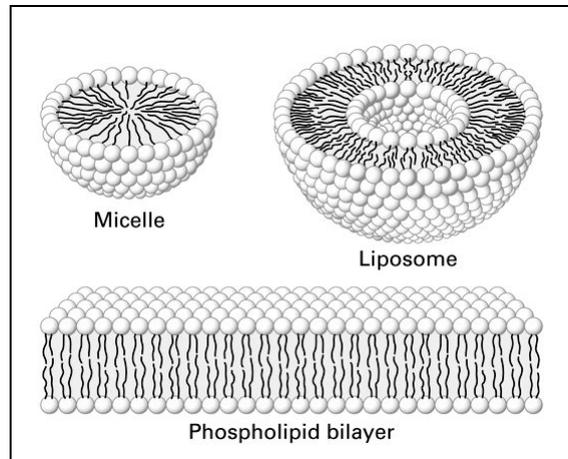
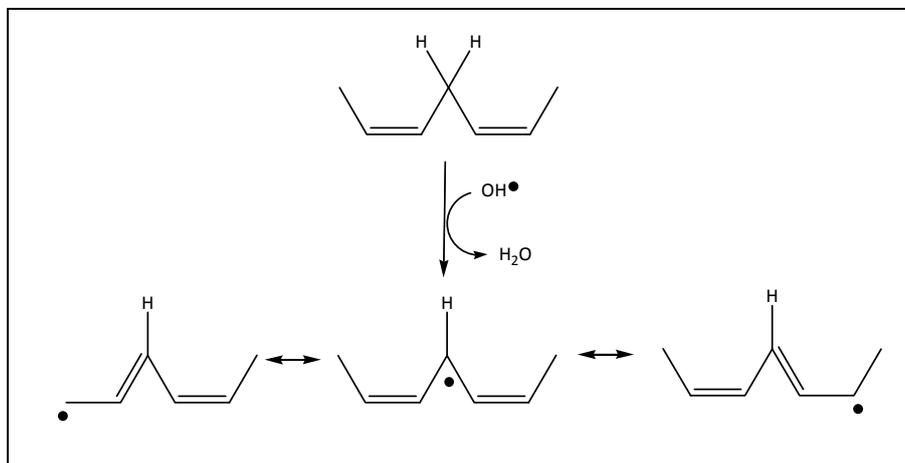
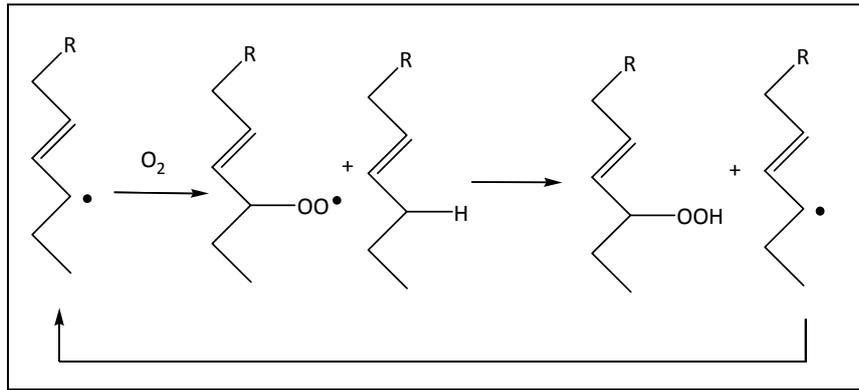


Figura 1.1. Rappresentazione di una micella, un liposoma e un doppio strato lipidico.

Le membrane cellulari sono molto sensibili all'ossidazione per il fatto che buona parte dei fosfolipidi che le compongono sono costituiti da acidi grassi poli-insaturi. La presenza di doppi legami, infatti, dà luogo a strutture maggiormente vulnerabili all'attacco del radicale  $\text{OH}^\bullet$ , in quanto il radicale lipidico, prodotto della reazione è stabilizzato per risonanza.

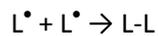


La perossidazione lipidica prosegue con lo stadio di propagazione nel quale il radicale lipidico reagisce con ossigeno formando un radicale lipoperossidico. Tale radicale acquista poi un  $\text{H}^\bullet$  dando vita ad un lipide perossido e ad un ulteriore radicale lipidico [9].



Si innesca quindi un meccanismo a catena, nel quale un solo radicale lipidico che si forma può ripetere nuovamente il ciclo di reazioni; ne consegue che ogni radicale alchilico, generatosi nello stadio di iniziazione, può di fatto dar vita ad innumerevoli lipidi perossidi.

L'ultimo stadio della reazione è quello di terminazione, in cui più radicali si combinano producendo molecole non radicaliche [9].



Come si nota in Figura 1.2 la perossidazione lipidica porta alla frammentazione delle catene idrocarburiche dei fosfolipidi e ad un loro aumento di polarità per effetto dell'inserimento dei gruppi -OOH. Queste modificazioni provocano la perdita della compattezza della membrana, che quindi non è più in grado di svolgere naturalmente la sua funzione di barriera e di trattenere all'interno della cellula nutrienti e metaboliti necessari alla sua normale fisiologia; ciò si traduce in una grave difficoltà di sopravvivenza della cellula stessa.

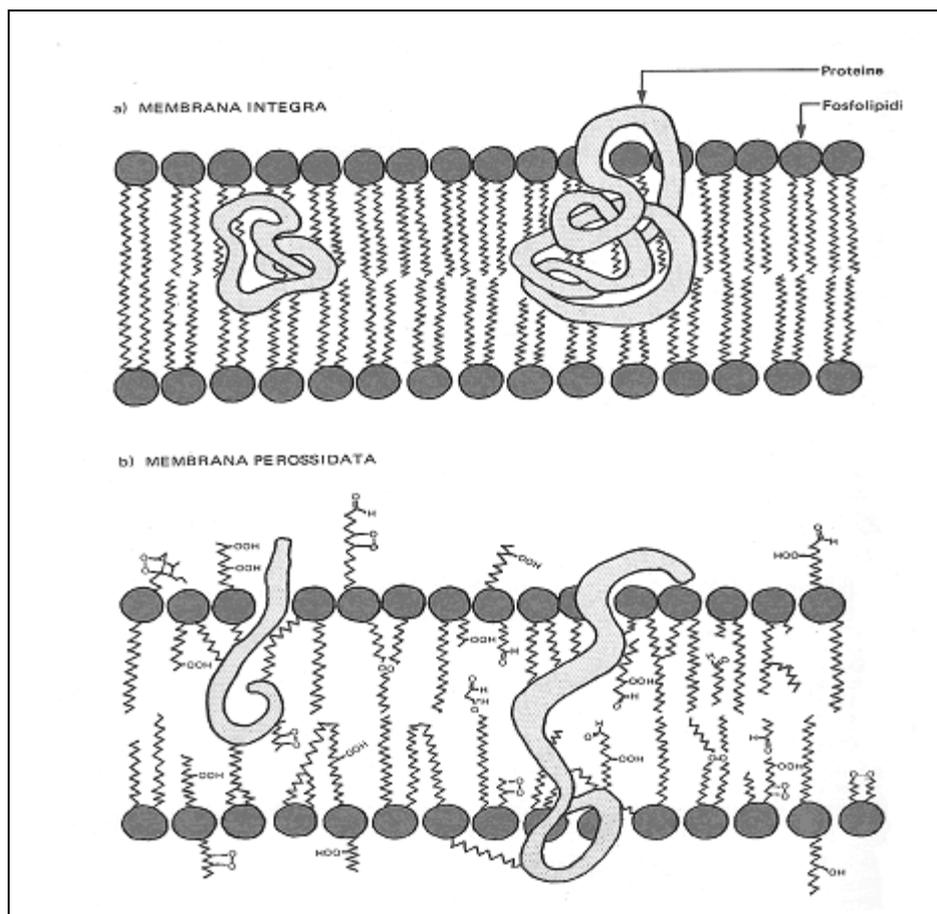


Figura 1.2. a) membrana integra; b) membrana perossidata.

### 1.1.5 EFFETTO DEI ROS SULLA SALUTE UMANA

L'elevata reattività dei ROS provoca inevitabilmente danni sulla salute umana. Tra le diverse patologie che sono state associate all'elevata concentrazione di specie reattive dell'ossigeno spicca il cancro, la cui causa principale è la mutazione del DNA ad opera di radicali come  $\text{OH}^\bullet$ , già illustrata in precedenza. Il meccanismo di carcinogenesi prevede tre stadi: l'iniziazione (mutazione del DNA), la promozione (espansione delle cellule mutate per induzione della proliferazione cellulare e/o inibizione dei meccanismi di apoptosi) e la progressione (mutazione cellulare da stato preneoplastico a neoplastico). I ROS possono intervenire come cancerogeni in tutti e tre gli stadi [4].

Non sono da trascurare però anche altre patologie provocate dai ROS, come le malattie cardiovascolari. È stato dimostrato che lo stress ossidativo indotto dai ROS su cellule del cuore e dei vasi sanguigni ha un ruolo importante in malattie come arteriosclerosi, ipertensione, ischemia miocardica, cardiomiopatie, malattie cardiache congenite ed infarti. Uno dei fattori che porta all'insorgere di queste malattie è l'aumento del livello intracellulare di  $\text{Ca}^{2+}$ , che può essere prodotto dai ROS sia direttamente, per reazione di specie reattive dell'ossigeno su proteine scambiatrici di  $\text{Ca}^{2+}$ , che indirettamente, attraverso la perossidazione lipidica delle membrane cellulari [3].

Il cervello è particolarmente vulnerabile al danno ossidativo a causa del suo intenso utilizzo di ossigeno, dell'elevato contenuto di acidi grassi poli-insaturi e della presenza di ioni metallici redox come ferro e rame. Il danno ossidativo aumenta inoltre con l'età e viene considerato un importante

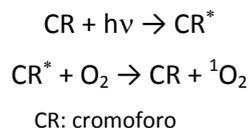
fattore in diverse malattie neurodegenerative, come le sindromi di Alzheimer e Parkinson, tipiche delle persone anziane. Nel cervello di malati di Alzheimer e Parkinson, infatti, è stato osservato un più elevato livello di stress ossidativo, rispetto ad individui sani della stessa età [3].

Il processo dell'invecchiamento può essere considerato un progressivo declino delle funzioni fisiologiche dell'organismo. Secondo la teoria proposta da Harman nel 1956 [10] la causa dell'invecchiamento è da imputare all'ossigeno: in condizioni normali, il passaggio di elettroni dalle catene di trasporto elettronico all'ossigeno, che porta alla formazione di anione superossido, è limitato ed i meccanismi di riparazione degli eventuali danni provocati dai ROS sono efficienti. Tali meccanismi sembrano però diventare meno efficaci con l'età: numerosi studi hanno riportato accumulo di 8-OH-G, *biomarker* per la valutazione del danno ossidativo, nel DNA mitocondriale di individui anziani [3].

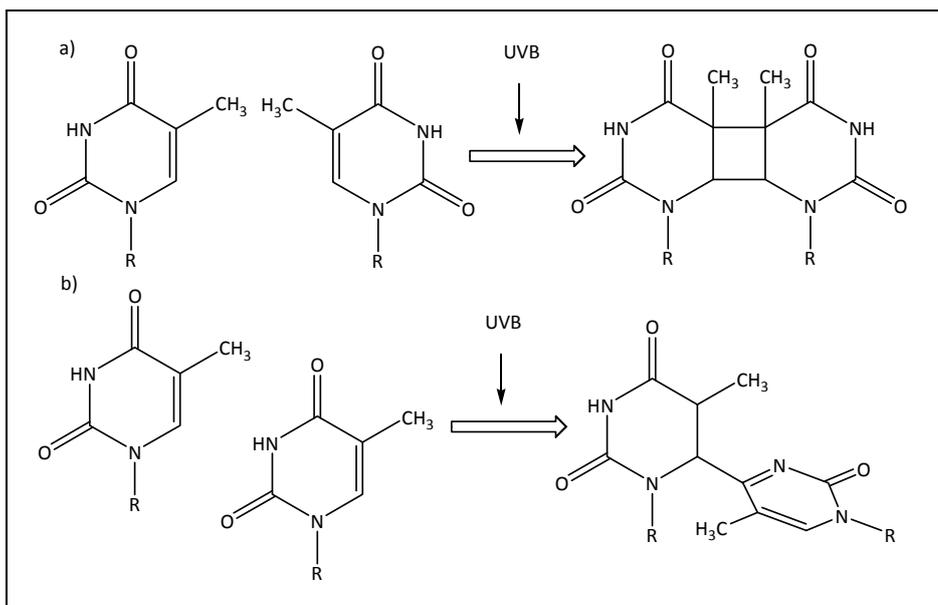
### 1.1.6 LE RADIAZIONI ULTRAVIOLETTE

Studi epidemiologici, clinici e di laboratorio hanno dimostrato come la radiazione solare ultravioletta sia responsabile dell'invecchiamento prematuro della pelle e dello sviluppo di tumori benigni e maligni, tra cui il melanoma [11].

Le radiazioni ultraviolette, come già accennato, contribuiscono alla produzione di ROS: i raggi UVB (290-320 nm) stimolano la produzione di  $O_2^{\bullet -}$  attraverso l'attivazione dell'enzima NADPH ossidasi e le reazioni della catena respiratoria, mentre i raggi UVA (320-400 nm) producono  $^1O_2$  attraverso reazioni foto-indotte con cromofori come riboflavina e porfirina, presenti sulla pelle. Il cromoforo eccitato reagisce con ossigeno portandolo al suo stato di singoletto [12].



Le radiazioni ultraviolette sono inoltre in grado di causare mutazioni al DNA direttamente, mediante un'interazione tra la radiazione stessa e le basi azotate. Gli effetti dei raggi UVB sul DNA si concretizzano principalmente con la formazione di fotoprodotti dimerici tra basi pirimidiniche adiacenti [13], secondo il seguente schema di reazione.

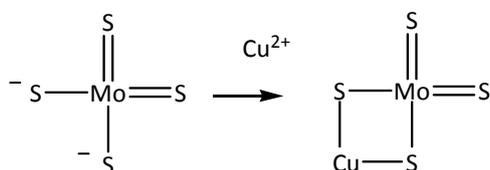


### 1.1.7 I METALLI DI TRANSIZIONE

La tossicità indotta dai metalli di transizione è stata oggetto di numerosi studi, che si sono concentrati in particolare sull'attività cancerogena dei metalli e sul loro ruolo nella generazione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto nei sistemi biologici.

Il ferro interviene nella generazione dei ROS reagendo con il perossido di idrogeno e generando OH<sup>•</sup>, (reazione di Fenton - paragrafo 1.1.2), che a sua volta può interagire con DNA e lipidi (paragrafi 1.1.3 e 1.1.4), provocando dei danni a lungo termine. È stato dimostrato che alcune cellule cancerose si sviluppano più rapidamente in presenza di ferro [4].

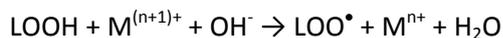
Il rame sembra non essere genotossico: non reagisce direttamente con la molecola del DNA provocando mutazioni. Studi in vitro hanno però riscontrato come cellule cancerose proliferino in tumore in un ambiente ricco di rame [4]. Inoltre Brewer ed il suo gruppo hanno dimostrato come il tetratiomolibdato (TM), che è in grado di legare il rame introdotto con la dieta prima che sia assorbito dall'organismo, può ridurre la diffusione del tumore in pazienti con tipi differenti di cancro in metastasi [14].



Il cromo (VI) è notoriamente un potente cancerogeno. È stato osservato che il cromo (VI) non reagisce con DNA in vitro, ma, una volta all'interno della cellula, in presenza di agenti riducenti, causa una ampia varietà di lesioni, come addotti Cr-DNA, reticolazioni DNA-proteine o DNA-DNA e danno ossidativo. Le forme ridotte del cromo, infatti, possono reagire con perossido di idrogeno, attraverso la nota reazione di Fenton [4].



I metalli di transizione interagiscono non solo con il DNA, ma anche con i lipidi, inducendo la formazione di radicali lipidici [9].



Tali radicali sono coinvolti nella perossidazione lipidica, introdotta nel paragrafo 1.1.4.

### 1.1.8 IL FRENCH PARADOX E LA DIETA MEDITERRANEA

Visti i danni per la salute che può determinare una sovrapproduzione di ROS, diventa importante mantenere inalterato l'equilibrio ossidanti/antiossidanti. È opportuno da un lato adottare un corretto stile di vita che minimizzi la sovrapproduzione di ROS (fumo di sigaretta ed esposizione a raggi UV, ad esempio); dall'altro è utile anche rinforzare le difese già naturalmente presenti nel nostro organismo introducendo sostanze antiossidanti con la dieta.

Il "paradosso francese" porta all'evidenza come alcuni specifici alimenti, ricchi di antiossidanti, possano influenzare in maniera rilevante l'incidenza di alcuni tipi di malattie. Tale paradosso è stato osservato durante gli anni Ottanta, nel momento in cui studi epidemiologici hanno rilevato una minor incidenza di malattie coronariche in Francia, rispetto ad altri paesi del centro Europa (es. Germania), nonostante vi sia, in tutti i casi, un elevato consumo di grassi saturi [15]. Renaud ha successivamente evidenziato come il *French paradox* fosse correlato al consumo di vino, ampiamente presente nella dieta dei francesi, ma non dei tedeschi, abituali consumatori di birra [16].

Il vino, infatti, ha un elevato contenuto di polifenoli, potenti antiossidanti; tra questi il resveratrolo (Figura 1.3) ha mostrato interessanti proprietà biomediche legate alla limitazione dello stress ossidativo, all'inibizione della promozione e della propagazione di tumori, ad azioni cardioprotettive dovute all'inibizione dell'ossidazione di lipoproteine a bassa densità (LDL) ed effetti preventivi della sindrome di Alzheimer e della demenza senile [17].

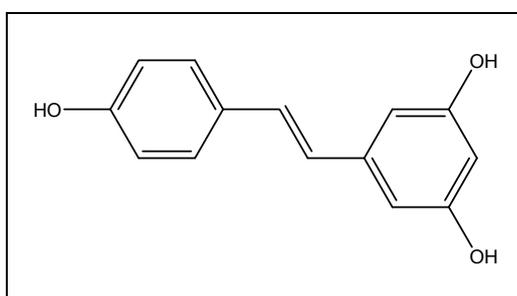


Figura 1.3. Formula di struttura del *trans*-resveratrolo.

Le dieta mediterranea, ricca di frutta, verdura, cereali, pesce, olio d'oliva e che prevede la regolare assunzione di una moderata quantità di vino, è sempre stata considerata salutare. Studi scientifici hanno dimostrato come in popolazioni che seguono la dieta mediterranea si abbia una riduzione della mortalità globale, con riduzioni del 9% della mortalità per malattie cardiovascolari, del

6% della mortalità per neoplasie, e del 13% dell'incidenza di sindromi di Alzheimer e Parkinson, rispetto alla media [18]. L'ultimo riconoscimento dell'importanza per la salute di questo tipo di alimentazione è stato dato dall'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Educazione, la Scienza e la Cultura (UNESCO) che, il 17 novembre 2010, ha iscritto la dieta mediterranea nelle liste del patrimonio culturale immateriale dell'umanità [19].

## 1.2 Classificazione degli antiossidanti

L'organismo combatte lo stress ossidativo utilizzando una serie di sistemi, enzimatici e non enzimatici che, con la loro azione, limitano il potenziale danno causato dalle specie reattive dell'ossigeno. Molti sistemi antiossidanti sono già presenti all'interno dell'organismo (antiossidanti endogeni); altri devono essere introdotti attraverso la dieta (antiossidanti esogeni).

In generale gli antiossidanti sono definiti come "qualsiasi sostanza che, presente in bassa concentrazione rispetto ad un substrato ossidabile, è in grado di rallentare o inibire l'ossidazione di quel substrato" [9]; in questo modo substrati ossidabili come lipidi, proteine e DNA vengono protetti dall'ossidazione e rimangono inalterati. Una prima classificazione degli antiossidanti si può effettuare in base alla loro provenienza e caratteristiche strutturali: tra gli antiossidanti endogeni sono presenti sistemi enzimatici, come il sistema superossido dismutasi-catalasi-glutazione perossidasi e non enzimatici, come seleno-proteine e glutazione. Tra gli antiossidanti esogeni si trovano vitamine e composti non vitaminici, come carotenoidi e polifenoli.

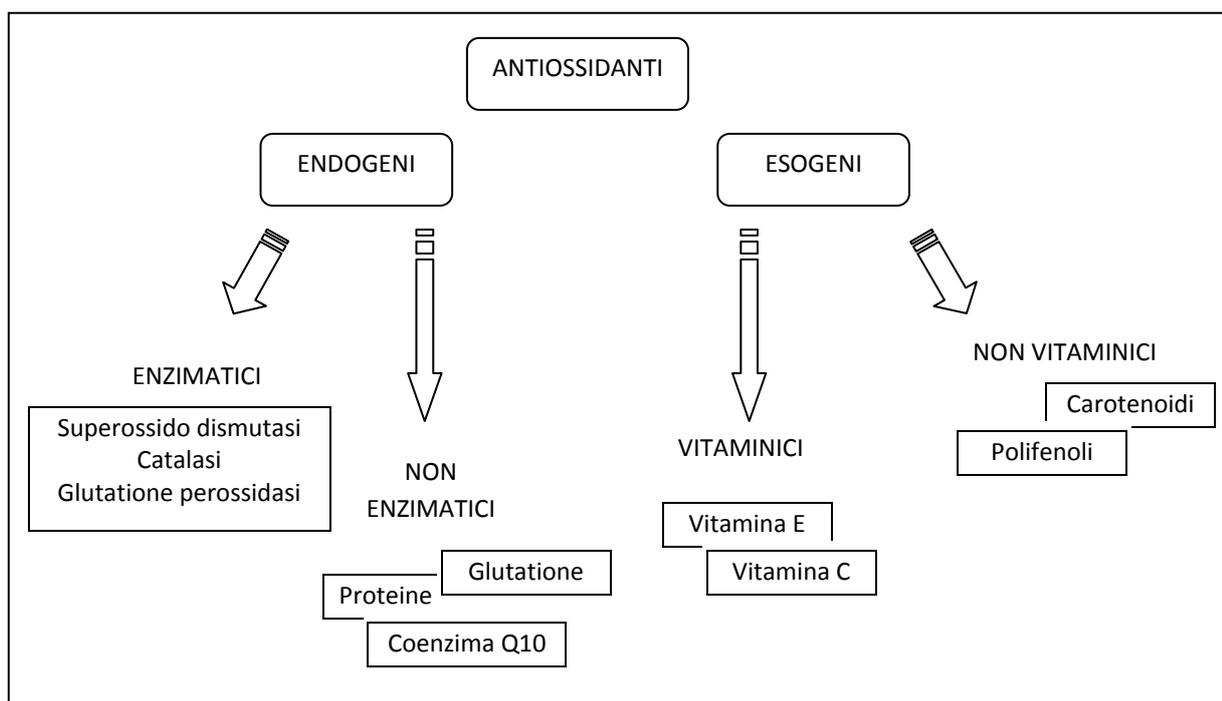
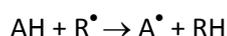


Figura 1.4. Classificazione degli antiossidanti a seconda di provenienza e struttura.

Un secondo tipo di classificazione si può effettuare considerando le modalità di azione degli antiossidanti: gli antiossidanti primari o preventivi limitano l'azione ossidante delle specie reattive dell'ossigeno favorendo la trasformazione dei ROS in specie non reattive (es. sistema enzimatico superossido dismutasi-catalasi-glutazione perossidasi), chelando metalli di transizione o rigenerando

altri antiossidanti (es. glutazione, vitamina C), riportandoli nelle loro forme attive. Gli antiossidanti secondari o di tipo *chain-breaking*, (es. polifenoli) hanno strutture che permettono loro di bloccare i radicali liberi, trasformandosi in radicali meno reattivi di quelli di partenza.



In questo modo gli antiossidanti riescono ad intervenire nella fase di iniziazione e di propagazione di reazioni radicaliche come ad esempio nel caso della perossidazione lipidica, rallentandone la velocità [20].

### 1.2.1 ANTIOSSIDANTI ENDOGENI

Il più efficiente sistema antiossidante enzimatico è quello costituito dagli enzimi superossido dismutasi, catalasi e glutazione perossidasi [4]. Attraverso l'azione combinata dei tre enzimi, il sistema contribuisce a limitare la concentrazione di ROS all'interno della cellula, riducendo l'anione superossido ad acqua e ossigeno, come già illustrato nel paragrafo 1.1.2.

Tra i sistemi non enzimatici è opportuno citare il glutazione (GSH), un tripeptide costituito da glutammato, cisteina e glicina (Figura 1.5).

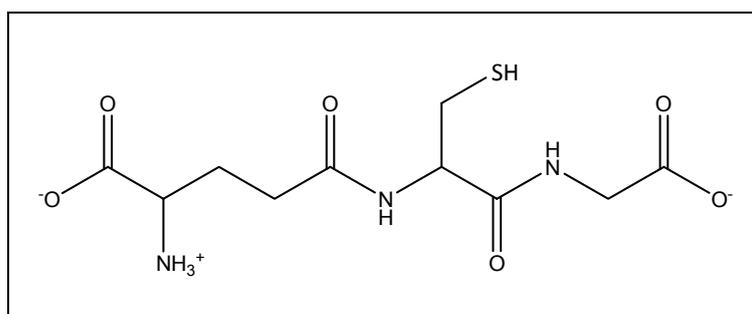
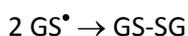
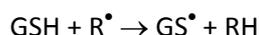


Figura 1.5. Formula di struttura del glutazione.

In genere, l'azione antiossidante dei composti tiolici è di tipo *chain-breaking*. Lo zolfo è in grado di accettare un elettrone, dando vita ad un radicale relativamente stabile. Nel caso del glutazione il radicale  $GS^{\bullet}$  può dimerizzare facilmente per formare un prodotto non radicalico.



Il glutazione è un antiossidante multifunzionale. Oltre all'azione di neutralizzazione dei radicali liberi, assume un importante ruolo come antiossidante preventivo: è un cofattore in diversi meccanismi di detossificazione nei confronti dello stress ossidativo, ad esempio nella degradazione del perossido di idrogeno e dei lipidi perossidi ed è in grado di rigenerare nelle loro forme attive alcuni importanti antiossidanti, come le vitamine C ed E [4].

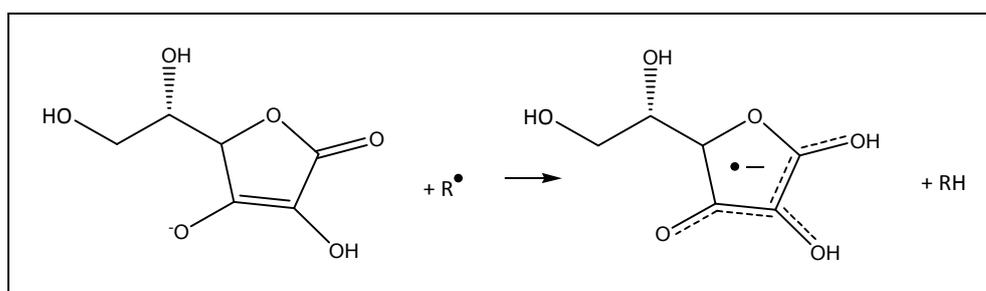
## 1.2.2 ANTIOSSIDANTI ESOGENI

### 1.2.2.1 VITAMINE

Tra gli antiossidanti vitaminici i più efficienti sono la vitamina C o acido ascorbico e la vitamina E, che svolgono fondamentalmente la stessa funzione: la prima in ambiente acquoso, la seconda in ambiente lipofilo.

L'acido ascorbico prende il nome dalla malattia scorbuto, che si sviluppa quando si ha una deficienza conclamata di vitamina C. Lo scorbuto è una malattia nota da lungo tempo: il suo periodo di maggior diffusione coincide con le prime traversate oceaniche perché i marinai non potevano rifornirsi di alimenti freschi e basavano la loro alimentazione su cibi secchi e salati. Tra i segni più noti dello scorbuto vi è una rallentata guarigione delle ferite, dolori articolari e spesso una sintomatologia neuropsichica, costituita da isteria, depressione e ipocondria [8].

A pH fisiologico l'acido ascorbico si trova sotto forma di anione; svolge la sua azione antiossidante attraverso diversi meccanismi: è coinvolto nella riduzione di metalli, come ferro e rame; rigenera la vitamina E, riportandola nella sua forma attiva; blocca i radicali liberi, convertendosi in un anione radicale stabilizzato per risonanza, come si osserva nel seguente schema di reazione.



La vitamina E è presente in otto differenti forme; la forma più attiva negli uomini è l' $\alpha$ -tocoferolo (Figura 1.6).

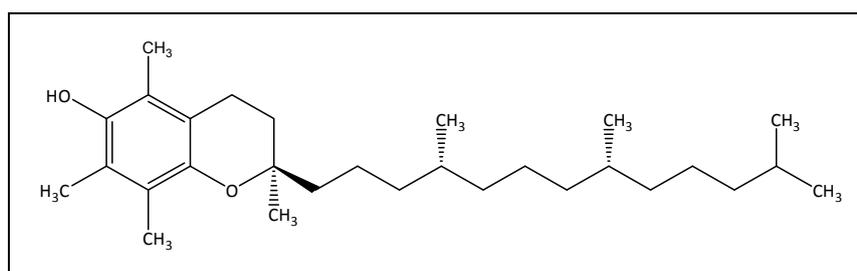
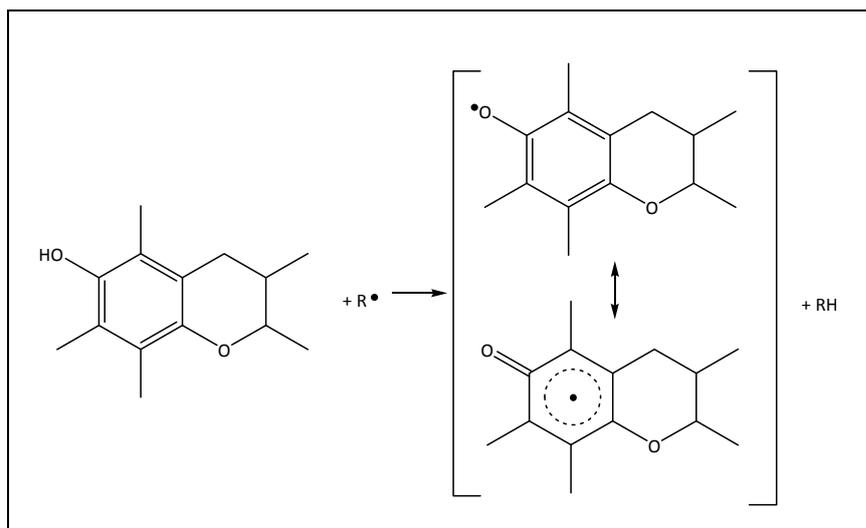


Figura 1.6. Formula di struttura dell' $\alpha$ -tocoferolo.

È difficile porre in relazione l'ipovitaminosi con una malattia umana ben definita, perché è molto raro osservare carenze di questa vitamina. Oggi si ritiene che la vitamina E agisca come antiossidante [8] donando un idrogeno ai radicali e convertendosi in un radicale stabilizzato per risonanza.

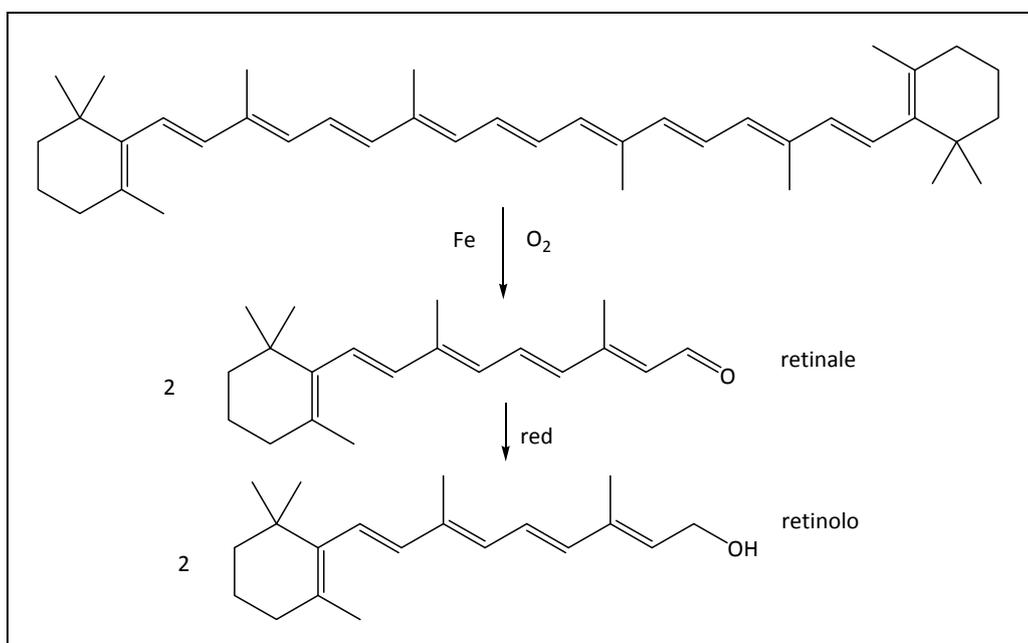


La vitamina E ossidata può essere ridotta alla sua forma originaria dall'acido ascorbico. Questa reazione probabilmente avviene all'interfaccia della membrana dove la vitamina C idrosolubile e la vitamina E liposolubile possono venire a contatto [7].

### 1.2.2.2 ANTISSIDANTI NON VITAMINICI

Tra gli antiossidanti non vitaminici sono importanti da citare i polifenoli, che verranno discussi in dettaglio nel paragrafo successivo, ed i carotenoidi.

I carotenoidi sono dei pigmenti che si trovano in piante e microorganismi, responsabili dei colori rosso, giallo ed arancione di frutta e verdura. Alcuni carotenoidi, come il  $\beta$ -carotene, una volta introdotti nell'organismo possono produrre molecole di retinolo, secondo il seguente schema di reazione.



Il retinolo e altri retinoidi che posseggono la sua stessa attività biologica (retinale, acido retinoico, 3-idroretinolo e loro derivati) sono chiamati vitamina A. La vitamina A è richiesta per la formazione

del pigmento fotosensibile della retina, indispensabile per il processo visivo. Inoltre, è necessaria per il funzionamento delle cellule epiteliali capaci di secernere muco, per la crescita, per lo sviluppo del tessuto osseo e per la riproduzione; possiede inoltre ruoli fondamentali sulla regolazione della crescita e della differenziazione cellulare [8].

I carotenoidi hanno inoltre un'elevata capacità antiossidante, dovuta all'abilità della struttura a doppi legami coniugati nel delocalizzare elettroni spaiati. Anche in questo caso dunque l'azione antiossidante è di tipo *chain-breaking*. In Figura 1.7 viene riportato uno schema che riassume alcune delle reazioni descritte in questo capitolo: si nota la complessità delle reazioni che avvengono all'interno dell'organismo, attraverso cui viene mantenuto il corretto equilibrio ossidanti/antiossidanti: da un lato l'anione superossido dà vita ai ROS secondari che possono interagire con proteine, lipidi e DNA; dall'altro la continua azione di antiossidanti tende a limitare tali danni, detossificando i ROS, bloccando i radicali liberi, riportando nelle loro condizioni originarie lipidi e vitamine.

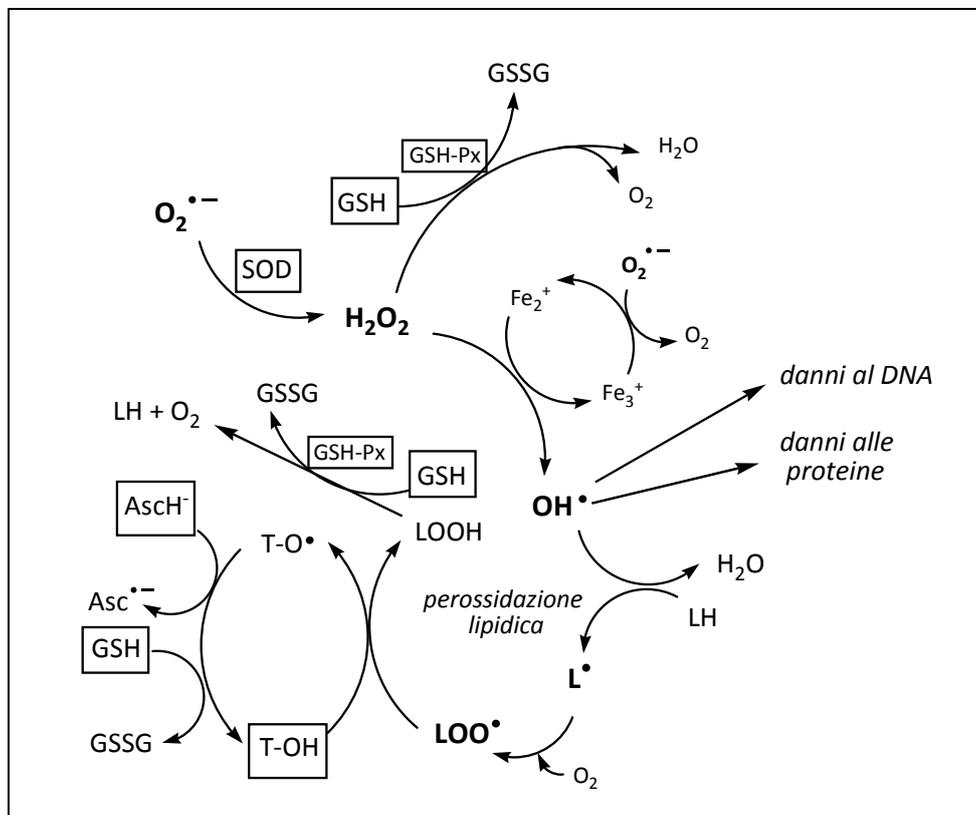


Figura 1.7. Complessa serie di reazioni che avvengono nell'organismo attraverso cui viene mantenuto il corretto equilibrio ossidanti/antiossidanti. SOD: superossido dismutasi; GSH: glutazione; GSH-Px: glutazione perossidasi; GSSG: glutazione dimero; LH: lipide; LOOH: lipide perossido; T-OH:  $\alpha$ -tocoferolo (vitamina E); AscH<sup>+</sup>: ascorbato (vitamina C).

### 1.3 I polifenoli

I polifenoli sono i più abbondanti antiossidanti nella nostra dieta e sono presenti in frutta, vegetali, cereali, olive, legumi secchi, cioccolato e bevande, come tè, caffè e vino. Malgrado la loro ampia distribuzione, gli studi sugli effetti dei polifenoli sono cominciati solamente negli ultimi anni.

La classica struttura polifenolica è caratterizzata da diversi gruppi ossidrilici su anelli aromatici, ma possono essere considerati polifenoli anche molecole con un solo anello fenolico [21], come acidi ed alcoli fenolici (Figura 1.8).

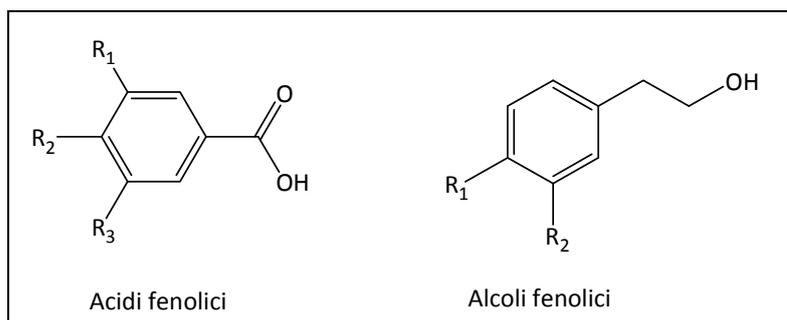


Figura 1.8. Formula di struttura di acidi e alcoli fenolici.

I polifenoli naturali sono divisi in diverse classi a seconda del numero di anelli fenolici che contengono ed agli elementi strutturali che legano ciascun anello con un altro. I più importanti gruppi di polifenoli vengono riportati in Figura 1.9. Le caratteristiche delle diverse classi vengono discusse nei paragrafi successivi.

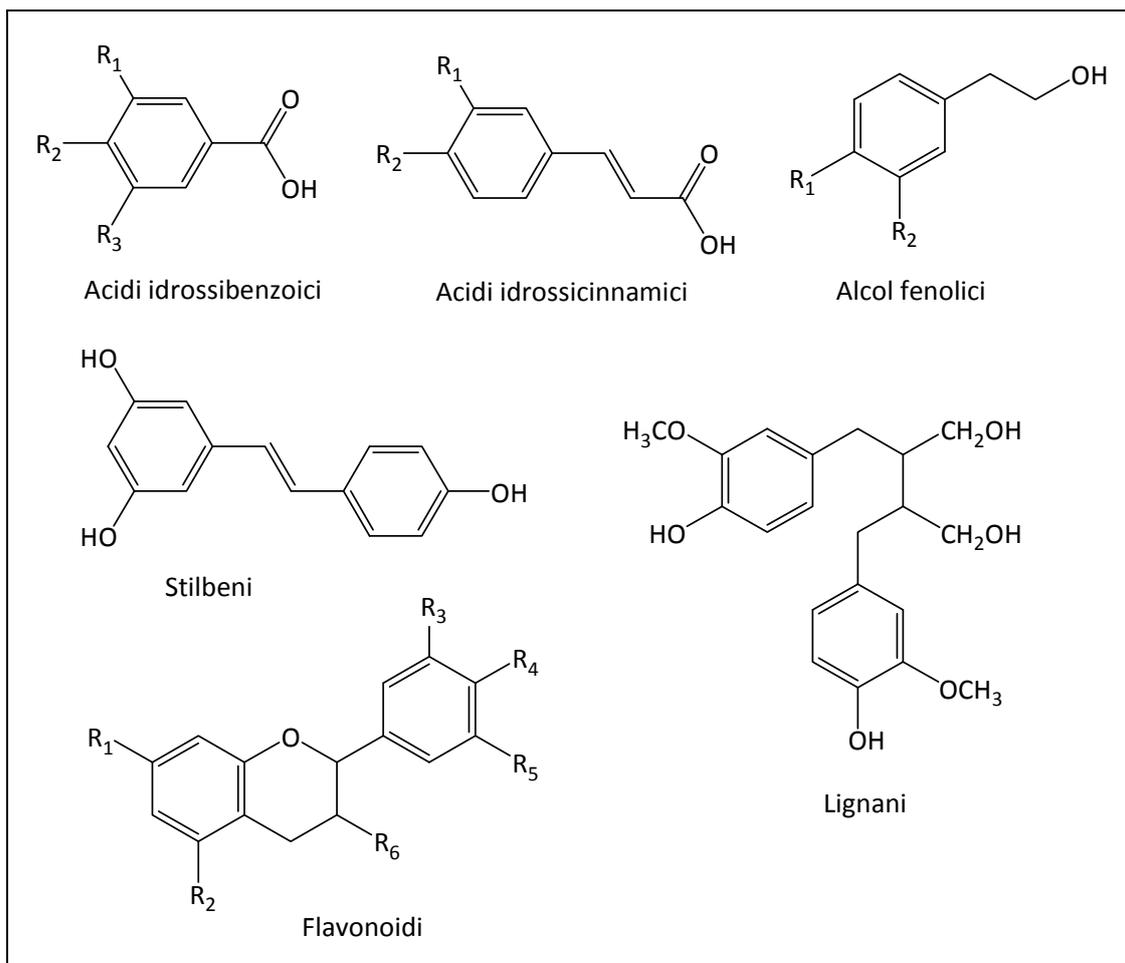
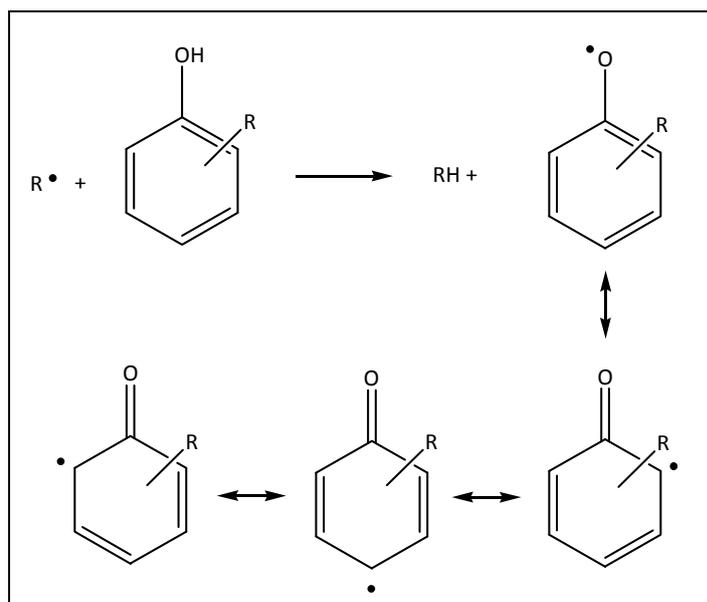


Figura 1.9. Classi di polifenoli [21].

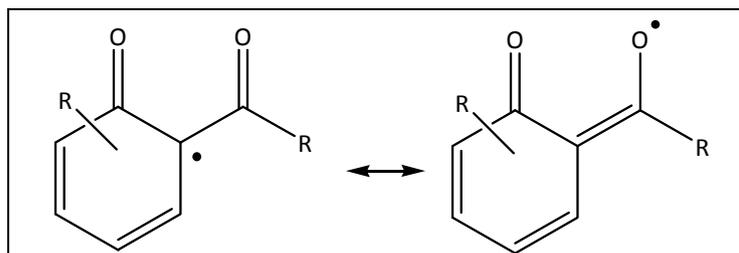
L'azione antiossidante dei polifenoli è del tipo *chain-breaking*: reagiscono con i radicali cedendo loro un radicale idrogeno, secondo il seguente schema di reazione.



Si è approfondito nei paragrafi precedenti come i radicali possano portare al danno ossidativo, attraverso serie di reazioni radicaliche a catena. È evidente dunque che sostanze in grado di bloccare il radicale  $R^\bullet$  portano ad un rallentamento o all'arresto di tali reazioni. Il radicale fenossile che si forma, infatti, è molto meno reattivo di  $R^\bullet$ , a causa della delocalizzazione dell'elettrone spaiato sull'anello aromatico e partecipa molto più lentamente alle reazioni radicaliche.

La reazione è tanto più spostata verso destra, quanto più è elevata la capacità del polifenolo a cedere un  $H^\bullet$ . Tale capacità può essere quantificata attraverso:

- l'energia di dissociazione omolitica del legame O-H: la tendenza a donare  $H^\bullet$  aumenta al diminuire dell'energia di dissociazione di legame, che dipende da tipo e quantità di sostituenti presenti sulla molecola (es. sostituenti elettro-attrattori favoriscono la dissociazione di legame)
- la posizione del legame O-H: è necessaria una buona mobilità del radicale  $R^\bullet$  verso il gruppo OH perché si abbia la reazione tra i due componenti;
- la stabilità del radicale derivato dall'antiossidante: nei polifenoli l'elettrone spaiato sull'ossigeno viene delocalizzato sull'anello aromatico. La stabilità è influenzata dai sostituenti presenti sull'anello: sostituenti elettro-attrattori tendono ad attrarre verso di sé l'elettrone spaiato e ad aumentare la delocalizzazione [20].



### 1.3.1 I FLAVONOIDI

I flavonoidi rappresentano i polifenoli più abbondanti nelle piante. Strutturalmente sono caratterizzati da due anelli benzenici legati da una catena lineare di tre atomi di carbonio, che può formare un anello a 6 atomi con un gruppo ossidrilico di uno degli anelli benzenici [21].

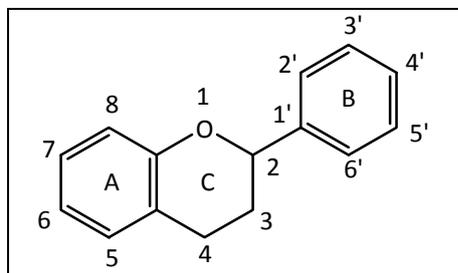


Figura 1.10. Formula di struttura di un generico flavonoide.

Sono stati identificati più di 4000 singoli flavonoidi, divisi in sottoclassi a seconda dello schema di sostituzione e dello stato di ossidazione dell'anello centrale (Figura 1.11), così come sotto schematizzato:

- a) i flavonoli sono caratterizzati da un gruppo carbonilico in posizione 4, un doppio legame  $C_2=C_3$  ed un gruppo ossidrilico in  $C_3$ ;
- b) i flavoni posseggono un gruppo carbonilico in posizione 4 e un doppio legame  $C_2=C_3$ ;
- c) i flavanoni sono caratterizzati dal gruppo carbonilico in  $C_4$ , ed un singolo legame  $C_2-C_3$ ;
- d) negli isoflavoni l'anello benzenico B è legato in posizione 3, invece che in posizione 2, come negli altri flavonoidi. Gli isoflavoni possiedono il gruppo  $C=O$  in posizione 4 e singolo legame  $C_2-C_3$ ;
- e) i flavanoli sono caratterizzati dall'assenza del gruppo  $C=O$  in posizione 4; contengono un singolo legame  $C_2-C_3$  e un gruppo ossidrilico in posizione 3;
- f) nelle antocianine, l'anello C è aromatico ed è presente il gruppo OH in posizione 3.

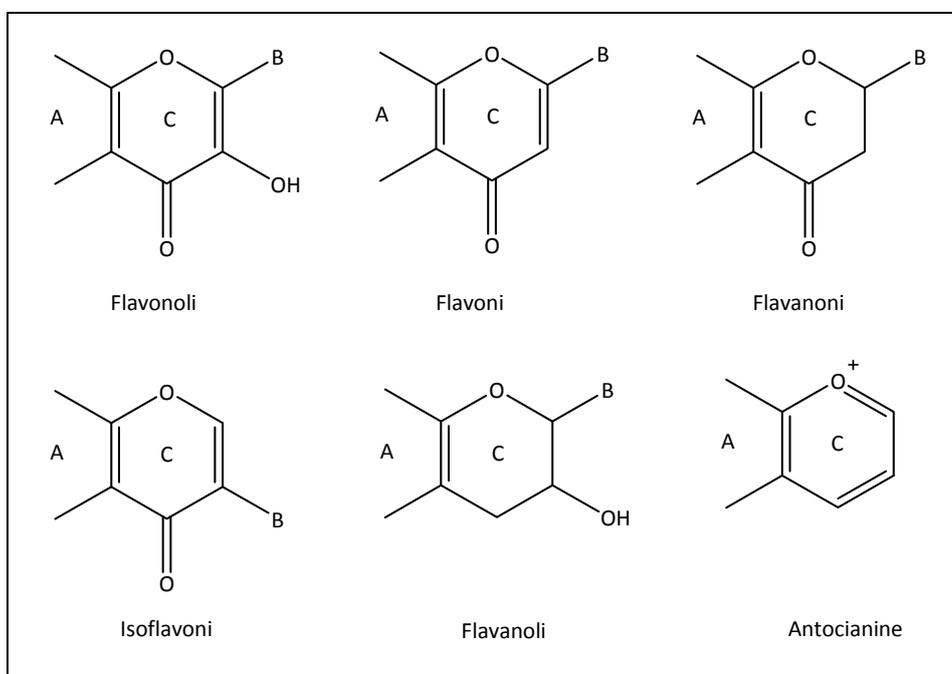
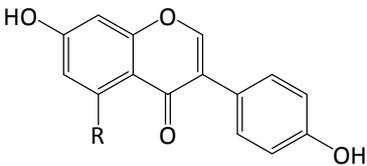
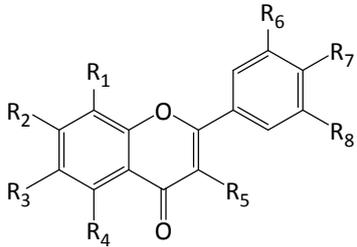
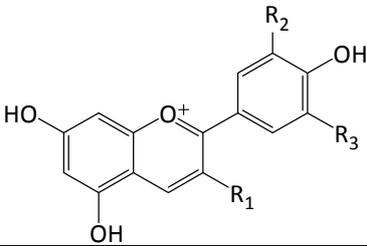
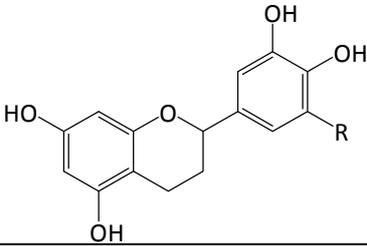
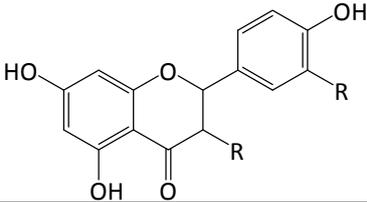


Figura 1.11. Classi di flavonoidi [21].

I flavonoidi sono ampiamente distribuiti nei cibi. In Tabella 1.2 vengono riportate le sostanze più rappresentative di ogni sottoclasse e gli alimenti in cui principalmente si trovano.

Tabella 1.2. Flavonoidi più rappresentativi e alimenti in cui sono presenti [22].

CLASSE	SOSTANZA		ALIMENTO
<b>Isoflavoni</b> 	R: OH	Genisteina	Soia
	R: H	Daidzeina	Soia
<b>Flavoni e flavonoli</b> 	R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>6</sub> : H R <sub>2</sub> , R <sub>4</sub> , R <sub>7</sub> , R <sub>8</sub> : OH R <sub>5</sub> : O-Glucoside	Rutina	Cipolla, mela, uva, broccoli e tè
	R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> , R <sub>5</sub> , R <sub>8</sub> : H R <sub>2</sub> , R <sub>4</sub> , R <sub>6</sub> , R <sub>7</sub> : OH	Luteolina	Limone, olive e sedano
	R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> , R <sub>5</sub> , R <sub>6</sub> , R <sub>7</sub> , R <sub>8</sub> : H R <sub>2</sub> , R <sub>4</sub> : OH	Crisina	Buccia della frutta
	R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> , R <sub>5</sub> , R <sub>6</sub> , R <sub>8</sub> : H R <sub>2</sub> , R <sub>4</sub> , R <sub>7</sub> : OH	Apigenina	Sedano e prezzemolo
	R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> , R <sub>5</sub> , R <sub>8</sub> : H R <sub>2</sub> , R <sub>4</sub> , R <sub>6</sub> : OH R <sub>7</sub> : OCH <sub>3</sub>	Esperetina	Arance
	R <sub>5</sub> , R <sub>6</sub> , R <sub>8</sub> : H R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> , R <sub>7</sub> : OCH <sub>3</sub>	Tangeretina	Agrumi
	R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> , R <sub>8</sub> : H R <sub>2</sub> , R <sub>4</sub> , R <sub>5</sub> , R <sub>6</sub> , R <sub>7</sub> : OCH <sub>3</sub>	Quercetina	Tè, cipolle, broccoli, fagioli, cereali, mele e uva
	R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> : H R <sub>2</sub> , R <sub>4</sub> , R <sub>5</sub> , R <sub>6</sub> , R <sub>7</sub> , R <sub>8</sub> : OH	Miricetina	Uva
R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> , R <sub>6</sub> , R <sub>8</sub> : H R <sub>2</sub> , R <sub>4</sub> , R <sub>5</sub> , R <sub>7</sub> : OH	Canferolo	Indivia, broccoli e tè	
<b>Antocianine</b> 	R <sub>1</sub> : O-Glucoside R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> : OCH <sub>3</sub>	Enina	Uva nera e vino rosso
	R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> : OH R <sub>3</sub> : H	Cianidina	Uva, lamponi e fragole
	R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> : OH	Delfinidina	Melanzane
<b>Flavanoli</b> 	R: H	Catechina	Mele, tè, uva, vino e cioccolata
	R: OH	Epigallocatechina	Mele, tè, vino e cioccolata
<b>Flavanoni</b> 	R: H	Naringenina	Buccia degli agrumi
	R: OH	Tassifolina	Agrumi

### 1.3.2 ACIDI FENOLICI

Gli acidi fenolici si possono suddividere in due sottoclassi: gli acidi idrossibenzoici, derivati dell'acido benzoico e gli acidi idrossicinnamici, derivati dell'acido cinnamico.

Gli acidi idrossibenzoici si trovano molto raramente nelle piante commestibili; questa è la ragione per la quale non assumono un grande interesse nutrizionale. Uno dei polifenoli rappresentativi di questa categoria è l'acido gallico (Figura 1.12), contenuto nel tè.

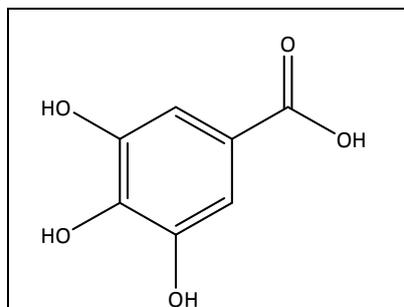


Figura 1.12. Formula di struttura dell'acido gallico.

Gli acidi idrossicinnamici sono contenuti nei cereali ed in alcuni tipi di frutta, tra cui il kiwi; sono presenti in tutte le parti del frutto, ma la concentrazione maggiore è stata misurata sulla buccia [9]. Tra gli acidi idrossicinnamici, il più comune è l'acido caffeico (Figura 1.13).

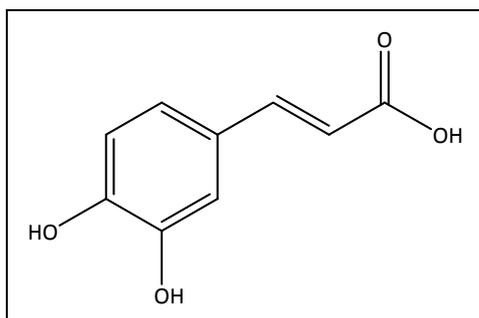


Figura 1.13. Formula di struttura dell'acido caffeico.

### 1.3.3 ALCOLI FENOLICI

I più comuni alcoli fenolici sono il tirosolo (4-idrossifeniletanolo) e l'idrossitirosolo (3,4-diidrossifeniletanolo), contenuti principalmente nell'olio d'oliva. Nonostante ci siano molte evidenze sulle proprietà salutari dell'olio, sono limitati gli studi su questi composti, probabilmente a causa della loro bassa concentrazione [9].

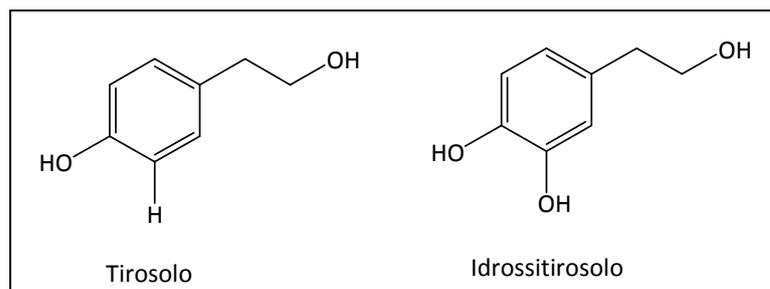


Figura 1.14. Formule di struttura di tirosolo e idrossityrosolo.

#### 1.3.4 STILBENI

Gli stilbeni sono poco presenti nella dieta; il maggior rappresentante di questa classe è il resveratrolo (Figura 1.3), presente in più di 70 specie di piante, in uva, frutti di bosco e arachidi. La buccia dell'uva rossa è particolarmente ricca di resveratrolo; ciò contribuisce all'elevata concentrazione di questo composto nel vino rosso e nel succo d'uva [9].

#### 1.3.5 LIGNANI

I lignani sono costituiti da due unità di fenilpropano. La maggiore fonte di questa classe di polifenoli sono i semi di lino. L'interesse nei lignani e nei loro derivati sintetici sta crescendo a causa delle potenziali applicazioni in chemioterapia [9].

## 1.4 Metodi in vitro per lo studio chimico-fisico degli antiossidanti

Negli ultimi anni sta crescendo notevolmente l'interesse nei confronti della corretta alimentazione ed in particolare su tipologia, concentrazione, caratteristiche, proprietà benefiche, meccanismi chimico-fisici di tutte quelle sostanze comunemente chiamate "antiossidanti" [23]. Per questo motivo nasce la necessità di avere metodi analitici *in vitro* per l'identificazione delle molecole antiossidanti e dei polifenoli, in quanto classe più attiva, che siano il più possibile semplici, convenienti, flessibili e veloci. È importante da approfondire anche lo studio delle motivazioni chimico-fisiche che sottostanno al potere antiossidante, attraverso l'analisi di singole molecole con possibile potere antiossidante.

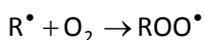
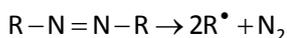
I metodi esistenti per l'identificazione delle proprietà antiossidanti si possono dividere in due grandi classi: metodi che permettono la valutazione della capacità di *scavenger* nei confronti di specifici ROS/RNS e metodi che valutano la capacità di *scavenger* nei confronti di radicali non biologici stabili. Tali radicali non sono presenti in natura, ma il loro utilizzo permette di ottenere una quantificazione del potere antiossidante in modo più semplice e rapido, in quanto generalmente sono disponibili commercialmente e si degradano lentamente. Una terza classe di metodi racchiude i saggi che non valutano la capacità di *scavenger*, ma altre grandezze correlate con il potere antiossidante, quali ad esempio la capacità riducente del campione. Vengono descritti inoltre saggi che quantificano singole categorie di antiossidanti (polifenoli, flavonoidi, acido ascorbico).

### 1.4.1 CAPACITÀ DI SCAVENGER NEI CONFRONTI DI ROS O RNS

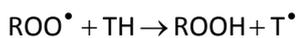
I metodi che misurano la capacità di *scavenger* nei confronti di radicali biologici sono quelli che riflettono maggiormente ciò che accade *in vivo*, in quanto durante l'analisi si riproduce esattamente il comportamento tipico della molecola antiossidante all'interno dell'organismo.

In genere in questi saggi è applicato uno schema di tipo competitivo, nel quale la molecola antiossidante ed un'altra molecola *target* reagiscono con il radicale  $ROO^\bullet$ . In questo tipo di metodi sono coinvolti tre elementi:

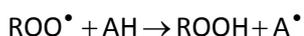
- a) un azo-composto termolabile (R-N=N-R), che dà vita ad un radicale  $R^\bullet$ , il quale reagisce con ossigeno molecolare generando un flusso costante di radicali  $ROO^\bullet$



- b) una molecola *target* ossidabile (TH)



- c) il composto antiossidante (AH)



Nello schema competitivo la presenza dell'antiossidante inibisce o ritarda l'ossidazione della molecola *target* indotta dal radicale perossilico. La velocità di ossidazione del composto *target* può essere misurata attraverso diverse modalità, così come si possono utilizzare diverse molecole come

*target* [23]. Si riportano alcuni esempi di saggi che vengono utilizzati per la determinazione della capacità di *scavenger* nei confronti di radicali perossilici.

#### 1.4.1.1 METODO ORAC

Il metodo ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) è uno dei metodi più comuni per la determinazione della capacità di *scavenger* nei confronti di radicali perossilici. Il principio del saggio è basato sulla misura della diminuzione dell'intensità di fluorescenza di una molecola *target* fluorescente (ad esempio fluoresceina), sotto un flusso costante di radicali perossilici, generati dalla decomposizione termica di un azocomposto.

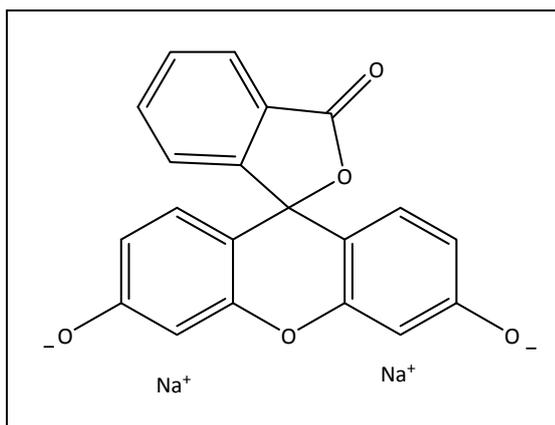


Figura 1.15. Formula di struttura della fluoresceina sodica.

La velocità della decomposizione spontanea della fluoresceina viene rallentata dalla presenza di antiossidanti di tipo *chain-breaking*. La reazione è condotta per tempi lunghi (superiori ai 30 minuti) e la quantificazione del potere antiossidante viene effettuata misurando la differenza tra l'area sottesa alla curva che rappresenta l'ossidazione della fluoresceina in assenza ed in presenza di antiossidante [23].

#### 1.4.1.2 METODO TRAP

Il saggio TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*) è stato messo a punto per la determinazione dello stato antiossidante del plasma umano. Il metodo si basa sulla misura del tempo che l'ossigeno molecolare impiega per inibire la reazione di perossidazione del plasma indotta da radicali perossilici, generati da decomposizione termica di un azo-composto. In questo caso il *target* è il plasma stesso [24]. Nel saggio TRAP originale si utilizzava l'elettrodo ad ossigeno come rivelatore; nelle versioni più recenti del metodo si preferisce utilizzare  $\beta$ -ficoeritrina come *target* fluorescente (Figura 1.16) e si determina l'abilità del plasma ad impedire o rallentare l'ossidazione del *target*, tramite misure di intensità di fluorescenza [23].

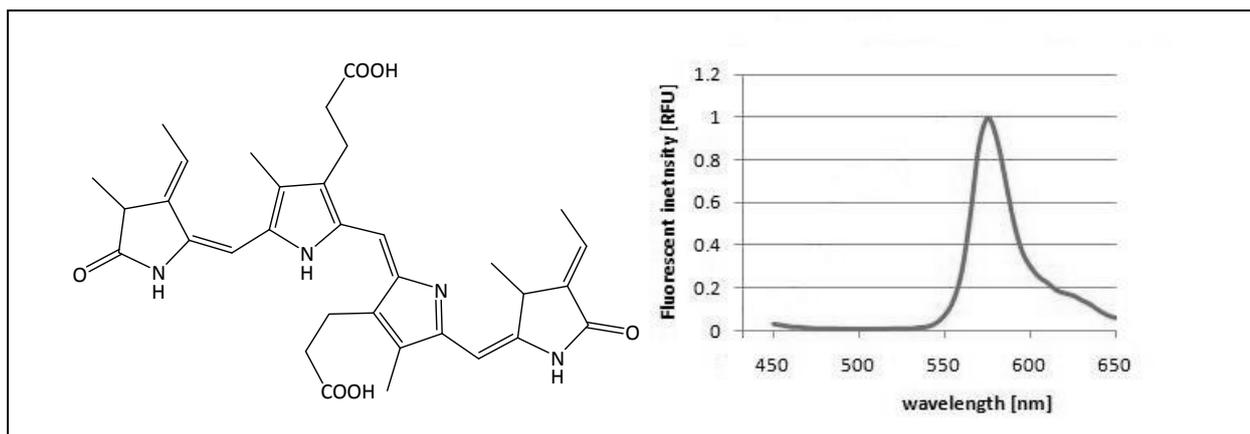


Figura 1.16. Formula di struttura della  $\beta$ -ficoeritrina e spettro di fluorescenza.

### 1.4.1.3 INIBIZIONE DELLA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

In questo metodo viene indotta artificialmente l'ossidazione di acido linoleico o di LDL (*Low Density Lipoprotein*) in presenza di ossigeno, catalizzata da Cu (II) o da un azo-composto. Se la reazione viene condotta in solvente organico il progresso dell'auto-ossidazione può essere monitorato misurando l'assorbanza a 234 nm, lunghezza d'onda di massimo assorbimento del lipide perossido che si forma. Se invece la reazione viene condotta in micelle, situazione che più si avvicina a ciò che accade *in vivo*, la cinetica di consumo di ossigeno non può più essere monitorata spettrofotometricamente [25], a causa dell'assorbimento di H<sub>2</sub>O alla stessa lunghezza d'onda, ma amperometricamente, utilizzando un elettrodo ad ossigeno (elettrodo di Clark). In questo caso si misura la velocità di consumo di ossigeno in assenza ed in presenza dell'antiossidante. I risultati sono generalmente espressi in termini di IC<sub>50</sub>, concentrazione di campione in grado di inibire del 50% la reazione di perossidazione lipidica [26].

Rispetto agli altri saggi, questo metodo permette di riprodurre la perossidazione lipidica in modo più simile a ciò che accade *in vivo*, anche per l'utilizzo di acido linoleico, substrato largamente presente nell'organismo [27] e dunque soggetto ad ossidazione da parte dei radicali liberi.

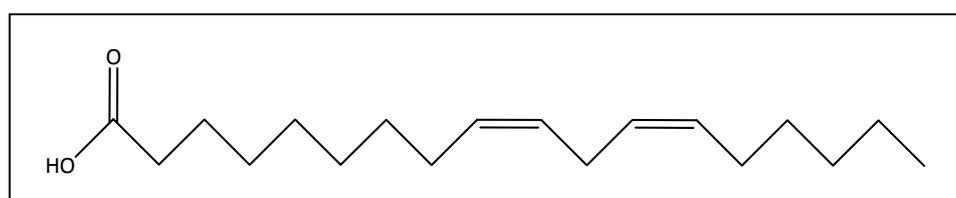


Figura 1.17. Formula di struttura dell'acido linoleico.

La variante del metodo che utilizza le micelle permette di avvicinarsi al sistema reale delle membrane fosfolipidiche, senza i disagi in termini di tempo e le difficoltà della procedura per la preparazione di liposomi modello. Inoltre, le micelle permettono agli antiossidanti e all'iniziatore di andare rapidamente all'equilibrio all'interno della fase lipidica facilitando quindi l'ottenimento di dati cinetici [28].

### 1.4.1.4 CAPACITÀ DI SCAVENGER NEI CONFRONTI DI ALTRI ROS/RNS

Sono noti anche metodi che valutano la capacità di *scavenger* nei confronti di altri ROS, diversi dal radicale perossilico. Sono presenti diversi saggi per la valutazione del potere antiossidante in cui si

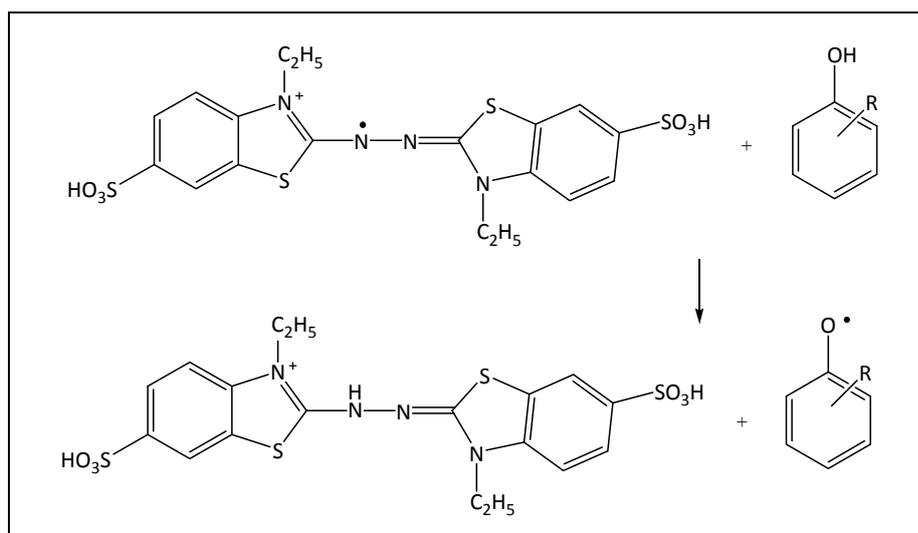
generano *in situ* il radicale anione superossido ( $O_2^{\bullet-}$ ), l'idrogeno perossido ( $H_2O_2$ ), il radicale idrossilico ( $OH^{\bullet}$ ), l'acido ipocloroso ( $HOCl$ ), l'ossigeno singoletto ( $^1O_2$ ), il radicale nitrico ossido ( $NO^{\bullet}$ ) ed il perossinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ). In molti di questi saggi si monitora l'ossidazione di un composto *target* ad opera del ROS, e si misura l'entità dell'inibizione causata dalla presenza dell'antiossidante. La determinazione viene effettuata principalmente attraverso misure di assorbanza, intensità di fluorescenza o chemiluminescenza, a seconda delle caratteristiche della molecola *target* scelta [29].

#### 1.4.2 CAPACITÀ DI SCAVENGER NEI CONFRONTI DI RADICALI NON BIOLOGICI STABILI

In alternativa ai metodi già citati, in cui viene generato un radicale dell'ossigeno già presente in natura, sono stati sviluppati dei saggi che si basano sull'utilizzo di radicali non biologici stabili. La popolarità di questi metodi risiede nella loro semplicità e rapidità; inoltre si tratta di metodi *substrate-free*, in quanto non vi è la necessità di avere una molecola *target* a cui fare riferimento durante l'analisi, ma gli unici componenti in ambiente di reazione sono il radicale e l'antiossidante [9].

##### 1.4.2.1 METODO ABTS

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



Il metodo originale è basato sulla generazione del radicale ferrilmioglobina che reagisce con ABTS per formare il radicale  $ABTS^{\bullet+}$ . In questa prima versione del metodo il campione deve essere introdotto prima della formazione dell' $ABTS^{\bullet+}$ : in questo modo l' $ABTS^{\bullet+}$  appena generato viene immediatamente consumato dal campione, finché sono presenti sostanze antiossidanti. Il tempo durante il quale non si osserva un aumento netto di concentrazione di radicale viene considerato proporzionale alla capacità antiossidante del campione [30]. L'ordine di introduzione dei reagenti è stato molto discusso, a causa di possibili reazioni tra le molecole antiossidanti del campione ed il perossido di idrogeno che viene utilizzato per la generazione della ferrilmioglobina. È stata quindi proposta una variante del metodo in cui il campione viene introdotto dopo la generazione del radicale  $ABTS^{\bullet+}$  e dove viene determinata spettrofotometricamente la differenza in concentrazione dell' $ABTS^{\bullet+}$  prima e dopo la reazione con l'antiossidante. Sono inoltre state studiate modifiche del metodo nella formazione del radicale  $ABTS^{\bullet+}$ , nel tempo di reazione e nella lunghezza d'onda di misura. L' $ABTS^{\bullet+}$

può essere ad esempio generato utilizzando manganese diossido, AAPH o potassio persolfato; per quanto riguarda invece la lunghezza d'onda di analisi, la determinazione a 734 nm è preferita perché minimizza le interferenze dovute ad altri componenti assorbenti e alla torbidità del campione. Per la quantificazione si misura il valore di assorbanza del campione dopo la reazione tra antiossidante e  $ABTS^{•+}$ , proporzionale alla concentrazione rimanente di  $ABTS^{•+}$ .

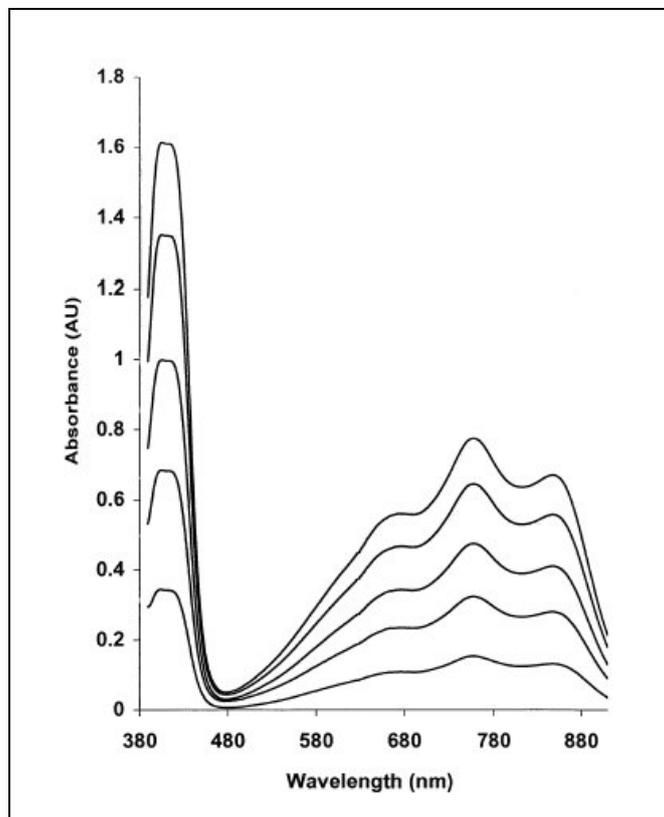


Figura 1.18. Spettro UV del radicale  $ABTS^{•+}$ . L'assorbanza diminuisce all'aumentare della quantità di antiossidante inserito.

I risultati sono generalmente espressi come equivalenti di Trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico) (Figura 1.19), ossia come concentrazione di una soluzione di Trolox (mM) con una capacità antiossidante equivalente a quella trovata per una soluzione 1 mM della sostanza in esame.

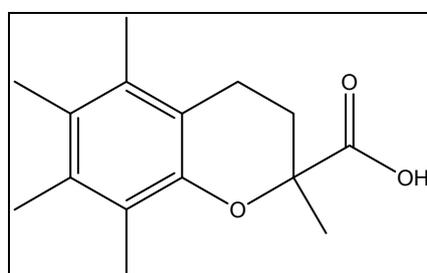


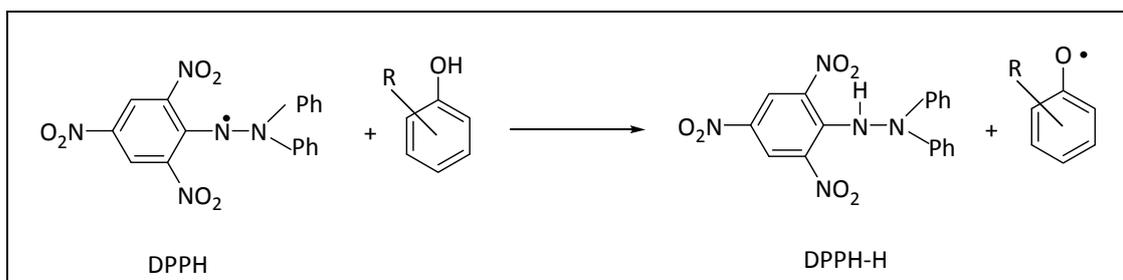
Figura 1.19. Formula di struttura del Trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico).

Il saggio è molto semplice ed applicabile per analisi di routine. Lo *scavenging* con il metodo ABTS può essere effettuato a vari pH con la possibilità di studiare l'effetto del pH sull'azione antiossidante, e la solubilità dell' $ABTS^{•+}$  sia in acqua che in solventi organici permette l'analisi sia di antiossidanti

lipofili che idrofili. Gli svantaggi sono che il risultato dipende non solo dalla capacità antiossidante del campione, ma anche dal comportamento cinetico delle sostanze antiossidanti che lo compongono. Inoltre il radicale ABTS<sup>•+</sup> non è disponibile commercialmente, ma deve essere preparato *in situ* [29].

#### 1.4.2.2 METODO DPPH

In questo saggio si sfrutta la riduzione del radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH<sup>•</sup>) da parte dell'antiossidante.



La reazione può essere studiata spettrofotometricamente, misurando la scomparsa del picco tipico del DPPH<sup>•</sup> a 515-528 nm (Figura 1.20), oppure mediante la risonanza di spin elettronico, monitorando il picco ESR del DPPH<sup>•</sup> (Figura 1.21). Recentemente è stata messa a punto una variante del metodo basata sulla riduzione amperometrica del DPPH<sup>•</sup> ad un elettrodo di carbonio [31]. La misura di corrente registrata è proporzionale alla concentrazione di DPPH<sup>•</sup>.

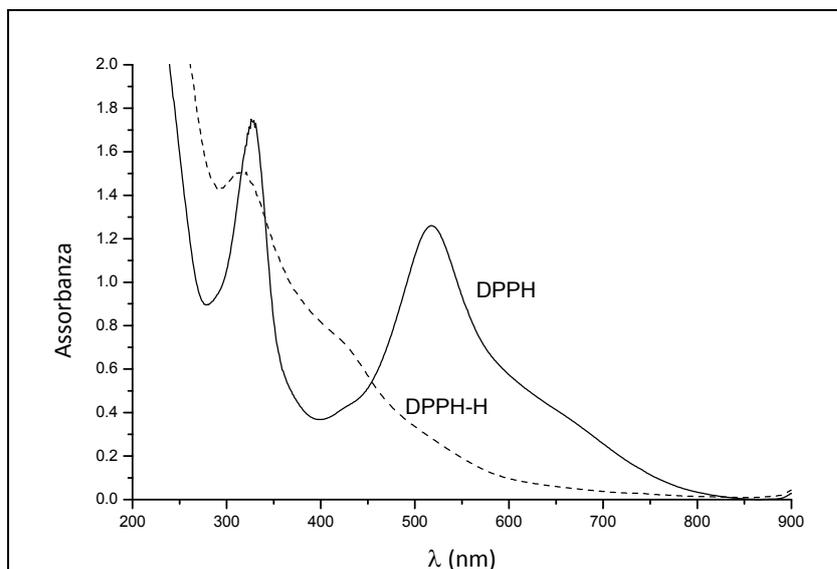


Figura 1.20. Spettro UV del DPPH<sup>•</sup> e del DPPH-H.

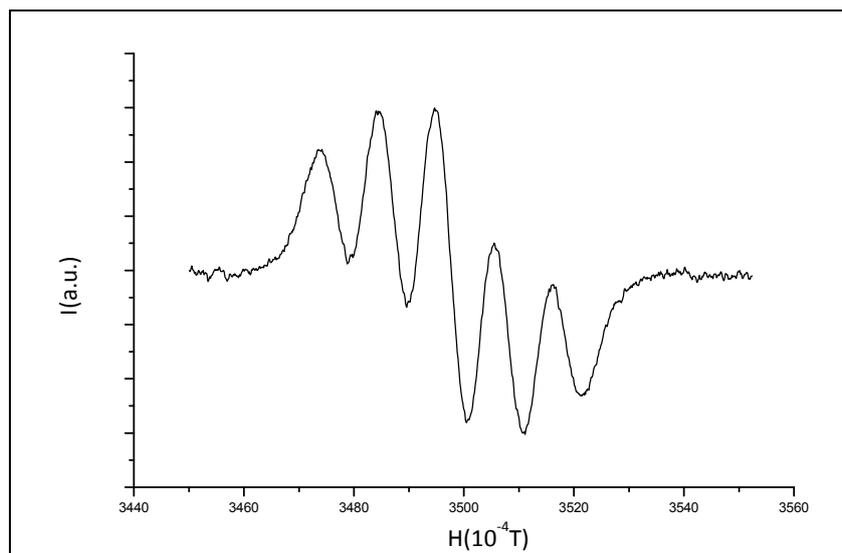


Figura 1.21. Spettro ESR del DPPH<sup>•</sup> in etanolo.

La capacità di *scavenger* misurata attraverso questo metodo è influenzata dal pH e dal solvente; inoltre un fattore determinante perché avvenga la reazione tra antiossidante e DPPH<sup>•</sup> è l'accessibilità sterica del radicale: alcuni grandi antiossidanti che reagiscono velocemente con radicali perossilici, possono non essere quantificati attraverso questo saggio. Altri svantaggi del metodo sono il fatto che il radicale DPPH<sup>•</sup> non presenta similitudini con le specie reattive dell'ossigeno; inoltre, pare che alcune reazioni del DPPH con polifenoli siano di equilibrio [25]. Nonostante le limitazioni, il metodo del DPPH è ampiamente utilizzato in quanto il radicale DPPH<sup>•</sup> è stabile, disponibile commercialmente e non deve essere generato *in situ* [29].

### 1.4.3 ALTRI METODI PER LA DETERMINAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE

Tra i metodi per la quantificazione del potere antiossidante, che non determinano la capacità di *scavenger* di un campione, ce ne sono alcuni che misurano il potere riducente totale. L'entità della capacità di ridurre una sostanza *target* è indice della capacità antiossidante del campione, dato che, per comportarsi da antiossidante all'interno dell'organismo la sostanza in esame deve possedere un elevato potere riducente. Vengono inoltre riportati metodi che permettono l'identificazione diretta di alcune specifiche molecole antiossidanti: polifenoli, flavonoidi, acido ascorbico.

#### 1.4.3.1 METODO FOLIN-CIOCALTEAU

Il metodo Folin-Ciocalteu è ancora il metodo ufficiale per la determinazione del contenuto totale di polifenoli (TPC) nei vini, nella Comunità Europea. Questo metodo si basa sull'ossidazione chimica dei composti fenolici da parte di una miscela ossidante, chiamata reattivo di Folin, costituita da acido fosfotungstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) che, riducendosi, forma una miscela di ossidi ( $W_8O_{23}$  e  $Mo_8O_{23}$ ) colorata di azzurro. L'analisi è condotta mediante determinazione spettrofotometrica [32].

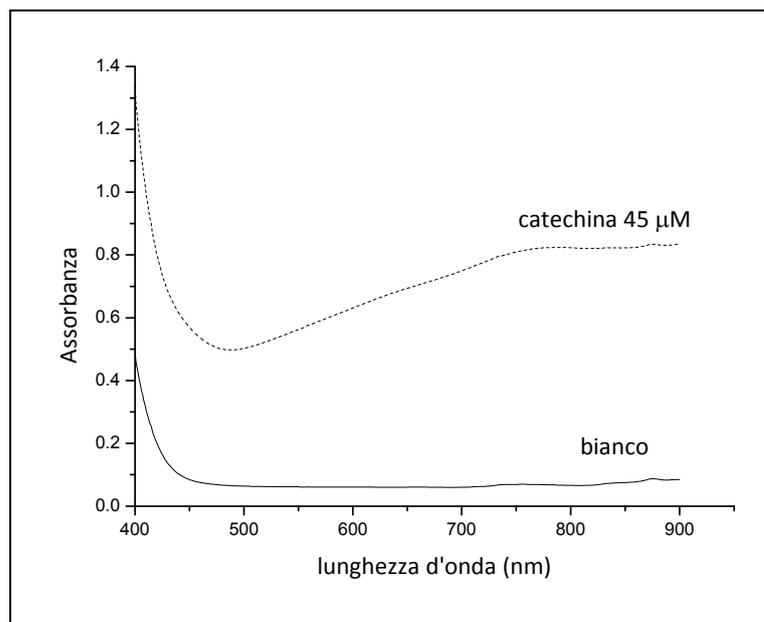


Figura 1.22. Spettro UV del reattivo di Folin-Ciocalteu, in assenza ed in presenza di un polifenolo (catechina).

Il metodo di Folin-Ciocalteu è non-specifico per i composti fenolici, a causa dei numerosi interferenti come ammine aromatiche e acido ascorbico, che aumentano il valore di TPC trovato. Per questo motivo, a meno che gli interferenti non vengano rimossi, il metodo non è applicabile per la determinazione del TPC, ma recentemente viene proposto per la misura di un generico potere riducente totale.

Il metodo viene ampiamente utilizzato, in quanto è semplice e riproducibile; i reagenti sono disponibili commercialmente e la misura dell'assorbance ad alta lunghezza d'onda minimizza le interferenze della matrice alimentare. Le limitazioni sono il fatto che il metodo richiede tempi lunghi per poter effettuare l'analisi (circa 2 ore) e, dovendo essere effettuato in fase acquosa, non è applicabile per antiossidanti lipofili [29].

#### 1.4.3.2 SAGGIO FRAP

Il saggio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) misura l'abilità degli antiossidanti a ridurre il complesso di ferro (III) con 2,4,6-tripiridil-s-triazina  $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  al complesso ridotto di ferro (II)  $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  (Figura 1.23), intensamente colorato di blu, in ambiente acido. Il potere riducente viene calcolato monitorando l'aumento di assorbance a 593 nm, confrontandola con quella di una soluzione standard antiossidante (ad esempio acido ascorbico).

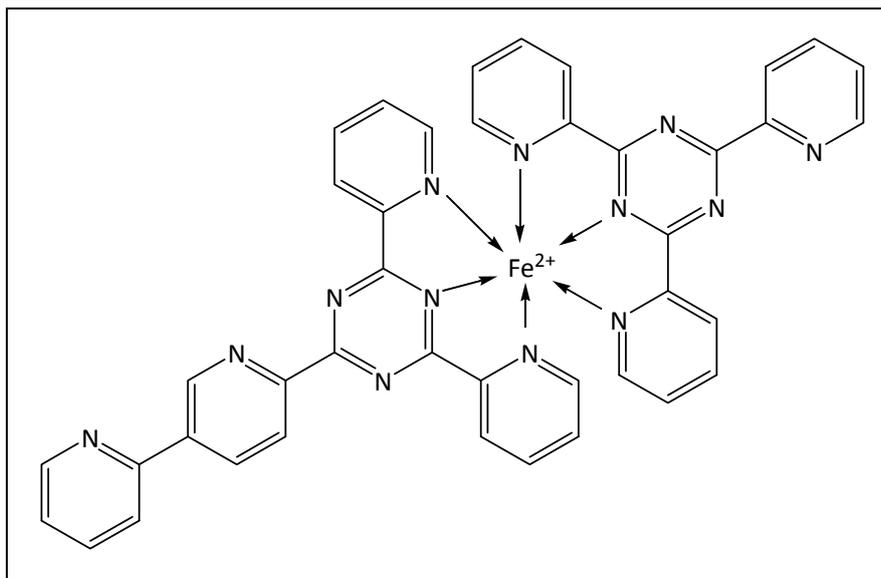


Figura 1.23. Formula di struttura del  $[\text{Fe(II)-TPTZ}]^{2+}$ .

Questo saggio non è molto utilizzato a causa delle sue molte limitazioni: il valore del potere riducente potrebbe essere influenzato da qualunque sostanza che possiede un potenziale di riduzione più basso di quello della coppia redox  $\text{Fe(II)}/\text{Fe(III)}$ ; d'altra parte ci possono essere antiossidanti che riducono lentamente il  $\text{Fe(III)}$  rispetto al tempo di analisi (generalmente 4 minuti) e dunque vengono solo parzialmente quantificati. Inoltre, dato che il metodo FRAP misura la capacità riducente, antiossidanti che agiscono solo da *chain-breaker* non vengono quantificati. Infine la concomitante produzione di  $\text{Fe(II)}$ , noto pro-ossidante, può portare alla produzione di radicali dell'ossigeno aggiuntivi [29].

#### 1.4.3.3 METODI ELETTROCHIMICI

La capacità riducente totale si può infine misurare per via elettrochimica. Tra le tecniche elettrochimiche, la voltammetria ciclica sembra essere quella più flessibile. La capacità riducente del campione si misura attraverso i parametri: corrente anodica di picco ( $i_{pa}$ ) e area sottesa alla curva anodica (A), che sono correlate alla concentrazione delle specie riducenti presenti nel campione.

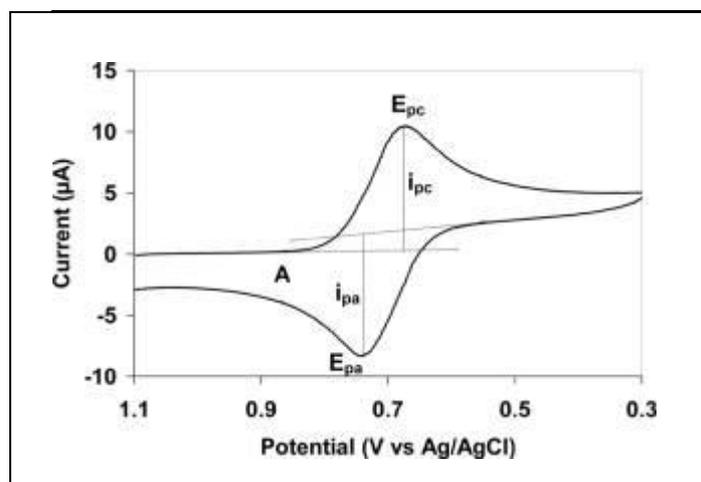


Figura 1.24. Esempio di voltammogramma ciclico.

Le matrici complesse, come i campioni biologici o alimentari, spesso presentano più di un singolo componente che può donare un elettrone intorno allo stesso potenziale: in questi casi il parametro A è preferibile per la quantificazione del potere antiossidante complessivo.

Le tecniche basate su misure elettrochimiche presentano diversi vantaggi:

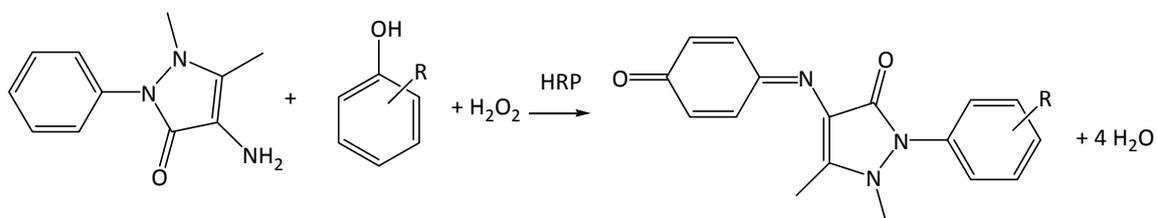
- il voltammogramma è ottenibile sia in ambiente acquoso che in solvente organico;
- non sono necessarie reazioni chimiche preparative, ma si misura direttamente il comportamento elettrochimico del campione;
- si possono analizzare campioni torbidi o intensamente colorati, caratteristiche che rendono la determinazione per via spettrofotometrica più complicata, per l'aggiunta di preventivi stadi di preparazione del campione.

Un'importante limitazione di queste tecniche è dovuta alla necessità di pulire frequentemente dai residui di campione sulla sua superficie e mantenere la sua sensibilità [23].

#### 1.4.4 DETERMINAZIONE DI SINGOLE CATEGORIE DI ANTIOSSIDANTI

##### 1.4.4.1 METODO ENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI POLIFENOLI TOTALI

Stevanato *et al* ha messo a punto un nuovo metodo enzimatico per la determinazione del contenuto di polifenoli totali (TPC) nel vino e nel tè. Questo metodo si ispira alla classica reazione Trinder. In presenza di perossidasi (HRP), il perossido di idrogeno reagisce con le strutture fenoliche e con il 4-amminofenazone, che è incolore, dando un composto colorato, la cui assorbanza è proporzionale sia al contenuto di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente nel campione, che al contenuto di fenolo [33].



Nella sua versione originale la reazione è utilizzata per la determinazione spettrofotometrica del perossido di idrogeno; in questo nuovo metodo, invece, viene determinata la concentrazione del polifenolo. Per questo saggio è stata dimostrata una maggiore appropriatezza e facilità di esecuzione rispetto alle due note metodiche Folin-Ciocalteu e di quenching del DPPH. L'analisi è molto più rapida; è stato inoltre dimostrato che sostanze come acido ascorbico, acido citrico e solfiti, classici interferenti nel metodo Folin-Ciocalteu, non influenzano i risultati ottenuti con il metodo enzimatico.

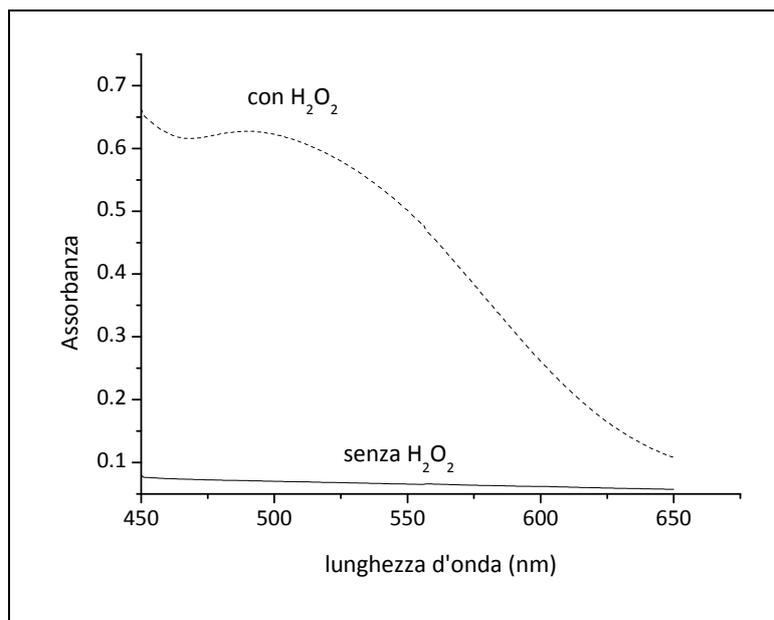


Figura 1.25. Spettri di assorbimento di una soluzione contenente  $3 \cdot 10^{-3}$  M di 4-aminofenazone, pH 8;  $1 \cdot 10^{-4}$  M di catechina;  $3,3 \cdot 10^{-7}$  M di HRP, in assenza ed in presenza di  $2 \cdot 10^{-3}$  M di  $H_2O_2$ .

#### 1.4.4.2 METODO DELL'ALLUMINIO CLORURO PER LA DETERMINAZIONE DEI FLAVONOIDI

Il metodo dell'alluminio cloruro, introdotto da Smirnova *et al* permette di determinare il contenuto di flavonoidi totali, separando il loro contributo da quello dei polifenoli. Il principio di base si fonda sul fatto che l'alluminio cloruro è in grado di formare complessi con i flavonoidi che posseggono gruppi orto-diidrossi, peri-idrossi-osso e orto-idrossi-osso.

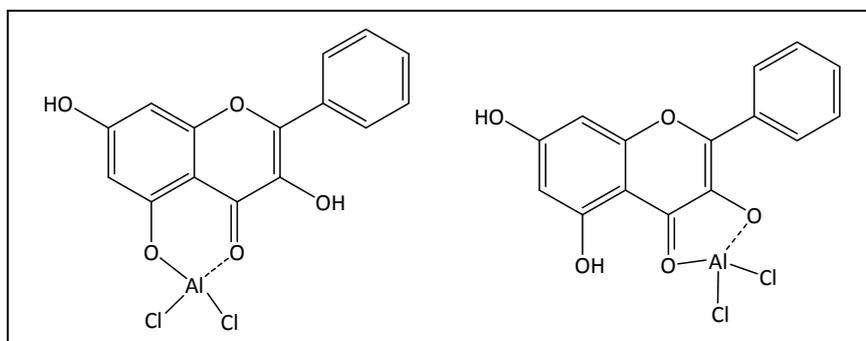


Figura 1.26. Esempio di complessi tra galangina e  $AlCl_3$ .

La formazione dei complessi è accompagnata da uno spostamento della banda di assorbimento nello spettro UV (Figura 1.27). In ambiente acido il complesso nei gruppi orto-diidrossi si rompe e vengono mantenuti solo i complessi tra il carbonile in C-4 e gli idrossidi in C-3 o C-5, più stabili [34].

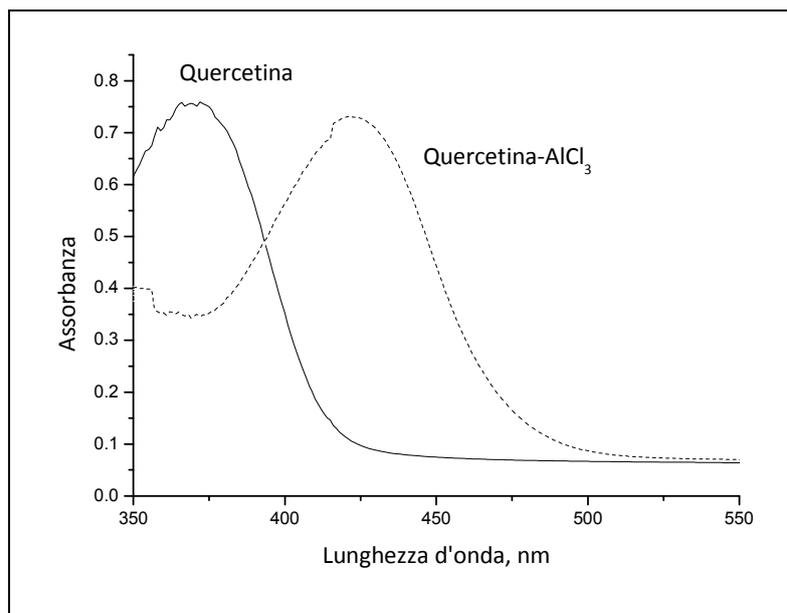
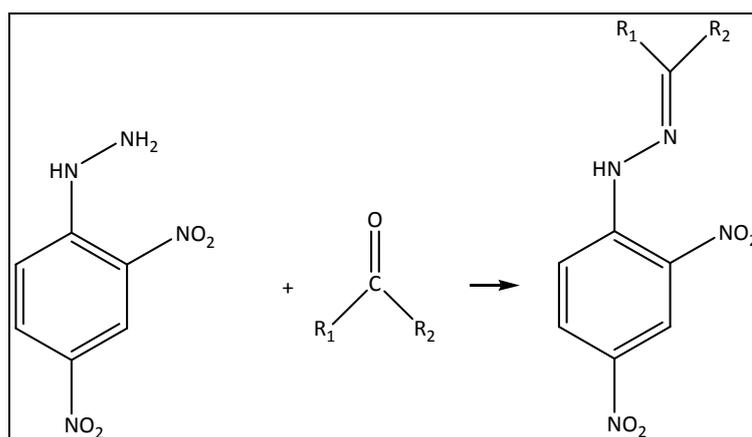


Figura 1.27. Spettro della quercetina e del complesso quercetina-AlCl<sub>3</sub>, in ambiente acido.

Il metodo, nonostante sia stato introdotto per la quantificazione dei flavonoidi, è in grado di identificare solo alcune sottoclassi di flavonoidi, i flavoni (flavonoidi che contengono un carbonile in C4) e flavonoli (flavoni che contengono un ossidrilico in C3), che posseggono le caratteristiche strutturali indispensabili per la formazione di complessi con l'alluminio [35]. Utilizzando questo metodo si ha quindi una sottostima del contenuto di flavonoidi totali presenti nel campione, perché alcune sottoclassi non vengono rilevate.

#### 1.4.4.3 METODO DELLA DNPH PER LA DETERMINAZIONE DEI FLAVONOIDI

Il metodo si basa sul fatto che la 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) reagisce con chetoni e aldeidi per formare 2,4-dinitrofenilidrazoni, che mostrano un massimo di assorbimento a 450 nm.



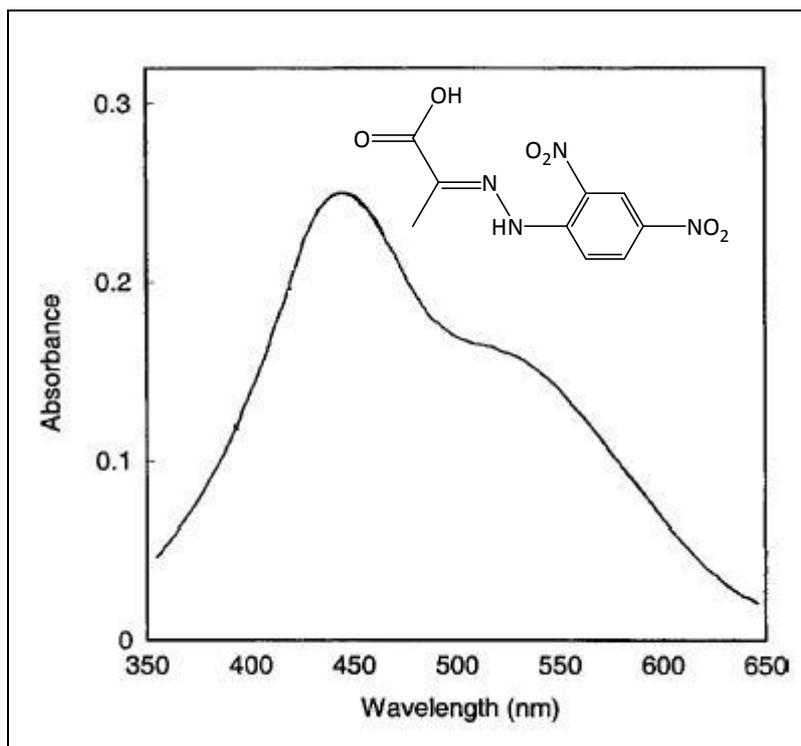
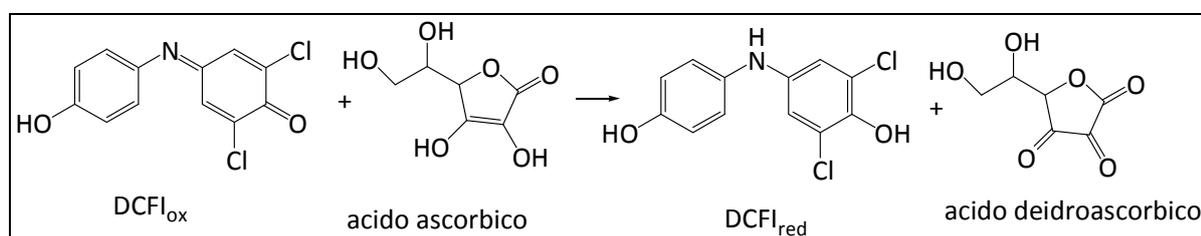


Figura 1.28. Spettro di un idrazone (prodotto dalla reazione della 2,4-dinitrofenilidrazina con l'acido piruvico).

La reazione può essere sfruttata per determinare i flavonoidi che contengono un gruppo carbonile. Come nel caso del metodo dell'alluminio cloruro, alcune sottoclassi di flavonoidi non vengono rilevate [35].

#### 1.4.4.4 METODO DELLA DNPH PER LA DETERMINAZIONE DELL'ACIDO ASCORBICO

Il metodo è stato introdotto da Roe *et al* e si basa sulla reazione tra l'acido deidroascorbico e la 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH), secondo quanto illustrato nel paragrafo precedente. L'idrazone che si forma si dissolve in acido solforico ed assume una colorazione rossastra, con un picco di assorbanza tra i 500 ed i 550 nm [36]. Per ottenere una quantificazione della vitamina C è ovviamente necessario ossidare preventivamente l'acido ascorbico a deidroascorbico, in modo che possa partecipare alla reazione con DNPH: l'ossidante più comunemente utilizzato è il 2,6-diclorofenolo-indofenolo [37].



## 1.5 Studio delle interazioni di membrana

L'azione di *chain-breaking* di molecole con proprietà antiossidanti è tanto più efficace quanto più l'antiossidante si posiziona nelle immediate vicinanze del sito di reazione, ovvero all'interno del doppio strato lipidico nel caso della perossidazione lipidica. La penetrazione di molecole idrofobiche nel doppio strato lipidico può, d'altra parte, comportare modificazioni anche sensibili delle caratteristiche strutturali e meccaniche del doppio strato lipidico. Nel corso dell'attività di ricerca

scientifico del presente lavoro di tesi si è ritenuto pertanto importante effettuare alcuni studi sulle possibili perturbazioni delle proprietà di membrana causate da molecole con proprietà antiossidanti.

I fosfolipidi, come introdotto nel paragrafo 1.1.4, sono molecole anfipatiche, con una parte idrofilica ed una parte idrofobica. La struttura di un fosfolipide è costituita da una molecola di glicerina esterificata con un gruppo fosfato e due acidi grassi (Figura 1.29): il gruppo fosfato fornisce alla molecola l'idrofilicità; nella zona degli acidi grassi, invece, il comportamento è idrofobico.

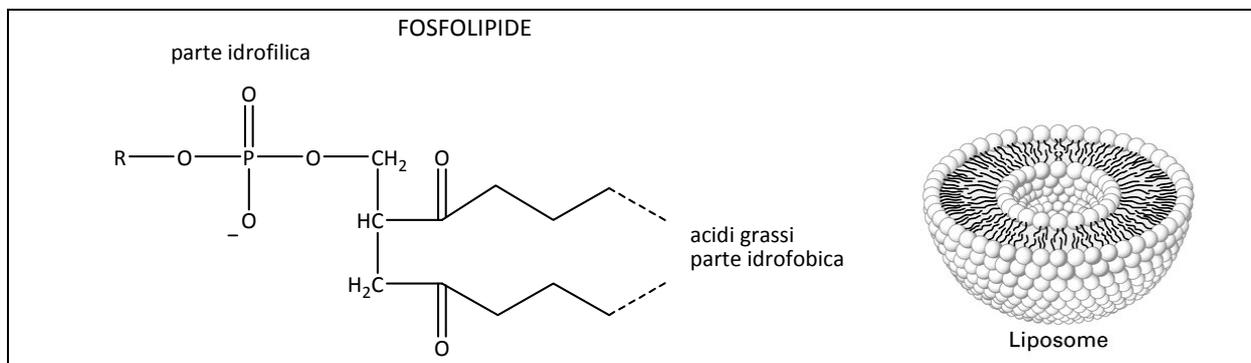


Figura 1.29. Formula di struttura di un generico fosfolipide e immagine di un liposoma.

I fosfolipidi in soluzione acquosa si dispongono in varie strutture che tendono a minimizzare l'interazione tra gli acidi grassi idrofobici e l'acqua circostante. Nello studio delle interazioni di membrana si costruiscono dei liposomi modello, che rappresentino *in vitro* le più complesse membrane cellulari, determinando dapprima l'assorbimento delle molecole in membrana e successivamente le modificazioni delle caratteristiche chimico-fisiche dei liposomi in presenza delle molecole antiossidanti come dopanti.

### 1.5.1 COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE

Prima di studiare eventuali interazioni che un dopante può determinare su membrane fosfolipidiche è opportuno valutare l'assorbimento del dopante stesso in membrana. Un coefficiente comunemente utilizzato come misura dell'assorbimento è il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (logP). Generalmente si assume che logP rappresenti la tendenza generale di una sostanza chimica a ripartirsi tra una fase acquosa ed una organica. Si definisce come:

$$P = \frac{n_{\text{oct}} / V_{\text{oct}}}{n_{\text{wat}} / V_{\text{wat}}} \quad (1.1)$$

ove  $n$  è il numero di moli del composto;  $V$  è il volume ed i pedici  $_{\text{oct}}$  e  $_{\text{wat}}$  si riferiscono rispettivamente alla fase ottanolica e acquosa [38].

È necessario sottolineare che il concetto di coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua, quando esteso a dispersioni liposomi/acqua, può non essere preciso per diverse ragioni, ad esempio la difficoltà nel definire il volume dei liposomi ed il fatto di considerarli come una fase omogenea. Ad ogni modo logP è in letteratura comunemente accettato ed utilizzato per descrivere la frazione di dopante assorbita dalla membrana.

Una maggior precisione deriva dal calcolo del coefficiente di ripartizione liposomi/acqua. Il volume dei liposomi, di difficile misura, generalmente di approssima a  $V_{lip} = \beta \cdot (C_L)_0 \cdot V_0$ , dove  $\beta$  è il volume molare del fosfolipide,  $(C_L)_0$  è la concentrazione iniziale di liposomi e  $V_0$  è il volume totale. Considerando che il volume occupato dai liposomi è molto piccolo e di conseguenza  $V_0 \cong V_{wat}$  si ottiene l'espressione:

$$P = \frac{C_{lip}}{C_{wat}} \cdot \frac{1}{(C_L)_0 \cdot \beta} \quad (1.2)$$

ove  $C_{lip}$  e  $C_{wat}$  indicano le concentrazioni del composto rispettivamente nei liposomi e nella fase acquosa, riferite al volume totale della dispersione;  $(C_L)_0$  è la concentrazione iniziale di liposomi, espressa in mol/L;  $\beta$  è il volume molare del fosfolipide [39].

### 1.5.2 STUDIO DELLE INTERAZIONI DI MEMBRANA TRAMITE CALORIMETRIA DIFFERENZIALE A SCANSIONE (DSC)

La calorimetria differenziale a scansione misura, in termini di entalpia, l'energia necessaria per annullare la differenza di temperatura tra il campione ed il riferimento, quando a questi si impone una rampa di temperatura. Durante la transizione di fase la temperatura del campione rimane inalterata, mentre quella del riferimento continua a seguire la rampa. È dunque necessario fornire del calore aggiuntivo affinché anche il campione segua la rampa di temperatura impostata: la quantità di calore addizionata è registrata sotto forma di picco.

I doppi strati lipidici sono sottoposti ad una serie di transizioni di fase che dipendono dalla temperatura, dalla composizione dei fosfolipidi, dalla pressione idrostatica e osmotica, dal pH e dagli ioni presenti in soluzione. La transizione di fase principale consiste nel passaggio dalla fase gel ( $L_\beta$ ) alla fase fluida ( $L_\alpha$ ). Tale transizione comporta delle variazioni nell'organizzazione e nel movimento delle catene idrocarburiche all'interno del doppio strato lipidico.

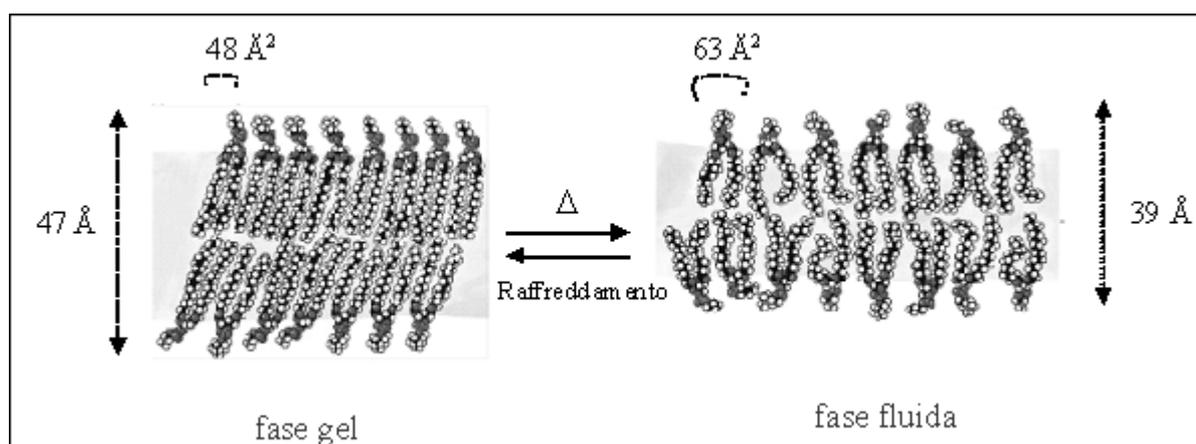


Figura 1.30. Organizzazione dei fosfolipidi in un doppio strato lipidico nelle fasi gel e fluida.

Da un grafico DSC si possono ricavare alcuni parametri termodinamici legati alle transizioni di fase dei fosfolipidi (Figura 1.31):

- temperatura di transizione ( $T_p$ ), è legata alla compattezza della membrana. Più la membrana è compatta più la temperatura di transizione è alta e viceversa. Per sistemi fosfolipidici

monocomponenti la transizione di fase è in genere ben definita all'interno di un intervallo di tempo piuttosto ristretto.

- cooperatività, è legata alla larghezza del picco. Più il picco è stretto più il processo è cooperativo. Se il comportamento di una o più molecole influenza il comportamento di quelle vicine, la transizione avverrà in tempi brevi, dunque sarà fornito molto calore in un tempo ristretto. Viceversa più il picco è allargato meno il processo è cooperativo: se le molecole non cooperano la quantità di calore da fornire istante per istante sarà minore, per un intervallo di tempo maggiore.
- entalpia di transizione ( $\Delta H$ ), è l'area sottesa al picco.

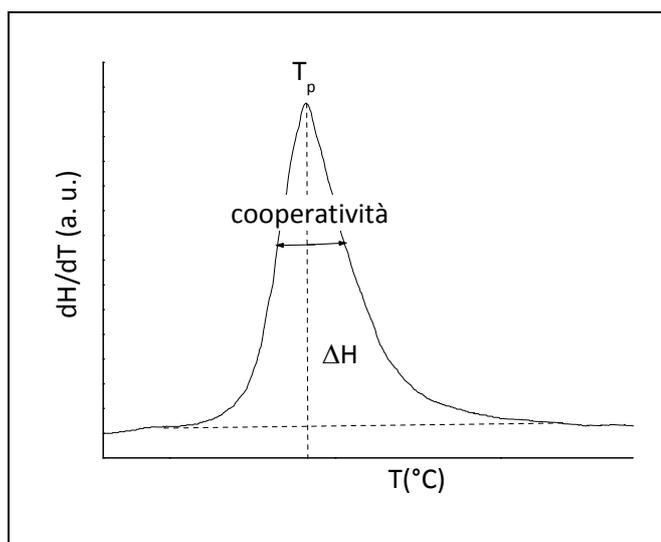


Figura 1.31. Picco ricavato da un grafico DSC in cui sono evidenziati la temperatura di transizione di fase ( $T_p$ ); la cooperatività (ampiezza del picco a metà altezza) e l'entalpia della transizione ( $\Delta H$ ).

Tramite la calorimetria differenziale a scansione è possibile quindi valutare eventuali cambiamenti nel comportamento naturale dei fosfolipidi all'interno dei liposomi, causati dalla presenza del dopante, come uno spostamento della temperatura di transizione di fase o una variazione nella cooperatività [40].

### 1.5.3 STUDIO DELLE INTERAZIONI DI MEMBRANA TRAMITE RISONANZA DI SPIN ELETTRONICO (ESR) – TECNICA DELLO *SPIN LABELLING*

La tecnica dello *spin labelling*, applicata alle membrane, permette di studiare la mobilità dei fosfolipidi a diverse profondità all'interno del doppio strato lipidico. Le informazioni si ottengono intercalando nella matrice fosfolipidica molecole di acido stearico con un radicale nitrossido stabile legato in posizione variabile, generalmente nelle posizioni 5, 7, 10, 12 e 16. Questi particolari radicali liberi vengono denominati SASL (SASL = *Stearic Acid Spin Label*) (Figura 1.32).

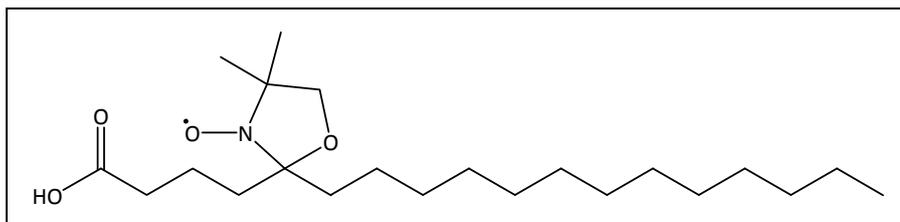


Figura 1.32. Formula di struttura del 5-SASL. Il nitrossido è legato in posizione 5 rispetto al carbonio carbossilico.

Per la loro natura anfipatica, in ambiente acquoso, i SASL interagiscono con i fosfolipidi in maniera analoga a quanto essi fanno tra di loro, nell'autoassemblaggio spontaneo di formazione della membrana, per cui, quando i SASL sono miscelati ad una dispersione di fosfolipidi nella fase di formazione dei liposomi, partecipano alla costituzione del doppio strato. Il comportamento delle catene aciliche del SASL all'interno della membrana mima quello delle catene fosfolipidiche, per cui le informazioni legate al moto del nitrossido possono essere direttamente riferite ai moti dei fosfolipidi.

Lo spettro di un SASL ha un aspetto diverso a seconda della mobilità che questo ha all'interno del doppio strato lipidico. Più è alta la mobilità più lo spettro si contrae. Questo effetto viene quantificato tramite il parametro d'ordine  $S$ , definito come segue:

$$S = 0.5407 \cdot \frac{A_{MAX} - A_{MIN}}{a_0} \quad (1.3)$$

ove  $a_0 = (A_{MAX} + 2A_{MIN})/3$ ;  $A_{MAX}$  indica la differenza tra le righe esterne dello spettro;  $A_{MIN}$  la differenza tra le righe interne dello spettro, misurate quando il sistema è in fase fluida, al di sopra della temperatura di transizione [41].

In Figura 1.33 viene riportato lo spettro ESR del 5-SASL e vengono evidenziati i valori  $A_{MAX}$  e  $A_{MIN}$ , corrispondenti rispettivamente alla differenza tra le righe esterne ed interne dello spettro.

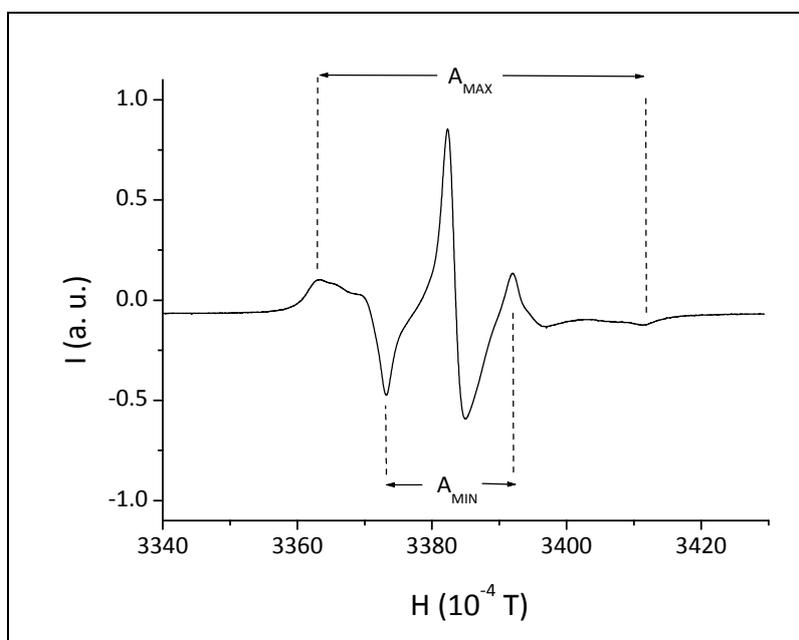


Figura 1.33. Spettro del 5-SASL, in cui vengono evidenziati  $A_{MAX}$  e  $A_{MIN}$ . T: 45°C; f: 9 GHz; P: 10 mW.

Maggiore è il valore di  $S$ , più il sistema è rigido, minore è il valore di  $S$ , maggiore è la mobilità del sistema. Analogamente, più il radicale si trova in profondità lungo il SASL, più è elevata la sua mobilità, dunque lo spettro è più compatto: in particolare si osserva un avvicinamento delle righe esterne dello spettro con quelle interne (Figura 1.34).

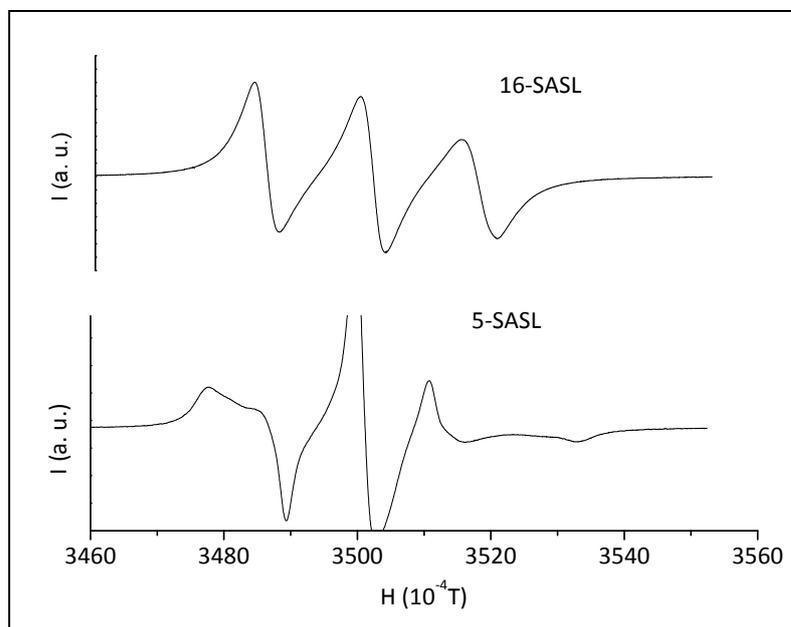


Figura 1.34. Spettro ESR del 5-SASL e del 16-SASL in fosfolipidi di DSPC.

Nel caso estremo di una mobilità totale lo spettro è caratterizzato da tre righe di uguale intensità, come nel caso del nitrossido in soluzione (Figura 1.35).

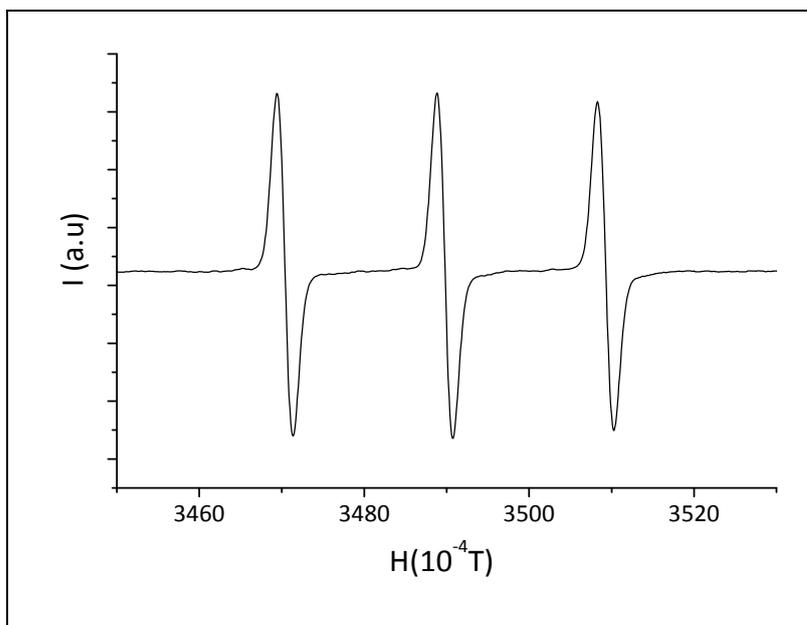


Figura 1.35. Spettro ESR di un nitrossido in fase acquosa.



## 2 - Materiali e metodi nell'analisi delle proprietà antiossidanti -

---

### 2.1 Materiali

I reagenti utilizzati sono stati forniti da Sigma-Aldrich Co. (Milano, Italia), ABIP è fornito da Wako Chemicals (Neuss, Germania). I campioni di propoli italiano sono stati gentilmente donati dall'apicoltore Piergiorgio Michieletto; tra i campioni di propoli brasiliano, quelli provenienti dagli stati di San Paolo e Minas Gerais sono stati procurati dalla prof.ssa Giuseppina Pace Pereira Lima, quelli provenienti dallo stato di Mato Grosso sono stati donati dall'apicoltore Felix Labaig. I campioni di frutta brasiliana, proveniente dal nord del paese sono stati donati da René Arnoux Silva Campos e Luiza Fernandes.

I fosfolipidi, gli enzimi ed il DPPH sono stati conservati in *freezer* a  $-18^{\circ}\text{C}$ , i polifenoli e gli altri reagenti in frigo a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Le soluzioni tampone sono state preparate con acqua Milli-Q, conservate in frigo a  $+4^{\circ}\text{C}$  e rinnovate ogni 15 giorni. Le soluzioni di polifenoli sono invece state preparate in etanolo giornalmente e le diluizioni successive fatte in acqua Milli-Q. La soluzione madre di DNPH è preparata in acido solforico 4.5 M, mentre le diluizioni successive sono in metanolo.

### 2.2 Strumentazione

#### 2.2.1 MISURE UV-VIS

Per le analisi spettrofotometriche sono stati utilizzati uno spettrofotometro UV/VIS Beckman DU 640 (Beckman Coulter S. p. A., Milano, Italia) ed uno spettrofotometro UV/VIS Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Italia srl, Milano) fornito di cella termostatabile in quarzo (Hellma Italia slr, Milano) con cammino ottico da 1 cm. La temperatura di lavoro è garantita da un termostato Haake K20-DC30.

#### 2.2.2 MISURE DI CONSUMO DI OSSIGENO

Le misure di consumo di ossigeno sono state effettuate con un potenziostato Amel 559 (Amel srl, Milano, Italia), dotato di un microelettrodo ad ossigeno MI-730 della Microelectrodes (Microelectrodes Inc, Bedford, NH, USA). La cella di misura è costituita da un *vial* a fondo conico del volume di 500  $\mu\text{l}$ , dotato di chiusura a vite a tenuta e di due fori: l'uno per il microelettrodo e l'altro

per l'iniezione del campione. Il *vial* è inserito sino al collo in una camera termostata, costruita appositamente per questo scopo. La temperatura di lavoro è garantita da un termostato Haake D1.

### 2.2.3 MISURE DSC

Le misure della temperatura di transizione di fase sulle membrane modello sono state effettuate con un DSC Setaram 92 (Setaram Italia, Milano), utilizzando 50 µl di campione e 50 µl di tampone HEPES 0.1 M (pH 7.2) come riferimento. La velocità di scansione impostata è 0.5 °C/min.

### 2.2.4 MISURE ESR

Le misure di risonanza di spin elettronico sono state effettuate con uno spettrometro Bruker ER 200D (Bruker Corporation, Milano, Italia), a frequenza 9 GHz e a potenza 10 mW.

### 2.2.5 ANALISI HPLC-MS

L'HPLC-MS utilizzato per l'analisi dei campioni di propoli è un Agilent 1100 (Agilent Technologies, USA) con rivelazione a triplo quadrupolo API 4000 (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Toronto, Canada). Le misure HPLC sono state effettuate in collaborazione con il gruppo di Chimica Analitica Ambientale dell'Università Ca' Foscari di Venezia, nelle persone del prof. Carlo Barbante e della dott.ssa Roberta Zangrando (Istituto per la Dinamica dei Processi Ambientali – CNR, Venezia).

Per l'analisi del propoli è stata utilizzata una colonna C18 Synergy Hydro-RP 80° (50x2 mm, 4 µm) con una precolonna Aqua C18 125° (2 mm i. d. x 4 mm).

## 2.3 Metodologie applicate

Sono state scelte alcune metodologie tra quelle descritte nel paragrafo 1.3.2, per valutare il potere antiossidante, sotto forma di capacità di *scavenger*, potere riducente, contenuto di polifenoli, di flavonoidi e di acido ascorbico. Come riferimento per valutare i risultati ottenuti attraverso i diversi metodi, è preferibile il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica, in quanto, tra i metodi applicati, è quello che maggiormente si avvicina a ciò che accade *in vivo*.

Per l'espressione dei risultati in molti casi è stato necessario scegliere una sostanza di riferimento, con la quale costruire le rette di taratura. Dove possibile è stata scelta la catechina, la cui formula di struttura viene riportata in Figura 2.1, in quanto si tratta di uno dei polifenoli più presenti negli alimenti. La catechina fa parte della sottoclasse dei flavonoidi ed è frequentemente utilizzata come riferimento in letteratura.

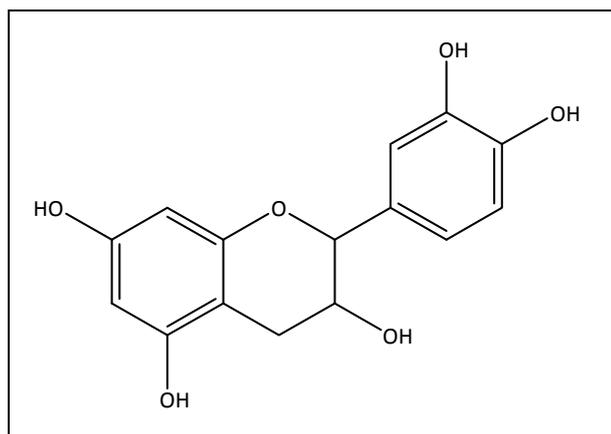


Figura 2.1. Formula di struttura della catechina.

Per alcuni campioni di propoli sono state inoltre studiate le interazioni con la membrana applicando i metodi descritti nel paragrafo 1.5. Seguono le condizioni dettagliate per ciascun metodo utilizzato.

### 2.3.1 INIBIZIONE DELLA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA (IPL) IN MICELLE DI SDS

Tra le diverse varianti del saggio dell'inibizione della perossidazione lipidica viene scelto il metodo di misura del consumo di ossigeno con elettrodo di Clark nella perossidazione di acido linoleico (LA) in micelle di sodiododecilsolfato (SDS). Si effettuano dunque misure di intensità di corrente, che sono proporzionali alla concentrazione di ossigeno, in una soluzione termostata a 37°C e contenente 50 mM SDS e 10 mM LA in tampone sodio/fosfato 50 mM, a pH 7.4 [17]. L'andamento del consumo di ossigeno durante la misura viene schematizzato in Figura 2.2.

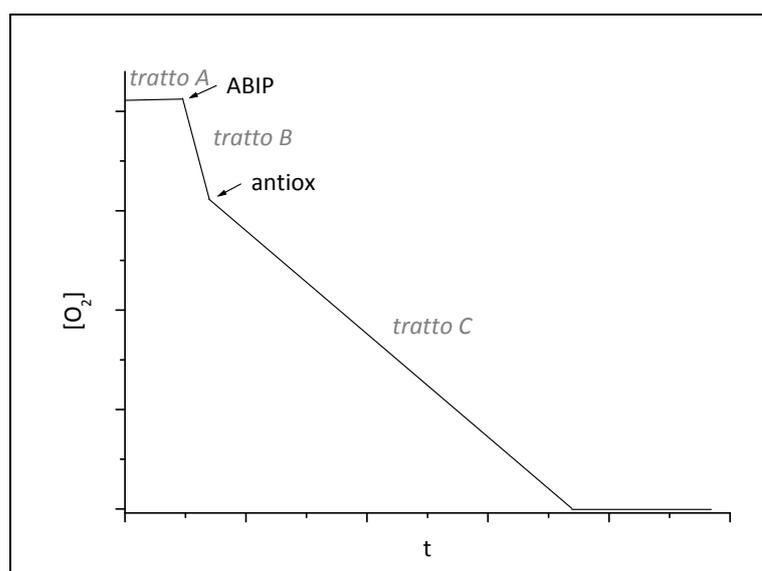


Figura 2.2. Andamento schematico del consumo di ossigeno, durante una misura di inibizione della perossidazione lipidica. Tratto A: linea di base, in assenza di ABIP o antiossidante. Tratto B: consumo di ossigeno in presenza di ABIP ed assenza di antiossidante. Tratto C: consumo di ossigeno in presenza di ABIP e antiossidante.

In una soluzione contenente SDS 50 mM ed LA 10 mM in tampone, non si osservano variazioni nella concentrazione di ossigeno nel tempo (Tratto A del grafico di Figura 2.2). Quando si inserisce in cella 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propano] (ABIP) (4 mM in soluzione), prende avvio la reazione di perossidazione lipidica e si osserva un calo dell'intensità di corrente, indice di consumo dell'ossigeno disciolto (Tratto B); successivamente, all'aggiunta del campione con proprietà antiossidanti, si osserva una diminuzione della pendenza della curva (Tratto C), corrispondente ad un rallentamento nella velocità di reazione di consumo di ossigeno. Le pendenze delle curve nei tratti B e C corrispondono alla velocità di reazione rispettivamente in assenza ed in presenza di antiossidante. L'entità della diminuzione di velocità, causata dalla presenza in soluzione del campione, è un indice del potere antiossidante del campione stesso e viene quantificata come % di inibizione:

$$\% \text{inibizione} = \frac{v_{ABIP} - v_{AO}}{v_{ABIP}} \cdot 100$$

ove  $v_{ABIP}$  è la velocità di reazione in presenza di ABIP e assenza di antiossidante e  $v_{AO}$  è la velocità di reazione in presenza di ABIP e di antiossidante.

Il potere antiossidante del campione viene invece espresso come  $IC_{50}$ , che rappresenta la concentrazione di campione che determina un'inibizione del 50% della perossidazione lipidica. A tal fine vengono effettuate misure a diverse concentrazioni di campione e viene ricavato per interpolazione il parametro  $IC_{50}$ . Tutte le misure vengono effettuate in triplicato.

### 2.3.2 METODO FOLIN-CIOCALTEAU (FC)

Si prepara una soluzione contenente  $Na_2CO_3$  al 3%, reattivo di Folin-Ciocalteu al 5% ed il campione. Si misura l'assorbanza della soluzione a 784 nm, dopo 120 minuti dall'inizio della reazione. Il valore di assorbanza ricavato viene convertito in concentrazione utilizzando una retta di taratura precedentemente preparata con soluzioni a concentrazione nota di catechina. L'equazione della retta utilizzata è  $A=0.0168 \cdot C$  ( $\mu M$ ) (A: assorbanza; C: concentrazione). Il valore di concentrazione che si ricava è espresso dunque in Catechina Equivalente (CE). Tutte le misure vengono effettuate in triplicato.

### 2.3.3 METODO DPPH

Si utilizza la variante del metodo del DPPH per via spettrofotometrica. Si effettua una misura di assorbanza a lunghezza d'onda 518 nm in una soluzione contenente DPPH 125  $\mu M$  in etanolo ed il campione, dopo 60 min dall'inizio della reazione. Il valore ricavato deve essere confrontato con l'assorbanza del bianco, ossia del DPPH 125  $\mu M$ , senza campione. Il termine  $dh/h_0$  (diminuzione dell'assorbanza, normalizzata per l'altezza del picco del bianco) viene convertito in concentrazione utilizzando una retta di taratura di equazione  $dh/h_0=0.0352 \cdot C$  ( $\mu M$ ), precedentemente preparata con soluzioni a concentrazione nota di catechina. Il valore di concentrazione che si ricava è espresso dunque in Catechina Equivalente (CE). Tutte le misure vengono effettuate in triplicato.

### 2.3.4 METODO ENZIMATICO

Si effettua una misura di assorbanza a lunghezza d'onda 490 nm in una soluzione contenente 4-amminofenazone 3 mM in tampone potassio/fosfato 0.1 M (pH 8.0), HRP 0.167  $\mu M$ ,  $H_2O_2$  2 mM ed il campione, dopo 10 minuti dall'inizio della reazione, a 22°C. Il valore di assorbanza ricavato viene convertito in concentrazione utilizzando una retta di taratura di equazione  $A=0.0083 \cdot C$  ( $\mu M$ ),

precedentemente preparata con soluzioni a concentrazione nota di catechina. Il valore di concentrazione di polifenoli che si ricava è espresso dunque in Catechina Equivalente (CE). Tutte le misure vengono effettuate in triplicato.

### **2.3.5 METODO ABTS**

Il radicale ABTS<sup>•+</sup> viene preparato per reazione tra ABTS 7 mM e potassio persolfato (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 2.45 mM in acqua. La soluzione viene mantenuta al buio per almeno 12-16 ore e successivamente diluita in tampone sodio acetato 0.1 M (pH 4.5). Si effettua una misura di assorbanza a lunghezza d'onda 734 nm in una soluzione contenente ABTS<sup>•+</sup> 117 μM ed il campione, dopo 6 minuti dall'inizio della reazione. Il valore ricavato deve essere confrontato con l'assorbanza del bianco, ossia dell'ABTS<sup>•+</sup> 117 μM in assenza di campione. Il termine  $dh/h_0$  (diminuzione dell'assorbanza, normalizzata per l'altezza del picco del bianco) viene convertito in concentrazione utilizzando una retta di taratura, di equazione  $dh/h_0=0.0055 \cdot C$  (μM), precedentemente preparata con soluzioni a concentrazione nota di catechina. Il valore di concentrazione di polifenoli che si ricava è espresso dunque in Catechina Equivalente (CE). Tutte le misure vengono effettuate in triplicato.

### **2.3.6 METODO ALLUMINIO CLORURO**

Si effettua una misura di assorbanza a lunghezza d'onda 430 nm di una soluzione contenente alluminio cloruro 15 mM, sodio acetato 20 mM ed il campione, dopo 10 minuti dall'inizio della reazione. All'assorbanza misurata si sottrae quella del bianco, ossia di una soluzione in cui l'alluminio cloruro è sostituito da acqua milli-Q. Il valore di assorbanza ricavato viene convertito in concentrazione utilizzando una retta di taratura di equazione  $A=0.0215 \cdot C$  (μM), precedentemente preparata con soluzioni a concentrazione nota di quercetina, dato che la catechina non risponde a questo metodo. Il valore di concentrazione di flavonoidi che si ricava è espresso dunque in Quercetina Equivalente (QE). Tutte le misure vengono effettuate in triplicato.

### **2.3.7 METODO DNPH PER I FLAVONOIDI**

Si prepara una soluzione contenente dinitrofenilidrazina (DNPH) 20 mM ed il campione, che viene mantenuta a 50°C per 50 minuti. Una volta raffreddata a temperatura ambiente alla soluzione viene aggiunto un uguale volume di sodio idrossido 1% in metanolo al 70% e incubata a temperatura ambiente per 2 minuti. Successivamente si diluisce la soluzione 1:30 e si misura l'assorbanza a 495 nm. La concentrazione di DNPH in cella è dunque 0.33 mM. Il valore di assorbanza ricavato viene convertito in concentrazione utilizzando una retta di taratura di equazione  $A=0.0056 \cdot C$  (μM), precedentemente preparata con soluzioni a concentrazione nota di naringenina, dato che né catechina né quercetina rispondono a questo metodo. Il valore di concentrazione di flavonoidi che si ricava è espresso dunque in Naringenina Equivalente (NE). Tutte le misure vengono effettuate in triplicato.

### **2.3.8 METODO DNPH PER L'ACIDO ASCORBICO**

Si prepara una soluzione contenente 2,6-diclorofenolo-indofenolo (DCFI) 0.186 mM, dinitrofenilidrazina (DNPH) 10 mM, tiourea 13 mM ed il campione in acido ossalico circa 20 mM e si pone in bagnomaria in ebollizione per 15 minuti. Una volta raffreddata in bagno a ghiaccio alla soluzione viene aggiunto un uguale volume di acido solforico all'85%. Si lascia a riposare per 15 minuti e si misura l'assorbanza della soluzione a 520 nm. All'assorbanza misurata si sottrae quella del bianco,

ossia di una soluzione identica alla precedente, ma in assenza di campione. Il valore di assorbanza ricavato viene convertito in concentrazione di vitamina C utilizzando una retta di taratura di equazione  $A=0.0079 \cdot C$  ( $\mu\text{M}$ ), precedentemente preparata con soluzioni a concentrazione nota di acido ascorbico. Tutte le misure vengono effettuate in triplicato.

### 2.3.9 PREPARAZIONE LIPOSOMI PER MISURE DI INTERAZIONE DI MEMBRANA

I liposomi multilamellari si preparano a partire da soluzioni sature di fosfolipidi in miscela  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  2:1. Le soluzioni vengono portate a secco sotto  $\text{N}_2$  per alcune ore e successivamente sotto vuoto per tutta la notte. Il solido viene ripreso con tampone HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico) 0.1 M (pH 7.2) e vengono successivamente effettuati cicli di riscaldamento al di sopra della temperatura di transizione e di mescolamento. Il dopante viene aggiunto alla soluzione di sale di fosfolipide, se è solubile in solvente organico; al tampone HEPES, se è idrosolubile. Si effettua sempre anche una misura del bianco, in assenza del dopante.

Sono stati utilizzati i seguenti fosfolipidi: dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), le cui formule di struttura vengono riportate in Figura 2.3.

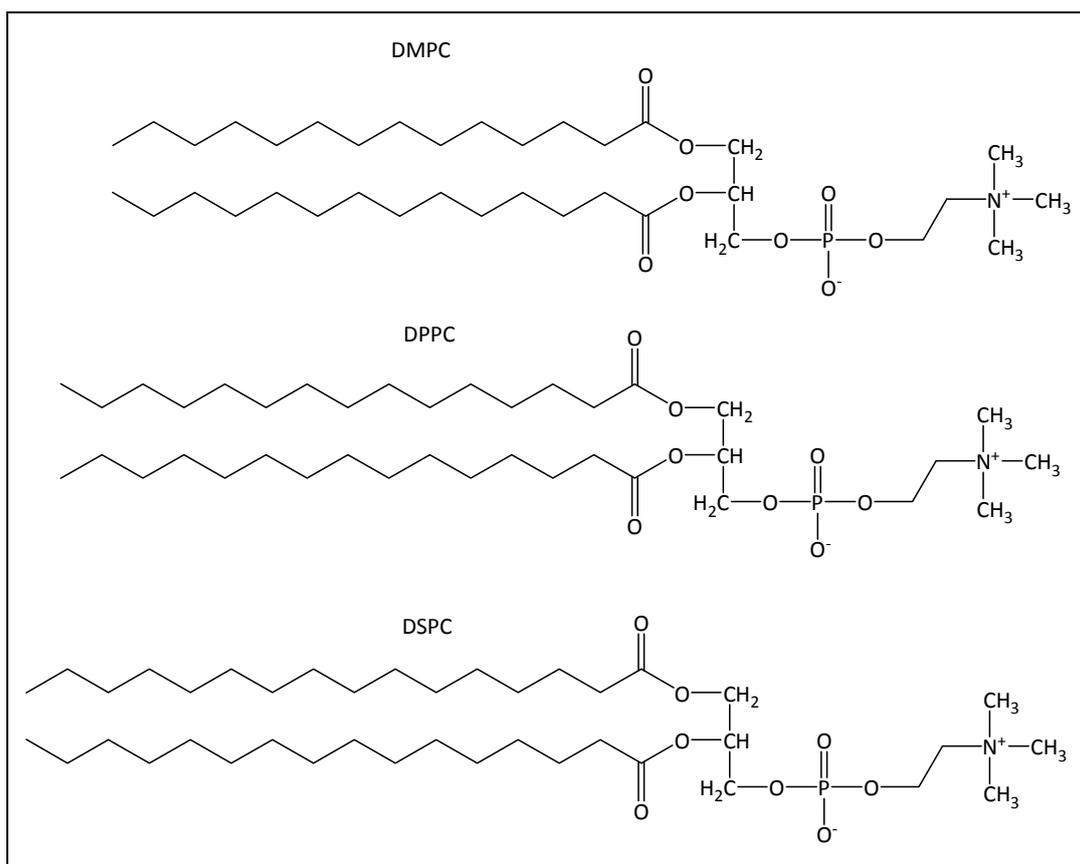


Figura 2.3. Formule di struttura dei fosfolipidi: dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e distearoilfosfatidilcolina (DSPC).

La preparazione di liposomi per le misure all'ESR varia leggermente perché è necessario inoltre aggiungere l'opportuno SASL al momento della preparazione delle soluzioni di sali di fosfolipidi.

### **2.3.10 DETERMINAZIONE DEL COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE LIPOSOMI/ACQUA**

#### **2.3.10.1 COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE OTTANOLO/ACQUA**

Si preparano due soluzioni di campione in ottanolo alla stessa concentrazione: una funge da riferimento; all'altra viene aggiunto un uguale volume di acqua e viene agitata per favorire il maggior scambio possibile tra le due fasi. Vengono registrati gli spettri della parte ottanolica delle due soluzioni. Conoscendo la quantità di campione inserita, a partire dall'area del picco della soluzione ottanolica di riferimento si calcola la concentrazione residua di campione contenuta nella parte ottanolica dell'altra soluzione. Viene quindi calcolato il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua secondo l'equazione 1.1.

#### **2.3.10.2 COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE LIPOSOMI/ACQUA**

Si preparano i liposomi, come descritto nel paragrafo 2.3.9, utilizzando come fosfolipide DPPC, in concentrazione 50 mM. I liposomi sono incubati per 1 ora a 6°C, poi centrifugati per 15 minuti a 12000 g, a 6°C. Sul surnatante raccolto viene registrato lo spettro. Conoscendo la quantità di campione inserita al momento della preparazione dei liposomi si ricava la quantità residua in acqua dallo spettro e quella nei liposomi per differenza. Si applica quindi l'equazione 1.2, utilizzando come  $\beta$  il valore  $0.678 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$  [42].

### **2.3.11 STUDIO DI INTERAZIONI DI MEMBRANA TRAMITE DSC**

Vengono preparati liposomi di DMPC, DPPC e DSPC, come descritto nel paragrafo 2.3.9. La concentrazione di fosfolipide finale è 100 mM. Per ciascun tipo di fosfolipide viene preparato un bianco, senza dopante.

### **2.3.12 STUDIO DI INTERAZIONI DI MEMBRANA TRAMITE ESR**

Vengono preparati liposomi di DMPC, DPPC e DSPC, come descritto nel paragrafo 2.3.9, con l'aggiunta di una soluzione di SASL in miscela  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  2:1 prima di portare a secco sotto  $\text{N}_2$ . Le misure sono effettuate con 5-SASL, 7-SASL e 10-SALS. La concentrazione di fosfolipide finale è 100 mM; quella di SASL è 1.8 mM. Per ciascun tipo di fosfolipide viene preparato un bianco, senza dopante.



## 3 - Proprietà antiossidanti del propoli -

---

### 3.1 Introduzione

Propoli è il nome generico di una sostanza resinosa raccolta dalle api da miele (*Apis Mellifera*). Il nome "propolis" deriva dal greco *pro* = davanti; *polis* = città, perché si è osservato che le api lo usano per sigillare le loro arnie [43]. Le api raccolgono il propoli nei germogli, nelle crepe della corteccia di diverse piante, soprattutto dal pioppo (*Populus nigra*) e, in misura minore, anche da faggio, castagno, betulla e conifere. Successivamente il propoli grezzo viene mischiato con cera e  $\beta$ -glucosidasi, che le api secernono durante la raccolta del propoli. Il materiale risultante viene utilizzato per chiudere fessure presenti negli alveari, per proteggere l'ambiente dalla luce, per rinforzare le pareti interne dell'alveare, ma anche per difendersi da aggressori esterni [44]. Il propoli presenta spiccate proprietà antibatteriche che comportano la completa sterilità all'interno dell'alveare, che, per sue caratteristiche di temperatura e umidità sarebbe luogo ideale per la proliferazione batterica.

Per secoli i popoli hanno utilizzato il propoli come rimedio naturale per curarsi. Già i sacerdoti egizi lo usavano per mummificare i corpi dei faraoni, evidenziandone le magnifiche doti conservative. Greci e Romani ne apprezzavano invece le qualità terapeutiche ed i loro soldati lo utilizzavano per disinfettare le ferite riportate sul campo di battaglia. Durante il medioevo il propoli veniva utilizzato come rimedio per i disturbi di gola e come cicatrizzante. Oggi queste proprietà del propoli sono documentate da letteratura scientifica, che ne evidenzia altresì le qualità battericide, antimicotiche, antiossidanti, antivirali, cicatrizzanti ed anestetiche [43].

#### 3.1.1 NATURA CHIMICA DEL PROPOLI E COMPOSIZIONE

Il propoli è una sostanza di colore marrone (può andare dal grigio al nero), di consistenza che varia con la temperatura: plasmabile e appiccicosa a temperatura ambiente, friabile a basse temperature. Il punto di fusione è intorno ai 60-70°C. È insolubile in acqua, a contatto con la quale forma una sostanza di consistenza cerosa. La composizione è molto variabile; in generale il propoli è composto da:

- ◆ 50% resine;
- ◆ 30% cera;
- ◆ 10% oli essenziali ed altre sostanze volatili;

- ◆ 5% polline;
- ◆ 5% altre sostanze e residui organici [44].

Complessivamente, in propoli di diversa provenienza, sono stati individuati più di 200 composti [44-56], così come risulta dall'Allegato 1, ove vengono riportati i componenti del propoli di diversa origine, con le relative quantità, se riportate in letteratura. La composizione del propoli sembra dipendere dal tipo di vegetazione dal quale le api ricavano le materie prime per produrlo; di conseguenza, a causa delle differenze geografiche, propoli europeo, sudamericano ed asiatico hanno una composizione molto diversa. Propoli provenienti da Cina ed Europa contengono molti flavonoidi ed esteri fenolici, invece i componenti principali del propoli brasiliano sono terpenoidi e derivati prenilati dell'acido *p*-cumarico [53].

A causa della diversa composizione chimica le proprietà antiossidanti di propoli di diversa provenienza possono essere molto differenti. In generale le molecole principalmente responsabili delle proprietà antiossidanti, antimicrobiche e antimicotiche del propoli sono i polifenoli e la sottoclasse dei flavonoidi. Di questi, galangina, pinocembrina e crisina sono i più abbondanti, seguiti da naringenina, quercetina, canferolo ed acido caffeico [43].

### 3.1.2 PROPRIETÀ FARMACOLOGICHE E TOSSICITÀ

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi sulle proprietà benefiche del propoli. Il propoli, in particolare nelle sue soluzioni etanoliche, dimostra un'attività antimicrobica contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi, protozoi, funghi e virus; le proprietà anti-infiammatorie nei confronti di infezioni acute e croniche sembra siano dovute principalmente al contributo del fenetilestere dell'acido caffeico (CAPE) e della galangina. Il propoli ha inoltre mostrato effetti immunostimolatori ed immunomodulatori *in vitro*, oltre ad essere un potente antiossidante. Il propoli ha un effetto anestetico simile a quello della cocaina e mostra effetti rigenerativi sui tessuti biologici e di attività anti-neoplastica contro molte cellule tumorali. Oltre ai molti effetti benefici, il propoli presenta un'altra importante caratteristica positiva: la sua bassa tossicità. Può provocare effetti collaterali solo ad alte dosi (15 g/giorno), che si concretizzano esclusivamente sotto forma di reazioni allergiche ed irritazioni [43].

## 3.2 Propoli veneto

Il propoli di origine veneta dovrebbe, come il propoli europeo, essere ricco di flavonoidi, derivati dagli acidi fenolici [53] e acidi aromatici [47]. Si riportano in Allegato 2 i componenti riscontrati nel propoli di tipo europeo [44, 50, 52-54].

In letteratura sono presenti numerosi studi che si occupano di varie proprietà del propoli: come neuro protettivo [57] e anticancerogeno [58] in particolare. I lavori che studiano le proprietà antiossidanti del propoli, escludendo quelli che applicano metodologie *in vivo* o in colture di cellule [59], utilizzano i seguenti metodi di misura: Folin-Ciocalteu per i polifenoli totali [48, 50, 53]; DPPH per il potere antiossidante [48, 52, 56, 60]; il metodo dell'alluminio cloruro per il contenuto di flavonoidi totali [34, 48, 53]. Un solo lavoro misura il potere antiossidante con il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica su acido linoleico [61], effettuando la misura in solvente organico e non in micelle. Non sono presenti inoltre lavori che studino il propoli di origine veneta,

regione che peraltro è tra i primi posti, a livello nazionale, nella produzione di miele [62]. Data la scarsità di informazioni circa il potere antiossidante del propoli proveniente dalle nostre zone, si rende necessaria l'analisi di questa importante proprietà, soprattutto con il metodo IPL, scarsamente utilizzato in letteratura, ma più vicino a ciò che accade nell'organismo, rispetto agli altri metodi spettrofotometrici più estesamente impiegati, ma scarsamente significativi.

### 3.2.1 CAMPIONI DI PROPOLI

I campioni di propoli da noi pervenuti sono stati forniti da apicoltori locali, che assicurano l'assenza di sostanze aggiunte. Alcuni sono stati ricevuti sotto forma di soluzioni etanoliche già pronte, altri in fase solida, ricavati da raschiamento dell'alveare, con un contenuto variabile di impurezze. I cinque campioni analizzati provengono dalla regione veneta, ma da zone geografiche di diversa tipologia: alcuni campioni sono stati raccolti in campagna, uno nella zona del Montello, uno dalla barena, un terreno lagunare caratteristico per il fatto di essere periodicamente sommerso dalla marea (Tabella 3.1).

Tabella 3.1. Caratteristiche e provenienza dei campioni di propoli veneto.

<i>propoli</i>	<i>Tipologia</i>	<i>Zona di origine</i>	<i>Caratteristiche territoriali</i>
<b>TRI 1</b>	Solido da raschiamento	Trivignano	Campagna coltivata
<b>TRI 2</b>	Soluzione pronta al 30% w/v	Trivignano	Campagna coltivata
<b>MONT</b>	Soluzione pronta al 42% w/v	Montello	Boschi
<b>ERA</b>	Solido da raschiamento	Eraclea	Campagna
<b>GAMB</b>	Solido da raschiamento	Gambarare	Barena



Figura 3.1. Cartina del Veneto in cui sono evidenziate le zone di provenienza dei campioni di propoli.

Per la preparazione delle soluzioni di propoli grezzo, il miglior solvente è l'etanolo, poiché permette di ottenere estratti di propoli in cui viene eliminata la parte cerosa e mantenuta la frazione polifenolica. L'etanolo viene comunemente usato sia puro, che in soluzioni acquose al 70%, 80% o 95% [50]. È stata effettuata una breve valutazione per la scelta della composizione del solvente di estrazione.

Sono state preparate tre sospensioni con 5 g di propoli grezzo e 50 ml di etanolo al 60%, 80% e 96% rispettivamente. Dopo aver lasciato in agitazione per 24 ore, si è separato il surnatante dal residuo solido pastoso depositato sul fondo, costituito per lo più dalle impurezze provenienti dall'alveare. Il surnatante è stato filtrato e centrifugato per 30 minuti a 2000 giri, fino ad ottenere una soluzione limpida.

L'estratto diluito 1:10000 è stato utilizzato tal quale per la misura dell'inibizione della perossidazione lipidica, descritta nel paragrafo 2.3.1, al fine di valutarne il potere antiossidante totale. I risultati, riportati in Tabella 3.2, mostrano che vi è una trascurabile differenza di potere antiossidante variando la composizione del solvente di estrazione.

Tabella 3.2. Potere antiossidante di estratti di propoli diluiti 1:10000, espresso in % di inibizione della perossidazione lipidica.

<i>Solvente</i>	<i>% inibizione perossidazione lipidica</i>
EtOH 96%	82 ± 4
EtOH 80%	78 ± 6
EtOH 60%	76 ± 3

I campioni di propoli analizzati in questo lavoro sono stati estratti con etanolo al 96%, seguendo la procedura descritta precedentemente. La concentrazione esatta del propoli nelle soluzioni finali è stata misurata eliminando fino a secchezza sotto flusso di azoto il solvente di una soluzione a volume noto e pesando quindi il residuo solido.

### 3.2.2 RISULTATI

Al fine di poter effettuare un confronto tra i campioni, data la diversa concentrazione delle soluzioni di propoli, tutti i risultati, dove non espresso diversamente, vengono riferiti ad una ipotetica soluzione al 15% w/v.

#### 3.2.2.1 SPETTRI UV/VIS

In Figura 3.2 vengono riportati gli spettri UV/VIS delle soluzioni di propoli espressi in assorbanza specifica ( $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$ ), ovvero l'assorbanza di una soluzione 1% w/v (cammino ottico di 1 cm), in funzione della lunghezza d'onda. In Tabella 3.3 vengono inoltre riportati i coefficienti  $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$  alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento (289 nm).

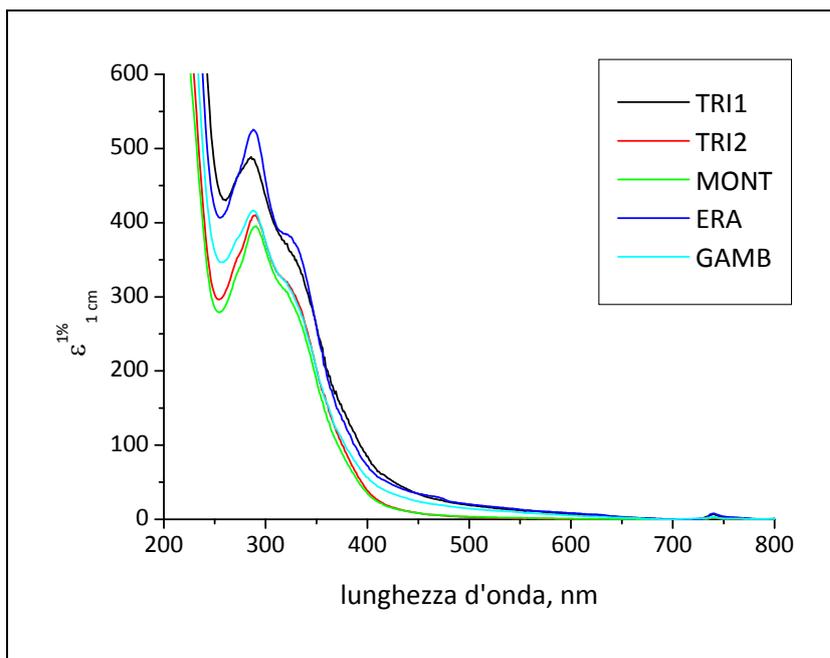


Tabella 3.3. Assorbanza specifica  $\epsilon^{1\%}_{1cm}$  dei campioni di propoli veneto, a 289 nm.

<b>Propoli</b>	<b><math>\epsilon^{1\%}_{1cm}</math> (289 nm)</b>
TRI1	0.48
TRI2	0.41
MONT	0.39
ERA	0.52
GAMB	0.42

Figura 3.2. Spettri UV/VIS dei diversi campioni di propoli veneto.  $\epsilon^{1\%}_{1cm}$ : assorbanza specifica (concentrazione 1% w/v; cammino ottico 1 cm)

Da un primo esame si osserva che i profili degli spettri UV/VIS delle soluzioni di propoli sono molto simili, da cui se ne può dedurre che i diversi campioni di propoli dovrebbero avere, in prima approssimazione, la stessa composizione. Si osserva un forte assorbimento nella zona tra i 250 ed i 400 nm, con un picco molto intenso a 289 nm ed una spalla tra i 320 ed i 330 nm. Questo profilo è compatibile con quello dei flavonoidi che generalmente presentano un primo massimo tra i 240 ed i 285 nm, dovuto all'assorbimento dell'anello A, ed un altro massimo, di posizione variabile, sopra i 300 nm, dipendente dalla sostituzione e coniugazione sull'anello C [63].

### 3.2.2.2 POTERE ANTIOSSIDANTE

Per la valutazione del potere antiossidante viene applicato il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica su micelle di SDS ed il risultato trovato viene considerato un riferimento per i risultati ottenuti con altri saggi, in quanto, tra i metodi utilizzati, è quello che più si avvicina a ciò che accade *in vivo*. Le condizioni che sono state utilizzate sono riportate nel paragrafo 2.3.1.

Il valore di  $IC_{50}$  ricavato per il propoli viene confrontato con una sostanza di riferimento. Dal momento che, per gli altri metodi che si applicheranno sul propoli, il riferimento è la catechina (Figura 2.1) è stato misurato il parametro  $IC_{50}$  anche per questo flavonoide. I risultati ottenuti vengono riportati in Tabella 3.4 e Figura 3.3.

Tabella 3.4. Potere antiossidante di catechina e campioni di propoli veneto, misurato con il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS ed espresso in  $IC_{50}$  (mg/L).

<i>campione</i>	<i><math>IC_{50}</math> (mg/L)</i>
<b>Catechina</b>	0.58±0.08
<b>Propoli TRI1</b>	0.45±0.06
<b>Propoli TRI2</b>	0.47±0.06
<b>Propoli MONT</b>	0.32±0.04
<b>Propoli ERA</b>	0.50±0.05
<b>Propoli GAMB</b>	0.51±0.06

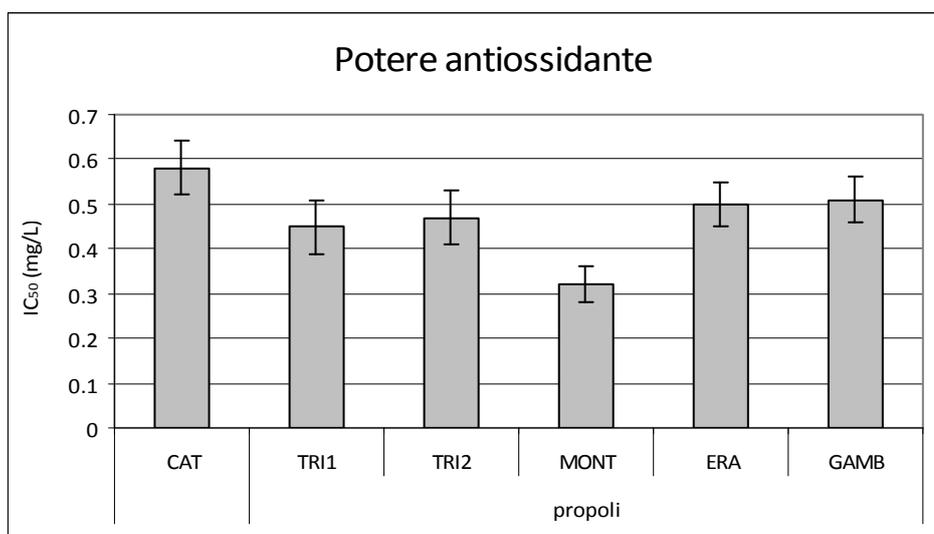


Figura 3.3. Potere antiossidante di catechina e propoli veneto, misurato con il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS. CAT: catechina.

I risultati ottenuti evidenziano come tutti i campioni di propoli siano caratterizzati da un'eccezionale capacità di rallentare la perossidazione lipidica in micelle di SDS, molto simile a quella della catechina. Tranne che per il campione MONT, non si osservano differenze significative tra i diversi campioni di propoli, nonostante siano di provenienza geografica diversa.

I medesimi campioni di propoli vengono inoltre analizzati secondo i seguenti tre metodi spettrofotometrici:

- a) il metodo di Folin-Ciocalteu, per la valutazione del potere riducente;
- b) il metodo DPPH, per la valutazione della capacità di *scavenger*;
- c) il metodo enzimatico, per la valutazione del contenuto di polifenoli totali.

Le condizioni utilizzate nell'applicazione dei tre metodi vengono riportate rispettivamente nei paragrafi 2.3.2, 2.3.3 e 2.3.4. I risultati sono espressi come Catechina Equivalente e riferiti ad un'ipotetica soluzione al 15% w/v (Tabella 3.5).

Tabella 3.5. Potere riducente, capacità di *scavenger* e contenuto totale di polifenoli dei campioni di propoli veneto, misurati rispettivamente con i metodi Folin-Ciocalteau, DPPH ed enzimatico, espressi in mM CE e riferiti ad una soluzione di propoli al 15% w/v.

<i>propoli</i>	<i>Potere riducente CE (mM)</i>	<i>Capacità di scavenger CE (mM)</i>	<i>Contenuto totale di polifenoli CE (mM)</i>
TRI1	216±9	170±20	340±40
TRI2	190±20	130±10	490±60
ERA	194±9	114±7	200±20
MONT	216±6	99±2	240±30
GAMB	146±7	60±10	310±10

È opportuno inoltre tenere conto che una soluzione di catechina al 15% w/v corrisponde a 517 mM. Il confronto tra i risultati ottenuti per il propoli e il valore caratteristico della catechina vengono riportati in Figura 3.4.

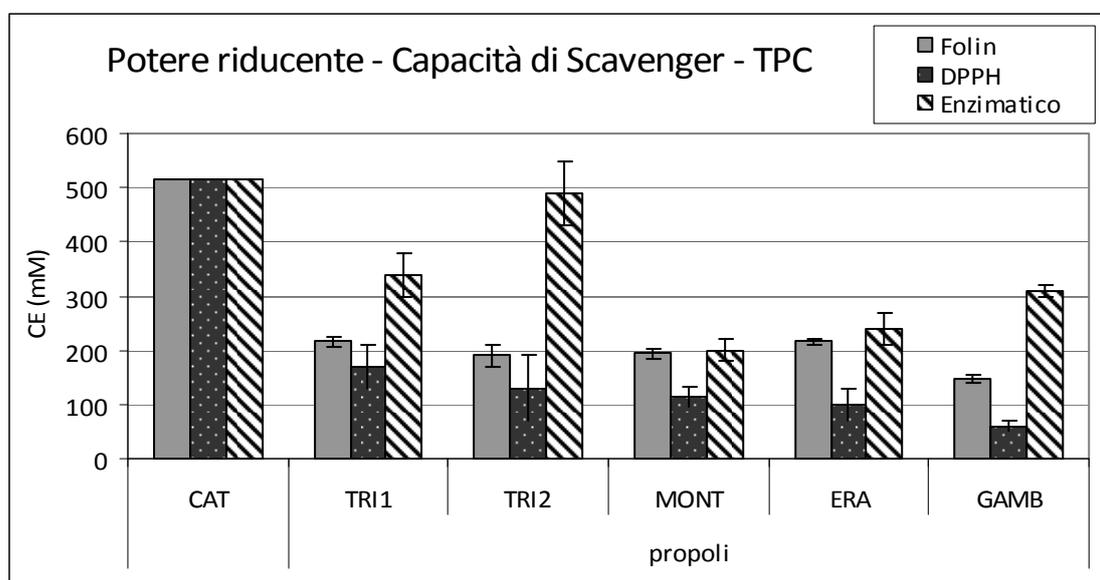


Figura 3.4. Potere riducente, capacità di *scavenger* e contenuto totale di polifenoli dei campioni di propoli veneto, misurati rispettivamente con i metodi Folin-Ciocalteau, DPPH ed enzimatico, espressi in mM CE e riferiti ad una soluzione di propoli al 15% w/v.

Si può notare come i risultati ottenuti con i tre metodi Folin-Ciocalteau, DPPH ed enzimatico non rispecchiano totalmente quelli ricavati con il metodo IPL, in quanto i valori in CE riscontrati nel propoli sono nettamente inferiori rispetto a quelli della catechina: il metodo enzimatico è, tra i tre, quello che fornisce valori più elevati, in termini di CE, per il propoli, con valori che oscillano tra il 45% ed il 95% rispetto alla catechina, mentre il metodo DPPH è quello che fornisce valori più bassi.

Considerando l'insieme dei risultati si può affermare che non c'è una differenza significativa tra i vari campioni. Il metodo enzimatico fornisce valori molto differenti per i diversi campioni, ma non è supportato dagli altri metodi spettrofotometrici e dal metodo IPL. Il campione MONT, d'altra parte, è caratterizzato da un  $IC_{50}$  che si discosta leggermente dagli altri, mentre sembra essere perfettamente nella media dei risultati ottenuti con i metodi spettrofotometrici.

Si conclude quindi con la conferma che attraverso quattro diversi metodi analitici *in vitro*, il propoli veneto possiede un eccezionale potere antiossidante, mentre non sembrano esserci differenze causate dalla diversa provenienza geografica, probabilmente a causa del fatto che la materia prima per la produzione del propoli proviene dallo stesso tipo di pianta.

### 3.2.2.3 STUDIO DI MODIFICAZIONI DI MEMBRANA

Inizialmente sono stati calcolati i coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua e liposomi/acqua, secondo la procedura descritta nel paragrafo 2.3.10. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 3.6.

Tabella 3.6. Coefficiente di ripartizione ( $\log P$ ) tra le fasi ottanolo/acqua e liposomi/acqua dei cinque campioni di propoli veneto.

<i>propoli</i>	<i>logP</i>	
	<i>Ottanolo/acqua</i>	<i>Liposomi/acqua</i>
<b>TRI1</b>	0.93	1.81
<b>TRI2</b>	1.00	1.57
<b>MONT</b>	0.86	1.55
<b>ERA</b>	1.33	1.84
<b>GAMB</b>	1.69	1.89

Si nota che per tutti i campioni di propoli si è ottenuto un coefficiente di ripartizione simile o superiore ad 1.0 e nel caso della ripartizione liposomi/acqua  $\log P$  è sempre superiore a 1.5. Ciò implica che il propoli è altamente assorbito dalle membrane fosfolipidiche.

Successivamente si sono studiate le eventuali interazioni che può provocare il propoli su membrane fosfolipidiche. A tal fine sono state preparate membrane modello monocomponente, come descritto nel paragrafo 2.3.9, utilizzando come fosfolipidi DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) e DSPC (distearilfosfatidilcolina).

I liposomi sono stati trattati opportunamente per poter effettuare la misura della temperatura di transizione di fase al DSC, seguendo la procedura descritta nel paragrafo 2.3.11. Ciascun tipo di liposoma è stato drogato con differenti quantità di propoli: 0 g/L (bianco); 0.75 g/L; 1.5 g/L; 2.5 g/L; 3 g/L. Data la sostanziale similitudine tra i vari tipi di propoli dimostrata precedentemente, si è scelto di effettuare quest'analisi con un solo campione (TRI1). In Figura 3.5 vengono riportati i profili DSC registrati.

Per tutti i liposomi si osserva una diminuzione della temperatura di transizione di fase e un abbassamento e allargamento del picco, ad alte concentrazione di drogante. Per ciascun tipo di liposoma è stata calcolata la differenza nella temperatura di transizione causata dalla presenza del drogante (Tabella 3.7).

Tabella 3.7. Differenza nella temperatura di transizione ( $\Delta T$ ) in  $^{\circ}\text{C}$ , osservata per i diversi tipi di liposomi drogati con propoli in diversa concentrazione, rispetto alla temperatura di transizione in assenza di drogante.

<i>fosfolipide</i>	$\Delta T (^{\circ}\text{C})$			
	<b>0.75 g/L</b>	<b>1.5 g/L</b>	<b>2.5 g/L</b>	<b>3 g/L</b>
<b>DMPC</b>	0.2	0.2	1.3	1.4
<b>DPPC</b>	1.1	1.3	1.7	1.3
<b>DSPC</b>	0.1	0.9	0.9	1.6

Si nota che il propoli ha effetti diversi sui tre tipi di liposomi: nel caso del DMPC non si osserva una variazione significativa di temperatura di transizione né una variazione del profilo di fase a bassa concentrazione, il  $\Delta T$  è significativo ( $> 1^{\circ}\text{C}$ ) solo ad alta concentrazione ( $> 2 \text{ g/L}$ ); nei liposomi di DPPC, invece, si osserva un  $\Delta T$  di  $1^{\circ}\text{C}$ , già a bassa concentrazione di drogante, che rimane pressoché inalterato aumentando la concentrazione; infine, nel caso del DSPC, si osserva un aumento graduale di  $\Delta T$ , all'aumentare della concentrazione di drogante.

Prendendo come riferimento una concentrazione media di  $1.5 \text{ g/L}$  di drogante si osserva come le maggiori differenze di temperatura di transizione di fase, pur non essendo comunque elevate, si verificano per i liposomi costituiti da DPPC e, in misura minore, DSPC. Ciò suggerisce che i componenti attivi del propoli, che hanno azione perturbante sulla struttura della membrana, si posizionino in profondità all'interno dello strato lipidico, approssimativamente oltre il  $C_{15}$ .

Per completare l'analisi sulle modificazioni di membrana si sono effettuate misure di compattezza dei liposomi all'ESR. I liposomi sono stati preparati come descritto nei paragrafi 2.3.9 e 2.3.12, drogandoli con diverse quantità di propoli:  $0 \text{ g/L}$  (bianco),  $1.5 \text{ g/L}$  e  $3 \text{ g/L}$  ed utilizzando diversi tipi di SASL (5-SASL, 7-SASL e 10-SASL). I profili ESR sono riportati in Figura 3.6.

Il parametro d'ordine  $S$  in fase fluida ( $T = 45^{\circ}\text{C}$  per liposomi di DPPC) e la distanza tra i valori estremi dello spettro  $A_{\text{MAX}}$  in fase gel ( $T = 32^{\circ}\text{C}$  per liposomi di DPPC) vengono confrontati con i corrispondenti valori di liposomi non drogati. Vengono riportati in Tabella 3.8 i risultati espressi in termini di differenza nel parametro d'ordine e nella distanza tra le righe più esterne dello spettro, tra i liposomi drogati e non.

Tabella 3.8. Differenza tra le righe più esterne dello spettro ( $\Delta A_{\text{MAX}}$ ) e del parametro d'ordine ( $S$ ) tra liposomi drogati con differenti quantità di propoli e non drogati, utilizzando diversi SASL.

Parametri	$\Delta A_{\text{MAX}} \cdot 10^{-4} T$		$\Delta S$	
	<b>1.5 g/L</b>	<b>3 g/L</b>	<b>1.5 g/L</b>	<b>3 g/L</b>
<b>5-SASL</b>	0.16	4.50	0.011	0.018
<b>7-SASL</b>	3.77	4.92	0.006	0.004
<b>10-SASL</b>	2.85	3.66	0.003	0.046

Si osserva che per i diversi liposomi, sia al di sopra che al di sotto della temperatura di transizione, l'aggiunta di propoli non modifica il profilo del picco. Gli spettri ESR ottenuti mostrano che alle tre

profondità C<sub>5</sub>, C<sub>7</sub> e C<sub>10</sub> non si evidenziano significative modificazioni della forma dello spettro, così come appare dai bassi valori di  $\Delta A_{MAX}$  e  $\Delta S$ . Se ne deduce che i componenti del propoli si dispongono all'interno della membrana a profondità maggiori rispetto alla posizione C<sub>10</sub>, con ciò confermando quanto emerso dall'analisi dei dati delle misure di calorimetria a scansione differenziale.

I risultati congiunti ottenuti dallo studio delle modificazioni di membrana portano alle seguenti conclusioni:

- il propoli riesce ad entrare all'interno delle membrane fosfolipidiche: ciò viene confermato dal coefficiente di ripartizione liposomi/acqua superiore a 1.5 e dalle misure di potere antiossidante tramite il metodo di inibizione della perossidazione lipidica, che mostrano come il propoli riesca ad inibire l'ossidazione di acido linoleico anche all'interno di micelle;
- il propoli non interagisce con le membrane fosfolipidiche, pur attraversandole: svolge la sua azione antiossidante proteggendo i lipidi dall'ossidazione da parte di radicali liberi, ma senza modificare significativamente parametri chimico-fisici delle membrane come la temperatura di transizione di fase (misurata al DSC) o la compattezza stessa della membrana (misurata all'ESR).

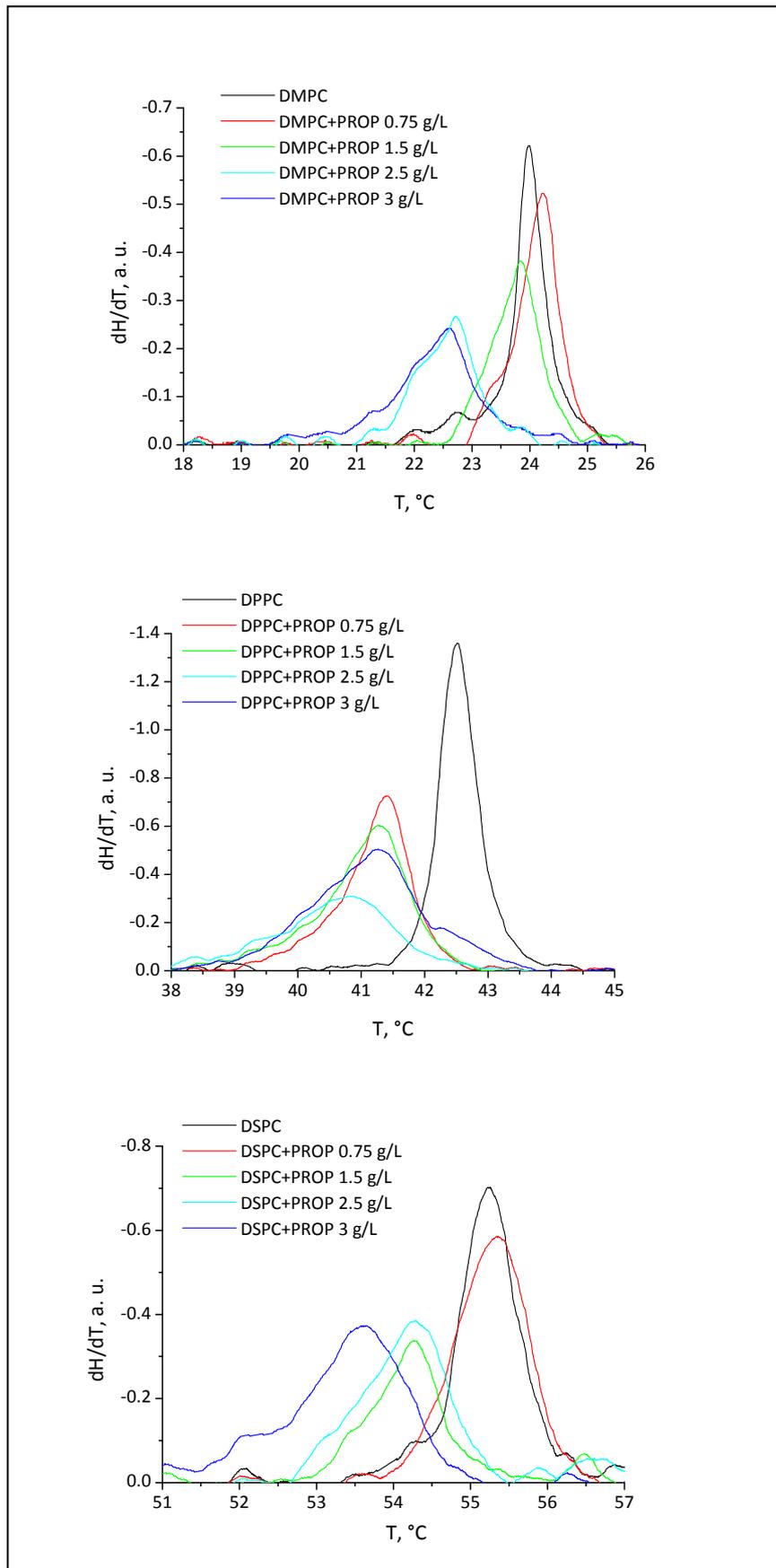


Figura 3.5. Profili DSC dei liposomi costituiti da DPMC, DPPC, DSPC, drogati con diverse quantità di propoli. Velocità di scansione 0.5°C/min.

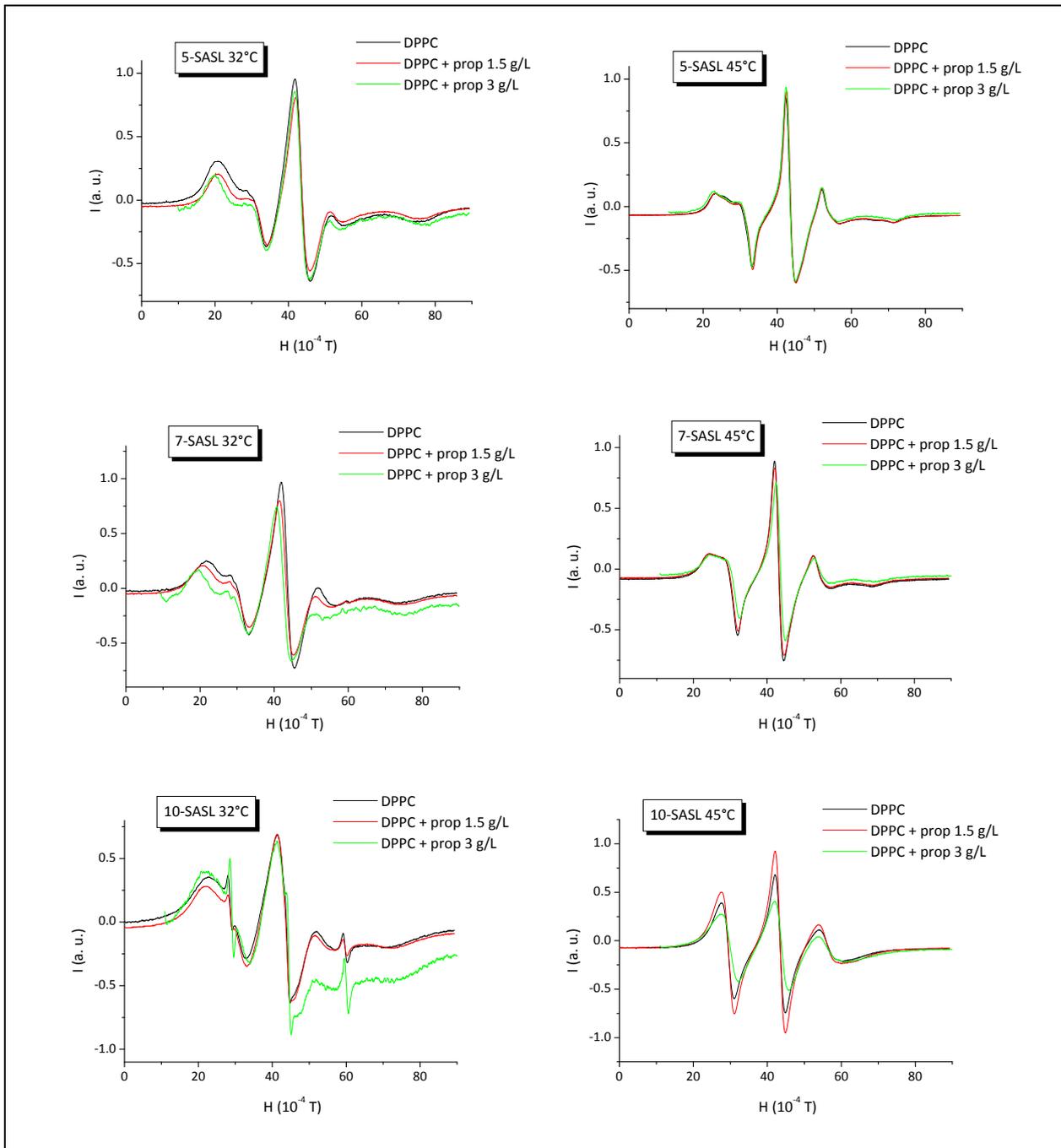


Figura 3.6. Spettri ESR dei liposomi di DPPC drogati con differenti quantità di propoli e diversi SASL. f: 9 GHz; P: 10 mW.

### 3.2.2.4 ANALISI HPLC/MS

Data l'assenza in letteratura di analisi riguardanti la composizione chimica del propoli veneto, si è ritenuto necessario effettuare un'analisi HPLC/MS, al fine di individuare in particolare quali siano le sostanze responsabili dell'eccezionale capacità antiossidante del propoli. È noto che tra i vari antiossidanti presenti negli alimenti le sostanze che forniscono potere antiossidante al propoli siano i polifenoli [64]. Si sono individuati dieci polifenoli: sette flavonoidi (apigenina, canferolo, crisina, galangina, naringenina, pinocembrina e quercetina) e tre derivati dell'acido cinnamico (acido caffeico e due suoi esteri: il fenetilcafeato o CAPE e l'1,1-dimetilallilcafeato o DMAC). Le formule di struttura vengono riportate in Figura 3.7.

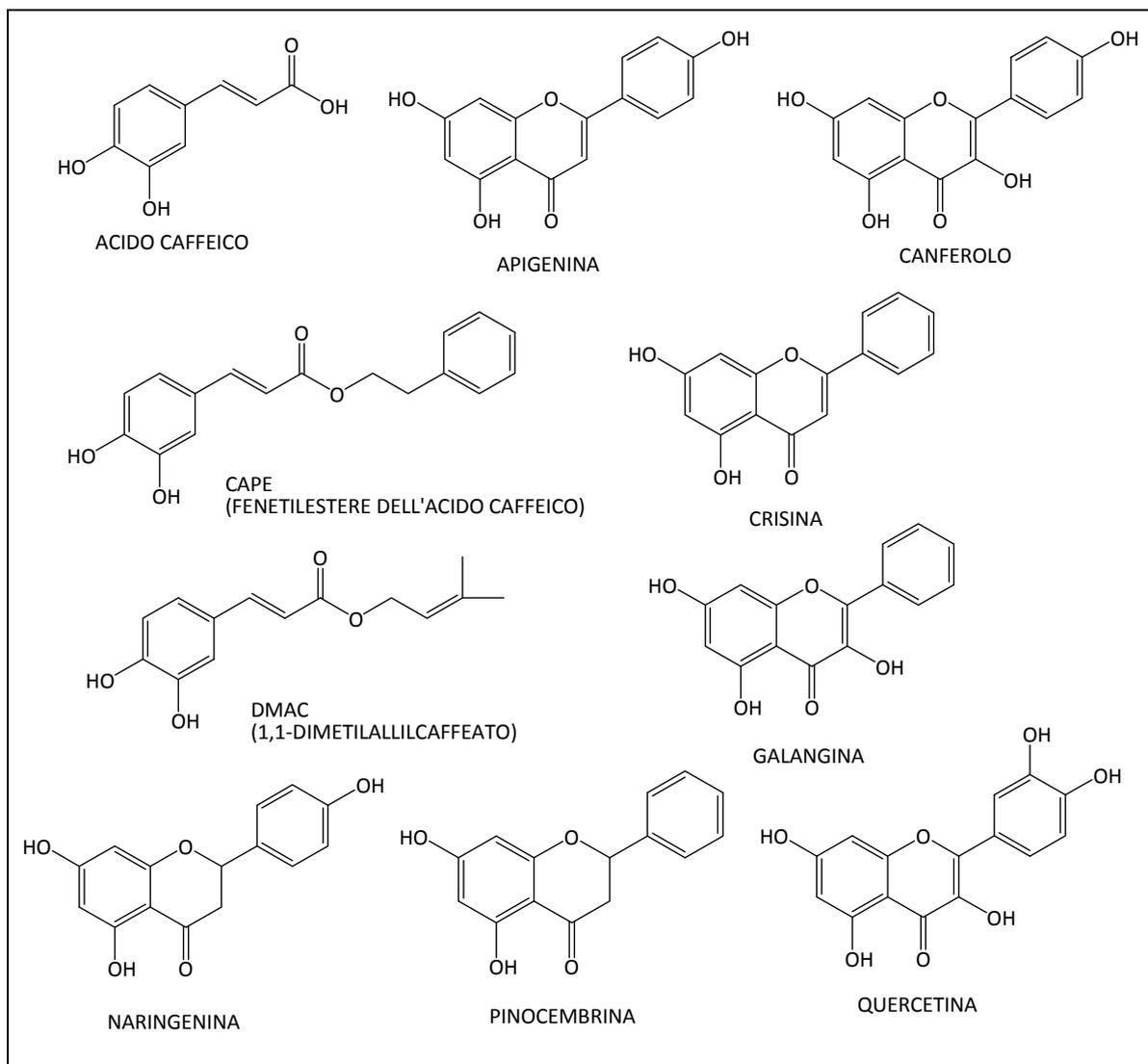


Figura 3.7. Formule di struttura dei polifenoli che vengono quantificati nel propoli tramite HPLC/MS.

Data la complessità della matrice è stato scelto il metodo delle aggiunte standard per la quantificazione dei polifenoli nel propoli.

È stata effettuata dapprima una valutazione preliminare per conoscere l'ordine di grandezza della concentrazione di ciascun polifenolo nel propoli. Si è operato iniettando soluzioni di propoli a

concentrazione nota e confrontando il picco di ciascun polifenolo nei propoli con quello di polifenoli standard.

Successivamente si sono analizzate soluzioni in cui al propoli 0.01 g/L è stata aggiunta una quantità variabile di una soluzione dei dieci polifenoli. La concentrazione dei dieci polifenoli in soluzione ed i volumi aggiunti sono stati attentamente valutati in modo da ottenere una retta delle aggiunte caratterizzata da:

- il primo punto della retta, dopo il bianco, con concentrazione di polifenoli aggiunta pari, in linea di massima, a quella già presente;
- l'ultimo punto della retta con concentrazione di polifenoli aggiunta circa dieci volte maggiore rispetto a quella già presente.

Per ciascun tipo di propoli sono state dunque costruite rette di taratura, utilizzando l'area del picco cromatografico caratteristico di ciascun polifenolo, in funzione della concentrazione aggiunta del polifenolo stesso.

La linearità di risposta dello strumento era stata preventivamente verificata iniettando soluzioni dei dieci polifenoli a diverse concentrazioni. Nella costruzione della retta delle aggiunte standard sono stati esclusi i valori che risultavano al di fuori dell'intervallo di linearità. In Tabella 3.9 vengono riportate le concentrazioni dei dieci polifenoli ricavate per ciascun campione di propoli. Gli stessi risultati vengono anche riportati in Figura 3.8.

Tabella 3.9. Concentrazione di dieci polifenoli nei cinque campioni di propoli veneto, in mg/g propoli.

	<i>Concentrazione (mg/L)</i>				
	<i>TRI1</i>	<i>TRI2</i>	<i>MONT</i>	<i>ERA</i>	<i>GAMB</i>
<b>Acido Caffeico</b>	11.7	9.9	9.86	6.11	5.51
<b>Apigenina</b>	2.67	2.33	1.92	1.67	1.7
<b>Canferolo</b>	2.42	2.46	1.5	1.53	1.66
<b>CAPE</b>	21.8	17.6	18.3	13.3	13
<b>Crisina</b>	41.8	35.6	41.4	34.0	41.8
<b>DMAC</b>	8.8	5.2	7.3	5.1	8.8
<b>Galangina</b>	22.3	16.4	17.3	11.8	10.6
<b>Naringenina</b>	4.1	3.81	3.4	2.21	2.2
<b>Pinocembrina</b>	46.2	40.2	45.6	29.3	27.8
<b>Quercetina</b>	2.96	2.33	1.28	0.82	1.23

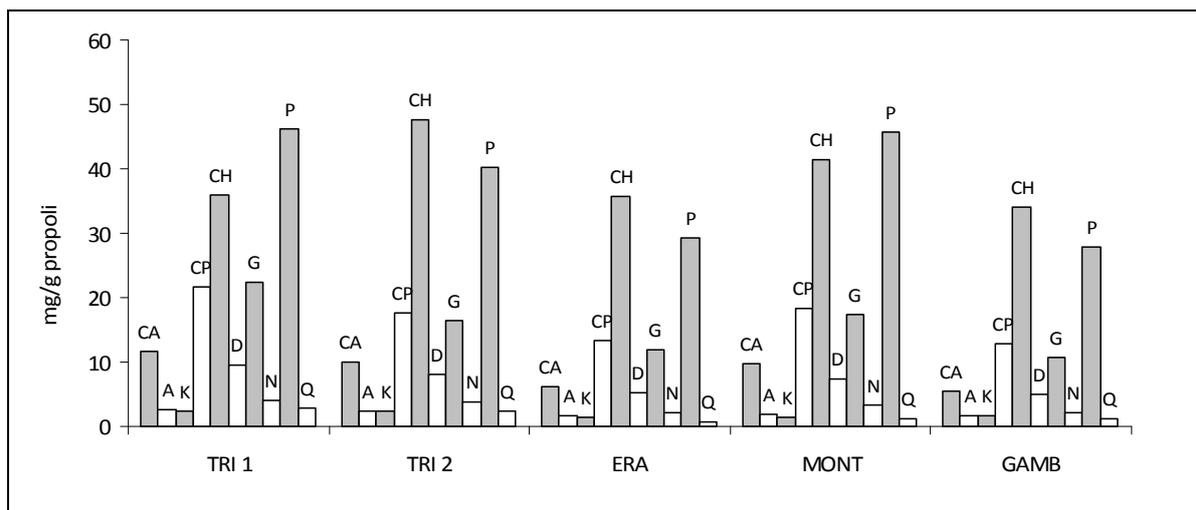


Figura 3.8. Concentrazione di dieci polifenoli nei cinque campioni di propoli veneto. CA: acido caffeico; A: apigenina; K: canferolo; CP: CAPE; CH: crisina; D: DMAC; G: galangina; N: naringenina; P: pinocebrina; Q: quercetina.

I risultati dell'analisi HPLC/MS dei differenti tipi di propoli evidenziano quanto segue:

- tutti campioni di propoli presi in esame sono costituiti prevalentemente dai medesimi polifenoli, riportati in Tabella 3.9;
- la distribuzione delle concentrazioni relative nei differenti polifenoli nei vari campioni di propoli è sostanzialmente la medesima, sebbene si noti una limitata differenza nei valori assoluti di concentrazione;
- le proporzioni dei vari polifenoli individuati rimangono pressoché costanti;
- crisina e pinocebrina risultano presenti sempre in elevata concentrazione ( $\geq 30$  mg/g propoli), seguite da galangina, CAPE, acido caffeico e DMAC (6-23 mg/g propoli circa) e con bassissime quantità dei polifenoli rimanenti ( $\leq 4$  mg/g propoli).

I risultati ottenuti appaiono in accordo sia con i profili degli spettri UV (Figura 3.2), che si sono rivelati simili per tutti i campioni, che con il loro potere antiossidante (Figura 3.3 e Figura 3.4), che non mostra grandi differenze tra un campione e l'altro.

Come verrà dimostrato nel capitolo 5, ove vengono riportati i risultati di misure sul potere antiossidante dei singoli polifenoli, crisina e pinocebrina, i due polifenoli presenti in maggiore concentrazione, evidenziano scarse proprietà antiossidanti, a differenza di acido caffeico, galangina, DMAC e CAPE che, pur presenti in quantità minori, sono caratterizzate da un potere antiossidante molto più elevato. Sono questi ultimi, quindi, i polifenoli che caratterizzano l'elevato potere antiossidante del propoli.

### 3.3 Propoli brasiliano e confronto con il propoli europeo

Il propoli brasiliano sembra avere una composizione chimica ed origine botanica molto diversa da quella del propoli di provenienza europea. È stato dimostrato che l'origine del propoli di Europa, Nord America, Asia e Nuova Zelanda è il pioppo (*Populus Nigra*); per quanto riguarda le zone tropicali, invece, in cui il pioppo non è molto diffuso, pare che le api possano estrarre i componenti per la

produzione del propoli anche da piante diverse, come ad esempio la *Hyptis divaricata* e la *Baccharis dracunculifolia* [45]. Il caso del propoli del Brasile, paese caratterizzato da una vastissima biodiversità, ha suscitato negli ultimi anni un crescente interesse scientifico ed economico [47].

All'interno del territorio brasiliano, che comprende zone temperate, subtropicali e tropicali, sono stati classificati 12 diversi tipi di propoli, a seconda della loro composizione ed origine botanica: cinque dalla zona meridionale, sei dal nord est ed uno dalla zona sudorientale: il propoli "verde" [45]. Negli ultimi anni è stato inoltre individuato un nuovo tipo di propoli, proveniente dalla zona settentrionale del paese, non inserito nelle precedenti 12 classi: il propoli "rosso", di cui si è cominciato a studiare la composizione solo dal 2006 [56].

### 3.3.1.1 COMPOSIZIONE

Come già accennato, analisi di composizione chimica condotte sul propoli europeo hanno rivelato un'alta percentuale di flavonoidi (10-15%), mentre nel propoli brasiliano, pur con qualche eccezione, la loro quantità è nettamente inferiore (< 4%) [65]. In effetti nel propoli brasiliano i componenti più comuni sembrano non essere i flavonoidi, ma i polipropileni prenilati [66]. In particolare i componenti principali del propoli verde, il tipo di propoli più comunemente utilizzato e studiato in Brasile, sono gli acidi cinnamici prenilati; tra questi l'artepillin C (acido 3,5-diprenil-4-idrossicinnamico; Figura 3.9) attrae molto interesse, non solo per la sua attività antimicrobica, ma anche per la sua tossicità nei confronti di cellule cancerose [66]; curiosamente questa sostanza, assente nel propoli europeo, nordamericano e neozelandese, non si riscontra nemmeno in quello di origine argentina e cilena [53]. Nei campioni di propoli brasiliano sono stati inoltre individuati nuovi composti con attività microbicide e citotossiche [47], non presenti nel propoli europeo.

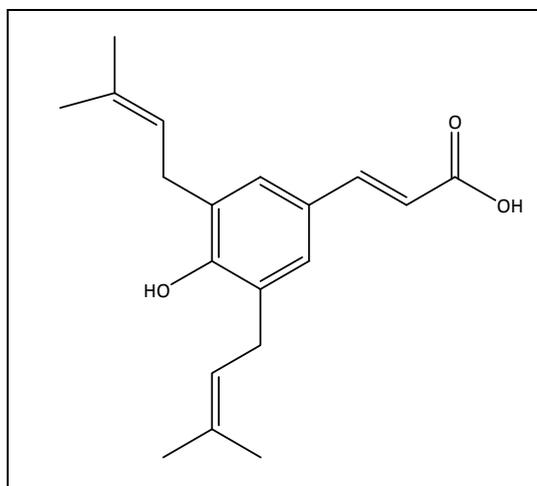


Figura 3.9. Formula di struttura dell'Artepillin C (acido 3,5-diprenil-4-idrossicinnamico).

Anche in base al profilo dei flavonoidi sorgono notevoli differenze: i flavonoidi principalmente presenti in propoli provenienti dalle zone temperate come Europa, Nordamerica e Asia orientale sono pinocembrina, crisina e galangina; mentre nel propoli brasiliano sono presenti canferide, isosacuratenina e tracce di canferolo [45]. In Allegato 3 vengono riportati i componenti che sono stati individuati nel propoli proveniente dal Brasile [45, 48, 49, 56, 67]. È opportuno aggiungere che, anche in Brasile, in virtù dell'enorme biodiversità, sono presenti propoli da pioppo: in questo caso la

composizione chimica in generale ed il profilo dei flavonoidi in particolare rispecchiano quelli europei [45].

### 3.3.1.2 PROPRIETÀ

Le proprietà farmacologiche del propoli brasiliano sono molto simili a quelle del propoli europeo; per questo motivo si è pensato erroneamente per anni che dovessero contenere, in linea di massima, le stesse sostanze [66]. Dato che, nonostante la diversa composizione, i due tipi di propoli hanno le stesse proprietà fungicide, alcuni studi hanno ipotizzato che altri composti, diversi dai flavonoidi, possano essere responsabili degli effetti antimicotici, ad esempio acidi aromatici contenuti in elevata quantità, come le amirine [47]. Pochi studi in letteratura invece si occupano del potere antiossidante del propoli brasiliano e solo uno [53] mette a confronto i due tipi di propoli “di zona temperata” e di “zona tropicale”, per quanto riguarda questa proprietà. Appare quindi interessante approfondire quest’argomento per verificare se a causa della ridotta presenza di flavonoidi, si riscontri un potere antiossidante inferiore nel propoli brasiliano, rispetto a quello europeo o se, come accade per altre proprietà, altri composti si sostituiscano ai flavonoidi nella loro azione di protezione nei confronti dei radicali liberi.

### 3.3.2 CAMPIONI DI PROPOLI

I campioni di propoli pervenuti provengono da diverse zone del Brasile: due sono provenienti dalla città di Botucatu, nello stato di São Paulo, due dallo stato del Mato Grosso, in particolare dalla zona del Nord Pantanal, che si trova nella parte centrale del Brasile ed uno, di tipo verde, dallo stato di Minas Gerais. A parte quest’ultimo, degli altri non si conosce la tipologia di appartenenza. Questi stati del Brasile sono caratterizzati da clima e caratteristiche territoriali diverse (Tabella 3.10).

Tabella 3.10. Caratteristiche e provenienza dei campioni di propoli brasiliano.

<i>propoli</i>	<i>Zona di origine</i>	<i>Zona climatica</i>	<i>Caratteristiche territoriali</i>
<b>SP1</b>	Botucatu, São Paulo	Subtropicale	Collina
<b>SP2</b>	Botucatu, São Paulo	Subtropicale	Collina
<b>MT1</b>	Pantanal Nord, Mato Grosso	Tropicale umido	Pianura alluvionale
<b>MT2</b>	Pantanal Nord, Mato Grosso	Tropicale umido	Pianura alluvionale
<b>MG</b>	Minas Gerais	Tropicale/ Tropicale di altitudine	Altopiano

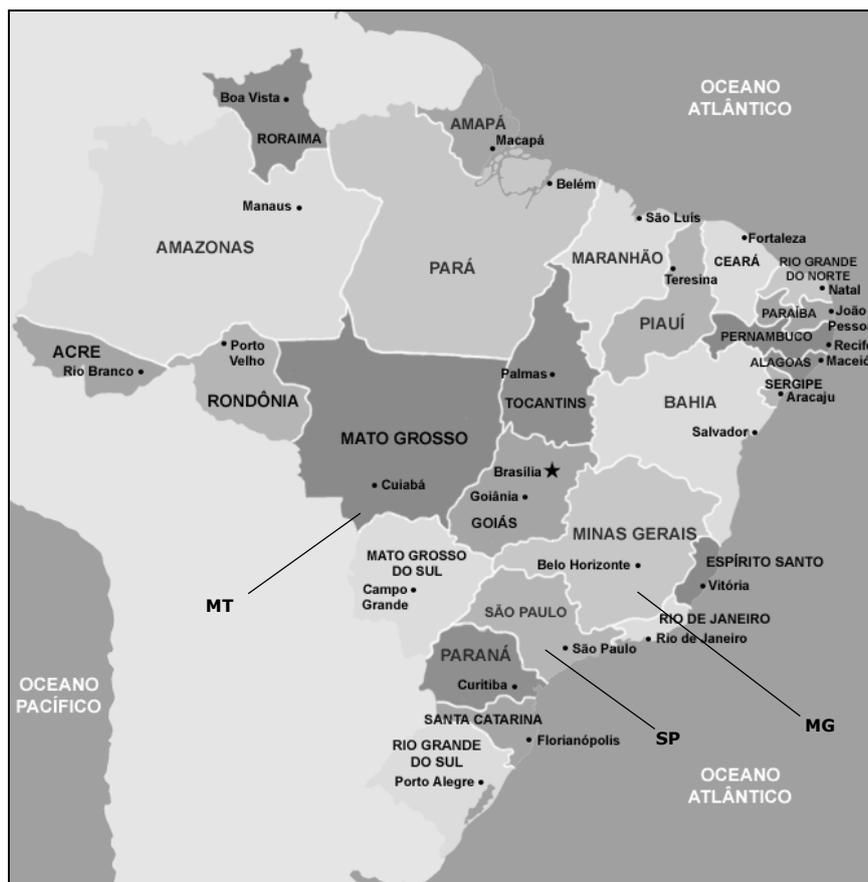


Figura 3.10. Zone di provenienza dei campioni di propoli brasiliano.

È particolarmente importante avere la possibilità di analizzare il propoli proveniente dal Pantanal, in quanto si tratta di una zona climatica unica al mondo, con un'immensa pianura alluvionale che viene sommersa dalle acque per l'80% della sua superficie. È inoltre considerato l'ecosistema con il maggior numero di specie di flora e di fauna nel mondo, e, ad oggi, non è mai stato analizzato il potere antiossidante del propoli proveniente da quella zona.

Tutti i campioni sono sotto forma di solido da raschiamento. È stata effettuata un'estrazione con etanolo al 96%, con la stessa procedura utilizzata per il propoli veneto. La concentrazione finale dei campioni di propoli è stata misurata eliminando il solvente di una soluzione di volume noto sotto flusso di azoto e pesando il residuo solido.

### 3.3.3 RISULTATI

Già a prima vista si nota una differenza di colore e consistenza tra i campioni: SP1, SP2 ed MG hanno una consistenza solida ed un colore dal marrone al giallognolo; i propoli provenienti dal Pantanal hanno invece un colore nero e una consistenza più pastosa.

Tutti i risultati, dove non espresso diversamente, vengono riferiti ad una soluzione al 15% w/v, al fine di poter effettuare un confronto tra i campioni.

#### 3.3.3.1 SPETTRI UV/VIS

In Figura 3.11 vengono riportati gli spettri UV/VIS delle soluzioni di propoli, espressi in assorbanza specifica ( $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$ ), ovvero l'assorbanza di una soluzione 1% w/v (cammino ottico di 1 cm). In Tabella

3.11 vengono inoltre riportati i coefficienti  $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$  alle lunghezze d'onda di massimo assorbimento (280 e 295 nm).

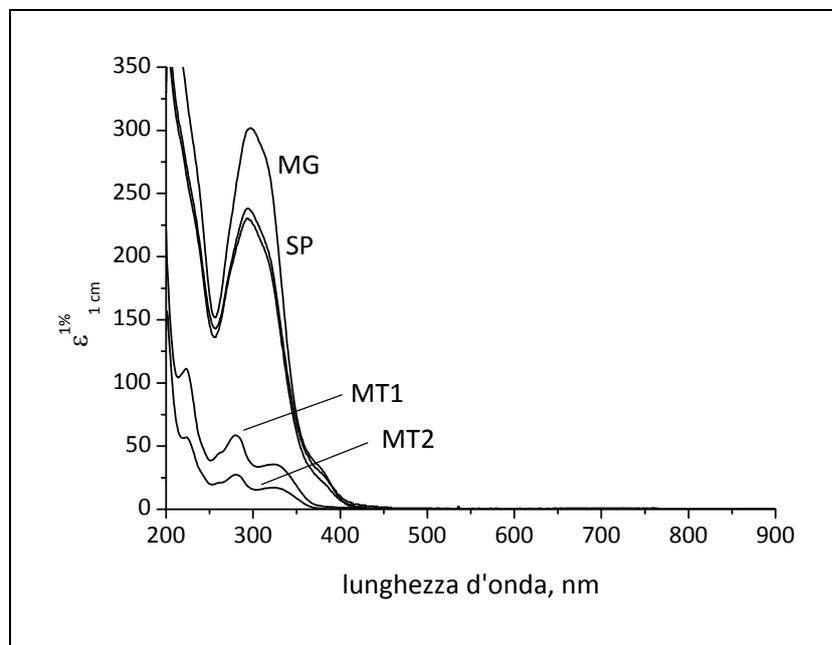


Tabella 3.11. Assorbanza specifica  $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$  dei campioni di propoli brasiliano, a 280 e 295 nm.

<b>Propoli</b>	$\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$ <b>(280 nm)</b>	$\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$ <b>(295 nm)</b>
SP1	0.21	0.24
SP2	0.20	0.23
MT1	0.06	0.04
MT2	0.03	0.02
MG	0.25	0.30

Figura 3.11. Spettri UV/VIS dei diversi campioni di propoli brasiliano.  $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$ : assorbanza specifica (concentrazione 1% w/v; cammino ottico 1 cm)

Come si può notare, il profilo degli spettri UV si differenzia da campione a campione: tutti mostrano un assorbimento di radiazione ultravioletta tra i 200 ed i 400 nm, ma i campioni MG, SP1 ed SP2 hanno a tutte le lunghezze d'onda un'assorbanza nettamente più elevata, con un picco ben definito a 295 nm; MT1 e MT2 hanno invece un diverso profilo, con un picco attorno ai 222 nm, uno a 280 nm ed una spalla a 325 nm. In prima analisi si può quindi affermare che tra i cinque campioni a disposizione sono presenti due diversi tipi di propoli, da verificare analizzandone la composizione.

Da un confronto con i profili UV dei campioni di propoli veneto (Figura 3.12) emerge inoltre come per i campioni brasiliani l'assorbanza specifica sia inferiore rispetto a quella dei campioni veneti. In particolare i propoli MG ed SP presentano valori di  $\epsilon$  molto vicini a quelli veneti, mentre i campioni MT mostrano un'assorbanza molare nettamente inferiore (circa il 10% rispetto a quelli veneti).

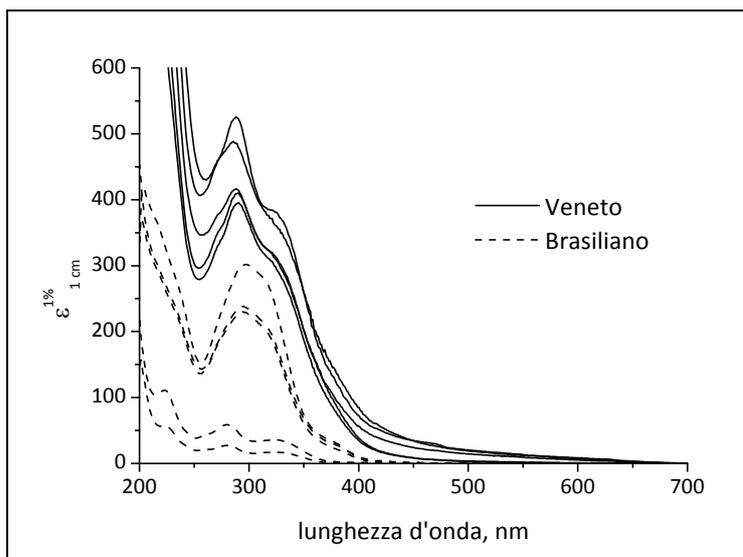


Figura 3.12. Confronto tra spettri UV/VIS dei diversi campioni di propoli veneto e brasiliano.  $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$ : assorbanza specifica (concentrazione 1% w/v; cammino ottico 1 cm)

Tabella 3.12. Assorbanza specifica  $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$  dei campioni di propoli, a 289 nm.

	<i>Propoli</i>	$\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$ (289 nm)
Veneto	TRI1	0.48
	TRI2	0.41
	MONT	0.39
	ERA	0.52
	GAMB	0.42
Brasiliano	SP1	0.23
	SP2	0.23
	MT1	0.05
	MT2	0.02
	MG	0.29

I minori valori di assorbanza, a parità sostanziale di concentrazione, registrati nell'intervallo 250-400 nm nel caso del propoli di origine brasiliana, indica un sensibile minor contenuto di flavonoidi rispetto al propoli veneto, dato che proprio in quell'intervallo di lunghezza d'onda assorbono questi flavonoidi.

### 3.3.3.2 POTERE ANTIOSSIDANTE

Come nel caso del propoli veneto, sono stati applicati i seguenti metodi:

- inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS, come riferimento;
- metodo di Folin-Ciocalteu;
- metodo del DPPH;
- metodo enzimatico.

I risultati ottenuti con il metodo IPL sono riportati in Tabella 3.13.

Tabella 3.13. Potere antiossidante dei campioni di propoli brasiliano, misurato con il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS ed espresso in  $IC_{50}$  (mg/L).

<i>propoli</i>	$IC_{50}$ (mg/L)
SP1	2.4±0.2
SP2	4.2±0.4
MT1	12±1
MT2	19±2
MG	1.7±0.2

In Figura 3.13 vengono confrontati i valori di IC<sub>50</sub> trovati per il propoli brasiliano, con quelli del propoli veneto.

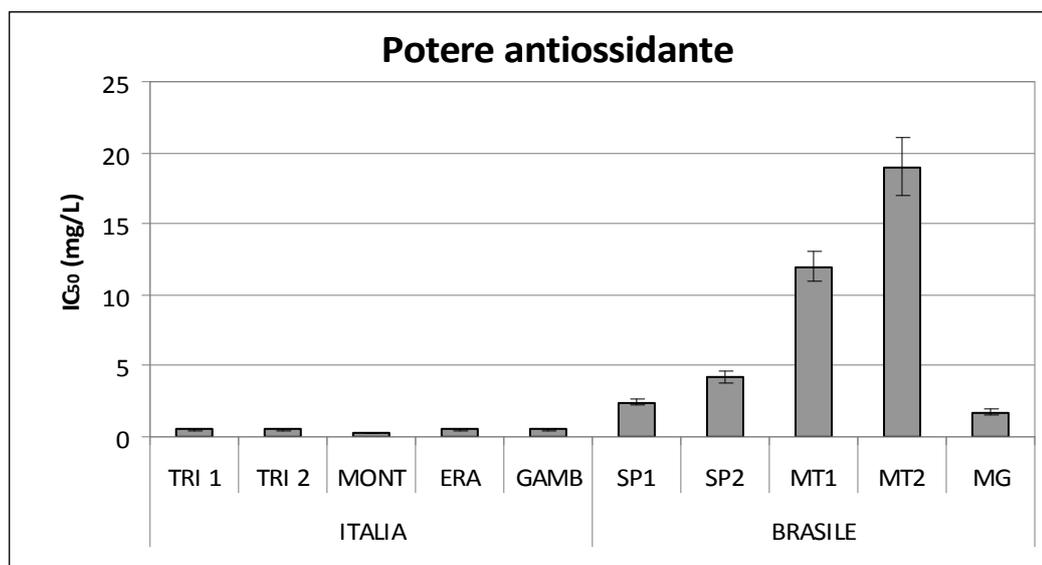


Figura 3.13. Potere antiossidante dei campioni di propoli veneto e brasiliano, misurato con il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS.

Si osserva innanzitutto una certa variabilità tra i campioni: il propoli proveniente dal Pantanal (MT1 e MT2) si differenzia dagli altri campioni per il suo elevato IC<sub>50</sub> (12-19 mg/L), mentre i campioni da São Paulo e Minas Gerais rimangono al di sotto dei 4 mg/L. Tra questi il propoli verde sembra possedere un più elevato potere antiossidante, senza differenziarsi però di molto dai campioni SP.

Confrontando il propoli brasiliano con quello veneto, si nota come il propoli veneto abbia un potere antiossidante di gran lunga superiore rispetto al propoli brasiliano, con un IC<sub>50</sub> dalle 2 alle 40 volte più basso rispetto al propoli dal Brasile. Ciò è in accordo con il più basso contenuto di polifenoli che caratterizza la composizione del propoli brasiliano, rispetto a quello europeo [65].

Tabella 3.14 e Figura 3.14 riportano i risultati ottenuti applicando i saggi di Folin-Ciocalteu, DPPH e metodo enzimatico sul propoli brasiliano.

Tabella 3.14. Potere riducente, capacità di *scavenger* e contenuto totale di polifenoli dei campioni di propoli brasiliano, misurati rispettivamente con i metodi Folin-Ciocalteu, DPPH ed enzimatico, espressi in mM CE e riferiti ad una soluzione di propoli al 15% w/v.

<i>propoli</i>	<i>Potere riducente CE (mM)</i>	<i>Capacità di scavenger CE (mM)</i>	<i>Contenuto totale di polifenoli - CE (mM)</i>
<b>SP1</b>	120±7	29±3	64±2
<b>SP2</b>	134±7	37.1±0.6	60±10
<b>MT1</b>	160±5	30±3	40±10
<b>MT2</b>	100±10	28±1	50±10
<b>MG</b>	180±10	43±1	125±3

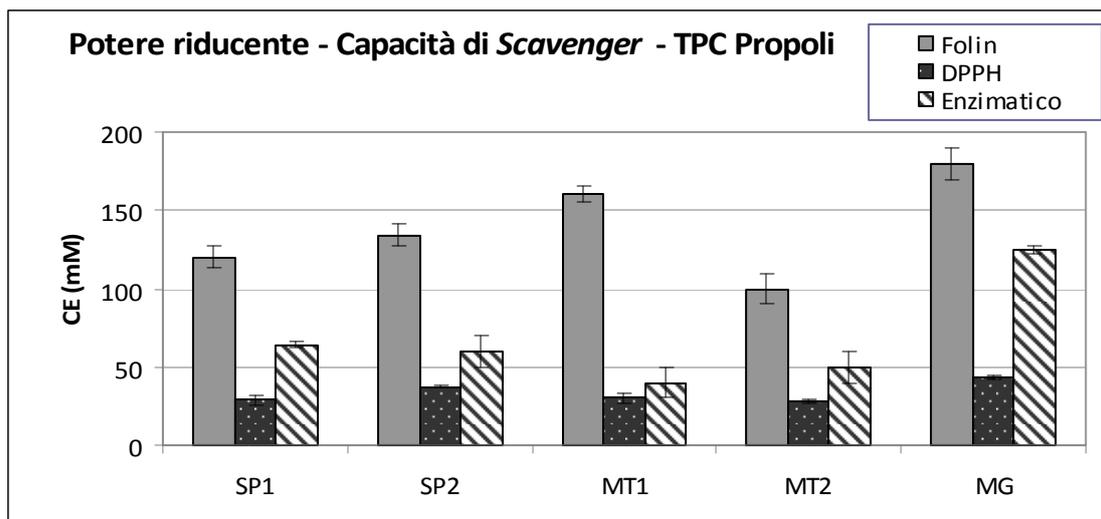


Figura 3.14. Potere riducente, capacità di *scavenger* e contenuto totale di polifenoli dei campioni di propoli brasiliano, misurati rispettivamente con i metodi Folin-Ciocalteu, DPPH ed enzimatico, espressi in mM CE e riferiti ad un'ipotetica soluzione di propoli al 15% w/v.

Si nota che, tra i tre saggi, solo il metodo enzimatico rispecchia i risultati ottenuti con il metodo IPL, con il propoli del Pantanal che presenta un contenuto di polifenoli più basso ( $\leq 50$  mM CE), il propoli di Botucatu un contenuto intermedio ( $\approx 60$  mM CE) ed il propoli da Minas Gerais più alto ( $> 100$  mM CE). Con gli altri due metodi non si osservano differenze significative tra i diversi campioni.

In Figura 3.15 vengono riportati, a confronto, i risultati ottenuti sul propoli brasiliano con quelli sul propoli veneto.

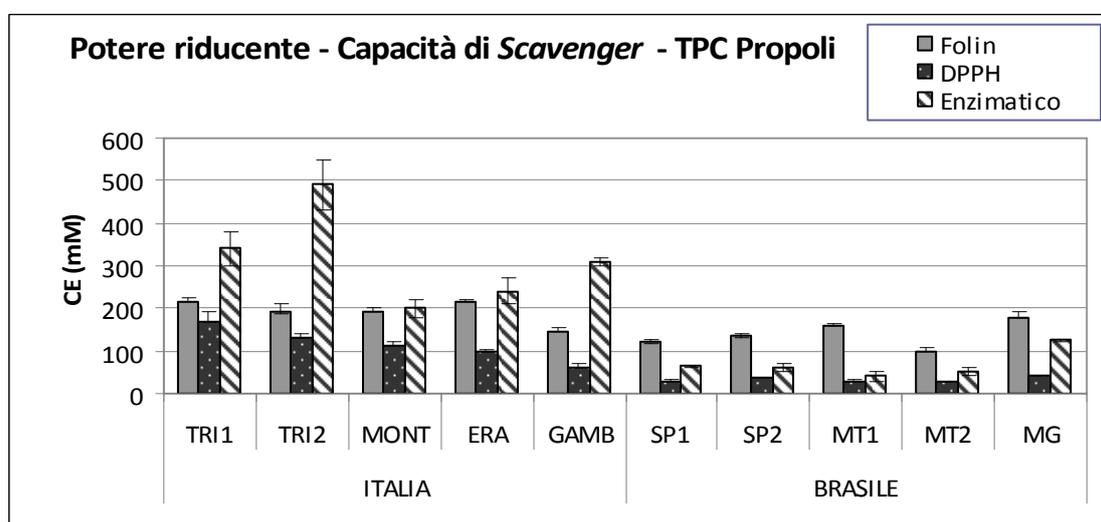


Figura 3.15. Potere riducente, capacità di *scavenger* e contenuto di polifenoli totali di propoli veneto e brasiliano, misurati rispettivamente con i metodi Folin-Ciocalteu, DPPH ed enzimatico, espressi in mM CE e riferiti ad un'ipotetica soluzione di propoli al 15% w/v.

Il grafico di Figura 3.15 mostra che, con tutti i metodi applicati, il propoli brasiliano evidenzia valori di potere antiossidante inferiori a quello veneto. La differenza si nota maggiormente con i metodi DPPH ed enzimatico. Al fine di effettuare una valutazione complessiva dell'affidabilità dei metodi spettrofotometrici, nel paragrafo 5.2 vengono calcolati i coefficienti di correlazione dei tre

saggi nei confronti del metodo IPL, applicati a tutti i campioni di propoli a disposizione, sia veneti che brasiliani.

### 3.3.3.3 ANALISI HPLC/MS

La variabilità dei risultati ottenuti sul propoli brasiliano rende indispensabile un'analisi più dettagliata dei componenti di questo prodotto dell'alveare, per valutare innanzitutto la differenza in termini di concentrazione di polifenoli, già citata in letteratura, tra propoli di zona tropicale e temperata, ma anche un eventuale differenza di quantità e tipo di polifenoli tra il propoli del Pantanal e gli altri campioni brasiliani.

L'analisi HPLC/MS è stata svolta seguendo la procedura già descritta al paragrafo 3.2.2. In Tabella 3.15 e Figura 3.16 vengono riportate le quantificazioni dei dieci polifenoli di Figura 3.7, nei cinque campioni di propoli brasiliano.

Tabella 3.15. Concentrazione di dieci polifenoli nei cinque campioni di propoli brasiliano, in mg/g propoli.

	<i>Concentrazione (mg/g)</i>				
	<i>SP1</i>	<i>SP2</i>	<i>MT1</i>	<i>MT2</i>	<i>MG</i>
<b>Acido Caffeico</b>	1.131	0.957	0.019	N.D.	1.610
<b>Apigenina</b>	0.046	0.019	0.275	0.088	N.D.
<b>Canferolo</b>	0.596	0.552	0.037	N.D.	1.214
<b>CAPE</b>	0.519	1.101	0.390	0.005	0.136
<b>Crisina</b>	0.028	0.027	0.017	N.D.	0.076
<b>DMAC</b>	0.161	0.085	0.174	0.166	0.039
<b>Galangina</b>	0.095	0.091	0.523	0.211	0.723
<b>Naringenina</b>	0.185	0.173	0.010	0.004	0.369
<b>Pinocembrina</b>	0.596	0.042	0.027	0.005	3.960
<b>Quercetina</b>	0.625	0.100	0.217	0.036	0.668

N.D. = non determinato: il valore è al di sotto del limite di rilevanza

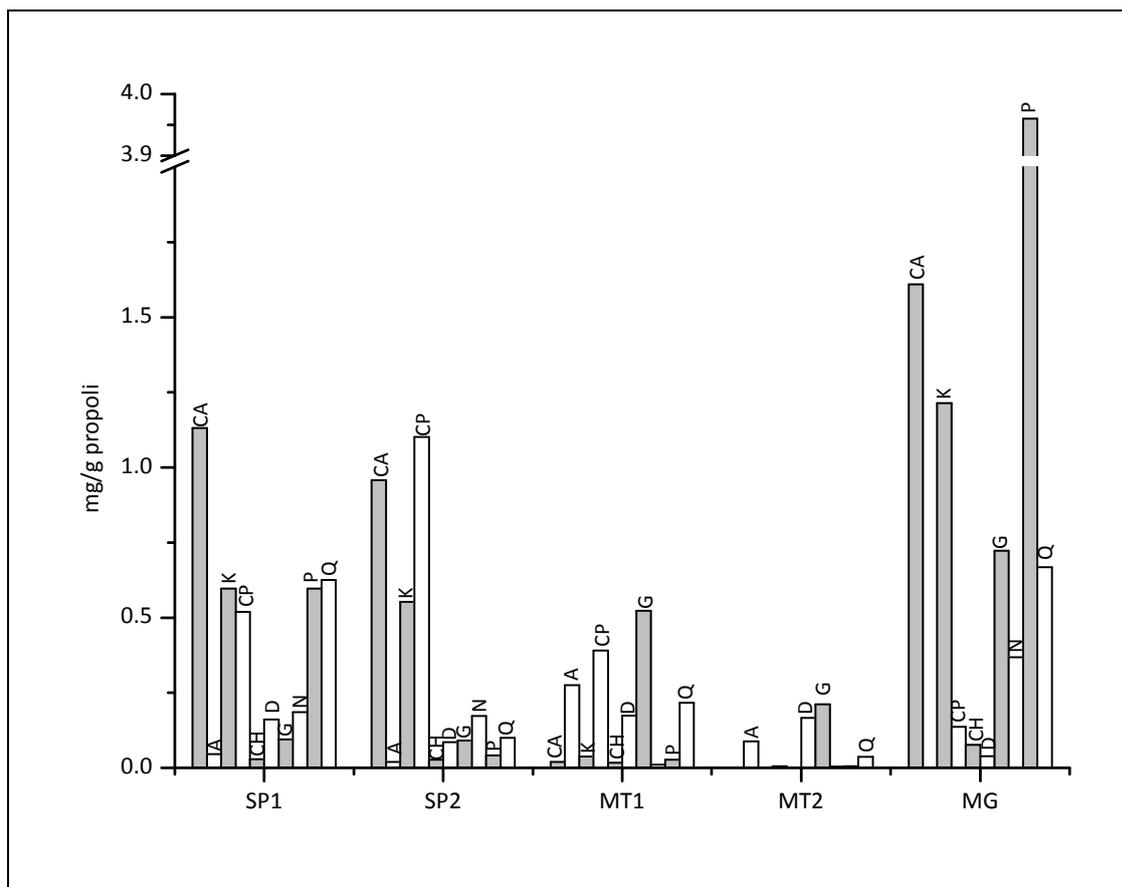


Figura 3.16. Concentrazione di dieci polifenoli nei cinque campioni di propoli brasiliano. CA: acido caffeico; A: apigenina; K: canferolo; CP: CAPE; CH: crisina; D: DMAC; G: galangina; N: naringenina; P: pinocebrina; Q: quercetina.

Dai risultati ottenuti sembra che i cinque campioni di propoli brasiliano possano suddividersi idealmente in tre classi in base alla loro composizione chimica, che corrispondono, come previsto, alla loro zona di origine.

Il campione che contiene complessivamente le maggiori quantità di polifenoli è quello proveniente da Minas Gerais, seguito dai campioni di São Paulo e da quelli provenienti dal Mato Grosso. Per quanto riguarda i singoli polifenoli presenti, i campioni SP contengono soprattutto acido caffeico, canferolo e CAPE, con, nel caso del campione SP1, anche quantità non trascurabili di pinocebrina e quercetina.

I campioni MT, invece, contengono soprattutto apigenina, galangina e DMAC con, nel caso di MT1, una quantità rilevante di CAPE e quercetina. MG invece contiene un picco di pinocebrina e quantità significative di acido caffeico, canferolo, galangina e quercetina. Come si può notare dunque, le classi di composti si differenziano tra loro non solo per la quantità di polifenoli contenuti, ma anche per i rapporti relativi tra i singoli polifenoli, al contrario di quanto visto per il propoli veneto.

È necessario tenere presente che la valutazione dei gruppi ai quali i campioni di propoli possano appartenere necessiterebbe di un'analisi di composizione chimica più approfondita rispetto a quella effettuata, e di informazioni sull'origine botanica, non disponibili. È possibile comunque effettuare un'analisi delle componenti principali, a partire dalle informazioni in possesso, per evidenziare analogie e differenze tra i campioni di propoli da noi pervenuti.

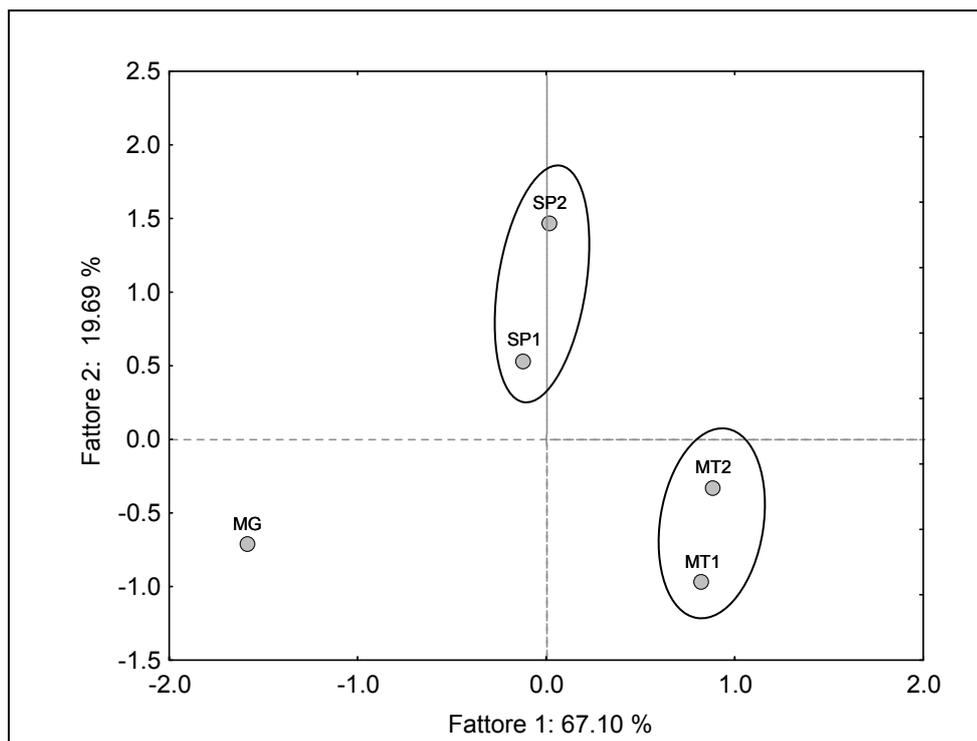


Figura 3.17. Grafico costruito effettuando un'analisi multivariata con estrazione delle due componenti principali sui valori di composizione dei cinque campioni di propoli brasiliano.

Come si osserva in Figura 3.17, nonostante le differenze di composizione, i cinque campioni di propoli sembrano disporsi in tre gruppi: un gruppo presenta il solo campione MG, un gruppo è costituito da SP1 ed SP2 e l'ultimo gruppo comprende MT1 ed MT2.

Le concentrazioni dei vari polifenoli nei cinque campioni sono in accordo con i risultati di potere antiossidante ottenuti in precedenza: il propoli proveniente da Minas Gerais, infatti, che presenta il potere antiossidante più elevato, mostra anche il più alto contenuto totale dei dieci polifenoli (circa 9 mg/g propoli) rispetto agli altri campioni. Si ha un contenuto intermedio complessivo dei dieci polifenoli (3-4 mg/g propoli) per i campioni di São Paulo, dove il maggior contenuto di CAPE, polifenolo con elevate proprietà antiossidanti, nel campione SP2 viene compensato dal maggior contenuto di quercetina, con analoghe proprietà antiossidanti, nel campione SP1. La differenza in termini di contenuto di polifenoli tra MG ed SP è però determinata soprattutto dal picco di pinocembrina, polifenolo non molto antiossidante, che si osserva in MG: di conseguenza ciò non può determinare una differenza molto marcata sul potere antiossidante dei tre campioni, che, come si è visto sperimentalmente (Tabella 3.13), si mantiene su valori molto simili tra loro. Molti dei polifenoli contenuti in elevata quantità nel propoli MG, sono anche presenti nei campioni SP (acido caffeico, canferolo, pinocembrina, quercetina): ciò può spiegare la somiglianza dello spettro UV/VIS (Figura 3.11); si osserva comunque una più elevata assorbanza nel caso del propoli MG, forse dovuta alla maggior quantità di pinocembrina contenuta.

Il propoli proveniente dallo stato di Mato Grosso mostra livelli complessivi molto bassi dei dieci polifenoli, con una certa differenza tra i due campioni: MT1 ha un più elevato contenuto dei dieci polifenoli (1.7 mg/g propoli), rispetto ad MT2 (0.5 mg/g propoli). In generale, passando dal campione MT1 al MT2, si ha una diminuzione di concentrazione di tutti i polifenoli più attivi, con un

dimezzamento della quantità di galangina; quercetina e CAPE, polifenoli particolarmente attivi, sono presenti in quantità quasi nulle (< 0.05 mg/g propoli) nel campione MT2, mentre si trovano in quantità significative, anche se non molto elevate (0.2-0.3 mg/g propoli), nel campione MT1. Ciò spiega adeguatamente la diminuzione di potere antiossidante che si osserva passando da MT1 a MT2, pur trattandosi di propoli proveniente dalla stessa zona.

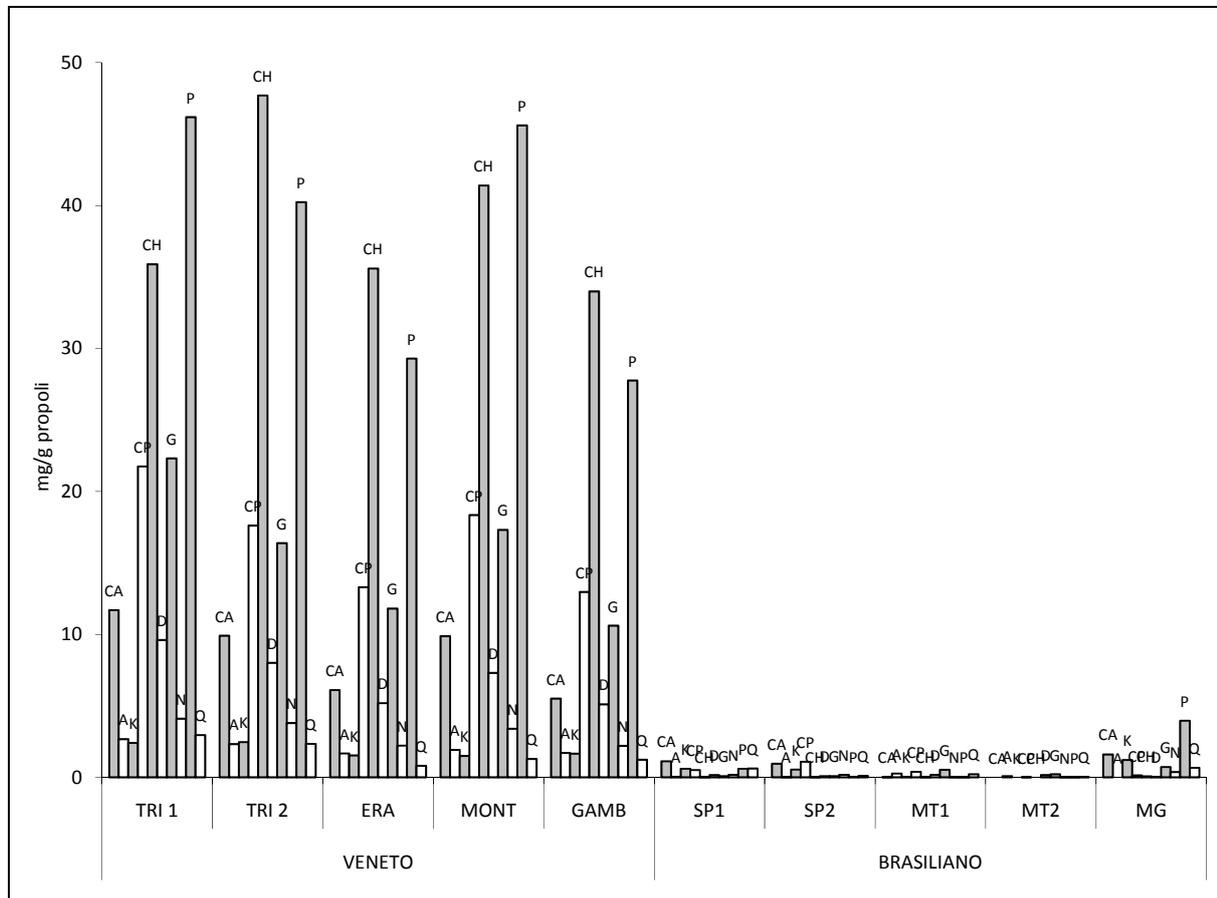


Figura 3.18. Concentrazione di dieci polifenoli nei dieci campioni di propoli analizzati. CA: acido caffeico; A: apigenina; K: canferolo; CP: CAPE; CH: crisina; D: DMAC; G: galangina; N: naringenina; P: pinocembrina; Q: quercetina.

Il confronto tra le quantità di polifenoli di propoli veneto e brasiliano (Figura 3.18) non lascia dubbi: il propoli di origine veneta contiene quantità molto più elevate di polifenoli. Ciò conferma quanto già presente in letteratura e fornisce una spiegazione per il basso potere antiossidante osservato nel propoli proveniente dal Brasile. La differenziazione tra propoli veneto e brasiliano è anche visibile effettuando un'analisi delle componenti principali (Figura 3.19).

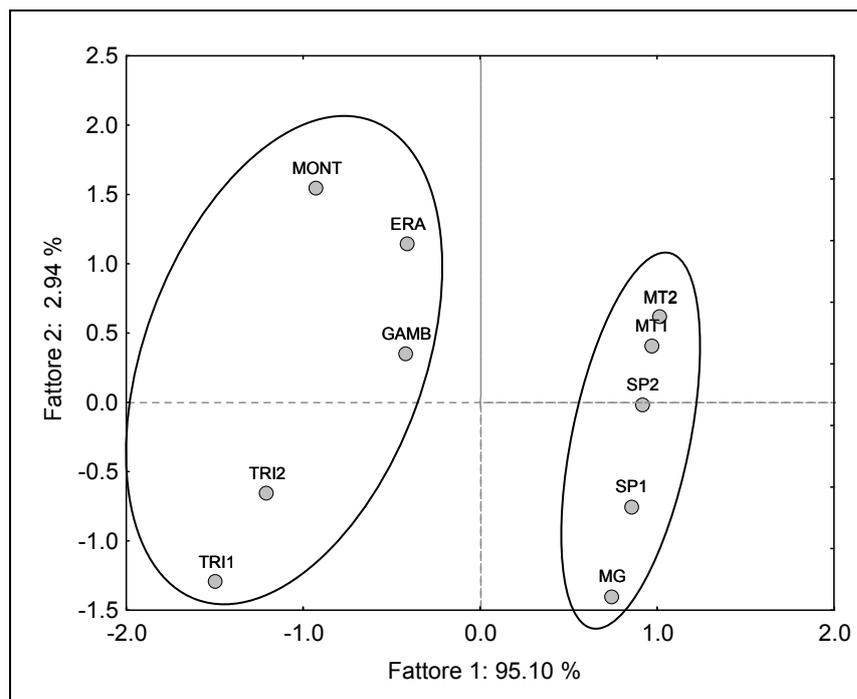


Figura 3.19. Grafico costruito effettuando un'analisi multivariata con estrazione delle due componenti principali sui valori di composizione dei dieci campioni di propoli. Propoli veneto: TRI1, TRI2, MONT, ERA GAMB. Propoli brasiliano: SP1, SP2, MT1, MT2, MG.

### 3.4 Propoli come protettivo solare?

L'esposizione ai raggi solari è il fattore responsabile di diversi disturbi della pelle, quali arrossamento, secchezza, iperpigmentazione ed invecchiamento precoce. Le radiazioni UVB (290-320 nm) provocano eritemi, aumentano lo stress ossidativo e causano danni al DNA mediante interazione diretta con le basi azotate. Le radiazioni UVA (320-400 nm) sono considerate responsabili dell'invecchiamento: generano ossigeno singoletto e radicali ossidrilici, che possono interagire con DNA, lipidi e proteine (paragrafo 1.1.6). L'organismo utilizza enzimi ed antiossidanti non enzimatici come difese naturali per proteggersi dall'azione delle radiazioni ultraviolette, ma talvolta un'esposizione cronica ai raggi UV e ai radicali liberi, generati per esempio dal fumo di sigaretta, fanno sì che queste difese diventino inadeguate.

Negli ultimi anni l'utilizzo di prodotti naturali nei protettivi solari ha suscitato notevole interesse. In questo campo i polifenoli sembrano essere molto promettenti in quanto sono caratterizzati da un'elevata assorbanza nella regione UV: il ridotto assorbimento di radiazioni ultraviolette da parte della pelle limita le infiammazioni, lo stress ossidativo e i danni al DNA [11]. Allo stesso tempo i polifenoli hanno proprietà anti-infiammatorie e antiossidanti: possono quindi reagire con i radicali liberi generati dalla radiazione UV ed inibire o ritardare i danni da essi causati [68].

Il propoli veneto potrebbe essere un buon candidato come additivo per protettivi solari: lo spettro mostra un picco nella regione UV (Figura 3.2); il propoli inoltre è caratterizzato da proprietà antibatteriche ed anti-infiammatorie [43] ed è ricco di polifenoli, che forniscono alla sostanza un elevato potere antiossidante (paragrafo 3.2.2.2).

### 3.4.1 IL FATTORE DI PROTEZIONE TOTALE (SPF)

Il fattore di protezione totale (SPF) è un indicatore universale introdotto da Sayre *et al* [69] per descrivere l'efficienza di un prodotto solare contro gli eritemi. Nel calcolo (equazione 3.1) vengono valutati simultaneamente:

- quantità e tipo di radiazioni che raggiungono la Terra, senza essere filtrate da componenti dell'atmosfera;
- i danni causati all'organismo dai diversi tipi di radiazioni ultraviolette, quantificati mediante lo spettro di azione eritemica;
- la capacità della crema solare di assorbire le radiazioni ultraviolette. La crema in esame viene generalmente depositata su un substrato disomogeneo in concentrazione pari a 2 mg/cm<sup>2</sup>, corrispondente a quella raccomandata *in vivo* durante l'esposizione solare [70].

$$SPF = \frac{\sum_{290nm}^{400nm} S(\lambda) \cdot AE(\lambda)}{\sum_{290nm}^{400nm} S(\lambda) \cdot AE(\lambda) \cdot T(\lambda)} \quad (3.1)$$

$S(\lambda)$  è lo spettro della radiazione solare;  $AE(\lambda)$  è lo spettro di azione eritemica;  $T(\lambda)$  è lo spettro della crema solare, espresso in trasmittanza.  $S(\lambda)$  e  $AE(\lambda)$  sono riportati in letteratura [70],  $T(\lambda)$  è misurato sperimentalmente (2 mg/cm<sup>2</sup>)

I prodotti solari sono classificati in base ai loro fattori SPF come segue:

- 2-12: bassa protezione solare;
- 12-30: moderata protezione solare;
- Oltre 30: alta protezione solare [71];

Tutti i metodi *in vitro* usano substrati disomogenei per la misura dello spettro della crema solare, in modo da mimare la struttura disomogenea della superficie della pelle, ma una distribuzione riproducibile del campione risulta in tal caso molto difficile. Viene utilizzato dunque il modello *calibrated step film* di Herzog [72]: un metodo che permette di evitare la misura dello spettro della crema, di più difficile esecuzione, e di utilizzare lo spettro della sostanza in soluzione, per la quantificazione del fattore SPF. La disomogeneità della superficie è introdotta matematicamente (equazione 3.2).

$$T(\lambda) = g \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \cdot (1-f)} + (1-g) \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \cdot \frac{g \cdot f}{(1-g)+1}} \quad (3.2)$$

ove  $d$  è lo spessore medio della superficie (20 μM) e corrisponde ad un'applicazione *in vivo* di 2 mg/cm<sup>2</sup>;  $\varepsilon(\lambda)$  è il coefficiente di estinzione molare della sostanza protettiva;  $c$  è la concentrazione della sostanza protettiva nella crema;  $g$  ed  $f$  sono fattori che descrivono la struttura della superficie (per un'emulsione olio/acqua  $g=0.269$ ;  $f=0.935$ ).

### 3.4.2 RISULTATI

La determinazione del fattore SPF del propoli viene effettuata utilizzando lo spettro del campione di propoli proveniente dal Montello (Figura 3.2) e applicando le equazioni 3.1 e 3.2. Al fine di valutare i risultati ottenuti per il propoli, sono stati presi come riferimento degli additivi ampiamente utilizzati nell'industria cosmetica per la produzione di creme solari [73]:

- Tinosorb S - Bis-etilesilossifenol-metossifenil-triazina (TS);
- Ossibenzone - (2-idrossi-4-metossifenil)-fenilmetanone (B3);
- Ottinossato - Etilsil metossicinnammato (EC);
- Padimato O – Acido etilesildimetil-*p*-aminobenzoico (EP).

Le formule di struttura di questi prodotti sono riportate in Figura 3.20.

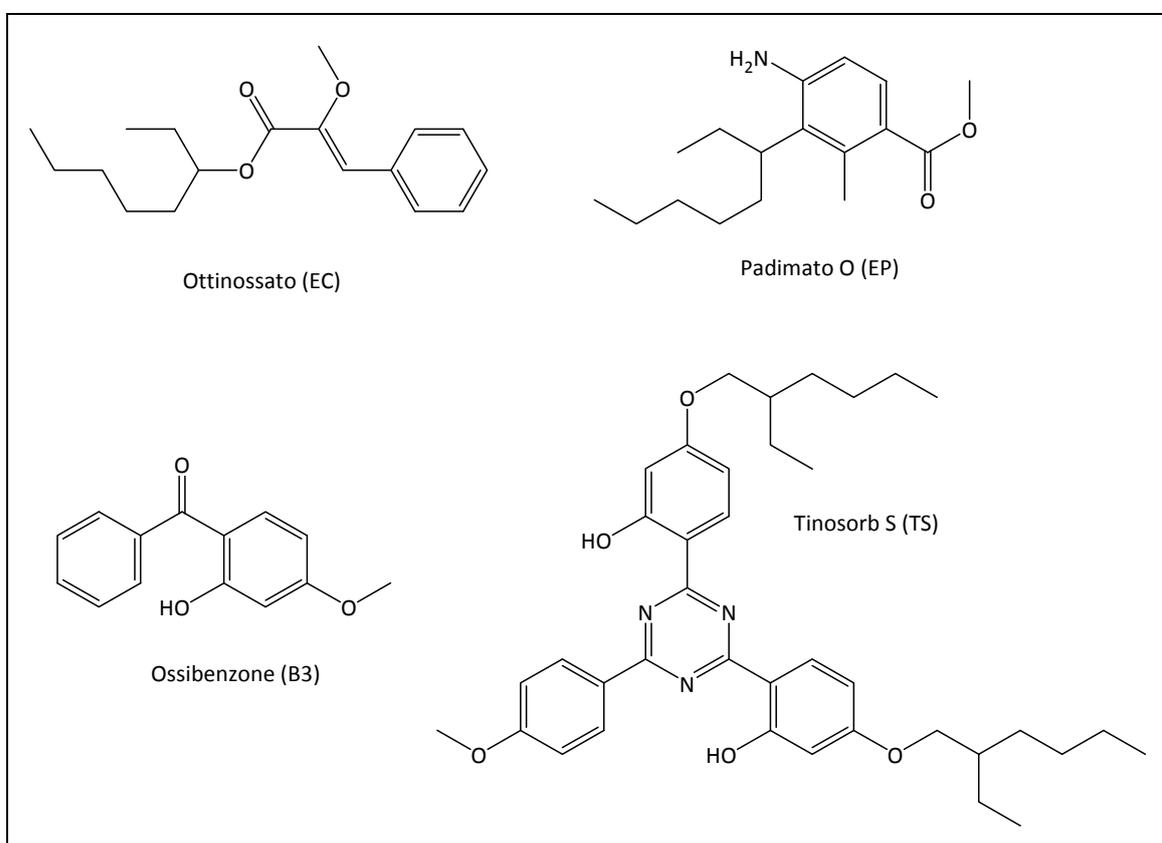


Figura 3.20. Formule di struttura di alcuni additivi utilizzati per la produzione di creme solari.

EC, EP e B3 sono stati forniti dalla Revivre Italia S. P. A. (Bassano del Grappa, Italia). Gli spettri UV/VIS, utilizzati per calcolare il fattore SPF, sono riportati in Figura 3.21.

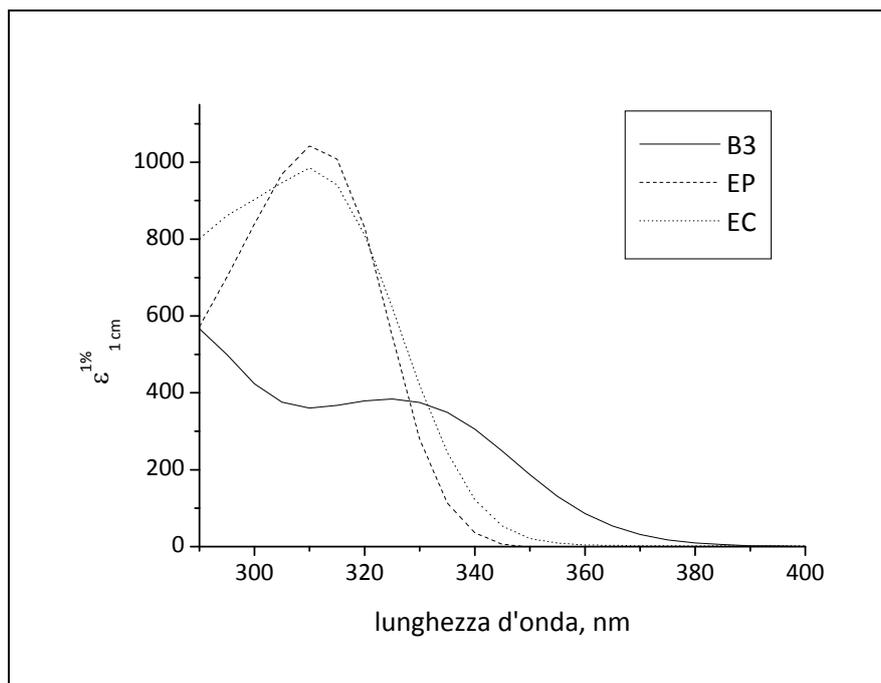


Figura 3.21. Spettri UV/VIS di alcune sostanze utilizzate come additivi in creme solari. B3: Ossibenzone; EP: Padimato O; EC: Ottinossato.  $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$ : assorbanza specifica (concentrazione 1% w/v; cammino ottico 1 cm).

Il valore di SPF di TS viene ricavato utilizzando il simulatore di protezione solare della CIBA [74]. In Figura 3.22 e Tabella 3.16 si riportano i valori di concentrazione di ciascuna sostanza necessari per ottenere un valore di SPF pari a 20, corrispondente ad un protezione solare media.

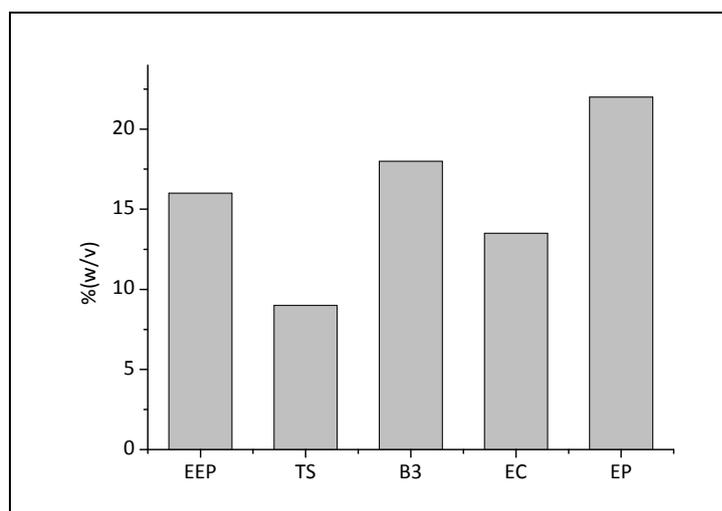


Tabella 3.16. Concentrazione (% w/v) di alcuni composti necessaria per ottenere SPF = 20. EEP: estratto etanolico di propoli; TS: Tinosorb S; B3: Ossibenzone; EC: Ottinossato; EP: Padimato O.

sostanza	Conc (%w/v)
EEP	16
TS	9.0
B3	18
EC	14
EP	22

Figura 3.22. Concentrazione (% w/v) di alcuni composti necessaria per ottenere SPF = 20. EEP: estratto etanolico di propoli; TS: Tinosorb S; B3: Ossibenzone; EC: Ottinossato; EP: Padimato O.

Il grafico di Figura 3.22 mostra che la concentrazione di propoli necessaria per ottenere una buona protezione solare è in linea con i valori calcolati per le altre sostanze, risultando addirittura inferiore rispetto a B3 ed EP.

I risultati ottenuti *in vitro* identificano il propoli come un possibile ingrediente nella preparazione di protettivi solari. Questo prodotto naturale unisce infatti alla funzione protettiva nei confronti dei raggi UV, superiore rispetto ad alcuni composti utilizzati nell'industria cosmetica, l'azione antiossidante, data dal suo elevato contenuto di polifenoli. È di fondamentale importanza lo studio di prodotti naturali caratterizzati da un elevato SPF che possano sostituire gli additivi di sintesi, considerato che TiO<sub>2</sub>, generalmente aggiunto a creme protettive solari per raggiungere un elevato SPF, a certe condizioni può generare radicali liberi [75].



## 4 - Proprietà antiossidanti di frutta tropicale -

### 4.1 Introduzione

I frutti tropicali analizzati sono sia frutti originari del Brasile, che frutti di origine estera, ma ormai coltivati comunemente all'interno del territorio brasiliano. In Tabella 4.1 viene presentato l'elenco dei frutti oggetto di questo lavoro: viene riportato il nome scientifico binomiale, il nome comunemente utilizzato in Brasile, in lingua portoghese e, per una maggiore comprensione, anche i nomi in lingua inglese ed italiana. In Italia, la maggior parte dei frutti è comunemente chiamata con il nome brasiliano, tranne i più noti mango e avocado, che mantengono il nome inglese. Si riporta inoltre la zona di origine del frutto.

Tabella 4.1. Nome binomiale, brasiliano, inglese ed italiano di alcuni frutti tropicali; luogo d'origine dei frutti.

<i>Nome binomiale</i>	<i>Portoghese</i>	<i>Inglese</i>	<i>Italiano</i>	<i>Origine</i>
<i>Persea Americana</i>	Abacate	Avocado	Avocado	America Latina
<i>Averrhoa Carambola</i>	Carambola	Starfruit	Carambola	Asia, sudest
<i>Annona Muricata</i>	Graviola	Graviola, Soursop	Graviola	America Centrale
<i>Solanum Paniculatum</i>	Jurubeba	Jurubeba	Jurubeba	Brasile, zone tropicali
<i>Mangifera Indica</i>	Manga	Mango	Mango	Asia, sudest
<i>Caryocar Brasiliense</i>	Pequi	Pequi, Souari nut	Pequi	Brasile, cerrado
<i>Hylocereus undatus</i>	Pitaya	Pitaya, Pitahaya, Dragon fruit	Pitaya	America Centrale e Meridionale
<i>Spondias Purpurea</i>	Siriguela	Purple Mombin	Siriguela	America Centrale
<i>Tamarindus Indica</i>	Tamarindo	Tamarindo, Tamarind	Tamarindo	Africa tropicale
<i>Spondias Tuberosa</i>	Umbu	Umbu, Imbu, Brazil Plum	Umbu	Brasile, Nordest

#### 4.1.1 CARATTERISTICHE DEI FRUTTI ANALIZZATI

Alcuni dei frutti tropicali analizzati sono piuttosto comuni e ampiamente distribuiti sia nelle zone tropicali che non, come mango e avocado; altri, invece, sono tipici di ristrette zone del Brasile, poco

diffusi già all'interno del paese e per questo motivo meno noti e studiati. Nei paragrafi successivi si descrivono i vari frutti analizzati, la loro origine, i loro usi e proprietà.

#### **4.1.1.1 AVOCADO**

L'avocado (Figura 4.1-a) è un frutto a forma di pera, con la buccia generalmente verde scuro, ma che può essere anche giallo-verde, porpora rossastra o porpora così scuro da sembrare nera; talvolta è maculata con piccoli puntini gialli. A seconda delle specie la buccia può essere liscia o ruvida, lucida o opaca, sottile o più resistente. La polpa è molto chiara e burrosa. Il frutto contiene all'interno un solo grosso seme, rotondo o ovoidale, duro e pesante, di color avorio, chiuso all'interno di un guscio marrone e molto sottile.

L'avocado ha avuto probabilmente origine in Messico, ma era estesamente coltivato in America Latina molto prima dell'arrivo degli Europei. Successivamente è stato esportato in tutte le zone tropicali e subtropicali del mondo, che avessero condizioni climatiche adatte alla sua coltivazione. Al giorno d'oggi l'avocado è coltivato negli Stati Uniti, nell'America Tropicale, in Polinesia e nelle Filippine, in Australia e Nuova Zelanda e anche in alcune zone meridionali dell'Europa, come il sud della Spagna e della Francia, in Sicilia e nell'Africa Tropicale [76].

L'avocado è sempre stato considerato un frutto salutare, da inserire in una dieta sana, a causa del suo basso apporto calorico, quantità di sodio e grassi. Inoltre nel frutto sono stati identificati almeno venti nutrienti essenziali e composti fitochimici potenzialmente chemo-preventivi [77].

#### **4.1.1.2 CARAMBOLA**

La carambola (Figura 4.1-b) è un frutto appariscente, oblungo e caratterizzato longitudinalmente da 5 o 6 angoli, cosicché tagliato in sezione assume la forma di una stella, da cui il nome inglese *starfruit*. La buccia è fina, di colore giallo-arancione; la polpa è succosa e giallo vivo [76].

La carambola è originaria dell'Asia sudorientale; è coltivata in molte zone tropicali e subtropicali come Taiwan, Brasile, Thailandia, Malesia, Indonesia, India ed il sud-est della Cina [78]. È stata introdotta in Brasile all'inizio del XIX secolo, dove è ampiamente coltivata in frutteti domestici ed in scala limitata per fini commerciali [79]. È inoltre coltivata in altri paesi, come India, Indonesia, Sri Lanka e nelle regioni tropicali dell'America.

La carambola viene consumata in varie forme: al naturale ed in insalata; viene inoltre utilizzata per fare succhi, dolci, salse e marmellate [76]. Le sue proprietà sono studiate da molto tempo; possiede proprietà antiossidanti e viene raccomandata come diuretico e come calmante per la tosse; sembra però che inibisca alcuni tipi di citocromo P450 [80] e pare contenga delle neurotossine che possono causare complicazioni neurologiche in pazienti con problemi renali cronici [78].

#### **4.1.1.3 GRAVIOLA**

La graviola (Figura 4.1-c) è un frutto ovale, coperto da una pelle di colore verde, da cui sporgono delle punte morbide e arrotondate. La polpa è color crema, molto succosa e ricca di semi [76], spesso usata per succhi, gelati o dolci.

La graviola è originaria delle Antille [79]; si trova principalmente nelle regioni nord e nord-orientali del Brasile, ma è ben distribuita in tutte le regioni tropicali del pianeta. Il frutto e le foglie

sono usate in medicina naturale per le loro proprietà sedative ed è stato dimostrato che possiedono proprietà antidepressive [81].

#### **4.1.1.4 JURUBEBA**

La jurubeba (Figura 4.1-d) è una pianta medicinale comune in quasi tutto il Brasile, in particolare nelle zone tropicali. È largamente utilizzata nella medicina popolare brasiliana come trattamento nei disturbi gastrointestinali e del fegato; l'infuso ricavato dalle foglie della pianta è utilizzato sin dall'antichità come rimedio naturale per le sue proprietà diuretiche, antianemiche e stimolanti dell'appetito. Il frutto si trova sotto forma di grappoli, con piccoli acini verdi, simili come consistenza a quelli dell'uva: la buccia è lucida e compatta; la polpa è fibrosa, dal sapore molto acido. Il frutto è stato poco studiato, ma è stata dimostrata la sua capacità stimolante degli acidi gastrici [82].

#### **4.1.1.5 MANGO**

Il mango (Figura 4.1-e) è il più comune e conosciuto frutto tropicale. È generalmente rotondo, ovale o ovoidale; vi è molta variabilità nella forma, colore, grandezza e gusto del frutto, variando la specie. La buccia è resistente, cerosa, liscia, piuttosto spessa ed aromatica e può variare dal verde, chiaro o scuro, al giallo, giallo-arancione o rosa-rossastro; può essere inoltre caratterizzata da puntini chiamate lenticelle di colore rosso, chiaro o scuro, porpora, gialle o verdi.

Il mango è nativo del sud-est dell'Asia e viene coltivato già dall'antichità; si ritiene sia stato introdotto in Brasile dai portoghesi nel XVI secolo [76]. Sono state dimostrate le sue proprietà antiossidanti e anticancerogene, probabilmente dovute alla densità di composti fitochimici presenti, come polifenoli, carotenoidi e agenti antimutagenici [83].

#### **4.1.1.6 PEQUI**

Il pequi (Figura 4.2-a) è un frutto caratterizzato da una buccia di colore verde o marrone-verdastro; la polpa, che è la parte commestibile del frutto, può essere bianca o gialla. All'interno vi è una parte spinosa che protegge il seme. Il pequi è coltivato in tutto il *cerrado* brasiliano, che comprende gli stati di Parà, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Minas Gerais e Paraná, e nel nord-est, negli stati di Piauí, Ceará e Maranhão. Lo Stato di Minas Gerais è il principale produttore e consumatore di pequi. La polpa è utilizzata nella preparazione di piatti diversi, principalmente serve da accompagnamento a riso, pollo o fagioli. Il seme interno viene utilizzato come ingrediente per dolci oppure può essere consumato come snack salato. La polpa di pequi è ricca di polifenoli e carotenoidi [84].

#### **4.1.1.7 PITAYA**

La pitaya (Figura 4.2-b) è un frutto nativo del Messico e dell'America Centrale e Meridionale, molto popolare in diversi paesi dell'Asia. La pitaya è presente sotto forma di diverse specie che si differenziano per il colore della buccia e/o della polpa: la pitaya rossa, la più comune (*Hylocereus undatus*), ha la buccia rossa e la polpa bianca. Viene chiamata anche pitaya bianca in Brasile ed in Asia è conosciuta come frutto del drago, a causa della sua buccia rosso acceso con piccole lingue verdi che ricoprono il frutto [85]. La polpa può essere anche di colore rosso acceso (*Hylocereus lemairei*); tra le specie più importanti è presente anche la pitaya gialla (*Selenicereus megalanthus*) con la buccia gialla e la polpa bianca [79]. Tutti i frutti contengono nella polpa dei piccoli semi. La pitaya è nota per il suo effetto diuretico e lassativo.

#### **4.1.1.8 SIRIGUELA**

La siriguela (Figura 4.2-c) è un piccolo frutto, simile ad una prugna, che nasce singolarmente o in gruppo di due o tre e può essere porpora, rosso, arancione o giallo. La buccia è lucida e compatta; la polpa è gialla, fibrosa, dal sapore acidulo. La siriguela è nativa dell'America Centrale. Viene coltivata nella zona compresa tra il sud del Messico ed il nord di Perù e Brasile, ma vi cresce anche spontaneamente. In Messico il frutto è utilizzato come diuretico e antispasmodico; lo sciroppo ricavato dal frutto è utilizzato contro la diarrea cronica; è stato dimostrato inoltre che l'estratto alcolico delle foglie di siriguela ha un'elevata azione antibatterica [76].

#### **4.1.1.9 TAMARINDO**

Il tamarindo (Figura 4.2-d) è un frutto simile ad un fagiolo. Il baccello può essere marrone-cannella o tendente al marrone grigiastro e inizialmente contiene semi verdi e teneri; quando giunge a maturazione la polpa diventa marrone o rossastra e la buccia friabile. I semi completamente formati sono resistenti, marroni e ricoperti da una membrana.

Il tamarindo è nativo dell'Africa tropicale, ma fu introdotto in tempi così antichi nelle Indie che inizialmente si pensava che fosse di origine indiana. Il nome "tamarindo" fu infatti introdotto dagli Arabi che lo chiamavano "*tamar hindi*" (dattero indiano). È stato inoltre introdotto in America tropicale, alle Bermuda e alle Bahamas.

Il frutto del tamarindo viene mangiato in molti modi diversi, a seconda delle zone: in India i semi ancora immaturi e verdi vengono cucinati con riso, carne o pesce; la polpa è un importante ingrediente per fare salse; spesso viene zuccherata ed utilizzata per produrre confetture. In Brasile la polpa viene conservata per utilizzarla in bevande calde, salse per carne o semplici torte. Gli usi medicinali del tamarindo sono moltissimi: preparazioni a base di tamarindo sono ufficialmente riconosciute come refrigeranti in caso di febbre e come lassative. Da sola o in combinazione con succo di limone, miele, latte o datteri la polpa è considerata efficace come digestivo e come rimedio in caso di disordini della bile o di scorbuto. Nella medicina popolare la polpa è anche applicata sulle infiammazioni o come unguento per i reumatismi [76]. Sono state inoltre dimostrate le sue proprietà analgesiche [86] e sembra che una dieta ricca di tamarindo influisca sull'assorbimento del colesterolo [87].

#### **4.1.1.10 UMBU**

L'umbu (Figura 4.2-e) è un frutto in genere ovale, giallo verdastro, con la buccia abbastanza spessa e la polpa morbida [76]. L'albero dell'umbu, *l'umbuzeiro*, è nativo della regione semiarida del Nordest brasiliano [79]. Il nome deriva dalla parola "y-m-bu", che significa "albero che dà da bere". Il frutto viene consumato al naturale oppure utilizzato per la preparazione di bevande, gelati e dolci [88].

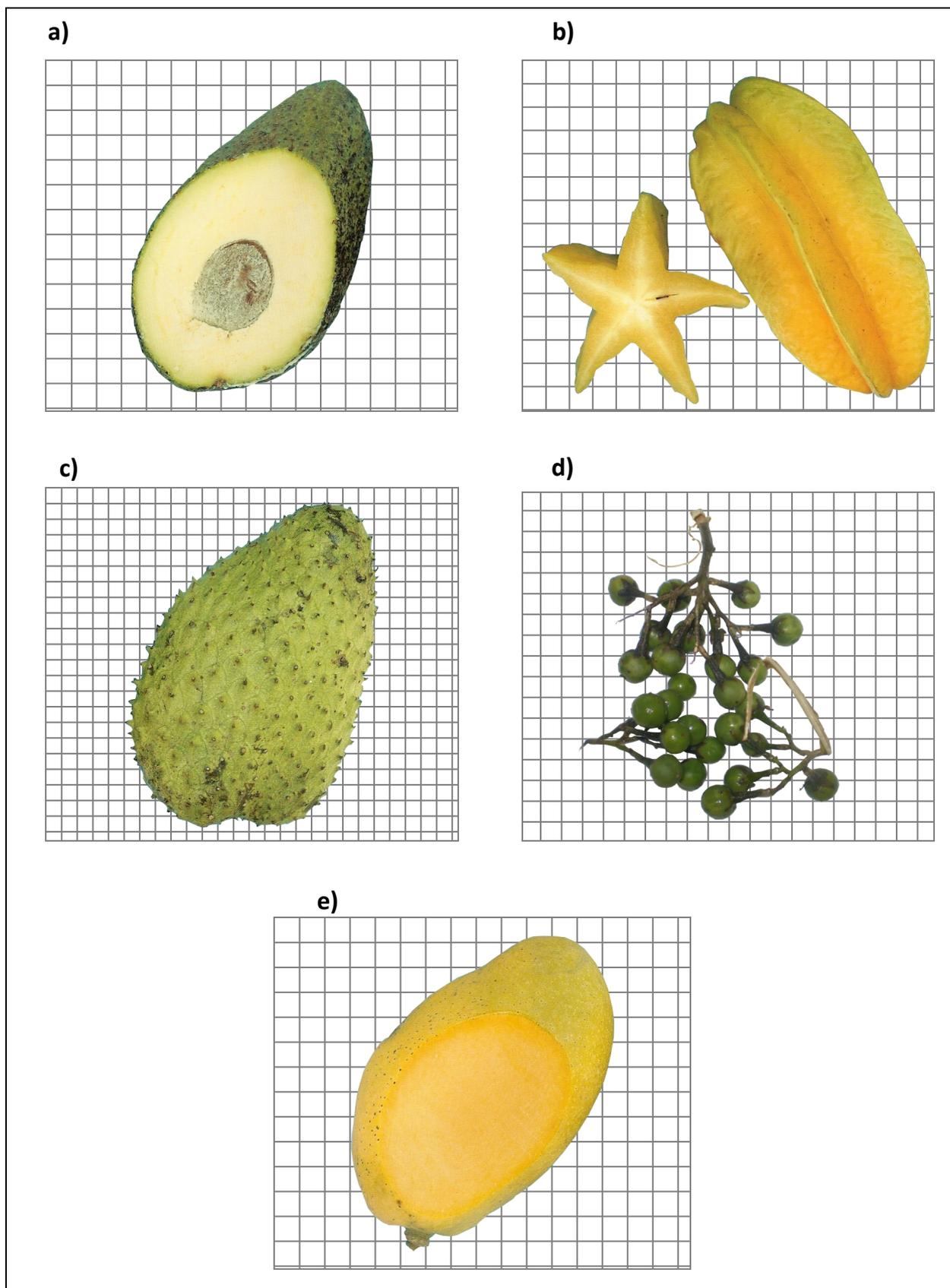


Figura 4.1. a) Avocado (*Persea Americana*) [76]; b) Carambola (*Averrhoa Carambola*) [76]; c) Graviola (*Annona Muricata*) [76]; d) Jurubeba (*Solanum Paniculatum*); e) Mango (*Mangifera Indica*) [76]. Ogni riquadro della griglia corrisponde ad un  $\text{cm}^2$ .

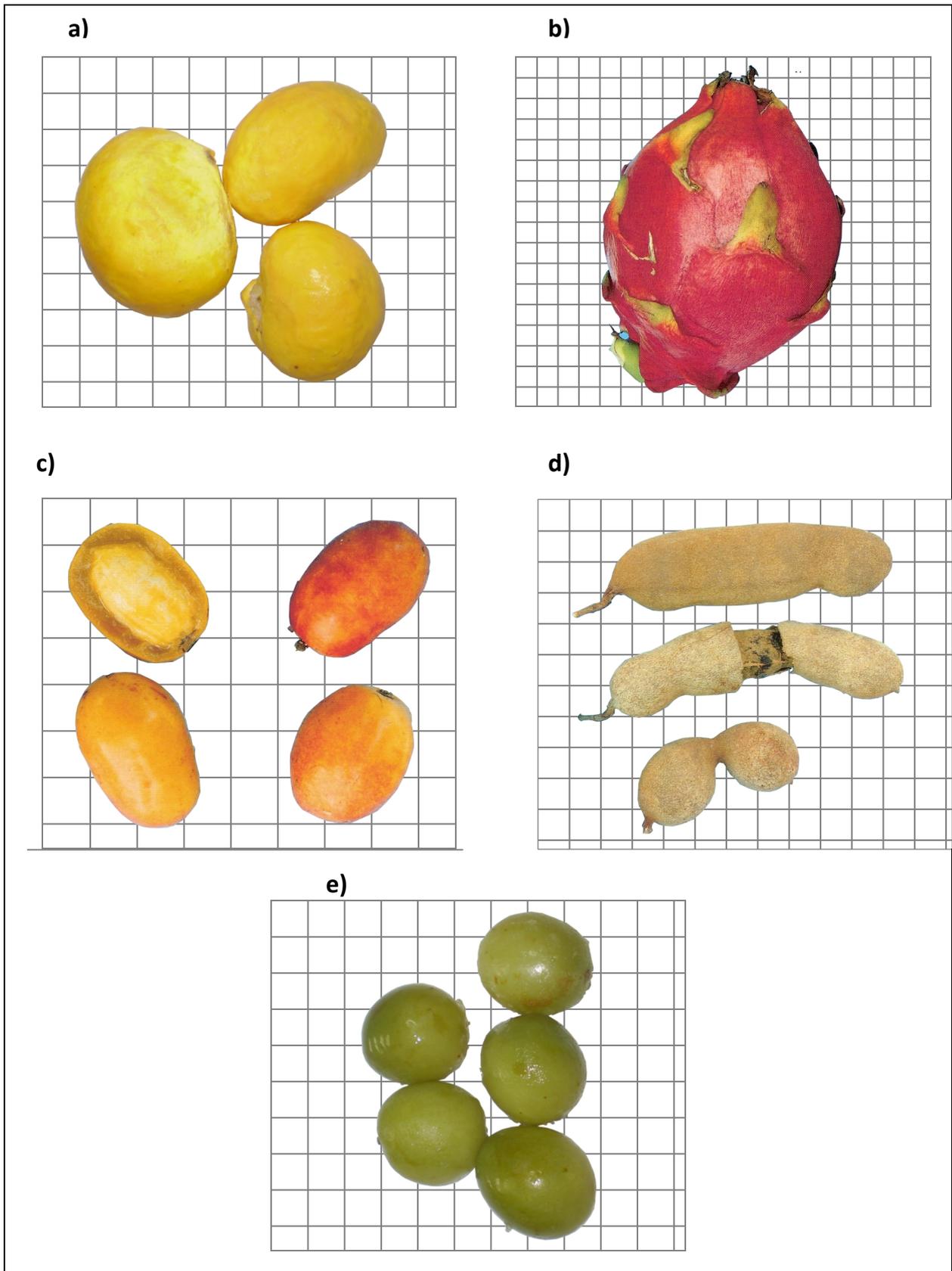


Figura 4.2. a) Pequi (*Caryocar Brasiliense*); b) Pitaya (*Hylocereus undatus*) [76]; c) Siriguela (*Spondias Purpurea*) [76]; d) Tamarindo (*Tamarindus Indica*) [76]; e) Umbu (*Spondias Tuberosa*). Ogni riquadro della griglia corrisponde ad un cm<sup>2</sup>.

#### **4.1.2 STATO DELL'ARTE SULLE PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI**

Non sono molto note le proprietà nutrizionali dei frutti tropicali, in particolare delle specie più esotiche. Sembra però che i frutti nativi brasiliani abbiano un'alta capacità antiossidante e buone quantità di flavonoidi e vitamina C [89]; in particolare viene sottolineato l'elevato potere antiossidante e contenuto di polifenoli della carambola [90].

I frutti più comuni, come mango e avocado sono già stati estesamente studiati, sia per quanto riguarda la capacità antiossidante, che per altre proprietà, ad esempio le potenzialità come anticancerogeni [77, 83]. Nel mango è stato già valutato il potere antiossidante, il contenuto di polifenoli, la composizione nelle diverse varietà del frutto [91]; l'avocado è meno studiato, ma sono comunque presenti informazioni in letteratura sulle sue proprietà antiossidanti e composizione, anche in rapporto alle diverse metodologie di conservazione [92]. Sono presenti in letteratura anche carambola, graviola e tamarindo, anche se la maggior parte delle informazioni riguardano proprietà diverse da quelle antiossidanti. Solo per mango e avocado è già stato applicato in passato il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica per la valutazione del potere antiossidante.

Nei pochi lavori disponibili in cui viene analizzato il potere antiossidante di frutti tropicali [89, 90, 93] sono praticamente assenti umbu, pitaya, jurubeba, siriguela e pequi: appare quindi interessante, data la scarsità di informazioni su questo argomento, analizzare in particolare il potere antiossidante di questi frutti.

### **4.2 Risultati**

#### **4.2.1 CAMPIONI DI FRUTTA**

I campioni analizzati sono i frutti di Tabella 4.1; nel caso del mango sono stati scelti tre diversi tipi: Haden, Tommy Atkins e Palmer. Mango, avocado, carambola e pitaya sono stati facilmente reperiti, in quanto presenti anche nello stato di São Paulo; jurubeba, umbu, graviola, pequi, siriguela, tamarindo e umbu ci sono stati recapitati direttamente dalle zone tropicali in cui sono diffusi.

Di tutti i frutti è stato fatto il succo utilizzando un frullatore. Dopo aver eliminato le parti solide residue la sospensione è stata filtrata e centrifugata fino ad ottenere una soluzione limpida.

#### **4.2.2 POTERE ANTIOSSIDANTE**

Per la valutazione del potere antiossidante viene applicato il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS ed il parametro ricavato viene considerato un riferimento per i risultati ottenuti con altri saggi. Le condizioni utilizzate vengono riportate nel paragrafo 2.3.1. Il valore di  $IC_{50}$  ricavato è espresso in parti per milione di frutto (ppm). I risultati vengono riportati in Tabella 4.2 e Figura 4.3.

Tabella 4.2. Potere antiossidante dei campioni di frutta tropicale, misurato con il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS ed espresso in IC<sub>50</sub> (ppm).

<i>campione</i>	<i>IC<sub>50</sub> (ppm)</i>	<i>campione</i>	<i>IC<sub>50</sub> (ppm)</i>
<b>Avocado</b>	240±20	<b>Mango Tommy Atkins</b>	300±20
<b>Carambola</b>	70±7	<b>Pequi</b>	500±50
<b>Graviola</b>	87±9	<b>Pitaya</b>	1000±100
<b>Jurubeba</b>	60±8	<b>Siriguella</b>	44±4
<b>Mango Haden</b>	200±20	<b>Tamarindo</b>	100±20
<b>Mango Palmer</b>	240±20	<b>Umbu</b>	500±30

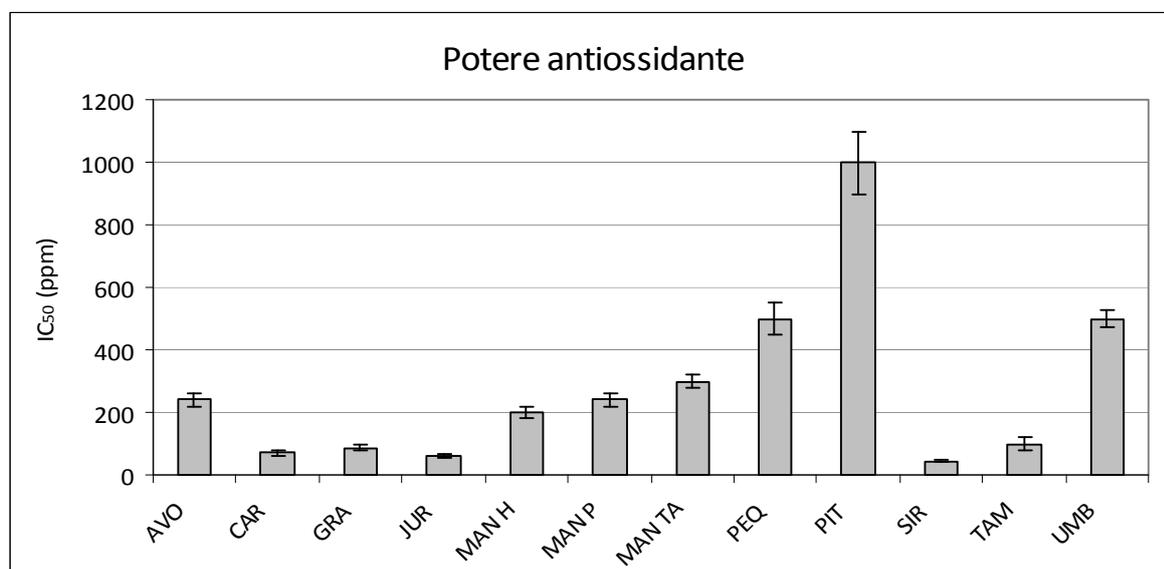


Figura 4.3. Potere antiossidante, misurato attraverso il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS, dei campioni di frutta tropicale. AVO: avocado; CAR: carambola; GRA: graviola; JUR: jurubeba; MAN H: mango Haden; MAN P: mango Palmer; MAN TA: mango Tommy Atkins; PEQ: pequi; PIT: pitaya; SIR: siriguella; TAM: tamarindo; UMB: umbu.

Si osserva che carambola, graviola, jurubeba, siriguella e tamarindo evidenziano un IC<sub>50</sub> inferiore a 100 ppm, indice di un elevato potere antiossidante. Si tratta di quei frutti che, tra l'altro, non sono particolarmente noti per le loro proprietà antiossidanti, ma mostrano una capacità di inibizione della perossidazione lipidica più elevata del mango, frutto comunemente considerato antiossidante [83]. Jurubeba e siriguella, in particolare, che mostrano la più elevata capacità antiossidante rispetto a tutti gli altri frutti, sono proprio quelli che non sono mai stati studiati per il loro potere antiossidante. Questo risultato assume quindi notevole importanza, in quanto si tratta del primo studio in assoluto su frutti che, inaspettamente, dimostrano di essere molto attivi *in vitro* nel contrastare l'effetto dei radicali liberi.

Per confermare tali risultati si applicano sugli stessi frutti tre metodi spettrofotometrici:

- a) il metodo di Folin-Ciocalteu, per valutare il potere riducente;
- b) il metodo DPPH, per valutare la capacità di *scavenger*;

c) il metodo enzimatico, per valutare il contenuto di polifenoli totali.

Le condizioni utilizzate nell'applicazione dei tre metodi sono riportate rispettivamente nei paragrafi 2.3.2, 2.3.3 e 2.3.4. I risultati sono espressi come Catechina Equivalente e riferiti al frutto tal quale.

Tabella 4.3. Potere riducente, capacità di *scavenger* e contenuto totale di polifenoli dei campioni di frutta tropicale, misurati rispettivamente con il metodo Folin-Ciocalteu, DPPH ed enzimatico, espressi come mM CE.

<i>campione</i>	<i>Potere riducente CE (mM)</i>	<i>Capacità di scavenger CE (mM)</i>	<i>Contenuto totale di polifenoli - CE (mM)</i>
<b>Avocado</b>	1.99±0.04	N.D.	1.06±0.05
<b>Carambola</b>	10.5±0.1	2.5±0.1	5.4±0.4
<b>Graviola</b>	8.6±0.4	2.4±0.6	3.7±0.5
<b>Jurubeba</b>	36±2	0.9±0.3	7.8±0.5
<b>Mango Haden</b>	5.7±0.2	0.31±0.05	0.75±0.09
<b>Mango Palmer</b>	4.5±0.3	0.89±0.01	1.21±0.05
<b>Mango Tommy Atkins</b>	1.4±0.1	0.50±0.07	0.15±0.03
<b>Pequi</b>	7.9±0.2	N.D.	0.5±0.1
<b>Pitaya</b>	2.1±0.2	N.D.	1.6±0.2
<b>Siriguela</b>	34±5	8±1	3.2±0.1
<b>Tamarindo</b>	18.5±0.8	2.4±0.3	2.9±0.1
<b>Umbu</b>	4.2±0.1	0.67±0.05	1.4±0.2

N.D. = non determinato: il valore è al di sotto del limite di rilevabilità.

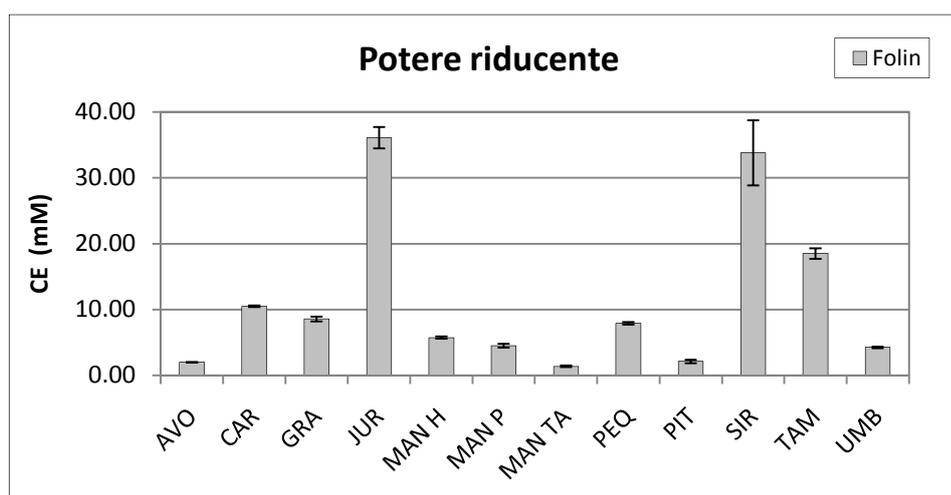


Figura 4.4. Potere riducente dei campioni di frutta tropicale, misurato con il metodo di Folin-Ciocalteu. AVO: avocado; CAR: carambola; GRA: graviola; JUR: jurubeba; MAN H: mango Haden; MAN P: mango Palmer; MAN TA: mango Tommy Atkins; PEQ: pequi; PIT: pitaya; SIR: siriguela; TAM: tamarindo; UMB: umbu.

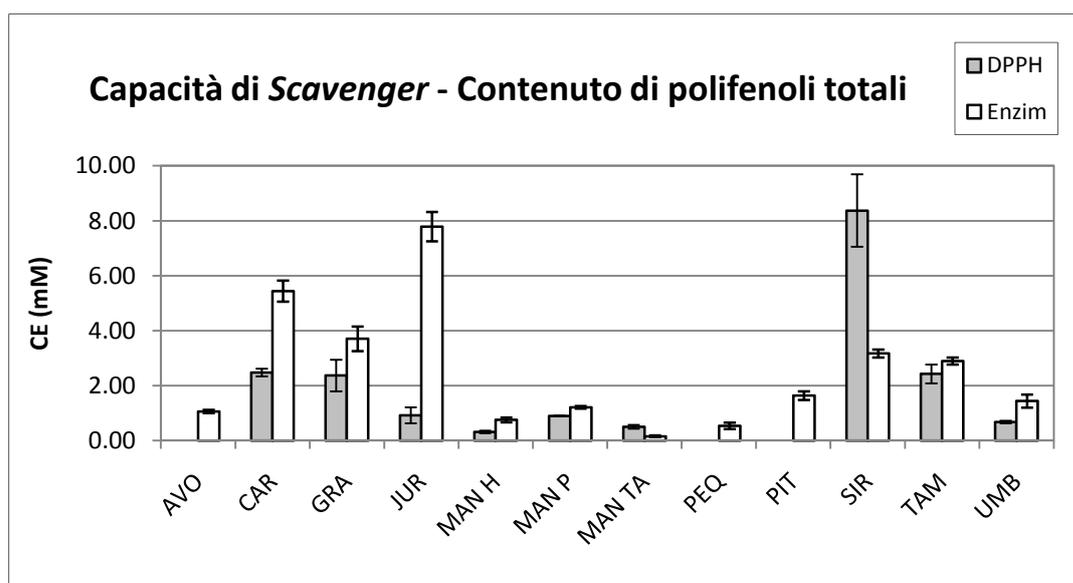


Figura 4.5. Capacità di *scavenger* e contenuto di polifenoli totali dei campioni di frutta tropicale, misurati rispettivamente con i metodi DPPH ed enzimatico. AVO: avocado; CAR: carambola; GRA: graviola; JUR: jurubeba; MAN H: mango Haden; MAN P: mango Palmer; MAN TA: mango Tommy Atkins; PEQ: pequi; PIT: pitaya; SIR: siriguella; TAM: tamarindo; UMB: umbu.

I metodi spettrofotometrici confermano i risultati ottenuti con il metodo IPL, in particolare evidenziano per jurubeba e siriguella un elevato potere riducente, un buon contenuto di polifenoli e capacità di *scavenger*. Nonostante differenze tra l'ordine dei diversi frutti, tutti i metodi indicano carambola, graviola, jurubeba, siriguella e tamarindo, come frutti caratterizzati da elevate proprietà antiossidanti, così come risulta anche dal metodo IPL.

#### 4.2.3 CONTENUTO DI ACIDO ASCORBICO

Il contenuto di vitamina C nella frutta è generalmente più studiato rispetto al potere antiossidante; nonostante ciò, per alcuni dei dieci frutti presi in considerazione, le informazioni quantitative su questo nutriente sono scarse. Vengono quindi analizzati i dieci frutti di Tabella 4.1 per valutare il contenuto di acido ascorbico, applicando il metodo della dinitrofenilidrazina (DNPH). Le condizioni sperimentali utilizzate sono riportate nel paragrafo 2.3.8. I risultati ottenuti vengono riportati in Tabella 4.4 e Figura 4.6.

Tabella 4.4. Contenuto di acido ascorbico dei campioni di frutta brasiliana, misurato con il metodo DNPH ed espresso in mM.

<i>campione</i>	<i>[vitC], mM</i>	<i>campione</i>	<i>vitC], mM</i>
<b>Avocado</b>	3.1±0.2	<b>Mango Tommy Atkins</b>	3.7±0.6
<b>Carambola</b>	4.2±0.3	<b>Pequi</b>	2.4±0.3
<b>Graviola</b>	4.7±0.2	<b>Pitaya</b>	2.6±0.2
<b>Jurubeba</b>	3.4±0.2	<b>Siriguella</b>	4.7±0.3
<b>Mango Haden</b>	8.6±0.8	<b>Tamarindo</b>	7±1
<b>Mango Palmer</b>	5±1	<b>Umbu</b>	1.5±0.2

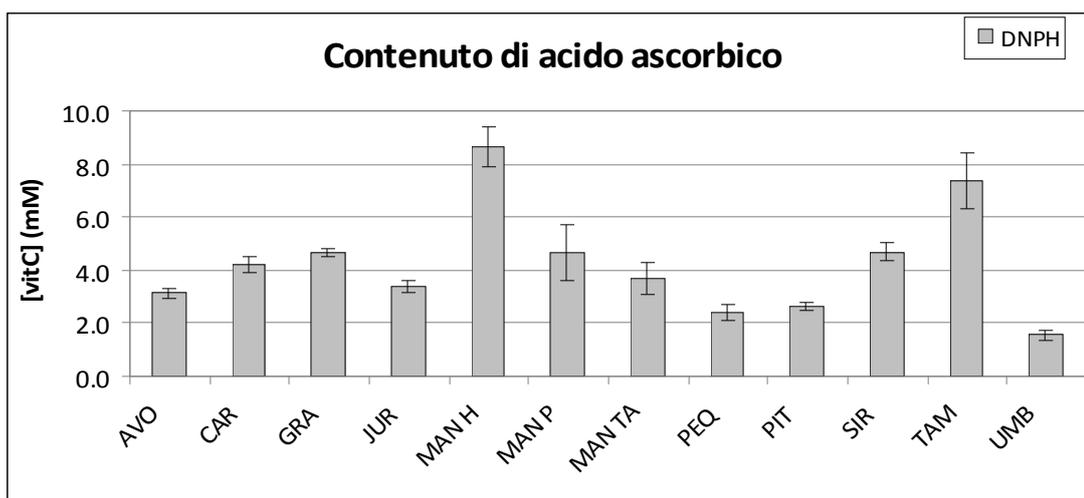


Figura 4.6. Contenuto di acido ascorbico dei campioni di frutta brasiliana, misurato con il metodo DNP ed espresso in mM. AVO: avocado; CAR: carambola; GRA: graviola; JUR: jurubeba; MAN H: mango Haden; MAN P: mango Palmer; MAN TA: mango Tommy Atkins; PEQ: pequi; PIT: pitaya; SIR: siriguela; TAM: tamarindo; UMB: umbu.

Come si può notare dal grafico di Figura 4.6 non ci sono differenze significative tra il contenuto di acido ascorbico dei vari frutti. Sembra non esserci una buona correlazione con il potere antiossidante: il frutto che mostra un maggior contenuto di vitamina C è infatti il mango, che non possiede un elevato potere antiossidante, se paragonato agli altri frutti tropicali; siriguela e jurubeba, che mostrano invece la più alta capacità di inibire la perossidazione lipidica, hanno un contenuto di acido ascorbico che è nella media rispetto agli altri. Il coefficiente di correlazione lineare fra il potere antiossidante, determinato col metodo IPL, ed il contenuto di acido ascorbico, risulta infatti molto basso (Figura 4.7). Conoscere il contenuto di acido ascorbico nei frutti è comunque importante per avere un'idea più completa degli antiossidanti presenti nei campioni.

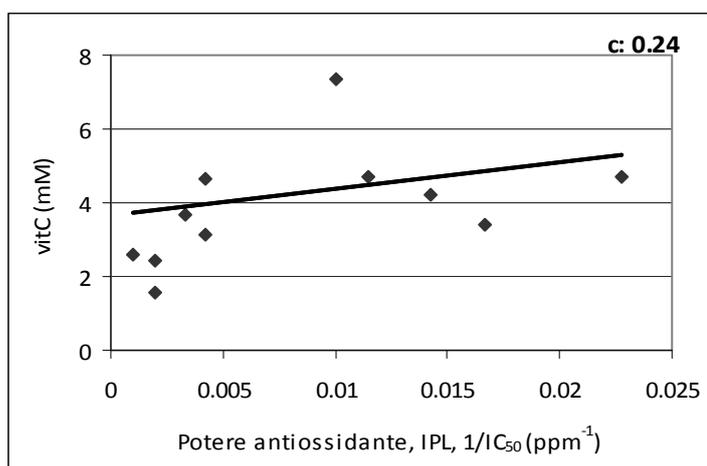


Figura 4.7. Correlazione tra il contenuto di vitamina C ed il potere antiossidante della frutta tropicale.

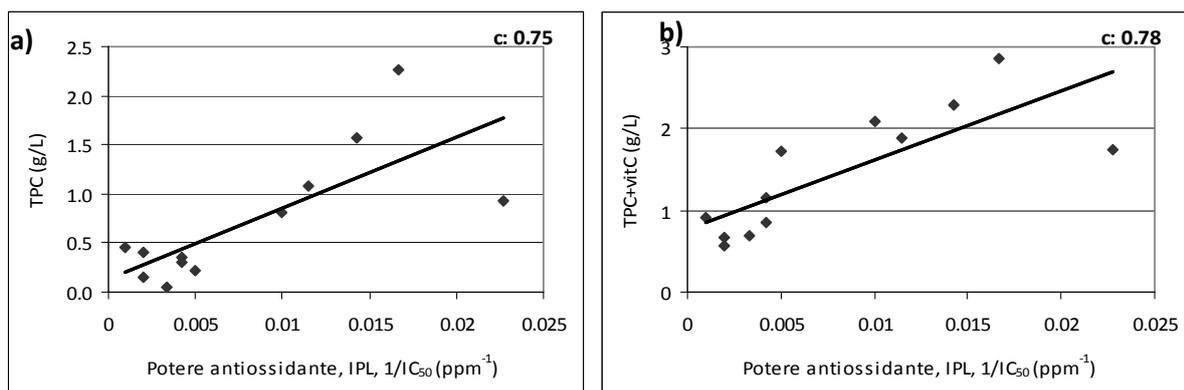


Figura 4.8. Correlazione tra a) Contenuto di polifenoli e potere antiossidante; b) Somma del contenuto di polifenoli e di acido ascorbico e potere antiossidante, relativamente alla frutta tropicale in esame.

La piccola differenza che si osserva tra il valore del coefficiente di correlazione TPC/potere antiossidante in assenza ed in presenza del contenuto di acido ascorbico (0.03) porta alla conclusione che, nonostante l'elevata quantità di vitamina C presente nei frutti, il potere antiossidante viene pressoché totalmente espresso tramite il contenuto di polifenoli.

#### 4.2.4 CONFRONTO DEI RISULTATI CON FRUTTA COMUNE ITALIANA

È stato misurato il potere antiossidante anche di frutta comune, per poter effettuare un confronto con i vari parametri determinati nella frutta tropicale. Ci si è soffermati soprattutto sui frutti di bosco, noti antiossidanti [94]. Come per la frutta tropicale è stato applicato anche in questo caso il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica per la valutazione del potere antiossidante, i metodi spettrofotometrici Folin-Ciocalteau, DPPH ed enzimatico per la valutazione rispettivamente del potere riducente, della capacità di *scavenger* e del contenuto di polifenoli totali ed infine il metodo DNPH per la valutazione del contenuto di acido ascorbico. Le condizioni applicate sono le stesse utilizzate in precedenza e descritte nei paragrafi 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3, 2.3.4 e 2.3.8. Si riportano i risultati ottenuti in Tabella 4.5.

Tabella 4.5. Potere antiossidante, potere riducente, capacità di *scavenger*, contenuto di polifenoli totali e di acido ascorbico di frutta comune delle nostre zone, misurati rispettivamente con i metodi: inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS, Folin-Ciocateau, DPPH, enzimatico e DNPH. IC<sub>50</sub> è espresso in ppm; potere riducente, capacità di *scavenger* e contenuto di polifenoli totali sono espressi in mM CE; il contenuto di acido ascorbico è espresso in mM.

	<b>Potere antiossidante IC<sub>50</sub> (ppm)</b>	<b>Potere riducente CE (mM)</b>	<b>Capacità di scavenger CE (mM)</b>	<b>Contenuto di polifenoli totali CE (mM)</b>	<b>Contenuto di acido ascorbico (mM)</b>
<b>Mora</b>	109±6	8.4±0.1	3.0±0.2	2.66±0.06	4.4±0.6
<b>Lampone</b>	77±9	21±1	4.2±0.1	2.7±0.1	3.7±0.3
<b>Ribes</b>	56±2	10.0±0.1	3.4±0.5	3.87±0.07	4±1
<b>Mirtillo</b>	41±7	7.8±0.5	3.4±0.1	2.8±0.1	3.0±0.1
<b>Fragola</b>	38±4	10±3	4.1±0.3	3.04±0.09	6±1
<b>Fragolina di bosco</b>	81±4	10.4±0.4	4.6±0.5	3.9±0.7	4.6±0.4
<b>Mela</b>	100±20	1.8±0.1	0.21±0.03	1.04±0.06	5.1±0.4
<b>Pera</b>	800±30	0.86±0.03	0.03±0.02	1.0±0.1	1.7±0.2
<b>Arancia</b>	90±8	6.1±0.8	2.7±0.1	6.6±0.8	4±0.5
<b>Limone</b>	141±9	4.6±0.2	4.6±0.2	4.5±0.1	2.16±0.05
<b>Kiwi</b>	270±20	2.5±0.2	1.6±0.1	0.54±0.01	9.3±0.4

I dati ottenuti vengono confrontati con quelli della frutta tropicale (Figura 4.9, Figura 4.10 e Figura 4.11).

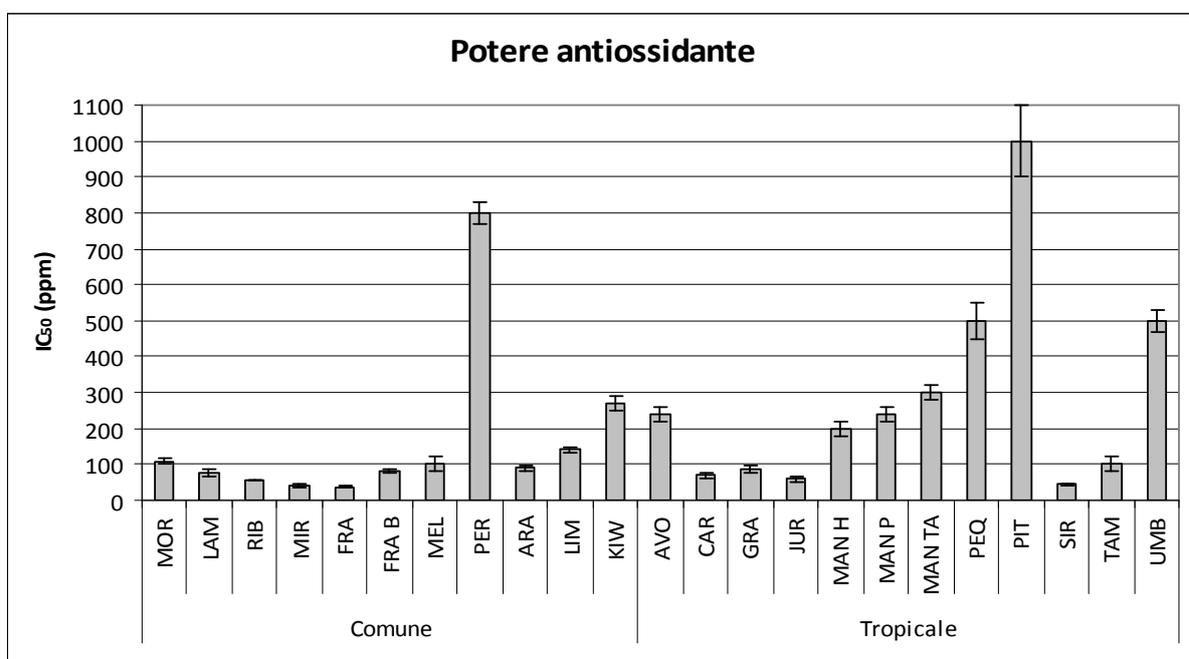


Figura 4.9. Potere antiossidante dei campioni di frutta comune e tropicale, misurato con il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS. Frutta comune: MOR: mora; LAM: lampone; RIB: ribes; MIR: mirtillo; FRA: fragola; FRA B: fragolina di bosco; MEL: mela Stark; PER: pera Williams; ARA: arancia; LIM: limone; KIW: kiwi. Frutta tropicale: AVO: avocado; CAR: carambola; GRA: graviola; JUR: jurubeba; MAN H: mango Haden; MAN P: mango Palmer; MAN TA: mango Tommy Atkins; PEQ: pequi; PIT: pitaya; SIR: siriguella; TAM: tamarindo; UMB: umbu.

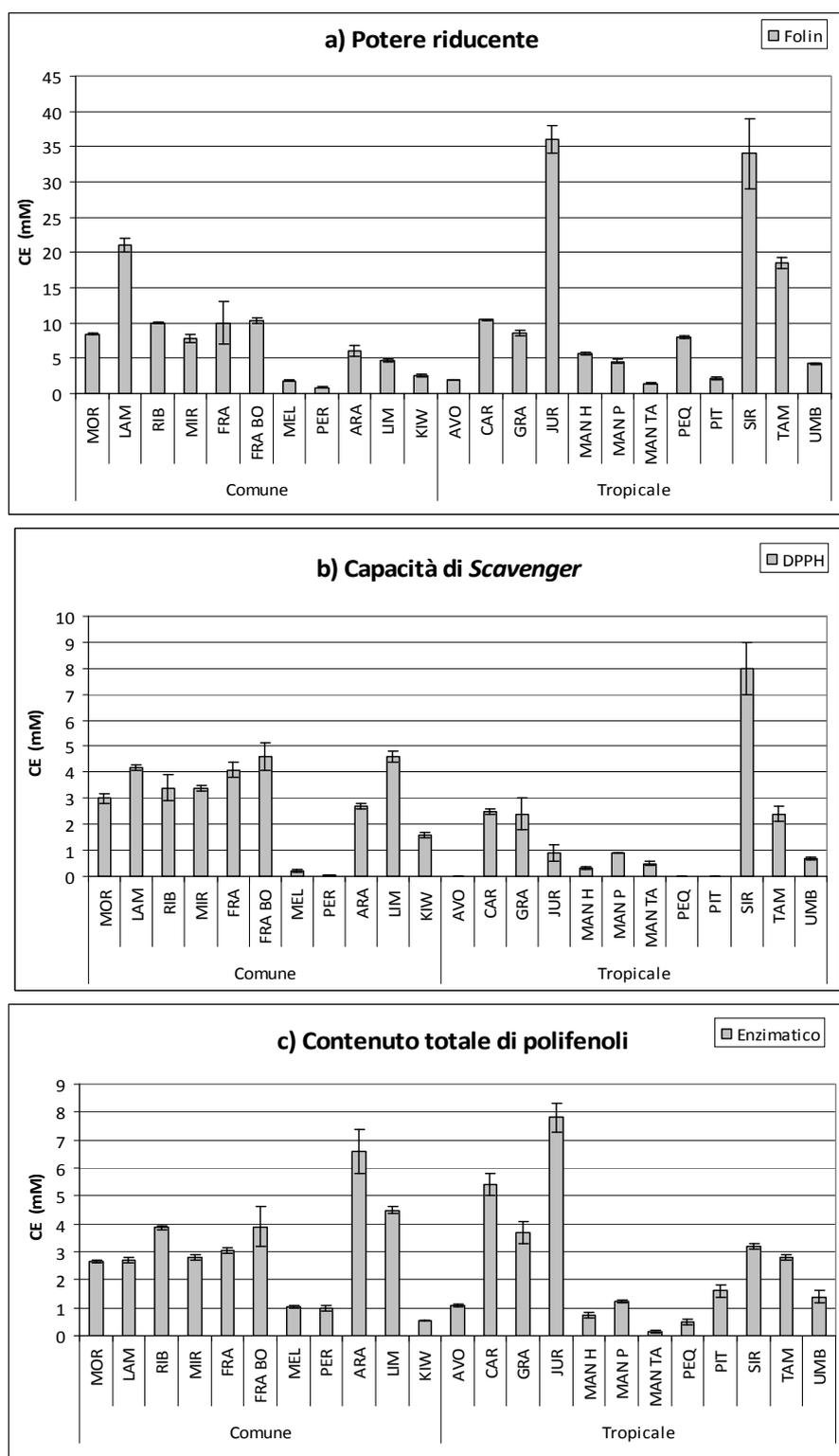


Figura 4.10. a) Potere riducente di campioni di frutta comune e tropicale, misurato con il metodo di Folin-Ciocalteu; b) Capacità di *scavenger*, misurata con il metodo DPPH; c) Contenuto di polifenoli totali, misurato con il metodo enzimatico. Frutta comune: MOR: mora; LAM: lampone; RIB: ribes; MIR: mirtillo; FRA: fragola; FRA B: fragolina di bosco; MEL: mela Stark; PER: pera Williams; ARA: arancia; LIM: limone; KIW: kiwi. Frutta tropicale: AVO: avocado; CAR: carambola; GRA: graviola; JUR: jurubeba; MAN H: mango Haden; MAN P: mango Palmer; MAN TA: mango Tommy Atkins; PEQ: pequi; PIT: pitaya; SIR: siriguella; TAM: tamarindo; UMB: umbu.

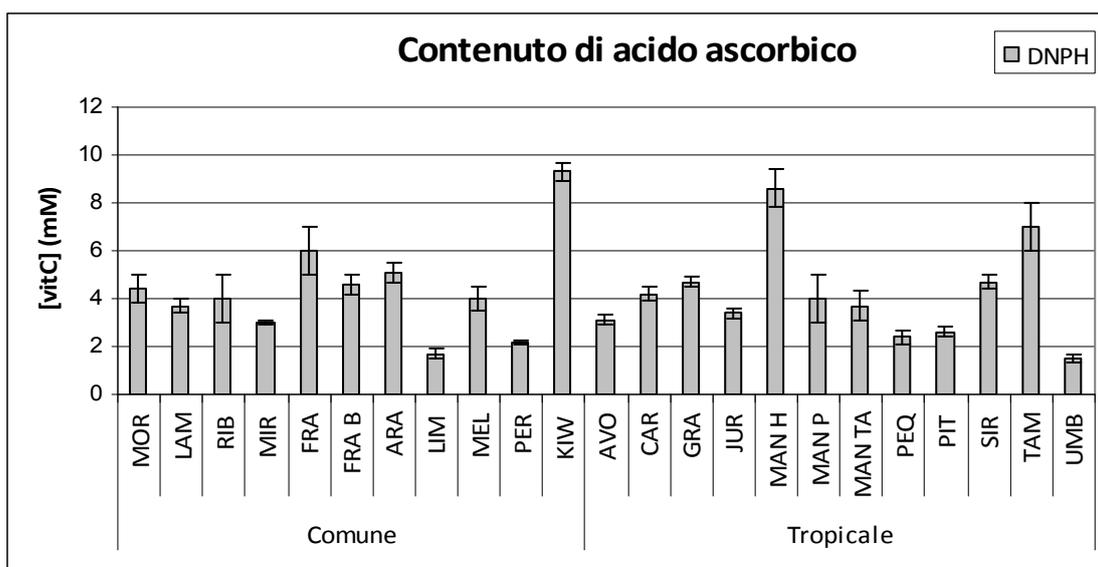


Figura 4.11. Contenuto di acido ascorbico dei campioni di frutta tropicale e comune, misurato con il metodo DNPH. Frutta comune. MOR: mora; LAM: lampone; RIB: ribes; MIR: mirtillo; FRA: fragola; FRA B: fragolina di bosco; MEL: mela Stark; PER: pera Williams; ARA: arancia; LIM: limone; KIW: kiwi. Frutta tropicale. AVO: avocado; CAR: carambola; GRA: graviola; JUR: jurubeba; MAN H: mango Haden; MAN P: mango Palmer; MAN TA: mango Tommy Atkins; PEQ: pequi; PIT: pitaya; SIR: siriguela; TAM: tamarindo; UMB: umbu.

La frutta tropicale, così come quella comune delle nostre zone, ha un'ampia variabilità per quanto riguarda il potere antiossidante, con frutti poco attivi (es. pitaya), intermedi e molto attivi (siriguela, jurubeba, ecc) con un  $IC_{50}$  confrontabile a quello dei frutti di bosco. Le misure effettuate con i metodi spettrofotometrici mostrano addirittura valori più elevati di potere riducente di siriguela e jurubeba rispetto ai frutti di bosco, con questo confermando l'eccezionale potere antiossidante, poco conosciuto, di questi frutti. Così come appare particolarmente elevata la capacità di *scavenger* della siriguela rispetto ai frutti comuni ed il contenuto di polifenoli totali di jurubeba, carambola e graviola, paragonabili a quella degli agrumi.



## 5 - Proprietà antiossidanti dei polifenoli -

---

Dopo aver applicato diversi saggi per la valutazione del potere antiossidante su matrici alimentari, si ritiene opportuno soffermarsi sui singoli polifenoli. È noto che la classe di composti causa del potere antiossidante del propoli siano i polifenoli [64]: si intende verificare quali tra questi siano i più attivi e dunque maggiormente responsabili dell'eccezionale potere antiossidante riscontrato. Parallelamente si utilizzeranno i risultati ottenuti anche per effettuare uno studio sulla struttura chimica dei singoli composti puri al fine di individuare gruppi funzionali e caratteristiche strutturali che rendono efficace la molecola nel bloccare i radicali liberi.

È noto che, tra i polifenoli, le classi più presenti nel propoli siano flavonoidi ed acidi fenolici [53]. Sono stati quindi selezionati, in base all'abbondanza nel propoli e alla disponibilità commerciale, dieci polifenoli, di cui sette flavonoidi e tre derivati dell'acido cinnamico. Come termine di paragone si è studiata la catechina: nonostante non sia presente nel propoli, la catechina è il flavonoide che viene utilizzato come riferimento in tutti i saggi utilizzati, in quanto è largamente presente negli alimenti. Complessivamente i flavonoidi analizzati sono quindi: apigenina, canferolo, catechina, crisina, galangina, naringenina, pinocembrina e quercetina; i derivati dell'acido cinnamico sono l'acido caffeico e due suoi esteri: il fenetilcaffeato (CAPE) e l'1,1-dimetilallilcaffeato (DMAC). Le formule di struttura sono riportate in Figura 5.1.

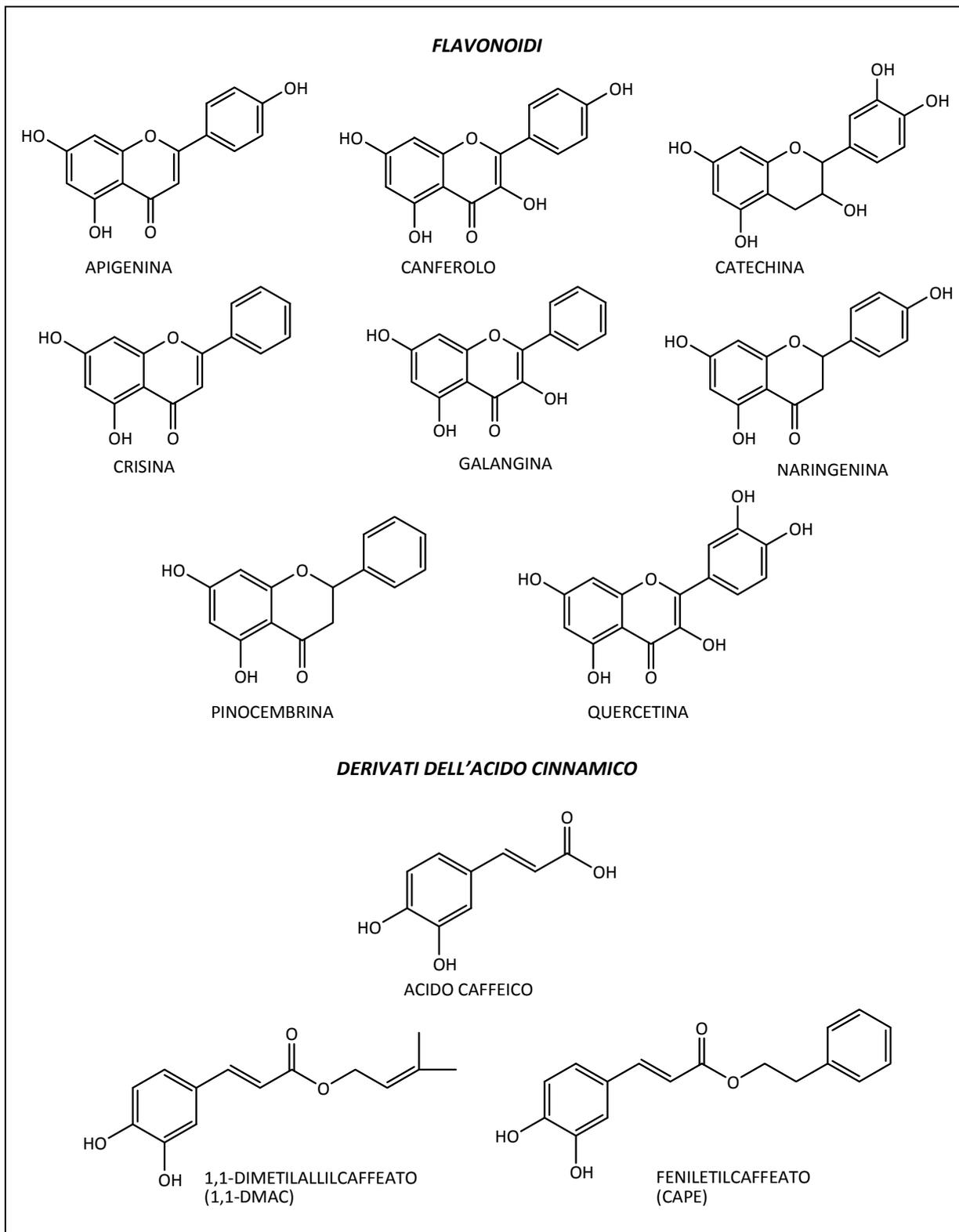


Figura 5.1. Formule di struttura dei polifenoli analizzati.

Sono state preparate soluzioni in etanolo di ciascun composto. Di questi si sono registrati spettri UV/VIS ed è stata effettuata una valutazione del potere antiossidante applicando il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica.

### **5.1 Effetto della struttura chimica dei polifenoli sugli spettri UV/VIS**

Sono stati registrati spettri nella zona ultravioletto-visibile dei polifenoli riportati in Figura 5.1.

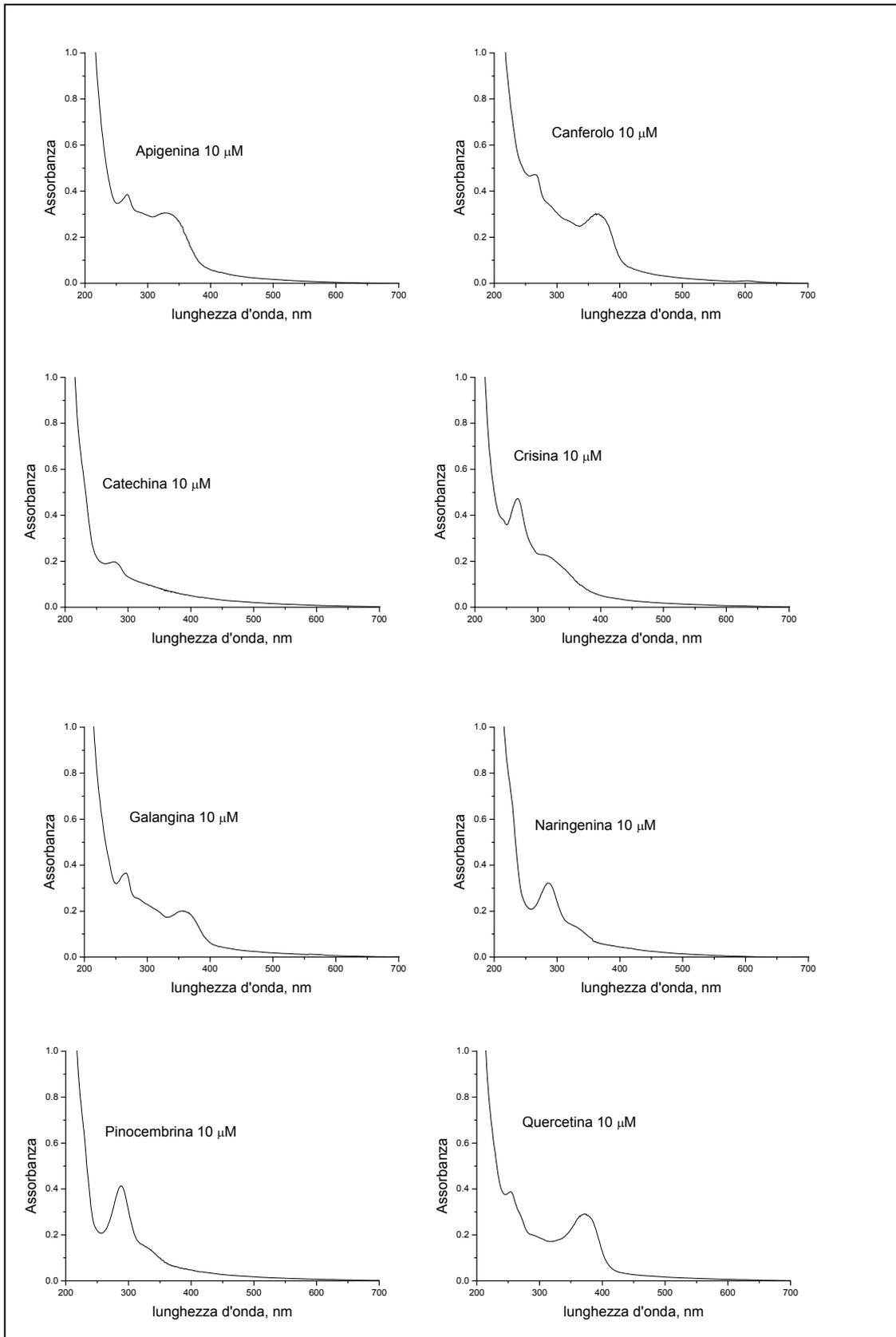


Figura 5.2. Spettri UV/VIS di apigenina, canferolo, catechina, crisina, galangina, naringenina, pinocebrina e quercetina (10 μM).

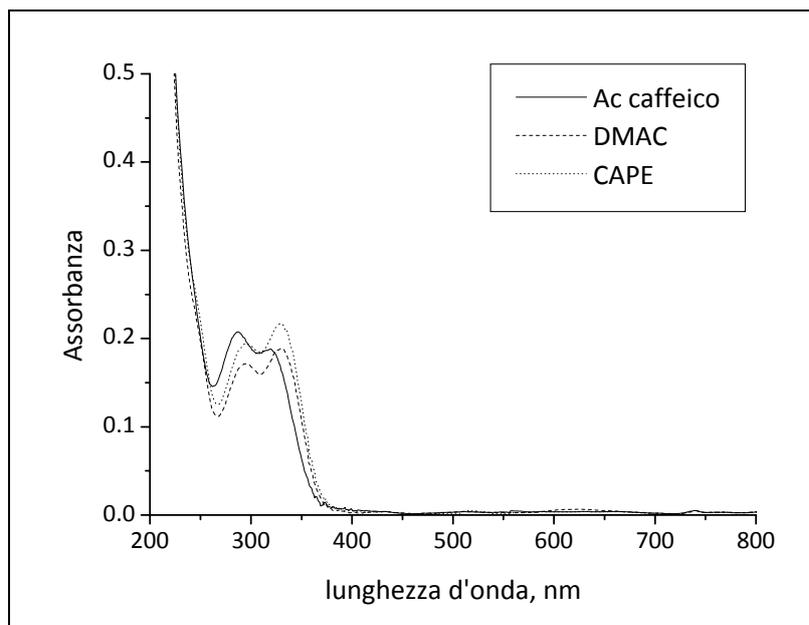


Figura 5.3. Spettri UV/VIS di acido caffeico, DMAC e CAPE (10  $\mu$ M).

Tabella 5.1. Lunghezza d'onda di massimo assorbimento ( $\lambda$ ) e relativo coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) dei polifenoli.

<i>polifenolo</i>	$\lambda$ , nm	$\epsilon$ , L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	<i>polifenolo</i>	$\lambda$ , nm	$\epsilon$ , L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>
<b>Apigenina</b>	268	63000	<b>Naringenina</b>	288	37000
	330	35000	<b>Pinocembrina</b>	290	46000
<b>Canferolo</b>	265	5200	<b>Quercetina</b>	255	20000
	367	35000		375	33000
<b>Catechina</b>	280	24000	<b>Acido Caffeico</b>	290	20000
				320	18000
<b>Crisina</b>	268	52000	<b>DMAC</b>	295	17000
	315	27000		330	18000
<b>Galangina</b>	267	41000	<b>CAPE</b>	295	19000
	360	24000		330	21000

Come si osserva in Figura 5.3, gli spettri dei derivati dell'acido cinnamico sono quasi coincidenti. Per quanto riguarda i flavonoidi, invece, i profili spettrali appaiono molto diversi tra loro, sia come numero di picchi, che per lunghezza d'onda di massimo assorbimento, nonostante tutti i flavonoidi abbiano la stessa struttura di base.

La diversa posizione delle bande UV dei flavonoidi può essere motivata considerando più in dettaglio le differenze nella loro struttura chimica. È noto che la delocalizzazione degli elettroni sulla molecola, dovuta a gruppi aromatici e doppi legami coniugati, ha come effetto quello di abbassare il livello energetico  $\pi^*$  del composto, spostando le bande di assorbimento a lunghezze d'onda maggiori. I profili spettrali mostrano chiaramente come quercetina, canferolo e galangina si differenzino dagli altri flavonoidi investigati per la posizione della banda B ( $\lambda \geq 360$  nm). La struttura chimica di questi

tre composti presenta infatti un sistema  $\pi$  particolarmente esteso, che porta ad una delocalizzazione elettronica maggiore rispetto a quanto avviene negli altri flavonoidi. È infatti presente un doppio legame coniugato sia ad un anello benzenico (anello B) che ad un gruppo carbonilico in C4, a sua volta coniugato con un secondo anello benzenico (anello A). La presenza del doppio legame permette una delocalizzazione elettronica dall'anello B all'eterociclo C (Figura 5.4).

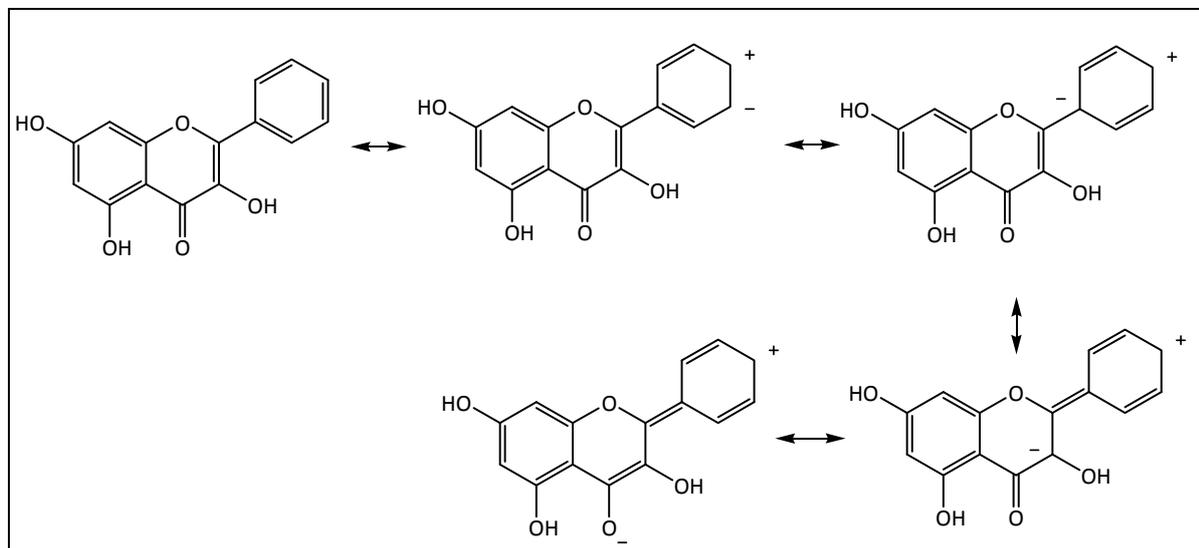


Figura 5.4. Formule di risonanza della galangina, in cui si evidenzia la delocalizzazione elettronica dall'anello B al legame C=O sull'anello C.

Il gruppo carbonilico in posizione 4 permette a sua volta la delocalizzazione elettronica dall'anello A all'eterociclo (Figura 5.5).

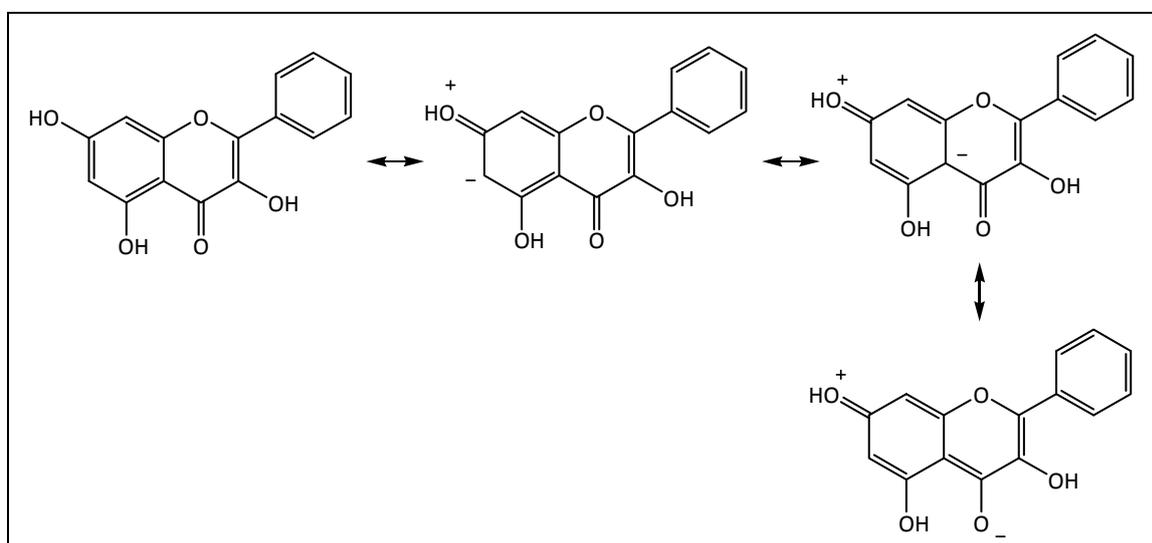


Figura 5.5. Formule di risonanza della galangina, in cui si evidenzia la delocalizzazione elettronica dall'anello A al legame C=O sull'anello C.

La presenza infine di un gruppo ossidrilico in posizione 3 dà la possibilità di un'ulteriore delocalizzazione degli elettroni n dell'ossigeno in C3 sul doppio legame e sull'anello B. (Figura 5.6).

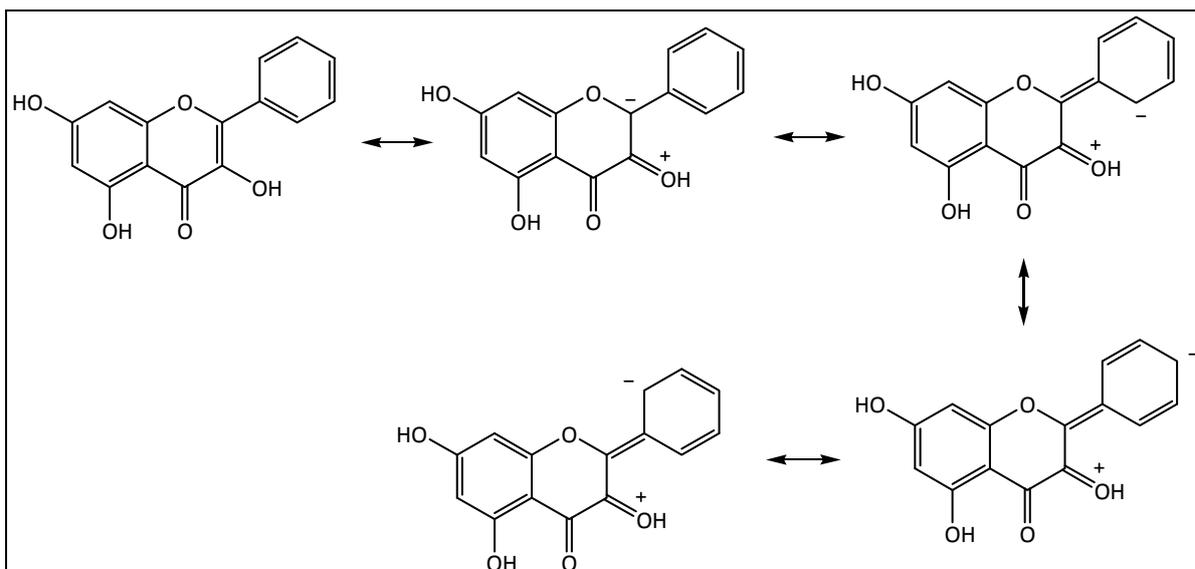


Figura 5.6. Formule di risonanza della galangina in cui si evidenzia la delocalizzazione elettronica dal gruppo ossidrilico in C3 all'anello B (possibile anche per quercetina e canferolo).

Ciò potrebbe spiegare lo spostamento della banda B di quercetina, canferolo e galangina rispetto a quelle di crisina e apigenina, che presentano rispettivamente la stessa struttura di galangina e canferolo, tranne per l'assenza del gruppo 3-OH. Le bande B di apigenina e crisina sono a loro volta spostate a lunghezze d'onda maggiori ( $\lambda \geq 310$  nm) rispetto a quelle di naringenina e pinocembrina (288 nm): ciò conferma le ipotesi proposte. Naringenina e pinocembrina, infatti, presentano la stessa struttura di apigenina e crisina, tranne per il doppio legame C2=C3. La presenza di un singolo legame C2-C3 impedisce la delocalizzazione elettronica dall'anello B all'eterociclo C, vista in Figura 5.4. La presenza del legame carbonilico in C4 mantiene comunque la delocalizzazione elettronica dall'anello A all'eterociclo (Figura 5.5).

## 5.2 Determinazione del potere antiossidante

Per la valutazione del potere antiossidante viene applicato sui polifenoli il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS. Le condizioni utilizzate sono descritte nel paragrafo 2.3.1. I risultati vengono riportati in Tabella 5.2 e Figura 5.7.

Tabella 5.2. Potere antiossidante dei polifenoli, misurato con il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS ed espresso in  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ).

<i>polifenolo</i>	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	<i>polifenolo</i>	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
<b>Apigenina</b>	84±9	<b>Pinocembrina</b>	110±10
<b>Canferolo</b>	2.0±0.2	<b>Quercetina</b>	1.6±0.2
<b>Catechina</b>	2.0±0.2	<b>Acido caffeico</b>	0.48±0.05
<b>Crisina</b>	100±10	<b>1,1-dimetilallilcaffeoato</b>	0.22±0.02
<b>Galangina</b>	3.0±0.3	<b>Fenetilcaffeoato</b>	0.47±0.05
<b>Naringenina</b>	56±6		

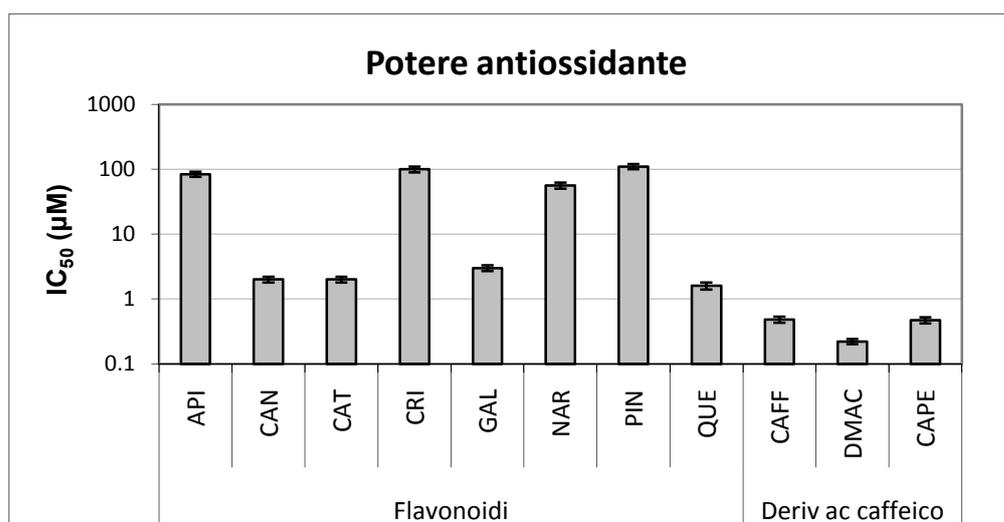


Figura 5.7. Potere antiossidante dei polifenoli, misurato con il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS ed espresso in IC<sub>50</sub> (µM). API: apigenina; CAN: canferolo; CAT: catechina; CRI: crisina; GAL: galangina; NAR: naringenina; PIN: pinocembrina; QUE: quercetina; CAFF: acido caffeico; DMAC: 1,1-dimetilallilcaffeato; CAPE: fenetilcaffeato.

I risultati mostrano come i polifenoli con maggiori proprietà antiossidanti siano i derivati dell'acido caffeico, con un IC<sub>50</sub> < 0.5 µM. Gli otto flavonoidi si possono a sua volta suddividere in due categorie, sulla base del loro potere antiossidante: canferolo, catechina, galangina e quercetina sono caratterizzati da un potere antiossidante comunque elevato, con 1.5 µM ≤ IC<sub>50</sub> ≤ 3 µM; gli altri invece sono tutti caratterizzati da un basso potere antiossidante (IC<sub>50</sub> > 50 µM).

Tenendo conto di questi risultati e delle abbondanze relative dei dieci polifenoli nel propoli si può confermare quanto già anticipato nel paragrafo 3.2.2: i maggiori responsabili dell'attività antiossidante del propoli sono acido caffeico, DMAC, CAPE e galangina. Questi non sono i polifenoli maggiormente presenti nel propoli, ma esercitano un potere antiossidante molto più elevato rispetto a crisina e pinocembrina, come si osserva in Figura 5.7.

### 5.3 Effetto della struttura chimica dei flavonoidi sul potere antiossidante

I flavonoidi analizzati sono caratterizzati da una struttura molto simile; nonostante ciò presentano spettri UV/VIS (paragrafo 5.1) e potere antiossidante (paragrafo 5.2) molto differenti tra loro. Si approfondisce dunque l'argomento motivando nelle differenze strutturali le cause del differente potere antiossidante che si osserva in Figura 5.7. La struttura base dei flavonoidi analizzati è costituita da due anelli benzenici A e B ed un eterociclo C (Figura 5.8), variamente sostituiti.

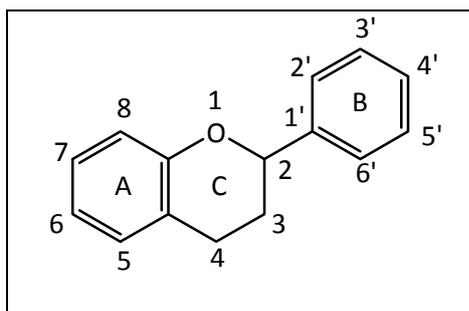


Figura 5.8. Struttura base di un generico flavonoide.

Come si può osservare in Figura 5.1, tutti i flavonoidi in esame posseggono il legame carbonilico in posizione 4, ad eccezione della catechina, che appartiene alla classe dei flavanoli. Tra gli altri, crisina e apigenina, con il doppio legame C2=C3 sono flavoni; pinocembrina e naringenina, senza il doppio legame in posizione 2-3 fanno parte dei flavanoni; infine galangina, canferolo e quercetina che, oltre al doppio legame C2=C3, posseggono anche l'ossidrile in posizione 3 sono flavonoli. Come si può notare tutti i flavonoidi scelti hanno la stessa struttura, con identica sostituzione nell'anello A e si differenziano tra loro per un numero ristretto di gruppi funzionali sugli anelli B e C. In Tabella 5.3 vengono riassunti i gruppi funzionali caratteristici di ogni flavonoide analizzato (si veda anche Figura 5.9).

Tabella 5.3. Gruppi funzionali dei flavonoidi analizzati.

<i>polifenolo</i>	<i>sottoclasse</i>	<i>Anello C</i>			<i>Anello B</i>	
		<i>C4</i>	<i>legame C2-C3</i>	<i>C3</i>	<i>C3'</i>	<i>C4'</i>
<b>Apigenina</b>	Flavoni	C=O	doppio	H	H	OH
<b>Canferolo</b>	Flavonoli	C=O	doppio	OH	H	OH
<b>Catechina</b>	Flavanoli	H	singolo	OH	OH	OH
<b>Crisina</b>	Flavoni	C=O	doppio	H	H	H
<b>Galangina</b>	Flavonoli	C=O	doppio	OH	H	H
<b>Naringenina</b>	Flavanoni	C=O	singolo	H	H	OH
<b>Pinocembrina</b>	Flavanoni	C=O	singolo	H	H	H
<b>Quercetina</b>	Flavonoli	C=O	doppio	OH	OH	OH

Pinocembrina e crisina sono identiche, ad eccezione del doppio legame C2=C3, così come naringenina e apigenina; crisina e galangina si differenziano solo per il 3-OH, così come apigenina e canferolo. Il flavonoide che si differenzia di più rispetto agli altri è la catechina che possiede gruppi funzionali in comune (3-OH e ossidrili sull'anello B, oltre all'anello A) solo con la quercetina. Le somiglianze tra le varie formule di struttura sono meglio rappresentate in Figura 5.9.

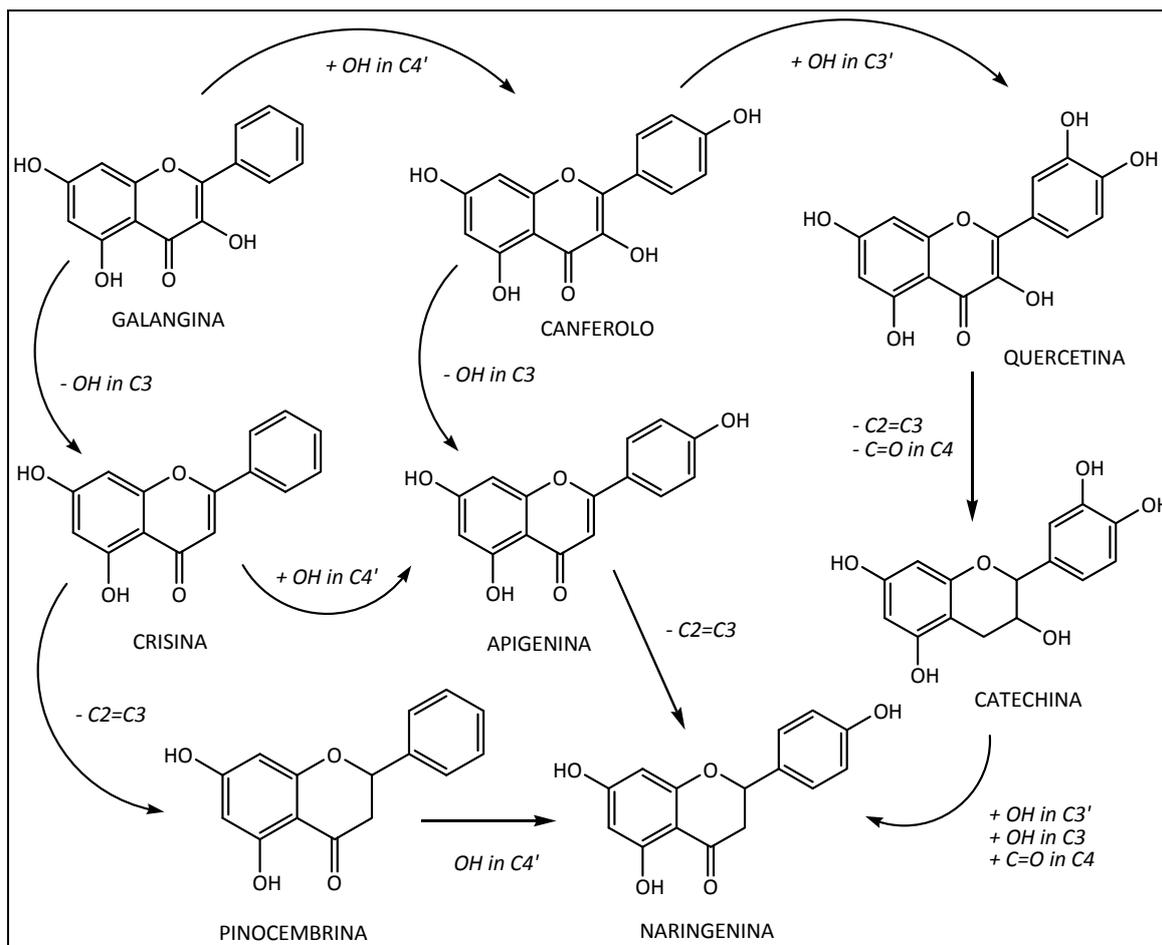


Figura 5.9. Somiglianze di struttura dei flavonoidi analizzati.

Da confronti incrociati tra i risultati che si ottengono per i diversi composti è possibile dunque studiare l'effetto del singolo gruppo funzionale sul potere antiossidante o effetti sinergici di più gruppi funzionali.

### 5.3.1 STATO DELL'ARTE

In letteratura sono numerosi gli studi che si sono occupati del potere antiossidante dei flavonoidi. In molti casi si è cercato di fornire una motivazione delle differenze di potere antiossidante presenti nei diversi composti: le informazioni finora presenti sono però ancora molto confuse ed in alcuni casi contraddittorie, in particolare per il ruolo del doppio legame C2=C3, che per alcuni studiosi sembra influire sul potere antiossidante totale [95], in altri casi sembra invece non contribuire al potere antiossidante della molecola [96]. Ciò su cui non ci sono dubbi è l'elevata importanza della presenza di gruppi ossidrilici nel fornire alla molecola capacità di *scavenger* di radicali liberi, in quanto i gruppi OH possono partecipare alla tipica reazione, già riportata nel paragrafo 1.3, che porta alla neutralizzazione del radicale libero da parte del flavonoide per formare un radicale fenossile stabilizzato per risonanza [95-102].

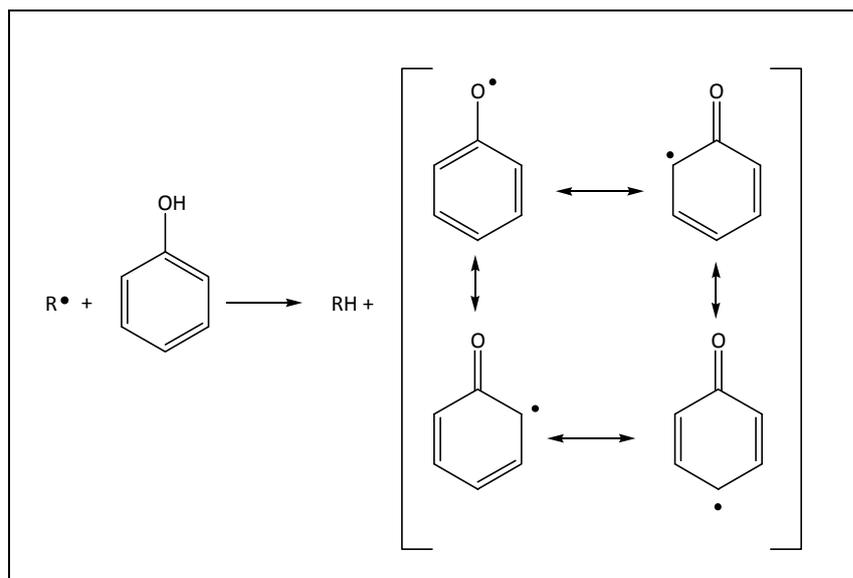


Figura 5.10. Reazione tra un generico fenolo e un radicale, con formazione di un radicale fenossilico, stabilizzato per risonanza.

Pare inoltre che sia più importante la posizione degli ossidrili nella struttura che il loro numero totale all'interno della molecola: fondamentale per avere capacità di *scavenger* sembra essere il gruppo catecolico in posizione 3'-4' dell'anello B [95-102]. Ciò è stato dimostrato confrontando il potere antiossidante di flavonoidi con gruppo catecolico con molecole con un singolo ossidrile sull'anello B [98, 101] e con flavonoidi caratterizzati da un gruppo catecolico bloccato per esterificazione [97].

Altrettanto noto è l'aumento della capacità di *scavenger* determinato dalla presenza di un ossidrile in posizione 3 [95-102], anche se le motivazioni riportate in letteratura per le quali si avrebbe questo effetto non sono sempre condivisibili [96], come si vedrà in seguito. Infine sembra dare un contributo rilevante al potere antiossidante anche il gruppo C=O in posizione 4, in coniugazione con il doppio legame 2-3 [96, 98, 100-102]. Gli ossidrili sull'anello A, invece, sembrano non contribuire in modo significativo al potere antiossidante [98, 100, 101], anche se, in alcuni casi, viene ipotizzato un contributo dell'ossidrile in posizione 5 [96, 99, 102], quando adiacente al gruppo carbonilico.

### 5.3.2 VALUTAZIONE DEI RISULTATI OTTENUTI

#### 5.3.2.1 OSSIDRILE IN POSIZIONE 3 DELL'ANELLO C

Considerando i dati ottenuti per i vari flavonoidi e conoscendo la loro struttura chimica, si può notare la differenza più evidente nella struttura delle due categorie di composti: canferolo, catechina, galangina e quercetina, caratterizzati da un elevato potere antiossidante (Tabella 5.2), hanno un ossidrile in posizione 3; apigenina, crisina, naringenina e pinocembrina non posseggono invece questo gruppo. L'ossidrile in C3 sembra di conseguenza avere un ruolo fondamentale nel fornire potere antiossidante alla molecola, vista anche la grande differenza in termini di  $IC_{50}$  che si osserva tra le due categorie di composti. Pare inoltre che la presenza dell'ossidrile in C3 sia addirittura più importante di quella dell'ossidrile in C4': come si approfondirà in seguito, vi è una notevole differenza tra il potere antiossidante della galangina e quello dell'apigenina. I due composti hanno lo stesso numero di ossidrili totali, oltre alla stessa struttura, ma l'ossidrile in C3 della galangina è sostituito da un ossidrile

in C4' nell'apigenina. Si conferma quindi in questo modo l'ipotesi che non sia il numero di gruppi OH a determinare il potere antiossidante della molecola, ma la loro posizione all'interno della struttura polifenolica.

L'effetto dell'OH in C3 è stato finora di difficile interpretazione, in quanto è noto che sono gli ossidril fenolici a determinare il potere antiossidante della molecola, a causa della delocalizzazione del radicale fenossilico nell'anello aromatico: l'ossidile in C3 non è però fenolico. Una possibile spiegazione si può ricavare osservando la struttura chimica dei flavonoli, che posseggono tutti un elevato potere antiossidante, che varia poco all'aumentare del numero di ossidril sull'anello B. In tali composti si può notare come, nonostante l'ossidile in C3 non sia direttamente legato ad un anello benzenico, si possa comunque avere una delocalizzazione elettronica del radicale in C3 sull'anello B, a causa della presenza del doppio legame C2=C3, che, essendo coniugato con l'anello benzenico B, permette la delocalizzazione dell'elettrone spaiato anche su quest'ultimo anello (Figura 5.11).

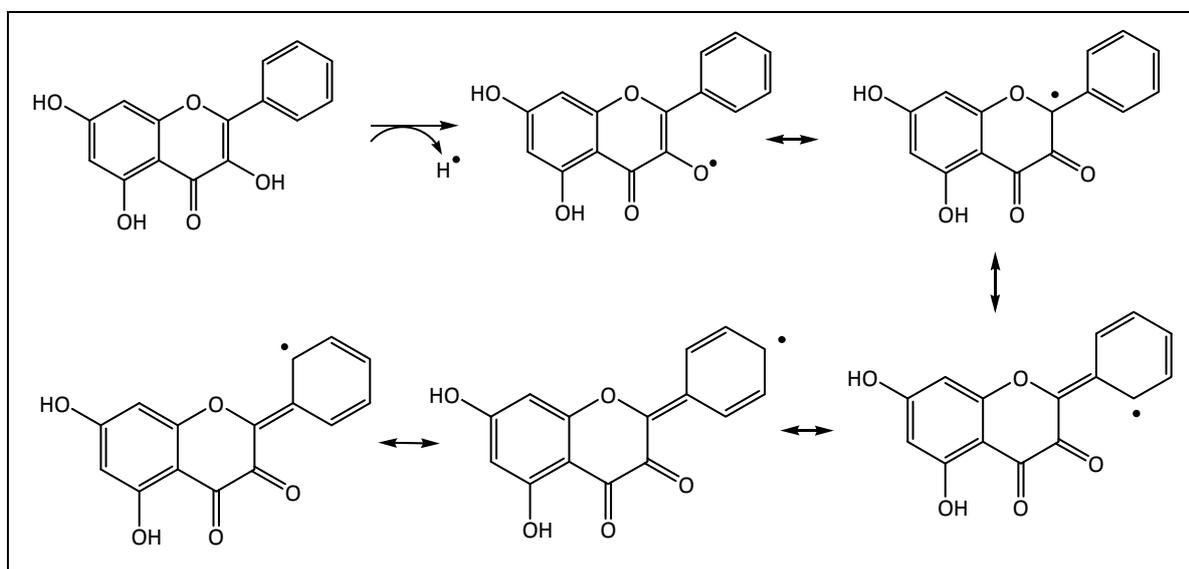


Figura 5.11. Formazione di un radicale in C3 in un flavonolo (galangina) e delocalizzazione sull'anello B.

Sembra quindi che non sia la semplice presenza del gruppo OH in C3 a fornire potere antiossidante alla molecola, ma la compresenza dell'ossidile in C3 e del doppio legame C2=C3, a sua volta coniugato con l'anello benzenico B.

### 5.3.2.2 GRUPPO CATECOLICO SULL'ANELLO B

Anche la catechina, che non è un flavonolo, fa parte dei flavonoidi con valori di IC<sub>50</sub> più bassi, quindi con potere antiossidante più elevato. La catechina non possiede il doppio legame C2=C3: non è quindi possibile avere la delocalizzazione dell'elettrone spaiato C3 sull'anello, così come avviene per la galangina. L'elevato potere antiossidante della catechina è dovuto quindi alla presenza del gruppo catecolico sull'anello B.

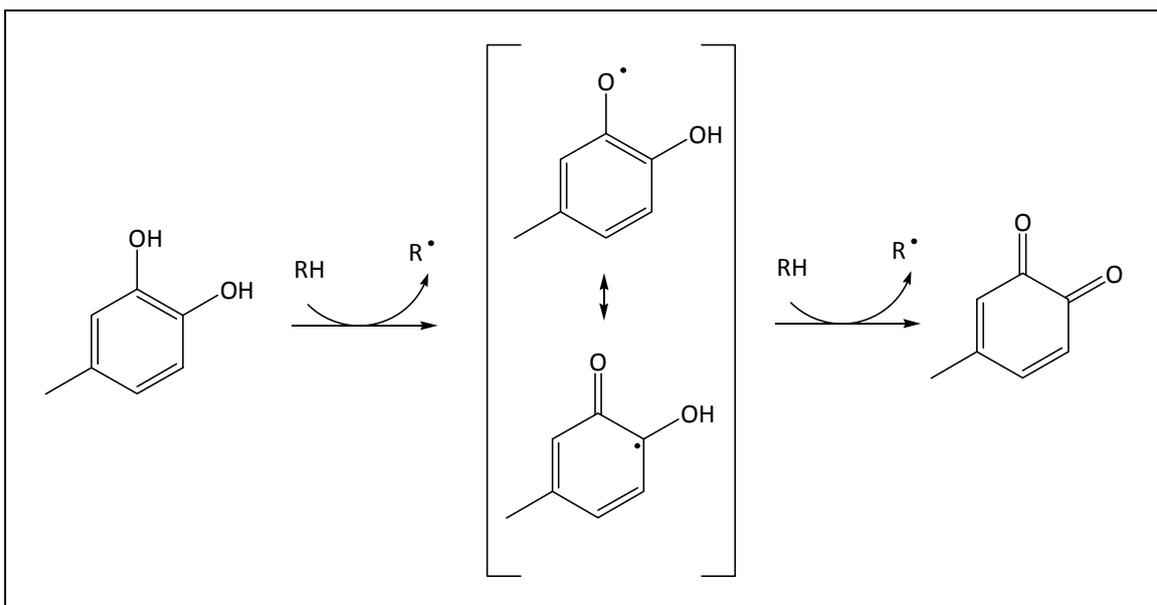


Figura 5.12. Reazione di un generico gruppo catecolico con due radicali e conseguente formazione di una struttura chinonica.

Come si osserva in Figura 5.12, un flavonoide provvisto di un gruppo catecolico può reagire facilmente con due molecole radicaliche, acquisendo la stabile struttura chinonica [100].

Sembra quindi che, in presenza del gruppo catecolico, non sia più necessario il gruppo 3-OH in  $\alpha$  al doppio legame C2=C3 per avere un elevato potere antiossidante; così come il basso  $IC_{50}$  della galangina dimostra che non è indispensabile il gruppo catecolico per avere un elevato potere antiossidante, quando sono già presenti all'interno del flavonoide il gruppo 3-OH e il doppio legame C2=C3. L'effetto delle due strutture sembra quindi indipendente ed il loro contributo appare di uguale entità. La presenza contemporanea di entrambe le strutture nella molecola non sembra aumentare particolarmente il potere antiossidante: la quercetina, che le possiede entrambe, è caratterizzata sì dal minor  $IC_{50}$  tra i vari flavonoidi analizzati, ma non si osserva una differenza particolarmente elevata con l' $IC_{50}$  di catechina, galangina e canferolo.

### 5.3.2.3 IMPORTANZA DEL DOPPIO LEGAME C2=C3

L'elevato potere antiossidante della galangina e le formule di risonanza di Figura 5.11 dimostrano, come già accennato, che in realtà non è la sola presenza dell'ossidrile in C3 a fornire potere antiossidante alla molecola, ma l'addizionale presenza di un doppio legame che permetta la delocalizzazione elettronica dall'ossidrile in C3 all'anello B.

In letteratura non è comunemente riconosciuto quanto il doppio legame sia importante affinché l'ossidrile in C3 riesca a fornire potere antiossidante alla molecola. Solo in Rice-Evans *et al* [101] viene evidenziato l'effetto della compresenza delle due strutture sul potere antiossidante. In altri casi viene descritto l'elevato contributo al potere antiossidante del 3-OH, ma viene considerato secondario rispetto all'effetto del gruppo catecolico nell'anello B ed il doppio legame C2=C3 viene valutato come importante solo quando coniugato con il carbonile in C4 [98-100, 102].

In Heim *et al* [96], ad esempio, si constata l'elevato potere antiossidante di canferolo e quercetina, che diminuisce quando il gruppo 3-OH viene bloccato; viene dunque sottolineata

l'importanza di questo gruppo nel fornire potere antiossidante alla molecola. Non viene però riconosciuta la dipendenza del contributo dell'ossidrilico in C3 dalla presenza del doppio legame C2=C3: viene ipotizzato che in flavanoli e flavonoli si formino legami idrogeno tra il 3-OH e gli ossidrilici dell'anello B; tali legami allineerebbero l'anello B con il resto della molecola e, a causa di questa planarità indotta, l'effetto del 3-OH verrebbe potenziato dalla struttura catecolica. In realtà la catechina, nonostante la presenza del 3-OH e degli ossidrilici in *orto* sull'anello B, non è planare: gli anelli B e C sono quasi perpendicolari tra loro e può essere resa planare solo attraverso la formazione di legami covalenti [103], ben più potenti dei postulati legami idrogeno, improbabili per motivi spaziali. Questa teoria viene ulteriormente smentita dall'elevato potere antiossidante della galangina che, essendo priva degli ossidrilici sull'anello B, non può dunque formare i citati legami idrogeno.

La fondamentale importanza del doppio legame viene indirettamente confermata da Kumazawa *et al* [53] che misura una bassa attività antiossidante nella pinobancsina, flavonoide che contiene il carbonile in C4, l'ossidrilico in C3, ma non il doppio legame C2=C3 (Figura 5.13). È evidente che, in assenza del doppio legame, il 3-OH non è più in grado di svolgere la sua azione.

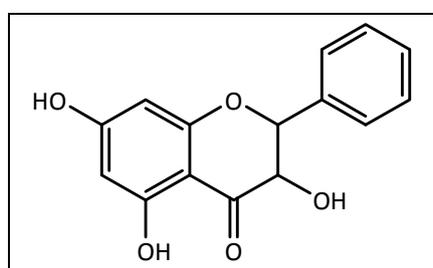


Figura 5.13. Formula di struttura della pinobancsina.

#### 5.3.2.4 OSSIDRILE IN C4' SULL'ANELLO B

Oltre all'elevato contributo al potere antiossidante fornito dal gruppo catecolico, non è da trascurare anche l'effetto dei singoli gruppi ossidrilici presenti sull'anello B: in ciascun sottogruppo di flavonoidi analizzati si osserva un incremento di potere antiossidante all'aumentare del numero di gruppi OH sull'anello B, come si osserva in Tabella 5.4.

Tabella 5.4. Potere antiossidante di flavonoli, flavoni e flavanoni, espresso in IC<sub>50</sub> (μM).

<i>n</i> OH	Flavonolo	IC <sub>50</sub> (μM)	Flavone	IC <sub>50</sub> (μM)	Flavanone	IC <sub>50</sub> (μM)
0	Galangina	3.0±0.3	Crisina	100±10	Pinocebrina	110±10
1	Canferolo	2.0±0.2	Apigenina	84±9	Naringenina	56±6
2	Quercetina	1.6±0.2				

Anche se in alcuni casi l'incremento di potere antiossidante è limitato, i dati ottenuti sono in accordo con l'ipotesi di Burda *et al* [95] secondo la quale anche il gruppo 4'-OH accresce il potere antiossidante della molecola.

Si nota il minor effetto del gruppo 4'-OH sul potere antiossidante, rispetto al 3-OH. Galangina e apigenina, infatti, si differenziano dalla crisina solo per un gruppo ossidrilico: il 3-OH nel caso della galangina ed il 4'-OH nel caso dell'apigenina. Mentre la galangina possiede un potere antiossidante particolarmente elevato, paragonabile a quello della quercetina, l'apigenina invece non si discosta molto dalla crisina. Anche la differenza di potere antiossidante tra naringenina e pinocembrina conferma questa tendenza: nonostante l'incremento del parametro  $1/IC_{50}$  della naringenina, la molecola continua a rimanere tra i flavonoidi poco antiossidanti.

Le formule di risonanza del radicale in C4' dell'apigenina (Figura 5.14) mostrano come l'elettrone spaiato sia estesamente delocalizzato non solo sull'anello B, ma anche lungo il doppio legame C2=C3 ed il carbonile in C4, fornendo addirittura una formula di risonanza in più rispetto alla galangina (Figura 5.4).

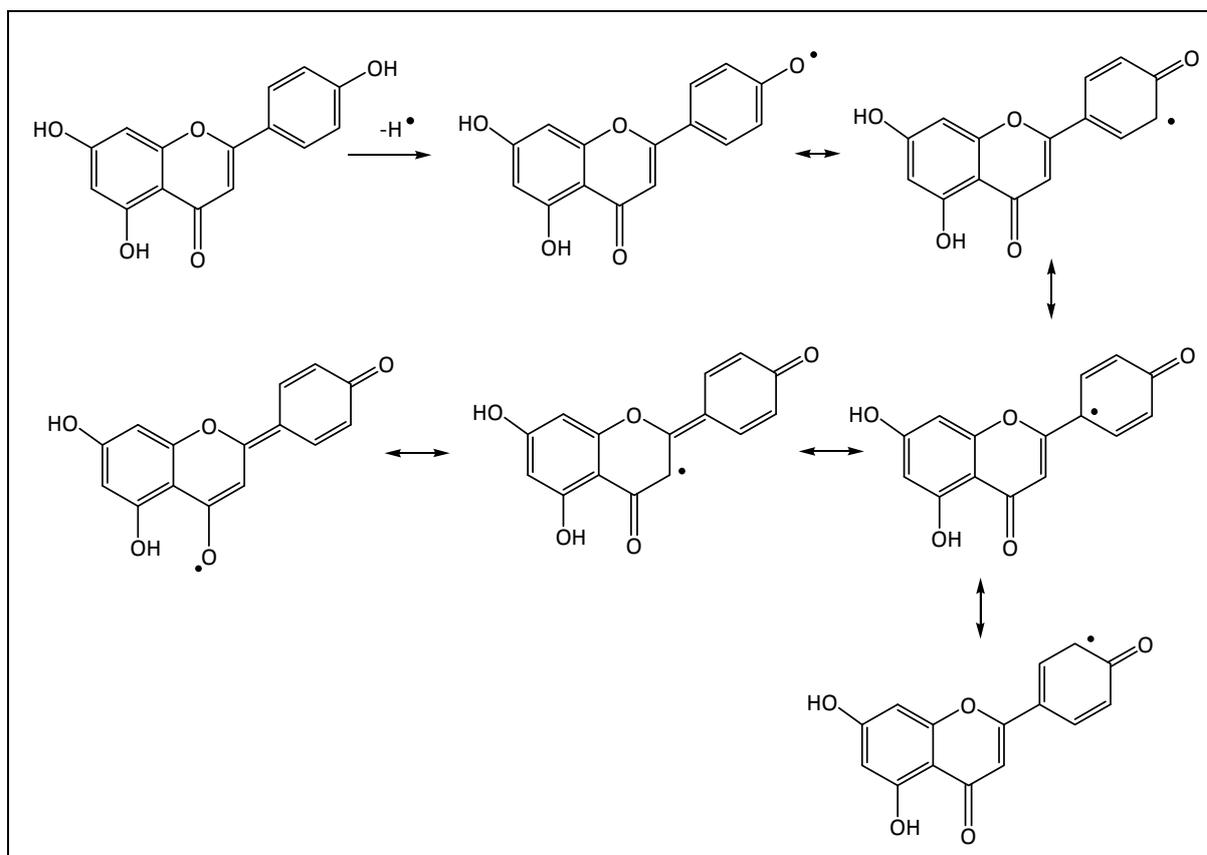


Figura 5.14. Formazione di un radicale in C4' in un flavone (apigenina) e delocalizzazione sull'anello B, sul doppio legame C2=C3 e sul carbonile in C4.

La stabilizzazione del radicale della galangina non si può dunque attribuire ad effetti mesomerici, ma si può spiegare invece sulla base del maggior ingombro sterico presente intorno alla posizione C3 rispetto alla C4'. È infatti stato dimostrato [104] come un fenolo ingombro possa avere un potere antiossidante molto più elevato del semplice fenolo a causa della maggiore stabilità del radicale: è il caso del 2,6-diisopropilfenolo (propofol) (Figura 5.15).

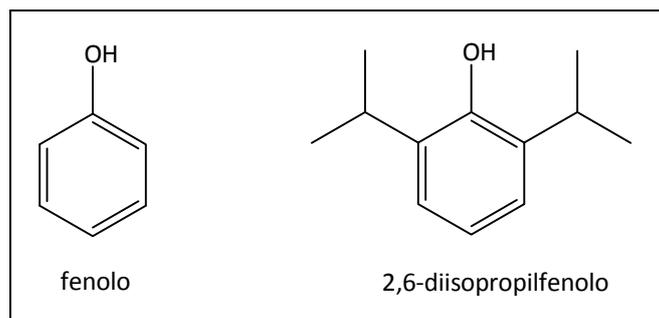


Figura 5.15. Formule di struttura del fenolo e del 2,6-diisopropilfenolo (propofol).

### 5.3.2.5 LA PLANARITÀ DELLA MOLECOLA

La delocalizzazione dell'elettrone spaiato è massima quando l'intera molecola giace sullo stesso piano [105]. Studi recenti hanno evidenziato come la planarità della struttura influenzi l'azione antiossidante di flavonoidi. È stato dimostrato che un derivato planare sintetico della catechina (PC) (Figura 5.16) possiede proprietà antiossidanti più elevate rispetto alla catechina [106]. Pare che la stabilità del radicale derivato per estrazione di un  $H^\bullet$  in posizione 4' da PC sia dovuta ad iperconiugazione tra gli elettroni  $\pi$  dell'anello B e gli elettroni  $\sigma$  in posizione 2 dell'anello C, fenomeno che può avvenire solo se gli anelli B e C giacciono sullo stesso piano [107].

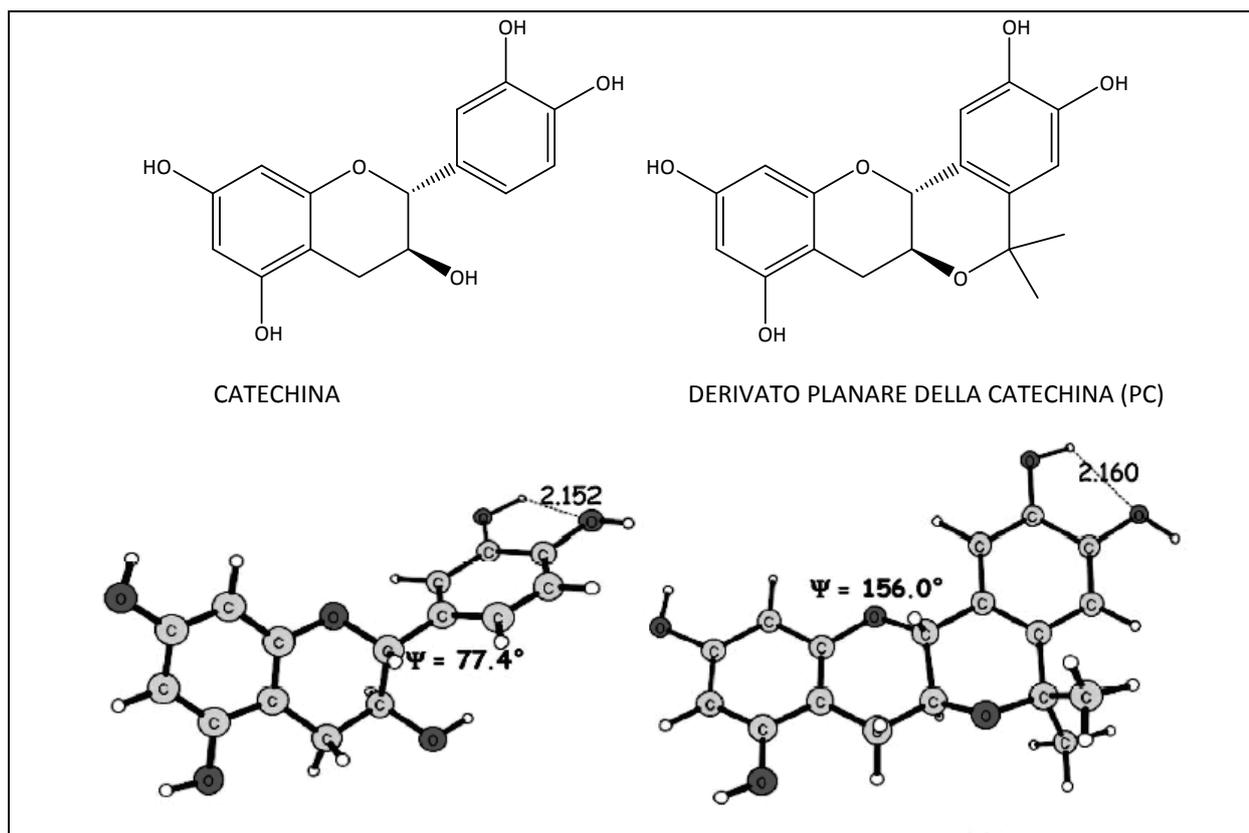


Figura 5.16. Formula di struttura e geometria di catechina e del suo derivato planare (PC) [103].

Nei flavonoidi naturali la planarità della molecola è indotta dalla presenza del doppio legame C2=C3: in flavoni e flavanoni tutti gli atomi di carbonio della struttura hanno ibridizzazione  $sp^2$ , che comporta un allineamento dell'anello B con il piano della molecola. In flavonoidi sprovvisti del doppio

legame C2=C3 si osserva una torsione dell'anello B rispetto al piano della molecola, come nel caso della catechina [103].

#### **5.3.2.6 CONCLUSIONI**

In conclusione i dati ottenuti suggeriscono che i gruppi principalmente responsabili del potere antiossidante dei flavonoidi siano:

- a) il gruppo catecolico in posizione 3'-4' sull'anello B;
- b) il gruppo 3-OH sull'anello C, in  $\alpha$  al doppio legame C2-C3;
- c) il gruppo 4'-OH sull'anello B, in misura nettamente inferiore.

Sia il gruppo catecolico che il gruppo 3-OH sono in grado di fornire un elevato potere antiossidante ai flavonoidi, in modo indipendente ed in misura presocchè equivalente. La presenza del solo gruppo ossidrilico in posizione 4' accresce il potere antiossidante della molecola, pur non portandolo a livelli eccezionali. Viene inoltre sottolineata l'importanza del doppio legame C2=C3, senza il quale il solo gruppo 3-OH non è in grado di fornire potere antiossidante alla molecola; il doppio legame è ulteriormente importante in quanto legato alla planarità della molecola.

Il tipo e quantità di flavonoidi analizzati non permette di ipotizzare teorie sull'effetto del carbonile in C4, dal momento che quasi tutti i flavonoidi a disposizione lo contengono. La catechina, unica molecola senza C=O, presenta una struttura troppo diversa da quella degli altri flavonoidi per essere utilizzata come confronto. Non si osservano inoltre effetti significativi del doppio legame C2=C3 in assenza del gruppo 3-OH.



## 6 - Affidabilità dei metodi spettrofotometrici per la misura del potere antiossidante -

---

Nella Parte I di questa tesi sono stati applicati alcuni metodi per la valutazione del potere antiossidante o dei parametri ad esso correlati *in vitro*. Come metodo standard a cui fare riferimento è stato scelto quello dell'inibizione della perossidazione lipidica in micelle di SDS, in quanto riproduce il tipico comportamento degli antiossidanti nella membrana cellulare. La variante utilizzata in questo lavoro, che prevede la formazione di micelle, permette di avvicinarsi ulteriormente al sistema reale delle membrane fosfolipidiche (paragrafo 1.4.1). Nonostante sia molto efficace, il metodo IPL presenta degli svantaggi, causati soprattutto dai lunghi tempi di misura e dalla preparativa complessa. Inoltre il metodo è difficilmente utilizzabile per misure di routine: dato che la determinazione prevede il monitoraggio di variazioni della velocità di reazione, ciascuna misura deve essere effettuata singolarmente e ciò allunga ulteriormente i tempi di analisi.

Per questi motivi i metodi maggiormente utilizzati sono in realtà saggi spettrofotometrici, che si avvalgono di uno strumento di facile utilizzo, preciso ed affidabile e sono più adatti a misure di routine: i tempi sono noti con precisione e si possono effettuare set di misure contemporaneamente, con conseguente risparmio di tempo. A motivo del loro largo utilizzo diventa importante valutare l'affidabilità di questi metodi.

Nei capitoli precedenti sono già stati applicati i metodi Folin-Ciocalteu, DPPH ed enzimatico su propoli e frutta. Questi ed altri saggi, largamente utilizzati per valutare parametri correlati al potere antiossidante, vengono ora applicati su alcuni flavonoidi puri: apigenina, canferolo, catechina, crisina, galangina, naringenina, pinocembrina e quercetina, le cui formule di struttura sono riportate in Figura 5.1. Ciò permette di verificare la risposta dei singoli metodi non più su una matrice complessa, in cui vari fattori potrebbero influire sul risultato finale, ma su singole molecole con una precisa e nota struttura chimica. Si può quindi valutare quali gruppi funzionali nella struttura influenzano i risultati ottenuti applicando i diversi metodi, verificare se si ottiene una risposta significativa con tutti i flavonoidi e se tale segnale sia proporzionale al potere antiossidante; si confronteranno i risultati ottenuti con il metodo standard IPL, attraverso il calcolo dei coefficienti di correlazione.

I metodi presi in considerazione quantificano parametri direttamente correlabili al potere antiossidante (Tabella 6.1). Ciascun metodo presenta vantaggi e svantaggi, dipendenti dal principio chimico e chimico-fisico su cui si basa e dalla procedura adottata.

Tabella 6.1. Metodi spettrofotometrici e parametri determinati.

<b>Parametro</b>	<b>Metodo</b>
Potere riducente	Folin-Ciocalteu
Capacità di <i>scavenger</i>	DPPH ABTS
Contenuto di polifenoli totali	Enzimatico
Contenuto di flavonoidi	Alluminio cloruro DNPH

## 6.1 Metodi Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS ed enzimatico

### 6.1.1 METODO FOLIN-CIOCALTEAU

Il metodo Folin-Ciocalteu permette di determinare il potere riducente. È noto infatti che una caratteristica fondamentale delle sostanze antiossidanti è la capacità di ossidarsi facilmente, in presenza di agenti ossidanti, mantenendo inalterate importanti molecole biologiche, come proteine, lipidi e DNA che potrebbero essere soggetti ad ossidazione da parte dei ROS. La metodica adottata è descritta nel paragrafo 2.3.2. I risultati, riportati in Tabella 6.2, vengono espressi in percentuale rispetto al valore della catechina, che viene presa come riferimento.

Tabella 6.2. Risposta dei flavonoidi al metodo Folin-Ciocalteu, espressa in % CE.

<b>flavonoide</b>	<b>%CE</b>	<b>flavonoide</b>	<b>%CE</b>
<b>Apigenina</b>	56±3	<b>Galangina</b>	58±1
<b>Canferolo</b>	106±1	<b>Naringenina</b>	76±3
<b>Catechina</b>	100	<b>Pinocembrina</b>	48±1
<b>Crisina</b>	37±4	<b>Quercetina</b>	174±4

I risultati ottenuti con il metodo Folin-Ciocalteu non mostrano una particolare differenza di potere riducente tra flavonoidi provvisti e sprovvisti del gruppo 3-OH, come si è riscontrato applicando il metodo IPL (paragrafo 5.2). Si può notare però un aumento medio del potere riducente all'aumentare del numero di gruppi OH sull'anello B (Figura 6.1).

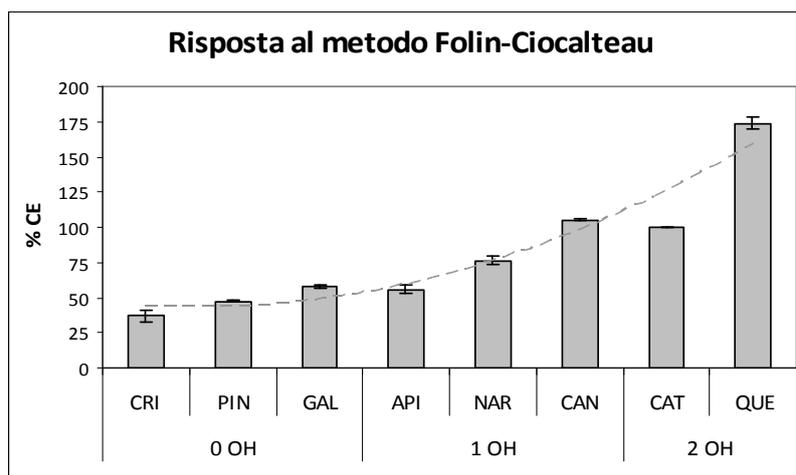


Figura 6.1. Risposta dei flavonoidi al metodo Folin-Ciocalteu, in funzione del numero di gruppi OH sull'anello B. CRI: crisina; PIN: pinoembrina; GAL: galangina; API: apigenina; NAR: naringenina; CAN: canferolo; CAT: catechina; QUE: quercetina.

Entrando più in dettaglio, tra i flavonoidi con uguale numero di gruppi OH nell'anello B, quello con potere riducente più elevato è sempre il flavonolo: galangina, tra i flavonoidi sprovvisti di OH nell'anello B; canferolo, tra quelli che possiedono il gruppo 4'-OH e quercetina tra quelli caratterizzati dal gruppo catecolico nell'anello B.

Pare quindi che la caratteristica strutturale che dà vita a valori più elevati di potere riducente sia il numero di gruppi OH sull'anello B, seguito dalla presenza del gruppo 3-OH in  $\alpha$  al doppio legame C2=C3. Il metodo Folin-Ciocalteu riesce dunque ad individuare le due caratteristiche fondamentali che forniscono proprietà antiossidanti al flavonoide, nonostante il metodo IPL evidenziasse un maggior contributo del gruppo 3-OH, rispetto a singoli gruppi OH sull'anello B. Il calcolo del coefficiente di correlazione (Figura 6.2) conferma il buon accordo tra i metodi Folin-Ciocalteu e dell'inibizione della perossidazione lipidica, quando applicati ai flavonoidi.

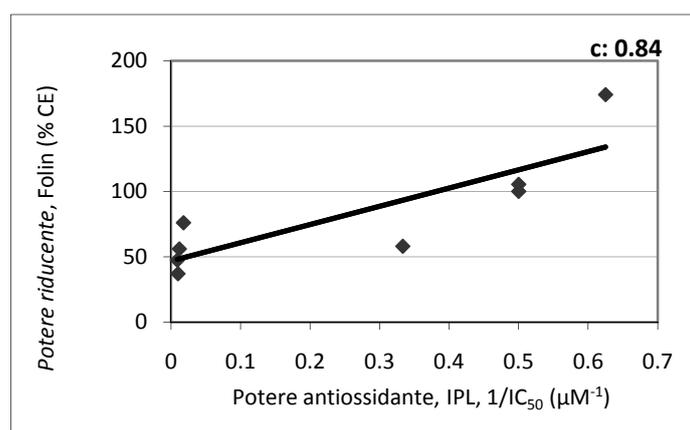


Figura 6.2. Correlazione tra il metodo Folin-Ciocalteu ed il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica, espresso sotto forma di  $1/IC_{50}$ , applicati ai flavonoidi.

### 6.1.2 METODI DPPH E ABTS

I metodi DPPH e ABTS determinano la capacità di *scavenger* di un campione, ossia la capacità di bloccare i radicali liberi, tipico comportamento degli antiossidanti nell'organismo. Le metodiche sono

descritte nei paragrafi 2.3.3 e 2.3.5. I risultati, riportati in Tabella 6.3, vengono espressi in percentuale rispetto al valore della catechina, che viene presa come riferimento.

Tabella 6.3. Risposta dei flavonoidi ai metodi DPPH e ABTS, espressa in % CE.

<i>flavonoide</i>	<i>Metodo DPPH</i> %CE	<i>Metodo ABTS</i> %CE
<b>Apigenina</b>	<1	<1
<b>Canferolo</b>	30±6	51±1
<b>Catechina</b>	100	100
<b>Crisina</b>	<1	<1
<b>Galangina</b>	17±1	25±1
<b>Naringenina</b>	<1	<1
<b>Pinocembrina</b>	<1	<1
<b>Quercetina</b>	123±6	182±7

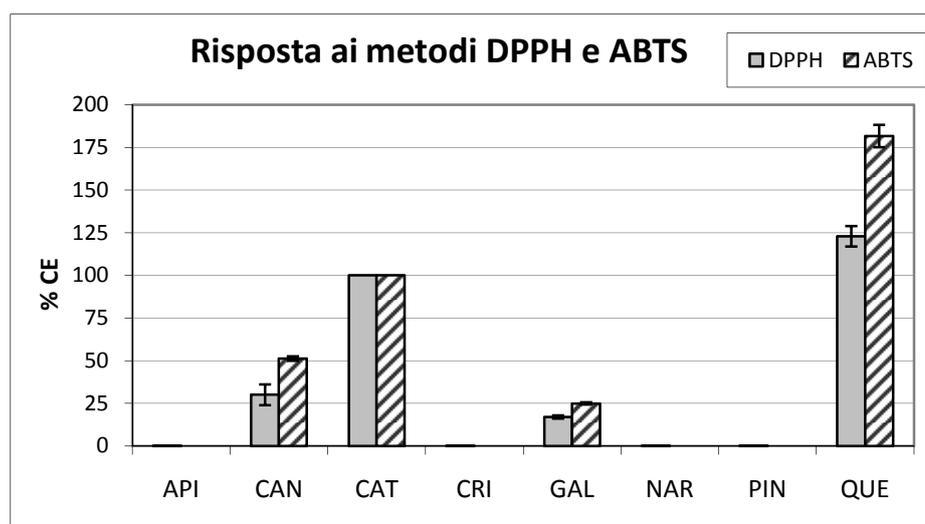


Figura 6.3. Risposta dei flavonoidi ai metodi DPPH e ABTS. API: apigenina; CAN: canferolo; CAT: catechina; CRI: crisina; GAL: galangina; NAR: naringenina; PIN: pinocembrina; QUE: quercetina.

Dal grafico di Figura 6.3 si osserva chiaramente come le due serie di misure abbiano un andamento molto simile. Solo i flavonoidi provvisti del gruppo 3-OH generano una risposta significativa, mentre apigenina, crisina, naringenina e pinocembrina sono caratterizzati da una capacità di *scavenger* inferiore all'1% rispetto alla catechina. Pare quindi che, in questo caso, il gruppo 3-OH sia la caratteristica che viene maggiormente rilevata; contribuisce poi al risultato finale anche il numero di gruppi OH sull'anello B, come si osserva confrontando i flavonoli galangina-canferolo-quercetina, che possiedono capacità di *scavenger* crescente. Ciò è concorde con quanto avviene utilizzando il metodo IPL (paragrafo 5.2); in quel caso, però, la categoria di flavonoidi sprovvista del gruppo 3-OH dà come risultati valori bassi, ma non trascurabili. I metodi DPPH e ABTS, dunque, da un lato discriminano molto bene i flavonoidi in base al loro potere antiossidante, dall'altro sottostimano

il potere antiossidante dei composti meno attivi. Ad ogni modo rimane buono il grado di accordo tra i metodi DPPH ed ABTS con il metodo IPL, come testimoniato dal calcolo dei coefficienti di correlazione (Figura 6.4).

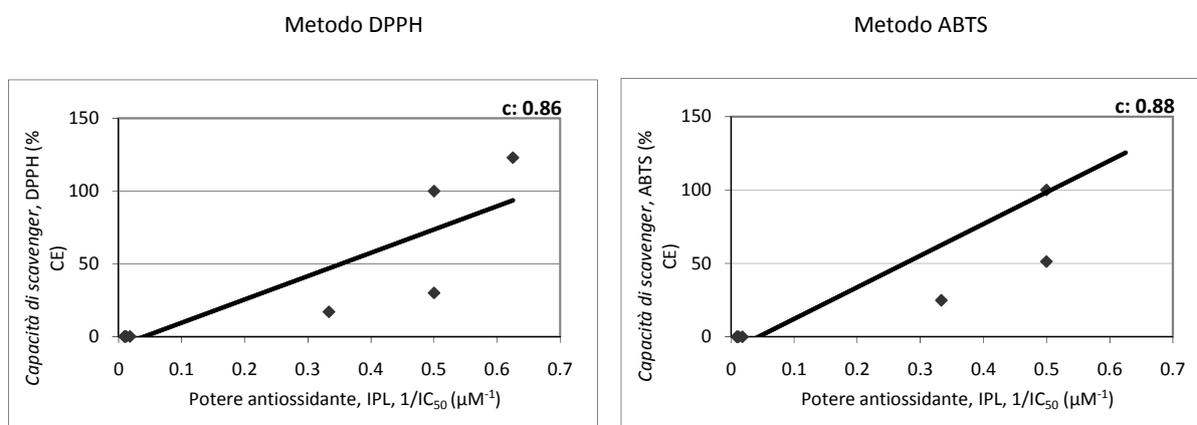


Figura 6.4. Correlazione tra i singoli metodi DPPH e ABTS ed il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica, espresso sotto forma di 1/IC<sub>50</sub>, applicati ai flavonoidi.

A livello pratico, tra i due saggi per la determinazione della capacità di *scavenger* è preferibile il metodo DPPH, in quanto il radicale ABTS<sup>•+</sup> non è disponibile commercialmente e deve essere prodotto *in situ* attraverso una reazione piuttosto lunga (12-16 h). Vista la somiglianza dei risultati ottenuti attraverso i due saggi, nelle considerazioni successive si valuterà solo il metodo DPPH.

### 6.1.3 METODO ENZIMATICO

I polifenoli sono la classe più abbondante di antiossidanti negli alimenti: la determinazione della loro concentrazione in un campione è dunque indice della quantità di antiossidanti globalmente presente in un alimento. A questo scopo ai flavonoidi di Figura 5.1 viene applicato il metodo enzimatico, descritto nel paragrafo 2.3.4. I risultati, riportati in Tabella 6.4, vengono espressi in percentuale rispetto al valore della catechina, che viene presa come riferimento.

Tabella 6.4. Risposta dei flavonoidi al metodo enzimatico, espressa in % CE.

<i>flavonoide</i>	%CE	<i>flavonoide</i>	%CE
<b>Apigenina</b>	59±1	<b>Galangina</b>	40±4
<b>Canferolo</b>	60±3	<b>Naringenina</b>	78±7
<b>Catechina</b>	100	<b>Pinocembrina</b>	21±1
<b>Crisina</b>	43±4	<b>Quercetina</b>	61±1

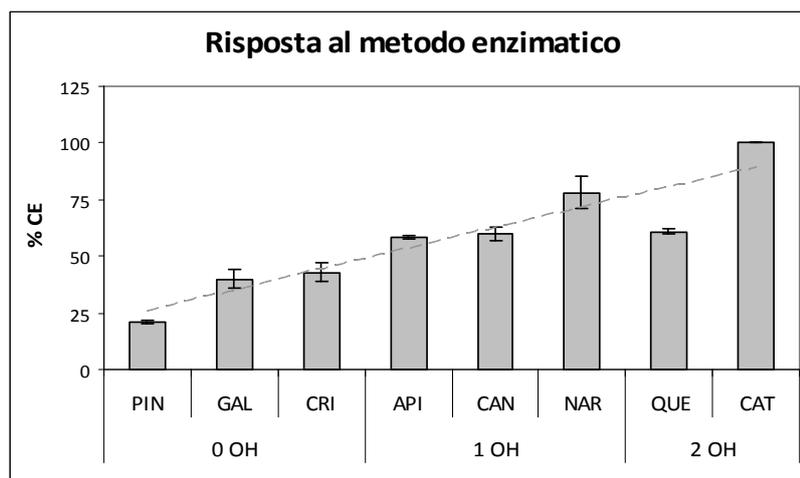


Figura 6.5. Risposta dei flavonoidi al metodo enzimatico, in funzione del numero di gruppi OH sull'anello B. PIN: pinocembrina; GAL: galangina; CRI: crisina; API: apigenina; CAN: canferolo; NAR: naringenina; QUE: quercetina; CAT: catechina.

Come si osserva in Figura 6.5, la risposta dei flavonoidi al metodo enzimatico è analoga a quella osservata nel caso del saggio di Folin-Ciocalteu: i risultati non portano ad una suddivisione dei flavonoidi in due categorie, come si è verificato con il metodo IPL (paragrafo 5.2), ma si osserva un incremento progressivo della risposta all'aumentare del numero di gruppi ossidrilici sull'anello B. In questo caso, però, al contrario di quanto avviene con il metodo FC, pare che la presenza del gruppo 3-OH non influenzi minimamente il risultato; al contrario, flavonoidi sprovvisti dell'ossidrilico in posizione 3 danno una risposta più elevata rispetto a quelli che invece lo contengono. Il calcolo del coefficiente di correlazione (Figura 6.6) conferma il basso accordo tra il metodo enzimatico e quello dell'iniziazione della perossidazione lipidica, nel caso dell'applicazione dei saggi sui flavonoidi.

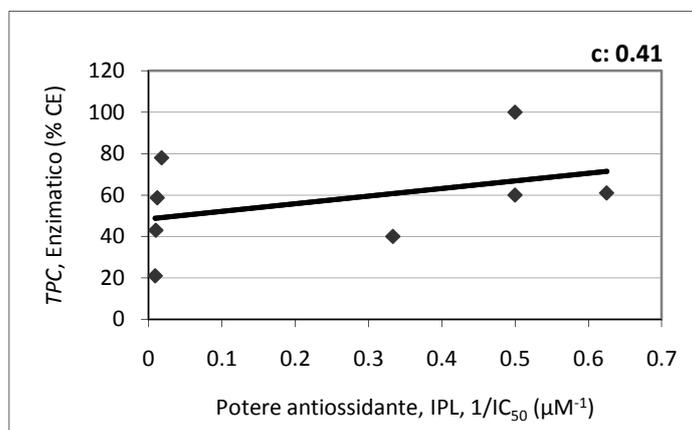


Figura 6.6. Correlazione tra il metodo enzimatico ed il metodo dell'inibizione della perossidazione lipidica, espresso sotto forma di 1/IC<sub>50</sub>, applicati ai flavonoidi.

#### 6.1.4 CONCLUSIONI

L'applicazione dei diversi metodi sui flavonoidi puri ha dimostrato come i saggi per la valutazione della capacità di *scavenger* individuino meglio degli altri le due caratteristiche fondamentali che devono avere i flavonoidi per comportarsi da antiossidanti. Altrettanto importanti sono i risultati ottenuti su matrici alimentari reali. Al fine di effettuare una valutazione complessiva sull'affidabilità

dei metodi spettrofotometrici si utilizzano i risultati ottenuti su frutta e propoli (capitoli 3 e 4) per calcolare coefficienti di correlazione tra i diversi saggi ed il metodo IPL, quando applicati su alimenti.

Tabella 6.5. Coefficienti di correlazione dei saggi spettrofotometrici con il metodo IPL, applicati su frutta, propoli e flavonoidi puri.

<b>Metodo</b>	<b>Frutta</b>	<b>Propoli</b>	<b>Flavonoidi</b>
<b>Folin-Ciocalteu</b>	0.58	0.69	0.84
<b>DPPH</b>	0.72	0.79	0.86
<b>Enzimatico</b>	0.52	0.71	0.41

Il calcolo dei coefficienti di correlazione (Tabella 6.5) mostra come, oltre che per i flavonoidi puri, anche nel caso degli alimenti il metodo DPPH fornisca risultati che si avvicinano molto al metodo IPL. In effetti, tra i saggi spettrofotometrici, il metodo DPPH è l'unico che studia la reazione che effettivamente svolgono gli antiossidanti all'interno dell'organismo; si tratta dello stesso meccanismo attraverso il quale viene rallentata la reazione della perossidazione lipidica, quando si applica metodo IPL. Inoltre, la determinazione avviene mediante la misura della diminuzione di assorbanza del radicale DPPH<sup>\*</sup> ad opera degli antiossidanti presenti nel campione. Tale misura è ovviamente indipendente dal tipo di composti presenti, ma solo dalla loro efficacia nel bloccare i radicali liberi.

I metodi FC ed enzimatico forniscono risposte a volte molto differenti, a causa del diverso meccanismo chimico coinvolto della determinazione. Il coefficiente di correlazione calcolato per i flavonoidi puri e le considerazioni effettuate nel paragrafo 6.1 suggeriscono che il metodo Folin-Ciocalteu riflette meglio le proprietà antiossidanti dei singoli polifenoli, rispetto al metodo enzimatico, ponendosi alla pari del saggio con il DPPH. Il metodo enzimatico, d'altra parte, è meno soggetto ad interferenti rispetto al metodo Folin-Ciocalteu, come già introdotto nel paragrafo 1.4.4.1 e come confermato in letteratura [108]: limitare il più possibile le interferenze diventa di fondamentale importanza nell'analisi di campioni reali. Nel caso di propoli e frutta i coefficienti di correlazione dei metodi Folin-Ciocalteu ed enzimatico indicano una sostanziale equivalenza dei due metodi nella valutazione del potere antiossidante totale. A parità di risultato finale, il saggio enzimatico è preferibile per motivi sperimentali: prevede il minor tempo di analisi (10 minuti) ed è quindi il più adatto per misure di *routine*.

## **6.2 Metodi dell'alluminio cloruro e DNPH**

### **6.2.1 METODO DELL'ALLUMINIO CLORURO**

I flavonoidi di Figura 5.1 vengono analizzati tramite il metodo dell'alluminio cloruro, seguendo la metodica descritta nel paragrafo 2.3.6. I risultati, riportati in Tabella 6.6, vengono espressi in percentuale rispetto al valore della quercetina, che viene presa come riferimento, in quanto la catechina non fornisce una risposta significativa a questo metodo.

Tabella 6.6. Risposta dei flavonoidi al metodo  $\text{AlCl}_3$ , espressa in % QE.

<i>flavonoide</i>	<i>% QE</i>	<i>flavonoide</i>	<i>% QE</i>
<b>Apigenina</b>	27±1	<b>Galangina</b>	124±3
<b>Canferolo</b>	168±5	<b>Naringenina</b>	<1
<b>Catechina</b>	<1	<b>Pinocembrina</b>	<1
<b>Crisina</b>	20±2	<b>Quercetina</b>	100

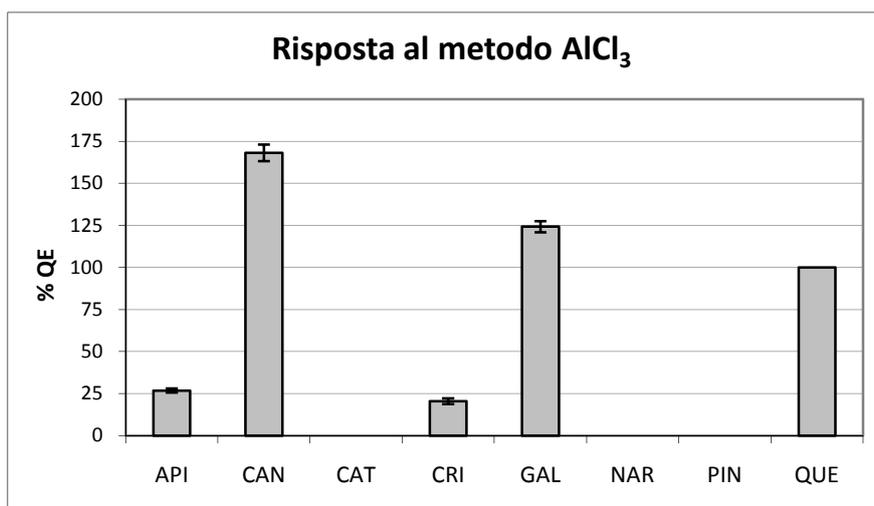


Figura 6.7. Risposta dei flavonoidi al metodo dell'alluminio cloruro. API: apigenina; CAN: canferolo; CAT: catechina; CRI: crisina; GAL: galangina; NAR: naringenina; PIN: pinocembrina; QUE: quercetina.

Il grafico di Figura 6.7 mostra come catechina, naringenina e pinocembrina non forniscano una risposta significativa a questo metodo: come già noto [35] la catechina non può formare complessi con l'alluminio rilevabili spettrofotometricamente, a causa della mancanza del gruppo  $\text{C}=\text{O}$  in posizione 4. Anche naringenina e pinocembrina, però, che possiedono tutte le caratteristiche strutturali necessarie alla formazione di complessi, non sono rilevate. Questo potrebbe essere dovuto ad un problema di scelta della lunghezza d'onda di analisi: viste le posizioni di massimo assorbimento dei flavonoidi (Figura 5.2) è possibile che i complessi dell'alluminio con naringenina e pinocembrina abbiano un massimo di assorbimento spostato rispetto agli altri complessi, e che quindi a 415 nm non siano rilevati. Oltre a questo, tra i flavonoidi che forniscono una risposta significativa, l'andamento del segnale in funzione del numero di gruppi ossidrilici sull'anello B è anomalo rispetto a quanto si osserva applicando gli altri metodi: il canferolo, dà una risposta più elevata sia rispetto alla galangina che alla quercetina.

La scelta di identificare i flavonoidi in base alla formazione di complessi, piuttosto che alla loro capacità di bloccare i radicali liberi porta ad una risposta dei singoli flavonoidi a questo metodo completamente indipendente dal loro potere antiossidante e influenzata semplicemente dalle posizioni delle bande di assorbimento del loro complesso dell'alluminio.

## 6.2.2 METODO DNPH

I flavonoidi di Figura 5.1 vengono infine analizzati utilizzando il metodo DNPH, seguendo la metodica descritta nel paragrafo 2.3.7. I risultati, riportati in Tabella 6.7, vengono espressi in percentuale rispetto al valore della naringenina, che viene presa come riferimento, in quanto catechina e quercetina non forniscono una risposta significativa a questo metodo.

Tabella 6.7. Risposta dei flavonoidi al metodo DNPH, espressa in % NE.

<i>flavonoide</i>	<i>% NE</i>	<i>flavonoide</i>	<i>% NE</i>
<b>Apigenina</b>	<1	<b>Galangina</b>	<1
<b>Canferolo</b>	<1	<b>Naringenina</b>	100
<b>Catechina</b>	<1	<b>Pinocebrina</b>	82±1
<b>Crisina</b>	<1	<b>Quercetina</b>	<1

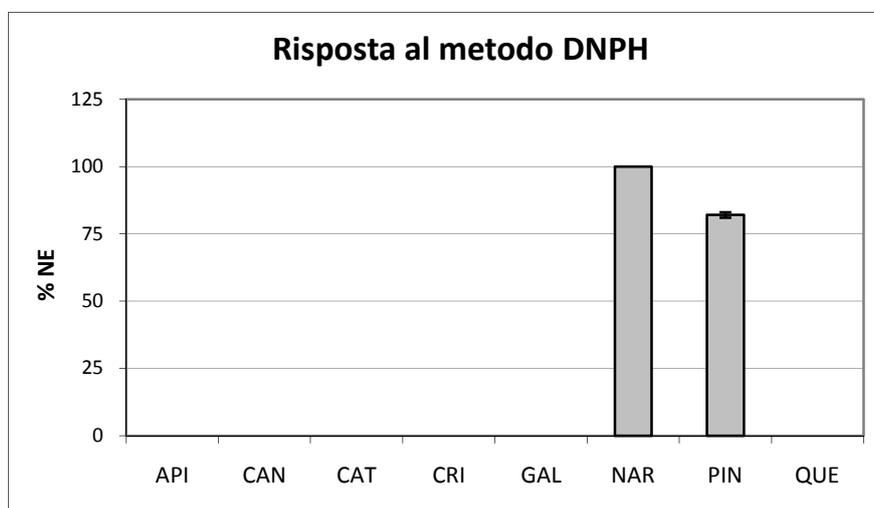


Figura 6.8. Risposta dei flavonoidi al metodo DNPH. API: apigenina; CAN: canferolo; CAT: catechina; CRI: crisina; GAL: galangina; NAR: naringenina; PIN: pinocebrina; QUE: quercetina.

Tutti i flavonoidi, tranne la catechina, possiedono il gruppo C=O, di conseguenza hanno le caratteristiche adatte a reagire con la 2,4-dinitrofenilidrazina. Il grafico di Figura 6.8, invece, mostra che solo due degli otto flavonoidi analizzati forniscono una risposta significativa a questo metodo: naringenina e pinocebrina. Curiosamente, tra quelli che hanno il gruppo C=O, naringenina e pinocebrina sono gli unici due flavonoidi caratterizzati dal singolo legame C2-C3; un simile risultato è stato già osservato in passato [35].

Naringenina e pinocebrina sono tra i flavonoidi con più basso potere antiossidante: il metodo DNPH non sembra quindi utile a fornire un'indicazione sul potere antiossidante totale, se applicato ad una matrice alimentare. Il fatto che la reazione con la 2,4-dinitrofenilidrazina si basi semplicemente sulla presenza di un gruppo carbonilico dà inoltre luogo a possibili interferenze da parte di aldeidi e chetoni in una matrice reale.

### 6.2.3 CONCLUSIONI

I saggi dell'alluminio cloruro e DNPH sembrano portare ad una quantificazione dei flavonoidi parziale e non correlata con il potere antiossidante delle singole sostanze. Nonostante questo, a partire dai risultati ottenuti si possono trarre delle conclusioni su quali debbano essere le caratteristiche del metodo spettrofotometrico ideale, che unisca ai vantaggi di semplicità e velocità, una quantificazione il più possibile attendibile del potere antiossidante di un campione.

Innanzitutto è opportuno scegliere un metodo che si basi su una reazione direttamente correlata al potere antiossidante ed a cui effettivamente la sostanza partecipi in natura. La risposta che si ottiene per ogni singola sostanza presente nell'alimento sarà proporzionale alla tendenza di quella sostanza a reagire e dunque proporzionale al potere antiossidante della sostanza stessa. In caso contrario si potrebbero avere risposte proporzionali, ad esempio, alla tendenza a reagire con 4-amminofenazone (metodo enzimatico), alla formazione di complessi ( $AlCl_3$ ) o alla reazione con gruppi carbonilici (metodo DNPH), che non sono correlati al potere antiossidante.

Il risultato finale può essere influenzato dalla tecnica di misura adottata. Nei metodi di determinazione della quantità di reagente misurando l'assorbanza del prodotto si può avere una sottostima dell'analita: ogni polifenolo presente nell'alimento porta alla formazione di un prodotto diverso, che presenta bande di assorbimento in posizioni differenti dello spettro; di conseguenza effettuare una determinazione ad una lunghezza d'onda fissa, pur essendo molto comodo, potrebbe dar luogo ad errore. In un metodo ideale si effettua la determinazione della quantità di analita misurando la diminuzione di assorbanza del reagente, piuttosto che l'aumento di assorbanza del prodotto: tale valore risulta indipendente dal tipo di molecola che ha reagito, ma solo dalla tendenza della sostanza a partecipare alla reazione.

Se si verificano entrambe le condizioni si ottiene un metodo nel quale il risultato ottenuto dipende effettivamente dal potere antiossidante del campione, come accade nel metodo DPPH. Questo metodo presenta comunque degli svantaggi: il DPPH<sup>\*</sup> è un radicale stabile che non presenta similitudini con i ROS; inoltre non è endogeno e la reazione avviene in etanolo, dunque non vengono riprodotte esattamente le condizioni nelle quali le sostanze antiossidanti partecipano allo *scavenging* di radicali liberi all'interno dell'organismo. Pare infine che con alcuni polifenoli la reazione non sia quantitativa [25] e vengano quindi sottostimati alcuni analiti, come si è effettivamente osservato nel paragrafo 6.1.2. Nonostante questo, tra i metodi analizzati, il metodo DPPH è quello che fornisce risultati più simili a quelli del metodo IPL, preso come riferimento, sia nei flavonoidi puri, che nelle matrici alimentari.

**PARTE II.**

**PROGETTAZIONE E  
MESSA A PUNTO DI  
BIOSENSORI**



## 7 - I biosensori -

Un biosensore è un dispositivo in grado di fornire un'informazione analitica quantitativa o semi-quantitativa utilizzando un elemento di riconoscimento biologico, in diretto contatto spaziale con il trasduttore [109]. Un tipico biosensore è costituito da tre elementi:

- Un elemento biologico (enzima, tessuto, ecc.) che è la parte sensibile alla concentrazione di analita;
- un trasduttore, che converte un cambiamento delle proprietà fisiche o chimiche della soluzione analizzata in un segnale misurabile;
- un processore del segnale o altri elementi elettronici che permettono la lettura del segnale.

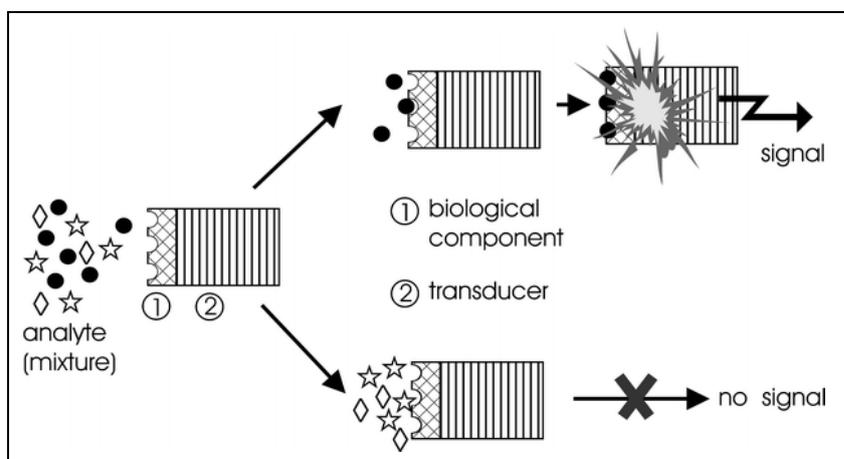


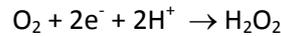
Figura 7.1. Schema di un generico biosensore [110].

L'elemento biologico è il motivo dell'elevata selettività dei biosensori: come si osserva in Figura 7.1, infatti, solo le sostanze che sono in grado di interagire con l'elemento biologico immobilizzato danno vita ad un segnale analitico; eventuali interferenti presenti nella matrice non forniscono segnale.

### 7.1 Origini dei biosensori

Le origini dei biosensori risalgono alla metà degli anni Cinquanta, quando venne costruito un elettrodo in grado di misurare la concentrazione di ossigeno: il cosiddetto "elettrodo ad ossigeno di Clark". In un sistema di questo tipo una normale coppia di elettrodi (elettrodo di lavoro di platino ed

elettrodo di riferimento (Ag/AgCl) viene circondata da una membrana di plastica permeabile ai gas, in modo che solo l'ossigeno (e non altre sostanze riducibili) possa raggiungere la coppia di elettrodi. La differenza di potenziale applicata ai due elettrodi è tale da determinare la riduzione immediata dell'ossigeno presente in soluzione.



La corrente che si genera è dunque direttamente proporzionale alla concentrazione di ossigeno.

L'elettrodo ad ossigeno è stato utilizzato nella messa a punto del primo biosensore della storia, descritto da Clark e Lions nel 1962 [111] e costruito per la determinazione del glucosio nel sangue di pazienti da sottoporre ad intervento chirurgico. Materialmente tale biosensore si costruisce posizionando un film di enzima glucosio ossidasi sull'elettrodo di Clark. L'enzima viene immobilizzato utilizzando una seconda membrana semipermeabile del tipo da dialisi (acetato di cellulosa), che permette al glucosio di raggiungere il sensore, ma non all'enzima di diffondere all'esterno.

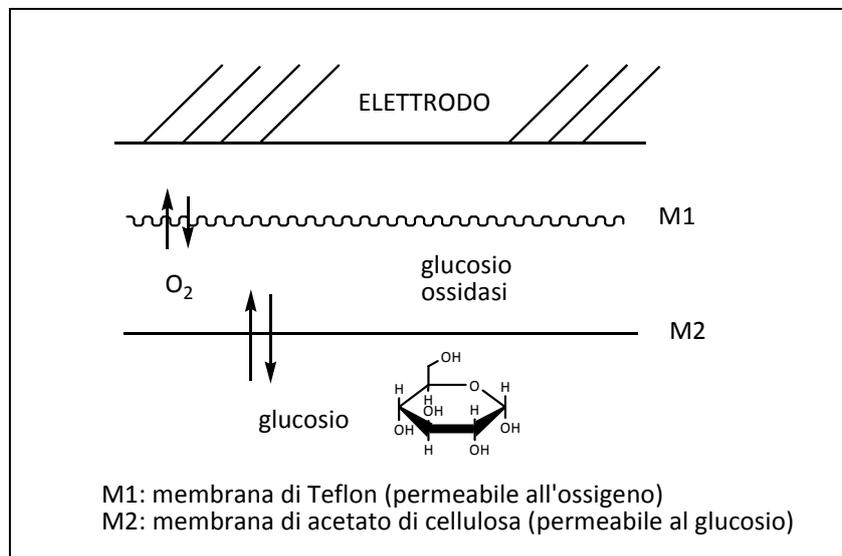
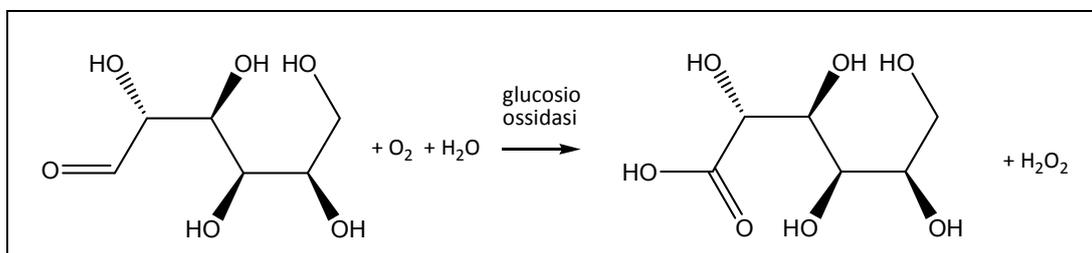


Figura 7.2. Schema del primo biosensore per il glucosio, messo a punto da Clark e Lions nel 1962.

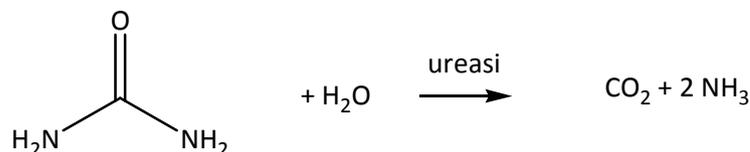
Il biosensore si basa sulla reazione di ossidazione del glucosio catalizzata dalla glucosio ossidasi.



Il glucosio che diffonde nel sensore determina dunque una diminuzione nella concentrazione di ossigeno, che viene rilevata all'elettrodo [112].

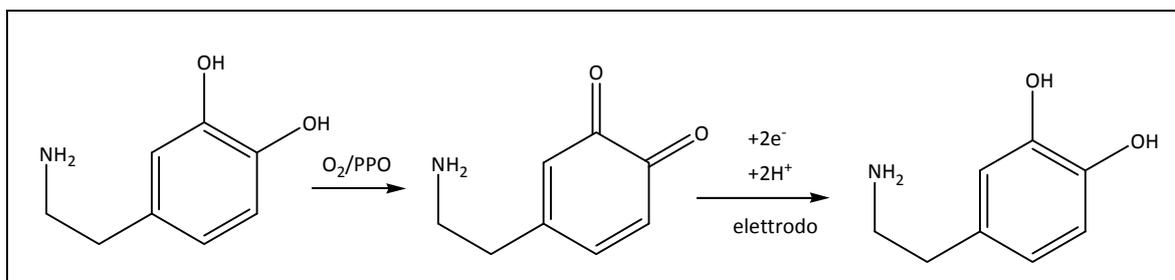
Il dispositivo di Clark non ebbe mai una grande diffusione nella pratica terapeutica; tuttavia l'apparecchio, formato da un composto biologico ed un trasduttore fisico, rappresentò un modello per le successive ricerche di Clark e altri [113].

Un altro biosensore fu messo a punto successivamente da Guibault e Montalvo nel 1969, per la determinazione dell'urea. In questo caso veniva sfruttato l'enzima ureasi, che trasforma l'urea in anidride carbonica e ammoniaca.



In un sistema di questo tipo, la concentrazione di ammoniaca è monitorata attraverso un elettrodo iono-selettivo. Viene misurato il potenziale dell'elettrodo, proporzionale alla concentrazione di ammoniaca sviluppata [112].

Nei decenni successivi molti sono stati gli studi sui biosensori e gli sviluppi della ricerca hanno evidenziato che i singoli enzimi non sono gli unici biocatalizzatori utili: anche certi preparati tissutali possono catalizzare una serie complessa di reazioni chimiche. Tra questi, curiosità ed interesse ha riscosso l'utilizzo della polpa di banana, che, se impiegata come elemento biologico, può dare vita ad un biosensore per la determinazione della dopamina, un importante neurotrasmettitore. Il dispositivo sfrutta l'azione della polifenolo ossidasi (PPO), presente nella polpa di banana, che catalizza l'ossidazione da parte dell'ossigeno della forma di-idrossi della dopamina nella forma chinonica. La riduzione elettrochimica della forma chinonica produce una corrente misurabile e direttamente proporzionale alla quantità di dopamina presente inizialmente [112].



Gli studi sui biosensori sono poi proseguiti, grazie anche ai progressi della tecnologia, verso una miniaturizzazione degli elementi elettronici, oltre che nell'applicazione di altri tipi di trasduttori innovativi, come le fibre ottiche o nello studio di membrane in grado di proteggere più a lungo l'elemento biologico. Lo studio di nuovi tipi di biosensori o di nuove tecniche di immobilizzazione del biomateriale sono di grande interesse in quanto vi è una richiesta sempre più ampia di tecniche che permettano di ottenere informazioni analitiche veloci, affidabili ed accurate in campo biomedico, ambientale ed industriale [114].

## 7.2 Classificazione dei biosensori

I biosensori si possono classificare a seconda di diversi criteri:

- a) tipo di biosensore (prima, seconda, terza generazione);
- b) tipo di elemento di riconoscimento molecolare (enzima, DNA, ...);
- c) tipo di trasduzione (elettrochimica, ottica, ...).

### 7.2.1 GENERAZIONI DI BIOSENSORI

La classificazione attraverso le generazioni permette di seguire il progresso associato allo studio dei biosensori, seguendo un ordine cronologico, a partire dai più semplici modelli che si basavano sull'elettrodo ad ossigeno di Clark a quelli più moderni.

#### 7.2.1.1 PRIMA GENERAZIONE

I biosensori di prima generazione sono quelli che si basano sulla riduzione dell'ossigeno molecolare e utilizzano l'elettrodo di Clark. La misura però presenta alcuni problemi: la concentrazione di ossigeno nell'ambiente circostante deve essere controllata e costante; l'ossigeno inoltre è caratterizzato da un potenziale di riduzione abbastanza elevato in valore assoluto (-0.7 V), che fa sì che la misura di corrente sia soggetta ad interferenze. Il primo metodo utilizzato per aggirare questo problema fu la misura dell'ossidazione dell' $\text{H}_2\text{O}_2$ , che viene generata dalla reazione del glucosio con l'ossigeno (paragrafo 7.1), ma in questo caso è necessario applicare un potenziale elevato in senso opposto (+0.65 V). Si è quindi passati ad un nuovo tipo di biosensore, detto "di seconda generazione", in cui l'ossigeno viene rimpiazzato da un'altra molecola [112].

#### 7.2.1.2 SECONDA GENERAZIONE

Nei sistemi con biosensori di seconda generazione viene inserita una molecola detta "mediatore redox" nell'ambiente di reazione: il mediatore ha la funzione di sostituire l'ossigeno ossidandosi o riducendosi all'elettrodo. Un buon mediatore deve dar luogo ad una reazione redox reversibile, veloce, ed avere un basso potenziale di riduzione: in questo modo si aggira il problema delle interferenze riscontrato con l'ossigeno. È bene inoltre che sia stabile in entrambe le sue forme redox. I mediatori più usati sono cationi di metalli di transizione, come il ferro, e loro complessi. Un mediatore molto efficace è il ferrocene.

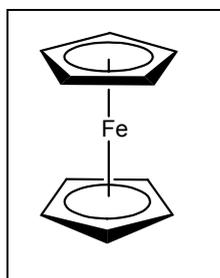
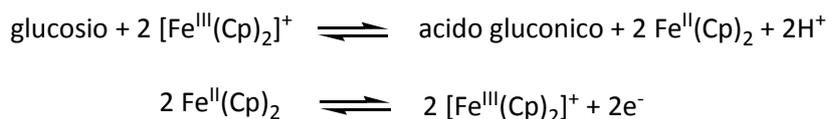


Figura 7.3. Formula di struttura del ferrocene.

In presenza di ferrocene la reazione di determinazione del glucosio diventa dunque:



CP: ciclopentadienile

L'ossidazione del glucosio determina una riduzione del ferrocene che viene poi riossidato all'elettrodo. La corrente misurata è proporzionale alla concentrazione di glucosio presente in soluzione [112].

### 7.2.1.3 TERZA GENERAZIONE

Il passo successivo è stato quello di eliminare sia l'ossigeno che il mediatore redox cercando di ossidare o ridurre l'enzima direttamente all'elettrodo. Dato che le proteine tendono a denaturarsi sulla superficie dell'elettrodo, il contatto diretto tra enzima ed elettrodo viene raggiunto modificando la superficie elettrodica con gruppi funzionali che possano reagire con alcuni residui aminoacidici dell'enzima e formare dei legami temporanei [112].

Le tre generazioni di biosensori si basano tutte su una reazione enzimatica e la misura è di tipo amperometrico. Con l'avanzare dell'interesse verso queste tecniche analitiche, si sono studiati biosensori in cui possono essere diversi sia l'elemento biologico che la trasduzione.

### 7.2.2 ELEMENTI DI RICONOSCIMENTO MOLECOLARE

I biosensori si differenziano dai sensori chimici per il fatto di possedere un elemento di riconoscimento molecolare di tipo biotico. La classificazione, a seconda dell'elemento molecolare, suddivide i biosensori in due categorie:

- biosensori a bioaffinità: viene sfruttata la formazione di un complesso analita/elemento biologico (DNA, antigene/anticorpo...);
- biosensori biocatalitici: lo strato di riconoscimento molecolare è un catalizzatore (enzima, tessuti, ...).

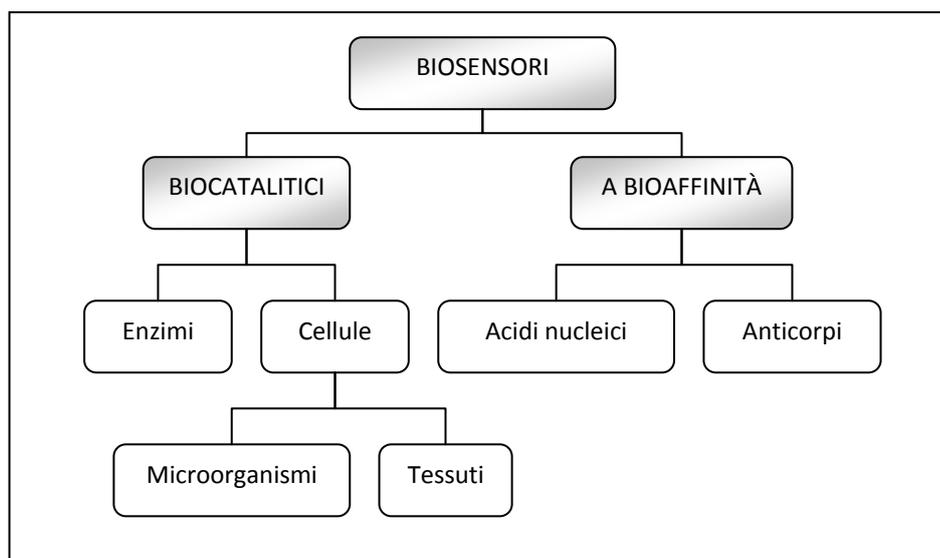


Figura 7.4. Classificazione dei biosensori in base all'elemento di riconoscimento molecolare [115].

### **7.2.2.1 BIOSENSORI A BIOAFFINITÀ**

Nei biosensori a bioaffinità il sistema di riconoscimento tra elemento biologico ed analita è basato sulla formazione di complessi di molecole biologiche. Molto comuni sono gli “immunosensori”, che si basano sulla formazione di complessi antigene/anticorpo (l’uno utilizzato come elemento biologico del sensore, se l’altro è l’analita) ed i sensori a DNA. In entrambi i casi si tratta di un metodo di riconoscimento estremamente selettivo, in quanto ciascun anticorpo riconosce solo il suo antigene e analogamente ciascuna sequenza di DNA è in grado di legarsi solo alla sua sequenza complementare.

Un esempio di immunosensore utilizzato commercialmente è il test di gravidanza. In questo caso si determina la presenza dell’ormone gonadotropina corionica, presente nelle donne in gravidanza, utilizzando l’anticorpo dell’ormone come elemento biologico del biosensore [112].

### **7.2.2.2 BIOSENSORI BIOCATALITICI**

I biosensori biocatalitici si basano invece su una reazione catalizzata da un enzima. L’elemento biologico può essere un enzima presente nella sua forma libera o all’interno di un sistema più complesso, come una cellula, un tessuto o un microrganismo. A seconda della forma in cui l’enzima si trova la tecnica può variare le sue caratteristiche.

Quando l’enzima è libero è al massimo della sua attività ed il biosensore è molto più selettivo. D’altra parte, però, l’enzima purificato è costoso e si degrada facilmente: il biosensore ha un tempo di vita inferiore.

Se viene immobilizzato un tessuto o una cellula, l’enzima si trova nel suo ambiente naturale e si degrada molto più lentamente; è anche molto più stabile nei confronti di modifiche di pH, temperatura, forza ionica. Dal momento che all’interno di un tessuto o di una cellula sono presenti diversi enzimi, utilizzando questi elementi per il riconoscimento molecolare si perde in selettività e la massa più grande presente sul trasduttore può dare problemi di diffusione del substrato, dando origine a risposte analitiche più lente [112].

## **7.2.3 TRASDUZIONE**

A seconda del tipo di trasduzione i biosensori si possono suddividere in: elettrochimici, ottici, termici e piezoelettrici.

### **7.2.3.1 BIOSENSORI ELETTROCHIMICI**

I biosensori elettrochimici sono i più utilizzati per la loro semplicità, la velocità di risposta ed il minor costo, rispetto agli altri tipi di biosensori. La determinazione avviene attraverso una reazione redox che genera un segnale, misurato da un rilevatore elettrochimico. A seconda del tipo di rilevatore e di segnale misurato i biosensori elettrochimici possono a loro volta suddividersi in:

- potenziometrici: misurano il potenziale di cella a corrente zero;
- amperometrici: misurano la corrente di cella, quando viene applicato un potenziale (fisso o variabile nel tempo);
- conduttimetrici: misurano la conducibilità della soluzione di analita.

Una descrizione più accurata dei biosensori elettrochimici si trova nel paragrafo 7.4.

### 7.2.3.2 **BIOSENSORI OTTICI**

I biosensori ottici si basano sulla misura di luce assorbita o emessa come risultato di una reazione chimica o biologica. In questo tipo di biosensori sono spesso utilizzate fibre ottiche per guidare le onde elettromagnetiche al rilevatore. Anche se questi biosensori sono molto sensibili, presentano degli svantaggi, ad esempio non possono essere utilizzati in ambienti torbidi.

### 7.2.3.3 **BIOSENSORI TERMICI**

Nei biosensori con trasduzione termica si sfruttano reazioni biochimiche che coinvolgono un assorbimento o una produzione di calore. Spesso però parte del calore prodotto può andare perso nell'ambiente e non essere rilevato. A causa della bassa sensibilità questi metodi sono scarsamente utilizzati [114].

### 7.2.3.4 **BIOSENSORI PIEZOELETTRICI**

In questo tipo di biosensori si sfrutta la generazione di una corrente elettrica da parte di un cristallo in vibrazione. La frequenza della vibrazione dipende dalla massa appoggiata sulla superficie del cristallo, che può essere legata ad una reazione biochimica [112].

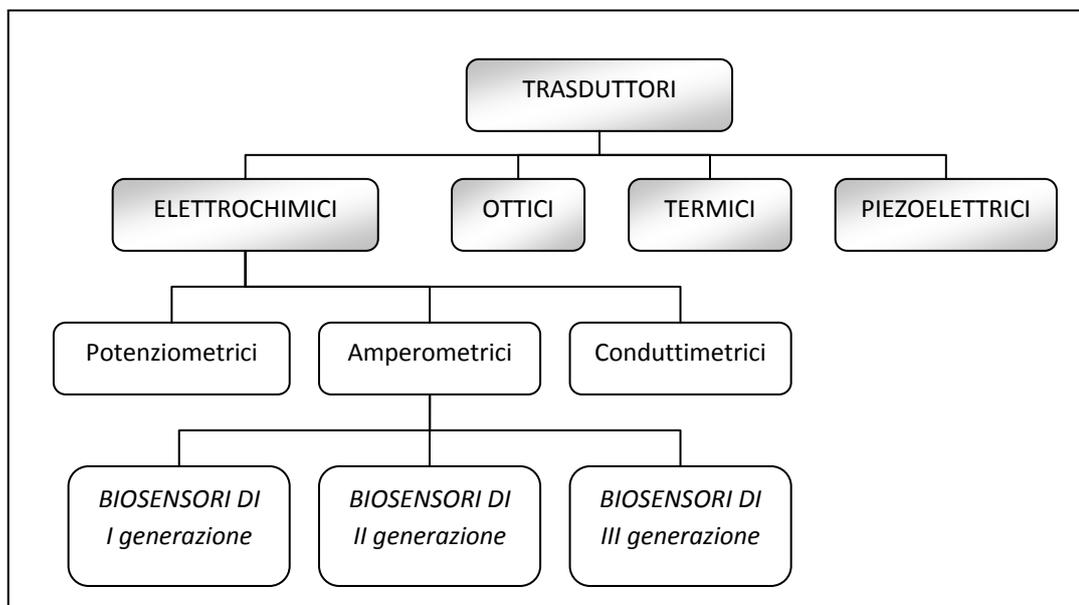


Figura 7.5. Classificazione dei biosensori in base al trasduttore.

## 7.3 **Immobilizzazione dell'elemento biologico**

Una fase fondamentale della costruzione di un biosensore è l'immobilizzazione dell'elemento biologico, in quanto strettamente legato al tempo di vita del biosensore. Di seguito vengono descritte varie tecniche di immobilizzazione; in realtà spesso non vengono utilizzate singolarmente, ma vengono accoppiate più tecniche per una singola immobilizzazione.

### **7.3.1 ADSORBIMENTO**

L'adsorbimento dell'elemento biologico sulla superficie del trasduttore è la tecnica più semplice e datata. Non sono richiesti reagenti, né procedure particolari. Il legame è però molto debole e la vita del sensore piuttosto breve. Questo metodo viene utilizzato solo per esperimenti esplorativi.

### **7.3.2 MICROINCAPSULAMENTO**

Questa è la tecnica impiegata nel primo biosensore per il glucosio. In questo metodo si utilizza una membrana per intrappolare il materiale biologico sul trasduttore. Si ottiene in questo modo una buona stabilità dell'elemento biologico a variazioni di pH, forza ionica, potenziale e concentrazione di substrato ed un'elevata specificità. I materiali di cui sono costituite solitamente tali membrane sono acetato di cellulosa, policarbonato, collagene, politetrafluoroetilene, Nafion o poliuretano.

### **7.3.3 INTRAPPOLAMENTO**

In questa tecnica si prepara un gel polimerico direttamente nella soluzione contenente l'elemento biologico, prima della deposizione sul trasduttore. In questo modo la biomolecola è intrappolata all'interno del gel: ciò può portare ad una perdita dell'attività del biosensore, anche a causa della difficoltà del substrato nel raggiungere l'elemento biologico, attraverso il gel polimerico.

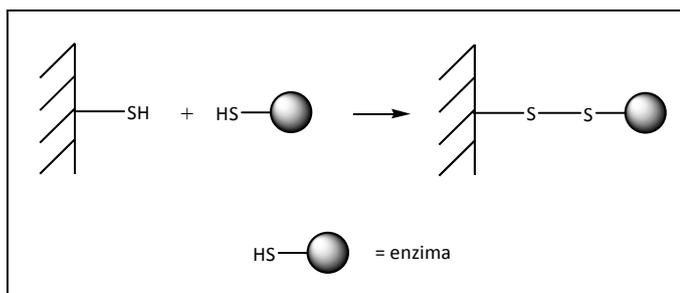
### **7.3.4 RETICOLAZIONE**

Questo metodo sfrutta agenti polifunzionali per legare il biomateriale al supporto solido. I più comuni materiali utilizzati sono glutaraldeide, esametildiisocianato e 1,5-dinitro-2,4-difluorobenzene. Anche in questo caso si può avere perdita dell'attività e limitata diffusione del substrato verso l'elemento biologico.

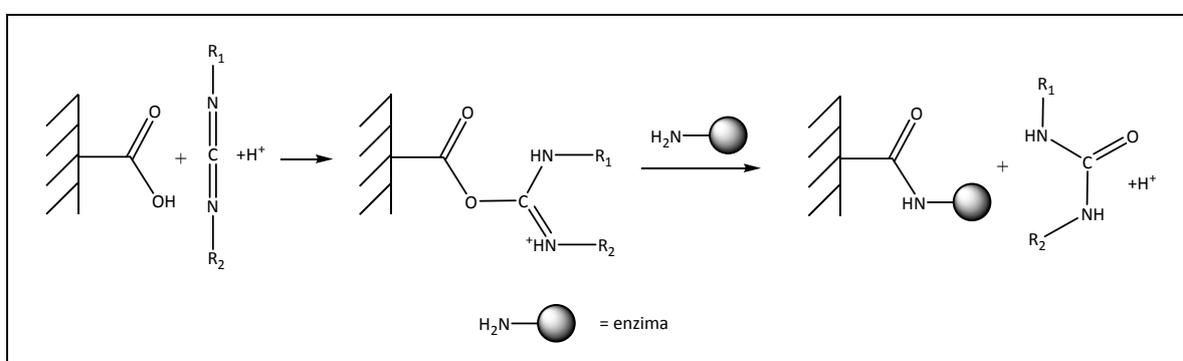
### **7.3.5 FORMAZIONE LEGAMI COVALENTI**

In questa tecnica si sfrutta il fatto che, se l'elemento biologico è un enzima, si possono utilizzare alcuni gruppi funzionali della proteina, non coinvolti nell'attività catalitica, per formare dei legami covalenti con la superficie del trasduttore. In genere la reazione viene condotta in presenza del substrato, per proteggere il sito attivo dell'enzima; i gruppi funzionali dell'enzima adatti a questo scopo sono gruppi amminici, carbossilici, tiolici, idrossilici, fenolici e imidazolici. Il vantaggio di questa tecnica è il fatto che l'enzima non viene rilasciato durante la misura, in quanto legato fortemente al supporto.

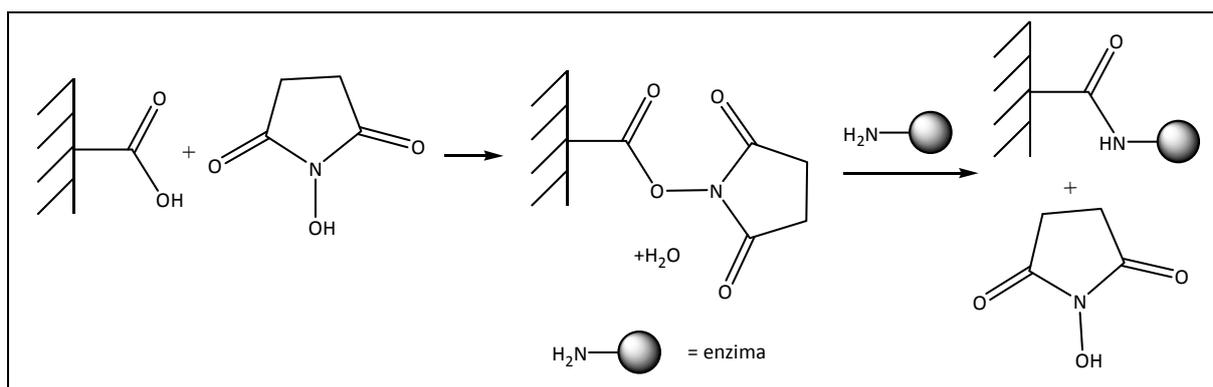
La procedura è piuttosto lunga perché è necessario modificare preventivamente la superficie del trasduttore in modo da ottenere gruppi funzionali che possano poi formare legami covalenti con l'enzima direttamente o attraverso reazione con una sostanza intermedia. Un esempio di reazione diretta tra un gruppo funzionale del trasduttore e l'enzima è l'accoppiamento di gruppi tiolici su residui cisteinici dell'enzima.



I residui lisinici dell'enzima sono i più comuni punti di ancoraggio per la formazione di legami covalenti [116]. Comuni reagenti che si possono utilizzare per facilitare la formazione di forti legami tra l'enzima e la superficie del trasduttore sono le carbodimmidi ( $R_1N=C=NR_2$ ). Il reagente si lega ai gruppi carbossilici del trasduttore attivando il carbonio carbonilico come centro elettrofilo e favorendo la formazione di un legame covalente con i gruppi amminici dell'enzima, secondo il seguente schema di reazione [112].



Anche l'*N*-idrossisuccinimide si lega covalentemente al gruppo carbossilico del trasduttore per favorire l'attacco nucleofilo dei gruppi amminici dell'enzima e formare un forte legame ammidico [116].



## 7.4 Biosensori elettrochimici

I biosensori elettrochimici riescono a combinare la sensibilità, evidenziata dai bassi limiti di rilevabilità, dei trasduttori elettrochimici con l'alta specificità dei processi di riconoscimento biologico. Sono inoltre di più basso costo rispetto agli altri tipi di biosensori, semplici da costruire ed utilizzare e, grazie al progresso nel campo delle nanotecnologie, sono anche i più adatti ad essere miniaturizzati.

Scegliere una tecnica elettrochimica permette inoltre di utilizzare piccoli volumi di reazione [117]. Per questi motivi più della metà dei biosensori descritti in letteratura sono di tipo elettrochimico [110].

La reazione redox monitorata può generare una corrente (amperometria), un accumulo di potenziale (potenziometria) o alterare le proprietà conduttive dell'ambiente di reazione (conduttimetria). L'ultimo caso è il meno sfruttato perché la conduttività può variare a seconda della carica, della mobilità e della dissociazione dei singoli ioni presenti in soluzione; inoltre è una tecnica per definizione non selettiva [112].

#### 7.4.1 BIOSENSORI POTENZIOMETRICI

I sensori potenziometrici sono basati sulla misura del potenziale di una cella elettrochimica, a corrente nulla. Comuni esempi sono l'elettrodo a pH e gli elettrodi iono-selettivi per l'identificazione di ioni come  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  e  $Cl^-$  [117].

In generale il potenziale di cella dipende dalla concentrazione delle specie presenti in soluzione e la relazione è espressa dall'equazione di Nernst:

$$E = E^\ominus + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}}$$

ove  $E^\ominus$  rappresenta il potenziale di riduzione standard della coppia redox; R è la costante universale dei gas; T è la temperatura; n è il numero di elettroni scambiati; F è la costante di Faraday;  $a_{ox}$  è l'attività della specie ossidata e  $a_{red}$  l'attività della specie ridotta.

Volendo determinare la concentrazione di uno specifico analita si può creare una cella utilizzando due semi-celle con la stessa coppia redox, ma in concentrazione differente. Questo è il principio utilizzato in un sensore iono-selettivo: una soluzione standard a concentrazione nota viene tenuta separata dalla soluzione da analizzare attraverso una membrana. Ai due lati della membrana si genera una differenza di potenziale che dipende dalla differenza di concentrazione tra le due soluzioni, ovvero solo dalla concentrazione della soluzione di analita [112].

Questi sensori chimici possono essere convertiti in biosensori immobilizzando un elemento biologico sulla loro superficie: è il caso del biosensore ad urea, descritto nel paragrafo 7.1, dove si utilizza un elettrodo iono-selettivo specifico per lo ione ammonio in cui è immobilizzata ureasi [112]. Un altro esempio è l'immobilizzazione della penicillasi, che catalizza la conversione della penicillina in penicilloato, con produzione di  $H^+$ , su un elettrodo a pH [117].

Il fatto che il potenziale dipenda dal logaritmo della concentrazione e non sia invece direttamente proporzionale alla concentrazione determina una minore sensibilità di questo tipo di sensori, rispetto, ad esempio, a quelli amperometrici [112].

#### 7.4.2 BIOSENSORI VOLTAMMETRICI/AMPEROMETRICI

Le tecniche voltammetriche e amperometriche sono caratterizzate dall'applicazione di una differenza di potenziale tra due elettrodi e dalla misurazione di una corrente, risultato di una reazione elettrochimica che avviene all'elettrodo di lavoro.

Nelle tecniche voltammetriche il potenziale applicato varia durante la misura. Esistono diversi tipi di voltammetria, a seconda della modalità con cui viene modificato il potenziale. Nella voltammetria a scansione lineare, in cui il potenziale viene variato linearmente nel tempo, il responso in corrente ha in genere la forma di un picco, come si osserva in Figura 7.6.

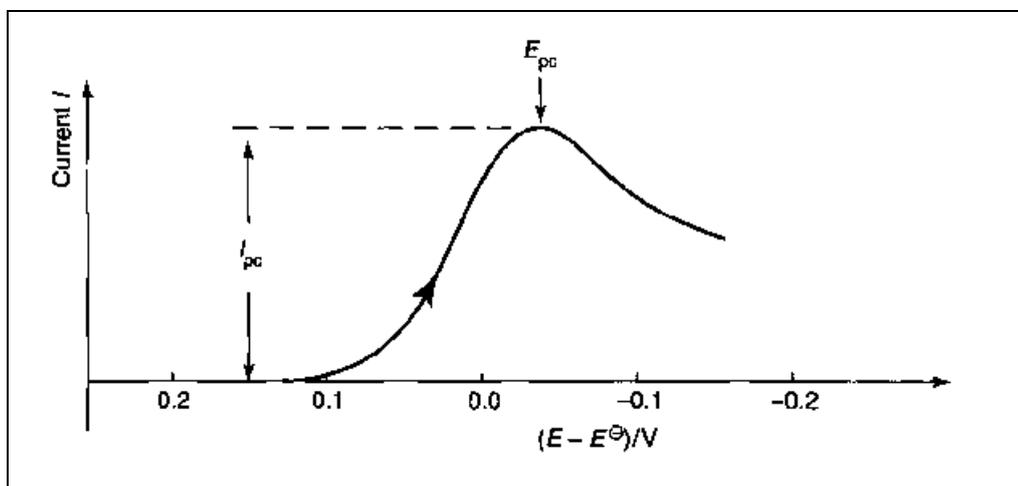


Figura 7.6. Voltammogramma di scansione lineare di una generica reazione di riduzione.  $E_{pc}$  = potenziale di picco catodico;  $i_{pc}$  = corrente di picco catodico [118].

Variando il potenziale - in senso positivo o negativo, a seconda che la reazione sia di ossidazione o riduzione - l'intensità di corrente misurata aumenta gradualmente a causa del trasferimento di carica sempre più massiccio, generato dalla reazione redox. Al potenziale di riduzione (o di ossidazione) dell'analita si raggiunge un picco: la corrente di picco è proporzionale alla concentrazione di analita.

Anche nella voltammetria ciclica, come nella voltammetria a scansione lineare, il potenziale viene variato linearmente: in questo caso però, dopo la formazione di un picco, la direzione di scansione viene invertita ed il potenziale viene riportato al suo valore originario. In questo modo vengono monitorate sia la reazione diretta che quella inversa ed è possibile ottenere ulteriori informazioni sul sistema redox in esame, quali ad esempio la reversibilità della reazione. Altri tipi di voltammetria sono: la voltammetria idrodinamica, la voltammetria ad impulso differenziale, la voltammetria ad onda quadra, la polarografia [117].

In amperometria, invece, si effettua una misura dell'intensità di corrente in funzione del tempo, mentre viene mantenuto un potenziale costante all'elettrodo: se la reazione è di riduzione si sceglie come potenziale un valore in cui la specie ridotta sia stabile, in modo da determinare una conversione immediata e quantitativa della specie ossidata. In genere si ha un decadimento della corrente nel tempo, ma dopo un certo periodo la corrente raggiunge una condizione approssimativamente di stato stazionario.

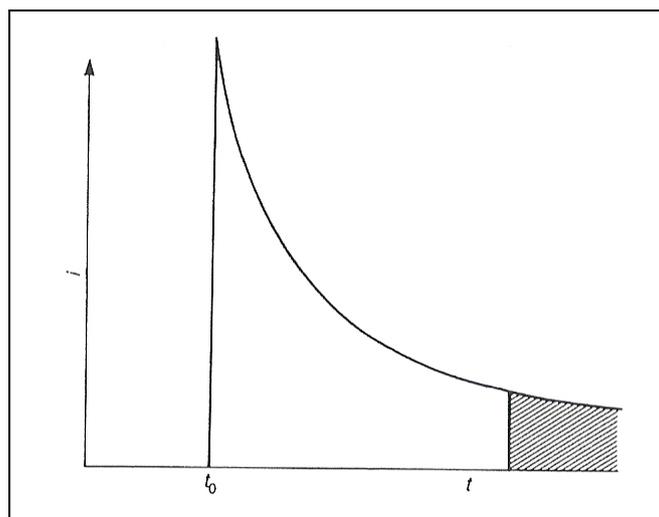


Figura 7.7. Cronoamperogramma di una generica reazione di riduzione. È evidenziata in tratteggio la condizione di stato stazionario [112].

Il valore di corrente di stato stazionario può essere utilizzato in modo più semplice per la quantificazione dell'analita. Tale valore di corrente dipende dalla concentrazione e non più dal tempo:

$$i = \frac{nFAD}{\delta} C$$

$n$  è il numero di elettroni scambiati;  $F$  è la costante di Faraday;  $A$  è l'area dell'elettrodo;  $D$  è il coefficiente di diffusione;  $\delta$  è lo spessore dello strato di diffusione;  $C$  è la concentrazione di analita [119].

Un metodo per ottenere in tempi più rapidi un valore di corrente costante è quella di operare in condizioni idrodinamiche: in questo modo si provvede a velocizzare il trasporto di massa all'elettrodo, mantenendo comunque in prossimità dell'elettrodo un trasporto di massa esclusivamente diffusivo.

La trasduzione amperometrica è molto utilizzata sia per biosensori catalitici che di bioaffinità a causa della sua semplicità e del basso limite di rilevabilità [117].

## 7.5 Biosensori per la determinazione dei polifenoli

Sono noti molti tipi di biosensori per la determinazione della capacità antiossidante. La maggior parte di questi usa enzimi della classe delle ossidasi in combinazione con trasduttori elettrochimici, in particolare sistemi amperometrici. I biosensori enzimatici sono infatti caratterizzati da un'eccellente selettività nei confronti di molecole biologiche e possono determinare direttamente composti antiossidanti anche in matrici complesse, senza che vi sia la necessità di preventive procedure di separazione. Inoltre permettono di ottenere informazioni sullo stato antiossidante di un campione in tempi rapidi; ciò li rende molto utili per misure in tempo reale, con possibilità anche di automatizzazione a basso costo [109].

Per la determinazione della capacità antiossidante si possono seguire diversi meccanismi: alcuni biosensori sono adatti alla misura di specifiche molecole biologiche (ad esempio DNA) la cui formula di struttura viene modificata come risultato di una reazione con i radicali liberi. Altri tipi di biosensori monitorano alcuni radicali liberi dell'ossigeno, come il radicale anione superossido, ma queste specie

sono difficili da determinare a causa della loro alta reattività. Altre tecniche consistono invece nel determinare la concentrazione di specifici composti antiossidanti, come l'acido ascorbico o i polifenoli [109].

Il funzionamento di un biosensore per i polifenoli è basato sulla serie di reazioni schematizzata in Figura 7.8.

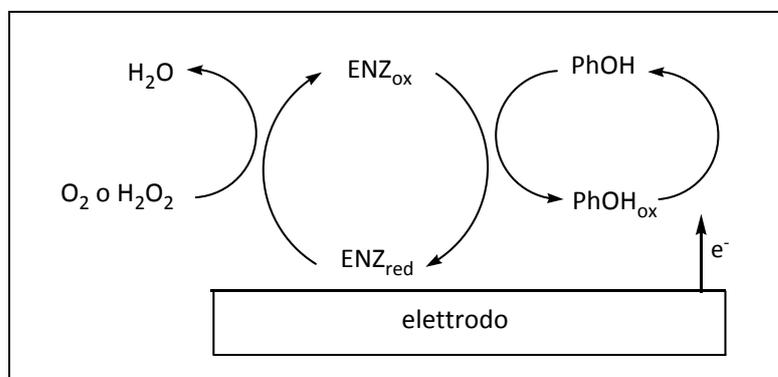


Figura 7.8. Schema di funzionamento del biosensore per i polifenoli: ossidazione del polifenolo PhOH catalizzata dall'enzima; riduzione del polifenolo ossidato all'elettrodo.

L'enzima immobilizzato sull'elettrodo viene ossidato in presenza di ossigeno o perossido di idrogeno e poi riconvertito nella sua forma originaria, attraverso una reazione redox in cui è coinvolto un mediatore: il polifenolo nella sua forma ridotta. La corrente misurata è quella generata dalla successiva riduzione che avviene all'elettrodo e che riporta il polifenolo nella sua forma originaria [109].

Gli enzimi che possono essere utilizzati per la costruzione di un biosensore per polifenoli sono laccasi, tirosinasi e perossidasi. Biosensori a perossidasi vengono raramente costruiti in quanto l'enzima necessita di perossido di idrogeno; nel caso di laccasi e tirosinasi, invece, per avere l'ossidazione dell'enzima è sufficiente l'ossigeno, già presente naturalmente in soluzione [120]. I biosensori più sensibili sono quelli a tirosinasi, ma, a causa della bassa stabilità di questa classe di enzimi, dispositivi di questo tipo presentano brevi tempi di vita [121]. Per questo motivo i biosensori maggiormente studiati sono quelli a laccasi [120-124].

Le laccasi vengono estratte principalmente da funghi, ma sono state isolate anche in piante, certi tipi di batteri e da alcuni insetti. La maggior parte delle laccasi fungine sono proteine globulari monomeriche di peso molecolare approssimativamente 60-70 kDa con un punto isoelettrico intorno a pH 4.0; sono generalmente glicosidate, con un'estensione della glicosidazione tra il 10 ed il 25%. Le laccasi catalizzano l'ossidazione monoelettronica di *orto*- e *para*-difenoli, amminofenoli, polifenoli, poliammine, aril diammine ed alcuni ioni inorganici, grazie alla presenza di ioni rame all'interno della struttura proteica. L'ossidazione del substrato è accompagnata da una riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua [125].

Le laccasi sono estesamente utilizzate come biocatalizzatori per la loro capacità di ossidazione non specifica e l'utilizzo di ossigeno come accettore di elettroni. Biosensori basati sull'enzima laccasi possono raggiungere fino a 100 giorni lavorativi di tempo di vita [121]. In taluni casi si osserva anche

un miglioramento in termini di intervallo di linearità e limite di rilevabilità per biosensori a laccasi, confrontati con gli analoghi a tirosinasi [120].

Oggetto del presente lavoro è la messa a punto di un biosensore per la misura delle proprietà antiossidanti di soluzioni contenenti polifenoli. Si tratta della prima fase di un più ampio progetto che ha come obiettivo finale la determinazione dei polifenoli direttamente in un campione liquido reale (vino, tè, succo di frutta, ...).

I metodi classici per la valutazione delle proprietà antiossidanti, discussi nella Parte I di questa tesi, sono largamente utilizzati, ma presentano degli svantaggi: richiedono strumentazione adatta, spesso costosa ed ingombrante; le procedure di analisi prevedono spesso fasi di preparazione del campione, per cui è richiesta una manualità specializzata ed i tempi di analisi in alcuni casi sono lunghi. L'utilizzo della tecnologia dei biosensori in questo campo, come già accennato nel paragrafo 7.5, permette di ottenere risultati in tempi rapidi, limitando inoltre la manualità necessaria alla misura.

Alla luce di questo, si è ritenuto importante lo studio di un biosensore per la misura delle proprietà antiossidanti in campioni alimentari reali (vino, tè, succo di frutta, ...). A questo scopo si è preferito utilizzare un trasduttore amperometrico strumento già presente in commercio (paragrafo 8.2.1), che permette di sostituire l'elemento biologico e variare le condizioni sperimentali, a seconda del substrato da analizzare. Dopo aver effettuato una valutazione sulle varie tecniche riportate in letteratura (paragrafo 7.5) si è scelto di immobilizzare l'enzima laccasi su un elettrodo d'oro e di operare in condizioni idrodinamiche. Per verificare la validità del sistema è stata utilizzata la coppia redox idrochinone/benzochinone: la conversione tra le due specie è infatti altamente reversibile ed il benzochinone possiede un potenziale di riduzione particolarmente basso, che limita il rischio di interferenze. Inoltre le due specie sono di basso costo e sono entrambe disponibili commercialmente.

# 8 - Materiali e metodi nella progettazione di biosensori -

---

## 8.1 Materiali

I reagenti utilizzati sono stati tutti forniti da Sigma-Aldrich Co. (Milano, Italia). Come enzima è stata utilizzata la laccasi da *Trametes versicolor* (E. C. 1.10.3.2).

Tutti i reagenti sono stati conservati in frigo a 4°C, ad eccezione dell'enzima, che è stato conservato in freezer a -18°C. Le soluzioni tampone sono state preparate con acqua Milli-Q, conservate in frigo a 4°C e rinnovate ogni 15 giorni.

## 8.2 Strumentazione

### 8.2.1 MISURE ELETTROCHIMICHE

Per le misure elettrochimiche è stato utilizzato un trasduttore amperometrico Tectronik Senzytech 1 (Tectronik S. r. l., Limena - Pd, Italia). Il sistema è costituito da un'unità di controllo collegata ad una sonda, munita di agitatore (Figura 8.1), nella quale viene inserito un sensore.



Figura 8.1. Immagine del trasduttore amperometrico Tectronik Senzytech 1.

Lo strumento permette di impostare e memorizzare i parametri di misura (potenziale di lavoro, tempi di misura, ...) direttamente dall'unità di controllo e di lavorare in completa autonomia: attraverso lo schermo viene richiesta in tempi prefissati l'introduzione di standard e di analita; in base ai segnali registrati, viene calcolata la concentrazione di analita presente in soluzione. In alternativa lo strumento può essere collegato ad un PC: in fase di messa a punto del sistema ciò è indispensabile per monitorare la variazione di intensità di corrente nel tempo e scegliere le opportune condizioni di lavoro. La gestione dei risultati sul PC è stata effettuata utilizzando il software Biosetup 3.2 (Tectronik S. r. l., Limena - Pd, Italia).

Il Senzytech 1 è altamente versatile: permette infatti di sostituire il sensore e variare le condizioni sperimentali a seconda del substrato da analizzare. Per alcuni analiti, i sensori già pronti per l'utilizzo vengono forniti direttamente dalla casa produttrice, assieme ai flaconi degli standard e al tampone corrispondente. Ad oggi sono disponibili biosensori per la determinazione di glucosio, zuccheri (glucosio e fruttosio), etanolo, acido L-malico, L-lattico e D-lattico in vino; sono in fase di sviluppo biosensori per acidità volatile, fruttosio, saccarosio e polifenoli [126].

Il sensore, la cui immagine è riportata in Figura 8.2, è costituito da tre elettrodi d'oro: due elettrodi di lavoro ( $w_1$  e  $w_2$ ) di diametro 2.1 mm ed un terzo elettrodo che funge sia da riferimento che da contro elettrodo (r-c), di diametro 2.3 mm.

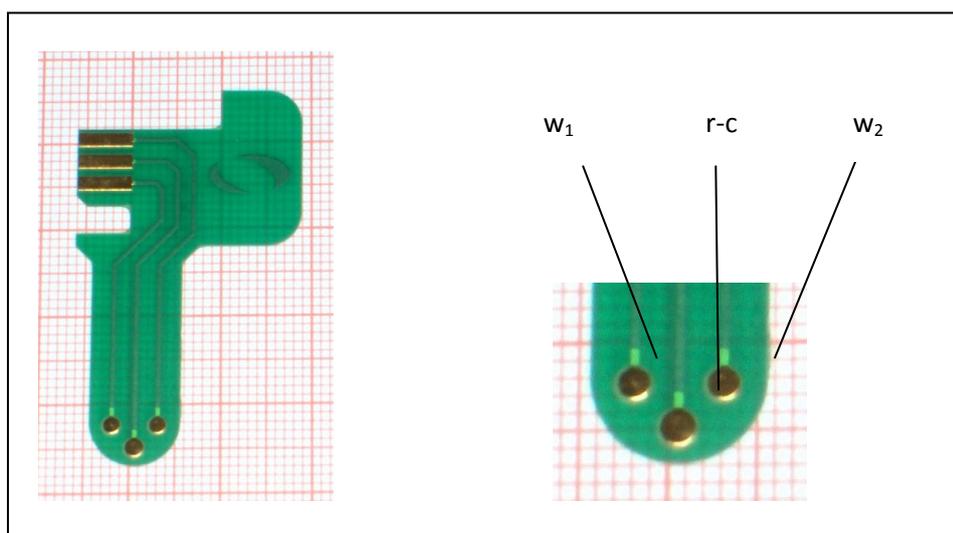


Figura 8.2. Foto del sensore per Tectronik Senzytech 1 con ingrandimento sugli elettrodi.  $w_1$  e  $w_2$ : elettrodi di lavoro; r-c: elettrodo che funge da riferimento e da contro elettrodo.

Lo stesso potenziale viene applicato sia alla coppia di elettrodi  $w_1/r-c$  che alla coppia  $w_2/r-c$ ; tale potenziale viene continuamente monitorato e tenuto costante dall'unità di controllo. Vengono registrati contemporaneamente due segnali: l'intensità di corrente tra  $w_1/r-c$  ( $i_1$ ) e quella tra  $w_2/r-c$  ( $i_2$ ); il segnale in uscita è la differenza tra  $i_1$  e  $i_2$ . Questo sistema permette di limitare fortemente le interferenze: un elettrodo di lavoro ( $w_1$ ) viene modificato immobilizzando l'enzima e viene utilizzato effettivamente per monitorare la reazione elettrochimica. L'intensità di corrente  $i_1$  sarà quindi dovuta soprattutto al trasferimento di carica dell'analita, ma ci potrebbe essere un contributo aggiuntivo dato da specie interferenti. Al secondo elettrodo di lavoro ( $w_2$ ) vengono applicati gli stessi trattamenti previsti per l'elettrodo  $w_1$ , ad eccezione della deposizione dell'enzima:  $i_2$  è dunque una corrente

dovuta solo ad interferenti. Utilizzando per la quantificazione la differenza  $i_1-i_2$  l'eventuale contributo dovuto a specie diverse dall'analita viene eliminato.

### **8.2.2 MISURE UV/VIS**

Per le analisi spettrofotometriche è stato utilizzato uno spettrofotometro UV/VIS Beckman DU 640 (Beckman Coulter S. p. A., Milano, Italia) fornito di cella termostatabile in quarzo (Hellma Italia slr, Milano) con cammino ottico da 1 cm. La temperatura di lavoro è garantita da un termostato Haake K20-DC30.

## **8.3 Metodologie applicate**

### **8.3.1 TRATTAMENTI PRE-IMMOBILIZZAZIONE**

Durante le prove preliminari si è operato proteggendo l'elettrodo  $w_2$ , in modo da ottenere una risposta strumentale dipendente solo dai trattamenti effettuati sull'altro elettrodo di lavoro ( $w_1$ ). Si lava il sensore con etanolo e lo si lascia in immersione per 24 ore in una soluzione 10 mM di cisteamina idrocloruro o acido 3-mercaptopropionico. Successivamente si lava nuovamente con etanolo e si conserva a secco a 4°C [123].

### **8.3.2 IMMOBILIZZAZIONE ENZIMA**

#### **8.3.2.1 PRIMA PROVA DI IMMOBILIZZAZIONE CON EDC E NHS**

Si effettua il trattamento pre-immobilizzazione lasciando in immersione il sensore in una soluzione 10 mM di acido 3-mercaptopropionico per 24 ore. Successivamente su entrambi gli elettrodi di lavoro vengono depositati 5  $\mu$ l di una soluzione di EDC (N-etil-N'-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide) e NHS (N-idrossisuccinimide) entrambe 50 mM; il sensore viene lasciato a riposo per un'ora in cella umida. Dopo aver sciacquato il sensore con acqua milliQ, si depositano solo sull'elettrodo  $w_1$  5  $\mu$ l di laccasi  $10^{-4}$  M e si lascia a riposo per 2 ore in cella umida. Si sciacqua con acqua milliQ e si conserva il sensore in tampone K/P<sub>i</sub> 0.1 M, a pH 7.0 [123].

#### **8.3.2.2 SECONDA PROVA DI IMMOBILIZZAZIONE CON EDC E NHS**

Nella seconda prova di immobilizzazione la concentrazione della soluzione di EDC e NHS viene portata a 0.1 M; il tempo di riposo dopo la deposizione dell'enzima è di 5 ore.

#### **8.3.2.3 IMMOBILIZZAZIONE CON CHITOSANO E GLUTARALDEIDE**

Si prepara una sospensione di chitosano ad alto peso molecolare di concentrazione 10 mg/ml in acido acetico 1%. La sospensione viene lasciata in agitazione per una notte e neutralizzata con NaOH. Vengono depositati 5  $\mu$ l di chitosano su entrambi gli elettrodi di lavoro e 5  $\mu$ l di laccasi solo sull'elettrodo  $w_1$ , lasciando a riposo in cella umida per un'ora. Infine si depositano 5  $\mu$ l di glutaraldeide 1% su entrambi gli elettrodi di lavoro, si lascia asciugare completamente e si conserva a secco a 4°C.



## 9 - Progettazione di un biosensore per la determinazione dei polifenoli -

Come si osserva in Figura 9.1, il sistema prevede l'ossidazione dell'idrochinone a benzochinone catalizzata da laccasi. Applicando un opportuno potenziale, all'elettrodo avviene la riduzione del benzochinone ad idrochinone: la reazione genera una corrente misurabile, proporzionale alla concentrazione di idrochinone presente inizialmente in soluzione.

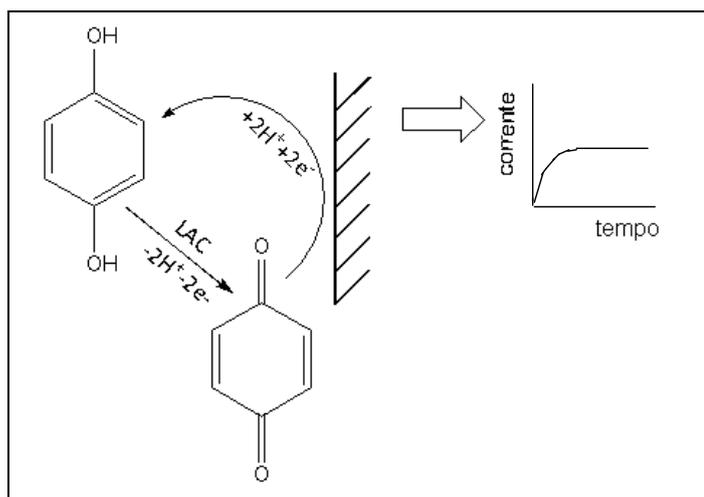


Figura 9.1. Schema di funzionamento del biosensore a laccasi: ossidazione dell'idrochinone catalizzata dall'enzima e successiva riduzione del benzochinone all'elettrodo.

Il tipo di trasduzione permette di effettuare iniezioni consecutive di idrochinone e di monitorare in tempo reale la variazione di intensità di corrente, che risulta correlabile, mediante una curva di taratura, alla quantità di analita aggiunto alla soluzione.

### 9.1 Prove preliminari in assenza di enzima

Si sono effettuate prove preliminari, in assenza di enzima, per scegliere alcuni parametri fondamentali come il potenziale di lavoro e le condizioni sperimentali. In questa prima fase, dunque, ci si è concentrati solo sulla reazione elettrodica di riduzione del benzochinone, al fine di ottenere un segnale ottimale all'elettrodo.

### 9.1.1 SCELTA POTENZIALE DI LAVORO E TRATTAMENTO PRE-IMMOBILIZZAZIONE

Uno dei parametri fondamentali in una misura amperometrica è il potenziale di lavoro: come già accennato nel capitolo 7, la differenza di potenziale che si applica ai due elettrodi deve essere sufficientemente grande in valore assoluto da permettere una riduzione immediata e quantitativa dell'analita. In genere il potenziale di riduzione dipende non solo dalla specie che si riduce all'elettrodo, ma anche dall'ambiente di reazione. È opportuno quindi, prima di effettuare una scelta, tenere anche presente le fasi successive di trattamento dell'elettrodo che si prevede di effettuare.

Una buona tecnica di immobilizzazione dell'elemento biologico prevede una modificazione preventiva dell'elettrodo, al fine di creare dei gruppi funzionali sulla sua superficie, su cui possano successivamente formarsi legami covalenti con l'enzima o con altre molecole. Noto che l'oro ha una grande affinità per lo zolfo, sono state scelte due molecole bifunzionali come alternative per il trattamento pre-immobilizzazione: l'acido 3-mercaptopropionico (MPA) e la cisteamina (CYS), le cui formule di struttura vengono riportate in Figura 9.2. Entrambe le molecole presentano un gruppo tiolico con cui possono legarsi all'oro ed un secondo gruppo disponibile a formare legami covalenti. Si cerca di creare quindi sull'elettrodo un monostrato di gruppi funzionali, carbossilici o amminici (Figura 9.3).

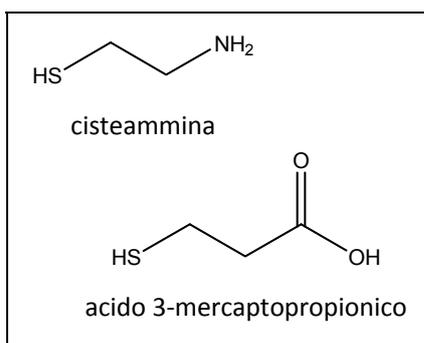


Figura 9.2. Formule di struttura di cisteamina e acido 3-mercaptopropionico.

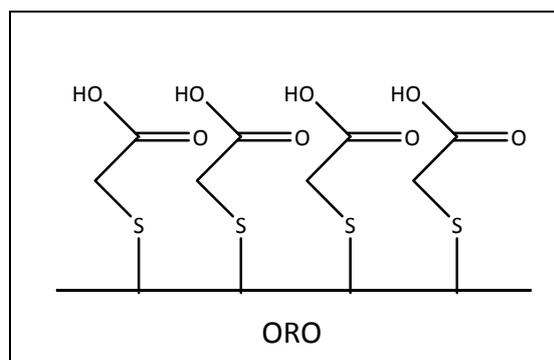


Figura 9.3. Monostrato di acido 3-mercaptopropionico su una superficie d'oro.

I sensori sono stati trattati seguendo la procedura riportata nel paragrafo 8.3.1, utilizzando alternativamente CYS e MPA e, per ciascun trattamento, sono state condotte misure a diverso potenziale: in questo modo si possono ottenere simultaneamente informazioni per l'ottimizzazione del pre-immobilizzazione e del potenziale di lavoro ideale. Le prove sono state effettuate in due diverse soluzioni tampone: sodio acetato e acido N-morfolinetansolfonico (MES), a pH 5.0.

Nei grafici seguenti vengono riportati i risultati ottenuti in termini di variazione di intensità di corrente corrispondente ad iniezioni di quantità note di benzochinone (BQ).

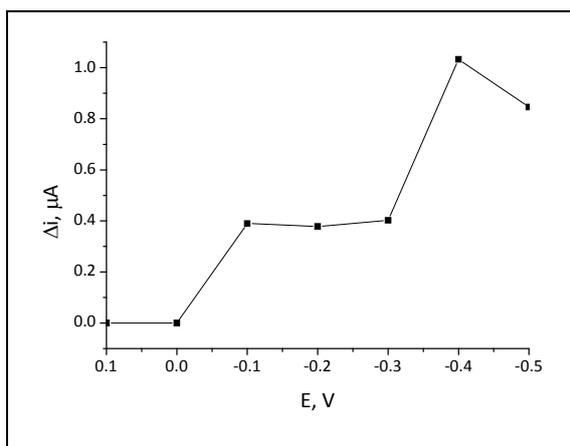


Figura 9.4. Trattamento sensore con CYS 10 mM. Iniezioni di 100  $\mu$ l di BQ 10 mM in 10 ml MES 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 5.0.

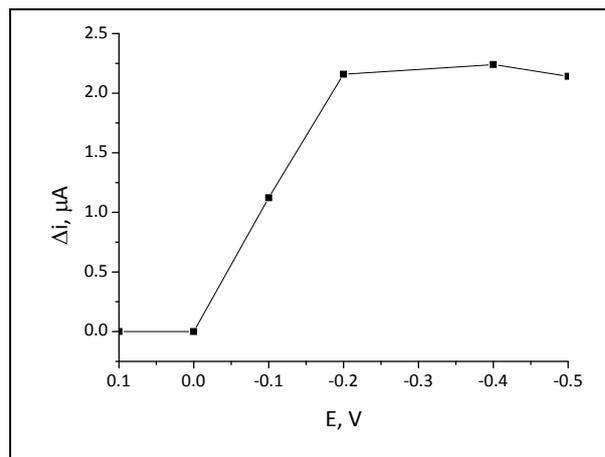


Figura 9.5. Trattamento sensore con MPA 10 mM. Iniezioni di 100  $\mu$ l di BQ 10 mM in 10 ml MES 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 5.0.

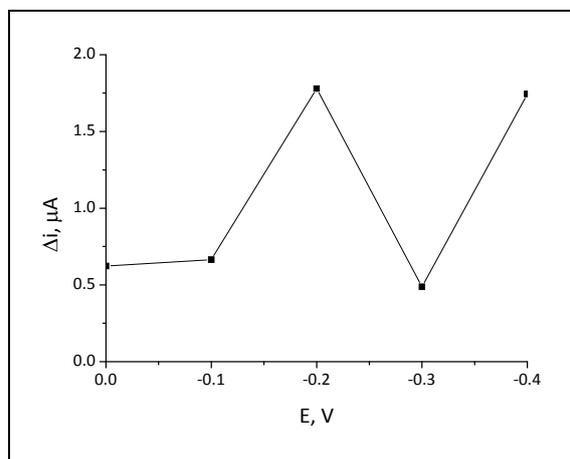


Figura 9.6. Trattamento sensore con CYS 10 mM. Iniezioni di 100  $\mu$ l di BQ 10 mM in 10 ml NaAc 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 5.0.

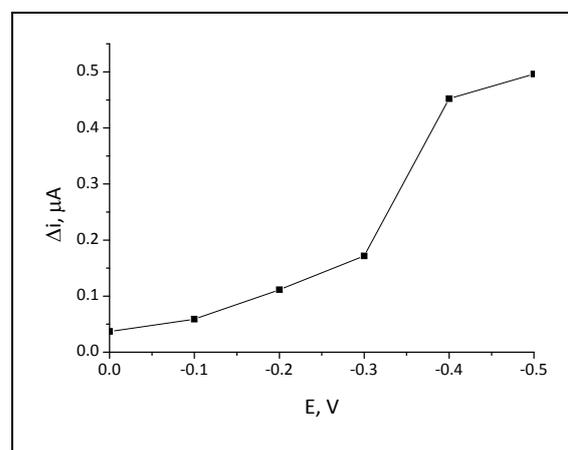


Figura 9.7. Trattamento sensore con MPA 10 mM. Iniezioni di 100  $\mu$ l di BQ 10 mM in 10 ml NaAc 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 5.0.

Come si può osservare in Figura 9.4 e Figura 9.6, effettuando il trattamento con cisteamina, le misure elettrochimiche forniscono risultati, in termini di  $\Delta i$ , che variano in modo non costante all'aumentare del potenziale; trattando invece i sensori con acido mercaptopropionico (Figura 9.5 e Figura 9.7) l'andamento della corrente in funzione del potenziale assume la classica forma a sigmoide. Sembra quindi che il miglior trattamento pre-immobilizzazione sia quello con MPA. In Figura 9.8 si riporta uno degli amperogrammi ottenuti applicando un potenziale di -0.4 V ed utilizzando un sensore trattato con MPA. Si osserva una buona linea di base che non sembra essere soggetta ad interferenze ed una variazione di corrente immediata all'aggiunta di benzochinone, con il segnale che si ristabilizza al nuovo valore di corrente in tempi brevi. Viene quindi scelto il potenziale di lavoro di -0.4 V.

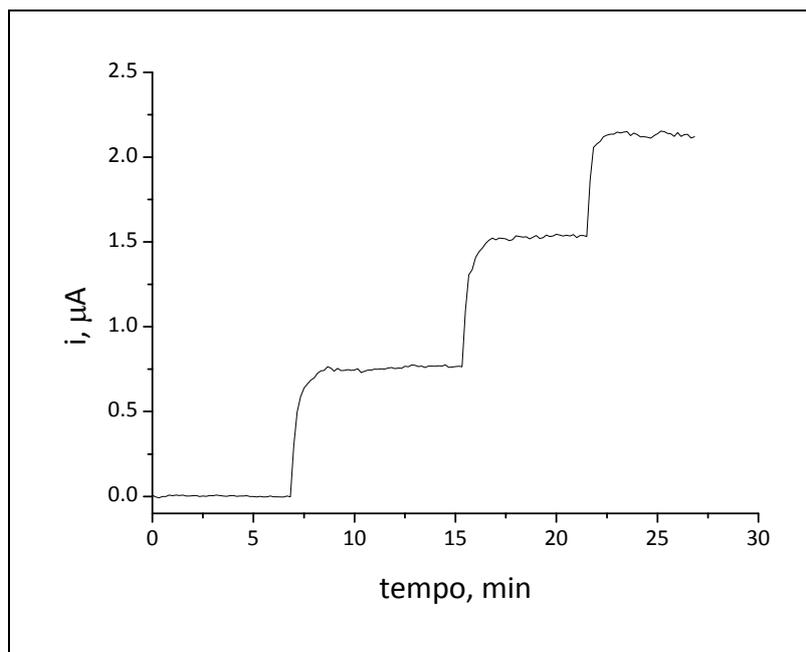


Figura 9.8. Amperogramma ottenuto effettuando iniezioni di 100  $\mu$ l di BQ 10 mM in 10 ml MES 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 5.0; trattamento sensore con MPA; -0.4 V.

### 9.1.2 VALUTAZIONE CONDIZIONI SPERIMENTALI

Oltre alla valutazione di aspetti operativi legati alla parte elettrodica, è importante anche la scelta delle condizioni riguardanti l'ambiente con cui vengono a contatto sensore ed analita durante la misura. È opportuno tenere presente che all'interno del sistema avvengono due reazioni di natura molto diversa: la reazione enzimatica e quella elettrodica. La presenza dell'enzima obbliga a mantenere la soluzione ad un pH al quale vi sia una buona attività catalitica: nasce dunque la necessità di operare in soluzione tampone. La reazione elettrodica necessita invece della presenza di un elettrolita di supporto, per fare in modo che il trasporto di massa all'elettrodo sia solo di tipo diffusivo: la scelta di tale sostanza è un aspetto delicato, perché l'elettrolita potrebbe interferire con la reazione enzimatica, inibendo l'enzima o partecipando a reazioni secondarie.

Al fine di trovare un compromesso tra le condizioni ideali della reazione enzimatica e quelle necessarie ad ottenere un segnale ottimale all'elettrodo, vengono effettuate delle prove incrociate di:

- attività enzimatica della laccasi allo spettrofotometro, attraverso la costruzione di curve di Michaelis-Menten con idrochinone e calcolo delle costanti  $k_c$  e  $K_M$ , legate rispettivamente all'attività dell'enzima ed all'affinità enzima-substrato;
- risposta strumentale, in seguito ad iniezioni di quantità note di benzochinone e calcolo di parametri come la sensibilità e l'intervallo di linearità.

#### 9.1.2.1 SCELTA SOLUZIONE TAMPONE

Vengono condotte prove al potenziostato, al fine di verificare la risposta strumentale in presenza di diverse soluzioni tampone. Si effettuano iniezioni di quantità variabili di benzochinone (da 1 a 100  $\mu$ M in cella), a -0.4 V, utilizzando KCl come elettrolita di supporto e trattando i sensori con acido 3-mercaptopropionico. Inizialmente sono adottate le seguenti condizioni sperimentali:

- Sodio acetato 0.1 M, a pH 5.0;
- MES 0.1 M, a pH 6.0;
- Acido succinico 0.1 M, a pH 5.0;
- Acido succinico 0.1 M, a pH 6.0.

Per ciascuna soluzione vengono calcolati sensibilità e intervallo di linearità. I risultati vengono riportati in Tabella 9.1.

Tabella 9.1. Sensibilità ed intervallo di linearità della risposta strumentale iniettando benzochinone in vari tamponi (KCl 0.1 M, -0.4 V, trattamento sensore con MPA).

<i>Tampone</i>	<i>Sensibilità, nA/μM</i>	<i>Intervallo di linearità, μM</i>
<b>NaAc 0.1 M, pH 5.0</b>	9.62	1-100
<b>MES 0.1 M, pH 6.0</b>	2.22	10-50
<b>Ac Succ 0.1 M, pH 5.0</b>	1.98	5-20
<b>Acc Succ 0.1 M, pH 6.0</b>	2.85	5-20

I risultati mostrano come il tampone che fornisce sensibilità più elevata ed intervallo di linearità più ampio sia sodio acetato.

#### **9.1.2.2 VALUTAZIONE ATTIVITÀ LACCASI**

Vengono costruite le curve di Michaelis-Menten per ricavare, alle varie condizioni sperimentali, i parametri  $k_c$  e  $K_M$ , che forniscono un'indicazione sull'attività dell'enzima e sull'affinità enzima-substrato.  $K_M$  rappresenta la concentrazione di substrato necessaria affinché la reazione enzimatica abbia una velocità pari alla metà di quella massima: un basso valore di  $K_M$  implica dunque che enzima e substrato hanno una buona affinità.  $k_c$ , invece, rappresenta il numero di molecole convertite in unità di tempo dall'enzima: più il valore di  $k_c$  è grande, più è elevata l'attività enzimatica.

Si opera nelle stesse soluzioni tampone in cui è stata precedentemente valutata la risposta strumentale:

- Sodio acetato 0.1 M, a pH 5.0;
- MES 0.1 M, a pH 6.0;
- Acido succinico 0.1 M, a pH 5.0;
- Acido succinico 0.1 M, a pH 6.0.

In tutti i casi le prove sono condotte in duplicato, in assenza ed in presenza di KCl 0.1 M, al fine di osservare la variazione di attività enzimatica causata dall'elettrolita di supporto.

La curva di Michaelis-Menten si costruisce ponendo in grafico la velocità iniziale della reazione enzimatica ( $v_0$ ) in funzione della concentrazione di substrato. La velocità di reazione si può ricavare misurando la diminuzione di assorbanza dovuta alla scomparsa del reagente oppure l'aumento di assorbimento causato dalla formazione del prodotto. Il benzochinone ha una banda di intensità molto elevata a 245 nm ( $\epsilon$ :  $200000 \text{ cm}^{-1}\text{Lmol}^{-1}$ ), mentre l'idrochinone presenta una banda più debole a 290 nm ( $\epsilon$ :  $27000 \text{ cm}^{-1}\text{Lmol}^{-1}$ ): si sceglie dunque 245 nm come lunghezza d'onda per effettuare le cinetiche.

Le misure sono condotte con una concentrazione di idrochinone (HQ) variabile da 10 a 100  $\mu\text{M}$  e concentrazione di laccasi 1  $\mu\text{M}$ . In Figura 9.9 viene riportato un esempio di grafico di Michaelis-Menten. Per il calcolo dei parametri viene utilizzato il metodo dei doppi reciproci (grafico di Lineweaver-Burk), in cui viene riportato il reciproco della velocità iniziale di reazione in funzione del reciproco della concentrazione di substrato (in Figura 9.10 ne viene mostrato un esempio). Si riportano i risultati ottenuti in Tabella 9.2.

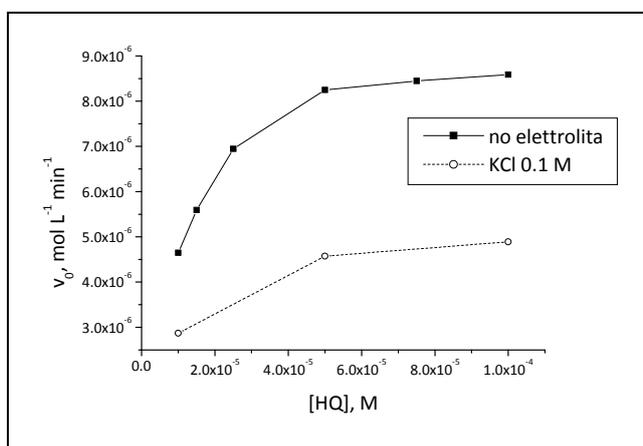


Figura 9.9. Grafico di Michaelis-Menten, in assenza ed in presenza di KCl 0.1 M. Acido Succinico 0.1 M, pH 6.0, laccasi 1  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda$  245 nm.

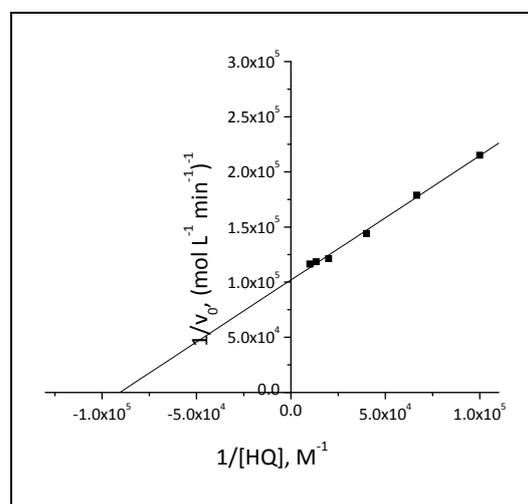


Figura 9.10. Grafico di Lineweaver-Burk. Acido Succinico 0.1 M, pH 6.0, laccasi 1  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda$  245 nm.

Tabella 9.2. Parametri  $K_M$  e  $k_c$  relativi alla coppia idrochinone-laccasi nelle varie soluzioni tampone, in presenza ed assenza di KCl 0.1 M (laccasi 1  $\mu\text{M}$ ;  $\lambda$ : 245 nm).

tampone	pH	Nessun elettrolita		KCl 0.1 M	
		$K_M$ , mol/L	$k_c$ , $s^{-1}$	$K_M$ , mol/L	$k_c$ , $s^{-1}$
NaAc 0.1 M	5.0	$3.32 \cdot 10^{-5}$	0.356	$1.15 \cdot 10^{-5}$	0.086
MES 0.1 M	6.0	$4.09 \cdot 10^{-5}$	1.69	$8.89 \cdot 10^{-5}$	0.942
Acido Succinico 0.1 M	5.0	$7.00 \cdot 10^{-4}$	13.3	$1.91 \cdot 10^{-4}$	0.605
Acido Succinico 0.1 M	6.0	$1.10 \cdot 10^{-5}$	0.163	$8.59 \cdot 10^{-6}$	0.089

I risultati mostrano che potassio cloruro, classico composto utilizzato come elettrolita di supporto in reazioni elettrochimiche, determina un crollo dell'attività enzimatica della laccasi, testimoniato

soprattutto dalla sensibile diminuzione del parametro  $k_c$ . Si rende necessario dunque effettuare prove con elettroliti di diversa natura.

Nella coppia di misure condotte in acido succinico si opera in condizioni identiche, ad eccezione del pH: il confronto dei parametri  $k_c$  e  $K_M$  mostra come l'affinità enzima-substrato sia molto più elevata a pH 5.0. Si sceglie dunque tale valore come pH di lavoro. Nonostante si abbia un'attività enzimatica più efficace con acido succinico, si effettuano le prove successive in tampone acetato, che fornisce migliori risposte strumentali. Vengono testati potassio perclorato e potassio nitrato, in concentrazione 0.1 M, come possibili elettroliti di supporto alternativi. A causa dell'intensa banda di assorbimento del nitrato tra 200 e 250 nm, che copre in parte quella del benzochinone, si preferisce misurare la velocità iniziale di reazione a 255 nm.

Tabella 9.3. Parametri  $K_M$  e  $k_c$  relativi alla coppia idrochinone-laccasi in presenza di  $KClO_4$  e  $KNO_3$  0.1 M (NaAc 0.1M, pH 5.0, laccasi 1  $\mu$ M;  $\lambda$ : 255 nm).

<i>Nessun elettrolita</i>		<i>KClO<sub>4</sub> 0.1 M</i>		<i>KNO<sub>3</sub> 0.1 M</i>	
<i>K<sub>M</sub>, mol/L</i>	<i>k<sub>c</sub> s<sup>-1</sup></i>	<i>K<sub>M</sub>, mol/L</i>	<i>k<sub>c</sub> s<sup>-1</sup></i>	<i>K<sub>M</sub>, mol/L</i>	<i>k<sub>c</sub> s<sup>-1</sup></i>
3.32·10 <sup>-5</sup>	0.356	1.91·10 <sup>-5</sup>	0.129	6.05·10 <sup>-6</sup>	0.156

$KNO_3$  determina una diminuzione più marcata del parametro  $K_M$  ed un calo più ridotto di  $k_c$  rispetto a  $KClO_4$ . Per scegliere definitivamente potassio nitrato come elettrolita di supporto, è necessario verificare la risposta strumentale all'elettrodo, nelle nuove condizioni.

### 9.1.2.3 VALUTAZIONE FINALE RISPOSTA STRUMENTALE

Si è verificata la risposta strumentale con elettroliti diversi dal potassio cloruro. Le condizioni strumentali erano le medesime delle prove precedenti: si sono utilizzati sensori trattati con MPA e si è applicata una differenza di potenziale di -0.4 V. Si sono effettuate le misure in tampone sodio acetato a pH 5 e si è variato l'elettrolita di supporto:  $KClO_4$  0.1 M e  $KNO_3$  0.1 M.

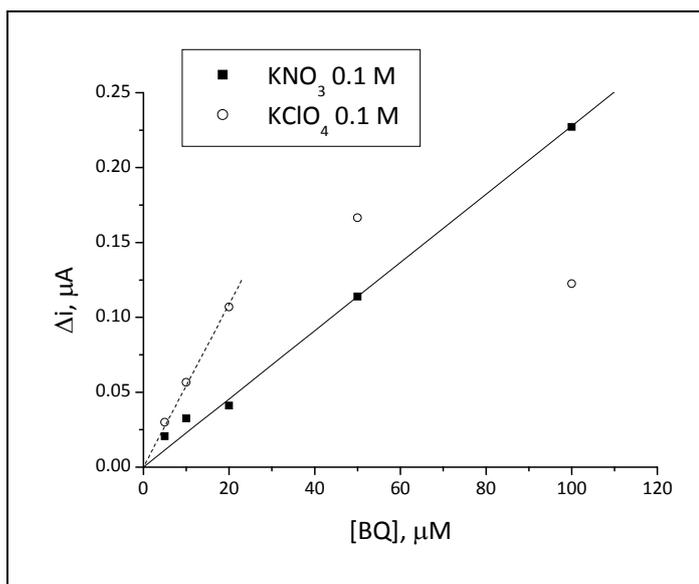


Figura 9.11. Retta di taratura del benzochinone. Trattamento sensore con MPA, -0.4 V, NaAc 0.1 M, pH 5.0.

Come fatto in precedenza, per ciascuna soluzione sono stati calcolati sensibilità ed intervallo di linearità.

Tabella 9.4. Sensibilità ed intervallo di linearità della risposta strumentale con  $\text{KClO}_4$  e  $\text{KNO}_3$  come elettrolita di supporto (NaAc 0.1 M, pH 5.0, -0.4 V, trattamento sensore con MPA).

<i>Elettrolita di supporto</i>	<i>Sensibilità, nA/<math>\mu\text{M}</math></i>	<i>Intervallo di linearità, <math>\mu\text{M}</math></i>
<b><math>\text{KClO}_4</math> 0.1 M</b>	5.40	5-20
<b><math>\text{KNO}_3</math> 0.1 M</b>	2.29	5-100

Come si osserva in Figura 9.11 e Tabella 9.4, nel caso del potassio perclorato si ha una sensibilità più elevata, ma un intervallo di linearità molto più basso del potassio nitrato. Questo dato, unito ai risultati ricavati allo spettrofotometro su affinità enzima-substrato ed attività enzimatica portano alla scelta delle seguenti condizioni sperimentali: tampone NaAc 0.1 M, pH 5.0,  $\text{KNO}_3$  0.1 M.

## 9.2 Immobilizzazione laccasi

Come accennato nel paragrafo 7.3, generalmente non viene utilizzata una sola tecnica di immobilizzazione, ma si accoppiano più tecniche al fine di ottenere un forte legame tra trasduttore ed enzima, che prolunghi il tempo di vita del biosensore. In questo caso è stata condotta una modificazione preventiva del trasduttore con acido 3-mercaptopropionico (paragrafo 9.1.1); dopo aver creato sul trasduttore dei gruppi carbossilici si può procedere con l'immobilizzazione.

### 9.2.1 FORMAZIONE LEGAMI COVALENTI CON EDC E NHS

La prima prova di immobilizzazione è condotta sfruttando una metodologia già impiegata da Vianello *et al* [123] e descritta nel paragrafo 8.3.2. Tale metodo porta alla formazione di legami covalenti tra il trasduttore e l'enzima, utilizzando N-etil-N'-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide (EDC) e N-idrossisuccinimide (NHS) (Figura 9.12).

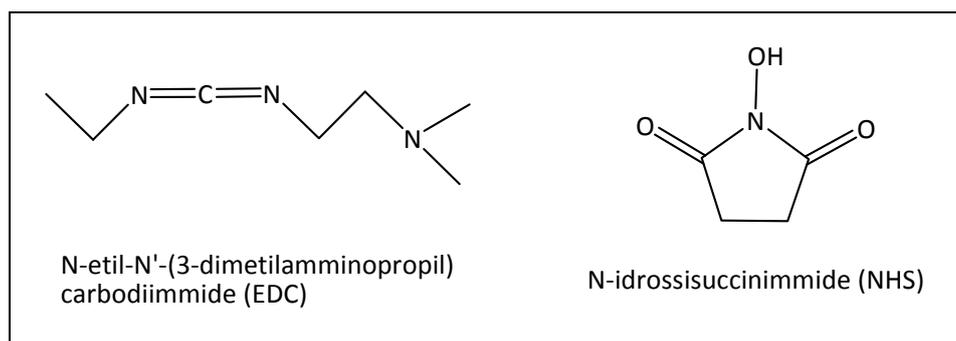
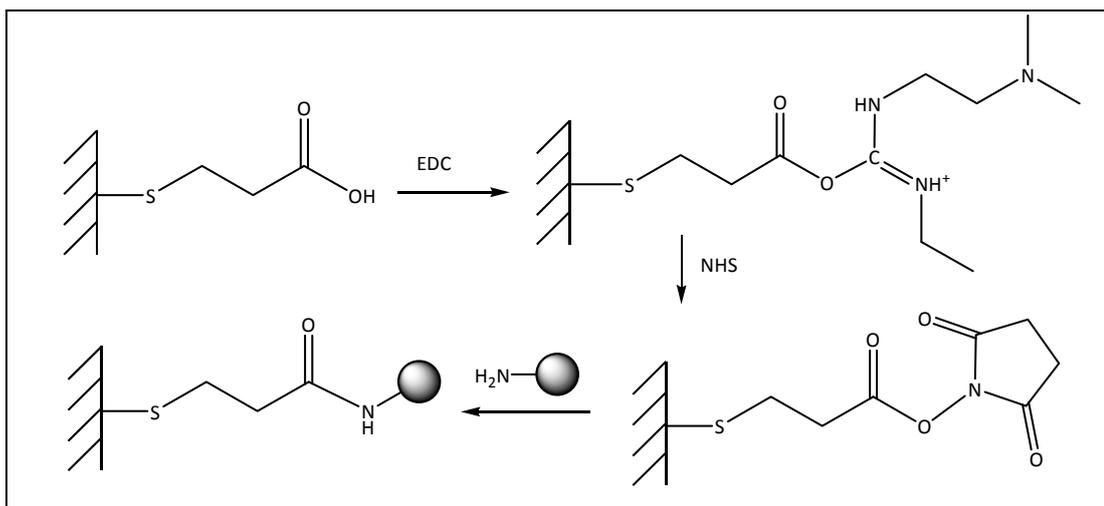


Figura 9.12. Formule di struttura di EDC e NHS.

I due reagenti hanno entrambi la funzione di legarsi al gruppo carbossilico del trasduttore attivandolo per il successivo attacco nucleofilo dell'enzima, come già esposto nel paragrafo 7.3.5.



EDC, più reattiva, attacca il gruppo carbossilico per prima, formando un estere; la presenza di NHS è necessaria per mantenere attivo il carbonio carbonilico, dal momento che l'elevata elettrofilicità del carbonio attivato con EDC può dare luogo facilmente ad idrolisi.

Pur aumentando la concentrazione di EDC e NHS depositate sull'elettrodo ed i tempi di riposo, non si è osservato un buon segnale all'aggiunta di idrochinone: la differenza di corrente che si è generata è minima e si confonde con il rumore di fondo (Figura 9.14-a).

### 9.2.2 RETICOLAZIONE CON CHITOSANO E GLUTARALDEIDE

Si è tentato dunque un secondo metodo di immobilizzazione, che impiega la tecnica di reticolazione. In questo caso non si formano legami covalenti direttamente tra trasduttore ed enzima, ma si utilizzano delle molecole bifunzionali che si legano da un lato al solido e dall'altro al biomateriale.

Il chitosano è un polisaccaride lineare con legami  $\beta$ -1,4, simile alla cellulosa. Formalmente è un copolimero di glucosammina e N-acetilglucosammina; la sua struttura non è ben definita e può differire per peso molecolare, grado di acetilazione e sequenza dei monomeri. La caratteristica strutturale unica del chitosano è la presenza di un gruppo amminico primario in posizione C-2 del residuo glucosamminico, come riportato in Figura 9.13-a. Pochi polimeri biologici hanno un così alto contenuto di ammine primarie, che possono essere utilizzate in biofabbricazione [127].

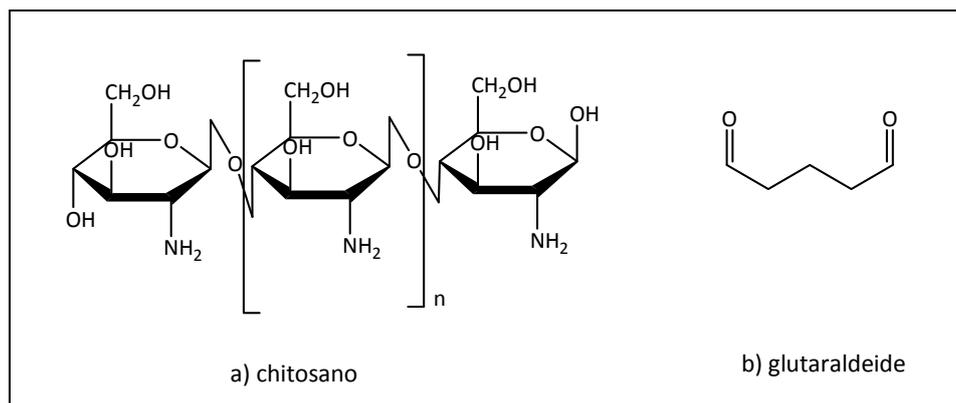
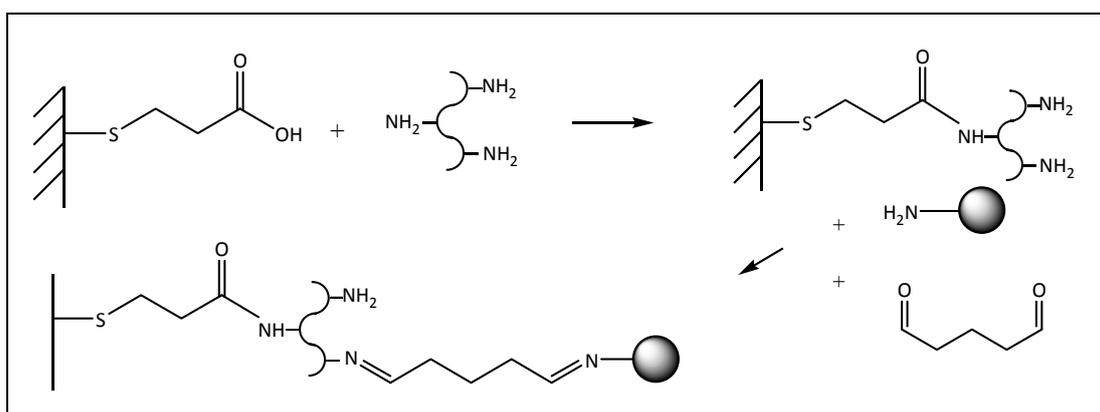


Figura 9.13. a) Formula di struttura semplificata del chitosano; b) formula di struttura della glutaraldeide.

La glutaraldeide, caratterizzata da due gruppi aldeidici terminali (Figura 9.13-b), è un tipico reagente utilizzato per l'immobilizzazione di biomolecole tramite reticolazione: i gruppi aldeidici si legano infatti facilmente ad alcuni residui amminoacidici dell'enzima, come la lisina [112]. La sequenza di reazioni attraverso cui avviene la reticolazione è rappresentata nel seguente schema di reazione.



Dapprima il chitosano si lega al gruppo carbossilico creato sul trasduttore durante il trattamento preventivo con acido 3-mercaptopropionico. Successivamente la glutaraldeide utilizza i suoi due gruppi aldeidici per legarsi da un lato al chitosano e dall'altro all'enzima. La procedura seguita è riportata nel paragrafo 8.3.2.

Nonostante siano noti alcuni svantaggi che si incontrano utilizzando la reticolazione come tecnica di immobilizzazione, quali una possibile perdita di attività dell'enzima o una limitata diffusione del substrato all'elettrodo [112], utilizzando questo metodo si ottengono risultati migliori che tramite formazione di legami covalenti con EDC e NHS. Il grafico di Figura 9.14 mostra una risposta amperometrica immediata all'aggiunta di idrochinone, molto più pronunciata che nel caso dell'immobilizzazione con EDC e NHS, anche ad una concentrazione di idrochinone molto più bassa.

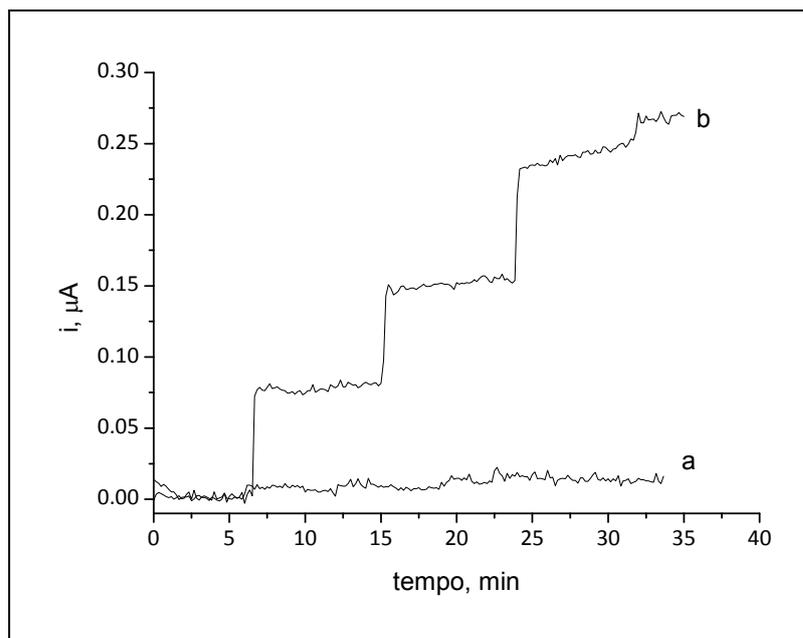


Figura 9.14. Amperogrammi registrati a  $-0.4$  V in NaAc  $0.1$  M, pH  $5.0$ ,  $\text{KNO}_3$   $0.1$  M. Trattamento sensore con MPA.  
 a) immobilizzazione laccasi  $10^{-4}$  M con EDC+NHS, iniezioni di  $200$   $\mu\text{l}$  di idrochinone  $10$  mM su  $10$  ml di tampone;  
 b) immobilizzazione laccasi  $10^{-4}$  M con chitosano e glutaraldeide, iniezioni di  $20$   $\mu\text{l}$  di idrochinone  $10$  mM su  $10$  ml di tampone.

### 9.2.3 CONCENTRAZIONE OTTIMALE DELL'ENZIMA

La ricerca della miglior tecnica di immobilizzazione è condotta depositando laccasi in concentrazione  $10^{-4}$  M. Nella fase successiva si verifica se variando la concentrazione dell'enzima sia possibile ottenere un miglioramento del segnale. Vengono effettuate delle immobilizzazioni con laccasi  $5 \cdot 10^{-5}$  M e  $2 \cdot 10^{-4}$  M. Si riporta in Figura 9.15 un esempio rappresentativo degli amperogrammi ottenuti.

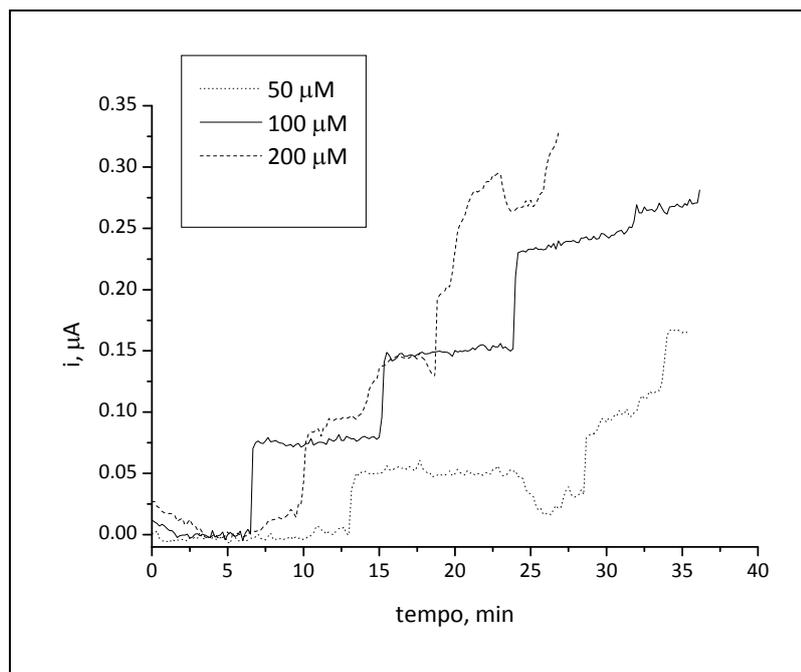


Figura 9.15. Amperogrammi registrati a -0.4 V; trattamento sensore con MPA; immobilizzazione laccasi a diverse concentrazioni con chitosano e glutaraldeide; iniezioni di 20  $\mu\text{l}$  di idrochinone 10 mM su 10 ml di NaAc 0.1 M, pH 5.0,  $\text{KNO}_3$  0.1 M.

I risultati ottenuti mostrano come, discostandosi dalla concentrazione di 100  $\mu\text{M}$  di enzima, sia in positivo che in negativo, si ottengono segnali disturbati e non riproducibili in seguito all'aggiunta di idrochinone. Viene quindi confermata la scelta della concentrazione di laccasi di  $10^{-4}\text{M}$ .

### 9.3 Misure con il biosensore

#### 9.3.1 VERIFICA DEL pH DI LAVORO

Come ultima valutazione, si è ritenuto opportuno verificare che il pH di lavoro, scelto nella prime fasi di messa a punto del sistema, fosse ancora quello ottimale, anche dopo l'immobilizzazione dell'enzima all'elettrodo. È noto infatti che l'attività dell'enzima può variare quando forma legami covalenti con altre molecole [112].

Per verificare l'attività del biosensore in un elevato intervallo di pH le iniezioni di idrochinone vengono condotte in tampone Britten-Robinson.

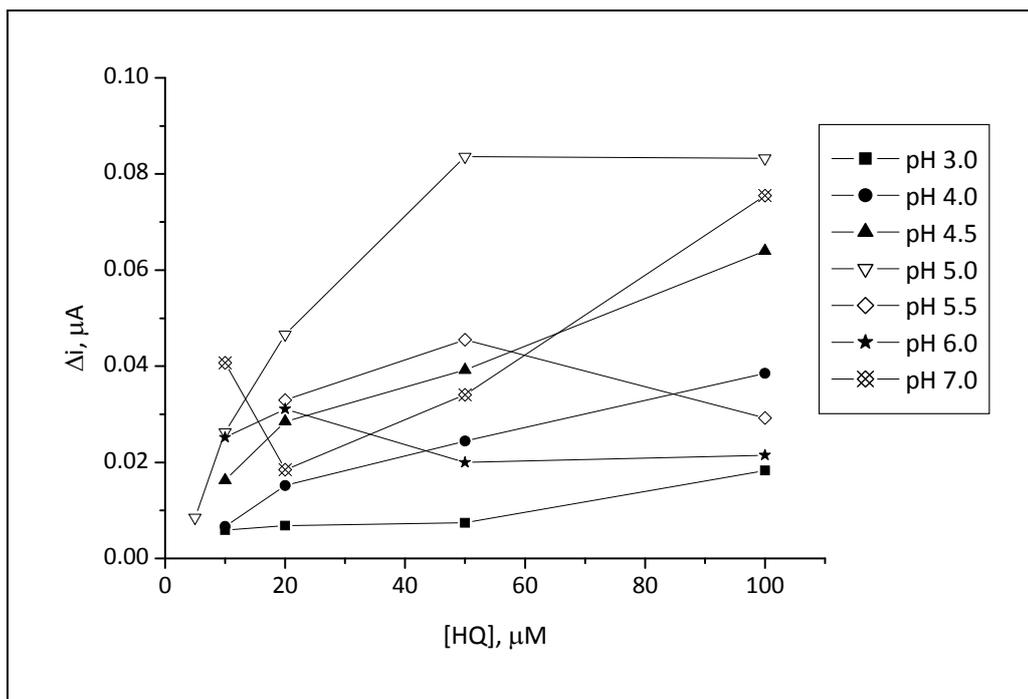


Figura 9.16. Andamento della risposta del biosensori ad iniezioni di idrochinone, al variare del pH. Potenziale applicato -0.4 V; trattamento sensore con MPA; immobilizzazione laccasi  $10^{-4}$  M con chitosano e glutaraldeide, in tampone Britten-Robinson 33 mM, variando il pH.

I risultati riportati in Figura 9.16 mostrano come il pH di lavoro, al quale si ha una risposta più elevata all'aggiunta di idrochinone, sia pH 5.0, ovvero ancora quello scelto in fase di messa a punto del sistema, prima dell'immobilizzazione dell'enzima.

### 9.3.2 VALUTAZIONI FINALI

Si riassumono in Tabella 9.5 le condizioni che si ritengono ottimali nella messa a punto di un biosensore per la determinazione dei polifenoli, testato con la coppia redox idrochinone/benzochinone.

Tabella 9.5. Condizioni sperimentali ottimali nella costruzione del biosensore, testato sulla coppia redox idrochinone/benzochinone.

<b>Condizioni sperimentali</b>		
Parametri strumentali	Potenziale di lavoro	-0.4 V
Costruzione biosensore	Tattamento sensore	MPA 10 mM per 24 ore
	Immobilizzazione laccasi	Chitosano e Glutaraldeide
	Concentrazione laccasi	$10^{-4}$ M
Ambiente di lavoro	Tampone	NaAc 0.1 M
	pH	5.0
	Elettrolita di supporto	$\text{KNO}_3$ 0.1 M

Con il biosensore costruito è stata effettuata una misura di controllo iniettando ripetutamente quantità note di idrochinone, non più al fine di testare una singola condizione sperimentale, ma puntando l'attenzione sul funzionamento del biosensore nel suo complesso. In Figura 9.17 viene riportato l'amperogramma ottenuto iniettando per 11 volte consecutive 25  $\mu\text{l}$  di idrochinone 10 mM; in Figura 9.18 si riporta la retta di taratura ricavata.

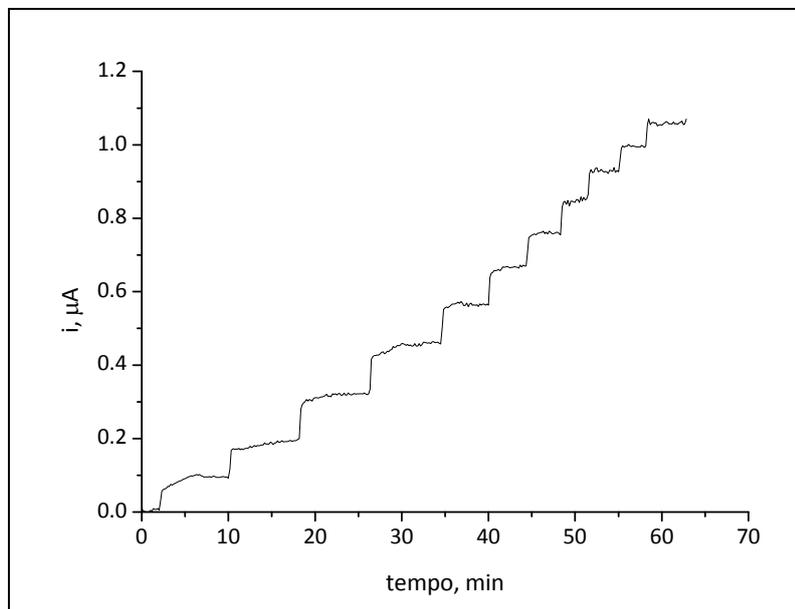


Figura 9.17. Amperogramma registrato a -0.4 V; trattamento sensore con MPA; immobilizzazione laccasi  $10^{-4}$  M con chitosano e glutaraldeide; iniezioni di 25  $\mu\text{l}$  di idrochinone 10 mM su 10 ml di NaAc 0.1 M, pH 5.0,  $\text{KNO}_3$  0.1 M.

Si osserva una risposta immediata in seguito all'iniezione di idrochinone ed il sistema si ristabilizza poi, in tempi ragionevoli, al nuovo valore di corrente, corrispondente alla nuova concentrazione di idrochinone.

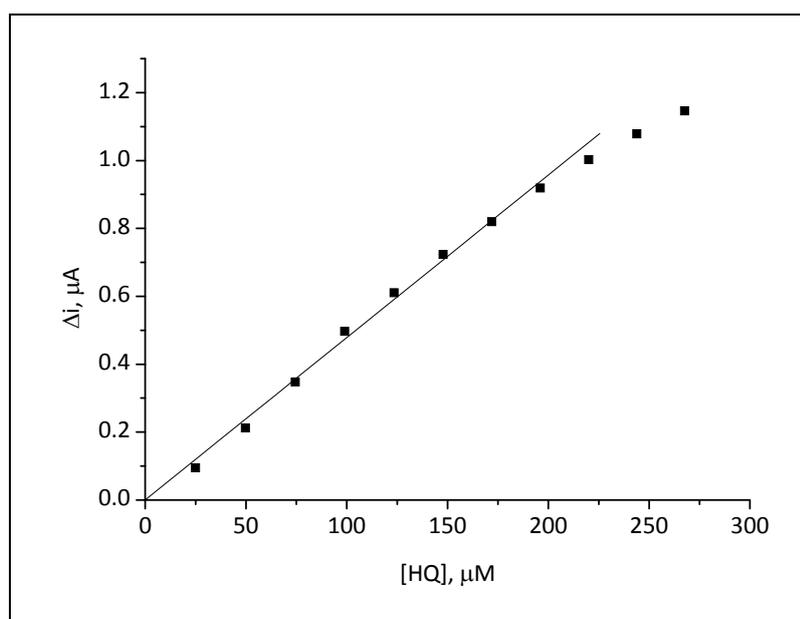


Figura 9.18. Retta di taratura dell'idrochinone; -0.4 V; trattamento sensore con MPA; immobilizzazione laccasi  $10^{-4}$  M con chitosano e glutaraldeide; NaAc 0.1 M, pH 5.0,  $\text{KNO}_3$  0.1 M.

La retta di taratura dell'idrochinone mostra un'elevata linearità ( $R^2 = 0.996$ ), che devia solo ad elevate concentrazioni. In Tabella 9.6 vengono riportati i valori di sensibilità, intervallo di linearità, limite di rilevabilità, calcolato considerando un rapporto segnale/rumore pari a 3 e riproducibilità su misure condotte in modo consecutivo, utilizzando lo stesso sensore.

Tabella 9.6. Sensibilità, intervallo di linearità, limite di rilevabilità e riproducibilità del biosensore completo, testato sulla coppia redox idrochinone/benzochinone (RSD%: deviazione standard relativa %).

<i>Sensibilità, nA/<math>\mu</math>M</i>	<i>Intervallo di linearità, <math>\mu</math>M</i>	<i>Limite di rilevabilità, <math>\mu</math>M</i>	<i>Riproducibilità, RSD%</i>
4.81	25-200	1.8	5.5 %

Effettuando un confronto con quanto presente in letteratura su biosensori a laccasi [122, 123], si nota che la sensibilità è piuttosto alta, l'intervallo di linearità sufficientemente ampio ed il limite di rilevabilità è in linea con altri lavori. Una riproducibilità inferiore al 10% ed un limite di rilevabilità inferiore a 10  $\mu$ M sono considerati accettabili [112, 122].

### **9.3.2.1 CONCLUSIONE**

Utilizzare i biosensori per la determinazione dei polifenoli ha numerosi vantaggi: la misura è veloce e immediata e non necessita di stadi preventivi di purificazione del campione, a causa della selettività intrinseca dell'elemento biologico del biosensore. Il sistema è facilmente automatizzabile: lo strumento utilizzato in questo lavoro permette infatti di impostare tempi e modi con i quali l'operatore è invitato ad inserire soluzioni standard, fornite assieme ai sensori, ed il campione; lo strumento non necessita inoltre di collegarsi ad un computer e fornisce il risultato finale in tempi brevi e automaticamente. Tutto questo, unito alla semplice operatività della misura, permette anche ad un operatore non specializzato di sfruttare questa tecnologia per determinare il contenuto di polifenoli in matrici reali.

Nella messa a punto del sistema sono sorti degli inconvenienti: anche utilizzando le stesse condizioni per ogni sensore che viene preparato, a parità di concentrazione di idrochinone la risposta strumentale è differente, probabilmente a causa della diversa quantità di enzima che riesce ad immobilizzarsi sull'elettrodo. In realtà questo problema viene eliminato utilizzando la procedura descritta nel paragrafo 8.2.1. Lo strumento richiede più volte durante la misura l'iniezione di una quantità nota di uno standard. A partire dal segnale dello standard viene calcolata la concentrazione di analita.

Il secondo svantaggio che si ha utilizzando i biosensori è il limitato tempo di vita, dovuto alla disattivazione dell'enzima nel tempo. Questo aspetto è difficilmente eliminabile, ma molti studi sono stati condotti per cercare di allungare il più possibile la vita del biosensore. In questo lavoro si è osservato un tempo di vita di circa 10 misure, che rende difficile l'applicazione del biosensore per analisi di routine. Anche in questo caso, l'iniezione ripetuta dello standard permette di tenere sotto controllo la risposta strumentale e di capire quando il biosensore non è più utilizzabile.

Nonostante non sia ancora stata testata l'efficacia di questo sistema biosensoristico nelle matrici reali, si è verificata la sua validità con la coppia redox idrochinone/benzochinone: i risultati hanno mostrato una buona sensibilità, un ampio intervallo di linearità, oltre a limite di rilevabilità e

riproducibilità accettabili. Nelle fasi successive di questo progetto sarà necessario verificare il funzionamento del biosensore anche con altri polifenoli, diversi dall'idrochinone, per passare infine alle matrici alimentari. Come ultimo obiettivo sarà anche importante valutare in modo preciso i tempi di analisi e programmare lo strumento: in questo modo si elimina la necessità di monitorare l'andamento del segnale durante la misura, ottenendo i risultati in modo semplice e immediato.

# **CONCLUSIONE**



# CONCLUSIONE

In questa tesi è stato studiato il potere antiossidante di alcuni prodotti dell'agroalimentare: frutta e propoli. Lo studio effettuato sugli alimenti ha permesso non solo di effettuare un confronto tra il potere antiossidante di prodotti locali e tropicali, analizzati durante il periodo passato presso l'istituto di Bioscienze dell'Università Statale di San Paolo, ma anche di condurre una valutazione approfondita sull'attendibilità dei più comuni metodi spettrofotometrici, largamente utilizzati per la loro rapidità e facilità di utilizzo, ma talvolta poco affidabili. L'identificazione dei componenti del propoli responsabili del suo eccezionale potere antiossidante ha portato inoltre ad una ricerca approfondita sulla correlazione tra struttura chimica dei flavonoidi e potere antiossidante. Infine, a completamento dello studio dei metodi per la quantificazione del potere antiossidante, è stato messo a punto un biosensore amperometrico a laccasi per la determinazione del potere antiossidante di soluzioni di polifenoli. Di seguito vengono descritti maggiormente in dettaglio i risultati ottenuti.

## **PROPOLI**

L'analisi del propoli, effettuata applicando diversi metodi di misura, ha evidenziato in primo luogo l'eccezionale potere antiossidante del propoli di origine veneta, attribuito all'elevato contenuto di flavonoidi. È stato evidenziato inoltre, tramite misure di calorimetria differenziale a scansione e di risonanza di spin elettronico come il propoli, nonostante penetri attraverso le membrane fosfolipidiche, non ne determini modificazioni di struttura. I risultati ottenuti per il propoli veneto sono stati confrontati con quelli ricavati su diversi tipi di propoli di origine brasiliana, analizzati presso l'Istituto di Bioscienze dell'Università Statale di San Paolo. È stato dimostrato che il propoli brasiliano presenta un potere antiossidante molto più basso rispetto a quello veneto, concorde con il ridotto contenuto di flavonoidi misurato attraverso analisi HPLC/MS. L'elevata capacità del propoli nel bloccare i radicali liberi, unita all'elevata assorbanza nella regione UV lo rende inoltre un possibile ingrediente per protettivi solari.

## **FRUTTA TROPICALE**

L'analisi condotta su frutti tropicali ha portato all'identificazione di jurubeba e siriguela come frutti più attivi, seguiti da carambola, graviola e tamarindo; il loro potere antiossidante è paragonabile a quello dei frutti di bosco. L'importanza di questo risultato è rappresentata dal fatto che il potere antiossidante di jurubeba e siriguela non è mai stato analizzato finora: si tratta dunque del primo lavoro in assoluto che verifica le proprietà antiossidanti di tali frutti.

## **POLIFENOLI**

La necessità di individuare quali polifenoli siano responsabili dell'eccezionale potere antiossidante del propoli veneto ha reso indispensabile l'analisi anche di soluzioni di polifenoli puri. Tali prove hanno portato all'identificazione di galangina, acido caffeico, fenetilcaffeoato e 1,1-dimetilallilcaffeoato come sostanze responsabili dell'elevato potere antiossidante del propoli. La somiglianza di struttura dei flavonoidi analizzati ha permesso inoltre l'individuazione di alcuni gruppi funzionali, all'interno

della struttura molecolare, che sembrano essere indispensabili perché il flavonoide nel suo complesso possieda potere antiossidante: il gruppo catecolico sull'anello B, già noto in letteratura, ed la compresenza del gruppo 3-OH e del doppio legame C2=C3. L'importanza del doppio legame non era finora stata dimostrata chiaramente in letteratura.

### **APPLICABILITÀ DEI DIVERSI METODI PER LA MISURA DEL POTERE ANTIOSSIDANTE**

Tutte le analisi sono state condotte attraverso diversi metodi largamente utilizzati per valutare il potere antiossidante. Scopo di questi tesi è anche quello di fare chiarezza sull'applicabilità di alcuni di questi. Il metodo che è stato scelto come standard è quello dell'inibizione della perossidazione lipidica, che monitora il comportamento della sostanza antiossidante nei confronti di una tipica reazione che avviene in natura ad opera dei ROS: l'ossidazione dell'acido linoleico a perossido. La reazione viene condotta in micelle: viene così riprodotto l'ambiente creato dalle membrane fosfolipidiche che le molecole antiossidanti devono attraversare per svolgere la loro azione. Si tratta dunque di un metodo che si avvicina molto a quello che avviene effettivamente all'interno dell'organismo. I metodi più largamente utilizzati sono invece saggi spettrofotometrici, più semplici e veloci, le cui condizioni sperimentali si allontanano però da quello che accade *in vivo*. I risultati ottenuti su alimenti e polifenoli hanno portato alla conclusione che, tra i metodi analizzati, il saggio con il DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile) è quello più attendibile: i risultati ottenuti sono infatti quelli che si avvicinano maggiormente al metodo IPL e la grandezza misurata è lo *scavenger* di radicali liberi da parte dell'antiossidante, uno dei meccanismi con i quali gli antiossidanti svolgono la loro azione.

### **BIOSENSORI**

La tecnologia dei biosensori permette di ridurre ulteriormente i tempi di analisi e rendere più semplici le procedure, senza incorrere negli inconvenienti individuati nel caso dei metodi spettrofotometrici. In questa tesi si sviluppa la prima fase di un progetto che ha come scopo la costruzione di un biosensore per la determinazione dei polifenoli in matrici alimentari. Viene studiata l'immobilizzazione dell'enzima laccasi su un elettrodo d'oro. Le condizioni ottimali sono: formazione di un monostrato di acido 3-mercaptopropionico sulla superficie elettrodica e reticolazione dell'enzima con chitosano e glutaraldeide. È inoltre stato valutato attentamente l'ambiente di reazione, in particolare la scelta dell'elettrolita di supporto, che deve permettere una buona risposta all'elettrodo, senza interferire con la reazione enzimatica. Le condizioni ottimali sono: - 0.4 V di potenziale applicato; tampone sodio acetato a pH 5, con sodio nitrato come elettrolita di supporto. Le prove sono state condotte con una coppia redox standard: idrochinone/benzochinone. Ulteriori fasi di questo progetto prevederanno misure con diversi tipi di polifenoli, per passare poi a matrici alimentari.

**ALLEGATI E  
RIFERIMENTI  
BIBLIOGRAFICI**



# ALLEGATI

## Allegato 1 - Tabella componenti propoli

	Composto	Provenienza	Quantità <sup>i</sup>
<b>Acidi Alifatici</b>			
1	Acido (Z,Z) 9-12, ottadecadienoico	Brasile [45] Iran [46]	
2	Acido 11-eicosanoico	Iran [46]	
3	Acido 2-idrossiacetico	Iran [46]	
4	Acido 2-idrossimetil-3-indolacetico	Brasile [47]	
5	Acido 2-propenoico	Anatolia [55]	
6	Acido 3-acetbutirrico	Brasile [47]	
7	Acido 3-chetoadipico	Brasile [47]	
8	Acido $\alpha$ -linolenico	Iran [46]	
9	Acido butanedioico	Brasile [45]	
10	Acido caprico	Anatolia [55] Iran [46]	
11	Acido cinnamildeneacetico	Argentina [53] Australia [53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Ungheria [53] Nuova Zelanda [53] Uruguay [53] Stati Uniti [53] Uzbekistan [53]	
12	Acido citrico	Iran [46]	
13	Acido 15-acetossiisocupressico (Acido 5-(6-acetossi-3-metil-es-3-enil)-1,4 $\alpha$ - dimetil-6-metilene-decaidro-naftalene-1- carbossilico)	Brasile [49]	
14	Acido agatalico (5-(5-Formil-5,8 $\alpha$ -dimetil-2-metilene- decaidro-naftalen-1-il)-3-metil-pent-2- enoico)	Brasile [49]	
15	Acido agatico (Acido 5-(4-carbossi-3-metil-but-3-enil)-1,4 $\alpha$ - dimetil-6-metilene-decaidro-naftalene-1- carbossilico)	Brasile [49]	
16	Acido cupressico (Acido 5-(3-idrossi-3-metil-pent-4-enil)-1,4 $\alpha$ - dimetil-6-metilene-decaidro-naftalene-1- carbossilico)	Brasile [49]	
17	Acido eptadecanoico	Iran [46]	
18	Acido esadecanoico	Brasile [47]	
19	Acido etilanoico	Brasile [47]	
20	Acido fumarico	Iran [46]	
21	Acido glicerico	Iran [46]	
22	Acido idrossi-malonico	Iran [46]	
23	Acido isocupressico (Acido 5-(6-idrossi-3-metil-es-3-enil)-1,4 $\alpha$ - dimetil-6-metilene-decaidro-naftalene-1- carbossilico)	Brasile [49]	
24	Acido isopimarico	Iran [46]	
25	Acido lattico	Iran [46]	
26	Acido laurico	Iran [46]	
27	Acido malico	Iran [46]	
28	Acido miristico	Iran [46]	
29	Acido oleico	Anatolia [55] Brasile [47] Iran [46]	
30	Acido ottanoico	Iran [46]	
31	Acido palmitelaidico	Iran [46]	
32	Acido palmitico (Acido esadecanoico)	Anatolia [55] Brasile [45] Iran [46]	
33	Acido pelargonico	Iran [46]	

	Composto	Provenienza	Quantità <sup>i</sup>
34	Acido pentanedioico	Brasile [47]	
35	Acido stearico	Iran [46]	
36	Acido succinico	Iran [46]	
37	Acido tetronico	Iran [46]	
38	Acido Undecanoico	Brasile [47]	
<b>Acidi aromatici</b>			
39	Acido 1,1-dimetilallilcaffeico	Argentina [51] Nuova Zelanda [50] Tunisia [50]	0.74 [0-1.74] mg/g propoli [51]
40	Acido 2-indolcarbonico	Brasile [47]	
41	Acido 2,2-dimetil-8-prenilcromene-6-propenoico	Brasile [49]	
42	Acido 2,2-dimetilcromene-6-carbossilico	Brasile [49]	
43	Acido 2,2-dimetilcromene-6-propenoico	Brasile [49]	
44	Acido 3-idrossi-2,2-dimetil-8-prenilcroman-6-propenoico	Brasile [49]	
45	Acido 3(3-metossi-4-idrossifenil)-2-propenoico	Iran [46]	
46	Acido 3,4-diidrossibenzoico	Iran [46]	
47	Acido 3,4-dimetossicinnamico	Anatolia [55] Argentina [53] Australia [53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Nuova Zelanda [53] Iran [46] Stati Uniti [53] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	3.9 [0-9.2] mg/g EEP [53]
48	Acido 3-idrossi-4-metossicinnamico	Anatolia [55]	
49	Acido 3-idrossicinnamico	Italia [44]	
50	Acido 4-diidrocinnamoidrossi-3-prenilcinnamico	Brasile [49]	
51	Acido 4-idrossi-3-prenilcinnamico	Brasile [49]	
52	Acido 4-idrossibenzoico	Iran [46]	
53	Acido 4-idrossi-cinnamico	Italia [44]	
54	Acido 4-metossibenzoico	Brasile [45]	
55	Acido 4-pentenoico	Anatolia [55]	
56	Acido benzeneacetico	Anatolia [55]	
57	Acido benzoico	Anatolia [55] Brasile [48] Iran [46]	
58	Acido caffeico	Argentina [53] Australia [53] Brasile [47, 50, 53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Croazia [52, 54] Egitto [50] Iran [46] Italia [44] Nuova Zelanda [53] Sudafrica [53] Stati Uniti [53] Turchia [50] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	1.9 [0-7.2] mg/g EEP [53] 26.999 µg/ml EEP [54]
59	Acido cinnamico	Argentina [51] Brasile [47, 50] Egitto [50] Nuova Zelanda [50] Iran [46] Turchia [50]	2.11 [0-8.26] mg/g propoli [51]
60	Acido cinnamildeneacetico	Nuova Zelanda [50]	10.3 [0-31.2] mg/g EEP [53]
61	Acido <i>cis</i> -4-cumarico	Iran [46]	
62	Acido <i>cis</i> -4-metossi-cinnamico	Iran [46]	
63	Acido deidro-abietico	Turchia [50]	
64	Acido $\delta$ -9-tetra-idrocannabinico	Iran [46]	
65	Acido diidrocinnamico	Egitto [50]	
66	Acido ferulico	Anatolia [55] Argentina [51] Brasile [45, 47, 50] Croazia [52] Egitto [50] Iran [46] Nuova Zelanda [50] Turchia [50]	2.48 [0.51-6.42] mg/g propoli [51] 2.4 mg/g propoli [45]
67	Acido idrocinnamico	Brasile [45, 47] Iran [46]	
68	Acido isoferulico	Brasile [50] Croazia [52] Egitto [50] Iran [46]	
69	Acido isoftalico	Anatolia [55]	
70	Acido isovanillico	Iran [46]	
71	Acido linoleico	Brasile [47]	
72	Acido p-cumarico	Argentina [51, 53] Australia [53] Brasile [45, 53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Croazia [52] Egitto [50] Nuova Zelanda [50, 53] Stati Uniti [53] Sudafrica [53] Turchia [50] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	5.9 [0-27.4] mg/g EEP [53] 5.99 [0.92-16.35] mg/g propoli [51] 8.5 mg/g propoli [45]
73	Acido pentenoico	Brasile [47]	

	Composto	Provenienza	Quantità <sup>i</sup>
74	Acido <i>trans</i> -4-cumarico	Iran [46]	
75	Acido <i>trans</i> -4-metossi-cinnamico	Iran [46]	
76	Acido vanillico	Nuova Zelanda [50]	
77	Artepillin C (Acido 4-idrossi-3,5-prenilcinnamico)	Brasile [49, 53]	2.7 [0-43.9] mg/g EEP [53]
<b>Esteri</b>			
78	1-fenilettil- <i>trans</i> caffeato	Iran [46]	
79	2',6'-diidrossi-4'-metossidiidro calcone	Iran [46]	
80	2-metil-2-butenil- <i>trans</i> -4-cumarato	Iran [46]	
81	2-metil-2-butenil- <i>trans</i> -caffeato	Iran [46]	
82	3-metil-2-butenil- <i>trans</i> -4-cumarato	Iran [46]	
83	3-metil-2-butenil- <i>trans</i> -caffeato	Iran [46]	
84	3-metil-2-butenil- <i>trans</i> -ferulato	Iran [46]	
85	3-metil-3-butenil- <i>trans</i> -caffeato	Iran [46]	
86	3-metil-3-butenil- <i>trans</i> -ferulato	Iran [46]	
87	3-metil-3-butenil- <i>trans</i> -isoferulato	Iran [46]	
88	3-metilbut-2-enil ferulato	Nuova Zelanda [50]	
89	3-metilbut-3-enil ferulato	Nuova Zelanda [50]	
90	Benzil Benzoato	Anatolia [55]	
91	Benzil Caffeato	Europa [50]	
92	Benzil Cinnamato	Anatolia [55] Turchia [50]	
93	Benzil- <i>trans</i> -4-cumarato	Iran [46]	
94	Cinnamil caffeato	Argentina [53] Australia [53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Iran [46] Nuova Zelanda [53] Stati Uniti [53] Turchia [50] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	
95	Cinnamil cinnamato	Turchia [50]	
96	Dietil-3-metil succinato	Brasile [47]	
97	Dietil ftalato	Iran [46]	
98	Dimetil succinato	Brasile [48]	
99	Dimetil-idrossi-butandioato	Brasile [48]	
100	Etil acetato	Anatolia [55]	
101	Etil cinnamato	Iran [46] Nuova Zelanda [50]	
102	Etil Ferulato	Nuova Zelanda [50]	
103	Etil idrocinnamato	Brasile [47, 50]	
104	Etil indolacetato	Brasile [47]	
105	Etil linoleato	Iran [46]	
106	Etil oleato	Iran [46]	
107	Etil palmitato	Iran [46]	
108	Etil stearato	Iran [46]	
109	Fenetil caffeato o Fenetil estere dell'acido caffeico (CAPE)	Argentina [53] Australia [53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Europa [50] Nuova Zelanda [53] Stati Uniti [53] Tunisia [50] Turchia [50] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	10.8 [0-29.2] mg/g EEP [53]
110	Fenilettil <i>trans</i> -4-cumarato	Iran [46]	
111	Metil abietato	Brasile [48]	
112	Metil idrocinnamato	Brasile [45]	
113	Metil laurato	Brasile [48]	
114	Metil stearato	Brasile [48]	
115	Metil-2,4-diidrossi-6-metilbenzato	Brasile [48]	
116	Metil-3(3,4-diidrossifenil)-2-propenato	Iran [46]	
117	Metil-3(3,4-dimetossifenil)-2-propenato	Iran [46]	
118	Metil-3(3-metossi-4-idrossifenil)-2- propenato	Iran [46]	
119	Metil-3(4-metossi-3-idrossifenil)-2- propenato	Iran [46]	
120	Pentenil caffeato	Europa [50]	
<b>Flavonoidi e derivati</b>			

	Composto	Provenienza	Quantità <sup>i</sup>
121	12-Acetossiviscidone (Etere 2-(6-acetil-5-idrossi-2,3-diidro-benzofuran-2-il)-allilico dell'acido acetico)	Brasile [49]	
122	15-metil estere dell'acido agatico (Acido 5-(4-metossicarbonil-3-metil-but-3-enil)-1,4 $\alpha$ -dimetil-6-metilene-decaidronaftalene-1-carbossilico)	Brasile [49]	
123	3,5,7-Triidrossi-4'-metossiflavanolo	Brasile [48, 49]	
124	7,4'-diidrossiisoflavone	Brasile [48]	
125	Acacetina	Anatolia [55]	
126	Apigenina	Argentina [51, 53] Australia [53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Croazia [52] Nuova Zelanda [53] Stati Uniti [53] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	2.09 [1.04-3.32] mg/g propoli [51]
127	Betuletolo (3,5,7-Triidrossi-6-metossi-2-(4-metossi-fenil)-cromen-4-one)	Brasile [49]	
128	Canferide (3,5,7-Triidrossi-2-(4-metossi-fenil)-cromen-4-one)	Argentina [51] , Brasile [45, 49]	1.57 [0-3.23] mg/g propoli [51] 12.3 mg/g propoli [45]
129	Canferolo (3,5,7-Triidrossi-2-(4-idrossi-fenil)-cromen-4-one)	Argentina [51, 53] Australia [53] Brasile [45] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Croazia [52] Iran [46] Italia [44] Nuova Zelanda [53] Stati Uniti [53] Sudafrica [53] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	3.6 [0-10.9] mg/g EEP [53] 0.4 [0-1.15] mg/g propoli [51] 0.4 mg/g propoli [45]
130	Crisin-7-metil etere	Nuova Zelanda [50]	
131	Crisina (5,7-diidrossi-2-fenil-4H-cromen-4-one)	Anatolia [55] Argentina [51, 53] Australia [53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Croazia [52, 54] Egitto [50] Europa [50] Iran [46] Italia [44] Nuova Zelanda [50, 53] Stati Uniti [53] Sudafrica [53] Tunisia [50] Turchia [50] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	75.6 [0-139] mg/g EEP [53] 3.46 [0-10.1] mg/g propoli [51] 53.462 $\mu$ g/ml EEP [54]
132	Ermanina (5,7-Diidrossi-3,6-dimetossi-2-(4-metossi-fenil)-cromen-4-one)	Brasile [49]	
133	Esametossi Flavone	Egitto [50]	
134	Galangin-7-metil etere	Croazia [52, 54] Iran [46] Nuova Zelanda [50]	
135	Galangina (3,5,7-triidrossi-2-fenil-4H-cromen-4-one)	Argentina [51, 53] Australia [53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Egitto [50] Europa [50] Italia [50] Nuova Zelanda [50, 53] Stati Uniti [53] Sudafrica [53] Tunisia [50] Turchia [50] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	31.9 [0-58.2] mg/g EEP [53] 2.13 [0-9.07] mg/g propoli [51] 30.624 $\mu$ g/ml EEP [54]
136	Isoninfaeolo-B	Giappone [50]	
137	Isosacuratenina (5,7-Diidrossi-2-(4-metossi-fenil)-cromen-4-one)	Brasile [45]	7.3 mg/g propoli [45]
138	Isosativan (5-Metossi-2-(7-metossi-cromen-3-il)-fenolo)	Brasile [56]	
139	Medicarpina (9-Metossi-6 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -diidro-6H-benzo[4,5]furo[3,2-c]cromen-3-ol)	Brasile [48, 56]	
140	Miricetin-3,7,4',5'-metiletere	Tunisia [50]	
141	Naringenina (2,3-diidro-5,7-diidrossi-2-(4-idrossifenil)cromen-4-one)	Anatolia [55] Croazia [54] Egitto [50] Iran [46] Italia [44]	24.517 $\mu$ g/ml EEP [54]
142	Ninfaeolo-A	Giappone [50]	
143	Ninfaeolo-B	Giappone [50]	
144	Ninfaeolo-C	Giappone [50]	
145	Omoeridictiolo	Croazia [52]	

	<b>Composto</b>	<b>Provenienza</b>	<b>Quantità<sup>i</sup></b>
146	omoptero carpina	Brasile [48]	
147	Pinobancsin-3-acetato	Argentina [53] Australia [53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Egitto [50] Iran [46] Nuova Zelanda [50, 53] Stati Uniti [53] Sudafrica [53] Tunisia [50] Turchia [50] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	45.2 [0-80.0] mg/g EEP [53]
148	Pinobancsin-3-isobutanoato	Iran [46]	
149	Pinobancsin-3-isopentanoato	Iran [46]	
150	Pinobancsin-3-propanoato	Iran [46]	
151	Pinobancsin-5-metil etere	Argentina [53] Australia [53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Nuova Zelanda [53] Sudafrica [53] Stati Uniti [53] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	17.8 [0-78.3] mg/g EEP [53]
152	Pinobancsina (3,5,7-Triidrossi-2-fenil-croman-4-one)	Argentina [51, 53] Australia [53] Brasile [45] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Egitto [50] Europa [50] Iran [46] Nuova Zelanda [50, 53] Stati Uniti [53] Sudafrica [53] Tunisia [50] Turchia [50] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	27.4 [0-84.8] mg/g EEP [53] 5.39 [0-10.3] mg/g propoli [51] 8.7 mg/g propoli [45]
153	Pinobancsin-O-acetato	Europa [50]	
154	Pinocebrin calcione	Iran [46]	
155	Pinocebrin-7-metil etere	Nuova Zelanda [50]	
156	Pinocebrina (2,3-diidro-5,7-diidrossi-2-fenilcromen-4-one)	Argentina [51, 53] Australia [53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Corea [50] Croazia [52, 54] Egitto [50] Europa [50] Iran [46] Italia [50] Nuova Zelanda [50, 53] Stati Uniti [53] Sudafrica [53] Tunisia [50] Turchia [50] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	54.2 [0-99.7] mg/g EEP [53] 15.1 [0-48.4] mg/g propoli [51] 41.843 µg/ml EEP [54]
157	Pinostronbin calcione	Egitto [50]	
158			
	Pinostronbina	Brasile [47] Croazia [52] Egitto [50] Iran [46]	
159	Quercetin-3,7,3'-trimetiletere	Tunisia [50]	
160	Quercetina (3,5,7-triidrossi-2-(3,4-diidrossifenil)-4H-cromen-4-one)	Argentina [51, 53] Australia [53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Croazia [54] Iran [46] Italia [44] Nuova Zelanda [53] Stati Uniti [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	2.2 [0-4.8] mg/g EEP [53] 1.35 [0-2.84] mg/g propoli [51] 20.420 µg/ml EEP [54]
161	Quercetin-metil etere	Iran [46]	
162	Ramnetina	Croazia [52]	
163	Sacuranetina	Croazia [52]	
164	Tectocrisina (5-idrossi-7-metossi-2-fenil-4H-cromen-4-one)	Argentina [51, 53] Australia [53] Bulgaria [53] Cile [53] Cina [53] Croazia [52] Corea [50] Nuova Zelanda [53] Stati Uniti [53] Sudafrica [53] Ucraina [53] Ungheria [53] Uruguay [53] Uzbekistan [53]	34.4 [0-96.9] mg/g EEP [53] 2.09 [0-4.45] mg/g propoli [51]
<b>Zuccheri e derivati</b>			
165	Acido L-Gluconico	Iran [46]	
166	D-Galattosio	Iran [46]	
167	D-Glucitolo	Iran [46]	
168	D-Glucosio	Iran [46]	
169	Glicerina	Anatolia [55] Iran [46]	
170	Inositolo	Brasile [47, 50] Iran [46]	
171	Mannosio	Brasile [47]	
172	Mioinositolo	Iran [46]	
173	Saccarosio	Iran [46]	
174	α-D-Xylopiranosio	Iran [46]	
<b>Aldeidi</b>			
175	3,4-idrossibenzaldeide	Iran [46]	
176	4-idrossi-2-metossicinnamaldeide	Anatolia [55]	
177	4-idrossibenzaldeide	Iran [46]	
178	Benzaldeide	Anatolia [55]	

	Composto	Provenienza	Quantità <sup>i</sup>
179	Coniferil aldeide (3-(4-Idrossi-3-metossi-fenil)-propenale)	Brasile [49]	
180	Propanale	Anatolia [55]	
181	Vanillina (4-idrossi-3-metossi-benzaldeide)	Anatolia [55] Brasile [49] Iran [46] Nuova Zelanda [50]Turchia [50]	
<b>Chetoni</b>			
182	2'-idrossi-acetofenone	Iran [46]	
183	2,4-cicloeptadien-1-one	Anatolia [55]	
184	2-Nonadecanone	Anatolia [55] Iran [46]	
185	2-propen-1-one	Anatolia [55]	
186	4H-1-benzopyran-4-one	Anatolia [55]	
<b>Idrocarburi alifatici</b>			
187	1,1,2-trimetil-3,5-bis(1-metiletenil)-, (2. α., 3. α., 5. β.)-cicloesano	Brasile [48]	
188	Docosano	Anatolia [55]	
189	Eicosano	Anatolia [55] Iran [46]	
190	Eneicosano	Anatolia [55]	
191	Eptadecano	Iran [46]	
192	Nonadecano	Anatolia [55]	
193	Ottadecano	Anatolia [55]	
<b>Fenoli</b>			
194	2-metossifenolo	Brasile [48]	
195	2,4,6-trimetilfenolo	Brasile [48]	
196	2H-1-benzopiran-7-olo	Brasile [48]	
197	4,5-dimetossi-2-fenolo	Anatolia [55]	
198	4-allil-2,6dimetossi-fenolo	Brasile [48]	
199	4-vinil-2-metossifenolo	Anatolia [55]	
200	4-vinilfenolo	Anatolia [55]	
201	Crisofanolo	Anatolia [55]	
202	Idrochinone	Iran [46]	
<b>Altri</b>			
203	1-(5-eteniltetraidro-5-metil-2-furanil)-1-metiletanolo	Iran [46]	
204	1,2,3-trimetossi-5-(2-propenil)-benzene	Brasile [48]	
205	1,2-Dimetossi-4-propenil-benzene	Brasile [56]	
206	1-metil-4-azailuorenone	Anatolia [55]	
207	1α-(3-Metil-but-2-enil)-1α,7α-diidro-1-ossaciclopropa[b]naftalene-2,7-dione	Brasile [56]	
208	1-metossi-4-(1-propenil)-benzene	Brasile [48, 56]	
209	2,2,6-β-trimetil-biciclo(4.3.0)non-9(1)-en-7.α-olo	Brasile [48]	
210	2-(3,4-Diidrossi-benzoil)-3-idrossi-4-(2-isopropenil-5-metil-es-4-enil)-6-(3-metil-but-2-enil)-5-metilene-6-(3,3,4,7-tetrametil-ott-6-enil)-cicloes-2-enone	Brasile [56]	
211	2-(3,4-Diidrossi-benzoil)-3-idrossi-4-(2-isopropenil-5-metil-es-5-enil)-6-(3-metil-but-2-enil)-5-metilene-6-(3,3,4,7-tetrametil-ott-6-enil)-cicloes-2-enone	Brasile [56]	
212	2,3-diidro-benzofurano	Anatolia [55]	
213	2,5-dietil-3,6-dimetilpirazina	Anatolia [55]	
214	Lupeolo (1-Isopropenil-3α,5α,5β,8,8,11α -esametileicosaidro-ciclopenta[a]crisen-9-one)	Brasile [56]	
215	2-naftalenemetanolo	Anatolia [55]	
216	3-metossi-β-amirina	Brasile [47]	
217	4-allil-1,2-dimetossibenzene (metal eugenolo)	Brasile [48, 56]	
218	4-βH,5α-Eremofil-1(10)-ene	Iran [46]	
219	5-Allil-1,2,3-trimetossi-benzene	Brasile [56]	

	Composto	Provenienza	Quantità <sup>i</sup>
220	$\alpha$ -amirina	Brasile [47, 56]	
221	$\beta$ -amirina	Brasile [47, 56]	
222	$\beta$ -amirin acetato	Brasile [47]	
223	Benzene	Anatolia [55]	
224	Benzeneetanolo	Anatolia [55]	
225	Benzil alcol	Anatolia [55]	
226	Cicloartenolo (17-(1,5-Dimetil-es-4-enil)-4,4,13,14-tetrametil-tetradecaidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3-olo)	Brasile [56]	
227	Coniferil acetato dimerico (Etere 3-[3-acetossimetil-2-(4-idrossi-3-metossi-fenil)-7-metossi-2,3-diidro-benzofuran-5-il]-allilico dell'acido acetico)	Brasile [49]	
228	Fosfato	Iran [46]	
229	Glicirizzina o Acido glicirizzico	Brasile [47]	
230	Isobutilchinolina	Brasile [47]	
231	Mentolo (2-Isopropil-5-metil-cicloesano)	Brasile [47]	
232	Patchuli Alcol ([1R-(1 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\alpha$ ,6 $\beta$ ,8 $\alpha\alpha$ )]-ottaidro-4,8a,9,9-tetrametil-1,6-metano-1(2H)-naftolo)	Brasile [47]	
233	<i>trans,trans</i> -Farnesolo	Iran [46] Brasile [45]	
234	<i>trans</i> -1-Fenil-1-propen-3-olo	Iran [46]	
235	Tremetone (1-(2-Isopropenil-2,3-diidro-benzofuran-5-il)-etanone)	Brasile [49]	
236	Viscidone (1-[5-Idrossi-2-(1-idrossimetil-vinil)-2,3-diidro-benzofuran-6-il]-etanone)	Brasile [49]	
237	$\alpha$ -Bisabololo	Anatolia [55]	
238	$\alpha$ -Cadinolo	Anatolia [55]	
239	$\alpha$ -Cedrolo	Iran [46]	
240	$\alpha$ -Eudesmolo	Anatolia [55]	
241	$\beta$ -Cadinene	Anatolia [55]	
242	$\beta$ -Eudesmolo	Anatolia [55]	
243	$\gamma$ -Cadinene	Iran [46]	
244	$\alpha$ -pinene	Brasile [45]	
245	$\beta$ -pinene	Brasile [45]	

<sup>i</sup> Viene riportata la quantità media di composto, se sono stati analizzati diversi campioni e, tra parentesi quadre, i valori limite

EEP = ethanolic extract of propolis

## Allegato 2 - Tabella componenti propoli europeo

	<b>Composto</b>	<b>Provenienza</b>	<b>Quantità</b>
<b>Acidi Alifatici</b>			
1	Acido cinnamilideneacetico	Bulgaria [53]	6.3 mg/g EEP
		Ungheria [53]	7.8 mg/g EEP
2	Acido 3,4-dimetossicinnamico	Bulgaria [53]	4.0 mg/g EEP
		Ucraina [53]	0.8 mg/g EEP
		Ungheria [53]	5.2 mg/g EEP
3	Acido 3-idrossicinnamico	Italia [44]	+
4	Acido 4-idrossi-cinnamico	Italia [44]	+
5	Acido caffeico	Bulgaria [53]	7.2 mg/g EEP
		Croazia [52, 54]	5.8 µg/ml EEP [52] 26.999 µg/ml EEP [54]
		Italia [44]	+
		Ucraina [53]	0.8 mg/g EEP
		Ungheria [53]	3.1 mg/g EEP
6	Acido ferulico	Croazia [52]	7.3 µg/ml EEP
7	Acido isoferulico	Croazia [52]	3.4 µg/ml EEP
8	Acido p-cumarico	Bulgaria [53]	3.5 mg/g EEP
		Croazia [52]	11.1 µg/ml EEP
		Ucraina [53]	8.9 mg/g EEP
		Ungheria [53]	3.7 mg/g EEP
<b>Esteri</b>			
9	Benzil Caffeato	Europa [50]	+
10	Cinnamil caffeato	Bulgaria [53]	6.1 mg/g EEP
		Ucraina [53]	2.1 mg/g EEP
		Ungheria [53]	13.8 mg/g EEP
11	Fenil caffeato o Fenil estere dell'acido caffeico (CAPE)	Bulgaria [53]	5.6 mg/g EEP
		Europa [50]	+
		Ucraina [53]	2.6 mg/g EEP
		Ungheria [53]	13.8 mg/g EEP
12	Pentil caffeato	Europa [50]	+
<b>Flavonoidi e derivati</b>			
13	Apigenina	Bulgaria [53]	13.4 mg/g EEP
		Croazia [52]	3.3 µg/ml EEP
		Ucraina [53]	3.9 mg/g EEP
		Ungheria [53]	9.0 mg/g EEP
14	Canferolo	Bulgaria [53]	5.0 mg/g EEP
		Croazia [52]	4.3 µg/ml EEP
		Italia [44]	+
		Ucraina [53]	10.9 mg/g EEP
		Ungheria [53]	4.8 mg/g EEP
15	Crisina	Bulgaria [53]	120.4 mg/g EEP
		Croazia [52, 54]	47.8 µg/ml EEP [52] 53.462 µg/ml EEP [54]
		Europa [50]	+
		Italia [44]	+
		Ucraina [53]	12.9 mg/g EEP
		Ungheria [53]	82.9 mg/g EEP
16	Galangina	Bulgaria [53]	45.6 mg/g EEP
		Croazia [52]	30.624 µg/ml EEP
		Europa [50]	+
		Italia [50]	+
		Ucraina [53]	13.4 mg/g EEP
		Ungheria [53]	44.2 mg/g EEP
17	Naringenina	Croazia [54]	24.517 µg/ml EEP
		Italia [44]	+
18	Omoeridictiolo	Croazia [52]	6.4 µg/ml EEP
19	Pinobancin-3-acetato	Bulgaria [53]	41.2 mg/g EEP
		Ucraina [53]	14.7 mg/g EEP

	<b>Composto</b>	<b>Provenienza</b>	<b>Quantità</b>
		Ungheria [53]	59.9 mg/g EEP
20	Pinobancsin-5-metil etere	Bulgaria [53]	19.7 mg/g EEP
		Ucraina [53]	7.5 mg/g EEP
		Ungheria [53]	21.8 mg/g EEP
21	Pinobancsina	Bulgaria [53]	84.8 mg/g EEP
		Europa [50]	+
		Ucraina [53]	6.6 mg/g EEP
		Ungheria [53]	21.3 mg/g EEP
22	Pinobancsin-O-acetato	Europa [50]	+
23	Pinocebrina	Bulgaria [53]	94.4 mg/g EEP
		Croazia [52, 54]	15.3 µg/ml EEP [52] 41.843 µg/ml EEP [54]
		Europa [50]	+
		Italia [44, 50]	+
		Ucraina [53]	9.2 mg/g EEP
		Ungheria [53]	51.2 mg/g EEP
24	Pinostrombina	Croazia [52]	10.2 µg/ml EEP
25	Quercetina	Bulgaria [53]	4.7 mg/g EEP
		Croazia [54]	20.420 µg/ml EEP
		Italia [44]	+
		Ungheria [53]	4.4 mg/g EEP
26	Ramnetina	Croazia [52]	1.2 µg/ml EEP
27	Sacuranetina	Croazia [52]	4.2 µg/ml EEP
28	Tectocrisina	Bulgaria [53]	96.9 mg/g EEP
		Croazia [52]	12.2 µg/ml EEP
		Ucraina [53]	12.4 mg/g EEP
		Ungheria [53]	39.0 mg/g EEP

### Allegato 3. Tabella componenti propoli brasiliano

Composto	Quantità	Rif
<b>Derivati dell'acido cinnamico</b>		
Acido 2,2-dimetil-8-prenilcromene-6-propenoico		[49]
Acido 2,2-dimetilcromene-6-propenoico		[49]
Acido 3-idrossi-2,2-dimetil-8-prenilcroman-6-propenoico		[49]
Acido 4-diidrocinnamoidossi-3-prenilcinnamico		[49]
Acido 4-idrossi-3-prenilcinnamico		[49]
Acido ferulico	2.4 mg/g	[45]
Acido idrocinnamico (Acido benzenopropanoico)		[45]
Acido p-cumarico	8.5 mg/g	[45]
Artepillin C (Acido 4-idrossi-3,5-prenilcinnamico)		[49]
Metil idrocinnamato		[45]
<b>Flavonoidi</b>		
3,5,7-Triidrossi-4'-metossiflavanolo		[49]
4',7-Dimetossi-2'-isoflavanolo		[48]
7,4'-Diidrossiisoflavone		[48]
Betuletolo (3,5,7-Triidrossi-6-metossi-2-(4-metossi-fenil)-cromen-4-one)		[49]
Canferide (3,5,7-Triidrossi-2-(4-metossi-fenil)-cromen-4-one)	12.3 mg/g	[45]
		[49]
Canferolo (3,5,7-Triidrossi-2-(4-idrossi-fenil)-cromen-4-one)	0.4 mg/g	[45]
Ermanina (5,7-Diidrossi-3,6-dimetossi-2-(4-metossi-fenil)-cromen-4-one)		[49]
Isosacuratenina (5,7-Diidrossi-2-(4-metossi-fenil)-croman-4-one)	7.3 mg/g	[45]
Isosativan (5-Metossi-2-(7-metossi-croman-3-il)-fenolo)		[56]
Medicarpina (9-Metossi-6 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -diidro-6H-benzo[4,5]furo[3,2-c]cromen-3-ol)		[48, 56]
Pinobancsina (3,5,7-Triidrossi-2-fenil-croman-4-one)	8.7 mg/g	[45]
<b>Terpenoidi</b>		
$\alpha$ -pinene		[45, 67]
$\alpha$ -terpineolo		[67]
$\beta$ -pinene		[45, 67]
4-terpineolo		[67]
Farnesolo		[45]
Mircene (7-Methyl-3-methylene-1,6-octadiene)		[67]
<b>Acidi carbossilici aromatici</b>		
Acido 2,2-dimetilcromen-6-carbossilico		[49]
Acido 4-metossibenzoico		[45]
Acido benzoico		[48]
<b>Acidi grassi e loro esteri</b>		
Acido 9,12-ottadecadienoico		[45]
Acido palmitico (Acido esadecanoico)		[45]
Metil estere dell'acido 10-ottadecenoico		[48]
Metil palmitato (Metil estere dell'acido esadecanoico)		[48]
<b>Altro</b>		
1,1,2-Trimetil-3,5-bis(1-metiletetil)-(2. $\alpha$ ,3. $\alpha$ ,5, $\beta$ )-iclosano		[48]
1,2-Dimetossi-4-propenil-benzene		[56]
12-Acetossiviscidone (Etere 2-(6-acetil-5-idrossi-2,3-diidro-benzofuran-2-il)-allilico dell'acido acetico)		[49]
15-metil estere dell'acido agatico (Acido 5-(4-metossicarbonil-3-metil-but-3-enil)-1,4 $\alpha$ -dimetil-6-metilene-decaidro-naftalene-1-carbossilico)		[49]
1 $\alpha$ -(3-Metil-but-2-enil)-1 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diidro-1-ossa-ciclopropa[b]naftalene-2,7-dione		[56]
1-fenil-etanone		[67]
1-metossi-4-(1-propenil)-benzene		[48, 56]
2,2,6- $\beta$ -trimetil-biciclo(4.3.0)non-9(1)-en-7. $\alpha$ -olo		[48]

Composto	Quantità	Rif
2-(3,4-Diidrossi-benzoil)-3-idrossi-4-(2-isopropenil-5-metil-es-4-enil)-6-(3-metil-but-2-enil)-5-metilene-6-(3,3,4,7-tetrametil-ott-6-enil)-cicloes-2-enone		[56]
2-(3,4-Diidrossi-benzoil)-3-idrossi-4-(2-isopropenil-5-metil-es-5-enil)-6-(3-metil-but-2-enil)-5-metilene-6-(3,3,4,7-tetrametil-ott-6-enil)-cicloes-2-enone		[56]
2,4,6-Trimetossifenolo		[48]
2H-1-Benzopiran-7-olo		[48]
3-metossifenolo (m-Guaiacol)		[48]
5-Allil-1,2,3-trimetossi-benzene		[48, 56]
$\alpha$ -amirina (4,4,6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,11,11,14 $\beta$ -Eptametil-1,2,3,4,4 $\alpha$ ,5,6,6 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7,8,8 $\alpha$ ,9,10,11,12,12 $\alpha$ ,14,14 $\alpha$ ,14 $\beta$ -eicosaidro-picen-3-olo)		[56]
$\alpha$ -umulene		[67]
$\beta$ -amirina (4,4,6 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,11,12,14 $\beta$ -Ottametil-1,2,3,4,4 $\alpha$ ,5,6,6 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7,8,8 $\alpha$ ,9,10,11,12,12 $\alpha$ ,14,14 $\alpha$ ,14 $\beta$ -eicosaidro-picen-3-olo)		[56]
$\gamma$ -murulene		[67]
$\delta$ -cadinene		[67]
Acido 15-acetossiisocupressico (Acido 5-(6-acetossi-3-metil-es-3-enil)-1,4 $\alpha$ -dimetil-6-metilene-decaidro-naftalene-1-carbossilico)		[49]
Acido agatalico (5-(5-Formil-5,8 $\alpha$ -dimetil-2-metilene-decaidro-naftalen-1-il)-3-metil-pent-2-enoico)		[49]
Acido agatico (Acido 5-(4-carbossi-3-metil-but-3-enil)-1,4 $\alpha$ -dimetil-6-metilene-decaidro-naftalene-1-carbossilico)		[49]
Acido butanedioico		[45]
Acido cupressico (Acido 5-(3-idrossi-3-metil-pent-4-enil)-1,4 $\alpha$ -dimetil-6-metilene-decaidro-naftalene-1-carbossilico)		[49]
Acido isocupressico (Acido 5-(6-idrossi-3-metil-es-3-enil)-1,4 $\alpha$ -dimetil-6-metilene-decaidro-naftalene-1-carbossilico)		[49]
Aromadendrene		[67]
Benzeneacetaldeide		[67]
Benzeneacetoneitrile		[67]
Benzeneetanolo		[67]
Cicloartenolo (17-(1,5-Dimetil-es-4-enil)-4,4,13,14-tetrametil-tetradecaidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3-olo)		[56]
<i>Cis</i> - $\beta$ -guaiene		[67]
Coniferil acetato dimerico (Etere 3-[3-acetossimetil-2-(4-idrossi-3-metossi-fenil)-7-metossi-2,3-diidro-benzofuran-5-il]-allilico dell'acido acetico)		[49]
Coniferil aldeide (3-(4-Idrossi-3-metossi-fenil)-propenale)		[49]
Dimetilestere dell'acido idrossibutandioico		[48]
Dimetilsuccinato (Dimetilestere dell'acido butandioico)		[48]
Etil 3-fenilpropionato		[67]
Globulolo		[67]
Limonene		[67]
Linalolo		[67]
Lupeolo (1-Isopropenil-3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,8,8,11 $\alpha$ -esametil-eicosaidro-ciclopenta[a]crisen-9-olo)		[56]
Metil Abietato ((1S,4 $\alpha$ R,4 $\beta$ S)-methyl 1,2,3,4,4 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,5,6,10,10 $\alpha$ -decaidro-7-isopropi-1,4 $\alpha$ -dimetilfenantrene-1-carbossilato)		[48]
Metilestere dell'acido benzenepropanoico		[67]
Metil Eugenolo (4-Allil-1,2-dimetossibenzene)		[48, 56]
Metil o-orsellinato (Metil 2,4-diidrossi-6-metilbenzoato)		[48]
Metossi Eugenolo (4-allil-2-(Metossimetossi)fenolo)		[48]
Nerolidolo		[67]

	<b>Composto</b>	<b>Quantità</b>	<b>Rif</b>
	Omoptero carpina		[48]
	Spatulenolo		[67]
	Torreioolo		[67]
	<i>Trans</i> -cariofillene		[67]
	Tremetone (1-(2-Isopropenil-2,3-diidro-benzofuran-5-il)-etanone)		[49]
	Vanillina (4-Idrossi-3-metossi-benzaldeide)		[49]
	Viscidone (1-[5-Idrossi-2-(1-idrossimetil-vinil)-2,3-diidro-benzofuran-6-il]-etanone)		[49]

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. SEIFRIED HE, ANDERSON DE, FISHER EI, MILNER JA. *A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species*. Journal of Nutritional Biochemistry; **18**, 9 (2007) 567-579.
2. GERSCHMAN R, GILBERT DL, NYE SW, DWYER P, FENN WO. *Oxygen poisoning and X-irradiation - A mechanism in common*. Science; **119**, 3097 (1954) 623-626.
3. VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MTD, MAZUR M, TELSER J. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology; **39**, 1 (2007) 44-84.
4. VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M, MAZUR M. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chemico-Biological Interactions; **160**, 1 (2006) 1-40.
5. MASAKI H. *Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects*. Journal of Dermatological Science; **58**, 2 (2010) 85-90.
6. VALAVANIDIS A, VLACHOGIANNI T, FIOTAKIS K. *Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles*. International Journal of Environmental Research and Public Health; **6**, 2 (2009) 445-462.
7. VALKO M, IZAKOVIC M, MAZUR M, RHODES CJ, TELSER J. *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence*. Molecular and Cellular Biochemistry; **266**, 1-2 (2004) 37-56.
8. ARIENTI G. *Le basi molecolari della nutrizione*. Padova: Piccin; 2003.
9. ANTOLOVICH M, PRENZLER PD, PATSALIDES E, MCDONALD S, ROBARDS K. *Methods for testing antioxidant activity*. Analyst; **127**, 1 (2002) 183-198.
10. HARMAN D. *Aging - A theory based on free-radical and radiation-chemistry*. Journals of Gerontology; **11**, 3 (1956) 298-300.
11. NICHOLS JA, KATIYAR SK. *Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms*. Archives of Dermatological Research; **302**, 2 (2010) 71-83.
12. WLASCHEK M, TANTCHEVA-POOR I, NADERI L, MA WJ, SCHNEIDER A, RAZI-WOLF Z, SCHULLER J, SCHARFFETTER-KOCHANEK K. *Solar UV irradiation and dermal photoaging*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology; **63**, 1-3 (2001) 41-51.
13. ICHIHASHI M, UEDA M, BUDIYANTO A, BITO T, OKA M, FUKUNAGA M, TSURU K, HORIKAWA T. *UV-induced skin damage*. Toxicology; **189**, 1-2 (2003) 21-39.
14. BREWER GJ, DICK RD, GROVER DK, LECLAIRE V, TSENG M, WICHA M, PIENTA K, REDMAN BG, JAHAN T, SONDAK VK, STRAWDERMAN M, LECARPENTIER G, MERAJVER SD. *Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study*. Clinical Cancer Research; **6**, 1 (2000) 1-10.
15. FERRIÈRES J. *French paradox: Lessons for other countries*. Heart; **90**, 1 (2004) 107-111.
16. RENAUD S, DELORGERIL M. *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart-disease*. Lancet; **339**, 8808 (1992) 1523-1526.

17. FABRIS S, MOMO F, RAVAGNAN G, STEVANATO R. *Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes*. *Biophysical Chemistry*; **135**, 1-3 (2008) 76-83.
18. SOFI F, CESARI F, ABBATE R, GENSINI GF, CASINI A. *Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis*. *British Medical Journal*; **337**, (2008) 1344-1350.
19. ORGANIZZAZIONE DELLE NAZIONI UNITE PER L'EDUCAZIONE LA SCIENZA E LA CULTURA (UNESCO). *La dieta mediterranea è patrimonio immateriale dell'umanità* (2010) <http://www.unesco.it/cni/index.php/news/174-la-dieta-mediterranea-e-patrimonio-immateriale-dellumanita>.
20. LAGUERRE M, LECOMTE J, VILLENEUVE P. *Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges*. *Progress in Lipid Research*; **46**, 5 (2007) 244-282.
21. D'ARCHIVIO M, FILESI C, DI BENETTO R, GARGIULO R, GIOVANNINI C, MASELLA R. *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*; **43**, 4 (2007) 348-361.
22. CARRATÙ B, SANZINI E. *Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale*. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*; **41**, 1 (2005) 7-16.
23. MAGALHÃES LM, SEGUNDO MA, REIS S, LIMA JLFC. *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties*. *Analytica Chimica Acta*; **613**, 1 (2008) 1-19.
24. WAYNER D, BURTON G, INGOLD K, LOCKE S. *Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins*. *FEBS Letters*; **187**, 1 (1985) 33-37.
25. HUANG D, OU B, PRIOR R. *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **53**, 6 (2005) 1841-1856.
26. ROSSETTO M, VANZANI P, MATTIVI F, LUNELLI M, SCARPA M, RIGO A. *Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; **408**, 2 (2002) 239-245.
27. NIKI E. *Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*; **49**, 4 (2010) 503-515.
28. PRYOR WA, STRICKLAND T, CHURCH DF. *Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous sodium dodecyl sulfate micelle solutions*. *Journal of American Chemical Society*; **110**, (1988) 2224-2229.
29. MAGALHAES LM, SEGUNDO MA, REIS S, LIMA J. *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties*. *Analytica Chimica Acta*; **613**, 1 (2008) 1-19.
30. MILLER N, RICE-EVANS C, DAVIES M, GOPINATHAN V, MILNER A. *A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates*. *Clinical Science (London)*; **84**, 4 (1993) 407-412.
31. MILARDOVIĆ S, IVEKOVIĆ D, GRABARIĆ B. *A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical*. *Bioelectrochemistry*; **68**, 2 (2006) 175-180.
32. SINGLETON VL, ROSSI JAJ. *Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents*. *American Journal of Enology and Viticulture*; **16**, 3 (1965) 144-158.

33. STEVANATO R, FABRIS S, MOMO F. *New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **52**, 20 (2004) 6287-6293.
34. SMIRNOVA LP, PERVYKH LN. *Quantitative determination of the total content of flavonoids in the flowers of immortal Helichrysum arenarium*. Pharmaceutical Chemistry Journal; **32**, 6 (1998) 35-38.
35. CHANG C-C, YANG M-H, WEN H-M, CHERN J-C. *Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods*. Journal of Food and Drug Analysis; **10**, 3 (2002) 178-182.
36. ROE JH, KUETHER CA. *The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid*. Journal of Biological Chemistry; **147**, (1943) 399-407.
37. TERADA M, WATANABE Y, KUNITOMO M, HAYASHI E. *Differential rapid analysis of ascorbic acid and ascorbic acid 2-sulfate by dinitrophenylhydrazine method*. Analytical Biochemistry; **84**, 2 (1978) 604-608.
38. MOMO F, FABRIS S, STEVANATO R. *Interaction of fluoxetine with phosphatidylcholine liposomes*. Biophysical Chemistry; **118**, 1 (2005) 15-21.
39. MOMO F, FABRIS S, BINDOLI A, SCUTARI G, STEVANATO R. *Different effects of propofol and nitrosopropofol on DMPC multilamellar liposomes*. Biophysical Chemistry; **95**, 2 (2002) 145-155.
40. MABREY-GAUD S. *Differential scanning calorimetry of liposomes*. In "Liposomes: from physical structure to therapeutic application". Cambridge: Elsevier/North-Holland Biomedical Press; 1981.
41. MARSH D, WATTS A. *ESR spin label studies of liposomes*. In "Liposomes: from physical structure to therapeutic application". Cambridge: Elsevier/North-Holland Biomedical Press; 1981.
42. WILKINSON DA, NAGLE JF. *Dilatometric Study of Binary Mixture of Phosphatidylcholines*. Biochemistry; **18**, (1972) 4244-4249.
43. CASTALDO S, CAPASSO F. *Propolis, an old remedy used in modern medicine*. Fitoterapia; **73**, (2002) S1-S6.
44. PIETTA PG, GARDANA C, PIETTA AM. *Analytical methods for quality control of propolis*. Fitoterapia; **73**, (2002) S7-S20.
45. PARK YK, ALENCAR SM, AGUIAR CL. *Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **50**, 9 (2002) 2502-2506.
46. MOHAMMADZADEH S, SHARIATPANAHI M, HAMED M, AHMADKHANIHA R, SAMADI N, OSTAD SN. *Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis*. Food Chemistry; **103**, 4 (2007) 1097-1103.
47. SALOMÃO K, DANTAS AP, BORBA CM, CAMPOS LC, MACHADO DG, NETO FRA, DE CASTRO SL. *Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis*. Letters in Applied Microbiology; **38**, 2 (2004) 87-92.
48. ALENCAR SM, OLDONI TLC, CASTRO ML, CABRAL ISR, COSTA-NETO CM, CURY JA, ROSALEN PL, IKEGAKI M. *Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis*. Journal of Ethnopharmacology; **113**, 2 (2007) 278-283.

49. BANSKOTA AH, TEZUKA Y, PRASAIN JK, MATSUSHIGE K, SAIKI I, KADOTA S. *Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities*. Journal of Natural Products; **61**, 7 (1998) 896-900.
50. GÓMEZ-CARAVACA AM, GÓMEZ-ROMERO M, ARRÁEZ-ROMÁN D, SEGURA-CARRETERO A, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A. *Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; **41**, 4 (2006) 1220-1234.
51. ISLA MI, PAREDES-GUZMAN JF, NIEVA-MORENO MI, KOO H, PARK YK. *Some chemical composition and biological activity of northern argentine propolis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **53**, 4 (2005) 1166-1172.
52. JASPRICA I, BOJIC M, MORNAR A, BESIC E, BUCAN K, MEDIC-SARIC M. *Evaluation of antioxidative activity of Croatian propolis samples using DPPH and ABTS<sup>+</sup> stable free radical assays*. Molecules; **12**, 5 (2007) 1006-1021.
53. KUMAZAWA S, HAMASAKA T, NAKAYAMA T. *Antioxidant activity of propolis of various geographic origins*. Food Chemistry; **84**, 3 (2004) 329-339.
54. LALIĆ Z, GRANIĆ P, LOVRIĆ M, BOŽINA N. *HPLC method for analysis of propolis extracts*. (.)
55. SILICI S, KUTLUCA S. *Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region*. Journal of Ethnopharmacology; **99**, 1 (2005) 69-73.
56. TRUSHEVA B, POPOVA M, BANKOVA V, SIMOVA S, MARCUCCI MC, MIORIN PL, PASIN FD, TSVETKOVA I. *Bioactive constituents of Brazilian red propolis*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine; **3**, 2 (2006) 249-254.
57. SHIMAZAWA M, CHIKAMATSU S, MORIMOTO N, MISHIMA S, NAGAI H, HARA H. *Neuroprotection by Brazilian green propolis against in vitro and in vivo ischemic neuronal damage*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine; **2**, 2 (2005) 201-207.
58. SZLISZKA E, CZUBA ZP, DOMINO M, MAZUR B, ZYDOWICZ G, KROL W. *Ethanollic Extract of Propolis (EEP) Enhances the Apoptosis-Inducing Potential of TRAIL in Cancer Cells*. Molecules; **14**, 2 (2009) 738-754.
59. NAKAJIMA Y, TSURUMA K, SHIMAZAWA M, MISHIMA S, HARA H. *Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities*. BMC Complementary and Alternative Medicine; **9**, (2009)
60. IZUTA H, NARAHARA Y, SHIMAZAWA M, MISHIMA S, KONDO S, HARA H. *1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical Scavenging Activity of Bee Products and Their Constituents Determined by ESR*. Biological & Pharmaceutical Bulletin; **32**, 12 (2009) 1947-1951.
61. RUSSO A, LONGO R, VANELLA A. *Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin*. Fitoterapia; **73**, (2002) S21-S29.
62. OSSERVATORIO NAZIONALE DELLA PRODUZIONE E DEL MERCATO DEL MIELE. *Andamento produttivo e di mercato del miele in Italia - Rapporto annuale (2006)*
63. DE RIJKE E, OUT P, NIESSEN WMA, ARIESE F, GOOIJER C, BRINKMAN UAT. *Analytical separation and detection methods for flavonoids*. Journal of Chromatography A; **1112**, 1-2 (2006) 31-63.
64. CHAILLOU LL, NAZARENO MA. *Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition*. Lwt-Food Science and Technology; **42**, 8 (2009) 1422-1427.

65. GARDANA C, SCAGLIANTI M, PIETTA P, SIMONETTI P. *Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; **45**, 3 (2007) 390-399.
66. SALATINO A, TEIXEIRA EW, NEGRI G, MESSAGE D. *Origin and chemical variation of Brazilian propolis*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine; **2**, 1 (2005) 33-38.
67. MARÓSTICA MRJ, DAUGSCH A, MORAES CS, QUEIROGA CL, PASTORE GM, PARK YK. *Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin Baccharis dracunculifolia*. Ciência e Tecnologia de Alimentos; **28**, 1 (2008) 178-181.
68. BRAVO L. *Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutrition Reviews; **56**, 11 (1998) 317-333.
69. SAYRE RM, AGIN PP, LEVEE GJ, MARLOWE E. *Comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas*. Photochemistry and Photobiology; **29**, 3 (1979) 559-566.
70. DIFFEY BL, ROBSON J. *A new substrate to measure sunscreen protection factor throughout the ultraviolet-spectrum*. Journal of the Society of Cosmetic Chemists; **40**, 3 (1989) 127-133.
71. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) - DEPARTMENT OF HEALTH EDUCATION AND WELFARE - USA. *Sunscreen drug products for the over-the-counter human use* (2001) Federal register: 64/27687, 276.
72. HERZOG B. *Prediction of sun protection factors by calculation of transmissions with a calibrated step film model*. J Cosmet Sci; **53**, 1 (2002) 11-26.
73. HEXSEL CL, BANGERT SD, HEBERT AA, LIM HW. *Current sunscreen issues: 2007 Food and Drug Administration sunscreen labelling recommendations and combination sunscreen/insect repellent products*. Journal of the American Academy of Dermatology; **59**, 2 (2008) 316-323.
74. CHEMISCHE INDUSTRIE BASEL (CIBA). *Sunscreen Simulator* (2010) [www.ciba.com/sunscreensimulator](http://www.ciba.com/sunscreensimulator).
75. GASPARRO FP, MITCHNICK M, NASH JF. *A review of sunscreen safety and efficacy*. Photochemistry and Photobiology; **68**, 3 (1998) 243-256.
76. MORTON JF. *Fruit of warm climates*. Miami, FL (USA): Julia F Morton; 1987.
77. DING H, CHIN Y-W, KINGHORN AD, D'AMBROSIO SM. *Chemopreventive characteristics of avocado fruit*. Seminars in Cancer Biology; **17**, 5 (2007) 386-394.
78. TSAI MH, CHANG WN, LUI CC, CHUNG KJ, HSU KT, HUANG CR, LU CH, CHUANG YC. *Status epilepticus induced by star fruit intoxication in patients with chronic renal disease*. Seizure-European Journal of Epilepsy; **14**, 7 (2005) 521-525.
79. LORENZI H, BACHER L, LACERDA M, SARTORI S. *Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas (de consumo in natura)*. Nova Odessa, SP (Brasil): Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda; 2006.
80. HOSOI S, SHIMIZU E, ARIMORI K, OKUMURA M, HIDAKA M, YAMADA M, SAKUSHIMA A. *Analysis of CYP3A inhibitory components of star fruit (Averrhoa carambola L.) using liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Natural Medicines; **62**, 3 (2008) 345-348.
81. HASRAT JA, DEBRUYNE T, DEBACKER JP, VAUQUELIN G, VLIETINCK AJ. *Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of Annona muricata as 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists in rats: Unexploited antidepressive (lead) products*. Journal of Pharmacy and Pharmacology; **49**, 11 (1997) 1145-1149.

82. MESIA-VELA S, SANTOS MT, SOUCCAR C, LIMA-LANDMAN MTR, LAPA AJ. *Solanum paniculatum L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice*. Phytomedicine; **9**, 6 (2002) 508-514.
83. PERCIVAL SS, TALCOTT ST, CHIN ST, MALLAK AC, LOUNDS-SINGLETON A, PETTIT-MOORE J. *Neoplastic transformation of BALB/3T3 cells and cell cycle of HL-60 cells are inhibited by mango (Mangifera indica L.) juice and mango juice extracts*. Journal of Nutrition; **136**, 5 (2006) 1300-1304.
84. DE LIMA A, DE OLIVEIRA E SILVA AM, ALMEIDA TRINDADE R, PAVAN TORRES R, MANCINI J-F. *Chemical composition and bioactive compounds in the pulp and almond of pequi fruit*. Revista Brasileira De Fruticultura; **29**, 3 (2007) 695-698.
85. ARIFFIN AA, BAKAR J, TAN CP, RAHMAN RA, KARIM R, LOI CC. *Essential fatty acids of pitaya (dragon fruit) seed oil*. Food Chemistry; **114**, 2 (2009) 561-564.
86. KHALID S, MOSSADEQ WMS, ISRAF DA, HASHIM P, REJAB S, SHABERI AM, MOHAMAD AS, ZAKARIA ZA, SULAIMAN MR. *In vivo Analgesic Effect of Aqueous Extract of Tamarindus indica L. Fruits*. Medical Principles and Practice; **19**, 4 (2010) 255-259.
87. CHOWDHURY SR, SARKER DK, CHOWDHURY SD, SMITH TK, ROY PK, WAHID MA. *Effects of dietary tamarind on cholesterol metabolism in laying hens*. Poultry Science; **84**, 1 (2005) 56-60.
88. EPSTEIN L. *A riqueza do umbuzeiro*. Revista Bahia Agrícola; **2**, 3 (1998) 31-34.
89. DE SOUSA SCHMIDT GONÇALVES AE, LAJOLO FM, GENOVESE MI. *Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **58**, 8 (2010) 4666-4674.
90. MAHATTANATAWEE K, MANTHEY JA, LUZIO G, TALCOTT ST, GOODNER K, BALDWIN EA. *Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **54**, 19 (2006) 7355-7363.
91. MANTHEY JA, PERKINS-VEAZIE P. *Influences of Harvest Date and Location on the Levels of beta-Carotene, Ascorbic Acid, Total Phenols, the in Vitro Antioxidant Capacity, and Phenolic Profiles of Five Commercial Varieties of Mango (Mangifera indica L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **57**, 22 (2009) 10825-10830.
92. PLAZA L, SÁNCHEZ-MORENO C, DE PASCUAL-TERESA S, DE ANCOS B, CANO MP. *Fatty Acids, Sterols, and Antioxidant Activity in Minimally Processed Avocados during Refrigerated Storage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **57**, 8 (2009) 3204-3209.
93. DE ASSIS AS, REBUGLIO VELLOSA CJ, BRUNETTI LI, KHALIL MN, DA SILVA CERQUEIRA LEITE MK, MARTINS BGA, MASCARENHAS DE FARIA OLIVEIRA MO. *Antioxidant activity, ascorbic acid and total phenol of exotic fruits occurring in Brazil*. International Journal of Food Sciences and Nutrition; **60**, 5 (2009) 439-448.
94. SARIBURUN E, SAHIN S, DEMIR C, TURKBEN C, UYLASER V. *Phenolic Content and Antioxidant Activity of Raspberry and Blackberry Cultivars*. Journal of Food Science; **75**, 4 (2010) C328-C335.
95. BURDA S, OLESZEK W. *Antioxidant and antiradical activities of flavonoids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **49**, 6 (2001) 2774-2779.
96. HEIM KE, TAGLIAFERRO AR, BOBILYA DJ. *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. Journal of Nutritional Biochemistry; **13**, 10 (2002) 572-584.

97. HAENEN G, PAQUAY JBG, KORTHOUWER REM, BAST A. *Peroxynitrite scavenging by flavonoids*. Biochemical and Biophysical Research Communications; **236**, 3 (1997) 591-593.
98. PANNALA AS, CHAN TS, O'BRIEN PJ, RICE-EVANS CA. *Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics*. Biochemical and Biophysical Research Communications; **282**, 5 (2001) 1161-1168.
99. BORS W, MICHEL C. *Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols*. Alcohol and Wine in Health and Disease; **957**, (2002) 57-69.
100. PIETTA PG. *Flavonoids as antioxidants*. Journal of Natural Products; **63**, 7 (2000) 1035-1042.
101. RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANGA G. *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Radical Biology and Medicine; **20**, 7 (1996) 933-956.
102. BORS W, HELLER W, MICHEL C, SARAN M. *Flavonoids as antioxidants - Determination of radical-scavenging efficiencies*. Methods in Enzymology; **186**, (1990) 343-355.
103. LEOPOLDINI M, RUSSO N, TOSCANO M. *A comparative study of the antioxidant power of flavonoid catechin and its planar analogue*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **55**, 19 (2007) 7944-7949.
104. RIGOBELLO MP, STEVANATO R, MOMO F, FABRIS S, SCUTARI G, BOSCOLO R, FOLDA A, BINDOLI A. *Evaluation of the antioxidant properties of propofol and its nitrosoderivative. Comparison with homologue substituted phenols*. Free Radical Research; **38**, 3 (2004) 315-321.
105. MARCH J. Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure. Tokyo, Japan: McGraw-Hill Kogakusha; 1968.
106. FUKUHARA K, NAKANISHI I, SHIMADA T, OHKUBO K, MIYAZAKI K, HAKAMATA W, URANO S, OZAWA T, OKUDA H, MIYATA N, IKOTA N, FUKUZUMI S. *A planar catechin analogue as a promising antioxidant with reduced prooxidant activity*. Chemical Research in Toxicology; **16**, 1 (2003) 81-86.
107. WANG LF, ZHANG HY. *A theoretical study of the different radical- scavenging activities of catechin, quercetin, and a rationally designed planar catechin*. Bioorganic Chemistry; **33**, 2 (2005) 108-115.
108. MA YT, CHEUNG PCK. *Spectrophotometric determination of phenolic compounds by enzymatic and chemical methods - A comparison of structure-activity relationship*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **55**, 10 (2007) 4222-4228.
109. MELLO LD, KUBOTA LT. *Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation*. Talanta; **72**, 2 (2007) 335-348.
110. KEUSGEN M. *Biosensors: new approaches in drug discovery*. Naturwissenschaften; **89**, 10 (2002) 433-444.
111. CLARK LC, LIONS C. *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*. Annals of the New York Academy of Sciences; **102**, 1 (1962) 29-45.
112. EGGINS B. Biosensors - An Introduction. Chichester, UK / Stuttgart, Germany: John Wiley & Sons and B. G. Teubner; 1996.
113. SHULTZ JS. *I biosensori*. Le Scienze; **278**, (1991) 72-80.
114. MEHRVAR M, ABDI M. *Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors*. Analytical Sciences; **20**, 8 (2004) 1113-1126.
115. CAMMANN K, ROSS B, KATERKAMP A, REINBOLD J, GRÜNDIG B, RENNEBERG R. Chemical and biochemical sensors. Wiley-VCH; 2001.

116. RUSMINI F, ZHONG ZY, FEIJEN J. *Protein immobilization strategies for protein biochips*. *Biomacromolecules*; **8**, 6 (2007) 1775-1789.
117. RONKAINEN NJ, HALSALL HB, HEINEMAN WR. *Electrochemical biosensors*. *Chemical Society Reviews*; **39**, 5 (2010) 1747-1763.
118. MONK P. *Fundamentals of electroanalytical chemistry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2001.
119. SKOOG DA, LEARY JJ. *Chimica analitica strumentale*. Napoli: EdiSES; 1995.
120. GAMELLA M, CAMPUZANO S, REVIEJO AJ, PINGARRON JM. *Electrochemical estimation of the polyphenol index in wines using a laccase biosensor*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **54**, 21 (2006) 7960-7967.
121. VIANELLO F, RAGUSA S, CAMBRIA MT, RIGO A. *A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element*. *Biosensors & Bioelectronics*; **21**, 11 (2006) 2155-2160.
122. GOMES S, NOGUEIRA JMF, REBELO MJF. *An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine*. *Biosensors & Bioelectronics*; **20**, 6 (2004) 1211-1216.
123. VIANELLO F, CAMBRIA A, RAGUSA S, CAMBRIA MT, ZENNARO L, RIGO A. *A high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of laccase as biorecognition element*. *Biosensors & Bioelectronics*; **20**, 2 (2004) 315-321.
124. DI FUSCO M, TORTOLINI C, DERIU D, MAZZEI F. *Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine*. *Talanta*; **81**, 1-2 (2010) 235-240.
125. GIARDINA P, FARACO V, PEZZELLA C, PISCITELLI A, VANHULLE S, SANNIA G. *Laccases: a never-ending story*. *Cellular and Molecular Life Sciences*; **67**, 3 (2010) 369-385.
126. TETRONIK. *www.tetronik.it* (2010)
127. YI HM, WU LQ, BENTLEY WE, GHODSSI R, RUBLOFF GW, CULVER JN, PAYNE GF. *Biofabrication with chitosan*. *Biomacromolecules*; **6**, 6 (2005) 2881-2894.

# RINGRAZIAMENTI

Ringrazio innanzitutto il prof. Stevanato, mio tutor, che mi ha dato la possibilità di svolgere questa tesi, aiutandomi nelle scelte relative al mio progetto di dottorato ed insegnandomi, giorno dopo giorno, il difficile lavoro del ricercatore. Un ringraziamento va al prof. Vianello, che mi ha dato supporto e aiuto sulla parte della tesi che tratta dei biosensori; un grazie ed un saluto particolare sono dovuti alla prof. Lima, *a minha orientadora. Muito obrigada pelo tempo maravilhoso que passei no Brasil.*

Ringrazio di cuore le mie colleghe Sabrina e Mariangela per gli anni passati insieme in laboratorio e con cui ho condiviso molti momenti importanti. Grazie a Roberta e al prof. Barbante per la disponibilità di tempo e strumentazione nell'analisi HPLC-MS del propoli. Grazie a Marinêz, Tatiana, Andréa e a tutto il gruppo di *Bioquímica* dell'*Instituto de Biociências* di Botucatu. Ancora un grazie agli amici dell'Università: Sarah, Stefano, Chiara, Sara, Elena, Paolo e tutti gli altri. Grazie alla presenza di ognuno di loro questi tre anni sono stati impegnativi, ma ricchi di esperienze e soddisfazioni.

Infine l'ultimo ringraziamento, ma il più importante, va alla mia famiglia e a Marco.



# ESTRATTO PER RIASSUNTO DELLA TESI DI DOTTORATO

Studente: ELENA GREGORIS

Matricola: 955483

Dottorato: SCIENZE CHIMICHE

Ciclo: XXIII

Titolo della tesi: MISURA DELLE PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI DI PRODOTTI TIPICI DELL'AGROALIMENTARE; PROGETTAZIONE E MESSA A PUNTO DI BIOSENSORI.

## Abstract

In questa tesi è stato studiato il potere antiossidante di alcuni prodotti dell'agroalimentare: frutta e propoli. Lo studio effettuato sugli alimenti ha permesso non solo di effettuare un confronto tra il potere antiossidante di prodotti locali e tropicali, analizzati durante il periodo passato presso l'istituto di Bioscienze dell'Università Statale di San Paolo, ma anche di condurre una valutazione approfondita sull'attendibilità dei più comuni metodi spettrofotometrici, largamente utilizzati a causa della loro rapidità e facilità di utilizzo, ma talvolta poco affidabili. L'identificazione dei componenti del propoli responsabili del suo eccezionale potere antiossidante ha portato inoltre ad una ricerca approfondita sulla correlazione tra struttura chimica dei flavonoidi e potere antiossidante. A completamento dello studio dei metodi per la quantificazione del potere antiossidante, è stato messo a punto un biosensore amperometrico a laccasi per la determinazione del potere antiossidante di soluzioni di polifenoli.

In this work some agrifood products has been studied to estimate their antioxidant activity: fruits and propolis. The results allow to compare the antioxidant power of local and tropical products, analyzed during the period I passed at the Institute of Biosciences of the State University of São Paulo. Moreover the results obtained has been used to conduct a thorough evaluation on the most common spectrophotometric methods, widely used because of their speed and convenience, but sometimes unreliable. The identification of the components of propolis responsible for its exceptional antioxidant power also led to an extensive research on the correlation between chemical structure of flavonoids and their antioxidant power. In order to complete the study on the methods that can be used for the quantification of the antioxidant power, an amperometric laccase biosensor has been developed.

Nesta tese foi estudado o poder antioxidante de alguns produtos do sector agro-alimentar: fruta e própolis. Os resultados obtidos no estudo realizado em alimentos permitiram a comparação entre o poder antioxidante dos produtos locais e tropicais, analisados durante o período transcorrido no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, como também uma profunda avaliação da credibilidade dos métodos espectrofotométricos, que são os métodos comumente aplicados nesse tipo de análise, graças à sua rapidez, mesmo se nem sempre são os mais confiáveis. A identificação dos componentes da própolis responsáveis pelo o exepcional poder antioxidante conduziu à realização de um estudo aprofundido da correlação entre a estrutura química dos flavonóides e o poder antioxidante. Completando o estudo sobre os métodos de quantificação do poder antioxidante, foi desenvolvido um biosensor amperométrico com a enzima lacase para a determinação do poder antioxidante de soluções de polifenóis.