



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO XXII

COORDINATORE Prof. Stefano Manfredini

**CARATTERIZZAZIONE DEI SOTTOPRODOTTI  
DELLA FILIERA DEL POMODORO  
PER UN POTENZIALE SVILUPPO INDUSTRIALE**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/10

**Dottorando**

Dott. Caterina Stagno

---

*(firma)*

**Tutore**

Prof. Vincenzo Brandolini

---

*(firma)*

Anni 2007/2009

# INDICE

<i>INTRODUZIONE</i>	1
DESCRIZIONE BOTANICA	2
PRODUZIONE	4
TRASFORMAZIONE DEL POMODORO	5
COMPOSIZIONE CHIMICA E VALORE NUTRIZIONALE	11
COMPOSTI BIOATTIVI NEL POMODORO	13
POLIFENOLI	13
CAROTENOIDI	14
Licopene	15
Attività benefiche del licopene	17
ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE	22
METODI DI DETERMINAZIONE DELLA ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE	23
I SOTTOPRODOTTI DI LAVORAZIONE	24
<i>SCOPO</i>	28
<i>PARTE SPERIMENTALE</i>	29
SPETTROSCOPIA ATOMICA	29
GASCROMATOGRAFIA-SPETTROMETRIA DI MASSA	32
CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI (HPLC)	35
PHOTOCHEM <sup>®</sup>	38
<i>MATERIALI E METODI</i>	40
CAMPIONI ANALIZZATI	40
PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	40
DETERMINAZIONE DELL'AZOTO ORGANICO TOTALE	41
DETERMINAZIONE DELLA FRAZIONE LIPIDICA	41
DETERMINAZIONE DELLA FRAZIONE MINERALE	42

DETERMINAZIONE DEI METALLI MEDIANTE SPETTROSCOPIA ATOMICA	42
DETERMINAZIONE DEL PROFILO IN ACIDI GRASSI MEDIANTE GC-MS	43
DETERMINAZIONE DELLA CAPACITA' ANTIOSSIDANTE	43
Sistema Photochem <sup>®</sup>	43
Metodo DPPH	44
Metodo ABTS	45
Metodo DMPD	46
Metodo FRAP	47
DETERMINAZIONE DEI POLIFENOLI TOTALI	48
DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN LICOPENE	48
Metodo UV-Vis	48
Metodo HPLC	49
ANALISI STATISTICA	49
<i>RISULTATI E DISCUSSIONE</i>	<i>50</i>
<i>CONCLUSIONI</i>	<i>72</i>
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	<i>74</i>

## INTRODUZIONE

Secondo le attuali conoscenze, si ritiene che il pomodoro abbia avuto origine in un'area compresa tra Cile settentrionale, Perù ed Ecuador<sup>[1]</sup> dove si è sviluppato come pianta selvatica per effetto del clima tropicale<sup>[2]</sup>. La domesticazione avvenne, probabilmente, in Messico attraverso la dispersione dei semi, tramite gli uccelli.

Quando il Messico venne conquistato dagli spagnoli nel 1523 il pomodoro era già coltivato in mezzo al mais. I primi esemplari che giunsero nel Vecchio Continente sulle navi dei conquistatori spagnoli al seguito di Hernàn Cortès (1485-1547) di ritorno dalle Americhe erano di piccole dimensioni e di colore giallo<sup>[3]</sup>.

Dall'Europa e più precisamente dalla Spagna, la pianta del pomodoro approdò in Marocco, trovando un clima ideale, e da lì si diffuse in tutto il bacino del Mediterraneo<sup>[2]</sup>.

Durante tutto il XVI secolo il pomodoro si diffuse in tutto il vecchio continente ed in Asia; tuttavia la sua coltura inizialmente fu a solo scopo ornamentale poiché i frutti erano ritenuti tossici e perciò non commestibili (come i frutti di altre specie appartenenti alla famiglia delle solanacee fra cui ad esempio l'*Atropus belladonna*)<sup>[1]</sup>. Non è chiaro in quale luogo ed in quale periodo il pomodoro da pianta ornamentale e velenosa, circondata da leggende popolari, improvvisamente sia diventata per gli Europei pianta commestibile<sup>[2]</sup>, ma si sa che attraverso il possedimento spagnolo di Napoli, nel XVI secolo, il pomodoro entrò nella cucina italiana. Nell'Europa meridionale, ma anche in Boemia ed in Inghilterra, a partire dal XVIII secolo, il pomodoro fresco o come sugo bollito, riscuoteva successo; nel Nord America trovava invece molte difficoltà, probabilmente dovute al mantenimento delle caratteristiche di altre specie di pomodoro selvatiche, ad alto contenuto di alcaloidi. Superati i pregiudizi sulla pericolosità della bacca, la coltivazione del pomodoro subiva una svolta in senso intensivo grazie anche all'opera di Livingstone che stabilì i cardini dei principi di selezione delle varietà, valutando i caratteri dell'intera pianta e non del singolo frutto. Qualche decennio dopo, cominciarono a comparire nei testi di botanica le prime descrizioni di varietà a frutto largo, a frutto lungo e a frutto piccolo<sup>[1]</sup>.

Fra le persone che contribuirono maggiormente alla diffusione ed alla comprensione circa il modo di conservare questo alimento va ricordato Lazzaro Spallanzani, che per primo, nel 1762, riuscì a scoprire che un estratto di carne fatto bollire e mantenuto in un contenitore chiuso non si altera<sup>[2]</sup>. Nel 1800 in Italia la coltivazione del pomodoro si diffuse tra gli agricoltori ed entrò nella economia di mercato. Nel 1809 un cuoco parigino, Nicolas Appert, pubblicò l'opera "L'art de conserver les substances alimentaires d'origine animale et végétale pour plusieurs années"<sup>[1]</sup> (l'arte di conservare

le sostanze alimentari d'origine animale e vegetale per diversi anni) e mentre in Francia il pomodoro veniva consumato principalmente nella corte reale, in Italia si diffuse rapidamente nelle cucine della gente comune<sup>[2]</sup>.

Nel 1810 l'inglese Peter Durand brevettò la scatola di stagno utilizzata poi da Bryan Donkin e dall'americano Woodhull Crosby che nel 1847 preparò le prime scatole di pomodori conservati. Il napoletano Ippolito Cavalcanti nella sua "Cucina Teorico-Pratica" del 1839, descrive la salsa di pomodoro affermando che essa sarebbe diventata il condimento ideale per la pasta di grano duro. Fu probabilmente nello stabilimento piemontese di Francesco Cirio, nell'ultimo quarto del XIX secolo, che cominciò la produzione industriale dei pomodori conservati. La prima produzione di un derivato del pomodoro stabilizzato si fa risalire al 1888, quando il Cavaliere Brandino Vignali attivò a Basilicanova (Parma) uno stabilimento per produrre «estratto di pomodoro» secondo una tecnica che riprendeva quella della «conserva nera» ottenuta dalle famiglie contadine del parmense, facendo essiccare al sole il succo di pomodoro che era stato preventivamente concentrato in grandi pentoloni di rame<sup>[1]</sup>. Quasi contemporaneamente nella provincia di Salerno viene studiata e sviluppata la tecnica per produrre i pomodori pelati, tecnica utilizzata con i pomodori dalla forma allungata coltivati alle pendici del Vesuvio. Dominante nella cucina napoletana, largamente diffuso nella cucina italiana ed in tutto il mondo per le sue proprietà, le sue caratteristiche organolettiche hanno tuttavia ritardato notevolmente il suo ingresso fra i vegetali commestibili. Fu certamente geniale l'abbinamento della salsa di pomodoro con la pizza, che fece e continuerà a far felici i palati degli estimatori di questo alimento della tradizione gastronomica napoletana<sup>[2]</sup>.

## **DESCRIZIONE BOTANICA**

Il pomodoro è stato classificato scientificamente per la prima volta da Carlo Linneo nel 1753 nel genere *Solanum*, come *Solanum lycopersicum* (*lycopersicum* deriva dal latino e significa pesca dei lupi). Nel 1768 tuttavia Philip Miller cambiò il nome, sostenendo che le differenze dalle altre piante del genere *Solanum*, quali patata e melanzana, erano sostanziali, tali da giustificare la creazione di un nuovo genere; da qui il nuovo nome scientifico di *Lycopersicon esculentum*. Questo nome ebbe notevole successo, sebbene fosse contrario alle regole di nomenclatura vegetale, secondo cui, se si sposta la specie in un nuovo genere deve essere cambiato il nome del genere e non della specie (*lycopersicum*). H. Karst corresse l'errore nel 1881 e pubblicò il nome formalmente corretto *Lycopersicon lycopersicum*. La controversia sul nome scientifico del pomodoro non è tuttavia finita. Innanzitutto il nome di Miller era fino a poco fa il più usato, nonostante l'errore indicato prima. Inoltre le moderne tecniche di biologia molecolare hanno permesso di creare precisi alberi filogenetici, che hanno indicato come il pomodoro in realtà faccia parte veramente del genere

*Solanum*, dando sostanzialmente ragione a Linneo. Il nome ufficiale è oggi *Solanum lycopersicum*, sebbene il nome di Miller rimanga ancora in uso in molte pubblicazioni<sup>[1]</sup>.

Il pomodoro è una pianta orticola, che raggiunge a volte l'altezza di due metri ma non avendo un fusto abbastanza resistente ha bisogno di appositi sostegni. Le foglie si presentano lunghe con un lembo profondamente inciso e la radice fittonante è provvista di numerose radici laterali. I fiori si presentano a grappoli distribuiti lungo il fusto e le sue ramificazioni<sup>[4]</sup>. Il frutto è una bacca carnosa: l'epicarpo è membranoso, mesocarpo e endocarpo sono entrambi carnosì<sup>[5]</sup>. La dimensione della bacca è una caratteristica varietale, ma può essere influenzata da condizioni ambientali così come dalla tecnica colturale. In genere, l'aumento del peso della bacca è inversamente correlato al numero di bacche per pianta. Anche il numero di semi per bacca può influenzare la dimensione, dato che i semi agiscono come centri di regolazione del metabolismo del frutto<sup>[1]</sup>.

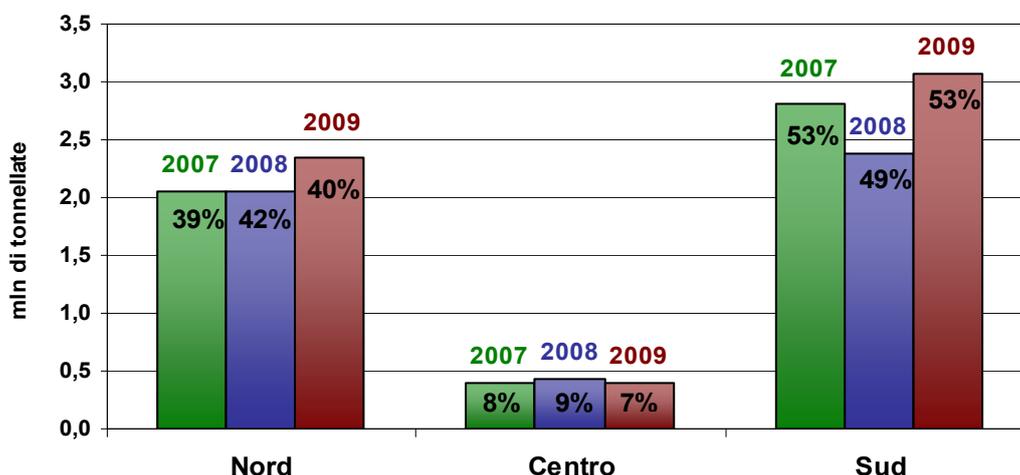
La pianta è estremamente adattabile, essendo diffusa in quasi tutto il pianeta, tuttavia predilige terreni di medio impasto, ben drenati, freschi e profondi<sup>[2]</sup>. Il pomodoro tuttavia è una pianta non adatta ai climi freddi tanto che a temperature troppo basse può anche seccare e perire. La temperatura minima di sopravvivenza per questa coltivazione è di 8°-10°C, la germinazione può avvenire tra 12°C e 28°C, tuttavia per ottenere ottimi risultati nell'accrescimento e nella produzione, bisogna assicurarsi che le piante crescano ad una temperatura media compresa tra 20°C e 29°C, temperature più basse o più alte possono compromettere l'accrescimento e il normale sviluppo degli arbusti di pomodoro e la conseguente produzione.

Importante è anche un giusto grado di umidità<sup>[4]</sup>. L'irrigazione del pomodoro rappresenta una delle pratiche colturali che più influiscono sulla resa e sulla qualità del prodotto, specialmente negli ambienti caldo aridi, con precipitazioni nel periodo primaverile-estivo basse o assenti. In alcune aree dell'Italia meridionale viene ancora praticata la coltura asciutta, ma con varietà, ad accrescimento limitato, a frutto piccolo o da serbo, con rese unitarie modeste, tanto che la coltura asciutta assume un interesse economico sempre più limitato. I fabbisogni idrici del pomodoro sono piuttosto elevati e variabili in funzione delle condizioni pedoclimatiche e dei livelli produttivi. Nella coltura irrigua è da tener presente che l'irrigazione può influenzare la qualità dei frutti, rendendoli più acquosi e meno sapidi, ritardare la loro maturazione e diminuirne la resistenza ai trasporti ed alla sosta pre-lavorazione. È preferibile un'irrigazione frequente e leggera per i pomodori da mensa; meno frequente ma più abbondante con un'ultima irrigazione con parecchio anticipo prima della raccolta (quando il 40% dei frutti è maturo) per quelli da industria. Con l'irrigazione si può anche ridurre notevolmente l'incidenza del marciume apicale causato da uno stress idrico, mentre un eccesso idrico durante la maturazione, o in presenza di frutti già maturi, ne può causare la spaccatura soprattutto se preceduta da limitazione idrica.

L'epoca di raccolta del pomodoro dipende dal tipo di coltura e dalle condizioni pedoclimatiche delle zone di coltivazione. In relazione alla destinazione del prodotto al consumo fresco o all'industria conserviera, il pomodoro può essere raccolto all'inviatura della bacca o completamente maturo. L'inizio della colorazione rossa della bacca si manifesta nella zona stilare e poi gradualmente si estende su tutto il frutto. Dal momento dell'inviatura si può raccogliere, perché il processo di maturazione proseguirà regolarmente anche con il distacco dalla pianta<sup>[1]</sup>.

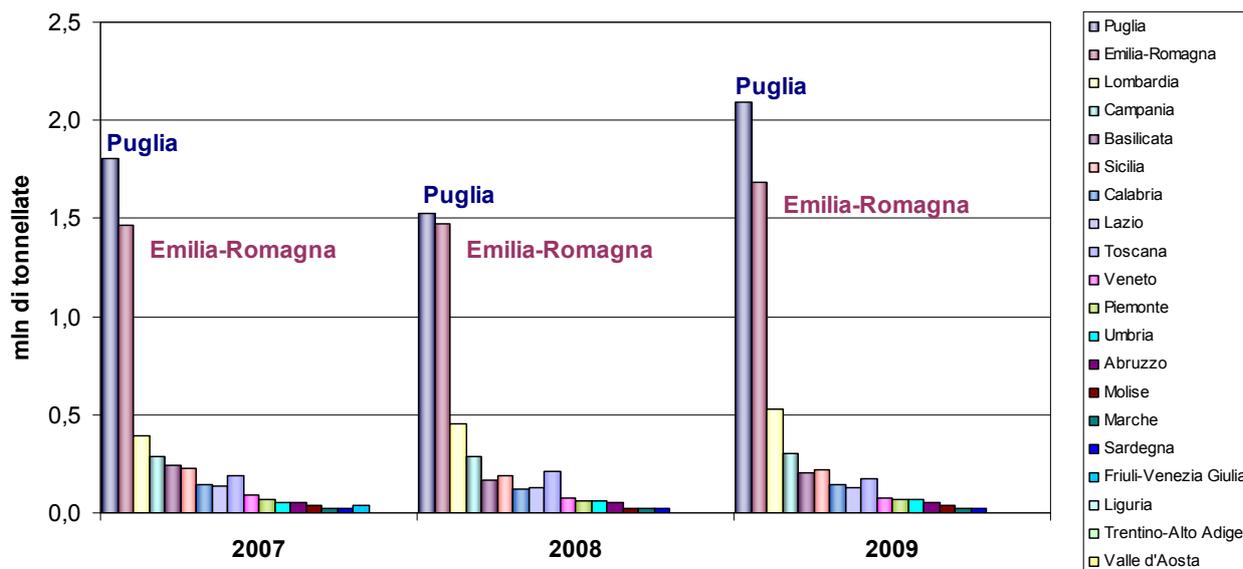
## PRODUZIONE

L'Italia è il sesto Paese produttore al Mondo di pomodoro da industria. E' preceduta da Cina, Stati Uniti, Turchia, India ed Egitto. I dati ISTAT <sup>[6]</sup> dimostrano che in Italia la produzione è superiore nelle regioni del Sud, che con una media 53000 ettari coltivati a pomodoro da industria nel triennio considerato coprono il 50% circa della produzione nazionale (Figura 1).



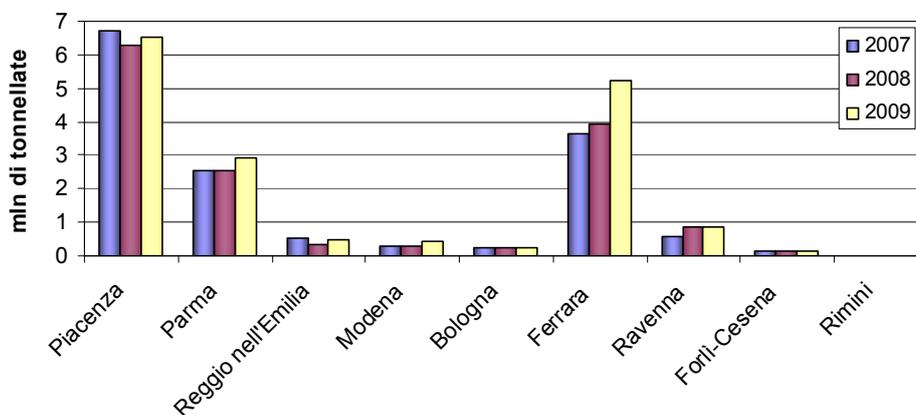
**Figura 1.** Produzione nazionale raccolta di pomodoro da industria (mln di tonnellate)

A livello regionale, Puglia ed Emilia Romagna rappresentano le regioni leader nella produzione di pomodoro destinato alla lavorazione ed insieme coprono più del 60% della produzione nazionale (Figura 2).



**Figura 2.** Produzione raccolta di pomodoro da industria nelle diverse regioni italiane

Focalizzando l'attenzione sulla regione Emilia Romagna (Figura 3), si nota come la provincia in cui si registra il maggior fatturato sia la provincia di Piacenza, seguita a breve distanza dalle province di Ferrara e di Parma. La provincia di Ferrara ha visto un aumento nella produttività durante il triennio considerato, passando da 5440 ettari coltivati e 3.644.800 tonnellate raccolte nell'anno 2007 a 7500 ettari coltivati e 5.525.000 tonnellate raccolte nell'anno 2009.



**Figura 3.** Produzione raccolta di pomodoro da industria nelle province dell'Emilia Romagna

## TRASFORMAZIONE DEL POMODORO

Le innovazioni tecnologiche nel campo conserviero consentono attualmente di poter consumare per tutto l'anno verdura raccolta solo in una determinata stagione. Molti trattamenti hanno raggiunto livelli di qualità tali da ridurre al minimo le perdite di nutrienti che si potrebbero verificare durante la lavorazione. La raccolta dei pomodori può avvenire manualmente o per mezzo di macchine, che successivamente selezionano e distribuiscono il prodotto negli imballaggi.

Così confezionato, il pomodoro viene destinato, in base alle caratteristiche chimico-fisiche e alla forma che presenta, alla vendita diretta o alla conservazione.

I principali prodotti ottenuti dalla lavorazione del pomodoro sono:

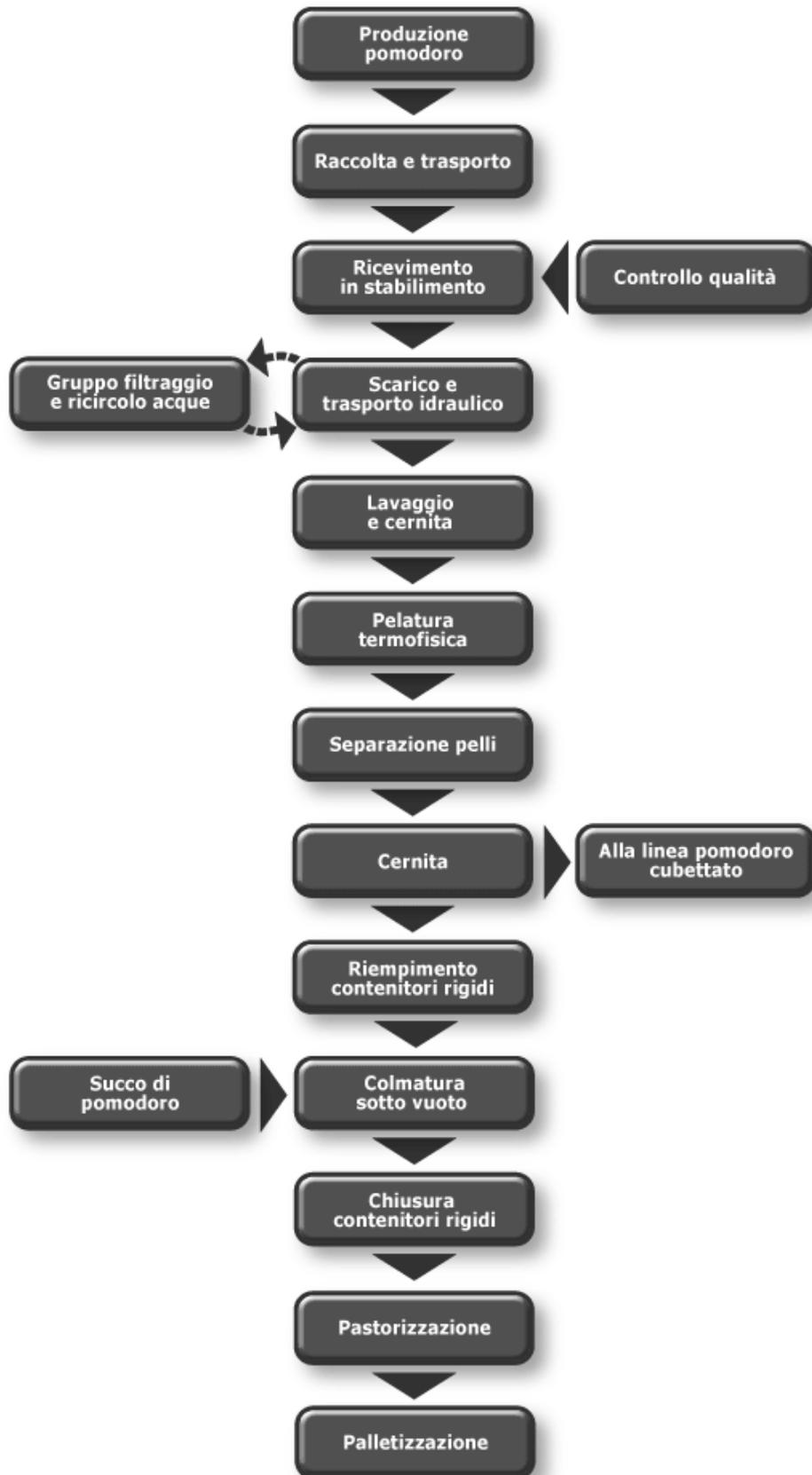
- pomodori pelati, passati e triturati
- concentrato
- succo

ed inoltre polvere, fiocchi e ketchup.

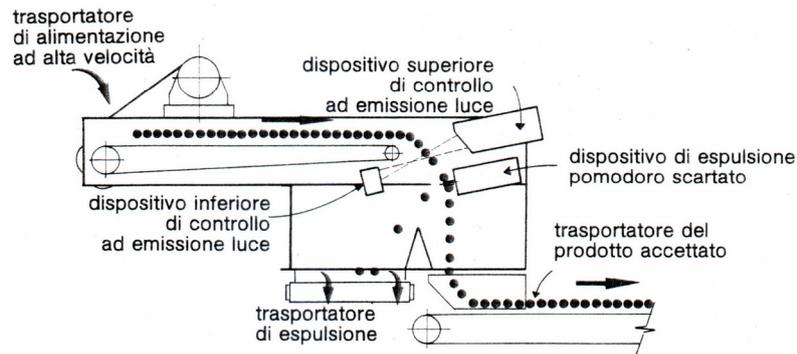
La preparazione dei **pomodori pelati**, per la quale si utilizza prevalentemente la varietà San Marzano dalla caratteristica forma allungata e dalla polpa consistente, prevede varie fasi (Figura 4):

- lavaggio e cernita servono rispettivamente a pulire i frutti ed a scartare quelli alterati e difettosi. Il pomodoro viene consegnato all'impianto e trasferito in canali idraulici. tramite i quali vengono convogliati all'area di lavaggio e cernita. Il materiale proveniente dal campo viene separato dal pomodoro, quindi il prodotto viene selezionato mediante sistemi manuali o elettronici (Figura 5).
- la calibratura viene attuata in modo da ottenere prodotti omogenei per dimensioni e valore commerciale;
- pelatura termofisica, il prodotto subisce un primo riscaldamento passando attraverso un ambiente pressurizzato con vapore acqueo sotto pressione e successivamente subisce un'evaporazione di flash in ambiente sottovuoto che provoca la rottura e il distacco della pelle. Tramite due rulli controrotanti le pelli vengono rimosse e allontanate.
- cernita, per assicurare la rimozione completa di residui di pelli e di pomodori non interi;
- l'inscatolamento prevede la sistemazione del prodotto nella scatola e l'eventuale aggiunta di succo o concentrato di pomodoro; questa viene poi chiusa in modo non ermetico (preaggraffatura);
- il preriscaldamento, con l'incremento di temperatura del prodotto si riducono i tempi di sterilizzazione e si favorisce l'allontanamento dell'aria trattenuta dai pomodori;
- si procede con l'aggraffatura quando il prodotto raggiunge al centro i 60°C;
- la sterilizzazione porta il prodotto fino a 95°C (essendo il pomodoro acido sono sufficienti temperature di circa 100°C);
- le scatole vengono poi raffreddate e imballate.

I pomodori pelati di qualità devono unire ad ineccepibili caratteristiche organolettiche, una giusta consistenza della polpa, assenza di bucce, integrità dei singoli pezzi, e devono essere ricchi di succo e privi di parti dure.



**Figura 4.** Linea di produzione per pomodori pelati



**Figura 5.** Apparecchio per la selezione cromatica dei pomodori. Mediante dispositivi di controllo ad emissione di luce, i pomodori rossi vengono inviati direttamente alla linea di lavorazione; quelli avariati o di colore irregolare sono allontanati.

Il **concentrato** si ottiene con una serie di passaggi che prevedono, oltre alle consuete fasi preliminari, la triturazione, la setacciatura (con passatrice), la raffinazione (che consente di ottenere concentrati omogenei eliminando impurità ed eventuali residui di bucce e semi), la concentrazione (con evaporatori o per osmosi inversa), la sterilizzazione mediante passaggio attraverso scambiatori di calore, ed infine il confezionamento del prodotto ancora caldo in contenitori di banda stagnata, in tubetti di alluminio o in fusti. Si trovano in commercio i seguenti tipi di prodotto (D.P.R. 428/75):

- semi-concentrato (con residuo secco non inferiore al 12%);
- concentrato (con residuo secco non inferiore al 18%);
- doppio concentrato (con residuo secco non inferiore al 28%);
- triplo concentrato (con residuo secco non inferiore al 36%);
- sestuplo concentrato (con residuo secco non inferiore al 55%).

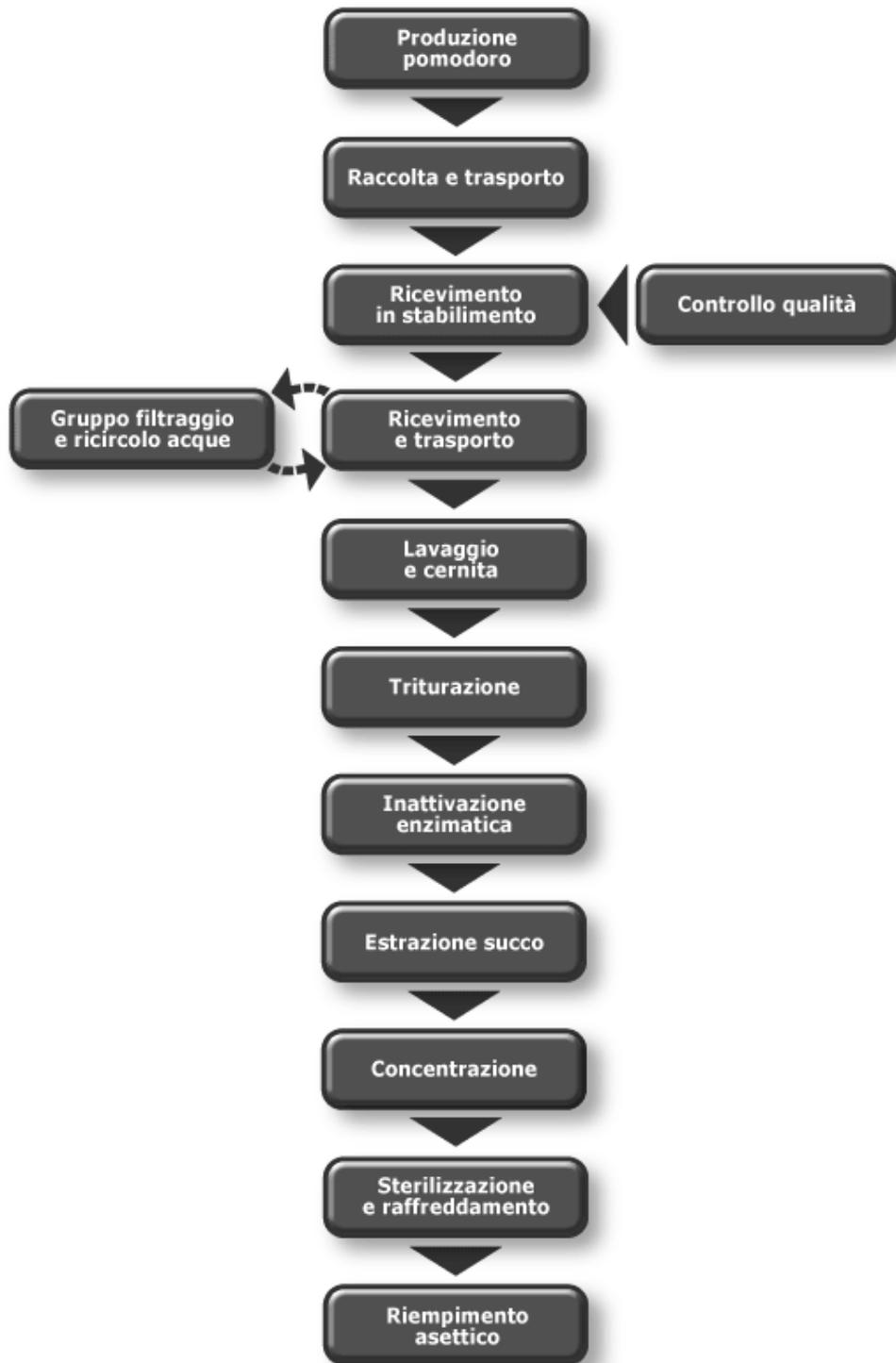
La **passata** e il **triturato** (o polpa) di pomodoro sono prodotti più recenti, ma che hanno avuto notevole affermazione in quanto consentono di ridurre i tempi di lavorazione in cucina. Oltre ai trattamenti preliminari e finali consueti, è prevista, per la passata, una fase di spremitura e una successiva raffinazione, allo scopo di allontanare semi e bucce.

Per **succo** di pomodoro si intende il liquido polposo ottenuto per triturazione e setacciamento del frutto, separato da bucce e semi. Per prepararlo si applicano varie operazioni (Figura 6):

- lavaggio e cernita;
- triturazione e preriscaldamento (attuati contemporaneamente in apparecchi continui);
- disareazione sotto vuoto spinto, per allontanare l'ossigeno sia libero che disciolto nel succo stesso. In questo modo viene preservata l'integrità delle pectine, che possono esprimere a pieno la loro azione addensante, e il colore del prodotto finale rimane inalterato.

- inattivazione enzimatica, che mira a bloccare attraverso il raggiungimento in tempi brevi di alte temperature (  $\geq 90^{\circ}\text{C}$  per l'hot break e  $60-77^{\circ}\text{C}$  per il cold break ), l'attività degli enzimi (poligalatturonasi e pectinesterasi) sulle pectine al fine di ottenere una viscosità ottimale del prodotto finale e limitare i fenomeni di sineresi. Temperature alte servono a garantire un prodotto finale con elevata consistenza come la passata, mentre temperature di break più basse sono utilizzate per prodotti meno viscosi come succhi<sup>[7]</sup>.
- spremitura;
- omogeneizzazione (si riducono le dimensioni delle particelle a qualche micron);
- concentrazione;
- sterilizzazione in scambiatori di calore;
- raffreddamento;
- riempimento asettico dei contenitori e aggraffatura, mediante riempitrici automatiche o imbottigliatrici.

Il prodotto, eventualmente salato, viene confezionato in barattoli a banda stagnata, in Tetrapack<sup>®</sup> o in bottiglie di vetro.



**Figura 6.** Linea di produzione per succo di pomodoro

Il **ketchup** si ottiene da pomodoro fresco o concentrato, addizionato di sale, zucchero, aceto, spezie e aromi vari (la cui qualità e quantità differenzia i vari tipi commerciali). L'aggiunta delle sostanze aromatiche e dell'aceto viene effettuata dopo la concentrazione del prodotto che, altrimenti, le disperderebbe.

Contrariamente al pensiero di molti, il ketchup è un alimento che contiene pochissime calorie; infatti lo zucchero (unico elemento calorico) viene aggiunti in quantità minima.

Dal pomodoro vengono prodotti anche il **succo di pomodoro in polvere** (ottenuto con essiccatoi a cilindri, per ebollizione sotto vuoto, con il metodo spray-drying e con liofilizzazione) e i **fiocchi di pomodoro** ottenuti direttamente dal pomodoro fresco, privato dei semi, portato ad un residuo secco non inferiore a 96% (destinati a preparati per zuppe, minestre e minestrone)<sup>[8]</sup>.

## COMPOSIZIONE CHIMICA E VALORE NUTRIZIONALE

Il rapporto tra elevato contenuto di acqua e basso tenore di zuccheri fa sì che il pomodoro apporti poca energia, ma di pronto utilizzo.

Le fibre sono soprattutto cellulosa ed emicellulosa, e sono concentrate nella buccia e nei semi.

Nella polpa si trovano gli acidi organici, soprattutto acido citrico e acido malico, che ne determinano il suo sapore caratteristico; facilitano inoltre la digestione, aumentano la salivazione, stimolano l'appetito e rigenerano i tessuti; infine, combinandosi con i minerali, determinano le proprietà alcalinizzanti del pomodoro. A dispetto infatti del suo sapore acido, quest'ortaggio ha un buon equilibrio acido-basico, e per questo favorisce l'alcalinizzazione dell'organismo. Ma non solo, grazie al suo sapore acidulo, il pomodoro stimola le secrezioni dell'apparato digerente e prepara ad una buona assimilazione del cibo.

Considerando l'apporto vitaminico il pomodoro presenta molti pregi: apporta tutte le vitamine idrosolubili, è un'ottima fonte di vitamina C. Basta un pomodoro di media grandezza per coprire il 40% degli 80 mg che un adulto dovrebbe assumere ogni giorno di questa vitamina, che facilita l'assorbimento del ferro e contribuisce alla produzione dell'emoglobina e dei globuli rossi nel midollo osseo. Infine contiene provitamina A sotto forma di  $\beta$ -carotene, uno dei componenti che conferiscono al pomodoro il suo colore rosso: con un pomodoro da 100 g si ingerisce il 15% della quantità di  $\beta$ -carotene che andrebbe assunta ogni giorno. Non bisogna dimenticare le vitamine del gruppo B (B1, B2 e B6) che sono, in quantità diverse, tutte presenti nel pomodoro e sono in grado di favorire il ricambio e l'ossigenazione delle cellule<sup>[9]</sup>.

*Caratterizzazione dei sottoprodotti della filiera del pomodoro per un potenziale sviluppo industriale*

	Prodotto fresco			Prodotto trasformato		
	Pomodori da insalata	Pomodori maturi	Pomodori da conserva	Pomodori passata	Pomodori pelati	Pomodori succo
Parte edibile %	100	100	100	100	100	100
Acqua (g)	94,2	94	70	90,8	94,7	93,8
Proteine (g)	1,2	1	3,9	1,3	1,2	0,8
Lipidi (g)	0,2	0,2	0,4	0,2	0,5	tr
Carboidrati (g)	2,8	3,5	20,4	3	3	3
Amido (g)	0	0	0	0	0	tr
Zuccheri solubili (g)	2,8	3,5	20,4	3	3	3
Fibra totale (g)	1	2	2	1,5	0,9	0,6
Energia Kcal	17	19	96	18	21	-
KJ	72	79	400	76	86	-
Sodio (mg)	3	6	-	160	9	230
Potassio (mg)	290	297	250	-	230	230
Ferro (mg)	0,4	0,3	2,2	-	0,2	0,4
Calcio (mg)	11	9	27	16	9	10
Fosforo (mg)	26	25	85	35	24	19
Tiamina (mg)	0,03	0,02	0,2	-	tr	0,02
Riboflavina (mg)	0,03	-	0,1	-	tr	0,02
Niacina (mg)	0,7	0,8	3,1	-	0,8	0,7
Vit A (mcg)	42	610	-	530	400	200
Vit C (mg)	21	25	43	8	18	2

**Tabella 1.** Valori per 100 g di parte edibile<sup>[10]</sup>

E' importante dal punto di vista nutrizionale considerare distintamente pomodori da insalata e pomodori maturi, che possono comparire direttamente sulla nostra tavola, da pomodori ad utilizzo industriale. Come mostrano i valori riportati in tabella 1, pomodori da insalata e maturi sono composti da oltre il 90% di acqua, mentre i pomodori da conserva, destinati ad una lavorazione industriale, risultano notevolmente meno ricchi di acqua con conseguente aumento di concentrazione della maggior parte dei nutrienti.

## COMPOSTI BIOATTIVI NEL POMODORO

### POLIFENOLI

I polifenoli rappresentano una categoria di sostanze molto vasta, caratterizzate dall'aver più cicli fenolici condensati. Ne fanno parte stilbeni idrossilati, flavonoidi, tannini, acidi fenolici e numerosi altri composti. I composti fenolici sono prodotti secondari delle piante che a seconda della diversità chimica rivestono ruoli differenti nella pianta. Alcuni servono come difesa dagli animali erbivori e dai patogeni, altri come sostegno meccanico, come attrazione per gli impollinatori e per la dispersione del frutto o come inibitori di crescita sulle piante in competizione.

I polifenoli sono largamente distribuiti in natura, pertanto si calcola che una dieta ricca di vegetali freschi dia un apporto giornaliero da 200 mg a 1 g di queste sostanze, tale da assicurare un apporto sufficiente di antiossidanti.

L'azione antiossidante non è l'unica attribuita a questi composti; studi effettuati *in vivo* ed *in vitro* tendono ad assegnare ai polifenoli un'azione anticarcinogenica, antiaterogenica, antinfiammatoria, antibatterica ed antivirale.

L'azione anticarcinogenica dei fenoli è stata correlata con l'inibizione del cancro al colon, esofago, polmone, fegato, seno e pelle.

I flavonoidi ed i polifenoli in generale hanno mostrato un impatto sullo step di iniziazione dello sviluppo del cancro, proteggendo le cellule contro l'attacco diretto da carcinogeni o alterando il loro meccanismo d'attivazione. L'attività antitumorale dei flavonoidi è stata correlata all'inibizione delle DNA e RNA polimerasi e/o all'attivazione dell'ornitina decarbossilasi.

Per quanto riguarda l'azione antiaterogenica il principale meccanismo responsabile della riduzione delle malattie cardiovascolari è la riduzione della coagulazione delle piastrine e delle HDL. Altri meccanismi sono l'inibizione della ossidazione delle lipoproteine, radical scavenger, e la modulazione del metabolismo degli ecosanoidi.

L'azione antinfiammatoria è stato il primo effetto conosciuto dei flavonoidi ed è relativa soprattutto agli antociani.

I polifenoli, specialmente acido caffeico, epicatechine e acido clorogenico, posseggono attività antibatteriche e antivirali. Gli acidi idrossibenzoico, salicilico, gallico e protocatechinico posseggono effetti antibatterici<sup>[11]</sup>.

## CAROTENOIDI

I carotenoidi devono il loro nome al carotene, una sostanza giallo-arancio, trovata per la prima volta (nel 1831) nella radice di *Daucus carota*, cioè nella comune carota.

Sono un gruppo di pigmenti, di colore dal giallo al violetto, molto diffusi in natura, privi di azoto nella molecola e solubili nei grassi. L'intensità del loro colore è dovuta al sistema cromoforico costituito da un elevato numero di doppi legami coniugati, responsabili anche della grande instabilità dei carotenoidi, che si ossidano facilmente all'aria e sono notevolmente modificati dalla presenza di acidi minerali.

Per esposizione alla luce e ad altri agenti, i carotenoidi naturali, in cui i doppi legami non ciclici sono sempre nella configurazione *trans*, possono trasformarsi in una miscela di stereoisomeri (isomerizzazione *trans-cis*), nei quali uno o più doppi legami si sono spostati in posizione *cis*.

I carotenoidi sono terpenoidi, di solito a 40 atomi di carbonio, formati da otto unità isopreniche. Lo scheletro della loro molecola consiste generalmente di una porzione centrale, con 22 atomi di carbonio, e due terminali di 9 atomi di carbonio ciascuna. Le unità terminali possono essere acicliche, come nel licopene, oppure tutte e due cicliche, come nell' $\alpha$ - e  $\beta$ -carotene, o una ciclica e l'altra aciclica, come nel  $\gamma$ -carotene. Le unità terminali cicliche possono inoltre presentare un'ampia varietà di gruppi, per esempio alcolici, chetonici, epossidici, benzenici.

Alla famiglia dei carotenoidi appartengono i caroteni, a struttura idrocarburica dienica, le xantofille, cioè i derivati ossigenati (alcoli, chetoni, epossidi), e gli acidi carotenici.

Idrocarburi carotenici sono ad esempio il licopene, il  $\beta$ -carotene e l' $\alpha$ -carotene, mentre tra i principali idrossicarotenoidi si annoverano la luteina, la zeaxantina, la violaxantina e l'auroxantina; ai carotenoidi acidi appartengono invece la bixina e la crocetina.

I carotenoidi sono stati isolati dalle piante, dalle alghe, dai batteri e dal mondo animale. Sono responsabili, per fare qualche esempio, della colorazione rossa dei pomodori (licopene), di quella arancio delle carote ( $\beta$ -carotene) e del mais (zeaxantina), di quella gialla delle calendule (violaxantina ed auroxantina), dello zafferano (crocetina) e delle foglie autunnali (luteina). Nei frutti acerbi non sono visibili, ma si formano durante il processo di maturazione in presenza di ossigeno, esibendo le caratteristiche colorazioni giallo, arancio e rosso.

I carotenoidi nelle piante, non solo partecipano alla fotosintesi, ma sono anche essenziali nella protezione delle stesse dalla grande produzione di radicali liberi che si verifica durante il processo fotosintetico. Nei vegetali a foglia verde si trovano nei cloroplasti, assieme alla clorofilla, generalmente complessati con proteine e grassi.

I carotenoidi sono stati ritrovati anche in molti organismi animali; conferiscono infatti la colorazione rossa alla corazza delle aragoste, tingono di vari colori le penne di numerosi uccelli e colorano perfino il tuorlo delle uova.

Gli animali, compreso l'uomo, non sono in grado di sintetizzare questi composti; se ne riforniscono quindi dal mondo vegetale attraverso l'alimentazione e poi li modificano. Di particolare importanza per l'uomo è la trasformazione degli  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -caroteni, soprattutto del  $\beta$ -carotene, in vitamina A, a livello della mucosa intestinale, che ci permette di ottenere questa molecola indispensabile per il nostro organismo. La vitamina A svolge un ruolo di primo piano nei processi biosintetici di molte glicoproteine, che regolano la differenziazione cellulare e l'espressione dei geni; per questo motivo è un fattore importante nello sviluppo e nella crescita dell'organismo umano. La carenza di vitamina A e di carotene si manifesta soprattutto nei tessuti che presentano un ricambio rapido, come quello epiteliale, che tende in tal caso ad ipercheratinizzarsi.

Nonostante siano stati caratterizzati chimicamente più di 600 carotenoidi, il  $\beta$ -carotene è stato da sempre considerato il carotenoide biologicamente più attivo, grazie alla sua elevata attività provitaminica A (doppia rispetto a quella di  $\alpha$ - e  $\gamma$ -carotenoidi), cioè alla possibilità di essere utilizzato come fonte di vitamina A da parte dell'organismo umano.

I frutti e i vegetali di colore arancio, come carote, albicocche, meloni e mango, sono di solito i più ricchi di carotenoidi provitamina A e la loro quantità è direttamente correlata all'intensità della colorazione. I frutti giallo-arancio contengono oltre al  $\beta$ -carotene altri carotenoidi provitamina A, mentre in quelli gialli sono presenti innanzitutto xantofille, ad attività provitaminica minore.

I frutti e i vegetali di colore rosso porpora, come pomodori, cavolo rosso e frutti di bosco, contengono carotenoidi e anche grandi quantità di altri pigmenti, per esempio i flavonoidi, che non hanno attività provitaminica A.

Studi moderni hanno però messo in evidenza che i carotenoidi non sono solo importanti fonti di vitamina A, ma esercitano molte altre azioni protettive nei confronti del nostro organismo.

Alla luce di studi sempre più approfonditi, molti carotenoidi, come il licopene, la zeaxantina e la luteina, hanno dimostrato di possedere proprietà altrettanto importanti, quale ad esempio una elevata attività antiossidante<sup>[12]</sup>.

## **Licopene**

Il licopene è un pigmento carotenoide, maggiormente presente nel pomodoro, che ne conferisce il caratteristico colore rosso ed è seguito in minor quantità da  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -carotene, fitoene, fitofluene, neurosporene e luteina<sup>[13]</sup>.

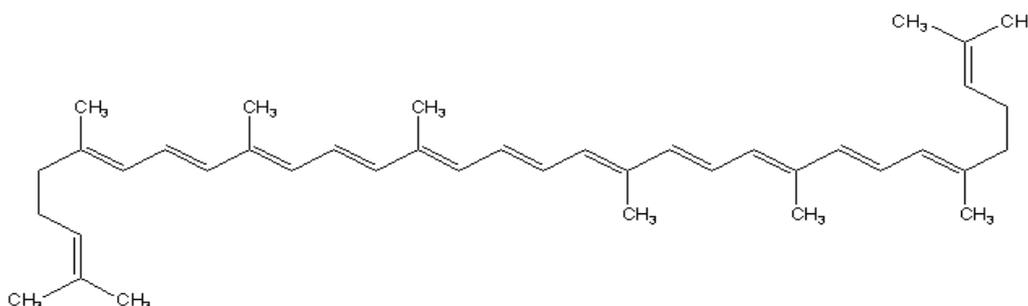
Nel frutto di pomodoro maturo il licopene è l'ultimo carotenoide che si forma. La sua biosintesi aumenta notevolmente quando i cloroplasti, nei quali è sintetizzata la clorofilla, si differenziano in cromoplasti, dove avviene la sintesi di pigmenti carotenoidi<sup>[14]</sup>.

La pelle e il pericarpo del frutto di pomodoro sono particolarmente ricchi in licopene e altri carotenoidi. Mentre la pelle contiene 12 mg di licopene per 100 g (peso umido) il pomodoro maturo in complesso ne contiene solo 3,4 mg per 100 g (peso umido)<sup>[15]</sup>.

Il contenuto di licopene nel pomodoro tuttavia varia considerabilmente, riflettendo l'influenza della varietà (generalmente fattori genetici), il grado di maturazione, e condizioni sia agronomiche che ambientali durante la crescita<sup>[16]</sup>.

Essendo un composto lipofilo è disperdibile in oli edibili e solubile in solventi organici apolari. In sistemi acquosi tende ad aggregarsi e a precipitare sotto forma di cristalli. Questo comportamento è ritenuto causa della diminuzione della biodisponibilità del licopene nell'uomo<sup>[17]</sup>.

Strutturalmente il licopene è un idrocarburo alifatico insaturo (Figura 7). La sua catena contiene 13 doppi legami carbonio-carbonio, 11 dei quali sono coniugati e disposti linearmente. Il sistema polienico coniugato così esteso è la chiave dell'attività biologica del licopene, che include la sua suscettibilità alla degradazione ossidativa. Diversamente da altri carotenoidi, il licopene non è provitaminico A, cioè non viene trasformato nel nostro corpo in vitamina A<sup>[18]</sup>.



**Figura 7.** Struttura del licopene all-*trans*

Una degradazione indesiderata del licopene non ha solo effetti negativi sulla qualità del prodotto finale di lavorazione ma porta anche ad una perdita di benefici. Le principali cause di degradazione durante la lavorazione sono isomerizzazione e ossidazione<sup>[19]</sup>.

Bassa temperatura di stoccaggio, bassi livelli di ossigeno e la ridotta esposizione alla luce sono fattori che limitano la degradazione del licopene dovuta all'ossidazione. Per prevenire tale degradazione durante la lavorazione e l'immagazzinamento può essere utile l'applicazione di antiossidanti quali acido ascorbico o pirofosfato acido di sodio in adeguate quantità<sup>[20,21,22]</sup>.

Per quanto riguarda l'isomerizzazione va premesso che il licopene nel pomodoro fresco si trova prevalentemente in configurazione all-*trans*<sup>[19]</sup>.

Durante i processi di lavorazione avviene un'isomerizzazione a forme mono- o poli-*cis*; è vero inoltre che il deposito dei prodotti di lavorazione del pomodoro favorisce la reisomerizzazione da *cis*- a *trans*-, perché l'isomero *cis* è relativamente più instabile se comparato all'isomero *trans*<sup>[23]</sup>.

Gli isomeri *cis* del licopene sono meglio assorbiti rispetto agli isomeri *trans*. Questo può essere dovuto alla maggior solubilità degli isomeri *cis* in micelle miste che favoriscono l'incorporazione nei chilomicroni e l'assorbimento intestinale abbassando la tendenza a formare aggregati<sup>[24,25,26,27]</sup>.

Anche la composizione e la struttura della matrice alimentare influenzano la biodisponibilità del licopene; pratiche come la cottura o la triturazione possono incrementarne la biodisponibilità per distruzione fisica o un rammollimento delle membrane cellulari della pianta e tramite la rottura dei complessi licopene-proteine<sup>[28]</sup>.

Per quanto riguarda il calore, è stato provato che temperature tra 90 e 150°C causano una grande diminuzione del contenuto totale di licopene. Durante la prima e la seconda ora di trattamento però la degradazione è modesta se la temperatura rimane inferiore ai 100°C. Per effetto del calore inoltre si assiste all'aumento di concentrazione dell'isomero *cis* e questo porta a dire che i processi di lavorazione del pomodoro possono favorire la *cis*-isomerizzazione se viene usata una adeguata temperatura di riscaldamento. Anche la durata del trattamento termico ha effetti modesti o nulli sulla degradazione del licopene se la temperatura rimane inferiore a 100°C<sup>[29,30]</sup>.

Uno studio ha inoltre dimostrato che l'aggiunta di olio d'oliva durante la cottura di pomodoro tagliato aumenta di molto l'assorbimento di licopene; è stato provato un aumento dell'82% nella concentrazione sanguigna di *trans*-licopene e del 40% di *cis*-licopene in 11 soggetti che hanno consumato pomodori in olio d'oliva, mentre in 12 soggetti che hanno consumato pomodoro senza olio d'oliva non ci sono variazioni nella concentrazione plasmatica di *trans*-licopene e si ritrova solo un 15% in più di *cis*-licopene.

Questi risultati sottolineano l'importanza della preparazione e del consumo dei cibi in una cucina che abbina la cottura di prodotti a base di pomodoro all'utilizzo dell'olio d'oliva, una combinazione caratteristica della dieta mediterranea<sup>[31]</sup>.

### **Attività benefiche del licopene**

Diversi studi e ricerche hanno evidenziato l'importanza nella dieta del consumo di frutta e ortaggi al fine di preservare la salute umana e il benessere fisico, prevenendo l'insorgenza di malattie cardiovascolari e di alcune forme tumorali<sup>[32]</sup>.

In particolare il pomodoro e i prodotti da esso derivati sono riconosciuti avere un ampio range di benefici sulla salute<sup>[33]</sup>.

I potenziali elementi protettivi introdotti con la dieta sono, tra gli altri, il licopene e altri carotenoidi, vitamina E, isoflavoni e polifenoli<sup>[34]</sup>.

In alcuni studi recenti, il consumo con la dieta di pomodoro e prodotti da esso derivati contenenti licopene è stato associato al decremento del rischio di malattie croniche come cancro e disturbi cardiovascolari. Le proprietà antiossidanti del licopene sono ritenute le responsabili di tali effetti benefici<sup>[35]</sup>.

Studi epidemiologici hanno portato in evidenza che l'alto consumo di pomodori effettivamente abbassa il rischio di patologie mediate dalle specie reattive dell'ossigeno migliorando le capacità antiossidanti. Il licopene è ritenuto il più stabile e potente agente di estinzione dell'ossigeno singoletto ( $O_2^-$ )<sup>[33]</sup>, una forma di ossigeno notoriamente deleteria, e un efficiente scavenger di un largo spettro di radicali liberi<sup>[36,37]</sup>.

L'organismo umano non è in grado di sintetizzare il licopene, quindi è necessario assumerlo con la dieta. Una volta assunto lo si trova in concentrazioni più alte nel fegato, nei testicoli, nelle ghiandole surrenali e nella prostata<sup>[32]</sup>.

### **Attività anticancerogenica**

La dieta mediterranea, ricca di frutta e vegetali compresi i pomodori, è stata indicata come responsabile di bassi livelli di cancro in questa area<sup>[38]</sup>.

In particolare l'apporto di pomodoro con la dieta è stato associato ad un basso rischio per diversi tipi di neoplasie in vari studi epidemiologici<sup>[39]</sup>.

Il licopene, carotenoide prevalente nel pomodoro, può avere valore terapeutico anticarcinogenico dal momento che è stato mostrato essere in grado di sopprimere la proliferazione delle cellule tumorali, inibire il segnale del fattore di crescita, indurre l'apoptosi, inibire l'angiogenesi, sopprimere l'espressione di proteine anti-apoptotiche<sup>[40]</sup>, abile nel migliorare le comunicazioni a livello delle gap junction intercellulari<sup>[41]</sup>.

Tali comunicazioni sono deficitarie in molte forme di tumori e il ripristino di questa funzione è associato a una riduzione della proliferazione cellulare<sup>[42]</sup>.

E' risultato inoltre che il licopene ha effetti contro la chemioresistenza e la radioresistenza in pazienti sottoposti a terapia antitumorale; grazie quindi a queste potenzialità può essere usato abbinato alle terapie attualmente in uso<sup>[40]</sup>.

Crescenti evidenze attorno al consumo di prodotti a base di pomodoro si sono rivelate promettenti nei confronti della prevenzione del cancro alla prostata che ha un'incidenza tre volte superiore rispetto agli altri tipi di cancro nella popolazione maschile mondiale. Gli effetti protettivi sono stati recentemente correlati al licopene<sup>[43]</sup>.

L'introduzione di licopene grazie ad una dieta ricca di prodotti a base di pomodoro ha mostrato essere inversamente associata al rischio di cancro alla prostata sia in colture cellulari che su animali, in studi epidemiologici e sulla popolazione<sup>[44]</sup>.

Uno dei primi studi che ha esaminato il ruolo del licopene nella prevenzione del cancro all'esofago è stato svolto nell'Iran del Nord dove questo tipo di patologia è fortemente diffusa; venne dimostrato che il suo consumo settimanale in un gruppo di soggetti presi in esame era associato alla riduzione del rischio di tumore all'esofago del 40%<sup>[45]</sup>.

Inoltre è stato valutato che alte concentrazioni di licopene nel sangue sono associate a una diminuzione del rischio di cancro alla mucosa gastrica<sup>[46]</sup>.

Buoni risultati nell'applicazione sull'organismo umano sono stati ottenuti anche nel tumore al pancreas che risulta essere una patologia di oscura eziologia e particolarmente devastante a causa del suo insidioso innestarsi, che viene individuato solo in uno stadio avanzato, e che mostra una irrilevante risposta positiva alle terapie mediche. Anche per questo tipo di neoplasia è stato provato che i soggetti con più alti livelli di licopene nel sangue avevano una probabilità cinque volte inferiore di sviluppare un tumore al pancreas<sup>[47]</sup>.

Esaminando i livelli di diversi carotenoidi, incluso il licopene, in plasma e tessuto cervicale in 87 donne, sono stati trovati bassi livelli nelle donne che avevano già sviluppato il cancro alla cervice, mentre i soggetti con alti livelli plasmatici di licopene si sono dimostrati essere un terzo meno esposti al rischio di tale patologia<sup>[48]</sup>.

### **Attività cardioprotettiva**

Lo stress ossidativo indotto dalle specie reattive dell'ossigeno è riconosciuto come un importante fattore eziologico delle patologie coronariche<sup>[49]</sup>.

L'ossidazione delle LDL (low-density lipoprotein) gioca un ruolo chiave nella patogenesi dei disturbi coronarici<sup>[50,51]</sup>.

Il licopene come importante antiossidante è risultato utile nella prevenzione dell'ossidazione delle lipoproteine (LDL) e delle lesioni ossidative dell'endotelio vascolare<sup>[52]</sup>, entrambi fattori di rischio dell'aterosclerosi e di disturbi cardiovascolari<sup>[53]</sup>.

Un altro fattore di rischio per i disturbi cardiaci è l'ipertensione. Uno studio su pazienti affetti da ipertensione di grado 1 ha dimostrato che un trattamento con estratti di pomodori ricchi in antiossidanti può ridurre la pressione sanguigna: è stato registrato un abbassamento della pressione sistolica da 144 a 134 mmHg e della diastolica da 87,4 a 83,4 mmHg<sup>[54]</sup>.

In un piccolo studio, sei soggetti sani hanno consumato 60 mg/giorno di licopene per un periodo di tre mesi. Alla fine del periodo di trattamento è stato registrato una diminuzione del 14% del livello

di colesterolo nel sangue. Tale risultato ha portato all'ipotesi di una proprietà ipocolesterolemica del licopene<sup>[55]</sup>.

Successivamente è stato provato che il licopene inibisce l'attività di un enzima essenziale nella sintesi del colesterolo sia *in vitro* sia in un piccolo studio clinico, supportando l'ipotesi di un effetto ipocolesterolemico<sup>[35]</sup>.

### **Attività fotoprotettiva**

Costituenti vegetali quali carotenoidi e flavonoidi sono coinvolti nel sistema di protezione dalla luce nelle piante e contribuiscono alla protezione dei danni dei raggi UV nell'uomo. Come micronutrienti vengono ingeriti con la dieta e si distribuiscono nei tessuti esposti alla luce dove provvedono ad una fotoprotezione sistemica<sup>[56]</sup>.

La radiazione UV incrementa il numero di radicali liberi e forme reattive dell'ossigeno, come l'anione superossido, l'idroperossido e l'idrossile, che essendo molto reattive ed instabili (la loro vita dura alcune frazioni di secondo), intervengono in numerose reazioni biochimiche e processi metabolici, portando all'alterazione e, col tempo, all'invecchiamento precoce dell'epitelio non protetto. I radicali liberi sono infatti implicati sia nel danno acuto da UV (scottatura solare, eritema), che nella fotocarcinogenesi e nel fotoinvecchiamento<sup>[12]</sup>.

Il licopene, con le sue alte capacità antiossidanti, è adeguato per essere usato con successo nella prevenzione dei danni cutanei provocati dai radicali liberi<sup>[57]</sup>.

Studiando l'ingestione di licopene e prodotti derivati dal pomodoro ricchi in licopene, sono stati dimostrati effetti fotoprotettivi: dopo 10-12 settimane di osservazione si è registrato nei volontari un abbassamento della sensibilità nei confronti di eritema foto-indotto<sup>[56]</sup>.

In più il licopene agisce come agente preventivo nei confronti dei danni cutanei attraverso la riduzione della risposta infiammatoria, il mantenimento della normale proliferazione cellulare nell'epidermide e la prevenzione di danni al DNA, bloccando l'apoptosi che segue ad una irradiazione di raggi UV, che possono portare allo sviluppo di patologie neoplastiche della pelle<sup>[58]</sup>.

### **Attività sull'apparato osseo**

Le ossa sono un organo dinamico sottoposto a continuo rimodellamento, strettamente regolato dall'accoppiamento tra il riassorbimento del tessuto osseo vecchio mediante gli osteoclasti e la formazione di tessuto osseo nuovo grazie agli osteoblasti, fondamentale per la normale fisiologia dell'osso. Disturbi nel rimodellamento portano a patologie dell'osso.

Lo stress ossidativo, osservato controllando le funzioni di osteoblasti e osteoclasti, può contribuire alla nascita di patologie del sistema scheletrico incluso l'osteoporosi, il prevalente disturbo metabolico<sup>[59,60,61,62]</sup>.

Per quanto riguarda gli osteoblasti, uno studio ha mostrato che il licopene stimola la proliferazione di cellule osteoblasto-simili, agendo come potente antiossidante e inibendo il danno ossidativo causato dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte a livello intracellulare<sup>[63]</sup>.

Riguardo gli osteoclasti è stato dimostrato che il licopene inibisce il riassorbimento minerale osteoclastico, la formazione di nuovi osteoclasti così come la produzione di specie reattive dell'ossigeno da parte degli stessi osteoclasti<sup>[64]</sup>.

Mentre ci sono evidenze epidemiologiche in supporto agli effetti benefici di pomodoro e prodotti derivati come principale fonte di licopene nella prevenzione dell'osteoporosi nella popolazione mediterranea, il diretto ruolo del licopene non è stato ancora esplorato. L'effetto del licopene sugli osteoblasti e osteoclasti *in vitro*, mostra come il licopene possa essere importante per la prevenzione dell'osteoporosi<sup>[65]</sup>.

### **Attività anti-neurodegenerativa**

Le patologie neurodegenerative sono un gruppo di malattie con diverse eziologie e diversa importanza clinica. Numerosi studi sperimentali ed epidemiologici mostrano tanti fattori di rischio tra cui l'età avanzata, difetti genetici, disordini vascolari, autoimmunità, anomalie nel corredo di enzimi antiossidanti, stress ossidativo. L'accumulo di danni ossidativi nei neuroni può portare all'aumento dell'incidenza di malattie neurodegenerative.

Interessi recenti sono stati focalizzati su antiossidanti come i carotenoidi, il licopene in particolare, flavonoidi e vitamine in quanto potenziali agenti per i trattamenti delle patologie neurodegenerative. In pazienti affetti da Morbo di Parkinson sono stati rilevati bassi livelli di licopene nel sangue<sup>[66]</sup>.

Analogamente, bassi livelli plasmatici di licopene sono risultati essere in relazione al rischio di microangiopatie in uno studio di prevenzione austriaco<sup>[67]</sup>.

La concentrazione plasmatica di antiossidanti (vitamina C, vitamina E, luteina, licopene e  $\alpha$ -carotene) in 35 pazienti affetti da Morbo di Alzheimer è risultata inferiore comparata a 40 pazienti-controllo; il sangue esposto ai radicali perossidici mostra un più elevato consumo di antiossidanti. La patologia di Alzheimer in età avanzata è accompagnata quindi da bassi livelli di antiossidanti nel plasma, un aumento della perossidazione lipidica e da una minor resistenza all'esposizione ai radicali perossidici<sup>[68]</sup>.

### **Protezione del tessuto oculare**

Uno studio epidemiologico ha stabilito che basse concentrazioni di carotenoidi nel sangue sono associate al rischio della Degenerazione Maculare correlata all'età<sup>[69]</sup>.

La macula lutea è una piccola regione circolare nella parte posteriore della retina in cui sono concentrati i recettori fotosensibili. I carotenoidi, con le loro proprietà antiossidanti, contribuiscono alla protezione della retina dai danni causati dai radicali liberi che si formano durante i processi metabolici della visione e a seguito di esposizione ad agenti esterni<sup>[12]</sup>.

Uno studio condotto in Francia ha determinato la concentrazione di carotenoidi nella frazione lipoproteica separata dal sangue in 34 pazienti affetti da degenerazione maculare. I valori confrontati con quelli di 21 soggetti sani, hanno dimostrato che luteina e zeaxantina sono i carotenoidi maggiormente presenti nella macula ma non mostrano variazione tra soggetti sani e soggetti malati; il livello di licopene è risultato invece notevolmente inferiore nei soggetti affetti da degenerazione maculare. Questi risultati hanno portato ad ipotizzare che l'ossidazione del licopene è un meccanismo di difesa del potere antiossidante specifico di luteina e zeaxantina<sup>[69]</sup>.

## **ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE**

Sono molto numerosi i processi, fisiologici e patologici, negli organismi viventi, sia vegetali che animali, in cui si ha la formazione di specie reattive radicaliche (per esempio nel normale metabolismo cellulare, nel processo di senescenza dei tessuti). Condizioni di stress radicalico o patologie radicaliche, sono determinate da uno sbilanciamento del rapporto tra fattori ossidanti e fattori antiossidanti, a livello locale o generalizzato ad un tessuto o a uno o più organi.

Sfuggendo al controllo dei sistemi di protezione, i radicali cercano di riequilibrare la loro struttura elettronica catturando elettroni altrui, a danno soprattutto di acidi grassi polinsaturi, lipidi, proteine o acidi nucleici (DNA e RNA), che si trasformano a loro volta in radicali liberi, scatenando reazioni radicaliche incontrollate.

L'ossigeno, in particolare, essenziale per la maggior parte dei processi cellulari, può essere altamente tossico. I radicali liberi dell'ossigeno (ROS) sono potenzialmente in grado di danneggiare tutti i componenti cellulari, compromettendone l'effettivo funzionamento.

L'ossidazione incontrollata dei lipidi costituenti le membrane (lipoperossidazione) è la più importante espressione della tossicità dell'ossigeno, causa di alterazioni funzionali e strutturali che si riscontrano per esempio nell'infiammazione, nella riossigenazione post-ischemica, nelle intossicazioni da sostanze di sintesi estranee all'organismo e in alcune fasi della cancerogenesi.

La protezione endogena nei confronti dei radicali liberi si deve essenzialmente all'intervento di enzimi protettivi, quali la glutazione perossidasi, la superossido dismutasi, la catalasi, la lattoperossidasi, presenti sia a livello intracellulare che extracellulare.

Le reazioni radicaliche possono essere inibite anche da alcune sostanze che reagiscono con i radicali, bloccando la serie di reazioni a catena da essi innescata, o rallentandola attraverso la formazione di radicali più stabili. Un inibitore che diminuisce la concentrazione di radicali liberi presenti è detto "radical scavenger"<sup>[12]</sup>.

Gli antiossidanti biologici sono molecole naturali che possono prevenire la formazione incontrollata dei radicali liberi e delle specie reattive dell'ossigeno o inibire la loro reazione con le strutture biologiche. Essi infatti possono agire inibendo enzimi proossidanti e chelando ioni di metalli di transizione che portano alla formazione di radicali (antiossidanti preventivi), oppure possono intervenire nella fase di propagazione della reazione a catena neutralizzando i radicali che si formano in questo stadio (antiossidanti chain-breaking). Una corretta definizione di antiossidante è "ogni molecola che, presente a basse concentrazioni rispetto al substrato ossidabile, diminuisce significativamente o inibisce l'ossidazione di quel substrato". Svolta la loro azione, gli antiossidanti biologici possono essere ripristinati mediante ossidoriduzione diminuendo così la necessità di una loro continua sintesi *de novo* o la necessità di uptake di nutrienti antiossidanti<sup>[70]</sup>.

## **METODI DI DETERMINAZIONE DELLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE**

Ogni antiossidante è in grado di espletare la sua attività secondo meccanismi diversi e con una diversa efficienza a seconda della sua struttura chimica e dell'ambiente in cui si trova. Per questo motivo una valutazione integrata del potenziale antiossidante può rivelarsi più importante della concentrazione dei singoli antiossidanti. Da qui l'esigenza di valutare la Capacità Antiossidante Totale di un alimento (TAC) cioè la capacità di un alimento di preservare un substrato ossidabile, inattivare una specie radicalica o ridurre un ossidante.

Sulla base delle reazioni chimiche coinvolte, i principali saggi per la determinazione della capacità antiossidante possono essere suddivisi in due categorie: saggi basati sul trasferimento di un singolo elettrone (ET, electron transfer), e saggi basati sul trasferimento di un atomo di idrogeno (HAT, hydrogen atom transfer). I primi misurano la capacità di un antiossidante di ridurre un ossidante il quale, in seguito alla reazione, subisce un cambiamento di colore. Tra questi vi sono, ad esempio, il metodo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ed il metodo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

I metodi basati sul trasferimento di un atomo di idrogeno, invece, solitamente sfruttano un generatore sintetico di radicali liberi, una sonda molecolare ossidabile, ed un antiossidante. Tra

questi vi sono, ad esempio, il metodo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) ed il metodo TRAP (total radical-trapping antioxidant parameters). In ogni caso tutte le metodologie misurano la capacità di scavenger degli antiossidanti nei confronti dei radicali e non la loro azione preventiva volta ad impedirne la formazione<sup>[71]</sup>.

## **I SOTTOPRODOTTI DI LAVORAZIONE**

L'industria di trasformazione delle produzioni vegetali genera quantità non trascurabili di scarti vegetali di vario genere, oltre a quantità significative di fanghi dalla depurazione biologica degli effluenti liquidi. Per quanto riguarda gli scarti di prodotti orticoli, compreso il prodotto principale, il pomodoro, si tratta di flussi consistenti che hanno nella pratica due destinazioni prevalenti: l'impiego come materia prima per mangimi nell'alimentazione zootecnica<sup>[72]</sup> e il ritorno diretto in agricoltura come concimi.

Dalla trasformazione industriale del pomodoro si ottengono scarti di lavorazione solidi, che derivano in parte dai difetti riscontrati sulla materia prima in arrivo (pomodori immaturi o con gravi difetti di pigmentazione; pomodori lesionati sia per cause meccaniche sia per azione microbica) e in parte dal processo di lavorazione e trasformazione (residui di lavorazione, scarti di raffinazione, di pulitura, bucce e semi). Gli scarti di lavorazione costituiscono un costo aggiuntivo per le aziende produttive a causa dei processi di smaltimento<sup>[73]</sup>.

Tuttavia, numerosi studi ne evidenziano anche il valore intrinseco e le potenzialità che potrebbero portare ad una rivalutazione degli scarti da rifiuti, definiti in base al D.Lgs. n. 152/2006 come *qualsiasi sostanza od oggetto ... di cui il detentore si disfi o abbia deciso o abbia l'obbligo di disfarsi* a sottoprodotti, definiti in base allo stesso Decreto *prodotti dell'attività dell'impresa che, pur non costituendo l'oggetto dell'attività principale, scaturiscono in via continuativa dal processo industriale dell'impresa stessa e sono destinati ad un ulteriore impiego o al consumo*.

Ricerche condotte su frazioni di bucce di pomodoro hanno mostrato che in esse sono elevati i livelli di fenoli totali, licopene, acido ascorbico e attività antiossidante a confronto con le frazioni di semi e polpa. E' stato dimostrato che bucce e semi contribuiscono al 53% dei fenoli totali, al 52% dei flavonoidi totali, al 48% del licopene totale, al 43% dell'acido ascorbico totale e al 52% dell'attività antiossidante presente nei pomodori. Questi risultati dimostrano come la rimozione di bucce e semi durante la cottura o la trasformazione industriale comportano una perdita significativa di tutti i maggiori antiossidanti<sup>[74]</sup>.

Dati di letteratura confermano come la buccia di pomodoro abbia significanti contenuti di fenoli e acido ascorbico<sup>[75]</sup> oltre che alti livelli di licopene a confronto di polpa e semi. Inoltre, bucce e semi

contengono aminoacidi essenziali e i semi in particolare hanno alti contenuti in minerali (ferro, manganese, zinco e rame) e acidi grassi monoinsaturi, soprattutto acido oleico<sup>[15]</sup>.

Più recente è lo studio di Knoblich M., Anderson B. e Latshaw D. che valutano la possibilità di utilizzare gli scarti di lavorazione del pomodoro nell'alimentazione delle galline per aumentare la quantità di carotenoidi nelle uova destinate ad uso umano. I risultati di tale studio non attribuiscono agli scarti di pomodoro qualità nutrizionali adatte alla dieta delle galline a causa dell'elevato contenuto in fibre che ne determina una ridotta digeribilità e una diminuita energia di metabolizzazione apportata. Si è però concluso che una piccola quantità di semi e bucce nella dieta delle galline incrementerebbe la pigmentazione del tuorlo d'uovo e porterebbe ad un aumento rilevabile del contenuto in licopene<sup>[76]</sup>.

Uno studio condotto nello stesso anno si è proposto di verificare se l'arricchimento di pasta di pomodoro con bucce di pomodoro aumentasse l'assorbimento di licopene e  $\beta$ -carotene. Tale lavoro esamina la biodisponibilità del licopene confrontando una normale pasta di pomodoro con una arricchita con un 6% di bucce finemente macinate utilizzando un modello di digestione *in vitro* che misura la quantità di carotenoidi che passano dalla pasta alle micelle, una linea di cellule intestinali umane e la valutazione della risposta post-prandiale di chilomicroni. Nelle micelle si è ritrovato un valore di licopene e  $\beta$ -carotene superiore del 30% dopo digestione di pasta addizionata, la quantità di carotenoidi assorbita dalle cellule intestinali era superiore del 75% e la risposta post-prandiale dei chilomicroni era migliorata del 38%. Se ne deduce che un arricchimento di pasta di pomodoro con bucce è un'opzione interessante per aumentare l'apporto di carotenoidi<sup>[77]</sup>.

Un approccio alternativo è basato sulle proprietà lipofile dei carotenoidi per la loro estrazione in oli edibili in vista di un potenziamento di oli di bassa qualità suggerendo quindi nuovi prodotti alimentari funzionali.

Sono stati incorporati della passata e delle bucce di pomodoro in un olio d'oliva raffinato, in un extravergine d'oliva e in olio di girasole raffinato. L'incorporazione della buccia negli oli raffinati ha aumentato la concentrazione di licopene e  $\beta$ -carotene più della passata di pomodoro. Inoltre l'incorporazione di passata ha indotto una diminuzione in composti fenolici, mentre le bucce di pomodoro hanno permesso di oltrepassare questo problema, potenziando il contenuto in fenoli totali nell'olio raffinato. I risultati di questo lavoro mostrano come l'incorporazione di bucce di pomodoro, come scarti agro-industriali, sia un mezzo efficace per estrarre carotenoidi e composti fenolici in substrati grassi, migliorando la loro biodisponibilità quindi migliorando la bassa qualità di oli edibili<sup>[78]</sup>.

Oltre a ipotesi di recupero dagli scarti di lavorazione del pomodoro di composti rilevanti dal punto di vista nutrizionale, esistono ipotesi di recupero alternative come per esempio l'utilizzo di tali scarti in termini di biomassa.

Le biomasse comprendono vari materiali di origine biologica, scarti delle attività agricole riutilizzati in apposite centrali termiche per produrre energia elettrica. Si tratta generalmente di scarti dell'agricoltura, dell'allevamento e dell'industria<sup>[79]</sup>.

La biomassa è una risorsa rinnovabile. Dalla combustione di una biomassa si sviluppa carbonio che ritorna nell'atmosfera potendo così essere riciclato nella crescita di nuove piante. Pertanto, l'applicazione di biomassa a fini energetici può portare a zero le emissioni di CO<sub>2</sub> netto in periodi molto brevi del ciclo di vita, in quanto il carbonio sotto forma di CO<sub>2</sub> e di energia sono fissati dalla fotosintesi durante la crescita della biomassa. Rispetto ad altre fonti energetiche rinnovabili, la biomassa è in abbondante produzione annua, con una distribuzione geograficamente diffusa nel mondo. D'altra parte, la maggior parte dei residui di biomassa può rappresentare un importante problema ambientale se questa viene conservata o posizionata su terreni senza controllo perché subisce una fermentazione anaerobica, causando la formazione di metano. Tutti questi problemi hanno portato a pensare la biomassa come combustibile per sostituire i combustibili fossili per il riscaldamento e la produzione di elettricità.

Ad oggi i residui di lavorazione del pomodoro, soprattutto pelli e semi, non generano alcun beneficio per le industrie che li generano. Anzi, l'accumulo di questi residui prevalentemente in periodi caldi ne favorisce la fermentazione anaerobica. Per questi motivi la ricerca tende ad approfondire lo studio dei residui di biomassa dell'industria del pomodoro come fonte di energia. La tecnica sperimentale più utilizzata è l'analisi termogravimetrica, che è una delle più comunemente utilizzate per lo studio delle reazioni derivanti dalla decomposizione termale di solidi. I residui hanno mostrato bassi valori di zolfo e ceneri ed elevati contenuti in sostanze volatili. Infine un alto potere calorifico sembra essere correlato al contenuto di olio nei residui<sup>[80]</sup>.

Altri studi prendono in considerazione invece lo sfruttamento della fermentazione anaerobica come fonte di sviluppo di gas metano. Si sta lavorando per stabilire se può essere trovato un rapporto tra composizione chimica e le rese di metano<sup>[81]</sup>.

A seguito della Direttiva Europea 2003/30/CE che promuove l'uso di biocarburanti o altri carburanti rinnovabili, è stata incentivata la sostituzione dei convenzionali carburanti con fonti di energia rinnovabile come gli oli vegetali. L'olio estratto dai semi di pomodoro è stato testato per le sue proprietà carburanti ed ha mostrato bassa volatilità, basso contenuto in solfuri e ceneri e alta viscosità, caratteristiche simili a quelle di altri oli vegetali. Questo studio condotto in Grecia ha

concluso che il combustibile derivato dai semi di pomodoro può essere una potenziale materia prima per la sostituzione del carburante diesel<sup>[82]</sup>.

Studi recenti condotti da ricercatori del CNR di Napoli riportano la possibilità di recuperare dagli scarti di lavorazione prodotti dall'industria alimentare polimeri naturali, in particolare polisaccaridi. Moderne tecnologie eco-compatibili promuovono l'uso di scarti di lavorazione del pomodoro per ottenere biopolimeri che possono essere riutilizzati nello stesso settore della materia prima<sup>[83]</sup>.

Sono state studiate procedure di purificazione della frazione polisaccaridica proveniente da prodotti e sottoprodotti dell'industria del pomodoro, studiandone la composizione chimica, le proprietà reologiche e la struttura primaria con analisi spettroscopiche. Tramite processi enzimatici sono stati inoltre ottenuti partendo da polisaccaridi dei materiali biodegradabili e termoplastici<sup>[84]</sup>.

Le potenzialità biotecnologiche di tali biopolimeri sono state sperimentate e ottimizzate al fine di realizzare biomateriali da utilizzare in differenti settori come l'agricoltura (solarizzazione e pacciamatura) e il settore farmacologico<sup>[73]</sup>.

Tutte le ipotesi fin qui prese in considerazione di applicazione per il recupero di biomolecole d'interesse degli scarti di lavorazione del pomodoro rappresentano un contributo notevole a risolvere anche problemi di inquinamento ambientale derivante dall'accumulo, stoccaggio e relativo smaltimento di tali scarti.

## **SCOPO**

L'industria di trasformazione delle produzioni vegetali genera quantità non trascurabili di scarti vegetali di vario genere; nel caso della lavorazione del pomodoro gli scarti generati dalla lavorazione industriale, principalmente bucce e semi, costituiscono un costo aggiuntivo per le aziende produttive che li generano a causa dei processi di smaltimento. Attualmente trovano impiego come mangimi nell'alimentazione zootecnica e come concimi per l'agricoltura. Tuttavia, numerosi studi ne evidenziano anche il valore intrinseco e le potenzialità che potrebbero portare ad una rivalutazione da scarti a sottoprodotti.

Da qui nasce un progetto per lo studio e la ricerca di uno o più estratti di bucce e/o semi che, se adeguatamente caratterizzati, sono proponibili come materie prime o come semilavorati alle industrie alimentari, farmaceutiche e cosmetiche che richiedono prodotti innovativi, con la contemporanea valorizzazione di un sottoprodotto di lavorazione del pomodoro.

Questo lavoro si inserisce in un progetto in collaborazione con l'industria Conserve Italia Soc. Coop. Agr. di San Lazzaro di Savena (BO) e prevede studio, caratterizzazione e ricerca di componenti salutistici e nutrizionali di maggior valore aggiunto ricavabili da uno o più prodotti di scarto ottenuti dalle diverse fasi della trasformazione del pomodoro e che hanno attualmente larga applicazione nell'industria alimentare, sia come integratori, sia come ingredienti funzionali aggiunti ad altre matrici.

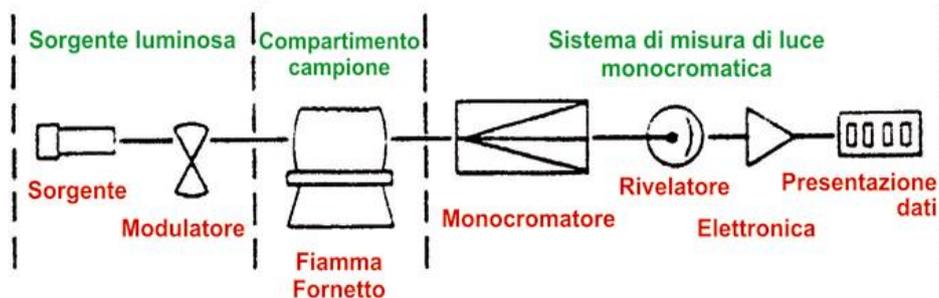
Una giusta combinazione fra la qualità della materia prima (pomodoro) e la capacità di recuperare alcuni importanti sottoprodotti sino ad ora considerati scarto con problemi di smaltimento, potrebbe portare ad un miglioramento della competitività della filiera del pomodoro italiano.

## PARTE SPERIMENTALE

### SPETTROSCOPIA ATOMICA

La Spettroscopia Atomica è una tecnica che, grazie all'accuratezza, alla precisione e alla ripetibilità dimostrata, è attualmente riconosciuta come la più idonea per la determinazione quali-quantitativa dei metalli presenti in matrici di varia natura. Per le analisi è stato utilizzato uno spettrofotometro atomico Perkin Elmer 1100B riportato in figura 8.

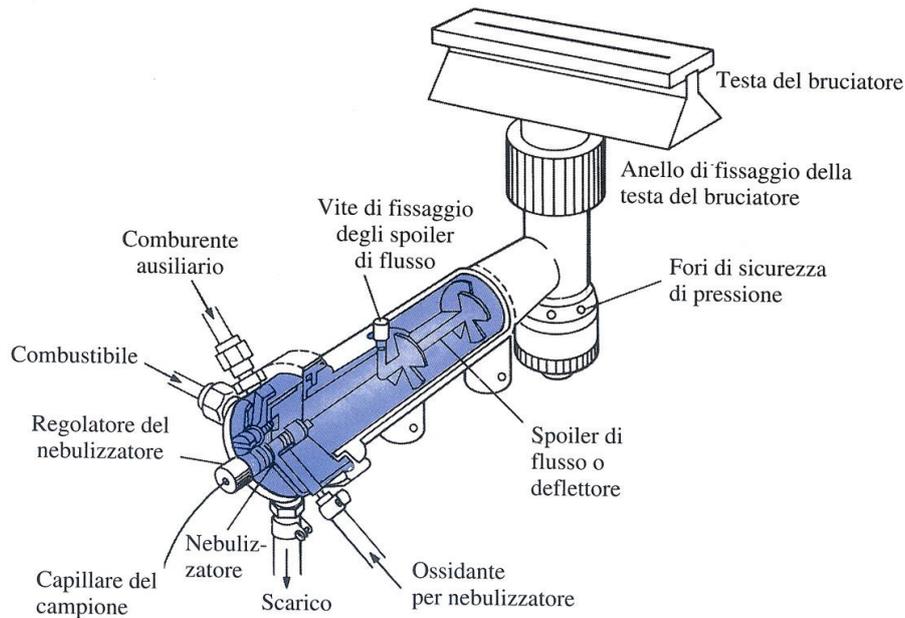
1. Lampada a catodo cavo, a singolo o multielemento, di tipo Intensitron TM Perkin Elmer;
2. Bruciatore a premiscelazione al Titanio (Figura 9), a fenditura singola di 10 cm, per fiamma ad aria/acetilene (2145/2400°C SIO S.p.A. Milano);
3. Monocromatore, per separare la riga analitica;
4. Sistema di traduzione;
5. Amplificatore;
6. Sistema computerizzato, per visualizzare i risultati.



**Figura 8.** Spettrofotometro atomico.

La lampada è costituita da un catodo cavo in tungsteno sulla cui superficie interna vi è un amalgama contenente uno o più elementi (lampade monoelemento o pluri-elemento); il tutto è posto all'interno di un cilindro in quarzo riempito con gas nobile, in genere Argon.

In seguito all'applicazione di corrente elettrica alla lampada, avviene l'emissione di energia sotto forma di radiazioni elettromagnetiche.



**Figura 9.** Bruciatore a premiscelazione

L'emissione di queste radiazioni è dovuta al fatto che gli atomi del metallo nella lampada, passano da uno stato eccitato, a cui sono arrivati a causa dell'energia fornita dalla lampada, a quello fondamentale.

Ogni elemento emette un insieme di radiazioni tipico, in quanto ha un numero ben preciso di livelli energetici e ciascuno di essi è quantizzato. Più precisamente possiamo dire che ogni radiazione emessa, corrisponde ad uno dei picchi che compongono lo spettro dell'elemento.

Ogni elemento può passare dallo stato fondamentale ad uno qualsiasi dei suoi livelli energetici e nel ritornare al livello a minore energia, emette una radiazione di energia e lunghezza d'onda ben precise. Ogni radiazione emessa, viene registrata come un picco, e l'insieme dei picchi andrà a costituire uno spettro.

Di tutti i vari picchi registrati, se ne considera uno solo, quello definito "*riga analitica*": è generato dall'atomo che passa dal livello energetico immediatamente superiore, allo stato fondamentale (definito E1), al livello con il minimo contenuto energetico, definito appunto stato fondamentale e indicato con E0.

Si può considerare utile, ai fini ultimi dell'identificazione dell'elemento, solo la riga analitica, poiché la transizione da E0 a E1 è molto più frequente rispetto alle altre transizioni che si verificano.

Le radiazioni che fuoriescono dalla lampada, passano attraverso una fiamma laminare, posta nella stessa direzione del cammino delle radiazioni in modo da essere totalmente attraversate da queste ultime. La fiamma è alimentata con aria compressa ed acetilene e raggiunge i 2400°C.

Tramite un capillare di aspirazione, il campione viene inviato alla fiamma dove, a causa dell'alta temperatura, il solvente acquoso evapora e rimangono, quindi, ioni privi dell'acqua di solvatazione presenti come  $Me^{n+}$ . La ricchezza di elettroni a livello della fiamma, fa sì che gli ioni positivi vengano ridotti a  $Me^0$ .

Per passare allo stato eccitato, gli atomi devono assorbire radiazioni elettromagnetiche e precisamente incontrano quelle provenienti dalla lampada. Il quantitativo di radiazioni assorbite è proporzionale al numero di atomi presenti nel campione secondo la legge di Lambert-Beer.

Il sistema di rilevazione e traduzione misura la differenza tra la radiazione inviata alla fiamma e la radiazione giunta al rilevatore stesso e calcola così la quantità di radiazione assorbita:

$$A = I_{\text{entrante}} / I_{\text{uscente}} = a b c$$

$I_{\text{entrante}}$  = intensità della radiazione entrante nel monocromatore e poi in fiamma,

$I_{\text{uscente}}$  = intensità della radiazione uscente dalla fiamma,

$a$  = assorbività o coefficiente di estinzione molare,

$b$  = cammino ottico,

$c$  = concentrazione.

L'apparecchio calcola ed esprime direttamente la concentrazione di metallo nel campione.

La tecnica di *Spettroscopia Atomica* può dunque essere applicata:

1. per ottenere informazioni qualitative; la lampada contiene lo stesso elemento che poi si va a ricercare nel campione; se nel campione l'elemento è assente, non si registra alcuna assorbanza; inoltre con il monocromatore si isola la riga analitica dell'elemento voluto;
2. per ottenere informazioni quantitative; come già detto, per ogni valore di assorbanza si ricava un valore di concentrazione.

## **GASCROMATOGRAFIA-SPETTROMETRIA DI MASSA**

La gas cromatografia è una delle tecniche più ampiamente usate per le analisi qualitative e quantitative. In gas cromatografia, il gas della fase mobile più comunemente usato è l'elio, sebbene vengano usati anche argon, azoto e idrogeno. Le velocità di flusso sono generalmente controllate da un riduttore di pressione a due stadi all'uscita del gas dalla bombola e da un riduttore di pressione o regolatore di flusso montato nel cromatografo. La pressione di ingresso è generalmente compresa fra 10 e 50 psi oltre la pressione atmosferica e porta a valori di velocità di flusso da 25 a 150 mL/min con colonne impaccate e da 1 a 25 mL/min per colonne capillari.

La camera di iniezione viene generalmente tenuta ad una temperatura di circa 50 °C oltre il punto di ebollizione del componente meno volatile nel campione. Per le più comuni colonne analitiche impaccate, la dimensione del campione varia da pochi decimi di microlitro a 20 microlitri.

Le colonne capillari richiedono campioni più piccoli di un fattore di 100 o più. In questo caso, spesso, si utilizza un sistema di ripartizione che suddivide il campione iniettato in modo tale da inviarne solo una piccola frazione nota (da 1:100 a 1:500) in testa alla colonna ed il rimanente allo scarico.

I campioni solidi sono introdotti sotto forma di loro soluzioni o alternativamente sono sigillati in fiale di vetro a pareti molto sottili che possono essere inserite in testa alla colonna e quindi forate o spezzate all'esterno.

Le colonne utilizzate possono essere di due tipi:

- Colonne impaccate
- Colonne capillari

In passato la stragrande maggioranza di lavori è stata condotta con colonne impaccate.

Attualmente, le colonne impaccate sono state sostituite nella maggior parte delle applicazioni dalle più efficienti e veloci colonne capillari. La lunghezza delle colonne è variabile da meno di due metri fino a cinquanta metri o più. Sono costruite in acciaio inossidabile, vetro, silice fusa o teflon. Per poterle sistemare agevolmente in forni termostatati, viene data loro la forma di avvolgimenti di diametro variabile da 10 a 30 cm. Le colonne capillari più usate sono le colonne tubulari aperte a silice fusa (colonne FSOT, Fused Silica Open Tubular), purificata in modo speciale per contenere quantità minime di ossidi metallici. Queste colonne hanno parete molto più sottile delle analoghe in vetro ed i tubi vengono rinforzati da un rivestimento esterno protettivo di poliammide, applicato durante la costruzione stessa del capillare. Le colonne che ne risultano sono molto flessibili e possono facilmente essere foggiate in avvolgimenti del diametro di centimetri.

La temperatura della colonna rappresenta una variabile particolarmente importante che deve essere controllata a pochi decimi di grado. Generalmente la temperatura ottimale dipende dal punto di

ebollizione del campione e dal grado di separazione richiesto. Di solito, la risoluzione ottimale è associata a una temperatura minima, tuttavia un abbassamento di temperatura determina un aumento nel tempo di eluizione e pertanto il tempo totale di analisi.

Numerosi rivelatori sono stati studiati ed utilizzati per le separazioni gas cromatografiche.

Il rivelatore ideale per la gas cromatografia ha le seguenti caratteristiche:

1. Adeguata sensibilità. In generale, le sensibilità degli attuali rivelatori sono comprese nell'intervallo analitico fra  $10^{-8}$  e  $10^{-15}$  g.
2. Buona stabilità e riproducibilità.
3. Risposta lineare alle concentrazioni dei soluti in un intervallo di parecchi ordini di grandezza.
4. Campo di temperatura che si estenda da una temperatura ambiente ad almeno 400 °C.
5. Tempo di risposta breve ed indipendente dalla velocità di flusso.
6. Alta affidabilità e facilità di uso.
7. Similarità di risposta nei confronti di tutti i soluti o, alternativamente, risposta altamente prevedibile e selettiva nei confronti di una o più classi di soluti.

Si può affermare che, attualmente, nessun rivelatore è dotato di tutte queste caratteristiche. Tra i più utilizzati ricordiamo il rivelatore a ionizzazione di fiamma, il rivelatore a conducibilità termica, il rivelatore a cattura di elettroni e lo spettrometro di massa (Tabella 2).

<b>Rivelatori per gas cromatografia</b>		
<b>Tipo</b>	<b>Campioni rivelati</b>	<b>Limiti di rilevabilità</b>
Ionizzazione di fiamma	Idrocarburi	0,2 pg
Conducibilità termica	Rivelatore universale	500 pg
Cattura di elettroni	Composti alogenati	5 fg
Spettrometria di massa	Adattabile a qualsiasi specie	0,25-100 pg
Termoionico	Composti contenenti azoto e fosforo	0,1 pg (N) 1 pg (P)
Conducibilità elettrolitica	Composti contenenti alogeni zolfo o azoto	0,5 pg Cl 2 pg S 4 pg C
Fotoionizzazione	Composti ionizzabili mediante UV	2 pg C
IR a trasformata di Fourier	Composti organici	0,2- 40 ng

**Tabella 2.** Rivelatori per gas cromatografia ed i rispettivi limiti di rilevabilità

### **Rivelatore a spettrometria di massa**

Lo spettrometro di massa misura il rapporto carica/massa ( $m/z$ ) degli ioni che vengono prodotti dal campione. Nel caso della gas cromatografia, il campione si trova allo stato di vapore e il dispositivo in ingresso deve interfacciarsi tra il sistema GC a pressione atmosferica e lo spettrometro di massa a bassa pressione (da  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  Torr). Per mantenere bassa la pressione è necessaria la presenza di un particolare sistema da vuoto. Nello spettrometro di massa, le molecole del campione vengono ionizzate in una sorgente di ionizzazione.

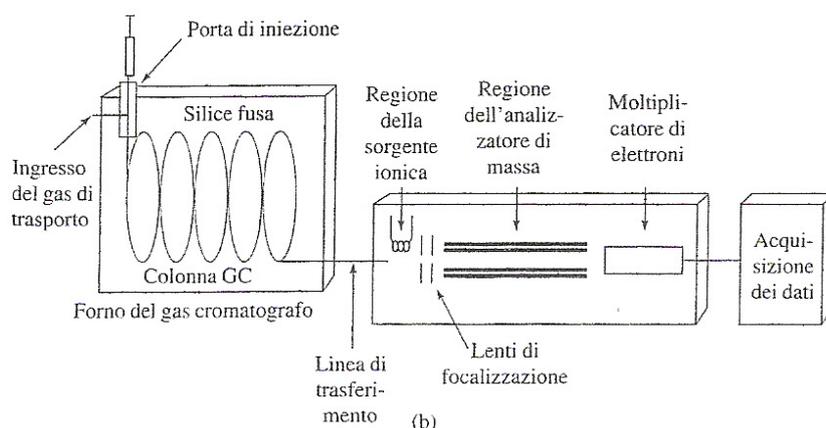
Una delle sorgenti più comune è la sorgente ad impatto elettronico (EI) (Tabella 3). In questa, le molecole vengono bombardate con un fascio di elettroni ad alta energia. Ciò produce ioni positivi, ioni negativi e specie neutre. Gli ioni positivi vengono accelerati verso l'analizzatore per repulsione elettrostatica.

Nell'impatto elettronico, il fascio di elettroni è così energetico che vengono prodotti molti frammenti; questi frammenti sono comunque molto utili per l'identificazione di specie molecolari che entrano nello spettrometro di massa.

<b>Sorgenti di ionizzazione per la spettrometria di massa abbinata alla gas cromatografia</b>			
<b>Tipo</b>	<b>Nome</b>	<b>Metodo di ionizzazione</b>	<b>Tipo di spettri</b>
A fase gassosa	Impatto elettronico (EI)	Elettroni energetici	Schemi di frammentazione
	Ionizzazione chimica	Ioni gassosi	Addotti di protoni, pochi frammenti

**Tabella 3.** Sorgenti di ionizzazione per la spettrometria di massa e rispettivi tipi di spettri

L'analizzatore di massa separa poi gli ioni sulla base dei loro valori  $m/z$ . I più comuni analizzatori sono il filtro di massa a quadrupolo e la trappola ionica, dove avviene l'immagazzinamento degli ioni nello spazio compreso tra l'elettrodo anulare e l'elettrodo di chiusura terminale. Il campo elettrico oscillante espelle sequenzialmente gli ioni con valori  $m/z$  crescenti (Figura 10).

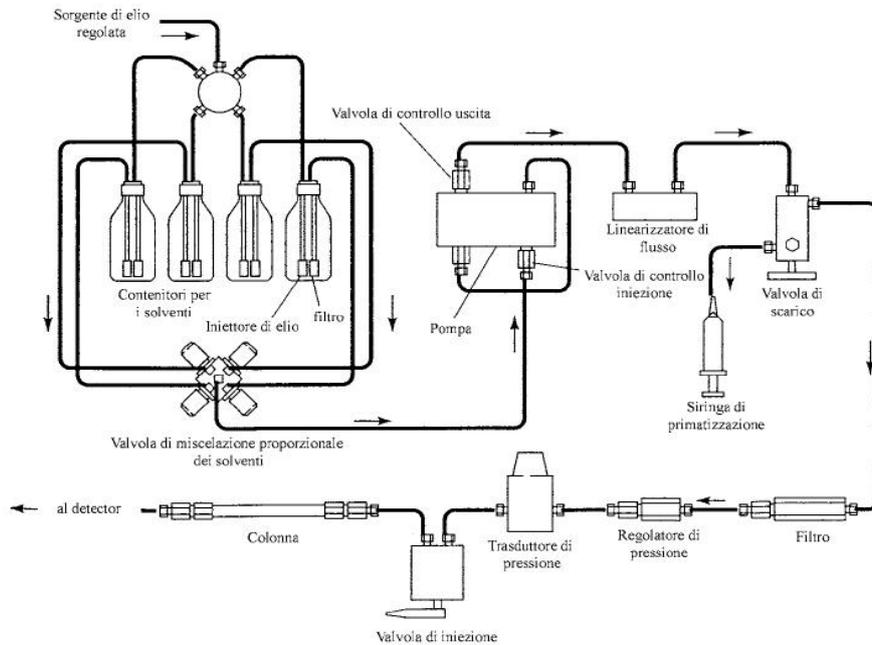


**Figura 10.** Schema di un tipico strumento GC-MS capillare. L'effluente della GC viene fatto passare attraverso l'ingresso di uno spettrometro di massa dove le molecole del gas vengono frammentate, ionizzate, analizzate e rivelate

## **CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI (HPLC)**

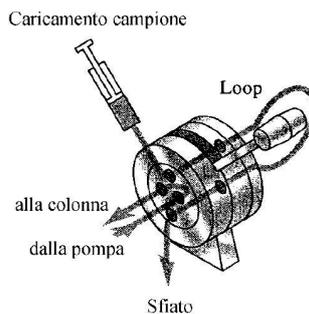
Le più importanti tecniche di cromatografia liquida sono la cromatografia liquido-liquido o di ripartizione, la cromatografia solido-liquido o di adsorbimento, la cromatografia a scambio ionico e la cromatografia di esclusione molecolare. Il metodo strumentale della cromatografia liquida ad alte prestazioni è frutto dell'evoluzione delle tecniche di cromatografia su colonna. Si tratta di una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una fase stazionaria posta all'interno della colonna cromatografica e una fase mobile che fluisce attraverso essa.

Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione) rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile. Il campione da analizzare è caricato all'inizio della colonna cromatografica dove è spinto attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile applicando pressioni mediante una pompa dell'ordine delle centinaia di atmosfere (Figura 11).



**Figura 11.** Schema generale di un apparecchio HPLC

Sebbene nella cromatografia in fase liquida sia spesso usata l'iniezione tramite siringa attraverso un setto costituito di materiale elastomero, questa procedura non è molto riproducibile e si può usare solo a pressioni di lavoro non troppo elevate: in questo caso il flusso del solvente viene bloccato per permettere il caricamento del campione in testa alla colonna. Il metodo di caricamento più usato in HPLC è quello che usa un sistema a valvola, detto *sampling loop* (Figura 12): qui il campione viene introdotto appena a monte della colonna e viene trascinato in essa dalla fase mobile senza interruzione di flusso. La caratteristica principale del sistema di iniezione tramite *loop* è l'alta riproducibilità dei volumi iniettati.



**Figura 12.** Sistema di iniezione con loop

Le colonne per HPLC sono di solito costruite in acciaio, ma esistono anche in vetro borosilicato, impiegate soprattutto quando si lavora a pressioni non troppo elevate. La lunghezza delle colonne è di solito compresa tra 10 e 30 cm, ma è possibile disporre di colonne più lunghe per particolari esigenze. Il diametro interno è compreso tra 4 e 10 mm e il diametro delle particelle del riempimento tra 3,5 e 10 $\mu$ m. Esistono anche modelli di colonne, di recente progettazione, più corte e sottili che permettono tempi di analisi inferiori e minor consumo di solvente.

Le colonne HPLC hanno una maggiore risoluzione dovuta all'impiego di fasi stazionarie molto finemente suddivise allo scopo di realizzare una superficie di interazione molto grande ed un migliore impaccamento. Per ottenere un'elevata efficienza nella separazione è necessario che le dimensioni delle particelle del riempimento siano molto ridotte (di solito hanno diametri compresi da 3 a 10  $\mu$ m), per questo motivo è indispensabile applicare un'elevata pressione se si vuole mantenere una ragionevole velocità di flusso dell'eluente e quindi un tempo di analisi adeguato. Le particelle di riempimento sono granuli sferici e non porosi, di vetro o materiale polimerico: il materiale più usato per le particelle di riempimento è la silice microporosa ma possono essere costituite anche di allumina o resina a scambio ionico. Anche in questo caso vengono applicati rivestimenti specifici, legati o per adsorbimento o attraverso legami chimici alla superficie delle particelle. Le colonne commerciali sono spesso dotate di fornelli termostatati per tenere sotto controllo la temperatura della colonna.

Le separazioni con HPLC possono essere eseguite con eluizione isocratica, ossia usando un eluente o fase mobile la cui composizione non varia durante l'analisi, oppure con eluizione a gradiente, in cui la composizione dell'eluente varia durante l'analisi in maniera continua o a gradini. Il secondo metodo aiuta in molti casi a migliorare la risoluzione dell'analisi o a diminuirne il tempo.

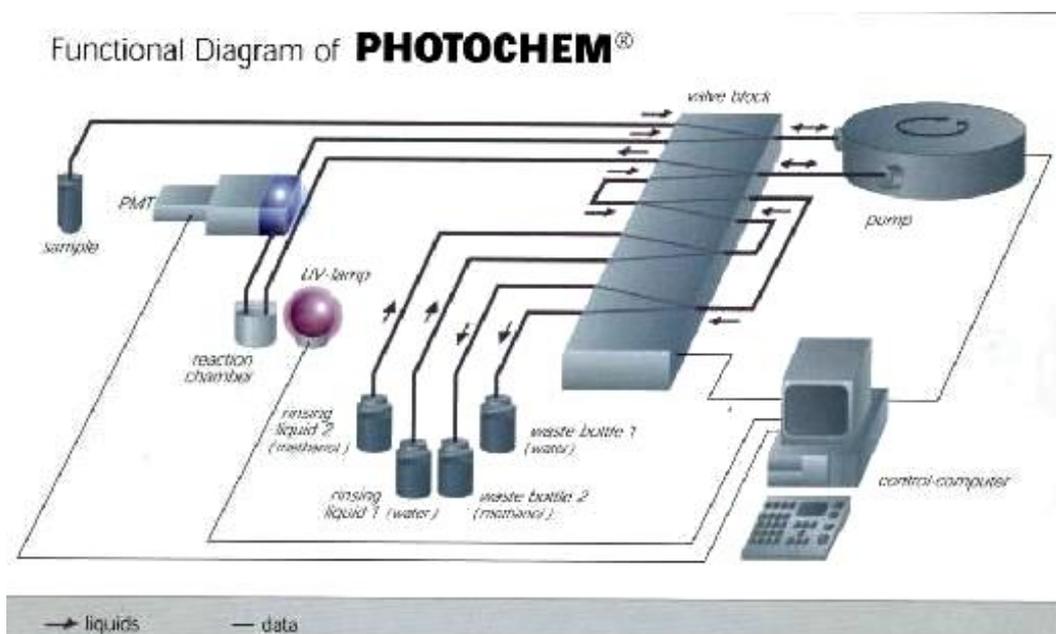
Per l'HPLC non sono disponibili rivelatori universali ed altamente sensibili, quindi il sistema di rivelazione usato dipende dalle esigenze dettate dalla natura del campione. I rivelatori più ampiamente usati per la cromatografia liquida si basano sulla misura dell'assorbimento della luce ultravioletta o della luce visibile da parte del campione. Come sorgente si usano filamenti in tungsteno o deuterio equipaggiati con filtri di interferenza che eliminano le radiazioni indesiderate. I rivelatori spettrofotometrici sono molto più versatili di quelli fotometrici e sono quelli più usati negli strumenti a più alte prestazioni: sono strumenti detti a diode array che possono mostrare l'intero spettro di assorbimento di un analita che entra in colonna.

Infine esistono rivelatori a indice di rifrazione, elettrochimici o a spettrometro di massa. L'applicabilità dello spettrometro di massa come rivelatore per HPLC è complicata dalla grande quantità di eluito proveniente dalla colonna. Si è quindi dovuto lavorare molto per sviluppare interfacce idonee che eliminino o riducano il solvente usato come eluente.

## PHOTOCHEM<sup>®</sup>

Il sistema Photochem<sup>®</sup> (Figura 13) è stato progettato per la determinazione della capacità antiossidante totale di sostanze solubili in acqua (ACW) e in matrici lipidiche (ACL).

E' un metodo innovativo che sfrutta la fotochemiluminescenza; è basato sull'autossidazione fotoindotta del luminol dovuta all'interazione con l'anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ) generato per via fotochimica nel sistema di misurazione per mezzo di un reagente, accompagnata da un'intensa chemiluminescenza.

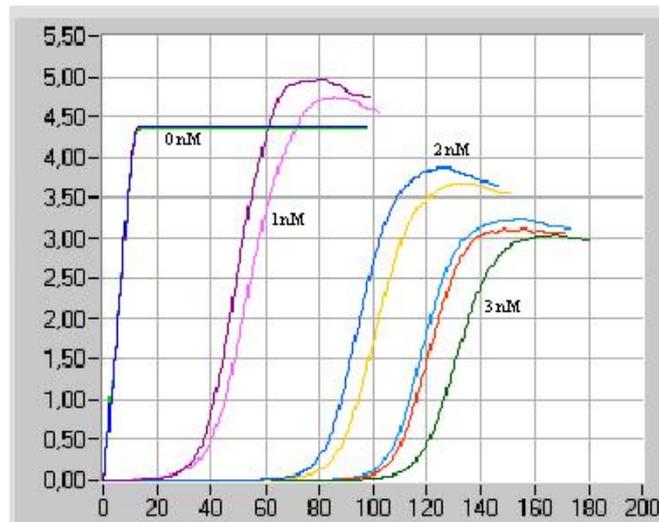


**Figura 13.** Schema del sistema Photochem<sup>®</sup> (Analytic Jena, AG, Germania)

In presenza di sostanze che agiscono come trappole di radicali, l'intensità della chemiluminescenza è attenuata in funzione della loro concentrazione. In questo modo, le proprietà antiradicaliche della sostanza analizzata possono essere realmente quantificate.

I risultati sono espressi come unità equivalenti di acido ascorbico per sostanze idrosolubili o unità equivalenti di Trolox per sostanze liposolubili. Ogni singola misura richiede da 1 a 3 minuti. In base al sistema di misurazione utilizzato si otterranno due diverse curve<sup>[85]</sup>.

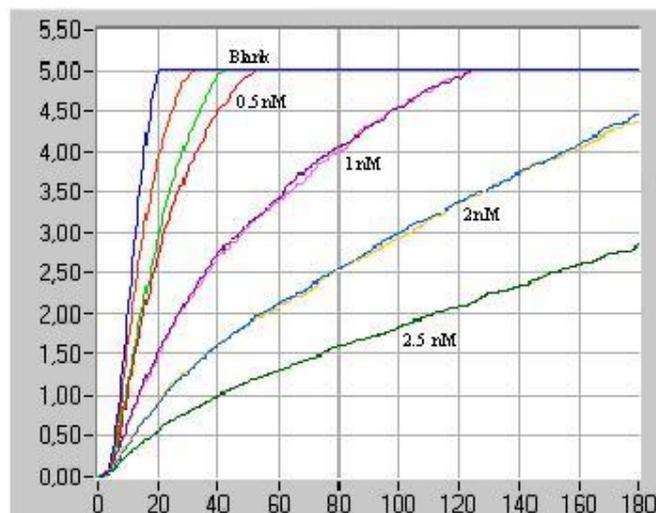
Utilizzando sistema ACW si otterranno delle curve con una tipica fase iniziale in cui la chemiluminescenza non è registrabile (Fase Lag, Figura 14).



**Figura 14.** Curva di calibrazione con il metodo ACW per sostanze idrosolubili

Maggiore è la concentrazione in antiossidanti nel campione più lunga è la fase Lag e la lunghezza della fase viene determinata dalla tangente al punto di flesso delle risultanti curve. Il punto dove la tangente interseca l'asse delle ascisse definisce la durata della fase Lag.

A differenza del sistema precedentemente descritto, il metodo ACL (Figura 15) non presenta una fase Lag; la curva parte istantaneamente e si presenta come una tipica curva di saturazione raggiungendo il plateau dopo pochi minuti. In questo caso la capacità antiossidante viene misurata dall'area sottesa alla curva, a confronto con il bianco.



**Figura 15.** Curva di calibrazione con il metodo ACL per sostanze liposolubili

### **Caratteristiche dello strumento risultano quindi essere:**

- Alta sensibilità: concentrazioni nanomolari
- Tempi di analisi molto brevi:  $\leq 3$  minuti
- Buona riproducibilità:  $CV < 2\%$

## MATERIALI E METODI

### CAMPIONI ANALIZZATI

Nell'ambito della ricerca sono stati analizzati campioni commerciali relativi a due lotti di passata di pomodoro e tre lotti di succo di pomodoro forniti direttamente dall'azienda Conserve Italia e campioni di scarti industriali derivanti dalla lavorazione dei suddetti prodotti industriali prelevati lungo la linea di produzione in due date diverse (bucce e semi 6/8 e 3/9). Infine sono state analizzate varietà spagnole di pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) di seguito riportate (Tabella 4) fornite da un'azienda di Granada (Spagna).

<b>Sigla</b>	<b>Descrizione</b>
POM1	Varietà Cherry a frutti piccoli e tondi, crescita a grappolo
POM2	Varietà Cherry a frutti piccoli e tondi, crescita a frutto singolo
POM3	Varietà Sugary a frutti piccoli e ovali
POM4	Varietà Bond a frutti grandi leggermente costoluti. Poco maturo
POM5	Varietà Bond a frutti grandi leggermente costoluti. Molto maturo
POM6	Varietà Cherry a frutti grandi e tondi
POM7	Varietà Applause a frutti medio-grandi a pelle liscia

**Tabella 4.** Varietà spagnole di pomodoro analizzate.

### PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

#### **Prodotti commerciali**

Un'aliquota pari a 2 g di campione imbottigliato è stata prelevata e posta in una provetta Falcon racchiusa con carta d'alluminio. Sono stati aggiunti 20 ml di metanolo puro per HPLC, il tutto tenuto in agitazione su Vortex per un minuto. Dopo centrifugazione a 5000 rpm per 15 minuti è stato prelevato il surnatante con una pipetta Pasteur e trasferito in un matraccio da 100ml. Questa estrazione è stata ripetuta per 5 cicli e le varie frazioni raccolte insieme, infine il matraccio è stato portato al volume finale di 100ml con metanolo puro per HPLC.

#### **Scarti industriali**

Sono stati raccolti durante lavorazione industriale del pomodoro campioni di scarti, bucce e semi insieme, successivamente separati mediante impianto pilota dell'industria e conservati in freezer fino al momento delle analisi.

Per l'analisi dell'azoto organico totale, delle ceneri, della sostanza grassa e dei metalli, sia i campioni di bucce che i campioni di semi sono stati posti in stufa a 105°C fino a peso costante.

L'umidità è espressa come percentuale p/p.

Per la preparazione degli estratti da semi di pomodoro si è proceduto partendo da semi interi precedentemente essiccati e da semi dopo trattamento Soxhlet quindi privati del loro contenuto lipidico. Ad un'aliquota pari a 3g di campione sono stati aggiunti 20 ml di metanolo puro da HPLC, il tutto lasciato in agitazione per 30 minuti. In seguito è stato prelevato il surnatante con una pipetta pasteur e trasferito in un pallone. L'estrazione è stata ripetuta con altri 20 ml di metanolo fresco per 30 minuti e il surnatante unito al precedente. Il contenuto del pallone è stato portato a secco con rotavapor a una temperatura di 35-40°C. L'estratto è stato recuperato con 3 ml di metanolo per HPLC. Gli estratti sono stati mantenuti a 4°C fino al momento dell'analisi.

### **Frutti di pomodoro**

Un'aliquota pari a 5g di campione fresco tagliato in piccoli pezzi è stata posta in una provetta Falcon con 20ml di metanolo puro per HPLC. Dopo 30 minuti di sonicazione l'estratto ottenuto è stato trasferito in un matraccio tarato filtrando su cotone. Il matraccio è stato poi portato al volume finale di 25ml con metanolo.

### **DETERMINAZIONE DELL'AZOTO ORGANICO TOTALE**

Si esegue con il tradizionale metodo di Kjeldahl, (International Dairy Federation. Determination of nitrogen content. Kjeldahl method, Norma FIL-IDF, No 20B, Brussels, Belgium, 1993) utilizzando un apparecchio semiautomatico (mineralizzatore, distillatore, titolatore).

Si scalda il campione (circa 1,5 grammi di campione essiccato) con acido solforico concentrato al 95% fino alla completa mineralizzazione della sostanza organica. Tutto l'azoto presente si trasforma in solfato d'ammonio, il quale, fatto reagire con una base forte, libera ammoniaca che viene distillata in corrente di vapore e raccolta dopo un refrigerante a ricadere in beuta. In questa, è contenuta una soluzione acida nota e titolata. Retrotitolando con sodio idrossido 0,5 N si ottiene la quantità di azoto, che moltiplicata per un fattore di conversione (in questo caso 6,25) dà direttamente la quota proteica.

### **DETERMINAZIONE DELLA FRAZIONE LIPIDICA**

Si esegue con il metodo Soxhlet basato sull'estrazione ponderale del grasso dal campione (circa 3g di campione essiccato) con etere etilico in un apparecchio distillatore (VELP SCIENTIFICA, Usmate, Milano). Per l'estrazione vengono utilizzati 50 ml di etere etilico. Il processo si compone di tre fasi: 30 minuti in immersione in solvente, 30 minuti con reflusso a ricadere, 10 minuti di recupero del solvente. Al termine, dopo raffreddamento a temperatura ambiente, si pesa l'estratto raccolto.

## **DETERMINAZIONE DELLA FRAZIONE MINERALE**

Si esegue trattando il campione essiccato in muffola a 570°C per 3h. La parte organica prima carbonizza poi si ossida completamente ad acqua e anidride carbonica. Il quantitativo di ceneri si ottiene per differenza con la tara iniziale della capsula e rapportando il valore a 100.

## **DETERMINAZIONE DEI METALLI MEDIANTE SPETTROSCOPIA ATOMICA**

### **Mineralizzazione dei campioni**

Ad un'aliquota pari a 1g di ciascun campione da mineralizzare si aggiungono 10 ml di HNO<sub>3</sub> 69-70% J.T.Baker ed alcune palline di vetro per creare punti di ebollizione moderata. Si applica poi ad ogni provettone un sistema refrigerante a ricaduta allo scopo di condensare i vapori che si formano durante la digestione e recuperare così eventuale metallo trascinato via dai vapori stessi. Si inseriscono i provettoni in un digestore e si applica una scala di temperatura fino ad arrivare a 200°C. La digestione si considera terminata quando dai refrigeranti non fuoriescono più fumi bruni dovuti all'ossidazione della sostanza organica a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O ed alla parallela riduzione dell'HNO<sub>3</sub> con produzione di vapori nitrosi.

Si lasciano raffreddare i campioni quindi si aggiunge ad ognuno di essi 1 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 130 vol. (Carlo Erba): essa serve a "striappare", cioè allontanare i vapori nitrosi residui mediante saturazione dell'ambiente con O<sub>2</sub>.

Si applica un ciclo di riscaldamento più breve rispetto al precedente, infine si lascia definitivamente raffreddare: si ottengono così soluzioni limpide, più o meno incolore. Si trasferisce quantitativamente ogni soluzione in un matraccio da 20 ml, lavando il provettone con aliquote di acqua deionizzata MilliQ. Si agita per omogeneizzare la soluzione e si filtra il tutto con filtro di carta Whatman senza ceneri. Accanto a questi campioni si preparano due soluzioni di controllo (bianchi) applicando la medesima procedura ma in assenza di campione.

### **Analisi dei campioni**

Per poter eseguire l'analisi dei campioni con il metodo precedentemente descritto è necessario costruire una retta di taratura per ogni metallo in esame. A tal scopo si preparano soluzioni standard a diversa concentrazione e previo azzeramento su acqua deionizzata MilliQ, si effettuano le rispettive letture di assorbanza con le quali costruire la retta ponendo in ascissa le concentrazioni e in ordinata le assorbanze.

Dato che la legge di Lambert-Beer è valida solo entro l'intervallo di linearità dello strumento, i campioni troppo concentrati, come pure il bianco, devono essere opportunamente diluiti con lo stesso solvente, in genere acqua deionizzata Milli-Q per rientrare nel range di linearità.

## **DETERMINAZIONE DEL PROFILO DEGLI ACIDI GRASSI MEDIANTE GC-MS**

Per la determinazione degli acidi grassi, il contenuto lipidico estratto con il metodo Soxhlet con estrattore automatico è stato recuperato con 3 ml di esano e transesterificato con 1,5 ml di metanolo con idrossido di sodio al 5%.

Si agita il tutto per qualche minuto e si recupera la fase superiore contenente gli acidi grassi metilati per la corsa cromatografica.

Lo strumento utilizzato è Gascromatografo VARIAN 3900 con iniettore Split-Splitless e rivelatore spettrometro di massa VARIAN 2100 ad impatto elettronico.

- Colonna: DB5 di silice fusa
  - Fase stazionaria: fenil-metil-silossano (al 5% di fenile);
  - Lunghezza: 30 metri;
  - Diametro interno: 0,25 mm;
  - Spessore del film: 0,25 µm;
  - Temperatura massima: 200°C;
- Temperatura iniettore: 280°C;
- Gas carrier: Elio;
- Pressione iniziale gas carrier: 10 psi;
- Programmata di temperatura: T iniziale 100 °C per 2 minuti, si sale di 10°C/min fino a 200°C e poi si ha un'isoterma per 25 minuti;
- Solvent delay: 3 minuti;
- Modalità di iniezione: Split;
- Modalità di acquisizione: Scan;
- Rapporto di splittaggio: 1:20;
- Quantità iniettata: 1 µl;
- Durata totale corsa: 37 minuti.

## **DETERMINAZIONE DELLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE**

### **Sistema Photochem®**

Il test di fotochemiluminescenza è stato eseguito secondo la metodica descritta da Popov e Lewin<sup>[85]</sup>. Per le analisi in ACL, la composizione della miscela di reazione è riportata in tabella 5.

Reagente	1	2	3-WS	4-WS	Campione
<b>Bianco</b>	2300	200	25	0	0
<b>Calibrazione</b>	2300-X	200	25	X	0
<b>Misure</b>	2300-X	200	25	0	Y

**Tabella 5.** Composizione della miscela di reazione in  $\mu\text{l}$  per analisi in ACL. X rappresenta le diverse quantità di standard per la retta di taratura (5, 10, 20, 25  $\mu\text{l}$ ). Y invece la quantità di campione da analizzare

Il reagente 1, 2, 3 e 4 sono stati forniti tal quali dalla ditta Analytic Jena (Germania). Il Reagente 3-WS (Luminol Work Solution) è stato preparato addizionando 750  $\mu\text{l}$  di reagente 2 al reagente 3. Tale soluzione è sufficiente per 40 misurazioni. Il reagente 4-WS (Trolox Work Solution) è stato preparato aggiungendo 500  $\mu\text{l}$  di reagente 1 al reagente 4. La soluzione è stata poi diluita 1:100. 10  $\mu\text{l}$  di 4-WS contengono 1 nmole dello standard di calibrazione (Trolox). La durata della corsa è di 180 secondi e la capacità antiossidante viene misurata dall'integrale al di sotto della curva ed è espressa in nmoli di Trolox equivalenti. Per le analisi in ACW, la composizione della miscela di reazione è riportata in tabella 6.

Reagente	1	2	3-WS	4-WS	Campione
<b>Bianco</b>	1500	1000	25	0	0
<b>Calibrazione</b>	1500-X	1000	25	X	0
<b>Misure</b>	1500-X	1000	25	0	Y

**Tabella 6.** Composizione della miscela di reazione in  $\mu\text{l}$  per analisi in ACW. X rappresenta le diverse quantità di standard per la retta di taratura (0, 5, 10 e 20  $\mu\text{l}$ ). Y invece la quantità di campione da analizzare

Il reagente 4-WS (Acid Ascorbic Work Solution) è stato preparato aggiungendo 500  $\mu\text{l}$  di reagente 1 al reagente 4. La soluzione è stata poi diluita 1:100. 10  $\mu\text{l}$  di 4-WS contengono 1 nmole dello standard di calibrazione (Acido Ascorbico).

La durata della corsa è variabile a seconda della concentrazione di antiossidanti nel campione e la capacità antiossidante viene determinata dalla tangente al punto di flesso delle risultanti curve ed è espressa in nmoli di Acido Ascorbico equivalenti.

### **Metodo DPPH**

Il principio di questo metodo è la inibizione del radicale stabile 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH $\cdot$ ) da parte delle sostanze antiossidanti<sup>[86]</sup>.

Il radicale 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>·</sup>) è stabile grazie alla capacità di delocalizzare l'elettrone spaiato su tutta la molecola; in questo modo non si ha dimerizzazione, come invece accade nel caso di altri radicali liberi. La delocalizzazione dà luogo a un colore viola profondo, caratterizzato da un assorbimento in soluzione di metanolo a 515 nm. In presenza di antiossidanti capaci di donare un atomo di idrogeno al radicale, la soluzione decolora; si misura la caduta dell'assorbanza a 515 nm come espressione della capacità antiossidante di un campione<sup>[87]</sup>.

Preparazione del radicale: per l'analisi viene preparata una soluzione di DPPH in metanolo 0,06 mM. La soluzione è stabile 12 ore.

Retta di calibrazione: lo standard utilizzato è Trolox in metanolo. Da una soluzione madre 20 mM sono state preparate diluizioni a 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM e 0,05 mM.

Misura dell'attività antiossidante: in una cuvetta vengono posti 2,9 ml di radicale DPPH e si legge l'assorbanza iniziale  $A_0$ . Si aggiungono 100  $\mu$ l di campione adeguatamente diluito, si agita e dopo 15 minuti si misura l'assorbanza finale  $A_f$ . Si calcola la percentuale di inibizione secondo la seguente equazione:

$$(\%) \text{ inibizione} = (1 - A_f/A_0) \cdot 100$$

E' necessario usare una concentrazione del campione tale per cui la sua percentuale di inibizione ricada nell'intervallo della retta dello standard. In questo modo si ottiene un valore di concentrazione di standard per una data concentrazione di campione.

### **Metodo ABTS**

Il metodo ABTS si basa utilizzo del cromogeno 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) che reagendo con potassio persolfato genera un catione radicalico di colore blu/verde che presenta un assorbimento tipico a 645 nm, 734 nm e 815 nm. L'attività antiossidante è valutata come riduzione dell'assorbanza a 734 nm del catione radicalico ABTS<sup>·+</sup> in presenza di antiossidanti. Il metodo è applicabile allo studio sia di antiossidanti idrosolubili che liposolubili, composti puri e estratti alimentari<sup>[88]</sup>.

Preparazione del radicale: ad 25 ml di una soluzione acquosa 7 mM di ABTS vengono addizionati 440  $\mu$ l una soluzione acquosa 140 mM di persolfato di potassio (di-potassium peroxdisulfate, Sigma-Aldrich). La soluzione ottenuta va mantenuta 12-16 ore al buio a temperatura ambiente per la completa generazione del radicale. Il radicale generato è stabile 2 giorni se mantenuto al buio e a temperatura ambiente. Al momento dell'analisi il radicale è stato opportunamente diluito in etanolo fino ad ottenere una soluzione del radicale con un'assorbanza a 734 nm pari a  $0,7 \pm 0,1$  u.a.

Retta di calibrazione: lo standard utilizzato è Trolox diluito in etanolo. Da una soluzione madre di 5 mM sono state preparate soluzioni tra 10  $\mu$ M e 500  $\mu$ M.

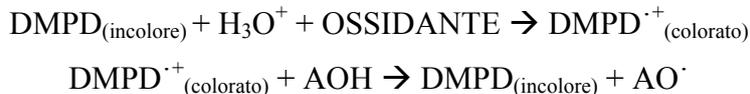
Misura dell'attività antiossidante: in una cuvetta vengono posti 2,85 ml di radicale ABTS<sup>•+</sup> e si legge l'assorbanza iniziale  $A_0$ . Si aggiungono 150  $\mu$ l di campione adeguatamente diluito, si agita e dopo 15 minuti si misura l'assorbanza finale  $A_f$ . Si calcola la percentuale di inibizione secondo la seguente equazione:

$$(\%) \text{ inibizione} = (1 - A_f/A_0) \cdot 100$$

E' necessario usare una concentrazione del campione tale per cui la sua percentuale di inibizione ricada nell'intervallo della retta dello standard. In questo modo si ottiene un valore di concentrazione di standard per una data concentrazione di campione.

### **Metodo DMPD**

Il metodo DMPD<sup>[89]</sup> si basa sull'utilizzo del cromogeno 4-ammino-N,N-dimetyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride, indicato con la sigla DMPD, composto che non presenta alcun assorbimento spettrofotometrico nel campo del visibile, mentre assume un'intensa colorazione rossa in ambiente acido e in presenza di un opportuno ossidante. Il DMPD forma in tal caso un catione radicalico stabile fortemente colorato e presenta un picco di assorbanza massimo a 505 nm. I composti antiossidanti che sono capaci di trasferire un atomo di idrogeno al radicale producono una decolorazione della soluzione e una caduta dell'assorbanza proporzionale alla loro concentrazione.



### Preparazione dei reattivi

a. Tampone acetato 0,1 M pH=5,25

Si pesano 0,8203g di acetato sodico anidro e si dissolvono in 100ml di acqua deionizzata. Si aggiusta il pH con acido acetico glaciale fino a pH 5,25.

b. DMPD 100 mM

Si pesano 209mg di DMPD e si dissolvono in 10 ml di acqua deionizzata.

c. Cloruro Ferrico 0,05 M

Si pesano 811 mg di cloruro ferrico anidro e si dissolvono in 100ml di acqua deionizzata.

Preparazione del radicale: l'ordine di addizione dei reattivi è tampone – DMPD – FeCl<sub>3</sub>.

A 8 ml di tampone si aggiungono 100  $\mu$ l di DMPD e 20  $\mu$ l di cloruro ferrico. Infine si porta a un volume finale di 10 ml con tampone. Per lo sviluppo omogeneo della colorazione il preparato è conservato a 4°C per 10 minuti. La concentrazione 1mM ottenuta del radicale deve avere un'assorbanza a 505 nm compresa tra 0,8 e 1 u.a.

Retta di calibrazione: gli standard utilizzati sono Trolox e acido ascorbico. Partendo da una soluzione madre 4 mM in metanolo per entrambi gli standard sono state preparate soluzioni 0,2

mM, 0,4 mM, 0,6 mM e 0,8 mM per il Trolox e 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, e 0,6 mM per l'acido ascorbico. I due standard hanno cinetiche di reazione differenti con il radicale DMPD<sup>•+</sup>: mentre la diminuzione dall'assorbanza indotta dall'acido ascorbico è immediata, il Trolox richiede diversi minuti.

Misura dell'attività antiossidante: in una cuvetta vengono posti 2 ml di radicale DMPD<sup>•+</sup> e si legge l'assorbanza iniziale  $A_0$ . Si aggiungono 100  $\mu$ l di campione adeguatamente diluito, si agita e dopo 10 minuti si misura l'assorbanza finale  $A_f$ . La reazione è rapida e il punto finale stabile.

Come bianco si usa la soluzione tampone. Si calcola la percentuale di inibizione secondo la seguente equazione:

$$(\%) \text{ inibizione} = (1 - A_f/A_0) \cdot 100$$

E' necessario usare una concentrazione del campione tale per cui la sua percentuale di inibizione ricada nell'intervallo della retta dello standard. In questo modo si ottiene un valore di concentrazione di standard per una data concentrazione di campione.

### **Metodo FRAP**

Il metodo FRAP (ferric reducing antioxidant power) misura l'abilità di riduzione del ferro ed è basato sulla riduzione a pH bassi del complesso ferrico 2,4,6-tripiridyl-s-triazine ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) alla forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) sviluppando una intensa colorazione blu. La variazione di assorbanza a 593 nm è direttamente correlata alla forza di riduzione degli antiossidanti elettron-donatori presenti nella reazione<sup>[90]</sup>.

#### Preparazione dei reattivi

a) Tampone acetato 0,3 M pH=3,6.

Si pesano 2,4609 g di acetato di sodio anidro e si sciolgono in 100 ml di acqua deionizzata. Il pH viene aggiustato a 3,6 con acido acetico glaciale.

b) TPTZ ( 2,4,6- tris(2-piridil)-S-triazina ) 10 mM in HCl 40 mM

Si pesano 0,03123 g di TPTZ e si sciolgono in 10 ml di HCl 40 mM. Per la preparazione dell'HCl 40 mM si diluiscono 333  $\mu$ l di HCl 37% v/v in 100 ml di acqua deionizzata.

c) Cloruro ferrico 6 idrato 20 mM

Si pesano 54,06 mg e si sciolgono in 10 ml di acqua deionizzata

Preparazione del radicale: il radicale è preparato al momento dell'analisi mescolando il tampone acetato, la soluzione di TPTZ e il cloruro ferrico in rapporto 10:1:1.

Retta di calibrazione: lo standard utilizzato per la calibrazione è Trolox in concentrazione da 10 a 300  $\mu$ M.

Misura dell'attività antiossidante: in una cuvetta vengono posti 1,5 ml di radicale e si legge l'assorbanza iniziale  $A_0$ . Si aggiungono 200  $\mu$ l di campione adeguatamente diluito, si agita e dopo 10 minuti si misura l'assorbanza finale  $A_f$ .

Viene calcolata la variazione di assorbanza:  $\Delta A = A_f - A_0$  .

La variazione di assorbanza dovuta alla riduzione del complesso colorato è direttamente proporzionale alla forza riduttiva/forza antiossidante del campione analizzato.

E' necessario usare una concentrazione del campione tale per cui il suo  $\Delta A$  ricada nell'intervallo della retta dello standard. In questo modo si ottiene un valore di concentrazione di standard per una data concentrazione di campione.

### **DETERMINAZIONE DEI POLIFENOLI TOTALI**

Un'aliquota di estratto compresa tra 50 e 100  $\mu$ l è stata posta in matraccio da 10 ml, nel quale sono stati addizionati 2,5 ml di acqua deionizzata e 500  $\mu$ l di reattivo di Folin-Ciocalteu<sup>[91]</sup>.

Trascorso qualche minuto in modo che il reattivo di Folin potesse reagire con i polifenoli presenti nel campione sono stati aggiunti 2 ml di carbonato di sodio al 10% e si è portato a volume con acqua deionizzata. I campioni sono stati lasciati al buio per 90 minuti e successivamente si è proceduto alla lettura allo spettrofotometro a 700 nm. Come standard di riferimento è stato utilizzato acido gallico, con il quale è stata costruita la retta di taratura. I polifenoli totali sono stati espressi in  $\mu$ g di acido gallico per grammo di campione.

### **DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN LICOPENE**

#### **Metodo UV-Vis**

Ad un'aliquota pari a 5g di campione sono stati aggiunti in una beuta con tappo 25 ml di miscela esano:metanolo:acetone 2:1:1 allo 0,5% di BHT<sup>[16]</sup>. Dopo 30 minuti di agitazione è stata recuperata la fase organica superiore e trasferita in un imbuto separatore filtrando su cotone.

Il ciclo di estrazione è stato ripetuto per 5 volte addizionando ogni volta miscela fresca. Alla fine dei 5 cicli estrattivi, il tutto è stato filtrato su cotone nello stesso imbuto di raccolta delle varie frazioni di estrazione. La fase acquosa è stata allontanata mentre la fase organica è stata trasferita in un matraccio e portata al volume finale di 100ml con esano.

Sugli estratti opportunamente diluiti stata effettuata una lettura allo spettrofotometro a 502nm. Per la retta di calibrazione è stato usato licopene standard.

### **Metodo HPLC**

Ad un'aliquota pari a 5g di campione sono stati aggiunti in una beuta con tappo 25 ml di miscela esano:metanolo:acetone 2:1:1 allo 0,5% di BHT<sup>[16]</sup>. Dopo 30 minuti di agitazione è stata recuperata la fase organica superiore e trasferita in un imbuto separatore filtrando su cotone.

Il ciclo di estrazione è stato ripetuto per 5 volte aggiungendo ogni volta miscela fresca. Alla fine dei 5 cicli estrattivi, il tutto è stato filtrato su cotone nello stesso imbuto di raccolta delle varie frazioni di estrazione. La fase acquosa è stata allontanata mentre la fase organica è stata trasferita in un matraccio e portata al volume finale di 100ml con esano. I campioni così preparati sono stati filtrati su filtro 0,45 $\mu$ m e iniettati in colonna. Lo strumento Shimadzu serie VP è dotato di forno termostato, pompa quaternaria e detector UV-Vis.

- Colonna: C18 250x4,6mm
- Diametro dei pori interni: 5 $\mu$ m
- Fase mobile: ACN/metanolo (30:70 v/v)
- Flusso: 1,5 ml/min
- Temperatura del forno portacolonna: 40°C
- Lunghezza d'onda del rivelatore: 472nm
- Durata della corsa: 25 minuti

Per la retta di calibrazione sono state usate soluzioni di licopene standard a concentrazioni 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 50ppm e 100 ppm e di  $\beta$ -carotene standard a concentrazioni 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm, 10 ppm, 20 ppm e 50 ppm.

### **ANALISI STATISTICA**

Per l'elaborazione statistica dei dati è stato utilizzato SPSS<sup>®</sup> 15.0 per Windows<sup>®</sup>.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

Questo lavoro trova inserimento in un progetto in collaborazione con l'industria che prevede studio, caratterizzazione e ricerca di componenti salutistici e nutrizionali di maggior valore aggiunto ricavabili da uno o più prodotti di scarto ottenuti dalle diverse fasi della trasformazione del pomodoro e proponibili come materie prime o come semilavorati alle industrie alimentari, farmaceutiche e cosmetiche che richiedono prodotti innovativi, con la contemporanea valorizzazione di un sottoprodotto di lavorazione del pomodoro.

La caratterizzazione della materia prima è una premessa indispensabile per predisporre un corretto piano di studio e lavorazione. Ricerche terminate durante il primo anno di dottorato hanno portato alla messa a punto di metodologie estrattive selettive nei confronti di componenti funzionali del pomodoro; in particolare l'attenzione è stata rivolta alla valutazione degli antiossidanti alla luce del crescente sviluppo di evidenze sperimentali riguardo le proprietà benefiche di tali composti.

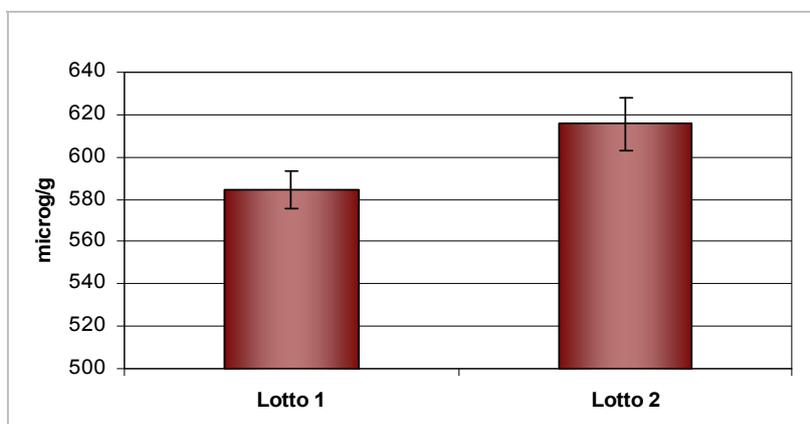
In particolare lo studio ha riguardato diverse varietà di pomodoro da industria tipiche della regione Emilia Romagna coltivate in differenti tipologie di terreni. Le analisi bromatologiche unite alle analisi del contenuto in componenti funzionali di maggior interesse, come polifenoli e licopene, hanno valutato l'importanza della genetica varietale e del terreno di coltivazione dimostrando come sia possibile arrivare all'individuazione di varietà e condizioni di terreno adatte all'ottenimento di un alimento funzionale di qualità.

Questi studi possono risultare utili ed efficaci nel processo di selezione della materia prima destinata poi alla lavorazione e alla trasformazione da parte dell'industria conserviera. Con la lavorazione industriale infatti tutta la materia prima in ingresso viene riunita e mescolata omogeneizzando le differenti tipologie di pomodoro eventualmente presenti al fine di originare un prodotto di buona qualità standardizzato nel tempo.

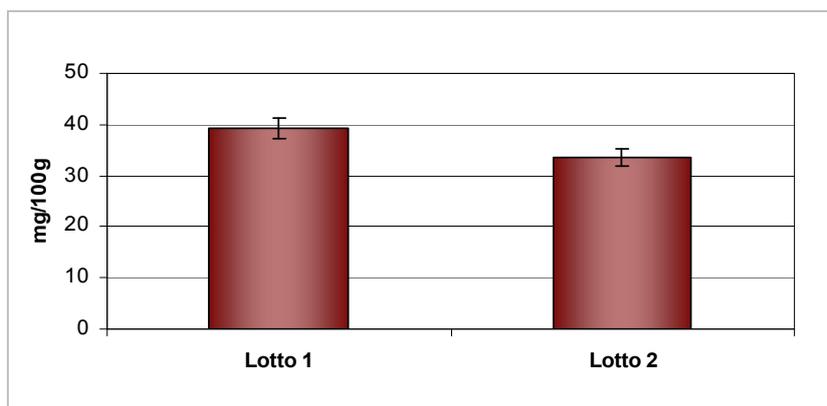
Se da una parte è possibile un miglioramento della qualità della materia prima in entrata, andando ad intervenire quindi a monte del processo industriale, dall'altra è possibile ricercare ed identificare componenti ad alto valore aggiunto negli scarti derivanti dalla trasformazione del pomodoro recuperandoli e reinserendoli nel processo industriale al fine di ottenere prodotti arricchiti in componenti funzionali.

Per questo motivo risulta evidente che il primo approccio del lavoro doveva essere il prodotto finito; in particolare sono stati analizzati due lotti di passata di pomodoro e tre lotti di succo di pomodoro forniti dall'industria. Su questi campioni è stato determinato il contenuto di componenti funzionali e la capacità antiossidante.

Come mostrato nella figura 16 il contenuto in polifenoli totali è risultato maggiore in uno dei due lotti di passata di pomodoro considerati ma entrambi i campioni analizzati mostrano un contenuto tendenzialmente vicino ai 600microg/g. Il contenuto in licopene negli stessi lotti di passata di pomodoro è compreso tra i 30 e i 40mg/100g come mostra la figura 17.

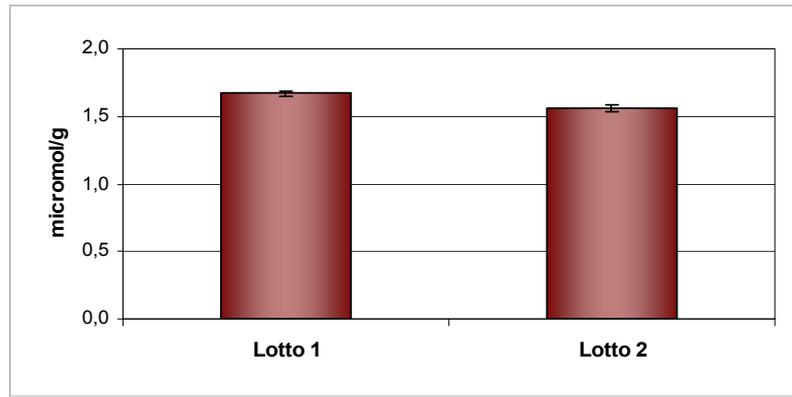


**Figura 16.** Determinazione dei polifenoli totali (valori espressi in microg di acido gallico equivalenti per g di campione) in due lotti di passata di pomodoro



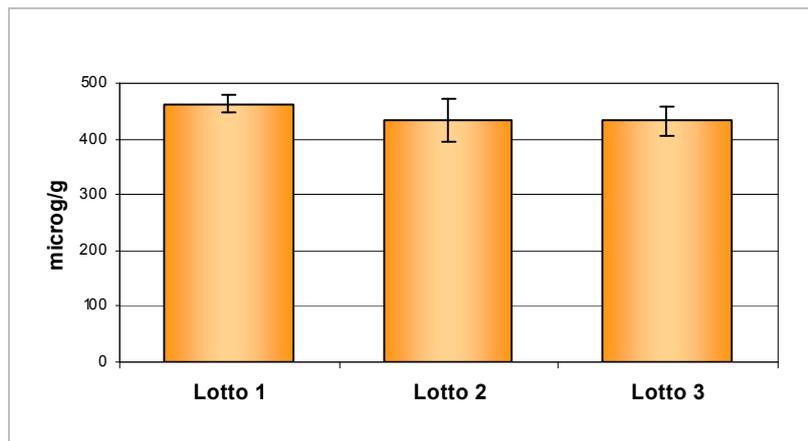
**Figura 17.** Determinazione del contenuto in licopene con metodo UV-Vis (valori espressi in mg di licopene per 100g di campione) in due lotti di passata di pomodoro

A completamento delle analisi delle componenti antiossidanti, è stata misurata la capacità antiossidante con il sistema Photochem<sup>®</sup> in modalità ACL che mette in evidenza la capacità antiossidante della componente liposolubile. I risultati, mostrati in figura 18, dimostrano una capacità antiossidante pressoché uguale nei due lotti e di poco superiore a 1,5 micromol/g di Trolox equivalenti.

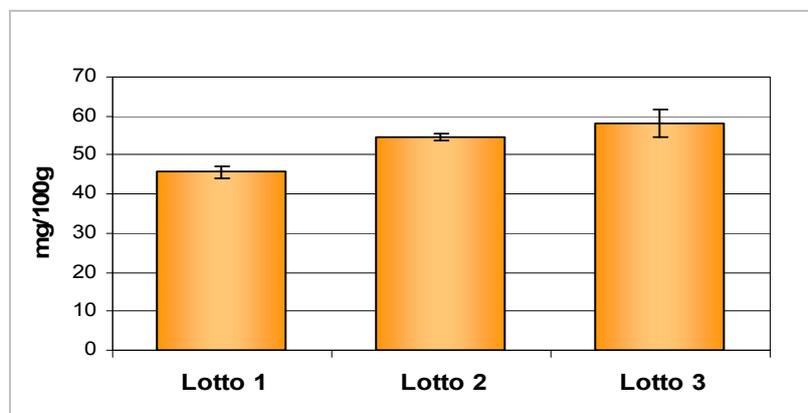


**Figura 18.** Determinazione della capacità antiossidante in due lotti di passata di pomodoro con sistema Photochem<sup>®</sup> in modalità ACL. Valori espressi in micromol di Trolox equivalenti per g di campione

Lo studio del prodotto commerciale finito è proseguito su tre lotti di succo di pomodoro sul quale sono state ricercate le stesse componenti antiossidanti. I tre campioni mostrano un contenuto in polifenoli totali tendenzialmente simile e compreso tra 430 e 470microg/g (Figura 19), mentre il contenuto in licopene è compreso tra 45 e 60mg/100g come mostrato in Figura 20.

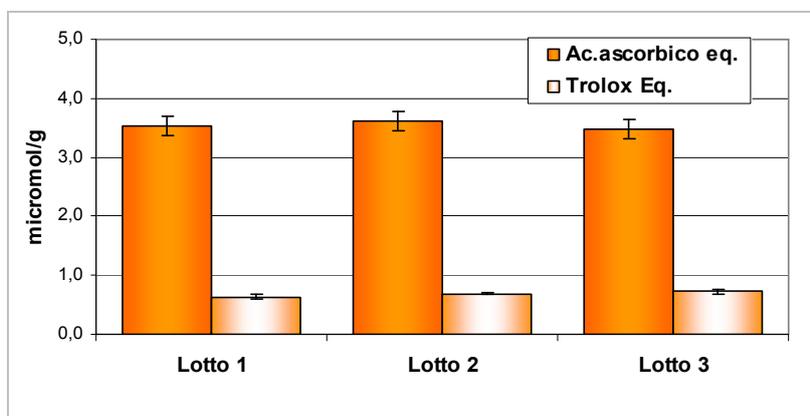


**Figura 19.** Determinazione dei polifenoli totali (valori espressi in microg di acido gallico equivalenti per g di campione) in tre lotti di succo di pomodoro



**Figura 20.** Determinazione del contenuto in licopene con metodo UV-Vis (valori espressi in mg di licopene per 100g di campione) in tre lotti di succo di pomodoro

Sui lotti di succo è stata determinata infine la capacità antiossidante sempre con il sistema Photochem<sup>®</sup> sia in modalità ACL che in modalità ACW mettendo così a confronto la capacità antiossidante della componente liposolubile e idrosolubile rispettivamente. Nella componente idrosolubile rientrano normalmente antiossidanti appartenenti alle famiglie dei flavonoidi, vitamina C e amminoacidi mentre nella componente liposolubile rientrano composti come tocoferoli, tocotrienoli e carotenoidi. Come mostrato in figura 21 la capacità antiossidante della componente idrofila, è in valori assoluti, di molto superiore a quella della componente lipofila permettendo di ipotizzare una maggior presenza nel succo di pomodoro di antiossidanti idrofilici. Confrontando questi valori con quelli ottenuti dall'analisi della passata di pomodoro risulta evidente inoltre come la passata abbia una capacità antiossidante relativa alla sua componente lipofila superiore rispetto a quella del succo.



**Figura 21.** Determinazione della capacità antiossidante in tre lotti di succo di pomodoro con sistema Photochem<sup>®</sup> in modalità ACL (valori espressi in micromol di Trolox equivalenti per g di campione) e in modalità ACW (valori espressi in micromol di acido ascorbico equivalenti per g di campione)

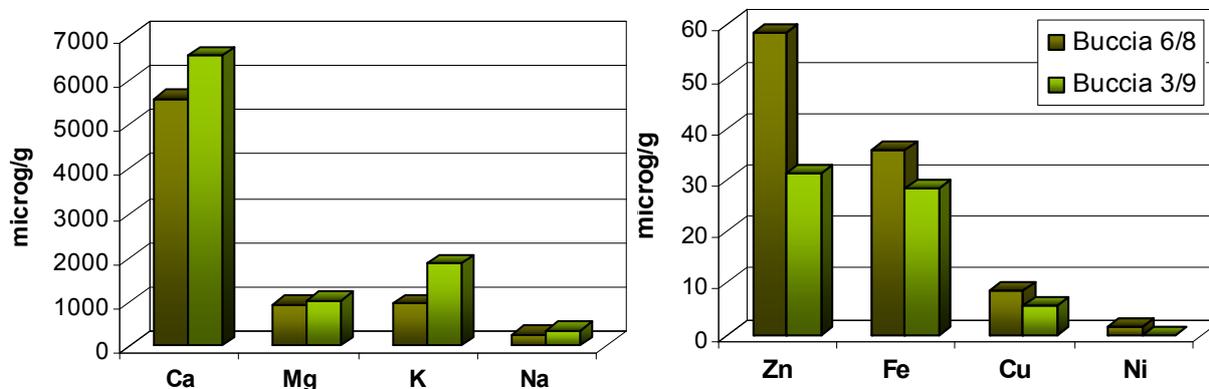
Dopo una breve indagine conoscitiva sui prodotti commerciali la ricerca è proseguita con la caratterizzazione degli scarti derivanti dalla trasformazione industriale del pomodoro. Durante la lavorazione per l'ottenimento dei lotti di prodotto precedentemente analizzati, sono stati effettuati prelievi di materiale di scarto direttamente dalla linea di lavorazione. Gli scarti prelevati, costituiti da bucce e semi insieme, sono stati separati mediante impianto pilota dall'industria. La caratterizzazione ha inizialmente riguardato i campioni di bucce di pomodoro; in tabella 7 sono riportati i contenuti in umidità, sostanza secca, proteine e ceneri espressi in percentuale.

CAMPIONE	UMIDITA' %	SOSTANZA SECCA. %	PROTEINE %	CENERI %
Buccia 6/8	74,57 ± 2,16	25,43 ± 2,16	3,21 ± 1,01	2,54 ± 0,33
Buccia 3/9	85,38 ± 1,13	14,62 ± 1,13	4,29 ± 1,17	2,79 ± 0,32

**Tabella 7.** Contenuto in umidità, sostanza secca, proteine e ceneri (valori espressi in % p/p) in campioni di bucce di pomodoro.

Il contenuto di umidità, e di conseguenza quello di sostanza secca, risultano molto diversi nei due campioni presi in esame a causa del diverso quantitativo di acqua che il campione stesso trattiene dopo separazione nell'impianto pilota. Questo dato però non influisce sulle analisi successive dato che il trattamento dei campioni in stufa fino a peso costante rende i risultati confrontabili. Il contenuto di proteine è risultato basso e la frazione minerale rappresenta poco più del 2%.

Per meglio approfondire la composizione della frazione minerale è stata effettuata l'analisi mediante Spettroscopia Atomica, ricercando la presenza di macro e micro elementi (Figura 22). Le concentrazioni di alcuni metalli pesanti quali Cd, Cr e Pb che sono tossici per gli organismi viventi, si presentano al di sotto dei limiti di rivelabilità dello strumento (0,01microg/g) in tutti i campioni analizzati.



**Figura 22.** Determinazione dei metalli in due campioni di bucce di pomodoro. Valori espressi in microg per g di campione secco ( $CV\% \leq 2$ )

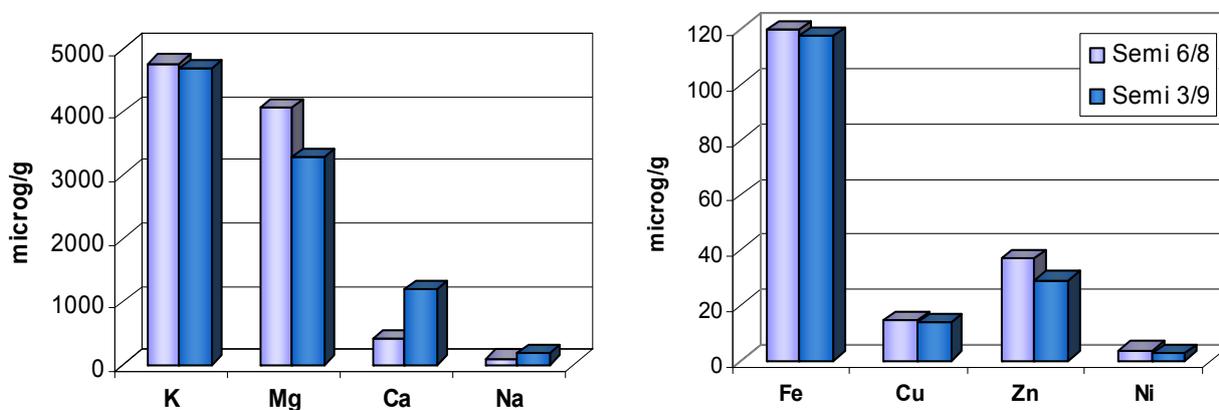
Il macroelemento di cui le bucce di pomodoro analizzate sono risultate più ricche è il calcio. Seguono magnesio, potassio e sodio a concentrazioni inferiori; questi elementi tendono infatti ad accumularsi per lo più nella polpa del frutto del pomodoro. I microelementi maggiormente presenti sono zinco e ferro, anche se con differenze tra i due campioni presi in esame. Segue a concentrazioni inferiori a 10microg/g il rame mentre il nichel è risultato essere inferiore ai 2microg/g di campione secco.

La caratterizzazione bromatologica è proseguita sui campioni di semi separati dalle bucce. Oltre alla determinazione di umidità, sostanza secca, proteine e ceneri è stata isolata inoltre la frazione lipidica mediante Soxhlet automatico (Tabella 8).

CAMPIONE	UMIDITA' %	SOSTANZA SECCA. %	LIPIDI %	PROTEINE %	CENERI %
Semi 6/8	71,15 ± 0,84	28,85 ± 0,84	14,14 ± 1,09	27,24 ± 0,11	4,83 ± 0,43
Semi 3/9	80,05 ± 0,37	19,95 ± 0,37	8,85 ± 1,80	24,70 ± 0,21	4,73 ± 0,27

**Tabella 8.** Contenuto in umidità, sostanza secca, lipidi, proteine e ceneri (valori espressi in % p/p) in campioni di semi di pomodoro (CV%≤2)

Come per i campioni di bucce, così nei semi l'umidità è risultata diversa nei due campioni presi in esame ma il trattamento di essiccazione del campione rende confrontabili i risultati delle analisi successive. Anche la frazione lipidica è risultata abbastanza diversa, a causa della variabilità costituzionale intrinseca dei semi. Il contenuto di proteine si è dimostrato compreso tra 24 e 28% mentre la frazione minerale è di poco inferiore al 5%. Per meglio approfondire la composizione della frazione minerale è stata effettuata l'analisi mediante Spettroscopia Atomica, ricercando la presenza di macro e micro elementi (Figura 23).



**Figura 23.** Determinazione dei metalli in due campioni di semi di pomodoro. Valori espressi in microg per g di campione secco (CV%≤2)

Potassio e magnesio si sono dimostrati i macroelementi maggiormente presenti nei semi di pomodoro. Mentre nelle bucce sono elevati i contenuti in calcio, nei semi questo elemento è presente a più basse concentrazioni. Il sodio è pari a 95 e 180microg/g rispettivamente nei due campioni. Tra i micro elementi il ferro è il più abbondante, seguito da zinco e rame. Infine i contenuti di nichel sono risultati compresi tra 2,5 e 4microg/g di campione secco.

Le concentrazioni di alcuni metalli pesanti quali Cd, Cr e Pb si presentano al di sotto dei limiti di rivelabilità dello strumento (0,01microg/g) in tutti i campioni analizzati.

Nel complesso, i campioni di bucce e semi caratterizzati si sono dimostrati una ricca fonte di minerali potenzialmente recuperabili e impiegabili nella produzione di integratori alimentari.

La ricerca per la caratterizzazione degli scarti di lavorazione del pomodoro è proseguita con l'analisi delle proprietà antiossidanti di estratti metanolici ottenuti sia partendo da semi interi di pomodoro sia da semi privati della loro frazione lipidica, ovvero delipidizzati con trattamento Soxhlet. Su tali estratti è stato determinato il contenuto in polifenoli totali con il metodo Folin-Ciocalteu e la capacità antiossidante con il sistema Photochem<sup>®</sup> in modalità ACL (Tabella 9).

	<b>Polifenoli Totali</b> mg/g ac.gallico eq	<b>Capacità Antiossidante</b> mmol/g Trolox eq
Semi Interi 6/8	403,30 ± 29,20	9,12 ± 0,26
Semi Interi 3/9	430,78 ± 26,06	10,21 ± 0,51
Delipidizzati 6/8	254,09 ± 11,95	6,56 ± 0,19
Delipidizzati 3/9	211,25 ± 2,12	5,41 ± 0,13

**Tabella 9.** Contenuto in polifenoli totali (valori espressi in mg ± ds di acido gallico equivalenti per g di campione) e capacità antiossidante misurata con sistema Photochem<sup>®</sup> in modalità ACL (valori espressi in mmol ± ds di Trolox equivalenti per g di campione) in estratti da semi di pomodoro interi e dopo trattamento con Soxhlet (delipidizzati)

Gli estratti ottenuti dai semi di pomodoro hanno dimostrato un elevato contenuto in polifenoli totali, superiore a 400mg di acido gallico equivalenti per grammo di semi interi e superiore a 200mg per grammo di semi delipidizzati, e una buona capacità antiossidante, superiore a 9mmol di Trolox equivalenti per grammo di semi interi e superiore a 5mmol per grammo di semi delipidizzati. I valori di polifenoli totali negli estratti ottenuti da semi interi sono risultati essere nell'ordine del doppio rispetto ai valori negli estratti ottenuti da semi privati della loro frazione lipidica. Lo stesso andamento segue la capacità antiossidante per la cui misura è stata scelta la modalità ACL del sistema Photochem<sup>®</sup> dato che questa mette in evidenza la capacità antiossidante della componente liposolubile. Questo fa supporre una possibile correlazione tra i due dati.

Alla luce di questi risultati è stata determinata la capacità antiossidante anche della frazione lipidica estratta mediante Soxhlet dai semi interi (Tabella 10): questa si è mostrata essere pari a circa 4mmol di Trolox equivalenti per g di campione. Tuttavia non è direttamente confrontabile con la capacità antiossidante misurata nei precedenti estratti poiché la metodica di estrazione prevede l'impiego di solventi diversi.

Non è stato inoltre possibile misurare il contenuto in polifenoli totali nell'estratto lipidico poiché l'estrazione con Soxhlet prevede l'impiego di esano per la dissoluzione dell'estratto lipidico per cui l'estratto così disciolto risulta immiscibile con l'ambiente metanolico del metodo Folin-Ciocalteu.

	<b>Capacità Antiossidante</b> mmol/g Trolox eq
Estratto lipidico 6/8	4,00 ± 0,01
Estratto lipidico 3/9	4,54 ± 0,72

**Tabella 10.** Capacità antiossidante misurata con sistema Photochem® in modalità ACL (valori espressi in mmol ± ds di Trolox equivalenti per g di campione) in estratti da semi interi mediante Soxhlet

Vista la notevole attività antiossidante dell'olio estratto da semi di pomodoro è proponibile uno sviluppo di questo prodotto come alimento funzionale. In generale, un alimento può essere considerato funzionale se dimostra in maniera soddisfacente di avere effetti positivi su una o più funzioni specifiche dell'organismo, che vadano oltre gli effetti nutrizionali normali, in modo tale che sia rilevante per il miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o per la riduzione del rischio di malattia<sup>[92]</sup>.

A proseguimento della caratterizzazione della frazione lipidica isolata dai semi di pomodoro è stato studiato il profilo in acidi grassi mediante gascromatografia. In Tabella 11 sono riportate le percentuali dei diversi acidi grassi identificati nei due campioni di semi. A titolo di esempio in figura 24 è riportato un cromatogramma ottenuto, mentre la figura 25 mostra lo stesso profilo ma ingrandito per evidenziare i picchi corrispondenti agli acidi grassi presenti in quantità minori.

		Semi 6/8	Semi 3/9
Acidi	Linoleico C18:2	33,29	34,74
Grassi	Oleico C18:1	21,58	20,66
Insaturi	Palmitoleico C16:1	0,13	0,16
	Palmitico C16:0	9,26	9,30
Acidi	Stearico C18:0	4,82	4,68
Grassi	Miristico C14:0	0,07	0,08
Saturi	Arachico C20:0	0,13	0,06

**Tabella 11.** Ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da semi di pomodoro. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Gli acidi grassi insaturi rappresentano più del 50% della composizione dell'olio estratto dai semi di pomodoro mediante Soxhlet. Tra questi il più abbondante è l'acido linoleico che supera il 30%; è un acido grasso polinsaturo che fa parte degli acidi grassi essenziali, ovvero quegli acidi grassi che l'organismo umano non è in grado di sintetizzare ma devono essere introdotti con la dieta.

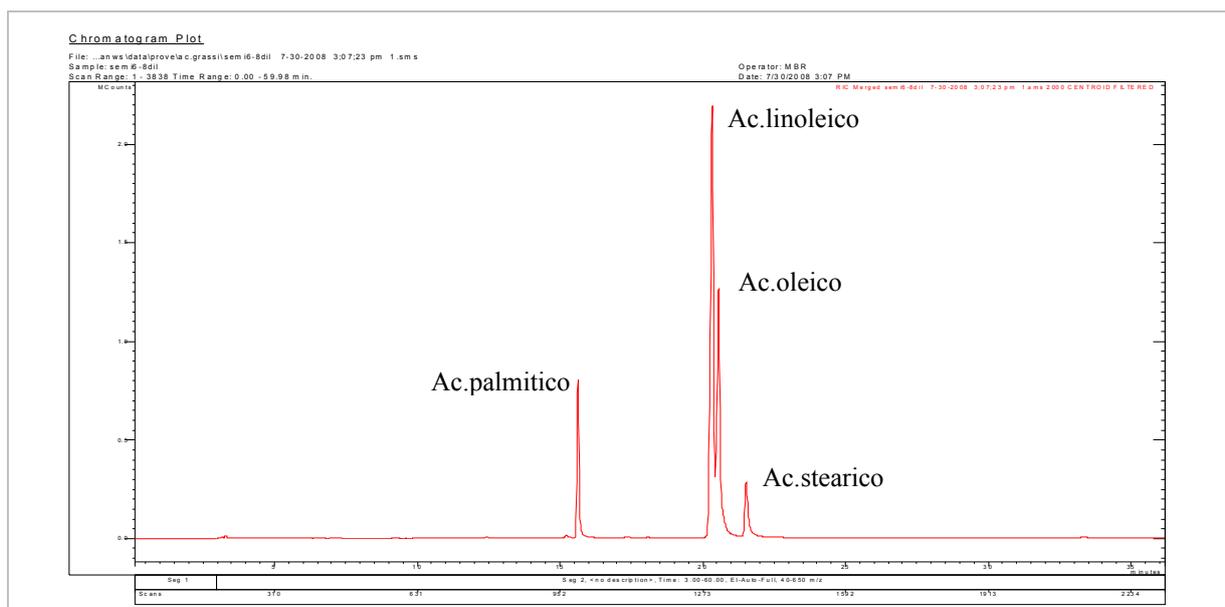
L'acido linoleico come acido grasso essenziale svolge diverse funzioni tra le quali: costituente delle membrane biologiche in quanto costituente dei fosfolipidi, precursore di mediatori chimici quali gli eicosanoidi e interviene nella regolazione dei lipidi ematici soprattutto il colesterolo.

Nell'olio di semi di pomodoro caratterizzato, l'acido linoleico è seguito con un 20% circa dall'acido oleico, costituente principale della maggior parte degli oli di origine vegetale. Tra gli acidi grassi saturi identificati quello presente a maggiori concentrazioni è l'acido palmitico che rappresenta circa il 9%; il palmitico è il primo acido grasso prodotto dall'uomo durante la lipogenesi partendo dal quale vengono sintetizzati acidi grassi a catena più lunga<sup>[8]</sup>.

Segue l'acido stearico con percentuali di poco inferiori al 5%. Sono stati inoltre identificati in basse concentrazioni l'acido palmitoleico, monoinsaturo, e gli acidi miristico e arachico, entrambi saturi.

La stessa composizione è confermata da dati di letteratura<sup>[93,94]</sup>. E' inoltre possibile affermare che tale composizione risulta molto simile a quella dell'olio di semi di soia<sup>[95]</sup>.

Dato il notevole contenuto nell'olio di semi di pomodoro di acidi grassi insaturi, soprattutto di acido linoleico, e date le notevoli proprietà di quest'ultimo è ipotizzabile un recupero o un impiego di un olio di semi di pomodoro come alimento dietetico, definito come un prodotto che risponda alle esigenze nutrizionali particolari delle specifiche categorie di persone.



**Figura 24.** Profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di un olio di semi di pomodoro estratto mediante Soxhlet



colesterolo LDL e pertanto anche il rischio di sviluppare la malattia. Gli acidi grassi insaturi, come l'acido linoleico, o gli acidi grassi monoinsaturi, sembrano addirittura incrementare i livelli di colesterolo HDL, che favorisce l'eliminazione dei trigliceridi dal flusso sanguigno. Sta crescendo inoltre l'interesse nei confronti degli effetti benefici degli acidi grassi polinsaturi  $\omega$ -3 a lunga catena presenti negli oli di pesce. Esistono prove a sostegno dell'ipotesi che questi acidi grassi proteggano dalle patologie cardiache a esito fatale. Negli ultimi anni, i potenziali effetti benefici dell'acido linoleico hanno risvegliato grande interesse e si accumulano le evidenze a favore di un possibile ruolo di questo acido grasso nella prevenzione del progresso delle malattie cardiovascolari.

È stata inoltre ipotizzata una relazione tra l'assunzione di acidi grassi insaturi e il decorso di numerosi altri disturbi; gli acidi grassi introdotti con la dieta sembrano influenzare molti altri percorsi metabolici, compresi quelli legati al controllo della glicemia; gli acidi grassi insaturi potrebbero anche essere associati a una diminuzione del rischio di sviluppare alcune forme neoplastiche, sebbene le prove a sostegno di tale ipotesi siano attualmente ritenute non sufficienti a giustificare raccomandazioni nutrizionali da parte di organismi autorevoli. Molte condizioni infiammatorie, come l'asma, il morbo di Crohn e l'artrite, potrebbero teoricamente essere alleviate da modificazioni della dieta. La composizione in acidi grassi delle membrane cellulari può essere alterata grazie al consumo di acidi grassi polinsaturi  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, con diminuzione dell'attività infiammatoria. Tuttavia non è ancora chiaro se tale effetto si accompagni a una riduzione significativa dei sintomi clinici<sup>[96]</sup>.

Viste le numerose proprietà benefiche degli acidi grassi insaturi, è comprensibile l'importanza di una giusta conservazione di tali lipidi. La presenza dei doppi legami rende un acido grasso molto più soggetto ad alterazione se esposto a luce, ossigeno e calore. L'alterazione principale è l'ossidazione che comporta la produzione di composti indesiderabili quali idroperossidi e aldeidi, responsabili di odori e sapori sgradevoli nell'alimento ma anche di effetti dannosi sull'organismo.

Un importante fattore per la conservazione dei lipidi è la presenza di una giusta quantità di antiossidanti naturali nell'alimento, che impedisce la formazione di prodotti di ossidazione. Più in generale gli antiossidanti naturali contenuti in un alimento inibiscono fenomeni di deterioramento quali l'irrancidimento dei lipidi ma anche la formazione di radicali liberi. Se da una parte gli antiossidanti naturali svolgono il ruolo di ritardare o prevenire significativamente l'ossidazione di un substrato ossidabile, rappresentato non solo dai lipidi, migliorando la shelf-life dell'alimento e mantenendone la qualità nutrizionale ed organolettica nel tempo, svolgono anche un effetto protettivo all'interno dell'organismo che consuma tali alimenti, nei confronti del danno cellulare determinato dai radicali liberi su biomolecole quali lipidi, proteine e DNA.

L'interesse per lo sviluppo di metodi analitici per la determinazione dei suddetti composti è crescente principalmente per il ruolo positivo che essi possono avere in molte attività biologiche. Per questo motivo durante il periodo di ricerca svolto presso il Dipartimento di Nutrizione e Bromatologia dell'Università di Granada (Spagna), l'attenzione è stata rivolta verso la messa a punto di metodi per la misura dell'attività antiossidante in matrici alimentari, chimicamente differenti poiché generano differenti specie radicaliche o hanno differenti molecole-target.

Ogni antiossidante è in grado di espletare la sua attività secondo meccanismi diversi e con una diversa efficienza a seconda della sua struttura chimica e dell'ambiente in cui si trova. Il livello dei singoli antiossidanti in matrici alimentari non riflette necessariamente la loro capacità antiossidante totale, ma esistono interazioni di sinergismo e antagonismo tra le diverse molecole presenti.

Per questo motivo una valutazione integrata del potenziale antiossidante può rivelarsi più importante della concentrazione dei singoli antiossidanti. Da qui l'esigenza di valutare la capacità antiossidante totale di un alimento o di un suo estratto, cioè la capacità di preservare un substrato ossidabile, inattivare una specie radicalica o ridurre un ossidante.

Sulla base delle reazioni chimiche coinvolte, i principali saggi per la determinazione della capacità antiossidante possono essere suddivisi in due categorie: saggi basati sul trasferimento di un singolo elettrone (ET, electron transfer), e saggi basati sul trasferimento di un atomo di idrogeno (HAT, hydrogen atom transfer). I primi misurano la capacità di un antiossidante di ridurre un ossidante il quale, in seguito alla reazione, subisce un cambiamento di colore. Tra questi vi sono, ad esempio, il metodo ABTS ed il metodo FRAP.

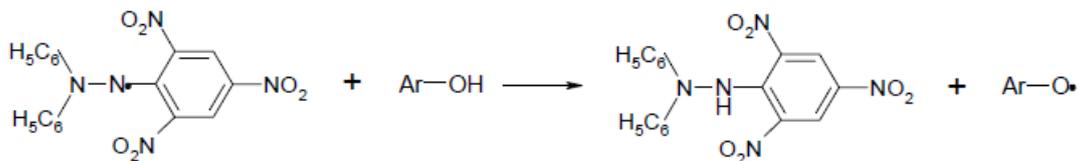
I metodi basati sul trasferimento di un atomo di idrogeno invece, solitamente sfruttano un generatore sintetico di radicali liberi, una sonda molecolare ossidabile, ed un antiossidante. Tra questi vi sono, ad esempio, il metodo ORAC ed il metodo TRAP. In ogni caso tutte le metodologie misurano la capacità di scavenger degli antiossidanti nei confronti dei radicali e non la loro azione preventiva volta ad impedirne la formazione.

I metodi messi a punto nella presente ricerca sono tutti basati sul trasferimento di un singolo elettrone, misurando così la capacità di riduzione di una specie radicalica generata<sup>[71]</sup>.

Per la messa a punto di tali metodi sono stati presi in considerazione estratti metanolici da diverse varietà di pomodoro fornite da un'azienda locale. Come standard di riferimento è stato utilizzato Trolox in tutti i saggi permettendo così un più rapido confronto tra i risultati.

Il primo saggio messo a punto è il metodo DPPH. Il radicale DPPH<sup>•</sup> è uno dei più stabili radicali dell'azoto in commercio che presenta un massimo di assorbanza nell'UV-Vis. Questa metodica consente di valutare l'attività riducente di molecole antiossidanti nei confronti del DPPH<sup>•</sup>: durante

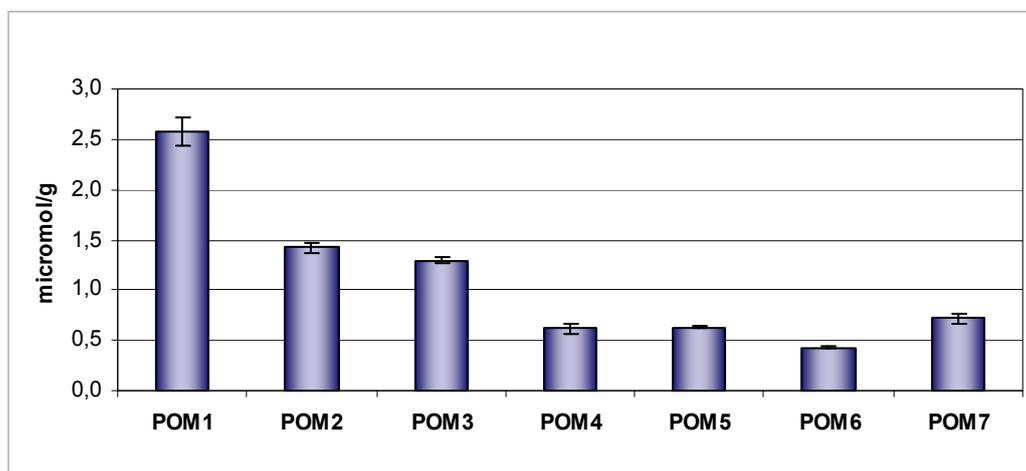
la riduzione da parte degli antiossidanti la soluzione si decolora, il radicale si trasforma nell'idrazina corrispondente (Figura 26)<sup>[87]</sup>.



**Figura 26.** Reazione del DPPH' con un fenolo generico

Il decremento dell'assorbanza è proporzionale alla concentrazione di antiossidanti negli estratti analizzati. Il punto finale della reazione si raggiunge quando l'assorbanza rimane costante.

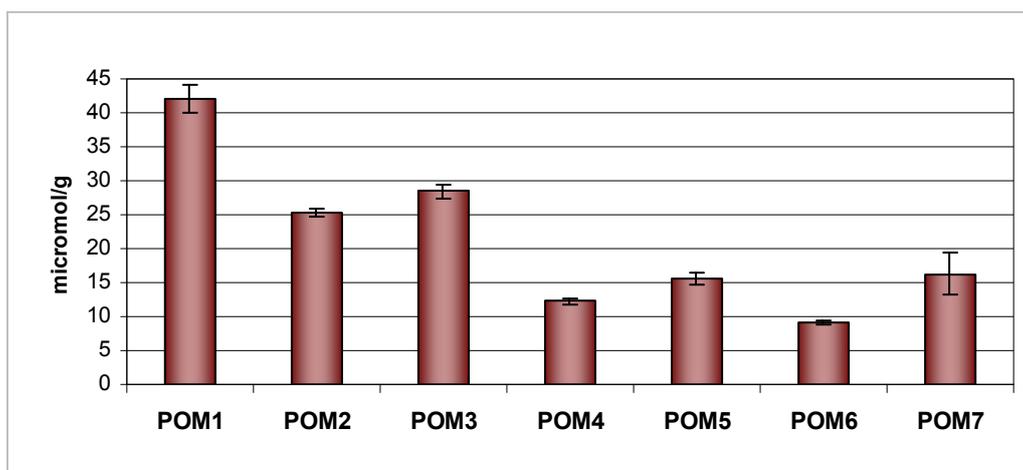
La capacità antiossidante nei campioni analizzati (Figura 27) è risultata compresa tra 0,61 e 2,59micromol di Trolox equivalenti per grammo di campione fresco. I primi tre campioni mostrano una capacità antiossidante tendenzialmente superiore rispetto agli altri campioni, compresa tra 1,29 e 2,59micromol/g di Trolox equivalenti indicando migliori capacità di inibizione del radicale DPPH'. Questo potrebbe essere legato al fatto che gli estratti POM1-POM3 sono ottenuti da pomodori di varietà a frutto piccolo, in cui le componenti funzionali potrebbero risultare più concentrate. Gli estratti POM4-POM7 sono invece relativi a varietà a frutti più grandi generalmente impiegati nel consumo in insalata, per cui il grado inferiore di maturazione potrebbe essere motivo di una presenza minore in composti antiossidanti reattivi nei confronti del radicale DPPH'.



**Figura 27.** Capacità antiossidante in estratti metanolici di 7 varietà spagnole di pomodoro misurata con il metodo DPPH (valori espressi in micromol di Trolox eq per grammo di campione)

Gli stessi estratti sono stati analizzati mediante il metodo ABTS. Questo è un metodo rapido che permette la misura della capacità antiossidante sia di antiossidanti lipofili che idrofili data la solubilità del radicale impiegato sia in solventi acquosi che organici<sup>[97]</sup>.

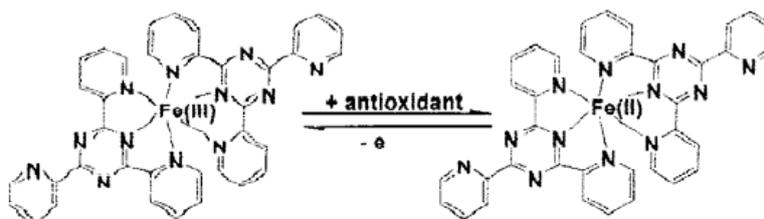
I risultati relativi a questo test sono mostrati in figura 28 e dimostrano un andamento del tutto simile al test precedente. Gli estratti hanno dimostrato una capacità antiossidante compresa tra 9,19micromol/g di Trolox equivalenti relativa all'estratto POM6 e 42,04micromol/g dell'estratto POM1. Tra gli estratti da varietà a frutto piccolo POM1-POM3, sia con il metodo DPPH che con il test ABTS, è l'estratto POM1 a mostrare la maggior capacità antiossidante dimostrando la miglior reattività nei confronti dei due radicali impiegati. In entrambi i test gli estratti POM1 e POM6 hanno mostrato rispettivamente la capacità antiossidante più alta e più bassa rispetto agli altri estratti presi in considerazione.



**Figura 28.** Capacità antiossidante in estratti metanolici di 7 varietà spagnole di pomodoro misurata con il metodo ABTS (valori espressi in micromol di Trolox eq per grammo di campione)

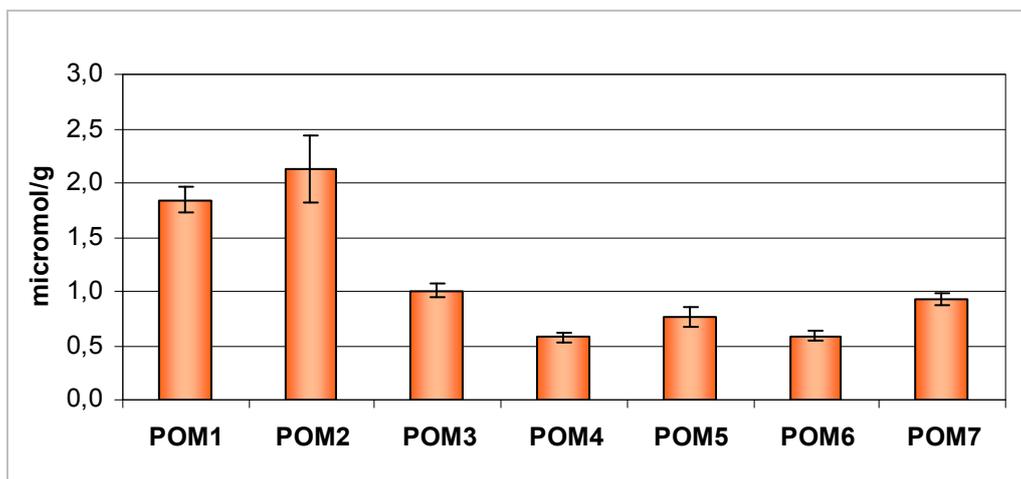
Con questo saggio si può inoltre osservare come i campioni evidenzino una capacità antiossidante, in termini assoluti, maggiore rispetto a quella osservata con il saggio DPPH. Bisogna comunque considerare che i radicali utilizzati nei due saggi sono diversi. Probabilmente quindi i composti antiossidanti presenti nei campioni risultano essere maggiormente reattivi nei confronti del radicale ABTS<sup>•</sup> piuttosto che nei confronti del radicale DPPH<sup>•</sup>.

La ricerca è proseguita con la messa a punto del metodo FRAP che misura l'abilità di riduzione a pH bassi del complesso ferrico 2,4,6-tripiridyl-s-triazine ( $Fe^{3+}$ -TPTZ) alla forma ferrosa ( $Fe^{2+}$ -TPTZ) da parte degli antiossidanti presenti nell'estratto (Figura 29). Il forza di riduzione sembra essere correlata al grado di idrossilazione e coniugazione dei composti fenolici<sup>[97]</sup>.



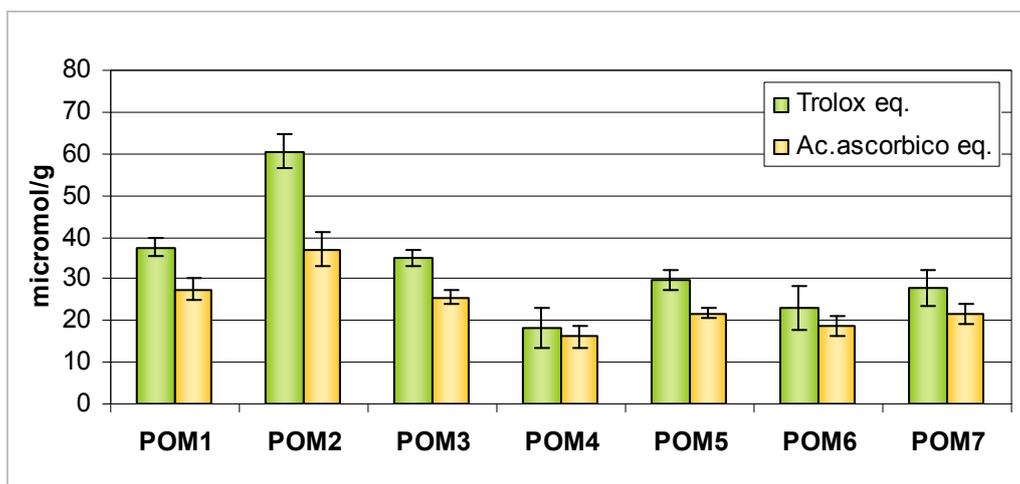
**Figura 29.** Reazione di riduzione del complesso Fe<sup>3+</sup>-TPTZ alla base del metodo FRAP

I risultati (Figura 30) mostrano valori compresi tra 0,58micromol/g di Trolox equivalenti dell'estratto POM4 e 2,12micromol/g relativo all'estratto POM2. Tra gli estratti da varietà a frutto piccolo POM1-POM3, è l'estratto POM2 a mostrare una maggior capacità riducente nei confronti del complesso ferrico. Ancora una volta gli estratti da varietà a frutto grande POM4-POM7 mostrano basse capacità antiossidanti, inferiori a 1micromol/g di Trolox eq.



**Figura 30.** Capacità antiossidante in estratti metanolici di 7 varietà spagnole di pomodoro misurata con il metodo FRAP (valori espressi in micromol di Trolox eq per grammo di campione)

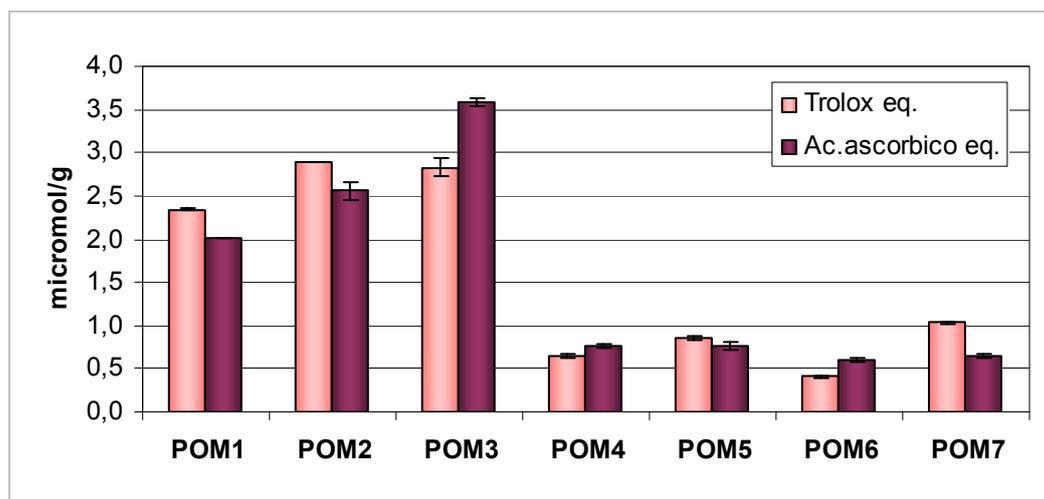
Proseguendo la ricerca è stato messo a punto il metodo DMPD che prevede l'impiego di un composto che assume un'intensa colorazione rossa in ambiente acido e in presenza di un opportuno ossidante. Questo metodo è rapido e assicura sensibilità e riproducibilità nella misura dell'attività antiossidante prevalentemente di composti idrofilici. Dati di letteratura indicano la possibilità di utilizzare con questo metodo due standard di riferimento, il Trolox, già utilizzato nei saggi precedenti, e l'acido ascorbico permettendo così una valutazione sia a confronto con uno standard lipofilo sia con uno standard idrofilo. Questi due standard mostrano differenti velocità di reazione nei confronti del radicale DMPD': mentre il decremento dell'assorbanza indotto dall'acido ascorbico è pressoché immediato, il Trolox richiede qualche minuto per esprimere la sua azione antiossidante<sup>[89]</sup>.



**Figura 31.** Capacità antiossidante in estratti metanolici di 7 varietà spagnole di pomodoro misurata con il metodo DMPD (valori espressi in micromol di Trolox eq e micromol di acido ascorbico eq per grammo di campione)

I valori di capacità antiossidante ottenuti con il metodo DMPD, riportati nella figura 31, sono compresi tra 18,16 e 60,52micromol/g Trolox equivalenti e tra 16,05 e 36,90micromol/g acido ascorbico equivalenti. L'andamento di tali valori risulta simile nei confronti di entrambi gli standard utilizzati. L'estratto POM2 mostra la maggior attività antiossidante sia in Trolox equivalenti (60,52micromol/g) che in acido ascorbico equivalenti (36,90micromol/g). La minor reattività nei confronti del radicale DMPD<sup>•</sup> è dimostrata dall'estratto POM4 con valori inferiori a 20micromol/g sia contro Trolox che contro acido ascorbico.

L'ultimo metodo utilizzato per la valutazione complessiva dell'attività antiossidante degli estratti di pomodoro è il sistema Photochem<sup>®</sup> che nelle due modalità ACL e ACW prevede l'uso degli stessi standard di riferimento utilizzati dal metodo DMPD. E' un metodo basato sulla fotochemiluminescenza in grado di valutare il potere dei campioni in esame di contrastare il radicale anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ) una delle specie ossigeno reattive (ROS) più dannose per l'uomo. Dai risultati ottenuti con questa analisi (Figura 32) risulta più evidente la differenza tra gli estratti derivanti da varietà di pomodori a frutto piccolo (POM1-POM3) ed estratti derivanti da varietà da insalata a frutti grandi (POM4-POM7). Si nota inoltre una corrispondenza tra i risultati ottenuti con i due diversi protocolli, probabilmente dovuta a un sostanziale equilibrio tra la capacità antiossidante della componente liposolubile e di quella idrosolubile.



**Figura 32.** Determinazione della capacità antiossidante in estratti metanolici di 7 varietà spagnole di pomodoro con sistema Photochem® in modalità ACL (valori espressi in micromol di Trolox equivalenti per g di campione) e in modalità ACW (valori espressi in micromol di acido ascorbico equivalenti per g di campione)

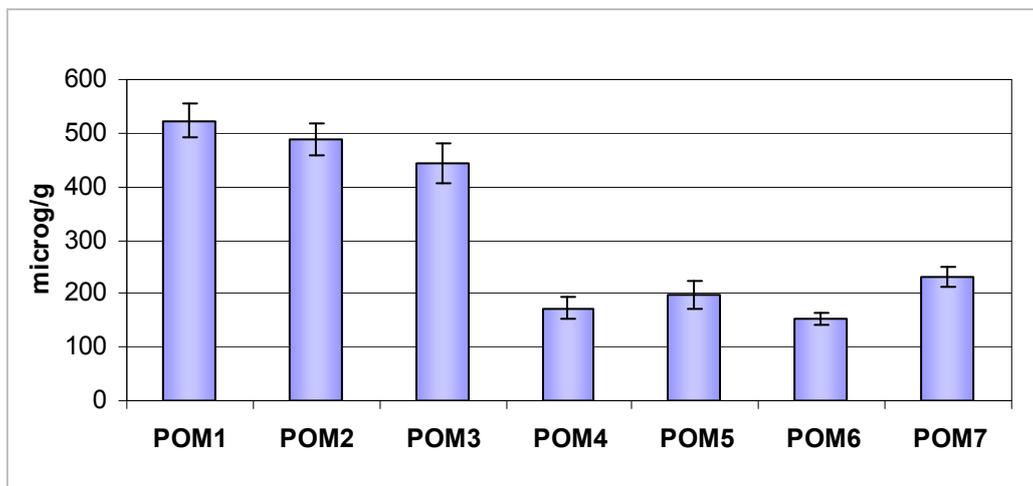
La tabella 12 riporta tutti i valori di capacità antiossidante ottenuti con i diversi metodi. Guardando i dati nel complesso si può affermare che con il metodo DPPH i campioni analizzati hanno dimostrato una capacità antiossidante, in termini assoluti, confrontabile con quella misurata con il metodo FRAP e con il metodo Photochem®, indipendentemente dal protocollo.

La capacità antiossidante dei campioni analizzati con il metodo DMPD risulta compresa in un range di valori più alti e più confrontabili, come ordine di grandezza, con quelli ottenuti con il metodo ABTS. Questo porta a ipotizzare la presenza negli estratti di pomodoro analizzati di composti più reattivi nei confronti dei radicali DMPD<sup>•</sup> e ABTS<sup>•</sup> rispetto ai radicali coinvolti negli altri saggi.

	DPPH	ABTS	FRAP	DMPD		PHOTOCHEM®	
				Trolox eq.	Ac. ascorbico eq.	Trolox eq.	Ac. ascorbico eq.
POM1	2,59 ± 0,14	42,04 ± 1,96	1,84 ± 0,12	37,44 ± 2,17	27,53 ± 2,43	2,34 ± 0,02	2,01 ± 0,00
POM2	1,42 ± 0,05	25,22 ± 0,64	2,12 ± 0,31	60,52 ± 4,12	36,90 ± 4,06	2,89 ± 0,00	2,56 ± 0,10
POM3	1,29 ± 0,03	28,40 ± 1,05	1,01 ± 0,06	35,05 ± 1,82	25,55 ± 1,79	2,83 ± 0,11	3,58 ± 0,05
POM4	0,61 ± 0,05	12,27 ± 0,49	0,58 ± 0,04	18,16 ± 4,61	16,05 ± 2,45	0,65 ± 0,02	0,77 ± 0,03
POM5	0,63 ± 0,02	15,55 ± 0,78	0,76 ± 0,09	29,76 ± 2,37	21,79 ± 1,27	0,86 ± 0,01	0,76 ± 0,05
POM6	0,43 ± 0,01	9,19 ± 0,34	0,59 ± 0,04	22,94 ± 5,18	18,66 ± 2,51	0,41 ± 0,01	0,60 ± 0,02
POM7	0,71 ± 0,05	16,31 ± 3,08	0,93 ± 0,05	27,93 ± 4,37	21,60 ± 2,49	1,04 ± 0,01	0,65 ± 0,02

**Tabella 12.** Capacità antiossidante in estratti metanolici di 7 varietà spagnole di pomodoro misurata con i metodi DPPH, ABTS, FRAP (valori espressi in micromol ± ds di Trolox eq per g di campione) e DMPD e Photochem® (valori espressi in micromol ± ds di Trolox eq e micromol ± ds di acido ascorbico eq per grammo di campione)

A completamento dello studio delle proprietà antiossidanti dei campioni precedentemente analizzati, è stato misurato il contenuto in polifenoli totali, un'ampia classe di composti naturali largamente presenti matrici vegetali come il pomodoro e dalle spiccate proprietà antiossidanti. Il metodo di Folin-Ciocalteu per la misura di tali composti rientra nei saggi basati sul trasferimento di un singolo elettrone (ET, electron transfer); i composti fenolici reagiscono con il reattivo di Folin-Ciocalteu in condizioni basiche che favoriscono la dissociazione del protone fenolico formando l'anione fenolato che è in grado di ridurre il reattivo<sup>[71]</sup>.



**Figura 33.** Determinazione dei polifenoli totali (valori espressi in microg di acido gallico equivalenti per g di campione) in estratti metanolici di 7 varietà spagnole di pomodoro

Gli estratti da POM1 a POM3 mostrano contenuti in polifenoli totali compresi tra 444,44microg/g e 523,11microg/g (Figura 33). L'elevata capacità antiossidante di questi tre estratti misurata precedentemente sembra corrispondere ad elevati contenuti in polifenoli. Il campione che ha mostrato il minor contenuto in polifenoli è l'estratto POM6 con 153,34microg/g di acido gallico equivalenti. La differenza di contenuti degli estratti da POM1 a POM3 a confronto con gli estratti da POM4 a POM7 può ancora una volta essere collegata alla diversità delle varietà, alla grandezza dei frutti e al loro grado di maturazione.

La corrispondenza che si nota nell'andamento dei contenuti in polifenoli totali e delle capacità antiossidanti nei diversi campioni analizzati è confermata da dati di letteratura che confermano l'esistenza di una correlazione tra i contenuti in fenoli totali ottenuti con il metodo Folin-Ciocalteu e l'attività antiossidante misurata con i saggi FRAP, ABTS e DPPH<sup>[71]</sup>.

Per verificare l'effettiva esistenza di una correlazione tra i risultati ottenuti in questo lavoro, è stata eseguita un'analisi statistica di tutti i dati ottenuti e riguardanti la misura dell'attività antiossidante e dei polifenoli totali.

		<b>Folin</b>	<b>ABTS</b>	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>	<b>DMPD</b>	<b>ACL</b>	<b>ACW</b>
<b>Folin</b>	Correlación de Pearson	<b>1</b>	<b>,918(**)</b>	<b>,887(**)</b>	<b>,892(**)</b>	<b>,796(*)</b>	<b>,961(**)</b>	<b>,843(*)</b>
	Sig. (bilateral)		,004	,008	,007	,032	,001	,017
	N	7	7	7	7	7	7	7
<b>ABTS</b>	Correlación de Pearson	<b>,918(**)</b>	<b>1</b>	<b>,980(**)</b>	<b>,769(*)</b>	<b>,545</b>	<b>,806(*)</b>	<b>,688</b>
	Sig. (bilateral)	,004		,000	,043	,206	,029	,087
	N	7	7	7	7	7	7	7
<b>DPPH</b>	Correlación de Pearson	<b>,887(**)</b>	<b>,980(**)</b>	<b>1</b>	<b>,802(*)</b>	<b>,534</b>	<b>,737</b>	<b>,588</b>
	Sig. (bilateral)	,008	,000		,030	,217	,059	,165
	N	7	7	7	7	7	7	7
<b>FRAP</b>	Correlación de Pearson	<b>,892(**)</b>	<b>,769(*)</b>	<b>,802(*)</b>	<b>1</b>	<b>,904(**)</b>	<b>,810(*)</b>	<b>,575</b>
	Sig. (bilateral)	,007	,043	,030		,005	,027	,177
	N	7	7	7	7	7	7	7
<b>DMPD</b>	Correlación de Pearson	<b>,796(*)</b>	<b>,545</b>	<b>,534</b>	<b>,904(**)</b>	<b>1</b>	<b>,820(*)</b>	<b>,641</b>
	Sig. (bilateral)	,032	,206	,217	,005		,024	,121
	N	7	7	7	7	7	7	7
<b>ACL</b>	Correlación de Pearson	<b>,961(**)</b>	<b>,806(*)</b>	<b>,737</b>	<b>,810(*)</b>	<b>,820(*)</b>	<b>1</b>	<b>,939(**)</b>
	Sig. (bilateral)	,001	,029	,059	,027	,024		,002
	N	7	7	7	7	7	7	7
<b>ACW</b>	Correlación de Pearson	<b>,843(*)</b>	<b>,688</b>	<b>,588</b>	<b>,575</b>	<b>,641</b>	<b>,939(**)</b>	<b>1</b>
	Sig. (bilateral)	,017	,087	,165	,177	,121	,002	
	N	7	7	7	7	7	7	7

\*\* La correlazione è significativa al livello 0,01 (bilaterale).

\* La correlazione è significativa al livello 0,05 (bilaterale).

**Tabella 13.** Analisi statistica dei risultati ottenuti dalla misura dell'attività antiossidante con diversi metodi (ABTS, DPPH, FRAP, DMPD, Photochem<sup>®</sup> in modalità ACL e ACW) e dalla determinazione dei polifenoli totali con metodo Folin-Ciocalteu

Come mostrato in tabella 13, l'elaborazione statistica dei dati ottenuti porta a coefficienti di correlazione mediamente elevati, dimostrando una buona correlazione tra i saggi applicati. Sono compresi tra lo 0,961 del confronto tra Folin-Ciocalteu e Photochem<sup>®</sup> in ACL e lo 0,796 relativo al confronto di Folin-Ciocalteu e DMPD. Di tutta la tabella la parte significativa è la prima riga selezionata in alto, relativa alle correlazioni tra i diversi metodi per la misura della capacità antiossidante e il metodo Folin-Ciocalteu; non ha significato infatti confrontare tra loro i diversi metodi, avendo già spiegato in precedenza le notevoli differenze tra un metodo e l'altro quali per esempio il radicale coinvolto o le condizioni di pH.

Le metodologie messe a punto per lo studio delle proprietà antiossidanti del pomodoro possono trovare applicazione non solo nella caratterizzazione della materia prima e del prodotto lavorato ma anche nella valorizzazione di eventuali frazioni estratte dagli scarti di lavorazione al fine di identificare in esse componenti di qualità da valorizzare per le loro peculiarità antiossidanti e potenzialmente riutilizzabili.

In una matrice come il pomodoro, è certamente marker di qualità il contenuto in licopene, il carotenoide antiossidante maggiormente presente in questo alimento.

Il licopene è ritenuto essere il più potente tra i seguenti antiossidanti:  $\alpha$ -tocoferolo,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina,  $\beta$ -carotene, luteina; è inoltre un ottimo scavenger dei radicali dell'ossigeno, più potente rispetto ai maggiori carotenoidi introdotti con la dieta<sup>[98,99]</sup>.

Data la crescente popolarità del licopene in integratori alimentari, il mondo della ricerca è interessato a sviluppare ingredienti e prodotti arricchiti in licopene derivante da fonti naturali; il processo di recupero presuppone la misura di tale molecola nella materia prima, nei prodotti intermedi e nei prodotti finali<sup>[100]</sup>.

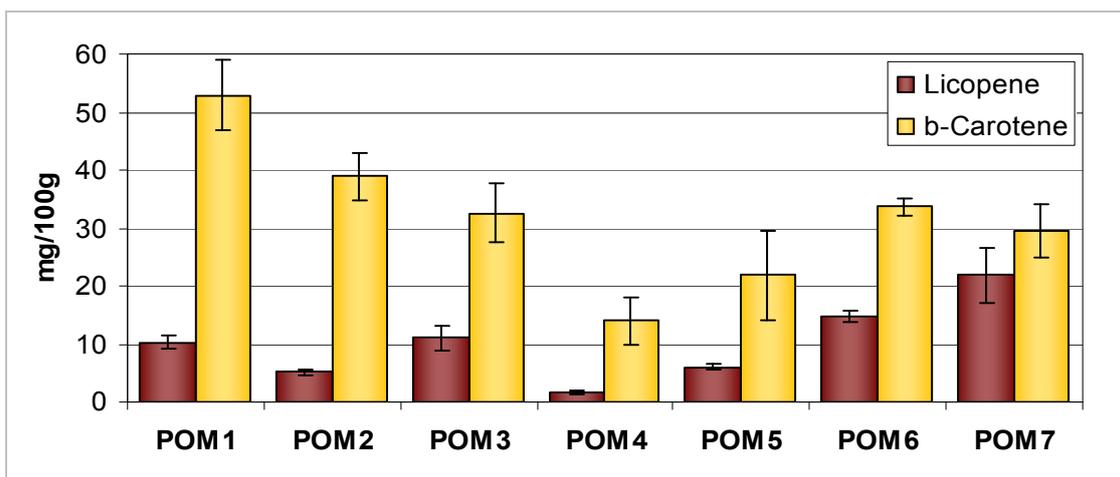
Per questo motivo, a proseguimento della ricerca, l'attenzione è stata puntata verso i singoli antiossidanti presenti nel pomodoro, sviluppando un metodo HPLC per la quantificazione del licopene. Tale metodo ha permesso altresì di identificare inoltre il  $\beta$ -carotene, permettendone la contemporanea quantificazione. Il metodo sviluppato si è dimostrato semplice e rapido; la tabella 14 riporta le caratteristiche di ripetibilità, LOD e LOQ, recupero e linearità.

	Licopene	$\beta$ -Carotene
<b>Ripetibilità intradia (RSD%)</b>	2,48	3,55
<b>Ripetibilità interdia (RSD%)</b>	0,06	0,62
<b>LOD (mg/100g)</b>	9,28E-05	9,89E-03
<b>LOQ (mg/100g)</b>	3,09E-04	3,30E-02
<b>Recupero %</b>	96,37	100,63
<b>Linearità (<math>r^2=0,999</math>) <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	0,5-100	2,5-50

**Tabella 14.** Caratteristiche del metodo HPLC per la determinazione di licopene e  $\beta$ -carotene

Il metodo ha dimostrato una buona ripetibilità ottenuta ripetendo l'analisi di uno stesso estratto per sei volte nello stesso giorno (*intradia*) e in giorni successivi (*interdia*). Anche per il calcolo dei limiti di rilevabilità e di quantificazione l'iniezione dello stesso estratto è stata ripetuta sei volte.

Le alte percentuali di recupero confermano l'efficienza e la selettività del metodo estrattivo applicato per isolare questi due carotenoidi. Infine, le rette di calibrazione di entrambi gli standard hanno dimostrato un elevato coefficiente di correlazione.



**Figura 34.** Contenuto in licopene e β-carotene in 7 varietà spagnole di pomodoro (valori espressi in mg/100g di campione fresco)

	Licopene	β-Carotene
<b>POM1</b>	10,30 ± 1,20	52,92 ± 6,13
<b>POM2</b>	5,08 ± 0,33	38,97 ± 4,06
<b>POM3</b>	10,99 ± 2,10	32,61 ± 5,01
<b>POM4</b>	1,76 ± 0,34	14,07 ± 4,12
<b>POM5</b>	6,01 ± 0,46	21,82 ± 7,83
<b>POM6</b>	14,77 ± 0,99	33,64 ± 1,56
<b>POM7</b>	21,83 ± 4,82	29,51 ± 4,69

**Tabella 15.** Contenuto in licopene e β-carotene in 7 varietà spagnole di pomodoro (valori espressi in mg/100g ± ds di campione fresco)

I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni (Figura 34 e Tabella 15) mostrano più alti contenuti in β-carotene che in licopene. Il campione che ha mostrato i maggiori livelli di licopene è POM7 con 21,83mg/100g, seguito da POM6 con 14,77mg/100g. Più scarsi contenuti sono relativi ai campioni POM4, POM2 e POM5 rispettivamente 1,76mg/100g, 5,08mg/100g e 6,01mg/100g. Il più ricco in di β-carotene è POM1 con 52,92mg/100g. POM4 si è rivelato il campione con i più scarsi contenuti anche di β-carotene, con 14,07mg/100g; questo probabilmente è dovuto al fatto che i frutti da cui deriva questo estratto hanno un basso grado di maturazione, che ha impedito la naturale e completa biosintesi dei carotenoidi. L'estratto POM5 deriva dalla stessa varietà di frutti di POM4 ma il grado di maturazione più avanzato dei frutti ha permesso un maggior sviluppo di licopene e β-carotene. Tuttavia non appare evidente una diretta corrispondenza tra i contenuti dei due carotenoidi.

La relativa semplicità e l'efficacia del metodo sviluppato permette una rapida quantificazione dei contenuti in licopene potenzialmente applicabile sia alla materia prima che a prodotti finiti e scarti di produzione. In questo lavoro, il metodo estrattivo è stato ottimizzato sul pomodoro fresco che rappresenta la materia prima della lavorazione industriale e su prodotti finiti quali passata e succo. Per i prodotti di scarti di lavorazione, soprattutto bucce, sarà necessario ottimizzare un apposito sistema di trattamento basandosi su metodi già in fase di studio. A una fase di pretrattamento delle bucce, principalmente disidratazione e macinazione, fa seguito una fase estrattiva. Le tecniche estrattive attualmente oggetto delle ricerche sono estrazioni solido-liquido. Una prima conseguenza negativa dell'impiego di solventi è che il materiale vegetale diventa un rifiuto speciale con aggravii di costi al processo complessivo di produzione di licopene; inoltre, le quantità di solventi utilizzate sono notevoli e i processi successivi di purificazione degli estratti complessi e non sempre completi. Metodi alternativi più recenti prevedono l'impiego di acqua in un particolare estrattore o di CO<sub>2</sub> supercritica che permette il recupero di un oleoresina al 6% in licopene<sup>[101]</sup>. Inoltre un metodo estrattivo con ultrasuoni e microonde è stato recentemente ottimizzato su pomodoro fresco ma in fase di studio perché potenzialmente applicabile anche a scarti di bucce<sup>[102]</sup>. La necessità è quella di sviluppare tecniche efficaci a costi contenuti e applicabili su larga scala a livello industriale.

Il licopene ottenuto da pomodori è autorizzato come colorante alimentare per alimenti e bevande (E160d) dal 1995 (Direttiva 95/45/CE). Non è comunque consentito evidenziare la dicitura "contiene licopene" con l'intento di suggerire eventuali benefici di tipo salutistico. La normativa sui *novel foods* approvata dalla UK's Food Standards Agency nel 2005 fornisce via libera all'uso di licopene negli alimenti fino a 5mg per porzione, considerata la dose utile per avere effetti benefici sulla salute. Prima era considerato nella legislazione sugli additivi unicamente come colorante. La ADI (Acceptable Daily Intake, dose giornaliera ammissibile) è valutata fra 0-0,5 mg/kg dalla JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives). Un parere positivo dell'EFSA (European Food Safety Authority) autorizza l'uso come ingrediente alimentare anche dell'oleoresina di licopene che contiene dal 5 al 15% di licopene ed è ottenuta con un processo di produzione identico a quello usato per l'additivo E160d<sup>[103]</sup>.

Per l'intensità della sua colorazione, il licopene è proposto come colorante per alimenti e bevande. Grazie alle sue proprietà benefiche, il licopene trova un impiego interessante nell'industria alimentare come integratore e viene applicato anche in combinazione con altri carotenoidi quali beta-carotene e luteina. I benefici effetti sulla salute ne fanno prevedere un'applicazione nell'industria farmaceutica. Infine il licopene avendo un effetto nella prevenzione delle cause che portano all'invecchiamento della pelle, può trovare impiego nell'industria cosmetica (es. LICOPEN Canova<sup>®</sup>)<sup>[104]</sup>.

## CONCLUSIONI

L'industria di trasformazione delle produzioni vegetali genera quantità non trascurabili di scarti vegetali di vario genere. Per quanto riguarda gli scarti di lavorazione del pomodoro, si tratta di quantità consistenti attualmente impiegate come mangimi animali o concimi e che costituiscono un costo aggiuntivo per le aziende produttive a causa dei processi di smaltimento. Tuttavia numerosi studi ne evidenziano il valore intrinseco e le potenzialità che potrebbero portare ad una rivalutazione degli scarti da rifiuti a sottoprodotti.

Per questo motivo è stata avviata una ricerca in collaborazione con l'industria che prevede studio, caratterizzazione e ricerca di componenti salutistici e nutrizionali di maggior valore aggiunto ricavabili da uno o più prodotti di scarto ottenuti dalle diverse fasi della trasformazione del pomodoro e proponibili come materie prime o come semilavorati alle industrie alimentari, farmaceutiche e cosmetiche che richiedono prodotti innovativi, con la contemporanea valorizzazione di un sottoprodotto di lavorazione del pomodoro.

Dopo una fase iniziale di caratterizzazione della materia prima (pomodoro da industria) e di prodotti trasformati finiti (passata e succo di pomodoro), la ricerca è proseguita su scarti di bucce e semi prelevati dalla linea di trasformazione industriale di pomodoro e successivamente separati.

Le analisi bromatologiche inizialmente condotte, hanno dimostrato come gli scarti di lavorazione siano una ricca fonte di minerali potenzialmente recuperabili e impiegabili nella produzione di integratori alimentari. I macroelementi più abbondanti sono risultati il calcio nelle bucce e potassio e magnesio nei semi, mentre in entrambi prevalgono i microelementi zinco e ferro.

La ricerca è proseguita con lo studio delle proprietà antiossidanti di semi; i campioni analizzati hanno dimostrato buoni contenuti in polifenoli totali e un'elevata capacità antiossidante. L'olio estratto dai semi di pomodoro ha dimostrato una notevole capacità antiossidante e un elevato contenuto in acidi grassi insaturi, principalmente in acido linoleico, acido grasso polinsaturo essenziale. Queste notevoli proprietà permettono di ipotizzare un recupero o un impiego di un olio di semi di pomodoro sia come alimento funzionale, per un'integrazione benefica e salutare nell'ambito di una dieta complessivamente bilanciata e di uno stile di vita attivo, sia come alimento dietetico, per rispondere alle esigenze nutrizionali particolari di specifiche categorie di persone.

L'importanza degli antiossidanti alimentari è legata al fatto che tali composti sono responsabili sia del mantenimento delle qualità organolettiche e nutrizionali dell'alimento che di diverse attività benefiche per l'organismo. Per una valutazione integrata del potenziale antiossidante del pomodoro sono stati messi a punto presso il Dipartimento di Nutrizione e Bromatologia dell'Università di Granada (Spagna) diversi metodi di misura chimicamente differenti. Guardando i dati nel complesso si può affermare che con il metodo DPPH i campioni analizzati hanno dimostrato una capacità antiossidante, in termini assoluti, confrontabile con quella misurata con il metodo FRAP e con il metodo Photochem<sup>®</sup>, indipendentemente dal protocollo applicato. La capacità antiossidante dei campioni analizzati con il metodo DMPD risulta compresa in un range di valori più alti e più confrontabili, come ordine di grandezza, con quelli ottenuti con il metodo ABTS. Questo porta a ipotizzare la presenza negli estratti di pomodoro analizzati di composti più reattivi nei confronti dei radicali DMPD<sup>·</sup> e ABTS<sup>·</sup> rispetto ai radicali coinvolti negli altri saggi. Tutti i metodi hanno dimostrato inoltre una buona correlazione con il metodo per la determinazione del contenuto in polifenoli totali.

La molecola antiossidante maggiormente presente nel pomodoro è il licopene e data la sua crescente popolarità in integratori alimentari, il mondo della ricerca è interessato a sviluppare ingredienti e prodotti arricchiti in licopene derivante da fonti naturali; il processo di recupero presuppone la misura di tale molecola nella materia prima, nei prodotti intermedi e nei prodotti finali. Per questo motivo è stato sviluppato un metodo HPLC per la quantificazione del licopene che ha altresì permesso di identificare il  $\beta$ -carotene, permettendone la contemporanea quantificazione.

Le metodologie messe a punto in questo lavoro possono trovare applicazione non solo nella caratterizzazione del pomodoro come materia prima o del prodotto lavorato ma anche nella valorizzazione di eventuali frazioni estratte dagli scarti di lavorazione al fine di identificare in esse componenti di qualità da valorizzare e potenzialmente riutilizzabili in ambito alimentare, farmaceutico e cosmetico.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] <http://it.wikipedia.org/wiki/Pomodoro>
- [2] <http://www.diwinetaste.com/dwt/it2004027.php>
- [3] <http://www.museidelcibo.it>
- [4] <http://www.pomodori.eu>
- [5] Bruni A. e Nicoletti M. *Biologia vegetale*. Japadre Editore. 1997
- [6] <http://www.istat.it>
- [7] Chong H.H., Simsek S., Reuhs B. L. “Analysis of cell-wall pectin from hot and cold break tomato preparations”. *Food Res. Int.* 2009; 42:770–772
- [8] Cappelli P., Vannucchi V. “Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazioni”. Zanichelli Editore, Bologna, 2005
- [9] [http://www.pomodoroitaliano.it/proprietà\\_pomodoro.html](http://www.pomodoroitaliano.it/proprietà_pomodoro.html)
- [10] <http://www.inran.it>
- [11] Taiz, Zieger. “Fisiologia vegetale”. Piccin, Padova, 2002
- [12] <http://www.planta-medica.it/edizioni/dispense.htm>
- [13] Trombly H.H. and Porter J.W. “Additional carotenes and colorless polyene of *Lycopersicon* species and strains”. *Arch. Biochem. Biophys.* 1953; 43(2):443-457
- [14] Kirk J.T.O. and Tilney-Basset R.A.E.. *The plastids. Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*, 2nd Ed. Amsterdam. Elsevier: 1978
- [15] Al-Wandawi H., Abdul-Rahman M. and Al-Shaikhly K. “Tomato processing waste as essential raw material source”. *J. Agric. Food Chem.* 1985; 33:804-807
- [16] Periago M.J., Rincon F., Aguera M.D., Ros G. “Mixture approach for optimizing lycopene extraction from tomato and tomato products”. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52(19):5796-5802
- [17] Zumbrunn A., Uebelhart P. and Eugster C.H. “HPLC of carotenes with  $\gamma$ -end groups and (Z)-configuration at terminal conjugated double bonds, isolation of (5Z)-lycopene from tomatoes”. *Helv. Chim. Acta.* 1985; 68:1540-1542
- [18] Hill H.M. and Rogers L.J. “Conversion of lycopene into  $\beta$ -carotene by chloroplast of higher plants”. *Biochem. J.* 1969; 113:31-32
- [19] Shi J., Le Maguer M. “Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing”. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2000; 20(4):293-334
- [20] Granado F., Olmedilla B., Blanco I. and Rojas-Hidalgo E. “Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables”. *J. Agric. Food Chem.* 1992; 40:2135-2140

- [21] Clinton S.K., Emenhiser C., Schwartz S.J., Bostwick D.G., Williams A.W., Moore B.J. and Erdman J.W. "Cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate". *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prevent.*, 1996; 5:823-833
- [22] Porrini M., Riso P. and Testolin G. "Adsorption of lycopene from single or daily portions of raw and processed tomato". *Br. J. Nutr.* 1998; 80:353-361
- [23] Xianquan S., Shi J., Kakuda Y., Yueming J. "Stability of lycopene during food processing and storage". *J. Med. Food*, 2005; 8(4):413-422
- [24] Sakamoto H., Mori H., Ojima F., Ishiguro Y., Arimoto S., Imae Y., Nanba T., Ogawa M. and Fukuba H. "Elevation of serum carotenoids after continual ingestion of tomato juice". *J. Jpn Soc. Nutr. Food Sci.* 1994; 47:93-99
- [25] Britton G. "Structure and properties of carotenoids in relation to function". *FASEB J.* 1995; 9(15):1551-1558
- [26] Stahl W. and Sies H. "Perspectives in biochemistry and biophysics". *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; 336(1):1-9
- [27] Boileau A.C., Merchen N.R., Wasson K., Atkinson C.A. and Herdman J.W. "Cis-lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets". *J. Nutr.* 1999; 129(6):1176-1181
- [28] Hussein L. and El-Tohamy M. "Vitamin A potency of carrot and spinach carotenes in human metabolic studies". *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 1990; 60(3):229-235
- [29] Shi J. And Le Maguer M. 1999a. "Lycopene as qualità index in tomato processing". *Industrial Application of Osmotic Treatment Seminar Proceeding, Milano, Italy*
- [30] Shi J. And Le Maguer M. 1999b. "Stability of lycopene bioactivity in tomato dehydration". *Proceeding of Industrial Application, Valencia, Spain*
- [31] Fielding JM, Rowley KG, Cooper P. and O' Dea K. "Increases in plasma lycopene concentration after consumption of tomatoes cooked with olive oil". *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2005; 14(2):131-136
- [32] <http://www.lapelle.it/alimentazione/licopene.htm>
- [33] Bhuvanewari V., Nagini S. "Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent". *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents.* 2005; 5(6):627-35
- [34] Chan J.M., Gann P.H. and Giovannucci E.L. "Role of diet in prostate cancer development and progression". *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(32): 8152-60
- [35] Blum A., Monir M., Wirsansky I. and Ben-Arzi S. "The beneficial effects of tomatoes". *Eur. J. Intern. Med.* 2005; 16(6):402-4

- [36] Di Mascio P., Kaiser S. and Sies H. "Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher". Arch. Biochem. Biophys. 1989; 274(2):532-538
- [37] Conn P.F., Schalch W. and Truscott T.G. "The singlet oxygen and carotenoid interaction". J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 1991; 11(1):41-47
- [38] LaVecchia C. "Mediterranean epidemiological evidence on tomatoes and the prevention of digestive tract cancers". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1997; 218:125-128
- [39] Giovannucci E. "Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: a review of the epidemiologic literature". J. Natl. Cancer Inst. 1999; 91(4):317-31
- [40] Dorai T. and Aggarwal B.B. "Role of chemopreventive agents in cancer therapy". Cancer Lett. 2004; 215(2):129-40
- [41] Forbes K., Gillette K. and Sehgal I. "Lycopene increases urokinase receptor and fails to inhibit growth or connexin expression in a metastatically passaged prostate cancer cell line: a brief communication". Exp. Biol. Med. 2003; 228(8):967-71
- [42] Parrett A.M., Edwards C.A. and Lokerse E. "Colonic fermentation capacity in vitro: development during weaning in breast-fed infants is slower for complex carbohydrates than for sugar". Am. J. Clin. Nutr. 1997; 65(7):927-33
- [43] Fraser M.L., Lee A.H. and Binns C.W. "Lycopene and prostate cancer: emerging evidence". Expert Rev. Anticancer Ther. 2005; 5(5):847-54
- [44] Ansari M. and Ansari S. "Lycopene and prostate cancer". Future Oncol. 2005; 1(3):425-430
- [45] Cook-Mozaffari P.J., Azordegan F., Day N.E., Ressicaud A., Sabai C. and Aramesh B. "Oesophageal cancer studies in the Caspian Littoral of Iran: results of a case-control study". Br. J. Cancer. 1979; 39(3):293-309
- [46] Tsugane S., Tsuda M., Gey F. and Watanabe S. "Cross-sectional study with multiple measurements of biological markers for assessing stomach cancer risks at the population level". Environ Health Perspect. 1992; 98:207-10
- [47] Burney P.G.J., Constock G.W. and Morris J.S. "Serologic precursors of cancer: serum micronutrients and the subsequent risk of pancreatic cancer". Am. J. Clin. Nutr. 1989; 49(5):895-900
- [48] Peng Y.M., Peng Y.S., Childers J.M., Hatch K.D., Roe D.J. and Lin P. "Concentrations of carotenoids, tocopherols and retinol in paired plasma and cervical tissue of patients with cervical cancer, precancer and noncancerous disease". Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 1998; 7(4):347-350
- [49] Rao A.V. "Lycopene, tomatoes and the prevention of coronary heart disease". Exp. Bio. Med. 2002; 227(10):908-13

- [50] Heller F.R., Descamps O. and Hondekijn J.C. “LDL oxidation: therapeutic perspectives”. *Atherosclerosis*. 1998; 137 Suppl: S25-31
- [51] Parthasarathy S., Steinberg D. and Witztum J.L. “The role of oxidized low-density lipoproteins in the atherosclerosis”. *Annu. Rev. Med.* 1992; 43:219-25
- [52] Kaliora A.C., Dedoussis G.V. and Schmidt H. “Dietary antioxidants in preventing atherogenesis”. *Atherosclerosis*. 2005; 187(1):1-17
- [53] Visioli F., Riso P., Grande S., Galli C. and Porrini M. “Protective activity of tomato products on in vivo markers of lipid oxidation”. *Eur. J. Nutr.* 2003; 42(4):201-6
- [54] Engelhard Y.N., Gazer B. and Paran E. “Natural antioxidants from tomato extract reduce blood pressure in patients with grade-1 hypertension: a double-blind, placebo-controlled pilot study”. *Am. Heart J.* 2006; 151(1):100
- [55] Fuhrman B., Elis A. and Aviram M. “Hypocholesterolemic effect of lycopene and  $\beta$ -carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 233(3):658-62
- [56] Stahl W., Heinrich U., Aust O., Tronnier H. and Sies H. “Lycopene-rich products and dietary photoprotection”. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2006; 5(2):238-42
- [57] Andreassi M., Stanghellini E., Ettore A., Di Stefano A. and Andreassi L. “Antioxidant activity of topically applied lycopene”. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2004; 18(1):52-55
- [58] Fazekas Z., Gao D., Saladi R.N., Lu Y., Lebowitz M. and Wei H. “Protective effects of lycopene against ultraviolet B-induced photodamage”. *Nutr. Cancer.* 2003; 47(2):181-7
- [59] Chan G.K. and Duque G. “Age-related bone loss: old bone, new facts”. *Gerontology.* 2002; 48(2):62-71
- [60] Mundy G.R. “Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism”. F. MJ. Ed.; Lippincott Williams & Wilkins, New York, 1999
- [61] Kenny A.M. and Raisz L.G. “Mechanisms of bone remodelling: implications for clinical practice”. *J. Reprod. Med.* 2002; 47(1 suppl):63-70
- [62] Manolagas S.C. “Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis”. *Endocr. Rev.* 2000; 21(2):115-37
- [63] Kim L., Rao A.V. and Rao L.G. “Lycopene II—effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells”. *J. Med. Food.* 2003; 6(2):79-86
- [64] Rao L.G., Krishnadev N., Banasikowska K. and Rao A.V. “Lycopene I—effect on osteoclasts: lycopene inhibits basal and parathyroid hormone-stimulated osteoclast formation and mineral

resorption mediated by reactive oxygen species in rat bone marrow cultures". J. Med. Food. 2003; 6(2):69-78

[65] Rao LG., Guns E. and Rao AV. "Lycopene: its role in human health and disease". AGROFood industry hi-tech. July/August2003. ISSN: 1120-6012

[66] Rao A.V. and Balachandran B. "Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases". Nutr. Neurosci. 2002; 5(5):291-309

[67] Schmidt R., Fazekas F., Hayn M., Schmidt H., Kapeller P., Toob G., Offenbacher H., Schumacher M., Heber B., Weinrauch V., Kostner G.M. and Esterbauer H. "Risk factors for microangiopathy-related cerebral damage in the Austrian stroke prevention study". J. Neurol. Sci. 1997; 152(1):15-21

[68] Polidori M.C. and Mecocci P. "Plasma susceptibility to free radical-induced antioxidant consumption and lipid peroxidation is increased in very old subjects with Alzheimer disease". J. Alzheimers Dis. 2002; 4(6):517-22

[69] Cardinault N., Abalain J.H., Sairafi B., Coudray C., Grolier P., Rambeau M., Carre J.L., Mazur A. and Rock E. "Lycopene but not lutein nor zeaxanthin decreases in serum and lipoproteins in age-related macular degeneration patients". Clin. Chim. Acta. 2005; 357(1):34-42

[70] Chaudière J, Ferrari-Iliou R. "Intracellular Antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms". Food Chem Toxicol. 1999; 37:949–62

[71] Huang D, Ou B, Prior RL. "The chemistry behind antioxidant capacity assays". J. Agric. Food Chem. 2005; 53:1841-1856

[72] Vecchietini M., Gaspari F., Piccaglia R. "Gli scarti agroindustriali nell'alimentazione animale: realtà attuali e risultati del progetto LR 28/98 Recupero scarti agroindustria". Atti del Convegno CRPA "La gestione degli scarti di trasformazione delle produzioni vegetali: quali prospettive". Bologna, 15 Maggio 2003

[73] [http://www.lsw.n.it/chimica/articoli/la\\_valorizzazione\\_degli\\_scarti\\_di\\_produzione\\_agroalimentare\\_introduzione](http://www.lsw.n.it/chimica/articoli/la_valorizzazione_degli_scarti_di_produzione_agroalimentare_introduzione)

[74] Ramandeep K. Toor , Geoffrey P. Savage. "Antioxidant activity in different fractions of tomatoes". Food Res. Int. 2005; 38:487–494

[75] George B., Kaur C., Khurdiya D. S. and Kapoor H. C. "Antioxidants in tomato (*Lycopersicon esculentum*) as a function of genotype". Food Chem. 2004; 84:45–51

[76] Knoblich M., Anderson B., Latshaw D. "Analyses of tomato peel and seed by-products and their use as a source of carotenoids". J Sci. Food Agr. 2005; 85:1166–1170

- [77] Reboul E., Borel P., Mikail C., Abou L., Charbonnier M., Caris-Veyrat C., Goupy P., Portugal H., Lairon D., Amiot M.J. “Enrichment of tomato paste with 6% tomato peel increases lycopene and  $\beta$ -carotene bioavailability in men”. *J. Nutr.* 2005; 135:790-794
- [78] Benakmoum A., Abbeddou S., Ammouche A., Kefalas P., Gerasopoulos D. “Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste”. *Food Chem.* 2008; 110:684–690
- [79] <http://www.ecoage.it/energia-biomassa-spiegazione.htm>
- [80] Mangut V., Sabio E., Gañán J., González J.F., Ramiro A., González C.M., Román S. and Al-Kassir A. “Thermogravimetric study of the pyrolysis of biomass residues from tomato processing industry”. *Fuel Process. Technol.* 2006; 87(2):109-115
- [81] Nallathambi Gunaseelan V. “Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks” *Biomass Bioenergy* 2004;26(4):389-399
- [82] Giannelos P.N., Sxizas S., Lois E., Zannikos F., Anastopoulos G. “Physical, chemical and fuel related properties of tomato seed oil for evaluating its direct use in diesel engines”. *Industrial Crops Prod.* 2005; 22:193–199
- [83] Strazzullo G., Schiano Moriello V., Poli A., Immirzi B., Amazio P. and Nicolaus B. “Solid wastes of tomato-processing industry (*Lycopersicon esculentum* “Hybride Rome”) as renewable sources of polysaccharides”. *J. Food Technol.* 2003; 1:102–105
- [84] Tommonaro G., De Stefano D., Pulsinelli M., Carnuccio R., Nicolaus B. and Poli A. “Natural products from tomato peels (*Lycopersicon esculentum* “Hybrid Rome”): new challenges and new opportunities of application: chemical, biotechnological and pharmacological”. *J. Biotechnol.* 2007; 131(2 Suppl.1):S26-S27
- [85] Popov I., Lewin G. “Antioxidative homeostasis: characterization by means of chemoluminescent technique”. *Methods Enzymol.* 1999; 300:437-356
- [86] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”. *Lebensm. Wiss. Technol/Food Sci. Technol.* 1995; 28:25-30
- [87] Molyneux P. “The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity”. *Songklanakarin J.Sci.Techol.* 2004; 26(2):211-219
- [88] Re R., Pellegrini N., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”. *Free Radical Biol. Med.* 1999; 26:1231-1237
- [89] Fogliano V., Verde V., Randazzo G. and Ritieni A. “Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines”. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47:1035-1040
- [90] Benzie I. F. F. and Strain J. J. “The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of Antioxidant Power: The FRAP assay”. *Anal. Biochem.* 1996; 239:70-76

- [91] Singleton V.L. and Rossi J.A. "Colorimetry of total phenols with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents". *Am. J. Enol. Vitic.* 1965; 16:144-158
- [92] <http://www.eufic.org/jarticle/it/guida-alimenti-nutrizione/alimenti-funzionali/expid/basics-alimenti-funzionali/>
- [93] Cantarelli P.R., Regitano-d'Arce M.A.B., Palma E.R. "Physicochemical characteristics and fatty acid composition of tomato seed oils from processing wastes". *Piracicaba Sci. Agric.* 1993; 50(1):117-120
- [94] Demirbas A. "Oil, micronutrient and heavy metal contents of tomatoes". *Food Chem.* 2010; 118:504–507
- [95] Demirbas A. "Fuel properties and calculation of higher heating values of vegetable oils". *Fuel* 1998; 77:1117-1120
- [96] <http://www.eufic.org/article/it/rid/health-effects-unsaturated-fatty-acids-Summary>
- [97] Phipps S.M., Maged H.M. Sharaf, Butterweck V. Assessing Antioxidant Activity in Botanicals and Other Dietary Supplements *Pharmacopeial Forum.* 2007, 33(4), 810-814.
- [98] Rao A.V. and Agarwal S. "Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer". *Nutr. Cancer.* 1998; 31:199–203
- [99] Heber D. and Lu Q.Y. "Overview of mechanisms of action of lycopene". *Exp. Biol. Med.* 2002; 227:920–923
- [100] Choudhary R., Bowser T.J., Weckler P., Maness N.O. and McGlynn W. "Rapid estimation of lycopene concentration in watermelon and tomato puree by fiber optic visible reflectance spectroscopy". *Postharvest Biol. Technol* 2009; 52(1):103-109
- [101] Naviglio D., Pizzolongo F., Ferrara L., Naviglio B., Aragón A. and Santini A. "Extraction of pure lycopene from industrial tomato waste in water using the extractor Naviglio®". *Afr. J. Food Sci.* 2008; 2(2):37-44
- [102] Lianfu Z., Zelong L. "Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes". *Ultras. Sonochem.* 2008; 15(5):731-737
- [103] Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission on the safety in use of lycopene as a food colour. *The EFSA Journal* 2008; 674:1-12.
- [104] [www.bioactive-net.com](http://www.bioactive-net.com)