

# Ruolo delle sostanze antiossidanti negli alimenti

Giuseppe Gambacorta<sup>1,2\*</sup>, Antonietta Baiano<sup>1,2</sup>, Maria Assunta Previtani<sup>1</sup>,  
Carmela Terracone<sup>1</sup>, Ennio La Notte<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Foggia  
Via Napoli 25, 71100 Foggia

<sup>2</sup>Istituto per la Ricerca e le Applicazioni Biotecnologiche per la Sicurezza e la Valorizzazione dei Prodotti  
Tipici e di Qualità  
Università di Foggia, Via Napoli 52, 71100 Foggia

Società Italiana di Scienze e Tecnologie degli Alimenti

---

## Riassunto

Gli antiossidanti sono sostanze presenti in basse concentrazioni negli alimenti, capaci di proteggere i substrati ossidabili e di contrastare gli effetti negativi che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) esercitano sull'organismo (riduzione del rischio di contrarre patologie cardiovascolari, cancro e malattie degenerative che accelerano i processi d'invecchiamento). L'ossidazione dei lipidi contenuti in un alimento è una degradazione a carico degli acidi grassi insaturi i quali reagiscono con l'ossigeno, per autoossidazione chimica, azione delle lipossigenasi, fotossidazione ed altri meccanismi. L'autoossidazione è il processo di ossidazione più importante e si sviluppa in tre diverse fasi (iniziatazione, propagazione e terminazione) portando alla produzione di idroperossidi. Questi ultimi possono decomporsi e formare composti a basso peso molecolare quali alcol, aldeidi, chetoni, acidi e altri composti meno reattivi che influenzano negativamente qualità, valore nutrizionale e shelf life dei prodotti.

Gli antiossidanti agiscono con meccanismi differenti e a differenti livelli nella sequenza ossidativa che coinvolge le molecole lipidiche. Essi possono ridurre la concentrazione di ossigeno, intercettare l'ossigeno singoletto, rallentare la fase di iniziatazione dell'autoossidazione bloccando i radicali liberi, interrompere la fase della reazione a catena prevenendo la continua sottrazione di idrogeno dal substrato e decomporre i prodotti primari di ossidazione in composti non radicalici. Nel presente lavoro sono riportati i risultati di due casi studio relativi alla frazione fenolica di oli vergini di oliva e di vini rossi prodotti in Puglia e alla loro potenziale attività antiossidante. Gli oli sono stati estratti con un impianto continuo a due fasi da olive provenienti da Cerignola e Torremaggiore, Foggia. I risultati hanno mostrato una diversa composizione fenolica tra gli oli e una stretta correlazione lineare tra contenuto fenolico ed attività antiossidante. I vini sono stati prodotti da uve della cv Primitivo, raccolte alla maturazione tecnologica da un vigneto di Manduria in provincia di Taranto, con l'applicazione di nove differenti tecniche di macerazione. I risultati hanno mostrato che l'aggiunta di coadiuvanti tannici di bucce e di vinaccioli al pigiadiraspato e la tecnica del salasso comportano una maggiore concentrazione fenolica nei vini. Infine, tra i metodi utilizzati per la determinazione dell'attività antiossidante, quello del  $\beta$ -carotene sembra essere il più efficace.

*Parole chiave:* olio vergine di oliva, ossidazione lipidica, polifenoli, sostanze antiossidanti, vino.

## Summary

### ROLE OF ANTIOXIDANT SUBSTANCES IN FOODS

Antioxidants are compounds present in food at low concentrations and able to both protect oxidable substrates and counterbalance the negative effects that the reactive oxygen species (ROS) cause in the human body (reduction of the risk to develop cardiovascular pathologies, cancer and degenerative diseases that accelerate the aging processes). In foods, lipid oxidation is a degradation regarding the unsaturated fatty acids that react with oxygen through several mechanisms such as chemical autoxidation, action of lipoxigenases, photoxidation, and others. Autoxidation is the main oxidation process and proceed via initiation, propagation, and termination steps leading to the hydroperoxide formation. Hydroperoxides could degraded into low molecular weigh compounds such as alcohols, aldehydes, ketons, acids and other low reactive compounds that negatively influence quality, nutritional va-

\* Autore corrispondente: tel./fax: +39 0881 589243. Indirizzo e-mail: giusgambacorta@unifg.it

lue and shelf life of foods. Antioxidants are known to act at different levels of the lipid oxidation. They may act in several ways: they can decrease the oxygen concentration, intercept the singlet oxygen, slow the initiation step by scavenging the first free radicals, break the reaction chain to prevent the hydrogen subtraction, and decompose primary products of oxidation into non-radical products. This work reports the results of two studies on the phenolic fraction and potential antioxidant activity of virgin olive oils and red wines produced in Apulia region. Oils were extracted from olives produced at Cerignola and Torremaggiore using a two phase continuous system. Results showed a different phenolic composition of the oils and a good linear correlation between phenolic content and antioxidant activity. Wines were produced from *Primitivo* grapes pickled at the so-called technological maturity in a vineyard located at Manduria (Taranto). Nine different maceration techniques were applied. Results showed that the addition of tannins from skins and seeds and the saignée allowed to obtain high phenolic concentrations in wines. Among the methods used to assess the antioxidant activity,  $\beta$ -carotene seems to be effective.

*Key-words:* virgin olive oil, lipid oxidation, polyphenols, antioxidant compounds, wine.

## 1. Introduzione

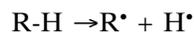
Gli antiossidanti sono sostanze presenti in basse concentrazioni negli alimenti e nel corpo in grado di diminuire drasticamente o prevenire i processi di ossidazione a carico di substrati ossidabili (Aruoma, 1994). Le industrie alimentari pongono in commercio alimenti contenenti sostanze antiossidanti al fine di prevenire il deterioramento qualitativo dei prodotti, mantenere il loro valore nutrizionale ed aumentare la *shelf life*. Gli antiossidanti hanno un particolare interesse dal punto di vista salutistico per la protezione che offrono nel contrastare gli effetti negativi delle specie reattive dell'ossigeno che portano a malattie degenerative. Gli antiossidanti agiscono a differenti livelli nella sequenza di ossidazione che coinvolge le molecole lipidiche intervenendo nel ridurre la concentrazione di ossigeno, intercettare l'ossigeno singoletto, prevenire la fase di iniziazione dell'autossidazione bloccando i radicali liberi legandosi ai catalizzatori ionici metallici, decomporre i prodotti primari a composti non radicalici e interrompere la fase della reazione a catena prevenendo la continua sottrazione di idrogeno dal substrato. Naturalmente il processo di ossidazione dei lipidi dipende anche dalla composizione in acidi grassi (grado di insaturazione), dalla presenza di pro-ossidanti e dalle condizioni di conservazione dell'alimento. Gli antiossidanti naturali assunti giornalmente con la dieta comprendono composti fenolici e polifenolici, chelanti, vitamine ed enzimi antiossidanti come carotenoidi e carnosina. L'inserimento nella dieta di prodotti vegetali ricchi in sostanze antiossidanti comporta degli indubbi benefici nutrizionali per

la diminuzione del rischio di molte malattie quali cardiovascolari, cancro, cataratte e altre degenerative che portano a processi d'invecchiamento (Shahidi, 1997).

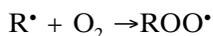
## 2. Ossidazione lipidica

L'ossidazione dei lipidi contenuti in un alimento è una degradazione a carico degli acidi grassi insaturi presenti nei gliceridi del grasso, i quali reagiscono con l'ossigeno atmosferico, per autossidazione chimica, azione delle lipossigenasi, fotossidazione, ecc. L'autossidazione è il processo di ossidazione più importante dei grassi e si sviluppa in tre diverse fasi: iniziazione, propagazione e terminazione. Nella fase di iniziazione, si ha la formazione di un radicale dell'acido grasso insaturo, in seguito alla perdita di un radicale  $H^\bullet$ , a livello del carbonio in posizione  $\alpha$  rispetto al doppio legame. Questa preferenza del sito di radicalizzazione è dovuta alla vicinanza del doppio legame che rende più labile il legame C-H, probabilmente a causa della formazione di un sistema di risonanza che coinvolge gli elettroni del doppio legame e rende "stabile" il radicale dell'acido grasso. Pertanto la suscettibilità di un olio o grasso all'autossidazione aumenta all'aumentare del numero di insaturazione.

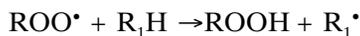
Il distacco del radicale  $H^\bullet$  è catalizzato dalla presenza di metalli, luce o calore ed avviene secondo la seguente reazione:



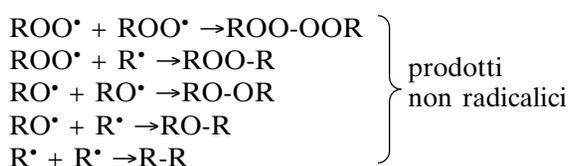
Il radicale  $R^\bullet$  reagisce con l' $O_2$  dell'aria formando un radicale idroperossido:



Questo radicale è instabile e reagisce con un'altra molecola di acido grasso insaturo formando l'idroperossido e un nuovo radicale dell'acido grasso:

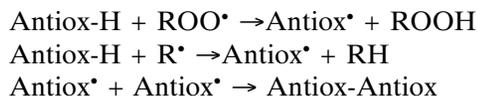


La formazione degli idroperossidi una volta iniziata procede secondo una reazione a catena (propagazione), facendo aumentare il numero di perossidi presenti nel grasso. La fase di terminazione avviene quando due molecole radicaliche reagiscono tra loro dando luogo a prodotti non radicalici:



Gli idroperossidi costituiscono i prodotti primari dell'ossidazione degli acidi grassi insaturi e sono composti inodori ed insapori. La loro presenza indica l'inizio del processo di ossidazione che continua mediante una serie di reazioni portando ad aldeidi, chetoni, acidi e idrocarburi, principali responsabili di odori e sapori di "rancido" e di "vecchio" che abbassano la *shelf-life* e il valore nutrizionale e commerciale del prodotto. Inoltre, gli idroperossidi possono prendere anche una via diversa, infatti reagendo di nuovo con l'ossigeno formano prodotti secondari quali epossiperossidi, chetoidroperossidi, perossidi ciclici e idroperossidi biciclici che potrebbero influenzare negativamente le caratteristiche sensoriali e salutistiche dei prodotti alimentari.

Gli alimenti possono contenere sostanze antiossidanti che sono in grado di bloccare la reazione di ossidazione al livello iniziale, limitando la propagazione secondo le seguenti reazioni:



Questi comportano l'inattivazione di proossidanti nel mezzo, come ad esempio con il meccanismo di *scavenging* dell'ossigeno singoletto o chelatori degli ioni metallici. Queste reazioni portano a ritardare l'inizio dell'ossidazione e ad allungare il periodo di induzione. Gli antiossi-

danti possono anche donare un atomo di idrogeno o un elettrone ai radicali prodotti dagli acidi grassi insaturi stabilizzando la sostanza grassa dell'alimento dai processi ossidativi.

### 3. Implicazioni salutistiche dei prodotti di ossidazione

I radicali liberi possono comportare nell'organismo una serie di malattie e di danni a carico di vari tessuti e processi di invecchiamento. Gli ossidanti e i radicali che influenzano varie malattie sono specie molto reattive formate da ossigeno tripletto, acqua e molecole lipidiche insature. Pertanto, la perossidazione lipidica rappresenta un problema non solo per gli oli edibili e l'industria alimentare ma anche per l'organismo. Un eccesso di produzione di specie radicaliche dell'ossigeno, in particolare di radicali idrossilici, possono interessare le membrane cellulari lipidiche e produrre perossidi e specie reattive dell'ossigeno (ROS) che sono legati a una serie di malattie che provocano l'accelerazione dei processi d'invecchiamento (fig. 1).

È ben noto che la malonaldeide (MDA) e la 4-idrossinonenale (4-HN) interagiscono con componenti biologici e con quelli contenuti negli alimenti come proteine, amminoacidi, ammine e DNA. Queste reazioni sono implicate in processi di invecchiamento, mutagenesi e carcinogenesi nel corpo (Crawford, 1967; Basu et al., 1984; Fujimoto et al., 1984), mentre negli alimenti influenzano negativamente l'aroma, la struttura e il colore. Inoltre, questi composti abbassano il valore nutrizionale dei prodotti per la distruzione degli acidi grassi essenziali e delle vitamine liposolubili e per la loro tossicità. Al fine di controllare i negativi effetti della rancidità è raccomandato l'aggiunta di antiossidanti

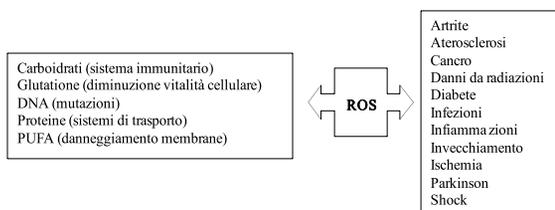


Figura 1. Substrati di azione dei ROS e implicazioni salutistiche.

Figure 1. Substrates of ROS action and health implications.

negli alimenti. Inoltre, il consumo di antiossidanti negli alimenti o come integratori nella dieta può essere consigliata al fine di contrastare le cause primarie di aterosclerosi, cancro e malattie degenerative d'invecchiamento.

#### 4. Antiossidanti naturali

Le piante sono ricche in sostanze antiossidanti quali tocoferoli, vitamina C, carotenoidi e composti fenolici. Nelle piante i fenoli hanno la funzione di "riparare" le lesioni dei tessuti provocate da eventi fisici o da agenti patogeni mediante reazioni di ossidazione e combinazione con proteine ed altri componenti a costituire una specie di barriera protettiva. Inoltre, i polifenoli con le loro caratteristiche di amaro e pungente scoraggiano l'attacco di insetti ed animali superiori come erbivori ed uccelli. I prodotti intermedi della fotosintesi possono produrre anche alti livelli di ossigeno, radicali liberi e di ROS, pertanto, le piante utilizzano una miriade di composti antiossidanti per assicurare la loro sopravvivenza. Molti di questi composti hanno una similitudine nella struttura molecolare in quanto presentano almeno un anello aromatico e un gruppo idrossilico.

Questi composti comprendono acidi fenolici, flavonoidi e isoflavoni, esteri gallati (tannini idrolizzabili), lignani, cumarine, stilbeni, flavononi e proantocianidine oligomere. Questi composti producono una serie di sostanze antiossidanti che, agendo con meccanismi diversi, costituiscono un sistema di difesa contro l'attacco dei radicali liberi. La tabella 1 riporta una lista di alcuni antiossidanti naturali e la loro matrice di provenienza (Shahidi, 1997). Gli antiossi-

danti naturali più conosciuti e più importanti per l'industria alimentare e per la salute umana sono i tocoferoli, vitamina C e carotenoidi (Packer, 1996). Erbe e spezie quali rosmarino, origano, aglio, peperoncino ed altre e i loro estratti hanno mostrato la capacità di estendere la shelf life di vari alimenti (Shahidi et al., 1995; Gambacorta et al., 2007). Sono stati identificati principi attivi e sostanze antiossidanti di composti naturali del rosmarino, crusca del riso, tè verde, semi di sesamo, semi di canola e ginger (Wu et al., 1982; Ramarathnam et al., 1989; Amarowicz e Shahidi, 1996; Fukuda et al., 1985; Wanasundara et al., 1994; Jitoe et al., 1992; Kasuga et al., 1988). Alcuni di questi estratti ricavati dal rosmarino e dal tè sono miscelati con tocoferoli e con palmitato ascorbico e commercializzati con successo in Europa, Giappone e Nord America, nonostante il maggior costo rispetto agli additivi sintetici. Anche certi oli vegetali, come ad esempio l'olio vergine di oliva, contengono sostanze antiossidanti e fungono da protezione contro i processi di ossidazione se aggiunti ad altri oli o ad alimenti ricchi di grasso. Inoltre, diversi vegetali come il ravanella, senape, rapa, cavolo e cipolla presentano un moderato effetto stabilizzante nei confronti dei lipidi alimentari. Studi epidemiologici e clinici hanno provato che gli antiossidanti fenolici presenti nei cereali, frutta e vegetali sono i principali fattori che contribuiscono a ridurre significativamente l'incidenza di malattie croniche e degenerative nelle popolazioni che seguono una dieta ricca di questi alimenti. Gli esperti del settore consigliano un'assunzione di 5 volte al giorno di alimenti a base di cereali e verdura.

Tabella 1. Composti antiossidanti e matrice di provenienza.

Table 1. Antioxidant compounds and source.

Composti antiossidanti	Matrice di provenienza
Vitamina E (tocoferoli e tocotrienoli)	Oli di semi, olio di palma, nocciola, uova, prodotti caseari, cariossidi di grano, vegetali, cereali, margarine, ecc.
Vitamina C	Frutti e vegetali, uva, agrumi, germogli, peperone verde, patate, ecc.
Carotenoidi	Vegetali a foglia scura, carote, patate dolci, pomodori, albicocche, agrumi, cavolo verde, rape verdi, olio di palma, ecc.
Flavonoidi/isoflavoni	Frutti e vegetali, oli di semi, uva, melanzane, peperoni, agrumi, pomodori, ecc.
Acidi fenolici e derivati fenolici	Oli di semi, oli vergini di oliva, cereali, ecc.
Catechine	Tè verde, uva, oli di semi, ecc.
Estratti	Estratti da tè verde, rosmarino, salvia, chiodi di garofano, origano, timo, avena, crusca di riso, ecc.

## 5. Azione degli antiossidanti

Un “antiossidante ideale” deve possedere delle appropriate caratteristiche se deve essere aggiunto agli alimenti. Esso deve: (a) essere sicuro; (b) non impartire colore, odore e gusto; (c) essere efficace a basse concentrazioni; (d) rimanere dopo il processo di produzione dell’alimento; (e) essere stabile nel prodotto finito; (f) essere solubile nella fase lipidica; (g) essere facilmente disponibile a basso costo; (h) essere “naturale”, in modo da riportarlo in etichetta, ed attrarre il consumatore (Cuppert et al., 1997). È stato generalmente mostrato che i composti antiossidanti derivanti dalle piante sono fenoli classificabili nei seguenti composti: tocoferoli, carotenoidi, acidi fenolici (derivati degli acidi benzoico e cinnamico), flavonoidi e diterpeni.

### 5.1 Tocoferoli

I tocoferoli possono agire come antiossidanti mediante due meccanismi quali donatore o accettore di elettrone in seguito alla rottura della catena. Il meccanismo di accettore di elettrone comprende lo *scavenging* o *quencing* dell’ossigeno singoletto (Scott, 1985). Nel meccanismo di donatore di elettrone i tocoferoli competono con gli acidi grassi insaturi per i radicali perossidici (ROO•), riducendo la formazione del radicale dell’acido grasso (R•) che avviene quando il ROO• reagisce con un RH, rallentando la fase di propagazione dell’autossidazione. I tocoferoli possono effettivamente competere con il RH per il ROO• mediante un pronto trasferimento di un atomo di idrogeno al radicale idroperossidico formando l’idroperossido (Frankel, 1991) e convertendosi prima in prodotti radicalici intermedi (semi-chinoni) e successivamente in un prodotto finale non radicalico più stabile (tocoferyl chinone) (fig. 2).

Il tocoferil chinone e il semichinone possono reagire con il radicale dell’acido grasso R•, competendo con l’ossigeno tripletto, a ricostituire l’acido grasso (RH) e rallentando la fase di propagazione a catena dell’autossidazione. Poiché a pressione atmosferica la reazione tra il radicale R• e l’ossigeno tripletto è maggiormente favorita rispetto a quella tra l’ossigeno del chinone e il radicale R•, questo tipo di attività antiossidante (AA) esercitata dai tocoferoli avviene principalmente in sistemi biologici o

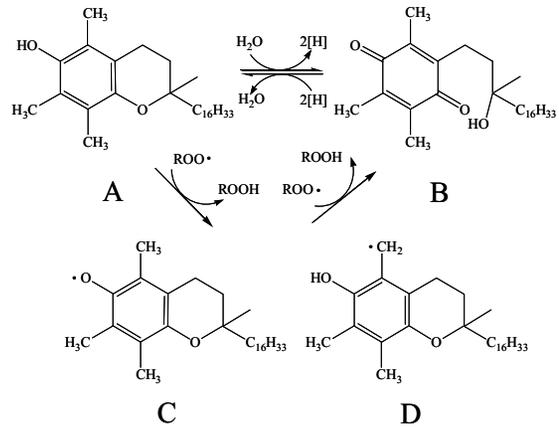


Figura 2. Ossidazione dell’α-tocoferolo (A) ad α-tocoferyl chinone (B) attraverso gli intermedi semi-chinonici (C, D).

Figure 2. (A) α-tocopherol oxidation to (B) α-tocopheryl quinone through semi-quinone intermediates (C, D).

in sistemi caratterizzati da basse concentrazioni di ossigeno (Frankel, 1991).

I tocoferoli possono controllare i processi di ossidazione agendo anche sull’ossigeno singoletto. L’abilità di “oxygen-scavenging” dei tocoferoli avviene attraverso due meccanismi: spegnimento (quencing) dell’ossigeno singoletto (fig. 3; Clough et al., 1979) e reazione irreversibile con l’ossigeno singoletto a formare una serie di prodotti (fig. 4; Grams et al., 1972).

### 5.2 Caroteni

I caroteni, ed in particolare il β-carotene, sono efficaci a “spegnere” l’ossigeno singoletto secondo la seguente reazione:



La velocità di *quencing* è dovuta al numero di doppi legami coniugati che consente la deloca-

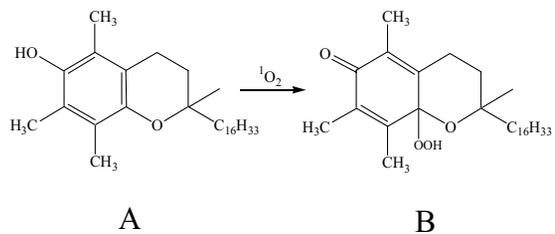


Figura 3. Reazione dell’α-tocoferolo (A) con l’ossigeno singoletto a dare l’idroperossidienone (B).

Figure 3. Reaction of (A) α-tocopherol with singlet oxygen to give (B) hydroperoxydienone.

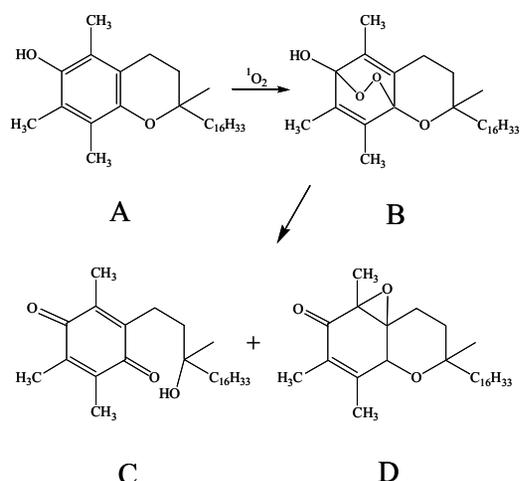


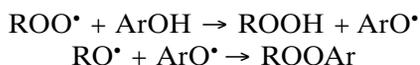
Figura 4. Reazione dell' $\alpha$ -tocoferolo (A) con l'ossigeno singoletto a dare l' $\alpha$ -tocoferil chinone (C) ed il chinone epossido (D) attraverso l' $\alpha$ -tocoferil endoperossido (B).

Figure 4. Reaction of (A)  $\alpha$ -tocopherol with singlet oxygen to give (C)  $\alpha$ -tocopheryl quinone and (D) quinone epoxide through (B)  $\alpha$ -tocopherol endoperoxide.

lizzazione degli elettroni spaiati provenienti dall'ossigeno singoletto nella catena (Foote et al., 1970). Pertanto, l'AA dei carotenoidi è dovuta ai loro sistemi polienici coniugati in grado di delocalizzare gli elettroni spaiati delle specie radicaliche libere e perossidiche (Burton e Ingold, 1984; Terao, 1989).

### 5.3 Acidi fenolici

Gli acidi fenolici possiedono AA. Gli ortodifenoli come caffeico, idrossitirosolo e oleuropeina presentano una forte AA rispetto a quella di acidi fenolici con meno impedimento sterico come il tirosolo (Chimi et al., 1991). I derivati dell'acido cinnamico (caffeico, ferulico, sinapico e p-cumarico) presentano una maggiore AA rispetto ai derivati dell'acido benzoico (p-idrossibenzoico, vanillico, siringico e 3,4-diidrossibenzoico) (Marinova et al., 1994). Gli antiossidanti fenolici agiscono inibendo l'ossidazione lipidica mediante cattura del radicale perossido secondo due meccanismi:



Nel primo meccanismo il radicale idroperossido  $ROO\cdot$  sottrae un idrogeno radicalico dall'antiossidante a dare un radicale aromatico  $ArO\cdot$  e l'idroperossido  $ROOH$ . Nel secondo

meccanismo i due radicali si combinano formando un dimero non radicalico. I fenoli caratterizzati da impedimento sterico presentano una maggiore AA poiché la velocità delle reazioni che portano alla produzione di specie non radicaliche è superiore rispetto a quelle che portano alla produzione di radicali. Al contrario, la mancanza di impedimento sterico favorisce la produzione di radicali riducendo, conseguentemente, l'AA dei fenoli (Chimi et al., 1991). Le molecole contenenti almeno due gruppi fenolici idrossilici vicinali presentano un'alta AA. Inoltre, la presenza nella molecola di un gruppo carbonile, come un acido aromatico, un estere o un lattone, aumenta l'AA. Infine, l'impedimento sterico di un idrossile fenolico da parte di un gruppo inerte, come ad esempio un metossile in posizione vicinale, aumenta l'AA.

### 5.4 Flavonoidi

I flavonoidi sono una grande classe di composti, ubiquitari nelle piante e abitualmente presenti come glucosidi e, a volte, come agliconi. Essi contengono diversi gruppi idrossilici fenolici attaccati agli anelli della struttura (A, B e C). Le variazioni strutturali all'interno degli anelli determinano la classificazione dei flavonoidi in diverse famiglie. I flavonoidi esplicano l'azione antiossidante agendo come donatori di idrogeno o chelando i metalli. La posizione e il numero degli idrossili sugli anelli influenza la loro AA: a) la presenza di un gruppo OH in posizione orto nell'anello B determina una forte AA; b) la sostituzione di un gruppo OH in posizione orto nell'anello B conferisce una minore AA, ma se accompagnata da un addizionale gruppo OH in posizione para determina un aumento dell'attività; c) la presenza di due gruppi OH vicinali (o-diidrossilati) nell'anello B contribuisce all'AA (3',4'-diidrossile); d) la presenza di due gruppi OH in posizione meta nell'anello A contribuisce all'AA (meta 5,7-diidrossile). Inoltre, la presenza di un doppio legame tra i carboni 2 e 3 dell'anello C contribuisce all'AA. Gli agliconi presentano una maggiore AA dei corrispondenti glucosilati per la mancanza di un gruppo OH in posizione 3 nell'anello C (Das e Pereira, 1990). I flavonoidi intervengono nel controllo dell'ossidazione dei lipidi mediante la chelazione di ioni metallici (rame). Questo intervento dipende da alcune condizioni: a) le molecole devono avere più gruppi

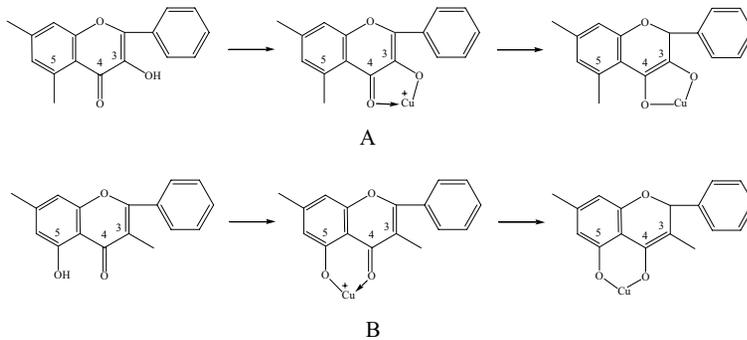


Figura 5. Meccanismo di chelazione di flavanoni (A) e flavoni (B).

Figure 5. Chelating mechanism for (A) flavanones and (B) flavones.

idrossilici (una configurazione 3',4'-diidrossi conferisce una forte AA); b) le molecole devono avere un gruppo carbonile in posizione 4; c) le molecole devono avere un gruppo idrossile in posizione 3 e/o 5 (Hudson e Lewis, 1983). La contemporanea presenza del gruppo carbonile in 4 e del gruppo ossidrilico in 3 o 5 conferisce azione chelante nei confronti dello ione rame (fig. 4) (Dziedzic e Hudson, 1984).

L'azione chelante nei confronti dei metalli si ha anche per gli orto-difenoli (posizione 3',4' dell'anello B dei gruppi idrossilici).

## 6. Caratterizzazione della frazione fenolica e valutazione dell'attività antiossidante di oli vergini di oliva monovarietali del territorio Dauno

### 6.1 Introduzione

La frazione fenolica ha un impatto positivo sulle caratteristiche qualitative dell'olio vergine di oliva e il contenuto è subordinato a diversi fattori: cultivar, tecniche agronomiche, grado di maturazione delle olive, tecnologie di estrazione e tempi e modalità di conservazione dell'olio. Inoltre, i fenoli sono dei potenti antiossidanti fungendo da chelanti degli ioni metallici (es. Cu<sup>2+</sup>) e da radical scavenger interrompendo la reazione a catena della perossidazione lipidica. Alcuni composti fenolici, come l'oleuropeina, aumentano la produzione di ossido nitrico (fattore di rilassamento vascolare), mentre altri, come il tirosolo, inibiscono la formazione di ossisteroli e la perossidazione della componente lipidica delle LDL, bloccando la genesi di malattie cardiovascolari (Visioli et al., 2002). È inoltre ormai accertato che i polifenoli, ed in particolare gli orto-difenoli, apportano il maggiore contributo alla stabilità ossidativa nell'olio di

oliva vergine (Aparicio et al., 1999), e studi condotti sulla sua shelf-life hanno dimostrato un cambiamento della composizione fenolica nel tempo (Cinquanta et al., 1997). Non meno importante è il contributo fornito dai fenoli nella formazione del gusto tipico dell'olio vergine di oliva, con le sfumature di "amaro" e "piccante" dovute principalmente ai derivati dell'oleuropeina e del ligitroside (Visioli et al., 1998; Andrewes et al., 2003).

In questo lavoro si riportano alcuni risultati di uno studio condotto sul profilo fenolico e potere antiossidante di alcuni oli monovarietali del territorio Dauno.

### 6.2 Materiali e metodi

Gli oli sono stati estratti da olive provenienti da due oliveti sperimentali di Cerignola (Casaliva, Cellina di Nardò, Grignano, Nociara, Ogliarola barese e Termite di Bitetto) e di Torremaggiore (Cellina di Nardò, Coratina, Frantoio, Leccino, Moraiole e Nociara). Al raggiungimento della maturazione tecnologica, le olive di ciascuna cultivar sono state raccolte a mano per brucatura e sottoposte entro le 36 ore ad estrazione meccanica dell'olio mediante un minifrantoio continuo a due fasi. I campioni di olio sono stati conservati in bottiglie di vetro da 1 litro al buio ed a temperatura ambiente fino al momento delle analisi.

*Analisi frazione fenolica.* L'estrazione dei composti fenolici è stata effettuata secondo il metodo di Montedoro et al. (1992), con opportune modifiche. Sull'estratto fenolico è stato determinato il contenuto in fenoli totali per spettrofotometria dopo reazione con il reattivo di Folin-Ciocalteu (FC), esprimendo il risultato come mg kg<sup>-1</sup> equivalenti di acido gallico. Il profilo fenolico è stato determinato sull'estratto metanoli-

co per cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) secondo il protocollo analitico utilizzato in un precedente lavoro (Gambacorta et al., 2006). L'identificazione dei composti fenolici è stata effettuata mediante confronto dei picchi con quelli di standard puri e dei tempi di ritenzione relativi riportati in letteratura (Brenes et al., 2000; Gomes-Alonso et al., 2002).

**Attività antiossidante.** L'attività antiossidante degli oli è stata determinata sottoponendo gli estratti fenolici al test dell'ABTS+/metamioglobina (Miller et al., 1993).

### 6.3 Risultati e discussione

La figura 6 mostra il profilo fenolico con l'identificazione dei picchi di uno degli oli studiati (Coratina di Torremaggiore), mentre le tabelle 1 e 2 riportano rispettivamente le composizioni fenoliche degli oli di Cerignola e Torremaggiore.

Tra le cultivar di Cerignola, la Casaliva ha presentato il più alto contenuto fenolico, seguita da Cellina di Nardò, Nociara, Grignano, Ogliarola barese e Termite di Bitetto. È stata osservata una certa variabilità nella composizione fenolica degli oli, mentre il p-HPEA-EDA è risultato il componente fenolico più abbondante in tutti gli oli. Per quanto riguarda i campioni di Torremaggiore, la Coratina ha mostrato il contenuto fenolico più alto, seguita da Nociara, Moraiolo, Frantoio, Cellina di Nardò e Leccino. Il comportamento della Coratina, cultivar notoriamente tardiva, è da ascrivere alle sue caratteristiche intrinseche e al basso indice di maturazione delle olive. Le figure 7, 8 e 9 riportano rispettivamente il contenuto fenolico determinato per spettrofotometria, l'attività an-

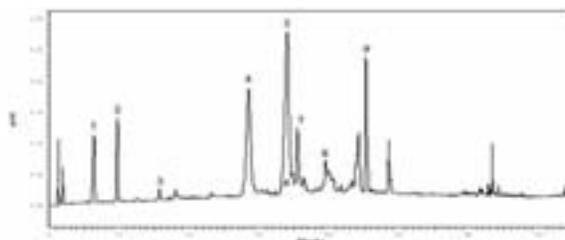


Figura 6. Profilo fenolico della Coratina: 1) idrossitirosolo, 2) tirosolo, 3) vanillina, 4) 3,4-DHPEA-EDA, 5) p-HPEA-EDA, 6) acetossi-pinoresinolo, 7) pinoresinolo, 8) 3,4-DHPEA-EA, 9) p-HPEA-EA.

Figure 6. Phenolic profile of Coratina: 1) hydroxytyrosol, 2) tyrosol, 3) vanilline, 4) 3,4-DHPEA-EDA, 5) p-HPEA-EDA, 6) acetoxy-pinoresinol, 7) pinoresinol, 8) 3,4-DHPEA-EA, 9) p-HPEA-EA.

tiossidante e la correlazione tra contenuto fenolico e attività antiossidante degli oli di Cerignola (A) e di Torremaggiore (B). Tra le cultivar di Cerignola, la Casaliva ha presentato i più alti valori del contenuto fenolico e di attività antiossidante, mentre i valori più bassi sono stati trovati per la Termite di Bitetto. Per quanto riguarda gli oli di Torremaggiore, la Coratina ha mostrato valori più alti del tenore fenolico ed attività antiossidante e la Leccino i più bassi. Per gli oli di entrambi gli oliveti la correlazione tra contenuto fenolico ed attività antiossidante è risultata buona e di tipo lineare con  $R = 0,9644$  e  $R = 0,9840$  ( $p = 0,01$ ), rispettivamente per Cerignola e Torremaggiore.

L'analisi statistica delle componenti principali (fig. 10) ha mostrato una netta distinzione tra la Casaliva di Cerignola e la Coratina di Torremaggiore dalle altre cultivar per il maggior

Tabella 2. Composizione fenolica degli oli di Cerignola ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

Table 2. Phenolic composition of Cerignola oils ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

Fenoli	Casaliva	Cellina di Nardò	Grignano	Nociara	Ogliarola barese	Termite di Bitetto
Idrossirosolo	78,1 ± 6,3	0,0	0,8 ± 0,1	3,0 ± 0,5	0,0	0,0
Tirosolo	63,3 ± 4,3	8,2 ± 3,2	4,7 ± 1,1	21,9 ± 1,9	7,0 ± 0,2	2,4 ± 0,1
Vanillina	4,6 ± 1,1	2,5 ± 1,2	2,5 ± 0,9	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,2	2,0 ± 0,1
3,4-DHPEA-EDA	22,3 ± 1,7	1,6 ± 0,3	2,6 ± 0,5	4,0 ± 0,4	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,2
p-HPEA-EDA	57,4 ± 4,9	79,7 ± 6,4	31,9 ± 2,9	62,0 ± 5,2	31,0 ± 2,9	18,7 ± 2,4
1-Acetossi-Pinoresinolo	2,2 ± 0,9	3,5 ± 0,6	2,0 ± 0,6	0,0	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,4
Pinoresinolo	37,6 ± 3,2	39,7 ± 3,2	12,8 ± 0,9	7,6 ± 0,5	10,7 ± 0,9	7,6 ± 0,3
3,4-DHPEA-EA	16,4 ± 2,8	2,3 ± 0,2	6,8 ± 0,5	0,9 ± 0,0	3,1 ± 0,3	0,4 ± 0,0
p-HPEA-EA	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,0
Σ Fenoli non identificati	89,6 ± 6,3	71,0 ± 5,2	64,0 ± 4,2	63,3 ± 6,1	66,5 ± 5,6	63,5 ± 6,2
Σ Fenoli	371,6 ± 22,1	208,7 ± 15,2	128,7 ± 11,6	165,9 ± 15,2	122,7 ± 19,1	98,7 ± 8,2

Tabella 3. Composizione fenolica degli oli di Torremaggiore (mg kg<sup>-1</sup>).

Table 3. Phenolic composition of Torremaggiore oils (mg kg<sup>-1</sup>).

Fenoli	Cellina di Nardò	Coratina	Frantoio	Leccino	Moraiolo	Nociara
Idrossitirosole	2,1 ± 0,2	19,1 ± 1,9	0,7 ± 0,1	0,0	0,0	1,0 ± 0,0
Tirosole	9,1 ± 1,0	20,6 ± 2,0	4,1 ± 0,3	8,1 ± 0,2	4,2 ± 0,2	9,7 ± 0,6
Vanillina	1,6 ± 0,2	2,5 ± 0,3	2,6 ± 0,2	3,7 ± 0,0	3,2 ± 0,2	1,7 ± 0,2
3,4-DHPEA-EDA	10,3 ± 1,0	78,2 ± 7,4	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	25,1 ± 1,2
p-HPEA-EDA	43,4 ± 2,8	115,1 ± 10,2	8,5 ± 1,6	16,0 ± 1,2	22,0 ± 1,9	91,5 ± 6,3
1-Acetossi-Pinoresinolo	2,4 ± 0,6	6,4 ± 1,2	2,9 ± 0,0	2,3 ± 0,2	3,7 ± 0,5	0,0
Pinoresinolo	56,8 ± 3,8	23,2 ± 1,9	73,4 ± 6,2	4,1 ± 0,6	86,2 ± 5,6	38,4 ± 2,9
3,4-DHPEA-EA	0,5 ± 0,0	14,5 ± 1,1	3,1 ± 0,3	3,1 ± 0,3	4,0 ± 0,2	2,6 ± 0,3
p-HPEA-EA	0,3 ± 0,0	36,2 ± 2,6	14,9 ± 1,2	7,5 ± 0,4	21,2 ± 2,3	3,8 ± 0,2
ΣFenoli non identificati	56,2 ± 6,2	122,0 ± 9,9	109,7 ± 9,6	104,9 ± 6,8	99,9 ± 7,8	79,4 ± 6,3
ΣFenoli	182,7 ± 15,2	437,8 ± 16,3	220,5 ± 21,0	150,2 ± 9,3	245,0 ± 22,1	253,2 ± 19,3

contenuto fenolico e la più elevata attività antiossidante. Queste due cv si sono invece distinte tra loro per la diversa composizione fenolica.

#### 6.4 Conclusioni

Gli oli dei due campi sperimentali hanno mostrato una grande variabilità nel contenuto e nel profilo fenolico. La Casaliva, tra le cultivar di Cerignola, e la Coratina, tra quelle di Torre-

maggiore, hanno presentato il maggior contenuto in fenoli totali e sono risultate ricche in idrossitirosole, tirosole, 3,4-DHPEA-EDA e p-HPEA-EDA. Invece, la Termite di Bitetto di Cerignola e la Leccino di Torremaggiore hanno presentato i più bassi contenuti in fenoli e più ricchi in p-HPEA-EDA. È stata riscontrata una buona correlazione lineare tra il contenuto fe-

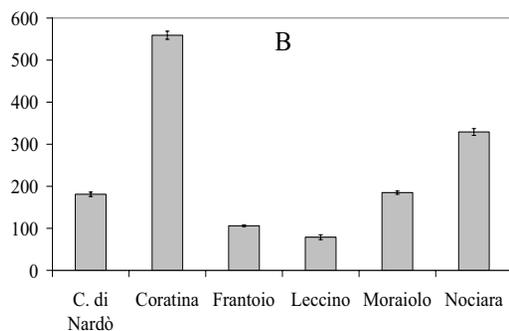
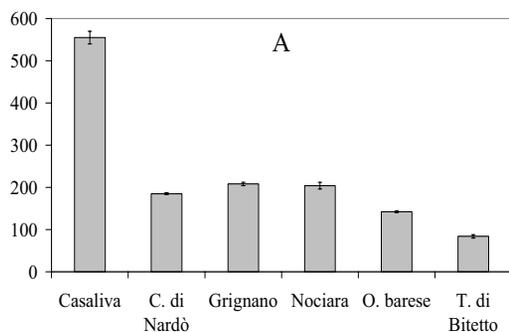


Figura 7. Contenuto fenolico totale degli oli di Cerignola (A) e Torremaggiore (B) (mg kg<sup>-1</sup>).

Figure 7. Total phenolic content of (A) Cerignola and (B) Torremaggiore oils (mg kg<sup>-1</sup>).

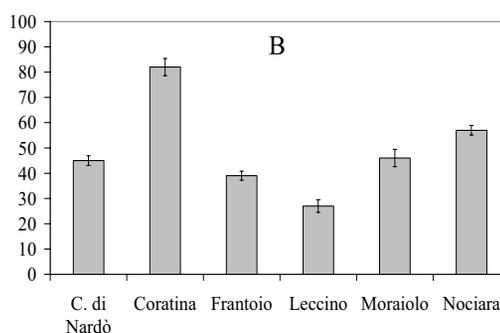
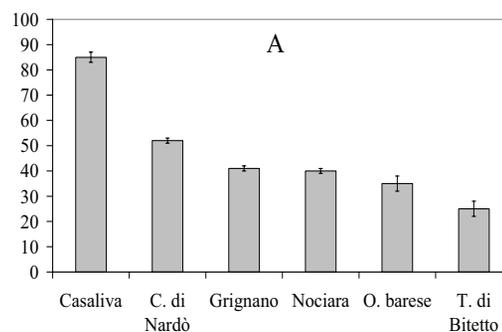


Figura 8. Attività antiossidante degli oli di Cerignola (A) e Torremaggiore (B) (%).

Figure 8. Antioxidant activity of (A) Cerignola and (B) Torremaggiore oils (%).



Tabella 4. Composizione fenolica dei vini (mg L<sup>-1</sup>).

Table 4. Phenolic composition of wines (mg L<sup>-1</sup>).

Campione	Polifenoli totali	Flavonoidi totali	Antociani totali	Antociani monomeri	Proantocianidine	Flavani reagenti con la vanillina
T	2008 ± 59	2226 ± 74	348 ± 24	65 ± 15	1581 ± 44	953 ± 43
D	1854 ± 47	1855 ± 34	292 ± 23	57 ± 15	987 ± 46	1082 ± 48
S	2165 ± 76	2115 ± 58	295 ± 25	87 ± 11	1610 ± 60	1293 ± 51
FR	1689 ± 37	1815 ± 36	244 ± 14	136 ± 15	1481 ± 29	1033 ± 46
ATV	2252 ± 99	2119 ± 36	245 ± 23	264 ± 53	2131 ± 51	1366 ± 55
ATVB	2291 ± 44	2046 ± 57	287 ± 21	231 ± 17	2335 ± 55	1256 ± 35
RVFM	1748 ± 36	1679 ± 35	278 ± 15	212 ± 38	2277 ± 20	1017 ± 54
CM	1598 ± 83	1712 ± 14	254 ± 14	106 ± 12	2088 ± 66	964 ± 30
MP	1698 ± 45	1938 ± 70	258 ± 15	97 ± 30	2490 ± 46	1109 ± 89

contenuto fenolico ed attività antiossidante del vino Primitivo.

7.2 Materiali e metodi

**Campioni.** Sono state allestite nove tesi, replicate due volte, su uve della cv Primitivo vendemmiate a maturazione tecnologica da un vigneto ubicato in agro di Manduria (Taranto, Italia) applicando le seguenti tecnologie di vinificazione: tradizionale (T), delestage (D), salasso (S), follatura ritardata (FR), aggiunta di tannini di vinaccioli (ATV), aggiunta di tannini di vinaccioli e di bucce (ATVB), riscaldamento vinacce a fine macerazione (RVFM), crio-macerazione (CM) e macerazione prolungata (MP).

**Frazione fenolica.** Il contenuto fenolico totale è stato determinato spettrofotometricamente utilizzando il reattivo di Folin-Ciocalteu (FC) (Singleton e Rossi, 1965) e con il metodo OIV (2006) esprimendo i risultati rispettivamente in mg L<sup>-1</sup> di acido gallico equivalenti e in indice polifenoli totali (IPT). Le analisi dei flavonoidi

totali, antociani totali, antociani monomeri, proantocianidine e flavani reagenti con la vanillina sono state condotte secondo le metodiche riportate da Di Stefano et al. (1989).

**Attività antiossidante.** In assenza di un metodo analitico standard accettato per i vini, la valutazione dell'attività antiossidante è stata condotta utilizzando tre diversi test: a) metodo dell'ABTS·+/metamioglobina (Miller et al., 1993); b) metodo del β-carotene (Katalinic et al., 2004; von Gadow et al., 1997) opportunamente modificato; c) metodo del DPPH (OIV n. ENO/SC-MAV/03/269, 2006).

7.3 Risultati e discussione

L'aggiunta dei coadiuvanti tannici in fase di macerazione quali vinaccioli (ATV) e vinaccioli + bucce (ATVB) e la tecnica del salasso ha comportato la produzione di vini con maggiore struttura fenolica (tab. 4).

I due metodi di analisi dei polifenoli totali utilizzati (FC e IPT) sono risultati entrambi va-

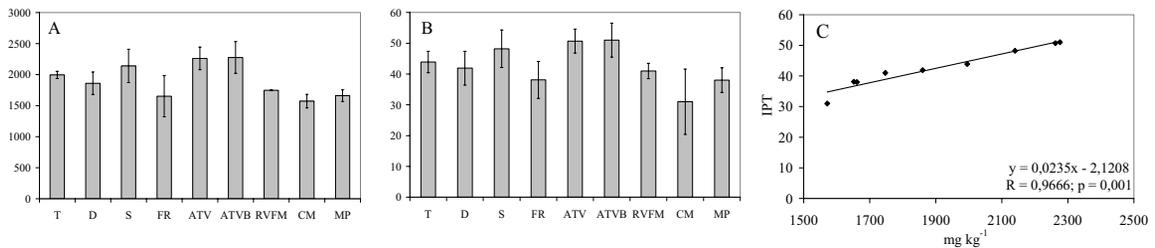


Figura 11. Contenuto fenolico totale dei vini determinati dopo reazione con Folin-Ciocalteu (A) e con il metodo OIV (B) e loro correlazione (C).

Figure 11. Total phenolic content of wines assessed (A) after reaction with Folin-Ciocalteu and (B) with OIV method, and (C) their correlation.

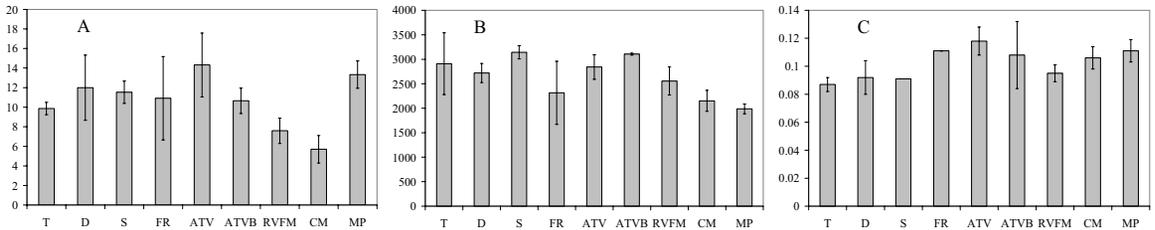


Figura 12. Attività antiossidante dei vini: metamioglobina/Abts (Attività Antiossidante %) (A),  $\beta$ -carotene (Coefficiente Attività Antiossidante) (B) e DPPH (ED50) (C).

Figure 12. Antioxidant activity of wines: (A) metamioglobin/Abts (% Antioxidant Activity), (B)  $\beta$ -carotene (Antioxidant Activity Coefficient), and (C) DPPH (ED50).

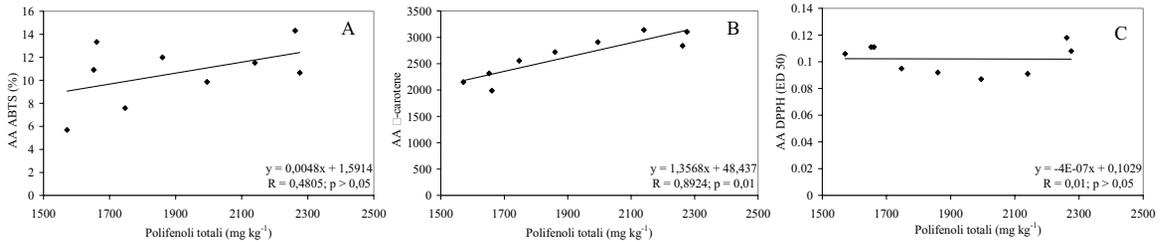


Figura 13. Correlazione tra polifenoli totali (PT) ed attività antiossidante dei vini: PT/ABTS (A), PT/ $\beta$ -carotene (B) e PT/DPPH (C).

Figure 13. Correlation between total polyphenols (TP) and antioxidant activity of wines: (A) TP/ABTS, (B) TP/ $\beta$ -carotene, and (C) TP/DPPH.

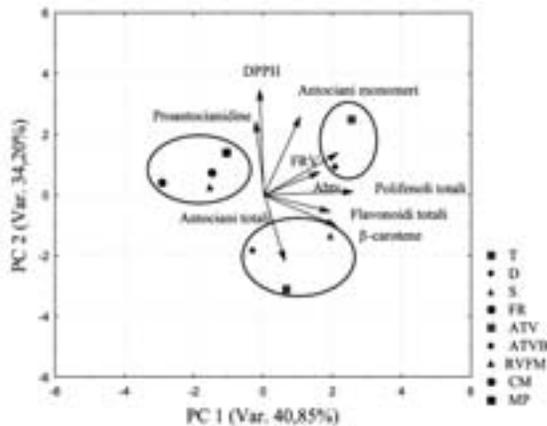


Figura 14. Analisi delle componenti principali dei vini.

Figure 14. Principal components analysis of wines.

lidi e tra loro ben correlati ( $R = 0,9666; p = 0,001$ ) (fig. 11). Per quanto riguarda l'attività antiossidante (fig. 12), l'applicazione dei tre metodi ha dato risultati differenti. Tra i metodi testati quello del  $\beta$ -carotene ha mostrato la maggiore correlazione con il contenuto fenolico ( $R = 0,8924; p = 0,01$ ) (fig. 13). Evidentemente l'attività antiossidante dei vini, come di altri

prodotti alimentari, dipende non solo dal contenuto fenolico ma anche dal tipo di fenoli.

L'analisi statistica delle componenti principali (PCA) ha consentito di raggruppare i campioni in 3 gruppi (fig. 14). Un primo gruppo è risultato costituito dai due vini ottenuti con l'aggiunta di tannini esogeni (ATV e ATVB), un secondo da quelli ottenuti con la criomacerazione (CM), riscaldamento finale delle vinacce (RVFM), follatura ritardata (FR) e macerazione prolungata (MP) e un terzo da quelli prodotti con la macerazione tradizionale (T), salasso (S) e delestage (D).

#### 7.4 Conclusioni

La scelta della tecnica di macerazione per la produzione del vino Primitivo dipende dagli obiettivi che si vogliono perseguire. L'aggiunta di tannini di vinaccioli e/o bucce potrebbe essere raccomandata per la produzione di vini con una maggiore struttura fenolica. L'attività antiossidante di un vino non può essere prevista solo sulla base del suo contenuto fenolico. Essa dipende anche dalla specifica composizione fenolica e dal metodo analitico utilizzato. Tra i tre metodi utilizzati quello del  $\beta$ -carotene sembra

essere il più efficace nella valutazione dell'attività antiossidante del vino. Un limite di questi saggi è rappresentato dal fatto che la capacità riducente non riflette necessariamente l'efficacia antiossidante dei campioni considerati.

## Bibliografia

- Amarowicz R., Shahidi F. 1996. A rapid chromatographic method for separation of individual catechins from green tea. *Food Res. Int.*, 29:71-76.
- Andrewes P., Busch J.L.H.C., de Joode T., Groenewegen A., Alexandre H. 2003. Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of Deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *J. Agric. Food Chem.*, 51:1415-1420.
- Aparicio R., Roda L., Albi M. A., Gutierrez F. 1999. Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *J. Agric. Food Chem.*, 47:4150-4155.
- Aruoma O.I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxic.*, 32:671-683.
- Basu A.K., Marnett L.J., Romano L.J. 1984. Dissociation of malondialdehyde mutagenicity in *Salmonella typhimurium* from its ability to induce interstrand DNA cross-links. *Mutat Res.*, 129:39-46.
- Bell J.R.C., Donovan J.L., Wong R., Waterhouse A.L., German J.B., Walzen J.R. 2000. (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71:103-108.
- Brenes M., García A, García P, Garrido A. 2000. Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by means of a colorimetric electrode array system. *J. Agric. Food Chem.*, 48:5178-5183.
- Burton G.W., Ingold K.U. 1984. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224:569-573.
- Chimi H., Cillard J., Cillard P, Rahmani M. 1991. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68:307-312.
- Cinquanta L., Esti M., La Notte E. 1997. Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74:1259-1264.
- Clough R.L., Yee B.G., Foote C.S. 1979. Chemistry of singlet oxygen 30. The unstable primary product of tocopherols photooxidation. *J. Am. Chem. Soc.*, 101:683-686.
- Crawford D.L., Yu T.C., Sinnhuber R.O. 1967. Reaction of malonaldehyde with protein. *J. Food Sci.*, 32:332-335.
- Cul J., Juhasz B, Tosaki A. 2002. Cardioprotection with grapes. *J. Cardio. Pharm.*, 40:762-769.
- Cuppett S., Schnepf M., Hall III C. 1997. Natural Antioxidants: An Overview. In: Shahidi F.(Ed.): *Natural Antioxidants – Chemistry, Health Effects, and Applications*, 13-24. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Das N.P., Pereira T.A. 1990. Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure activity relationship. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67:255-258.
- Di Stefano R., Cravero M.C., Gentilizi N. 1989. Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L'Enotecnico*, 5:83-89.
- Dziedzic, S.Z., Hudson B.J.F. 1984. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry*, 14:45-51.
- Foote C.S., Chang Y.C., Denny R.W. 1970. Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. *J. Am. Chem. Soc.*, 92:5216-5218.
- Frankel E.N. 1991. Recent Advances in Lipid Oxidation. *J. Sci. Food Agric.*, 54:495-511.
- Fukuda Y., Osawa T., Namiki M., Ozaki T. 1985. Studies on Antioxidant Substances in Sesame Seed. *Agric. Biol. Chem.*, 49:301-306.
- Fujimoto K., Neff W.E., Frankel E.N. 1984. The reaction of DNA with lipid oxidation products, metals and reducing agents. *Biochim. Biophys. Acta*, 795:100-107.
- Gambacorta G., Faccia M., Pati S., Lamacchia C., Baiano A., La Notte E. 2007. Changes in the chemical and sensorial profile of extra virgin olive oils flavored with herbs and spices during storage. *J. Food Lipid*, 14:202-215.
- Gambacorta G., Previtali M.A., Pati S., Baiano A., La Notte E. 2006. Characterization of the phenolic profiles of some monovarietal extra virgin olive oils of Southern Italy. *Proceedings XXIII International Conference on Polyphenols*. Winnipeg, Manitoba, Canada, 393-394.
- Gomes-Alonso S., Salvador M.D., Fregapanè G. 2002. Phenolic compounds profile of Cornicabra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, 50:6812-6817.
- Grams G.W., Eskin K., Ihglett G.H. 1972. Dye-sensitized photooxidation of  $\alpha$ -tocopherol. *J. Am. Chem. Soc.*, 94:866-868.
- Hudson B.J.F., Lewis J.I. 1983. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity. *Food Chem.*, 10:47-55.
- Jitoe A., Masuda T., Tengah I.G.P., Suptapta D.N., Gara I.W., Nakatani N. 1992. Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids. *J. Agric. Food Chem.*, 40:1337-1340.
- Kasuga A., Aoyagi Y., Sugahara T. 1988. Antioxidant activities of edible plants. *Nippon Shokuhin Gakkai-shi*, 35:828.
- Katalinic V., Milos M., Modun D., Music I., Boban M. 2004. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chem.*, 86:593-600.
- Kinsella J.E., Frankel E.N., German J.B., Kanner J. 1993. Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Techn.*, 47:467-469.

- Marinova E.M., Yanishieva N.V. 1994. Effect of lipid unsaturation on the antioxidative activity of some phenolic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71:427-434.
- Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Miller A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 84:407-412.
- Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M., Miniati E. 1992. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. I. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 40:1571-1576.
- OIV 2006. Progetti di Risoluzioni – Tappa 5 – Metodo n. ENO/SCMAV/03/269, Metodo rapido di valutazione del potere antiradicalico dei vini e delle acquaviti mediante l'uso di DPPH.
- OIV 2006. Progetti di Risoluzioni – Tappa 5 – Metodo n. ENO/SCMAV/04/298, Stima e quantificazione dei composti fenolici dei vini.
- Packer L. 1996. Molecular mechanisms and health effects. *Symposium International: Natural Antioxidants*. AOCS Press, Champaign, IL, 1996, 9-23.
- Ramarathnam N., Osawa T., Namiki M., Kawakishi S. 1989. Chemical studies on novel rice hull antioxidants II. Identification of isovitexin, AC-glycosyn flavonoid. *J. Agric. Food Chem.*, 37:316-319.
- Scott G. 1985. Antioxidants in vitro and in vivo. *Chem. Br.*, 21:648-653.
- Shahidi F. 1997. Natural Antioxidants: An Overview. In: Shahidi F. (ed.): *Natural Antioxidants – Chemistry, Health Effects, and Applications*, 1-11. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Shahidi F., Pegg R.B., Saleemi Z.O. 1995. Stabilization of meat lipids with ground spices. *J. Food Lipids*, 2:145-153.
- Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16:144-158.
- Terao J. 1989. Antioxidant activity of beta-carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, 24:659-661.
- Visioli F., Poli A., Galli C. 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.*, 22:75-65.
- Visioli F., Bellosta S., Galli C. 1998. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci.*, 62:541-546.
- von Gadow A., Joubert E., Hansmann C.F. 1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 45:632-638.
- Wanasundara U., Amarowicz R., Shahidi F. 1994. Isolation and identification of an antioxidative component on Canola Meal. *J. Agric. Food Chem.*, 42:1285-1290.
- Wu J.W., Lee M.-T., Ho C.-T., Chang S.S. 1982. Elucidation of chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59:339-345.