

*Alma Mater Studiorum – Università di Bologna*

***Università degli Studi di Perugia (sede consorziata)***

***DOTTORATO DI RICERCA IN***

**SCIENZE E BIOTECNOLOGIE DEGLI ALIMENTI**

Ciclo XXIV

**Settore Concorsuale di afferenza: 07/F1**

**Settore Scientifico disciplinare: AGR/15**

TITOLO TESI

**INDIVIDUAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI  
PRODOTTI DI DEGRADAZIONE OSSIDATIVA DEI  
SECOIRIDOIDI CONTENUTI NELL'OLIO VERGINE DI  
OLIVA MEDIANTE TECNICHE ANALITICHE  
INNOVATIVE**

**Presentata da: Dott.ssa Ilona Di Maio**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. C. CAVANI**

**Relatore**

**Prof. M. SERVILI**

**Esame finale anno 2012**

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>1.1</b>	<b>L'olio d'oliva: composizione chimica</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>I composti fenolici dell'oliva e dell'olio</b>	<b>5</b>
1.2.1	Trasformazione dei composti fenolici	12
<b>1.3</b>	<b>Proprietà biologiche dei polifenoli dell'olio vergine di oliva</b>	<b>16</b>
1.3.1	Proprietà sensoriali	16
1.3.2	Proprietà salutistiche	17
1.3.3	Attività antiossidante	21
<b>1.4</b>	<b>Analisi quali-quantitativa delle sostanze fenoliche dell'olio vergine di oliva</b>	<b>26</b>
1.4.1	Analisi qualitativa dei prodotti di ossidazione delle sostanze fenoliche	29
<b>1.5</b>	<b>Applicazione della spettrometria di massa in campo alimentare e biochimico</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Campioni</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Reagenti</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>Reazione di ossidazione di Fenton (Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	<b>38</b>
<b>3.4</b>	<b>Reazione di ossidazione enzimatica</b>	<b>38</b>
<b>3.5</b>	<b>Autossidazione dell'olio vergine di oliva</b>	<b>39</b>

<b>3.6</b>	<b>Analisi HPLC-DAD-ESI-MS</b>	<b>40</b>
3.6.1	Analisi Ultra High Definition (UHD) Accurate–Mass Q–TOF LC/MS	41
<b>4</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>p-HPEA (1)</b>	<b>42</b>
4.1.1	Reazione di ossidazione enzimatica	42
4.1.2	Reazione di ossidazione di Fenton ( $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ )	48
<b>4.2</b>	<b>3,4-DHPEA (2)</b>	<b>49</b>
4.2.1	Reazione di ossidazione enzimatica	49
4.2.2	Reazione di ossidazione di Fenton ( $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ )	51
<b>4.3</b>	<b>3,4-DHPEA-EDA (1a)</b>	<b>57</b>
4.3.1	Reazione di ossidazione enzimatica	57
4.3.2	Reazione di ossidazione di Fenton ( $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ )	61
<b>4.4</b>	<b>Olio vergine di oliva</b>	<b>62</b>
4.4.1	Prodotti di ossidazione dell'olio vergine di oliva durante il processo di autossidazione	62
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>79</b>

# 1 INTRODUZIONE

## *Un po' di storia...*

L'origine della coltivazione dell'ulivo, pianta tipica del Mediterraneo, si colloca nella notte dei tempi. Ricerche archeologiche datano V millennio a.C. le prime piante in Israele; è infatti, nella Genesi la testimonianza più antica dell'esistenza dell'ulivo.

Molto più tardi (V secolo a.C.), Grecia, Turchia, Siria e Palestina fecero dell'olio d'oliva la fonte primaria della loro civiltà e della loro ricchezza. E' proprio con la colonizzazione greca dell'Italia Meridionale, a partire dall'VIII sec. a.C., che la coltivazione dell'ulivo viene introdotta in quella che era la Magna Grecia.

Saranno poi i Romani a diffondere in tutto il loro Impero la coltivazione dell'ulivo il cui prodotto finirà per assicurare un ruolo sempre più sostanziale nell'economia generale dell'Impero.

Ancora oggi il nostro paese rientra tra le tre più importanti nazioni al mondo per la produzione di olio d'oliva (Alonso-Salces *et al.*, 2010).

I gusti e i sapori degli oli italiani sono molto diversi e hanno una notevole peculiarità a seconda della regione di provenienza, dall'Italia settentrionale con un olio dal gusto abbastanza pronunciato e fruttato, all'Italia meridionale con un olio dal gusto e sapore pieno e deciso.

Ciò che contraddistingue la qualità dell'olio d'oliva sono sicuramente gli aspetti organolettici e sensoriali facilmente percepibili dal consumatore: l'olio per essere giudicato di qualità deve soddisfare certe esigenze; esigenze sicuramente nutrizionali, ma che abbracciano anche l'aspetto edonistico e culturale. La qualità nutrizionale risponde al requisito attualmente auspicato a diversi livelli "mangiare bene per stare bene". L'olio infatti, possiede una composizione in macro e microelementi ottimale per la fisiologia umana per la presenza di principi attivi salutistici in particolare caroteni, tocoli e sostanze fenoliche che per le loro

caratteristiche di antiossidanti naturali rivestono un ruolo fondamentale nella nostra dieta (Owen *et al.*, 2000; Servili *et al.*, 2009).

### ***1.1 L'olio d'oliva: composizione chimica***

La gran parte della composizione chimica dell'olio vergine d'oliva è data dalla frazione saponificabile dei gliceridi che rappresenta più del 98% del suo peso totale. La restante parte della composizione è data dalla frazione così detta dei costituenti minori, che rappresenta con le sue 230 sostanze chimiche tra alcoli alifatici e triterpenici, steroli, idrocarburi, composti volatili e sostanze antiossidanti, il 2% in peso dell'olio. I maggiori composti antiossidanti dell'olio vergine di oliva sono i carotenoidi e i polifenoli che includono fenoli lipofili ed idrofili (Boskou, 1996; Shahidi, 1996).

Tra i carotenoidi maggiore importanza rivestono il  $\beta$ -carotene e la luteina, per quanto riguarda i fenoli lipofili, gli oli estratti dalle olive contengono quasi esclusivamente tocoferoli, in particolare l' $\alpha$ -tocoferolo, che oltre a svolgere la sua attività di antiossidante, possiede proprietà vitaminiche (Cortesi *et al.*, 1997).

La concentrazione dei tocoferoli nell'olio dipende principalmente dallo stato di maturazione del frutto al momento della raccolta. E' stato, infatti, evidenziato come quanto più la maturazione è avanzata, tanto minore è la concentrazione dei tocoferoli nell'olio d'oliva (García *et al.*, 1996). A differenza dei tocoferoli, che sono contenuti anche in altri oli vegetali, alcuni fenoli idrofili sono caratteristici dell'olio vergine di oliva, e gli conferiscono peculiari proprietà sensoriali e salutistiche che lo rendono un prodotto unico (Boskou, 1996; Shahidi, 1996).

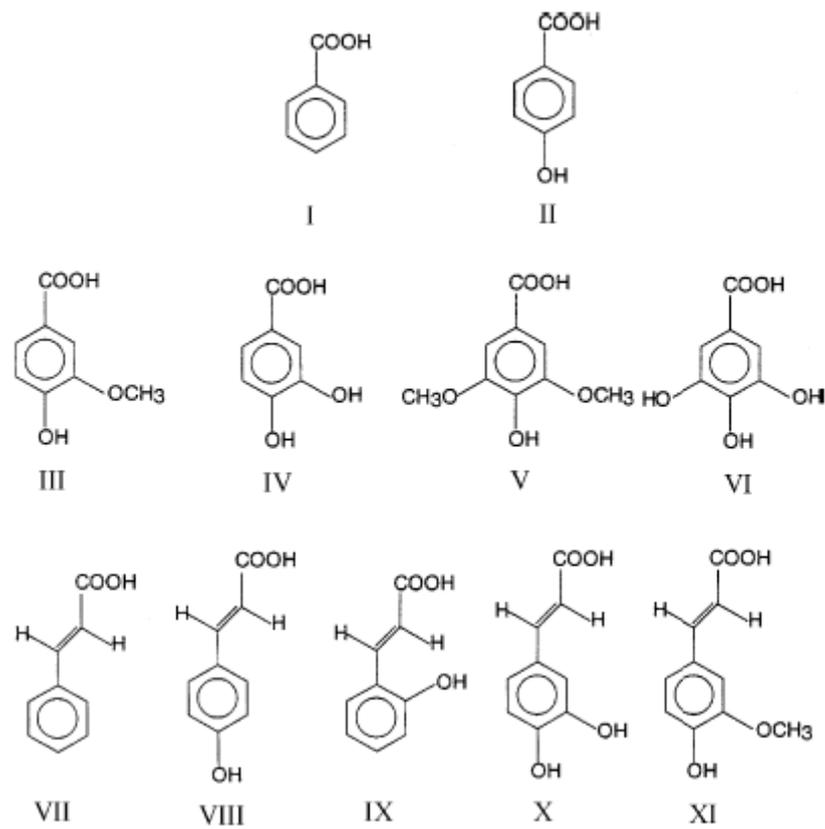
## 1.2 I composti fenolici dell'oliva e dell'olio

L'olio vergine di oliva contiene specifiche classi di fenoli idrofili tra cui acidi e alcoli fenolici, idrossi-isocromani, flavonoidi, secoiridoidi e lignani (Tabella 1).

**Tabella 1.** Composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva.

<b>Acidi fenolici e derivati</b>	<b>Alcoli Fenolici</b>	
Acido Vanillico	(3,4-Diidrossifenil)etanolo (3,4 DHPEA)	
Acido Siringico	(p-Idrossifenil)etanolo (p-HPEA)	
Acido p-Cumarico	(3,4-Diidrossifenil)etanolo-Glucoside	
Acido p-Cumarico		<b>Flavonoidi</b>
Acido Gallico		Apigenina
Acido Caffeico	(+)-1-Acetossipinoresinolo	Luteolina
Acido Protocatechico	(+)-Pinoresinolo	
Acido p-Idrossibenzoico		
Acido Ferulico		
Acido Cinnammico		
4-(acetossietil)-1,2-diidrossibenzene		
Acido Benzoico		
<b>Derivati dei Secoiridoidi</b>		
Forma dialdeidica dell' acido decarbossimetil elenolico legato al 3,4-DHPEA ( 3,4 DHPEA-EDA)		
Forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato al p-HPEA (p-HPEA-EDA)		
Oleuropeina Aglicone (3,4 DHPEA-EA)		
Ligustroside Aglicone		
Oleuropeina Aglicone (3,4 DHPEA-EA)		
p-HPEA-Derivati		
Forma dialdeidica dell'oleuropeina aglicone		
Forma dialdeidica del ligustroside aglicone		

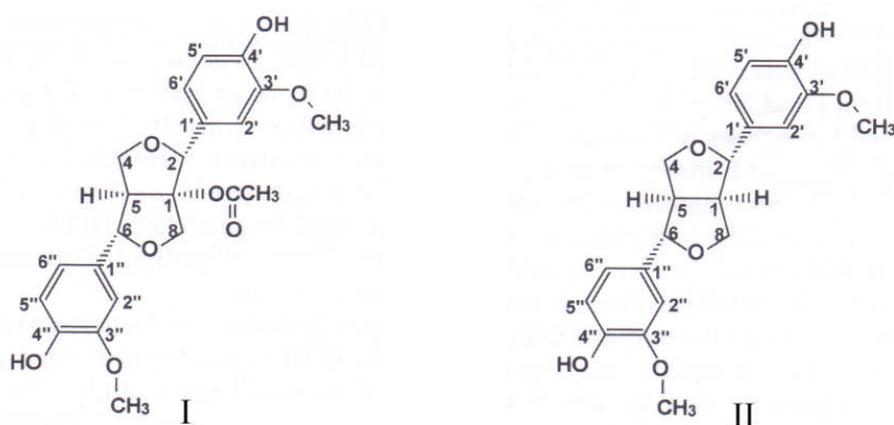
Gli acidi fenolici rappresentati da acido caffeico, vanillico, siringico, *p*-cumarico, *o*-cumarico, protocatetico, sinapico, *p*-idrossibenzoico e gallico, sono il primo gruppo di composti fenolici trovati nell'olio vergine di oliva (Montedoro *et al.*, 1992a; Tsimidou *et al.*, 1996; Servili *et al.*, 2004) (Fig.1).



**Figura 1.** Struttura chimica dei principali acidi fenolici: acido benzoico [I], acido p-idrossibenzoico [II], acido vanillico [III], acido protocatechico [IV], acido sirringico [V], acido gallico [VI], acido cinnamico [VII], acido p-cumarico [VIII], acido o-cumarico [IX], acido caffeico [X], acido ferulico [XI].

Alla classe degli alcoli fenolici appartengono l'idrossitirosolo (3,4-diidrossifenil)etanolo detto anche 3,4-DHPEA e il tirosolo (*p*-idrossifenil)etanolo detto anche *p*-HPEA (Montedoro *et al.*, 1992a). Gli acidi fenolici insieme agli alcoli, agli idrossi-isocromani e ai flavonoidi (apigenina, luteolina) sono contenuti in minore quantità nell'olio vergine di oliva rispetto ai secoiridoidi e ai lignani (Bianco *et al.*, 2001).

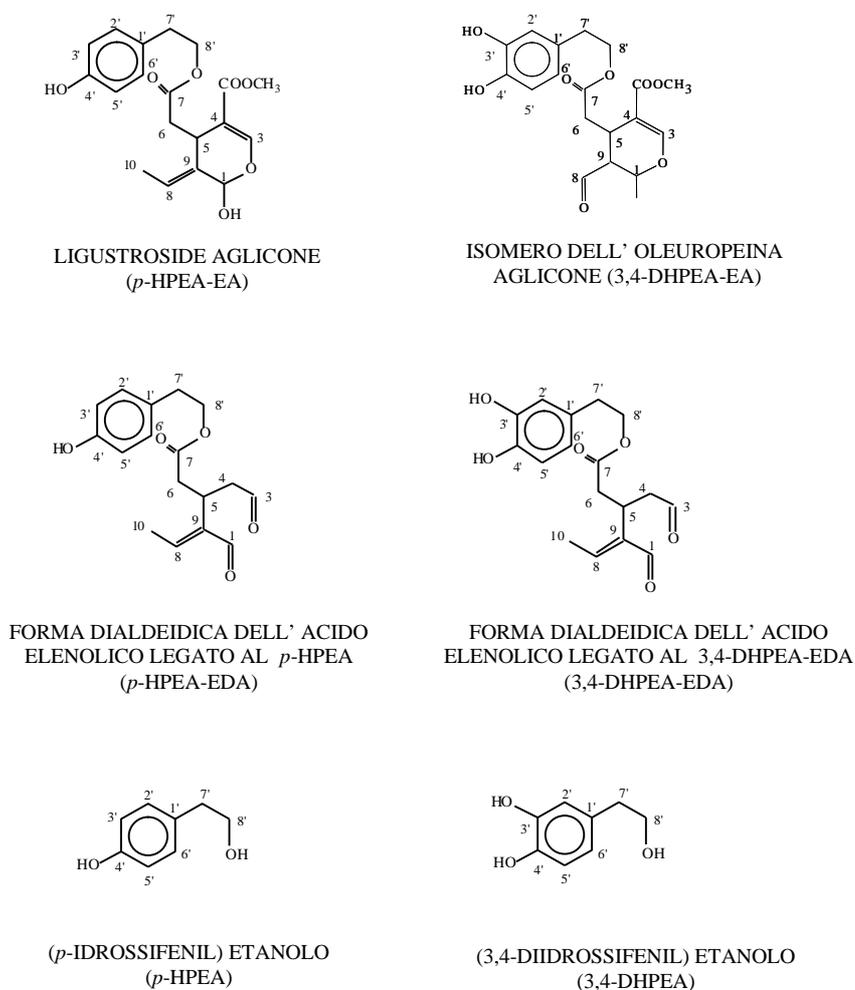
I lignani includono (+)-1-acetossipinoresinolo e (+)-pinoresinolo (Owen *et al.*, 2000; Brenes *et al.*, 2000a; Servili *et al.*, 2009) (Fig. 2). Questi composti sono contenuti nella polpa di oliva e nella porzione legnosa del seme, vengono trasferiti nell'olio durante il processo di estrazione meccanica. La loro concentrazione nell'olio è fortemente influenzata dalle condizioni agronomiche di coltivazione degli ulivi, mentre a differenza dei secoiridoidi non risente dei parametri tecnologici di estrazione (Servili *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Struttura chimica dei lignani presenti nell'olio vergine di oliva: I (+)-1-acetossipinoresinolo II (+)-1-pinoresinolo (Owen *et al.*, 2000).

I secoiridoidi sono i composti prevalenti dell'olio vergine d'oliva, sono infatti contenuti in maggiore quantità nell'olio, dove ritroviamo in particolare, la forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato all'idrossitirosolo o al tirosolo (3,4-DHPEA-EDA o *p*-HPEA-EDA), un isomero dell'oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EA) e il ligustroside aglicone (*p*-HPEA-EA) (Montedoro *et al.*,

1992a; Montedoro *et al.*, 1992b; Montedoro *et al.*, 1993; Angerosa *et al.*, 1996; Owen *et al.*, 2000) (Fig. 3).



**Figura 3.** Struttura chimica dei secoiridoidi derivati e dei fenil-alcoli presenti nell'olio vergine di oliva (Servili *et al.*, 2009).

Queste sostanze sono derivati agliconici dei secoiridoidi glucosidi contenuti nel frutto dell'oliva, si originano durante il processo di estrazione meccanica dell'olio a

partire dall'oleuropeina, demetil oleuropeina e dal ligustroside per idrolisi catalizzata dalle  $\beta$ -glucosidasi endogene (Montedoro *et al.*, 2002).

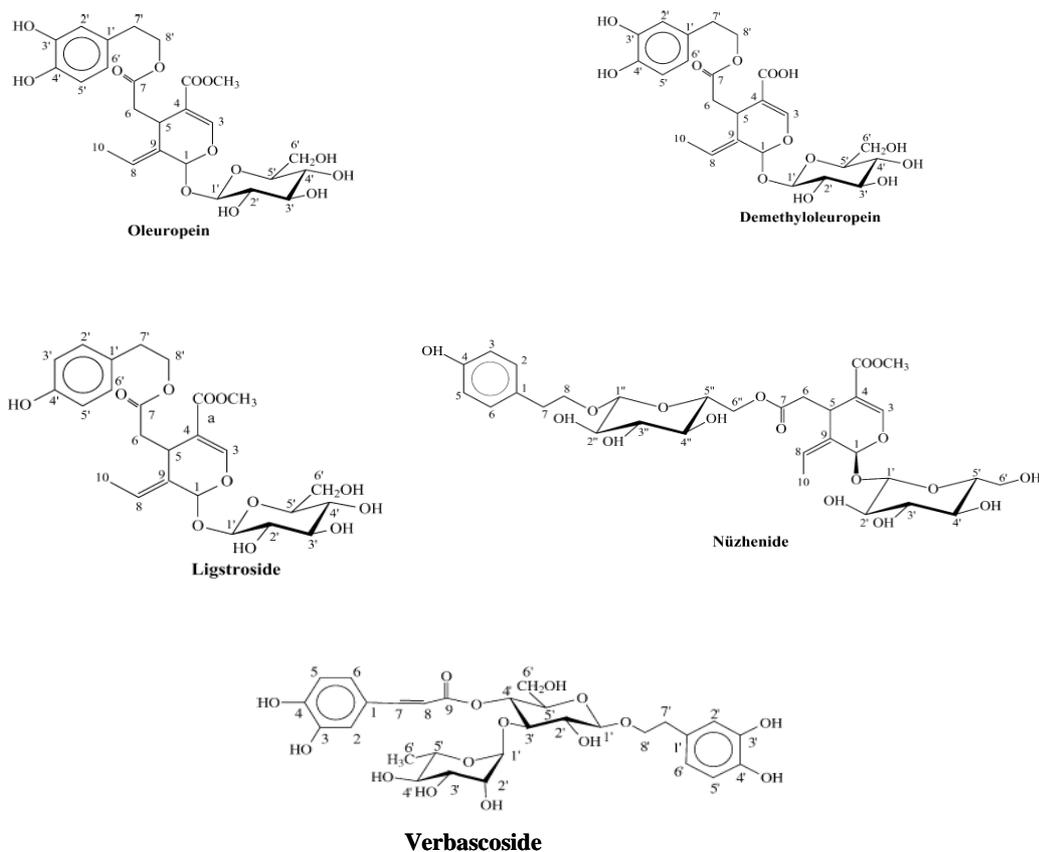
La drupa infatti, contiene alte concentrazioni di composti fenolici che possono raggiungere valori compresi tra 1 e 3% del peso fresco della polpa (Garrido Fernández *et al.*, 1997). Come riportato nella tabella 2, le classi più importanti di fenoli idrofili presenti nella drupa sono acidi fenolici, in particolare i derivati dell'acido benzoico a struttura C6-C1 e dell'acido cinnamico a struttura C6-C3 (Garrido Fernández *et al.*, 1997), alcoli fenolici, flavonoidi e secoiridoidi. Il 3,4-DHPEA e il *p*-HPEA sono i fenil alcoli più abbondanti (Addis, 1986; Haigh, 1986); la loro concentrazione è generalmente bassa nell'olio fresco e tende ad aumentare durante la fase di stoccaggio (Montedoro *et al.*, 1992a) per effetto dell'idrolisi a carico dei secoiridoidi quali 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA.

**Tabella 2.** Principali classi di composti fenolici idrofili del frutto

<b>Antociani</b>	<b>Flavonoidi</b>
Cianidina-3-glucoside	Quercetina-3-rutinoside
Cianidina-3-rutinoside	<b>Flavoni</b>
Cianidina-3-caffeilglucoside	Luteolina-7-glucoside
Cianidina-3-caffeilrutinoside	Luteolina-5-glucoside
Delfinidina 3-ramnosioglucoside-7-xilosio	Apigenina-7-glucoside
<b>Acidi Fenolici</b>	<b>Alcoli Fenolici</b>
Acido clorogenico	(3,4-Diidrossifenil)etanolo (3,4 DHPEA)
Acido caffeico	<i>p</i> -(Idrossifenil)etanolo ( <i>p</i> -HPEA)
Acido <i>p</i> -idrossibenzoico	<b>Secoiridoidi</b>
Acido protocatechico	Oleuropeina
Acido vanillico	Demetioleuropeina
Acido siringico	Ligustroside
Acido <i>p</i> -cumarico	Nüzhenide
Acido <i>o</i> -cumarico	<b>Derivati dell' Acido Idrossicinnamico</b>
Acido ferulico	Verbascoside
Acido sinapico	
Acido benzoico	
Acido cinnammico	
Acido gallico	

I flavonoidi includono flavoni glucosidi come la luteolina 7-glucoside e la rutina, e gli antociani come la cianidina e la delphinidina glucoside (Servili *et al.*, 2006). Mentre i flavonoidi, gli alcoli e gli acidi fenolici si possono ritrovare in diverse famiglie botaniche i secoiridoidi, al contrario, sono esclusivi delle specie appartenenti alla famiglia delle *Oleaceae*.

I composti fenolici classificati come secoiridoidi sono caratterizzati dalla presenza, nella loro struttura molecolare, dell'acido elenolico o di suoi derivati (Garrido Fernández *et al.*, 1997). L'oleuropeina, la demetiloleuropeina, il ligustroside e il nüzhenide sono i secoiridoidi più abbondanti della drupa. (Gariboldi *et al.*, 1986; Garrido Fernández *et al.*, 1997). Panizzi *et al.* (1960) hanno assegnato la struttura chimica all'oleuropeina, la demetiloleuropeina è stata isolata e caratterizzata per la prima volta da Ragazzi *et al.* (1973), mentre il ligustroside da Kubo e Matsumoto (1984) (Fig. 4). L'oleuropeina, il ligustroside aglicone e le loro forme dialdeidiche sono stati identificati anche come fenoli idrofili minori dell'olio vergine di oliva (Perri *et al.*, 1999; Owen *et al.*, 2000; Rovellini *et al.*, 2002). Il frutto, tra i composti fenolici principali, contiene anche il verbascoside, un derivato dell'acido idrossicinnamico che contiene il 3,4-DHPEA nella sua struttura molecolare (Servili *et al.*, 1999a), assegnata da Andary *et al.* (1982) e confermata da Servili *et al.* (1999b) (Fig. 1). Ryan *et al.* (1999) hanno identificato nel frutto dell'oliva diverse forme isomeriche del verbascoside. L'oleuropeina, la demetiloleuropeina e il verbascoside sono contenuti principalmente nella polpa, ma si ritrovano anche nelle altre parti costitutive del frutto, buccia e seme, mentre il nüzhenide, caratterizzato da Servili *et al.* (1999b) (Fig. 4) è stato ritrovato solo nel seme. Diversi derivati agliconici dell'oleuropeina e della demetiloleuropeina, come la forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legata al 3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA) e un isomero dell'oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EA) sono stati identificati nella polpa delle olive anche se in quantità decisamente ridotte rispetto ai più abbondanti secoiridoidi glucosidi (oleuropeina e demetiloleuropeina) (Servili *et al.*, 1999b; Romani *et al.*, 1999; Ryan *et al.*, 2003).



**Figura 4.** Struttura chimica dei secoiridoidi del frutto

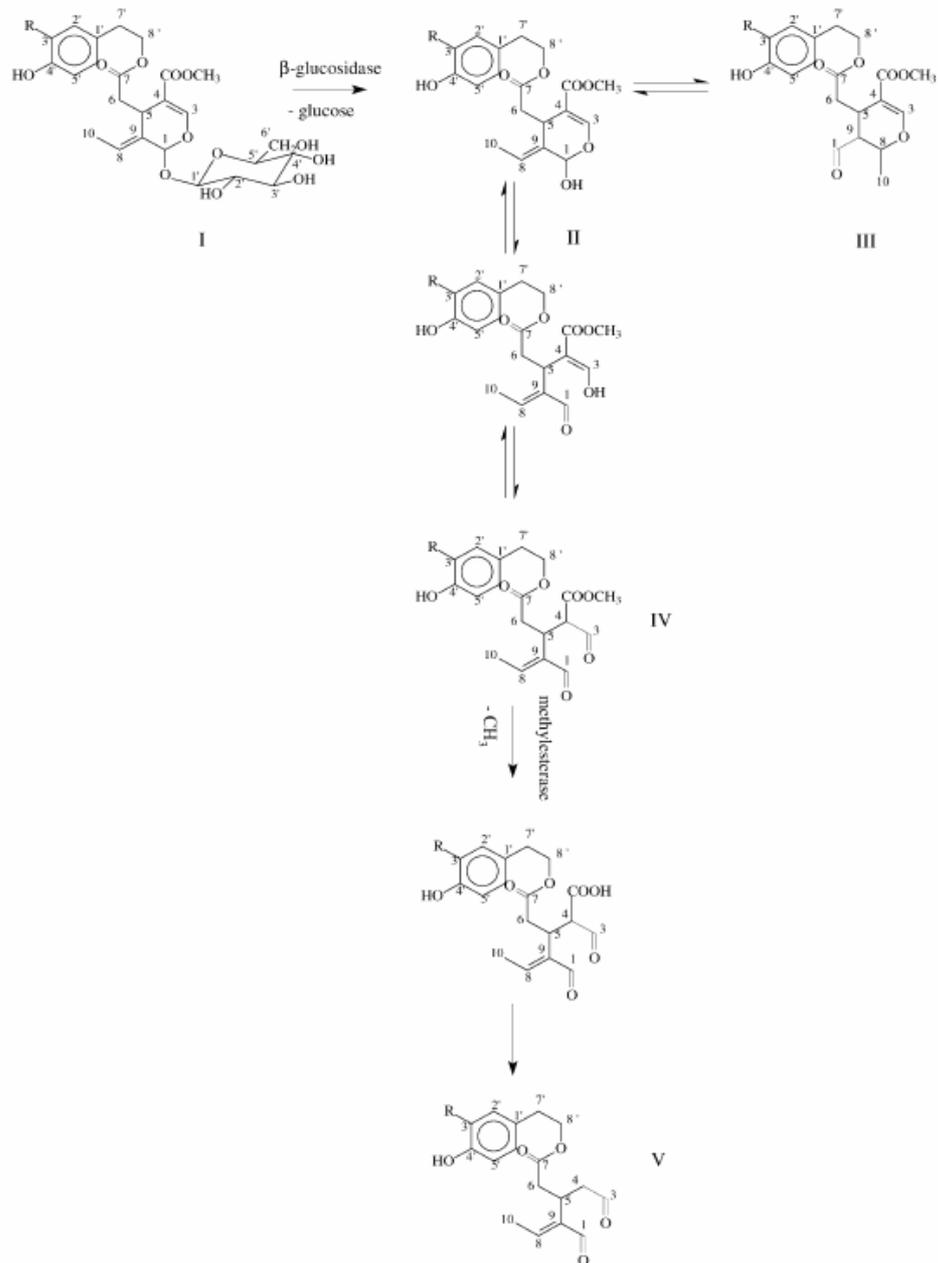
La concentrazione delle sostanze fenoliche è largamente influenzata dalle condizioni agronomiche e tecnologiche di produzione dell'olio vergine di oliva. In particolare varietà, stadio di maturazione, origine geografica delle olive e pratiche di irrigazione degli ulivi, sono i principali aspetti agronomici che possono modificare la composizione in secoiridoidi dell'olio vergine di oliva. Le fasi critiche del processo di estrazione meccanica dell'olio invece, sono la frangitura, la gramolatura e la separazione che causano una grande variazione della concentrazione dei secoiridoidi dell'olio vergine di oliva (Servili *et al.*, 2004; Servili *et al.*, 2007a; Servili *et al.*, 2007b).

La presenza delle sostanze fenoliche idrofile nell'olio vergine di oliva è un aspetto fondamentale della sua qualità che è strettamente correlata con numerose e specifiche funzioni di questi composti. Alcune sostanze fenoliche dell'olio hanno un'elevata incidenza sulla sua resistenza all'ossidazione e quindi sulla sua shelf-life (Servili *et al.*, 2006). I risultati sperimentali ottenuti hanno evidenziato che la stabilità dell'olio all'ossidazione è legata ai derivati dell'oleuropeina e della demetiloleuropeina, mentre l'incidenza di altri componenti quali i tocoferoli, i lignani e i derivati del ligustroside risulta, in questo contesto, marginale (Servili *et al.*, 2009).

### **1.2.1 Trasformazione dei composti fenolici**

La presenza dei fenoli idrofili nell'olio vergine di oliva è strettamente legata all'attività di diversi enzimi endogeni del frutto; perciò la loro concentrazione nell'olio oltre che ad essere influenzata da diversi fattori agronomici quali cultivar, maturazione del frutto, condizioni pedo-climatiche di produzione, e pratiche di irrigazione (Uceda *et al.*, 1999; Tovar *et al.*, 2001; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2010) dipende fortemente dalle condizioni di estrazione. La frangitura e la gramolatura sono due punti critici del processo di estrazione meccanica dell'olio vergine di oliva (Servili *et al.* 2004).

I secoiridoidi agliconi quali il 3,4-DHPEA-EDA, il p-HPEA-EDA, il p-HPEA-EA e il 3,4-DHPEA-EA si originano durante la fase di frangitura per idrolisi dell'oleuropeina, della demetiloleuropeina e del ligustroside; la reazione è catalizzata dalle  $\beta$ -glucosidasi endogene, in accordo con il meccanismo riportato in figura 5 (Lo Scalzo *et al.*, 1993; Uccella *et al.*, 1999).



**Figura 5.** Biogenesi dei secoiridoidi agliconi. (I) R = H: ligstroside; R = OH: oleuropeina; (II) R= H: p-HPEA-EA; (III) R= OH: 3,4-DHPEA-EA; (IV) R = H: dialdehydic form of ligstroside aglycon; R = OH: dialdehydic form of oleuropein aglycon; (V) R = H: p-HPEA-EDA; R = OH: 3,4-DHPEA-EDA.

Durante la fase di gramolatura la concentrazione del 3,4-DHPEA-EDA, del 3,4-DHPEA-EA e degli alcoli fenolici diminuisce nelle paste e negli oli con l'aumentare del tempo e della temperatura di processo (Bianco *et al.*, 2001; Angerosa *et al.*, 2001; Di Giovacchino *et al.*, 2002; Servili *et al.*, 2004). Nel corso della gramolatura i secoiridoidi vanno incontro a processi di ossidazione enzimatica per l'attivazione di alcuni enzimi endogeni (Servili *et al.*, 2007b) quali polifenolossidasi e perossidasi.

L'ossidazione dei fenoli ad opera della perossidasi avviene attraverso la formazione di radicali fenossi che dopo riarrangiamento e reazioni di accoppiamento con diversi substrati presenti nella matrice alimentare porta alla formazione di dimeri, oligomeri e polimeri (Ward *et al.*, 2001).

Studi effettuati sull'acido ferulico hanno dimostrato che dopo l'ossidazione iniziale le successive reazioni di accoppiamento sembrerebbero essere determinate dalla chimica dei radicali fenossi dell'acido ferulico, indipendentemente dall'enzima (Ward *et al.*, 2001).

Durante la fase di stoccaggio invece, può instaurarsi il processo di autossidazione non enzimatico a causa della presenza dell'ossigeno, dell'esposizione alla luce e della temperatura (Cilliers e Singleton, 1991).

Sempre durante questa fase si possono instaurare anche fenomeni idrolitici di natura non enzimatica che provocando la rottura del legame estereo nella molecola dei secoiridoidi agliconi porterebbero alla formazione di tirosolo e idrossitirosolo libero. Nel tempo infatti, si ha una diminuzione della concentrazione di questi secoiridoidi e un aumento della concentrazione di tirosolo e idrossitirosolo liberi (Brenes *et al.* 2001; Psomiadou *et al.*, 2002; Lavelli *et al.*, 2006). Risultati sperimentali in tal senso hanno messo in evidenza che la concentrazione di questi fenoli semplici mostra nel tempo un andamento a campana; inoltre, il loro aumento nell'olio vergine di oliva è molto meno marcato rispetto alla diminuzione del contenuto in secoiridoidi, questo indicherebbe che nel tempo si instaurano a carico

delle sostanze fenoliche sia processi di degradazione idrolitica che ossidativa (Lavelli *et al.*, 2006; Di Maio *et al.*, 2011).

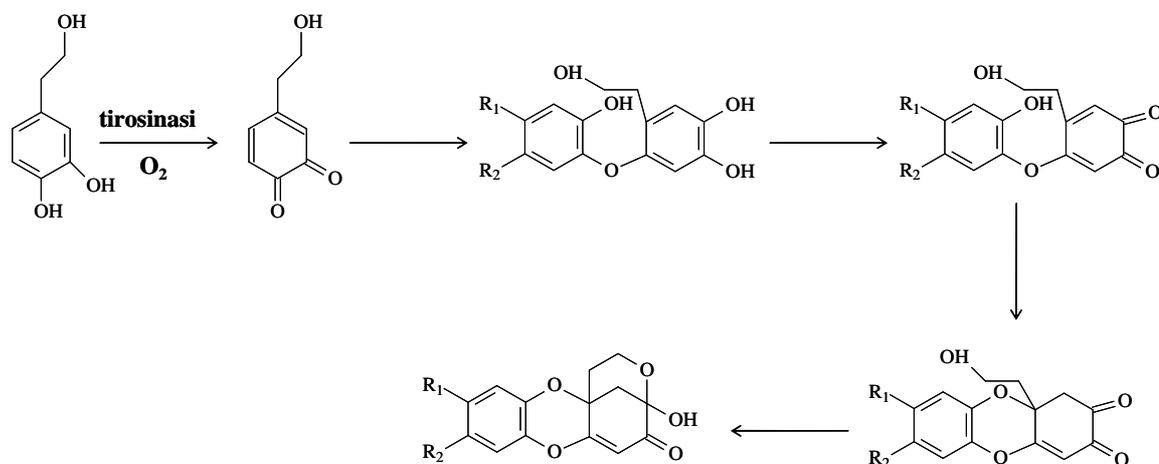
Come riportato da Di Maio *et al.* (2011) l'ossidazione non enzimatica dell'idrossitirosolo porta alla formazione del corrispondente *o*-chinone che essendo altamente instabile va incontro a reazioni di dimerizzazione e di polimerizzazione. Una volta che il chinone si è formato la reazione procede alla stessa maniera sia che il chinone è stato prodotto enzimaticamente, come nel caso della polifenolossidasi, che non enzimaticamente.

Le reazioni di dimerizzazione e di polimerizzazione coinvolgono anche le sostanze fenoliche; in letteratura l'accoppiamento ossidativo di *o*- e *p*-diidrossifenoli con conseguente formazione di prodotti di addizione in diverse posizioni dell'anello benzenico è ben documentato (Cilliers *et al.*, 1991; Ward *et al.*, 2001; Antolovich *et al.* 2004).

In uno studio condotto da Tazaki *et al.* (2001) è stato dimostrato che l'accoppiamento ossidativo tra i radicali fenossi dell'acido caffeico preso come sistema modello e l'*o*-chinone avviene in maniera random.

In figura 6 è riportato uno schema del possibile meccanismo dell'accoppiamento ossidativo tra l'idrossitirosolo e il suo chinone. Secondo lo studio condotto da Vogna *et al.* (2003) l'ossidazione dell'idrossitirosolo catalizzata dall'enzima tirosinasi porterebbe alla formazione di due regioisomeri.

I fenomeni di degradazione ossidativa sia di natura enzimatica che non enzimatica hanno effetti negativi sulle proprietà sensoriali e salutistiche dell'olio vergine di oliva, nonché sulla sua shelf-life (Servili *et al.*, 2004).



**Figura 6.** Possibile meccanismo di formazione del dimero della reazione di ossidazione enzimatica del 3,4 DHPEA. R1 = H, R2 = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; R1 = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, R2 = H. (Vogna *et al.*, 2003).

### 1.3 Proprietà biologiche dei polifenoli dell'olio vergine di oliva

Lo spiccato interesse verso gli antiossidanti dell'olio vergine di oliva deriva dal loro coinvolgimento in importanti attività biologiche che trovano riscontro sia a livello clinico che nutrizionale (Cornwell *et al.*, 2008). A questo si aggiunge l'importante azione protettiva nei confronti dell'alimento in quanto, ritardando i processi di natura ossidativi, hanno un benefico effetto sulla *shelf-life*.

#### 1.3.1 Proprietà sensoriali

Le proprietà organolettiche dell'olio vergine di oliva sono fortemente influenzate dalla sua composizione fenolica. Queste sostanze sono responsabili delle note di amaro e di pungenza dell'olio vergine di oliva (Kiritsakis, 1998; García *et al.* 2001).

Negli ultimi 10 anni diversi autori hanno studiato l'impatto sensoriale dei derivati dei secoiridoidi dell'olio vergine di oliva.

I derivati dell'oleuropeina e della demetiloleuropeina come il 3,4-DHPEA-EDA e il 3,4-DHPEA-EA sono i principali responsabili della nota di amaro dell'olio vergine di oliva (Kiritsakis, 1998; García *et al.* 2001).

Tovar *et al.* (2001) hanno evidenziato una forte correlazione tra le note gustative di amaro e di pungente e il *p*-HPEA-EDA.

Studi condotti da Gutiérrez-Rosales *et al.* (2003) hanno confermato che il 3,4-DHPEA-EDA, il 3,4-DHPEA-EA e il *p*-HPEA-EDA sono i composti maggiormente correlabili al gusto amaro dell'olio vergine di oliva.

Andrewes *et al.* (2003) hanno studiato la nota sensoriale di pungenza. Dopo aver isolato dall'olio vergine di oliva i derivati dei secoiridoidi hanno dimostrato che le frazioni contenenti *p*-HPEA-EDA producono una forte sensazione di bruciore/pungenza al contrario delle frazioni contenenti 3,4-DHPEA-EDA, dove questa sensazione è leggera e percepibile maggiormente sulla lingua. Quindi questi autori hanno concluso che il *p*-HPEA-EDA è il composto in assoluto più responsabile della nota gustativa di bruciore/pungenza; questo risultato è stato confermato da Beauchamp *et al.* (2005).

### ***1.3.2 Proprietà salutistiche***

L'olio vergine di oliva è il componente imprescindibile della dieta Mediterranea, con la sua composizione chimica contribuisce al fabbisogno giornaliero di acidi grassi essenziali e vitamina E; nonché all'apporto di specifici antiossidanti responsabili degli effetti benefici dell'olio vergine di oliva nel contrastare alcuni disturbi cronico-degenerativi come le malattie infiammatorie, cardiovascolari e il cancro (Mangas-Cruz *et al.* 2004).

Gli antiossidanti, oltre a preservare la *shelf-life* dell'olio vergine di oliva e a conferirgli resistenza ai trattamenti termici, esercitano, una volta assorbiti dall'organismo, un effetto protettivo inibendo l'azione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) (Viola, 2006). Queste specie altamente reattive sono i responsabili del cosiddetto "stress ossidativo" che sembra essere alla base delle malattie croniche e dell'invecchiamento. Le ROS causando l'ossidazione di lipoproteine a bassa densità (LDL) contribuiscono alla formazione di lesioni aterosclerotiche (Berliner *et al.*, 1995) oltre che a possibili mutazioni del DNA, che sono all'origine della carcinogenesi (Nakae *et al.*, 1997). Le ROS sono responsabili inoltre, di danni alla mucosa del colon in malattie infiammatorie dell'intestino, di coliti ulcerose e del morbo Crohn a causa del loro accumulo sulla parete dell'epitelio (Orlando, 2002). La produzione dei ROS è collegata anche alla modulazione della ciclossigenasi (COX-2) responsabile di processi infiammatori e del cancro (Rocca e Fitzgerald, 2002).

Lo stress ossidativo è responsabile dell'invecchiamento; infatti, nel tessuto corticale dei topi è stato dimostrato un aumento dell'attività dell'enzima superossido dismutasi con l'età (O'Donnel *et al.*, 1998). Un'indagine condotta sempre sui topi ha evidenziato che le mutazioni del DNA aumentano con l'età (Giovannelli *et al.*, 2003) e lo stress ossidativo sembra essere correlato con le malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson (Jenner *et al.*, 1996).

In questo contesto l'apporto da fonte esogena, attraverso la dieta, di antiossidanti diventa necessario. Recenti studi epidemiologici hanno dimostrato una chiara associazione tra il consumo di olio vergine di oliva e la riduzione del rischio di cancro al seno (Martin-Moreno *et al.*, 1994; Trichopoulou *et al.*, 1995; La Vecchia *et al.*, 1995), alla prostata (Hodge *et al.*, 2004), al pancreas (Soler *et al.*, 1998), al polmone (Fortes *et al.*, 2003), alla laringe (Bosetti *et al.*, 2002), all'esofago (Bosetti *et al.*, 2003), all'ovaio (Bosetti *et al.*, 2002) e al colon (Stoneham *et al.*, 2000).

Evidenze sperimentali hanno riscontrato che l'attività antitumorale dell'olio vergine di oliva, in aggiunta agli altri effetti benefici per la salute umana, è maggiormente

attribuibile all'elevato contenuto in sostanze fenoliche, le quali possiedono forte potere antiossidante (Vissers *et al.*, 2004). In particolare è stato dimostrato che il 3,4-DHPEA è in grado di inibire l'aggregazione delle piastrine (Petroni *et al.*, 1995), di interferire con il metabolismo degli eicosanoidi, riducendo la produzione del leucotriene B<sub>4</sub> nei leucociti attraverso l'inibizione dell'enzima 5-lipossigenasi (Petroni *et al.*, 1997) e di inibire l'ossidazione in vitro (Grignaffini *et al.*, 1994) e in vivo (Wiseman *et al.*, 1996) delle lipoproteine a bassa densità. Studi sperimentali hanno inoltre evidenziato che il 3,4-DHPEA, ma anche l'estratto fenolico dell'olio vergine di oliva e altri composti purificati come il 3,4-DHPEA-EDA e il *p*-HPEA-EDA, sono capaci di indurre l'apoptosi in diverse linee di cellule tumorali come le cellule del carcinoma del colon e del seno, del melanoma e nelle linee cellule HL60 della leucemia (Fabiani *et al.*, 2006; Ragione *et al.*, 2000). Particolarmente interessante è l'evidenza sperimentale secondo cui al contrario del 3,4-DHPEA che è risultato essere molto attivo nell'induzione dell'apoptosi, il *p*-HPEA è completamente inattivo alla stessa concentrazione (100 µM) e il *p*-HPEA-EDA è molto più attivo del 3,4-DHPEA-EDA (Fabiani *et al.*, 2002).

E' chiara da questi risultati sperimentali la relazione tra la struttura della molecola e la sua attività biologica. Infatti, i composti che possiedono un gruppo *o*-difenolico nella struttura molecolare hanno mostrato una più elevata attività antiossidante, confermando il meccanismo di azione che avviene attraverso la donazione di un radicale idrogeno del gruppo ossidrilico dell'anello benzenico ai radicali liberi.

Uno studio condotto da Fabiani et al. nel 2008 ha dimostrato che la capacità del 3,4-DHPEA e del 3,4-DHPEA-EDA di proteggere il DNA da danni causati dall'ossidazione è superiore rispetto a quella del *p*-HPEA e del *p*-HPEA-EDA. E' stata dimostrata in vitro, entro un basso intervallo di concentrazione (1-10 µM), la capacità del 3,4-DHPEA di inibire la fase di iniziazione della carcinogenesi.

Il *p*-HPEA-EDA, denominato di recente "oleocantale", sembra inibire l'attività degli enzimi ciclossigenasi COX-1 e COX-2 che catalizzano le reazioni all'interno della via biochimica infiammatoria dell'acido arachidonico. Questo effetto

farmacologico è simile a quello dell'ibuprofene, potente modulatore dell'infiammazione e analgesico (Beauchamp *et al.*, 2005).

In un recente lavoro di Fabiani *et al.* (2011) è stato evidenziato che la diversa composizione fenolica degli estratti di oli vergine di oliva esprime in vitro differenti potenziali chemopreventivi verso le linee cellulari HL60. I differenti effetti chemopreventivi mostrati dagli estratti non sembrano essere una diretta conseguenza del contenuto totale in sostanze fenoliche, ma piuttosto della loro composizione. Infatti, gli effetti antiproliferativi e pro-apoptotici sono dovuti ai principali componenti degli estratti, 3,4-DHPEA-EDA e *p*-HPEA-EDA. È importante sottolineare che le concentrazioni del 3,4-DHPEA-EDA e del *p*-HPEA-EDA puri (IC<sub>50%</sub> 30 – 35 e 7 – 8 μM, rispettivamente), necessarie per osservare un effetto significativo, erano molto al di sopra di quelle presenti nel mezzo di coltura contenente l'estratto fenolico ad una concentrazione di 5 μg/mL. Questo significa che all'interno dell'estratto fenolico si instaurano effetti sinergici con altri componenti.

La correlazione negativa del *p*-HPEA e del 3,4-DHPEA con gli effetti antiproliferativi e pro-apoptotici degli estratti è spiegabile con la concentrazione. Quando l'estratto fenolico viene disciolto nel mezzo di coltura ad una concentrazione di 5 μg/mL questi due componenti risultano essere presenti in quantitativi più bassi di quelli necessari (>250 μM per il *p*-HPEA e >10 μM per il 3,4-DHPEA) per avere un effetto sulle cellule HL60 (Fabiani *et al.*, 2011).

Per quanto riguarda i lignani sembrerebbe che il pinoresinolo possieda una piccola attività pro-apoptotica, ma sia capace di inibire la proliferazione delle cellule HL60 a concentrazioni (10 – 100 μM) molto al di sopra di quelle presenti nell'estratto fenolico (Fabiani *et al.*, 2011).

Sebbene diversi studi hanno dimostrato le proprietà chemopreventive, in termini di effetti antiproliferativi e pro-apoptotici, del 3,4-DHPEA restano ancora poco conosciuti gli effetti dell'estratto fenolico dell'olio vergine di oliva sulle cellule tumorali.

Per diversi autori rimane ancora molto controverso il discorso dell'assorbimento e della biodisponibilità da parte dell'organismo dei composti fenolici dell'olio vergine di oliva (Frankel, 2011).

### ***1.3.3 Attività antiossidante***

I polifenoli agiscono come antiossidanti di tipo I, per inibire l'ossidazione dell'olio vergine di oliva inattivando i radicali alchilperossidici generati dall'autossidazione lipidica donando loro un radicale idrogeno e trasformandosi essi stessi in radicali molto più stabili. Il radicale formato dalla reazione di un fenolo con un radicale lipidico è stabilizzato dalla delocalizzazione nell'anello aromatico dell'elettrone spaiato. La stabilità del radicale fenossilico riduce la velocità della fase di propagazione della reazione radicalica di autossidazione lipidica.

I fenoli idrofili, quali alcoli e acidi fenolici, flavonoidi, lignani e secoiridoidi, sono la classe più importante degli antiossidanti naturali dell'olio vergine di oliva, senza comunque tralasciare il contributo dei carotenoidi e dei tocoferoli (Servili *et al.*, 2004).

In letteratura è ampiamente documentato il ruolo determinante dei composti fenolici in tema di stabilità ossidativa dell'olio vergine di oliva; sono in grado infatti, di preservare nel tempo le sue proprietà nutrizionali ed edonistiche e questo si traduce in una prolungata *shelf-life* dell'olio vergine di oliva (Servili *et al.* 2007a; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2007).

Diversi studi hanno evidenziato la relazione tra polifenoli e relativa *shelf-life* dell'olio vergine di oliva, misurata usando metodi di ossidazione accelerata come l'AOM ( Active Oxygen Method) e il Rancimat (Baldioli *et al.*, 1996; Pirisi *et al.*, 2000; Brenes *et al.*, 2000).

Successivamente è stata confermata la correlazione tra polifenoli totali contenuti nell'estratto metanolico dell'olio vergine di oliva dosati con il metodo

colorimetrico, la loro attività antiossidante valutata usando l'ORAC test (Oxygen Radical Absorbance Capacity) e la shelf-life dell'olio vergine di oliva valutata con il Rancimat (Gordon *et al.*, 1990; Chimi *et al.*, 1991; Papadopoulus *et al.*, 1991; Ninfali *et al.*, 2001).

Sánchez *et al.* (2007) hanno sperimentato quattro diversi test (ABTS<sup>•+</sup> test, DPPH test, ORAC test,  $\beta$ -carotene-linoleate test) per determinare l'attività di "free-radical scavenging" di diversi oli vergini di oliva il cui contenuto in polifenoli totali è stato determinato con il metodo del Folin-Ciocalteu. Nonostante tutti e quattro i metodi abbiano mostrato un'ottima correlazione tra il contenuto in polifenoli totali e l'attività antiossidante misurata, il metodo migliore è risultato essere l'ABTS<sup>•+</sup> test.

Servili *et al.* (2004) hanno studiato l'attività antiossidante di alcuni specifici fenoli idrofili dell'olio vergine di oliva, quali 3,4-DHPEA, *p*-HPEA e acidi fenolici (acido caffeico, acido *p*-cumarico, acido ferulico, acido siringico e acido vanillico) dimostrando l'elevata attività antiossidante del 3,4-DHPEA.

Baldioli *et al.* (1996) hanno esaminato questa proprietà attraverso l'utilizzo del Rancimat test in diversi secoiridoidi isolati dall'olio vergine di oliva evidenziando come gli *o*-difenoli tra cui, 3,4-DHPEA, 3,4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA hanno una maggiore attività antiossidante rispetto al *p*-HPEA e all' $\alpha$ -tocoferolo. Questo conferma quanto detto sopra sul 3,4-DHPEA e di conseguenza i secoiridoidi che contengono questo composto nella loro struttura molecolare mostrano una più elevata attività antiossidante.

Artajo *et al.* (2006) hanno dimostrato, attraverso il Rancimat test, che molecole in cui è presente un anello aromatico sostituito da gruppi ossidrilici in posizione 3, 4 o 5 come l'oleuropeina, il 3,4-DHPEA-EDA e la forma metilata del 3,4-DHPEA-EA possiedono una più elevata attività antiossidante. Questo è spiegato dall'elevato effetto elettrone donatore del gruppo ossidrilico che aumentando la densità elettronica

sul gruppo ossidrilico adiacente per effetto induttivo, aumenta la reattività del fenolo verso i radicali lipidici.

Carrasco-Pancorbo et al. 2005 hanno esaminato l'attività di *radical scavengin* di singoli polifenoli estratti dall'olio vergine di oliva attraverso metodi chimici (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl test, DPPH test), metodi di ossidazione accelerata in sistemi lipidici modello (OSI, oxidative stability instrument) e attraverso metodi elettrochimici (analisi in iniezione diretta [FIA], amperometria e voltammetria ciclica). I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'abilità di donare un radicale idrogeno ai radicali alchilperossidici, generati dall'autossidazione lipidica con conseguente diminuzione della velocità della fase di propagazione della reazione radicalica a catena, aumenta all'aumentare del numero dei gruppi ossidrilici presenti nel fenolo. In particolare l'introduzione di un secondo gruppo ossidrilico in posizione 2 o 4 del fenolo aumenta l'attività antiossidante. Questo è spiegato dalla stabilizzazione via legame a idrogeno intramolecolare del radicale fenossilico formatosi dalla reazione del fenolo con il radicale lipidico. I risultati ottenuti con i tre test hanno dimostrato che il 3,4-DHPEA, 3,4-DHPEA-EDA, e 3,4-DHPEA-EA sono gli antiossidanti più forti. Questo conferma che la presenza di un solo gruppo ossidrilico nella molecola diminuisce la sua attività antiossidante; anche la presenza del gruppo carbossimetile, come nel caso dell'oleuropeina aglicone, sembra causare una diminuzione dell'attività antiossidante, non essendo un gruppo elettron donatore (Carrasco-Pancorbo et al., 2005).

A differenza di altri autori (Ninfali et al., 2001; Carrasco-Pancorbo et al., 2005; Artajo et al., 2006), che hanno trovato nessuna se non una debole attività antiossidante dei lignani, Owen et al. (2000) hanno evidenziato una chiara correlazione tra l'attività di *radical scavenging* dell'estratto fenolico dell'olio vergine di oliva e la concentrazione dei lignani.

Obied et al. (2007) hanno isolato due nuovi secoiridoidi da reflui derivanti dalla lavorazione di olive australiane appartenenti alla varietà Frantoio: l'idrossitirosil aciclodiidroelenolato e il p-cumaril-6'-secologanoside (comselogoside). Entrambi

questi composti comparati al 3,4-DHPEA e all'oleuropeina hanno evidenziato *in vitro* attività di *radical scavenging* nei confronti di radicali stabili come il 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH). In particolare è stato evidenziato che l'idrossitirosil aciclodiidroelenolato risulta essere un *radical scavenger* più efficiente del 3,4-DHPEA e dell'oleuropeina. Questo si può attribuire alla sua struttura lineare che facilita la reazione con il radicale DPPH ingombrato stericamente (Obied *et al.*, 2007).

Uno studio recente fatto da Obied *et al.* (2008) ha evidenziato che il verbascoside isolato da un estratto di reflui oleari da olive appartenenti alla varietà Correggiola è il più potente antiossidante seguito dal 3,4-DHPEA-EDA.

Negli ultimi anni sono stati fatti molti studi di simulazione del comportamento dell'olio vergine di oliva durante la frittura e altri tipi di cottura (Servili *et al.*, 2004). E' ormai noto dalla letteratura che tra gli oli vegetali l'olio vergine di oliva mostra una maggiore stabilità durante la fase di frittura del cibo quando scaldato ad elevate temperature (Fedeli *et al.*, 1988; Andrikopoulos *et al.*, 1989) o con microonde, questo significa che i polifenoli reagiscono rapidamente con i radicali lipidici e vengono di conseguenza consumati.

I composti fenolici con la più elevata attività antiossidante come il 3,4-DHPEA, il 3,4-DHPEA-EDA e il 3,4-DHPEA-EA diminuiscono notevolmente durante il riscaldamento per preservare l'olio vergine di oliva dai processi ossidativi.

Il *p*-HPEA, i derivati del ligustroside quali il *p*-HPEA-EDA e il *p*-HPEA-EA e i lignani, al contrario, hanno mostrato un'elevata stabilità durante studi di simulazione del processo di frittura e di cottura a microonde, confermando il loro scarso contributo nella protezione dell'olio vergine di oliva dai fenomeni ossidativi in fase di cottura (Servili *et al.*, 1989).

Gomez-Alonso *et al.* (2003) hanno confermato questa stabilità del tirosolo e dei suoi derivati secoiridoidei durante la fase di frittura evidenziando che la diminuzione della loro concentrazione è molto più bassa di quella osservata per i composti appartenenti alla famiglia dell'idrossitirosolo.

In letteratura diversi autori riportano che il 3,4-DHPEA, l'acido elenolico, il 3,4-DHPEA-EDA e il 3,4-DHPEA-EA riducono la loro concentrazione durante il trattamento termico molto più velocemente di altri composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva come 3,4-DHPEA acetato e *p*-HPEA-EA, mentre è stata confermata l'elevata resistenza al trattamento termico dei lignani (Carrasco-Pancorbo *et al.* 2007).

Pellegrini *et al.* (2001) hanno dimostrato che i polifenoli dell'olio vergine di oliva stabilizzano l' $\alpha$ -tocoferolo durante il riscaldamento dell'olio di oliva contribuendo al valore nutrizionale del cibo cotto.

Molte ipotesi sui meccanismi di azione dei singoli antiossidanti fenolici sono state formulate.

Lo studio sulla chimica di degradazione degli antiossidanti durante l'autossidazione dell'olio è importante anche per comprendere l'azione degli effetti sinergici dei composti fenolici contenuti nell'estratto fenolico dell'olio vergine di oliva che sembrerebbe potenziarne l'attività antiossidante (Fabiani *et al.* 2011).

Alcuni studi sono stati condotti anche sulla possibile attività antiossidante dei prodotti di degradazione ossidativa degli antiossidanti fenolici. L'attività di "radical scavenging" degli antiossidanti fenolici sembrerebbe rafforzata dalle reazioni di dimerizzazione e di polimerizzazione che seguono la reazione di ossidazione stessa (Hotta *et al.* 2002, Arakawa *et al.*, 2004).

In letteratura è riportato che certi dimeri formati dall'accoppiamento ossidativo dell'acido ferulico sono antiossidanti più potenti dell'acido ferulico stesso (García-Conesa *et al.*, 1997). La loro attività antiossidante sembrerebbe essere relazionata all'esistenza di un sistema coniugato all'interno della molecola.

#### ***1.4 Analisi quali-quantitativa delle sostanze fenoliche dell'olio vergine di oliva***

I derivati dell'oleuropeina e del ligustroside rappresentano gran parte della frazione fenolica totale dell'olio vergine di oliva. Negli ultimi anni è stato confermato l'elevato potere antiossidante *in vitro* e *in vivo* di queste sostanze.

Il livello dei derivati fenolici nella valutazione della qualità dell'olio vergine di oliva è un parametro molto importante dal momento che i fenoli sono fortemente relazionati sia alla resistenza all'ossidazione dell'olio che ad importanti attività biologiche (Papadoupoulos *et al.*, 1991; Servili *et al.* 2004) in parte responsabili degli effetti benefici per la salute umana della dieta mediterranea.

Tecniche analitiche sempre più sofisticate sono state messe a punto per la determinazione e l'identificazione delle sostanze fenoliche dell'olio vergine di oliva (Owen *et al.*, 2000; Fu, 2009; Casale *et al.*, 2010; Alonso-Salces 2010). L'analisi dei composti fenolici dell'olio vergine di oliva prevede in genere prima la loro estrazione e purificazione dalla matrice oleosa poi, la scelta della giusta tecnica analitica per la loro valutazione quali-quantitativa (Servili *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda il metodo di estrazione le principali tecniche riportate in letteratura sono l'estrazione liquido-liquido (LLE) (Tsimidou *et al.*, 1996) e l'estrazione in fase solida (SPE) (Servili *et al.*, 1999; Pirisi *et al.*, 2000).

Tra i metodi analitici convenzionali di determinazione dei fenoli dell'olio vergine di oliva ci sono i metodi colorimetrici con l'utilizzo del reagente Folin-Ciocalteu (Solinas *et al.*, 1981) e l'HPLC tra i metodi cromatografici (Montedoro *et al.*, 1993; Baldioli *et al.* 1996; Owen *et al.* 2000; Romero *et al.*, 2002; Brenes *et al.*, 2002).

L'HPLC accoppiata alla spettroscopia UV (Montedoro *et al.* 1992b; Brenes *et al.* 1999; Pirisi *et al.* 2000) è la tecnica più usata per la determinazione delle sostanze fenoliche, in letteratura sono riportati anche metodi elettrochimici e fluorimetrici (Tsimidou *et al.*, 1996; Brenes *et al.*, 2002). L'utilizzo del rivelatore elettrochimico

(EC) per la determinazione dei fenoli semplici fu proposto per la prima volta da Mannino et al. (1993).

Selvaggini et al. (2006) hanno messo a punto un metodo per la determinazione dei polifenoli mediante iniezione diretta dell'olio vergine di oliva nell'HPLC utilizzando per l'analisi quali-quantitativa un rivelatore a fluorescenza.

Secondo Brenes et al. (2000b) il fluorimetro è molto utile per la determinazione dei lignani nelle analisi di routine dei fenoli dell'olio vergine di oliva data la sua facilità rispetto alla gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) nel discriminare il (+)-1-pinoresinolo e il (+)-1-acetossipinoresinolo.

Angerosa et al. (1996) hanno messo a punto un metodo GC-MS per la valutazione dei composti fenolici dell'olio. Questo metodo prevede un ulteriore passaggio nella preparazione del campione, ossia la derivatizzazione con tetrametilsilano (TMS) dei gruppi ossidrilici delle sostanze fenoliche estratte. Nello spettro di massa dei derivati dei secoiridoidi sono stati identificati due picchi principali con rapporto  $m/z$  di 192 o 280 relativi al tirosolo e all'idrossitirosolo rispettivamente, che risultano essere molto utili per definire qualitativamente e quantitativamente la composizione fenolica dell'olio vergine di oliva.

Successivamente Owen et al. (2000) hanno confermato l'utilizzo del metodo GC-MS per la determinazione di tutte le classi di composti fenolici dell'olio vergine di oliva.

Miglioramenti nella strumentazione e avanzamenti nelle tecniche di separazione hanno contribuito all'espansione della spettrometria di massa in campo alimentare (Careri *et al.*, 2002).

La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS) è una tecnica ormai consolidata nell'analisi soprattutto qualitativa dei fenoli dell'olio vergine di oliva (Rovellini *et al.*, 2002). La cromatografia liquida accoppiata ai metodi di MS-MS è uno strumento molto efficiente nella chimica degli alimenti grazie alla sua elevata selettività (Careri *et al.*, 2002).

Perri et al. (1999) hanno messo a punto un metodo di MS/MS (Ionspray tandem mass spectrometry, ISI-MS/MS) per la determinazione quantitativa dell'oleuropeina nell'olio vergine di oliva.

Fu et al. (2009) hanno separato e caratterizzato i diversi composti fenolici contenuti nell'olio vergine di oliva attraverso l'utilizzo della cromatografia liquida a rapida risoluzione e della spettrometria di massa a tempo di volo (RRLC/ESI-TOF-MS) e a trappola ionica (RRLC/ESI-IT-MS<sup>n</sup>).

Nell'analisi strutturale dei composti fenolici dell'olio vergine di oliva accanto alla spettrometria di massa si colloca la tecnica della risonanza magnetica nucleare (NMR).

Una eccellente serie di esperimenti è stata condotta da Montedoro et al. (1993) che utilizzando le tecniche HPLC e NMR hanno separato e identificato il 3,4-DHPEA-EDA, il 3,4-DHPEA-EA e il *p*-HPEA-EDA.

Owen et al. (2000) attraverso l'utilizzo delle tecniche MS e NMR hanno identificato e determinato la struttura dei lignani, (+)-1-acetossipinoresinolo, (+)-pinoresinolo e (+)-1-idrossipinoresinolo, contenuti nell'olio vergine di oliva.

<sup>1</sup>H-NMR e la più recente tecnica LC-SPE-NMR sono state applicate per lo studio della frazione fenolica dell'olio vergine di oliva per scopi autentificativi (Christophoridou *et al.*, 2005).

### ***1.4.1 Analisi qualitativa dei prodotti di ossidazione delle sostanze fenoliche***

In letteratura il ruolo antiossidante delle sostanze fenoliche nel prevenire o ritardare l'autossidazione dell'olio vergine di oliva è ben documentato.

Dal momento che Bolland nel 1946 dimostrò che l'autossidazione dei grassi e dell'olio avveniva tramite una reazione radicalica a catena, diversi studi sono stati condotti sul meccanismo di azione degli antiossidanti (Kikugawa *et al.*, 1990). È stato dimostrato che gli antiossidanti fenolici ostacolano i radicali liberi, prodotti durante la fase di propagazione della reazione a catena, donando loro un radicale idrogeno.

I prodotti di degradazione ossidativa degli antiossidanti fenolici dell'olio vergine di oliva restano ancora sconosciuti. Diversi esperimenti riguardanti la degradazione di fenoli semplici sono stati condotti attraverso sistemi modello che riproducono le condizioni di autossidazione dell'olio.

Cilliers *et al.* (1991) hanno condotto studi sull'ossidazione nonenzimatica, attraverso il metodo dell'ossigeno attivo, dell'acido caffeico considerato come un sistema fenolico modello per i derivati cinnamici. I prodotti di degradazione ossidativa, in particolare dimeri e trimeri dell'acido caffeico formati dalle reazioni che coinvolgono la catena laterale di almeno una delle unità di acido caffeico, sono stati isolati con la tecnica HPLC preparativa e caratterizzati attraverso analisi NMR e FAB-MS (Fast atom bombardment mass spectrometry).

Altri autori hanno confermato la formazione del dimero dell'acido caffeico via *o*-chinone attraverso sistemi modello di ossidazione chimica (Fulcrand *et al.*, 1994) ed di elettrochimica accoppiata alla spettrometria di massa (On-Line Electrochemistry/Electrospray Ionization Mass Spectrometry) (Arakawa *et al.*, 2004).

In uno studio condotto da Pati *et al.* (2006) l'ossidazione dell'acido caffeico è stata eseguita per via enzimatica con l'utilizzo dell'enzima tirosinasi (EC 1.14.18.1). I principali prodotti di ossidazione identificati attraverso la spettrometria di massa

(HPLC-ESI-MS e HPLC-ESI-MS/MS) sono dimeri dell'acido caffeico che si possono formare anche attraverso legami C-C degli atomi dell'anello aromatico o tramite il gruppo carbossilico.

Di Maio et al. (2011) hanno indagato i prodotti di ossidazione di natura enzimatica e non enzimatica del *p*-HPEA e del 3,4-DHPEA tramite HPLC-ESI-MS e HPLC-ESI-MS/MS.

In una indagine *in vitro* condotto da Ward et al. (2001) l'acido ferulico è stato scelto come sistema modello per studiare gli steps iniziali della reazione di polimerizzazione dei composti fenolici catalizzata dalla lignina-perossidasi (LIP). I prodotti della dimerizzazione e polimerizzazione ossidativa sono stati caratterizzati attraverso l'utilizzo della risonanza magnetica (NMR) e della gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS).

Antolovich et al. (2004) hanno condotto uno studio sui prodotti di ossidazione di diversi antiossidanti fenolici tra cui acidi cinnamici, acidi benzoici, tirosolo e oleuropeina glucoside. I prodotti di reazione sono stati identificati tramite LC-UV/MS come chinoni, dimeri e aldeidi. Inoltre è stato osservato che variazioni nella struttura dei fenoli influenza la loro reattività e i prodotti di ossidazione formati. Tutti gli acidi cinnamici producono per ossidazione principalmente benzaldeide. La formazione del chinone interessa le molecole aventi gruppi *o*-idrossilici nella loro struttura molecolare.

Rovellini et al. (2002) mediante la tecnica HPLC-ESI-MS hanno identificato nell'estratto fenolico dell'olio vergine di oliva alcuni prodotti di ossidazione dell'oleuropeina e del ligustroside aglicone. Tali prodotti di ossidazione sono stati confermati mediante analisi GC-MS da Ríos et al. (2005), resta ancora sconosciuta la relativa struttura molecolare.

## ***1.5 Applicazione della spettrometria di massa in campo alimentare e biochimico***

L'importanza della spettrometria di massa (MS) nella ricerca in campo biochimico e alimentare si è ormai consolidata (Careri *et al.* 2002).

In MS viene determinato il rapporto massa su carica ( $m/z$ ) di ioni in fase gassosa. Le origini di questa tecnica risiedono negli studi condotti da J. J. Thomson (Thomson, 1913) e dal suo studente F. W. Aston (Aston, 1933) intorno alla fine del secolo scorso.

Oggi la spettrometria di massa è il metodo più sensibile per la caratterizzazione strutturale di biomolecole.

Gli steroidi possono essere identificati e caratterizzati a livelli del picogrammo (Chatman *et al.*, 1999; Griffiths *et al.*, 1999), le proteine separate per elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) possono essere determinate a concentrazioni al di sotto delle picomoli (Wilm *et al.*, 1996), e nei casi migliori, i neuropeptidi possono essere valutati a livello delle zeptomoli (Andrén *et al.*, 1994).

In campo alimentare questa tecnica permette la valutazione anche dei trigliceridi, degli acidi grassi, delle cere (De Meulenaer *et al.*, 2000; Byrdwell, 2001), dei carotenoidi e di vitamine idro e liposolubili (Dachtler *et al.*, 2001; Stokes *et al.*, 1999).

Molti progressi nell'applicazione della MS in biochimica sono una diretta conseguenza dell'introduzione delle tecniche di ionizzazione *soft* come il desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice (MALDI) (Karas *et al.*, 1988) e *electrospray* (ESI) (Yamashita *et al.*, 1984; Fenn *et al.*, 1989). La tecnica MALDI è un perfezionamento della ionizzazione FAB (*Fast-atom-bombardment*). A differenza di quest'ultima, applicabile per molecole con pesi molecolari di poche migliaia di dalton (Barber *et al.*, 1982), la massa delle biomolecole valutabili con i metodi MALDI e ESI è oggi entro l'intervallo dei megadalton (Tito *et al.*, 2000).

Queste nuove tecniche di ionizzazione hanno permesso l'analisi diretta di biomolecole polari e termicamente labili senza l'uso di derivatizzazioni come invece era necessario nel caso della spettrometria di massa ad impatto elettronico o a ionizzazione chimica (EI o CI-MS).

Come la ionizzazione FAB anche la MALDI è limitata nell'intervallo dei bassi pesi molecolari perché a causa dell'effetto matrice si può avere la soppressione degli ioni del campione.

A partire dalla fine degli anni '90 la tecnica MALDI si è affermata soprattutto nel campo della chimica delle proteine, dove è diventata il metodo più efficiente di ionizzazione dei peptidi (Griffiths, 2001); essendo una metodologia pulsata spesso viene accoppiata all'analizzatore a tempo di volo (TOF) (Roepstorff, 2000).

Allo stato attuale dell'arte l'utilizzo di sistemi MALDI-TOF-MS e LC-ESI-MS accoppiata con analizzatori a triplo quadrupolo è l'approccio analitico predominante nello studio delle proteine anche in campo alimentare.

Léonil et al. (2000) hanno applicato tali metodologie per la determinazione di peptidi e proteine nel latte, uova e cereali.

In una review di Alomirah et al. (2000) la capacità delle tecniche ESI-MS e MALDI-TOF-MS per la caratterizzazione strutturale delle proteine è ben discussa con particolare riguardo ai vantaggi in termini di sensibilità, accuratezza di massa (sempre all'interno del range 0.5-1%) e tempi di analisi. Nel lavoro viene anche evidenziato il potenziale di queste tecniche per la determinazione della sequenza delle proteine, delle modificazioni post-translazionali e delle interazioni proteina-proteina, e proteina-legante.

Il sistema MALDI-MS è stato applicato anche nella caratterizzazione delle reazioni non enzimatiche delle proteine alimentari con alcuni metaboliti secondari delle piante quali acido clorogenico, *o*-, *m*-, *p*-diidrossibenzene, acido gallico e acido ferulico (Rawel et al., 2001).

Un approccio basato sull'utilizzo della tecnica HPLC-ESI-MS è stato applicato all'identificazione di oligopeptidi nel prosciutto di Parma (Sforza et al., 2001).

I ricercatori del Centro Ricerca Nestlé hanno applicato la tecnica LC-ESI-TOF-MS per risolvere un problema di identificazione in un siero proteico modificato (Hau *et al.*, 2001). L'accoppiamento di queste tecniche di ionizzazione *soft* con la spettrometria di massa *tandem* (MS/MS), nella quale si seleziona uno ione precursore che viene ulteriormente frammentato e se ne analizzano gli ioni prodotti mette a disposizione dei ricercatori un potente mezzo per la caratterizzazione di biomolecole.

In un recente lavoro la metodologia ESI-CID-MS/MS, in cui il precursore viene frammentato in una cella di collisione (collision-induced dissociation), è stata applicata per l'analisi delle mioglobine in campioni di carne (Ponce-Alquicira *et al.*, 2000). La tecnica ESI-MS è stata in grado di distinguere parzialmente le mioglobine provenienti da carne di pecora, cavallo, manzo e maiale.

La tecnica MALDI-TOF-MS si è dimostrata essere un potente strumento nella chimica degli alimenti anche per la caratterizzazione dei carboidrati (Vierhuis *et al.*, 2001).

Accanto alla tecnica di ionizzazione ESI si colloca la ionizzazione APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), un'altra tecnica di ionizzazione *soft*, anche se molto spesso le due metodologie sono intercambiabili, l'ESI è molto più utilizzata.

Thurman *et al.* (2001) hanno applicato le metodologie di ionizzazione ESI e APCI per la determinazione HPLC-MS e HPLC-MS/MS di 75 pesticidi e dei loro prodotti di degradazione. Dai risultati sperimentali è emerso che la ionizzazione ESI è molto più sensibile della tecnica APCI.

La ionizzazione ESI accoppiata alla spettrometria di massa tandem risulta essere un sistema molto sensibile e selettivo per lo *screening* multi residuo di una vasta gamma di pesticidi anche nelle bevande, con la possibilità di ottenere rilevanti informazioni strutturali (Pozo *et al.* 2001).

A causa del largo utilizzo di droghe in medicina veterinaria come terapeutici o di agenti promuoventi la crescita, lo sviluppo di tecniche analitiche per la

determinazione di loro residui nella carne e in altri prodotti di origine animale (latte e uova) è diventato un compito molto importante per gli aspetti tossicologico e normativo. Negli ultimi anni metodi LC-MS e LC-MS/MS sono stati ampiamente applicati per confermare la presenza di residui di droghe veterinarie in diversi alimenti (Horie et al. 2000; Heller et al. 2001; Riediker 2001).

Di recente è stata pubblicata da Quilliam (2001) una review sugli aspetti tossicologici e cromatografici riguardanti la determinazione di ficotossine in ambiente acquatico, inclusa la contaminazione degli alimenti marini e dell'acqua. Nella determinazione delle diverse tossine potenzialmente presenti negli alimenti la spettrometria di massa accoppiata alla tecnica HPLC risulta essere un valido strumento analitico (Leitner *et al.*, 2002).

Un recente progresso nella determinazione delle tossine negli alimenti, riguarda l'applicazione di una metodologia basata sull'analisi MS dell'interazione biomolecolare (BIA-MS) per la simultanea determinazione dell'enterotossina stafilococcica B (SEB) e della tossina-1 della sindrome da shock tossico (TSST-1) (Nedelkov *et al.*, 2000). L'accoppiamento della risonanza plasmonica superficiale per l'analisi delle interazioni biomolecolari (SPR-BIA) con la tecnica MALDI-TOF-MS permette misure e determinazioni inequivocabili delle tossine SEB e TSST-1 (Nedelkov *et al.*, 2000). Conoscendo i pesi molecolari delle tossine target l'analisi MALDI-TOF-MS permette sia di confermare la loro presenza nel campione che di identificare altri composti trattenuti sul chip sensoriale.

Un aspetto altrettanto importante nella chimica degli alimenti è la caratterizzazione dei metalli nelle bevande, in quanto la loro concentrazione può influenzare la qualità del prodotto e quindi le caratteristiche organolettiche e la sua stabilità (Griffiths *et al.*, 2001). L'accoppiamento della cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con la determinazione del rapporto isotopico attraverso la spettrometria di massa (IRMS) è un importante mezzo per l'analisi di alterazioni anche molto piccole nell'abbondanza isotopica di alcuni elementi in campioni di interesse alimentare (Tefferà *et al.*, 1996). Questo approccio trova interessanti

riscontri nella valutazioni di frodi alimentari (Guillou *et al.*, 1999; Abramson *et al.*, 2001).

## 2 SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi si propone di valutare i prodotti di degradazione ossidativa dei principali antiossidanti fenolici dell'olio vergine di oliva quali, tirosolo (*p*-HPEA), idrossitirosolo (3,4-DHPEA) e la forma dialdeidica dell'acido decarbossimetileneolico legato all'idrossitirosolo (3,4-DHPEA-EDA). A tal proposito il lavoro è stato suddiviso in due parti, nella prima parte si è proceduto alla caratterizzazione dei prodotti di ossidazione attraverso lo studio di due sistemi di ossidazione modello: ossidazione enzimatica e ossidazione di Fenton; nella seconda parte, l'attenzione è stata focalizzata sulla identificazione di tali prodotti nell'olio in via di ossidazione.

I prodotti di degradazione ossidativa degli antiossidanti sopra menzionati potrebbero essere usati sia come marker di "freschezza" dell'olio vergine di oliva sia nella valutazione della sua *shelf life*.

### 3 MATERIALI E METODI

#### 3.1 *Campioni*

I campioni di olio vergine di oliva sono stati estratti da olive appartenenti alla *cultivar* Coratina raccolte nell'anno 2008.

L'olio è stato estratto per centrifugazione usando un decanter Rapanelli modello ECO/G (Rapanelli SpA, Foligno) con un basso livello di acqua di diluizione.

L'acidità libera (%) e il numero di perossidi (mEq O<sub>2</sub>/Kg) erano 0.25 e 4.0, rispettivamente.

L'olio rettificato è stato acquistato presso l'azienda Monini SpA. (Perugia). L'acidità libera (%) e il numero di perossidi (mEq O<sub>2</sub>/Kg) erano 0.23 e 2.0, rispettivamente.

#### 3.2 *Reagenti*

I reagenti usati in questo lavoro di tesi sono stati reperiti come segue: l'idrossitirosolo (3,4-DHPEA) è stato acquistato presso l'azienda Cayman Chemical Ltd. (Milano); il tirosolo (*p*-HPEA), l'acido 3,4-diidrossifenilacetico, il solfato di ferro (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%), l'acetato d'ammonio, l'acido acetico, l'acido solforico e il cloruro di calcio sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano); l'enzima tirosinasi da fungo (EC 1.14.18.1), il metanolo e l'acqua per HPLC-MS sono stati acquistati presso la Fluka (Milano). La forma dialdeidica dell'acido decarbossimetilelenolico legato all'idrossitirosolo (3,4-DHPEA-EDA) è stata isolata dall'olio vergine di oliva seguendo la procedura riportata da Montedoro et al. (1993) con le seguenti modificazioni: per l'HPLC semi-preparativa è stata utilizzata una Pursuit XRs C18 (250 mm x 10 mm i.d.), con

un diametro delle particelle di 5  $\mu\text{m}$  (Varian Inc., Walnut Creek, CA). Le fasi mobili impiegate sono state acqua acidificata con acido acetico 0.2% (A) e metanolo (B) a un flusso di 3 mL/min. Il tempo totale della corsa cromatografica è stato di 155 min e il gradiente è stato modificato come segue: dal 70% di A e il 30% di B, si è passati in 8 min al 65% di A e al 35% di B, questa composizione è stata mantenuta per 92 min, in 5 min si è raggiunto il 50% di A e il 50% di B e lo si è mantenuto per 30 min, in 3 min il gradiente è stato portato allo 0% di A e al 100% di B, è rimasto in queste condizioni per 12 min prima di ritornare alle condizioni iniziali dell'analisi in 5 min.

### ***3.3 Reazione di ossidazione di Fenton ( $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ )***

La reazione di ossidazione di Fenton è stata eseguita in una *vial* di vetro da 20 mL; la miscela di reazione del volume di 10 mL è stata tenuta continuamente sotto agitazione a temperatura ambiente nel sistema aperto. Il pH della miscela è stato portato a 3.5 all'inizio di ogni esperimento con una soluzione acquosa di  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

La concentrazione iniziale dello *standard* fenolico era 1 mM, e la concentrazione iniziale del catalizzatore ferroso era 0.5 mM. Il rapporto molare  $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$  era 1:10. Il rapporto molare fenolo: $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$  utilizzato in questo studio non ha causato la completa mineralizzazione dei composti fenolici indagati.

### ***3.4 Reazione di ossidazione enzimatica***

La reazione di ossidazione enzimatica è stata eseguita aggiungendo alla soluzione tampone ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ ; pH = 5) contenente lo standard fenolico a una concentrazione di 5 mM l'enzima tirosinasi da fungo (EC 1.14.18; 300 U/mg). La reazione è avvenuta a temperatura ambiente, in un sistema aperto, una *vial* da 10

mL. Il volume complessivo della miscela di reazione, sottoposta a continua agitazione, era di 5 mL.

Una soluzione acquosa satura di  $\text{CaCl}_2$  è stata utilizzata per inattivare l'enzima e bloccare la reazione.

### ***3.5 Autossidazione dell'olio vergine di oliva***

Campioni da 60 g di olio vergine di oliva sono stati posti in piastre Petri, coperte con carta da filtro e tenute in stufa per diversi giorni a 60 °C. Ogni 5 giorni è stato misurato il numero di perossidi secondo il metodo ufficiale della Commissione Europea (Regolamento CE n. 1989/2003 della Commissione del 6 novembre 2003 che modifica il regolamento CEE n. 2568/91). L'estrazione dei composti fenolici dalla matrice oleosa è stata eseguita secondo la procedura riportata da Montedoro et al. (1992a), l'estratto fenolico è stato poi analizzato tramite cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata con le tecniche di rivelazione UV-Vis a serie di diodi (Diode array detector, DAD) e alla spettrometria di massa ESI-MS (Electrospray ionization mass spectrometry) e LC/MS Q-TOF. La stessa procedura è stata applicata all'olio rettificato, al quale dopo rimozione dell'ossigeno per gorgogliamento di azoto, è stato addizionato l'idrossitirosole (15.0 mg/Kg).

Il processo di autossidazione dell'olio vergine di oliva è stato monitorato nel tempo per osservare la relazione tra il sistema modello (reazione enzimatica e reazione non enzimatica) e l'autossidazione dell'olio stesso. I prodotti di degradazione ossidativa del 3,4-DHPEA sono stati confermati nell'olio rettificato.

### 3.6 *Analisi HPLC-DAD-ESI-MS*

I campioni sono stati analizzati usando un cromatografo Varian composto da una pompa 218 e un rivelatore a serie di diodi ProStar 335 accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo Varian 1200 L con sorgente ESI (Electrospray ionisation).

Per le analisi HPLC è stata utilizzata una colonna C18 Intersil ODS-3 (250 x 4.6 mm, 5µm). Il volume di campione iniettato è stato 20 µL, l'eluizione è stata condotta ad una velocità di flusso di 1.0 mL/min usando come fasi mobili acqua/acido acetico (99.8:0.2 v/v) (solvente A) e metanolo (solvente B). Il gradiente è stato modificato come segue: dal 95% del solvente A, mantenuto per 2 min, si è passati in 8 min al 75% del solvente A, poi al 60% di A in 10 min e al 50% in 16 min, fino ad arrivare allo 0% di A e al 100% di B in 14 min, questa composizione è stata mantenuta per 20 min, per tornare poi alle condizioni iniziali dell'analisi in 7 min. Il tempo totale della corsa cromatografica è stato di 77 min. L'intervallo di lunghezze d'onda impostato è stato 190 – 600 nm ed è stato registrato anche lo spettro a 278 nm.

Lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo utilizzato per le analisi LC-MS è stato connesso al rivelatore a sistemi di diodi tramite una valvola di *split* che ha consentito un flusso in ingresso di 0.2 mL/min. Durante le analisi LC-MS le scansioni sono state eseguite sia con la ionizzazione ESI in positivo che in negativo. Lo spettro di massa è stato registrato impostando le seguenti condizioni analitiche: il voltaggio dello *spray* è stato settato a 5000 V per le scansioni degli ioni positivi e a 4500 V per gli negativi, il voltaggio dello *shield* era 600 V, il voltaggio del capillare è stato ottimizzato dal programma di *Autotune*, il *range* di scansione di massa *m/z* per le analisi in *full scan* era 100 – 700, la pressione del *nebulising gas* è stata impostata a 50 psi, la pressione e la temperatura del *drying gas* erano rispettivamente 18 psi e 230 °C, il voltaggio dell'elettromoltiplicatore è stato impostato a 1100 V. La dissociazione di ioni precursori selezionati, negli

esperimenti di MS/MS, è stata indotta per collisione (CID) con argon utilizzando diverse energie di collisione. Per la caratterizzazione delle molecole sono stati utilizzati i seguenti metodi di MS/MS: *Product Ion Scan* (PIS), *Neutral Loss Scan* (NLS), *Single Reaction Monitoring* (SRM) e *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). I dati sono stati acquisiti con il sistema Varian MS workstation e con il software PolyView 2000 – Diode Array Spectral Processing.

### ***3.6.1 Analisi Ultra High Definition (UHD) Accurate – Mass Q – TOF LC/MS***

Le analisi LC/MS Q-TOF sono state eseguite utilizzando un sistema HPLC Agilent 1290, nelle stesse condizioni sperimentali riportate sopra, interfacciato con uno spettrometro di massa Q-TOF Agilent Ultra High Definition (UHD) Accurate-Mass 6540. Il sistema 6540 Q-TOF è dotato di tecnologia Agilent *Jet Stream* con una sensibilità MS/MS a livello di femtogrammi e una capacità di risoluzione di massa pari a 40.000. Le scansioni sono state eseguite sia in modalità di ionizzazione positiva che negativa. Le condizioni analitiche impostate erano le seguenti: il voltaggio del capillare è stato settato a 4000 V per le scansioni degli ioni positivi e a 3500 V per gli ioni negativi, il voltaggio del *fragmentor* è stato impostato a 120 V, il voltaggio dello *skimmer* è stato impostato a 65 V, il voltaggio dell'*octapole* era 750 V, la temperatura e la pressione del *drying gas* erano 300 °C e 40 psi, rispettivamente, la temperatura dello *sheat gas* era 280 °C. I dati sono stati acquisiti con il software della workstation MassHunter.

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

L'ossidazione del *p*-HPEA, del 3,4-DHPEA e del 3,4-DHPEA-EDA è stata monitorata nel tempo attraverso la cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata con le tecniche di rivelazione UV-Vis a serie di diodi (Diode array detector, DAD) e alla spettrometria di massa ESI-MS (Electrospray ionization mass spectrometry) e LC/MS Q-TOF.

A diversi tempi di reazione, aliquote della miscela sono state analizzate tramite HPLC-DAD-ESI-MS, HPLC-ESI-MS/MS e LC/MS Q-TOF.

A differenza della reazione di ossidazione di Fenton che è partita immediatamente dopo l'aggiunta del perossido di idrogeno alla miscela che si è colorata di rosso-arancio, la reazione di ossidazione enzimatica è avanzata più lentamente con formazione graduale nel tempo dei prodotti di reazione. In entrambe le reazioni infatti, si è generato il chinone, ma nel caso della reazione di ossidazione di Fenton è sparito nel corso di pochi minuti convertendosi velocemente in prodotti di ossidazione più complessi, come dimeri e probabilmente polimeri.

I dati spettrali e i prodotti di frammentazione dei composti di partenza e dei loro prodotti di ossidazione sono mostrati nelle tabelle 3-7.

Il *p*-HPEA, il 3,4-DHPEA e il 3,4-DHPEA-EDA sono meglio rilevabili in modalità di ionizzazione ESI negativa come  $[M-H]^-$ .

### 4.1 *p*-HPEA (1)

#### 4.1.1 *Reazione di ossidazione enzimatica*

Inizialmente è stata analizzata la soluzione tampone contenente il *p*-HPEA, prima dell'aggiunta dell'enzima ( $t = 0$  min). Il cromatogramma della corrente ionica totale

(TIC) della miscela, acquisito in modalità di ionizzazione ESI negativa, ha mostrato il solo picco del substrato (**1**) al tempo di ritenzione di 19.0 min (Fig. 7A). Lo spettro di massa del picco **1**, ottenuto attraverso l'analisi HPLC-ESI-MS in modalità di ionizzazione ESI negativa, era costituito dallo ione molecolare  $[M-H]^-$  con rapporto  $m/z$  di 137. Questo risultato è stato confermato anche dalla sua banda di assorbimento nell'UV a 277 nm. Lo spettro di MS/MS dello ione precursore con  $m/z$  di 137, acquisito tramite il metodo *Product Ion Scan* (PIS), ha generato ioni prodotto con pesi molecolari di 119  $[M-H_2O]^-$  e 106  $[M-CH_2OH]^-$  (Tab. 3). Dopo un tempo di reazione di 20 min, nel cromatogramma è comparso un nuovo picco a 14.8 min (**2**). Lo spettro di massa, acquisito in ESI negativa, ha mostrato lo ione molecolare  $[M-H]^-$  con un rapporto  $m/z$  di 153; questo segnale era dovuto alla formazione del 3,4-DHPEA (Fig. 7B). Questa assegnazione è stata confermata dal tempo di ritenzione e dallo spettro di massa del composto standard, nonché dallo spettro di assorbimento con la banda più intensa a 282 nm. La scansione per i frammenti dello ione precursore 153 ha generato lo ione prodotto con rapporto  $m/z$  di 123  $[M-CH_2OH]^-$  (Tab. 3). Dopo 180 min di reazione, l'intensità del picco appartenente al *p*-HPEA è diminuita, quella del picco dovuto al 3,4-DHPEA è aumentata e altri quattro nuovi picchi prodotto sono comparsi nel cromatogramma (Fig. 7C). Il picco al tempo di ritenzione di 12.1 min aveva un valore del rapporto  $m/z$  di 151, sia in modalità di ionizzazione ESI positiva, che negativa. Questo potrebbe appartenere al chinone radicale del 3,4-DHPEA (**3**). L'esperimento di MS/MS, eseguito con il metodo PIS in modalità ESI negativa, per lo ione precursore con rapporto  $m/z$  di 151 ha prodotto ioni frammento

**Tabella 3.** Tempi di ritenzione, massimi di assorbimento UV-Vis, dati ESI-MS e ESI-MS/MS in negativo del tirosolo, dell'idrossitirosolo e dei loro prodotti di ossidazione enzimatica.

Picco	Composti	t <sub>r</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	Frammenti principali in ESI negativa					
				[M - H] <sup>-</sup>	[M + 2H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	[M + CH <sub>3</sub> COOH] <sup>-</sup>	[M + CH <sub>3</sub> OH] <sup>-</sup>	Esperimenti Product Ion Scan	Esperimenti Single Reaction Monitoring
1	p-HPEA <sup>a</sup>	19,0	222/276	137		197		137 → 119 → 106	
2	3,4-DHPEA <sup>a</sup>	14,8	219/278	153				153 → 123	
3	chinone del 3,4-DHPEA <sup>b</sup>	12,1	217/254/400	151				151 → 133 → 123 → 122	
4	dimero chinone-p-HPEA <sup>b</sup>	28,6	217/267/435	288	324		320		288 → 151; 288 → 137
5	dimero chinone-chinone <sup>b</sup>	27,5	208/260/346	303				302 → 284 → 272 → 254 → 223 → 162 → 151 → 122 → 121	
6	dimero chinone-chinone <sup>b</sup>	31,5	210/262/343	303				302 → 284 → 272 → 254 → 223 → 162 → 151 → 122 → 121	
7	N.I.	24,4	219/319/385	304					
8	dimero chinone-3,4-DHPEA <sup>b</sup>	35,2	218/255/289	304				304 → 153 → 123	304 → 151; 304 → 153
17	prodotto di ossidazione del 3,4-DHPEA	7,0	224/278	169				169 → 151 → 123	
20	acido 3,4-diidrossifenilacetico <sup>a</sup>	16,8	217/280	167					

<sup>a</sup> Identificati per confronto con composti standard. <sup>b</sup> Tentativo di identificazione attraverso esperimenti di MS/MS con metodi PIS e SRM.  
N.I. = Non Identificato.

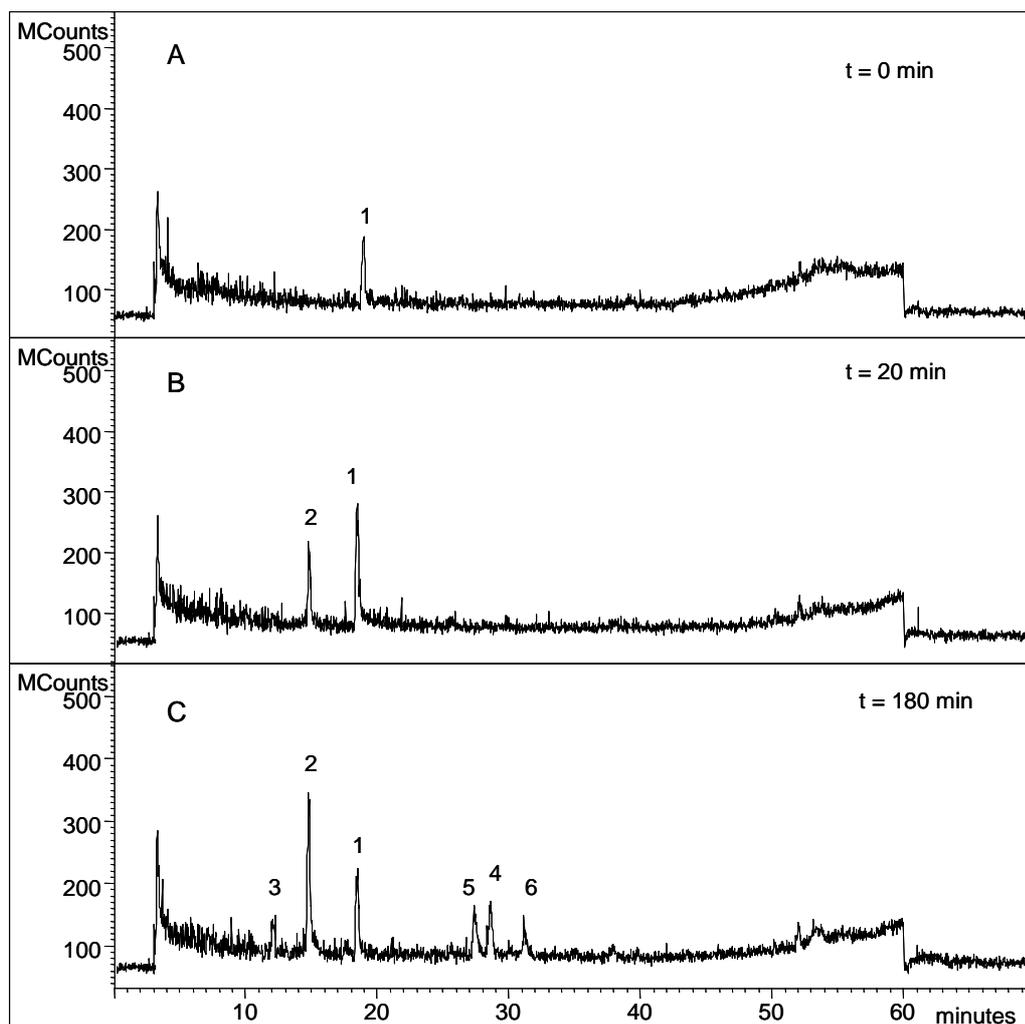
**Tabella 4.** Tempi di ritenzione, massimi di assorbimento UV-Vis, dati ESI-MS e ESI-MS/MS in negativo del tirosolo, dell'idrossitirosolo e dei loro prodotti di ossidazione di Fenton.

Frammenti principali in ESI positiva						
Picco	Composti	t <sub>r</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	[M+H] <sup>+</sup>	[M-OH] <sup>+</sup>	Esperimenti Product ion Scan
9	N.I.	17,3	217/268/384	305		
10	N.I.	19,2	217/295/365	344	327	344 → 327 → 283 → 177 → 133
11	N.I.	21,0	debole	388	371	
12	N.I.	22,6	217/280/363	432		
13	N.I.	24,0	debole	476	459	
14	N.I.	25,4	debole	525		
21	prodotto di ossidazione del 3,4-DHPEA	12,8	debole	217		

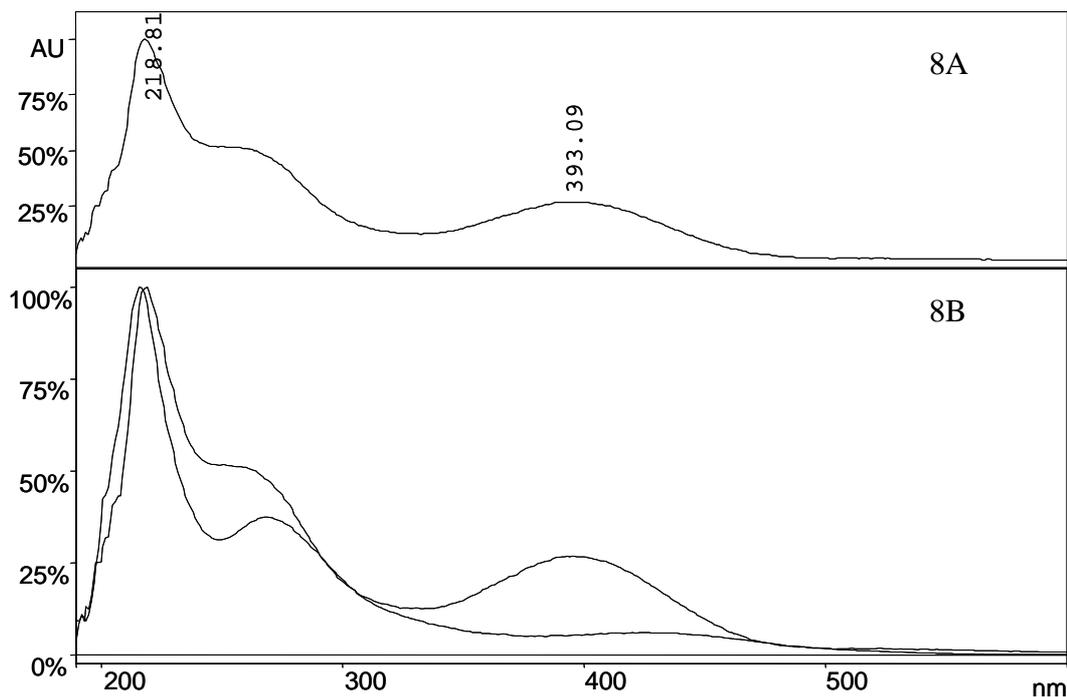
Frammenti principali in ESI negativa						
Picco	Composti	t <sub>r</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	[M - H] <sup>-</sup>	[M + CH <sub>3</sub> COOH] <sup>-</sup>	Esperimenti Product ion Scan
1	p-HPEA <sup>a</sup>	19,0	222/276	137	197	137 → 119 → 106
2	3,4-DHPEA <sup>a</sup>	14,8	219/278	153		153 → 123
3	chinone del 3,4-DHPEA <sup>b</sup>	12,1	217/254/400	151		151 → 133 → 123 → 122
5	dimero chinone-chinone <sup>b</sup>	27,5	208/260/346	303		302 → 284 → 272 → 254 → 223 → 162 → 151 → 122 → 121
6	dimero chinone-chinone <sup>b</sup>	31,5	210/262/343	303		302 → 284 → 272 → 254 → 223 → 162 → 151 → 122 → 121
15	N.I.	26,2	218/249/439	605		
16	N.I.	27,4	debole	649		
17	prodotto di ossidazione del 3,4-DHPEA	7,0	224/278	169		169 → 151 → 123
18	N.I.	12,0	debole	163		
19	N.I.	13,8	218/282	167		167 → 149 → 123
20	acido 3,4-diidrossifenilacetico <sup>a</sup>	17,0	217/278	167		
22	N.I.	15,8	219/278/326	207		

<sup>a</sup> Identificati per confronto con composti standard. <sup>b</sup> Tentativo di identificazione attraverso esperimenti di MS/MS con metodi PIS e SRM. N.I. = Non Identificato.



**Figura 7.** Cromatogramma della corrente ionica totale (TIC) acquisito in ESI negativa dei prodotti di ossidazione enzimatica del p-HPEA (A) senza enzima nella miscela di reazione, (B) dopo 20 min dall'aggiunta dell'enzima, (C) dopo 180 min dall'aggiunta dell'enzima; attività enzimatica 300 U/mg.

con pesi molecolari di 133 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> e 123 [M-CO]<sup>-</sup> (Tab. 3). Lo spettro UV-Vis del composto **3** aveva la banda del massimo di assorbimento a 400 nm, che è caratteristica di questi chinoni (Fig. 8A). Lo spettro di massa in ESI negativa del composto **4**, al tempo di ritenzione di 26.8 min, ha mostrato un picco con peso molecolare di 288 (Fig. 7C). Esperimenti di MS/MS eseguiti con il metodo *Selected Reaction Monitoring* (SRM) sulla singola transizione dello ione precursore con rapporto *m/z* di 288 hanno generato ioni prodotto con pesi molecolari di 137 e 151 (Tab. 3). Gli spettri di assorbimento dei composti **3** e **4**, come mostrato nella figura 8B, risultano essere simili nella regione spettrale 200 – 300 nm e si osserva uno spostamento verso il rosso (*redshift*) della banda a 400 nm per il composto **4**; da queste evidenze sperimentali è possibile ipotizzare che i composti **3** e **4** potrebbero essere strutturalmente simili. Quindi è possibile ipotizzare che si potrebbe trattare di un dimero formatosi dall'accoppiamento ossidativo del chinone e del *p*-HPEA; inoltre, nel cromatogramma della miscela della reazione di ossidazione enzimatica del 3,4-DHPEA non è comparso nessun picco con un peso molecolare di 288. I picchi **5** e **6** ai tempi di ritenzione di 27.5 min e di 31.5 min rispettivamente (Fig. 7C), avevano spettri UV-Vis simili, e dato che avevano anche stesso spettro di massa con lo ione molecolare [M-H]<sup>-</sup> con rapporto *m/z* di 303, potrebbero corrispondere a due isomeri. Le scansioni per i frammenti dei picchi con *m/z* di 303 tramite il metodo PIS, in modalità di ionizzazione ESI negativa, hanno generato ioni prodotto con pesi molecolari di 302, 284, 272, 254, 223, 151, 122 e 121 (Tab. 3). Quindi è possibile ipotizzare che i picchi **5** e **6** potrebbero appartenere a dimeri formati dall'accoppiamento ossidativo di due radicali chinoni.



**Figura 8.** Spettro UV-Vis del composto 3 (8A), sovrapposizione degli spettri UV-Vis dei composti 3 e 4 (8B).

#### 4.1.2 *Reazione di ossidazione di Fenton ( $Fe^{2+}/H_2O_2$ )*

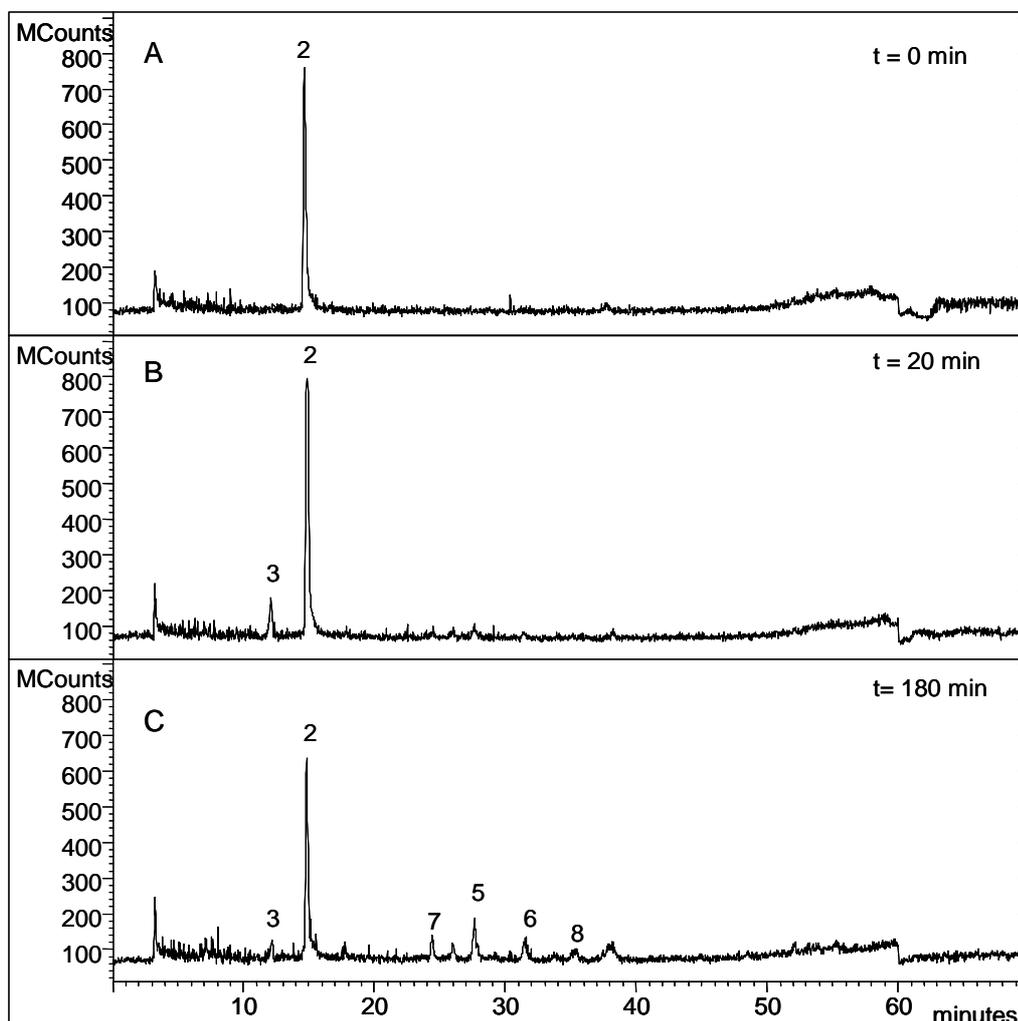
La reazione del composto **1** con il reagente di Fenton ha generato gli stessi prodotti della reazione di ossidazione enzimatica: il 3,4-DHPEA (**2**) e il chinone del 3,4-DHPEA (**3**), con gli stessi tempi di ritenzione e spettri di massa riportati per la reazione di ossidazione enzimatica. Questi prodotti sono stati confermati anche dagli spettri di assorbimento UV-Vis. Nella tabella 4 sono riportati i prodotti di ossidazione della reazione di Fenton del *p*-HPEA. Il picco con valore del rapporto  $m/z$  di 303, essendo molto meno intenso, era visibile solamente estraendo la massa dal cromatogramma totale (Extracted ion chromatogram, EIC). Durante il corso

della reazione, l'intensità dei picchi prodotto presenti nel cromatogramma è diminuita e il picco relativo al chinone del 3,4-DHPEA è scomparso.

## 4.2 3,4-DHPEA (2)

### 4.2.1 Reazione di ossidazione enzimatica

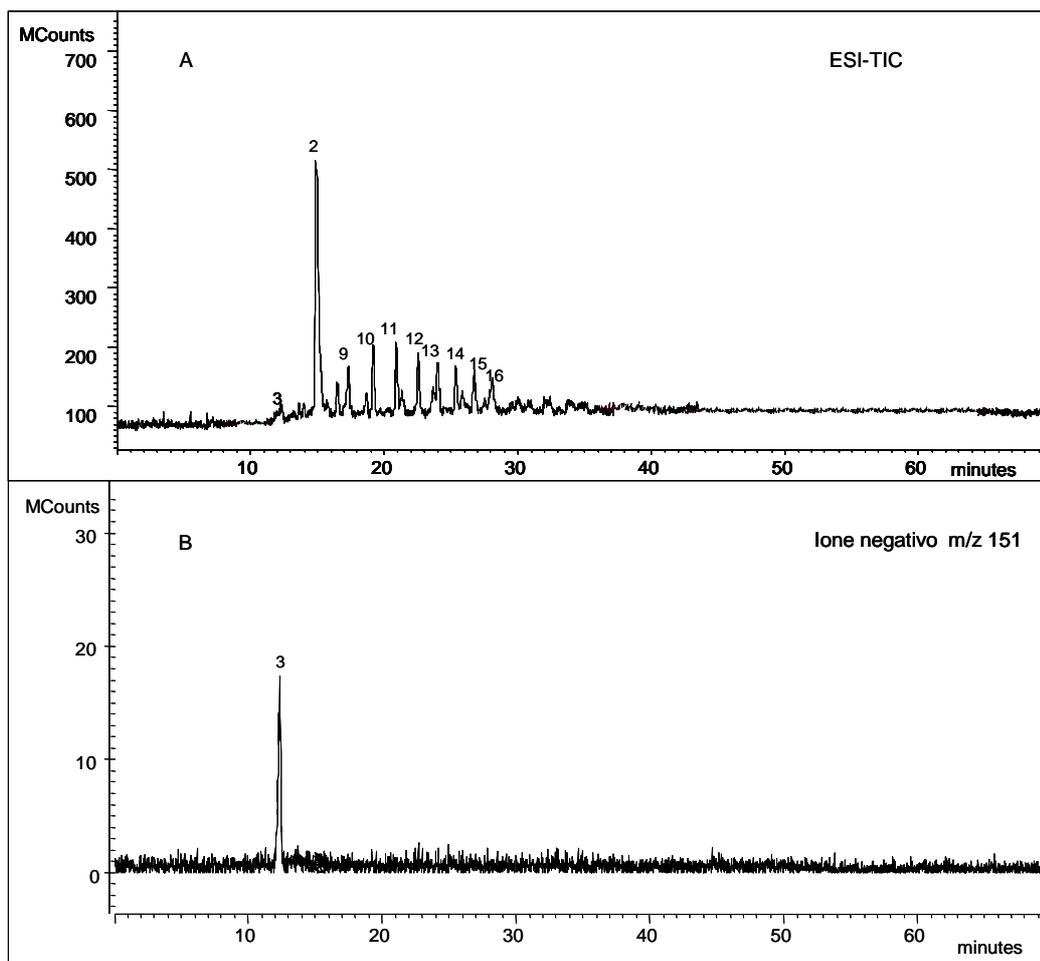
Al tempo  $t = 0$  min nella soluzione era presente solo il 3,4-DHPEA (**2**), come mostrato nella figura 9A. Dopo un tempo di reazione di 20 min nell'ESI-TIC, acquisito in negativo, è comparso il picco appartenente al chinone del 3,4-DHPEA (**3**) (Fig. 9B). Dopo 180 min di reazione quattro nuovi picchi prodotto sono comparsi nel cromatogramma (Fig. 9C). Ai tempi di ritenzione di 27.5 min e di 31.5 min rispettivamente, sono comparsi di nuovo i picchi **5** e **6** che avevano spettri di massa e di assorbimento nell'UV identici a quelli riportati per la reazione di ossidazione enzimatica del p-HPEA. Il picco **7**, al tempo di ritenzione di 24.4 min, aveva un valore del rapporto  $m/z$  di 304, non è stato possibile assegnare a questo composto nessuna struttura molecolare. Anche il composto **8** a 35.2 min aveva un rapporto  $m/z$  di 304. Gli esperimenti di MS/MS eseguiti con il metodo PIS in ESI negativa, per lo ione precursore con  $m/z$  di 304, hanno generato gli ioni frammento con pesi molecolari di 151, 153 e 123 (Tab. 3), dimostrando che si potrebbe trattare di un dimero derivante dall'accoppiamento ossidativo dei composti **2** e **3**. Nel tempo l'intensità del picco dovuto al 3,4-DHPEA è diminuita, il picco del chinone è scomparso, mentre l'intensità dei picchi **5**, **6**, **7** e **8** è aumentata.



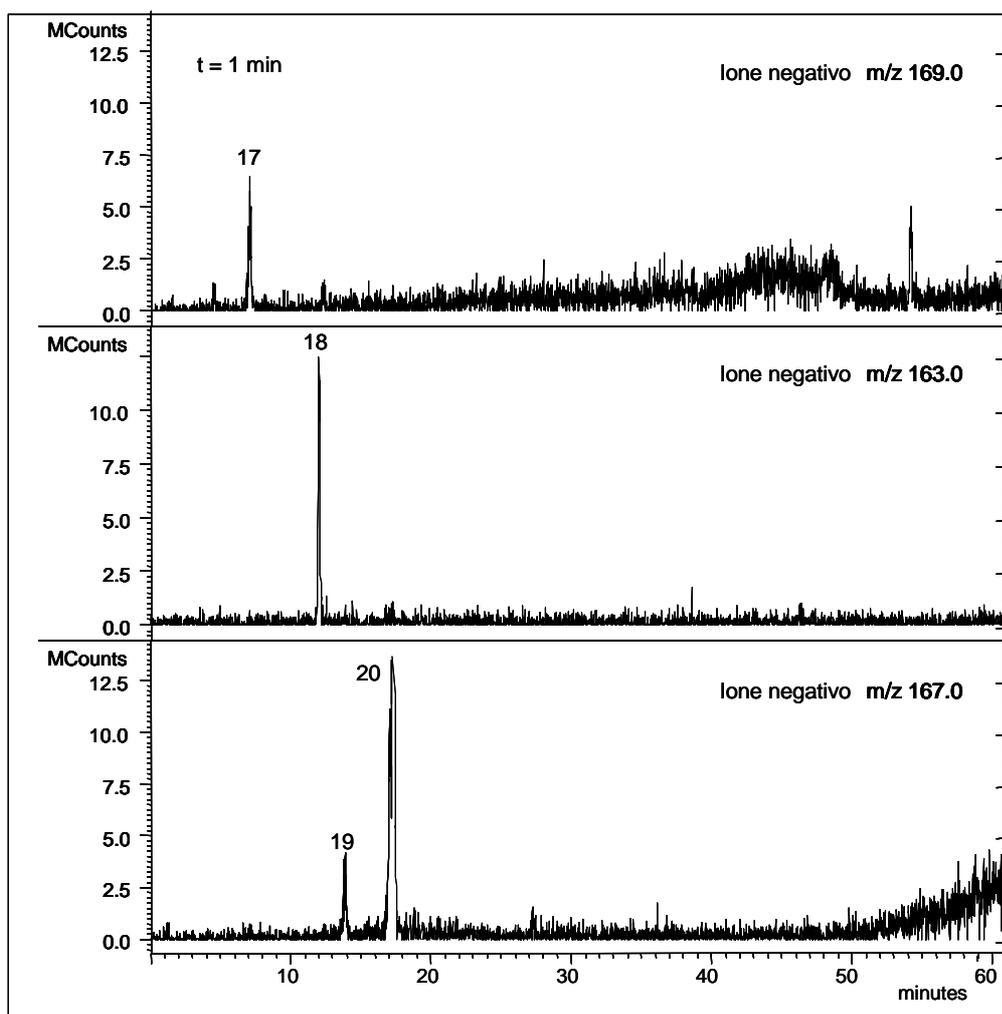
**Figura 9.** Cromatogramma della corrente ionica totale (TIC) acquisito in ESI negativa dei prodotti di ossidazione enzimatica del 3,4-DHPEA (A) senza enzima nella miscela di reazione, (B) dopo 20 min dall'aggiunta dell'enzima, (C) dopo 180 min dall'aggiunta dell'enzima; attività enzimatica 300 U/mg.

#### **4.2.2 Reazione di ossidazione di Fenton ( $Fe^{2+}/H_2O_2$ )**

La reazione del composto **2** con il reagente di Fenton ha generato molti più picchi prodotto della reazione di ossidazione enzimatica. Nella tabella 4 sono riportati i prodotti di ossidazione di Fenton del 3,4-DHPEA. L'ESI-TIC ha mostrato un picco dovuto al composto **2**, un picco dovuto al chinone del 3,4-DHPEA (**3**) e altri picchi, visibili meglio in modalità di ionizzazione ESI positiva, con pesi molecolari di 305 (**9**), 344 (**10**), 388 (**11**), 432 (**12**), 476 (**13**), 525 (**14**), 605 (**15**) e 649 (**16**) (Fig. 10). L'esperimento di MS/MS, eseguito con il metodo PIS in ESI positiva, per lo ione molecolare 344 ha prodotto gli ioni frammento con i seguenti pesi molecolari: 327, 283, 177 e 133 (Tab. 4); probabilmente nella miscela di reazione si sono instaurate reazioni di dimerizzazione e di polimerizzazione. Al tempo di ritenzione di 7.0 min, si notava un picco, visibile meglio nel cromatogramma estratto (EIC), con un valore del rapporto  $m/z$  di 169 (**17**) (Fig. 11).



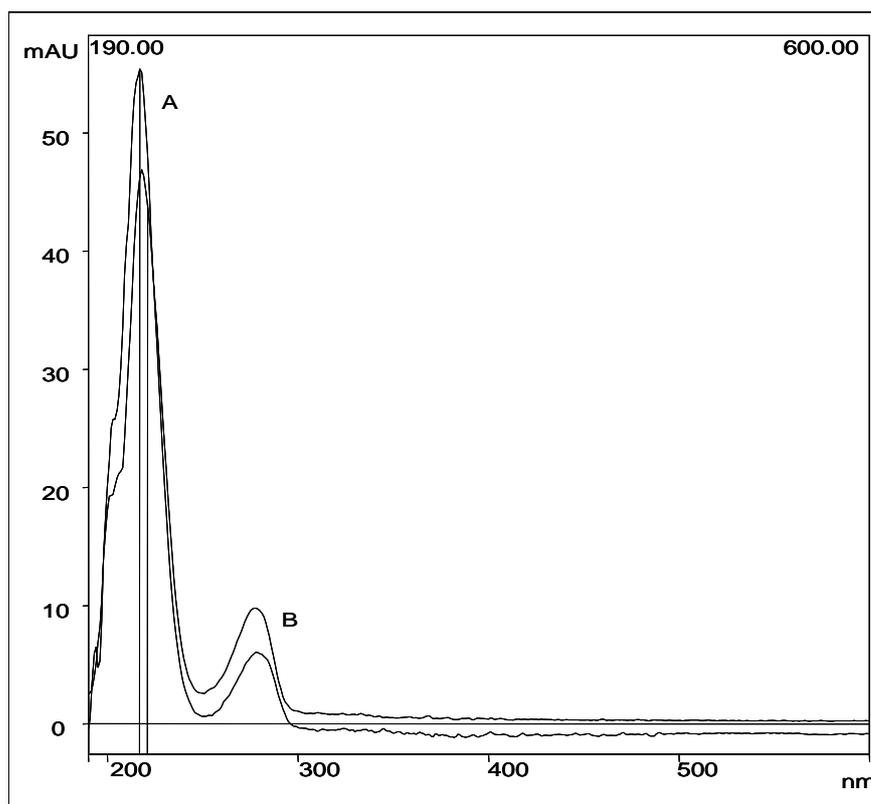
**Figura 10.** Cromatogramma della corrente ionica totale (TIC) acquisito in ESI negativa dei prodotti di ossidazione di Fenton del 3,4-DHPEA, 0.5 mM Fe<sup>2+</sup>, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A); cromatogramma estratto (EIC) in ESI negativa per il picco 3, m/z 151 (B).



**Figura 11.** Cromatogrammi estratti (EICs) per i prodotti di ossidazione di Fenton del 3,4-DHPEA.

Gli esperimenti di MS/MS eseguiti tramite il metodo PIS per lo ione precursore 169 hanno generato ioni frammento con valori del rapporto  $m/z$  di 151  $[M-H_2O]^-$  e 123  $[M-CH_2CH_2O]^-$  (Tab. 4); questo risultato potrebbe essere dovuto all'inserzione di un gruppo ossidrilico nella molecola del 3,4-DHPEA. Questa ipotesi risulterebbe supportata anche dallo spettro di assorbimento nell'UV del composto **17**. Come mostrato in figura 12 gli spettri di assorbimento del 3,4-DHPEA (A) e del composto

**17 (B)** sono simili, per cui è possibile supporre che si tratti di molecole strutturalmente analoghe. Questo prodotto di ossidazione era presente anche nelle reazioni di ossidazione enzimatica e di Fenton del *p*-HPEA, e nella reazione enzimatica del 3,4-DHPEA, comparando nel cromatogramma sempre dopo la formazione del chinone. L'EIC come riportato in figura 11 ha mostrato anche un picco a 12.0 min con un valore del rapporto  $m/z$  di 163 (**18**) e un altro a 13.8 min con un peso molecolare di 167 (**19**). Le scansioni per i frammenti dello ione precursore 167 acquisite con il metodo PIS, hanno generato ioni prodotto con valori del rapporto  $m/z$  di 149 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 139 [M-CO]<sup>-</sup>, 123 [M-CO-OH]<sup>-</sup>, 109 [M-CO-CO]<sup>-</sup> e 93 [M-CO-CO-OH]<sup>-</sup> (Tab. 4). Parte della frammentazione di questa molecola risulta essere simile a quella del chinone del 3,4-DHPEA, si potrebbe ipotizzare che ci sia stata l'inserzione di un gruppo ossidrilico nella molecola del chinone. Al tempo di ritenzione di 17.0 min, nel cromatogramma era presente un altro picco con un valore  $m/z$  di 167 (**20**) che potrebbe appartenere all'acido 3,4-diidrossifeliacetico. Questa assegnazione è stata confermata dallo spettro UV e dallo spettro di massa del composto standard. Questo prodotto di ossidazione era presente anche nelle miscele delle reazioni di ossidazione enzimatica e di Fenton del *p*-HPEA e anche nella miscela della reazione enzimatica del 3,4-DHPEA. Ai tempi di ritenzione di 12.8 min e di 15.8 min sono comparsi altri due prodotti di ossidazione con pesi molecolari di 217 (**21**) e di 207 (**22**), rispettivamente (Tab. 4).



**Figura 12.** Sovrapposizione degli spettri UV dei composti 2 e 17.

I principali risultati sperimentali fin qui acquisiti sono stati confermati anche attraverso analisi LC/MS Q-TOF. Questo sistema, grazie alla tecnologia *Jet Stream* che permette una migliore focalizzazione delle gocce prodotte in ESI, risulta molto più sensibile ed è inoltre in grado di raggiungere elevati livelli di accuratezza di massa e di risoluzione. La *Workstation MassHunter* dell'Agilent, per le analisi MS e MS/MS, ci ha permesso di identificare attraverso la formula molecolare e la massa esatta i composti presenti nella miscela di reazione. Nella tabella 5 sono riportati i risultati ottenuti analizzando la miscela di reazione dell'ossidazione di Fenton del 3,4-DHPEA (**2**). Attraverso la formula molecolare e la massa esatta è stata confermata la presenza nella miscela di reazione del chinone del 3,4-DHPEA (**3**).

Inoltre il prodotto di ossidazione del 3,4-DHPEA con un valore del rapporto  $m/z$  di 167 (**19**), che compariva al tempo di ritenzione di 13.8 min, possiede un ossigeno in più nella sua formula molecolare rispetto a quella del chinone; questo confermerebbe l'ipotesi iniziale dell'inserzione di un gruppo ossidrilico nella struttura molecolare del chinone. Risulta confermata anche la presenza, nella miscela di reazione, dell'acido 3,4-diidrossifenilacetico con formula molecolare C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> (**20**). Il prodotto di ossidazione con valore del rapporto  $m/z$  di 169 al tempo di ritenzione di 7.0 min, presenta nella sua formula molecolare un ossigeno in più rispetto alla molecola del 3,4-DHPEA, questa evidenza supporterebbe l'ipotesi secondo cui sia avvenuta l'inserzione di un gruppo ossidrilico nella molecola dell'idrossitirosolo. Infine nella tabella 3 sono riportate anche la massa esatta e la formula molecolare che potrebbero appartenere al dimero formatosi dall'accoppiamento ossidativo del il 3,4-DHPEA e del suo chinone (**8**).

**Tabella 5.** Tempi di ritenzione, dati LC/MS Q-TOF in modalità di ionizzazione negativa del 3,4-DHPEA e dei suoi prodotti di ossidazione di Fenton.

Picco	Composti	$t_r$ (min)	$[M-H]^-$	formula molecolare	errore
2	3,4-DHPEA <sup>a</sup>	14,8	153.05484	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	-1.31
3	chinone del 3,4-DHPEA <sup>a</sup>	12,1	151.04343	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	-22.13
8	dimero chinone-3,4-DHPEA <sup>a</sup>	35,2	304.11062	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	-23.26
17	prodotto di ossidazione del 3,4-DHPEA <sup>a</sup>	7,0	169.05558	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	-28.84
19	prodotto di ossidazione del 3,4-DHPEA <sup>a</sup>	13,8	167.04009	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	-30.06
20	acido 3,4-diidrossifenilacetico <sup>a</sup>	17,0	167.03993	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	-29.18

<sup>a</sup> Tentativo di identificazione attraverso esperimenti LC/MS Q-TOF.

### 4.3 3,4-DHPEA-EDA (1a)

#### 4.3.1 Reazione di ossidazione enzimatica

Al tempo  $t = 0$  min, prima dell'aggiunta dell'enzima alla soluzione tampone, nel ESI-TIC, acquisito in modalità di ionizzazione ESI negativa, era presente solo il picco del composto 3,4-DHPEA-EDA (**1a**) al tempo di ritenzione di 34.2 min. Lo spettro di massa ha mostrato lo ione molecolare  $[M-H]^-$  con il valore del rapporto  $m/z$  di 319. Lo spettro di MS/MS, registrato tramite il metodo PIS in modalità di ionizzazione ESI negativa, per lo ione precursore 319 ha generato ioni prodotto con rapporti  $m/z$  di 301  $[M-H_2O]^-$ , 275  $[M-COO]^-$ , 248  $[M-COOCH_2CH_2]^-$ , 195  $[M-CH_2Ph(OH)_2]^-$ , 183  $[M-CH_2CH_2Ph(OH)_2]^-$ , 165  $[M-OCH_2CH_2PH(OH)_2]^-$ , 138  $[M-COOCH_2CH_2Ph(OH)_2]^-$  e 123  $[M-CH_2COOCH_2CH_2Ph(OH)_2]^-$  (Tab. 4). Dopo 20 min di reazione, nel TIC della miscela, è comparso il picco del 3,4-DHPEA (**2**), la cui intensità è aumentata con il procedere della reazione di ossidazione. Dopo un tempo di reazione di 180 min, il cromatogramma della miscela di reazione, acquisito in ESI negativa, ha evidenziato un altro picco a 17.0 min (**3a**), visibile meglio nell'EIC, con valore del rapporto  $m/z$  di 183. La scansione per i frammenti dello ione precursore con  $m/z$  di 183, eseguita con il metodo PIS, ha generato ioni prodotto con pesi molecolari di 165  $[M-H_2O]^-$  e 139  $[M-COO]^-$  (Tab. 6). Questi risultati sperimentali permettono di ipotizzare che si potrebbe trattare della forma dialdeidica dell'acido decarbossimetilolenolico; quindi la reazione di ossidazione enzimatica potrebbe aver causato l'idrolisi del legame estereo della molecola del 3,4-DHPEA-EDA con conseguente liberazione del fenolo da una parte e della restante metà terpenica dall'altra. Dopo 180 min di reazione nel TIC è comparso anche un picco al tempo di ritenzione di 18.8 min, il cui spettro di massa ha mostrato in ESI negativa lo ione molecolare  $[M-H]^-$  con valore del rapporto  $m/z$  di 241. (**4a**).

**Tabella 6.** Tempi di ritenzione, massimi di assorbimento UV, dati ESI-MS e ESI-MS/MS in modalità di ionizzazione negativa del 3,4-DHPEA-EDA e dei suoi prodotti di ossidazione enzimatica.

Picco	Composti	$t_r$ (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[M - H] <sup>-</sup>	[M - O] <sup>-</sup>	[M - CH <sub>3</sub> COOH-O] <sup>-</sup>	Frammenti Principali in ESI negativa
							Esperimenti Product Ion Scan
1a	3,4-DHPEA-EDA <sup>b</sup>	34.2	230/280	319			319 → 301 → 275 → 248 → 195 → 183 → 165 → 138 → 123
1b	3,4-DHPEA-EDA <sup>b</sup>	35.9	230/280	377			377 → 349 → 273 → 241
2	3,4-DHPEA <sup>a</sup>	14.8	219/278	153			153 → 153
3a	forma dialdeidica dell'acido decarbossimetileneolico <sup>b</sup>	17.1	230	183			183 → 165 → 139
4a	forma dialdeidica dell'acido carbossimetileneolico <sup>b</sup>	18.8	223	241			241 → 210 → 181 → 165 → 139 → 127 → 111 → 95
5a	forma dialdeidica dell'acido carbossimetileneolico ossidata <sup>b</sup>	40.8	242	257	241	183	257 → 239 → 225 → 213 → 195 → 181 → 137 → 109 → 95
6a	3,4-DHPEA-EDA ossidato <sup>b</sup>	35.1	232/281	335			335 → 199 → 181 → 155 → 111

<sup>b</sup>Tentativo di identificazione tramite esperimenti di MS/MS con metodo PIS.

**Tabella 7.** Tempi di Ritenzione, Massimi di Assorbimento UV, dati ESI-MS e ESI-MS/MS in modalità di ionizzazione positiva/negativa del 3,4-DHPEA-EDA e dei suoi prodotti di ossidazione di Fenton.

Picco	Composti	t <sub>r</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	Frammenti Principali in ESI positiva			Esperimenti Product Ion Scan
				[M + H] <sup>+</sup>	[M - OH] <sup>+</sup>		
9	N.I.	17.3	217/268/384	305			
10	N.I.	19.2	217/295/365	344	327		344 → 327 → 283 → 177 → 133
11	N.I.	21.0	debole	388	371		
12	N.I.	22.6	217/280/363	432			
13	N.I.	24.0	debole	476	459		
14	N.I.	25.4	debole	525			
21	prodotto di ossidazione del 3,4-DHPEA	12.8	debole	217			
Frammenti Principali in ESI negativa							
Picco	Composti	t <sub>r</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	[M - H] <sup>-</sup>	[M - O] <sup>-</sup>	[M - CH <sub>3</sub> COOH-O] <sup>-</sup>	Esperimenti Product Ion Scan
1	3,4-DHPEA-EDA <sup>b</sup>	34.2	230/280	319			319 → 301 → 275 → 248 → 195 → 183 → 165 → 138 → 123
1a	3,4-DHPEA-EDA <sup>b</sup>	35.9	230/280	377			377 → 349 → 273 → 241
2	3,4-DHPEA <sup>a</sup>	14.8	219/278	153			153 → 153
3a	forma dialdeidica dell'acido decarbossimetileneolico <sup>b</sup>	17.1	230	183			183 → 165 → 139
4a	forma dialdeidica dell'acido carbossimetileneolico <sup>b</sup>	18.8	223	241			241 → 210 → 181 → 165 → 139 → 127 → 111 → 95
5a	forma dialdeidica dell'acido carbossimetileneolico ossidata <sup>b</sup>	40.8	242	257	241	183	257 → 239 → 225 → 213 → 195 → 181 → 137 → 109 → 95
6a	3,4-DHPEA-EDA ossidato <sup>b</sup>	35.1	232/281	335			335 → 199 → 181 → 155 → 111
7a	3,4-DHPEA-EDA ossidato <sup>b</sup>	47.0	debole	393	377		
15	N.I.	26.2	218/249/439	605			
16	N.I.	27.4	debole	649			
17	prodotto di ossidazione del 3,4-DHPEA <sup>b</sup>	7.0	224/278	169			169 → 151 → 123
18	N.I.	12.0	debole	163			
22	N.I.	15.8	219/278/326	207			

<sup>a</sup>Identificati per confronto con composti standard. <sup>b</sup>Tentativo di identificazione tramite esperimenti di MS/MS con metodo PIS. N.I. = Non identificato.

Lo spettro di MS/MS acquisito con il metodo PIS per lo ione precursore 241, ha generato ioni prodotto con pesi molecolari di 210 [M-OCH<sub>3</sub>], 181 [M-CH<sub>2</sub>COOH], 165 [M-OH-COOCH<sub>3</sub>], 139 [M-COOH-COOCH<sub>3</sub>], 127 [M-COOCH-C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O], 111 [M-COOCH<sub>3</sub>-CCO-CO] e 95 [M-CCOH-COOCH<sub>3</sub>-COH-OH] (Tab. 4). Da questa frammentazione è possibile ipotizzare che si potrebbe trattare della forma dialdeidica dell'acido carbossimetilolenolico. Attraverso l'HPLC semi-preparativa infatti, si sono separate due forme del 3,4-DHPEA-EDA, sia la forma carbossimetile, il cui ione molecolare in ESI negativa ha un rapporto  $m/z$  di 377 (**1b**), presente in basse concentrazioni, che la forma decarbossimetile con valore del rapporto  $m/z$  di 319 (**1a**) presente in maggiori quantità. Dopo un tempo di reazione di 180 min nel TIC della miscela di reazione del 3,4-DHPEA-EDA, acquisito in ESI negativa, è comparso anche un picco al tempo di ritenzione di 40.8 min (**5a**). Il picco **5a** possedeva uno spettro di massa con lo ione molecolare [M-H]<sup>-</sup> con rapporto  $m/z$  di 257, e gli ioni con  $m/z$  di 241 [M-O]<sup>-</sup> e di 183 [M-COOCH<sub>3</sub>-O]<sup>-</sup> (Tab. 6). Lo spettro di MS/MS, acquisito mediante il metodo PIS, per lo ione precursore con rapporto  $m/z$  di 257 ha generato gli ioni prodotto con pesi molecolari di 257, 239, 225, 213, 195, 181, 137, 109 e 95 (Tab.6). Da questa frammentazione è possibile dedurre che il composto **5a** potrebbe derivare dall'acido carbossimetilolenolico; si potrebbe ipotizzare che dopo l'idrolisi del legame estereo della molecola del 3,4-DHPEA-EDA ci sia stata l'ossidazione della forma dialdeidica dell'acido carbossimetilolenolico libero. Un altro prodotto di ossidazione del 3,4-DHPEA-EDA è comparso a un tempo di ritenzione di 35.1 min, lo spettro di massa ha mostrato lo ione molecolare [M-H]<sup>-</sup> con un valore del rapporto  $m/z$  di 335 (**6a**). La scansione per i frammenti dello ione precursore 335, eseguita con il metodo PIS, ha generato gli ioni prodotto con valori del rapporto  $m/z$  di 199, 181, 155 e 111 (Tab. 6).

### 4.3.2 *Reazione di ossidazione di Fenton ( $Fe^{2+}/H_2O_2$ )*

La reazione di ossidazione di Fenton del 3,4-DHPEA-EDA ha generato gli stessi prodotti di reazione dell'ossidazione enzimatica. L'ossidazione ha provocato l'idrolisi della molecola del 3,4-DHPEA-EDA con liberazione del 3,4-DHPEA e dei derivati della parte terpenica, che hanno subito successiva ossidazione. Nella tabella 7 sono riportati i prodotti di ossidazione della reazione di Fenton del 3,4-DHPEA-EDA. L'intensità del picco del 3,4-DHPEA è aumentata meno velocemente rispetto alla velocità di ossidazione del 3,4-DHPEA-EDA, questo è dovuto al fatto che l'idrossitirosole una volta formatosi ha preso parte a reazioni di ossidazione successive e nel cromatogramma sono comparsi tutti i prodotti di ossidazione della reazione di Fenton del 3,4-DHPEA. Un prodotto di ossidazione molto interessante è comparso nel cromatogramma a un tempo di ritenzione di 47.5 min, lo spettro di massa ha mostrato lo ione molecolare  $[M-H]^-$  con rapporto  $m/z$  di 393 e lo ione con rapporto  $m/z$  di 377 (Tab. 7). Questo composto potrebbe appartenere alla forma carbossimetile del 3,4-DHPEA-EDA ossidata (**7a**).

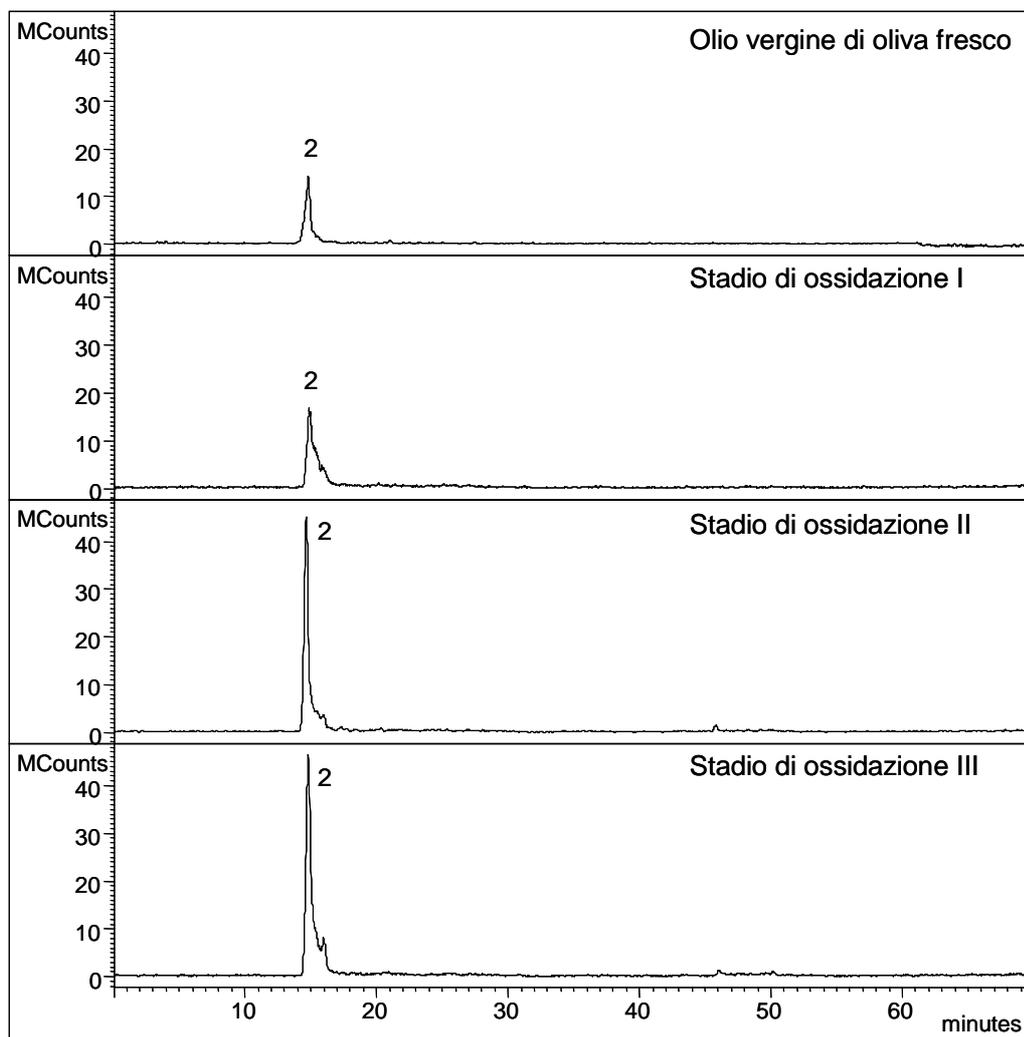
## 4.4 *Olio vergine di oliva*

### 4.4.1 *Prodotti di ossidazione dell'olio vergine di oliva durante il processo di autossidazione*

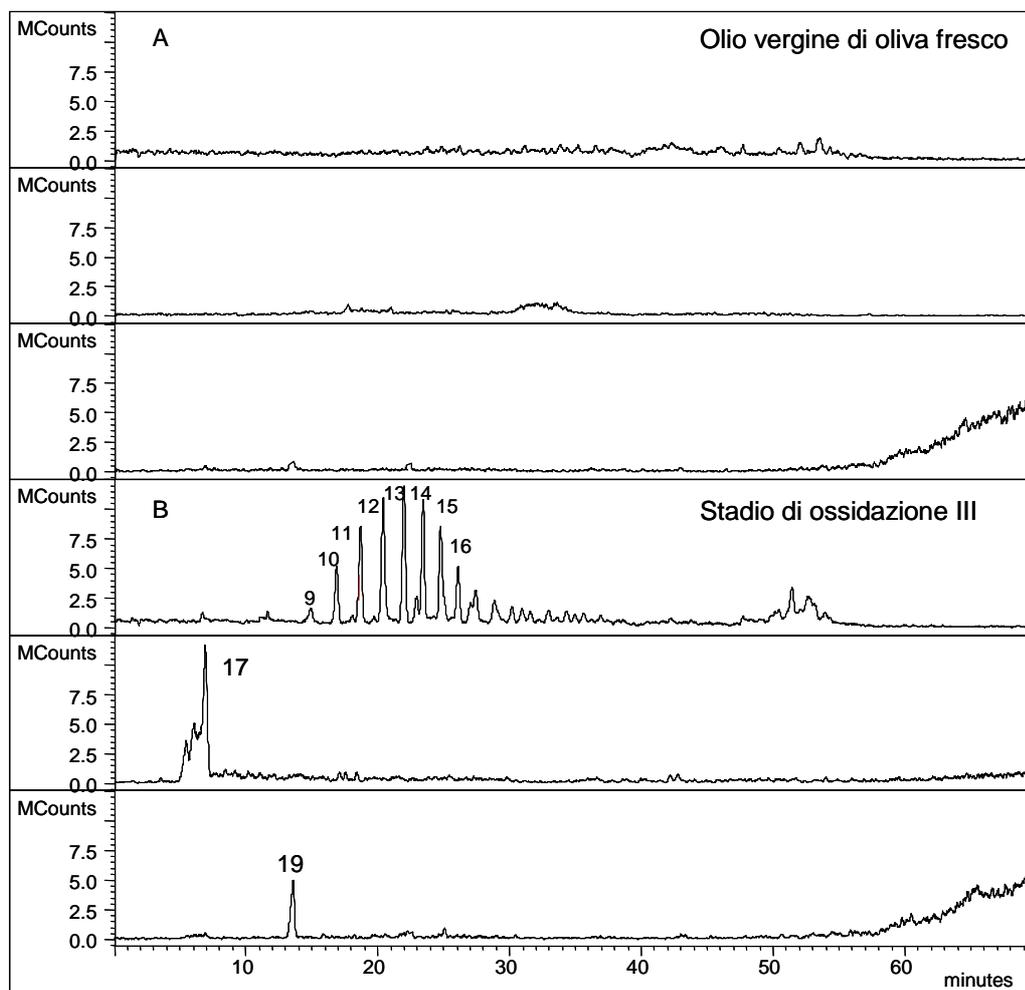
La degradazione ossidativa del *p*-HPEA, del 3,4-DHPEA e del 3,4-DHPEA-EDA, durante il processo di autossidazione dell'olio vergine di oliva, e i loro prodotti di ossidazione, sono stati valutati tramite analisi HPLC-DAD-ESI-MS, HPLC-ESI-MS/MS e analisi LC/MS Q-TOF. Inizialmente è stato analizzato l'olio vergine di oliva fresco (numero di perossidi = 4.0 mEq O<sub>2</sub>/Kg) per indagare la potenziale presenza dei prodotti di ossidazione del *p*-HPEA, del 3,4-DHPEA e del 3,4-DHPEA-EDA, che si potrebbero originare nella pasta delle olive durante la fase di gramolatura per effetto dell'attività delle polifenolossidasi endogene. A questo proposito è stato analizzato l'estratto metanolico dell'olio vergine di oliva proveniente da *cultivar* Coratina. Il profilo cromatografico acquisito con la metodologia HPLC-ESI-MS ha evidenziato che nell'olio vergine di oliva fresco non ci sono né i prodotti di degradazione dell'ossidazione enzimatica, né quelli dell'ossidazione di Fenton. Per valutare i prodotti di ossidazione del *p*-HPEA, del 3,4-DHPEA e del 3,4-DHPEA-EDA i campioni di olio vergine di oliva da *cultivar* Coratina sono stati posti in stufa a 60 °C per diversi giorni. In questo studio sono stati considerati tre stadi di ossidazione: uno stadio di ossidazione iniziale (I) a numero di perossidi 14.0 (mEq O<sub>2</sub>/Kg), uno stadio di ossidazione intermedio (II) a numero di perossidi 24.0 (mEq O<sub>2</sub>/Kg) e uno stadio di ossidazione avanzato (III) a numero di perossidi 35.0 (mEq O<sub>2</sub>/Kg). Dopo cinque giorni di trattamento termico il numero di perossidi è aumentato da 4.0 (mEq O<sub>2</sub>/Kg) a 14.0 (mEq O<sub>2</sub>/Kg) con una leggera diminuzione della concentrazione dei derivati dell'oleuropeina e della demetiloleuropeina che contengono il 3,4-DHPEA nella loro struttura molecolare, come il 3,4-DHPEA-EDA e l'oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EA). Il contenuto

espresso come somma del 3,4-DHPEA-EDA, del 3,4-DHPEA-EA e del 3,4-DHPEA è diminuito da 179.9 mg/Kg nell'olio vergine di oliva fresco a 167.3 mg/Kg nell'olio ossidato. La diminuzione del 3,4-DHPEA-EDA e del 3,4-DHPEA-EA è stata controbilanciata dall'aumento del 3,4-DHPEA che si è originato per idrolisi del legame estereo delle molecole dei secoiridoidi. L'intensità del picco del 3,4-DHPEA (2) è aumentata significativamente nel passare dall'olio vergine di oliva fresco all'olio nel II stadio di ossidazione, ma non è variato nel passare dal II al III stadio di ossidazione come mostrato nell'EIC riportato in figura 13. Questo può essere spiegato affermando che inizialmente la concentrazione del 3,4-DHPEA è aumenta per effetto dell'idrolisi dei secoiridoidi, ma successivamente il 3,4-DHPEA è andato incontro a reazioni di ossidazione per cui non vi è stato un suo accumulo nell'olio. Come si vede dalla figura 14 infatti, nel passare dall'olio vergine di oliva fresco (A) al III stadio di ossidazione (B) sono comparsi nel cromatogramma i prodotti di ossidazione del 3,4-DHPEA. Questi prodotti di ossidazione sono stati confermati anche dall'autossidazione dell'olio rettificato addizionato con idrossitirosole. L'autossidazione dell'olio rettificato è stata monitorata per osservare la relazione tra un sistema semplificato e l'autossidazione dell'olio stesso. I campioni di olio rettificato sono stati posti in stufa a 60 °C per 15 giorni, il numero di perossidi è aumentato da 2.0 (mEq O<sub>2</sub>/Kg) a 10.0 (mEq O<sub>2</sub>/Kg) e la concentrazione dell'idrossitirosole è diminuita da 15.0 mg/Kg a 8.5 mg/Kg. Nell'olio in via di autossidazione è comparso anche il picco del *p*-HPEA (1) che è aumentato nel passare dall'olio vergine di oliva fresco ai successivi stadi di ossidazione (Fig. 15) per via dell'idrolisi del *p*-HPEA-EA e del *p*-HPEA-EDA. Da queste evidenze sperimentali è evidente la maggior attività antiossidante del 3,4-DHPEA rispetto al *p*-HPEA. Il contenuto dei secoiridoidi, nel passare dal I al III stadio di ossidazione, dopo 15 giorni di trattamento termico, è calato da 167.3 mg/Kg a 37.3 mg/Kg. Nel cromatogramma dell'olio ossidato acquisito in modalità di ionizzazione ESI negativa, si è osservata la presenza di un picco a un tempo di ritenzione di 17.6 min, il suo spettro di massa era costituito dallo ione molecolare

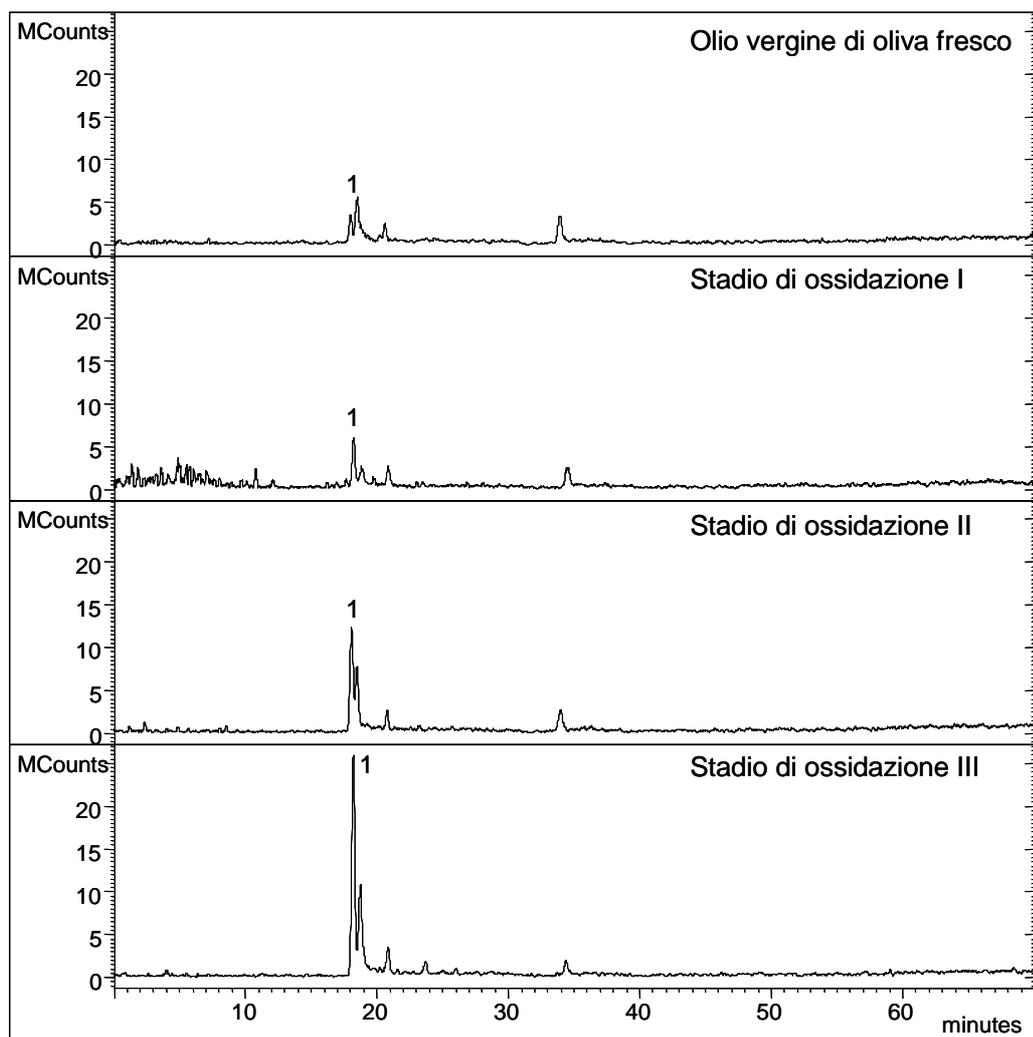
[M-H]<sup>-</sup> con un valore del rapporto  $m/z$  di 199 (**23**). Nel passare dall'olio vergine di oliva fresco al III stadio di ossidazione l'intensità del picco **23** è aumentata in maniera molto marcata (Fig. 16). Lo spettro di MS/MS per lo ione precursore 199, acquisito con il metodo PIS in ionizzazione ESI negativa, ha generato gli ioni prodotto con valori del rapporto  $m/z$  di 181, 155, 111 e 95 (Tab. 8). Questa frammentazione risulta essere simile alla frammentazione della forma dialdeidica dell'acido decarbossimetilenoico con valore del rapporto  $m/z$  di 183 (**3a**), per cui possiamo ipotizzare che si potrebbe trattare di una sua forma ossidata. Confrontando i cromatogrammi dell'olio vergine di oliva fresco e dell'olio ossidato si osserva un aumento dell'intensità del picco dell'acido decarbossimetilenoico



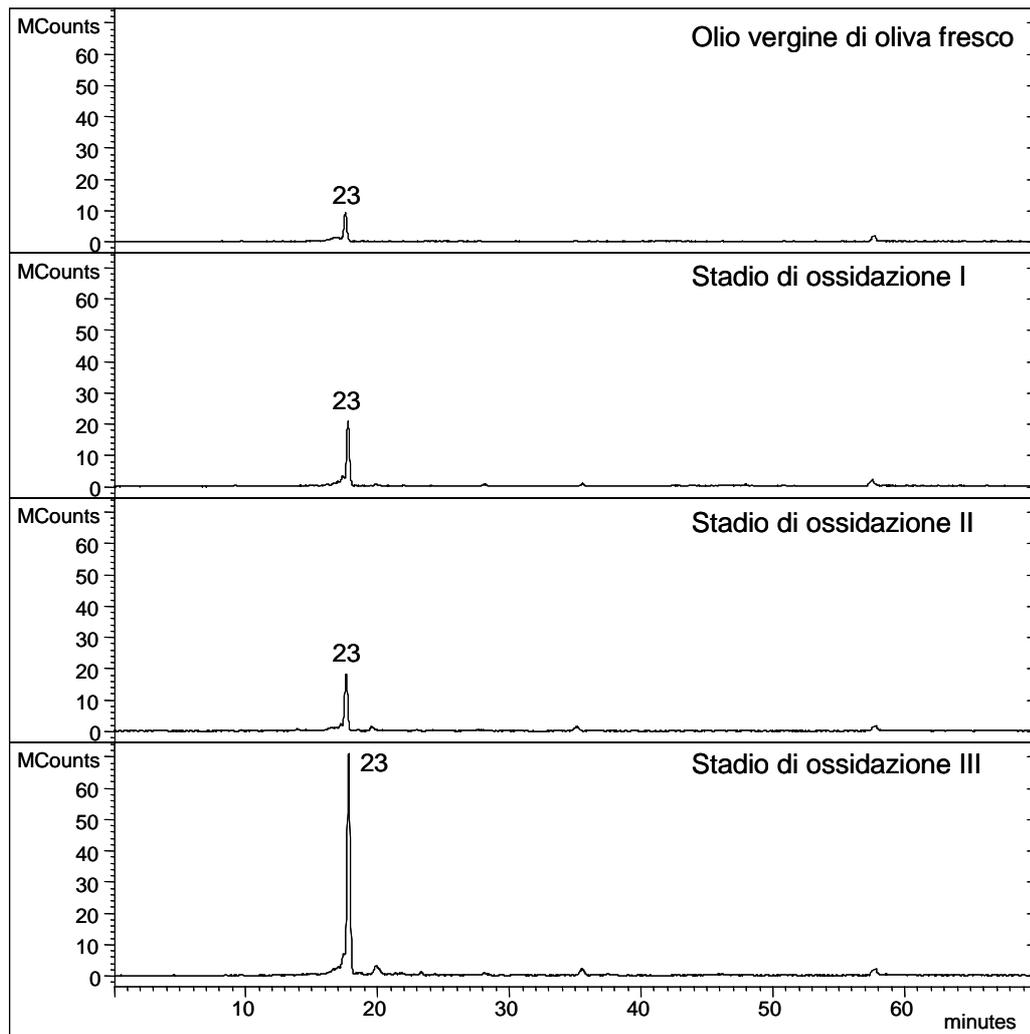
**Figura 13.** Cromatogramma estratto (EIC) per il picco 2,  $m/z$  153.



**Figura 14.** Cromatogrammi estratti (EICs) per i picchi **9**,  $m/z$  305, **10**,  $m/z$  344, **11**,  $m/z$  388, **12**,  $m/z$  432, **13**,  $m/z$  476, **14**,  $m/z$  525, **15**,  $m/z$  605, **16**,  $m/z$  649, **17**,  $m/z$  169, **19**,  $m/z$  167.



**Figura 15.** Cromatogramma estratto (EIC) per il picco 2,  $m/z$  137.



**Figura 16.** Cromatogramma estratto (EIC) per il picco **23**,  $m/z$  199.

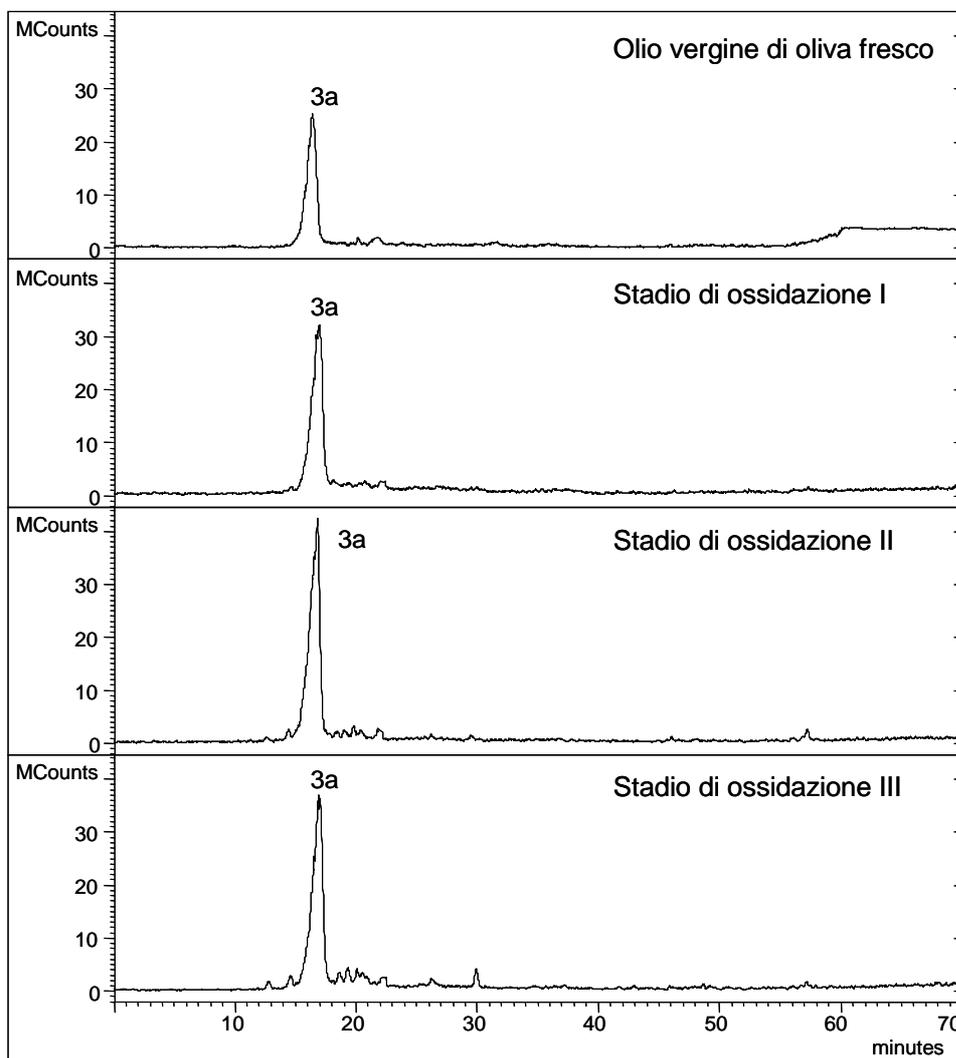
**Tabella 8.** Tempi di ritenzione, massimi di assorbimento UV-Vis, dati ESI-MS e ESI-MS/MS in modalità di ionizzazione positiva/negativa dell'olio durante il processo di autossidazione.

Picco	Composti	t <sub>r</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	Frammenti Principali in ESI positiva			Esperimenti Product Ion Scan
				[M + H] <sup>+</sup>	[M - OH] <sup>+</sup>		
9	N.I.	17.3	217/268/384	305			
10	N.I.	19.2	217/295/365	344	327		344 → 327 → 283 → 177 → 133
11	N.I.	21.0	debole	388	371		
12	N.I.	22.6	217/280/363	432			
13	N.I.	24.0	debole	476	459		
14	N.I.	25.4	debole	525			
21	prodotto di ossidazione del 3,4-DHPEA	12.8	debole	217			
Picco	Composti	t <sub>r</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	Frammenti Principali in ESI negativa			Esperimenti Product Ion Scan
				[M - H] <sup>-</sup>	[M - O] <sup>-</sup>	[M - CH <sub>2</sub> COOH-O] <sup>-</sup>	
1a	3,4-DHPEA-EDA <sup>b</sup>	34.2	230/280	319			319 → 301 → 275 → 248 → 195 → 183 → 165 → 138 → 123
1b	3,4-DHPEA-EDA <sup>b</sup>	35.9	230/280	377			377 → 349 → 273 → 241
2	3,4-DHPEA <sup>a</sup>	14.8	219/278	153			153 → 153
3a	forma dialdeidica dell'acido decarbossimetileneolico <sup>b</sup>	17.1	230	183			183 → 165 → 139
4a	forma dialdeidica dell'acido carbossimetileneolico <sup>b</sup>	18.8	223	241			241 → 210 → 181 → 165 → 139 → 127 → 111 → 95
5a	forma dialdeidica dell'acido carbossimetileneolico ossidata <sup>b</sup>	40.8	242	257	241	183	257 → 239 → 225 → 213 → 195 → 181 → 137 → 109 → 95
6a	3,4-DHPEA-EDA ossidato <sup>b</sup>	35.1	232/281	335			335 → 199 → 181 → 155 → 111
7a	3,4-DHPEA-EDA ossidato <sup>b</sup>	47.0	debole	393	377		
15	N.I.	26.2	218/249/439	605			
16	N.I.	27.4	debole	649			
17	prodotto di ossidazione del 3,4-DHPEA <sup>b</sup>	7.0	224/278	169			169 → 151 → 123
18	N.I.	12.0	debole	163			
22	N.I.	15.8	219/278/326	207			
23	forma dialdeidica dell'acido decarbossimetileneolico ossidata <sup>b</sup>	17.6	227	199			199 → 181 → 155 → 111 → 95
24	acido carbossimetileneolico ossidato <sup>b</sup>	24.2	232	257			257 → 239 → 225 → 213 → 195 → 181 → 169 → 153 → 137 → 125 → 111 → 101
25	acido carbossimetileneolico ossidato <sup>b</sup>	30.0	238	257			257 → 239 → 225 → 213 → 195 → 181 → 137 → 109 → 95
26	3,4-DHPEA-EA ossidato <sup>b</sup>	37.4	230/277	393			393 → 377 → 363 → 349 → 272 → 241 → 211 → 183
27	3,4-DHPEA-EA ossidato <sup>b</sup>	41.1	228/275	393			393 → 377 → 361 → 333 → 272 → 257 → 212
28	3,4-DHPEA-EA ossidato <sup>b</sup>	44.6	235/280	393			393 → 377 → 361 → 335 → 257 → 241 → 212 → 169 → 120
29	3,4-DHPEA-EA ossidato <sup>b</sup>	48.9	226/276	393			393 → 377 → 361 → 349 → 303 → 257 → 241 → 212 → 165 → 120
30	3,4-DHPEA-EA ossidato <sup>b</sup>	50.1	225/277	393			393 → 377 → 361 → 303 → 257 → 241 → 212

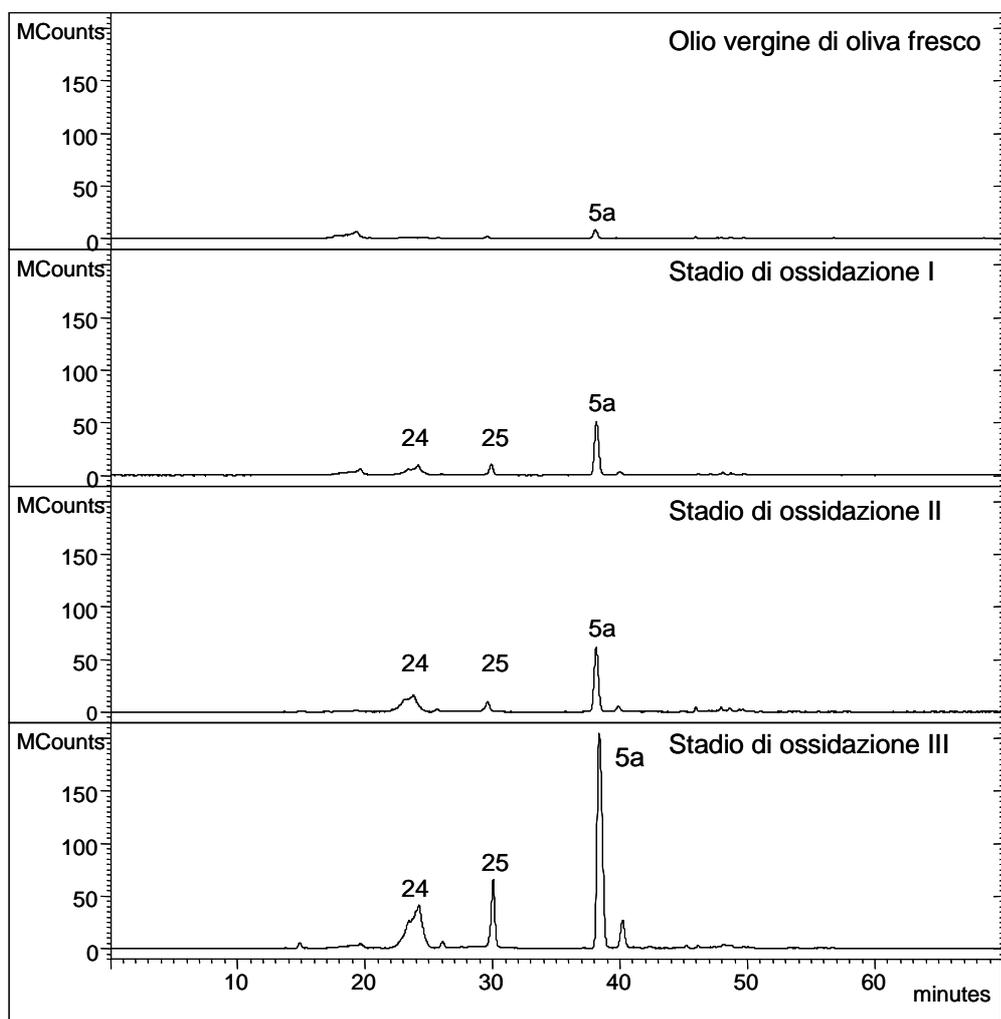
<sup>a</sup> Identificati per confronto con composti standard. <sup>b</sup> Tentativo di identificazione attraverso esperimenti di MS/MS con metodi PIS e SRM.  
N.I. = Non Identificato.

fino al II stadio di ossidazione poi è rimasta invariata nel passare dal II al III stadio di ossidazione (Fig. 17). Lo stesso comportamento si è riscontrato per il picco appartenente alla forma dialdeidica dell'acido carbossimetileneolico (**4a**) con valore del rapporto  $m/z$  di 241 in ESI negativa, che è aumentato fino al II stadio di ossidazione e poi è rimasto costante, mentre è aumentata in modo significativo l'intensità del picco **5a** con valore del rapporto  $m/z$  di 257, che potrebbe appartenere, come si è ipotizzato sopra, alla forma dialdeidica dell'acido carbossimetileneolico ossidata. Inoltre nel passare dall'olio vergine di oliva fresco all'olio ossidato sono comparsi altri due picchi con rapporto  $m/z$  di 257, ai tempi di ritenzione di 24.2 min (**24**) e 30.0 min (**25**), rispettivamente (Tab. 8). Come si può vedere dall'EIC riportato in figura 18 l'intensità dei picchi in questione è aumentata significativamente nel passare dall'olio vergine di oliva fresco al III stadio di ossidazione. Lo spettro di MS/MS del picco **25**, acquisito con il metodo PIS, ha generato gli stessi ioni frammento del picco **23**. Nell'olio in via di autossidazione è comparso un picco al tempo di ritenzione di 52.4 min il cui spettro di massa ha mostrato lo ione molecolare  $[M-H]^-$  con rapporto  $m/z$  di 377 e gli ioni con rapporto  $m/z$  di 361  $[M-O]^-$  e 333  $[M-COOH]^-$  che potrebbe corrispondere al ligustroside aglicone (*p*-HPEA-EA) ossidato. Quindi il picco **25** potrebbe derivare dall'idrolisi del *p*-HPEA-EA ossidato. Lo spettro di MS/MS del picco **24** invece, ha generato ioni prodotto con rapporti di  $m/z$  di 239, 225, 213, 195, 181, 169, 153, 137, 125, 111 e 101 (Tab. 8). Questo composto potrebbe appartenere alla forma chiusa dell'acidocarbossimetileneolico ossidata derivante dall'idrolisi del 3,4-DHPEA-EA che nel corso del trattamento termico si è ossidato. Nel passare dall'olio vergine di oliva fresco all'olio al I stadio di ossidazione sono comparsi diversi picchi il cui spettro di massa presentava lo ione molecolare  $[M-H]^-$  con rapporto  $m/z$  di 393, ai tempi di ritenzione di 37.4 min (**26**), 41.1 (**27**), 44.6 min (**28**), 48.9 min (**29**) e 50.1 min (**30**), rispettivamente. Dallo spettro di MS/MS acquisito con il metodo PIS in ESI negativa è risultato che il picco **27** potrebbe appartenere al 3,4-DHPEA-EA ossidato (Tab. 8). Molto probabilmente gli altri picchi potrebbero corrispondere a

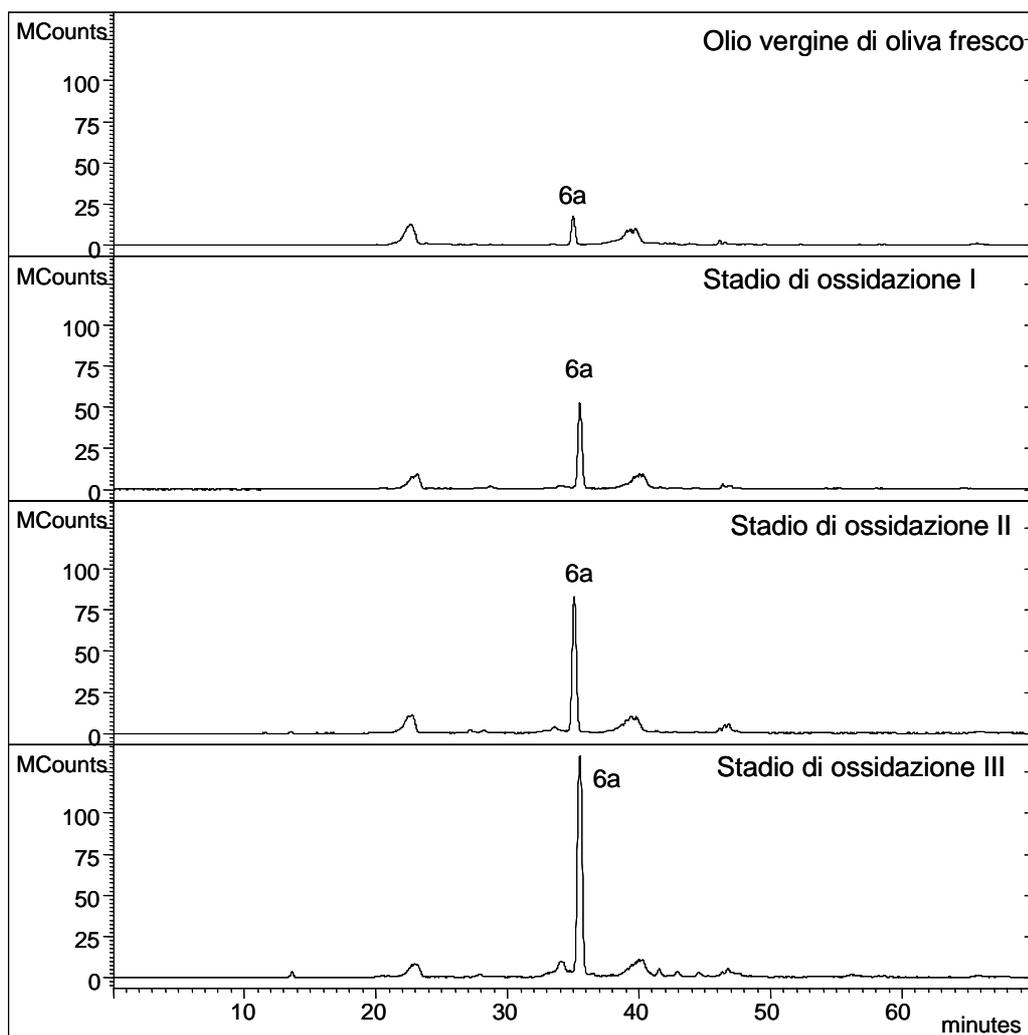
delle sue forme isomeriche. L'aumento di intensità molto più marcato del picco **5a**, nel passare dall'olio vergine di oliva fresco ai successivi stadi di ossidazione, rispetto ai picchi **24** e **25** potrebbe essere dovuto all'apertura nel tempo dell'anello delle forme chiuse ossidate dell'acido carbossimetileneolico. Nel cromatogramma dell'olio ossidato è presente anche il picco **6a** con valore del rapporto  $m/z$  di 335 che avevamo ipotizzato appartenere al 3,4-DHPEA-EDA ossidato. Nella figura 19 è riportato l'EIC per il picco **6a** con  $m/z$  di 335, è evidente l'aumento della sua intensità nel passare dall'olio vergine di oliva fresco all'olio ossidato. Come mostrato in tabella 8 la frammentazione del picco **6a** è del tutto analoga alla frammentazione del picco **23**, per cui si può ipotizzare che il 3,4-DHPEA-EDA inizialmente si ossida e poi per idrolisi rilasci la forma dialdeidica dell'acido decarbossimetileneolico ossidata.



**Figura 17.** Cromatogramma estratto (EIC) per il picco **3a**,  $m/z$  183.



**Figura 18.** Cromatogrammi estratti (EICs) per i picchi **5a**,  $m/z$  257, **24**,  $m/z$  257, **25**,  $m/z$  257.



**Figura 19.** Cromatogrammi estratto (EIC) per il picco **6a**,  $m/z$  335.

I principali prodotti di ossidazione del 3,4-DHPEA-EDA che sono stati identificati nell'olio nel corso dell'autossidazione sono stati confermati tramite analisi LC/MS Q-TOF. Nella tabella 9 sono riportati i prodotti di ossidazione individuati nell'olio in via di autossidazione.

**Tabella 9.** Tempi di Ritenzione, dati LC/MS Q-TOF in modalità di ionizzazione negativa dei prodotti di ossidazione dell'olio durante il processo dell'autossidazione

Picco	Composti	t <sub>r</sub> (min)	[M - H] <sup>-</sup>	formula molecolare	score
1b	3,4-DHPEA-EDA <sup>a</sup>	35.9	377.1312	C19H22O8	99.47
3a	forma dialdeidica dell'acido decarbossimetilolenico <sup>a</sup>	17.1	183.0656	C9H12O4	97.10
4a	forma dialdeidica dell'acido carbossimetilolenico <sup>a</sup>	18.8	241.0715	C11H14O6	99.44
5a	forma dialdeidica dell'acido carbossimetilolenico ossidata <sup>a</sup>	40.8	257.0665	C11H14O7	94.70
6a	3,4-DHPEA-EDA ossidato <sup>a</sup>	35.1	335.1134	C17H20O7	99.07
23	forma dialdeidica dell'acido decarbossimetilolenico ossidata <sup>a</sup>	17.6	199.0679	C9H12O5	96.44
24	forma dialdeidica dell'acido carbossimetilolenico ossidata <sup>a</sup>	24.2	257.0510	C11H14O7	99.32
25	forma dialdeidica dell'acido carbossimetilolenico ossidata <sup>a</sup>	30.2	257.1011	C11H14O7	99.11
26	3,4-DHPEA-EA ossidato <sup>a</sup>	37.4	393.1210	C19H20O9	99.87
27	3,4-DHPEA-EA ossidato <sup>a</sup>	40.8	393.0435	C19H20O9	97.85
28	3,4-DHPEA-EA ossidato <sup>a</sup>	44.6	393.0765	C19H20O9	98.23
29	3,4-DHPEA-EA ossidato <sup>a</sup>	48.9	393.1023	C19H20O9	99.20
30	3,4-DHPEA-EA ossidato <sup>a</sup>	50.1	393.1153	C19H20O9	98.80

<sup>a</sup> Tentativo di identificazione attraverso esperimenti LC/MS Q-TOF.

Dai dati sperimentali riportati nella tabella 9 è stato possibile confermare la presenza nell'olio vergine di oliva della forma carbossimetile del 3,4-DHPEA-EDA con lo ione molecolare [M-H]<sup>-</sup> con rapporto  $m/z$  di 377 (**1b**). Dalle formule molecolari dei picchi **3a** e **4a** con rapporti  $m/z$  di 183 e di 241 rispettivamente, è stato possibile confermare la presenza nell'olio delle forme dialdeidiche dell'acido decarbossimetilolenico e carbossimetilolenico. Nella tabella 9 è riportata anche la formula molecolare del picco **5a** con rapporto  $m/z$  di 257, come si può notare contiene un atomo di ossigeno in più rispetto alla formula molecolare del picco **4a**, quindi si può confermare l'ipotesi secondo cui questo composto appartenga alla forma dialdeidica dell'acido carbossimetilolenico ossidata. Il composto **6a** possiede nella sua formula molecolare un atomo di ossigeno in più rispetto alla molecola del 3,4-DHPEA-EDA, questo risultato è in accordo con quanto riportato secondo cui questo composto potrebbe appartenere al 3,4-DHPEA-EDA ossidato. Il composto **23** invece, possiede nella sua formula molecolare un atomo di ossigeno in più rispetto al picco **3a**, per cui risulta confermata l'ipotesi secondo la quale

potrebbe appartenere alla forma dialdeidica dell'acido decarbossimetilolenolico ossidata. I picchi **24** e **25** possiedono entrambi nella loro formula molecolare un atomo di ossigeno in più rispetto al picco **4a**, risulterebbe confermata l'ipotesi secondo cui potrebbero appartenere a due forme chiuse dell'acido carbossimetilolenolico ossidate. I picchi **26**, **27**, **28**, **29** e **30** possiedono tutti stessa formula molecolare corrispondente a quella del 3,4-DHPEA-EA ossidato, per cui è confermata l'ipotesi che potrebbero essere delle forme isomeriche della stessa molecola.

## 5 CONCLUSIONI

Questa tesi di dottorato ha fornito informazioni circa i prodotti di ossidazione di alcuni composti fenolici dell'olio vergine di oliva quali il *p*-HPEA, il 3,4-DHPEA e il 3,4-DHPEA-EDA che potrebbero essere usati come possibili *marker* molecolari della "freschezza" dell'olio vergine di oliva, e quindi come indici di valutazione preventiva della sua *shelf-life*. Lo studio di sistemi modello, quali le reazioni di ossidazione enzimatica e di Fenton del *p*-HPEA, del 3,4-DHPEA e del 3,4-DHPEA-EDA hanno permesso di trarre delle importanti conclusioni relative alla qualità dell'olio vergine di oliva e alla sua produzione. Le reazioni di ossidazione del *p*-HPEA e del 3,4-DHPEA hanno generato il corrispondente *o*-chinone che essendo altamente instabile è andato incontro a reazioni di dimerizzazione e di polimerizzazione. Una volta che il chinone si è formato la reazione è avanzata alla stessa maniera sia che il chinone è stato prodotto enzimaticamente, come nel caso della polifenolossidasi, che non enzimaticamente. Le reazioni di dimerizzazione e di polimerizzazione hanno coinvolto gli stessi fenoli, e i loro prodotti di ossidazione. Nell'olio vergine di oliva in via di autossidazione la concentrazione del *p*-HPEA e del 3,4-DHPEA, generatisi dall'idrolisi dei secoiridoidi, è aumentata in maniera molto meno marcata rispetto alla diminuzione del contenuto dei secoiridoidi stessi, questo perchè successivamente i fenoli semplici sono andati incontro a processi di degradazione ossidativa. Il processo di ossidazione prima, e le reazioni di dimerizzazione e di polimerizzazione poi, non hanno permesso di evidenziare specifiche molecole legate all'ossidazione dei composti fenolici da utilizzare come *marker* del processo ossidativo. Nel caso del 3,4-DHPEA-EDA invece, è possibile trarre due conclusioni molto importanti, la prima è che anche la parte terpenica della molecola è andata incontro a fenomeni ossidativi, quindi a svolgere attività antiossidante non è solo la parte fenolica che si libera con l'idrolisi; la seconda è che il 3,4-DHPEA-EDA ossidandosi ha rilasciato anche i prodotti di

ossidazione della parte terpenica che si sono accumulati nell'olio nel corso dell'autossidazione. Questi prodotti di ossidazione non erano presenti nell'olio vergine di oliva fresco, ma sono comparsi già nello stadio di ossidazione iniziale. Aver individuato dei composti di ossidazione che si sono accumulati nell'olio in relazione all'evoluzione dello stato di ossidazione delle sostanze fenoliche rappresenta un risultato importante in quanto evidenzia per la prima volta la possibilità di individuare dei *marker* dello stato di ossidazione del grasso che non sono legati all'ossidazione degli acidi grassi, ma alla degradazione ossidativa di alcuni antiossidanti primari in esso contenuti. Questo potrebbe essere molto importante nella definizione del grado di "freschezza" degli oli e in particolare per oli con bassi valori dei classici indici di ossidazione, quali il numero di perossidi e le costanti spettrofotometriche, potrebbe comunque segnalare che è in corso un processo ossidativo che coinvolge gli antiossidanti primari. Tali risultati possono essere molto interessanti sia per la valutazione della *shelf-life* dell'olio e quindi per la definizione di un indice oggettivo legato alla sua durata nel tempo, sia per la qualità salutistica degli oli vergini di oliva che è fortemente legata all'attività antiossidanti dei secoiridoidi e derivati. L'assenza dei prodotti di ossidazione di tali molecole fornirebbe al consumatore un'indicazione oggettiva sul mantenimento nel tempo di quei valori di concentrazione fenolica che sulla base dei *claim* ammessi dalla comunità europea contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo; effetto questo che si traduce in una riduzione delle malattie cardiovascolari quali l'aterosclerosi e l'infarto.

## 6 BIBLIOGRAFIA

Abramson F. P., Black G. E., Lecchi P. (2001). Application of high-performance liquid chromatography with isotope-ratio mass spectrometry for measuring low levels of enrichment of underivatized materials. *J. Chromatogr. A* **913**: 269-273.

Addis P. B. (1986). Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food Chem. Toxicol.* **24**: 1021-1030.

Alomirah H. F., Alli I., Konishi Y. (2000). Applications of mass spectrometry to food proteins and peptides. *J. Chromatogr. A.* **893**: 1-21.

Alonso-Salces R. M., Héberger K., Holland M. V., Moreno Rojas J. M, Mariani C., Bellan G., Reniero F., Guillou C. (2010). Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chem.* **118**: 956-965.

Andary C., Wylde R., Laffite C., Privat G., Winternitz F. (1982). Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobanche rapum-genistae*. *Phytochem.* **21(5)**: 1123-1127.

Andrén P. E., Emmett M. R., Caprioli R. M. (1994). Micro-electrospray: zeptomole/attomole per microlitre sensitivit  for peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**: 867-869.

Andrewes P., Busch J. L. H. C., de Joode T., Groenewegen A., Alexre 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.

Andrikopoulos N. K., Tzamtzis V. A., Giannopoulos G. A., Kalantzopoulos G. K., Domopoulos C. A. (1989). Deterioration of some vegetable oils: I. during heating or frying of several foods. *Rev. Franci. Corps Gras.* **3-4**: 127-129.

Angerosa F., D'Alessandro N., Konstantinou P., Di Giacinto L. (1996). GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Chromatogr. A* **736**: 195-203.

Angerosa F., Mostallino R., Basti C., Vito R. (2001). Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chem.* **72**: 19-28.

Antolovich M., Bedgood JR. D. R., Bishop A. G., Jardine D., Prenzler P. D., Robards K. (2004). LC-MS investigation of oxidation products of phenolic antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 962-971.

Arakawa R., Yamaguchi M., Hotta H., Osakai T., Kimoto T. (2004). Product analysis of caffeic acid oxidation by on-line electrochemistry/electrospray ionization mass spectrometry. *J Am. Soc. Mass. Spectrom.* **15**: 1228-1235.

Artajo L. S., Romero M. P., Morello J. R., Motiva M. J. (2006). Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. *J. Agric. Food. Chem.* **54**: 6079-6088.

Aston F. W. (1933). Mass spectra and isotopes. Edward Arnold, London.

Baldioli M., Servili M., Perretti G., Montedoro G. F. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**: 1589-1593.

Barber M., Bordoli R. S., Elliott G. J., Sedgwick R. N., Tyler A. N. (1982). Fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal. Chem.* **54**: 645A-657A.

Beauchamp G. K., Keast R. S. J., Morel D., Lin J., Pika J., Han Q., Lee C. H., Smith A.B., Breslin P.A.S. (2005). Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra virgin olive oil. *Nature* **437**: 45-46.

Beauchamp GK, Keast RSJ, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee C-H, Smith AB, Breslin PAS (2005) Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra virgin olive oil. *Nature* **437**: 45-46.

Berliner J. A., Navab M., Fogelman A. M., Frank J. S., Demer L. L., Edwards P. A., Watson A. D., Lusis A. J. (1995). Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* **91**: 2488-2496.

Bianco A., Coccioli F., Guiso M., Marra C. (2001). The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. *Food Chem.* **77**: 405-411.

Bosetti C., Gallus S., Trichopoulou A., Talamini R., Franceschi S., Negri E., La Vecchia C. (2003). Influence of the mediterranean diet on the risk of cancers of upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **12**: 1091-1094.

Bosetti C., Negri E., Franceschi S., Talamini R., Montella M., Conti E., Lagiou P., Parazini F., La Vecchia C. (2002). Olive oil, seed oil and other added fats relation to ovarian cancer (Italy) *Cancer causes Control* **13**: 465-470.

Boskou D.(1996). Olive oil composition. Boskou D. (Eds) *Olive Oil: Chemistry and Technology. AOCS press, Champaign, (Illinois)* pp. 52-83.

Brenes M., García A., García P., Garrido A. (2000b). Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by means of a coulometric electrode array system. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 5178-5183.

Brenes M., García A., García P., Garrido A. (2001). Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 5609-5614.

Brenes M., García A., García P., Rios J. J., Garrido A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 3535-3540.

Brenes M., García A., Rios J. J., García P., Garrido A. (2002). Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *Int. J. Food Sci. Technol.* **37**: 615- 625.

Brenes M., Hidalgo F. J., García A., Rios J. J., García P., Zamora R., Garrido A. (2000a). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77**: 715-720.

Byrdwell W. C. (2001). Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids* **36**: 327-346.

Cantarelli C. (1961). Polyphenols in the fruit and olive oil. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **38**: 69-72.

Careri M., Bianchi F., Corradini C. (2002). Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. *J. Chromatogr. A* **970**: 3-64.

Carrasco-Pancorvo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Lercker G., Fernández-Gutiérrez A. (2007). Evaluation of the influence of thermal oxidation on the phenolic composition and on the antioxidant activity of extra-virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 4771-4780.

Carrasco-Pancorvo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Del Carlo M., Gallina-Toschi T., Lercker G., Compagnone D., Fernández-Gutiérrez A. (2005). Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food. Chem.* **53**: 8918-8925.

Casale M., Casolino C., Oliveri P., Forina M. (2010) The potential of coupling information using three analytical techniques for identifying the geographical origin of Liguria extra virgin olive oil. *Food Chem.* **118**: 163-170.

Chatman K., Hollenbeck T., Hagey L., Vallee M., Purdy R., Weiss F., Siuzdak G. (1999). Nanoelectrospray mass spectrometry and precursor ion monitoring for quantitative steroid analysis and attomole sensitivity. *Anal. Chem.* **71**: 2358-2363.

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.

Christophridou S., Dais P., Tseng L. H., Sprau M. (2005). Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling High-Performance Liquid Chromatography with postcolumn Solid-Phase Extraction to Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (LC-SPE-NMR). *J. Agric. Food Chem.* **53**: 4667-4679.

Cilliers J. J. L. e Singleton V. L. (1991). Characterization of the products of nonenzymic autoxidative phenolic reactions in a caffeic acid model system. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 1298-1303.

Cortesi N., Fiorino P., Novellini P. (1997). “The role of the different parts of the drupe on the chemical composition of olive oil” da *Riv. Ital. delle Sost. Grasse* **74**: 391-393.

Dachtler M., Glaser T. G., Kohler K., Albert K., (2001). Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina. *Anal. Chem.* **73**: 667-674.

De Meulenaer B., Van Royen G., Vanhoutte B., Huyghebaert A. (2000). Combined liquid and gas chromatographic characterisation of polyglycerol fatty acid esters. *J. Chromatogr. A* **896**: 239-251.

Della Ragione F., Cucciolla V., Borriello A., Della Pietra V., Pontoni G., Racioppi L., Manna C., Galletti P., Zappia V. (2000). Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**: 733-739.

Di Giovacchino L., Sestili S., Di Vincenzo D. (2002). Influence of olive on virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104**: 587-601.

Di Maio I., Esposto S., Taticchi A., Selvaggini R., Veneziani G., Urbani S., Servili M. (2011). HPLC-ESI-MS investigation of tyrosol and hydroxytyrosol oxidation products in virgin olive oil. *Food Chem.* **125**: 21-28.

Fabiani R., De Bartolomeo A., Rosignoli P., Servili M., Montedoro G. F., Morozzi G. (2002). Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur. J. Cancer Prev.* **11**: 351-358.

Fabiani R., De Bartolomeo A., Rosignoli P., Servili M., Selvaggini R., Montedoro G. F., Di Saverio C., Morozzi G. (2006). Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J. Nutr.* **136**: 614-619.

Fabiani R., Rosignoli P., De Bartolomeo A., Fucelli R., Morozzi G. (2008). Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J. Nutr.* **138**: 1411-1416.

Fabiani R., Sepporta M. V., Mazza T., Rosignoli P., Fucelli R., De Bartolomeo A., Crescimanno M., Taticchi A., Esposto S., Servili M., Morozzi G. (2011). Influence

of cultivar and concentration of selected phenolic constituents on the in vitro chemiopreventive potential of olive oil extracts. *J. Agric. Food. Chem.* **59**: 8167-8174.

Fedeli E. (1988). The behaviour of olive oil during cooking and frying. In *Frying of food, Principles, Changes, New Approaches*, Varela, G. Bender, A. E. e Morton, I. D. (Eds), pp. 52-81. Chichester, England, VCH.

Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**: 64-71.

Fortes C., Forestiere F., Farchi S., Mallone S., Trequatrini T., Anatra F., Schmid G., Peducci C. A. (2003). The protective effect of the mediterranean diet on lung cancer. *Nutr. Cancer* **46**: 30-37.

Frankel E. N. (2011). Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. . *J. Agric. Food. Chem.* **59**: 785-792.

Fu S., Segura-Carretero A., Arráez-Román D., Menéndez J. A., De La Torre A., Fernández-Gutiérrez A. (2009) Tentative characterization of novel phenolic compounds in extra virgin olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 11140-11147.

Fulcrand H., Cheminat A., Brouillard R., Cheynier V. (1994). Characterization of compounds obtained by chemical oxidation of caffeic acid in acidic conditions. *Phytochem.* **35**: 499-505.

García J. M. Sella S., Pérez-Canono M. C. (1996). Influence of fruit ripening on olive oil quality. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 3516-3520.

García J. M., Yousfi K., Mateos R., Olmo M., Cert A. (2001). Reduction of oil bitterness by heating of olive (*Olea europaea*) fruits. *J. Agric. Food. Chem.* **49**: 4231-4235.

García-Conesa M. T., Plumb G. W., Kroon P. A., Wallace G., Williamson G. (1997). Antioxidant properties of ferulic acid dimers. *Redox rep.* **3**: 239-244.

García-González D. L. e Aparicio R. (2010). Research in olive oil: challenger for the near future. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 12569-12577.

Gariboldi P., Jommi G., Verotta L. (1986). Secoiridoids from *oleaeuropea*. *Phytochem.* **25**: 865-869.

Garrido Fernández A., Fernández Díez M. J., Adamos M. R. (1997). Physical and chemical characteristics of the olive fruit, in: Table olives, Garrido Fernández A., Fernández Díez M. J. and Adamos M. R. (Eds), pp. 67-109. *Chapman & Hall*, London, UK.

Giovannelli L., Decorosi F., Dolora P., Pulvirenti L. (2003). Vulnerabilità to DNA damage in the aging rat substantia nigra: a study with the comet assay. *Brain Res.* **969**: 244-247.

Gómez-Alonso S., Fregapane G., Salvador D., Gordon M. H. (2003). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying. *J. Agric. Food. Chem.* **51**: 667-672.

Gordon M. H. (1990). The mechanism of antioxidant action in vitro, in: Food antioxidants, Hudson, B.J.F. (Ed), 1-8. *Elsevier Applied Science*, London, UK.

Griffiths W. J., Liu S., Yang Y., Purdy R. H., Sjövall J. (1999). Nanoelectrospray tandem mass spectrometry for the analysis of neurosteroid sulphates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**: 1595-1610.

Grignaffini P., Roma P., Galli C., Catalano A. L. (1994). Protection of low-density lipoprotein from oxidation by 3,4-dihydroxyphenylethanol. *Lancet* **343**: 1296-1297.

Guillou C., Koziat J., Rossmann A., Martin G. J. (1999). Determination of the <sup>13</sup>C contents of organic acids and sugars in fruit juices: an inter-comparison study. *Anal. Chim. Acta* **388**: 137-143.

Gutiérrez-Rosales F., Ríos J. J. , Gómez-Rey M. L. (2003). Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* **51**: 6021-6025.

Haigh R. (1986). Safety and necessity of antioxidants: Eec approach. *Food Chem. Toxicol.* **24**: 1031-1034.

Hau J., Bovetto L. (2001) Characterization of modified whey protein in milk ingredients by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **926**: 105-112.

Heller D. N., Clark S. B., Righter H. F. (2000). Confirmation of gentamicin and neomycin in milk by weak cation-exchange extraction and electrospray ionization/ion trap tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **35**: 39-49.

Hodge A. M., English D. R., McCredie M. R. E., Severi G., Boyle P., Hopper J. L., Giles G. G. (2004). Food nutrients and prostate cancer. *Cancer causes Control* **15**: 11-20.

Horie M., Nakazawa H. (2000). Determination of trenbolone and zeranol in bovine muscle and liver by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **882**: 53-62.

Hotta H., Ueda M., Nagano S., Tsujino Y. Koyama J., Okasai T. (2002). Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**: 123-132.

Jenner P., Olanov C. W. (1996). Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* **47**: 161-170.

Karas M., Hillenkamp F. (1988). Ultraviolet laser desorption of ions above 10 kDa. In abstracts of the 11th international mass spectrometry conference, Bordeaux, abstract MOA OR, 29 August – 2 September 1988.

Kikugawa K., Kunugi A., Kurechi T. (1990). Chemistry and implications of degradation of phenolic antioxidants. In Food Antioxidants B. J. F. Hudson (Ed.) Elsevier Science Publishers LTD Essex UK, pp. 65-98.

Kiritsakis A. K. (1998). Flavor components of olive oil—A review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**: 673-681.

Kubo I., Matsumoto A. (1984). Molluscicides from olive *Olea Europaea* and their efficient isolation by countercurrent chromatographies. *J. Agric. Food. Chem.* **32**: 687-688.

La Vecchia C., Negri E., Franceschi S., De Carli A., Giocosa A., Lipworth (1995). Olive oil, other dietary fat, and the risk of breast cancer. *Cancer Causes Control* **6**: 545-550.

Lavelli V., Fregapane G., Salvador M. D. (2006). Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 3002-3007.

Leitner A., Zöllner P., Paolillo A., Stroka J., Papadopoulou-Bouraoui A., Jaborek S., Anklam E., Lindner W. (2002). Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine. *Anal. Chim. Acta* **453**: 33-41.

Leonil J., Gagnaire V., Mollé D., Pezennec S., Bouhallab S. (2000). Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. *J. Chromatogr. A* **881**: 1-21.

Lo Scalzo R., Scarpati M. L. (1993). A new secoiridoid from olive wastewaters. *J. Nat. Prod.* **56**: 621-623.

Mangas-Cruz M. A., Martinez-Brocca M., Ortiz-Leyba C., Garnacho-Montero J., Cunill J. L. P., Garcia-Luna P. P. (2004). Olive Oil clinical nutrition. *Grasas Aceites* (Sevilla, Spain) **55**: 76-83.

Mannino S., Cosio M. S., Bertuccioli M. (1993). High performance liquid chromatography of phenolic compounds in virgin olive oil using amperometric detector. *Ital. J. Food Sci.* **4**: 363-370.

Martínez-Cruz M., Zenteno E., Córdoba F. (2001). Purification and characterization of a galactose-specific lectin from corn (*Zea mays*) coleoptile. *Biochim. Biophys. Acta.* **1568**: 37-44.

Martin-Moreno J. M., Willet W. C., Gorgojo L., Banegas J. R., Rodriguez-Artalejo F., Fernandez-Rodriguez J. C., Maisonneuve P., Boyle P. (1994). Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *Int. J. Cancer* **58**: 774-780.

Montedoro G. F., Cantarelli C. (1961). Indagine sulle sostanze fenoliche presenti nell'olio d'oliva. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **46**: 115-124.

Montedoro G. F., Servili M., Baldioli M., Miniati E. (1992a). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation,

and quantification and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 1571-1577.

Montedoro G. F., Servili M., Baldioli M., Miniati E. (1992b). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Initial characterization of the hydrolyzable fraction. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 1577-1580.

Montedoro G. F., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Begliomini A. L., Taticchi A. (2002). The use of biotechnology means during oil mechanical extraction process: relationship with sensory and nutritional parameters of virgin olive oil quality. *Acta Horticult.* **586**: 557-560.

Montedoro G. F., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E. Macchini A. (1993). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 2228-2234.

Nakae D., Kobayashi Y., Akai H., Andoh N., Satoh K., Ohashi K., Tsutsumi M., Konishi Y. (1997). Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-nitrosodiethylamine. *Cancer res.* **57**: 1281-1287.

Nedelkov D., Rasooly A., Nelson R. W. (2000). Multitoxin biosensor-mass spectrometry analysis: anew approach for rapid, real-time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food. *Int. J. Food Microbiol.* **60**: 1-13.

Ninfali P., Aluigi G., Bacchiocca M., Magnani M. (2001). Antioxidant capacity of extra-virgin olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**: 243-247.

O'Donnell E., Lynch M. A. (1998). Dietary antioxidant supplementation reverses age-related neuronal changes *Neurobiol. Aging* **19**: 461-467.

- Obied H. K., Karuso P., Prenzler P. D., Robards K. (2007). Novel secoiridoids with antioxidant activity from Australian olive mill waste. *J. Agric. Food. Chem.* **55**: 2848-2853.
- Obied H. K., Prenzler P. D., Ryan D., Servili M., Taticchi A., Esposito S., Robards K (2008). Biosynthesis and biotrasformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea L.* *Nat. Prod. Rep.* **25**: 1167-1179.
- Orlando R. C. (2002). Mechanisms of epithelial injury and inflammation in gastrointestinal diseases. *Rev. Gastroenterol. Disord.* **2**: S2-S8.
- Owen R. W., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalter B., Bartsch H. (2000). Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil. *Food Chem. Toxicol.* **38**: 647-659.
- Panizzi L., Scarpati M. L., Oriente G. (1960). Costituzione della oleuropeina, glucoside amaro e ad azione ipotensiva dell'olivo. Nota II. *Gazz. Chim. Ital.* **90**: 1449-1485.
- Papadopoulos G., Boskou D. (1991). Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**: 669-671.
- Pati S., Losito I., Palmisano F., Zambonin P. G. (2006). Characterization of caffeic acid enzymatic oxidation by-products by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1102**: 184-192.
- Pellegrini N., Visioli F., Buratti S., Brighenti F., (2001). Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. *J. Agric. Food. Chem.* **49**: 2532-2538.

- Perri E., Raffaelli A., Sindona G. (1999). Quantitation of oleuropein in virgin olive oil by ionspray mass spectrometry-selected reaction monitoring. *J. Agric. Food. Chem.* **47**: 4156-4160.
- Petroni A., Blasevich M., Salami M., Papini N., Montedoro G. F., Galli C. (1995). Determination of synthetic hydroxytyrosol in rat plasma by GC-MS. *Throm. Res.* **78**: 151-160.
- Petroni A., Blasevich, M., Papini N., Salami, M., Sala A., Galli C. (1997). Inhibition of leukocyte B4 production by an olive oil-derived phenol identified by mass-spectrometry. *Thromb. Res.* **87**: 315-322.
- Pirisi F. M., Cabras P., Cao C. F., Magliorini M., Suggelli M. (2000). Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation and quantification procedures. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 1191-1196.
- Ponce-Alquicira E., Taylor A. J. (2000). Extraction and ESI-CID-MS/MS analysis of myoglobins from different meat species. *Food Chem.* **69**: 81-86.
- Pozo O., Pitarch E., Rancho J. V., Hernández (2001). Determination of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and its main metabolite, 4-chloro-2-methylphenol in water and soil by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **923**: 75-85.
- Psomiadou E. e Tsimidou M. (2002). Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 716-721.
- Quilliam M. A. (2001). Phycotoxins. *J. AOAC Int.* **84**: 194-201.
- Ragazzi E., Veronese G., Guiotto A. (1973). Demetil oleuropeina, nuovo glucoside isolato da olive mature. *Ann. Chim.* **63**: 13-20.

Rawel H., Kroll J., Rohn S. (2001). Reactions of phenolic substances with lysozyme-physicochemical characterization and proteolytic digestion of the derivatives. *Food Chem.* **72**: 59-71.

Riediker S., Diserens J. M., Stadler R. H. (2001) Analysis of beta-lactam antibiotics in incurred raw milk by rapid test methods and liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4171-4176.

Ríos J. J., Gil M.J., Gutiérrez-Rosales F. (2005). Solid-phase extraction gas chromatography-ion-trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products. *J. Chromatogr. A* **1093**: 167-176.

Rocca B. e Fitzgerald G. A. (2002). Cyclo oxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int. immunopharmacol.* **2**: 603-630.

Roepstorff P. (2000). MALDI-TOF mass spectrometry in protein chemistry. In *Proteomics in Functional Genomics: Protein Structure Analysis* (Jollès, P. and Jörnvall, H., eds.), pp. 81-97, Birkhäuser Verlag, Basel.

Romani A., Mulinacci N., Pinelli P., Vinceri F. F., Cimato A. (1999). Polyphenolic content in five tuscan cultivars of *Olea europaea* L.. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 964-967.

Rovellini P., Cortesi N. (2002). Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oil: aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **79**: 1-14.

Ryan D., Lavee S., Robards K. (1999). Changes in phenolic content of olive during maturation. *Int. J. Food Sci. Tech.* **34**: 265-274.

Ryan D., Prenzler P. D., Lavee S., Antolovich M., Robards K. (2003). Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 2532-2538.

Samaniego Sánchez C., Troncoso González A. M., García-Parrilla M.C, Quesada Granados J. J., López García de la Serrana H., López Martínez M. C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytical Chim. Acta* **593**: 103-107.

Selvaggini R., Servili M., Urbani S., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G. F. (2006). Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil by direct injection in high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *J. Agric. Food Chem.* **54**; 2832-2838.

Servili M. e Montedoro G. F. (1989). Recupero di polifenoli delle olive e valutazione del loro potere antiossidante. *Ind. Alim.* **28**: 14-19.

Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Macchioni A., Montedoro G. F. (1999a). Phenolic compounds of olive fruit: one-and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of nüzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 12-18.

Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A., Montedoro G. F. (1999b). High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomace and 1-D and 2-D nuclear magnetic resonance characterization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76**: 873-882.

Servili M., Esposto S., Lodolini E., Selvaggini R., Taticchi A., Urbani S., Montedoro G. F., Serravalle M., Gucci R. (2007a). Irrigation effects on quality, phenolic composition and selected volatiles of virgin olive oils Cv. Leccino. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 6609-6618.

Servili M., Esposto S., Lodolini E., Selvaggini R., Taticchi A., Urbani S., Montedoro G. F., Serravalle M., Gucci R. (2007b). Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 7028-7035.

Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G. F., Morozzi G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J. Chromatogr.* **1054**: 113-127.

Servili M., selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Urbani S., Montedoro G. F. (2006). La composizione fenolica dell'oliva e dell'olio vergine. In atti del Convegno "Gli antiossidanti degli oli vergini di oliva con particolare riferimento ai composti fenolici e alla loro importanza biologica", Spoleto, 10 giugno 2005 Accademia Nazionale dell'olivo e dell'Olio, pp. 7-26.

Sforza S., Pigazzani M., Motti M., Porta C., Virgili R., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R. (2001). Oligopeptides and free amino acids in Parma hams of Known cathepsin B activity. *Food Chem.* **75**: 267-273.

Shahidi F. (1996). Natural antioxidants Chemistry, Health effect and applications. *AOCS press, Champaign, (Illinois)*, pp 97-149.

Soler M., Chatenaud L., La Vecchia C., Franceschi S., Negri E. (1998). Diet, alcohol, coffee and pancreatic cancer: final results from an Italian study. *Eur. J. Cancer Prev.* **7**: 455-460.

Solinas M., Cichelli A. (1981). Sulla determinazione delle sostanze fenoliche dell'olio di oliva. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **58a**: 159-164.

- Stokes P., Webb K, (1999). Analysis of some folate monoglutamates by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **864**: 59-67.
- Stoneham M., Goldacre M., Seagroatt V., Gill L. (2000). Olive oil diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *J. Epidemiol Community Health* **54**: 756-760.
- Tazaki H., Taguchi D., Hayashida T., Nabeta K. (2001). Stable isotope-labeling studies on the oxidative coupling of caffeic acid via o-quinone. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 2613-2621.
- Teffera Y., Kusmierz J. J., Abramson F. P. (1996). Continuous-Flow isotope ratio MS using CRIMS for either GC or LC. *Anal. Chem.* **68**: 1888-1894.
- Thomson J. J. (1903). Rays of positive electricity and their applications to chemical analysis. Longmans Geen, London.
- Thurman E. M., Ferrer I., Barcelò D. (2001). Choosing between atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides. *Anal. Chem.* **73**: 5441-5449.
- Tito M. A., Tars K., Valegard K., Hajdu J., Robinson C. V. (2000). Electrospray time-of-flight mass spectrometry of the intact MS2 virus capsid. *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 3550-3551.
- Tovar M. J., Motilva M. J., Romero M. P. (2001). Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. Cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 5502-5508.

Trichopoulou A., Katsouyanni S., Stuver L., Tzala E., Gnardellis C., Rimm E., Trichopoulou D. (1995). Consumption of olive oil and specific food group in relation to breast cancer risk in Greece. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 110-116.

Tsimidou M., Lytridou M., Boskou D., Paooa-Lousi A., Kotsifaki F., Petrakis C. (1996). On the determination of minor phenolic acids of virgin olive oil by RP-HPLC. *Grasas y Aceites* **47**: 151-157.

Uccella N. Bianco A. D., Piperno A., Romeo G., (1999). NMR experiments of oleuropein biomimetic hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 3665- 3668.

Uceda M., Hermoso M., García-Ortiz A., Jmenez A., Beltrán G. (1999). Intraspecific variation of oil contents and the characteristic of oils in olive cultivars. *Acta Horticulturae* **474**: 652-659.

Vierhuis E., York W. S., Kumar Kolli V. S., Vincken J. P., Schols H. A., Van Alebeek G. J. W. M., Voragen A. G. J. (2001). Structural analysis of two arabinose containig oligosaccharides derived from olive fruit xyloglucan: XXSG and XLSG. *Carbohydr. Res.* **332**: 285-297.

Viola P. (2006). L'olio vergine di oliva in nutrizione: aspetti generali. In atti del Convegno "Gli antiossidanti degli oli vergini di oliva con particolare riferimento ai composti fenolici e alla loro importanza biologica", Spoleto, 10 giugno 2005 Accademia Nazionale dell'olivo e dell'Olio, pp. 71-77.

Vissers M. N., Zock P. L., Katan M. B. (2004). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* **58**: 955-965.

Vogna D., Pezzella A., Panzella L., Napoletano A., d'Ischia M. (2003). Oxidative chemistry of hydroxytyrosol: isolation and characterisation of novel methanooxocinobenzodioxinone derivatives. *Tetrahedrom Letters* **44**: 8289-8292.

Ward G., Hadar Y., Bilkis I., Konstantinovsky L. (2001). Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* **276**: 18734-18741.

Wilm M., Shevchenko A., Houthaeve T., Brecht S., Schweigerer L., Fotsis T., Mann M. (1996). Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature (London)* **379**: 466-469.

Wiseman S. A., Mathot J. N., deFouw N. J., Tijburg L. B. (1996). Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis* **120**: 15-23.

Yamashita M., Fenn J. B. (1984). Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **88**: 4451-4459.