



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI CHIMICA BIOLOGICA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA E BIOTECNOLOGIE

INDIRIZZO BIOCHIMICA E BIOFISICA

CICLO XX

**SVILUPPO DI UN MODELLO CINETICO E SUA
APPLICAZIONE ALLO STUDIO DELL'INIBIZIONE DELLA
PEROSSIDAZIONE LIPIDICA DA PARTE DEL PLASMA
E DEI FITOFENOLI IN DIVERSI SISTEMI**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Lorenzo Pinna

Supervisore: Ch.mo Prof. Adelio Rigo

Dottoranda: Veronica De Marco

31 gennaio 2008

INDICE

Riassunto/Abstract	pag. 1
1. Introduzione	pag. 5
1.1. La perossidazione lipidica	pag. 7
1.2. I polifenoli	pag. 9
1.3. Attività antiossidante del plasma	pag. 11
2. Materiali e Metodi	pag. 13
2.1. Materiali	pag. 13
2.1.1. Reagenti	pag. 13
2.1.2. Strumentazione	pag. 14
2.2. Metodi	pag. 14
2.2.1. Preparazione delle soluzioni tampone	pag. 14
2.2.2. Misura del consumo di ossigeno per via polarografica	pag. 15
2.2.3. Studio dell'inibizione della perossidazione lipidica in differenti sistemi modello	pag. 16
2.2.4. Preparazione degli estratti di mele, di radicchio e di mirtillo	pag. 18
2.2.5. Trattamento dei campioni di sangue	pag. 19
2.2.6. Desalting del plasma	pag. 19
2.2.7. Determinazione della concentrazione di bilirubina, acido ascorbico, acido urico e vitamina E	pag. 21
3. Risultati e discussione	pag. 23
3.1. Processo di inibizione della perossidazione lipidica	pag. 23
3.1.1. Variazione della velocità di consumo di ossigeno durante il processo di perossidazione lipidica	pag. 26
3.1.2. Possibili errori nella valutazione dei valori di n e IC_{50}	pag. 28
3.1.3. Analisi cinetica	pag. 30
3.1.4. Procedura di calcolo	pag. 34
3.1.5. Conferma della validità delle equazioni cinetiche	pag. 36
3.1.6. Processo di perossidazione lipidica in un sistema bifasico	pag. 38
3.2. Applicazione del modello cinetico e del metodo di calcolo ad antiossidanti puri	pag. 40

3.2.1. Scelta del sistema micellare	pag. 40
3.2.2. Attività antiossidante di composti puri	pag. 41
3.3. Applicazione del modello cinetico e del metodo di calcolo a sistemi complessi: estratti vegetali e vino	pag. 44
3.3.1. Capacità ed efficienza di inibizione della perossidazione lipidica di alcuni antiossidanti presenti negli alimenti	pag. 45
3.3.2. Capacità ed efficienza di inibizione della perossidazione lipidica di alcuni cibi caratterizzati dalla presenza di una significativa quantità di antiossidanti	pag. 47
3.4. Applicazione del modello cinetico e del metodo di calcolo a sistemi complessi: il plasma umano e le sue componenti ad alto e basso peso molecolare	pag. 52
3.4.1. Attività antiossidante del plasma umano e delle sue componenti ad alto e basso peso molecolare misurata nel sistema PIP4	pag. 53
3.4.2. Attività antiossidante del plasma umano e delle sue componenti ad alto e basso peso molecolare misurata nel sistema DCA	pag. 59
3.4.3. Contributo dei principali antiossidanti presenti nel plasma umano all'inibizione della perossidazione lipidica nel sistema DCA	pag. 60
Bibliografia	pag. 65
Appendice	
Supplemento	
Ringraziamenti	

RIASSUNTO

Il termine “antiossidante” ha più significati e quindi si rende necessario precisare quale meccanismo d’azione delle molecole definite con questo termine si intende studiare. Nello specifico, la nostra attenzione è stata focalizzata sul ruolo che svolgono gli antiossidanti nell’inibire il processo della perossidazione lipidica. In letteratura, sono già stati trattati in maniera più o meno rigorosa i meccanismi alla base del processo d’inibizione, così come sono stati utilizzati e descritti diversi sistemi modello che riproducono condizioni di ossidazione accelerata. Ne consegue che, differenze nel tipo di substrato utilizzato, nella composizione dei sistemi modello e nei metodi analitici determinano forti incongruenze tra i dati riportati in letteratura.

Per superare, almeno in parte, questi problemi abbiamo messo a punto un metodo per lo studio della perossidazione lipidica, sia elaborando un modello cinetico delle reazioni coinvolte sia mettendo a punto un sistema micellare sperimentale. L’approccio rigoroso, basato sulla variazione del consumo di ossigeno che accompagna le varie fasi del processo, ci ha permesso così di valutare i due parametri fondamentali che caratterizzano un antiossidante come inibitore della fase di propagazione della perossidazione lipidica: la “capacità” (n), che rappresenta il numero di specie reattive bloccate, e l’“efficienza” (IC_{50}^{-1}), che rappresenta, invece, l’abilità nel bloccare le specie reattive. Il sistema sperimentale e di calcolo che abbiamo messo a punto ci hanno consentito di determinare con buona precisione entrambi i parametri da una singola misura.

Il modello cinetico che abbiamo elaborato valuta in maniera rigorosa le reazioni che avvengono durante il processo di inibizione della perossidazione lipidica, con particolare attenzione rivolta alle reazioni di terminazione oltre che alle reazioni di propagazione. Le reazioni di terminazione sono in competizione con le reazioni di inibizione, infatti, il numero di radicali perossidici bloccati da un inibitore diminuisce in funzione della scomparsa dell’inibitore stesso, mentre aumenta il numero di radicali che scompaiono per mutua interazione. Un’analisi cinetica rigorosa ha permesso di ricavare una funzione complessa, contenente la velocità di consumo di ossigeno, che dipende linearmente dal tempo. Questa relazione lineare è caratterizzata da un parametro “C”. Dal valore di “C” si possono ottenere sia il valore di “n” sia il valore di “ IC_{50}^{-1} ”, relativi al processo di inibizione, a cui corrispondono, nel caso di composti puri, la stechiometria del processo di inibizione e il rapporto tra le costanti cinetiche del processo di scavenging dei radicali perossidici e di terminazione di questi radicali per mutua interazione.

La validità del modello cinetico e del metodo di calcolo è stata verificata eseguendo misure di inibizione della perossidazione lipidica con diversi tipi di antiossidanti a differenti concentrazioni e in vari sistemi micellari. Sono stati testati diversi antiossidanti di origine vegetale, tra cui i derivati dell’acido benzoico, i derivati dell’acido idrossicinnamico, flavanoli, flavonoli e antociani, per i quali si sono calcolati i corrispondenti valori di “n” e “ IC_{50}^{-1} ”, caratteristici della loro attività antiossidante nel processo di inibizione della perossidazione lipidica.

Sulla base dei buoni risultati ottenuti nelle misure dell’attività antiossidante di questi composti puri si è voluta verificare la possibilità di applicazione del metodo messo a punto allo studio di sistemi complessi come alimenti e plasma umano.

Nel caso di alimenti particolarmente ricchi di antiossidanti, per i quali numerose ricerche epidemiologiche indicano effetti benefici sulla salute umana, il metodo da noi

sviluppato interpreta correttamente i dati sperimentali e permette di ottenere per ogni alimento analizzato i valori di capacità (PRTC: Peroxyl Radical Trapping Capacity) ed efficienza (PRTE: Peroxyl Radical Trapping Efficiency). È da notare che dal punto di vista cinetico molti alimenti, benché contengano una varietà di antiossidanti, mostrano un comportamento simile a quello di un singolo inibitore, particolarità che consente di calcolare valori di PRTC e PRTE caratteristici. Questi valori dipendono dalla composizione dell'alimento e sono quindi un buon indicatore delle proprietà antiossidanti dell'alimento stesso.

L'applicazione del metodo per la misura dell'attività del plasma umano nel bloccare i radicali perossidici ha messo in luce la sua adattabilità allo studio di sistemi complessi. Infatti, ha permesso di rivelare la presenza nel plasma di due fasi di inibizione, riconducibili alle proprietà degli antiossidanti che esso contiene: una prima fase in cui il processo di inibizione della perossidazione lipidica è di ordine zero rispetto alla concentrazione dell'antiossidante, il che significa efficienza del 100% nel bloccare i radicali, e una seconda fase caratterizzata da una cinetica del primo ordine rispetto all'antiossidante. Per interpretare questo comportamento si è analizzato da un lato quale sia il contributo delle componenti ad alto e basso peso molecolare del plasma al processo d'inibizione, dall'altro l'azione degli antiossidanti presi singolarmente. In particolare, abbiamo verificato che la frazione del plasma ad alto peso molecolare (HMW), in cui sono presenti vitamina E e bilirubina legata ad albumina, inibisce la perossidazione lipidica secondo un processo di ordine zero per cui è possibile ottenere solo il valore di capacità antiossidante. Gli antiossidanti presenti nella frazione a basso peso molecolare (LMW), per lo più acido ascorbico ed acido urico, inibiscono la perossidazione lipidica secondo un processo di primo ordine rispetto alla concentrazione di inibitore e quindi è stato possibile ottenere valori di capacità ed efficienza di questa frazione. Infine, l'esame del plasma intero ha messo in luce l'alta sinergia che si instaura fra le componenti ad alto e basso peso molecolare. Infatti, l'analisi dei tracciati ossigrafici mediante un ulteriore affinamento del metodo messo a punto ha rivelato che una parte dell'attività antiossidante dei bassi pesi molecolari, caratterizzati da una relativamente bassa efficienza ed alta capacità, viene trasferita agli alti pesi molecolari con un potenziamento notevole dell'efficienza. Quindi, questo metodo appare utile per studiare differenti situazioni di attività antiossidante del plasma umano.

In conclusione, il modello cinetico proposto e il metodo di calcolo sono applicabili non solo alla valutazione dei singoli antiossidanti, ma anche allo studio di sistemi complessi, come alimenti e plasma umano, e permettono di mettere in luce aspetti particolarmente interessanti, quali, ad esempio, fenomeni di sinergia ed antisinergia, che gli altri metodi attualmente in uso non sono in grado di evidenziare.

L'attività di ricerca svolta ha portato alla stesura dei seguenti lavori pubblicati o in corso di pubblicazione:

- Zennaro L; Rossetto M; Vanzani P; De Marco V; Scarpa M; Battistin L; Rigo A. A method to evaluate capacity and efficiency of water soluble antioxidants as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *462*, 38-46.
- Rossetto M; Vanzani P; De Marco V; Zennaro L; Scarpa M; Rigo A. A fast and simple method for the simultaneous evaluation of the capacity and efficiency of food antioxidants in trapping peroxy radicals in an intestinal model system. Manoscritto in attesa di pubblicazione su *J. Agric. Food Chem.*

ABSTRACT

The term “antioxidant” has several meanings and so it is necessary specifying the antioxidant mechanism we intend to study. We focused the attention on the role of antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation process. In literature, the mechanisms at the base of the inhibition process have been discussed more or less rigorously and several model systems reproducing conditions of accelerated oxidation have been used and described. The differences in the used substrates, in the composition of the systems and in the analytical methods produced data difficult to compare.

In the order to overcome these problems, we set up a method for the study of the lipid peroxidation, both by developing the kinetic model of the reactions and by setting up the experimental micelle system. The rigorous approach, based on the variation of oxygen consumption during the various phases of the process, permits to evaluate two fundamental parameters characterizing a radical chain-breaking antioxidant in the inhibition of lipid peroxidation: the “capacity” (n), that is the number of free radicals scavenged by each molecule of inhibitor, and the “efficiency” (IC_{50}^{-1}), that is the ability of an inhibitor to scavenge peroxy radicals. This method permits to obtain both parameters correctly and simultaneously from a single kinetic run.

The elaborated kinetic model evaluates the reactions occurring in the inhibition of lipid peroxidation process with particular attention to the termination reactions between peroxy radicals besides the propagation reactions. The termination reactions compete with the inhibition reactions of antioxidants. Indeed, the number of peroxy radicals scavenged by an inhibitor molecule decreases with its consumption, but the number of peroxy radicals disappearing by mutual interaction increases. A rigorous kinetic analysis permits to obtain a complex function containing the rate of oxygen consumption which is linearly correlated with the time. This linear relationship is characterized by the “C” parameter. The “C” value permits to obtain both “n” and “ IC_{50}^{-1} ” values concerning the inhibition process. In the case of pure antioxidants “n” is related to the stoichiometry of the inhibition process and “ IC_{50}^{-1} ” is related to the kinetic rate constant of the trapping process. The validity of the kinetic model and of the analytical method were verified measuring the inhibition of lipid peroxidation by different antioxidants at several concentrations and in various micelle systems. We tested many plant polyphenols such as the derivatives of benzoic acid, hydroxycinnamic acids, flavanols, flavonols and anthocyanins. For these compounds it was calculated the values of “n” and “ IC_{50}^{-1} ” characterizing their antioxidant activity in the inhibition of lipid peroxidation process.

On the base of the good results, we verified the possibility to applicate the method for the study of complex systems such as foods and human plasma.

In the case of foods, characterized by the presence of a significant amount of antioxidants, which have a protecting action on the human health as described by recent epidemiological studies, the developed method correctly explains the experimental data and permits to evaluate simultaneously both capacity (PRTC: Peroxyl Radical Trapping Capacity) and efficiency (PRTE: Peroxyl Radical Trapping Efficiency) for each tested food. It is important to point out that many foods, although they contain various antioxidants, show a kinetic behaviour like a single inhibitor, peculiarity that permits to obtain typical values of PRTC and PRTE for these foods. These values depend on the food composition and then they are good indicators of the antioxidant properties of each food.

The application of the method to measure the human plasma activity in the scavenging of peroxy radicals shows its adaptability to study complex systems. Indeed, in the case of plasma, it permits to demonstrate the presence of two inhibition phases related to the properties of contained antioxidants. The first phase of inhibition is characterized by a zero-order process with respect to antioxidant concentration that means 100% efficiency in the scavenging of peroxy radicals, while the second phase is characterized by a first-order process with respect to the antioxidant concentration. To understand this behaviour we have analyzed both the contribution of the high and low molecular weight components of plasma in the inhibition process and the action of the single antioxidants. In particular, we have verified that the high molecular weight (HMW) fraction of plasma, containing vitamin E and albumin-bound bilirubin, inhibits lipid peroxidation by a zero-order process and so we have obtained only the antioxidant capacity. The antioxidants present in the low molecular weight (LMW) fraction, which are mainly ascorbic acid and uric acid, inhibit the lipid peroxidation by a first-order process with respect to the inhibitor concentration. For this reason, it is possible to obtain the values of capacity and efficiency of LMW. The plasma analysis has shown the high synergy existing between the high and low molecular weight components. Indeed, the analysis of the oxygraphic trace by means of an ulterior refining of our method displayed that a part of antioxidant activity of the low molecular weight component, characterized by relatively low efficiency and high capacity, is transferred to the high molecular weight component with a remarkable increase of the plasma efficiency. This method appears useful to study different situation of human plasma antioxidant activity.

In conclusion, the proposed method can be applied both to evaluate single antioxidants and to study complex systems such as food and human plasma and permits to light particularly interesting aspects such as synergistic and antisnergistic phenomena that the other currently used methods do not show.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni si è osservato un continuo aumento di interesse nei confronti della funzione degli antiossidanti naturali presenti negli alimenti e nei sistemi biologici. Alcuni antiossidanti, come i polifenoli che vengono assunti con la dieta, sono associati ad un effetto di protezione contro cancro, malattie cardiovascolari e disfunzioni neurologiche legate all'invecchiamento [Ziegler, 1991; Hollman & Katan, 1999; Serafino *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2000; Joseph *et al.*, 2005]. Per questo motivo è di notevole interesse l'individuazione di un metodo adeguato a testare l'attività antiossidante in condizioni il più possibile vicine a quelle presenti nel corpo umano.

In senso generale, gli antiossidanti sono stati definiti come molecole in grado di ritardare significativamente o prevenire l'ossidazione di substrati ossidabili [Halliwell, 1990], che possono essere rappresentati da lipidi, proteine, DNA e carboidrati. In realtà, tale definizione non fornisce informazioni sul meccanismo con cui agiscono gli antiossidanti. In senso più stretto, gli antiossidanti sono stati definiti come molecole in grado di bloccare i radicali [Uri, 1961] e il meccanismo d'azione implicitamente descritto in tale affermazione prevede che essi agiscano bloccando catene radicaliche, come quelle generate durante il processo di perossidazione lipidica.

Sono stati sviluppati molti metodi per misurare l'attività degli antiossidanti nel bloccare i radicali liberi, utilizzando una grande varietà di sistemi modello e sfruttando uno dei meccanismi mediante i quali gli antiossidanti possono disattivare i radicali, ossia il trasferimento di un atomo di idrogeno. Tra le molte tecniche attualmente in uso per misurare l'attività antiossidante sono da ricordare l'ORAC [Cao *et al.*, 1993], il saggio sulla chemiluminescenza [Whitehead *et al.*, 1992], il FRAP [Benzie & Szeto, 1999], il saggio dell'ABTS (o TEAC) [Miller *et al.*, 1993] e del DPPH [Bondet *et al.*, 1997; Sanchez-Moreno *et al.*, 1998]. La grande differenza esistente tra le metodologie appena elencate, in particolare, tra i principi su cui esse si basano, ha condotto a risultati a volte contrastanti. Inoltre, grossi limiti legati all'applicazione di tali tecniche sono da

ricondere ai sistemi modello utilizzati, che in genere non riproducono condizioni e meccanismi di rilevanza biologica.

La perossidazione lipidica ed, in particolare, la sua inibizione sono processi di grande importanza biologica. I radicali perossidici, infatti, sono coinvolti nell'autoossidazione delle lipoproteine e delle membrane biologiche e sono responsabili di processi degenerativi, tra cui la formazione di placche aterosclerotiche e la generazione di danni microvascolari [Chisolm & Steinberg, 2000; Cantuti-Castelvetri *et al.*, 2000]. Per questo motivo, è importante studiare i meccanismi con cui gli antiossidanti agiscono per bloccare tali processi. La loro azione nell'inibizione della perossidazione lipidica è caratterizzata da due importanti parametri, cioè la capacità (il numero di radicali liberi bloccati) e l'efficienza (l'abilità nel bloccare i radicali). La capacità è legata alla stechiometria della reazione, mentre l'efficienza è legata alle costanti cinetiche delle reazioni di scavenging.

Per studiare il processo di inibizione della perossidazione lipidica sono stati sviluppati diversi metodi che si basano su condizioni di ossidazione accelerata. Tali metodi utilizzano un sistema micellare modello che contiene un substrato lipidico ed un iniziatore radicalico, un azocomposto, fonte costante di radicali liberi, e consentono di misurare l'effetto che hanno gli antiossidanti sul processo di perossidazione lipidica così generato. Su queste condizioni si basa, ad esempio, il saggio TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) che permette, però, di ricavare il solo valore di capacità antiossidante [Ghiselli *et al.*, 1995; Ghiselli *et al.*, 2000; Wayner *et al.*, 1985; Wayner *et al.*, 1987], mentre solo pochi autori hanno considerato la possibilità di misurare sia la capacità sia l'efficienza di inibizione della perossidazione lipidica [Barclay *et al.*, 1984; Pryor *et al.*, 1988; Pryor *et al.*, 1993; Roginsky *et al.*, 1996; Roginsky & Barsukova, 2001; Roginsky, 2003]. Anche tali metodi, in realtà, presentano notevoli problemi, legati per lo più alla composizione del sistema modello, al fatto che il meccanismo alla base del processo d'inibizione in quel determinato sistema sia stato descritto in maniera più o meno rigorosa ed al metodo analitico con cui vengono trattati i dati sperimentali. In particolare, i sistemi micellari modello, descritti ed adottati da questi autori, sono costituiti da sodio dodecilsolfato e acido linoleico o da Triton X-100 e metil linoleato e riproducono condizioni che si discostano molto da quelle presenti nel sistema in cui gli antiossidanti agiscono.

In quest'ottica, la nostra attenzione si è focalizzata sullo studio dell'inibizione della perossidazione lipidica al fine di analizzare in dettaglio il meccanismo cinetico alla base del processo, di individuare un sistema modello che si avvicini alle condizioni presenti in alcuni comparti del corpo umano e di adottare un metodo di calcolo che consenta di ricavare sia il valore della capacità sia il valore dell'efficienza di inibizione della perossidazione lipidica.

Il lavoro descritto in questa tesi è stato, quindi, condotto al fine di:

- Elaborare una rigorosa trattazione cinetica che descriva il comportamento degli antiossidanti nell'inibizione della perossidazione lipidica.
- Mettere a punto sistemi modello per valutare l'azione degli antiossidanti nell'inibizione della perossidazione lipidica.
- Individuare un adeguato metodo analitico che consenta di calcolare contemporaneamente i valori di capacità ed efficienza d'inibizione della perossidazione lipidica.
- Misurare l'azione d'inibizione della perossidazione lipidica da parte di alcuni antiossidanti puri, in particolare, di alcune classi di polifenoli e degli alimenti che li contengono.
- Valutare l'azione d'inibizione della perossidazione lipidica da parte del plasma umano e delle sue componenti ad alto e basso peso molecolare.

1.1. LA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

Lo studio della perossidazione lipidica ha ricevuto un notevole interesse nel campo della medicina e della biologia, basato sull'evidenza che tale processo è coinvolto nello sviluppo di molte malattie croniche, quali, asma [Wood *et al.*, 2003], artrite reumatoide [Hitchon & El-Gabalawy, 2004], Alzheimer [Markesbery, 2005], sclerosi multipla, Parkinson [Sayre *et al.*, 2005], oltre ad essere legato all'invecchiamento [Spiteller, 2007].

La perossidazione lipidica, un processo di deterioramento degli acidi grassi insaturi, è un fenomeno piuttosto complesso indotto dall'ossigeno in presenza di iniziatori come i radicali liberi o gli ioni metallici. Gli effetti specifici della perossidazione lipidica includono l'ossidazione delle lipoproteine a livello plasmatico, che può condurre alla formazione di placche aterosclerotiche [Jira & Spiteller, 1998], e il danneggiamento delle membrane biologiche, che è determinato da un'alterazione della fluidità dei lipidi di membrana e da una variazione della sua permeabilità.

La conseguenza diretta del processo di perossidazione lipidica è la formazione di idroperossidi (LOOH) che successivamente possono decomporsi in radicali liberi. Il meccanismo della perossidazione lipidica consta di una serie di reazioni a catena che può essere suddivisa in tre stadi: iniziazione, propagazione e terminazione (figura 1.1).

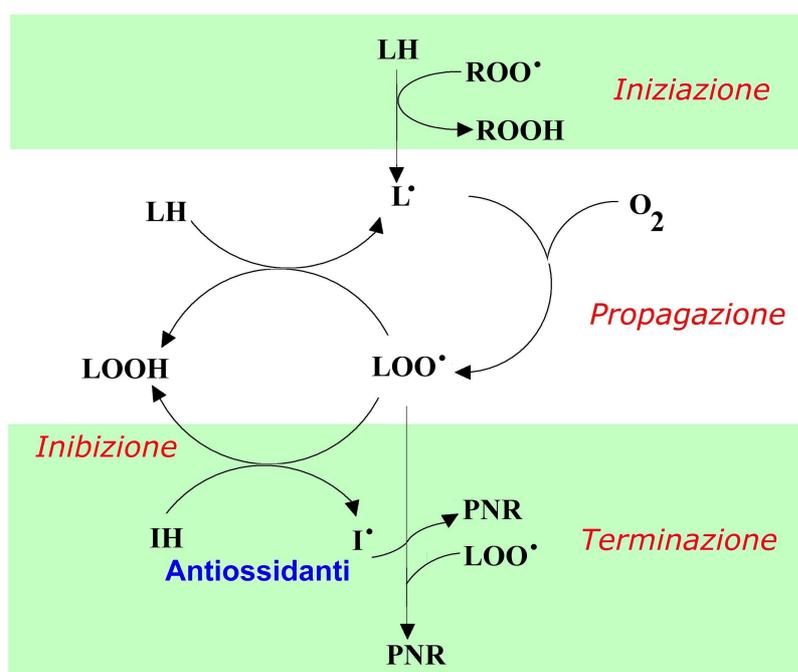


Figura 1.1. Fasi del processo di perossidazione lipidica e sua inibizione.

La fase di iniziazione prevede il distacco, per azione di un radicale libero (ROO^\bullet), di un atomo di idrogeno allilico dal gruppo metilenico coniugato ad un doppio legame nella catena dell'acido grasso insaturo (LH), con conseguente formazione di un radicale (L^\bullet) sull'atomo di carbonio corrispondente. Nello stadio di propagazione, i radicali L^\bullet reagiscono molto velocemente con l'ossigeno molecolare, generando i

radicali perossidici LOO^\bullet che a loro volta sottraggono un atomo di idrogeno ad un'altra molecola di acido grasso insaturo per formare un idroperossido (LOOH) e un altro radicale L^\bullet . Le reazioni di propagazione portano alla formazione di una catena cinetica, in cui per ogni radicale ROO^\bullet generato vengono consumate più molecole di LH e per ogni molecola di LH che reagisce scompare una molecola di ossigeno. In fase di terminazione, i radicali liberi prodotti durante il processo reagiscono tra loro e danno origine a prodotti non radicalici, inattivi.

Se si aggiunge al sistema un inibitore (IH), un antiossidante, durante la fase di propagazione della perossidazione lipidica, questo reagisce con i radicali perossidici interrompendo le catene radicaliche. Un antiossidante, in base alle sue caratteristiche, è in grado di bloccare una o più catene radicaliche donando atomi di idrogeno, con conseguente formazione di radicali liberi (I^\bullet) relativamente stabili. Il ruolo riconosciuto a queste molecole riguarda proprio la loro abilità nel reagire con radicali altamente reattivi, al fine di svolgere un'azione protettiva contro possibili danni ossidativi.

Per generare i radicali ROO^\bullet in questa tesi è stato utilizzato un iniziatore radicalico di tipo diazenico, che si decompone termicamente liberando azoto e due radicali R^\bullet con l'elettrone spaiato centrato su un atomo di carbonio. In presenza di ossigeno molecolare, una frazione dei radicali liberi R^\bullet reagisce con esso, generando il radicale perossidico ROO^\bullet , mentre l'altra frazione origina prodotti non radicalici attraverso reazioni di terminazione.

L'utilizzo di azoiniziatori nei test in vitro semplifica il trattamento dei dati cinetici sperimentali e garantisce la formazione di radicali perossidici ad una velocità costante e riproducibile.

1.2. I POLIFENOLI

I composti fenolici, comunemente definiti polifenoli, sono presenti in tutte le piante, costituiscono uno dei gruppi più numerosi e importanti dei metaboliti vegetali e sono parte integrante della dieta umana [Bravo, 1998]. Infatti, sono presenti nei legumi, nei cereali, nella frutta (mele, more, mirtilli, ciliegie, uva, lamponi e fragole), nella verdura (radicchio, lattuga, cipolle, sedano e cavoli), nelle bevande (vino rosso e tè verde), nella cioccolata e nell'olio d'oliva.

Molti studi epidemiologici hanno messo in evidenza il fatto che i polifenoli hanno effetti benefici sulla salute umana [Kris-Etherton et al., 2002], in particolare, mostrano proprietà antiinfiammatorie, anticarcinogeniche e vasodilatatorie. Inoltre, è stato dimostrato che i polifenoli sono in grado di inibire in vitro l'ossidazione delle LDL, evento correlato alla patogenesi dell'aterosclerosi e delle malattie cardiovascolari. Questi effetti sono da ricondurre alle proprietà antiossidanti dei polifenoli che sono in grado di bloccare le catene radicaliche durante il processo di perossidazione lipidica, donando atomi di idrogeno e formando radicali liberi relativamente stabili.

All'interno della grande famiglia dei polifenoli di origine vegetale sono state individuate più di 8000 strutture fenoliche, che vanno dalle molecole con un anello a sei atomi di carbonio (acidi fenolici) ai composti altamente polimerizzati (tannini). I composti, distinti sulla base della struttura chimica, sono stati raggruppati in flavonoidi e acidi fenolici (non flavonoidi) (Figura 1.2).

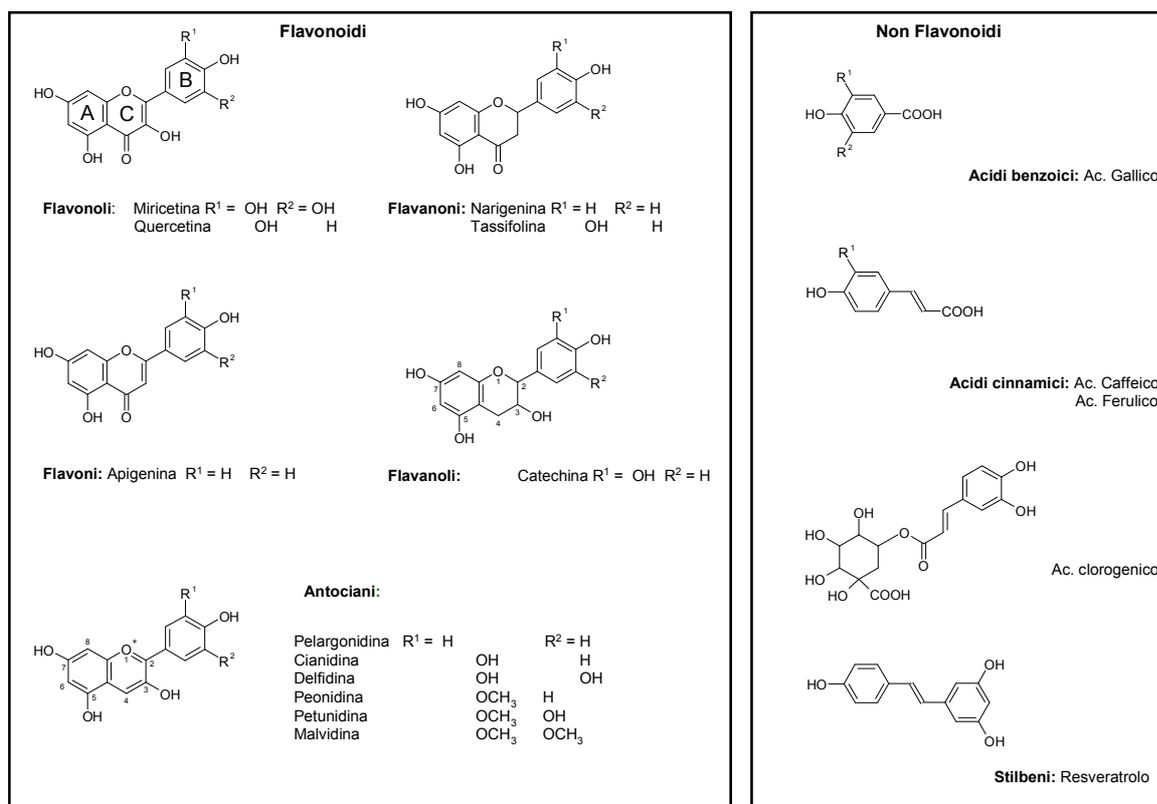


Figura 1.2. Struttura chimica delle varie classi di composti flavonoidi e non flavonoidi.

I composti non flavonoidi possono essere distinti in derivati dell'acido benzoico (come l'acido gallico), derivati dell'acido cinnamico (come l'acido caffeico, l'acido ferulico e l'acido clorogenico) e stilbeni (come il resveratrolo). Gli acidi fenolici sono presenti nella forma libera o esterificata.

I composti flavonoidi sono raggruppati in cinque classi principali: flavanoli, flavoni, flavonoli, flavanoni e antociani. La struttura che li caratterizza è un anello benzenico condensato con un anello γ -pirone, denominati A e C rispettivamente, al quale in posizione 2 è legato un anello fenolico, detto anello B, che può essere variamente sostituito in 3' e 5'. L'attività antiossidante dei composti flavonoidi è strettamente correlata alla loro struttura idrossiaromatica a tre anelli, che permette la delocalizzazione dell'elettrone spaiato con la conseguente formazione di un radicale stabile [Rice-Evans *et al.*, 1996]. Ad eccezione delle catechine, i flavonoidi nelle piante sono presenti nella forma glicosilata, necessaria per la loro localizzazione nel vacuolo. Il sito principale di glicosilazione sulla molecola è in posizione 3, meno frequentemente può essere glicosilata in posizione 5 e 7. Solitamente si lega il glucosio, ma possono legarsi anche arabinosio, galattosio, ramnosio e xilosio. L'apporto medio dei polifenoli con la dieta nei paesi occidentali è stimato essere 1 g/die [Kuhnau, 1976; Pierpoint, 1986]. Le catechine raggiungono una concentrazione massima nel plasma pari a 1 μ M, l'acido gallico fino a 4 μ M e l'acido caffeico fino a 1 μ M [Manach *et al.*, 2005].

1.3. ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEL PLASMA

Nel plasma sono presenti sistemi di difesa responsabili della protezione dagli effetti del cosiddetto "stress ossidativo". Questi possono inibire il processo di ossidazione in due differenti modi: riducendo la velocità di produzione di radicali liberi, ad esempio i ROS, o bloccando le catene radicaliche prodotte durante la fase di propagazione della perossidazione lipidica.

La difesa contro le specie reattive dell'ossigeno è rappresentata primariamente da tre sistemi enzimatici endogeni: Superossido Dismutasi (SOD), che catalizza la dismutazione dell'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) a perossido di idrogeno e ossigeno; Glutazione Perossidasi (GSH-Px) che catalizza la rimozione dell'acqua ossigenata;

Catalasi, che riduce il perossido di idrogeno ad acqua e ossigeno molecolare [Valko *et al.*, 2007].

Oltre a questi sistemi enzimatici di difesa, nel plasma sono presenti anche altri composti con proprietà antiossidanti di origine non proteica, che sono in grado di bloccare direttamente i radicali liberi ed hanno quindi un ruolo significativo nell'inibire il processo di perossidazione lipidica. Tra questi antiossidanti troviamo l' α -tocoferolo (vitamina E), l'acido ascorbico (vitamina C), l'acido urico, la bilirubina glucoronata o legata all'albumina, i carotenoidi e i flavonoidi introdotti con la dieta. In questo modo, l'attività antiossidante del plasma è finemente regolata allo scopo di minimizzare i fenomeni di perossidazione lipidica, che possono avvenire a livello della parte proteica e lipoproteica del plasma, fenomeno coinvolto nella progressione dell'aterosclerosi.

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

2.1. MATERIALI

2.1.1. Reagenti

Per il lavoro sperimentale svolto in questa tesi sono stati utilizzati reagenti al massimo grado di purezza ottenibile commercialmente.

Il (\pm)- α -tocoferolo, il rac1-laurilglicerolo (LG), il 3-[(3-colamidopropil)dimetilammonio]-1-propansulfonato (CHAPS), l'acido gallico, l'acido protocatecuico e l'albumina sierica umana (HSA) libera da acidi grassi sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich (Italia). L'acido linoleico (LH), il sodio deossicolato (DCA), il sodio dodecilsolfato (SDS), il 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico (Trolox), la (+)-catechina, l'acido caffeico, l'acido ferulico, l'acido clorogenico, l'acido ellagico, la quercetina, l'acido ascorbico, l'acido urico, il 2,6-di-*tert*-butil-*p*-cresolo (BHT) e la bilirubina sono stati acquistati dalla ditta Fluka (Svizzera). L'acido cicorico è stato fornito dalla ditta PhytoLab GmbH & Co. KG (Germania). La cianidina-3-*O*- β -glucoside, la malvidina-3-*O*- β -glucoside, la petunidina-3-*O*- β -glucoside, la delphinidina-3-*O*- β -glucoside e la delphinidina aglicone sono state acquistate dalla ditta Extrasynthese (Francia).

Gli enzimi catalasi e ascorbato ossidasi sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich (Italia), l'uricasi dalla ditta Fluka (Svizzera).

I tre tipi di vino, il radicchio di tre cultivar e le due varietà di mirtillo testate sono state campionate in Veneto; le mele di tre cultivar sono state campionate in Trentino.

Come iniziatore radicalico idrofilico è stato usato il 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propano]diidrocloreidrato (ABIP), un cortese dono della ditta Wako Chemicals (Germania). Inoltre, sono stati utilizzati il 2,2'-azobis-(2-metilamidinopropano)diidrocloreidrato (AAPH), un iniziatore radicalico idrofilico, e il 2,2'-azobisisobutironitrile (AIBN), un iniziatore radicalico liposolubile, forniti dalla ditta Fluka.

Il Chelex-100 (BIO-RAD) utilizzato è caratterizzato da una granulometria di 200-400 mesh e capacità totale uguale a 0.4 meq/mL di resina.

Tutte le soluzioni (tamponi, acque di lavaggio, ecc.) sono state preparate utilizzando acqua deionizzata con distillazione finale su distillatore di quarzo.

2.1.2. Strumentazione

Per condurre gli esperimenti sono state utilizzate le seguenti strumentazioni:

1. Polarografo: METROHM 641 VA
2. Spettrofotometro UV-Visibile VARIAN CARY 50 SCAN
3. Centrifuga Beckman J2-21
4. Centrifuga ALC 4235
5. Termostato GRANT W6
6. Termometri a Hg

Nel caso delle misure ossigrafiche è stato utilizzato un elettrodo di Clark della Yellow-Spring YSI 5331 per la misura della concentrazione di ossigeno, inserito in un cilindro di Teflon (diametro 12 mm), a sua volta inserito in una cella ossigrafica in vetro termostata, opportunamente costruita e fornita di magnete.

2.2. METODI

2.2.1. Preparazione delle soluzioni tampone

Gli esperimenti eseguiti nel sistema DCA (sodio deossicolato, *rac*-1-laurilglicerolo e acido linoleico), nel sistema PIP4 (proteine e lipoproteine del plasma arricchite in acido linoleico) e nel sistema CHAPS-LH (3-[(3-colamidopropil)dimetilammonio]-1-propansulfonato e acido linoleico) sono stati condotti in tampone sodio fosfato 20 mM, pH 7.40, contenente NaCl 110 mM, quelli effettuati nel sistema SDS-LH (sodio dodecilsolfato e acido linoleico) in tampone sodio fosfato 50 mM, pH 7.40, contenente NaCl 20 mM. Le soluzioni sono state purificate prima dell'uso mediante Chelex-100, mettendo ad equilibrare le soluzioni direttamente

con la resina per qualche ora prima dell'utilizzo, per immobilizzare eventuali tracce di ioni metallici.

Queste soluzioni sono state conservate in frigo alla temperatura di 4°C in recipienti di vetro precedentemente risciacquati con acqua distillata.

2.2.2. Misura del consumo di ossigeno per via polarografica

In questo lavoro il consumo di ossigeno nella soluzione di misura, mantenuta sotto continua agitazione utilizzando un magnete, è stato misurato mediante l'elettrodo di Clark. L'elettrodo di Clark è costituito da un elettrodo di platino, che funge da elettrodo di lavoro, e da uno di argento (Ag/AgCl), che funziona da contro elettrodo e da elettrodo di riferimento. Questi elettrodi vengono bagnati con una soluzione di KCl e rivestiti con una membrana permeabile all'ossigeno. Mediante un potenziostato viene applicata una differenza di potenziale di -800 mV, in modo tale che l'elettrodo di platino assuma un potenziale negativo rispetto al contro elettrodo. Sulla superficie dell'elettrodo di lavoro avviene la riduzione dell'ossigeno molecolare, che determina un passaggio di corrente. La corrente così misurata in funzione del tempo viene registrata e digitalizzata mediante un computer equipaggiato con un sistema di acquisizione dati (DAQ PCI-6221, serie M, National Instruments).

La concentrazione dell'ossigeno molecolare presente in soluzione a $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ è stata stimata essere di circa 180 μM . Tale concentrazione è stata determinata mediante calibrazione con H_2O_2 a concentrazione nota e catalasi a partire dalla soluzione tampone completamente deossigenata mediante flusso di azoto.

Per i sistemi modello studiati, la soluzione di misura contenente acido linoleico è stata posta in cella ossigrafica termostata a $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ e mantenuta in costante agitazione. Dopo qualche minuto, quando cioè la soluzione ha raggiunto l'equilibrio termico, viene chiusa la cella ossigrafica e viene iniettato l'iniziatore radicalico ABIP che consuma ossigeno a velocità costante. Tale iniziatore, mediante decomposizione termica, conduce alla generazione di un processo di perossidazione dell'acido linoleico, accompagnato sempre da un costante consumo di ossigeno. Dopo aver introdotto in cella l'antiossidante da esaminare, che rallenta la cinetica di perossidazione lipidica, si registra la velocità di consumo dell'ossigeno, fino alla sua completa scomparsa. Le

tracce ossigrafiche sperimentali ottenute sono state processate automaticamente mediante un software sviluppato nel nostro laboratorio al fine di ottenere le velocità di consumo di ossigeno e quindi calcolare i valori di capacità ed efficienza di inibizione della perossidazione lipidica da parte di un antiossidante.

2.2.3. Studio dell'inibizione della perossidazione lipidica in differenti sistemi modello

Il metodo messo a punto si basa sulla misura del grado di inibizione della perossidazione lipidica da parte di alcuni antiossidanti, degli alimenti o dei loro estratti, del plasma e delle frazioni ad alto e basso peso molecolare da esso isolate, in sistemi modello ed in presenza di una fonte di radicali liberi, che si decompone termicamente con velocità costante. Il processo di perossidazione lipidica viene monitorato misurando la velocità di scomparsa dell'ossigeno con l'elettrodo di Clark.

Per la valutazione dell'attività di inibizione della perossidazione lipidica si sono messi a punto sostanzialmente due sistemi modello che contengono un substrato ossidabile:

- *Sistema DCA*
- *Sistema PIP4*

nonostante si siano eseguiti esperimenti di inibizione anche in altri sistemi modello, nello specifico:

- *Sistema CHAPS-LH*
- *Sistema SDS-LH*

In particolare, l'attività inibitoria della maggior parte degli antiossidanti puri e degli alimenti è stata testata nel sistema DCA, mentre l'inibizione della perossidazione lipidica da parte del plasma e delle sue frazioni è stata valutata sia nel sistema DCA sia nel sistema PIP4.

Nel corso degli esperimenti si sono utilizzate le seguenti condizioni:

Sistema DCA

Il sistema DCA viene preparato facendo evaporare il solvente della soluzione di rac1-laurilglicerolo (LG) disciolto in diclorometano e dissolvendo il film così ottenuto in una soluzione di sodio deossicolato 5 mM (DCA), preparato in tampone fosfato 20 mM, NaCl 110 mM a pH 7.4, in modo da ottenere una concentrazione di LG in cella pari a 0.5 mM; infine, viene aggiunto acido linoleico alla concentrazione finale 2 mM (LH). La soluzione così preparata viene sottoposta ad agitazione con Vortex qualche secondo per consentire l'omogenea dispersione dell'acido linoleico nelle micelle di DCA-LG, quindi, viene posta in cella a $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ e mantenuta in agitazione. Dopo qualche minuto, quando la soluzione ha raggiunto l'equilibrio termico, viene chiusa la cella di misura e viene iniettato ABIP alla concentrazione finale 4 mM. L'iniziatore radicalico origina una catena di radicali perossidici e quando viene raggiunta una velocità costante di consumo dell'ossigeno, dovuta al processo di perossidazione lipidica, è possibile iniettare gli antiossidanti da testare. Gli inibitori aggiunti determinano una riduzione di tale velocità. Le cinetiche di inibizione della perossidazione lipidica vengono registrate fino alla completa scomparsa dell'ossigeno.

Sistema PIP4

Un'aliquota della frazione proteica e lipoproteica del plasma (PIP), definita anche frazione ad alto peso molecolare (HMW), ottenuta come descritto nel Paragrafo 2.2.6, è stata mescolata con acido linoleico (LH), sottoponendola ad agitazione su Vortex per qualche secondo, allo scopo di favorire l'omogenea dispersione dell'acido grasso. La frazione proteica e lipoproteica così preparata è stata successivamente diluita 25 volte rispetto alla concentrazione che essa ha nel plasma, in tampone sodio fosfato 20 mM, NaCl 110 mM a pH 7.40, in modo da ottenere una concentrazione di acido linoleico in cella pari a 2 mM. L'arricchimento in acido linoleico è necessario per aumentare la lunghezza delle catene perossidiche che in presenza dei soli acidi grassi contenuti nella frazione proteica e lipoproteica del plasma diluita sarebbe altrimenti troppo corta. La soluzione così preparata viene posta nella cella di misura termostata a $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ e mantenuta in agitazione. Dopo qualche minuto, quando cioè la soluzione ha raggiunto la temperatura prevista, viene innalzata la concentrazione dell'ossigeno del

30% rispetto alla concentrazione presente quando la soluzione viene posta in equilibrio con l'aria, flussando ossigeno al 100% per qualche secondo. Una volta chiusa ermeticamente la cella di misura, viene iniettato ABIP alla concentrazione finale 4 mM ed esaurita l'azione degli antiossidanti presenti nel sistema PIP4 viene aggiunto l'inibitore da testare: il plasma o le sue componenti ad alto e a basso peso molecolare separate oppure antiossidanti di varia natura, che determinano una diminuzione della velocità di consumo dell'ossigeno. L'innalzamento dell'ossigeno consente di ottenere il completo esaurimento dell'effetto degli antiossidanti presenti nel sistema PIP4 e di poter avere un più lungo periodo di osservazione dell'inibizione. La registrazione del processo si protrae fino alla completa scomparsa dell'ossigeno.

Sistema CHAPS-LH

Il sistema CHAPS-LH è costituito da una soluzione di 3-[(3-colamidopropil)dimetilammonio]-1-propansulfonato 6 mM (CHAPS), disciolto nel medesimo tampone utilizzato nel sistema DCA e nel sistema PIP4, e contenente acido linoleico 2 mM (LH). La soluzione viene sottoposta ad agitazione con Vortex qualche secondo per consentire l'omogenea dispersione dell'acido linoleico nelle micelle di CHAPS, quindi, viene posta in cella a $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ e mantenuta in agitazione. Quando la soluzione ha raggiunto l'equilibrio termico, viene chiusa la cella di misura e viene iniettato ABIP alla concentrazione finale 1 mM.

Sistema SDS-LH

Il sistema SDS-LH è costituito da una soluzione di sodio dodecilsolfato 50 mM (SDS), sciolto in tampone fosfato 50 mM, NaCl 20 mM a pH 7.40 e contenente acido linoleico 2.5 mM (LH). Le misure sono condotte a $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ e la perossidazione viene indotta da ABIP 8 mM, che si decompone termicamente con velocità costante.

2.2.4. Preparazione degli estratti di mele, di radicchio e di mirtillo

Sono stati campionati casualmente circa 50 g in peso fresco di parte edibile di verdura o frutta, solo le foglie nel caso del radicchio, l'intero frutto nel caso del mirtillo, e sono stati omogeneizzati in 200 mL (0.25 g/L) di etanolo/acqua (85/15 v/v)

contenente HCl 0.1 M. Per quanto riguarda le mele, sono stati campionati 90 g di parte edibile del frutto fresco, polpa e buccia, e sono stati omogeneizzati in 375 mL (0.24 g/mL) di acetone/acqua (70/30 v/v). Gli omogenati sono stati centrifugati a $30000 \times g$ per 15 minuti ed è stato recuperato il surnatante. L'estratto ottenuto, una soluzione limpida, è stato poi conservato a -80°C fino all'analisi di inibizione della perossidazione lipidica.

2.2.5. Trattamento dei campioni di sangue

I campioni di sangue sono stati prelevati e raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante da adulti volontari sani, a digiuno per i quali è stato ottenuto un consenso informato. Il plasma è stato ottenuto in seguito a centrifugazione a $1000 \times g$ del sangue per 15 minuti e quindi congelato in azoto liquido nel giro di 1 ora. Le aliquote raccolte sono state conservate a -80°C ed utilizzate al massimo a distanza di un mese.

2.2.6. Desalting del plasma

Il desalting del plasma è stato eseguito su colonne cromatografiche PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech), preimpaccate con SephadexTM G-25 Medium, che consentono di separare molecole ad alto peso molecolare ($\text{MW} > 5000 \text{ Da}$) da molecole a basso peso molecolare ($\text{MW} < 1000 \text{ Da}$). Il passaggio in colonna permette di ottenere la separazione della componente ad alto peso molecolare (HMW) da quella a basso peso molecolare (LMW) del plasma.

Le colonne, dopo essere state lavate con 50 mL di acqua distillata ed equilibrate con 25 mL di tampone fosfato 20 mM, NaCl 110 mM a pH 7.4, sono state caricate con 2.5 mL di plasma ed eluite con lo stesso tampone.

Misurando l'assorbanza delle frazioni eluite dalla colonna e diluite 1/100, quando necessario, a 280 nm, lunghezza d'onda di massimo assorbimento delle proteine, si è determinato quali frazioni raccogliere al fine di isolare la componente ad alto peso molecolare del plasma. Da 2.5 mL di plasma caricati in colonna si sono

ottenuti circa 4 mL di HMW, corrispondenti alle prime frazioni raccolte. Il fattore di diluizione della soluzione di HMW rispetto al plasma è stato calcolato dal rapporto tra l'assorbimento a 280 nm degli alti pesi molecolari e del plasma, diluiti entrambi 1/100 in cuvetta. Tale valore, calcolato di volta in volta per ogni separazione, si aggira generalmente tra 1.4 e 1.6.

Per individuare le frazioni eluite che corrispondono ai LMW, contenenti acido ascorbico ed acido urico, è stato registrato per ciascuna aliquota, escludendo quelle più ricche in proteine, l'assorbimento a 268 nm e a 291 nm, lunghezze d'onda di massima assorbanza rispettivamente di acido ascorbico ed acido urico. Per individuare le frazioni che contengono acido ascorbico è stata misurata la variazione del valore di assorbanza alla lunghezza d'onda di 268 nm in seguito all'aggiunta dell'enzima ascorbato ossidasi ($2 \cdot 10^{-5}$ U/ μ L). Questa procedura ha permesso di individuare le frazioni contenenti per lo più acido ascorbico, quelle contenenti entrambe le molecole a basso peso molecolare e, infine, quelle contenenti esclusivamente acido urico (figura 2.1). Le frazioni così identificate sono state riunite ed è stato calcolato il volume di eluizione per i LMW (17.5 mL). Il rapporto tra il volume raccolto e il volume di plasma caricato in colonna ha fornito il fattore di diluizione dei bassi pesi molecolari, calcolato essere pari a 7.

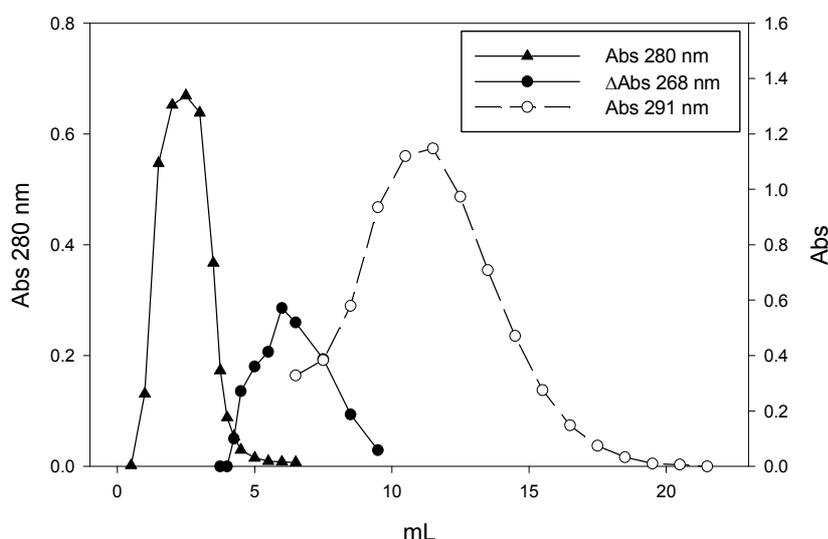


Figura 2.1. Andamento dell'assorbimento a diverse lunghezze d'onda delle frazioni isolate dopo desalting in funzione del volume di eluizione. (▲) Assorbimento a 280 nm delle frazioni degli HMW, isolate dopo desalting del plasma e diluite 1/100 in cella spettrofotometrica, in funzione del volume di eluizione. (●) Variazione dell'assorbimento a 268 nm. (○) Assorbimento a 291 nm.

2.2.7. Determinazione della concentrazione di bilirubina, acido ascorbico, acido urico e vitamina E

La concentrazione di bilirubina totale è stata determinata utilizzando la tecnica descritta da Malloy & Evelyn, 1937. Sono state preparate due soluzioni, la prima contenente acido sulfanilico 20 mM, HCl 50 mM e DMSO 7 M (soluzione A), la seconda contenente sodio nitrato 30 mM sciolto in acqua (soluzione B). È stata inoltre preparata una soluzione standard di bilirubina disciolta in NaOH 10 mM. I campioni da analizzare sono stati preparati nel seguente modo: 1 mL di soluzione A, 50 μ L di soluzione B e 100 μ L di campione (soluzione standard di bilirubina o plasma). Dopo aver atteso 10 minuti affinché avvenga la reazione, viene misurato l'assorbimento a 555 nm.

Per determinare la concentrazione di acido ascorbico ed acido urico è stata utilizzata la frazione a basso peso molecolare del plasma ottenuta per desalting (paragrafo 2.2.6). Per quanto riguarda l'acido ascorbico, è stata misurata l'assorbanza dei LMW a 268 nm, lunghezza d'onda di massimo assorbimento di questa molecola, prima e dopo l'aggiunta dell'enzima ascorbato ossidasi ($2 \cdot 10^{-5}$ U/ μ L), preparato in tampone fosfato 20 mM, NaCl 110 mM a pH 7.4. Per quanto riguarda l'acido urico, è stata misurata l'assorbanza dei LMW a 291 nm, prima e dopo l'aggiunta degli enzimi uricasi ($1.3 \cdot 10^{-3}$ U/ μ L) e catalasi ($6 \cdot 10^{-3}$ U/ μ L), rispettivamente preparati in tampone borato 50 mM a pH 9.3 e in tampone fosfato 20 mM, NaCl 110 mM a pH 7.4. Durante tale degradazione è richiesta la presenza di catalasi per eliminare l'acqua ossigenata liberata nel processo di ossidazione dell'acido urico via uricasi. Una volta determinate le variazioni di assorbanza e costruite le relative rette di taratura utilizzando soluzioni a concentrazione nota di acido ascorbico e di acido urico, è stato possibile risalire alla concentrazione nel plasma di entrambi gli antiossidanti.

La concentrazione di vitamina E è stata determinata mediante cromatografia HPLC [Lang et al., 1986] presso il centro di analisi mediche Pavanello.

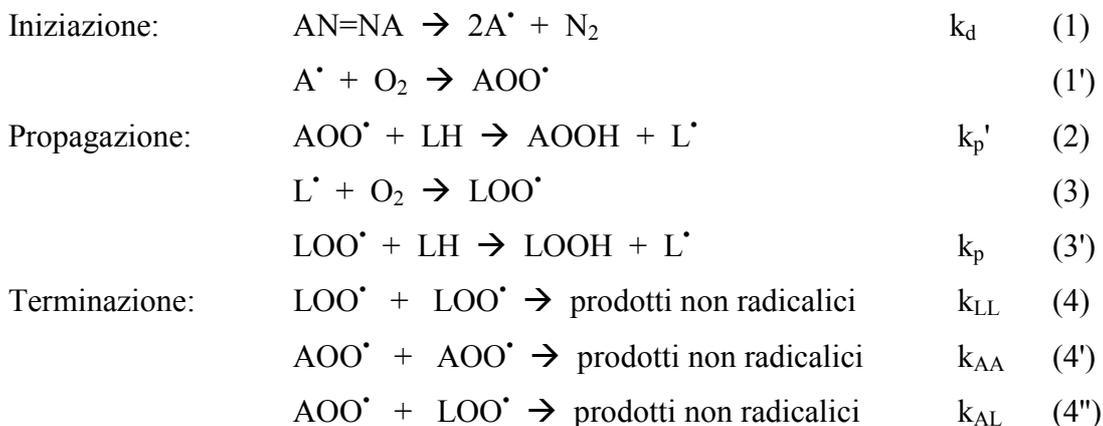
Capitolo 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. PROCESSO DI INIBIZIONE DELLA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

Si è messo a punto un metodo che mima il processo di perossidazione lipidica, per misurare l'attività degli inibitori. Il modello in vitro adottato, che consente un'analisi semplificata di quanto si verifica in vivo, è costituito da un sistema micellare acquoso in cui vengono generati radicali perossidici solubili mediante la decomposizione termica di un iniziatore radicalico, in genere un azo-composto solubile in acqua. I radicali prodotti a velocità costante attaccano l'acido grasso insaturo presente nel sistema, che genera a sua volta una catena di radicali perossidici.

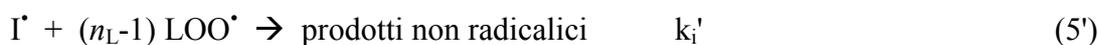
Il processo di perossidazione lipidica nel sistema modello adottato può essere schematizzato nel seguente modo:



dove AN=NA è l'azo-composto che genera una fonte costante di radicali liberi, e LH è l'acido linoleico, substrato della perossidazione lipidica.

Da questo schema risulta che la reazione di iniziazione e quella di propagazione comportano un consumo di ossigeno che può essere monitorato mediante l'utilizzo di un elettrodo. L'effetto dell'aggiunta di un inibitore (IH) al sistema interferisce con la reazione di propagazione mediante la donazione di un atomo di idrogeno determinando

un rallentamento del consumo di ossigeno. Questo effetto può essere schematizzato dalle seguenti reazioni:



dove n_L e n_A sono, rispettivamente, il numero di radicali LOO^\bullet e AOO^\bullet bloccati da una molecola di inibitore (IH) e dai suoi prodotti di reazione. Il numero totale n di radicali perossidici bloccati da un antiossidante è il risultato della somma $n_L + n_A$.

La reazione (5') (e il corrispondente valore k_i') prende in considerazione tutte le possibili reazioni della molecola di inibitore con i radicali perossidici che avvengono dopo la sottrazione del primo atomo di idrogeno dall'inibitore. In particolare, nel caso di alcuni polifenoli, si possono verificare reazioni di addizione dei radicali perossidici ai chinoni, che si possono generare nella dismutazione degli intermedi semichinonici [Flory, 1953]. Queste reazioni di addizione richiedono meno energia di quanta sia necessaria per l'estrazione dell'atomo di idrogeno (60-80 kcal/mole) [Lucarini *et al.*, 2002] e quindi i valori di k_i' saranno maggiori dei valori di k_i , motivo per cui sono stati riportati valori di $n \gg 2$ (anche fino a 12) nel caso di alcuni polifenoli [Roginsky, 2003]. Questi valori di n così alti sono spiegabili grazie alla partecipazione dei prodotti di ossidazione dei polifenoli al processo di inibizione, dal momento che tali prodotti sono più reattivi nei confronti dei radicali LOO^\bullet di quanto non siano i composti di partenza [Roginsky, 2003].

Nello schema sono riportate anche le reazioni (4'), (4''), (6) e (6') in cui sono coinvolti i radicali AOO^\bullet , in quanto i radicali AOO^\bullet e LOO^\bullet potrebbero avere un diverso comportamento nel sistema micellare dovuto a differenze in termini di carica elettrica o di distribuzione tra fase micellare ed acquosa. Tuttavia, queste reazioni possono essere trascurate se si opera in condizioni tali per cui la lunghezza della catena cinetica (ν) della fase di propagazione risulti essere > 10 , caso in cui si avrà $n \approx n_L$.

Il processo di iniziazione porta alla formazione di radicali liberi AOO^\bullet con una velocità costante $R_0 = 2 \cdot k_d \cdot e \cdot [\text{AN}=\text{NA}]$ (reazione (1)) e comporta un consumo di ossigeno che è indipendente dalla presenza di LH. R_0 dipende dalla costante di

decomposizione dell'iniziatore radicalico k_d ($2.44 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ a 37°C) [Rigo *et al.*, 2000], dall'efficienza "e" con cui i radicali A^\bullet sfuggono all'effetto "cage" e dalla concentrazione dell'azo-composto AN=NA.

Le reazioni di propagazione che iniziano con una velocità R_i (reazione (2)) generano un processo di perossidazione radicalico di tipo catalitico che consuma ossigeno con velocità α_0 ($\alpha_0 = \nu \cdot R_i$). In genere, a livello sperimentale, si verifica che $R_i < R_0$ [Bedard *et al.*, 2001].

La velocità di consumo di ossigeno al tempo t , in assenza (α_0) ed in presenza dell'inibitore (α_t), può essere calcolata sulla base dello schema cinetico sopra riportato e delle seguenti assunzioni:

- (i) le reazioni in cui è coinvolto l'ossigeno molecolare (1') e (3) non sono limitanti e sono indipendenti dalla concentrazione di ossigeno, almeno fino a quando $[\text{O}_2] \geq 0.10 [\text{O}_2]_0$, dove $[\text{O}_2]_0$ è la concentrazione di ossigeno iniziale;
- (ii) le velocità di generazione dei radicali AOO^\bullet e LOO^\bullet , e quindi R_0 e R_i , sono costanti durante la misura sperimentale;
- (iii) la concentrazione di acido linoleico è costante, dal momento che $[\text{LH}] \gg [\text{O}_2]$;
- (iv) $k_i' \gg k_i$;
- (v) la lunghezza della catena cinetica della fase di propagazione è > 10 .

In base alle reazioni (3) e (3'), il consumo di ossigeno dovuto all'ossidazione dell'acido linoleico (LH) in assenza dell'inibitore (IH) è:

$$\alpha_0 = -\left(\frac{d[\text{O}_2]}{dt}\right)_{\text{IH}=0} = k_p [\text{LOO}^\bullet]_{\text{IH}=0} [\text{LH}] \quad (7)$$

con $\alpha_0 = \alpha_0' - R_0$, dove α_0' è la velocità sperimentale di scomparsa di ossigeno in assenza di IH. In presenza di IH:

$$\alpha_t = -\left(\frac{d[\text{O}_2]}{dt}\right)_{\text{IH}\neq 0} = k_p [\text{LOO}^\bullet]_{\text{IH}\neq 0} [\text{LH}] \quad (8)$$

con $\alpha_t = \alpha_t' - R_0$, dove α_t' è la velocità sperimentale di scomparsa di ossigeno in presenza di IH. In accordo con l'ipotesi di stato stazionario, sono state ottenute le seguenti equazioni:

$$\left(\frac{d[\text{LOO}\cdot]}{dt} \right)_{\text{IH}=0} = R_i - 2k_{\text{LL}} [\text{LOO}\cdot]_{\text{IH}=0}^2 = 0 \quad (9)$$

$$\left(\frac{d[\text{LOO}\cdot]}{dt} \right)_{\text{IH}\neq 0} = R_i - 2k_{\text{LL}} [\text{LOO}\cdot]_{\text{IH}\neq 0}^2 - n \cdot k_i [\text{LOO}\cdot]_{\text{IH}\neq 0} [\text{IH}] = 0 \quad (10)$$

da cui

$$[\text{LOO}\cdot]_{\text{IH}=0} = \sqrt{\frac{R_i}{2k_{\text{LL}}}} \quad (11)$$

$$[\text{LOO}\cdot]_{\text{IH}\neq 0} = \frac{\sqrt{(n \cdot k_i \cdot [\text{IH}])^2 + 8R_i \cdot k_{\text{LL}} - n \cdot k_i \cdot [\text{IH}]}}{4k_{\text{LL}}} \quad (12)$$

dove $[\text{LOO}\cdot]_{\text{IH}=0}$ e $[\text{LOO}\cdot]_{\text{IH}\neq 0}$ rappresentano rispettivamente le concentrazioni dei radicali perossidici dell'acido linoleico allo stato stazionario in assenza e presenza di antiossidante.

3.1.1. Variazione della velocità di consumo di ossigeno durante il processo di perossidazione lipidica

Il processo di perossidazione lipidica si accompagna ad un consumo di ossigeno (reazioni (1') e (3)) che può essere valutato mediante una misura cronoamperometrica. La registrazione di tale consumo, consente di ottenere tracciati ossigrafici come quelli mostrati in Figura 3.1.

In un sistema micellare, in presenza di acido linoleico ed in assenza di inibitore, l'aggiunta dell'iniziatore radicalico (ABIP) determina un consumo costante dell'ossigeno (α_0') disciolto in soluzione, fino alla sua completa scomparsa (Figura 3.1, curva a). L'introduzione nel sistema di un inibitore come l'acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico (Trolox), un derivato sintetico e idrosolubile della vitamina E, porta ad una forte riduzione della velocità di scomparsa dell'ossigeno (α_t') (Figura 3.1, curva b), dovuta all'azione di inibizione della perossidazione dell'acido linoleico. La velocità α_t' dipende dalla concentrazione di inibitore introdotta e nel caso in cui la perossidazione sia completamente inibita, come avviene ad alte concentrazioni di IH, α_t' tenderà ad assumere il valore di R_0 . Con la progressiva diminuzione della concentrazione dell'inibitore, che scompare secondo le reazioni (5) e (5') con i radicali

LOO^\bullet , la velocità di consumo di ossigeno tenderà ad aumentare significativamente nel tempo fino al valore iniziale, α_0' : si tratta di un processo di primo ordine rispetto alla concentrazione di IH.

L'attività di un inibitore, che blocca i radicali della catena perossidica, è caratterizzata da due parametri: la capacità (n), ossia il numero di radicali bloccati da una molecola di inibitore e dai suoi prodotti di reazione, e l'efficienza (IC_{50}^{-1}), che rappresenta il reciproco della concentrazione di IH che dimezza la velocità di consumo di ossigeno dovuta alla perossidazione dell'acido linoleico, o meglio la quantità di inibitore che dimezza la concentrazione allo stato stazionario dei radicali LOO^\bullet .

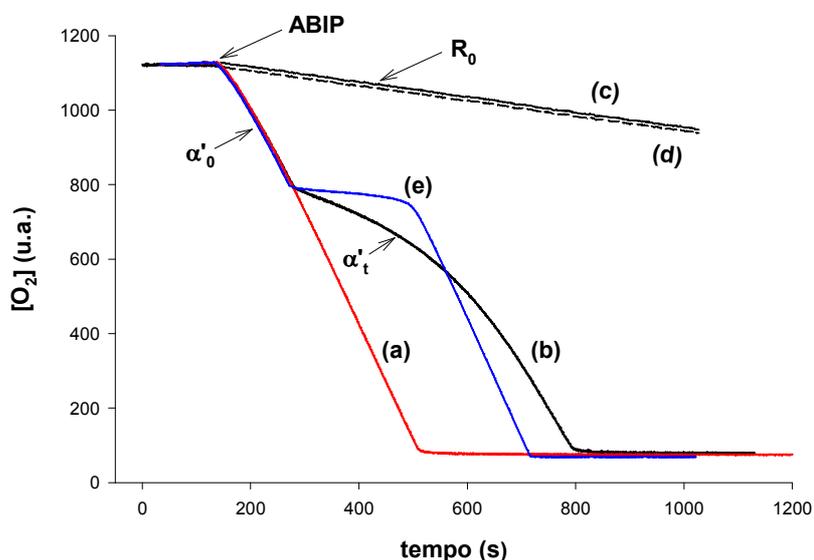


Figura 3.1. Tracciato ossigrafico rappresentativo del processo di perossidazione dell'acido linoleico in presenza ed in assenza di un antiossidante. La perossidazione di LH 2 mM è stata condotta a 37°C mediante la decomposizione di ABIP 4 mM nel sistema micellare DCA 5 mM, LG 0.5 mM, in assenza di antiossidante (curva a), in presenza di un antiossidante idrosolubile (trolox 3 μM , curva b) e in presenza di un antiossidante liposolubile (α -tocoferolo 2 μM , curva e). La curva c rappresenta il tracciato ossigrafico ottenuto durante la decomposizione di ABIP 4 mM nel sistema micellare non contenente LH; curva d, stesse condizioni curva c, in presenza di trolox 10 μM . Il sistema micellare è stato preparato in tampone fosfato 20 mM, NaCl 110 mM a pH 7.4.

L'esperimento condotto in assenza di acido linoleico e di inibitore consente di ottenere sperimentalmente il valore di R_0 , cioè la velocità di scomparsa dell'ossigeno che accompagna la formazione dei soli radicali AOO^\bullet , in accordo con la reazione (1') (Figura 3.1, curva c). Se in tali condizioni si introduce un inibitore, non si registrano variazioni nella velocità di scomparsa dell'ossigeno (Figura 3.1, curva d), indicando che i radicali A^\bullet , prodotti per decomposizione termica dell'azo-composto secondo la

reazione (1), reagiscono più rapidamente con l'ossigeno di quanto non facciano con l'inibitore.

L'aggiunta di un inibitore liposolubile, come l' α -tocoferolo, al sistema micellare in cui si conduce il processo di perossidazione lipidica, comporta un'inibizione totale della catena perossidica dell'acido linoleico (Figura 3.1, curva e) e tale processo appare indipendente dalla concentrazione dell'inibitore, praticamente fino al suo completo consumo. Si tratta di un processo di ordine zero rispetto alla concentrazione di IH.

3.1.2. Possibili errori nella valutazione dei valori di n e IC_{50}

Nella stima dei valori di n e IC_{50} si possono commettere degli errori di tipo metodologico.

Come già descritto in letteratura [Barclay *et al.*, 1984; Pryor *et al.*, 1988; Pryor *et al.*, 1993], alcuni autori hanno trattato la misura dell'efficienza e della capacità di inibire la perossidazione lipidica di molti inibitori e hanno ottenuto tracciati ossigrafici simili a quelli mostrati in Figura 3.2.

Il valore di n può essere calcolato dalla durata del processo di inibizione (lag time), ovvero dal lasso di tempo che intercorre dal momento dell'aggiunta dell'inibitore fino all'esaurimento del suo effetto, secondo la seguente equazione:

$$n = R_i \cdot LT / [IH]_0 \quad (13)$$

dove $[IH]_0$ è la concentrazione iniziale di antiossidante. Questa equazione, in cui il lag time (LT) è correlato linearmente con la concentrazione di inibitore introdotto nel sistema, è valida solo nel caso di una reazione di ordine zero rispetto alla concentrazione dell'inibitore introdotto.

Esistono, quindi, due problemi sostanziali nella valutazione del lag time: determinare l'esatto punto finale e valutare LT in funzione della variazione dell'efficienza di inibizione della perossidazione lipidica.

Come si vede in Figura 3.2, in cui si è adottato il procedimento usualmente riportato in letteratura per il calcolo di LT, il valore di n , calcolato secondo l'equazione (13), dipende dalla lunghezza del lag time (LT), misurato dal punto di aggiunta dell'inibitore all'intersezione delle tangenti al tracciato ossigrafico (α_t') all'inizio e alla fine del processo di inibizione. Il lag time è fortemente correlato alla pendenza del

tracciato ossigrafico nella parte finale: quanto più la velocità di consumo dell'ossigeno α_t' si avvicinerà al valore di α_0' tanto maggiore sarà il lag time e quindi n . Questa velocità è influenzata da diversi fattori: l'iniezione ritardata dell'inibitore, la concentrazione iniziale dell'ossigeno e la concentrazione di inibitore. Il caso ideale, in cui è possibile utilizzare l'equazione (13) per calcolare la capacità, è quello del α -tocoferolo, mostrato in Figura 3.1, curva e. In questo caso l'inibizione avviene secondo un processo di ordine zero rispetto alla concentrazione di IH. Infatti, l'inibitore reagisce con tutti i radicali LOO \cdot prodotti indipendentemente dalla sua concentrazione.

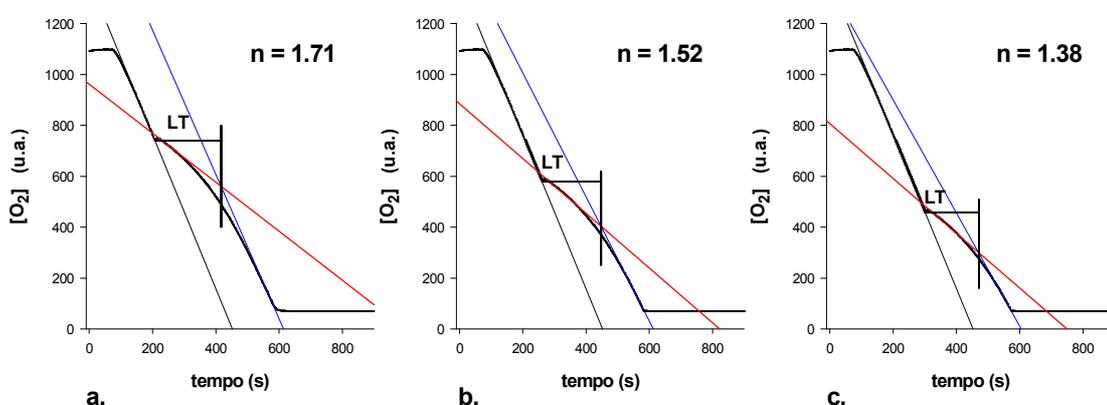


Figura 3.2. Inibizione del processo di perossidazione dell'acido linoleico: dipendenza del valore di n dalla pendenza del tracciato ossigrafico nella parte finale. Gli esperimenti sono stati condotti aggiungendo trolox 2.3 μ M a tempi differenti rispetto all'inizio della perossidazione lipidica. Sono mostrati i valori di n calcolati dal lag time (LT) secondo la procedura usuale riportata in letteratura: si ottiene il più alto valore di LT quando la pendenza α_t' si avvicina al valore di α_0' (si confronti **a** con **b** e **c**). Condizioni sperimentali: DCA 5 mM, LG 0.5 mM, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C.

Per quanto riguarda il valore di IC_{50}^{-1} , come descritto in letteratura, viene ricavato dalla misura della pendenza del tracciato ossigrafico dopo l'aggiunta dell'inibitore. Tale procedura di calcolo si basa su uno schema di equazioni semplificato [Pryor *et al.*, 1988; Pryor *et al.*, 1993] che assume che tutti i radicali perossidici LOO \cdot generati reagiscano con l'inibitore, non tenendo conto di quelli che scompaiono per mutua interazione. In realtà, poiché il processo di inibizione è di primo ordine rispetto alla concentrazione di IH, bisogna considerare che con la scomparsa nel tempo dell'inibitore diminuisce il numero di radicali LOO \cdot bloccati da IH mentre aumenta il numero di quelli scompaiono per mutua interazione. Trascurando questo effetto si rischia di sottostimare i valori di n e IC_{50}^{-1} .

3.1.3. Analisi cinetica

Le relazioni ottenute sulla base della trattazione cinetica permettono di calcolare simultaneamente i valori di capacità (n) ed efficienza (IC_{50}^{-1}) di inibizione della perossidazione lipidica da un singolo tracciato ossigrafico.

Relazione tra concentrazione di antiossidante e velocità di consumo di ossigeno

Dalle equazioni (7) e (8) si ottiene la seguente espressione

$$\frac{\alpha_t}{\alpha_0} = \frac{k_p [\text{LOO}\cdot]_{\text{IH}\neq 0} [\text{LH}]}{k_p [\text{LOO}\cdot]_{\text{IH}=0} [\text{LH}]} = \frac{[\text{LOO}\cdot]_{\text{IH}\neq 0}}{[\text{LOO}\cdot]_{\text{IH}=0}} = x_t \quad (14)$$

dove x_t è il rapporto tra il consumo di ossigeno dovuto alla perossidazione dell'acido linoleico in presenza dell'antiossidante al tempo t e la velocità del processo di perossidazione non inibito, α_0 .

Introducendo le concentrazioni allo stato stazionario dei radicali $\text{LOO}\cdot$ (equazioni (11) e (12)) si ricava

$$x_t = \sqrt{\frac{(n \cdot k_i \cdot [\text{IH}])^2}{8k_{\text{LL}}R_i} + 1} - \frac{n \cdot k_i \cdot [\text{IH}]}{2\sqrt{2k_{\text{LL}}R_i}} \quad (15)$$

Ponendo z_t la concentrazione di IH al tempo t e $q = k_i / \sqrt{k_{\text{LL}}}$, l'equazione (15) può essere scritta come segue

$$x_t = \sqrt{\frac{(n \cdot q \cdot z_t)^2}{8R_i} + 1} - \frac{n \cdot q \cdot z_t}{\sqrt{8R_i}}$$

che dopo rielaborazione diventa

$$\left(x_t + \frac{n \cdot q \cdot z_t}{\sqrt{8R_i}} \right)^2 = \left(\sqrt{\frac{(n \cdot q \cdot z_t)^2}{8R_i} + 1} \right)^2$$

da cui si può facilmente ottenere

$$z_t = \left(\frac{1}{x_t} - x_t \right) \frac{\sqrt{2R_i}}{n \cdot q} \quad (16)$$

Il valore di IC_{50} si ottiene ponendo nell'equazione (16) $x_t = 0.5$

$$z_{x_t=0.5} = IC_{50} = 1.5 \frac{\sqrt{2R_i}}{n \cdot q} \quad (17)$$

Relazione tra la frazione η di radicali LOO^\bullet bloccati da IH e la velocità di consumo di ossigeno

La frazione η di radicali LOO^\bullet che scompaiono grazie alla reazione con l'inibitore viene definita anche rendimento

$$\eta = \frac{\text{velocità di scomparsa di } LOO^\bullet \text{ nella reazione con } IH}{\text{velocità di scomparsa di } LOO^\bullet \text{ nella reazione con } IH + \text{velocità di scomparsa di } LOO^\bullet \text{ nella reazione con se stesso}}$$

Dallo schema cinetico, reazioni (4), (5) e (5'), si ottiene

$$\eta = \frac{n \cdot k_i [LOO^\bullet]_{IH \neq 0} [IH]}{n \cdot k_i [LOO^\bullet]_{IH \neq 0} [IH] + 2k_{LL} [LOO^\bullet]_{IH \neq 0}^2}$$

$$\eta = \frac{1}{1 + \frac{2k_{LL} [LOO^\bullet]_{IH \neq 0}}{n \cdot k_i [IH]}}$$

Introducendo la concentrazione dei radicali perossidici LOO^\bullet allo stato stazionario (equazione (12)) si ha

$$\eta = \frac{1}{1 + \frac{\sqrt{(n \cdot k_i [IH]^2) + 8R_i \cdot k_{LL}} - n \cdot k_i [IH]}{2n \cdot k_i [IH]}}$$

$$\eta = \frac{2}{1 + \sqrt{1 + \frac{8R_i \cdot k_{LL}}{(n \cdot k_i [IH])^2}}}$$

Ricordando che $z_t = [IH]_t$ e $q = k_i / \sqrt{k_{LL}}$ si può scrivere

$$\eta = \frac{2}{1 + \sqrt{1 + \frac{8R_i}{n^2 q^2 z_t^2}}}$$

e ricordando l'equazione (16) si ottiene

$$\eta = \frac{2}{1 + \sqrt{1 + \frac{4x_t^2}{(1-x_t^2)^2}}}$$

da cui

$$\eta = 1 - x_t^2 \tag{18}$$

che mostra la dipendenza di η dalla velocità di consumo di ossigeno.

Relazione tra la velocità di consumo di ossigeno ed il tempo

Se teniamo conto del rendimento nell'equazione (13) e assumiamo che η , n e R_i siano costanti nel tempo dt , la relazione tra dt e la diminuzione dz della concentrazione di antiossidante dovuta alla reazione con i radicali LOO^{\bullet} è

$$dt = \frac{n}{R_i \cdot \eta} dz = \frac{n}{R_i} \cdot \frac{1}{(1-x^2)} dz \quad (19)$$

Differenziando l'equazione (16) risulta

$$dz = f(x)dx = -\frac{\sqrt{2R_i}}{n \cdot q} \left(1 + \frac{1}{x^2} \right) dx$$

e sostituendo dz nell'equazione (19) si ottiene

$$dt = -\frac{1}{q} \cdot \sqrt{\frac{2}{R_i}} \cdot \left(\frac{1}{1-x^2} + \frac{1}{x^2(1-x^2)} \right) dx$$

Integrando la precedente equazione nell'intervallo t_a-t , dove $t > t_a > t_j$ e dove t_j è il tempo d'iniezione dell'antiossidante IH, si ottiene

$$\left(\ln \frac{1+x_t}{1-x_t} - \frac{1}{x_t} \right) - \left(\ln \frac{1+x_a}{1-x_a} - \frac{1}{x_a} \right) = C(t-t_a)$$

da cui risulta

$$\left(\frac{1}{x_a} - \frac{1}{x_t} \right) + \ln \frac{(1-x_a)}{(1+x_a)} + \ln \frac{(1+x_t)}{(1-x_t)} = C(t-t_a) = F(x_t) \quad (20)$$

dove x_a e x_t sono i valori del rapporto $x = \alpha_t / \alpha_0$ rispettivamente al tempo t_a e t e $C = q\sqrt{R_i/2}$. Il tempo t_a è scelto il più vicino possibile a t_j , escludendo la parte del tracciato ossigrafico che mostra una perturbazione dovuta all'iniezione dell'antiossidante.

L'equazione (20) mostra la relazione lineare che esiste tra $F(x_t)$ ed il tempo e permette di calcolare direttamente C . Questa operazione è resa possibile grazie all'introduzione del valore di x_a e della serie di valori x_t ricavati dalla pendenza del tracciato ossigrafico ai vari tempi t , presi nell'intervallo t_a-t_f . Con il termine t_f è indicato l'ultimo valore di tempo considerato.

Estrapolazione del valore x_j e calcolo dei parametri n e IC_{50}

Il tracciato ossigrafico generalmente risulta perturbato in seguito all'iniezione dell'antiossidante IH nella cella di reazione, rendendo difficoltosa la misura della pendenza del tracciato in prossimità del tempo d'iniezione t_j . La perturbazione può essere legata a differenze nella concentrazione di ossigeno tra soluzione iniettata e il sistema di misura (solitamente $[O_2]_{\text{soluzione iniettata}} > [O_2]_{\text{sistema di misura}}$) e alle cinetiche di distribuzione dell'antiossidante tra fase acquosa e micellare, oltre al fatto che la concentrazione del radicale LOO \cdot deve raggiungere un nuovo stato stazionario determinato dall'aggiunta dell'inibitore. Per questo motivo, invece di misurare x_j al tempo d'iniezione t_j , abbiamo preferito ricavare questo valore in accordo con l'equazione (20) riscritta come segue, dopo la sostituzione di t e x_t rispettivamente con t_j e x_j

$$\left(\frac{1}{x_j}\right) + \ln\left(\frac{1-x_j}{1+x_j}\right) = B_j \quad (21)$$

Il valore B_j è ricavato dai dati sperimentali in accordo con la seguente equazione ottenuta dall'equazione (20)

$$B_j = C(t_a - t_j) + \frac{1}{x_a} + \ln\left(\frac{1-x_a}{1+x_a}\right) \quad (22)$$

Il valore x_j , calcolato per estrapolazione, permette di ottenere n a partire dall'equazione (16), così riscritta

$$n = \left(\frac{1}{x_j} - x_j\right) \frac{\sqrt{2R_i}}{z_j \cdot q} = \left(\frac{1}{x_j} - x_j\right) \frac{R_i}{z_j \cdot C} \quad (23)$$

dove la concentrazione z_j di IH al tempo d'iniezione è nota. Sulla base del valore calcolato di n ed essendo $C = q\sqrt{R_i/2}$, si ricava il parametro IC_{50} , in accordo con l'equazione (17), modificata come segue

$$IC_{50} = 1.5 \frac{R_i}{n \cdot C} \quad (24)$$

3.1.4. Procedura di calcolo

Utilizzando le equazioni ottenute dall'analisi cinetica si sono calcolati i valori di C , x_j , n e IC_{50} mediante la seguente procedura.

Calcolo del valore C

A partire da un tipico tracciato ossigrafico sperimentale, come quello mostrato in Figura 3.3, si calcolano le velocità di consumo di ossigeno α'_t , e quindi i corrispondenti valori di x_t , ai vari tempi t usando un software sviluppato nel nostro laboratorio. Mediante questo software si misura la pendenza del tracciato ossigrafico entro i limiti d'integrazione t_a e t_f (Figura 3.3a). Una volta introdotti i valori di x_t nell'equazione (20), si ricava il valore di C dalla pendenza della retta che correla $F(x_t)$ con il tempo (Figura 3.3b). Nel caso specifico rappresentato, in cui si mostra l'inibizione della perossidazione dell'acido linoleico da parte del trolox, il coefficiente di regressione lineare R^2 è > 0.99 . La stima di C è indipendente dai limiti d'integrazione t_a e t_f utilizzati nell'equazione (20) (vedi Tabella 1).

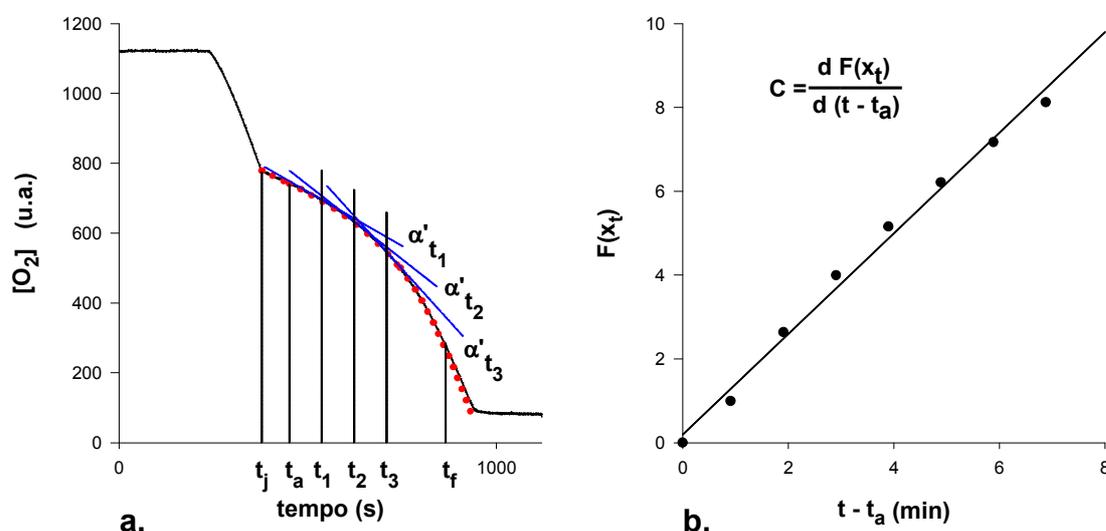


Figura 3.3. Procedura di calcolo e conferma delle equazioni cinetiche. (a) Il tracciato ossigrafico sperimentale di inibizione della perossidazione di LH da parte del trolox $4.1 \mu\text{M}$ (linea continua) è stato ricostruito sulla base dell'equazione (20) (pallini) usando il valore di C calcolato. Le pendenze α'_t ai vari tempi t sono state misurate nell'intervallo tra t_a e t_f , dove t_f indica l'ultimo tempo considerato. (b) Relazione lineare esistente tra $F(x_t)$ e tempo; il valore di C è calcolato dalla pendenza del grafico. Condizioni sperimentali: DCA 5 mM, LG 0.5 mM, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C .

I valori migliori e più attendibili di C , n e IC_{50}^{-1} sono stati ottenuti scegliendo t_a il più vicino possibile a t_j , escludendo la regione del tracciato ossigrafico interessata da perturbazione e optando per un intervallo di tempo il più ampio possibile. Inoltre, si è

evitato di scegliere t_f in corrispondenza di concentrazioni di ossigeno $\leq 0.1[O_2]_0$, dove $[O_2]_0$ è la concentrazione iniziale di ossigeno.

Stima di x_j

Una volta calcolato B_j in accordo con eq. (22), si può ottenere il valore di x_j dall'equazione (21), un'equazione trascendentale che non può essere risolta dal punto di vista algebrico; x_j deve, infatti, essere stimato mediante approssimazione numerica, assegnando a x_j tutti i valori x_i ($x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$) nell'intervallo compreso tra 0.001 e 0.999 e calcolando i corrispondenti valori di B_i ($B_1, B_2, B_3, \dots, B_n$). Questa operazione può essere fatta molto semplicemente e rapidamente utilizzando la Tabella 1A (Appendice) dove sono riportati tutti i valori di x_i e i corrispondenti valori di B_i . La migliore approssimazione di x_j si ottiene quando x_i ci permette di avere $B_i \approx B_j$.

Calcolo dei parametri n e IC_{50}

I parametri n e IC_{50} sono stati calcolati introducendo i valori di x_j e C così ottenuti rispettivamente nelle equazioni (23) e (24).

Tabella 1. Dipendenza dei valori di C , n e IC_{50}^{-1} dai limiti d'integrazione.

t_a (min)	t_f (min)	x_f	C (min^{-1})	R^2	n	IC_{50}^{-1} (μM^{-1})
<u>0.5</u>	<u>5.9</u>	<u>0.86</u>	<u>0.912</u>	<u>0.998</u>	<u>2.01</u>	<u>1.081</u>
<u>1.0</u>	<u>5.9</u>	<u>0.86</u>	<u>0.889</u>	<u>0.998</u>	<u>2.00</u>	<u>1.052</u>
1.4	5.9	0.86	0.885	0.999	2.00	1.052
1.9	5.9	0.86	0.878	0.999	2.00	1.041
<u>0.5</u>	<u>4.4</u>	<u>0.65</u>	<u>0.936</u>	<u>0.996</u>	<u>1.97</u>	<u>1.094</u>
<u>0.5</u>	<u>4.9</u>	<u>0.72</u>	<u>0.920</u>	<u>0.997</u>	<u>1.98</u>	<u>1.076</u>
<u>0.5</u>	<u>5.4</u>	<u>0.80</u>	<u>0.915</u>	<u>0.998</u>	<u>1.98</u>	<u>1.076</u>
1.0	4.4	0.65	0.900	0.995	1.99	1.058
1.0	4.9	0.72	0.888	0.996	2.00	1.052
1.0	5.4	0.80	0.889	0.998	2.00	1.052
1.4	4.4	0.65	0.896	0.997	1.99	1.058
1.4	4.9	0.72	0.881	0.998	2.00	1.041
1.4	5.4	0.80	0.883	0.999	2.00	1.041
1.9	4.4	0.65	0.882	0.995	2.00	1.041
1.9	4.9	0.72	0.867	0.997	2.01	1.033
1.9	5.4	0.80	0.874	0.998	2.00	1.029

I parametri C , n e IC_{50}^{-1} sono stati calcolati tutti dallo stesso tracciato ossigrafico d'inibizione della perossidazione lipidica per azione di trolox 2.3 μM , scegliendo diversi valori di t_a e t_f . I valori di riferimento, corrispondenti al più ampio intervallo d'integrazione, sono sottolineati; in corsivo sono indicati i parametri ottenuti ponendo t_a a meno di un minuto da t_f . I valori di R^2 sono riferiti al calcolo di C . I valori di α_t sono stati calcolati ogni 30 secondi. Condizioni sperimentali: DCA 5 mM, LG 0.5 mM, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C.

3.1.5. Conferma della validità delle equazioni cinetiche

Sostituendo nelle equazioni (21) e (22) t_j e x_j rispettivamente con t_i e x_i e utilizzando il valore di C calcolato dal tracciato sperimentale, è possibile ottenere il valore x_i e quindi i valori di α_i e α_i' ad ogni tempo t_i . Di conseguenza, si può realizzare un tracciato ossigrafico teorico che, come mostrato in Figura 3.3a, ricalca fedelmente il corrispondente tracciato sperimentale, dimostrando la bontà del modello cinetico e della procedura di calcolo da noi adottata. Inoltre, il valore di n , calcolato con il metodo da noi proposto, è indipendente dalla pendenza della parte finale del tracciato, diversamente da quanto accade se si ricava tale valore dalla durata del periodo d'inibizione (vedi Figura 3.4).

I valori di t_a e t_f possono essere scelti arbitrariamente entro i limiti appena discussi. Infatti, quando t_a e t_f sono entro l'intervallo d'integrazione più ampio che si possa scegliere, i parametri C , n e IC_{50}^{-1} così misurati deviano $< 2.5\%$ dai corrispondenti valori calcolati utilizzando l'intervallo di tempo maggiore possibile. Invece, considerando t_a vicino a t_j (meno di un minuto) questi parametri sono misurati con un errore relativamente più alto ($\pm 5\%$) (Tabella 1).

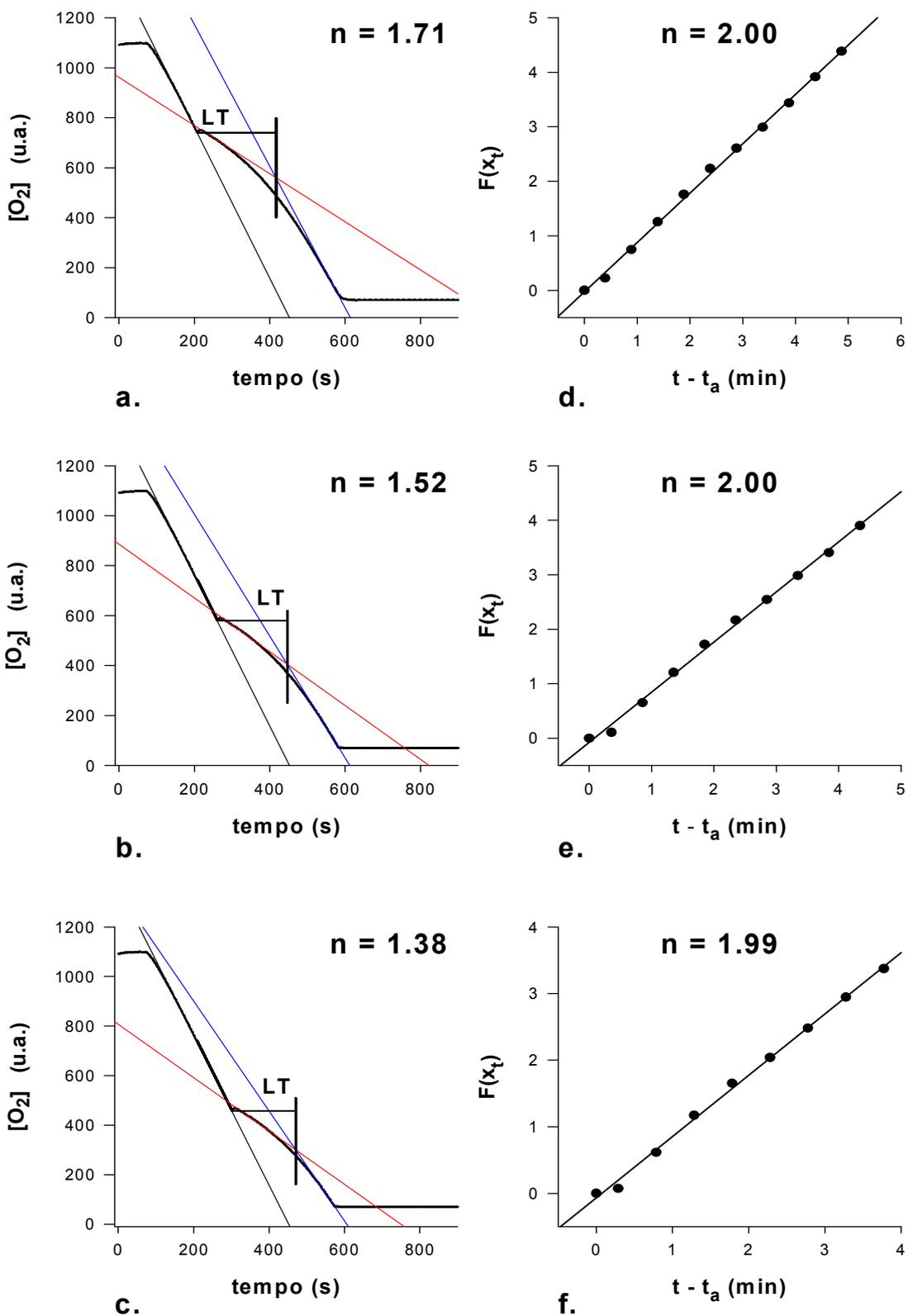


Figura 3.4. Inibizione della perossidazione lipidica: calcolo del valore n . I valori di n calcolati dal lag time (a, b, c), in accordo con la procedura standard, sono messi a confronto con quelli calcolati applicando il metodo da noi proposto, dopo aver ottenuto il parametro C grazie alla relazione lineare esistente tra $F(x_t)$ e tempo (d, e, f). Condizioni sperimentali: DCA 5 mM, LG 0.5 mM, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C.

3.1.6. Processo di perossidazione lipidica in un sistema bifasico

Per avere un'indicazione della dipendenza della perossidazione lipidica dalla fase acquosa e micellare di generazione dei radicali, sono stati condotti alcuni esperimenti d'inibizione della perossidazione lipidica nel sistema micellare costituito da sodio-dodecilsolfato e acido linoleico (SDS-LH), in presenza di un iniziatore radicalico idrosolubile (AAPH) e di uno liposolubile (AIBN). Entrambi gli iniziatori radicalici presentano costanti di decomposizione molto minori di quella dell'ABIP ($k_d = 2.44 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ a 37°C): AAPH presenta a 37°C una k_d pari a $8.2 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ [Niki, 1990], mentre AIBN ha una $k_d = 2.2 \cdot 10^{-6} \text{ min}^{-1}$ a 50°C , misurata in benzene¹. Per ottenere, quindi, velocità di perossidazione lipidica comparabili a quelle raggiunte con ABIP, gli esperimenti sono stati condotti operando con AAPH 16 mM a 37°C , mentre quelli con AIBN sono stati eseguiti a 45°C con una concentrazione 5 mM di iniziatore.

Per avere informazioni sul comportamento di inibitori aventi diversa lipofilicità, sono stati utilizzati trolox e α -tocoferolo come modelli di antiossidanti solubili rispettivamente nelle fasi acquosa e lipidica. Il trolox, infatti, non è altro che la forma idrosolubile del α -tocoferolo, che è stato privato della coda alifatica mediante la quale riesce a localizzarsi nella fase micellare.

I tracciati ossigrafici del trolox sono stati analizzati sulla base del metodo proposto e si sono ottenuti valori di q simili, entro l'errore sperimentale, utilizzando come iniziatore AAPH o AIBN. L'inibizione della perossidazione di LH per azione del α -tocoferolo è risultata essere anche in questo caso un processo di ordine zero rispetto alla concentrazione di antiossidante, indipendentemente dal tipo di iniziatore usato. Questi risultati si possono spiegare considerando il momento di dipolo dei radicali LOO^\bullet . Infatti, le teste reattive dei radicali perossidici si localizzano all'interfaccia micella-acqua dove la concentrazione di α -tocoferolo, solubile in fase lipidica, è relativamente alta [Buettner, 1993], mentre la concentrazione di trolox, solubile in acqua, è relativamente bassa. Tali differenze in termini di concentrazione degli antiossidanti a livello dell'interfaccia, dove si trovano le teste polari dei radicali LOO^\bullet , possono spiegare l'ordine di reazione, motivo per cui il processo d'inibizione per azione del α -tocoferolo è di ordine zero rispetto alla concentrazione d'inibitore, mentre per azione del trolox è di primo ordine.

¹ Da catalogo Sigma-Aldrich, www.sigmaaldrich.com/aldrich/brochure/al_pp_initiators.

Per quanto riguarda la reazione tra acido linoleico e teste reattive dei radicali perossidici (AOO^\bullet o LOO^\bullet) presenti all'interfaccia, considerando la lunga emivita dei radicali LOO^\bullet , il numero di molecole di LH per micella e la lunghezza della catena cinetica, si può ipotizzare che le reazioni di propagazione avvengano tra molecole di LH e radicali perossidici nella fase acquosa, al di fuori delle micelle, in funzione del momento di dipolo e delle rapide dinamiche del sistema [Patist *et al.*, 2001]. Infatti, le micelle sono in equilibrio dinamico con i monomeri del tensioattivo e dell'acido linoleico presenti in soluzione, che si scambiano continuamente con le molecole in micella.

3.2. APPLICAZIONE DEL MODELLO CINETICO E DEL METODO DI CALCOLO AD ANTIOSSIDANTI PURI

3.2.1. Scelta del sistema micellare

Al fine di superare i problemi mostrati da alcune classi di antiossidanti connessi alla natura del sistema micellare, come nel caso dell' SDS o Triton X-100, abbiamo sperimentato vari tensioattivi. Sono stati testati vari tensioattivi cationici, neutri e anionici, tra cui i sali biliari, come l'acido colico, l'acido taurocolico e l'acido deossicolico (DCA), a varie concentrazioni. I sali biliari sono risultati essere particolarmente adatti a costituire il sistema micellare in cui eseguire le prove di attività antiossidante. In generale, i problemi osservati per alcune classi di antiossidanti in SDS-LH (mancanza di LT) o in metil linoleato-Triton X-100 (continuo aumento dell'inibizione con il tempo dopo l'iniezione dell'antiossidante) sono stati ovviati. Tra i sistemi micellari testati abbiamo scelto un sistema misto costituito da acido deossicolico, mono-laurilglicerolo e acido linoleico (DCA-LG-LH), la cui composizione è stata suggerita sulla base delle condizioni presenti nell'intestino superiore durante digestione ed assorbimento dei grassi. In accordo con i diagrammi di equilibrio di fase [Staggers *et al.*, 1990; Gustafsson *et al.*, 1999], il sistema lipidico ternario scelto genera micelle stabili con un raggio idrodinamico massimo di 40 Å nelle condizioni fisiologiche dell'intestino superiore. In questa regione del corpo, la presenza di lipidi di varia natura emulsionati in sistemi micellari, la concentrazione di ossigeno molecolare sufficientemente alta [Hillman *et al.*, 1993; Iwao *et al.*, 1995; He *et al.*, 1999] e la presenza di specie proossidanti di origine alimentare (Fe, eme-derivati, perossidi...) costituiscono le condizioni per iniziare e sostenere la perossidazione lipidica [Goupy *et al.*, 2007; Roginsky *et al.*, 2007]. Va sottolineato che, in accordo con la Figura 3.1, la velocità di perossidazione lipidica risulta essere indipendente dalla concentrazione di ossigeno. In effetti, come già sostenuto da altri autori, la concentrazione di ossigeno nel tratto digestivo umano e di maiale, in particolare nei fluidi gastrici e nel duodeno, si avvicina a quella di saturazione dell'aria [He *et al.*, 1999; Kanner & Lapidot, 2001; Hillman *et al.*, 1993].

3.2.2. Attività antiossidante di composti puri

Nel sistema micellare appena descritto, costituito da DCA-LG-LH, è stata testata l'attività antiossidante di diversi composti come inibitori della perossidazione lipidica. Sono stati testati gli antiossidanti più rappresentativi delle principali classi di fenoli di origine vegetale, tra cui i derivati dell'acido benzoico e dell'acido idrossicinnamico, i flavanoli, i flavonoli e gli antociani. Nella Tabella 2 sono riportati i valori di n , IC_{50}^{-1} , $q = k_i / \sqrt{k_{LL}}$ ed il rapporto q / q_{trolox} . Questo ultimo rapporto corrisponde ai valori relativi di k_i rispetto alla costante k_i del trolox per i vari antiossidanti. Da questa Tabella appare chiaro che non vi è alcuna correlazione tra i valori di q e n , come era facile prevedere.

Tabella 2. Valori di n , IC_{50}^{-1} , $q = k_i / \sqrt{k_{LL}}$ dei vari antiossidanti calcolati in accordo con il metodo proposto.

	IC_{50}^{-1} (μM^{-1})	n	$q \left(\frac{k_i}{\sqrt{k_{LL}}} \right)$ ($\mu M^{-1/2} \text{ min}^{-1/2}$)	$q / q_{trolox} = k_i / k_{i \text{ trolox}}$
Trolox	1.09 ± 0.02	2.00 ± 0.01	1.23 ± 0.02	1.00 ± 0.02
BHT	8.06 ± 0.49	2.39 ± 0.04	7.62 ± 0.34	6.20 ± 0.05
Acido caffeico	5.46 ± 0.65	10.6 ± 0.76	1.18 ± 0.17	0.96 ± 0.15
Acido clorogenico	6.49 ± 0.45	11.0 ± 1.12	1.34 ± 0.11	1.09 ± 0.08
Acido cicorico	13.5 ± 3.47	21.8 ± 0.30	1.47 ± 0.41	1.19 ± 0.30
Acido ferulico	0.66 ± 0.03	5.82 ± 0.47	0.26 ± 0.03	0.21 ± 0.13
Acido ellagico	12.2 ± 1.78	4.40 ± 0.42	5.69 ± 1.08	4.63 ± 0.21
Acido gallico	1.16 ± 0.14	2.50 ± 0.36	0.95 ± 0.13	0.77 ± 0.15
Acido protocatecuico	0.89 ± 0.12	4.48 ± 0.24	0.50 ± 0.06	0.41 ± 0.12
Catechina	5.78 ± 0.35	10.7 ± 2.45	1.29 ± 0.39	1.05 ± 0.30
Quercetina	2.38 ± 0.23	1.14 ± 0.15	4.87 ± 0.60	3.96 ± 0.14
Cianidina 3-glucoside	17.8 ± 1.37	5.60 ± 0.23	7.25 ± 0.40	5.89 ± 0.07
Malvidina 3-glucoside	6.67 ± 0.44	4.01 ± 0.30	3.73 ± 0.05	3.03 ± 0.03
Petunidina 3-glucoside	11.1 ± 0.12	15.35 ± 0.35	1.65 ± 0.03	1.34 ± 0.03
Delfinidina 3-glucoside	7.14 ± 0.51	2.35 ± 0.16	7.05 ± 0.39	5.73 ± 0.07
Delfinidina	2.20 ± 0.25	2.30 ± 0.31	2.23 ± 0.49	1.81 ± 0.22

Gli esperimenti sono stati condotti nel sistema micellare DCA 5 mM, LG 0.5 mM, LH 2 mM. Per iniziare la perossidazione lipidica è stato utilizzato ABIP 4 mM. La deviazione standard è stata ottenuta da quattro esperimenti condotti a diverse concentrazioni.

Il valore di R_i utilizzato per calcolare il parametro n dei vari antiossidanti è stato ottenuto dagli esperimenti condotti con il trolox come inibitore, ponendo nell'equazione (23) n uguale a 2 [Burton & Ingold, 1981]. In particolare, nelle condizioni sperimentali in cui si sono eseguite le misure degli antiossidanti riportati in Tabella 1, tale valore risulta essere $R_i = 1.14 \pm 0.01 \mu\text{M min}^{-1}$ ed è minore del valore $R_0 = 1.60 \pm 0.07 \mu\text{M min}^{-1}$ che è stato misurato durante la decomposizione termica di ABIP 4 mM nel sistema micellare DCA-LG, in assenza di LH, come osservato in precedenza [Bedard *et al.*, 2001].

Le deviazioni standard dei parametri n e IC_{50}^{-1} riportati in Tabella 1 sono state calcolate da esperimenti condotti a quattro diverse concentrazioni di antiossidante e in genere sono inferiori al 10%.

Alcuni dei valori di $k_i / k_{i \text{ trolox}}$ riportati sono del tutto differenti da quelli misurati da altri autori in differenti condizioni sperimentali [Roginsky *et al.*, 1996], dal momento che la reattività degli antiossidanti dipende da molte variabili sperimentali, tra cui la temperatura e la composizione del sistema micellare. Infatti, i principali eventi che determinano la velocità e l'inibizione della perossidazione lipidica avvengono all'interfaccia micella-acqua [Patist *et al.*, 2001], per questo motivo il processo d'inibizione è fortemente influenzato dalla fluidità e dalla dinamica delle micelle e dalla presenza di cariche elettriche sulla superficie micellare.

I risultati riportati nelle Tabelle 1 e 2, nelle Figure 3.3 e 3.4, mostrano la validità dell'analisi cinetica descritta nel capitolo 3.1.3 e la possibilità di ottenere valori di n e IC_{50}^{-1} attendibili da una singola misura sperimentale. Per di più, esperimenti condotti a diverse concentrazioni di ABIP, tra 1 e 8 mM, hanno dimostrato che i valori q e n , calcolati mediante il metodo da noi proposto, sono indipendenti dalla velocità di generazione dei radicali perossidici (dati non mostrati).

La definitiva convalida di questo modello cinetico e delle relative equazioni è stata ottenuta eseguendo le misure in differenti sistemi micellari, oltre a quello costituito da DCA-LH-LG-ABIP finora descritto. La dipendenza lineare esistente tra $F(x_t)$ ed il tempo (equazione (20)), messa in evidenza dall'analisi dei dati sperimentali, è risultata indipendente dal sistema micellare (DCA-LH-LG, SDS-LH, CHAPS-LH) e dal tipo di antiossidante utilizzato, purché il processo d'inibizione della perossidazione lipidica sia di primo ordine rispetto alla concentrazione di antiossidante. Nelle Figure 3.5 e 3.6 sono appunto riportati due esempi del processo d'inibizione registrato in due sistemi micellari

alternativi, costituiti rispettivamente da SDS-LH-ABIP e CHAPS-LH-ABIP: la dipendenza lineare tra $F(x_t)$ e t (Figure 3.5b e 3.6b) è chiaramente rispettata e la ricostruzione teorica della curva a partire dal modello cinetico (pallini) riproduce perfettamente il dato sperimentale (linea continua)(Figure 3.5a e 3.6a).

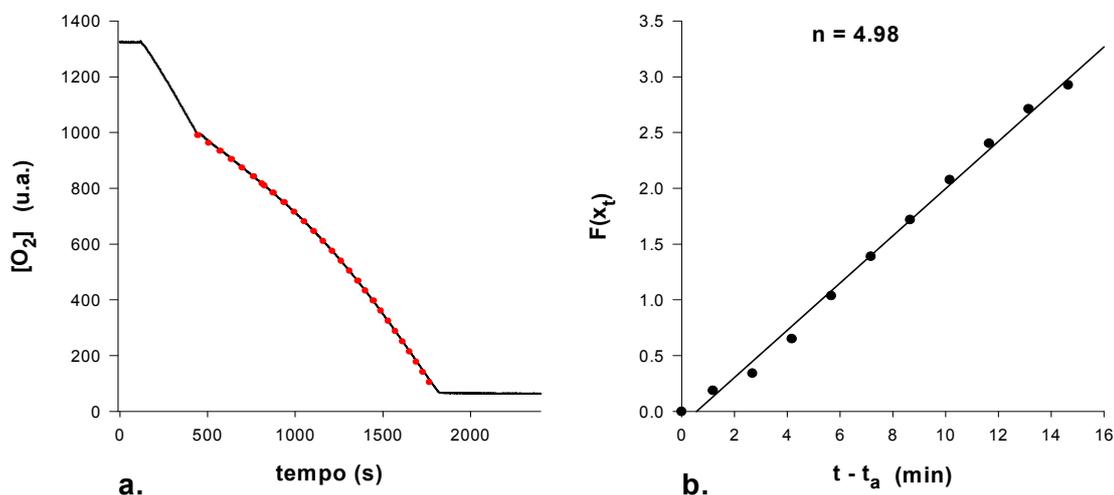


Figura 3.5. Inibizione della perossidazione lipidica nel sistema micellare SDS-LH. (a) È mostrato il tracciato ossigrafico sperimentale d'inibizione della perossidazione di LH (linea continua) per azione della cianidina 3-glucoside, aggiunta alla concentrazione $3.4 \mu\text{M}$. La ricostruzione teorica della curva (pallini) a partire dalle equazioni (21) e (22) e utilizzando il parametro sperimentale C , riproduce fedelmente la curva ossigrafica ottenuta sperimentalmente. (b) Relazione lineare esistente tra $F(x_t)$ e tempo; il valore di n è calcolato in accordo con la procedura che abbiamo proposto. Condizioni sperimentali: SDS 50 mM, LH 2.5 mM, ABIP 8 mM a 37°C .

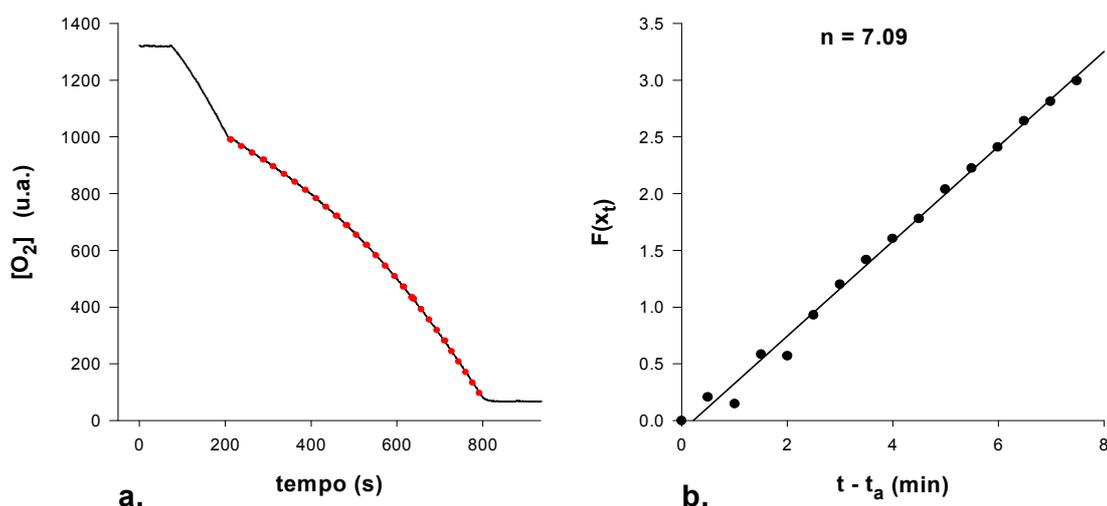


Figura 3.6. Inibizione della perossidazione lipidica nel sistema micellare CHAPS-LH. (a) È mostrato il tracciato ossigrafico sperimentale d'inibizione della perossidazione di LH (linea continua) per azione di acido clorogenico, aggiunto alla concentrazione $0.3 \mu\text{M}$. La ricostruzione teorica della curva (pallini) a partire dalle equazioni (21) e (22) e utilizzando il parametro sperimentale C , riproduce fedelmente la curva ossigrafica ottenuta sperimentalmente. (b) Relazione lineare esistente tra $F(x_t)$ e tempo; il valore di n è calcolato in accordo con la procedura che abbiamo proposto. Condizioni sperimentali: CHAPS 6 mM, LH 2 mM, ABIP 1 mM a 37°C .

3.3. APPLICAZIONE DEL MODELLO CINETICO E DEL METODO DI CALCOLO A SISTEMI COMPLESSI: ESTRATTI VEGETALI E VINO

La presenza di antiossidanti in cibi e bevande ha acquistato particolare attenzione di recente poiché studi epidemiologici hanno riportato molti effetti benefici di questi composti sulla salute, e in particolare nella protezione contro il cancro, le malattie cardiovascolari e l'invecchiamento [Liu *et al.*, 2000; Ziegler, 1991; Hollman & Katan, 1999; Serafino *et al.*, 2004]. Proprio l'aumento d'interesse verso gli antiossidanti ci ha spinto ad individuare un metodo per testare i vari aspetti della loro azione e a confrontare i risultati con quelli di altri studi [Prior *et al.*, 2005].

La maggior parte dei metodi già descritti in letteratura valuta l'attività antiossidante di estratti vegetali o di alimenti con vari tipi di reagenti, quali DPPH, reattivo di Folin-Ciocalteu, ABTS, radicali altamente reattivi come i radicali perossidici, Fe(III), Cu(II) [Bondet *et al.*, 1997; Sanchez-Moreno *et al.*, 1998; Singleton *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1993; Benzie & Szeto, 1999; Apak *et al.*, 2004]. Solo un piccolo numero di metodi stima l'efficienza dell'inibitore, ossia l'abilità dell'antiossidante nel bloccare le specie reattive [Bors *et al.*, 1984; Tubaro *et al.*, 1998] e un numero ancora più ridotto di procedure valuta simultaneamente capacità ed efficienza [Barclay *et al.*, 1984; Pryor *et al.*, 1988; Pryor *et al.*, 1993; Roginsky, 2003]. Queste procedure sono in ogni caso soggette a vari problemi che rendono difficile e a volte impossibile ottenere risultati attendibili [Zennaro *et al.*, 2007]. Infine, deve essere considerato che le condizioni sperimentali della maggioranza dei metodi proposti per testare l'attività antiossidante degli alimenti si discostano molto da quelle che si verificano nel sistema in cui gli antiossidanti agiscono, e in particolare nell'uomo.

È stato applicato il metodo di analisi sopra descritto per stimare le proprietà antiossidanti dei cibi in un sistema micellare modello ed in particolare un sistema che riproduce, per quanto possibile, condizioni vicine a quelle dell'intestino superiore [Staggers *et al.*, 1990], regione del corpo in cui non si hanno problemi di biodisponibilità e dove può effettivamente verificarsi il processo di perossidazione lipidica [Kerem *et al.*, 2006].

Per valutare le proprietà antiossidanti dei cibi sono stati calcolati, applicando le equazioni cinetiche già descritte, i seguenti parametri: PRTC (Peroxyl Radical Trapping Capacity) e PRTE (Peroxyl Radical Trapping Efficiency) equivalenti, nel caso degli

alimenti, ai parametri n e IC_{50}^{-1} riferiti ai singoli antiossidanti. In particolare, il PRTC rappresenta il numero di radicali perossidici bloccati da una data quantità di alimento (solitamente μmoli di radicali perossidici / g di alimento), mentre il PRTE è il reciproco della quantità di alimento che dimezza la concentrazione allo stato stazionario dei radicali perossidici, solitamente riportato come $(\text{g di alimento} / \text{L})^{-1}$.

3.3.1. Capacità ed efficienza di inibizione della perossidazione lipidica di alcuni antiossidanti presenti negli alimenti

Nel sistema micellare che riproduce le condizioni dell'intestino superiore, sono stati testati alcuni antiossidanti idrosolubili rappresentativi di quelli presenti in alimenti caratterizzati da buone proprietà antiossidanti. Per questi composti è stato calcolato il numero n di radicali perossidici bloccati da una molecola di IH e dai suoi prodotti di reazione, e il reciproco della concentrazione di antiossidante che dimezza la concentrazione di radicali LOO^{\bullet} allo stato stazionario (IC_{50}^{-1}). In Tabella 3 sono mostrati in parte gli stessi composti presenti in Tabella 2, per i quali, oltre ai parametri n e IC_{50}^{-1} , sono stati riportati i valori di PRTE e PRTC, a scopo di confronto con gli alimenti che li contengono, e il valore $t_{1/2}$.

Essendo $C = k_i \sqrt{R_i / 2k_{LL}}$, un parametro indipendente dalla concentrazione di antiossidante, e poiché il termine $\sqrt{R_i / 2k_{LL}}$ rappresenta la concentrazione dei radicali LOO^{\bullet} allo stato stazionario in assenza di IH (equazione (9)), C potrebbe essere considerata come la costante cinetica di pseudo-primordine del decadimento di IH in presenza di un iniziatore che genera radicali perossidici alla velocità costante R_i , quando la reazione (5) è trascurabile rispetto alla reazione (4). Per questo motivo è possibile scrivere

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{C} \quad (25)$$

Il parametro $t_{1/2}$ rappresenta l'emivita di IH.

Tabella 3. Capacità ed efficienza d'inibizione della perossidazione lipidica di alcuni antiossidanti maggiormente presenti negli alimenti.

	C (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	IC ₅₀ ⁻¹ (μM ⁻¹)	n	PRTE (L/mg)	PRTC (μmoli/mg)
Trolox	0.93 ± 0.02	0.75 ± 0.02	1.09 ± 0.02	2.00 ± 0.01	4.35	7.99
Acido caffeico	0.89 ± 0.12	0.78 ± 0.11	5.46 ± 0.65	10.6 ± 0.76	30.31	58.84
Acido clorogenico	1.01 ± 0.09	0.69 ± 0.06	6.49 ± 0.45	11.0 ± 1.12	18.32	31.05
Acido cicorico	1.11 ± 0.31	0.62 ± 0.17	13.5 ± 3.47	21.8 ± 0.30	28.46	45.96
Acido ferulico	0.20 ± 0.02	3.47 ± 0.35	0.66 ± 0.03	5.82 ± 0.47	3.40	29.97
Acido ellagico	4.27 ± 0.81	0.16 ± 0.03	12.2 ± 1.78	4.40 ± 0.42	40.37	14.56
Acido gallico	0.71 ± 0.10	0.98 ± 0.14	1.16 ± 0.14	2.50 ± 0.36	6.82	14.70
Acido protocatecuico	0.31 ± 0.06	2.24 ± 0.43	0.89 ± 0.12	4.48 ± 0.24	5.77	29.07
Catechina	0.98 ± 0.30	0.71 ± 0.22	5.78 ± 0.35	10.7 ± 2.45	19.91	36.86
Quercetina	3.65 ± 0.45	0.19 ± 0.02	2.38 ± 0.23	1.14 ± 0.15	7.04	3.37
Cianidina 3-glucoside ^{a)}	5.47 ± 0.30	0.13 ± 0.01	17.8 ± 1.37	5.60 ± 0.23	36.71	11.55
Malvidina 3-glucoside ^{a)}	2.82 ± 0.04	0.25 ± 0.01	6.67 ± 0.44	4.01 ± 0.30	12.61	7.58
Petunidina 3-glucoside ^{a)}	1.24 ± 0.02	0.56 ± 0.01	11.1 ± 0.14	15.4 ± 0.35	21.56	29.91
Delfinidina 3-glucoside ^{a)}	5.32 ± 0.30	0.13 ± 0.01	7.14 ± 0.51	2.35 ± 0.16	14.28	4.70
Delfinidina ^{a)}	1.68 ± 0.37	0.41 ± 0.09	2.20 ± 0.25	2.30 ± 0.31	6.50	6.79

Gli esperimenti sono stati condotti nel sistema micellare DCA 5 mM, LG 0.5 mM, LH 2 mM. Per iniziare la perossidazione lipidica è stato utilizzato ABIP 4 mM. La deviazione standard è stata ottenuta da quattro esperimenti condotti a diverse concentrazioni. I composti riportati sono in parte gli stessi mostrati in Tabella 2, per i quali sono stati calcolati i valori di PRTE e PRTC. Il trolox è utilizzato come composto di riferimento: dall'inibizione della catena perossidica si può calcolare il valore R_i. ^{a)} Prima dell'iniezione la soluzione di antocianina in etanolo assoluto è stata diluita in etanolo/acqua (85/15 v/v) contenente HCl 0.1 M.

In generale, nel caso di composti idrosolubili, l'inibizione della perossidazione lipidica è un processo del primo ordine rispetto alla concentrazione di antiossidante e la relazione lineare tra F(x_t) ed il tempo è rispettata (R² > 0.98), indipendentemente dal sistema micellare utilizzato e dalla fase in cui vengono generati i radicali perossidici (fase acquosa o lipidica) [Zennaro *et al.*, 2007]. Tuttavia, in alcuni casi, come per le antocianine, malgrado l'accuratezza con cui le misure sono state condotte, i valori di R² ottenuti erano < 0.98. Infatti, la correlazione tra F(x_t) e il tempo non è lineare e questo comportamento si evidenzia, in particolare, nel caso in cui si inietti la soluzione alcolica dell'antocianina direttamente nella soluzione di misura, mentre si evidenzia un comportamento lineare nel caso in cui si inietti l'antocianina solubilizzata in etanolo/acqua (85/15 v/v) contenente HCl 0.1 M. È possibile attribuire questo fenomeno al fatto che le antocianine esistono in fase acquosa in più specie molecolari, in equilibrio tra loro, la cui concentrazione relativa dipende dal pH. La preventiva incubazione delle

antocianine a pH acido porta ad una rapida trasformazione in una forma relativamente più stabile [Lapidot *et al.*, 1999], che inibisce la perossidazione lipidica secondo lo schema cinetico previsto e permette di ottenere una buona correlazione lineare tra $F(x_t)$ e il tempo.

Al fine di verificare la possibilità che avvengano reazioni tra radicali perossidici ed altre componenti fondamentali degli alimenti, è stata esaminata l'eventuale interferenza di carboidrati ed aminoacidi nelle nostre condizioni sperimentali. In particolare, si è verificato che glucosio, fruttosio, cisteina e albumina non inibiscono la perossidazione lipidica. Infatti, a concentrazioni $\gg 10^{-4}$ M di questi composti non danno variazioni significative della velocità di perossidazione, mentre le molecole antiossidanti presenti negli alimenti inibiscono in genere la perossidazione dell'acido linoleico a concentrazioni 10^{-7} - 10^{-6} M.

3.3.2. Capacità ed efficienza di inibizione della perossidazione lipidica di alcuni cibi caratterizzati dalla presenza di una significativa quantità di antiossidanti

Come già detto in precedenza, il sistema micellare e le condizioni sperimentali influenzano i valori di PRTC e PRTE [Zennaro *et al.*, 2007], motivo per cui risulta importante simulare le condizioni in cui agiscono gli antiossidanti per poter valutare nel modo più verosimile le proprietà antiossidanti dei cibi. Infatti, le misure sono state eseguite in un sistema modello che riproduce le condizioni dell'intestino superiore umano, dove la perossidazione lipidica può avvenire semplicemente [Staggers *et al.*, 1990; Hernell *et al.*, 1990], scegliendo alcuni tipi di alimenti particolarmente ricchi di antiossidanti, come il vino rosso, le mele, il radicchio e i mirtilli. I cibi presi in considerazione sono caratterizzati dalla presenza di varie classi di polifenoli con proprietà antiossidanti [Rigo *et al.*, 2000; Kanner *et al.*, 1994; Chinnici *et al.*, 2004; Tsao *et al.*, 2003; Vanzani *et al.*, 2005; Vrhovsek *et al.*, 2004; Rossetto *et al.*, 2005; Papetti *et al.*, 2002; Gazzani *et al.*, 2000; Zadernowski *et al.*, 2005].

Gli esperimenti d'inibizione della perossidazione lipidica sono stati eseguiti aggiungendo piccole quantità di alimento o di estratto al sistema micellare costituito da DCA-LG-LH. Come si può vedere nelle Figure 3.7a, 3.8a e 3.9a, la curva teorica

d'inibizione della perossidazione lipidica, costruita sulla base della trattazione cinetica, riproduce fedelmente il tracciato sperimentale di tutti i cibi testati, nello specifico le misure sono state eseguite iniettando nel sistema vino rosso, succo di mela ed estratto di radicchio. Inoltre, anche la correlazione lineare esistente tra $F(x_t)$ e tempo è chiaramente rispettata e questo è messo in evidenza dai buoni valori del coefficiente di regressione lineare ($R^2 > 0.99$) (vedi Figure 3.7b, 3.8b e 3.9b). È interessante notare che si ottengono risultati migliori con questi sistemi complessi rispetto a quelli ottenuti con i composti puri, comportamento attribuibile alla presenza di forme stabilizzate degli antiossidanti nei cibi testati.

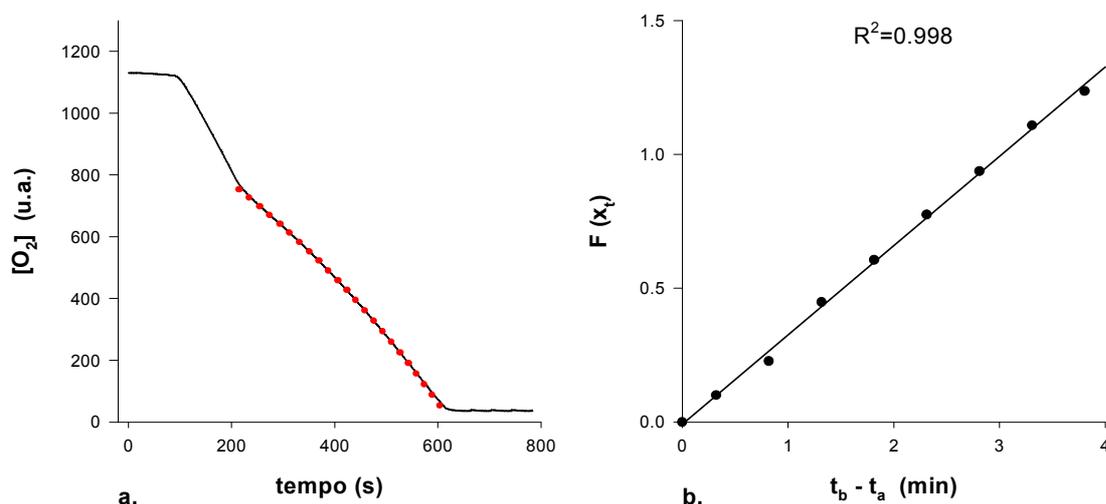


Figura 3.7. Inibizione della perossidazione dell'acido linoleico per azione del vino rosso. Nella cella ossigrafica è stato aggiunto il vino rosso Cabernet Franc alla concentrazione finale 0.19 g/L. (a) È mostrato il tracciato ossigrafico sperimentale d'inibizione della perossidazione di LH (linea continua). La ricostruzione teorica della curva (pallini) a partire dalle equazioni (21) e (22) e utilizzando il parametro sperimentale C, riproduce fedelmente la curva ossigrafica ottenuta sperimentalmente. (b) Relazione lineare esistente tra $F(x_t)$ e tempo. Condizioni sperimentali: DCA 5 mM, LG 0.5 mM, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C.

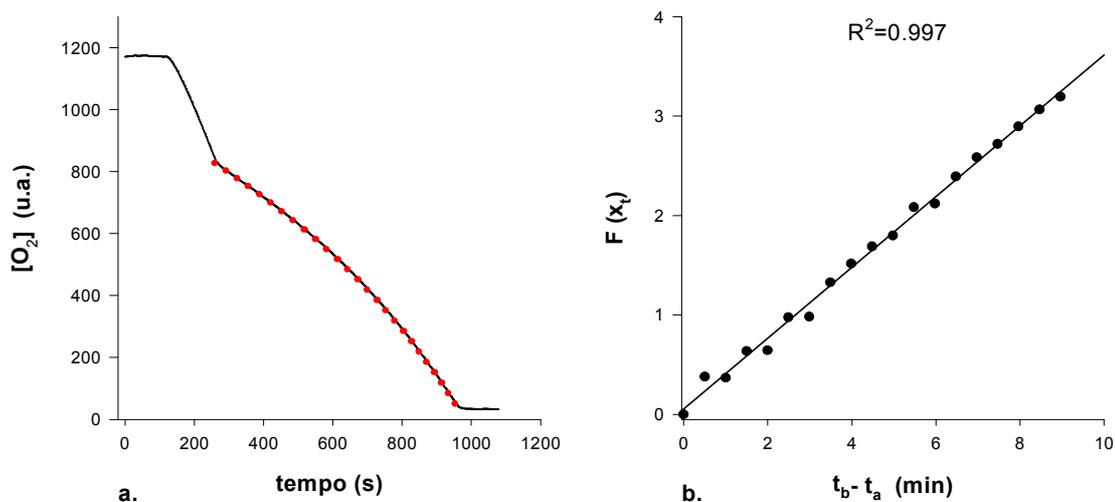


Figura 3.8. Inibizione della perossidazione dell'acido linoleico per azione dell'estratto di mela. Nella cella ossigrafica è stato aggiunto l'estratto di mela Renetta alla concentrazione finale 0.17 g in peso fresco/L. **(a)** È mostrato il tracciato ossigrafico sperimentale d'inibizione della perossidazione di LH (linea continua). La ricostruzione teorica della curva (pallini) a partire dalle equazioni (21) e (22) e utilizzando il parametro sperimentale C, riproduce fedelmente la curva ossigrafica ottenuta sperimentalmente. **(b)** Relazione lineare esistente tra $F(x_t)$ e tempo. Condizioni sperimentali: DCA 5 mM, LG 0.5 mM, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C.

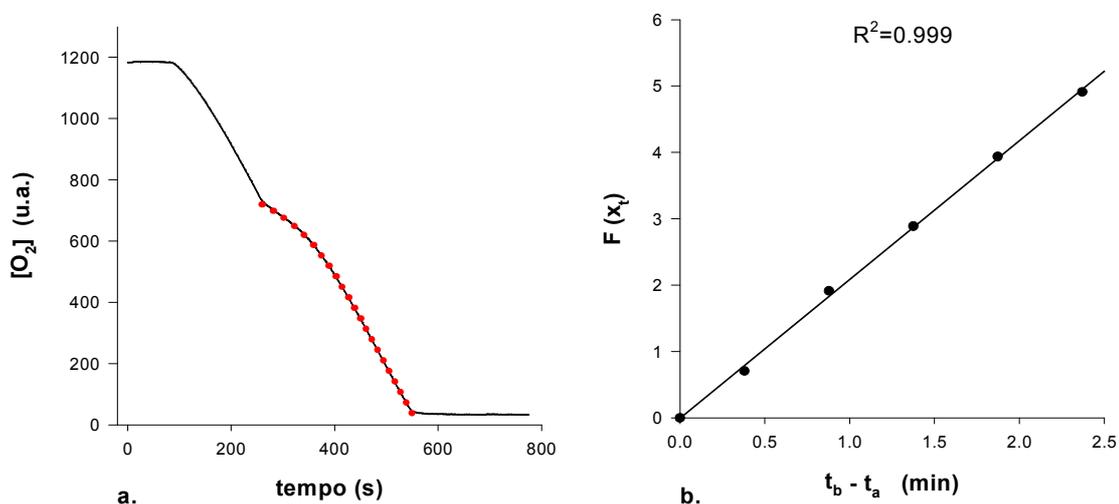


Figura 3.9. Inibizione della perossidazione dell'acido linoleico per azione dell'estratto di radicchio rosso. Nella cella ossigrafica è stato aggiunto l'estratto di radicchio rosso di Verona alla concentrazione finale 0.03 g in peso fresco/L. **(a)** È mostrato il tracciato ossigrafico sperimentale d'inibizione della perossidazione di LH (linea continua). La ricostruzione teorica della curva (pallini) a partire dalle equazioni (21) e (22) e utilizzando il parametro sperimentale C, riproduce fedelmente la curva ossigrafica ottenuta sperimentalmente. **(b)** Relazione lineare esistente tra $F(x_t)$ e tempo. Condizioni sperimentali: DCA 5 mM, LG 0.5 mM, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C.

Applicando la nostra procedura di calcolo e le equazioni descritte in precedenza, sono stati calcolati i valori di PRTC, PRTE e $t_{1/2}$ per ciascun alimento testato. Questi parametri sono indipendenti dalla concentrazione aggiunta al sistema micellare di misura, come atteso, e la dipendenza lineare tra $F(x_t)$ ed il tempo risulta meglio rispettata quando la quantità di alimento iniettata nella cella ossigrafica da valori di x_j compresi nell'intervallo 0.2-0.4.

È molto interessante notare che dal punto di vista cinetico ogni alimento, benché contenga una varietà di antiossidanti, mostri il comportamento attribuibile ad un singolo inibitore; questa particolarità consente di calcolare valori di PRTC, PRTE e $t_{1/2}$ caratteristici del sistema complesso (Tabella 4). Questi parametri possono variare in un ampio intervallo, per un singolo alimento, come si vede in Tabella 4, suggerendo la loro utilità nel caratterizzare l'attività antiossidante specifica di diversi cibi. Sulla base dei dati riportati in Tabella 4, si può notare che non esiste una relazione lineare tra PRTC e PRTE ($R^2 < 0.4$), come atteso.

Tabella 4. Capacità ed efficienza d'inibizione della perossidazione lipidica di alcuni cibi ricchi di antiossidanti.

Alimenti	C (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	PRTE (L/g)	PRTC (μmoli/g)	ePRTE (mg _{trolox} /g)	ePRTC (mg _{trolox} /g)
Vino Cabernet Franc	0.358 ± 0.024	1.94 ± 0.13	8.9 ± 0.8	42.5 ± 5.0	2.1	5.3
Vino Pinot noir	0.260 ± 0.022	2.69 ± 0.23	10.7 ± 1.1	70.6 ± 9.5	2.5	8.8
Vino Syrah	0.276 ± 0.037	2.54 ± 0.35	13.3 ± 1.6	82.6 ± 3.3	3.1	10.3
Mela Renetta	0.361 ± 0.022	1.93 ± 0.12	19.7 ± 2.0	93.1 ± 3.8	4.5	11.7
Mela Stark Delicious	0.373 ± 0.033	1.87 ± 0.16	7.7 ± 0.6	35.4 ± 0.7	1.8	4.4
Mela Fuji	0.285 ± 0.018	2.44 ± 0.15	3.5 ± 0.2	21.2 ± 0.6	0.8	2.7
Radicchio di Verona	1.981 ± 0.109	0.35 ± 0.02	83.4 ± 5.3	72.2 ± 2.7	19.2	9.0
Radicchio di Treviso	1.436 ± 0.035	0.48 ± 0.01	21.6 ± 0.2	25.7 ± 0.8	5.0	3.2
Radicchio di Chioggia	1.559 ± 0.101	0.46 ± 0.03	19.0 ± 1.7	20.8 ± 0.6	4.4	2.6
Mirtillo <i>Vaccinium myrtillus</i>	2.687 ± 0.172	0.26 ± 0.02	76.0 ± 4.6	48.5 ± 5.5	17.5	6.1
Mirtillo Americano	1.825 ± 0.104	0.38 ± 0.02	78.3 ± 1.3	73.4 ± 3.3	18.0	9.2

Gli esperimenti sono stati condotti nel sistema micellare DCA 5 mM, LG 0.5 mM, LH 2 mM. Per iniziare la perossidazione lipidica è stato utilizzato ABIP 4 mM. La deviazione standard è stata ottenuta da quattro esperimenti condotti a diverse concentrazioni.

Dai risultati riportati nelle Figure 3.7, 3.8 e 3.9 e in Tabella 4 appare evidente che la procedura da noi proposta, basata sull'analisi di semplici tracciati ossigrafici, consente di caratterizzare l'inibizione della perossidazione lipidica per azioni di alcuni

alimenti mediante i tre parametri PRTC, PRTE e $t_{1/2}$, con una deviazione standard relativamente bassa.

Inoltre, i valori di PRTC e PRTE calcolati per i cibi, possono essere normalizzati nel seguente modo:

- a) Il PRTC ($\mu\text{moli di LOO}^{\bullet}$ bloccati da 1 g di alimento) può essere diviso per il PRTC di un composto di riferimento (come il trolox, la catechina, ecc.) ottenuto nelle stesse condizioni sperimentali ed espresso in $\mu\text{moli di LOO}^{\bullet}$ bloccati da 1 mg di antiossidante. In questo modo si può assegnare ad ogni alimento un valore di capacità equivalente (ePRTC) in termini di mg del composto di riferimento presente in 1 g in peso fresco dell'alimento.
- b) Una simile procedura si può applicare anche per il PRTE, assegnando in questo modo un valore di efficienza equivalente (ePRTE) in termini di mg del composto di riferimento presenti in 1 g in peso fresco dell'alimento.

Questa procedura è stata applicata ai dati riportati in Tabella 4, dove i valori di PRTC e PRTE sono stati normalizzati al trolox (ePRTC_{trolox}, ePRTE_{trolox}), che è stato scelto come composto di riferimento.

In conclusione, si può affermare che ogni alimento può essere considerato un sistema complesso di antiossidanti che si comporta, nell'inibire la perossidazione lipidica, come un singolo composto avente quindi capacità ed efficienza ben definiti. Per questo motivo, dall'analisi di una traccia ossigrafica, ottenuta in tempi relativamente brevi, si possono ricavare con buona precisione i parametri che caratterizzano l'attività antiossidante di un alimento, rendendo più facile il confronto tra proprietà antiossidanti degli alimenti.

3.4. APPLICAZIONE DEL MODELLO CINETICO E DEL METODO DI CALCOLO A SISTEMI COMPLESSI: IL PLASMA UMANO E LE SUE COMPONENTI AD ALTO E BASSO PESO MOLECOLARE

Sulla base dei buoni risultati ottenuti nelle misure dell'attività antiossidante dei composti puri e soprattutto degli alimenti ricchi di antiossidanti, è stata verificata la possibilità di applicare il metodo messo a punto per analizzare il comportamento nell'inibire il processo di perossidazione lipidica da parte di un sistema ricco di antiossidanti, quale il plasma umano. Le proprietà antiossidanti del plasma, per quanto riguarda lo scavenging dei radicali perossidici, dipendono sostanzialmente dalla presenza di quattro antiossidanti: la vitamina E, la bilirubina legata all'albumina, l'acido ascorbico e l'acido urico. Inoltre, possono avere un certo ruolo sostanze presenti a più bassa concentrazione come i carotenoidi, bilirubina libera glucoronata e altre molecole con proprietà antiossidanti derivate dalla dieta, le cui concentrazioni sono generalmente dell'ordine di 10^{-6} M od inferiori [Manach *et al.*, 2005].

L'analisi del processo di inibizione della perossidazione lipidica da parte del plasma è stata condotta in due sistemi modello. Il primo è rappresentato dalla frazione proteica e lipoproteica del plasma, opportunamente diluita e arricchita in acido linoleico. Questo sistema verrà indicato **sistema PIP4** ed è stato scelto allo scopo di mimare, per quanto possibile, le condizioni fisiologiche in cui viene esplicata l'azione antiossidante del plasma. Il secondo sistema modello, costituito da acido deossicolico, mono-laurilglicerolo e acido linoleico (DCA-LG-LH) (**sistema DCA**), è stato scelto al fine di ridurre le tempistiche sperimentali e di ovviare a problemi di riproducibilità incontrati nell'utilizzo del sistema PIP4, la cui composizione dipende in parte dal donatore e dalle sue condizioni fisiologiche.

3.4.1. Attività antiossidante del plasma umano e delle sue componenti ad alto e basso peso molecolare misurata nel sistema PIP4

La scelta del sistema PIP4 è legata al desiderio di riprodurre condizioni il più vicino possibile a quelle presenti in vivo. Tuttavia, sono necessari degli interventi per utilizzare il sistema nella maniera più corretta. Il sistema PIP4, come riportato nei Materiali e Metodi, è costituito dalle proteine e lipoproteine del plasma diluite 25 volte, a cui è stato aggiunto acido linoleico alla concentrazione 2 mM. Un intervento riguarda la necessità di eliminare gli antiossidanti presenti nella frazione proteica e lipoproteica del plasma, essenzialmente vitamina E e bilirubina. A tale fine, dopo l'aggiunta dell'ABIP nel sistema, è necessario attendere che l'attività di scavenging di questi composti si esaurisca. Quindi, solo dopo che la velocità di perossidazione lipidica ha raggiunto il valore massimo e costante nel tempo si può iniettare il plasma o le sue componenti di cui si vuole misurare l'attività antiossidante, vedi ad esempio la Figura 3.10. Per consentire il completo esaurimento dell'effetto degli antiossidanti presenti nel sistema PIP4 e per poter avere un più lungo periodo di osservazione dell'inibizione, si è innalzata la concentrazione dell'ossigeno nella soluzione del 30% rispetto alla concentrazione presente quando le soluzioni sono poste in equilibrio con l'aria.

Attività antiossidante della frazione ad alto peso molecolare del plasma (HMW) misurata nel sistema PIP4

La frazione ad alto peso molecolare separata per gel filtrazione è costituita da proteine e lipoproteine del plasma, per cui l'attività antiossidante è essenzialmente dovuta alla presenza della vitamina E, presente nella fase lipoproteica, e della bilirubina, che forma un complesso con l'albumina [Stocker *et al.*, 1987]. Nella Figura 3.10a viene mostrato un tracciato ossigrafico sperimentale di inibizione della perossidazione lipidica da parte degli HWM. L'analisi di questo tracciato evidenzia la presenza di una fase dove la frazione ad alto peso molecolare del plasma blocca i radicali perossidici mediante un processo di ordine zero rispetto alla concentrazione degli HMW. Infatti, gli HMW, in un vasto intervallo di concentrazione, sono in grado di inibire il processo di perossidazione lipidica con un'efficienza del 100%. Efficienza 100% significa che tutti i radicali perossidici (AOO^{*}) prodotti a seguito della decomposizione dell'ABIP vengono bloccati. Infatti, la velocità di scomparsa dell'ossigeno durante il processo di inibizione

coincide sostanzialmente con R_0 , la velocità di consumo dell'ossigeno dovuta alla formazione degli AOO \cdot a seguito della decomposizione dell'iniziatore radicalico. La conseguenza diretta del comportamento degli HMW è la possibilità di calcolare il valore di capacità ($PRTC_0$), espresso come μmoli di radicali bloccati da un litro di alti pesi molecolari (vedi Tabella 5), direttamente dalla durata del periodo di inibizione massima (lag time)(Figura 3.10b), cioè durante la fase 0, applicando l'equazione (13).

Il valore di R_i ($R_i = 0.84 \pm 0.05 \mu\text{M min}^{-1}$) utilizzato per calcolare il valore di $PRTC_0$ è stato ottenuto dagli esperimenti condotti con il trolox come inibitore nel sistema PIP4, come è stato fatto nel sistema DCA.

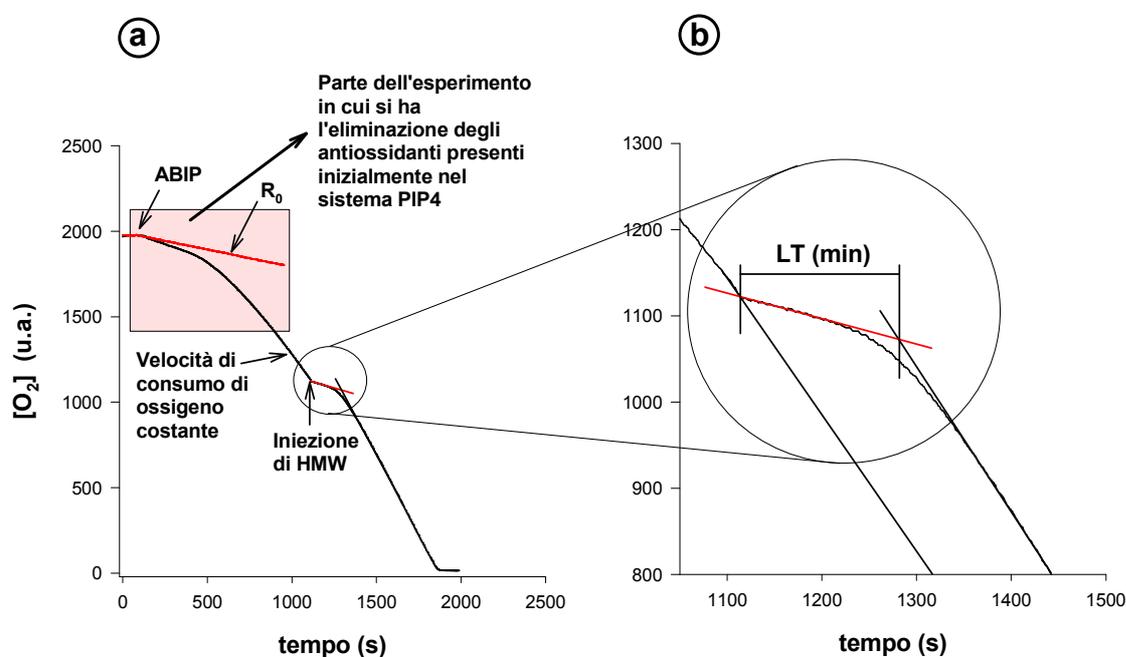


Figura 3.10. Inibizione della perossidazione dell'acido linoleico per azione della frazione ad alto peso molecolare del plasma (HMW) nel sistema PIP4. Nella cella ossigrafica è stato aggiunta la frazione plasmatica ad alto peso molecolare alla diluizione finale $0.02 L_{\text{HMW}}/L_{\text{soluzione di misura}}$, tenendo conto della diluizione risultata dopo desalting. (a) È mostrato il tracciato ossigrafico sperimentale d'inibizione della perossidazione di LH. (b) Dettaglio dell'effetto inibitorio caratterizzato da un processo di ordine zero rispetto alla concentrazione degli HMW. Condizioni sperimentali: PIP4, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C.

Attività antiossidante della frazione a basso peso molecolare del plasma (LMW) misurata nel sistema PIP4

La frazione a basso peso molecolare del plasma, per lo più costituita da acido ascorbico ed acido urico, mostra la presenza di una fase caratterizzata da un processo di primo ordine rispetto alla concentrazione dell'antiossidante (fase 1) (Figura 3.11a). Infatti, l'analisi del tracciato ossigrafico sperimentale ha messo in luce l'esistenza di una relazione lineare tra $F(x_t)$ e il tempo (Figura 3.11b), che dimostra il comportamento cinetico ipotizzato (vedi Paragrafo 3.1.3). I valori di x_t in funzione del tempo consentono di ricavare il parametro C, da cui si risale ai valori di capacità ($PRTC_1$) ed efficienza ($PRTE_1$) di inibizione della perossidazione lipidica, caratteristici dei LMW (vedi Tabella 5).

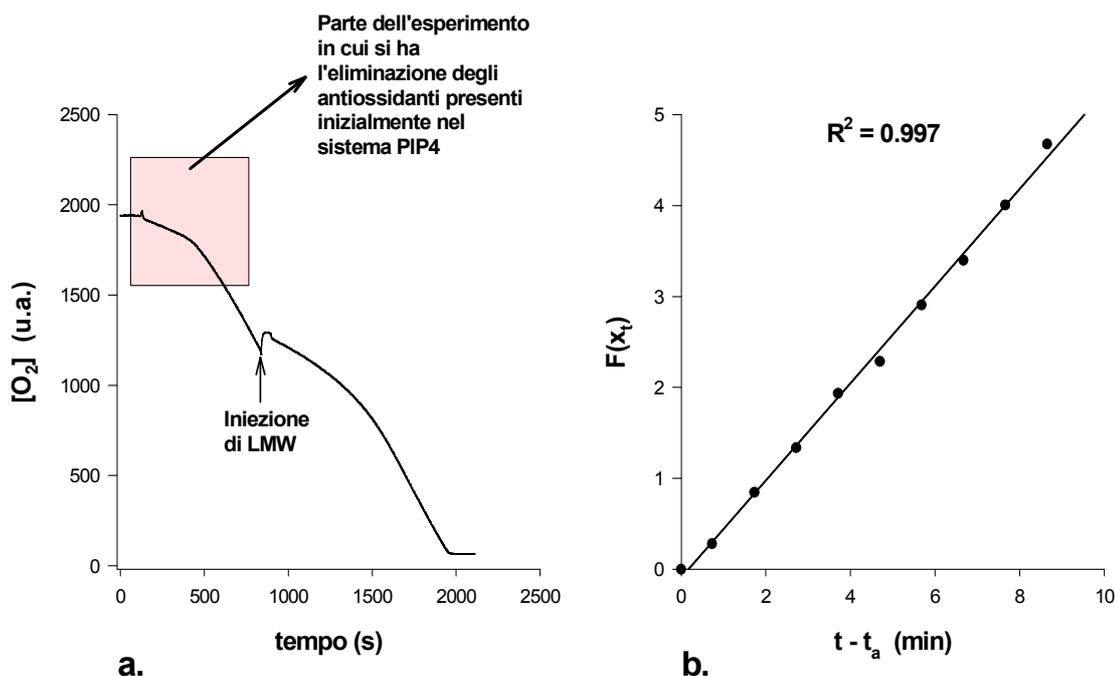


Figura 3.11. Inibizione della perossidazione dell'acido linoleico per azione della frazione a basso peso molecolare del plasma (LMW) nel sistema PIP4. Nella cella ossigrafica è stata aggiunta la frazione plasmatica a basso peso molecolare alla diluizione finale $0.02 L_{LMW}/L_{soluzione}$ di misura, tenendo conto della diluizione risultata dopo desalting. (a) È mostrato il tracciato ossigrafico sperimentale d'inibizione della perossidazione di LH. (b) Relazione lineare esistente tra $F(x_t)$ e tempo. Condizioni sperimentali: PIP4, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C.

Tabella 5. Valori di capacità (PRTC: $\mu\text{moli/L}$) ed efficienza (PRTE: $L_{\text{soluzione di misura}}/L$ di plasma o delle sue componenti) di inibizione della perossidazione lipidica.

Caratteristiche delle fasi					
	Fase di ordine zero		Fase di primo ordine		Somma delle capacità
	PRTC ₀ ($\mu\text{moli/L}$)	PRTE ₀ ($L_{\text{soluzione di misura}}/L$)	PTRC ₁ ($\mu\text{moli/L}$)	PRTE ₁ ($L_{\text{soluzione di misura}}/L$)	PRTC _{tot} * ($\mu\text{moli/L}$)
HMW	141.2 ± 13.0	massimo	/	/	627.1 ± 69.1
LMW	/	/	485.9 ± 56.1	219.9 ± 51.9	
Plasma	272.6 ± 24.1	massimo	334.7 ± 14.3	215.0 ± 29.9	607.3 ± 19.7

I parametri sono stati calcolati dalla curva di inibizione della perossidazione lipidica da parte delle frazioni ad alto (HMW) e basso peso molecolare (LMW) separate per desalting e dalla curva di inibizione da parte del plasma intero. La deviazione standard è stata ottenuta da almeno quattro misure sperimentali. Condizioni sperimentali: PIP4, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C.

* $\text{PRTC}_{\text{tot}} = \text{PRTC}_0 + \text{PRTC}_1$

Attività antiossidante del plasma intero misurata nel sistema PIP4

L'osservazione accurata del tracciato di inibizione (vedi Figura 3.12) rivela che l'azione del plasma nell'inibire il processo di perossidazione lipidica è caratterizzata da due fasi: una prima fase in cui l'inibizione avviene secondo un processo di ordine zero rispetto alla concentrazione degli inibitori presenti nel plasma (fase 0) e una seconda fase in cui avviene secondo un processo di primo ordine rispetto alla concentrazione degli inibitori (fase 1). La fase iniziale, rigorosamente lineare, è caratterizzata da un consumo di ossigeno riconducibile allo scavenging dei radicali perossidici con il 100% di efficienza. Dalla durata della fase 0 si ottiene il valore di PRTC₀ relativo al plasma (vedi Tabella 5), legato al contenuto degli antiossidanti che partecipano al processo. Diversamente, la fase 1 è caratterizzata da un consumo di ossigeno riconducibile allo scavenging dei radicali perossidici da parte di antiossidanti che presentano una bassa reattività rispetto a quelli che agiscono nella fase 0. Dall'analisi di questa fase, una volta ricavato il parametro C a partire dalla relazione lineare tra $F(x_t)$ e il tempo, è possibile calcolare i valori di PRTC₁ e PRTE₁ del plasma (vedi Tabella 5).

I valori di capacità nel bloccare i radicali perossidici relativi alla fase 0 e alla fase 1 misurati nel plasma e nelle sue frazioni ad alto e basso peso molecolare sono differenti. In particolare, risulta $(\text{PRTC}_0)_{\text{plasma}} > (\text{PRTC}_0)_{\text{HMW}}$ e $(\text{PRTC}_1)_{\text{LMW}} >$

$(PRTC_1)_{\text{plasma}}$. La differenza fra le coppie di valori è pressoché simile e si può attribuire all'acido ascorbico presente nei LMW che, nel caso del plasma, contribuisce al riciclo della vitamina E presente negli HMW [Scarpa *et al.*, 1984]. In altre parole, quando viene misurata l'attività antiossidante del plasma intero, l'effetto dell'acido ascorbico si manifesta nella fase 0 tipica degli HMW invece che nella fase 1 tipica dei LMW.

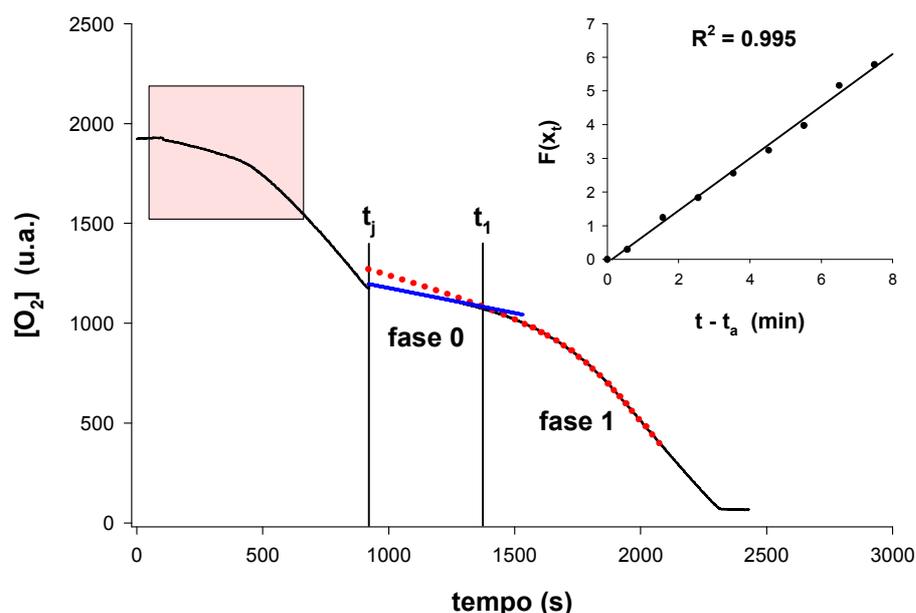


Figura 3.12. Inibizione della perossidazione dell'acido linoleico per azione del plasma umano nel sistema PIP4. Nella cella ossigrafica è stato aggiunto il plasma alla diluizione finale $0.02 L_{pl}/L_{\text{soluzione}}$ di misura. È mostrato il tracciato ossigrafico sperimentale d'inibizione della perossidazione di LH e sono indicate le due fasi d'inibizione: la fase 0 e la fase 1. **Nell'inserto:** relazione lineare esistente tra $F(x_i)$ e tempo. L'intervallo d'integrazione è relativo alla fase 1. Condizioni sperimentali: PIP4, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C .

Per quanto riguarda il calcolo dei valori di PRTC e PRTE del plasma riportati in Tabella 5 si è proceduto nel modo seguente. È stata analizzata la porzione del tracciato ossigrafico che corrisponde alla fase 1, da cui è stato possibile ricavare il valore del parametro C. A partire dal valore di C calcolato è stata ricostruita la curva teorica di inibizione della perossidazione lipidica, che si sovrappone perfettamente alla porzione finale del tracciato sperimentale che coincide con la fase 1, mentre si discosta notevolmente dalla porzione iniziale che coincide con la fase 0 (vedi Figura 3.12). Il punto di intersezione tra la curva teorica ricostruita e la parte rettilinea del tracciato sperimentale che corrisponde alla fase 0, è stato assunto come il momento (t_1) in cui ha

fine il contributo degli antiossidanti che agiscono nella fase 0 e ha inizio il contributo degli antiossidanti che agiscono nella fase 1 del processo di inibizione da parte del plasma. Su questa base sono stati calcolati i valori di $PRTC_0$, $PRTC_1$ e $PRTE_1$ riportati in Tabella 5.

Questo sistema di calcolo, applicato al plasma intero, offre il vantaggio di ottenere i diversi parametri che caratterizzano l'azione di scavenging dei radicali perossidici da parte del plasma così come avviene in vivo, mettendo in luce l'azione di riciclo della vitamina E da parte degli antiossidanti presenti nei bassi pesi molecolari, in particolare dell'acido ascorbico.

Sulla base di queste considerazioni e al fine di verificare la riproducibilità dei dati ottenuti, sono state eseguite misure ripetute di inibizione della perossidazione lipidica da parte del plasma e delle sue componenti, utilizzando come campioni di riferimento un plasma proveniente da un donatore maschio (D1) e uno proveniente da una donatrice femmina (D2), in quanto la capacità totale di inibizione della perossidazione lipidica è correlata al sesso del donatore. In Figura 3.13 sono riportati, in forma di istogrammi, i parametri calcolati dalle curve di inibizione, ottenuti applicando le metodiche di calcolo descritte ai due campioni di plasma.

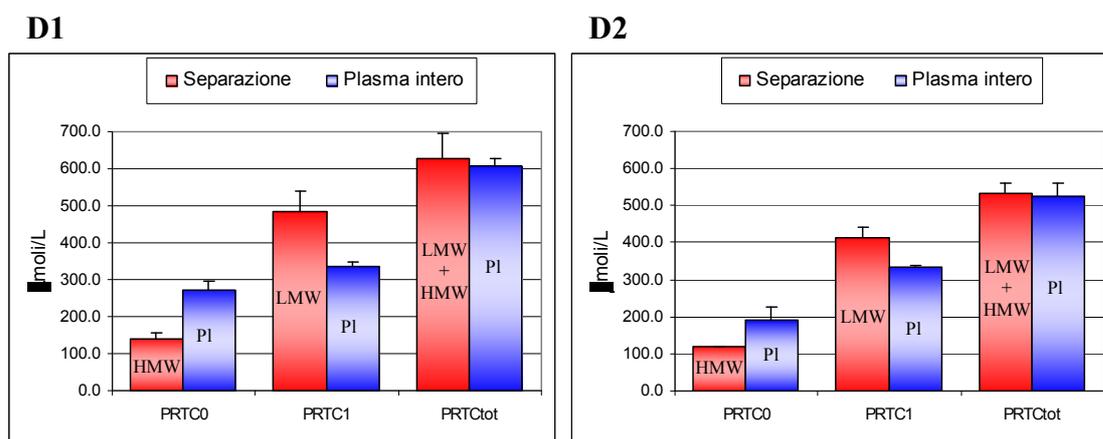


Figura 3.13. Valori di capacità ($\mu\text{mol/L}$) di inibizione della perossidazione lipidica misurati nel sistema PIP4. In rosso sono indicati i valori di capacità calcolati dalle curve di inibizione della perossidazione da parte delle frazioni ad alto (HMW) e basso peso molecolare (LMW) separate per desalting. In blu sono indicati i parametri ottenuti dalla sola curva di inibizione da parte del plasma intero. La deviazione standard è stata ottenuta da almeno quattro esperimenti. **D1: donatore di sesso maschile, **D2**: donatore di sesso femminile. Condizioni sperimentali: PIP4, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C.**

In rosso sono indicati i valori ricavati dalle frazioni plasmatiche separate, in blu quelli ottenuti dall'analisi della curva di inibizione del plasma in toto. Dal confronto degli istogrammi si nota che alla diminuzione di capacità del plasma rispetto a quella dei LMW durante la fase 1 corrisponde un'equivalente aumento della capacità del plasma rispetto a quella degli HMW durante la fase 0.

3.4.2. Attività antiossidante del plasma umano e delle sue componenti ad alto e basso peso molecolare misurata nel sistema DCA

Per ovviare ai problemi legati all'utilizzo del sistema PIP4 e nell'ottica di ridurre i tempi di preparazione e di analisi sperimentale, è stata testata l'attività di inibizione della perossidazione lipidica da parte del plasma, delle sue componenti ad alto e basso peso molecolare separate e dei singoli antiossidanti in un altro sistema modello, il sistema DCA, costituito da acido deossicolico, mono-laurilglicerolo e acido linoleico (DCA-LG-LH). Il processo di perossidazione lipidica viene indotto dalla decomposizione termica dell'ABIP. I vantaggi del sistema DCA sono legati all'assenza degli antiossidanti endogeni del sistema PIP4 e alla maggiore velocità di perossidazione lipidica raggiunta in condizioni di stato stazionario, motivi per cui si riducono notevolmente le tempistiche sperimentali. Inoltre, è garantita la riproducibilità delle condizioni di misura.

Nel sistema DCA gli effetti inibitori registrati per azione del plasma umano e delle sue frazioni rispecchiano fedelmente il comportamento già misurato ed analizzato nel sistema PIP4. In particolare, gli HMW inibiscono la perossidazione lipidica secondo un processo di ordine zero rispetto alla loro concentrazione, i LMW secondo un processo di primo ordine ed il plasma mostra sempre un andamento bifasico. Dai corrispondenti tracciati ossigrafici è stato, quindi, possibile ottenere i valori di $PRTC_0$, $PRTC_1$ e $PRTE_1$ per le componenti ad alto e basso peso molecolare e per il plasma. In Figura 3.14 sono rappresentati in forma di istogrammi i valori di capacità di inibizione della perossidazione lipidica, calcolati per i campioni di plasma già studiati nel sistema DCA (D1 e D2). Il confronto dei valori ottenuti mette in luce il contributo dell'acido ascorbico all'attività antiossidante del plasma nella fase 0. Questo risultato è analogo a quanto visto nel sistema PIP4.

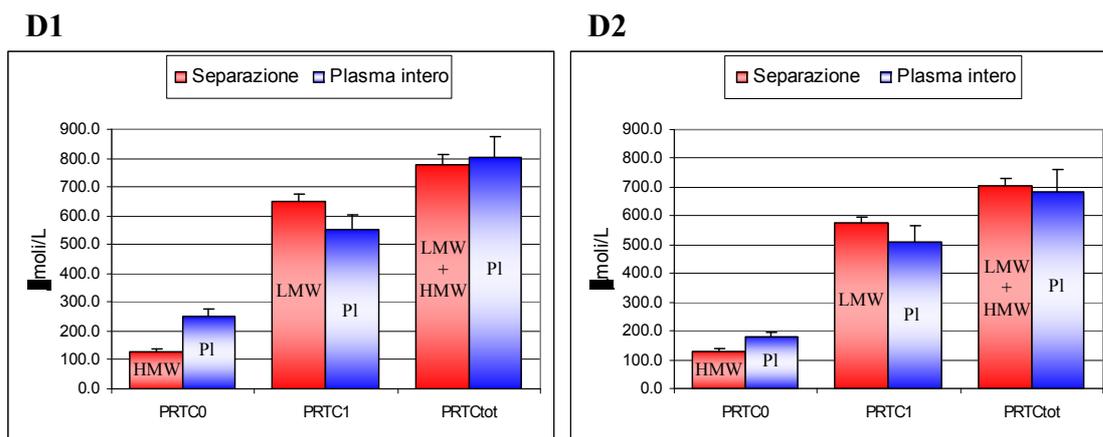


Figura 3.14. Valori di capacità ($\mu\text{mol/L}$) di inibizione della perossidazione lipidica misurati nel sistema DCA. In rosso sono indicati i valori di capacità calcolati dalle curve di inibizione della perossidazione da parte delle frazioni ad alto (HMW) e basso peso molecolare (LMW) separate per desalting. In blu sono indicati i parametri ottenuti dalla sola curva di inibizione da parte del plasma intero. La deviazione standard è stata ottenuta da almeno quattro esperimenti. **D1:** donatore di sesso maschile, **D2:** donatore di sesso femminile. Condizioni sperimentali: DCA 5 mM, LG 0.5 mM, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C.

È da notare, però, che nel sistema DCA i valori di PRTC_1 , e di conseguenza quelli di PRTC_{tot} , sono più elevati di quelli misurati nel sistema PIP4. Questo aumento può essere dovuto al fatto che nel sistema PIP4 l'aggiunta di plasma al 2% fa variare in modo significativo (50%) la concentrazione delle proteine e lipoproteine del plasma che costituiscono il sistema. Questo si rispecchia in un aumento della velocità di consumo di ossigeno e, quindi, in una diminuzione della durata della fase 1.

3.4.3. Contributo dei principali antiossidanti presenti nel plasma umano all'inibizione della perossidazione lipidica nel sistema DCA

Per valutare il contributo dei vari antiossidanti presenti nel plasma al processo di inibizione della perossidazione lipidica, è stata misurata l'attività di inibizione dei principali componenti molecolari presenti nel plasma che hanno potenzialmente la possibilità di bloccare i radicali perossidici, fra cui in particolare la vitamina E, la bilirubina, l'acido ascorbico, l'acido urico, l'albumina, i gruppi tiolici delle proteine e del glutathione ridotto. Dalle prove compiute è emerso che l'albumina libera da bilirubina e da acidi grassi non ha alcun effetto sul processo di perossidazione lipidica, così come i gruppi tiolici. Diversamente, la bilirubina legata all'albumina, l'acido

ascorbico e l'acido urico bloccano i radicali perossidici mediante un processo di primo ordine rispetto alla concentrazione di antiossidante, proprietà messa in luce dal fatto che viene rispettata la relazione lineare tra $F(x_t)$ e il tempo. Per questo motivo è stato possibile calcolare per questi composti i valori di capacità (n) ed efficienza (IC_{50}^{-1}) di inibizione della perossidazione lipidica (vedi Tabella 6).

Tabella 6. Valori di capacità (n) ed efficienza (IC_{50}^{-1}) di inibizione della perossidazione lipidica da parte dei principali antiossidanti presenti nel plasma misurati nel sistema DCA.

	n	IC_{50}^{-1} (μM^{-1})
Vitamina E	1.91 ± 0.03	/ *
Bilirubina legata a HSA	3.01 ± 0.13	6.34 ± 1.22
Acido ascorbico	1.56 ± 0.14	4.06 ± 0.37
Acido urico	1.78 ± 0.30	0.47 ± 0.06

Gli esperimenti sono stati condotti nel sistema micellare DCA 5 mM, LG 0.5 mM, LH 2 mM. Per iniziare la perossidazione lipidica è stato utilizzato ABIP 4 mM. La deviazione standard è stata ottenuta da quattro esperimenti condotti a diverse concentrazioni.

* In questo caso non è stato possibile calcolare IC_{50}^{-1} in quanto si ha inibizione massima.

Inoltre, in questo sistema, è stata valutata l'attività inibitoria della vitamina E, che è in grado di bloccare i radicali perossidici mediante un processo di ordine zero rispetto alla concentrazione di antiossidante presentando un valore di capacità ≈ 2 (vedi Tabella 6).

Una volta ottenuto il valore della capacità dei composti puri si è calcolato il loro contributo al PRTC del plasma, in base alla loro concentrazione analitica. Il valore di PRTC teoricamente atteso per il plasma o per le sue frazioni viene calcolato dalla sommatoria del PRTC di ogni composto "i", ottenuto dal prodotto della sua capacità " n_i " per la sua concentrazione " z_i ": $PRTC_{atteso} = \sum PRTC_i = \sum (n_i \times z_i)$. Un esempio di questa procedura di calcolo è riportato in Tabella 7 relativamente al donatore D1.

Tabella 7. Valori attesi sulla base dei dati di capacità e concentrazione dei singoli componenti

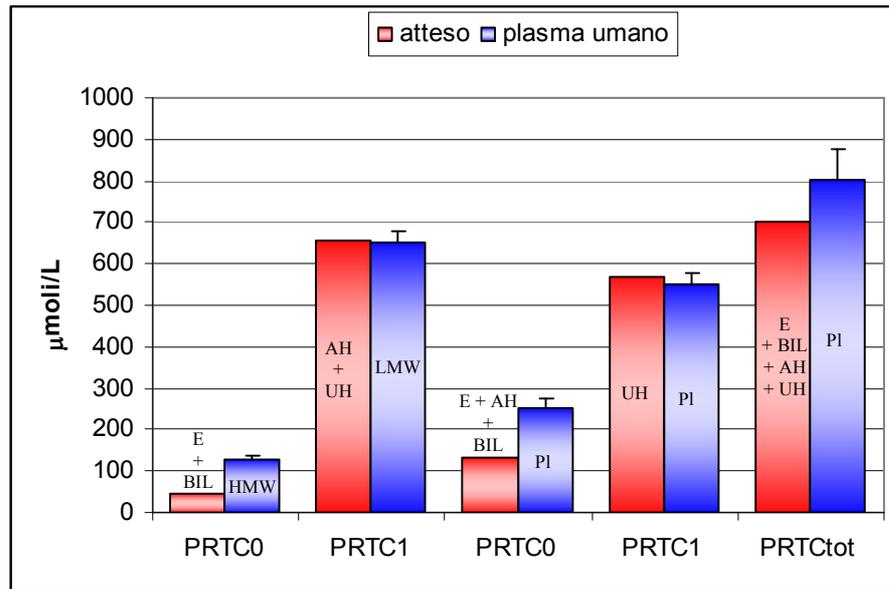
Componenti aventi attività di scavenging	Concentrazione misurata (μM)	HMW	LMW	Plasma	
		PRTC ₀ ($\mu\text{mol/L}$)	PRTC ₁ ($\mu\text{mol/L}$)	PRTC ₀ ($\mu\text{mol/L}$)	PRTC ₁ ($\mu\text{mol/L}$)
Vitamina E	16.3	44.2		131.6	
Bilirubina totale	4.3				
Acido ascorbico	55.5		657.9		
Acido Urico	319				570.5

$\text{PRTC}_{\text{atteso}} = \sum \text{PRTC}_i = \sum (n_i \times z_i)$, dove n_i è la capacità di ogni componente e z_i la sua concentrazione analitica. I dati riportati sono relativi al donatore D1.

Come mostrato in Figura 3.15, i valori di PRTC₀ e PRTC₁ teoricamente attesi sono del tutto simili ai valori di PRTC₀ e PRTC₁ calcolati dalle curve di inibizione della perossidazione lipidica da parte del plasma o delle sue componenti ad alto e basso peso molecolare, per entrambi i campioni di plasma analizzati (D1 e D2) (vedi Figura 3.15). In particolare, il valore di PRTC₀ relativo al plasma coincide con il contributo all'inibizione della perossidazione lipidica di vitamina E, bilirubina ed acido ascorbico, mentre il valore di PRTC₁ relativo al plasma è legato sostanzialmente al contributo dell'acido urico.

La notevole differenza registrata tra il valore di PRTC₀ sperimentale e il valore di PRTC₀ calcolato, entrambi relativi agli HMW per il campione di plasma D1 (vedi Figura 3.15), fa presupporre che sia presente un componente molecolare che ha la possibilità di bloccare i radicali perossidici, il cui contributo non è stato considerato. Questo comportamento è stato confermato dall'analisi di altri campioni di plasma, prelevati da 10 donatori sani di sesso maschile, per i quali il valore di PRTC₀ misurato relativo agli HMW è risultato essere maggiore rispetto al valore di PRTC₀ calcolato di 20-80 $\mu\text{mol/L}$, pari al 15-50% del valore di PRTC₀ sperimentale. Le stesse differenze sono state riscontrate anche misurando il valore di PRTC₀ direttamente dalla curva del plasma.

D1



D2

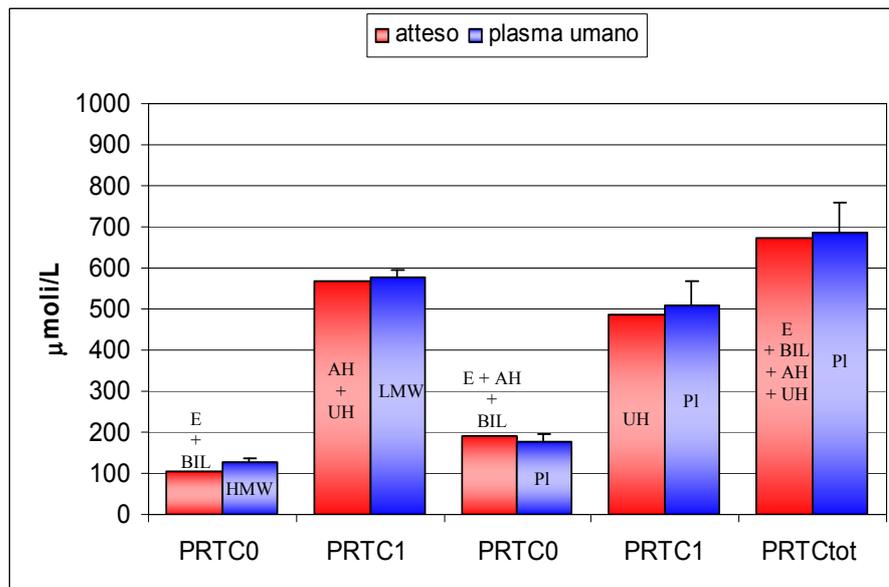


Figura 3.15. Valori di capacità di inibizione della perossidazione lipidica attesi e sperimentali. In **rosso** sono indicati i valori di PRTC attesi sulla base dei dati di capacità e concentrazione dei singoli componenti. In **blu** sono indicati i valori di PRTC misurati dalle curve di inibizione della perossidazione lipidica da parte delle frazioni ad alto e basso peso molecolare del plasma o da parte del plasma intero. **D1**: donatore di sesso maschile, **D2**: donatore di sesso femminile. Condizioni sperimentali: DCA 5 mM, LG 0.5 mM, LH 2 mM, ABIP 4 mM a 37°C. **E**: vitamina E; **BIL**: bilirubina legata all'albumina; **AH**: acido ascorbico; **UH**: acido urico.

BIBLIOGRAFIA

- Apak R; Güçlü K; Ozyürek M; Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7970-7981.
- Barclay LRC; Locke SJ; MacNeil JM; VanKessel J; Burton GW; Ingold KU. Autoxidation of micelles and model membranes. Quantitative kinetic measurements can be made by using either water-soluble or lipid-soluble initiators with water-soluble or lipid-soluble chain-breaking antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2479-2481.
- Bedard L; Young MJ; Hall D; Paul T; Ingold KU. Quantitative studies on the peroxidation of human low-density lipoprotein initiated by superoxide and by charged and neutral alkylperoxyl radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12439-12448.
- Benzie IF; Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 633-636.
- Bondet V; Brand-Williams W; Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH-free radical method. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1997**, *30*, 609-615.
- Bors W; Michel C; Saran M. Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin. A rapid test for quantifying antioxidant activity. *Biochem. Biophys. Acta* **1984**, *796*, 312-319.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 317-333.
- Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *300*, 535-543.
- Burton GW; Ingold KU. Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6472-6477.
- Cantuti-Castelvetri I; Shukitt-Hale B; Joseph JA. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2000**, *18*, 367-381.
- Cao G; Alessio HM; Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *14*, 303-311.
- Chisolm GM; Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28*, 1815-1826.

- Chinnici F; Gaiani A; Natali N; Riponi C; Galassi S. Improved HPLC determination of phenolic compounds in Cv. Golden Delicious apples using a monolithic column. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3-7.
- Flory PJ. Principles of polymer chemistry. Cornell University Press, Ithaca, N.Y., **1953**.
- Gazzani G; Daglia M; Papetti A; Gregotti C. In vitro and ex vivo anti- and prooxidant components of Cichorium intybus. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *23*, 127-133.
- Ghiselli A; Serafini M; Maiani G; Azzini E; Ferro-Luzzi A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 29-36.
- Ghiselli A; Serafini M; Natella F; Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 1106-1114.
- Goupy P; Vulcain E; Caris-Veyrat C; Dangles O. Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: mechanism of action and synergism. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 933-946.
- Gustafsson J; Nylander T; Almgren M; Ljusberg-Wahren H. Phase Behavior and aggregate structure in aqueous mixtures of sodium cholate and glycerol monooleate. *J. Coll. Int. Sci.* **1999**, *211*, 326-335.
- Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* **1990**, *9*, 1-32.
- He G; Shankar RA; Chzhan M; Samouilov A; Kuppusamy P; Zweier JL. Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4586-4591.
- Hernell O; Staggars JE; Carey MC. Physical-chemical behaviour of dietary and biliary lipids during digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2041-2056.
- Hillman K; Whyte AL; Stewart CS. Dissolved-oxygen in the porcine gastrointestinal-tract. *Lett. Appl. Microbiol.* **1993**, *16*, 299-302.
- Hitchon CA; El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2004**, *6*, 265-278.
- Hollman PC; Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 937-942.

- Iwao T; Toyonaga A; Shigemori H; Ikegami M; Tanikawa K. Omeprazole administration does not impair gastrointestinal mucosal perfusion, oxygenation, and hexosamine generation. *Gastrointest. Endosc.* **1995**, *41*, 497-501.
- Jira W; Spiteller G; Carson W; Schramm A. Strong increase in hydroxy fatty acids derived from linoleic acid in human low density lipoproteins of atherosclerotic patients. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *91*, 1-11.
- Joseph JA; Shukitt-Hale B; Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 313S-316S.
- Kanner J; Frankel E; Graint R; German B; Kinsella JE. Natural antioxidant in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 64-69.
- Kanner J; Lapidot T. The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 1388-1395.
- Kerem Z; Chetrit D; Oded S; Regev-Shoshani G. Protection of lipids from oxidation by epicatechin, *trans*-resveratrol, and gallic and caffeic acids in intestinal model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 10288-10293.
- Kris-Etherton PM; Hecker KD; Bonanome A; Coval SM; Binkoski AE; Hilpert KF; Griel AE; Etherton TD. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* **2002**, *113*, 71S-88S.
- Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* **1976**, *24*, 117-191.
- Lang JK; Gohil K; Packer L. Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Anal. Biochem.* **1986**, *157*, 106-116.
- Lapidot T; Harel S; Akiri B; Granit R; Kanner J. pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 67-70.
- Liu S; Manson JE; Cole SR; Hennekens CH; Willet WC; Buring JE. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the women's health study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 922-928.
- Lucarini M; Mugnaini V; Pedulli GF. Bond dissociation enthalpies of polyphenols: the importance of cooperative effects. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 928-931.
- Malloy HT; Evelyn KA. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.* **1937**, *119*, 481-490.

- Manach C; Williamson G; Morand C; Scalbert A; Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 230S-242S.
- Markesbery WR; Kryscio RJ; Lovell MA; Morrow JD. Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann. Neurol.* **2005**, *58*, 730-735.
- Miller NJ; Rice-Evans C; Davies MJ; Gopinathan V; Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, *84*, 407-412.
- Niki E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 100-8.
- Papetti A; Daglia M; Gazzani G. Anti- and pro-oxidant activity of water soluble compounds in *Cichorium intybus* var. *silvestre* (Treviso red chicory). *J. Pharm. Biomed. An.* **2002**, *30*, 939-945.
- Patist A; Oh SG; Leung R; Shah DO. Kinetics of micellization: its significance to technological processes. *Colloid Surface A* **2001**, *176*, 3-16.
- Pierpoint WS. Flavonoids in the human diet. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1986**, *213*, 125-140.
- Prior RL; Wu X; Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290-4302.
- Pryor WA; Strickland T; Church DF. Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous SDS [sodium dodecyl sulfate] micelle solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2224-2229.
- Pryor WA; Cornicelli JA; Devall LJ; Tait B; Trivedi BK; Witiak M; Wu M. A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3521-3532.
- Rice-Evans CA; Miller NJ; Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933-956.
- Rigo A; Vianello F; Clementi G; Rossetto M; Scarpa M; Vrhovsek U; Mattivi F. Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1996-2002.
- Roginsky VA; Barsukova TK; Remorova AA; Bors W. Moderate antioxidative efficiencies of flavonoids during peroxidation of methyl linoleate in homogeneous and micellare solutions. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1996**, *73*, 777-786.

- Roginsky VA; Barsukova TK. Chain-breaking antioxidant capability of some beverages as determined by the Clark electrode technique. *J. Med. Food* **2001**, *4*, 219-229.
- Roginsky VA. Chain-breaking antioxidant activity of natural polyphenols as determined during the chain oxidation of methyl linoleate in Triton X-100 micelles. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *414*, 261-270.
- Roginsky VA; Zheltukhina GA; Nebolsin VE. Efficacy of metmyoglobin and hemin as a catalyst of lipid peroxidation determined by using a new testing system. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6798-6806.
- Rossetto M; Lante A; Vanzani P; Spettoli P; Scarpa M; Rigo A. Red chicories as potent scavengers of highly reactive radicals: a study on their phenolic composition and peroxy radical trapping capacity and efficiency. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8169-8175.
- Sanchez-Moreno C; Larrauri JA; Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *76*, 270-276.
- Sayre LM; Moreira PI; Smith MA; Perry G. Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann. Ist. Super Sanità* **2005**, *41*, 143-164.
- Scarpa M; Rigo A; Maiorino M; Ursini F; Gregolin C. Formation of alpha-tocopherol radical and recycling of alpha-tocopherol by ascorbate during peroxidation of phosphatidylcholine liposomes. An electron paramagnetic resonance study. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *801*, 215-219.
- Serafino A; Sinibaldi-Vallebona P; Lazzarino G; Tavazzi B; Rasi G; Pierimarchi P; Andreola F; Moroni G; Galvano G; Galvano F; Garaci E. Differentiation of human melanoma cells induced by cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1940-1942.
- Singleton V; Orthofer R; Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152-178.
- Spiteller G. The important role of lipid peroxidation processes in aging and age dependent diseases. *Mol. Biotechnol.* **2007**, *37*, 5-12.
- Stiggers JE; Hernell O; Stafford RJ; Carey MC. Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 1. Phase behavior and aggregation states of model lipid systems patterned after aqueous duodenal contents of healthy adult human beings. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2028-2040.
- Stocker R; Glazer AN; Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 5918-5922.

- Tsao R; Yang R; Young JC; Zhu H. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6347-6353.
- Tubaro F; Ghiselli A; Rapuzzi P; Maiorino M; Ursini F. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *24*, 1228-1234.
- Uri N. Mechanisms of antioxidation, in *Autooxidation and Antioxidants*. Lundberg WO ed., Interscience, New York, **1961**, 133-169.
- Valko M; Leibfritz D; Moncol J; Cronin MTD; Mazur M; Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44-84.
- Vanzani P; Rossetto M; Rigo A; Vrhovsek U; Mattivi F; D'Amato E; Scarpa M. Major phytochemicals in apple cultivars: contribution to peroxy radical trapping efficiency. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3377-3382.
- Vrhovsek U; Rigo A; Tonon D; Mattivi F. Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6151-6155.
- Wayner DDM; Burton GW; Ingold KU; Locke SJ. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett.* **1985**, *187*, 33-37.
- Wayner DDM; Burton GW; Ingold KU; Barclay LRC; Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *924*, 408-419.
- Whitehead TP; Thorpe GHG; Maxwell SRJ. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *266*, 265-277.
- Wood LG; Gibson PG; Garg ML. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur. Respir. J.* **2003**, *21*, 177-186.
- Zadernowski R; Naczek M; Nesterowicz J. Phenolic acid profiles in some small berries. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2118-2124.
- Zennaro L; Rossetto M; Vanzani P; De Marco V; Scarpa M; Battistin L; Rigo A. A method to evaluate capacity and efficiency of water soluble and H-donor antioxidants as peroxy radical scavengers. *Archiv. Biochem. Biophys.* **2007**, *462*, 38-46.
- Ziegler RG. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**, *53*, 251S-259S.

APPENDICE

Tabella 1A. Valori di B_i calcolati

x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i
0.001	999.998	0.144	6.654	0.287	2.894	0.430	1.406	0.573	0.441	0.716	-0.402	0.859	-1.415
0.002	499.996	0.145	6.604	0.288	2.879	0.431	1.398	0.574	0.435	0.717	-0.408	0.860	-1.424
0.003	333.327	0.146	6.555	0.289	2.865	0.432	1.390	0.575	0.429	0.718	-0.414	0.861	-1.433
0.004	249.992	0.147	6.507	0.290	2.851	0.433	1.382	0.576	0.423	0.719	-0.420	0.862	-1.442
0.005	199.990	0.148	6.459	0.291	2.837	0.434	1.375	0.577	0.417	0.720	-0.426	0.863	-1.451
0.006	166.655	0.149	6.411	0.292	2.823	0.435	1.367	0.578	0.411	0.721	-0.432	0.864	-1.460
0.007	142.843	0.150	6.364	0.293	2.809	0.436	1.359	0.579	0.405	0.722	-0.439	0.865	-1.470
0.008	124.984	0.151	6.318	0.294	2.795	0.437	1.351	0.580	0.399	0.723	-0.445	0.866	-1.479
0.009	111.093	0.152	6.273	0.295	2.782	0.438	1.344	0.581	0.393	0.724	-0.451	0.867	-1.488
0.010	99.980	0.153	6.228	0.296	2.768	0.439	1.336	0.582	0.387	0.725	-0.457	0.868	-1.498
0.011	90.887	0.154	6.183	0.297	2.755	0.440	1.328	0.583	0.381	0.726	-0.463	0.869	-1.507
0.012	83.309	0.155	6.139	0.298	2.741	0.441	1.321	0.584	0.375	0.727	-0.469	0.870	-1.517
0.013	76.897	0.156	6.096	0.299	2.728	0.442	1.313	0.585	0.369	0.728	-0.475	0.871	-1.526
0.014	71.401	0.157	6.053	0.300	2.714	0.443	1.305	0.586	0.363	0.729	-0.481	0.872	-1.536
0.015	66.637	0.158	6.010	0.301	2.701	0.444	1.298	0.587	0.357	0.730	-0.488	0.873	-1.546
0.016	62.468	0.159	5.969	0.302	2.688	0.445	1.290	0.588	0.351	0.731	-0.494	0.874	-1.555
0.017	58.790	0.160	5.927	0.303	2.675	0.446	1.283	0.589	0.346	0.732	-0.500	0.875	-1.565
0.018	55.520	0.161	5.886	0.304	2.662	0.447	1.275	0.590	0.340	0.733	-0.506	0.876	-1.575
0.019	52.594	0.162	5.846	0.305	2.649	0.448	1.268	0.591	0.334	0.734	-0.512	0.877	-1.585
0.020	49.960	0.163	5.806	0.306	2.636	0.449	1.260	0.592	0.328	0.735	-0.518	0.878	-1.595
0.021	47.577	0.164	5.767	0.307	2.623	0.450	1.253	0.593	0.322	0.736	-0.525	0.879	-1.605
0.022	45.411	0.165	5.728	0.308	2.610	0.451	1.245	0.594	0.316	0.737	-0.531	0.880	-1.615
0.023	43.432	0.166	5.689	0.309	2.597	0.452	1.238	0.595	0.310	0.738	-0.537	0.881	-1.625

x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i
0.024	41.619	0.167	5.651	0.310	2.585	0.453	1.231	0.596	0.304	0.739	-0.543	0.882	-1.636
0.025	39.950	0.168	5.613	0.311	2.572	0.454	1.223	0.597	0.298	0.740	-0.550	0.883	-1.646
0.026	38.410	0.169	5.576	0.312	2.560	0.455	1.216	0.598	0.292	0.741	-0.556	0.884	-1.656
0.027	36.983	0.170	5.539	0.313	2.547	0.456	1.208	0.599	0.286	0.742	-0.562	0.885	-1.667
0.028	35.658	0.171	5.503	0.314	2.535	0.457	1.201	0.600	0.280	0.743	-0.568	0.886	-1.677
0.029	34.425	0.172	5.466	0.315	2.522	0.458	1.194	0.601	0.274	0.744	-0.575	0.887	-1.688
0.030	33.273	0.173	5.431	0.316	2.510	0.459	1.187	0.602	0.269	0.745	-0.581	0.888	-1.699
0.031	32.196	0.174	5.396	0.317	2.498	0.460	1.179	0.603	0.263	0.746	-0.587	0.889	-1.709
0.032	31.186	0.175	5.361	0.318	2.486	0.461	1.172	0.604	0.257	0.747	-0.594	0.890	-1.720
0.033	30.237	0.176	5.326	0.319	2.474	0.462	1.165	0.605	0.251	0.748	-0.600	0.891	-1.731
0.034	29.344	0.177	5.292	0.320	2.462	0.463	1.158	0.606	0.245	0.749	-0.606	0.892	-1.742
0.035	28.501	0.178	5.258	0.321	2.450	0.464	1.150	0.607	0.239	0.750	-0.613	0.893	-1.753
0.036	27.706	0.179	5.225	0.322	2.438	0.465	1.143	0.608	0.233	0.751	-0.619	0.894	-1.764
0.037	26.953	0.180	5.192	0.323	2.426	0.466	1.136	0.609	0.227	0.752	-0.625	0.895	-1.776
0.038	26.240	0.181	5.159	0.324	2.414	0.467	1.129	0.610	0.222	0.753	-0.632	0.896	-1.787
0.039	25.563	0.182	5.126	0.325	2.402	0.468	1.122	0.611	0.216	0.754	-0.638	0.897	-1.798
0.040	24.920	0.183	5.094	0.326	2.391	0.469	1.115	0.612	0.210	0.755	-0.644	0.898	-1.810
0.041	24.308	0.184	5.063	0.327	2.379	0.470	1.108	0.613	0.204	0.756	-0.651	0.899	-1.822
0.042	23.725	0.185	5.031	0.328	2.368	0.471	1.100	0.614	0.198	0.757	-0.657	0.900	-1.833
0.043	23.170	0.186	5.000	0.329	2.356	0.472	1.093	0.615	0.192	0.758	-0.664	0.901	-1.845
0.044	22.639	0.187	4.969	0.330	2.345	0.473	1.086	0.616	0.186	0.759	-0.670	0.902	-1.857
0.045	22.132	0.188	4.939	0.331	2.333	0.474	1.079	0.617	0.180	0.760	-0.677	0.903	-1.869
0.046	21.647	0.189	4.908	0.332	2.322	0.475	1.072	0.618	0.175	0.761	-0.683	0.904	-1.881
0.047	21.183	0.190	4.878	0.333	2.311	0.476	1.065	0.619	0.169	0.762	-0.690	0.905	-1.893
0.048	20.737	0.191	4.849	0.334	2.299	0.477	1.058	0.620	0.163	0.763	-0.696	0.906	-1.906
0.049	20.310	0.192	4.820	0.335	2.288	0.478	1.051	0.621	0.157	0.764	-0.703	0.907	-1.918
0.050	19.900	0.193	4.790	0.336	2.277	0.479	1.044	0.622	0.151	0.765	-0.709	0.908	-1.931
0.051	19.506	0.194	4.762	0.337	2.266	0.480	1.037	0.623	0.145	0.766	-0.716	0.909	-1.943

x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i
0.052	19.127	0.195	4.733	0.338	2.255	0.481	1.030	0.624	0.140	0.767	-0.722	0.910	-1.956
0.053	18.762	0.196	4.705	0.339	2.244	0.482	1.024	0.625	0.134	0.768	-0.729	0.911	-1.969
0.054	18.410	0.197	4.677	0.340	2.233	0.483	1.017	0.626	0.128	0.769	-0.735	0.912	-1.982
0.055	18.072	0.198	4.649	0.341	2.222	0.484	1.010	0.627	0.122	0.770	-0.742	0.913	-1.995
0.056	17.745	0.199	4.622	0.342	2.211	0.485	1.003	0.628	0.116	0.771	-0.749	0.914	-2.009
0.057	17.430	0.200	4.595	0.343	2.200	0.486	0.996	0.629	0.110	0.772	-0.755	0.915	-2.022
0.058	17.125	0.201	4.568	0.344	2.190	0.487	0.989	0.630	0.104	0.773	-0.762	0.916	-2.035
0.059	16.831	0.202	4.541	0.345	2.179	0.488	0.982	0.631	0.099	0.774	-0.768	0.917	-2.049
0.060	16.547	0.203	4.514	0.346	2.168	0.489	0.975	0.632	0.093	0.775	-0.775	0.918	-2.063
0.061	16.271	0.204	4.488	0.347	2.158	0.490	0.969	0.633	0.087	0.776	-0.782	0.919	-2.077
0.062	16.005	0.205	4.462	0.348	2.147	0.491	0.962	0.634	0.081	0.777	-0.789	0.920	-2.091
0.063	15.747	0.206	4.436	0.349	2.137	0.492	0.955	0.635	0.075	0.778	-0.795	0.921	-2.105
0.064	15.497	0.207	4.411	0.350	2.126	0.493	0.948	0.636	0.069	0.779	-0.802	0.922	-2.120
0.065	15.254	0.208	4.386	0.351	2.116	0.494	0.942	0.637	0.064	0.780	-0.809	0.923	-2.134
0.066	15.019	0.209	4.360	0.352	2.105	0.495	0.935	0.638	0.058	0.781	-0.815	0.924	-2.149
0.067	14.791	0.210	4.336	0.353	2.095	0.496	0.928	0.639	0.052	0.782	-0.822	0.925	-2.164
0.068	14.570	0.211	4.311	0.354	2.085	0.497	0.921	0.640	0.046	0.783	-0.829	0.926	-2.179
0.069	14.355	0.212	4.286	0.355	2.075	0.498	0.915	0.641	0.040	0.784	-0.836	0.927	-2.195
0.070	14.145	0.213	4.262	0.356	2.064	0.499	0.908	0.642	0.034	0.785	-0.843	0.928	-2.210
0.071	13.942	0.214	4.238	0.357	2.054	0.500	0.901	0.643	0.029	0.786	-0.849	0.929	-2.226
0.072	13.745	0.215	4.214	0.358	2.044	0.501	0.895	0.644	0.023	0.787	-0.856	0.930	-2.242
0.073	13.552	0.216	4.191	0.359	2.034	0.502	0.888	0.645	0.017	0.788	-0.863	0.931	-2.258
0.074	13.365	0.217	4.167	0.360	2.024	0.503	0.881	0.646	0.011	0.789	-0.870	0.932	-2.274
0.075	13.183	0.218	4.144	0.361	2.014	0.504	0.875	0.647	0.005	0.790	-0.877	0.933	-2.290
0.076	13.006	0.219	4.121	0.362	2.004	0.505	0.868	0.648	0.000	0.791	-0.884	0.934	-2.307
0.077	12.833	0.220	4.098	0.363	1.994	0.506	0.862	0.649	-0.006	0.792	-0.891	0.935	-2.324
0.078	12.664	0.221	4.075	0.364	1.984	0.507	0.855	0.650	-0.012	0.793	-0.898	0.936	-2.341
0.079	12.500	0.222	4.053	0.365	1.974	0.508	0.848	0.651	-0.018	0.794	-0.905	0.937	-2.359

x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i
0.080	12.340	0.223	4.031	0.366	1.965	0.509	0.842	0.652	-0.024	0.795	-0.912	0.938	-2.376
0.081	12.183	0.224	4.009	0.367	1.955	0.510	0.835	0.653	-0.030	0.796	-0.919	0.939	-2.394
0.082	12.031	0.225	3.987	0.368	1.945	0.511	0.829	0.654	-0.035	0.797	-0.926	0.940	-2.412
0.083	11.882	0.226	3.965	0.369	1.935	0.512	0.822	0.655	-0.041	0.798	-0.933	0.941	-2.431
0.084	11.736	0.227	3.943	0.370	1.926	0.513	0.816	0.656	-0.047	0.799	-0.940	0.942	-2.449
0.085	11.594	0.228	3.922	0.371	1.916	0.514	0.809	0.657	-0.053	0.800	-0.947	0.943	-2.468
0.086	11.455	0.229	3.901	0.372	1.907	0.515	0.803	0.658	-0.059	0.801	-0.954	0.944	-2.488
0.087	11.320	0.230	3.879	0.373	1.897	0.516	0.796	0.659	-0.065	0.802	-0.962	0.945	-2.507
0.088	11.187	0.231	3.859	0.374	1.888	0.517	0.790	0.660	-0.070	0.803	-0.969	0.946	-2.527
0.089	11.057	0.232	3.838	0.375	1.878	0.518	0.783	0.661	-0.076	0.804	-0.976	0.947	-2.548
0.090	10.931	0.233	3.817	0.376	1.869	0.519	0.777	0.662	-0.082	0.805	-0.983	0.948	-2.568
0.091	10.807	0.234	3.797	0.377	1.859	0.520	0.770	0.663	-0.088	0.806	-0.990	0.949	-2.590
0.092	10.685	0.235	3.776	0.378	1.850	0.521	0.764	0.664	-0.094	0.807	-0.998	0.950	-2.611
0.093	10.566	0.236	3.756	0.379	1.841	0.522	0.758	0.665	-0.100	0.808	-1.005	0.951	-2.633
0.094	10.450	0.237	3.736	0.380	1.831	0.523	0.751	0.666	-0.106	0.809	-1.012	0.952	-2.655
0.095	10.336	0.238	3.716	0.381	1.822	0.524	0.745	0.667	-0.111	0.810	-1.019	0.953	-2.678
0.096	10.224	0.239	3.697	0.382	1.813	0.525	0.738	0.668	-0.117	0.811	-1.027	0.954	-2.701
0.097	10.115	0.240	3.677	0.383	1.804	0.526	0.732	0.669	-0.123	0.812	-1.034	0.955	-2.724
0.098	10.007	0.241	3.658	0.384	1.795	0.527	0.726	0.670	-0.129	0.813	-1.042	0.956	-2.748
0.099	9.902	0.242	3.638	0.385	1.786	0.528	0.719	0.671	-0.135	0.814	-1.049	0.957	-2.773
0.100	9.799	0.243	3.619	0.386	1.776	0.529	0.713	0.672	-0.141	0.815	-1.056	0.958	-2.798
0.101	9.698	0.244	3.600	0.387	1.767	0.530	0.707	0.673	-0.147	0.816	-1.064	0.959	-2.824
0.102	9.599	0.245	3.581	0.388	1.758	0.531	0.700	0.674	-0.152	0.817	-1.071	0.960	-2.850
0.103	9.502	0.246	3.563	0.389	1.749	0.532	0.694	0.675	-0.158	0.818	-1.079	0.961	-2.877
0.104	9.407	0.247	3.544	0.390	1.741	0.533	0.688	0.676	-0.164	0.819	-1.087	0.962	-2.905
0.105	9.313	0.248	3.526	0.391	1.732	0.534	0.681	0.677	-0.170	0.820	-1.094	0.963	-2.933
0.106	9.221	0.249	3.507	0.392	1.723	0.535	0.675	0.678	-0.176	0.821	-1.102	0.964	-2.962
0.107	9.131	0.250	3.489	0.393	1.714	0.536	0.669	0.679	-0.182	0.822	-1.109	0.965	-2.992

x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i								
0.108	9.042	0.251	3.471	0.394	1.705	0.537	0.662	0.680	-0.188	0.823	-1.117	0.966	-3.022
0.109	8.955	0.252	3.453	0.395	1.696	0.538	0.656	0.681	-0.194	0.824	-1.125	0.967	-3.054
0.110	8.870	0.253	3.435	0.396	1.687	0.539	0.650	0.682	-0.199	0.825	-1.132	0.968	-3.086
0.111	8.786	0.254	3.418	0.397	1.679	0.540	0.644	0.683	-0.205	0.826	-1.140	0.969	-3.119
0.112	8.704	0.255	3.400	0.398	1.670	0.541	0.637	0.684	-0.211	0.827	-1.148	0.970	-3.154
0.113	8.623	0.256	3.383	0.399	1.661	0.542	0.631	0.685	-0.217	0.828	-1.156	0.971	-3.189
0.114	8.543	0.257	3.365	0.400	1.653	0.543	0.625	0.686	-0.223	0.829	-1.164	0.972	-3.226
0.115	8.465	0.258	3.348	0.401	1.644	0.544	0.619	0.687	-0.229	0.830	-1.171	0.973	-3.264
0.116	8.388	0.259	3.331	0.402	1.635	0.545	0.612	0.688	-0.235	0.831	-1.179	0.974	-3.303
0.117	8.312	0.260	3.314	0.403	1.627	0.546	0.606	0.689	-0.241	0.832	-1.187	0.975	-3.344
0.118	8.237	0.261	3.297	0.404	1.618	0.547	0.600	0.690	-0.247	0.833	-1.195	0.976	-3.386
0.119	8.164	0.262	3.280	0.405	1.610	0.548	0.594	0.691	-0.253	0.834	-1.203	0.977	-3.430
0.120	8.092	0.263	3.264	0.406	1.601	0.549	0.588	0.692	-0.258	0.835	-1.211	0.978	-3.476
0.121	8.021	0.264	3.247	0.407	1.593	0.550	0.581	0.693	-0.264	0.836	-1.219	0.979	-3.524
0.122	7.951	0.265	3.231	0.408	1.585	0.551	0.575	0.694	-0.270	0.837	-1.227	0.980	-3.575
0.123	7.883	0.266	3.214	0.409	1.576	0.552	0.569	0.695	-0.276	0.838	-1.236	0.981	-3.628
0.124	7.815	0.267	3.198	0.410	1.568	0.553	0.563	0.696	-0.282	0.839	-1.244	0.982	-3.683
0.125	7.749	0.268	3.182	0.411	1.559	0.554	0.557	0.697	-0.288	0.840	-1.252	0.983	-3.742
0.126	7.683	0.269	3.166	0.412	1.551	0.555	0.551	0.698	-0.294	0.841	-1.260	0.984	-3.804
0.127	7.619	0.270	3.150	0.413	1.543	0.556	0.545	0.699	-0.300	0.842	-1.268	0.985	-3.870
0.128	7.555	0.271	3.134	0.414	1.535	0.557	0.538	0.700	-0.306	0.843	-1.277	0.986	-3.941
0.129	7.492	0.272	3.118	0.415	1.526	0.558	0.532	0.701	-0.312	0.844	-1.285	0.987	-4.016
0.130	7.431	0.273	3.103	0.416	1.518	0.559	0.526	0.702	-0.318	0.845	-1.293	0.988	-4.098
0.131	7.370	0.274	3.087	0.417	1.510	0.560	0.520	0.703	-0.324	0.846	-1.302	0.989	-4.186
0.132	7.310	0.275	3.072	0.418	1.502	0.561	0.514	0.704	-0.330	0.847	-1.310	0.990	-4.283
0.133	7.251	0.276	3.056	0.419	1.494	0.562	0.508	0.705	-0.336	0.848	-1.319	0.991	-4.390
0.134	7.193	0.277	3.041	0.420	1.486	0.563	0.502	0.706	-0.342	0.849	-1.327	0.992	-4.509
0.135	7.136	0.278	3.026	0.421	1.477	0.564	0.496	0.707	-0.348	0.850	-1.336	0.993	-4.644

x_i	B_i	x_i	B_i	x_i	B_i								
0.136	7.079	0.279	3.011	0.422	1.469	0.565	0.490	0.708	-0.354	0.851	-1.344	0.994	-4.800
0.137	7.024	0.280	2.996	0.423	1.461	0.566	0.484	0.709	-0.360	0.852	-1.353	0.995	-4.984
0.138	6.969	0.281	2.981	0.424	1.453	0.567	0.477	0.710	-0.366	0.853	-1.362	0.996	-5.209
0.139	6.914	0.282	2.966	0.425	1.445	0.568	0.471	0.711	-0.372	0.854	-1.371	0.997	-5.498
0.140	6.861	0.283	2.952	0.426	1.437	0.569	0.465	0.712	-0.378	0.855	-1.379	0.998	-5.905
0.141	6.808	0.284	2.937	0.427	1.429	0.570	0.459	0.713	-0.384	0.856	-1.388	0.999	-6.599
0.142	6.756	0.285	2.923	0.428	1.422	0.571	0.453	0.714	-0.390	0.857	-1.397		
0.143	6.705	0.286	2.908	0.429	1.414	0.572	0.447	0.715	-0.396	0.858	-1.406		

I valori di B_i sono stati calcolati in accordo all'equazione $B_i = \frac{1}{x_i} + \ln \frac{(1-x_i)}{(1+x_i)}$ assegnando ad x_i i valori compresi nell'intervallo da 0.001 a 0.999.

SUPPLEMENTO

A method to evaluate capacity and efficiency of water soluble antioxidants as peroxy radical scavengers

Lucio Zennaro ^{a,d}, Monica Rossetto ^{a,d}, Paola Vanzani ^{a,e}, Veronica De Marco ^a,
Marina Scarpa ^{b,d}, Leontino Battistin ^{c,e}, Adelio Rigo ^{a,e,*}

^a Department of Biological Chemistry, University of Padova, viale G. Colombo 3, 35121 Padova, Italy

^b Department of Physics, University of Trento, via Sommarive 14, 38100 Povo (TN), Italy

^c Department of Neuroscience, University of Padova, via N. Giustiniani 5, 35121 Padova, Italy

^d Consortium INBB, Section of Padova, via Medaglie d'Oro 305, 00136 Roma, Italy

^e IRCCS, S. Camillo Hospital, Venice, Italy

Received 22 December 2006, and in revised form 7 March 2007

Available online 5 April 2007

Abstract

In this paper, we report on a method to evaluate the activity of water soluble and H-atom donor antioxidants as peroxy radical scavengers in a micelle system reproducing the conditions occurring in the upper small intestine in humans, during digestion and absorption of lipids. This method, which overcomes some of the problems of the total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) assays, measures the peroxy radical trapping capacity (n) and the peroxy radical trapping efficiency IC_{50}^{-1} of antioxidants, that is the number “ n ” of peroxy radicals trapped by one molecule of the studied antioxidant and the reciprocal of the antioxidant concentration that halves the steady-state concentration of peroxy radicals, respectively. These two fundamental parameters characterizing the radical chain breaking of many water soluble antioxidants, among which dietary polyphenols, can be obtained with relatively good precision from a single experiment, on the basis of a rigorous treatment of the kinetic data.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Antioxidant capacity; Antioxidant efficiency; Lipid peroxidation; Antioxidant reaction kinetics; Free radical reactions; Antioxidant activity assay

One of the main properties of an antioxidant is the ability to trap highly reactive free radicals, such as peroxy radicals involved in auto-oxidation of lipoproteins and of biological membranes that are responsible of degenerative processes among which the formation of atherosclerotic plaque and of microvascular damage

[1,2]. The emerging role of antioxidants, in particular of some classes of dietary polyphenols (PP),¹ is associated also with the protective effect in age-related neurological dysfunctions [3].

Kinetic studies on inhibition by antioxidants of autoxidation of biological membranes promoted by peroxy radicals [4–6] outlined the importance of studying this process using aqueous micelle systems and soluble peroxy radicals [4]. The ability of an antioxidant to scavenge peroxy radicals is characterized by two parameters, i.e. the peroxy

BHT, 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol; AAPH, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride; LG, rac1-lauroylglycerol; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; DCA, deoxycholic acid sodium salt monohydrate.

* Corresponding author. Address: Department of Biological Chemistry, University of Padova, viale G. Colombo 3, 35121 Padova, Italy. Fax: +39 049 807 33 10.

E-mail address: adelio.rigo@unipd.it (A. Rigo).

¹ Abbreviations used: TRAP, radical trapping antioxidant parameter; PP, polyphenols; LT, lag time; SDS, sodium dodecyl sulfate; LOO[•], linoleic acid peroxy radicals; ABIP, 2,2'-azobis(2'-(2-imidazolyl)propane dihydrochloride); AIBN, 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile); trolox, (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid;

radical trapping capacity (n) and the peroxy radical trapping efficiency IC_{50}^{-1} of antioxidants. The peroxy radical trapping capacity is connected to the stoichiometry of the peroxidation process, that is the total number “ n ” of peroxy radicals trapped by one molecule of antioxidant and by its reaction products. The peroxy radical trapping efficiency is related to the kinetic rate constant of the trapping process, and is expressed as IC_{50}^{-1} that represents the reciprocal of the antioxidant concentration that halves the rate of oxygen consumption due to the peroxidation process.

Among the many methods that have been proposed for the measurement of the antioxidant activity [7], the measurement of both n and inhibition kinetic rate constant is considered only by few authors [8–13], which developed assay methods that take advantage by the use of azo-compounds as constant sources of free radicals in aqueous solutions containing micelle systems. These methods are the basis of TRAP (total radical trapping antioxidant parameter) assays [14,15], which however measure only the value of n [16,17] from the lag time (LT) of the inhibition process.

Although, the use of a constant source of free radicals makes easier the treatment of kinetic experimental data, some problems, both experimental and theoretical, must be solved to obtain correct values of n and IC_{50}^{-1} . In fact the inhibition of peroxidation of linoleic acid (LH) in sodium dodecyl sulfate (SDS) micelle systems by some classes of antioxidants, such as catechins, hydroxycinnamic acids, etc. does not show a clear lag phase. This behavior is probably due to their relatively low reactivity as H-atom donors in the reaction with peroxy radicals, associated with a remarkable trapping capacity of their reaction products. As a consequence, it is not possible to evaluate the trapping capacity of these classes of compounds [18]. Furthermore, the simplified solution of the equations relative to the kinetic scheme proposed by Pryor [9,10] does not properly describe the experimental data because it does not take into account the fraction of linoleic acid peroxy radicals (LOO^{\cdot}), which disappear by mutual interaction (see below). In addition it requires more than one experimental run to obtain the values of n and IC_{50}^{-1} .

A more rigorous treatment of the kinetic data obtained by monitoring the oxygen consumption that accompanies the chain peroxidation of methyl linoleate in Triton X-100 micelle system, in the presence of antioxidants, has been proposed [19]. This method indeed strictly requires the full disappearance of the inhibitory effect of the antioxidant within the time course of the experimental run. Unfortunately, beyond the impossibility (observed with many compounds or antioxidant systems) to achieve the total disappearance of the antioxidant action, the increase of the inhibition with time observed in the presence of some antioxidants and the long experimental time course (2–3 h in some cases) make difficult or impossible to obtain correct results.

Alternatively to SDS or Triton X-100 based micelle systems, a more physiological system should be considered. In particular it has been shown that mixed micelles

are generated during lipid digestion and absorption in the upper small intestine [20,21]. Furthermore, during gastrointestinal digestion of food containing oxidized fatty acid, the presence of food constituents, such as heme derivatives, generates highly reactive free radicals in the upper part of the gastrointestinal tract where the oxygen concentration is rather high [22,23]. These radicals lead to a fast lipid peroxidation which produces cytotoxic, mutagenic and atherogenic compounds that may pose a menace to human health [22,24]. Therefore foodstuff with high antioxidant content, such as polyphenols, may contribute to prevent the formation of these dangerous by-products [22,25].

In this paper, we report on a micelle system containing LH, which mimics the conditions occurring in the upper small intestine and overcomes the problems of the SDS and Triton X-100 micelle based systems. Furthermore the proposed method is based on a rigorous treatment of the kinetic data that permits a good fit of the experimental data to the kinetic equations and enables to obtain from a single kinetic run the two fundamental parameters, n and IC_{50}^{-1} , characterizing the antioxidant action of a pure compound without requiring the full disappearance of the antioxidant during the experimental time course.

Materials and methods

Reagents

The chemicals were of analytical reagent grade and were used without further purification. 2,2'-Azobis(2'-(2-imidazolin-2-yl)propane dihydrochloride (ABIP) was a kind gift of Wako Chemicals (Germany) while 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN), (\pm)- α -tocopherol, rac1-lauroylglycerol (LG), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) and protocatechuic acid were obtained from Sigma-Aldrich (Milano, Italy). Linoleic acid (LH), deoxycholic acid sodium salt monohydrate (DCA), (+)-catechin, caffeic acid, chlorogenic acid, (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox), uric acid, ascorbic acid, 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland) and were of the highest available quality. Cyanidin-3-*O*- β -glucoside and delphinidin (HPLC grade) were obtained from Extrasynthese (France). Deionized water, quartz bidistilled, was used to prepare all the aqueous solutions. When necessary these solutions were purified by a Chelex-100 column (Bio-Rad, Richmond, CA) to minimize the concentration of heavy metal ions. All the antioxidant standard solutions were prepared in absolute ethanol.

Measurement of the peroxy radical scavenging activity

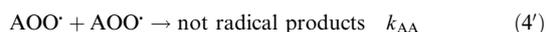
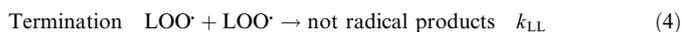
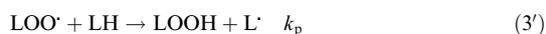
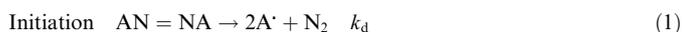
The rate of LH peroxidation was measured from the rate of O_2 disappearance, in the presence and in the absence of an antioxidant. A Yellow Spring Oxygen electrode with a Metrohm 663 VA stand was used, inserted into a home built thermostated oxygraphic cell (volume 3 mL) equipped with a magnetic stirrer. The working electrode was poised at -800 mV vs Ag/AgCl, while the current was recorded and digitalized by a personal computer equipped with a data acquisition board (DAQ PCI-6221, M series, National Instruments, Austin, TX). The experimental oxygraphic traces were automatically processed by means of a software developed in our laboratory to obtain oxygen consumption rates and to calculate n and IC_{50}^{-1} values.

ABIP was generally used as a constant source of peroxy radicals. This azo compound at pH 7 is water soluble and slowly decomposes according to a first-order kinetic rate law, being the kinetic rate constant $k_d = (4.07 \pm 0.22) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ at 37°C [18].

The test solution was prepared by drying 350 μL of 10 mM LG in dichloromethane and by dissolving the obtained film in 7 mL of 5 mM DCA in 20 mM phosphate buffer, pH 7.4. Linoleic acid (2 mM final concentration) was then added and the resulting solution was stirred continuously in the oxygraphic cell, thermostated usually at $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$. After thermal equilibrium was achieved, a concentrated solution of ABIP was added and the oxygen consumption rate due to the uninhibited autoxidation of linoleic acid was recorded for some minutes. At the end of this period the antioxidant was injected into the test solution and the rate of oxygen consumption of the inhibited reaction was followed until the O_2 disappearance. The rates of oxygen consumption before and after the antioxidant injection, α'_0 and α'_t , respectively, were calculated from the slope of the oxygraphic record, see Fig. 1, curves a and b, respectively.

The kinetic analysis

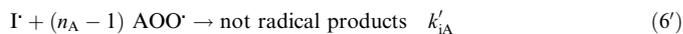
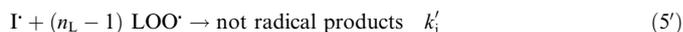
The theory of lipid peroxidation developed some years ago [26] is summarized in a simple form in the following scheme:



where $\text{AN}=\text{NA}$ is an azo compound, that is a constant source of free radicals, and LH is the peroxidized molecule.

The reaction (1') represents the O_2 consumption in the absence of LH . In the presence of an H-atom donor antioxidant (IH), beyond the reac-

tions 4,4',4'' the following termination reactions must be taken into account.



where n_L and n_A are the number of LOO^{\cdot} and AOO^{\cdot} radicals, respectively, terminated by one molecule of the antioxidant IH and by its reactions products, being $n_L + n_A = n$.

Reaction (5') (and the correspondent k'_i value) takes into account all the possible reactions of the antioxidant molecule with peroxy radicals occurring after the abstraction of the first H-atom from the antioxidant by these radicals. In particular, in the case of some polyphenols such reactions, beyond radical-radical termination, can be the addition of the peroxy radicals to the quinones, which could be generated by dismutation of semiquinone intermediates, or to the unsaturated systems formed by partial polymerization of the polyphenol radical intermediates [27]. These addition reactions require less energy than that necessary for H-abstraction (60–80 kcal/mole) [28] and therefore k'_i values are higher than the values of k_i . To this regard n values $\gg 2$ (up to 12) have been reported in the case of some polyphenols [11]. These high values have been explained by the participation of oxidative products of polyphenols in the inhibition, with products being more reactive toward LOO^{\cdot} than parent compounds [11].

In the above reported scheme the reactions (4'), (4'') and (6') involving AOO^{\cdot} radicals were accounted for, since AOO^{\cdot} and LOO^{\cdot} radicals may have different behaviour due to the differences in the electrical charge and/or in their distribution between the micelle and aqueous phase. However, these reactions can be neglected operating with a length of kinetic chains (ν) of the propagation step >10 , being in this case $n \approx n_L$. Furthermore, in this kinetic scheme, we took into account both the rate of O_2 consumption (R_0) by reaction (1') (cage escape of the geminate pair of A radicals), and the rate of initiation of peroxidation chain of LH (R_i) through reaction (2), being $R_0 > R_i$ [29].

The rates, at time t , of O_2 consumption due to LH peroxidation only, in the absence (α_0) and in the presence (α_t) of the inhibitor, were calculated on the basis of the above reported kinetic scheme and of the following assumptions:

- The reactions involving molecular oxygen (1') and (3) are not rate limiting and are independent of O_2 concentration, at least until $[\text{O}_2] \geq 0.10 [\text{O}_2]_0$, where $[\text{O}_2]_0$ is the initial O_2 concentration.
- The rates of generation of AOO^{\cdot} and LOO^{\cdot} radicals, and therefore R_0 and R_i , are constant during the experiment.
- The LH concentration is constant, being $[\text{LH}] \gg [\text{O}_2]$.
- $k'_i \gg k_i$ and $\nu > 10$.

In particular, we obtained

$$\alpha_0 = \alpha'_0 - R_0 = - \left(\frac{d[\text{O}_2]}{dt} \right)_{\text{IH}=0} = k_p [\text{LOO}^{\cdot}]_{\text{IH}=0} [\text{LH}] \quad (7)$$

$$\alpha_t = \alpha'_t - R_0 = - \left(\frac{d[\text{O}_2]}{dt} \right)_{\text{IH} \neq 0} = k_p [\text{LOO}^{\cdot}]_{\text{IH} \neq 0} [\text{LH}] \quad (8)$$

where the concentrations $[\text{LOO}^{\cdot}]_{\text{IH}=0}$ and $[\text{LOO}^{\cdot}]_{\text{IH} \neq 0}$ of the peroxy radicals of LH , according to the steady-state hypothesis, which assumes that the reaction between LOO^{\cdot} radicals and the IH antioxidant is a first-order process with respect to IH (see Supplementary material), are

$$[\text{LOO}^{\cdot}]_{\text{IH}=0} = \sqrt{\frac{R_i}{2k_{LL}}} \quad (9)$$

and

$$[\text{LOO}^{\cdot}]_{\text{IH} \neq 0} = \frac{\sqrt{(n \cdot k_i \cdot [\text{IH}])^2 + 8R_i \cdot k_{LL} - n \cdot k_i \cdot [\text{IH}]}}{4k_{LL}} \quad (10)$$

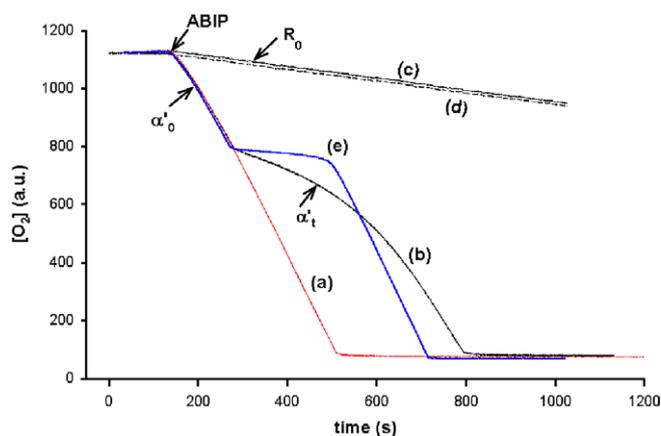


Fig. 1. Representative oxygraphic records of peroxidation of linoleic acid in an aqueous micelle system in the presence and in the absence of an antioxidant. The peroxidation of 2 mM LH was carried out at 37°C by decomposition of 4 mM ABIP in the micelle system 5 mM DCA, 0.5 mM LG, in the absence of antioxidants (curve a), in the presence of a water soluble antioxidant (3 μM trolox, curve b) and in the presence of a lipid soluble antioxidant (2 μM α -tocopherol, curve e). For comparison the curve c represents the oxygraphic trace obtained during the decomposition of 4 mM ABIP in the micelle system 5 mM DCA, 0.5 mM LG, in the absence of LH . In the case of curve d, 10 μM trolox was added.

Results and discussion

Dependence of the rate of oxygen consumption on the components of the test solution

The addition of an azo-compound, as a constant source of peroxy radicals, to a micelle system such as DCA–LG–LH or SDS–LH establishes a high and constant consumption rate α'_0 of the dissolved oxygen (see reactions (1') and (3)), until its total disappearance, see Fig. 1, curve a. The presence of a water soluble antioxidant such as trolox at a concentration higher than its IC_{50} leads to a strong decrease of the rate of oxygen consumption α'_t , see Fig. 1, curve b. This rate is initially close to R_0 , that is the rate of O_2 consumption due to the generation of AOO^\bullet radicals, and significantly increases with time due to the decrease of IH concentration throughout the reactions (5) and (5') with peroxy LOO^\bullet radicals. With the progress of the IH disappearance, the rate of oxygen consumption tends to resume the initial value α'_0 .

A similar experiment carried out in the absence of both LH and IH shows a much slower rate of O_2 disappearance (R_0), which we attributed to the AOO^\bullet radical generation according to Eq. (1') (see Fig. 1, curve c). No significant change of the rate R_0 was observed after the addition to this system of IH, at a concentration much higher than its IC_{50} value, see Fig. 1, curve d. This behaviour indicates that the primary radicals A^\bullet , generated by thermal decomposition of ABIP according to reaction (1), react much faster with O_2 than with the added antioxidant molecule.

If in the experiment represented in Fig. 1, curve b, a water insoluble antioxidant such as α -tocopherol is substituted for trolox, the full inhibition of LH chain peroxidation is obtained. The inhibition appears independent of α -tocopherol concentration until its complete disappearance, as it clearly appears from Fig. 1, curve e. In this case we are in the presence of a zero-order process with respect

to IH and the calculation of the n value is straightforward (simple titration of the antioxidant by AOO^\bullet radicals).

Theory and experiment: possible errors in evaluation of n and IC_{50}

In previous papers [8–10] dealing with the measurement of the efficiency and capacity of an antioxidant IH, oxygraphic traces similar to those shown in Fig. 2 were reported for many antioxidants. The values of n and of the ratio $k_i/\sqrt{k_p}$, which is related to IC_{50}^{-1} , were calculated from the measurement of the lag time (LT) and from the evaluation of the slope of the initial part of the oxygraphic trace, respectively, according to a simplified equation scheme [9,10] which does not take into account the fraction of LOO^\bullet radicals disappearing by mutual interaction. In fact in this case the relationship used to calculate n was [30]

$$n = R_i LT / [IH]_0 \quad (11)$$

where $[IH]_0$ is the initial antioxidant concentration.

The fraction of LOO^\bullet radicals, which react according to reaction (4), continuously increases with the decrease of IH concentration, being 25% at $\alpha_t/\alpha_0 = 0.5$ and about 50% at $\alpha_t/\alpha_0 = 0.70$, see below. Neglecting this fraction brings to underestimate n and IC_{50}^{-1} . Moreover, as it is shown in Fig. 2, the n value depends on the length of the LT, which strictly depends on the slope of the final part of the oxygraphic trace. This slope is a function of many variables such as the delay of IH injection from the onset of peroxidation and the initial oxygen and antioxidant concentrations. Furthermore the inhibition process by some classes of antioxidants (e.g., catechins and hydroxycinnamic acids) in the SDS–LH system does not show any LT [18] (that is the rate of O_2 consumption after the addition of the antioxidant decreases to a value α'_0 which remains practically constant until the disappearance of oxygen). Therefore for

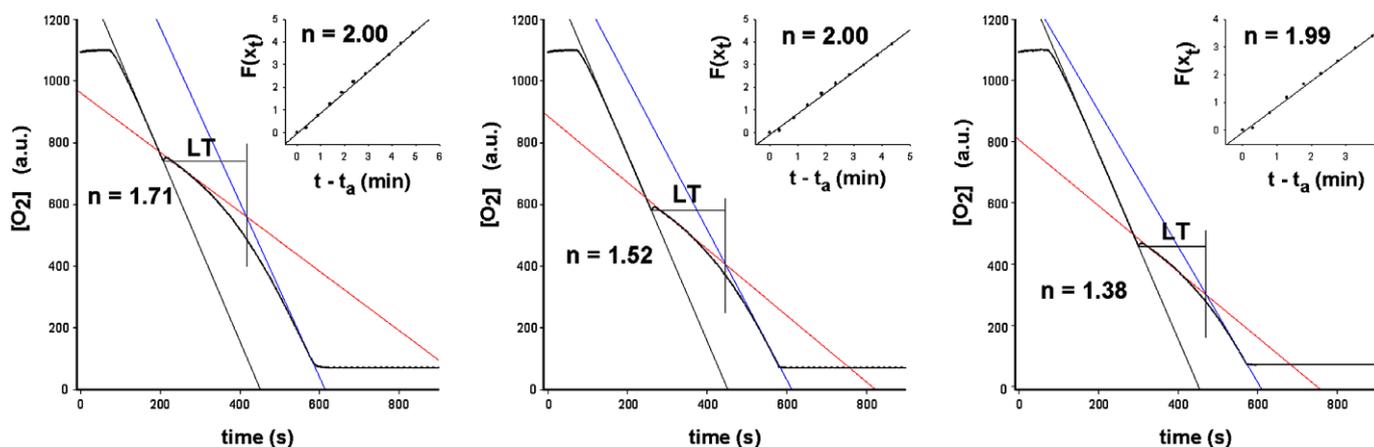


Fig. 2. Inhibition of LH peroxidation: dependence of the n value on the final value of the slope of the oxygraphic record. The experiments were performed by adding $2.30 \mu\text{M}$ trolox at various times from the onset of the peroxidation process. The values of n , calculated from the LT according to the usual standard procedure, are reported. The highest value of LT is obtained when the final value of the slope α'_t is equal to α'_0 (first panel). For the other experimental conditions see Fig. 1. Inset: plot of $F(x_t)$ vs $(t - t_a)$, according to the procedure we are proposing. The n values calculated according to this procedure are also reported.

such classes of antioxidants it is not possible to use the SDS micelle system for the measurement of n .

Lately Roginsky and Barsukova [12] proposed Triton X-100 as surfactant and methyl linoleate as the peroxidized molecule. They solved the kinetic equations relative to substituted hydroquinones used as chain breaking compounds, taking into account the reaction (4) as one of the termination processes of LOO^\bullet kinetic chains. However the proposed method requires both the progressive and the complete disappearance of the antioxidant IH, and of its reaction by-products having scavenging properties towards peroxy radicals, before oxygen disappearance. This means to achieve the condition $\alpha'_t/\alpha'_0 = 1.0$ before the complete disappearance of O_2 . In the case of many antioxidants it is difficult or impossible to fulfil this condition [11]. Furthermore, in the micelle system methyl linoleate–Triton X-100 a continuous increase of inhibition with time (decrease of α'_t) was reported [12] for some classes of antioxidants. This increase, which may last hours, makes difficult (or practically impossible) the evaluation of the antioxidant activity.

Theory and experiment: a new proposal—I. The micelle system

To overcome the above pointed out problems connected to the micelle systems containing SDS or Triton X-100, we tested various classes of surfactants. The bile salts were found particularly suitable as micelle system for antioxidant tests. Sodium salts of cholic acid, of taurocholic acid and of deoxycholic acid (DCA) were tested at various concentrations below and above their Critical Micellization Concentration. In general the problems observed for some classes of antioxidants in SDS–LH (absence of lag phase) or in methyl linoleate–Triton X-100 micelle systems (continuous increase of inhibition with time after injection of the antioxidant) were overcome. Among the tested micelle systems we chose a ternary lipid system constituted by 5 mM DCA, 2 mM LH and 0.5 mM LG, which is very close to that one present in the upper small intestine during fat digestion and absorption. According to equilibrium phase diagrams [20,31], the chosen ternary lipid system generates stable micelles with a maximum hydrodynamic radius of 40 Å, under the physiological conditions occurring in the upper small intestine. In this body compartment the concentration of molecular oxygen should be high enough to sustain lipid peroxidation the rate of which, according to Fig. 1, appears to be independent of the O_2 concentration down to sub-micromolar level. In fact according to some authors the oxygen concentration in human and pig digestive tract, and in particular in gastric fluids and in duodenum, has values approaching air-saturation [23,24,32].

Theory and experiment: a new proposal—II. The kinetic analysis

We propose to calculate simultaneously n and IC_{50}^{-1} values directly from a single O_2 experimental trace using

the relationships obtained on the basis of the following treatment.

Relationship between the antioxidant concentration and the rate of O_2 disappearance. From Eqs. (7) and (8) the following expression can be obtained

$$\frac{\alpha_t}{\alpha_0} = x_t = \frac{[\text{LOO}^\bullet]_{\text{IH} \neq 0}}{[\text{LOO}^\bullet]_{\text{IH} = 0}} \quad (12)$$

being x_t the ratio between the rate of O_2 disappearance (due to LH peroxidation) in the presence of IH at time t and the rate of the uninhibited peroxidation, α_0 , which is independent of time.

Introducing the steady-state concentration of LOO^\bullet radicals, see Eqs. (9) and (10), the following relationship between the concentration z_t of the antioxidant IH at the time t and x_t was obtained (see Supplementary material)

$$z_t = \left(\frac{1}{x_t} - x_t \right) \frac{\sqrt{2R_i}}{nq} \quad (13)$$

where $q = k_i/\sqrt{k_{\text{LL}}}$.

Remembering that IC_{50} is the IH concentration that halves the rate of O_2 consumption due LH peroxidation (i.e. the concentration halving the steady-state concentration of LOO^\bullet radicals), to which corresponds $x_t = 0.50$, it results

$$z_{x_t=0.5} = \text{IC}_{50} = 1.5 \frac{\sqrt{2R_i}}{n \cdot q} \quad (14)$$

Relationship between the fraction η of LOO^\bullet radicals scavenged by IH and the rate of O_2 disappearance. The fraction η of LOO^\bullet radicals, which disappear through the reaction with IH, is

$$\begin{aligned} \eta &= \left\{ \text{Rate of disappearance of } \text{LOO}^\bullet \text{ by reaction with IH} \right\} \\ &\quad / \left\{ \text{Rate of disappearance of } \text{LOO}^\bullet \text{ by reaction with IH} \right. \\ &\quad \left. + \text{rate of disappearance of } \text{LOO}^\bullet \text{ by reaction with itself} \right\} \\ &= \frac{k_i[\text{LOO}^\bullet]_{\text{IH} \neq 0}[\text{IH}]}{k_i[\text{LOO}^\bullet]_{\text{IH} \neq 0}[\text{IH}] + 2k_{\text{LL}}[\text{LOO}^\bullet]_{\text{IH} \neq 0}^2} \quad (15) \end{aligned}$$

Introducing the steady-state concentration of LOO^\bullet radicals, the following relationship is obtained (see Supplementary material)

$$\eta = 1 - x_t^2 \quad (16)$$

which elucidates the dependence of η on the rate of O_2 disappearance.

Relationship between the rate of O_2 disappearance and time. If in Eq. (11) we take into account η , and assuming η , n and R_i constant in time dt , the relationship between dt and the decrease dz of $[\text{IH}]$ due to the reaction with LOO^\bullet radicals is

$$dt = \frac{n}{R_i \eta} dz = \frac{n}{R_i} \cdot \frac{1}{(1 - x^2)} dz \quad (17)$$

Introducing the expression of dz obtained by differentiation of Eq. (13), and then integrating the resulting equation (see Supplementary material) between t_a and t , being $t > t_a > t_j =$ injection time of the antioxidant IH, the following relationship is obtained

$$\left(\frac{1}{x_a} - \frac{1}{x_t}\right) + \ln\left(\frac{1-x_a}{1+x_a}\right) + \ln\left(\frac{1+x_t}{1-x_t}\right) = C(t-t_a) \quad (18)$$

where the left side member is a function of x_t , that is

$$F(x_t) = C(t-t_a) \quad (19)$$

being $C = q\sqrt{R_i/2}$, and x_a the value of x_t at the time t_a . With t_a (which is a time as close as possible to t_j) we denote a time where the perturbation of the oxygraphic trace due to IH injection is no longer present (see below).

Eq. (19) shows the linear relationship existing between $F(x_t)$ and time and permits to obtain the value of C . This is achieved by introducing in Eq. (18) the x_a value and a series of x_t values obtained from the slope of the oxygraphic trace at various times t in the range $t_f > t > t_a$, being t_f the last value of t considered, see Fig. 3.

Extrapolation of x_j value and calculation of n and IC_{50} parameters. The oxygraphic trace usually appears perturbed after the injection of IH in the reaction cell, making difficult the measure of the slopes of the oxygraphic trace in the close proximity of the injection time t_j . This perturbation is due to the different oxygen concentration between the injected solution and the reaction system (generally $[O_2]_{\text{injected solution}} > [O_2]_{\text{reaction system}}$), and to the kinetics of IH distribution between the aqueous and the micelle phase. Therefore, instead of measuring x_j at the injection time t_j , we prefer to obtain it according to Eq. (18) rearranged as follows, after substitution of t_j and x_j for t and x_t , respectively

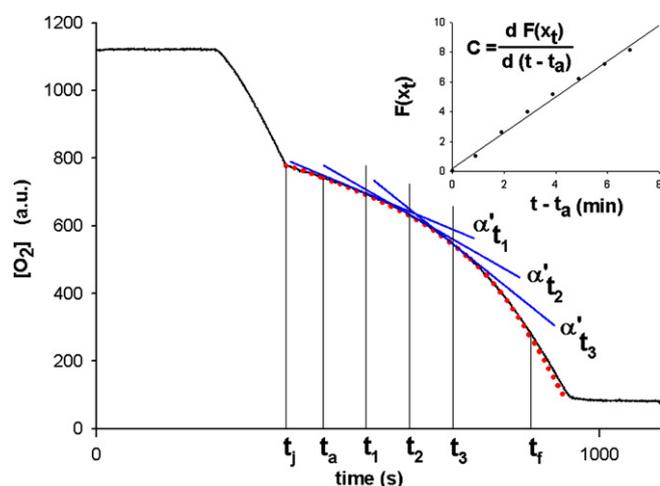


Fig. 3. Fitting procedure and assessment of the kinetic equations. The experimental oxygraphic trace (solid) of inhibition of LH peroxidation by 4.10 μM trolox was reconstructed (circle) according to Eq. (20) using the calculated C value, see text. The slopes α'_t at various times t were measured in the range t_a-t_f , being t_f the final value we considered for t , see text. For the other experimental conditions see Fig. 1. Inset: plot of $F(x_t)$ vs $(t-t_a)$. From this plot the value of the slope C is obtained.

$$\left(\frac{1}{x_j}\right) + \ln\left(\frac{1-x_j}{1+x_j}\right) = B_j \quad (20)$$

being the value of B_j obtained from the experimental data according to the following relationship obtained by rearrangement of Eq. (18)

$$B_j = C(t_a-t_j) + \frac{1}{x_a} + \ln\left(\frac{1-x_a}{1+x_a}\right) \quad (21)$$

The extrapolated value of x_j permits to calculate the n value by Eq. (13) rewritten as follows

$$n = \left(\frac{1}{x_j} - x_j\right) \frac{\sqrt{2R_i}}{z_j q} = \left(\frac{1}{x_j} - x_j\right) \frac{R_i}{z_j C} \quad (22)$$

where the concentration z_j of IH at the injection time t_j is known. On the basis of the calculated value of n , and because of $C = q\sqrt{R_i/2}$, the IC_{50} value is obtained according to Eq. (14) rearranged as follows

$$IC_{50} = 1.5 \frac{R_i}{nC} \quad (23)$$

Calculation procedure

By using the relationships obtained from the kinetic analysis the values of C , x_j , n and IC_{50} were obtained according to the following procedure.

Calculation of C value

From the experimental oxygraphic trace the rates of oxygen depletion α'_t , and therefore the corresponding values of x_t , were calculated at various times t by using a software developed in our laboratory. By this software the slope of the oxygraphic trace within the integration limits t_a and t_f is calculated, see Fig. 3 (usually the rates α'_t were calculated every 0.5–3 min). Introducing in Eq. (18) the x_t values, the value of C is obtained from the slope of the linear plot of $F(x_t)$ vs time (see Fig. 3, inset), with R^2 usually >0.98 . C appears largely independent of the integration limits t_a and t_f values used in Eq. (18). The best and most reliable values of C , n and IC_{50}^{-1} (that we assumed as reference values) were obtained by choosing t_a as close as possible to t_j , avoiding the region where the possible perturbation of the oxygraphic trace is present, and by setting the range t_f-t_a as large as possible. Moreover, t_f values beyond the 10% residual O_2 concentration were avoided since small deviations may occur in the final part of the kinetic experiment.

Evaluation of x_j

The value of x_j is obtained by Eq. (20), where B_j value is calculated according to Eq. (21). Equation (20) is a transcendental equation and cannot be solved by algebraic methods; therefore the x_j value must be calculated by numerical approximation assigning to x_j all the values x_i ($x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$) ranging from 0.001 to 0.999 and calculating the corresponding values of B_i ($B_1, B_2, B_3, \dots, B_n$). To

this regard the x_j values ranging from 0.001 to 0.999 with the corresponding B_i values were tabulated (see Table S1 of Supplementary material). The best approximation for x_j is the value x_i which gives $B_i \approx B_j$.

Calculation of n and IC_{50}

The values of n and IC_{50} were obtained introducing the calculated values of x_j and C in Eqs. (22) and (23), respectively. In Table 1 the values of n , IC_{50}^{-1} , $q = k_i/\sqrt{k_{LL}}$ and the ratios q/q_{trolox} are reported. The ratios q/q_{trolox} correspond to the relative values of k_i with respect to the k_i of trolox obtained for the antioxidants we have tested in the micelle system DCA–LG–LH. From this table it appears also that there is no correlation between q and n values, as expected.

The R_i value used to calculate the parameter n of the antioxidants we have tested was obtained from experiments carried out with trolox as inhibitor by using Eq. (22) where n was set equal to 2 [30]. In particular, under the experimental conditions of Table 1, a value $R_i = 19.00 \pm 0.16$ $nM s^{-1}$ was calculated. This value is lower than the value of $R_0 = 26.7 \pm 1.16$ $nM s^{-1}$ we have measured during the decomposition of 4 mM ABIP in the micelle system DCA–LG, in the absence of LH, as observed by Bedard et al. [29].

Assessment of the kinetic equations

The substitution in Eqs. (20) and (21) of t_i and x_i for t_j and x_j , respectively, permits also to calculate the value x_i and therefore the values of α_i and α'_i at any time t_i . As a consequence it is possible to reconstruct the oxygraphic trace, as it is shown in Fig. 3, where the oxygraphic trace reconstructed by this procedure and the corresponding experimental trace are reported, demonstrating the very good fitting of the calculated data to the experimental one's. Furthermore, from Fig. 2, inset, it appears that the n value, calculated by the method we are proposing, is inde-

pendent of the slope of the final part of the oxygraphic trace.

It must also be considered that the t_a and t_f values can be arbitrarily chosen within the limits above discussed. To this regard we found that when t_a and t_f are within the range of times used to obtain the reference values of C , n and IC_{50}^{-1} (see Calculation of C value), the calculated values of these parameters deviate <2.5% from the corresponding reference values, see Table S2 of Supplementary material.

The standard deviations of n and IC_{50}^{-1} values reported in Table 1, were calculated from experiments carried out at four different concentrations of the antioxidant, and were usually below 10%.

The results reported in Table 1, in Figs. 2 and 3 and in Table I of Support Information show the validity of the above reported kinetic analysis and the possibility to obtain reliable n and IC_{50}^{-1} values from a single experimental run. Furthermore experiments carried out with concentrations of ABIP ranging from 1 to 8 mM demonstrated that the q and n values calculated according to the proposed method are independent of the rate of generation of peroxy radicals.

Finally, the general validity of the kinetic model and of the relative equations was checked using various micelle systems, beyond the system DCA–LG–LH–ABIP used in the above reported experiments. Usually the reliability of the fitting of Eq. (18) to the experimental data was found to be independent of the micelle system (DCA–LG–LH, SDS–LH, CHAPS–LH) and of the type of antioxidant used, if the inhibition of the peroxidation process occurs according to a first-order process with respect to the antioxidant. Examples of the fitting of the inhibition of LH peroxidation by some antioxidants in the systems SDS–LH–ABIP and CHAPS–LH–ABIP are reported in Figs. 4 and 5, respectively, where the back reconstruction of the experimental traces are also reported. The good over imposition of the calculated values and the experimental traces clearly shows the general validity of the proposed method if the conditions above discussed are satisfied.

Table 1
 n , IC_{50}^{-1} and $q = k_i/\sqrt{k_{LL}}$ of various antioxidants calculated according to the proposed method

	IC_{50}^{-1} (μM^{-1})	n	$q(k_i/\sqrt{k_{LL}})$ ($\mu M^{-1/2} \text{ min}^{-1/2}$)	$q/q_{trolox} = k_i/k_{i \text{ trolox}}$
Trolox	1.09 ± 0.02	2.00 ± 0.01	1.23 ± 0.02	1.00 ± 0.02
BHT	8.06 ± 0.49	2.39 ± 0.04	7.62 ± 0.34	6.20 ± 0.05
Caffeic acid	5.46 ± 0.65	10.6 ± 0.76	1.18 ± 0.17	0.96 ± 0.15
Chlorogenic acid	6.49 ± 0.45	11.0 ± 1.12	1.34 ± 0.11	1.09 ± 0.08
Protocatechuic acid	0.89 ± 0.12	4.48 ± 0.24	0.50 ± 0.06	0.41 ± 0.12
Catechin	5.78 ± 0.35	10.7 ± 2.45	1.29 ± 0.39	1.05 ± 0.30
Delphinidin	2.20 ± 0.25	2.30 ± 0.31	2.23 ± 0.49	1.81 ± 0.22
Ascorbic acid	5.32 ± 0.49	2.09 ± 0.10	5.82 ± 0.79	4.73 ± 0.14
Uric acid	0.64 ± 0.05	1.83 ± 0.06	0.79 ± 0.06	0.64 ± 0.08

The experiments were carried out in 5 mM DCA, 0.5 mM LG, 2 mM LH. 4 mM ABIP was added to start the LH peroxidation. Standard deviations were obtained from experimental runs carried out at four different antioxidant concentrations.

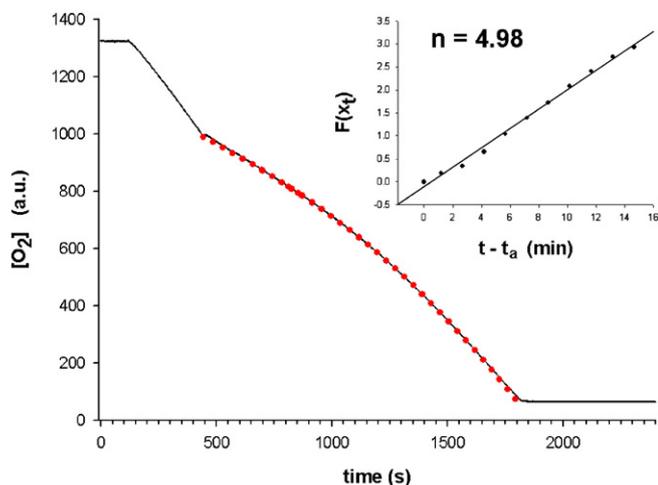


Fig. 4. Inhibition of LH peroxidation by cyanidin 3-glucoside in SDS micelle system. The continuous line is the experimental oxygraphic trace of the inhibition of LH peroxidation when $3.4 \mu\text{M}$ cyanidin 3-glucoside was added. The circles are the calculated values on the basis of Eqs. (20) and (21). Inset: plot of $F(x_t)$ vs t , with the corresponding n value calculated according to the procedure we are proposing. The peroxidation of LH was carried out in 50 mM SDS, 2.5 mM LH, 8 mM ABIP at 37°C .

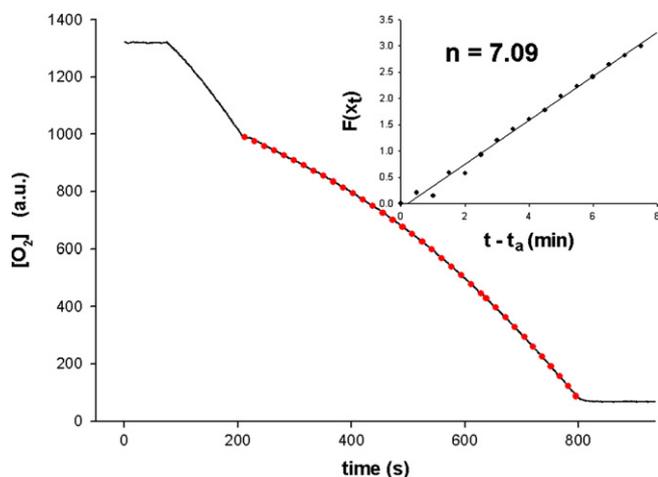


Fig. 5. Inhibition of LH peroxidation by chlorogenic acid in CHAPS micelle system. The continuous line is the experimental oxygraphic trace of the inhibition of LH peroxidation when $0.3 \mu\text{M}$ chlorogenic acid was added. The circles are the calculated values on the basis of Eqs. (20) and (21). Inset: plot of $F(x_t)$ vs t , with the corresponding n value calculated according to the procedure we are proposing. The peroxidation of LH was carried out in 6 mM CHAPS, 4 mM LH, 1 mM ABIP at 37°C .

To have some indication on how the existence of the two phases (aqueous and micellar) affects the peroxidation process, inhibition experiments were performed with the system SDS–LH in the presence of initiators soluble in the aqueous (AAPH) and in the lipid (AIBN) phase. These experiments were carried out at 55°C , to have comparable LH peroxidation rates, while trolox and α -tocopherol were used as representatives of inhibitors soluble in the aqueous and the lipid phase, respectively.

In the case of trolox the oxygraphic traces were analyzed according to the proposed method and the q values obtained with AIBN or AAPH as initiator, were similar

within the experimental error, while the inhibition of LH peroxidation by α -tocopherol was still found a zero-order process with respect to the inhibitor concentration independently of the type of initiator used. These results indicate that the kinetic of inhibition of LH peroxidation is independent of the use of water or lipid soluble initiators. A similar behaviour was reported in the case of LH oxidizability [33]. These results may be explained considering the significant dipole moment of LOO^\bullet radical (≈ 2.6 Debye) that allows to the $\text{R}_2\text{CH-O-O}^\bullet$ reactive head of peroxy radicals to float on the micelle–water interface, where the concentration of $-\text{OH}$ of α -tocopherol (soluble in the lipid phase) is relatively high [34] while the concentration of trolox (soluble in the aqueous solution) is relatively low. The difference between the concentration of the two antioxidants at the interface where the reactive head of LOO^\bullet radicals are confined may explain why the process is zero and first-order with respect to the concentration of these two types of antioxidants.

As regards the reaction between the pentadienyl group of the LH, buried in the micelle, and the reactive head of the peroxy radicals (AOO^\bullet or LOO^\bullet) present at interface, on account of the relative long half life of the LOO^\bullet radicals, of the number of LH molecules in a SDS micelle in the experiments carried out at 37°C (in average 2–3 LH molecules/micelle), and of the length of kinetic chain it can be hypothesized that the propagation reaction may occur between LH molecules and peroxy radicals partitioned in the aqueous phase out of the micelle due to their dipole moment and to the fast dynamics of this system [35].

Conclusions

The method we are proposing to test the antioxidant activity, which permits to obtain both IC_{50}^{-1} and n values of a water soluble antioxidant from a single experimental run, in experiments which may last only 10–15 min, does not suffer of the drawbacks of the methods proposed until now.

In fact:

- (i) In the micelle system, we have proposed (DCA–LG–LH), all the antioxidant tested show an inhibitory effect decreasing with time, due to the disappearance of the antioxidant. This behaviour permits to calculate both the efficiency and capacity for all the classes of antioxidants we have tested.
- (ii) The fraction of LOO^\bullet radicals, which disappear by mutual interaction, is taken into account in the equations used to calculate n and IC_{50}^{-1} values.
- (iii) The equations used do not require to achieve the $\alpha'_t = \alpha'_0$ condition in the final part of the kinetic run, corresponding to the complete disappearance of the inhibition effect of IH.
- (iv) The perturbation of the micelle system due to injection of IH does not influence the values of n and IC_{50}^{-1} , since the slope of oxygraphic trace at the

injection point (x_j) is obtained by numerical extrapolation on the basis of the fitting of the Eq. (18) to the experimental data.

- (v) The standard deviations of n and IC_{50}^{-1} values, usually below 10%, are lower than those reported for similar methods [36].
- (vi) The equations we have proposed can be used for various antioxidant systems if the inhibition of the peroxidation process occurs according to a first-order process with respect to the antioxidant.
- (vii) The inhibition process seems to occur at the interface between the aqueous and lipid phases.

Finally, it must be considered that the micelle system used (DCA–LG–LH) to carry out most of the antioxidant activity test is similar to that present in the part of our digestive tract where intestinal digestion and absorption of lipids occur, and therefore may give information on the potential value of dietary antioxidants in a body compartment where bioavailability problems are absent.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.abb.2007.03.017](https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.03.017).

References

- [1] I. Cantuti-Castelvetri, B. Shukitt-Hale, J.A. Joseph, *Int. J. Dev. Neurosci.* 18 (2000) 367–381.
- [2] G.M. Chilsom, D. Steinberg, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 1815–1826.
- [3] J.A. Joseph, B. Shukitt-Hale, G. Casadeus, *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (suppl) (2005) 313S–316S.
- [4] L.R.C. Barclay, S.J. Locke, J.M. MacNeil, *Can. J. Chem.* 61 (1983) 1288–1290.
- [5] E. Niki, T. Saito, Y. Kamiya, *Chem. Lett.* 12 (1983) 631–632.
- [6] M. Scarpa, A. Rigo, M. Maiorino, F. Ursini, C. Gregolin, *Biochim. Biophys. Acta—Gen. Subjects* 801 (1984) 215–219.
- [7] R.L. Prior, G. Cao, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 1173–1181.
- [8] L.R.C. Barclay, S.J. Locke, J.M. MacNeil, J. VanKessel, G.W. Burton, K.U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 2479–2481.
- [9] W.A. Pryor, J.A. Cornicelli, L.J. Devall, B. Tait, B.K. Trivedi, D.T. Witiak, M. Wu, *J. Org. Chem.* 58 (1993) 3521–3532.
- [10] W.A. Pryor, T. Strickland, D.F. Church, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 2224–2229.
- [11] V.A. Roginsky, *Arch. Biochem. Biophys.* 414 (2003) 261–270.
- [12] V.A. Roginsky, T.K. Barsukova, *J. Med. Food* 4 (2001) 219–229.
- [13] V.A. Roginsky, T.K. Barsukova, A.A. Remorova, W. Bors, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73 (1996) 777–786.
- [14] D.D.M. Wayner, G.W. Burton, K.U. Ingold, L.R.C. Barclay, S.J. Locke, *Biochim. Biophys. Acta* 924 (1987) 408–419.
- [15] D.D.M. Wayner, G.W. Burton, K.U. Ingold, S. Locke, *FEBS Lett.* 187 (1985) 33–37.
- [16] A. Ghiselli, M. Serafini, F. Patella, C. Scaccini, *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 1106–1114.
- [17] A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini, A. Ferro-Luzzi, *Free Radic. Biol. Med.* 18 (1995) 29–36.
- [18] A. Rigo, F. Vianello, G. Clementi, M. Rossetto, M. Scarpa, U. Vrhovsek, F. Mattivi, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1996–2002.
- [19] D. Loshadkin, V.A. Roginsky, E. Pliss, *Int. J. Chem. Kinet.* 34 (2002) 162–171.
- [20] J.E. Stagers, O. Hernell, R.J. Stafford, M.C. Carey, *Biochemistry* 29 (1990) 2028–2040.
- [21] O. Hernell, J.E. Stagers, M.C. Carey, *Biochemistry* 29 (1990) 2041–2056.
- [22] S. Gorelik, T. Lapidot, I. Shaham, R. Granit, M. Ligumsky, R. Kohen, J. Kanner, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3397–3402.
- [23] G. He, R.A. Shankar, M. Chzhan, A. Samouilov, P. Kuppusamy, J.L. Zweier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 4586–4591.
- [24] J. Kanner, T. Lapidot, *Free Rad. Biol. Med.* 31 (2001) 1388–1395.
- [25] F. Ursini, A. Sevanian, *Biol. Chem.* 383 (2002) 599–605.
- [26] L.R.C. Barclay, K.U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 6478–6485.
- [27] P.J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, N.Y., 1953.
- [28] M. Lucarini, V. Mugnaini, G.F. Peduli, *J. Org. Chem.* 67 (2002) 928–931.
- [29] L. Bedard, M.J. Young, D. Hall, T. Paul, K.U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 12439–12448.
- [30] G.W. Burton, K.U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 6472–6477.
- [31] J. Gustafsson, T. Nylander, M. Almgren, H. Ljusberg-Wahren, *J. Coll. Int. Sci.* 211 (1999) 326–335.
- [32] K. Hillman, A.L. Whyte, C.S. Stewart, *Lett. Appl. Microbiol.* 16 (1993) 299–302.
- [33] L.R.C. Barclay, *Can. J. Chem.* 71 (1993) 1–16.
- [34] G.R. Buettner, *Arch. Biochem. Biophys.* 300 (1993) 535–543.
- [35] A. Patist, S.G. Oh, R. Leung, D.O. Shah, *Colloid Surf.* 176 (2001) 3–16.
- [36] D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J.A. Flanagan, R.L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4437–4444.