

Metodologie analitiche per la determinazione di nutraceutici negli alimenti

R. Gatti, D. Masci

Il termine *nutraceutical* è stato coniato quasi trenta anni fa (Stephen De Felice, 1989) dall'unione dei due termini *nutrition* e *pharmaceutical*. In base alla definizione, per "nutraceutico" si intende "ogni sostanza che può essere considerata un cibo (o parte di un cibo) e che fornisce benefici medici o salutistici, incluso la prevenzione e/o il trattamento di una malattia".

Le sostanze nutraceutiche sono presenti per la maggior parte in alimenti di origine vegetale (pomodori, agrumi, uva, frutta secca), ma si trovano anche in alimenti di origine animale (pesce e crostacei) e microbica (yogurt e latticini) (Tabella 1). Nel caso degli alimenti di origine vegetale, in relazione alla produzione primaria, il contenuto può variare a seconda delle cultivar, delle pratiche colturali e delle caratteristiche pedoclimatiche del sito di coltivazione; mentre, durante il processo produttivo, esso può essere modificato dalle modalità di raccolta, conservazione, trasformazione, stoccaggio, trasporto, cottura (industriale e domestica).

Considerata la complessità delle matrici agroalimentari e l'ampia variabilità delle caratteristiche chimiche delle sostanze in esse contenute, da anni, nei labora-

tori di chimica analitica della Divisione Biotecnologie e agroindustria, presso il Centro Ricerche Casaccia dell'ENEA, vengono sviluppate e validate metodologie analitiche per l'individuazione e la quantificazione di sostanze nutraceutiche. Ciò al fine di valorizzare alcune cultivar in relazione al genotipo, all'area geografica di produzione, alle pratiche colturali, o allo scopo di valutarne il contenuto rispetto alle tecniche di conservazione o di trasporto delle materie prime e dei prodotti trasformati.

Nel caso delle brassicacee (broccolo, cavolo verza, cavolo nero, cavolino di Bruxelles), ad esempio, il contenuto di glucosinolati e dei loro metaboliti, gli isotiocianati, cui è attribuita un'azione chemioprotettiva, può variare sia in relazione al genotipo e alle pratiche colturali (ad esempio in base all'uso di fertilizzanti a base di azoto e zolfo), che alle condizioni climatiche. Al fine di determinare il contenuto del sulforafano, principale responsabile dell'azione antitumorale, è stata messa a punto una metodologia di estrazione e di analisi mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) accoppiata a sistemi di rivelazione UV-visibile confermata, poi, da analisi in gascromatografia (GC)

accoppiata a spettrometria di massa (MS), per valutare la variabilità rispetto al genotipo di alcune cultivar di broccolo siciliano, cavolo nero e verza.

Un'altra importante classe di composti nutraceutici è rappresentata dai polifenoli, molecole con una potente attività antiossidante; tra essi, la vasta famiglia dei flavonoidi mostra anche un'attività anti-infiammatoria e vasoprotettiva. Il grano saraceno è tra quegli alimenti che costituisce una ricca fonte di flavonoidi, tra cui rutina, quercetina, orientina, isorientina; la rutina, la molecola più attiva, mostra effetti ipotensivi ed attività antiemorragica ed antiossidante. Tra le due cultivar maggior-

Allimenti	Sostanze o famiglia di sostanze nutraceutiche	Meccanismo di azione
Peperoncino	Capsaicinoidi (capsaicina)	Antidolorifico Antibatterico
Brassicacee (broccoli, cavoli)	Glucosinolati (glucoorafanina) Isotiocianati (sulforafano)	Anticancro
Uva, Vino rosso	Polifenoli (resveratrolo)	Antiossidanti Antinfiammatori Effetto protettivo malattie cardio-circolatorie
Semi di soia ed altri legumi	Isoflavoni (genesteina, daidzeina)	Anticancro
Pomodoro e derivati	Carotenoidi (licopene)	Antiossidante
Agrumi, carote, zucchine e zucche	Carotenoidi (β -carotene)	Antiossidante
Pesce, crostacei Mandorle, noci	Acidi grassi polinsaturi Omega-3 (o PUFA n-3)	Effetto positivo sul profilo lipidico ematico Effetto antitrombotico
Yogurt e latticini	Probiotici (Lattobacilli, bifidobatteri)	Anticancro

Tabella 1
Esempi di alimenti ad alto contenuto di nutraceutici e loro meccanismi di azione

mente coltivate, grano saraceno comune e tartarico, quest'ultimo presenta livelli di rutina superiore di oltre 100 volte a quello determinato nel grano saraceno comune.

Per la caratterizzazione di flavonoidi in alcune cultivar di grano saraceno tartarico, sono state impiegate differenti tecniche di estrazione con solvente [estrazione per macerazione, estrazione agli ultrasuoni (UA) ed estrazione con liquido pressurizzato (PLE)], ottimizzandone i parametri di influenza (solvente o miscela di solventi, temperatura, tempo e nel caso della PLE, pressione e numero di cicli di estrazione), per ottenere le migliori condizioni di resa estrattiva e riproducibilità degli analiti di interesse. La determinazione qualitativa e quantitativa dei flavonoidi presenti negli estratti del grano saraceno tartarico è stata poi condotta mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS), con un sistema di cromatografia liquida ad ultra pressione (UHPLC) ed uno spettrometro di massa ibrido, quadrupolo- tempo-di-voce (Q-TOF), munito di una sorgente ionica elettrospray (ESI). Si è operato in modalità di ionizzazione sia positiva che negativa, ottimizzando i parametri del sistema ESI-Q-TOF (temperatura e velocità del dry gas, pressione del gas nebulizzante, voltaggio del capillare ecc.).

L'elevata risoluzione cromatografica ottenibile dal sistema UHPLC assieme all'elevata risoluzione ed accuratezza di massa dello spettrometro Q-TOF, unite alle informazioni strutturali fornite dagli esperimenti massa/massa MS/MS, hanno consentito di ottenere un accurato profilo polifenolico, anche in altre tipologie di matrici agroalimentari, come ad esempio nelle nocciole. Anche in questo caso, il fine è stato la valorizzazione di varie cultivar di nocciolo sulla base delle differenze quali-quantitative di alcuni polifenoli tra cui acido gallico, catechine, procianidine.

Analogamente, è stato sviluppato un metodo analitico mediante LC-MS per la determinazione di polifenoli (quali catechina, epicatechina, acido gallico, quercetina) nelle vinacce (buccia d'uva e vinaccioli). In questo caso, il fine era di valorizzare materiale di scarto del processo di vinificazione e di supportare analiticamente il processo di recupero di polifenoli, con tecniche separative di filtrazione tangenziale a membrana, sviluppato e messo a punto presso la Hall Tecnologica della Divisione biotecnologie e agroindustria.

Recentemente, presso i laboratori di chimica analitica, è stata presa in esame un'altra classe di sostanze nutraceutiche: i carotenoidi. Tra questi pigmenti naturali, già abbondantemente noti per le loro capacità antios-



Figura 1
Principali strumentazioni analitiche impiegate per le analisi di nutraceutici:
a) estrattore PLE; b) gas-cromatografo (GC); c) cromatografo liquido (HPLC-UV/Visibile); d) cromatografo liquido-spettrometro di massa (UHPLC-MS)

sidanti, un particolare ruolo viene svolto dalla luteina (ed dal suo stereoisomero zeaxantina). Tale composto è l'unico carotenoide presente nella macula retinica e, grazie alla presenza di doppi legami coniugati, assorbe nella regione dello spettro del visibile intorno a 446 nm. In questo modo, protegge efficacemente dalla luce blu, che sembra essere 20 volte più dannosa per la retina rispetto alla luce rossa. Sono state effettuate analisi per HPLC-UV-Visibile di carotenoidi su estratti di uva di differenti cultivar e a diversi stadi di maturazione. Tali misure sono state fondamentali per la messa a punto di un metodo di analisi non distruttivo, basato sulla spettroscopia Raman, per la determinazione di *b*-carotene e luteina come marker del grado di maturazione. Lo studio ha dimostrato come sia possibile monitorare tali composti direttamente sugli acini di uva.

Per approfondimenti:
rosanna.gatti@enea.it, domenica.masci@enea.it

Rosanna Gatti, Domenica Masci
ENEA, Divisione Biotecnologie e agroindustria