Enrico Postorino Francesco Gionfriddo

I FLAVONOIDI DEGLI AGRUMI

INDICE GENERALE

1.0	Introduzione	
2.0	Struttura chimica	9
3.0	Meccanismi di biosintesi	17
4.0	Sapore dei flavonoidi in relazione alla loro struttura chimica	21
5.0	I flavonoidi nelle piante	25
5.1	Distribuzione nel regno vegetale	25
5.2	Proprietà biologiche	25
5.3	Flavonoidi e tassonomia agrumaria	26
5.4	Flavonoidi nel corso della maturazione degli agrumi	26
6.0	Flavonoidi e alimentazione	29
6.1	Distribuzione dei flavonoidi in alcuni alimenti vegetali	29
6.2	Contenuto in flavonoidi di diversi alimenti vegetali	30
7.0	Attività antiossidante	33
7.1	Formazione delle specie reattive dell'ossigeno e meccanismi di difesa	33
7.2	Relazioni tra struttura ed attività antiossidante	36
	Proprietà farmacologiche	20
8.0		
8.1	Consumo da parte dell'uomo	42
8.2	Specialità medicinali contenenti flavonoidi	43
8.3	Attività antiossidante dei flavonoidi e protezione delle bevande agrumarie dalle ossidazioni	11
0.4	Considerazioni conclusive	
8.4	Considerazioni conclusive	44
9.0	Metodi analitici per la determinazione dei flavonoidi degli agrumi	
9.1	Metodi spettrofotometrici	45
9.1.1	Determinazione dei flavonoidi totali secondo il metodo Davis	
9.1.2	Determinazione del contenuto in antociani	
9.2	Metodi cromatografici	48

9.2.1	Determinazione quantitativa (HPLC) dei flavanoni glucosidici	49
9.2.2	nei succhi agrumari	
7.2.2	scorze degli agrumi	49
9.2.3	Determinazione quantitativa (HPLC) dei flavoni polimetossilati	
	nei succhi agrumari	50
9.2.4	Determinazione quantitativa (HPLC) degli antociani nei succhi	51
	agrumari pigmentati	31
Q		
10.0	Distribuzioni qualitativa dei flavonoidi in diversi agrumi	53
11.0	Contenuto in flavonoidi totali nelle diverse parti di un agrume	
120	Contenuto in flavonoidi della parte edibile (endocarpo) di diverse specie agrumarie	57
	(i) diverse specie agrainarie	
4650	Grafterizzazione dei principali derivati agrumari	61
	Contenuto in flavanoni e flavoni glucosidici dei succhi agrumari	
	i control cromatografici (HPLC) di alcuni succhi agrumari	62
- 1 3510	Contenuto in flavoni polimetossilati dei succhi agrumari	67
	ontenuto in flavoni polimetossilati degli olii essenziali degli agrumi	70
	onlenuto in flavonoidi dei sottoprodotti di lavorazione di alcuni agrumi	12
63(0)	Contenuto in flavonoidi delle foglie di diverse piante di agrumi	75
1.00	Contention in navonoital delle logile di diverse più	
(60)	Estrazione industriale dei flavonoidi dai residui	
	di lavorazione degli agrumi	, 79
list	Estrazione dell'esperidina	79
15.2	Estrazione della naringina	84
15.3	Estrazione degli antociani	
16.0	Principali proprietà di alcuni flavonoidi presenti nei frutti	
10.0	e nelle foglie del genere Citrus	87
## \$	•	
17.0	Rassegna di lavori di cromatografia liquida (HPLC) riguardanti	
7.1	i flavonoidi degli agrumi, pubblicati a partire dal 1987	93

1. INTRODUZIONE

I flavonoidi sono derivati del benzo-γ-pirone distribuiti in maniera ubiquitaria nelle cellule fotosintetiche. Finora ne sono stati identificati da diversi tipi di vegetali, alcune migliaia e questo numero è in continuo aumento. Questa molteplicità non sorprende se si considera la diversità chimica dei flavonoidi la cui struttura di base consente un numero notevolmente elevato di varianti.

I flavonoidi sono presenti in molte piante commestibili destinate all'alimentazione umana, ma sono considerati privi di valore nutritivo per l'uomo. Tuttavia, se si valuta che l'assunzione quotidiana media di queste sostanze è stimata intorno ad 1 grammo (ma questo valore tende ad aumentare se si tiene conto anche dell'assunzione sotto forma purificata di farmaci e integratori alimentari), è ragionevole supporre che i flavonoidi possano in qualche modo influenzare la salute umana.

Le basi biochimiche, fisiologiche e farmacologiche del ruolo di queste sostanze nell'alimentazione umana sono rimaste, tuttavia, a lungo sconosciute.

Solo nel 1936, infatti, Szent-Gyorgi riuscirono a dimostrare che alcuni flavonoidi derivati dal frutto del limone erano importanti nel mantenimento dell'integrità della parete capillare e nella resistenza capillare nell'uomo. Venne coniato così, per essi, il termine di vitamina P (da Permeabilità) o C_2 , a causa della loro attività biologica simil-ascorbica. L'attribuzione ai flavonoidi di un'attività simil-vitaminica, tuttavia, non venne ulteriormente sostanziata sul piano sperimentale e ambedue i termini caddero in disuso intorno al 1950.

Alla fine degli anni '60 alcuni studi evidenziarono che ad alte dosi la quercetina, uno dei più diffusi flavonoidi, poteva essere cancerogena.

Studi successivi non riuscirono a confermare questi dati, anzi evidenziarono che la quercetina ha potenti attività anticancerogene, antiossidanti ed anti-infiammatorie. Da allora, l'interesse degli studiosi si è concentrato sui potenziali benefici effetti sull'uomo non solo della quercetina ma anche di altri flavonoidi come il canferolo, l'apigenina e la luteolina.

Dall'enorme massa di risultati sperimentali emerse che i flavonoidi possiedono attività antiaritmica ed antiipertensiva, ipercolesterolemizzante, stabilizzante sulle piastrine e sulle *mastcellule*, antiepatotossica ed antiinfertilità.

Molto recentemente, i flavonoidi hanno suscitato un rinnovato interesse sia fra i profani che nella comunità scientifica, in relazione all'anomalia dietologica definita come "paradosso francese" (Dolnick, 1990; Safer, 1991).

Questo paradosso si riferisce al fatto che nelle popolazioni mediterranee, come quella francese, una dieta ad elevato tenore lipidico si associa ad una più bassa incidenza di cardiopatia coronarica, in contrasto con quanto osservato nelle altre popolazioni occidentali, nelle quali, a parità di tenore lipidico, l'incidenza della stessa patologia è più elevata. Un'analisi epidemiologica accurata ha individuato in fattori alimentari e, precisamente, nel moderato consumo di vino rosso nelle popolazio-

ni mediterranee, la possibile spiegazione dell'arcano. Appare evidente che il consumo moderato di vino rosso, di birra e di distillati alcolici rappresenta un comune fattore protettivo nei riguardi dell'incidenza della cardiopatia coronarica, risultata più bassa nelle popolazioni mediterranee. Si è potuto dimostrare che i bevitori moderati hanno una più bassa incidenza di cardiopatia coronarica rispetto ai non bevitori o ai forti bevitori. Oltre all'implicazione dell'etanolo stesso come un agente cardioprotettivo, lo studio di altre sostanze presenti nel vino rosso ha suggerito che i flavonoidi sono potenziali candidati come agenti cardioprotettivi ed anti-senescenza. La parallela individuazione nei radicali liberi della responsabilità di una serie di patologie infiammatorie, degenerative e neoplastiche e, per converso, in sostanze di origine vegetale di un'attività antiossidante, ha ulteriormente stimolato la ricerca in campo alimentare. Si è osservato che gli effetti protettivi di diete ricche in frutta e verdura nei riguardi di malattie cardiovascolari e di certi tipi di neoplasie possono essere attribuiti, almeno in parte, agli antiossidanti contenuti in essi, particolarmente alla vitamina C, ai carotenoidi e, in definitiva, ai flavonoidi.

Lo scopo di questo lavoro è quello di descrivere, attraverso l'analisi degli studi sperimentali ed epidemiologici della più recente letteratura scientifica internazionale, gli aspetti biochimici e fisiologici dei flavonoidi e il loro ruolo nell'alimentazione umana. Viene approfondito lo studio sul rapporto tra la loro struttura chimica ed il sapore. Infine si descrivono alcuni metodi analitici per la determinazione della composizione flavonoidica dei frutti agrumari.

2. STRUTTURA CHIMICA

La caratteristica strutturale di base dei flavonoidi è il nucleo flavonico formato da un anello benzenico (A) condensato con un anello eterociclico di tipo piranico (C), al quale è legato, a sua volta, un secondo anello benzenico (B). Lo scheletro base è quello del difenilpropano (p.d.) (C_6 - C_3 - C_6). Se il secondo anello benzenico è legato nella posizione 2 o nella posizione 3 dell'anello piranico, si distinguono, rispettivamente, i flavonoidi (2-fenilbenzo- γ -pironi) dagli isoflavonoidi (3-fenilbenzo- γ -pironi) (figura 1).

Figura 1: Formule di struttura generali dei flavonoidi

Caratteristica comune a tutti questi composti è la presenza di un numero variabile di sostituenti idrossilici a livello soprattutto degli anelli benzenici: questa caratteristica strutturale spiega l'appartenenza dei flavonoidi e degli isoflavonoidi ai cosiddetti polifenoli, composti ubiquitariamente distribuiti nel regno vegetale.

I flavonoidi, in particolare, sono spesso idrossilati nelle posizioni 5 e 7 (anello A) e 3', 4' e 5' (anello B); la presenza o l'assenza di un ulteriore ossidrile nella posizione 3 (anello C) consente di distinguere due principali sottogruppi di flavonoidi: i 3-deossiflavonoidi (flavoni e flavanoni) ed i 3-idrossiflavonoidi (flavonoli e flavanonoli) (figura 2).

STRUTTURA BASE DEI 3-DEOSSIFLAVONOIDI

A C OH

STRUTTURA BASE DEI 3-IDROSSIFLAVONOIDI

Figura 2: Principali sottogruppi di flavonoidi

FLAVONI E FLAVONI GLUCOSIDICI

$$\begin{array}{c|c}
R_{1} & & & \\
R_{2} & & & \\
R_{3} & & & \\
R_{5} & & & \\
\end{array}$$

Figura 5: Struttura base del flavone (aglicone)

Tabella 2 - Nomi comuni e sistematici dei più comuni flavoni e flavoni glucosidici

	P	osizio						
Nome Comune					a bas			Nome Sistematico
	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₃ .	R₄·	
Tangeretina	Н	OMe ^c	OMe ^c	OMe	OMe°	Н	OMe ^c	4',5,6,7,8-pentametossiflavone
Eptametossiflavone	OMe ^c	OMe°	OMe ^c	OMe ^c	OMe ^c	OMe ^c	OMe ⁻	3,3',4',5,6,7,8-eptametossiflavone
Nobiletina	Н	OMe⁵	OMe ^c	OMe ^c	OMe ^c	OMe ^c	OMe ^c	3',4',5,6,7,8-esametossiflavone
Sinensetina	н	OMe ^c	OMe ^c	OMe	Н	OMe ^c	OMe ^c	3',4',5,6,7-pentametossiflavone
Scutellareina	н	OMe ^c	OMe ^c	OMe ^c	Н	н	OMe ^c	4',5,6,7-tetrametossiflavone
Isoscutellareina	н	OMe ^c	н	OMe ^c	OMe ^c	н	OMe ^c	4',5,7,8-tetrametossiflavone
Isosinensetina	н	OMe ^c	Н	OMe ^c	OMe ^c	OMe ^c	OMe ^c	3',4',5,7,8- pentametossiflavone
Esametossiquerce tagetina	OMe ^c	OMe ^c	OMe ^c	OMe ^c	Н	OMe ^c	OMe ^c	3,3',4',5,6,7- esametossiflavone
Crisina	н	ОН	Н	ОН	Н	Н	Н	5,7- diidrossiflavone
Apigenina	Н	OH	н	ОН	н	н	ОН	4',5,7- triidrossiflavone
Luteolina	н	ОН	н	ОН	н	ОН	ОН	3',4',5,7 -tetraidrossiflavone
Diosmina	н	он	Н	ORut ^a	Н	ОН	OMe ^c	5, 3'-diidrossi- 4'metossiflavone 7-ß rutinoside (Diosmetina-7-O-rutinoside)
Roifolina	Н	ОН	Н	ONeo ^b	Н	Н	ОН	5,4'-diidrossiflavone-7-ß-neoesperidoside (Apigenina-7-O-neoesperidoside)
Isoroifolina	н	ОН	Н	ORut ^a	Н	Н	ОН	5,4'-diidrossiflavone-7-ß-rutinoside (Apigenina-7-O-rutinoside)

^{*}rutinosio, *neoesperidosio, *CH3

FLAVONOLI E FLAVONOLI GLUCOSIDICI

Figura 6: Struttura base del flavonolo (aglicone)

Tabella 3 - Nomi comuni e sistematici dei più comuni flavonoli e flavonoli glucosidici

Nome		Pos		e e tip la stru	Nome Sistematico				
Comune	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₃ ·	R₄·	R ₅ ·	, and old of the control of the cont
Quercetina	ОН	ОН	Н	ОН	Н	ОН	ОН	Н	3,3',4',5,7- pentaidrossiflavonolo
Canferolo	ОН	ОН	Н	ОН	Н	Н	ОН	Н	3,4',5,7-tetraidrossiflavonolo
Miricetina	ОН	ОН	Н	ОН	Н	ОН	ОН	ОН	3,3',4',5,5',7 -esaidrossiflavonolo
Ramnetina	ОН	ОН	Н	OMe⁵	Н	ОН	ОН	Н	3, 3', 4',5,7 -tetraidrossi- 7-metossiflavonolo
Isoramnetina	ОН	ОН	Н	ОН	Н	OMe ^b	ОН	Н	3,4',5,7-tetraidrossi-3' metossiflavono
Quercetagetina	ОН	ОН	ОН	ОН	н	ОН	ОН	Н	3,3',4',5,6,7- esaidrossiflavonolo
Rutina	ORut ^a	ОН	Н	ОН	Н	ОН	ОН	Н	5,7,3',4'-tetraidrossiflavonolo 3-ß- rut noside (Quercetina-3- 0-rutinoside)

*rutinosio, *CH;

ANTOCIANIDINE E CATECHINE

Correlati con i flavonoidi sono le catechine e le antocianidine che hanno la struttura di base dei 3-idrossiflavonoidi. In particolare le antocianidine si distinguono dalle catechine per il fatto di avere una struttura base che è quella del catione 3,5,7,4' tetraidrossiflavilio (fig.7).

Figura 7: Struttura base delle catechine e delle antocianidine

Le antocianidine si presentano spesso come antocianine o antociani in seguito ad un legame tra il gruppo semiacetalico di una molecola di zucchero e l'ossidrile in posizione 3 di una molecola di antocianidina, secondo lo schema di figura 8.

Oltre il glucosio anche altri zuccheri (galattosio, arabinosio, rutinosio) possono legarsi alle antocianidine. Ad esempio dalla cianidina oltre la cianidin-3 glucoside si ottengono le seguenti antocianine:

cianidin-3-galattoside, cianidin -3-arabinoside, cianidin-3-rutinoside.

L'antocianidina può legarsi anche ad una seconda molecola di glucosio, in genere la posizione 5, ottenendo così un diglucoside (ad es. malvidin-3,5-diglucoside).

Nella tabella 4 riportiamo i nomi comuni e sistematici delle più diffuse antocianidine ed antocianine.

Antocianidine e Antociani o Antocianine

Figura 8: Struttura base delle antocianine

Tabella 4 - Nomi comuni e sistematici delle più comuni antocianidine ed antocianine

Nome Comune	Posi			ipo di sostituente ruttura base Nome Sistematico				
	R ₃	R ₅	R ₇	R₃·	R ₄ ·	R ₅ ⋅		
Pelargonidina	он	ОН	ОН	н	ОН	н	3,5,7,4'- tetraidrossi- 2 - fenilbenzopirilio	
Cianidina	ОН	ОН	ОН	он	ОН	н	3,5,7,3',4'- pentaidrossi-2-fenilbenzopirilio	
Peonidina	ОН	он	ОН	OMe ⁻	ОН	н	3,5,7,4'-tetraidrossi-3'-metossi- -2-fenilbenzopirilio	
Delfinidina	он	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	3,5,7,3',4',5'- esaidrossi- -2-fenilbenzopirilio	
Petunidina	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	OMe [,]	3,5,7,3',4'-pentaidrossi- 5'- metossi- -2-fenilbenzopirilio	
Malvidina	ОН	он	ОН	OMe ⁻	ОН	OMe [,]	3,5,7, 4'- tetraidrossi-3' -5'- dimetossi- -2- fenilbenzopirilio	
Pelargonidina-3- glucoside	C-glu ³	ОН	ОН	н	ОН	н	5,7, 4'- triidrossiflavilio-3-ß-D- glucoside	
Cianidina-3- glucoside	C-glu³	ОН	ОН	ОН	ОН	н	5,7,3',4'- tetraidrossiflavilio- -3-ß-D- glucoside	
Peonidina-3- glucoside	C-glu ^a	он	ОН	OMe ⁵	ОН	н	5,7, 4'-triidrossi-3'-metossi-	
Delfinidina-3-glucoside	C-glu ³	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	5,7,3',4',5'- pentaidrossiflavilio 3-B-D-glucoside	
Petunidina-3-glucoside	C-glu ^a	ОН	ОН	ОН	ОН	OMe _*	5,7,3',4'- tetraidrossi- -5'-metossiflavilio-3-ß- D-glucoside	
Malvidina-3-glucoside	C-glu ³	ОН	ОН	OMe-	ОН	OMe [»]	5,7, 4 -triidrossi-3' -5'-dimetossiflavilio- -3-β- D-glucoside	
Malvidina-3,5-di glucoside	C-glu³	C-glu	ОН	OMe-	ОН	OMe ⁻	7,4'-diidrossi-3' -5' -dimetossiflavilio- -3,5-ß-diglucoside	

È ovvio che, a causa di questa variabilità nella natura e nel numero dei sostituenti della struttura di base, che può andare incontro ad idrossilazioni, metossilazioni, solfatazione glicosilazioni, è possibile ipotizzare un numero elevatissimo di flavonoidi, superiore a 2.0 x 10⁷!

Fino al 1994 sono stati identificati almeno 5000 differenti flavonoidi naturali e ben 179 differenti tipi di glucosidi della sola quercetina. Ma il numero è destinato ancora a crescere. Questa considerazione è importante perché la diversità strutturale dei flavonoidi sembra determinare la loro attività.

3.0. MECCANISMI DI BIOSINTESI

La biosintesi dei flavonoidi nelle piante avviene attraverso l'interazione di divers percorsi biosintetici¹.

Nella figura 9 vengono schematizzati quattro differenti percorsi individuati con seguenti nomi: percorso glicolitico; percorso "shikimate" che sintetizza la fenilala nina; metabolismo fenilpropanoide che produce derivati dell'acido cinnamico cumarico; metabolismo dei carboidrati.

Il percorso "shikimate", attraverso l'acido scichimico ed il fenilpiruvico, porta all L-fenilalanina e da questa agli acidi cinnamico e cumarico.

Successivamente una molecola di acido cumarico-CoA (4-cumaril-CoA) insieme tre molecole di malonil-CoA (provenienti dal metabolismo del glucosio) forman un calcone (Naringenincalcone). Questa reazione viene catalizzata dall'enzima cal cone-sintasi (CHS). Quindi, direttamente dal calcone prende origine l'aurone, men tre per chiusura dell'anello centrale (figura 9 bis) del calcone si formano un flava none (naringenina), un flavone (apigenina) ed un isoflavone dai quali prendono ori gine i flavonoli, le antocianidine, le antocianine e le catechine.

1

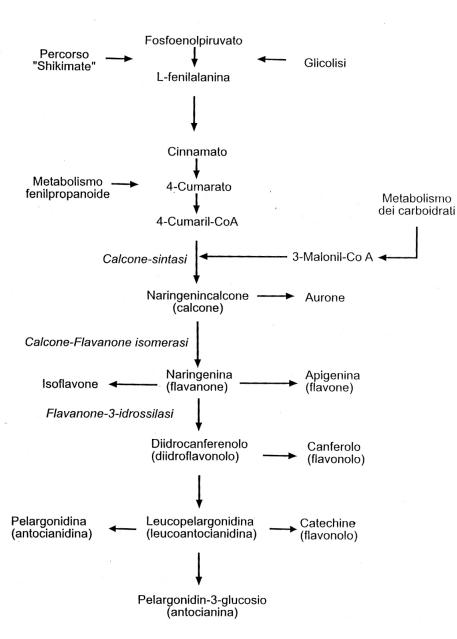


Figura 9: Percorsi biosintetici che portano alla formazione di diversi flavonoidi

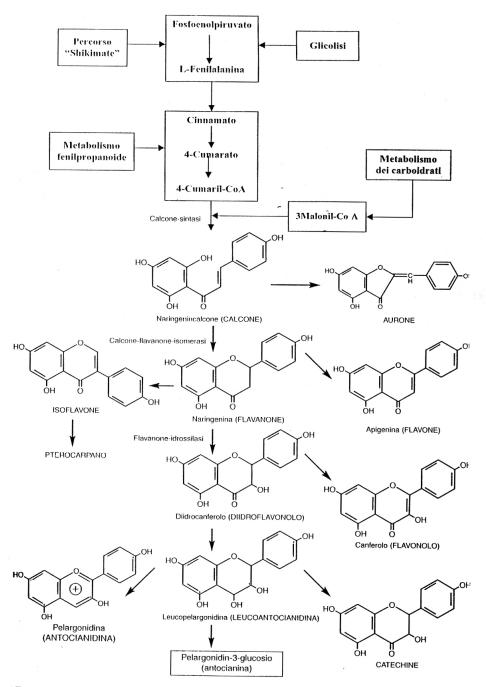


Figura 9 bis: Percorsi biosintetici che portano alla formazione di diversi flavonoidi

4.0. SAPORE DEI FLAVONOIDI IN RELAZIONE ALLA LORO STRUTTURA CHIMICA

I flavonoidi degli agrumi sono spesso dei flavanoni combinati con disaccaridi come il rutinosio o il neoesperidosio. La glucosilazione, nella posizione 7 del flavanone, influenza fortemente alcune loro proprietà quali la solubilità in acqua ed il sapore; infatti, se l'anello flavanonico è esterificato con neoesperidosio (ramnosil- α -(1 \rightarrow 2) glucosio) il flavonoide è di sapore nettamente amaro (figura 10), se l'esterificazione è dovuta al rutinosio (ramnosil- α -(1 \rightarrow 6) glucosio) il flavonoide risulta insapore (figura 11), se l'esterificazione è dovuta al glucosio il composto risulta di sapore leggermente amaro.

Alcuni AA., approfondendo gli studi sul rapporto tra struttura chimica e sapore amaro dei flavonoidi, hanno accertato che il disaccaride neoesperidosio è di per sé insapore e che l'amaro è dovuto al ramnosio: infatti, quando il ramnosio viene rimosso da questi composti, tutti i prodotti formati sono insapori. Inoltre è stato evidenziato che notevole importanza ha il punto di attacco del ramnosio al glucosio; infatti, sostituendo altri pentosi o esosi al ramnosio non si altera molto il sapore del composto, purché questi zuccheri siano attaccati alla posizione C₂ del glucosio²³⁴⁵. Sia l'idrolisi acida dei flavonoidi che l'apertura dell'anello, con formazione dei corrispondenti calconi, danno origine a composti insapori o dolci⁶.

Nella tabella 5 riportiamo la correlazione tra sapore e struttura chimica di alcuni flavonoidi degli agrumi'.

Tabella 5 - Correlazione tra struttura chimica e sapore dei principali flavonoidi degli agrumi.

Sa	pore (riferito a conc. mol.)	Specie di agrume
Flavonoidi amari (cloridrato di chinina=100)		
Naringina (naringenina-7-neoesperidoside) (G+R; 2-i)	20	pompelmo
Poncirina (isosakuranetina-7-neoesperidoside) (G + R		pompelmo
Florizina (diidrocalcone 2'-O-glucosio)	10	,
Naringerina-7- glucoside	6	
Neoesperidina (esperetina-7-neoesperidoside) (G + R	(2-1) 2	pompelmo
Flavonoidi dolci (saccarina = 1)		
Neoesperidina diidrocalcone	20	
Flavonoidi insapori		
Esperidina (esperetina-7-rutinoside) (G +R; 6→1) e rela	ativo calcone	arancia, pompelmo, limone
Eriocitrina (eriodictiolo-7-rutinoside) (G + R; 6+1)		limone
Narigenina-5-glucoside		
Naringenina-7-rutinoside (G + R; 6→1) e relativi calcon	e e diidrocalcone	arancia, pompelmo, limone
Isosakuranetina-7-rutinoside (G + R; 6-1)		arancia, pompelmo, limone

G = glucosio

R = ramnosio

NARINGINA (4',5-diidrossi-7-neoesperidosilnaringenina)

NEOESPERIDINA (3',5-diidrossi-4'metossi-7-neoesperidosilesperetina)

NEOERIOCITRINA (3',4',5-triidrossi-7-neoesperidosileriodictolo)

PONCIRINA (5-idrossi-4'metossi-7-neoesperidosilisosakuranetina)

Figura 10: Struttura chimica dei più comuni flavanoni neoesperidosidi (sapore amaro)

ESPERIDINA (3',5-diidrossi-4'metossi-7-rutinosilesperetina)

NARIRUTINA (4',5-diidrossi-7-rutinosilnaringenina)

ÓН

DIDIMINA (5-idrossi-4'-metossi-7-rutinosilisosakuranetina)

Figura 11:Struttura chimica dei più comuni flavanoni rutinosidi (insapori)

5.0 I FLAVONOIDI NELLE PIANTE

5.1. DISTRIBUZIONE NEL REGNO VEGETALE

Flavonoli e flavoni sono localizzati principalmente nelle foglie e nelle parti esteri delle piante, mentre solo quantità trascurabili sono reperibili al di sotto della supe ficie del suolo. Una eccezione è rappresentata dai tuberi di cipolla che contengori elevate quantità di 4'-D-glucoside della quercetina. Nelle verdure (ortaggi) predoni nano i glucosidi della quercetina, anche se sono pur presenti il canferolo, la luteo na e l'apigenina. I frutti contengono quasi esclusivamente glucosidi della quercetina Negli agrumi sono presenti in piccole quantità come flavanoni in forma idrossila e flavoni altamente metossilati (P.M.F.), ma soprattutto come flavanoni e flavo glucosidici (F.G.), in seguito ad un legame tra il gruppo semiacetalico di uno zuchero (β-neoesperidosio o β-rutinosio) e l'ossidrile del flavanone o flavone in pos zione 7.

Per i flavoni la glucosilazione avviene anche per legame diretto tra il carbonio C_6 dell'anello A del flavone con formazione dei flavoni C-glucosidici.

In alcune varietà di agrumi sono presenti le antocianidine sotto forma di antocian ne in seguito ad un legame tra il gruppo semiacetalico di una molecola di glucos e l'ossidrile in posizione 3 di una molecola di antocianidina.

5.2 Proprietà biologiche

I flavonoidi svolgono numerose funzioni nelle piante, alcune delle quali solo ipotizzate, altre chiaramente documentate. Alla base di tutte c'è da un lato la fotosei sibilità e dall'altro la capacità chelante nei riguardi di ioni metallici (come ferro rame): ciò spiega sia l'attività antiossidante che quella di filtro nei riguardi dell'radiazioni ultraviolette. Non è da escludersi, tuttavia, l'intervento di altri meccan smi biochimici, quali l'inibizione di specifici sistemi enzimatici cellulari.

I flavonoidi. sono dotati di attività antivirale, battericida, antifungina e antiparass taria. Sembra, inoltre, che essi controllino il livello di auxine, i regolatori della cre scita e del differenziamento delle piante. Essendo colorati, poi, essi posson influenzare l'impollinazione inibendo o stimolando l'alimentazione degli insetti. Ben Aziz e coll. hanno notato che alcuni flavonoidi polimetossilati contribuiscon alla resistenza degli agrumi al "mal secco".

Da estratti di buccia di varietà resistenti a questa malattia sono state isolate alcun sostanze fungistatiche: nobiletina, naringina, tangeritina ed altre, che non risultan presenti nella buccia degli agrumi suscettibili al "mal secco" ¹⁰.

Infine, è stato ipotizzato che i flavanoni glucosidici (esperidina, narirutina, eriocitrin ecc.) servano come mezzo di trasporto del glucosio sintetizzato sul tessuto elorofillica Questi composti, arrivati in alcune parti della pianta, in seguito ad idrolisi cedono glucosio necessario per i processi metabolici.

5.3 Flavonoidi e tassonomia agrumaria

La composizione quali-quantitativa dei flavonoidi degli agrumi varia in relazione alle diverse specie e cultivars, tanto che è stata proposta l'applicazione di tale conoscenza ai problemi della tassonomia agrumaria: gli agrumi si possono differenziare sulla base della diversa composizione in flavanoni glucosidici ed in flavoni polimetossilati.

Una prima classificazione del genere Citrus è basata sulla presenza o meno del gusto amaro. L'arancia amara, il pompelmo, il bergamotto sono caratterizzati dalla presenza di flavanoni neoesperidosidi di sapore amaro, mentre l'arancia, il mandarino, il limone sono caratterizzati da flavanoni rutinosidi, insapori, come l'esperidina.

I flavoni polimetossilati caratterizzano, soprattutto, il flavedo degli agrumi. Differenze nel contenuto in esperidina della buccia sono state riscontrate in 7 varietà di arance coltivate in Spagna: l'arancia Cadenera contiene quasi il doppio di esperidina rispetto all'arancia Comune, a parità di maturazione misurata col rapporto 'Brix/acidità".

Sono state anche trovate delle differenze nel contenuto in flavonoidi di succhi di arance coltivate in Libano: il succo di Valencia contiene circa il 50% in meno dei flavonoidi delle altre varietà¹².

L'effetto di due portainnesti sul contenuto in flavonoidi è stato studiato da Huet¹³: all'inizio della stagione, frutti di arancio W. Navel cresciuti su arancio amaro hanno contenuto in flavonoidi del 50% più alto rispetto a quello dei frutti di W. Navel coltivati su arancio trifoliato; alla fine della stagione però le differenze diventano trascurabili. Sono state riscontrate anche delle variazioni nel contenuto di flavonoidi di agrumi coltivati in diverse zone dello stesso Paese: così per l'arancio amaro e il limone in India,^{14 15 16 17} per il limone in Florida e in California rispetto a quelli delle aree agrumicole interne e quasi desertiche degli Stati Uniti¹⁸, per il pompelmo in Israele¹⁹ e per gli agrumi di altre zone.^{20 21}

5.4 FLAVONOIDI NEL CORSO DELLA MATURAZIONE DEGLI AGRUMI

Da segnalare infine un processo biogenetico riguardante i flavonoidi degli agrumi nel corso della loro maturazione.

Le differenze nei flavonoidi durante la maturazione non sembrano essere qualitative, ma solo quantitative, in quanto il contenuto di sostanze amare decresce piuttosto rapidamente nei mesi da luglio a novembre e poi più lentamente da dicembre ad aprile, con conseguente deamarizzazione.

Ciò è stato riscontrato per la naringina nel pompelmo,²² nel bergamotto e nel Natsudaidai²³, per la neoesperidina nell'arancio amaro²⁴ e per la poncirina, la naringina e la neoesperidina nel pummelo²⁵ 26.

A titolo di esempio, il contenuto di naringina del bergamotto subisce una marcata diminuzione con il progredire della maturazione, passando da valori di circa 800 p.p.m. a circa 300 p.p.m.⁸¹

Griffiths e Lime²⁷ non hanno trovato traccia della formazione della naringenia aglicone insapore della naringina, quando questo flavonone amaro scompare c pompelmo durante la maturazione. Tuttavia la presenza della roifolina, il corrispo dente flavone insapore, assieme alla naringina nel pompelmo²⁸, permette di avanz re l'ipotesi che la scomparsa dell'amaro nel pompelmo durante la maturazione s dovuta alla conversione della naringina a roifolina²⁹.

6.0 FLAVONOIDI E ALIMENTAZIONE

6.1 DISTRIBUZIONE DI ALCUNI FLAVONOIDI IN ALCUNI ALIMENTI VEGETALI

La presenza di flavonoidi è molto diffusa nelle piante e nei prodotti da queste deri vati, soprattutto negli alimenti fermentati e processati.

Nella tabella 6 sottostante riportiamo i principali flavonoli, antocianine, flavanon glucosidici, catechine (flavan-3-oli), calconi, flavoni polimetossilati presenti i alcuni frutti (mela, arancia, limone, pompelmo, uva, pera, pomodoro ecc.)³⁰.

Tabella 6 - Principali flavonoidi presenti in diversi frutti

	TIPO DI FLAVONOIDI								
Frutto	Flavonoli	Antocianine	Flavan-3-oli (cate- chine), Flavanoni, Flavanoni glucosidici.	Flavoni polimetossilati e flavoni glucosidici					
Mela	Quercetina, Canferolo, Rutina	Cianidine glucosi- late	(+) Catechina (-) Epicatechina						
Arancia rossa e bionda		Derivati glucosidici della Pelargonidina, Peonidina, Delfinidina, Petunidina	Esperidina, Narirutina, Eriocitrina, Narirutina4'-glucoside, Naringenina, Esperetina, Eriodictolo	Sinensetina, Nobiletina, Tangeretina, Isosinensetina.					
Pompelmo			Naringina, Narirutina, Esperidina, Neoesperidina	Tangeretina ed altri flavoni polimetossilati					
Limone	Rutina, Limocitrina		Esperidina, Eriocitrina, Naringenina, Esperetina	Diosmina,Luteolina -7- rutinoside, Apigenina					
Uva	Quercetina, Canferolo, Rutina, Miricetina	Derivati glucosidici della Cianidina, Peonidina	(+) Catechina (-) Epicatechina (+) Gallocatechina (-) Epigallocatechina						
Pera	Quercetina, Isoquercetina, Canferolo, Isoramnetina	Derivati glucosodici della Cianidina	(+) Catechina (-) Epicatechina						
Pomodoro	Canferolo e derivati glucosidici della Quercetina		Naringenina, Naringenina glucosidica						
Prugna	Glucosidi della Quercetina e del Canferolo	Derivati glucosidici della Cianidina e della Peonidina	(+) Catechina (-) Epicatechina						

6.2 CONTENUTO IN FLAVONOIDI DI DIVERSI PRODOTTI VEGETALI

Le quantità di alcuni flavonoidi presenti in alcuni prodotti vegetali sono riportate nelle tabelle 7³¹ 8³² 9³³.

Il contenuto in singoli flavonoidi, (quercetina, canferolo, miricetina, apigenina, luteolina, catechine) di un gruppo selezionato di alimenti vegetali (verdure, ortaggi, cereali, legumi, succhi di frutta e bevande), secondo diversi autori, è riportato nelle tabelle 8¹² e 9³¹.

Tabella 7 - Contenuto in singoli flavonoidi di alcuni alimenti vegetali

Alimento	Composto	Contenuto medio mg/100g ¹
	Quercetina	10.4
Cipolla rossa	Quercetina	30.7
Cipolla gialla	Quercetina	19.2
Broccoli	Quercetina	1.5
	Canferolo	6.0
Tè verde	Epigallocatechina	3.9
	(+)-Catechina	0.8
	(-)-Epicatechina	2.7
	Epigallocatechina gallata	28.6
	(-)-Epicatechina gallata	6.9
	Quercetina	2.3
	Canferolo	1.3
	Miricetina	0.8
Tè nero	Epigallocatechina	0.5
	(+)-Catechina	0.4
	(-)-Epicatechina	0.7
	Epigallocatechina gallata	2.9
	(-)-Epicatechina gallata	2.0
	Quercetina	1.7
	Canferolo	1.4
	Miricetina	0.3
Vino rosso	Quercetina	0.7
	Miricetina	0.6
	(+)-Catechina	6.3
	(-)-Epicatechina	3.2
Mela	Quercetina	4.8
	Canferolo	0.5
Limone	Naringenina	0.6
	Esperetina	17.2
	Luteolina	1.5
	Eriodictiolo	17.6
	Quercetina	1.1
Arancia	Naringenina	11.9
	Esperetina	41.4

Tabella 8 - Contenuto in flavoni e flavonoli (') di un gruppo di alimenti vegetali selezionati (verdure, ortaggi, cereali, legumi e frutta)¹⁷

ALIMENTO	QUERCETINA	CANFEROLO	MIRICETINA	LUTEOLINA
Lattuga¹	0.7-3.0	<0.2	<0.1	<0.1
Cipolle'	28.4-48.6	<0.2	<0.1	<0.1
Cavoli	11.0	n.r.	n.r.	n.r.
Fagiolini verdi	3.2-4.5	n.r.	n.r.	n.r.
Broccoli	3.0	n.r.	n.r.	n.r.
Pomodori	0.8	n.r.	n.r.	n.r.
Indivia'	<0.1	1.5-9.5	<0.1	<0.1
Pepe rosso ^a	<0.1	<0.2	<0.05	0.7-1.4
Fave	2.0	<0.2	- 2.6	<0.1
Mele ¹	2.1-7.2	<0.2	<0.1	<0.1
Fragole ¹	0.8-1-0	12	<0.1	<0.1

(')I risultati sono espressi come mg di agliconi ottenuti da idrolisi acida per 100 g di peso fresco

Come si può osservare, la massima concentrazione di quercetina la si osserva nelle cipolle.

Nella tabella 9 è riportato, invece, il contenuto in singoli flavoni e flavonoli di una serie di bevande (infusi di tè, succhi di frutta e vini)³

Tabella 9 - Contenuto in flavoni e flavonoli (') di un gruppo di bevande selezionate (succhi di frutta, infusi di tè e vini)

ALIMENTO	QUERCETINA	CANFEROLO	MIRICETINA	LUTEOLINA
Succo di mela**	0.3	<0.1	<0.05	<0.1
Succo di uva ^h	0.7-0.9	. n. r.	n. r.	n. r.
Succo di limone	0.7	n. r.	n. r.	n. r.
Succo di pomodoro"	1,3	n. r.	n. r.	ń. r.
Vino rosso ^a	0.4-1.6	<0.1	0.7-0.9	<0.1
Vino bianco	<0.1	n. r.	n. r.	n. r.
Birra	<0.1	n. r.	n. r.	n. r.
Caffè	<0.1	n. r.	n. r.	n. r.
Cioccolato al latte	<0.1	n. r.	n. r.	n. r.
Tè nero (busta)	1.7-2.5	1.3-1.7	0.3-0.5	<0.1

^{(&#}x27;)I risultati sono espressi come mg di agliconi ottenuti da idrolisi acida per 100 ml di bevanda

Come si può osservare gli infusi di tè hanno la più elevata concentrazione in flavonoidi.

n.r. dati non riportati.

^a variazioni in tre stagioni

[&]quot; cinque varietà

<0.05, <0.1, <0.2 limite inferiore di rilevamento.

^{*} cinque marche

^b mg/100g

<0.05, <0.1, <0.2 limite inferiore di rilevamento.

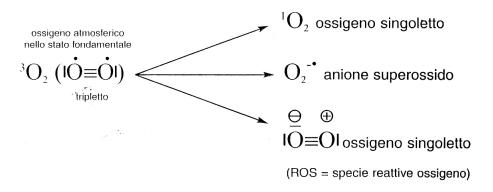
7.0 L'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

7.1. FORMAZIONE DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO E MECCANISMI DI DIFESA I flavonoidi sono potenti antiossidanti e forniscono un esempio di attività scavenger diretta nei riguardi di radicali liberi.

Sotto questo nome si intendono molecole o ioni che hanno elettroni non accoppiati, quindi sono entità chimiche altamente reattive che possono attaccare un gran numero di biomolecole (come proteine, DNA ecc..) ed essere molto pericolose per l'organismo.

Essi vengono normalmente prodotti durante il metabolismo ossidativo cellulare. La loro presenza non è dannosa, anzi sono indispensabili nel combattere infezioni batteriche e nel controllo del tono della muscolatura liscia, ma qualora se ne verifichi un accumulo e/o una overproduzione (conseguente a condizioni fisiopatologiche o a depauperamento delle difese antiossidanti dell'organismo) sono causa di estesi danni (il cosiddetto "stress ossidativo cellulare"), dovuti alla loro interazione con i vari componenti cellulari.

I radicali di maggiore interesse biologico sono quelli dell'ossigeno che si formano (ROS=REACTIVE OXYGEN SUBSTANCES) in seguito alla riduzione monovalente dell'ossigeno tripletto, durante il processo di metabolizzazione dell'organismo. La formazione di questi radicali può essere cosi schematizzata:



Il radicale anione superossido (O₂ ') può rappresentare il substrato per la generazione di tre ROS coinvolti nell'ossidazione degli alimenti:

1) Acqua ossigenata (H₂O₂) ottenuta per dismutazione spontanea o grazie all'enzima superossidodismutasi (SOD)

$$O_2^{-\bullet} + O_2^{-\bullet} + 2H^+ \xrightarrow{\text{spontanea}} H_2O_2 + O_2$$

2) Radicale ossidrile (OH') generato dalla reazione tra l'acqua ossigenata ed il radicale superossido in presenza di Fe²⁺ e Fe³⁺ (reazione di Haber-Weiss):

$$H_2O_2 + O_2^{-\bullet} \xrightarrow{\text{metalli}} OH + OH + 1O_2$$
 (1)

3) Ossigeno singoletto ('O₂) che si forma durante la dismutazione spontanea di O₂ e durante la reazione di Haber-Weiss (Equaz. 1).

L'acqua ossigenata può derivare direttamente dalla riduzione monovalente dell'ossigeno allo stato fondamentale

$$^{3}O_{2} \xrightarrow{+e^{-}} O_{2} \xrightarrow{+e^{-}} H_{2}O_{2}$$

I metalli di transizione, presenti come ioni nei vegetali, funzionano come donatori di elettroni e possono ridurre l'acqua ossigenata con produzione del radicale ossidrile ('OH) secondo la reazione descritta da Fenton:

$$H_2O_2 + Fe^{++} \longrightarrow {}^{\bullet}OH + OH^{-} + Fe^{3+}$$

L'effetto di tutte queste molecole reattive a livello cellulare si esplica su substrati diversi:

- sul DNA, con possibili fenomeni di mutazione che possono essere causa dello sviluppo di tumori e di danno cellulare;
- sulle proteine, di cui modificano la struttura e la funzione, con conseguente alterazione delle attività enzimatiche e del turnover proteico
- sui lipidi, con fenomeni di perossidazione che determinano alterazioni della struttura e delle funzioni delle membrane, modificazioni a carico delle lipoproteine (le LDL ossidate sono un importante fattore patogenetico nel processo aterosclerotico) e di altre strutture essenziali (ad esempio, la degenerazione della mielina è implicata in alcuni disordini neurologici);
- sui carboidrati, con possibili alterazioni a carico di ricettori.

I danni provocati dai radicali liberi e dalle altre specie reattive si pensa che siano implicati in una serie di patologie, alcune delle quali, sono di seguito riportate nella tabella 10³⁴.

Tabella 10 - Patologie associate al danno ossidativo.

Aterosclerosi	Invecchiamento
Artriti e malattie infiammatorie	Pancreatiti
Cataratta	Malattie infiammatorie del tratto intestinale
Diabete	Morbo di Parkinson
Ischemia	Disfunzioni polmonari
Tumori	Lesioni cutanee
Sclerosi multipla	Malattie renali

Il meccanismo di difesa nelle cellule aerobiche da queste specie di ossigeno reattive si basa su:

- antiossidanti di tipo fenolico che agiscono sia come donatori di idrogeno che di elettroni (flavonoidi, aminoacidi solforati e analoghi).
- antiossidanti di tipo enzimatico (proteine enzimatiche capaci di catalizzare la degradazione delle ROS, come la superossido-dismutasi, la glutatione perossidasi).
- antiossidanti di tipo vitaminico (vitamina C, ubichinone, carotenoidi, vitamina E o tocoferolo)
- attivatori di enzimi antiossidanti di tipo oligominerale (selenio, zinco, magnesio, rame, manganese).

Tra gli antiossidanti sopra nominati i flavonoidi agiscono secondo i seguenti meccanismi:

- inibiscono gli enzimi (ossidasi e lipossigenasi) che catalizzano le reazioni di formazione delle ROS;
- chelano i metalli quali il ferro ed il rame, come si può osservare nella figura 12, bloccando così la reazione descritta da Fenton, che porta alla formazione del temibilissimo radicale ossidrile (OH') (equazione 1)

Figura 12: Chelazione di ioni metallici da parte di alcuni polifenoli

grazie alla loro struttura polifenolica cedono l'idrogeno ossidrilico del gruppo fenolico ai radicali liberi (scavengers di radicali liberi) trasformandoli in radicali molto meno aggressivi. Ad esempio tra gli antiossidanti di tipo vitaminico illustriamo il meccanismo di azione del tocoferolo e del \(\beta\)-carotene:

Come si vede da questa reazione un radicale lipidico molto instabile (LOO') è trasformato dall'antiossidante T-H in un prodotto stabile LOOH, con formazione di un radicale tocoferile (T').

Da sottolineare che il radicale tocoferile (T'), oltre ad essere meno reattivo del radicale lipidico, viene trasformato in tocoferolo da una serie di antiossidanti, tra cui la vitamina C o polifenoli vari.

Per quanto riguarda il \(\beta\)-carotene, assorbe l'eccesso di energia dell'ossigeno singoletto, riportandolo al suo stato normale:

$$\beta$$
-carotene + ${}^{1}O_{2} \rightarrow \beta$ -carotene* + O_{2}

7.2 Relazioni tra struttura dei flavonoidi ed attivita' antiossidante

I criteri strutturali³⁵ per l'effettiva azione "scavenger" di alcuni flavonoidi nei riguardi dei radicali liberi sono i seguenti:

- la presenza del gruppo ossidrilico in posizione 3 dell'anello insaturo C: confrontando la quercetina con la rutina e la luteolina si osserva che il blocco o la rimozione di tale gruppo 3-OH dalla partecipazione alla delocalizzazione elettronica riduce sostanzialmente l'attività antiossidante e quasi approssimativamente nella stessa misura;
- il doppio legame in posizione 2,3 con il gruppo 3-OH e quello 4-cheto nell'anello C: se si confronta la taxifolina (diidroquercetina) con la quercetina, la riduzione del legame insaturo nell'anello B della quercetina a taxifolina (dudroquercetina) riduce l'attività antiossidante per l'eliminazione della possibilità di delocalizzazione elettronica attraverso la struttura; ciò ha apparentemente una conseguenza analoga per l'attività antiossidante a quella che deriva dalla rimozione del gruppo 3-OH o dall'assenza del doppio legame 2,3 e del gruppo 4-cheto (come nella catechina);
- la struttura O-diidrossi nell'anello B: la presenza di un singolo gruppo ossidrilico nell'anello B al posto della struttura O-diidrossi riduce drasticamente l'attività antiossidante, sottolineando il significato fondamentale di questo arrangiamento strutturale. Confrontando la crisina con l'apigenina e il canferolo, l'attività antios-

sidante è più che la stessa, suggerendo che un gruppo ossidrilico isolato nell'anello B non reca contributi all'attività antiossidante. Se un gruppo 3-OH è presente sotto queste condizioni strutturali è irrilevante.

Un'ulteriore conferma di quanto sopra affermato è data dal raffronto tra l'attività antiossidante dei flavanoni (naringenina ed esperetina) con quella dei flavonoli (quercetina) e delle antocianidine (cianidina). Questi due ultimi presentano un'attività antiossidante quattro volte superiore a quella dei flavanoni.

Possiamo elencare³⁵, in ordine di attività antiossidante crescente, i seguenti flavonoidi:

Naringenina < Eriodictolo < Tangeretina < Luteolina < Canferolo < Quercetina

Secondo Dziedzic et al. ³⁶ e Rice Evans et. al. ³⁷ la presenza di due gruppi ossidrilici nella molecola dei flavonoidi (posizioni 3' e 4' dell'anello B) insieme al gruppo 3-OH, al doppio legame 2,3 ed al gruppo 4-cheto, comporta un'elevata attività antiossidante. Un'esempio di quanto affermato è l'elevato potere antiossidante della quercetina. La genotossicità dei flavonoidi nei linfociti umani in vitro sembra essere connessa con la planarità della molecola. Solo il planare flavone o i derivati del flavonolo mostrano attività, mentre i flavanoli non planari sono inattivi.

È stato visto che alcuni flavonoidi sono inibitori selettivi della lipoossigenasi e della cicloossigenasi, alcuni inibiscono ambedue gli enzimi e altri ancora sono scarsamente attivi nei riguardi di ambedue gli enzimi. È stato dimostrato che il 3,5,6,7,3',4' esametossiflavone manifesta un'elevata attività inibitoria nei confronti dell'enzima 15-lipoossigenasi. Queste selettività suggeriscono che differenti meccanismi struttura-dipendenti determinano l'inibizione di due enzimi da parte dei flavonoidi.

I flavonoidi possedendo gruppi ossidrilici inibiscono l'attività enzimatica P-450, mentre quelli che mancano di gruppi ossidrilici stimolano la stessa attività. Analoghe relazioni tra struttura e attività esiste per quanto riguarda l'effetto di flavoni sull'attività dell'enzima etossicumarina deetilasi in microsomi epatici di ratto. Inoltre, Friedman e coll. hanno mostrato che vari flavonoidi differiscono nei loro effetti inibitori sull'attività costitutiva e indotta dell'idrocarburo idrossilasi nel fegato di ratto. Anche l'idrossilazione e la glicosilazione del flavone modifica la potenza di questi composti.

8.0 PROPRIETÀ FARMACOLOGICHE

I flavonoidi sono tra i più comuni metaboliti delle piante trovandosi quasi ubiquitariamente nei frutti, nei vegetali e nelle bevande della nostra dieta così come in diverse piante medicamentose. A causa della loro importanza i flavonoidi sono stati estensivamente valutati per il potenziale genotossico e carcinogenetico. L'uso dei flavonoidi nel trattamento delle malattie è in larga misura basato sull'empirismo perché la pratica è molto più vecchia della scienza nella chimica. Fino ad epoche recentissime, le conoscenze sulla biochimica dei flavonoidi non sono state sufficienti per una razionale applicazione medica di queste sostanze. Esperimenti clinici controllati sull'uso dei flavonoidi mediante lineè ben definite sono davvero pochi e i flavonoidi usati sono stati quelli facilmente disponibili come sostanze pure o in miscele come la preparazione di Propolis. La maggior parte degli studi sono stati condotti in piccoli gruppi, senza quantificazione dell'assorbimento. La loro somiglianza strutturale a nucleosidi, isoallossazina ed acido folico, costituisce la base di molte delle ipotesi correnti sulle loro azioni fisiologiche. Alcune di queste malattie nelle quali è stato tentato l'impiego terapeutico dei flavonoidi sono elencate nella tabella 11.

Tabella 11 - Effetti biochimici ed applicazioni terapeutiche dei flavonoidi.

BERSAGLI	RUOLO NELLE MALATTIE			
Sintesi di prostaglandine	Anti-infiammatori / analgesici			
laluronidasi	Anti-allergici			
Perossidazione dei lipidi	Anti-aterosclerotici			
Topoisomerasi I e II	Anti-proliferativi			
Trascrittasi inverse	Anti-retrovirali			
Proteolisi dellå matrice	Anti-metastatici			
Enzimi lisosomiali	Anti-virali			
Proprietà estrogeniche	Anti-proliferativi/anabolizzanti ossei			
Prolina idrossilasi	Anabolizzanti ossei			

L'effetto antinfiammatorio dei flavonoidi può essere spiegato sulla base del loro effetto inibitorio sul metabolismo dell'acido arachidonico, dal quale per azione dell'enzima cicloossigenasi prendono origine le prostaglandine (PG). L'infiammazione è noto essere accompagnata dal rilascio di prostaglandine che, attraverso la chemiotassi, attraggono i leucociti al punto di invasone, creano dolore locale e incrementano la temperatura corporea. La nota inibizione della ciclossigenasi e della lipoossigenasi, con il conseguente impedimento della produzione di PG, potrebbero portare all'osservata attenuazione del dolore e all'effetto antipiretico.

Vi è una relativa scarsezza di informazione sugli effetti dei flavonoidi sul sistema

nervoso centrale. Solo pochi risultati hanno mostrato un'attività analgesica da parte di certi flavonoidi senza coinvolgimento dei recettori per gli oppiacei, probabilmente attraverso l'inibizione della sintesi delle prostaglandine. Con la cefalea, una plausibile spiegazione potrebbe essere il rilasciamento dei muscoli lisci, che sono affetti da spasmi, attraverso l'azione di prostaglandine e leucotrieni. I flavonoidi riducono inoltre il dolore nell'ulcera gastrica e duodenale, nella paradontopatia, punture di insetti e nell'infiammazione articolare, senza causare effetti collaterali. L'inibizione dell'induzione di idrolasi catabolizzanti da parte delle prostaglandine potrebbe offrire una spiegazione plausibile per comprendere gli effetti di questi composti.

Un'importante azione farmacologica riconosciuta ai flavonoidi è quella della riduzione della permeabilità e fragilità capillare con attività antivaricose ed antiemorroidarie.

Il meccanismo per mezzo del quale questi composti agiscono sembra sia dovuto alla loro capacità di potenziare l'acido ascorbico (questo, come è noto, possiede azione trofica sui tessuti mesenchimali e quindi sulla sostanza cementante l'endotelio capillare). Secondo un altro meccanismo la parete capillare diverebbe più resistente alla rottura perchè la sua membrana non sarebbe più costituita, come di norma, da 4 singoli strati di molecole fosfolipidiche (2 nel foglietto interno, luminale, e 2 in quello esterno, interstiziale), ma da questi più altri quattro strati di molecole di flavonoidi (antocianidine), che sarebbero "attaccate" alla regione polare delle molecole fosfolipidiche.

Grazie a queste proprietà, i flavonoidi vengono spesso associati ai farmaci dicumarolici nella terapia anticoagulante, nell'intento di neutralizzare la tendenza all'emorragia capillare.

Gli effetti dei flavonoidi sul cancro³⁸ comprendono:

- inibizione della formazione addotta fra carcinogeni prossimi e macromolecole quali il DNA.
- capacità a stimolare i sistemi enzimatici epatici che facilitano la trasformazione metabolica di idrocarburi aromatici policiclici carcinogeni verso forme meno cancerogene.
- inibizione della proliferazione delle cellule del cancro. Ad esempio si stanno facendo ricerche sulla tangeretina come potenziale farmaco in vivo anti-invasivo e anti-metastasi.
- inibizione del ristabilimento del DNA della cellula del cancro tramite effetti di topoisomerasi.

Quercetina e canferolo esibiscono potenti attività inibitorie sulla crescita in cellule leucemiche umane e su diverse altre linee cellularineoplastiche. Inoltre, la quercetina e certi flavonoidi ad essa correlati, possono agire come inibitori della carcinogenesi sperimentale cutanea. Ed ancora: l'acido flavone-8-acetico è un farmaco flavonoide che aumenta l'attività natural killer di cellule di topo, induce l'espressione del gene delle citochine e sinergizza con l'interleuchina 2 ricombinante nel tratta-

mento del cancro renale murino. I flavonoidi inibiscono anche l'invasione di nume rosi tipi di cellule attraverso differenti meccanismi, il più notevole dei quali è l'ini bizione della proteolisi della matrice extracellulare.

Recentemente, in esperimenti condotti in vivo su modelli animali è stato dimostra to clie l'ipriflavone, un derivato dell'isoflavone, è attivo nel prevenire la riduzione della massa ossea in diversi modelli di osteoporosi sperimentale.

Tra i flavonoidi polimetossialati, presenti nelle scorze di agrumi, è stato dimostrato che la tangeretina può essere utilizzata come potenziale farmaco anti-invasivo anti-metastasi.

Nella maggioranza dell'epitelio umano, la normale architettura (fig.13) del tessut dipende dall'azione dell'adesione cellula-cellula della molecola E-caderina, per cu questa viene considerata come una molecola fisiologica "soppressore dell'invasio ne". L'invasività del tumore è talvolta il risultato di un funzionamento difettoso dell'E-caderina. Il flavonoide tangeretina degli agrumi ristabilisce al funzione ade siva cellula-cellula della E-caderina almeno in un tipo di cellule del cancro al seno nelle donne ed inibisce l'invasione in vitro.

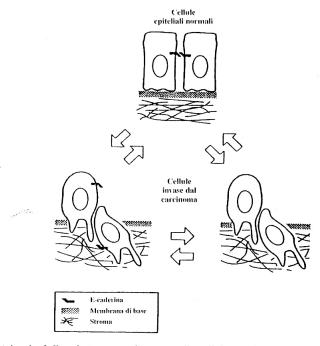


Figura 13: Molecola di E-caderina e sua funzione sulle cellule epiteliali

Un'ulteriore proprietà dei flavoni polimetossilati degli agrumi (sinensetina, tangeretina, nobiletina) è quella di agire come inibitori dell'enzima 15-lipoossigenasi.

Si ritiene che questi composti naturali possano proteggere le LDL (lipoproteine a bassa densità) da eccessiva ossidazione con conseguente rallentamento del processo di sviluppo dell'aterosclerosi.

8.1 CONSUMO DA PARTE DELL'UOMO

Hertog e coll. 40 condussero un'indagine riguardante l'assunzione di flavoni e flavonoli in 8 nazioni. I risultati sono raccolti nella tabella 12.

Tabella 12 - Assunzione di flavoni e flavonoli di uomini di età media intorno al 1960 in varie nazioni e contributo degli alimenti all'assunzione totale.

NAZIONE	FLAVONI E FLAVONOLI	QUERCETINA	FRUTTA E. VERDURA	VINO ROSSO	ΤÈ
	(mg/die)		(%)		
Finlandia	6	6	100	0	0
USA	13	11	80	0	20
Serbia	12	10	98	2	0
Grecia	16	15	97	3	0
Italia	27	21	54	46	0
Olanda	33	13	36	0	64
Croazia	49	30	82	18	0
Giappone	. 64	31	10	0	90

Come si può osservare dall'analisi delle prime due colonne della Tabella 12, i maggiori consumatori di flavoni e flavonoli sono i Giapponesi e i Croati; gli Italiani si collocano in una posizione intermedia; all'ultimo posto i finlandesi.

Nella dieta statunitense⁴¹ il consumo totale di flavonoidi è stimato intorno a lg/die, dei quali circa 100 mg (espressi come agliconi) consistono di flavonoli e flavoni. La distribuzione e la quantità di flavonoidi consumati quotidianamente comprendono: 44 mg dai cereali, 79 mg dalle patate, bulbi e radici; 45 mg da arachidi e noci; e 162 mg da verdure ed erbe. La maggioranza dei flavonoidi assunti con l'alimentazione deriva dal cacao, dalla cola, dal caffè, tè, birra e vino (420 mg/die) con un'aggiunta di 290 mg/die da frutti e relativi succhi. Comunque queste stime sono basate su dati sulla composizione degli alimenti probabilmente inaccurati o incompleti.

L'assunzione media di flavonoli e flavoni combinati è circa 27 mg al giorno.

La quercetina rappresenta il principale flavonolo alimentare con 17mg/die e, per i finlandesi, è l'unico flavonoide.

Come si può osservare dalle rimanenti colonne della tabella 12, le principali fonti di quercetina sono il tè in Giappone e in Olanda, il vino rosso in Italia e la cipolla negli USA.

Non sono ancora stati individuati dei livelli minimi di assunzione per i flavonoidi. Dal punto di vista tossicologico, negli USA, poiché approssimativamente il 5% dei

flavonoidi consumati è rappresentato dalla quercetina, è stato raccomandato un con sumo quotidiano non superiore a 50 mg. Tuttavia, un rapporto del Programm Nazionale di Tossicologia ha più recentemente (1992) suggerito precauzionalmen te una dose non superiore a 25 mg/die/persona.

8.2 Specialità medicinali contenenti flavonoidi

In tabella 13 riportiamo un elenco di specialità medicinali contenenti flavonoid registrate in Italia

Tabella 13 - Elenco delle specialità medicinali contenenti flavonoidi registrate in Italia.

Principio attivo	Nome commerciale	Indicazioni terapeutiche riportate nella scheda tecnica dei farmac	
DIOSMINA	Venosmine Doven Diosven Alven	Coadiuvanti nel trattamento delle varici e delle complicazioni flebitiche, delle emorroidi interne ed esterne e, in genere, negli stati di fragilità capillare e nelle loro manifestazioni (ecchimosi, ematomi, porpora).	
O-ß-IDROSSIETIL- -RUTOSIDEA	Venoruton	Malattie da aumentata fragilità capillare; trattamento delle ulcere varicose e degli stati emorroidali.	
	Fleboside	Malattie da aumentata fragilità capillare; trattamento delle ulcere varicose e degli stati emorroidali.	
	Venolen	Malattie da aumentata fragilità capillare; trattamento delle ulcere varicose e degli stati emorroidali.	
	Dermoangiopan	Dermatiti flebopatiche, distrofie cutanee da varici venose, stati linfedematosi.	
	Traumal	Contusioni, ematomi, ecchimosi.	
ESPERIDINA	Reparil	Terapia degli edemi negli interventi chirurgici in generale. Stasi venose, varici, emorroidi, tromboflebiti.	
	Edeven	Edemi cerebrali da trombosi; emorragie cerebrali; stasi venose, varici, emorroidi tromboflebiti.	
FRAZIONE FLAVONOICA PURIFICATA E MICRONIZZATA	Arvenum Daflon	Coadiuvanti nel trattamento delle varici e delle complicanze flebiti- che; degli stati di fragilità capillare; delle emorroidi interne ed esterne.	
COMPLESSO ANTICIANOSIDICO DEL MIRTILLO AL 36% DI ANTICIANOSIDI	Tegens	Coadiuvante nel trattamento sintomatico dei disturbi da varici da alterata permeabilità capillare.	
	Ultravisin	Retinopatie vascolari; turbe della visione notturna crepuscolare; miopia elevata e degenerativa.	
	Angiorex	Stati di fragilità e alterata permeabilità dei capillari sanguigni.	

Fonte: Bollettino d'informazione sui farmaci, anno IX, n.5, pag. 38 (2002).

8.3 ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEI FLAVONOIDI E PROTEZIONE DELLE BEVANDE AGRUMA-RIE DALLE OSSIDAZIONI

Poiché alcuni flavonoidi si trovano nei succhi in equilibrio con i corrispondenti calconi si ritiene che essi possano influire sui processi ossido-riduttivi della vitamina C e degli olii essenziali⁴².

L'attività antiossidante dei flavonoidi degli agrumi è da lungo tempo riconosciuta, particolarmente per quanto riguarda la protezione dell'acido ascorbico, ma sono stati ottenuti da diversi AA. risultati contrastanti. Di Giacomo e Rispoli⁴² riferiscono che i flavonoidi offrono una considerevole protezione alle bevande agrumarie contro le ossidazioni catalizzate da raggi ultravioletti, che provocano perdita di colore, aroma e vitamina C, con il risultato che i prodotti contenenti la polpa hanno una maggiore durata rispetto alle bevande senza polpa. Gli stessi autori aggiungendo acido ascorbico (40 ppm) e flavonoidi (250 ppm) a succhi di agrumi senza polpa, hanno ottenuto una migliore conservazione del colore della bibita stessa.

D'altra parte Gutfinger e Zimmermann⁴³ riferiscono che l'esperidina, la naringina e i loro agliconi non ritardano il deterioramento ossidativo di diversi oli vegetali, sebbene i flavonoidi grezzi degli agrumi risultino soddisfacentemente antiossidanti per i grassi animali, gli oli vegetali e l'acido ascorbico. Anche Davidek⁴⁴ ha riscontrato nei flavonoidi grezzi una grande attività stabilizzante contro l'ossidazione dell'acido ascorbico, mentre la naringina purificata svolge solo una modesta attività; l'esperidina invece non presenta alcuna attività nei riguardi di questo processo ossidativo¹⁵.

È stato dimostrato che il principale antiossidante naturale degli agrumi è probabilmente un tocoferolo, presente alla concentrazione di 0,01% nel flavedo dell'arancia e di 0,4% nell'olio di arancia non lavato, mentre non si riscontra nei succhi sottoposti a procedimenti di lavorazione. Appare evidente che sia ossidazioni lipidiche che altre ossidazioni determinanti cambiamenti di colore e aroma possono essere inibite all'α-tocoferolo, mentre lo stesso antiossidante non riesce ad impedire l'ossidazione dell'acido ascorbico, causata dalla formazione di un complesso tra flavonoidi e metalli, come è stato dimostrato per l'imbrunimento dell'olio della buccia del Natsudaidai⁴⁶.

8.4 Considerazioni conclusive

L'identificazione dei flavonoidi biologicamente attivi nella frutta, nelle verdure e in alcune bevande di largo consumo (vino, birra, tè) può aiutare a comprendere le basi biochimiche e farmacologiche dell'attività antiossidante di sostanze naturali la cui assunzione mediante l'alimentazione può proteggere l'uomo dagli effetti nocivi dei radicali liberi. Nel contempo, queste informazioni possono essere utili al fine di sviluppare la produzione e la commercializzazione di prodotti alimentari sicuri e di additivi a base di flavonoidi aventi adeguate proprietà antiossidanti.

9.0 METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DEI FLAVONOIDI DEGLI AGRUMI

9.1 METODI SPETTROFOTOMETRICI

Per i flavonoidi glucosidici il metodo più diffuso, in quanto semplice e rapido, è quello sviluppato da Davis nel 1947. Nel test di Davis⁴⁷ i flavonoidi reagiscono con alcale diluito in ambiente di glicol dietilenico e vengono rapidamente convertiti nei corrispondenti calconi gialli, in seguito alla rottura dell'anello del γ-pirone.

Ad esempio la naringina reagisce con soda secondo la seguente reazione:

Misurando l'assorbanza a 420 nm si può calcolare la concentrazione totale dei flavonoidi espressa come Naringina nei succhi di pompelmo, bergamotto, arancia amara, come Esperidina nel succo di arancia e limone. È da evidenziare che quello descritto non è un test specifico per un singolo flavonoide ma permette di ottenere una stima dei flavonoidi presenti (vedi paragrafo 9.2).

Un altro metodo spettrofotometrico a luce U.V. è quello sviluppato da Hendrickson nel 1958¹⁸.

Il campione viene diluito con propan-2-olo e filtrato in modo da ottenere un estratto il cui contenuto in flavonoidi è proporzionale alla differenza delle assorbanze lette, contro propan-2-olo, a 295 e 290 nm ($A_{295} - A_{290}$).

Un metodo simile al precedente è quello di Vandercook e Rolle (1963)⁴⁹ che prevede la misura dell'assorbanza di una soluzione alcolica del succo chiarificato a 328 nm (assorbimento dei polimetossiflavoni) ed a 280 nm (assorbimento dei flavanoni glucosidici) per ottenere una misura dei polifenoli totali. La misura viene espressa in unità di assorbanza.

Succhi estratti drasticamente danno valori di assorbanza, in corrispondenza delle lunghezze d'onda soprannominate, molto elevati.

Nella figura 14 (a pagina seguente) riportiamo gli spettri UV- Vis dell'esperidina, della sinensetina, del \(\beta\)-carotene:

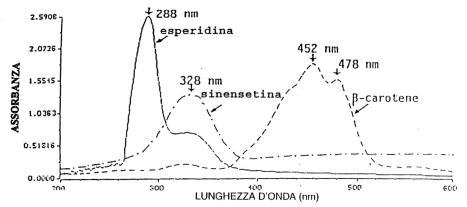


Figura 14: Spettri UV-visibile dell'esperidina, della sinensetina e del B-carotene

Infine un metodo finalizzato alla ricerca dell'estratto acquoso di polpa (pulp-wash) o WESOS (water extractable soluble orange solids) aggiunto al succo d'arancia è quello proposto da Petrus Attaway⁵⁰ in cui vengono misurate le assorbanze UV/visibile a 280, 325 e 443 nm nella soluzione etanolica del succo in esame.

In presenza di "pulp-wash" i valori di A_{280} (flavanoni glucosidici) e di A_{325} (polimetossiflavoni) aumentano mentre quello di A_{443} (carotenoidi) diminuisce; inoltre la somma delle assorbanze ($A_{280}+A_{325}+A_{443}$) che nei succhi di arancia genuini raramente supera il valore di 5,0; nei succhi ai quali è stato aggiunto pulp-wash arriva a valori che superano 11,0; inoltre il rapporto A_{443} / A_{325} è inferiore a 0,100.

9.1.1 Determinazione dei flavonoidi totali secondo il metodo Davis. Metodi di analisi RSK N. 6.11, p. 94 (1987).

Principio del metodo

Misura spettrofotometrica della colorazione gialla ottenuta in seguito alla reazione dei flavonoidi con alcali diluito in ambiente glicol dietilenico.

Reagenti: Glicol dietilenico, Sodio idrossido (C=4M), Esperidina, Naringina.

Materiale: Centrifuga, Spettrofometro UV-Visibile, Cuvette per spettrofometro con cammino ottico di 10 mm.

Procedura

A) Preparazione del campione

'Agitare il campione di succo per circa tre minuti. Centrifugare un'aliquota per 20 minuti a 15.000giri/min. La soluzione surnatante viene utilizzata per la misura.

B) Misura

In una beutina da 50 ml versare, nell'ordine, 0,2 ml di soluzione surnatante, 10 ml di glicol dietilenico al 90% e 0,2 ml di idrossido di sodio 4 M. Attendere 30 minu-

ti per lo sviluppo del colore e quindi leggere l'assorbanza a 420 nm contro un bianco costituito dal succo centifugato (0,2 ml), glicoldietilenico (10 ml), acqua distillata (0,2 ml).

C) Retta di taratura e calcolo

L'assorbanza letta si moltiplica per il coefficiente di estinzione ottenuto dalla curva di taratura costruita utilizzando una serie di soluzioni di esperidina o naringina a concentrazione nota contro assorbanza. Il contenuto (mg/l) in flavonoidi totali, espresso come esperidina o naringina, si ottiene utilizzando la sottostante espressione:

Flavonoidi totali (espressi come Esperidina o Naringina) (mg/l) = Assorbanza letta a 420nm x Coefficiente di estinzione della retta di taratura.

9.1.2 Determinazione del contenuto in antociani secondo la metodica Essenze-Derivati Agrumari N.3, p.269 (1996).

Reagenti:

Soluzione di alcool etilico acidificato costituita da 1 parte di acido cloridrico al 37% e da 4 parti di alcool al 95%.

Materiale occorrente:
Pallone tarato da 20 ml
Carta da filtro
Cuvette da 10 mm per spettrofotometro
Spettrofotometro UV-visibile

Procedimento:

In un pallone tarato da 20 ml si pipettano con precisione 5 ml di succo naturale, si aggiungono 10 ml della soluzione di alcool-acidificato e si agita. Si porta a volume aggiungendo piccole porzioni dell'alcool-acidificato, agitando dopo ogni aggiunta, e si filtra.

Si legge la Densità Ottica del filtrato a 420 nm, 620 nm e 530 nm, usando come bianco di riferimento l'alcool acidificato.

Le densità ottiche lette a 420 nm e 620 nm permettono di tenere conto delle assorbanze dovute ai carotenoidi e ad altri pigmenti estranei.

Retta di Taratura:

Preparare, seguendo il procedimento, 3 soluzioni standard contenenti rispettivamente 50, 100 e 200 mg/l di cianidina 3 glucoside (Extrasynthese cod. 0915 S). Leggere l'assorbanza alle tre lunghezze d'onda e misurare l'assorbanza netta della lettura a 530 nm nel seguente modo:

Calcoli

Calcolare il coefficiente di estinzione della retta di taratura. Concentrazione contro Assorbanza netta. Valutare l'assorbanza netta della lettura rilevata a 530 nm per il campione e calcolare il contenuto in antociani nel seguente modo:

Antociani (mg/l) = Ass.za netta a 530 nm x coeff. di estinzione della retta di taratura x diluizione.

9.2 METODI CROMATOGRAFICI

La gascromatografia (GC) è poco impiegata nell'analisi dei flavonoidi, in quanto richiede la derivatizzazione di questi composti che non sono volatili e sono termicamente instabili.

Numerosi sono invece i metodi di cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) e a fase inversa (RPLC) con colonne che usualmente sono una C_8 o una C_{18} ed un eluente binario formato da una soluzione acquosa di acido acetico o perclorico o fosforico o formico (Eluente A) e da un solvente organico, meno polare (Eluente B), formato da metanolo o acetonitrile.

RIVELAZIONE DEI FLAVONOIDI

Lo spettro di assorbimento è caratterizzato da due bande: Banda I tra 300 e 500 nm (dovuta all'anello B) e la Banda II tra 240 e 285 nm (dovuta all'anello A).

Nella tabella 14 sottostante riportiamo le bande di assorbimento di diversi flavonoidi.

Taballa 11	Danda di	assorbimento	di alauni	flouopoidi
Tanella 14 -	· Bande di	assorbimento	or sichini	navonoidi.

Flavonoidi	Banda di assorbimento II (nm)	Banda di assorbimento I (nm)
Flavoni, biflavoni	250-280	310-350
Isoflavoni	245-275	310-350
Flavonoli	250-280	350-385
Flavanoni	275-295	310-330
Calconi	240-260	365-390
Ąuroni	240-270	390-430
Antocianine	265-275	465-560

I diversi flavonoidi eluiti vengono rivelati con un detector/diode-array (DAD) a diverse lunghezze d'onda. In particolare i flavanoni ed i loro glucosidi vengono generalmente rivelati a lunghezze d'onda tra 280 e 290 nm, i flavoni tra 315 e 320 nm, i flavonoli a 370nm, gli isoflavoni tra 250 e 260nm, le antocianine e flavonoli a 270 nm, gli isoflavoni a 260 nm, le antocianine tra 510 e 525nm.

9.2. I Determinazione quantitativa dei flavanoni glucosidici nei succhi agrumari secondo il metodo (HPCL) della Federazione Internazionale Produttori Succhi di Frutta (IFFJP) n° 58 pag.1 (1991).

Principio del metodo

I flavonoidi vengono solubilizzati addizionando al succo N,N-Dimetilformammide (DMF).

Un'aliquota filtrata di questa soluzione si sottopone ad analisi HPLC.

A) Procedura

In un pallone tarato da 50 ml versare 10 ml di succo e 10 ml di una soluzione di ossalato di ammonio 0,025M. Aggiungere 10 ml di DMF, agitare vigorosamente e diluire a volume con acqua distillata. Riscaldare per 10 minuti su bagnomaria, raffreddare e filtrare attraverso una cartuccia Millipore da 0,45 µm.

B) Condizioni cromatografiche

Colonna: C₁₈, 250 x 4 mm d.i., 10 μm ad esempio: Hypersil ODS o Lichrosorb RP18 o Spherisorb ODS.

Fase mobile: Acetonitrile, acqua, acido acetico 200/800/0,5 (v/v/v)

Rivelatore: U.V. selezionato a 287 nm

Flusso: 1ml/min.

Temperatura della colonna: 40° C

Volume iniettato: 20 μl

Standard esterno: Soluzioni standard dei diversi flavonoidi sciolti in una miscela di acqua - DMF (1:1) con concentrazione di 50 mg/l.

C) Identificazione e calcolo dei singoli flavanoni glucosidici

I singoli F.G. presenti nel campione vengono identificati confrontando i tempi di ritenzione e gli spettri U.V. con quelli dei corrispondenti standards.

Le concentrazioni dei diversi flavanoni glucosidici si calcolano dopo avere integrato le aree dei corrispondenti picchi cromatografici relativi alle diverse soluzioni standard.

9.2.2 Determinazione quantitativa dei flavanoni glucosidici nelle scorze degli agrumi secondo il metodo (HPLC) di Wu Houjiu, Calvarano M., Di Giacomo A. Essenze Derivati Agrumari, 61, 103 (1991).

Principio del metodo

I flavonoidi vengono estratti dalla scorza mediante N,N Dimetilformammide (DMF) e successivamente con alcool etilico 95%. Un aliquota degli estratti riuniti vengono filtrati su cartuccia Millipore da 0,45 µm e sottoposta ad analisi HPLC.

A) Procedura

Le scorze essiccate a 60 °C vengono triturate fino a polvere fine. 2 g di polvere di scorza vengono posti in agitazione con 50 ml di DMF a temperatura ambiente per 24 ore e quindi si filtrano.

Il residuo si sottopone ad una seconda estrazione con 20 ml di alcol etilico al 95% e si filtra. Si riuniscono i due filtrati che si versano in un pallone da 100ml.

Si porta a volume con acqua-DMF (1:1). Un aliquota della soluzione filtrata (5 ml) su cartuccia millipore da 0,45 μ m si versa in un palloncino da 25 ml e si mescola con 5 ml di una soluzione di cumarina 100 ppm (Standard interno) si porta a volume con una miscela acqua: DMF (1:1) e si procede all'analisi HPLC.

B) Condizioni cromatografiche

Colonna: Lichrosorb RP 18 (250 x 4mm d.i., 5 µm)

Fase mobile: Acetonitrile: acqua (25:75 v/v)

Flusso: 1 ml/min.

Rivelatore: U.V. selezionato a 287 nm Temperatura della colonna: 40 °C

Volume iniettato: 20 µl Standard interno: Cumarina

C) Identificazione e calcolo dei singoli flavonoidi

La concentrazione dei flavonoidi si calcola dopo avere prima determinato il fattore di correzione di ognuno rispetto allo standard interno (cumarina).

9.2.3 Determinazione quantitativa dei flavoni polimetossilati nei succhi agrumari secondo il metodo (HPLC) di Pupin A.M., Dennis M.J., Toledo M.C.F. Food Chemistry, 63, N.4, pg. 514 (1998).

Principio del metodo

I polimetossiflavoni vengono estratti con toluene. La frazione organica viene evaporata sotto corrente di azoto a 50° C.

Il residuo viene sciolto in metanolo ed iniettato in un cromatografo HPLC usando un sistema isocratico.

A) Procedura

5 ml di succo agrumario vengono versati in un tubo da centrifuga da 25 ml. Si aggiungono 5 ml di toluene e la miscela viene agitata fortemente per 10 secondi. Successivamente si centrifuga per 10 minuti a 3000 giri/min. a 10 °C.

Si pipetta la fase sovrastante ripetendo la procedura di estrazione altre due volte. Le frazioni organiche vengono riunite ed evaporate sotto corrente di azoto a 50°C. Il residuo si scioglie in 1 ml di metanolo e si inietta al cromatografo.

B) Condizioni cromatografiche

Colonna: Nucleosil C18 (250 x 4,6 mm d.i.), 5 µm

Fase mobile: Acqua, Acetonitrile, Tetraidrofurano 53/43/4 v/v/v

Rivelatore: U.V. selezionato a 340 nm

Flusso: 0,7 ml/min

Temperatura della colonna: 22°C

Volume iniettato: 20µl

Standard esterno: Soluzioni standards di diversi PMF sciolti in metanolo con con-

centrazioni di 5 mg/l.

C) Identificazione e calcolo dei singoli PMF

I singoli PMF vengono identificati confrontando i tempi di ritenzione e gli spettri di assorbimento U.V. con quelli dei corrispondenti standard.

Le concentrazioni dei diversi flavanoni polimetossilati si calcolano dopo aver integrate le aree dei corrispondenti picchi cromatografici relativi alle diverse soluzioni standard.

9.2.4 Determinazione quantitativa degli antociani nei succhi di agrumi pigmentati secondo il metodo (HPLC) della Gesellshaft für Lebensmittel GmbH (Berlino). Trifirò A., Gherardi S., Calza M. Industria conserve 70, 243 (1995).

A) Preparazione del campione

Il campione di succo rosso viene diluito con acqua distillata (in rapporto 1:2 p/p) e successivamente filtrato prima su carta e quindi su filtro Millipore da 0,45 μ m. Un'aliquota del filtrato si sottopone ad analisi HPLC

B) Condizioni cromatografiche

Colonna: RP-18 (250 x 4mm) 10 µm termostatata a 40°C ad esempio Nucleosil RP18 Fase mobile: Eluizione a gradiente lineare binario con flusso di 1ml/min.

Eluenti:

A: 900ml di acqua bidistillata e 100ml di Ac. Formico

B: 400ml di acqua bidistillata, 100ml di Ac. Formico e 500ml di Acetonitrile Entrambe le miscele vengono filtrate separatamente con filtro da 0,45μm e degasate.

Condizione di gradiente:

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
00	88	12
01	88	12
26	70	30
35	0	100
38	0	100
43	88	12
60	88	12

Volume iniettato: 10µl Tempo di analisi: 60 min.

Rivelatore: U.V. selezionato a 518nm

Per l'identificazione si utilizzano soluzioni standard di antociani della Extrasynthese (GENAY-Francia).

Il profilo HPLC dei vari componenti antocianici di un succo naturale pigmentato deve essere analogo a quello riportato in figura 15.

I risultati vengono espressi come aree dei picchi relativi agli antociani in mv-sec (1mv = 0,001 unità di assorbanza).

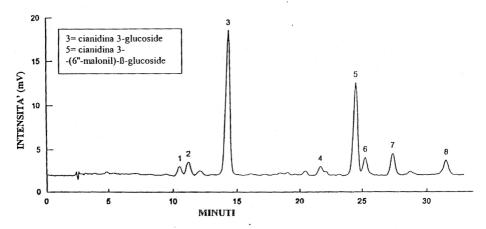


Figura 15: Profilo cromatografico degli antociani nel succo di arance rosse appena prodotto

È possibile notare la presenza di otto picchi caratteristici di cui due presenti in concentrazione notevolmente superiori, identificati il primo (picco n.3 con tempo di ritenzione 14,5 min.) come cianidina-3-glucoside ed il secondo (picco n.5 con tempo di ritenzione 24,5 min.) come cianidina 3- (6"-malonil - β-glucoside)⁵¹. L'analisi degli spettri d'assorbimento ha confermato che anche gli altri sei picchi sono composti antocianici. La loro identificazione non è possibile a causa della carenza di standards.

10.0 DISTRIBUZIONE QUALITATIVA DEI FLAVONOIDI IN DIVERSI AGRUMI

Tabella 15 - Flavonoidi identificati in diversi agrumi.

COMPONENTI	Arancia amara	Arancia dolce	Arancia dolce pigmen- tata	Berga- motto	Grape fruit	Limetta	Limone	Manda- rino	Tange- rine
Apigenina (4',5,7-triidrossillavone)					×		x		
Apigenina-6,8-C-diglucosilde	1						X		
Auranetina (3,4',6.7.8 pentametossiflavone)	X							x	
Auranetina-5-idrossi	1 x		 						
Citromitina (3',4',5,6,7,8-esametossiflavanone)	-		 				-	X	
Crisoeriolo 7-glucoside (5,4'-diidrossi-3'-metossiflavone-7-glucoside)	 		 				X		
Canferolo-7-glucoside (3,5,4'triidrossiflavone-7-glucoside)	 				×		_^_		
Didimina (Isosakuranetina 78-rutinoside) (Neoponcirina)	X	×	×	Х	$\frac{\hat{x}}{x}$	X	X	X	
Diosmetina-6- (6-B-D-glucoside)	-^-		<u> </u>		_^_	-^-	×		
Diosmetina-6,8- C- ß-glucoside) (5,3'-diidrossi-4 metossi-6,8-di-Cglucosilllavone)	 						×		
Diosmetina-8-(C- B-D-glucoside)	-	×							
Diosmina (5,3' diidrossi-4'-metossiflavone-7-rutinoside)			Х			Х	X	Х	
3,3',4',5,6,7,8 eptametossiflavone	L.,		l				X		
	×	X	X					Х	<u> </u>
3.3',4'5.6,7 esametossillavone	l	X	X						
Eriocitrina (5,3',4'-triidrossiflavanone-7-ß-rutinoside)	X					×	Х		
Eriodictolo (5,7,3',4'-tetraidrossillavanone)					Х		Х	Х	
Esperetina (5,7,3'-triidrossi-4'-metossi -flavanone)	 	×	×		×				
Esperidina (5,7-diidrossi-4'-metossiflavanone-7-rutinoside)	×	Х	×		×	X	Х	X	×
Isolimocitrolo (5,7,3'-triidrossi-6,8,4'-trimetossiflavanolo)							X		
Isoramnetina (5,7,4'-triidrossi-3'-metossillavonolo)					Х		X		
Isoroifolina (Apigenina-7-rutinoside)					Х	×		X	X
Isosakuranetina (5,7-diidrossi-4'metossiflavanone)					Х				
Isosinensetina (5,7,8,3',4'-pentametossiflavone)	×	×	×						
Canferolo (3,4',5,7-tetraidrossiflavone)					X				
Limocitrina (3,4',5,7-tetraidrossi-3',8-dimetossiflavone)							X		
Limocitrina-3-glucoside		×	X				Х		
Limocitrolo (3,4',5,7-tetraidrossi-3',6,8-trimetossillavone)							Х		
Luteolina (3',4',5,7-tetraidrossiflavone)							Х		
Luteolina-C-glucoside							Х		
Naringenina (4',5,7-triidrossillavanone)							X		
Naringenina-4'-glucosil-7-ramnoglucoside (due isomeri		×	X		X				
Naringina (5,4'-driidrossiflavanone-7-neoesperidoside)	X			×	×				
Narirutina (5,4'-diidrossiflavanone-7-rutinoside)	X	X	X	×	×		X	X	
Neodiosmina (5,3'-diidrossi-4'metossiflavone -7-neoesperidoside)	×								
Neoeriocitrina (5.3'diidrossiflavanone-7-neoesperidoside)	×			X					
Neoesperidina (5,3'diidrossi-4'-metossiflayanone-7-neoesperidoside)	X			X	×				
Nobiletina (3,4',5,6,7,8-esametossillavone)	×	×	X		X		-	Х	X
Poncirina (5-idrossi-4'-metossi-7-neoesperidoside)	X				×			_^_	<u>~</u>
Poncirina					X				×
Quercetina (3',4',5,7-pentaidrossiflavone)					X		Х		
Roifolina (5,4'-diidrossiflavone-7-neoesperidoside)	×			X	X				
Sinensetina (5.6,7,3'4'-pentametossiflavone)		×	×	X				X	
Tangeretina (4',5.6.7.8-pentametossillavone)	×	×	×	_^_	X			x	×
Tetra-o-metilscutellareina (3',4',7,8-tetrametossi-5-idrossiflavone)	X	X	×	X	_^_			×	×
Vitexina (5,4'-diidrossiflavone-8C-glucoside)	<u> </u>		-^-	_^_			х	^	
Vitexina glucoside (5,4'-diidrossiflavone-7.8C-diglucoside)							X		
Cianidina-3-glucoside (5,7,3',4'-tetraidrossillavilio-3 glucoside)			x				_^_	-	
Cianidina-3-(6"malonil)β-glucosid			×						
Cianidina-3,5-diglucoside			×						
Delfinidina-3-glucoside (5.7,3'.4'.5'-pentaidrossiflavilio-3-glucoside)			X						
Definidina-3-glucoside (5.7,3.4.5-pentaidrossillavilio-3-glucoside)									
Peonidina-3,5-diglucoside			X						
. comuna o,o digiucoside			×						

Fonti: Di Giacomo A., Calvarano M., Leomponenti degli agrumi, Staz. Sper Essenze, R. C., vol.3, 75, (1972). Kawai S., Tomono Y., Katase E., Ogawa K., Yano M., J. Agric. Food Chem., vol. 47, n.9 (1999)

11.0 CONTENUTO IN FLAVONOIDI TOTALI DELLE DIVERSE PARTI DI UN AGRUME

I flavonoidi sono distribuiti nelle diverse parti di un agrume ma la maggiore quantità si riscontra nelle parti solide: albedo, medula, sepimenti radiali, membrane vescicolari, flavedo.

In particolare l'albedo risulta più ricco in flavanoni glucosidici mentre il flavedo $\dot{\epsilon}$ molto ricco in flavoni polimetossilati.

La tabella 16 riporta il contenuto in flavonoidi totali (espressi come esperidina) presenti nelle varie parti di un'arancia.

Tabella 16 - Contenuto di flavonoidi totali in varie parti di un'arancia.

Parti di un'arancia	Flayonoidi totali (mg/kg)
Flavedo	2.000-10.000
Albedo fresco	10.000-22.000
Medula fresca	13.000-20.000
Polpa e membrane fresche	4.000-8.000
Succo	400-1.000

Soffermandoci al succo d'arancia dell'area mediterranea il contenuto normale in flavonoidi è intorno a 800 mg/l con un massimo di 1000 mg/l. Questo limite può essere superato se le arance impiegate per l'estrazione del succo sono inidonee oppure premute con pressione eccessiva o se è stato aggiunto al succo "pulp-wash".

12.0 CONTENUTO IN FLAVONOIDI DELLA PARTE EDIBILE (ENDOCARPO) DI DIVERSE SPECIE AGRUMARIE

Le diverse cultivar agrumarie hanno una diversa composizione in flavonoidi. Kawaii e coll. in uno studio del 1999⁵² determinano le concentrazioni di 24 flavonoidi presenti nell'endocarpo di 66 specie agrumarie (tabella 24).

L'analisi effettuata mediante cromatografia liquida (HPLC) prevede i seguenti punti:

A) Preparazione del campione

La parte edibile viene essiccata e frullata. Quindi 100 mg di campione vengono sottoposti a tre successive estrazioni con 1 ml di miscela metanolo (MeOH)/ dimetil-sulfossido (DMSO) (1:1). Gli estratti vengono riuniti e portati ad un volume di 5 ml con metanolo (MeOl1). Si filtra un'aliquota con filtro da 0,45µm.

20 μl di questa miscela vengono iniettati al cromatografo (HPLC).

B) Condizioni analitiche:

Colonna: Hypersil RP 18; diametro delle particelle 5 μm; 100x4,6 mm (d.i.) (Hewlett-Packard);

Fase mobile: il programma di eluizione consiste nell'utilizzare inizialmente una miscela 80% di 11₃PO₄ 0,01 M e 20% di alcool metilico per 2 minuti; successivamente il gradiente prevede il passaggio al 100% di alcool metilico in 55 minuti.

Per l'analisi dei flavoni polimetossilati si utilizza un'eluizione isocratica (con una fase mobile: 50% di $\rm H_3PO_4$ 0,01 M e 50% di MeOH).

Un'altra eluizione isocratica (con una fase mobile: 70% di H₃PO₄ 0,01M e 30% di MeOH) viene utilizzata per l'analisi di QCT, NGEN, LTN, NPNC e PNC. La rivelazione viene effettuata per assorbimento nell'UV tra 200 e 400nm. Nella tabella 17 vengono riportati i valori delle concentrazioni dei singoli flavonoidi espressi in μg/100g. di campione secco. Il valore 0 si riferisce a flavonoidi non rivelati; tr si riferisce a flavonoidi presenti in quantità così basse da non potersi calcolare.

Tabella 17 - Contenuto (µg/100 g) in flavonoidi della parte edibile essiccata di diversi frutti agrumari.

Specie	Cultivar	TXF	ERC	NERC	NRTN	RTN	NGIN	HSP	IRHF	NHSP	RHF	DSM	NDSM	atc	NGEN	LNT	NPNC	PNC	KMP	APG	SNT	NBL	HPT	NTD	THE
C. latifolia	Tahiti lime	0	186	0	0	18.1	0	572	55.1	0	0	83.6	0	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0	2.5	1.1	1.4
C. bergamia	Bergamot	0	22.6	670	20.9	5.4	598	42.0	22.0	508	107	0	44.5	0	0	0	222	0	0	0	0	0.1	0.2	0.3	0.2
C. limon	Eureka lemon	0	245	0	0	22.7	0	358	0	0	0	73.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0.1	0.1	0.0
C. limonia	Rangpur lime	0	33.1	0	2.2	35.9	0	472	0	0	0	51.1	0	1.0	0	0.2	0.9	0	0	0	0	0.6	0.1	0.2	1.4
C.meyerii	Sweet lemon	0	2.7	7.8	14.1	18.7	0	1099	12.0	0	0	57.9	0	0.8	0	0	2.5	0	0	0	0	0.1	0	0.2	0
C.meyerii	Meyer lemon	0	2.0	0	2.4	3.1	0	855	0	0	0	39.6	0	0.3	0	0	1.4	0	0	0	0	0.4	0.2	0	0.1
C. lumia	Lumie	0	143	0	0	9.1	0	985	0	0	0	38.2	0	0.7	0	0	0.4	0	0	0	0	0.1	0.1	0	0.0
C. grandis	Hirado buntan	8.1	6.7	8.1	0	0	397	8.5	0	0	24.7	0	0	0.3	0	0	9.3	0	0	0	0	0.1	0	0	0.7
C. panuban	Shaten yu	16.9	3.6	3.7	2.5	0	170	42.6	0	0	13.6	0	0	0	0	0	178	0	0	0	0	0	0	0	0
C. paradisi	Red blush	1.7	1.8	9.9	285	0	1143	19.0	0	76.2	9.1	0	0	0	0	0	15.1	84.1	0	0	0	0.4	0.2	0	0.1
C. paradisi	Marsh grapefruit	3.8	1.2	3.5	500	0	1459	5.0	0	88.3	12.8	0	0	0	0	0	12.2	67.8	0	0	0	0.2	0.2	0	0.2
C. glaberrima	Kinukava	0	9.6	17.5	42.6	0	85.2	0	0	35.5	7.0	0	0	0	0	0	2.7	3.2	0	0	0	0.1	0.2	0	0.2
C. hassaku	Hassaku	0	7.1	4.2	98.2	0	138	33.7	0	67.6	9.9	0	0	0	0	0	3.0	4.1	0	0	0	0.2	0.5	0	0.3
C. tengu	Tengu	0	0	0	634	0	0	29.1	9.8	0	3.3	0	0	0	0	0	8.2	0	0	0	0	0.4	0.1	0	0.2
C. natsudaidai	Natsudaidai	8.1	6.1	6.4	61.2	0	636	9.7	0	141	34.1	0	0	0	0	0	7.4	7.1	0	0	0	0.4	0.5	0.5	1.0
C. natsudaidai	Kawano Natsudaidai	0	1.3	4.9	45.8	0	440	11.9	0	97.8	19.5	0	0	0.3	0	0,	9.7	2.3	0	0	0	0.6	0.2	0.9	0.5
C. sukata	Sanbokan	0	73.4	1.4	502	0	4.7	189	0	0	0	0	0	0	0	0	1.1	0	0	0	0	0.9	1.6	0.5	1.1
C. aurantium	sour orange	0	13.2	331	11.8	0	377	10.6	0	324	26.5	0	5.7	0	0	0	21.6	0	0	0	0	0.7	0.5	0.5	0.5
C. sinensis	Valencia	0	6.9	0	75.5	3.5	0	698	0	0	0	0	0	3.1	0	0	9.8	0.4	0	0	4.0	1.3	0.4	0.2	0.3
C. sinograndis	Oto mikan	0.9	3.7	0	433	0	0	583	106	0	0	28.7	0	0.4	0	0	19.6	0	0	0	0	0.4	0.2	0	0.3
C. sinensis	Morita navel	0	11.9	4.1	444	13.7	0	1080	0	0	6.6	9.0	0	1.0	0	0.2	39.9	0	0	0	0	2.2	0.5	0	0.3
C. iyo	lyo	0	7.9	0	251	0	0	406	0	0	0	0	0	1.3	0	0	7.7	0	0	0	0	2.0	0.8	0	1.1
C. iyo	Miyauchi iyo	0	3.4	0	108	0	0	264	0	0	0	0	0	0.8	0	0.1	3.8	0	0	0	0	1.2	0.4	0	0.6
C. tamurana	Hyuganatsu	0	3.4	0	167	0	0	165	0	0	0	0	0	0	0	0	23.0	0	0	0	0	1.5	0.9	0	1.3
C. shunkoukan	Shunkoukan	0	23.2	3.5	1022	20.7	0	387	107	0	4.6	10.2	0	0.6	0	0	6.9	0	0	0	0	3.7	0.7	0	1.6
C. Junos	Yuzu	0.9	2.8	3.4	309	B.1	162	94.8	0	64.4	0	0	0	0	0	0	3.6	3.0	0	0	0	0.1	0.0	0.1	0.1
C. Junos	Makaku yuzu	0	1.6	5.1	303	0	134	156	0	84.4	0	0	0	1.4	0.3	0.6	3.5	2.2	0	0	0	0	0.4	0.3	0.1
C. hanayu	Hanayu	0	3.3	2.7	35.6	0	32.5	2001	0	209	0	4.3	0	0	0	0	0.8	1.7	0	0	0	4.6	0	0	2.4
C. sudaci	Guachi	0.8	14.9	80.6	270	0	98.4	163	0	220	0	7.9	0	0	0	0	0.9	1.1	0	0	0	0.2	0.3	0	0
C. inflata	Mochiyu	0.6	2.5	8.2	203	0	103	96.1	0	69.5	0	0	0	0	0	0	10.0	1.5	0	0	0	0.3	0.3	0	0.3
C. sphaerocarp	Kabosu	1.0	4.6	5.2	90.1	0	30.2	65.2	0	23.4	0	0	0	0	0	0	1.0	0	0	0	0	0.5	0.5	0.4	0.5
C. voitsonii	Ichang lemon	1.4	0	4.8	0	9.4	482	60.7	0	5.1	10.6	0	0	0	0	0	1.1	0	0	0	0	8.9	1.5	1.4	6.5
C. nippokorean	Kourai tachibana	0	2.8	19.7	689	0	0	177	0	0	0	0	0	0	0	0	14.2	0	0	0	10.7	3.2	0.3	1.7	1.2
C. nobilis	Kunenbo	0.8	20.8	5.0	634	12.0	0	588	5.1	0	9.5	13.0	0	0.3	0	0	22.5	0	0	0	0	1.3	2.0	0	0.9
C. nobilis	King	0	1.6	0	319	0	0	1172	0	0	3.3	0	4.7	0.7	0	0	45.9	0	0	0	0	1.4	4.0	2.5	2.0
C. unshu	Unshu	0	5.9	11.5	61.1	0	0	1596	0	0	0	4.1	0	2.0	0	0	35.2	0	0	0	0	8.6	0	0	4.7
C. unshu	Sugiyama unshiu	0	8.4	3.1	625	23.0	0	664	.0	0	10.4	12.9	0	1.1	0	0	34.7	0	0	0	0	0.9	1.2	0	0.5
C. unshu	Okitsu wase	0	0	11.1	157	4.2	0	456	. 0	0	9.3	11.0	0	0	0	0	10.6	0.8	0	0	0	0.9	0.9	0	0.4
C. yatsusiro	Yatsusiro	0	0	1.4	4.0	3.0	0	549	0	0	0	0	0	0.4	0	0	2.2	0	0	0	0	0.8	1.1	0	0.8
C. keraji C. keraji	Keraji Kabuchi	0	19.8	1.8	99.2	39.7	0	843	0	0	0	0	0	0	0	0	2.1	0	0	0	0	2.1	1.2	0.2	1.7
C. oto	Oto	0	0	4.3	22.6	0	0	379 1030	0	0	0	0	0	0	0	0	3.5	0	0	0	0	5.2	1.3	0	7.4
C. reticulata	Ponkan	0	1.3	1.7	148	0	0	1199	<u> </u>	0		_	0	1.3	0	0.1	5.3	0	0	0	0	1.7	1.8	1.9	1.1
C. reticulata			5.7	3.2	73.4	·	·		0	-	0	0	0	-	0	0.2	32.8	0	0	0	0	12.8	0	0	9.1
C. deliziosa	Ota ponkan Mediterranean mandarin	0	0	1.6	174	0	0	676 1464	18.5	0	0	12.5	0	0	0	0	13.5	0	0	0	0	5.3	0	0	5.2
C. tangerina	Dancy tangerin	0	6.7	1.9	192	0	0	1513	37.6	0	0	0	0	1.5	0.2	0.4	25.7	0	0	0	0	5.7	0	0	3.5
C.tangerina C.tangerina	Obenimikan	0	8.0	1.5	121	0	0	1734	0	0	0	0	0	0	0.2	0.4	11.3	0	0	0	0	6.1	0.1	0	1.5
C. Clementina	Clementine	0	3.1	4.5	51.1	0	0	852	0	0	0	3.3	0	0.9	0	0	8.4	0	0	0	0	0.8	0.8	0	0.3
C. succosa	Jimikan	0	2.2	6.3	276	0	0	1326	0	0	3.1	4.6	0	0.9	0	0	27.5	0	0	0	0	5.5	0.8	0	3.2
C. suhuiensis	Shikaikan	0	5.2	2.0	193	0	0	1197	0	0	0	0	0	0.9	0	0	24.5	0	0	0	0	3.5	0.3	0	1.4
C. tachibana	Tachibana	0	13.1	5.5	14.2	0	24.4	626	0	3.4	0	11.5	0	0.5	0	0	3.9	2.1	0	0	66.6	8.2	0.3	0.1	4.1
C. erythrosa	Kobeni mikan	0	1.7	14.1	94.0	0	0	869	0	0	0	14.1	0	0	0	0.2	22.4	0	0	0	0	5.2	0.1	0.1	3.5
C. kinokuni	Hirakishu	0	3.3	8.9	27.1	0	0	621	0	0	0	12.4	0	0.8	0	0	3.2	0	0	0	0	6.7	0	0	3.9
C. kinokuni	Sokitsu	0.5	1.7	1.5	167	13.4	0	409	0	0	13.8	8.0	0	1.3	0	0	14.4	0	0	0	0	0.4	0.3	0.2	0.1
C. kinokuni	Mukaku kishu	0	4.6	7.3	129	0	0	1319	9.9	0	0	25.9	0	1.5	0	0	7.7	0	0	0	0	12.5	0.3	0	6.0
C. sunki	Sunki	0	9.1	9.7	68.5	tr	5.9	1520	0	0	0	8.4	0	2.6	0	0	18.6	ō	0	0	0	3.4	0.1	0	0.9
C. reshini	Cleopatra	0	3.9	0	95.9	0	0	1905	30.5	0	3.3	4.0	0	0	0	0	8.8	0	0	0	0	4.0	1.0	0	4.4
C. tardiva	Giri mikan	0	64.6	0	349	3.7	0	119	0	0	0	0	0	0	0	0	27.1	0	0	0	0	1.8	0	0	1.9
C. depressa	Shiikuwasha	0	0	5.1	18.4	4.2	0	992	0	0	0	12.9	0	0.4	0	0.3	5.3	0.6	3.3	0	6.0	21.0	0	0	8.8
C. leiocarpa	Koji	0	142	1.9	189	0	0	180	0	0	0	3.3	0	0	0	0	15.3	0	0	0	0	2.7	0	3.1	2.4
C. tumida	Fukure mikan	0	10.1	8.9	24.1	0	0	980	0	0	0	13.1	0	0	0	0	5.4	1.3	0	0	0	10.0	0	0	6.4
C. madurensis	Shikikitsu	0	0	1.4	142	25.5	0	50.3	0	26.6	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	2.0	0.1	0	1.0
F. crassifolia	Neiha kumquat	0	1.5	2.5	320	0	6.2	2.4	0	1.4	74.7	0	0	3.4	0	13.8	1.4	9.7	32.1	0	0	0.1	0.1	0	0.1
F. japonica	round kumquat	0.9	1.5	0	460	33.9	0	9.3	0	0	18.9	0	0	8.3	ō	8.7	3.1	4.0	20.4	0	0	0.1	0	0	0.1
F. margarita	Naga Kumquat	0	1.4	0	289	0	0	5.4	0	0	25.5	0	0	0	0	6.8	0.8	2.9	16.1	0	0	0	0	0	0
P. trifoliate	Trifoliate orange	0	0	23.2	20.7	0	123	0	20.1	0	3.5	8.9	0	4.6	0	0	41.3	289	8.8	0	0	0.7	0	0	0

I singoli flavonoidi della tabella sono indicati con le seguenti abbreviazioni: apigenina (APG), diosmina (DSM), eriocitrina (ERC), esperidina (HSP), isoroifolina (IRHF), canferolo (KMP), naringenina (NGEN), naringina (NGIN), narirutina (NRTN), neodiosmina (NDSM), neoeriocitrina (NERC), neoesperidina (NHSP), neoponcirina (NPNC), roifolina (RHF), rutina (RTN), sinensetina (SNT), luteolina (LTN), quercetina (QCT), taxifolina (TXF), 3,3',4',5,6,7,8-esametossiflavone (HPT), natsudaidaina (NTD), nobiletina (NBL) e tangeretina (TNG).

13.0 CARATTERIZZAZIONE DEI PRINCIPALI DERIVATI AGRUMARI

13.1 CONTENUTO IN FLAVANONI E FLAVONI GLUCOSIDICI DEI SUCCHI AGRUMARI

A seguito di numerosi lavori (HPLC) condotti sui flavonoidi dei succhi agrumari italiani si può disporre oggi di un quadro abbastanza dettagliato della loro distribuzione quantitativa.

Di conseguenza questi composti possono venire utilizzati come parametro per il controllo e la certificazione di tali succhi (tabella 18):

Tabella 18 - Concentrazione (mg /l) in flavanoni e flavoni glucosidici di alcuni succhi agrumari naturali (Italia).

	Narirutina	Naringina	Esperidina	Neoespe- ridina	Ériocitrina	Neoerio- citrina	Didimina	Diosmina
Succo di arancia bionda	50-116		300-750	Tracce-30		Tracce	20-50	
Succo di arancia rossa	35-122		230-950	v		Tracce 30	20-50	
Succo di limone	0-20		80-500		130-340		5-15	30-50
Succo di mandarino	30-100		300-950				13-80	
Succo di bergamotto	12-35	100-250	tracce	90-150		150-290		
Succo di pompelmo (Marsh-seedless)	23-124	73-420	4-16	4-16			2-10	

Il succo d'arancia dolce (bionda o pigmentata) è caratterizzato da un alto contenuto di esperidina insieme a piccole quantità di narirutina e didimina.

Il succo di limone è caratterizzato dalla presenza (130-340 mg/l) di eriocitrina insieme ad esperidina, narirutina e didimina. Questi due ultimi flavonoidi sono presenti in tracce o in quantità molto piccole (rispettivamente 5-15 mg/l e 0-20mg/l). Inoltre è presente il flavone glucosidico, diosmina^{87,91} (30-50 mg/l).

I succhi di bergamotto e pompelmo hanno il più alto contenuto di flavonoidi e contengono sia i flavonoidi rutinosidi (esperidina e narirutina) che flavonoidi neoesperidosidi (naringina e neoesperidina). In entrambi il flavonoide più importante è la naringina mentre soltanto nel bergamotto è presente la neoeriocitrina (150-230 mg/l).

13.1 Profili cromatografici (HPLC) di alcuni succhi agrumari

Un'ulteriore possibilità di immediata differenziazione dei diversi succhi è offerta dall'osservazione dei singoli profili cromatografici (HPLC) caratteristici come "impronte digitali" (finger print). Dal confronto dei profili è possibile rivelare la miscelazione di succhi di specie diverse.

Nella figura 16 confrontando i profili dei succhi di arancia e limone⁵³ si evidenzia nel secondo succo la presenza di eriocitrina (picco n. 5) e l'assenza di narirutina (picco n. 1).

Considerato che i flavanoni glucosidici contenuti nell'arancia sono tutti rutinosidi, l'aggiunta anche in piccole percentuali di succhi di pompelmo, arancia amara, e bergamotto è riconoscibile dalla presenza di flavanoni neoesperidosidi come naringina, neoeriocitrina, poncirina.

Quanto affermato viene illustrato nelle figure 17, 18, 19.

Nella figura 17 vengono raffrontati i profili cromatografici di due succhi di arancia⁴. La presenza di naringina in uno dei due succhi, fa pensare ad una aggiunta di succo di pompelmo o di bergamotto o di arancia amara.

Nella figura 1855 il raffronto tra i profili cromatografici dei succhi di bergamotto, limone, limetta evidenzia che nel succo di bergamotto sono presenti sei flavanoni glucosidici, tre dei quali, neoeriocitrina, naringina e neoesperidina, sono predominanti mentre sono assenti nei succhi di limone e limetta. Questi due ultimi sono caratterizzati dalla presenza di elevate quantità di eriocitricina ed esperidina.

La narirutina è completamente assente o presente in tracce nel succo di limetta mentre è presente in piccole quantità negli altri due succhi (limone e bergamotto).

Nella figura 19⁵⁵ vengono raffrontati i cromatogrammi dei flavonoidi dei succhi di pompelmo e bergamotto. Si evidenzia che in entrambi è presente la naringina e la narirutina, mentre la neoeriocitrina è completamente assente nel succo di pompelmo. La neoesperidina è presente in elevate quantità nel succo di bergamotto ed in piccole quantità nel succo di pompelmo.

Per questa strada, però, non è possibile riconoscere la presenza di succo di mandarino e dei relativi ibridi nel succo d'arancia. Entrambi questi succhi contengono tre flavonoidi: narirutina, esperidina, didimina.

Bisogna pertanto ricorrere alla determinazione dei polimetossiflavoni di cui parleremo in seguito (cap. 12.2 fig. 22).

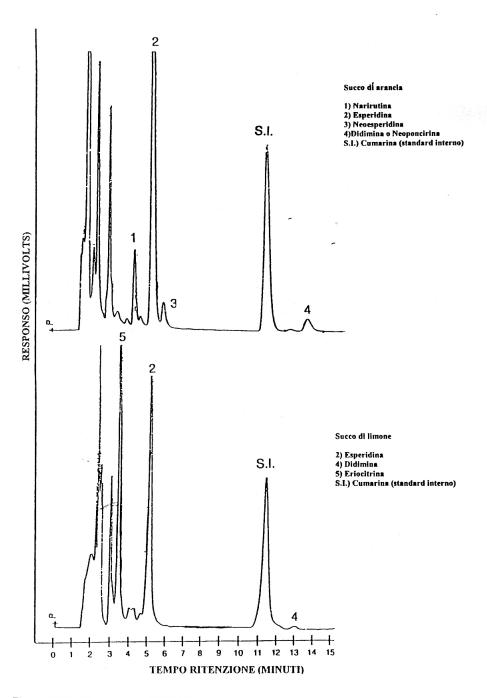


Figura 16: Profili cromatografici dei flavonoidi nei succhi genuini di arancia e limone a 280 nm

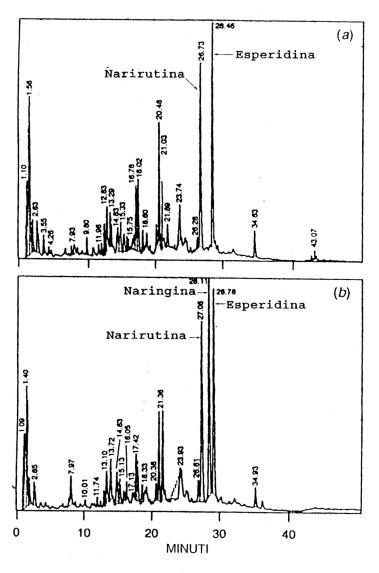


Figura 17: Profili cromatografici (HPLC) di due succhi di arancia

- a) Succo di arancia Valencia
- b) Succo d'arancia con aggiunta di succo di pompelmo 5% (v/v)

Condizioni analitiche54:

Cromatografo: Waters modello 600 E

Colonna: Nova-Pak C18 (150 x 3,9 mm d.i.)

Lunghezza d'onda del rivelatore: 280 nm

Fase mobile: Eluizione a gradiente partendo da una soluzione tampone di fosfato di potassio 0,01M (pH = 3,5) fino a 38 minuti.

Dopo il 38° minuto l'eluizione utilizza una miscela di tampone fosfato 58% e acetonitrile –acqua (70 + 30 v/v) 42% Fonte: Robards K., Antolowich M. Chern. Aust. 61, 392 (1994).

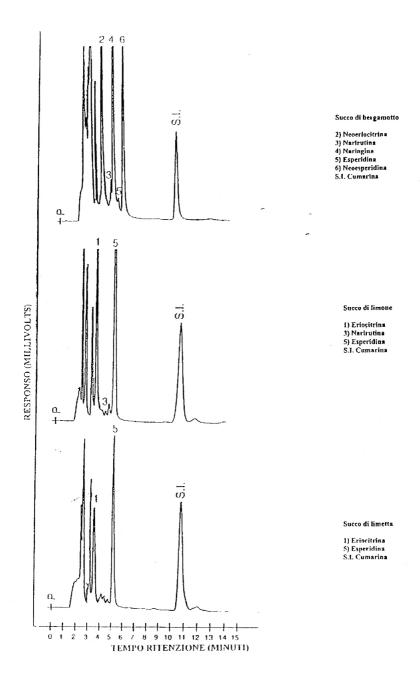


Figura 18: Profili cromatografici dei flavonoidi nei succhi genuini di bergamotto, limone, limetta a 280 nm

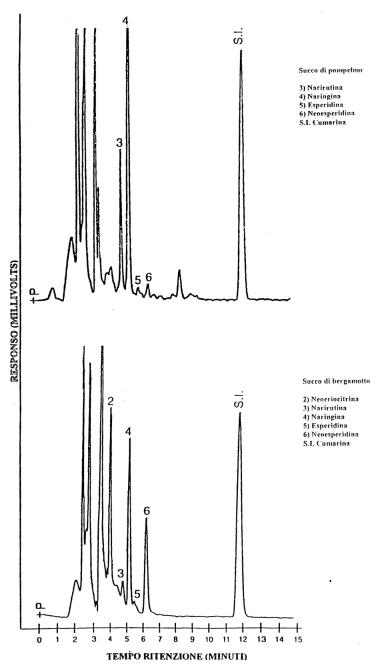


Figura 19: Profili cromatografici dei flavonoidi nei succhi genuini di pompelmo e bergamotto a 280 nm.

Infine un'ulteriore applicazione delle metodiche HPLC all'analisi dei succhi agrumari è rappresentata dalla capacità di scoprire aggiunte di "pulp-wash", sottoprodotto dell'industria agrumaria ottenuto lavando ripetutamente con acqua i residui dell'estrazione del succo costituiti da polpe, membrane, ecc. Per il succo d'arancia il rapporto tra narirutina ed esperidina è utile per svelare aggiunte anche limitate di "pulp wash"; negli estratti acquosi la concentrazione di narirutina aumenta in rapporto all'esperidina, a causa della maggiore solubilità. Secondo Rouseff⁵⁶ l'aggiunta di 5% di "pulp wash" al succo d'arancia, sposta il ratio narirutina-esperidina da 0,399 a 0,480, per giungere fino a 0,721 con il 20% di "pulp wash". In generale se il valore del rapporto è superiore a 0,50 bisogna sospettare l'aggiunta di "pulp wash".

Ooghe e coll.⁵⁷ hanno preso in considerazione il valore del rapporto inverso cioè esperidina/narirutina, riscontrando che per i succhi di arancia genuini deve essere almeno pari a 3.

13.3 Contenuto in Flavoni polimetossilati dei succhi di agrumi

Negli agrumi sono presenti un gruppo di flavonoidi minori (dal punto di vista quantitativo) individuati con il nome generico di "polimetossiflavoni". Sono dei flavoni nella cui molecola sono presenti un numero di gruppi metossilici pari o superiore a quattro. (vedi pag.7).

Sono distribuiti nelle varie parti di un agrume ed in alcuni prodotti della sua lavorazione (flavedo, membrane, melasse concentrate, olio essenziale estratto a freddo, cere, succo) come riportato in tabella 19⁵⁸.

Tabella 19 - Quantità di polimetossiflavoni presenti in diverse parti di un agrume (arancia) ed in alcuni prodotti della sua lavorazione.

Parte di agrume e prodotti di lavorazione	Nobiletina (p.p.m.)	Sinensetina (p.p.m.)	Tangeretina (p.p.m.)
Flavedo	300-500	200-300	5-100
Membrane	< 1	<1	<0,2
Semi	< 1	< 1	<0,2
Melasse 50° Brix	500-700	300-500	50-80
Olio essenziale	2700	400	800
Cera	17000	2000	13000
Succo	1	< 1	<0,2

Osservando la tabella 19 si notano elevate concentrazioni di flavoni polimetossilati nella cera separata dall'olio essenziale e nel flavedo della scorza. Soltanto piccolissime quantità nella polpa, nel succo e nei semi.

Considerato l'elevato contenuto di questi composti nel flavedo ne consegue che la loro concentrazione nel succo dipende fortemente dalla tecnologia di estrazione, più o meno drastica utilizzata.

Quanto affermato trova riscontro dall'osservazione della tabella 20^{so} nella quale si riportano le concentrazioni dei singoli polimetossiflavoni nel succo d'arancia naturale (11,2 °Brix) di prima e seconda premitura.

Tabella 20 - Concentrazione dei polimetossiflavoni nel succo naturale (11, 2° Brix) di arancia di prima e seconda premitura (66).

	Succo di prima	premitura (FMC)	Succo di seco	nda premitura
	min.	max.	min.	max.
Sinensetina* (mg/l)	1,7	4,5	38,5	62,1
Quercetogetina* (mg/l)	0,4	0,6	9,2	15,6
Nobiletina* (mg/l)	2,1	4,9	36,8	56,8
Tetra-o-metilscutel- lareina* (mg/l)	0,7	0,9	8,9	19,3
3,3',4',5,6,7,8 eptame- tossiflavone* (mg/l)	0,5	0,8	8,0	20,2
Tangeretina* (mg/l)	0,3	0,5	2,2	5.7

^{*} Valori espressi come sinensetina

Condizioni analitiche: Shimadzu HPLC, modello Lc10AD; la colonna usata è un Discovery C_{18} Supelco, 200 x 4,6 mm (i.d.), accoppiata ad una colonna di guardia Discovery C_{18} Supelco 20 x 40,6 mm. La fase mobile è formata da due solventi acido acetico 0,2% (eluente A) ed aceto nitrile (eluente B). Questi venivano miscelati secondo un gradiente che al tempo 0 è 90% A - 5% B) e dopo 40' è 0% di Λ e 100% B.

Il flusso è di 1 ml/min. Il volume iniettato è 20 µl.

Si può constatare come nei succhi di seconda premitura, il contenuto in sinensetina è quasi 20 volte superiore a quello dei succhi di prima premitura.

Il contenuto di flavoni polimetossilati ed i profili cromatografici di questi composti nei diversi succhi agrumari permette di differenziarli e scoprire la loro miscelazione. Ad esempio nella figura 20⁶⁰ si mettono a confronto le concentrazioni di sei P.M.F. nei succhi di arancia e mandarino. Si osserva come il succo di mandarino è caratterizzato da un alto contenuto in tangeretina ed assenza di esametossiflavone.

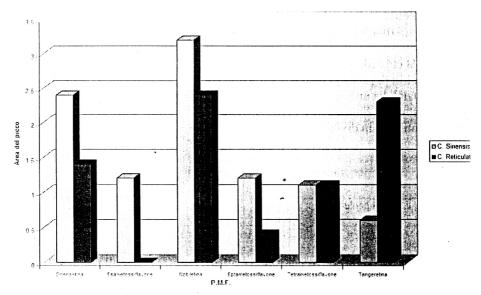


Figura 20: Contenuto di P.M.F. nei succhi di arancia e mandarino.

Nella figura 21⁶⁰ si osserva come i succhi di arancia provenienti da diversi paesi s differenziano dal contenuto in P.M.F. Il valore di quest'ultimo nei succhi italiani è nettamente più elevato di quello nei succhi provenienti dal Brasile e dalla Florida.

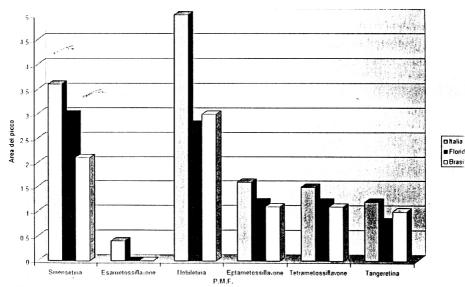


Figura 21: Distribuzione dei P.M.F. nel succo di arancia proveniente da diversi paesi.

13.4 Contenuto in flavoni polimetossilati degli olii essenziali degli agrumi.

Come già affermato in precedenza, il flavedo degli agrumi è particolarmente ricco in polimetossiflavoni (PMF) di conseguenza questi composti si ritrovano negli oli essenziali la cui sede è il flavedo.

La conoscenza dei singoli polimetossiflavoni e della loro concentrazione nei diversi oli essenziali ha un importante significato tassonomico per la loro differenziazione e per valutarne l'autenticità.

I PMF identificati in diversi olii essenziali agrumari sono riportati nella tabella 21.61

Tabella 21 - Polimetossiflavoni identificati in alcuni olii essenziali agrumari.

Flavoni polimetossilati	AA	AD	L	LM	В	М	Р
Tangeretina (4',5,6,7,8-penta- metossiflavone)	Х	х	,			X	X
Nobiletina (3', 4',5,6,7,8-esa- metossiflavone)	Х	х				Х	X
3,3',4',5,6,7,8-eptametossifla- vone	Х	Х				X	X
Sinensetina (3', 4',5,6,7-pentametossiflavone)		х			Х	Х	
3,3',4',5,6,7-esametossiflavo- ne		х					
Tetra-O-metilscutellareina (4',5,6,7tetrametossiflavone)	X	х			×	X	

A A = arancia amara; A D = arancia dolce; L = Limone; L M = Limetta Messicana; M = Mandarino; B = Bergamotto; P = Pompelmo

Soffermandoci sugli olii essenziali di arancia dolce e mandarino, in entrambi sono presenti tangeretina, eptametossiflavone, nobiletina, tetra-O-metilscutellareina, sinensetina, soltanto nell'olio di arancia dolce è presente il 3,3',4',5,6,7- esametossiflavone.

Nella figura 22⁶¹ sono raffrontati i profili cromatografici HPLC dei PMF presenti negli olii essenziali di arancia dolce e mandarino.

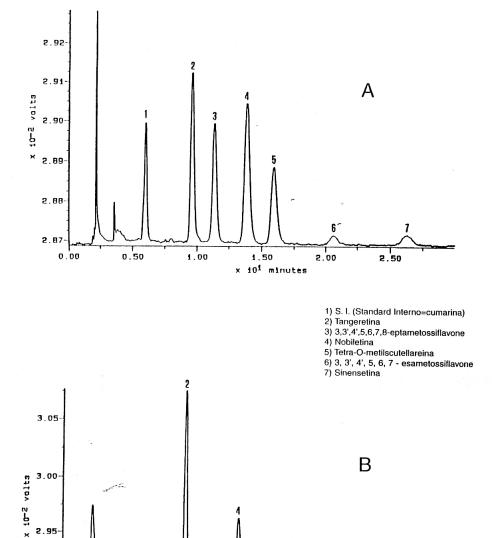


Figura 22: Profili cromatografici (HPLC) dei P.M.F. negli olii essenziali di arancia dolce (A) e mandarino (B)

1.00

1.50

x 10¹ minutes

2.00

2.50

2.90

0.00

0.50

Condizioni analitiche: Cromatografo HPLC Waters Associates.

Colonna: Zorbax Silica 7µm, 250x4,6 nm d.i.; la fase mobile era una miscela di esano: alcool etilico (95:5); flusso: 1,6 ml/min.; il volume iniettato: 20 µl. di una soluzione ottenuta diluendo a 1 ml con acetato di etile 50 mg di olio essenziale accuratamente pesato e 0,1 ml di una soluzione di cumarina a concentrazione nota. La rivelazione è stata effettuata per assorbimento nell'UV a 315 nm.

Utilizzando rette di taratura ottenute con i diversi PMF contro cumarina standard si procedeva al dosaggio dei singoli PMF.

Le concentrazioni medie dei diversi PMF presenti negli olii essenziali (arancia dolce, mandarino, arancia amara, pompelmo) sono riportate in tabella 22.61

Tabella 22 - Contenuto medio dei polimetossiflavoni negli olii essenziali di arancia dolce, mandarino, arancia amara e pompelmo.

		Cont	Contenuto medio (mg/1000 g di olio essenziale)									
	Flavoni polimetossilati	Arancia dolce	Mandarino	Arancia amara	Pompelmo							
1	Tangeretina	480	2140	890	680							
2	3,3',4',5,6,7,8- eptametssiflavone	840	370	310	370							
3	Nobiletina	520	740	500	460							
4	Tetra-O-metilscu- tellareina	310	50	140	20							
5	3,3',4',5,6,7-esa- metossiflavone	130	-	-	-							
6	Sinensetina	90	20	-	-							

13.5 Contenuto in flavonoidi dei sottoprodotti di lavorazione di alcuni agrumi. ("Pastazzo")

I flavonoidi sono distribuiti nelle diverse parti di un agrume ma la maggiore quantità si riscontra nelle parti solide: flavedo, albedo, sepimenti radiali, membrane vescicolari (cap. 3.7).

Ad esempio nella scorza di arancia (albedo + flavedo), sono presenti sia flavanoni glucosidici (narirutina-4'-O-glucoside, eriocitrina, narirutina, esperidina, isosakuranetina, rutinosina, didimina) sia flavoni polimetossilati (sinensetina, nobiletina, 3,5,6,7,8,3',4' eptametossiflavone, tetra-O-metilscutellareina, tangeretina, 5-idrossi-3,7,8, 3',4' pentametossiflavone).

Il contenuto in flavonoidi totali della scorza supera di oltre 10 volte il contenuto del succo⁶².

Il contenuto di alcuni flavanoni glucosidici nel "pastazzo" (scorze, membrane, polpe) fresco ed essiccato dell'arancia, è riportato in tabella 2363.

Tabella 23 - Flavonoidi nel "pastazzo" di arancia fresco ed essiccato.

Pastazzo	Pastazzo Flavonoidi totali mg/kg		Narirutina mg/kg	Didimina mg/kg
Pastazzo "fresco"	12500	8000	450	220
Pastazzo "essiccato"	30300	15400	11000	750

In un lavoro del 1996 Manthey e coll. determinano le concentrazioni di alcuni flvanoni glucosidici e flavoni polimetossilati nella scorza essiccata di diverse varie di arancia (Valencia, Navel, Temple, Ambersweet) tabella 2464

Tabella 24 - Concentrazioni (ppm) di flavonoidi nella scorza essiccata di alcune varietà di arancia.

Flavonoide	Valencia	Navel _	Temple	Amberswee		
Narirutina 4'-O-glucoside	835 ± 16 ^a	499 ± 8	675 ± 16	663 ± 17		
Eriocitrina	1010 ± 57	870 ± 40	1649 ± 54	1278 ± 6		
Narirutina	1998 ± 41	2673 ± 118	2344 ± 85	1676 ± 16		
Esperidina	19170 ± 595	31749± 1422	27781 ± 1005	20549 ± 286		
Isosakuranetina rutinoside o Didimina	1858 ± 31	1806 ± 56	316 ± 10	3361 ± 80		
Sinensetina	305 ± 8	468 ± 26	475 ± 15	ND		
Nobiletina e tetra-O-metilscutellareina	513±4	576±2	1127±12	ND		
3,5,6,7,8,3'4' eptametossiflavone	225 ± 3	415 ± 2	ND	ND		
Tangeretina e 5-idrossi-3.7,8,3',4', pentametossiflavone	109±4	74±2	142±2	51±7		

^a Le concentrazioni dei singoli flavonoidi sono il risultato di una triplice analisi sullo stesso campione di scorza essiccata.

Il contenuto in flavanoni glucosidici del pastazzo fresco di bergamotto viene ripor tato in tabella 25%.

Tabella 25 - Concentrazioni di Flavonoidi nel "pastazzo" fresco di bergamotto.

N. campione	Flavonidi totali come naringina (Davis) mg/kg		Narirutina mg/kg	Naringina mg/kg	Neoesperidina mg/kg		
1	6750	2030	200	1750	1480		
2	8730	3422	152	2232	2138		
3	8245	2643	87	1993	1517		
4	9100	3000	195	2430	1940		

Per quanto riguarda i flavoni polimetossilati la concentrazione di alcuni di questi ne flavedo dell'arancia è riportata nella tabella 19 (cap. 12.2).

14.0 CONTENUTO IN FLAVONOIDI DELLE FOGLIE DI DIVERSE PIANTE DI AGRUMI

Nelle foglie di piante agrumarie è stata riscontrata la presenza di numerosi flavonoi di. Tra questi i più abbondanti sono i neoesperidosidi ed i rutinosidi seguiti di numerosi polimetossiflavoni. In uno studio del 2000 Kawai e coll⁶⁶. determinano le concentrazioni di 23 flavonoidi nelle foglie di diverse cultivar agrumarie.

L'analisi effettuata tramite cromatografia liquida (HPLC) prevede i seguenti punti:

A) Preparazione del campione

100 mg di foglie essiccate e triturate vengono estratte per tre volte con una miscela di alcool metilico: dimetilsulfossido (1:1), gli estratti mescolati e filtrati si sottopongono ad analisi HPLC.

Per l'analisi di ERC, NERC, RTN, NRTN, NGIN, HSP, IRHF, NHSP, RHF, DSM NDSM, APG, si utilizza un' eluizione a gradiente.

 $5~\mu l$ di estratto (MeOH:DMSO) vengono iniettati in una colonna TSK gel Super-ODS 100 mm x 4,6 mm d.i.; dimensioni delle particelle 2 μm; fase mobile: il programma del gradiente di eluizione consiste inizialmente nell'utilizzare una miscela 80% di $\rm H_3PO_4$ 0,01M e 20% di alcool metilico per 2 minuti; successivamente il gradiente prevede il passaggio al 55% di $\rm H_3PO_4$ 0,01M e 45% di alcool metilico in 43 minuti; la lunghezza d'onda di rivelazione, è di 285 nm.

Per l'analisi dei flavononi polimetossilati: SNT, NBL, NTD, HPT, DNBL e TNG viene utilizzata una eluizione isocratica con una fase mobile formata dal 50% di H₃PO₄ 0,01 M e 50% di alcool metilico. Una seconda eluizione isocratica viene utilizzata per l'analisi di QCT, NGEN, NPNC, PNC con una fase mobile costituita dal 70% di H₃PO₄ 0,01 M e 30% di alcool metilico. La lunghezza d'onda di rivelazione è di 360 nm.

I valori delle singole concentrazioni vengono riportate in tabella 26%.

Tabella 26 - Contenuto in flavonoidi delle foglie di alcune diverse specie agrumarie.

Specie	Cultivar	Tipo di glucoside legato	ERC (R)	NERC (N)	RTN (R)	NRTN (R)	NGIN (N)	HSP (R)	IRHF (R)	NHSP (N)	UF1	RHF (N)	DSM (R)	NDSM (N)	аст	NGEN	NPNC	PNC	APG	SNT	NBL	нрт	NTD	DNBL	TNG
C. Latifolia	Thaiti lime	R	250,0	0	254,0	10	0	53,4	97.7	0	0	0	124,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.1	42	e
C. limettioides	Sweet lime	R	0	0	153.7	0	0	109.0	410,8	0	0	0	57.2	0	0	0	0	0	0	0	0	3.3	1.6	0.9	15
C. bergamia	Bergamot	N	0	216.5	0	0	0	0	0	0	0	309.0	0	0	0	0	0	1,7	0	10.0	0	0	1.6	0	0
C. montana	Bilolo	R	0	0	1587	0	0	2774	0	0	193.9	0	1331	0	0	0.7	0	0	0	14.3	115.9	9.6	0	65.1	13.7
C. limon	Eureka limon	R	60.0	0	591.3	0	0	0	142,7	0	0	0	204.0	0	0	0	0.7	0	0	0	0.5	0	1.3	2.8	0
C. limonia	Rangpur lime	R	161,1	0	741,1	0	0	190.2	121.5	0	0	0	327.0	0	0	0	2.5	0	0	9.3	58.8	0	0	52,4	131,1
C. meyerii	Meyer lemon	R	0	0	269.3	0	0	405.5	134.3	0	0	0	220.2	0	0	0	1.2	0	0	1.2	9.2	1,4	0.8	22	44
C. lumia	Lumie	R	1132.9	0	1821	0	0	0	151.3	0	289.6	0	556.8	0	0	0	2.4	0	0	0	3.1	0	0	2.2	1.0
C. grandis	Hirado buntan	N	0	73,3	0	0	1076	0	0	0	0	562,1	0	50.3	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0.7	0	0
C. paradisi	Marsh GF	RN	0	0	0	80.5	402.2	0	91.8	0	0	352,9	0	0	0	0	3.2	3.0	0	0	3.6	0.6	2.2	2.2	1,8
C. paradisi	Red blush	R/N	0	0	05,1	100,5	378,8	0	113.8	0	0	0	0	0	0	0	0	1,4	0	0.8	6.0	0	1.6	25	19
C. aurantium	Sour orange	N	0	217,6	0	0	159.6	0	0	0	234.0	0	0	36.8	0	0	0	0	0	0	20.6	0	1.8	4.5	6.9
C. sinensis	Valencia	R	0	0	215.1	0	0	498.6	233.6	0	204.8	0	163.2	0	0	0	0	0	0	19.8	30,B	0	2.0	19.9	72
C. sinensis	Morita navel	R	0	0	212.5	0	0	741,2	283.6	0	260.2	0	206.9	0	0	0	0.8	1.5	0	24.3	38.7	0	0	23.6	80
C. reticulata	Ponkan	R	0	0	0	0	ó	1481	64,7	0	150,9	0	229.7	0	0	0	0,7	0	0	23.1	354.8	2	0	192.4	233.6
C. reticulata	Ota pon- kan	R	0	0	0	0	0	1239	129,6	0	223.1	0	308.5	0	0	0.4	0.7	0	0	30.2	371.3	0	0	151.0	217.9
C. deliciosa	Mediterrane- an mandarin	R	0	0	459,9	0	.0	1263	112.2	0	368.0	0	458.0	0	0	0	2.6	0	0	39.1	708.6	0	0	398,6	349.
C. tangerina	Obenimik an	R	0	0	307.7	0	0	1538	161,7	0	413.2	0	359.6	0	0	0.4	1.0	0	0	79.9	913.5	0	0	285.1	327.
C. tangerina	Dancy tangerine	R	0	0	298,3	0	0	2185	130,0	0	0	0	339.2	0	0	0.5	1,1	0	0	74.0	876.4	0	0	270.0	318
C. clementina	Clementi	R	0	0	885,1	0	0	763	420,8	0	428.6	0	253.0	0	0	0	1,4	0	0	46,4	137.6	0	0	67.4	67.0
F. crassifolia	Neiha Kumquat	N	0	0	0	0	0	.0	0	0	0	628.2	0	0	2.9	0	0	0	330.5	0	0	0	1,4	0	0
F. japonica	Round Kumquat	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	273.3	0	0	4.2	0	0	0	175.8	0	0	0	10	0	0
F. margarita	Naga Kumquat	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	252.9	0	0	0	1,4	0	0
P. trifoliate	Trifoliate orange	RN	0	0.	38.7	0	36.3	19.2	0	0	0	73.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0

Tutti i valori sono espressi in µg/100 mg di foglie essiccate.

0: non rivelato

UF1: Flavonoide non identificato

R: I Flavonoidi Rutinosidi sono predominanti

N: I Flavonoidi Neoesperidosidi sono predominanti

, R/N: Flavonoidi Rutinosidi e Neoesperidosidi

I flavonoidi della tabella sono indicati con le seguenti abbreviazioni:

ERC: Eriocitrina; NERC: Neoeriocitrina; RTN: Rutina; NRTN: Narirutina;

NGIN: Naringina; HSP: Esperidina; IRHF: Isoroifolina; NHSP: Neoesperidina;

RHF: Roifolina; DSM: Diosmina; NDSM: Neodiosmina; QCT: Quercetina;

NGEN: Naringenina; NPNC: Neoponcirina o Didimina; PNC: Poncirina;

APG: Apigenina; SNT: Sinensetina; NBL: Nobiletina;

HPT: 3,3',4',5,6,7,8 Eptametossiflavone;

NTD: Natsudaidaina; DNBL: Dimetilnobiletina; TNG: Tangeretina.

Esperidina, rutina e diosmina sono i flavonoidi presenti in maggiore quantità. In particolare nella specie Citrus Montana (cultivar: Bilolo) l'esperidina è in as

luto presente con la maggiore concentrazione.

Tra i polimetossiflavoni la nobiletina è diffusa nelle foglie di quasi tutte le speci spesso con alte concentrazioni come nel Citrus Tangerina.

15.0 ESTRAZIONE INDUSTRIALE DEI FLAVONOIDI DAI RESIDUI DI LAVORAZIONE DEGLI AGRUMI

Il crescente interesse verso i flavonoidi agrumari da parte dell'industria farmactica e cosmetica ha incentivato la ricerca di diversi metodi per la loro estrazio industriale.

I residui di lavorazione degli agrumi, per il loro elevato contenuto in flavono costituiscono una interessante materia prima per l'estrazione.

In particolare le scorze di pompelmo e bergamotto rappresentano un importa fonte di naringina mentre le scorze di mandarino, arancia, limone, ricche di espe dina, possono essere utilizzate per la sua estrazione.

Infine le polpe residue della lavorazione dellé arance pigmentate costituiscono ubuona sorgente di antociani.

In considerazione della notevole richiesta nel mercato dei flavonoidi sopra nomi ti e delle apparecchiature di estrazione molto semplici, che non richiedono mo anni di ammortamento, é auspicabile che molte industrie agrumarie, specie quell maggiore potenzialità, considerino seriamente la possibilità di utilizzare gli scarti i residui come buone sorgenti di flavonoidi.

Le tecnologie di estrazione dei diversi flavonoidi, sopra ricordati, vengono descreti in seguito.

15.1 Estrazione dell'esperidina

A) Metodo classico

Questo metodo suggerito da Baier⁶⁷ per l'estrazione e da Hendrickson e Kesterso per la purificazione, consiste nel trattamento alcalino delle scorze e nell'acidifizione dell'estratto con conseguente precipitazione dell'esperidina.

La chimica del processo è illustrata in fig. 23.

L'esperidina grezza così ottenuta, dopo filtrazione ed essiccazione a 80°C, vie sciolta una seconda volta in una soluzione di idrato sodico. Riacidificando si ott ne una riprecipitazione di esperidina molto più pura.

Uno schema di impianto⁶⁹ per l'estrazione industriale dell'esperidina è mostrato figura 24.

La scorza priva di essenza, viene macinata in modo da ottenere una pasta omos nea che viene introdotta nel contenitore C.

Nel contenitore C vengono introdotti 500 Kg di pasta omogenea, 750 Kg di acc e 5-5,5 Kg di ossido di calcio.

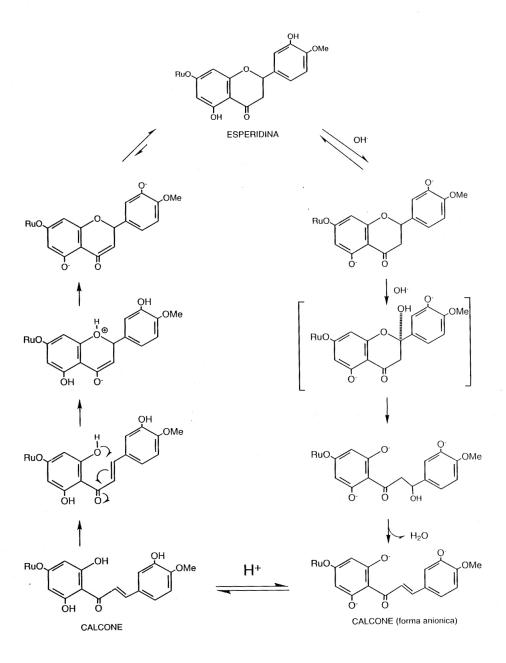


Figura 23: Trasformazioni strutturali dell' esperidina in soluzioni acquose.

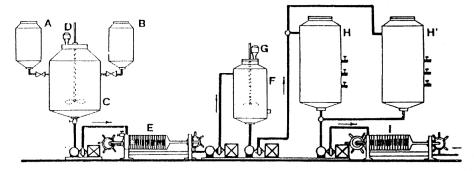


Figura 24: Schema di un impianto di estrazione dei flavonoidi dalle scorze

La pasta viene introdotta tramite la tramoggia A, l'acqua da D e la calce da B. Il pH della massa in questo modo viene portato a circa 11-11,5.

La massa pastosa è mescolata per 90-100 minuti. Trascorso questo tempo, per pressatura attraverso filtropressa si ottiene una soluzione lattiginosa alcalina che è pompata nel contenitore di acidificazione F.

Attraverso il dosatore G viene aggiunto lentamente dell'acido cloridrico al 37% fino ad arrivare ad un pH di circa 4,7. Il pH non deve scendere sotto 3,0, in quanto il rendimento un esperidina diminuisce di molto poiché l'elevata acidità del mezzo causa la distruzione di essa.

La soluzione rimescolata per circa 90 minuti, viene poi pompata in una delle vasche di decantazione II e II' dove rimane per un periodo di 18-20 ore.

Lateralmente alle vasche H e H' sono applicati rubinetti per il controllo e lo spurgo del liquido decantato.

La massa viene convogliata verso la filtropressa I. Al suo posto potrebbe essere utilizzata una centrifuga a paniere.

Purificazione dell'esperidina

1) Metodo Hendrickson e Kesterson⁶⁸

L'esperidina grezza (40%) viene essiccata a 80°C e successivamente sciolta in NaOII 0,2 N. La filtrazione del liquido torbido così ottenuto è, però, eccessivamente lenta. Per evitare questo inconveniente viene aggiunto al liquido alcool isopropilico che si è dimostrato utile per aumentare la velocità di filtrazione poiché coagula le sostanze ad alto peso molecolare e accelera il tempo di cristallizzazione dell'esperidina.

A questo scopo viene aggiunto alcool isopropilico fino ad ottenere una soluzione con concentrazione finale del 50%. Concentrazioni più elevate di alcool se da un lato migliorano la velocità di filtrazione, dall'altro diminuiscono la resa in esperidina, in quanto questa non si scioglie più facilmente e totalmente nel mezzo idrato sodico-alcool isopropilico ed inoltre si rende sempre meno economico il processo.

Si filtra ed il filtrato è portato a pH 8,5 mediante acido cloridrico 1:2. Si lascia in riposo almeno 48 ore. Questo processo può essere ripetuto fino ad ottenere esperidina pura al 95%.

2) Metodo di Pritchett D. E. e Merchant H. E.⁷⁰

Si prepara una soluzione di esperidina in formammide al 10% scaldando fino a 60 °C. La soluzione viene trattata per 30 minuti con carbone attivato e previamente bollito con acido cloridrico diluito.

Alla massa si aggiunge una soluzione acquosa al 50 % di formammide leggermente acidificata con acido acetico. Si filtra attraverso celite e la soluzione filtrata si diluisce con uguale volume di acqua.

Si aspetta alcune ore per permettere all'esperidina di cristallizzare.

I cristalli di esperidina separati per filtrazione vengono trattati prima con acqua calda e quindi con isopropanolo.

Si filtra e si lascia in riposo la soluzione in modo da ottenere i cristalli di esperidina più pura.

B) Metodo che utilizza una resina Stirene-Divinil-Benzene (SDVB)

Questo metodo⁷¹ prevede che le scorze triturate vengano trattate con calce idrata [Ca (OH)₂] fino a pH=12. Si agita meccanicamente e contemporaneamente si scalda a 60°C per 1 ora.

La massa viene filtrata e la soluzione viene successivamente acidificata con una soluzione acquosa di acido cloridrico fino a pH=6.

Il liquido viene fatto passare attraverso una resina (SDVB) che adsorbe l'esperidina, la quale successivamente viene eluita con una soluzione di NaOH 0,5 N contenete il 10% di alcool etilico.

Si acidifica la soluzione fino a pH=3,5 con conseguente precipitazione dell'esperidina.

Lo schema di recupero dell'esperidina dalla scorza di arancia è riportato in figura 25.

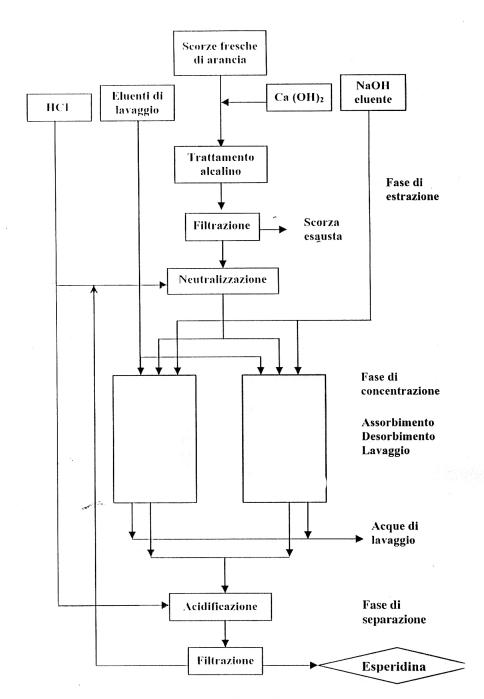


Figura 25: Schema di recupero dell'esperidina dalla scorza di arancia

15.2 Estrazione della naringina

A) Metodi classici

La naringina viene estratta dalle scorze di pompelmo o bergamotto mediante un metodo analogo a quello utilizzato (Baier 1947)⁶⁷ per l'estrazione dell'esperidina (descritto nel capitolo 15.1) con l'unica differenza di utilizzare un pH più basso (pH 9-10) grazie alla maggiore solubilità di questo flavonoide in acqua.

Un procedimento che evita l'uso di soluzioni alcaline è quello proposto da Poore II. D⁷². Questo processo si basa sulla differente solubilità della naringina in acqua calda e fredda.

Una parte di scorze viene mescolata con quattro parti di acqua, si riscalda a 90°C per cinque minuti. Si filtra il tutto e la porzione di scorze rimasta si tratta ancora con due parti di acqua scaldando a 80°C per cinque minuti.

Gli estratti acquosi riuniti si filtrano e la soluzione risultante si evapora sottovuoto fino a ridurre il volume iniziale di nove volte. A quest'ultima soluzione concentrata fredda si aggiungono alcuni cristalli di naringina per favorire la sua precipitazione. Si lascia cristallizzare per due o tre giorni. Il rendimento, per ogni kg di miscela costituita da flavedo, albedo, membrane è di 6,3 g di naringina.

B) Metodo che utilizza una resina Amberlite XAD16

Recentemente è stato sperimentato⁷³ un processo per l'estrazione della naringina dalle scorze di bergamotto che prevede l'uso di un impianto formato da un modulo di ultrafiltrazione collegato in serie ad una colonna di acciaio inox contenente una resina adsorbente (Amberlite XAD16) (figura 26).

Per l'estrazione, viene sfruttata la elevata solubilità della naringina in acqua calda, in sostituzione del trattamento con calce, con conseguente riduzione della quantità di pectina e abbassamento del suo potere gelatinizzante.

Il procedimento, schematizzato in figura 27 nelle linee essenziali, consiste nel trattare il pastazzo macinato con acqua calda due o tre volte. Il liquido, così ottenuto, si sottopone prima ad ultrafiltrazione e successivamente ad un passaggio su resina adsorbente che trattiene la naringina. Successivamente quest'ultima viene eluita con una miscela acqua-alcool (2:1).

Il metodo si è rivelato molto efficace, per rimuovere la naringina dalle scorze e separarla dagli altri componenti anche essi solubili in acqua calda (zuccheri, acidi e minerali).

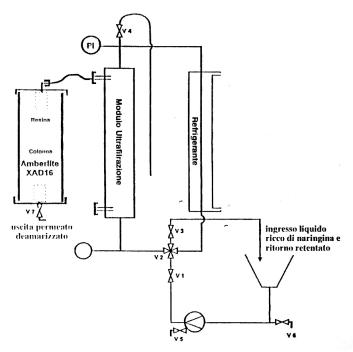


Figura 26: Schema dell'impianto di ultrafiltrazione ed adsorbimento per l'estrazione de naringina

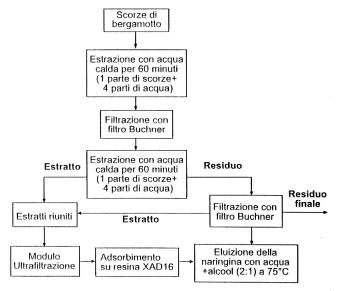


Figura 27: Processo di estrazione della naringina

15.3 Estrazione degli antociani

- A) Il metodo classico per estrarre le antocianine dai vegetali utilizza alcool acidificato. Comunemente viene usato alcool metilico o etilico contenente l'1% o meno di acido cloridrico.
- B) Una moderna tecnica⁷⁴ per estrarre le antocianine dalle polpe residue della lavorazione delle arancie pigmentate, utilizza ultrafiltrazione ed adsorbimento su resina. Le polpe residue vengono inizialmente trattate con una miscela acqua-alcool che estrae gli antociani.

La soluzione, dalla quale viene allontanato l'alcool per distillazione sotto vuoto, viene avviata su resina adsorbente (Amberlite XAD16) che trattiene gli antociani. Successivamente questi, vengono eluiti con una miscela acqua-alcool.

Il liquido, concentrato sotto vuoto, viene trasformato con uno spray-drier in forma di polvere antocianica.

16.0 PRINCIPALI PROPRIETÀ DI ALCUNI FLAVONOII PRESENTI NEI FRUTTI E NELLE FOGLIE DEL GENERE CITRUS. ⁷⁵

Flavanoni glucosidici

1) Esperidina (5, 7, 3'-triidrossi-4'-metossiflavanone-7-β-rutinoside) (7-β-rutino de della esperidina)

Componente del Citrus sinensis, limon, paradisi, medica, reticulata, auranti aurantifolia, tachibana, mitis, macroptera, karna, jambhiri, halimii, volkameria taiwanica, limettioides, excelsa, Fortunella hindsii, crassifolia.

È presente in grande quantità nelle membrane e nella scorza degli agrumi specie se acei È insolubile in soluzione acquose mentre è leggermente solubile in soluzione aci È poco solubile in acetone ed in acetato di etile. È fortemente solubile in piridi dimetilformammide (DMF) ed altri solventi simili [alcool metilico, dimetilsulfos do (DMSO)].

Dopo l'estrazione del succo dal frutto, l'esperidina venendo in contatto con il su acido precipita sotto forma di cristalli aghiformi. Nell'albedo degli agrumi e segmenti delle membrane che subiscono disidratazioni o il gelo precipita in maisolate e visibili. I cristalli di esperidina possono apparire anche sulla superficie arance è limoni appena raccolti e lesionati, ed esposti all'aria per alcune ore.

Punto di fusione: 251°- 252°C λmax C₂H₅OH: 285; 330 nm λmax + NaOH: 287; 360 nm λmax + AlCl₃: 308; 380 nm λmax + NaOAc: 285,9 nm

Con cloruro ferrico dà luogo ad una colorazione rosso vino.

Con idrossido di sodio in soluzione acquosa dà una colorazione gialla.

L'esperidina con acidi minerali diluiti si scinde in glucosio, ramnosio ed espereti

2) Naringina (5, 7, 4', triidrossiflavanone-7- β-neoesperidoside) (7- β-neoesperidoside) (7- β-neoesperidoside).

Scoperta 100 anni fa da De Vry, è componente del Citrus *paradisi, grandis aure tium, bergamia, kassaku*, Natsudaidai; Poncirus *trifoliata*; Fortunella *margarita*. Ha un sapore amaro intenso che supera quello del chinino, infatti si avverte a concentrazione di 10⁻⁵ - 10⁻⁴ M.

È discretamente solubile in acqua fredda e fortemente solubile in acqua calda (108 a 75°C). Inoltre è solubile in alcool, acetone, acido acetico glaciale, piridina.

Punto di fusione: 81-83°C (forma idrata), 171°C (dopo essiccazione).

λmax C₂H₅OH: 284; 328 nm λmax + NaOH: 428 nm (calcone)

 λ max + AIC1₃: 308; 382 nm.

È il flavonoide principale del pompelmo e del bergamotto.

Con la maturazione del frutto il contenuto di naringina, sia nel succo che nella scorza, subisce una diminuzione.

Negli Stati Uniti il recupero della naringina, durante l'estrazione della pectina dai residui di lavorazione dei pompelmi, è di pratica attuazione.

La naringina, per idrolisi con gli acidi minerali diluiti, si scinde in glucosio, ramnosio e naringenina. Quest'ultima non presenta sapore amaro.

Reagisce con il cloruro ferrino dando luogo ad un colore rosso vinoso

Con idrossido di sodio in soluzione acquosa dà una colorazione gialla.

3) Neoesperidina. (5, 7, 3'- triidrossi-4'-metossiflavanone-7- \(\beta\)-neoesperidoside (7-\\ \beta\)-neoesperidoside dell'esperetina)

Componente del Citrus aurantium, paradisi macroptera, limon, f. ponderosa, Poncirus trifoliata.

L'isomero naturale 2S fonde a 244°C, le forme sintetiche (2R, 2S) fondono da 244°C a 246°C.

Si può separare dall'esperidina perché più solubile in miscela idroalcolica.

È una sostanza molto amara che per idrolisi da esperetina, ramnosio e glucosio.

Massimi di assorbimento in alcoo etilico: 285, 330 nm

λmax + NaOH : 287; 360 nm λmax + AlCl₃ : 308; 380 nm λmax + CH₃COONa : 285; 9 nm

4) Narirutina (5, 7, 4'- triidrossi-4'-metossiflavanone-7- β-rutinoside) (7- β-rutinoside della naringenina)

Componente del Citrus sinensis, limon, paradisi, unshiu (mandarino Satsuma).

Punto di fusione: 180 -181°C

Massimo di assorbimento uguale a quella della naringina in alcool etilico: (284; 328nm)

5) Eriocitrina (5, 7, 3' 4'- triidrossi-flavanone-7- \(\beta\)-rutinoside)

Componente del Citrus limon; Fortunella hindsii, crassifolia

Dopo l'esperidina è il più importante flavonoide presente nel limone.

Punto di fusione: 135-136°C

Massimi di assorbimento uguale a quella della neoeriocitrina in alcool etilico: (285; 330nm).

.6) Neoeriocitrina (5, 7, 3' 4'- tetraidrossi-flavanone-7- β-neoesperidoside).

Componente del Citrus aurantium, bergamia, Fortunella crassifolia.

È meno amara della naringina, poncirina e neoesperidina.

Punto di fusione : 192 - 194°C λmax C₂H₅OH: 285; 330 nm λ max + AICl₃: 306; 382 nm

λmax + CH₃COONa : 285; 330 nm

7) Poncirina (5, 7, diidrossi 4'- metossi flavanone-7- β-neoesperidoside) (7-neoesperidoside dell'isosakuranetina).

Componente del Poncirus *Trifoliata*, Citrus *Paradisi*, grandis, macróptera, taiw nica, amblycarpa, Fortunella crassifolia, margarita.

Isolata dal Poncirus *Trifoliata* da Hattori (1944), con sapore amaro uguale quel della naringina (Horowitz y Gentili, 1961).

Punto di fusione 212 - 213°C (Wagner 1969)

λmax C₂H₅OH: 283; 330 nm

λmax: + CH₃COONa: 285; 360 nm

λmax: + AlCl₃: 380; 380 nm

λmax: + CH₃COONa: 283; 332 nm

8) Didimina o Neoponcirina (5, 7, diidrossi 4'- metossi flavanone-7- \(\beta\)-rutinosid (7- \(\beta\)-rutinoside dell'isosakuranetina).

Componente del Citrus sinensis, paradisi, macroptera, reticulata, ambly-carp Fortunella margarita.

Punto di fusione: 207 - 208°C

Massimi di assorbimento uguali a quelli della poncirina.

Flavanoni agliconi

Citromitina (5, 6, 7, 8, 3', 4'- esametossiflavanone).

Componente del Citrus mitis, reticulata.

È stata isolata nel 1962 da Sastry e Row

Punto di fusione 134 - 136°C

λmax in alcool etilico: 250; 272; 335 nm

Flavoni glucosidici

1) Roifolina (5, 7, 4'-tiidrossiflavone-7-\(\mathbb{B}\)- neoesperidoside)

Componente del: Citrus aurantium, paradisi, grandis.

Isolata da Hattori e Matsuda nel 1952.

Punto di fusione: 213 - 215°C

λmax C₂H₅OH: 268; 335 nm

λmax + NaOH : 268; 388 nm

 λ max + Δ ICI₃: 347; 381 nm

λmax + CH₃COONa: 266; 345; 397 nm

La roifolina è insapore e non molto solubile in acqua ed ha il potere di sopprimer parzialmente il sapore amaro della naringina.

2) Apigenina 7-\(\beta\)-rutinoside (5, 7, 4' triidrossiflavone - 7-\(\beta\)-rutinoside) "Isoroifolina"

Componente del: Citrus paradisi, limon.

Punto di fusione: 267 - 269°C

3) Fortunellina (5, 7, diidrossi-4' metossiflavone 7-ß-neoesperidoside) Componente di: Fortunella *japonica*, *margarita*, *crassifolia*, *obovata*

Punto di fusione: 219 - 220°C λ max C₂H₅OH: 269; 325 nm λ ma + NaOH : 290; 365 nm

λmax + AlCl₃: 278; 299; 339; 380 nm

4) Diosmina (5, 7, 3'- triidrossi-4'- metossiflavone-7-\(\beta\)-rutinoside)

Componente del: Citrus limon, medica

Il punto di fusione: 250 - 280°C λmax C₂H₅OH: 253, 268, 344 nm λmax in NaOH: 269, 375 nm

λmax in AlCl₃: 276, 295, 356, 385 nm

5) Rutina (3, 5, 7, 3'- 4'- pentaidrossiflavone 3-β-rutinoside) (Quercetina 3-β-rutinoside)

Componente del Satsumelo (C. reticulata x C. paradisi)

Il punto di fusione: 185,5 - 187,5°C

λmax C₂H₅OH: 258; 361 nm

6) Limocitrina 3-β-D-glucoside (3,5,7,4'-tetraidrossi-8, 3'-dimetossiflavone-3-β-D-glucoside

Componente del Citrus limon, sinensis

Punto di fusione 150°C

λmax C₂H₅OH: 261, 274, 361 nm

λmax + CH₃COONa: 284; 326; 395 nm

λmax + NaOH: 285 nm λmax + AlCl₃: 283; 305 nm

Flavoni agliconi

1) Tetraossimetilscutellareina (5, 6, 7, 4'-tetrametossiflavone)

Componente del Citrus sinensis

Punto di fusione: 142°C λmax C₂H₅OH: 266; 318 nm

2) Sinensetina (5, 6, 7, 3', 4'-pentametossiflavone)

Componente del Citrus sinensis, aurantium.

Punto di fusione: 157,5 - 158,5°C λmax C₂H₅OH: 241; 329 nm

3) Tangeritina (5, 6, 7, 8, 4'- pentametossiflavone).

Componente del Citrus reticulata, jambhiri, aurantium, sinensis, volkamerian medica, paradisi, Murcott tangor; Fortunella japonica; Poncirus trifoliata.

Punto di fusione:154°C

λmax C₃H₅OH: 271; 322 nm

Questo composto ha un'interesse storico in quanto è stato il primo flavone, alt mente metossilato, ad essere isolato dall'olio essenziale di Tangerina (Nelse 1934).

4) Nobiletina (5, 6, 7, 8, 3' 4'- esametossiflavone).

Componente del: Citrus reticulata, aurantium, paradisi volkameriana; Fortune japponica

Punto di fusione: 134°C

λmax C₂H₅OH: 248; 272; 332 nm

5) Esa-O-metilquercetagetina (3, 5, 6, 7, 3' 4' esametossiflavone).

Componente del Citrus sinensis

Punto di fusione 140 - 141°C

λmax C₂H₅OH: 242; 260; 332 nm

6) 3-idrossi-5, 6, 7, 3' 4'- pentametossiflavone

Componente del: Fortunella margarita

Punto di fusione: 184 - 185°C

λmax C₂H₅OH: 255; 357 nm

λmax + NaOH: 269; 330; 407 nm

λmax + CH₃COONa: 255; 362 nm

λmax + AlCl₃: 422nm

Antocianine

1) Cianidina 3-β-D-glucoside (3, 5, 7, 3' 4'-pentaidrossiflavilio-3-β-D-glucoside) Componente del: Citrus *sinensis* (varietà Moro).

λmax in alcool metilico + acido cloridrico: 274; 523 nm

2) Cianidina 3, 5-di-β-D-glucoside (3, 5, 7, 3' 4'-pentaidrossiflavilio-3,5-di-β-I glucoside).

Componente di Citrus sinensis (varietà Moro)

λmax in alcool metilico + acido eloridrico: 273; 524 nm

3) Peonidina 5-β-D-glucoside (3, 5, 7, 4'-tetraidrossi-3'-metossiflavilio-5-β-D-glucoside).

Componente di: Citrus sinensis (varietà Moro).

4) Delfinidina 3-β-D-glucoside (3, 5, 7, 3', 4' 5'-esaidrossiflavilio-3-β-glucoside) Componente di Citrus *sinensis* (varietà Moro). λmax in alcool metilico + acido cloridrico: 276; 534 nm

5) Petunidina 3-β-glucoside (3, 5, 7, 3', 4' pentaidrossi-5'-metossiflavilio-3-β-glucoside).

Componente di: Citrus sinensis (varietà Moro).

λmax in alcol metilico + acido cloridrico: 276, 534 nm

17.0 RASSEGNA DI LAVORI DI CROMATOGRAFIA LIQUIDA (HPLC), RIGUARDANTI I FLAVONOIDI DEGLI AGRUMI PUBBLICATI A PARTIRE DAL 1987

Flavanoni e flavanoni glucosidici

La maggioranza dei metodi sono isocratici e derivano dal metodo messo a punto Fisher e Wheaton (1976) che impiega una colonna Bondapak C18 (30 cm x 4 mm i.d una miscela acqua- acetonitrile (80:20) come eluente ed un rilevatore U.V. a 280nm. Prima dell'iniezione in colonna è preferibile estrarre i flavanoni con un solvente (es. una miscela acquosa di dimetilformammide) in quanto alcuni di essi presentar una bassa solubilità in fase acquosa. Occorre precisare che l'uso del solvente cor porta la perdita di alcuni picchi del cromatogramma.

Nella tabella 27 vengono elencati alcuni dei più recenti metodi utilizzati per determinazione dei flavanoni e flavanoni glucosidici degli agrumi.

Tabella 27 - Metodi HPLC per la determinazione di flavanoni e flavanoni glucosidici

Campione	Preparazione del campione	guard	Fase Stazionaria	Fase mobile	Autori	Numero di riferimento bibliografio
Succhi agrumari	Filtro SPE	×	Zorbax ODS C ₁₈ (250 x 4 6 mm)	Isocratica: H ₂ O/CH ₃ CN/CH ₃ COOH 79,5:20,0:0,5	Rouseff e coll. 1987	77
Succhi agrumari	Centrifugazione e filtrazione	×	Supelco C ₁₈ (125 x 3,6 mm)	Isocratica: H ₂ O/CH ₃ CN/CH ₃ COOH	Rouseff 1988	78
Succo arancia	Comprehensive recovery sche- me	x	Zorbax ODS (250 x 4.6 mm)	A: 1% CH ₃ COOH/H ₂ O; B: 1% CH ₃ COOH/CH ₃ CN Gradiente: 20-50% B in 10 min	Perfetti e coll. 1988	79
Agrumi	Centrifugazione e filtrazione	×	Superspher (250 x 4.6 mm)	Gradiente: tampone fosfato in CH ₃ CN	Schimell 1990	80
Succhi di agrumi	Filtro SPE1	x	Cyclobond I (B-cyclodextrin 250 x 4.6 mm)	A: H ₂ O/CH ₃ OH/CH ₃ COOH (90:10:0,5); B: CH ₃ OH/H ₂ O (95:5). Gradiente: A, 0- 1 min; 5-50% B in 25 min.	Krause e Galensa, 1991	81
Scorza di agrumi	Tiatlamento delle scorze con Dimetifformam mide (DMF). Filtrazione	×	Hypersil ODS C ₁₈ (250 x 4.0 mm, 7μm)	Isocratica: H ₂ O/CH ₃ CN 75% -25% (v/v)	Wu Houju e coll. 1991	82
Agrumi	Centralingazione e filtrazione	x	Supelcosil LC-18 (150 x 46 mm)	Gradiente: tampone fosfato in CH ₃ CN	Wade 1992	83
Agrumi	Centrifugazione e filtrazione	×	Supelco LC- 18 (150 mm)	Isocratica: H ₂ O/CH ₃ CN/CH ₃ COOH	Widmer e coll. 1992	84
Succo arancia	Centrifugazione e filtrazione	×	M.S. Gel C ₁₈ (250 x 4.6 mm)	$ \begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	Gamache e coll., 1993	85
Succhi di: pompelmo, limone, limetta dolce, arancia amara	Succhi diluiti con DMF ed una solu- zione di ammonio ossalato Riscaldamento centrifugazione e filtrazione	С	RP-18 UHS (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Isocratica: H ₂ O/CH ₃ CN/THF/CH ₃ COOH, (80:16:3:1 v/v)	Mouly e coll. 1993	86
Succo arancia	Riscaldamento del succo su bagnomaria. centrifugazio- ne filtrazione	×	Novapak RP- 18 (150 x 3.9 mm, 4 μm)	A: KH ₂ PO ₄ , H ₂ O, H ₃ PO ₄ , B: H ₃ PO ₄ , CH ₃ CN, H ₂ O: gradiente: 100% A, 0-3 min; 58% Å, 42% B, 38 min; 100% B, 40-43 min; 100% Å, 46-58 min	Ooghe e coll., 1994	57

Campione	Preparazione del campione	guard	Fase Stazionaria	Fase mobile	Autori	Numero di riferimento bibliografico
Succo limone	Succo diluito con DMF ed una soluzione di ammonio ossalato,riscal- dato e filtrato.	x	Supelco LC-18 (150 x 4.6 mm 3µm)	A: K ₃ PO ₄ , H ₃ PO ₄ , H ₂ O B: K ₃ PO ₄ , H ₃ PO ₄ , CH ₃ CN, H ₂ O gradiente: 100% A, 0-3 min: 58% A, 42% B, 38 min; 100% B, 40-43 min; 100% A, 46-58 min	Grandi e coll. 1994	87
Succhi arancia e pompelmo concentrati	Estrazione con CH ₃ OH	×	Alltima RP C18 modified silica (250 x 4.6 mm, 5 μm)	Isocratica: $\rm H_2O/CH_3CN/2$ -propanolo/ $\rm CH_2O_2$ (158:23:19:0.2, v/v); $\rm H_2O/THF$ (18:7, v/v), soltanto analisi qualitativa	Bronner e Beecher, 1995	88
Succhi di arancia e pompelmo	Due estrazioni per rimuovere carotenoidi e fla- voni metossilati	d	Zorbax ODS C18 (250 x 4.6 mm)	A: 1% CH ₃ COOH/H ₂ O B: 1% CH ₃ COOH/CH ₃ CN gradiente: 20-50% B in 10 min	Marini e Balestrieri, 1995	89
Succo bergamotto	Diluizione con DMF : H ₂ O (1:1) centrifuga- zione filtrazione	x	Sil-X-10 C ₁₈ (250 x 4.6 mm)	Isocratica: CH ₂ O ₂ /THF/CH ₃ CN (85:12:3 v/v)	Gionfriddo e coll. 1996	90
Succhi Agrumi freschi e concentrati	Centrifugazione e filtrazione	x	Novapak C ₁₈ (150 x 3.9 mm)	Gradiente: KH ₂ PO ₄ :CH ₃ CN:H ₂ O	Robards e coll. 1997	91
Succo arancia Brasile	Frutti premuti manualmente; diluizione del succo con DMF e soluzio- ne di ammonio ossalato	b	C18 nucleosil (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Isocratica: H ₂ O/CH ₃ CN/THF/CH ₃ COOH, (80:16:3:1, v/v)	Pupin e coll., 1998	92
Succhi agrumari	Succhi ottenuti da frutti premuti manualmente, diluiti con DMF, e H ₂ O centrifugazione e filtrazione.	b	Alltima (250 x 4.6 mm, 5 μm)	A: H ₂ O/CH ₃ COOH (96:4, v/v) B: CH ₃ CN: gradiente: 0% A, 100% B, 0 min: 8% A, 92% B, 12 min: 34% A, 66% B, 43 min; 70 % A, 30% B, 44 min 30% B, 44-49 min convex: 30-100% B, 49-50 min	Mouly e coll., 1998	93
Agrumi	Estrazione con DMSO: CH ₃ OH	×	Hypersil RP 18 (100 x 4.6 mm)	Gradiente: H ₃ PO ₄ : CH ₃ OH	Kawai e coll. 1999	52
Succo arancia	Diluizione con DMF: H ₂ O (1:1) Centrifugazione filtrazione	×	Hypersil ODS C ₁₈ (200 x 4.6 mm, 5µm)	Isocratica: H ₂ O/CH ₃ CN 75%(v/v)-25% (v/v)	Postorino e coll. 1999	53
Foglie di piante agrumarie	Foglie trattate con DMSO: CH ₃ OH (1:1)	x .	TSK gel Super-ODS (100x4.6mm, 2µm)	A: H ₃ PO ₄ 0,01M B: CH ₃ OH gradiente: 80%A, 20%B, 0-2 min 55%A, 45%B, 43 min	Kawai e coll. 2000	66
Succo arancia	Diluizione con DMF. Centrifugazione e filtrazione	a	Discovery C ₁₈ Supelco (250 x 4,6 mm)	A: CH ₃ COOH/H ₂ O 0.2% B: CH ₃ CN gradiente: 95% A; 5%B, 0-10 min 75% A; 25% B, 10-20 min 60% A; 40% B, 20-30 min 50% A; 50% B, 30-35 min 0% A; 100% B, 35-40 min 95%A; 5% B, 40-60 min	Leuzzi e coll. 2000	59
Succo limone	Diluizione con DMF e filtra- zione	×	Discovery C ₁₈ Supelco (250 x 4,6 mm, 2 µm)	Isocratica: H ₂ O/ CH ₃ CN 80% - 20% (v/v)	Caristi e coll. 2003	94

^a Discovery C18 Supelco (20x4,0 mm) ^b Alltima C18 (7,5 x 4,6 mm, 5 mm) ^c RP –18 UHS (30 x 4,6 mm) ^d Spheri 5 C18 (50 X 4.6 mm)

Flavoni polimetossilati e flavonoli

Il metodo Ting-Rouseff (1979)³³ prevede la loro estrazione con un solvente organ co (cloroformio) e l'impiego di una colonna Du Pount Zorbax C₈, con un eluer formato da tetraidrofurano-acqua. (25:75 v/v) rivelatore U.V: a 313 nm.

Un altro metodo è quello di Sendra et. al. $(1986)^{94}$ che prevede l'estrazione in fa solida mediante l'uso di una cartuccia Sep.Pak C_{18} ed una successiva eluizione ℓ flavoni polimetossilati con una miscela cloroformio/metanolo (50:50 v/v).L'anal HPLC avviene in isocratica, utilizzando una colonna Nucleosil C_{18} (250 x 4.6 m 5 μ m) ed un eluente formato da: tetraidrofurano, acetonitrile, acqua (220:60:7. v/v/v) con il rivelatore U.V. a 340 nm. Il volume iniettato è di 20 μ l. Una rassegna dei metodi dal 1979 è riportata in tab. 28

Tabella 28 - Metodi HPLC per la determinazione di flavoni polimetossilati e flavonoli

Preparazione del Fase Stazionaria Numero d Campione Fase mobile ~ Autori campione (colonna) rif, bibl. Zorbax C₈ (4,6 x Succo di Filtro - aggiunta di Ting e coll. arancia e NaOH - estrazio-250 mm) Isocratica: THF - Acqua 1979 95 Microbondapak-C₁₈ tangerini ne con cloroformio Succhi di Filtro - aggiunta di Zorbax C8 Rousef e coll. NaOH - estrazio-Isocratica: THF - Acetonitrile - Acqua arancia con-96 (4,6 x 250 mm) 1979 centrati ne con benzene Estratti dalla Bianchini e Soxblet - estrazio-Lichrosorb Si 60 Isocratica: Eptano - Etanolo e scorza degli coll. 97 (4 x 250 mm) propan-2-olo ne con benzene agrumi 1980 Scorza degli Estrazione con Ultrasphere C₈ Gradiente: metanolo-acetonotrile-acqua-Park e coll. QR (4,6 x 250 mm) agrumi Succo di Nucleosil C₁₈ Sendra e coll. Filtro - SPE Isocratica: Acqua - acetonitrile - THE QQ arancia (4,6 x 250 mm) Olii essenziali Olii estratti Gaydou e coll. dalla scorza di mediante Lichrosorb Si 60 Eptano-propan-2-olo 100 arancia e 1987 torchiatura mandarino Succo di Zorbax ODS Perfetti e coll. Gradiente: Acido acetico-acqua-metanolo 70 (4,6 x 250 mm) Succo di Hypersyl ODS Sendra e coll Filtro - SPE Gradiente: Acqua- acetonitrile - THF 101 arancia (2.1 x 200 mm) 1988 Addizione di Heimhuber e dimetilformammi-Succo di Hypersyl ODS coll Isocratica: Acetonitrile-acqua 102 arancia (4,6 x 250 mm) 1988 to e centrifugazione - SPE A: 0.01 Molare H₃PO₄ B: CH₃OH Gradiente: 20% B 0-2 min. 20-100% B 2-55 min. Vandercook e C₁₈ RP Estrazione Limoni coll. 103 liquido-liquido (4 x 250 mm) 1989 Succo di mela Hertog e coll. uva, pompelmo, Idrolisi acida ed Isocratica: Acetonitrile - tampone Novapak C₁₈ 1993 33 pomodoro, limoestrazione ne e arancia A: H₂O - CH₂O2,5% Ferres e coll. Lichrochart RP18 Miele di B: CH₃OH Filtro - SPE 1993 104 agrumi (4 x 250 mm, 5 μm) Gradiente: 40-45%B, 0-10 min. 45-60% B. 10-35min. Nucleosil C₁₈ (4 x Succo Estrazione con Pupin e coll. Acqua: acetonitrile: Acido acetico: THE 92 d'arancia toluene 250 mm, 5 µm) (80:16:3:1: v/v) A: CH₃OH 0,01M Succo RP 18 (HP) Kawai e coll Filtro - SPE B: CH₃OH Gradiente: 20% B 0-2min. 52 di agrume (4 x 125 mm, 5 µm) 1999 20-100% B, 2 56min.

Tabella 28

Campione	Preparazione del campione	Fase Stazionaria (colonna)	Fase mobile	Autori	Numero di rif. bibl.
Foglie degli agrumi	Estrazione dalle foglie con DMSO: MeOH (1:1)	TSK gel super ODS (4,6 x 100 mm, 2 µm)	Isocratica: H ₃ PO ₄ 0,01M 50% CH ₃ OH 50%	Kawai e coll. 2000	66
Olii essenziali di limone, ber- gamotto, man- darino, arancia dolce, arancia amara	Diluizione con acetonitrile 1:100	P.E.C ₁₈ (3 cm x 4,6 mm d. i., 3 µm)	A = acetonitrile B= acqua Gradiente: 30% A - 70% B - 0.5 min. 80% A - 20% B - 2,5 min.	Bonaccorsi e coll. 1999	105

Tabella 29 - HPLC di Antocanidine ed antocianine.

Campione	Preparazione del campione	Fase Stazionaria (colonna)	Fase mobile	Autori	Numero di riferimento bibliografico
Frutti rossi	Centrifugazione, filtrazione	RP-18 Licrhospher (250cmx10mm, 7µm)	Quattro eluizioni isocratiche: H ₂ O/CH ₃ CN/CH ₂ O ₂ (84:6:10; 81:9:10; 80:10:10; 75:10:10) (v/v)	Goiffon e coll. 1991	106
Succo arancia rosso	Centrifugazione, filtrazione Sep- Pack C18, estra- zione in 5ml di MeOH 0,1% HCL	Bondapak C18 (250x4,6mm)	A:H ₂ O-CH ₃ COOH (85-15x100v/v) B:H ₂ O-CH ₃ COOH-CH ₃ OH (65-15-20%v/v) Gradiente: 99%A,1%B fino a 100%v,0-40min.	Rapisarda e coll. 1994	107
Sottoprodotti dell'arancia rossa	Centrifugazione, filtrazione	Nucleosyl C18 (250x4,6mm)	A: 10% CH ₂ O ₂ /H ₂ O(v/v) B.CH ₃ CN Gradiente: 94%A, 6%B, fino a 80%A, 20% B; 0-30 min.	Calvarano e coll. 1995	108
Succhi di frutta rossi, concentrati. Sciroppi	Filtro - SPE	Lichrospher (250x4,5mm, 5µm)	Isocratica: H ₂ O/CH ₃ CN/CH ₂ O ₂ (84:6:10) A: H ₂ O B: CH ₃ CN C: CH ₂ O ₂ Gradiente: 84%A, 6%B, 10%C, 0-25min.; 65%A, 25%B, 10%C, 25-min.; fino a 45 min.	Goiffon e coll. 1999	109

Abbreviazioni nelle tabelle 27, 28, 29.

SPE (Solid Phase Extraction= Estrazione in fase solida)

CH₃CN CH3COOH acetonitrile

CH₃OH

acido acetico alcool metilico

CH₃COONa CH₂O₂

acetato di sodio acido formico

DMF **DMSO**

dimetilformammide dimetilsulfossido

acqua H_2O

H₃PO₄

acido fosforico

KH2PO4

potassio fosfato monobasico

K₃PO₄

fosfato di potassio

NaH₂PO₄ NaOH

sodio fosfato monobasico

SDS

sodio idrossido

THF

sodio dodecil solfato

Tetraidrofurano

v/v

volume/volume

INDICE ANALITICO

Antociani o Antocianine	1
Antociani (estrazione)	8
Antocianidine	14, 15, 17, 25, 37, 4
Apigenina	
Auranetina5-idrossi	5
Calconi	4
Canferolo7-glucoside	13, 19, 25, 29, 36, 53, 5
Catechina (+)	2
Catechine	14, 17, 19, 2
Cianidina	15, 47, 52, 53, 9
Citromitina	
Crisina	12, 3
Crisoeriolo-7-glucoside	
Delfinidina	15, 2 15, 53, 9
3-deossiflavonoidi (v. flavoni e flavanoni)	
Didimina	11, 23, 53, 58, 61, 72, 73, 76, 5
Diidrocanferolo	
Diosmetina 6-(6-β-D-glucoside) 6-(8-C-β-D-glucoside)	
Diosmina	12, 29, 43, 53, 58, 61, 76,
Epicatechina (-) Epigallocatechina (-)	

Eptametossiflavone	12, 53, 68, 70, 72, 77
Eriocitrina	9, 53, 58, 61, 72, 73, 76, 88
Eriodictolo	11, 29, 37, 53
Esametossiflavone	53
Esametossiquercetagetina	12
Esa-O-metilquercetagetina	
Esperetina	
Esperidina11, 21, 23, 25, 26, 29, 43, 45, 46, 53, 5 estrazione	8, 61, 67, 72, 73, 76, 79, 87
Flavanoni	5, 49, 55, 61, 72, 87, 89, 93
Flavanonoli	9
Flavoni9, 12, 25, 26, 29, 37, 42, 45, 50, 55, 6	61, 67, 70, 73, 76, 89, 90, 95
Flavonoidi alimentazione attività antiossidante caratterizzazione dei succhi agrumari distribuzione estrazione industriale maturazione dei frutti meccanismi di biosintesi metodi analitici pastazzo profili cromatografici proprietà proprietà biologiche proprietà farmacologiche protezione delle bevande sapore struttura tassonomia agrumaria	35 61 25, 29, 53, 55, 57, 75 79 26 17 45, 48, 93-96 72 62-66, 87 25 39 44 21 9, 36
Flavonoli9,	
Florizina	
Fortunellina	
Gallocatechina (+)	

3-idrossiflavonoidi (v. flavonoli e flavanonoli)
3-idrossi-5, 6, 7, 3', 4' - pentametossiflavone
soflavonoidi struttura
Isolimocitrolo
Isoquercetina
soramnetina
Isoroifolina
Isosakuranetina
Isoscutellareina
Isosinensetina
Leucopelargonidina
Limocitrina
Limocitrolo
Luteolina
Malvidina 3-glucoside 3,5 diglucoside
Metodi analitici cromatografici
Miricetina
Naringenina 11, 19, 27, 29, 30, 37, 53, 59, 76 7-glucoside 4'-glucosil-7-ramnoglucoside
Naringina
Narirutina 11, 23, 25, 29, 53, 58, 61, 67, 72, 76 4'-O- glucoside 29, 72

Natsudaidaina	
Neodiosmina	53, 58.
Neoeriocitrina	11, 22, 53, 58, 61, 73, 76
-	
Neoponcirina (v. Didimina)	
	11, 25, 29, 41, 53, 58, 67, 68, 70, 72, 76
5-pentametossiflavone	
3-glucoside	
Prunina	
Quercetagetina	
Ramnetina	
Roifolina	12, 27, 53, 58, 76
Rutina	13, 29, 36, 58, 76
Scutellareina	
Sinensetina	12, 29, 41, 45, 53, 58, 67, 70, 72, 73, 76
Tanaaratina	12, 29, 37, 40, 53, 58, 67, 70, 72
rangerenna	

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 16 Contenuto di flavonoidi totali in varie parti di un'arancia
Tabella 17 Contenuto in flavonoidi della parte edibile essiccata di diversi frutti agrumari58
Tabella 18 Concentrazione (mg /l) dei flavanoni glucosidici in alcuni succhi agrumari naturali (Italia)
Tabella 19 Quantità di polimetossiflavoni presenti in diverse parti di un agrume (arancia) ed in alcuni prodotti della sua lavorazione
Tabella 20 Concentrazione dei polimetossiflavoni nel succo naturale (11, 2° Brix) di arancia di prima e seconda premitura
Tabella 21 Polimetossiflavoni identificati in alcuni olii essenziali agrumari
Tabella 22Contenuto medio dei polimetossiflavoni negli olii essenzialidi arancia dolce, mandarino, arancia amara e pompelmo
Tabella 23 Flavonoidi nel "pastazzo" di arancia fresco ed essiccato
Tabella 24 Concentrazioni di flavonoidi nella scorza essiccata di alcune varietà di arancia 73
Tabella 25 Concentrazioni di Flavonoidi nel "pastazzo" fresco di bergamotto
Tabella 26 Contenuto in flavonoidi delle foglie di alcune diverse specie agrumarie76
Tabella 27 Metodi HPLC per la determinazione di flavanoni e flavanoni glucosidici 93-94
Tabella 28 Metodi HPLC per la determinazione di flavoni polimetossilati e flavonoli. 95-96
Tabella 29 HPLC di Antocanidine ed antocianine

ERRATA – CORRIGE

Ci scusiamo con i lettori, per alcuni errori che sono sfuggiti, nonostante le diverse revisioni correttive.

PAGINA	ERRATA	CORRIGE
13	Quercetina-3-o-rutinoside	Quercetina-3-β-rutinoside
42	finlandesi	Finlandesi
97	Calvarano M., Di Giacomo A.:Essenze Derivati Agrumari, 47, 19 (1977).	Zamorani A., Lanza C.M., Castaldi M.G., Russo C.: Essenze Derivati Agrumari, 47, 27 (1977).
99	et altri	J. Food Chem. (1995)
100	Leuzzi M.,	Leuzzi U.,
	Laconica	Lamonica
	72, n, 1, 15-19 1991).	72, 1, 15-19 (2002).
	J.Agric Food Chem., 47, 4391-4397	J. Agric Food Chem., 47, 4391-4397 (1999).
101	Horowitz R.M., Gentili B.: "Citrus Science and Technology", Capitolo 10, p. 397	Nagy S., Shaw P.E., Veldhuis M.K "Citrus Science and Technology", Capitolo 10, p. 397, The AVI Publis Company, 1997.