



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Dipartimento di Scienze Del Farmaco

Valutazione dell'attività antiossidante e antiglicante di un
estratto di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) e la sua
applicazione in una formulazione cosmetica

Relatore:
Prof.ssa Paola Perugini

Tesi Sperimentale di
Chiara Di Ludovico

Anno Accademico 2025/2026

Sommario

1. Introduzione	5
1.1 Attività antiglicante	5
1.1.1 Processo di glicazione	5
1.1.2 Prodotti finali della glicazione avanzata (AGE).....	7
1.1.3 Molecole antiglicanti	12
1.2 Attività antiossidante	13
1.2.1 Stress ossidativo e specie reattive dell'ossigeno	13
1.2.2 Molecole antiossidanti	16
1.2.3 Test per la valutazione dell'attività antiossidante	19
1.3 Valorizzazione degli scarti e residui agroindustriali	25
1.3.1 Sottoprodotti della lavorazione del pomodoro	27
1.3.1.1 Licopene	29
1.3.1.2 Polifenoli.....	31
1.3.1.3 Farina di pomodoro	36
2 Scopo della tesi.....	39
3 Materiali.....	41
4 Metodi	42
4.1 Contenuto totale di polifenoli (TPC).....	42
4.2 Valutazione attività antiossidante	43
4.2.1 Saggio del radicale DPPH	43
4.3 Valutazione attività antiglicante	44
4.3.1 Sistema glicato <i>in vitro</i>	44
4.3.2 Valutazione attività inibitoria della produzione di AGE	45
4.4 Formulazione dell'estratto di pomodoro in un siero.....	45
4.4.1 Valutazione dell'attività antiossidante del siero.....	46
5 Risultati e discussione	49

5.1 TPC	49
5.2 Valutazione attività antiossidante	50
5.3 Valutazione attività antiglicante	54
5.4 Formulazione e valutazione della capacità antiossidante del siero	57
6 <i>Conclusioni</i>	58
<i>Bibliografia</i>	60

Abstract

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo la caratterizzazione di un estratto glicerico di pomodoro (*Solanum lycopersicum* Fruit Extract) e la valutazione delle sue proprietà biologiche in termini di attività antiossidante e antiglicante, con successiva applicazione in una formulazione cosmetica topica.

L'estratto è stato analizzato per il contenuto totale di polifenoli mediante metodo Folin-Ciocalteu, evidenziando una significativa presenza di composti fenolici. L'attività antiossidante è stata valutata tramite saggio del radicale stabile DPPH, mostrando un comportamento dose-dipendente e una capacità di scavenging moderata ma significativa. L'attività antiglicante è stata studiata utilizzando un modello in vitro BSA-glucosio, monitorando la formazione di prodotti finali della glicazione avanzata (AGEs) nel tempo. I risultati hanno evidenziato una marcata capacità inibitoria dell'estratto, più evidente nelle fasi iniziali del processo glicativo e nei confronti degli AGE di tipo argpirimidina-like, con un'efficacia generalmente dipendente dalla concentrazione e dal tempo di incubazione.

Successivamente, l'estratto è stato incorporato in una formulazione cosmetica in forma di siero idrofilo contenente ialuronato di sodio. La formulazione ottenuta si è dimostrata stabile, omogenea e con pH compatibile con la fisiologia cutanea. La valutazione dell'attività antiossidante del prodotto finito ha mostrato una limitata riduzione rispetto all'estratto puro, pur mantenendo una significativa capacità di neutralizzazione dei radicali liberi.

Nel complesso, i risultati ottenuti suggeriscono che l'estratto di pomodoro rappresenta una fonte promettente di composti bioattivi con potenziale applicazione cosmetica per la protezione dallo stress ossidativo e dai processi di glicazione cutanea, contribuendo alla prevenzione dei fenomeni associati all'invecchiamento della pelle.

1. Introduzione

1.1 Attività antiglicante

1.1.1 Processo di glicazione

La glicazione, nota anche come reazione di Maillard o imbrunimento non enzimatico, è stata descritta per la prima volta nel 1912 da Louis-Camille Maillard come l'interazione tra zuccheri e amminoacidi con formazione di prodotti brunastrati [1]. Le reazioni di Maillard sono innescate dalla condensazione dei gruppi amminici su proteine, peptidi e amminoacidi con gruppi carbonilici su zuccheri riducenti, con conseguente formazione di basi di Schiff e riarrangiamento in prodotti di Amadori o Heyns [2]. Le reazioni di Maillard determinano alterazioni del colore degli alimenti, delle proprietà organolettiche, della funzionalità e della digeribilità delle proteine.

La reazione di Maillard può essere considerata una delle reazioni chimiche più importanti che avvengono durante la lavorazione degli alimenti. La sua influenza sulle caratteristiche degli alimenti, quali colore, sapore e valore nutrizionale, comprende effetti sia desiderabili sia indesiderabili e dipende dalle condizioni di lavorazione e dalle proprietà fisico-chimiche della matrice alimentare. Le principali variabili che determinano l'entità della reazione di Maillard includono la temperatura e il tempo di trattamento, strettamente legati alle condizioni di lavorazione, nonché il pH, l'attività dell'acqua e la natura e la disponibilità dei reagenti. Questi ultimi dipendono dalle caratteristiche intrinseche del prodotto, ma possono essere significativamente modificati dai processi di trasformazione degli alimenti e delle materie prime. Processi quali la tostatura, la cottura al forno e la frittura sfruttano gli effetti favorevoli della reazione di Maillard, in particolare la formazione di composti responsabili del colore e del sapore. Al contrario, durante trattamenti come l'essiccazione, la pastorizzazione e la sterilizzazione, l'attivazione della reazione di Maillard risulta indesiderata. Tra gli effetti negativi associati rientrano la perdita di amminoacidi essenziali coinvolti nella reazione e la formazione di prodotti di reazione potenzialmente dannosi [3].

La reazione di Maillard si verifica anche in processi industriali che implicano il riscaldamento, come quelli utilizzati nell'industria tessile, cosmetica o biofarmaceutica.

Fasi del processo di glicazione

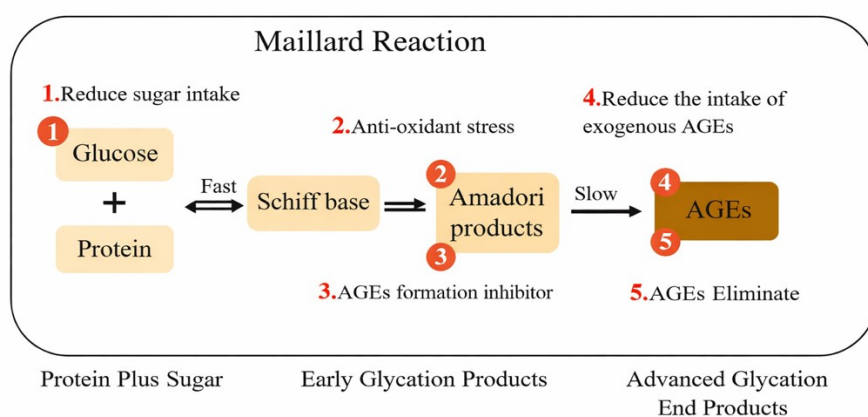


Figura 1. Schema di produzione dei prodotti finali della glicazione avanzata (AGE) [4].

Il processo di reazione è simile a una reazione a catena di radicali liberi e generalmente consiste in tre fasi: inizio, propagazione e fase avanzata (Figura 1). La reazione richiede solitamente da diversi giorni a diverse settimane per completarsi; la velocità di reazione è straordinariamente bassa perché non è coinvolta alcuna catalisi enzimatica.

Durante la reazione di inizio, uno zucchero riducente, come il glucosio, si lega al gruppo amminico libero di amminoacidi, peptidi o proteine per produrre una base di Schiff instabile, che a sua volta porta alla formazione di una chetoammina relativamente stabile, nota come prodotto di Amadori. Queste reazioni sono tutte reversibili fino al momento della sintesi del prodotto di Amadori, e l'equilibrio dipende fortemente dalle concentrazioni del substrato e dal tempo di incubazione. È importante notare che la base di Schiff è altamente soggetta a ossidazione e generazione di radicali liberi, che porta alla formazione di intermedi carbonilici reattivi. Il glucosio stesso può autoossidarsi per formare perossido di idrogeno e chetoaldeidi in presenza di ioni di metalli di transizione, e successivamente accelerare la formazione di AGE.

Durante la reazione di propagazione, i prodotti di Amadori reagiscono con gli amminoacidi per formare *Nε*-(carbossimetil)lisina (CML) o rigenerano ammine attraverso una catalisi mediata da ioni metallici e un'ossidazione indotta dall'ossigeno, mentre il gruppo glicosilico viene disidratato per formare desossiglucosone (DG). Questi passaggi costituiscono la fase intermedia della reazione di Maillard.

Durante la fase avanzata della reazione, il DG altamente reattivo reagisce con i residui di lisina nella proteina per produrre pirralina, oppure un pentoso reagisce con i residui di lisina e arginina nella proteina per generare pentosidina e altri prodotti. Di conseguenza, nella molecola proteica si verificano reticolazioni e frammentazioni eterocicliche intermolecolari o intramolecolari, che portano alla denaturazione della proteina e a danni irreversibili. Oltre a pirralina e pentosidina, altri tipi di AGE irreversibili possono essere generati dai prodotti di Amadori, tra cui CML, Nε-(carbossietil)lisina (CEL), 2-(2-furoil)-4(5)-(2-furanil)-1H - imidazolo (FFI), dimero di gliosale-lisina (GOLD) e dimero di metilgliosale-lisina (MOLD), così come altri composti non ancora identificati. I prodotti finali della reazione di Maillard, gli AGE, hanno un'elevata stabilità termica e pertanto questi passaggi costituiscono la fase finale della reazione di Maillard [5].

1.1.2 Prodotti finali della glicazione avanzata (AGE)

I prodotti finali della glicazione avanzata (AGE) sono miscele covalenti stabili generate dalla reazione spontanea di macromolecole come proteine, lipidi o acidi nucleici con glucosio o altri monosaccaridi riducenti, comunemente nota come reazione di Maillard [6].

I complessi meccanismi alla base della formazione degli AGE, insieme all'ampia varietà di molecole precursori coinvolte, portano alla generazione di numerose specie di AGE chimicamente eterogenee. Sono stati identificati più di 40 diversi tipi di AGE nel sangue e nei tessuti umani e negli alimenti. Le differenze nelle loro strutture chimiche, nelle proprietà, nelle origini e nel significato fisiologico consentono di classificarle in diversi gruppi sulla base di specifici criteri [7].

Sulla base delle loro proprietà strutturali e funzionali, gli AGE identificati nei tessuti possono essere suddivisi in tre principali categorie:

- AGE reticolanti fluorescenti, capaci di formare legami crociati tra proteine e dotati di fluorescenza intrinseca. A questa categoria appartiene, tra gli altri, la pentosidina.
- AGE reticolanti non fluorescenti, che inducono la formazione di legami crociati proteici pur non presentando proprietà fluorescenti. Esempi rappresentativi includono i legami crociati imidazolio tra due residui di lisina.
- AGE non reticolanti, che non determinano la formazione di legami crociati tra proteine.

Tra questi rientrano la pirralina e la N-carbossimetil-lisina (CML) [8].

Gli AGE fluorescenti sono caratterizzati dalla capacità di emettere fluorescenza quando esposti alla luce ultravioletta (UV) o visibile, tra questi troviamo la pentosidina, pirropiridina, metilgliossale-lisina e dimeri di gliossale-lisina. La pentosidina, ad esempio, si trova comunemente nelle fibre di collagene ed elastina e si forma attraverso la glicazione dei residui di lisina e arginina nelle proteine e il suo accumulo è associato all'invecchiamento e a molteplici patologie correlate all'età [6]. I legami crociati imidazolici tra due lisine sono anche noti come dimero gliossal-lisina (GOLD) e dimero metilgliossal-lisina (MOLD). Questi due composti derivano dalla reazione tra due catene laterali di residui di lisina e due molecole di gliossale (GO) o metilgliossale (MG), rispettivamente. La pirralina, invece, si forma in seguito alla reazione tra il glucosio e i residui di lisina presenti nelle proteine. Tale composto riveste un ruolo significativo in vivo ed è comunemente riconosciuto come un indicatore dell'accumulo dei prodotti finali della glicazione avanzata (AGE) sia durante l'invecchiamento fisiologico sia in condizioni patologiche, come il diabete [9].

Gli AGE non fluorescenti si riferiscono a specifici tipi di proteine e lipidi glicati che non possiedono le stesse proprietà di emissione di fluorescenza delle loro controparti fluorescenti, come la N ϵ -(carbossimetil) lisina (CML), la N ϵ -(carbossietil) lisina (CEL), il glucosioipano e gli AGE derivati dal 3-desossiglucosone. La N ϵ -(carbossimetil) lisina (CML), ad esempio, è un AGE formato attraverso la glicazione dei residui di lisina nelle proteine ed è associata a stress ossidativo e infiammazione in varie malattie [6].

In Figura 2, vengono illustrate le strutture degli AGE maggiormente presenti nell'organismo umano.

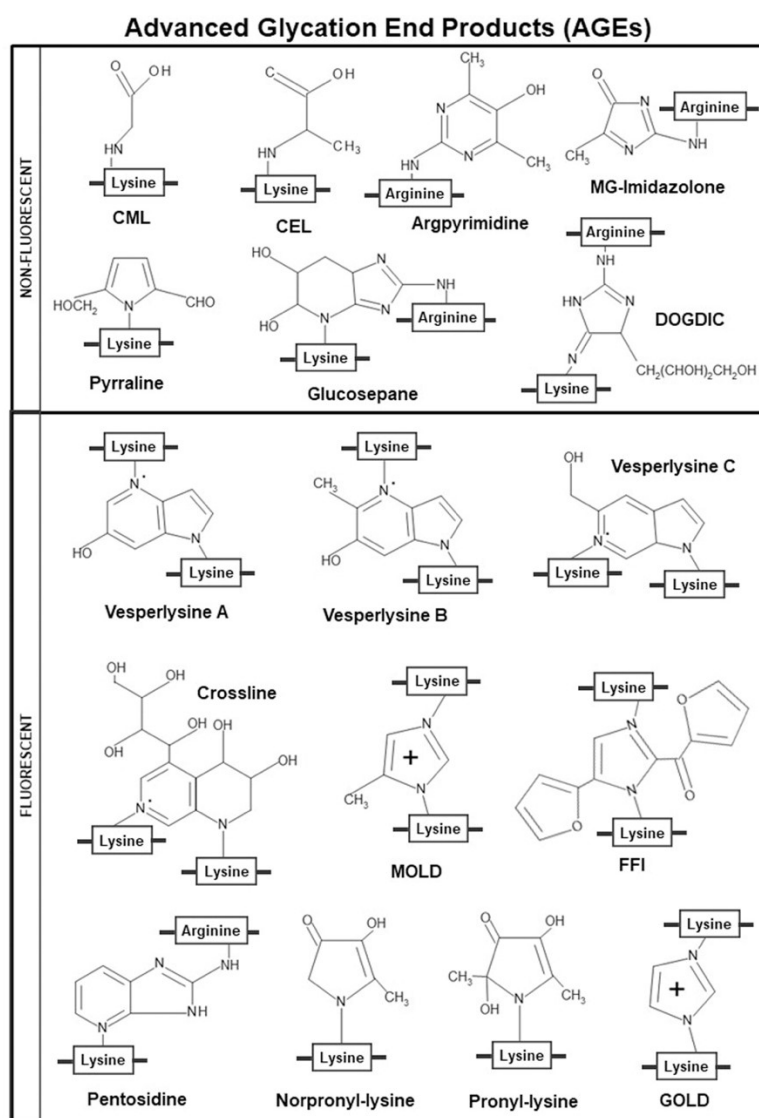


Figura 2. Rappresentazione schematica degli Advanced Glycation End Products (AGE), suddivisi in AGE non fluorescenti e fluorescenti [10].

Gli esseri umani sono esposti a due fonti principali di AGE: esogene ed endogene. I prodotti finali della glicazione avanzata possono essere suddivisi in AGE assorbiti dal cibo (esogeni e dietetici, dAGE) o generati all'interno di un organismo. Questi ultimi, chiamati AGE endogeni, si formano solitamente in tutti i tessuti e fluidi corporei in condizioni fisiologiche nelle reazioni di glicazione, costituendo un elemento importante del normale metabolismo degli zuccheri nella cellula [7]. Le proteine glicate, ad esempio, partecipano al metabolismo del glucosio e al ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA), contribuendo al normale apporto energetico. Durante il turnover proteico, alcune proteine subiscono glicazione, e l'accumulo di AGE aumenta progressivamente con l'invecchiamento.

Gli AGE esogeni, invece, derivano dall'assunzione di composti glicati tramite la dieta e rappresentano una fonte significativa di accumulo di AGE nell'organismo.

La loro presenza negli alimenti è strettamente correlata alla composizione nutrizionale e ai metodi di cottura: in generale, gli alimenti altamente trasformati e sottoposti a temperature elevate, come cibi fritti o prodotti da forno, contengono concentrazioni di AGE significativamente superiori rispetto agli stessi alimenti cotti con metodi più delicati, come la bollitura o la cottura a vapore. Inoltre, alimenti ricchi di proteine o lipidi, come carne, oli e frutta secca, sono particolarmente predisposti alla formazione di AGE durante la cottura alla griglia, alla piastra o tramite frittura.

Oltre all'alimentazione, fattori legati allo stile di vita contribuiscono in maniera significativa all'esposizione agli AGE esogeni. Il fumo, l'abuso di alcol e l'eccesso di grassi introducono nell'organismo composti tossici e sostanze pro-glicanti che possono accelerare la formazione di AGE. Anche l'esposizione ad inquinanti ambientali, radiazioni UV e altre tossine si associa a un incremento della produzione di AGE [6].

Recettori per gli AGE (RAGE)

Gli AGE non mediano i loro effetti patologici esclusivamente attraverso le loro proprietà chimico-biologiche intrinseche, ma anche tramite l'interazione con recettori specifici [11]. Si distinguono due tipi di recettori per gli AGE: il recettore per gli AGE (RAGE) e il recettore specifico per gli AGE (AGER1) [6].

RAGE è un recettore di superficie cellulare multi-ligando appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline. È codificato dal gene AGER, situato sul cromosoma 6 vicino al complesso maggiore di istocompatibilità III. Può essere suddiviso in RAGE a lunghezza intera, RAGE secretorio endogeno (esRAGE) e RAGE solubile (sRAGE) [6]. RAGE è stato rilevato in diversi organi e tessuti, con le concentrazioni più elevate riscontrate nei polmoni, nel cuore e nei muscoli scheletrici. L'attivazione di RAGE innesca una cascata infiammatoria caratterizzata dall'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B, il quale promuove l'espressione di citochine pro-infiammatorie, fattori di crescita e molecole di adesione cellulare. Parallelamente, il legame di AGE o di altri ligandi a RAGE stimola numerosi percorsi di segnalazione intracellulari, tra cui le chinasi proteiche attivate da mitogeni (MAPK), le chinasi ERK1/2, p21^{ras}, p38 e le chinasi Janus (JAK)-STAT [12]. L'interazione tra AGE e RAGE contribuisce significativamente all'aumento dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) mediante l'attivazione della NADPH-ossidasi e di vie metaboliche mitocondriali. L'accumulo di ROS nei tessuti deriva in

parte dalla conversione del glucosio in fruttosio attraverso vie dipendenti dal NADPH, determinando un incremento della formazione di AGE e instaurando un circolo vizioso di danno intracellulare. Tale stress ossidativo comporta una riduzione dell'attività di enzimi antiossidanti endogeni, quali la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi, nonché dei principali sistemi di difesa redox, come il glutathione (GSH) e l'acido ascorbico.

Lo stress ossidativo è strettamente correlato ai processi di glicazione, poiché l'esaurimento del GSH compromette l'attività della gliossalasi-1 (Glo-1), favorendo l'accumulo di glicotossine reattive quali gliossale (GO) e metilgliossale (MGO) [12].

AGER1, invece, ha il ruolo di recettore anti-glicazione legandosi agli AGE e promuove l'internalizzazione e la degradazione, riducendo l'accumulo di AGE nei tessuti [6].

AGE nella pelle

La pelle è l'organo più esteso del corpo umano e rappresenta al contempo la principale barriera tra l'organismo e l'ambiente esterno. In quanto tale, essa è soggetta non solo ai processi di invecchiamento intrinseco, ma anche a numerosi fattori di stress esterni, che determinano specifiche modificazioni strutturali e influenzano non soltanto l'aspetto giovanile della cute, ma anche le sue molteplici funzioni fisiologiche.

L'invecchiamento cutaneo endogeno comprende l'insieme dei cambiamenti associati al naturale processo di senescenza dell'organismo ed è osservabile prevalentemente nelle aree cutanee non esposte o scarsamente esposte alla radiazione ultravioletta (UV), come la superficie interna delle braccia.

L'invecchiamento cutaneo esogeno, o fotoinvecchiamento, si riferisce invece a una condizione in cui i processi di invecchiamento endogeno risultano accentuati dall'azione di fattori di stress ambientali. Tra questi, il principale è rappresentato dall'esposizione cronica alla radiazione UV, ma contribuiscono anche il fumo di tabacco, l'esposizione a sostanze chimiche e l'inquinamento ambientale.

Negli ultimi anni, il ruolo dei prodotti finali della glicazione avanzata (AGE) nei processi di invecchiamento cutaneo è stato oggetto di grande attenzione [11].

1.1.3 Molecole antiglicanti

In generale, i meccanismi biochimici di tipo anti-glicazione comprendono tutti quei processi in grado di ritardare o prevenire la glicazione in vivo, con conseguente riduzione della formazione dei prodotti finali della glicazione avanzata (AGE) [6]. Gli inibitori sintetici o chimici sono riassunti in base alle strategie per combattere gli AGE:

- Sostanze che prevengono e inibiscono la formazione di AGE tramite intrappolamento dei composti carbonilici.
- Sostanze mirate alla modulazione del recettore RAGE.
- Sostanze in grado di rompere i legami crociati degli AGE.
- Sostanze chelanti degli ioni metallici.
- Sostanze con proprietà antiossidante [6].

L'aminoguanidina, in particolare, è stata una delle prime molecole identificate in grado di limitare la formazione dei prodotti finali della glicazione avanzata. Si tratta di un'idrazina nucleofila, la cui attività anti-AGE è attribuibile principalmente alla capacità di intrappolare i prodotti iniziali della glicazione, in particolare gli intermedi carbonilici reattivi, come metilgliossale (MGO) e gliossale (GO) [11].

La carnosina (β -alanil-L-istidina) è un composto dotato di attività antiossidante, capacità di chelazione degli ioni metallici di transizione e proprietà di scavenging nei confronti dei composti 1,2-dicarbonilici reattivi; tuttavia, il suo potenziale impiego come inibitore terapeutico della formazione degli AGE risulta limitato dalla relativamente rapida degradazione idrolitica operata dall'enzima carnosinasi intracellulare [13].

I composti chimici possono avere effetti collaterali e problemi di sicurezza; pertanto, sono stati preferiti gli estratti vegetali naturali e i loro ingredienti in quanto offrono un approccio naturale e più sicuro per inibire la formazione di AGE e combattere i problemi di salute ad essi correlati [6]. Tra questi, i polifenoli inibiscono la formazione di AGE attraverso un effetto di rimozione dei radicali liberi e di chelazione degli ioni dei metalli di transizione (ad esempio, Cu^+ e Fe^{2+}) [13].

1.2 Attività antiossidante

1.2.1 Stress ossidativo e specie reattive dell'ossigeno

Lo stress ossidativo è stato definito come un'alterazione dell'equilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (radicali liberi) e i sistemi di difesa antiossidanti, condizione che può condurre a danno tissutale e cellulare [14].

La condizione di squilibrio alla base dello stress ossidativo è riportata in figura 3.

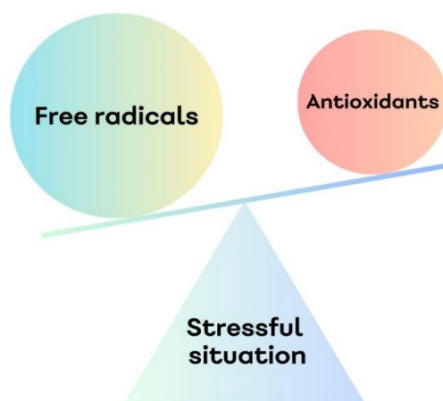


Figura 3. Equilibrio ROS / difese antiossidanti [15].

I radicali liberi possono essere definiti come qualsiasi specie chimica che contiene elettroni spaiati. Gli elettroni spaiati aumentano la reattività chimica di un atomo o di una molecola. I radicali liberi sono molecole intrinsecamente instabili a causa della presenza di uno o più elettroni spaiati. Questa caratteristica conferisce loro un'elevata reattività chimica, che può variare in funzione della specifica specie radicalica. Per raggiungere una condizione energeticamente più stabile, i radicali liberi tendono a reagire a livello locale accettando o cedendo elettroni ad altre molecole. Poiché la maggior parte delle molecole biologiche non presenta natura radicalica, tali reazioni coinvolgono prevalentemente specie non radicaliche. L'interazione tra un radicale libero e una molecola non radicalica, includendo lipidi, proteine, acidi nucleici e carboidrati, può innescare reazioni a catena, con la formazione di nuovi radicali [15].

L'ossigeno è un elemento non metallico altamente reattivo e rappresenta uno dei principali agenti ossidanti, in grado di formare facilmente ossidi con la maggior parte degli elementi e dei

composti chimici. In atmosfera, esso è presente prevalentemente nel suo stato fondamentale come tripletto biradiale stabile ($^3\text{O}_2$) e subisce un processo di riduzione graduale nei sistemi biologici. Le reazioni di ossidoriduzione costituiscono processi metabolici essenziali negli organismi viventi, in quanto permettono il trasferimento di elettroni tra diverse specie chimiche e la conseguente produzione di energia. Tuttavia, quando il trasferimento di elettroni risulta inefficiente o disaccoppiato, possono verificarsi trasferimenti di singoli elettroni che portano alla formazione di radicali liberi. I radicali liberi derivano principalmente da ossigeno, azoto e zolfo. In particolare, quelli centrati sull'ossigeno sono noti come specie reattive dell'ossigeno (ROS) e comprendono il radicale superossido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), il radicale idrossile ($\text{HO}^{\cdot}$), i radicali perossilici ($\text{ROO}^{\cdot}$), alcossilici ($\text{RO}^{\cdot}$) e l'ossido nitrico ($\text{NO}^{\cdot}$) [16].

In Figura 4 è presentata una classificazione dei più comuni radicali liberi, distinta in specie reattive dell'ossigeno e specie non radicaliche.

Free Radicals		Non Radicals	
$\text{HO}^{\cdot}$	hydroxy radical	$^1\text{O}_2$	singlet oxygen
$\text{O}_2^{\cdot-}$	superoxide anion radical	O_3	ozone
$\text{RO}^{\cdot}$	alkoxy radical	H_2O_2	hydrogen peroxide
$\text{ROO}^{\cdot}$	peroxy radical	ROOH	lipid hydroperoxide
$\cdot\text{OOH}$	hydroperoxyl radical	HOCl	hypochlorous acid
$\cdot\text{NO}_2$	nitrogen dioxide		
$\cdot\text{NO}$	nitric oxide		

Figura 4. Specie reattive dell'ossigeno, specie reattive dell'azoto e specie non radicaliche [17].

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono originare sia da fonti endogene sia da fattori esogeni. Tra le principali fonti endogene rientrano i mitocondri, il metabolismo catalizzato dal citocromo P450, i perossisomi e l'attivazione delle cellule coinvolte nella risposta infiammatoria [18].

I mitocondri, in particolare, svolgono un ruolo centrale nel metabolismo energetico cellulare, essendo responsabili della produzione di ATP mediante i processi di respirazione cellulare e

fosforilazione ossidativa. In condizioni fisiologiche, l'1-2% dell'ossigeno molecolare consumato dalle cellule dei mammiferi viene metabolizzato a specie reattive dell'ossigeno (ROS) a causa della fuoriuscita di elettroni dalla catena di trasporto mitocondriale. È stato dimostrato che la produzione o l'accumulo di ROS aumenta quando la catena respiratoria mitocondriale è compromessa da composti chimici, come gli inibitori della respirazione, o da mutazioni patologiche nei geni mitocondriali coinvolti nella biosintesi dei polipeptidi che costituiscono gli enzimi respiratori [19].

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono essere prodotte da una serie di processi esogeni. Gli agenti ambientali possono generare direttamente, o indirettamente, i ROS. È stata osservata induzione di stress e danno ossidativo dopo esposizione a diversi tipi di xenobiotici: metalli (ridotti e non ridotti), ioni, radiazioni (UV, raggi gamma, raggi X), farmaci (barbiturici), contaminanti ambientali e agenti cancerogeni, come mostrato in Figura 5 [20].

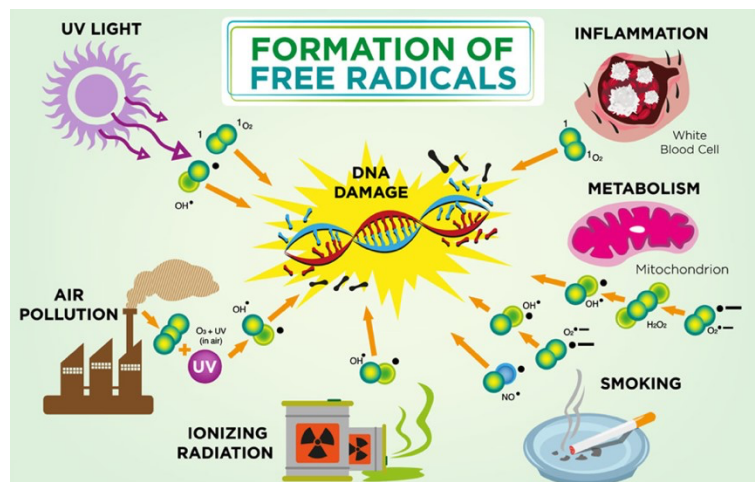


Figura 5. Meccanismi di produzione delle specie reattive [20].

Lo stress ossidativo e le conseguenze nella pelle

La pelle rappresenta il principale sistema di interfaccia tra l'organismo umano e l'ambiente circostante, esercitando una funzione essenziale di barriera e di regolazione nei confronti delle sollecitazioni e delle aggressioni di origine sia esterna sia interna.

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) presenti nella pelle, oltre ad essere generate come sottoprodotti del normale metabolismo mitocondriale, possono essere indotte anche da fattori

estrinseci quali le radiazioni UVA e UVB, la luce visibile, lo spettro infrarosso, gli inquinanti e lo stress psicologico [21].

I raggi UV rappresentano la maggior fonte di produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nella pelle. Lo spettro d'azione per la produzione di ROS è prevalentemente compreso nella regione UVA (320-400 nm), con una parziale sovrapposizione allo spettro UVB. È stato dimostrato che livelli misurabili di perossido di idrogeno (H_2O_2) e di radicale ossidrilico ($\bullet OH$) sono stati osservati entro 15 minuti dall'esposizione ai raggi UV e continuano ad aumentare fino a 60 minuti. Oltre alle radiazioni ultraviolette, anche la luce visibile, con lunghezze d'onda comprese tra 400 e 700 nm, contribuisce alla generazione di specie reattive dell'ossigeno nella pelle. In seguito all'esposizione a tale radiazione è stata infatti documentata la formazione di radicali ossidrilici ($\bullet OH$), radicali perossilici ($\bullet OOH$) e ossigeno singoletto. Allo stesso modo, le radiazioni infrarosse, comprese tra 700 e 4000 nm, sono in grado di indurre la produzione di ROS, soprattutto a livello mitocondriale [21].

1.2.2 Molecole antiossidanti

Un antiossidante è stato definito come “qualsiasi sostanza che, quando presente in basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato ossidabile, ritarda o inibisce significativamente l'ossidazione di tale substrato” [16].

Gli antiossidanti svolgono un ruolo cruciale nella protezione dei lipidi dalla perossidazione indotta dai radicali liberi, prevenendo il danno ossidativo a livello cellulare. La loro efficacia è legata alla capacità di donare elettroni ai radicali liberi, neutralizzandone la reattività. In seguito all'acquisizione dell'elettrone, il radicale libero perde la tendenza ad attaccare le strutture cellulari, interrompendo così la reazione a catena dell'ossidazione. Dopo la cessione dell'elettrone, l'antiossidante assume formalmente la natura di radicale. Tuttavia, tale forma non risulta dannosa, poiché queste molecole possiedono una struttura sufficientemente stabile da adattarsi alla variazione elettronica senza acquisire un'elevata reattività [22].

I tre principali meccanismi d'azione degli antiossidanti sono:

1. Reazioni di trasferimento di elettroni dall'AO al substrato (reazione di ossidazione dell'AO), ovvero meccanismo ET.

2. Reazioni di trasferimento di un atomo di idrogeno da AO a un substrato che, in mezzi acquosi, possono essere considerate come trasferimento di protoni accompagnato da trasferimento di elettroni (reazione di ossidazione AO), ovvero meccanismo HAT.
3. Reazioni di trasferimento di una o più coppie di elettroni con formazione del legame covalente mediante il meccanismo donatore-accettore (reazione di complessazione dell'AO con ioni metallici di valenza variabile), cioè meccanismo chelante [23].

Gli antiossidanti possono essere classificati in due principali categorie: antiossidanti non-enzimatici e antiossidanti enzimatici.

Antiossidanti non-enzimatici

Gli antiossidanti non enzimatici includono gli antiossidanti ad azione diretta, i quali rivestono un ruolo di fondamentale importanza nella difesa dell'organismo contro lo stress ossidativo [22]. Tra questi:

- Glutatione (GSH): è un tripeptide caratterizzato da un legame peptidico γ tra il gruppo amminico della cisteina (legata alla glicina tramite un normale legame peptidico) e il gruppo carbossilico della catena laterale del glutammato. Il GSH è presente sia nella forma ridotta (GSH) sia in quella ossidata (GSSG). Nello stato ridotto, il gruppo tiolico della cisteina è in grado di donare equivalenti riducenti ($H^+ + e^-$) a molecole instabili, quali le specie reattive dell'ossigeno (ROS). In seguito alla donazione dell'elettrone, il GSH diventa temporaneamente reattivo, ma reagisce rapidamente con un'altra molecola di GSH formando il disolfuro di glutatione (GSSG) [24].
- Ceruloplasmina, ferritina, transferrina e albumina: la loro funzione protettiva è principalmente legata alla capacità di sequestrare ioni metallici di transizione, come ferro e rame, limitandone la disponibilità e prevenendone il coinvolgimento in reazioni ossidative dannose.
- Metallotioneina (MT): svolge un ruolo fondamentale nella protezione cellulare nei confronti del cadmio [25].

Antiossidanti enzimatici

Gli antiossidanti enzimatici agiscono attraverso la degradazione e la rimozione dei radicali liberi. A differenza degli antiossidanti non enzimatici, gli antiossidanti enzimatici non possono

essere assunti tramite integrazione orale, ma devono essere sintetizzati endogenamente dall'organismo. Tra questi:

- Superossido dismutasi (SOD): catalizza la dismutazione del superossido in ossigeno molecolare e perossido di idrogeno. La SOD è presente in quasi tutte le cellule aerobiche e nei fluidi extracellulari, costituendo una prima linea di difesa contro lo stress ossidativo.
- Catalasi (CAT): converte il perossido di idrogeno in acqua e ossigeno, tramite l'azione dei cofattori ferro e manganese.
- Glutazione perossidasi (GPx): catalizza l'eliminazione del perossido di idrogeno e dei perossidi organici attraverso l'ossidazione del glutathione ridotto (GSH), proteggendo così le cellule dal danno ossidativo.
- Glutathione reduttasi (GSR): catalizza la riduzione del disolfuro di glutathione (GSSG) alla forma tiolica ridotta (GSH), molecola chiave nella resistenza cellulare allo stress ossidativo [24].

Gli antiossidanti possono essere anche classificati in due principali gruppi in base alla loro origine: antiossidanti naturali e antiossidanti sintetici.

Antiossidanti naturali

Numerosi antiossidanti naturali vengono forniti all'organismo umano attraverso l'alimentazione, sia di origine vegetale sia animale [22]. Le piante, incluse frutta, verdura ed erbe medicinali, costituiscono una fonte particolarmente ricca e diversificata di molecole con attività scavenger nei confronti dei radicali liberi. Tra i principali possiamo trovare:

- Vitamine: vitamina C (acido ascorbico) che neutralizza diverse specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto nei sistemi biologici, prevenendo il danno ossidativo delle biomolecole. La vitamina E (tocoferolo) protegge le membrane cellulari dalla perossidazione lipidica interrompendo la catena radicalica e formando prodotti a bassa reattività.
- Carotenoidi: β -carotene, α -carotene, licopene e luteina. Il β -carotene, in particolare, mostra proprietà antiossidanti legate alla sua struttura chimica e all'interazione con le membrane biologiche, risultando un efficace quencher dell'ossigeno singoletto [26].

- Composti fenolici: il gruppo più diffuso e diversificato è rappresentato dai flavonoidi (flavonoli, flavani, flavoni, antocianidine). Altri composti fenolici sono i derivati dell'acido benzoico o dell'acido cinnamico, presenti in frutta e verdura [22].

Antiossidanti sintetici

Gli antiossidanti sintetici sono composti chimicamente prodotti, poiché non si trovano in natura, e vengono aggiunti agli alimenti come conservanti per prevenire l'ossidazione dei lipidi. Tra questi si hanno il butilidrossitoluene (BHT), il butilidrossianisolo (BHA) e il terz-butildrochinone (TBHQ) che presentano una struttura ad anello benzenico o fenolica [22].

Una classificazione schematica degli antiossidanti è riportata in Figura 6.

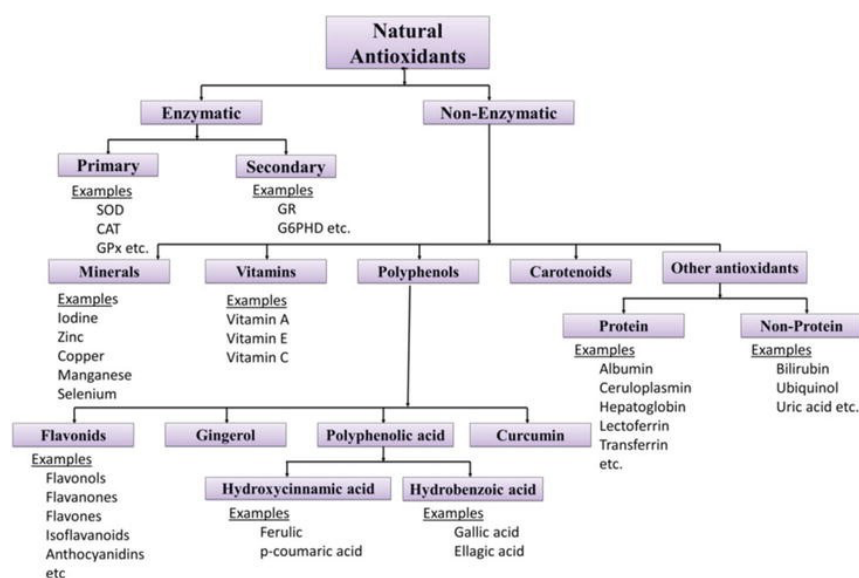


Figura 6. Classificazione e sottoclassificazione degli antiossidanti presenti in natura [27].

1.2.3 Test per la valutazione dell'attività antiossidante

Negli ultimi decenni i metodi e gli strumenti per la determinazione dell'attività antiossidante hanno subito un notevole avanzamento. I primi approcci erano principalmente orientati alla misurazione dell'efficacia degli antiossidanti nel contrastare la formazione di specifici prodotti di ossidazione, basandosi prevalentemente sulla determinazione dell'ossidazione lipidica.

Successivamente, sono stati introdotti numerosi saggi chimici finalizzati alla valutazione dell'attività antiossidante attraverso differenti meccanismi, quali la capacità di scavenging nei confronti di diverse specie radicaliche o specie reattive dell'ossigeno (ROS), il potere riducente e la capacità di chelazione dei metalli.

Attualmente sono disponibili numerosi test in grado di misurare direttamente il trasferimento di un atomo di idrogeno (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o il trasferimento di elettroni (Electron Transfer, ET) dagli antiossidanti ai radicali liberi. I valori di attività antiossidante ottenuti mediante tali metodi sono generalmente correlati alla capacità delle molecole analizzate di neutralizzare specifiche specie radicaliche, alcune delle quali possono essere artificiali e non necessariamente rilevanti dal punto di vista biologico [28].

L'attività antiossidante di un campione non può essere valutata in modo esaustivo mediante un singolo metodo analitico. Per una caratterizzazione più completa, è necessario ricorrere a più saggi in vitro, ciascuno dei quali fornisce informazioni complementari sui diversi meccanismi d'azione degli antiossidanti. Alla luce di questa eterogeneità metodologica, risulta complesso effettuare un confronto diretto e univoco tra i diversi test disponibili. Pertanto, la scelta del metodo o dei metodi più appropriati deve essere preceduta da un'accurata valutazione critica delle procedure analitiche, in funzione degli specifici obiettivi della ricerca.

In base alle reazioni chimiche che possono essere coinvolte, questi test sono suddivisi in due categorie: metodi basati su reazioni di trasferimento di atomo di idrogeno (HAT) e di trasferimento di singolo elettrone (SET) [28].

Test basati sul trasferimento di singoli elettroni (SET)

I test basati sul trasferimento di un singolo elettrone, detti anche saggi di trasferimento elettronico (Single Electron Transfer, SET o Electron Transfer, ET), valutano la capacità di un antiossidante di donare un elettrone per ridurre ioni metallici, gruppi carbonilici e radicali liberi. I test spettroscopici basati su questo meccanismo misurano la capacità dell'antiossidante di ridurre una specie ossidante che subisce una variazione cromatica in seguito alla riduzione. L'entità del cambiamento di colore risulta proporzionale alla concentrazione e alla capacità antiossidante totale del campione analizzato.

Cuprac assay

Il test CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) prevede l'impiego di un ligando specifico in grado di formare un complesso stabile con il rame, al fine di facilitare la misurazione spettrofotometrica dell'assorbanza. Nel saggio CUPRAC, il ligando maggiormente utilizzato è la neocuproina (Nc; 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina). La determinazione della capacità antiossidante dei costituenti avviene mediante l'utilizzo del complesso Cu^{2+} -neocuproina come agente ossidante cromogenico. In presenza di un agente riducente, lo ione Cu^{2+} viene ridotto a Cu^+ , formando il complesso Cu^+ -neocuproina, caratterizzato da un massimo di assorbimento a 450 nm, come mostrato in Figura 7.

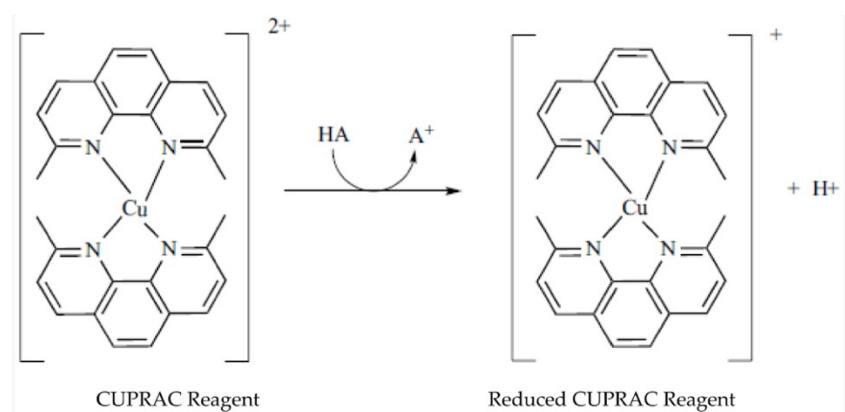


Figura 7. Schema di reazione coinvolto nel test Cupric Reducing Antioxidant Power (CUPRAC) [28].

FRAP assay

Il test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) è un metodo che misura la capacità degli antiossidanti di ridurre un complesso di ioni ferrici (Fe^{3+}) legati a un ligando alla corrispondente forma ferrosa (Fe^{2+}), caratterizzata da una colorazione blu intensa, in ambiente acido. L'attività antiossidante viene determinata come incremento dell'assorbanza a 593 nm. La Figura 8 presenta il meccanismo di reazione alla base del test FRAP.

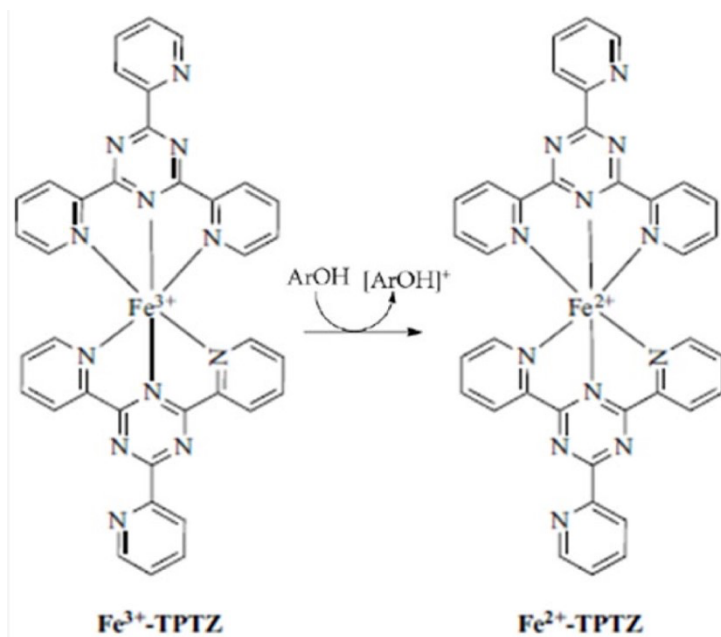


Figura 8. Schema di reazione coinvolto nel test Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) [28].

ABTS assay

Il test TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) è un metodo semplice e rapido per la determinazione della capacità antiossidante totale (Total Antioxidant Capacity, TAC). Il saggio si basa sulla capacità degli antiossidanti di neutralizzare il catione radicale stabile 2,2'azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonato) (ABTS^{•+}), un cromoforo di colore blu-verde caratterizzato da un massimo di assorbimento a 734 nm, la cui intensità diminuisce in presenza di composti antiossidanti. Il radicale ABTS^{•+} viene generalmente generato a partire da ABTS mediante l'azione di agenti ossidanti appropriati. La capacità antiossidante del campione viene valutata in funzione del grado di decolorazione del cromoforo, espresso come diminuzione dell'assorbanza a 734 nm. Tale diminuzione dipende da diversi fattori, tra cui il tempo di reazione, l'attività antiossidante intrinseca dei composti presenti e la loro concentrazione nel campione analizzato. In Figura 9 è presente lo schema di reazione di tale test.

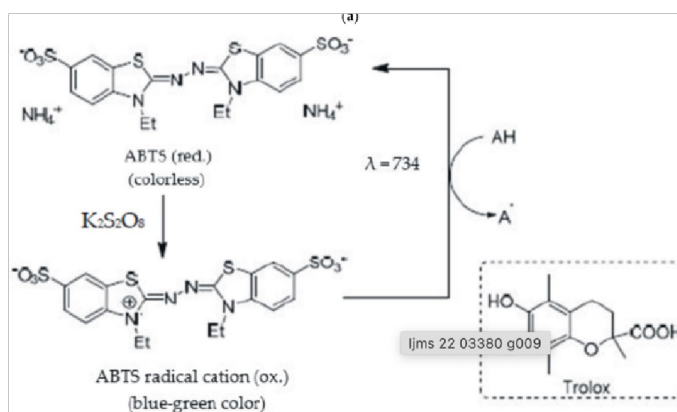


Figura 9. Meccanismo di reazione coinvolto nel test ABTS, con formazione del radicale ABTS [28].

DPPH assay

Il radicale 1,1-difenil-2-picril-idrazile (DPPH•) fu scoperto per la prima volta nel 1922. La soluzione di DPPH presenta una colorazione viola intensa, con un massimo di assorbimento a 517 nm. In presenza di una sostanza in grado di donare un atomo di idrogeno, il radicale DPPH• viene ridotto alla corrispondente forma idrazinica, 2,2-difenil-1-picril-idrazina, determinando un viraggio cromatico dal viola al giallo e una concomitante diminuzione dell'assorbanza. La riduzione dell'assorbanza è proporzionale alla quantità di DPPH ossidato residuo in soluzione. Nella Figura 10 è rappresentato lo schema di reazione alla base del DPPH assay.

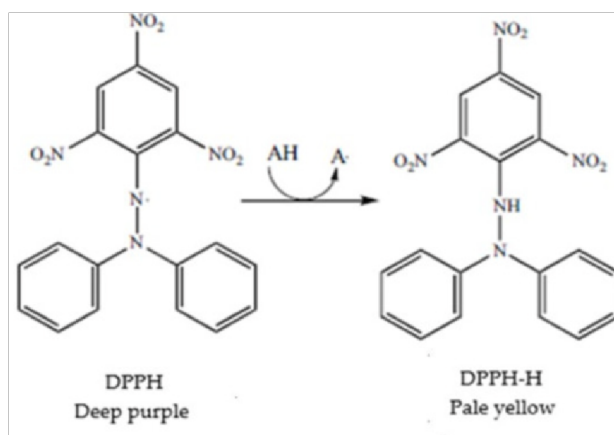


Figura 10. Meccanismo di rimozione del radicale libero DPPH mediato da un antiossidante (AH) [28].

L'attività di scavenging del radicale libero DPPH viene comunemente espressa in termini di percentuale di inibizione del radicale da parte degli antiossidanti in esame. Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di antiossidante necessaria per ottenere una riduzione del 50% dell'assorbanza del DPPH. Questo parametro è ampiamente utilizzato non solo per esprimere la capacità antiossidante, ma anche per confrontare l'attività di differenti composti tra loro.

La capacità di rimozione dei radicali liberi può essere calcolata mediante la seguente equazione:

$$\text{Percentage effect}(E\%) = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs sample})}{\text{Abst control}} \times 100 \text{ [29]}.$$

Test basati sul trasferimento dell'atomo di idrogeno (HAT)

I test basati sul trasferimento dell'atomo di idrogeno (Hydrogen Atom Transfer, HAT) valutano la capacità di un antiossidante di neutralizzare i radicali liberi mediante la donazione di un atomo di idrogeno. Tra i principali saggi basati sul meccanismo HAT rientrano l'Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC), il Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Parameter (TRAP) e la Total Oxyradical Scavenging Capacity (TOSC) [28].

ORAC assay

Il saggio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) è un metodo fluorimetrico che prevede la combinazione del campione contenente antiossidanti (AH⁺) con un composto fluorescente, la ficoeritrina proteica (β-PE), e con un generatore di radicali liberi, il 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dicloridrato (AAPH). Il principio del metodo si basa sulla perdita di fluorescenza del composto fluorescente in seguito alla sua ossidazione da parte dei radicali liberi generati. Il segnale di fluorescenza viene monitorato per 1 ora, utilizzando una lunghezza d'onda di emissione (565 nm) e una di eccitazione (540 nm).

TRAP assay

Il saggio TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) è un metodo analitico basato sulla chemiluminescenza utilizzato per la valutazione della capacità antiossidante totale di un campione. Il principio del metodo si fonda sulla generazione di radicali liberi a partire da un iniziatore azoico termolabile, come il 2,2'-azobis(2-amidinopropano) cloridrato (ABAP), che in presenza di ossigeno molecolare porta alla formazione di radicali perossilici. Questi radicali reagiscono con composti ossidabili dotati di proprietà chemiluminescenti, quali il luminolo,

producendo un segnale misurabile nel tempo. La presenza di sostanze antiossidanti nel campione in esame interferisce con questo processo, riducendo l'intensità della chemiluminescenza grazie alla loro capacità di intrappolare i radicali perossilici, consentendo così di stimare quantitativamente l'attività antiossidante totale [30].

1.3 Valorizzazione degli scarti e residui agroindustriali

La rapida crescita della popolazione mondiale e i cambiamenti negli stili di vita hanno portato a un aumento significativo degli sprechi alimentari provenienti da diverse fonti industriali, agricole e domestiche. Gli scarti alimentari contengono una ricca materia organica che, se non gestita correttamente, può rappresentare una seria minaccia per l'ambiente e la salute umana, rendendo il corretto smaltimento degli scarti alimentari una questione globale urgente. Tuttavia, vari tipi di scarti alimentari, come gli scarti di frutta, verdura, cereali e altri prodotti alimentari, contengono importanti composti bioattivi, come polifenoli, fibre alimentari, proteine, lipidi, vitamine, acidi organici e minerali, alcuni dei quali si trovano in quantità maggiori nelle parti scartate rispetto a quelle accettate dal mercato. La valorizzazione degli scarti alimentari attraverso la produzione di prodotti a valore aggiunto basati sui loro composti bioattivi è una soluzione pionieristica per ridurre gli sprechi e generare nuove possibilità economiche. Questi composti bioattivi, come polifenoli, vitamine, minerali, apportano numerosi benefici per la salute e aumentano il valore dei prodotti. Sfruttando il potenziale degli scarti alimentari nell'estrazione di questi composti, è possibile creare ingredienti alimentari, prodotti cosmetici e integratori alimentari funzionali e di alta qualità [31].

Il settore agroindustriale produce grandi quantità di rifiuti alimentari, spesso smaltiti in modo dannoso per l'ambiente, ma ricchi di composti bioattivi utili. Questi residui contengono sostanze con proprietà antiossidanti e antibatteriche, sfruttabili in diversi settori industriali. In ambito cosmetico, tali composti possono contribuire a contrastare l'invecchiamento cutaneo, causato anche dall'accumulo di specie reattive dell'ossigeno. Inoltre, gli antiossidanti migliorano la stabilità delle formulazioni cosmetiche, riducendo l'ossidazione di oli e grassi. L'impiego dei residui agroindustriali nei cosmetici rappresenta quindi una strategia sostenibile e funzionale, in linea con gli obiettivi di sviluppo sostenibile [32].

L'evoluzione del dibattito sulla sostenibilità nell'industria cosmetica ha portato alla diffusione di una terminologia spesso ambigua, in cui espressioni di matrice prevalentemente commerciale quali “verde”, “naturale” e “biologico” vengono frequentemente utilizzate come sinonimi di “sostenibile”. In realtà, tali termini fanno riferimento soprattutto all'origine degli ingredienti e alle pratiche agricole adottate nella loro produzione, piuttosto che a una valutazione complessiva degli impatti ambientali e sociali del prodotto finito.

Il concetto di sostenibilità, in senso più rigoroso, implica un approccio sistemico e multidimensionale, che tenga conto degli impatti ambientali lungo l'intero ciclo di vita del prodotto, come visibile in Figura 11. Ciò include l'approvvigionamento etico delle materie prime, l'efficienza energetica dei processi produttivi, le modalità di distribuzione, i modelli di utilizzo da parte dei consumatori e, infine, la gestione del fine vita e dei rifiuti. Sebbene non esista una definizione universalmente condivisa di “cosmetici sostenibili”, tali prodotti sono generalmente associati a caratteristiche ecocompatibili e a un impegno concreto nei confronti delle responsabilità etiche, sociali ed economiche [33].

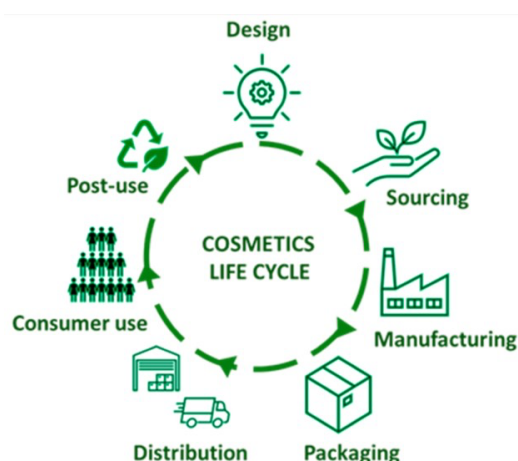


Figura 11. Ciclo di vita dei prodotti cosmetici [33].

La sostenibilità di un prodotto cosmetico è il risultato delle decisioni assunte lungo l'intero ciclo di vita, con una particolare rilevanza attribuibile alla fase di progettazione. Le scelte effettuate nelle fasi iniziali influenzano in modo determinante tutte le fasi successive, incidendo in maniera significativa sul profilo complessivo di sostenibilità del prodotto. Studi di letteratura evidenziano che la progettazione del prodotto e la selezione delle materie prime contribuiscono congiuntamente a circa il 32% dell'impatto totale sulla sostenibilità. Le fasi di produzione, confezionamento e post-utilizzo incidono ciascuna per circa il 14%, mentre la distribuzione e

l'uso da parte del consumatore rappresentano rispettivamente il 13% dell'impatto complessivo [33].

Lo smaltimento convenzionale dei rifiuti dell'industria cosmetica avviene generalmente tramite incenerimento o attraverso processi di riprocessamento quali coagulazione/flocculazione e flottazione a pressione. Tuttavia, tali approcci comportano significativi costi ambientali, energetici ed economici. Di conseguenza, risulta necessaria l'introduzione di tecnologie innovative e sostenibili per il trattamento dei rifiuti. Una soluzione promettente è rappresentata dalla digestione anaerobica finalizzata alla produzione di energia, nella quale i pretrattamenti hanno lo scopo di incrementare la resa in biogas. Questo approccio rappresenta un esempio virtuoso di gestione integrata del processo produttivo e dei rifiuti post-produzione, con benefici ambientali rilevanti [34].

1.3.1 Sottoprodotti della lavorazione del pomodoro

Due tra i più importanti processi alimentari che generano prodotti di valore esportati in tutto il mondo sono quelli impiegati dall'industria di trasformazione del pomodoro e dalla produzione di olio d'oliva, localizzati principalmente nelle aree del Mediterraneo.

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) appartiene alla famiglia delle Solanacee ed è botanicamente classificato come un frutto. I frutti del pomodoro presentano un'ampia variabilità in termini di colore (rosso, giallo, verde), forma (da ovale a sferica) e dimensione (1,5-7,5 cm) [35].

La luce e la temperatura rappresentano i principali fattori ambientali che influenzano il valore nutrizionale del pomodoro, mentre gli effetti diretti di CO₂ e umidità risultano meno conclusivi. In pieno campo, le variazioni stagionali e geografiche riflettono l'interazione di più fattori ambientali, rendendo complessa l'interpretazione dei singoli effetti. Un'elevata intensità luminosa, inclusa la radiazione UV, può favorire l'accumulo di carotenoidi, antocianine, fenoli e vitamina C, anche se la risposta dipende dal genotipo. La luce influenza la biosintesi dei fitonutrienti attraverso la fotosintesi e l'attivazione di specifici fotorecettori, in particolare per antocianine e flavonoidi. Anche la durata e la qualità spettrale della luce sono determinanti: la luce rossa stimola i carotenoidi, mentre la luce rosso-lontano ne inibisce la sintesi; la luce blu

e l'infrarossa possono aumentare licopene e vitamina C. Tuttavia, un'eccessiva esposizione alla radiazione solare o UV-B può causare stress fotoossidativo e ridurre il contenuto di carotenoidi e acido ascorbico. Infine, pratiche agronomiche che modificano l'intercettazione luminosa del frutto influenzano significativamente il suo contenuto fitochimico [36].

La temperatura influisce direttamente sul metabolismo della pianta e sul valore nutrizionale del frutto di pomodoro. Temperature più basse riducono la respirazione, aumentando la disponibilità di zuccheri necessari alla biosintesi di composti come acido ascorbico e flavonoidi; di conseguenza, il contenuto di vitamina C tende a diminuire all'aumentare della temperatura. La regolazione dei carotenoidi è invece specie- e genotipo-specifica: nel pomodoro, la sintesi del licopene è massima tra 12 e 21 °C, con un intervallo ottimale generalmente compreso tra 20 e 24 °C. Temperature inferiori a 10 °C o superiori a 30 °C inibiscono la biosintesi del licopene, mentre il β -carotene risulta meno sensibile alle alte temperature. Temperature elevate e forte irraggiamento possono causare stress ossidativo, riducendo carotenoidi e vitamina C. Infine, nelle colture in serra, specifici regimi termici giorno/notte o impulsi di bassa temperatura possono alterare il contenuto di licopene e l'attività antiossidante del frutto [36].

Lo stress ossidativo rappresenta uno dei principali processi fisiologici in grado di ridurre la qualità nutrizionale e l'attività antiossidante dei prodotti vegetali. Inquinanti atmosferici quali ozono, polveri, anidride solforosa, ossidi di azoto e ammoniaca possono diminuire il contenuto di acido ascorbico, carotenoidi e vitamine del gruppo B nei frutti, principalmente attraverso danni ossidativi a DNA, proteine, enzimi e membrane cellulari. In particolare, l'ozono può alterare il metabolismo dei composti fenolici e dei flavonoidi modulando l'attività della fenilalanina ammoniliasi (PAL) e l'intera via dei fenilpropanoidi [36].

I sottoprodotti della lavorazione industriale del pomodoro, costituiti prevalentemente da bucce e semi con una piccola frazione di polpa, rappresentano una matrice di notevole interesse dal punto di vista compositivo e applicativo. Essi sono infatti caratterizzati dalla presenza di numerosi composti ad elevato valore nutrizionale e funzionale, tra cui licopene, fibre alimentari, proteine e frazioni lipidiche. In particolare le bucce risultano particolarmente ricche in fibre, carotenoidi, soprattutto licopene, e composti fenolici mentre i semi si distinguono per

l'elevato contenuto in olio e proteine. Questa marcata differenza compositiva tra le diverse frazioni del prodotto ne determina differenti potenzialità di valorizzazione. Inoltre la presenza di tali composti bioattivi rende questi sottoprodotti una risorsa promettente per il recupero di ingredienti funzionali [37].

1.3.1.1 Licopene

Il licopene (ψ,ψ -carotene), un membro della famiglia dei carotenoidi, è un antiossidante liposolubile sintetizzato da molte piante e microrganismi, ma non da animali ed esseri umani. È un idrocarburo a catena lineare aperta altamente insaturo, costituito da 11 doppi legami coniugati e 2 non coniugati [38].

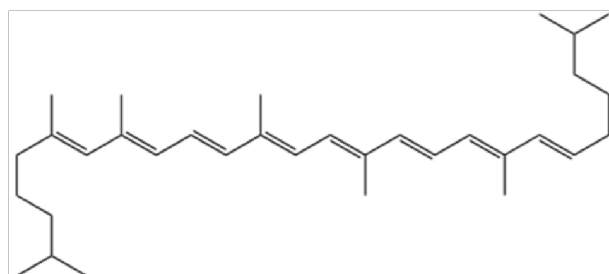


Figura 12. Struttura chimica del licopene [38].

La disposizione dei doppi legami gli conferisce un elevato grado di coniugazione, rendendo il licopene uno degli antiossidanti più potenti conosciuti. Infatti, la sua capacità antiossidante è circa il doppio di quella del β -carotene e dieci volte maggiore di quella del tocoferolo. Oltre all'attività antiossidante, ha attività antinfiammatoria, ipoglicemizzante, fotoprotettiva, antiangiogenesi antiparassitaria, antivirale e altre. Diversi studi hanno anche indicato l'effetto del licopene alimentare nel ridurre il rischio di malattie croniche come la malattia coronarica, essendo utile anche nel ridurre lo stress ossidativo nei pazienti affetti dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Inoltre, il licopene migliora le malattie della pelle e delle ossa e i disturbi epatici, neurali e riproduttivi [38].

Il pomodoro rappresenta una riserva significativa di componenti ad alto valore aggiunto, tra cui licopene, fibre alimentari, proteine e olio. I differenti costituenti presenti nei segmenti di buccia e di seme evidenziano una marcata eterogeneità nei profili nutrizionali.

La buccia del pomodoro è particolarmente ricca di fibre alimentari, licopene e fenoli, mentre il seme è composto principalmente da olio e proteine. In particolare, le bucce di pomodoro presentano un notevole contenuto di potassio, in media circa 1,1 g per 100 g, con livelli di sodio relativamente inferiori, pari a 70 mg per 100 g. Questa caratteristica contribuisce a un basso rapporto Na/K, rendendo la buccia di pomodoro un agente potenzialmente benefico nella lotta alle malattie cardiovascolari [39].

Le bucce di pomodoro sono la riserva più ricca di licopene, comprendendo l'80-90% dei carotenoidi totali, come riportato da Nour et al. A titolo di confronto, il contenuto di licopene in 100 g di pomodoro fresco è di 4,96-6,67 mg, e nella sansa di 0,48-8,03 mg/100 g (peso umido) [40].

Oggi la domanda di cosmetici a base di licopene è in rapido aumento. Per aumentarne l'estrazione da fonti naturali, in particolare dagli scarti solidi della lavorazione industriale del pomodoro, vengono impiegati diversi approcci. Grazie alla sua natura non polare, il licopene può essere estratto utilizzando solventi organici appropriati. Oltre alla scelta del solvente, è fondamentale ottimizzare parametri come il rapporto solvente/matrice, la temperatura e il tempo di estrazione, al fine di massimizzare il recupero dei composti target. Le tecniche più comuni basate su solventi per l'estrazione del licopene includono l'estrazione mediante apparato Soxhlet e l'agitazione meccanica. Il metodo Soxhlet consente una maggiore resa, ma i lunghi tempi e le alte temperature impiegati possono comportare la degradazione dei composti termolabili. Un'alternativa è la progettazione di miscele di solventi, che consente di formulare sistemi ottimizzati per il recupero del licopene. Ad esempio, un sistema ternario costituito da n-esano, etanolo e acetone ha dimostrato di garantire una resa superiore al 95%, ottenendo un'oleoresina di pomodoro con un elevato contenuto di licopene. Successivamente, al fine di ridurre l'impiego di solventi organici e in un'ottica di chimica verde, sono stati sviluppati e applicati processi di estrazione più eco-compatibili, operanti in condizioni blande, quali l'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE), l'estrazione con fluidi supercritici (SFE) e l'estrazione assistita da enzimi (EAE) [41].

Attività antiossidante del licopene

Lo stress ossidativo è una condizione caratterizzata da uno squilibrio tra la produzione e l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS) nelle cellule e nei tessuti e la capacità dei sistemi biologici di neutralizzare e detossificare tali specie reattive [42].

Grazie alla sua struttura polienica e alla presenza di numerosi doppi legami coniugati, il licopene risulta altamente reattivo nei confronti dell'ossigeno e dei radicali liberi ed è considerato l'antiossidante più efficace nel neutralizzare l'ossigeno singoletto tra i circa 600 carotenoidi presenti in natura. Ogni singola molecola di licopene è in grado di inattivare circa 1000 molecole di O₂ [43]. Il licopene esercita la sua attività antiossidante nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) attraverso tre meccanismi principali. In primo luogo, può formare addotti con i radicali liberi attraverso l'addizione di radicali, stabilizzandoli e riducendone l'effetto dannoso. In secondo luogo, il licopene è in grado di neutralizzare i radicali liberi attraverso il trasferimento di elettroni, convertendoli in forme meno reattive. Infine, agisce come donatore di idrogeno attraverso l'estrazione di idrogeno allilico, contribuendo alla neutralizzazione dei radicali liberi e alla prevenzione del danno ossidativo [44].

Numerosi studi hanno dimostrato l'attività antiossidante del licopene mediante diversi saggi in vitro. Pataro et al. hanno valutato tale capacità utilizzando il metodo FRAP impiegando licopene estratto da bucce di pomodoro mediante lattato di etile e acetone [45].

Amorim et al., attraverso il test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), hanno dimostrato che la guava rossa presenta un contenuto di antiossidanti superiore rispetto al pomodoro. Inoltre, gli estratti vegetali di entrambe le matrici hanno mostrato un'attività antiossidante maggiore rispetto al licopene puro, probabilmente a causa della presenza di altri composti bioattivi con potenziale antiossidante [46].

Stinco et al., sulla base dei valori TEAC, hanno dimostrato che il licopene possiede una marcata capacità di scavenging del radicale ABTS^{•+} (acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6solfonico)) [47]. Analogamente, Alvi et al. hanno evidenziato mediante il test DPPH (2,2-difenil-1-picril-idrazile) un'elevata attività di neutralizzazione dei radicali liberi da parte di questo carotenoide, con un valore di IC₅₀ pari a 4,57 ± 0,23 µg/mL, inferiore a quello della vitamina C (IC₅₀ = 9,82 ± 0,42 µg/mL) [48].

1.3.1.2 Polifenoli

I polifenoli sono composti naturali sintetizzati esclusivamente dalle piante, caratterizzati dalla presenza di uno o più gruppi fenolici e da una struttura chimica analoga a quella delle sostanze fenoliche. Numerosi studi hanno evidenziato la loro bioattività, in particolare la capacità di modulare lo stress ossidativo e i processi infiammatori, di influenzare la digestione e l'assorbimento dei macronutrienti e di esercitare effetti di tipo prebiotico sul microbiota intestinale. I polifenoli sono onnipresenti nelle piante, dove svolgono funzioni strutturali, difesa

contro le radiazioni ultraviolette e invasioni microbiche [49]. Sono presenti anche in alimenti, quali frutta, verdura, legumi e cereali, e bevande, come birra, tè, vino rosso e caffè. In generale, i metaboliti dei polifenoli vengono eliminati rapidamente dal plasma, suggerendo che un consumo quotidiano di alimenti di origine vegetale sia necessario per mantenere concentrazioni plasmatiche adeguate di tali metaboliti [50].

I polifenoli costituiscono un noto gruppo di sistemi fenolici caratterizzati dalla presenza di almeno due anelli fenilici e di uno o più gruppi idrossilici sostituenti. Questa definizione comprende un gran numero di composti eterogenei in termini di complessità strutturale. Pertanto, i polifenoli possono essere semplicemente classificati in flavonoidi e non flavonoidi, oppure suddivisi in numerose sottoclassi a seconda del numero di unità fenoliche presenti nella struttura molecolare, dei gruppi sostituenti e/o del tipo di legame tra le unità fenoliche. I flavonoidi rappresentano la classe più ampia e diversificata, mentre i non flavonoidi comprendono composti come acidi fenolici, stilbeni e lignani. Gli acidi fenolici, in particolare, derivano dall'acido benzoico o dall'acido cinnamico [51].

Flavonoidi

I flavonoidi sono un gruppo di composti naturali caratterizzati da strutture fenoliche variabili e sono ampiamente distribuiti nel regno vegetale.

Dal punto di vista chimico, i flavonoidi presentano uno scheletro di quindici atomi di carbonio costituito da due anelli benzenici collegati tramite un anello piranico eterociclico, come mostrato in Figura 13 [52].

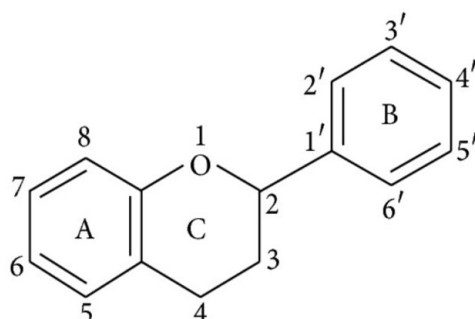


Figura 13. Struttura chimica base dei flavonoidi [52].

La diversità strutturale dei flavonoidi deriva da differenze nel grado di idrossilazione e nello stato di ossidazione dell'anello piranico centrale, che danno origine a diverse classi di composti, tra cui flavanoni, flavanoli, flavonoli, isoflavoni, flavoni e antocianidine (Figura 14) [52].

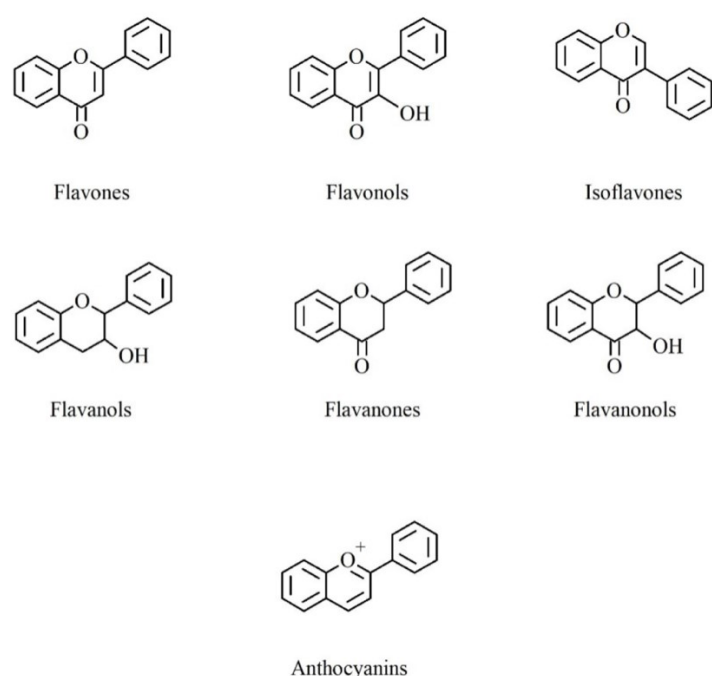


Figura 14. Struttura chimica di base delle principali sottoclassi di flavonoidi [49].

I flavonoidi sono presenti in quasi tutte le parti delle piante, in particolare nelle cellule vegetali fotosintetiche. Essi svolgono un ruolo rilevante come pigmenti naturali nelle piante da fiore e costituiscono una componente fondamentale della dieta umana e animale. Tra i flavonoidi presenti negli alimenti, i flavonoli risultano essere i più abbondanti e contribuiscono in modo significativo alle caratteristiche sensoriali degli alimenti, quali colore e sapore, oltre a svolgere un ruolo nella prevenzione dell'ossidazione lipidica e nella protezione di vitamine ed enzimi [52].

Acidi fenolici

Gli acidi fenolici comprendono una vasta classe di polifenoli caratterizzati dalla presenza di più gruppi ossidrilici su anelli aromatici. Tra questi, gli acidi fenolici si distinguono principalmente in base a due strutture di riferimento: acidi derivati dall'acido benzoico e quelli derivati dall'acido cinnamico. Tra i principali derivati dell'acido benzoico si annoverano l'acido *p*-

idrossibenzoico, il protocatecuico, il salicilico, il gallico e l'ellagico, mentre i derivati dell'acido cinnamico includono l'acido *p*-cumarico, il caffeico e il ferulico, come mostrato in Figura 15 [53].

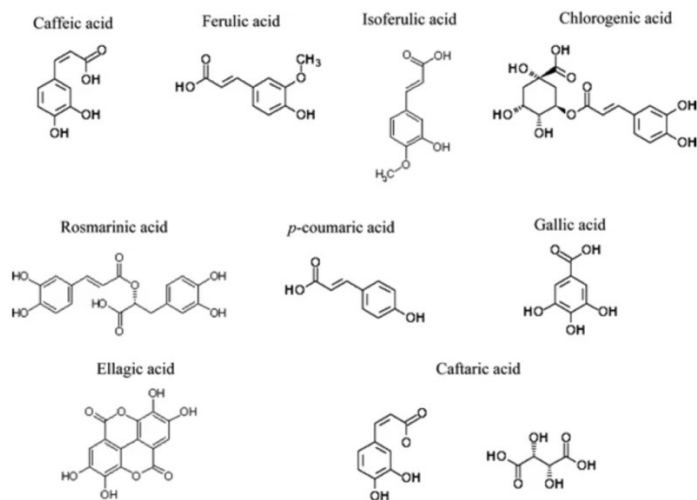


Figura 15. Strutture chimiche dei principali acidi fenolici [54].

Gli acidi fenolici rivestono un ruolo significativo nella dieta umana e sono associati a molteplici effetti benefici sulla salute, tra cui attività antiossidante, antinfiammatoria, immunomodulante, antiallergica, antiaterogena, antimicrobica, cardioprotettiva, antitumorale e antidiabetica [53].

Presenza dei polifenoli nel pomodoro

I polifenoli sono presenti nel pomodoro in concentrazioni relativamente inferiori. Tuttavia, rappresentano una classe di potenti antiossidanti. In base alla loro struttura chimica, possono essere suddivisi in diversi gruppi. I principali polifenoli del pomodoro comprendono acidi idrossicinnamici, flavanoni, flavonoli e antociani. Inoltre, nei frutti di pomodoro sono presenti glicosidi flavonolici, quali la rutina e il kaempferol-3-rutinoside [55].

La quercetina è il principale flavonolo e uno dei flavonoidi più importanti del pomodoro. Il suo contenuto varia da 0,7 a 4,4 mg/100 g in diversi tipi di pomodoro. L'acido clorogenico è il principale polifenolo della famiglia degli acidi idrossicinnamici. La sua concentrazione varia tra 1,4 e 3,3 mg/100 g. Altri flavonoidi come il kaempferolo e la miricetina si trovano in piccole quantità o tracce nel pomodoro coltivato, sebbene siano presenti in specie selvatiche correlate [56].

L'accumulo dei flavonoidi nel pomodoro è fortemente tessuto-specifico e regolato durante specifiche fasi di sviluppo del frutto. In particolare, la naringenina calcone si accumula quasi esclusivamente nella buccia in concomitanza con l'accumulo dei carotenoidi e la degradazione delle clorofille, raggiungendo un picco nei frutti sovramaturi. La via biosintetica dei flavonoidi non è attiva nella polpa, a causa della mancata espressione dei geni coinvolti. Analogamente, l'accumulo dei flavonoli, principalmente quercetina e glicosidi del kaempferolo, è per circa il 98% limitato alla buccia [55].

Nel complesso, i risultati relativi alla ritenzione dei polifenoli nei prodotti trasformati a base di pomodoro risultano variabili [55]. Muir et al. hanno riportato che circa il 65% dei flavonoli presenti in pomodori ad alto contenuto di questi composti viene mantenuto nel concentrato di pomodoro [57]. Stewart et al., invece, hanno dimostrato che flavonoli come la quercetina possono resistere ai comuni processi di lavorazione ed essere ritrovati in prodotti derivati quali succo e passata di pomodoro, spesso particolarmente ricchi di tali composti [58].

Attività antiossidante dei polifenoli

I polifenoli sono considerati tra i composti fitochimici riconosciuti come composti bioattivi e funzionali. È stato dimostrato che i polifenoli alimentari svolgono un ruolo importante nella salute umana. Un elevato consumo di frutta, verdura e cereali integrali, ricchi di polifenoli, è stato collegato a una riduzione del rischio di molte malattie croniche, tra cui cancro, malattie cardiovascolari, infiammazione cronica e molte malattie degenerative. Studi recenti hanno rivelato che molte di queste malattie sono correlate allo stress ossidativo causato da specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto. In questo contesto i polifenoli sono potenti antiossidanti in grado di neutralizzare i radicali liberi mediante la donazione di elettroni o di atomi di idrogeno [59].

La loro efficacia antiossidante è strettamente correlata alla struttura chimica, in particolare alla presenza di sistemi altamente coniugati e a specifici pattern di idrossilazione, come il gruppo 3-idrossi nei flavonoidi. I polifenoli esercitano la loro azione antiossidante principalmente attraverso la soppressione della formazione di radicali liberi, la disattivazione delle specie reattive e l'inibizione dei loro precursori. In molti casi, agiscono come scavenger diretti dei

radicali nelle reazioni a catena della perossidazione lipidica, interrompendo tali reazioni (chainbreaking activity). In questo processo, i polifenoli donano un elettrone al radicale libero, neutralizzandolo e trasformandosi a loro volta in radicali relativamente stabili e meno reattivi, con conseguente arresto della reazione a catena [59].

Oltre alla neutralizzazione diretta dei radicali, i polifenoli sono noti per la loro capacità chelante dei metalli di transizione, come Fe^{2+} . La chelazione di tali ioni può ridurre la formazione di radicali idrossilici altamente reattivi e limitando il danno ossidativo. Inoltre, i polifenoli possono agire in sinergia con altri antiossidanti, funzionando come co-antiossidanti e contribuendo alla rigenerazione di vitamine essenziali [59].

Oltre ai meccanismi antiossidanti diretti e indiretti precedentemente descritti, sono stati proposti ulteriori meccanismi di azione dei polifenoli, tra cui l'inibizione della xantina ossidasi e la stimolazione dei sistemi antiossidanti endogeni. In particolare, i polifenoli sono in grado di indurre l'espressione e l'attività di enzimi antiossidanti quali glutazione perossidasi, catalasi e superossido dismutasi, responsabili rispettivamente della decomposizione degli idroperossidi, del perossido di idrogeno e degli anioni superossido. Contestualmente, essi possono ridurre l'espressione di enzimi pro-ossidanti, come la xantina ossidasi, contribuendo in modo significativo al mantenimento dell'equilibrio redox cellulare [59].

1.3.1.3 Farina di pomodoro

Tra le principali strategie di valorizzazione dei sottoprodotti della filiera del pomodoro la produzione di farina di pomodoro rappresenta un approccio tecnologico semplice ed efficace. Essa si ottiene a partire da pomodori freschi o da residui di lavorazione costituiti da una miscela di bucce e semi mediante processi di essiccazione e macinazione, finalizzati alla riduzione del contenuto di umidità e alla stabilizzazione del prodotto [60].

Il processo produttivo prevede generalmente una fase preliminare di selezione, lavaggio e taglio del materiale vegetale seguita da trattamenti di essiccazione effettuati mediante aria calda, essiccazione solare o sistemi industriali controllati. Ad esempio Tommonaro et al [60] descrivono un processo in due fasi che include una deumidificazione mediante aria trattata a temperature comprese tra 45 e 60°C, seguita da una fase di polverizzazione tramite mulino a martelli ottenendo così una polvere fine di pomodoro. Analogamente Owureku-Asare et al [61]

riportano l'impiego di essiccazione solare per circa tre giorni fino al raggiungimento di un contenuto di umidità pari al 13-14%, seguita da macinazione meccanica.

Le condizioni operative influenzano significativamente la qualità finale del prodotto. In particolare temperature di essiccazione intorno a 60°C risultano ottimali in termini di caratteristiche fisiche e sensoriali del prodotto [62]. Tuttavia i trattamenti termici e i processi di disidratazione possono determinare perdite di composti termolabili, come la vitamina C, il cui contenuto nella polvere è stato riportato pari a circa 125 mg/100 g con una riduzione rispetto al prodotto fresco. La perdita di vitamina C è strettamente correlata alla riduzione del contenuto d'acqua e risulta fortemente influenzata dalle condizioni di processo, in particolare dalla temperatura e dalla tipologia di prodotto [62].

Dal punto di vista compositivo la farina di pomodoro rappresenta una fonte concentrata di composti bioattivi. Il contenuto di licopene, in particolare, può variare significativamente in funzione delle condizioni di processo adottate. In condizioni standard sono stati riportati valori pari a 1,41 mg/100 g con una ritenzione del 52% rispetto al prodotto fresco [62] mentre altri studi evidenziano concentrazioni fino a 66,6 mg/100 g in campioni essiccati ad alte temperature, con incrementi fino a 10-19 volte rispetto al pomodoro fresco [63].

Anche i composti fenolici risultano ben rappresentati. Ad esempio nei residui essiccati di lavorazione sono riportati valori medi di fenoli pari a 1229,5 mg GAE/kg [40] mentre farine di semi di pomodoro mostrano contenuti di circa 2,00 mg GAE/g, associati ad una significativa attività scavenger dei radicali liberi [64]. Tra i principali composti identificati figurano flavonoidi quali quercetina, kaempferolo e naringenina, oltre ad acidi fenolici e altri metaboliti bioattivi.

Per quanto riguarda i carotenoidi studi su farine ottenute da sottoprodotti e scarti di campo hanno evidenziato contenuti elevati di licopene (fino a 1126 ± 141 mg/100 g) e β -carotene (fino a 612 ± 9 mg/100 g) confermando il potenziale di questi materiali come fonti concentrate di antiossidanti naturali [65].

La composizione minerale della farina di pomodoro risulta anch'essa significativa: sono stati riportati valori pari a 2805,8 mg/100 g di potassio, 173 mg/100 g di fosforo e 126 mg/100 g di magnesio, oltre a ferro, zinco e altri micronutrienti [62].

Nel complesso la produzione di farina di pomodoro consente non solo la stabilizzazione e conservazione del prodotto ma anche la concentrazione di composti bioattivi con elevata

attività antiossidante. Ciò rende questo ingrediente particolarmente interessante per applicazioni nutraceutiche e cosmetiche, oltre a rappresentare una soluzione sostenibile per la valorizzazione dei sottoprodotti agroindustriali in un'ottica di economia circolare.

2 Scopo della tesi

La presente tesi si inserisce nel contesto della crescente attenzione verso l'impiego di composti bioattivi di origine naturale per applicazioni in ambito cosmetico con particolare riferimento alla prevenzione dei processi alla base dell'invecchiamento cutaneo. In questo scenario lo stress ossidativo e la glicazione rappresentano due dei principali meccanismi fisiopatologici coinvolti nel deterioramento delle strutture cellulari e tissutali, contribuendo alla perdita di elasticità, alla formazione di rughe e all'alterazione delle funzioni biologiche della pelle.

In particolare la glicazione non enzimatica delle proteine porta alla formazione dei prodotti finali della glicazione avanzata (AGE), composti altamente reattivi in grado di accumularsi nei tessuti e di promuovere stress ossidativo, infiammazione e danno cellulare. Parallelamente un'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) determina uno squilibrio del sistema redox, aggravando ulteriormente i processi di invecchiamento e contribuendo alla comparsa di patologie cronico-degenerative. Alla luce di tali evidenze l'identificazione di molecole in grado di contrastare lo stress ossidativo e la formazione di AGE rappresenta un obiettivo di grande interesse scientifico e applicativo.

In questo contesto i composti fitochimici presenti nelle matrici vegetali, quali polifenoli e carotenoidi, hanno dimostrato di possedere rilevanti proprietà antiossidanti e antiglicanti. Tra questi, il pomodoro e i suoi derivati costituiscono una fonte particolarmente ricca di molecole bioattive, tra cui il licopene, flavonoidi e acidi fenolici, noti per la loro capacità di neutralizzare i radicali liberi e modulare i processi ossidativi e infiammatori.

Negli ultimi anni si è sviluppato un crescente interesse verso la valorizzazione dei sottoprodotti agroindustriali in un'ottica di sostenibilità ed economia circolare. I residui derivanti dalla lavorazione del pomodoro, quali bucce e semi, rappresentano infatti una fonte concentrata di composti ad alto valore aggiunto, spesso presenti in quantità superiori rispetto al prodotto fresco. Il recupero e l'impiego di tali materiali non solo contribuiscono alla riduzione degli sprechi ma offrono anche nuove opportunità per lo sviluppo di ingredienti funzionali innovativi. Lo scopo della presente tesi è quello di valutare il potenziale biologico di un estratto ottenuto da sottoprodotti del pomodoro, con particolare attenzione alle loro proprietà antiossidanti e antiglicanti. A tal fine, viene innanzitutto effettuata una caratterizzazione chimica degli estratti mediante la determinazione del contenuto totale di polifenoli, parametro ampiamente utilizzato come indicatore della capacità antiossidante di una matrice vegetale. Successivamente, l'attività antiossidante viene valutata attraverso il saggio in vitro del radicale DPPH, che

consente di determinare la capacità degli estratti di neutralizzare i radicali liberi. Viene inoltre analizzata l'attività antiglicante attraverso l'impiego di modelli di glicazione in vitro, al fine di valutare la capacità degli estratti di inibire la formazione di AGE.

Un ulteriore obiettivo della tesi è rappresentato dall'esplorazione del potenziale applicativo degli estratti in ambito cosmetico. A questo scopo viene sviluppato un sistema formulativo sotto forma di siero contenente estratto di pomodoro, che funge da veicolo per i composti bioattivi. Tale formulazione viene quindi sottoposta a valutazione per verificare il mantenimento dell'attività biologica degli estratti all'interno del sistema cosmetico, elemento fondamentale per la loro efficacia finale.

Nel complesso il lavoro si propone di fornire un contributo alla comprensione delle proprietà funzionali dei sottoprodotti del pomodoro e di dimostrarne il potenziale utilizzo come ingredienti attivi in formulazioni cosmetiche innovative. Inoltre la tesi intende evidenziare come l'impiego di risorse derivanti da scarti agroindustriali possa rappresentare una strategia sostenibile e vantaggiosa sia dal punto di vista ambientale sia economico, promuovendo un approccio integrato tra ricerca scientifica, innovazione tecnologica e valorizzazione delle biomasse.

3 Materiali

Estratto glicerico di pomodoro (*Solanum Lycopersicum Fruit Extract*) fornito da Vortex Srl (TO, Italia).

Bovine Serum Albumine (BSA), D-(+)-glucosio, Sodium azide (NaN_3), Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), Folin & Ciocalteau's phenol reagent, Sodium carbonate (Na_2CO_3), Acido L-ascorbico da Sigma-Aldrich.

2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH), Sigma.

Etanolo assoluto anidro, Carlo Erba.

Ialuronato di sodio MMW (Sodium Hyaluronate).

Propandiolo (Propanediol).

Microcare SB (Aqua (and) Sodium Benzoate (and) Potassium Sorbate)).

4 Metodi

4.1 Contenuto totale di polifenoli (TPC)

L'estratto di pomodoro è stato sottoposto al saggio colorimetrico di Folin-Ciocalteu per determinare il contenuto fenolico totale dell'estratto. Il reattivo di Folin-Ciocalteu, composto da tungstofosfato e molibdofosfato, ha la capacità di reagire con i composti fenolici in un mezzo alcalino, provocando la formazione di un complesso blu. L'intensità della colorazione blu è proporzionale alla quantità di composti fenolici reattivi presenti nel campione. Il controllo del pH è ad opera di una soluzione tampone a base di carbonato di sodio. Il reattivo di Folin-Ciocalteu è stato preparato diluendo 1:10 in soluzione acquosa, mentre il tampone è stato ottenuto preparando una soluzione di carbonato di sodio al 7,5%.

In una Eppendorf sono stati aggiunti 150 µl di campione, 750 µl di reattivo e si lascia al buio per 5 minuti. Successivamente, sono stati aggiunti 750 µl della soluzione di Na₂CO₃ al 7,5% e lasciati reagire al buio per 40 minuti.

I campioni vengono poi trasferiti in una cuvetta e sottoposti a lettura in uno spettrofotometro UV-vis (Spettrofotometro UV-1900, Shimadzu) alla lunghezza d'onda di 734 nm, che corrisponde al picco di assorbimento del reattivo di Folin-Ciocalteu.

In questo saggio si utilizza come standard di riferimento l'acido gallico. Il contenuto totale di polifenoli viene espresso come µg equivalenti di acido gallico (GAE)/mL di estratto [66].

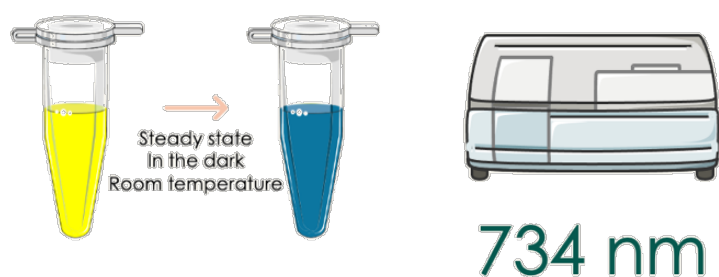


Figura 16. Rappresentazione schematica della variazione colorimetrica del saggio di Folin-Ciocalteu.

4.2 Valutazione attività antiossidante

4.2.1 Saggio del radicale DPPH

L'estratto di pomodoro è soggetto ad un'analisi delle proprietà antiossidanti tramite il saggio DPPH [67]. Il DPPH è un radicale libero organico stabile, viola scuro, che reagisce con gli antiossidanti, donando loro un elettrone e trasformandosi in un composto di colore giallo pallido. La quantità di DPPH ridotto è proporzionale alla sua attività antiossidante, permettendo di valutare la capacità dell'estratto in analisi di neutralizzare i radicali liberi, molecole altamente reattive coinvolte nello stress ossidativo.

In una Eppendorf vengono miscelati 25 μL di estratto con 975 μL di soluzione etanolica di DPPH (6×10^{-5} M) a temperatura ambiente e al riparo dalla luce, per il tempo necessario al raggiungimento dello steady state. L'estratto viene analizzato a concentrazioni di lavoro pari a 2,5%, 1,25%, 0,5%, 0,25% e 0,125%.

Ciascun composto in analisi viene analizzato in triplicato e il risultato viene espresso come media $\pm$ DS di tre misurazioni.

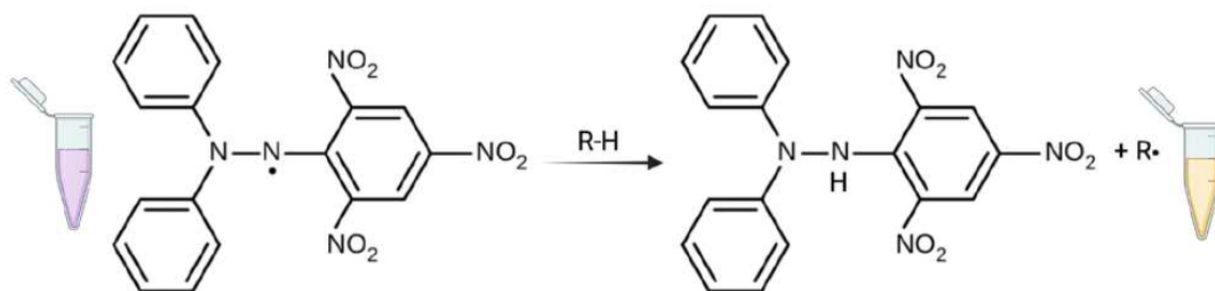


Figura 17. Rappresentazione schematica della struttura e reazione del saggio del radicale DPPH (creato con Biorender.com).

Valutazione della cinetica di reazione

Per lo studio cinetico è stato utilizzato il metodo dello stato stazionario. La diminuzione dell'assorbanza è stata monitorata nel tempo per ottenere lo steady state di diminuzione dell'assorbanza di DPPH. È stata calcolata la percentuale di DPPH residuo allo stato stazionario, mediante la seguente equazione:

$$\% \text{ DPPH rimanente} = \left(\frac{A_f}{A_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

Dove A_0 e A_f corrispondono all'assorbanza a 516 nm di DPPH allo stato iniziale e allo steady state, rispettivamente. Tale valore A_f è stato ottenuto nella regione dello stato stazionario in cui l'assorbanza non ha mostrato ulteriori diminuzioni osservabili.

La diminuzione dell'assorbanza è stata monitorata a 516 nm mediante spettrofotometro UV-Vis. La capacità di rimozione dei radicali di DPPH è stata calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$\text{Antioxidant activity} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs sample})}{\text{Abs control}} \times 100 \quad (2)$$

Dove: *Abs control* è il valore dell'assorbanza di DPPH iniziale, *Abs sample* è il valore di assorbanza al termine della reazione.

4.3 Valutazione attività antiglicante

4.3.1 Sistema glicato *in vitro*

L'attività antiglicante dell'estratto di pomodoro è stata valutata utilizzando il modello BSA-glucosio, un test *in vitro* ampiamente utilizzato per lo screening preliminare degli inibitori degli AGE. Secondo lo studio descritto da Mesias et al [68], il test è stato applicato in condizioni controllate, con fluorescenza correlata all'AGE monitorata in due intervalli di emissione corrispondenti a strutture simili all'argpirimidina e alla vesperlisina e valutata a diversi tempi di incubazione (giorni 7, 14 e 21, secondo la cinetica di glicazione del glucosio) per catturare la cinetica di inibizione.

È stata valutata l'attività antiglicante dell'estratto di pomodoro al 14%, 5% e 3%.

BSA (35 mg/mL) viene miscelata con glucosio (0.5 mol/L) in tampone fosfato (0.1 mol/L, pH 7.4, 0.02% NaN_3). Sono stati incubati 400 μL della soluzione di BSA con 800 μL della soluzione di glucosio a 37°C per 7, 14 e 21 giorni, in assenza o presenza del campione.

L'aminoguanidina è stata utilizzata come controllo positivo, in quanto capace di intrappolare specie α -dicarboniliche e inibire la formazione di AGE, a tre concentrazioni diverse (25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) [69].

4.3.2 Valutazione attività inibitoria della produzione di AGE

L'intensità di fluorescenza degli AGE, così come la fluorescenza intrinseca degli estratti e di BSA dopo l'incubazione, è stata valutata utilizzando uno spettrofluorimetro.

La fluorescenza (IF) degli AGE è stata monitorata alle seguenti lunghezze d'onda: eccitazione (λ_{ecc}) a 370 nm ed emissione (λ_{em}) a 436 nm e eccitazione a 335 nm con emissione a 412 nm. Queste lunghezze d'onda sono state selezionate in base alle proprietà spettrali caratteristiche degli AGE di tipo vesperlysina-like, che emettono a 436 nm dopo eccitazione a 370 nm, e argpyrimidine-like, che emettono a 412 nm dopo eccitazione a 335 nm.

La percentuale di inibizione della formazione di AGEs da parte dell'estratto è stata calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$Inib. \% = \left(1 - \frac{FI \text{ sistema glicato con inibitore} - FI \text{ campione}}{FI \text{ sistema glicato senza inibitore} - FI \text{ BSA}} \right) \times 100 \quad (3)$$

4.4 Formulazione dell'estratto di pomodoro in un siero

È stato formulato un siero con l'obiettivo di incorporare l'estratto di pomodoro in una matrice cosmetica idonea all'applicazione cutanea e in grado di preservarne la stabilità e la biodisponibilità.

La formulazione del siero è stata realizzata mediante preparazione a freddo, al fine di preservare l'integrità dei composti bioattivi dell'estratto (Figura 18).

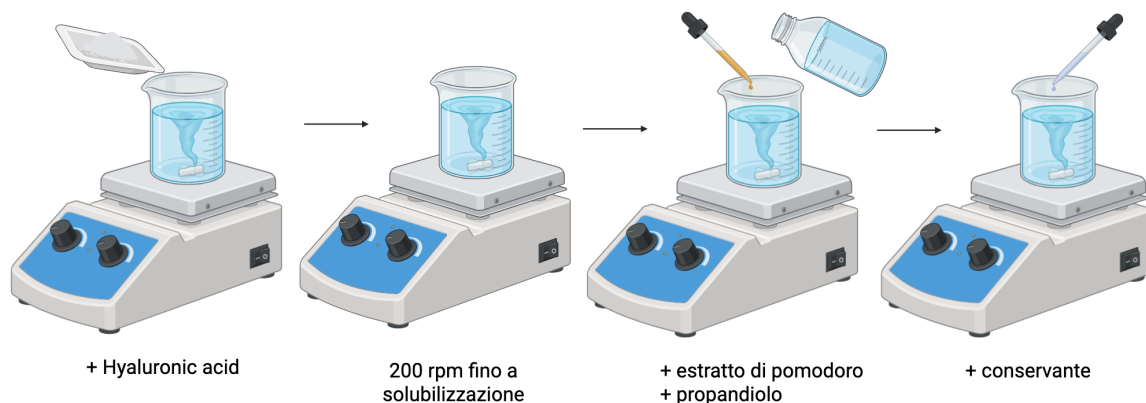


Figura 18. Schematizzazione dell'allestimento del siero con estratto di pomodoro (creato con Biorender.com).

In un becher è stata introdotta la quantità necessaria di acqua distillata. Il sistema è stato posto su piastra magnetica e mantenuto in agitazione a freddo a bassa velocità (circa 200 rpm).

Successivamente, lo ialuronato di sodio a medio peso molecolare è stato pesato e aggiunto gradualmente alla fase acquosa, evitando la formazione di agglomerati. La dispersione è stata mantenuta sotto agitazione fino a completa idratazione e solubilizzazione del polimero.

Una volta completata la dissoluzione, è stato aggiunto l'estratto glicerico di pomodoro e la miscela è stata mantenuta sotto agitazione fino a completa omogeneizzazione.

Successivamente sono stati incorporati il propandiol e il sistema conservante.

Il pH finale è stato misurato mediante pH-metro calibrato e regolato a un valore di circa 5,5 mediante aggiunta di soluzione di acido citrico 0,1 M. In Tabella 1 si riportano i componenti utilizzati per l'allestimento del siero.

In parallelo, è stato preparato un campione placebo, avente la medesima composizione del siero ma privo dell'estratto di pomodoro, sostituito da acqua.

Tabella 1. INCI del siero.

INCI	FUNZIONE
Sodium Hyaluronate	Idratante umettante
Solanum Lycopersicum Tomato Fruit Extract	Antiossidante, antiglicante
Propanediol	Umettante, texturizzante, conservante
Aqua and Sodium Benzoate and Potassium Sorbate	Conservante

4.4.1 Valutazione dell'attività antiossidante del siero

La valutazione dell'attività antiossidante del siero è stata condotta mediante saggio con radicale stabile DPPH adattando il protocollo utilizzato per l'analisi dell'ingrediente (paragrafo 4.2.1) al fine di consentire l'analisi del prodotto finito nella sua interezza. A tal fine, il metodo è stato opportunamente ottimizzato per garantire condizioni sperimentali comparabili a quelle utilizzate per la caratterizzazione dell'estratto e, al contempo, l'ottenimento di una soluzione idonea alla lettura spettrofotometrica.

In particolare, sono state effettuate prove preliminari per individuare condizioni operative che permettessero di ottenere una miscela di reazione sufficientemente limpida, riducendo possibili interferenze dovute alla matrice formulativa (es. presenza di polimeri idrofili).

Nel protocollo standard precedentemente impiegato per l'estratto, l'attività antiossidante veniva determinata facendo reagire 25 μL di campione con 975 μL di soluzione di DPPH a concentrazione pari a 60 μM , per un volume finale di 1 mL. Al fine di mantenere invariata la quantità di estratto sottoposta a reazione anche nel caso del siero, è stato necessario adattare i volumi in funzione della concentrazione dell'estratto all'interno della formulazione. Il protocollo è riportato graficamente in Figura 19.

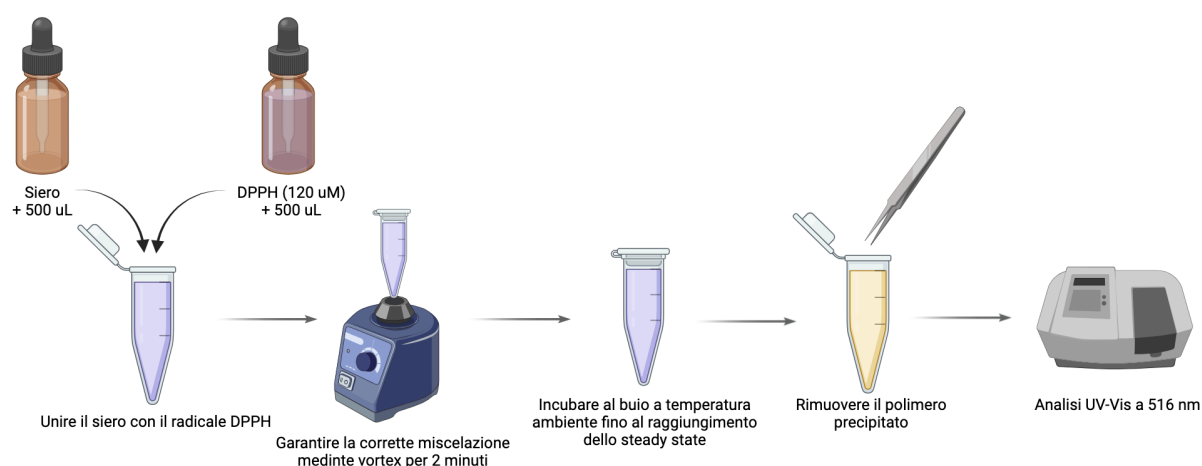


Figura 19. Schematizzazione del protocollo di valutazione dell'attività antiossidante del siero.

L'estratto di pomodoro è presente nel siero al 5% p/p; considerando la natura prevalentemente acquosa della formulazione, la densità del siero è stata approssimata a 1 g/mL. Sulla base di tale assunzione, il volume di siero necessario a fornire una quantità di estratto equivalente a 25 μL è risultato pari a 500 μL .

Al fine di mantenere invariata la concentrazione finale di DPPH (60 μM) nel volume totale di reazione (1 mL), la soluzione di DPPH è stata preparata a concentrazione pari a 120 μM e aggiunta in volume pari a 500 μL . In tali condizioni, la concentrazione finale di DPPH nella miscela di reazione risulta pari a quella del protocollo originale.

Il protocollo ottimizzato ha quindi previsto la miscelazione di 500 μL di siero con 500 μL di soluzione di DPPH (120 μM), seguita omogeneizzazione mediante vortex per 2 minuti e successiva incubazione al buio a temperatura ambiente. Quindi, è stato rimosso tramite una

pinzetta l'eventuale polimero precipitato per ottenere una soluzione limpida idonea per la lettura spettrofotometrica a 516 nm.

Questo approccio ha consentito di valutare l'attività antiossidante del prodotto finito mantenendo la comparabilità con i dati ottenuti sull'estratto puro e considerando l'effetto complessivo della matrice formulativa.

5 Risultati e discussione

5.1 TPC

La determinazione del contenuto totale di polifenoli (Total Phenolic Content, TPC) dell'estratto di pomodoro è stata effettuata mediante il saggio spettrofotometrico di Folin-Ciocalteu, ampiamente utilizzato per la quantificazione dei composti fenolici totali nelle matrici vegetali. I risultati sono stati espressi come equivalenti di acido gallico (Gallic Acid Equivalents, GAE) utilizzando una curva di calibrazione costruita con soluzioni standard di acido gallico (Figura 20).

La curva di calibrazione ha mostrato un'elevata linearità nel range di concentrazioni analizzato, con un coefficiente di determinazione pari a $R^2 = 0,9972$ e un'equazione della retta $y = 0,0057x + 0,024$, indicando un'elevata affidabilità del metodo analitico.

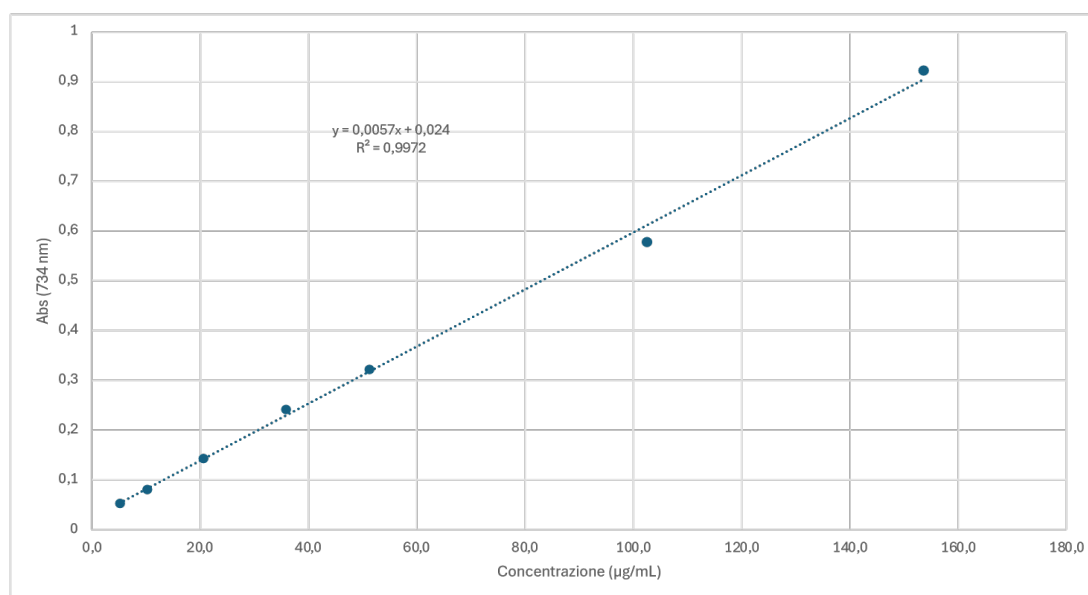


Figura 20. Curva di calibrazione dell'acido gallico.

Sulla base della curva di calibrazione dell'acido gallico le assorbanze misurate per l'estratto di pomodoro sono state convertite in concentrazioni ottenendo valori compresi tra 738,60 e 780,70 µg GAE/mL.

Il contenuto totale di polifenoli nell'estratto di pomodoro è risultato pari a $759,6 \pm 21,1$ µg GAE/mL, espresso come media $\pm$ deviazione standard di tre repliche indipendenti.

Tale valore evidenzia una significativa presenza di composti fenolici nell'estratto analizzato. È importante sottolineare che il metodo di Folin-Ciocalteu, pur essendo ampiamente utilizzato, non è specifico esclusivamente per i polifenoli, ma può reagire anche con altri composti riducenti presenti nella matrice. Tuttavia rappresenta comunque un indicatore affidabile del potenziale antiossidante complessivo.

In letteratura il contenuto totale di polifenoli viene espresso in mg GAE/g di peso secco. Nello studio di Li et al [70] è stato valutato il TPC di una variante di pomodoro viola. Il TPC risulta essere di $659,11 \pm 23,23$, un valore coerente e molto simile al risultato dell'analisi. Nello studio di Zhou et al [71] vengono presi in considerazione diversi ortaggi ottenuti mediante estrazione con una miscela acetone/acqua condotta a temperatura ambiente per 15 ore in atmosfera di azoto. Gli estratti così ottenuti sono stati utilizzati per l'analisi del contenuto fenolico totale (TPC).

I diversi ortaggi analizzati hanno mostrato valori differenti di TPC. I campioni di pomodoro hanno presentato un intervallo di TPC pari a 2,9-5,0 mg equivalenti di acido gallico (GAE)/g.

Gahler et al [72] hanno esaminato la distribuzione dei composti fenolici all'interno del pomodoro. All'interno del frutto sono stati determinati $27,0 \pm 0,6$ mg GAE/100 g di peso fresco. Il contenuto nello strato esterno è risultato inferiore ($18,9 \pm 0,3$ mg GAE/100 g peso fresco), mentre nei semi è stato rilevato un contenuto pari a $31,0 \pm 0,6$ mg GAE/100 g peso fresco.

Nel complesso i risultati ottenuti confermano che l'estratto di pomodoro analizzato possiede un contenuto significativo di composti fenolici che possono contribuire alle proprietà biologiche osservate nei saggi successivi.

5.2 Valutazione attività antiossidante

L'attività antiossidante dell'estratto è stata valutata mediante il saggio del radicale stabile DPPH che consente di determinare la capacità di un campione di donare elettroni o atomi di idrogeno neutralizzando i radicali liberi.

Curva di calibrazione

La curva di calibrazione del DPPH (Figura 21) ha mostrato un'elevata linearità con un coefficiente di determinazione $R^2 = 0,9987$ e un'equazione della retta $y = 0,0287x + 0,0029$, confermando l'affidabilità del metodo utilizzato.

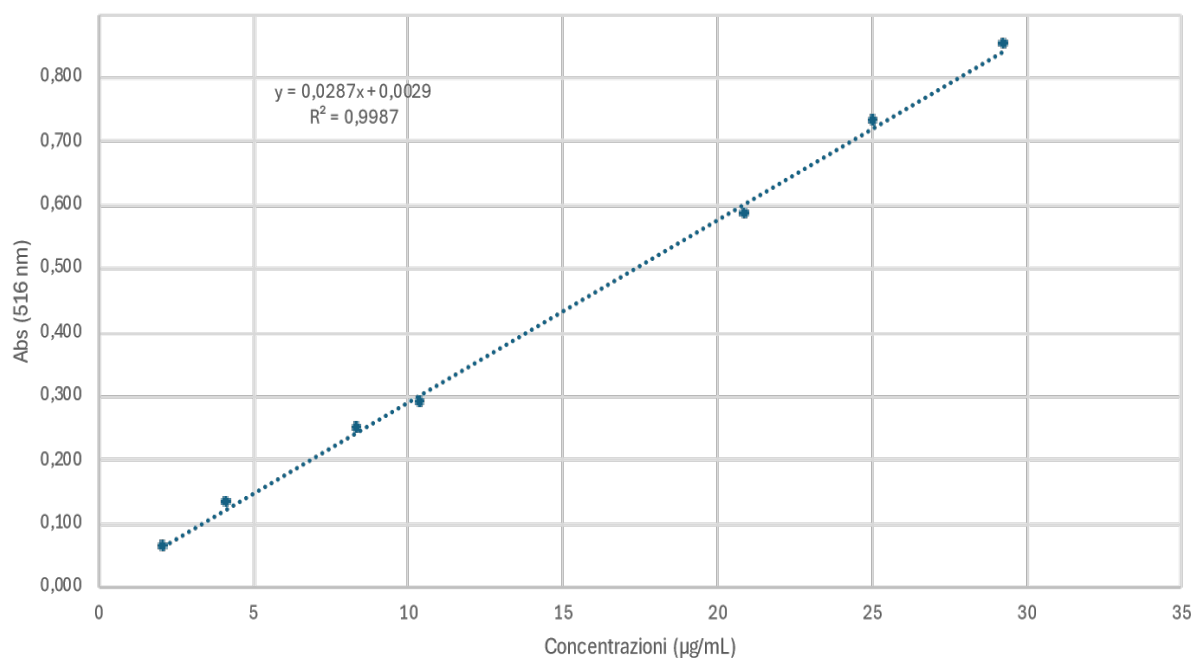


Figura 21. Curva di calibrazione della soluzione DPPH.

Cinetica di reazione dell'estratto di pomodoro

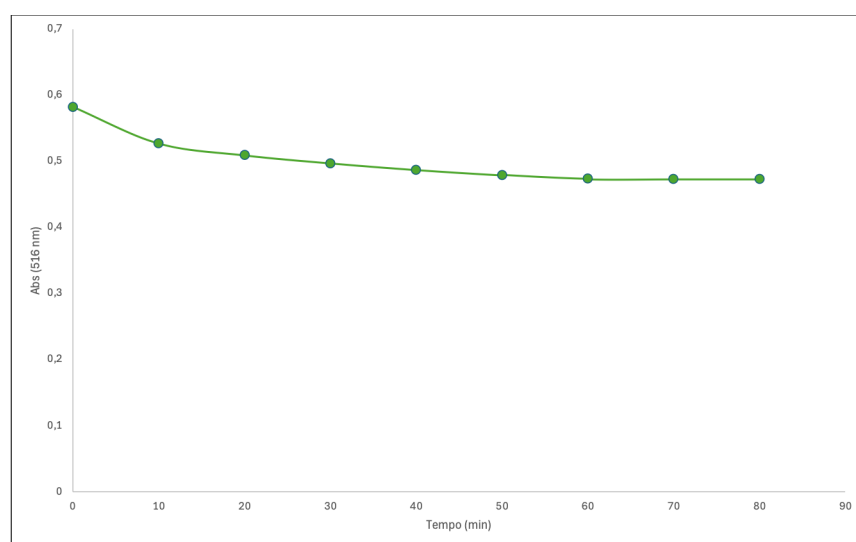


Figura 22. Cinetica di reazione tra la soluzione di lavoro di DPPH ed estratto di pomodoro a 516 nm.

In Figura 22 si riporta la cinetica di assorbimento della radiazione UV a 516 nm da parte della soluzione di lavoro di DPPH durante l'interazione con l'estratto di pomodoro. Si osserva una progressiva diminuzione dell'assorbanza nel tempo, indice della capacità antiossidante del campione nei confronti dei radicali liberi. La riduzione dell'assorbanza risulta più marcata nelle fasi iniziali della reazione suggerendo una rapida interazione tra il DPPH e i composti antiossidanti presenti nell'estratto. Successivamente la variazione tende a rallentare fino a raggiungere un andamento stazionario (steady state) indicativo del progressivo esaurimento delle specie reattive o del raggiungimento di un equilibrio.

Attività antiossidante dell'estratto di pomodoro

L'analisi dell'estratto a diverse concentrazioni nel volume finale di reazione ha rilevato un andamento dose-dipendente dell'attività antiossidante. In Figura 23 si può notare come l'attività diminuisca progressivamente con la concentrazione in analisi, suggerendo tale comportamento concentrazione-dipendente.

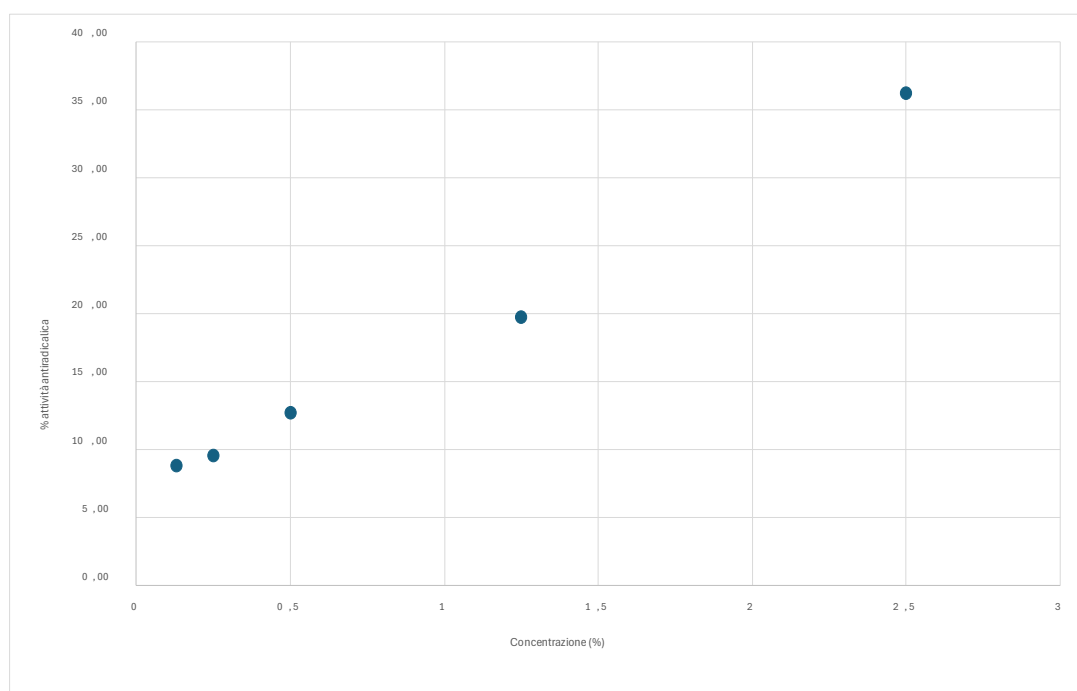


Figura 23. Relazione dell'attività antiradicalica dell'estratto in funzione della concentrazione espressa in percentuale (%).

La Figura 24 mostra la percentuale di attività antiradicalica dell'estratto di pomodoro alle diverse concentrazioni analizzate mediante il saggio DPPH. Il campione tal quale, che

corrisponde ad una percentuale di 2,5% nel volume di reazione finale, presenta la percentuale di inibizione più alta pari al 36,15%. Valori progressivamente inferiori sono stati osservati alle percentuali dell'estratto di 1,25%, 0,5%, 0,25% e 0,125%, pari rispettivamente al 19,74%, 12,71%, 9,68% e 8,81%. Questo comportamento è coerente con un meccanismo d'azione basato sulla presenza di composti bioattivi in grado di neutralizzare i radicali liberi, la cui efficacia dipende direttamente dalla concentrazione. Sebbene i valori di inibizione osservati siano moderati, essi indicano chiaramente la presenza di molecole antiossidanti attive, verosimilmente riconducibili a polifenoli e carotenoidi presenti nell'estratto.

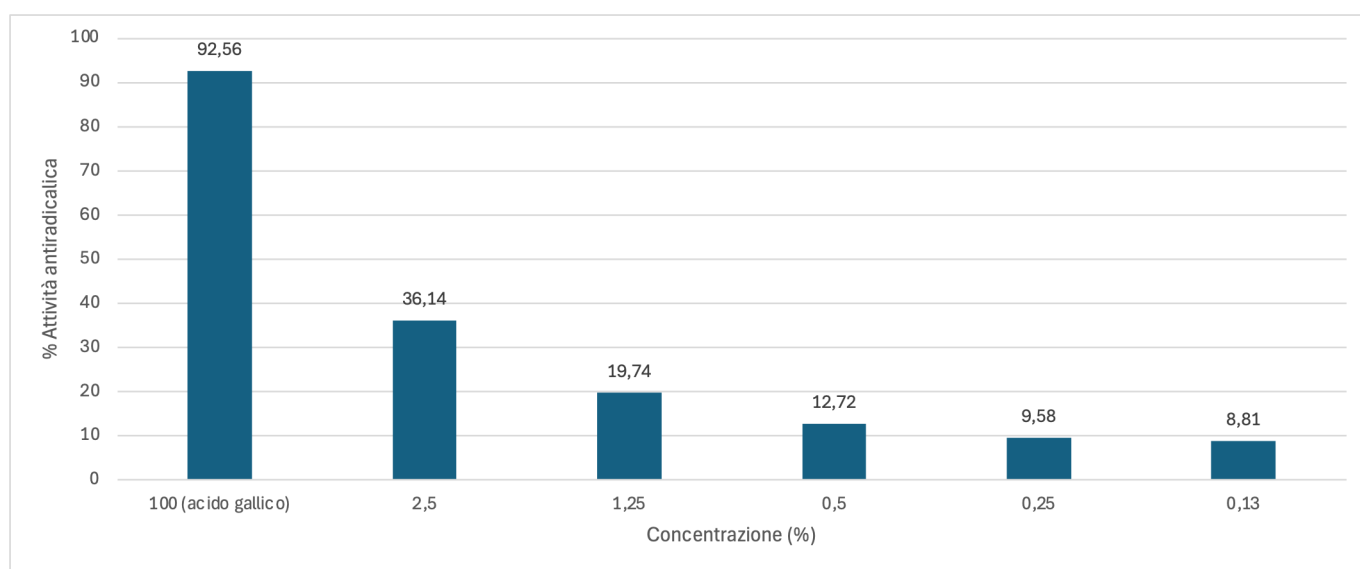


Figura 24. Rappresentazione della % dell'attività antiradicalica dell'estratto di pomodoro alle diverse concentrazioni espresse in percentuale e dello standard positivo, ovvero acido gallico a 100 µg/mL.

Grazie allo studio di Fuentes et al [73] si è visto che l'attività antiossidante del pomodoro sia fortemente influenzata sia dalla parte anatomica del frutto sia dallo stadio di maturazione. In generale le bucce e la polpa dei pomodori completamente maturi mostrano i valori più elevati di attività antiossidante seguite dalla mucillagine dei semi. I pomodori rossi evidenziano un'attività antiossidante significativamente superiore rispetto a quelli verdi confermando il ruolo della maturazione nell'accumulo di composti bioattivi come polifenoli e carotenoidi. Un'eccezione è rappresentata dai pomodori verdi in cui la polpa mostra valori superiori rispetto alle bucce suggerendo una diversa distribuzione dei composti antiossidanti nelle fasi iniziali di sviluppo.

Chabi et al [74] invece hanno analizzato una farina di semi derivata da scarti industriali di

Solanum lycopersicum. In questo studio la valutazione dell'attività antiossidante della farina di semi di pomodoro ha rivelato una percentuale di inibizione che va dal 23,13% al 27,97%, con una media del 25,03%, valori molto simili a quelli della nostra analisi.

Valori perfettamente in linea sono stati riportati da Shahzad et al [75] in cui hanno valutato l'attività antiossidante di diverse matrici vegetali tra cui pomodoro, cherry tomato e anguria. I risultati evidenziano che il pomodoro presenta un'attività antiossidante moderata con valori di inibizione del radicale DPPH compresi tra circa il 35% e il 45%.

Nel complesso i risultati ottenuti indicano che l'estratto di pomodoro possiede una capacità antiossidante significativa, sebbene non elevatissima, probabilmente dovuta alla natura della matrice e alle condizioni di estrazione. Tuttavia tale attività risulta sufficiente per giustificare un potenziale impiego dell'estratto in formulazioni cosmetiche dove anche effetti moderati possono contribuire alla protezione dallo stress ossidativo e alla prevenzione dell'invecchiamento cutaneo.

5.3 Valutazione attività antiglicante

L'attività antiglicante dell'estratto di pomodoro è stata valutata mediante un saggio in vitro basato sulla glicazione della BSA indotta da glucosio, monitorando la formazione di AGE. Il campione è stato testato a tre diverse concentrazioni (14%, 5% e 3%) e per differenti tempi di incubazione (7, 14 e 21 giorni) al fine di analizzare sia l'effetto dose-dipendente sia l'evoluzione temporale dell'attività.

I risultati dell'estratto di pomodoro nell'attività antiglicante sono riassunti in Tabella 2.

Tabella 2. Attività di inibizione % della formazione di AGE da parte dell'estratto di pomodoro analizzato alle diverse concentrazioni di lavoro (esprese in %) a 7, 14 e 21 giorni di incubazione.

Concentrazione (%)	Argpyrimidine-like			Vesperlysine-like		
	7 giorni	14 giorni	21 giorni	7 giorni	14 giorni	21 giorni
14	85,94 ± 3,59	81,84 ± 0,82	71,33 ± 5,99	62,42 ± 3,67	19,73 ± 2,88	32,55 ± 9,57
5	58,98 ± 0,43	76,38 ± 0,61	60,98 ± 5,07	33,51 ± 1,32	65,71 ± 1,96	28,02 ± 3,60
3	41,05 ± 2,03	55,24 ± 20,06	47,30 ± 6,77	30,17 ± 1,32	26,64 ± 29,53	15,47 ± 7,49

Per quanto riguarda gli AGE di tipo argpirimidina-like, i risultati evidenziano un chiaro andamento concentrazione-dipendente soprattutto nelle fasi iniziali dell'incubazione. Dopo 7 giorni l'estratto al 14% mostra un'elevata percentuale di inibizione ($85,94 \pm 3,59$), significativamente superiore rispetto al 5% ($58,98 \pm 0,43$) e al 3% ($41,05 \pm 2,03$), indicando una marcata efficacia dell'estratto alle concentrazioni più elevate. Questo suggerisce che i composti bioattivi presenti, verosimilmente polifenoli e carotenoidi, siano in grado di interferire efficacemente nelle prime fasi del processo glicativo.

Dopo 14 giorni l'attività antiglicante dell'estratto al 14% rimane sostanzialmente stabile ($81,84 \pm 0,82$), indicando una buona persistenza dell'effetto nel tempo. Interessante è il comportamento dell'estratto al 5% che mostra un incremento dell'inibizione fino a $76,38 \pm 0,61$, avvicinandosi ai valori della concentrazione più elevata. Questo potrebbe suggerire una possibile cinetica più lenta ma efficace dei composti attivi a concentrazioni intermedie. Al contrario il campione al 3% presenta un'inibizione inferiore ($55,24 \pm 20,06$) accompagnata da un'elevata variabilità, indicativa di una minore riproducibilità e stabilità dell'effetto a basse concentrazioni.

Dopo 21 giorni si osserva una generale riduzione dell'attività antiglicante per tutte le concentrazioni, pur mantenendo un trend dose-dipendente. In particolare l'estratto al 14% mostra un'inibizione pari a $71,33 \pm 5,99$, inferiore rispetto ai tempi precedenti, suggerendo una possibile perdita di efficacia nel lungo periodo, probabilmente dovuta a fenomeni di degradazione dei composti attivi o alla progressione avanzata delle reazioni di glicazione.

Anche il campione al 5% mantiene una discreta attività ($60,98 \pm 5,07$), mentre il 3% si conferma il meno efficace ($47,30 \pm 6,77$).

Per quanto riguarda gli AGE di tipo vesperlysine-like, il comportamento dell'estratto risulta più complesso e meno lineare. Dopo 7 giorni, si osserva un andamento concentrazione-dipendente simile a quello descritto per l'argpirimidina, con il campione al 14% che mostra la maggiore inibizione ($62,42 \pm 3,67$), seguito dal 5% ($33,51 \pm 1,32$) e dal 3% ($30,17 \pm 1,32$).

Tuttavia, già a partire da 14 giorni si evidenzia un'inversione di tendenza: l'attività dell'estratto al 14% diminuisce drasticamente ($19,73 \pm 2,88$), mentre il campione al 5% mostra un aumento significativo dell'inibizione ($65,71 \pm 1,96$).

Questo andamento non lineare potrebbe essere attribuito a diversi fattori, tra cui la diversa reattività dei composti coinvolti nella formazione dei vesperlysine-like AGE, nonché possibili interazioni tra i componenti dell'estratto che variano nel tempo e con la concentrazione. Inoltre, l'elevata deviazione standard osservata per il campione al 3% ($26,64 \pm 29,53$) suggerisce una risposta poco stabile e difficilmente interpretabile a basse concentrazioni.

Dopo 21 giorni, l'attività antiglicante nei confronti dei vesperlysine-like risulta complessivamente moderata per tutte le concentrazioni. L'estratto al 14% mostra un'inibizione pari a $32,55 \pm 9,57$, mentre valori inferiori si osservano per il 5% ($28,02 \pm 3,60$) e il 3% ($15,47 \pm 7,49$). Questo andamento suggerisce che, nel lungo periodo, l'efficacia dell'estratto nei confronti di questa specifica classe di AGE sia limitata rispetto a quanto osservato per gli argpirimidina-like.

Nel complesso, i risultati evidenziano che l'estratto di pomodoro possiede una significativa attività antiglicante, particolarmente evidente nei confronti degli AGE di tipo argpirimidina-like e soprattutto nelle fasi iniziali del processo glicativo. L'effetto risulta generalmente concentrazione-dipendente, con le migliori performance osservate alla concentrazione del 14%.

Tuttavia, l'efficacia tende a ridursi con l'aumentare del tempo di incubazione, suggerendo che l'azione inibitoria dell'estratto sia più rilevante nelle fasi precoci della glicazione piuttosto che nelle fasi avanzate. Inoltre, la risposta nei confronti dei vesperlysine-like AGE appare più variabile e meno prevedibile, indicando una possibile selettività dell'estratto verso specifiche vie di formazione degli AGE.

Questi risultati supportano il potenziale impiego dell'estratto di pomodoro come agente antiglicante naturale, in particolare in applicazioni cosmetiche volte a prevenire l'invecchiamento cutaneo precoce. Tuttavia, la variabilità osservata e la riduzione dell'efficacia nel lungo periodo suggeriscono la necessità di ulteriori studi per ottimizzare le condizioni di utilizzo e comprendere più a fondo i meccanismi d'azione dei composti bioattivi coinvolti.

5.4 Formulazione e valutazione della capacità antiossidante del siero

Il siero contenente l'estratto di pomodoro si presenta come un sistema omogeneo, limpido e trasparente, caratterizzato da una lieve colorazione giallastra attribuibile alla presenza dell'estratto. Non sono stati osservati fenomeni di separazione di fase né la presenza di particolato visibile.

Il campione placebo, privo dell'estratto, si presenta invece completamente limpido, trasparente e incolore, confermando che la colorazione del siero formulato è imputabile esclusivamente all'ingrediente attivo.

Il pH del siero è risultato pari a 5,5, valore compatibile con la fisiologia cutanea e in linea con l'intervallo desiderato per formulazioni cosmetiche topiche.

L'attività antiossidante del siero è stata valutata mediante il saggio del radicale stabile DPPH, secondo il protocollo ottimizzato descritto nel paragrafo 4.4.1.

Il siero contenente l'estratto di pomodoro al 5% ha mostrato una percentuale di inibizione pari al 28,26%. A titolo comparativo, il campione di estratto tal quale, testato alle medesime condizioni sperimentali (corrispondenti a una concentrazione finale del 2,5% nel volume di reazione), ha evidenziato una percentuale di inibizione superiore, pari al 36,15%.

La riduzione dell'attività antiossidante osservata nel siero rispetto all'estratto puro può essere attribuita a diversi fattori. In primo luogo, la presenza della matrice formulativa può influenzare la disponibilità dei composti bioattivi, limitandone parzialmente l'interazione con il radicale DPPH. Componenti quali polimeri idrofili (es. ialuronato di sodio) e solventi umettanti possono infatti modificare la diffusione dei radicali o la mobilità degli antiossidanti all'interno del sistema. Inoltre, possibili interazioni tra i costituenti della formulazione e i composti fenolici dell'estratto potrebbero contribuire a una parziale riduzione dell'attività scavenger misurata. Non si può escludere, infine, un effetto di diluizione o di interferenza ottica residua, nonostante l'ottimizzazione del protocollo per ottenere soluzioni limpide. Nonostante tale diminuzione, il siero mantiene l'attività antiossidante, indicando che l'estratto di pomodoro conserva le proprie proprietà funzionali anche una volta incorporato nella formulazione cosmetica. Questo risultato conferma l'idoneità del sistema formulativo come veicolo per composti ad attività antiossidante.

6 Conclusioni

Negli ultimi anni, l'interesse della cosmetica verso matrici di origine vegetale è cresciuto in modo significativo, in risposta alla crescente richiesta di ingredienti naturali, multifunzionali e sostenibili. Gli estratti botanici rappresentano infatti una fonte complessa di composti bioattivi in grado di esercitare effetti benefici sulla pelle, in particolare grazie alla loro attività antiossidante e alla capacità di modulare processi biologici coinvolti nell'invecchiamento cutaneo. Tra i principali meccanismi alla base del skin aging, lo stress ossidativo e la glicazione non enzimatica delle proteine rivestono un ruolo fondamentale. Lo stress ossidativo deriva da uno squilibrio tra produzione di specie reattive dell'ossigeno e sistemi antiossidanti endogeni, con conseguente danno a lipidi, proteine e componenti della matrice extracellulare. Parallelamente, la formazione di prodotti finali della glicazione avanzata contribuisce all'alterazione strutturale del derma, determinando perdita di elasticità, irrigidimento delle fibre e accelerazione dei processi di invecchiamento cutaneo. La possibilità di contrastare tali fenomeni attraverso ingredienti di origine naturale rappresenta quindi un approccio di particolare interesse nello sviluppo di formulazioni cosmetiche funzionali.

In questo contesto, il presente lavoro ha avuto come obiettivo la caratterizzazione di un estratto glicerico di pomodoro (*Solanum lycopersicum* Fruit Extract), la valutazione delle sue attività antiossidanti e antiglicanti e la successiva incorporazione in una formulazione cosmetica topica. I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare la presenza di un contenuto significativo di composti fenolici e una discreta attività antiossidante, con comportamento dose-dipendente nel saggio DPPH. Inoltre, l'estratto ha mostrato una marcata capacità di inibizione della formazione di AGEs, in particolare nelle fasi iniziali del processo glicativo e nei confronti degli AGE di tipo argpirimidina-like, suggerendo una possibile efficacia preventiva più che inibitoria sulle fasi avanzate della reazione.

La formulazione di un siero ha dimostrato la compatibilità dell'estratto con una matrice cosmetica idrofila stabile e fisiologicamente idonea all'applicazione cutanea, mantenendo condizioni di pH adeguate e buona stabilità fisica. La valutazione dell'attività antiossidante del prodotto finito ha evidenziato una riduzione rispetto all'estratto tal quale, pur mantenendo un'attività misurabile, indicando che l'incorporazione nella matrice cosmetica può influenzare parzialmente la disponibilità dei composti bioattivi senza annullarne l'efficacia funzionale.

Nel complesso, i risultati ottenuti supportano il potenziale impiego dell'estratto di pomodoro come ingrediente attivo in formulazioni cosmetiche finalizzate alla protezione dallo stress ossidativo e dal danno da glicazione, entrambi coinvolti nei processi di invecchiamento

cutaneo. Tuttavia, la variabilità osservata in alcuni saggi e la riduzione dell'efficacia nel lungo periodo evidenziano la necessità di ulteriori studi mirati all'ottimizzazione della formulazione, alla stabilità dei composti attivi e alla comprensione più approfondita dei meccanismi molecolari coinvolti.

Bibliografia

- [1] A. B. Uceda, L. Mariño, R. Casasnovas e M. Adrover, «An overview on glycation: molecular mechanisms, impact on proteins, pathogenesis, and inhibition,» *Biophysical Reviews*, vol. 16, n. 2, pp. 189-218, 2024.
- [2] M. N. Lund e C. A. Ray, «Control of Maillard reactions in foods: Strategies and chemical mechanisms Journal of agricultural and food chemistry,» *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 65, n. 23, pp. 4537-4552, 2017.
- [3] H. Jaeger, A. Janositz e D. Knorr, «The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies,» *Pathologie biologique*, vol. 58, n. 3, pp. 207-213, 2010.
- [4] C. P. He, C. Chen, X. C. Jiang, H. Li, L. X. Zhu, P. X. Wang e T. Xiao, «The role of AGEs in pathogenesis of cartilage destruction in osteoarthritis,» *Bone Joint Res*, vol. 11, n. 5, pp. 292-300, 2022.
- [5] C. H. Wu, S. M. Huang, J. A. Lin e G. C. Yen, «Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs,» *Food & function*, vol. 2, n. 5, pp. 224-234, 2011.
- [6] L. Wang, Y. Jiang e C. Zhao, «The effects of advanced glycation end-products on skin and potential anti-glycation strategies,» *Experimental dermatology*, vol. 33, n. 4, 2024.
- [7] A. Twarda-Clapa, A. Olczak, A. M. Białkowska e M. Koziolkiewicz, «Advanced glycation end-products (AGEs): formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs,» *Cells*, vol. 11, n. 8, p. 1312, 2022.
- [8] N. Ahmed, «Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications,» *Diabetes research and clinical practice*, vol. 67, n. 1, pp. 3-21, 2005.
- [9] A. Perrone, A. Giovino, J. Benny e F. Martinelli, «Advanced glycation end products (AGEs): biochemistry, signaling, analytical methods, and epigenetic effects,» *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2020, n. 1, p. 3818196, 2020.
- [10] C. Almengló, E. Rodriguez-Ruiz, E. Alvarez, A. López-Lago, J. R. González-Juanatey e J. L. Garcia-Allut, «Minimal invasive fluorescence methods to quantify advanced glycation end products (AGEs) in skin and plasma of humans,» *Methods*, vol. 203, pp. 103-107, 2022.
- [11] P. Gkogkolou e M. Böhm, «Advanced glycation end products: Key players in skin aging?,» *Dermato-endocrinology*, vol. 4, n. 3, pp. 259-270, 2012.
- [12] K. Zgutka, M. Tkacz, P. Tomasiak e M. Tarnowski, «A role for advanced glycation end products in molecular ageing,» *International journal of molecular sciences*, vol. 24, n. 12, p. 9881, 2023.
- [13] V. P. Reddy, P. Aryal e E. K. Darkwah, «Advanced glycation end products in health and disease,» *Microorganisms*, vol. 10, n. 9, p. 1848, 2022.
- [14] D. J. Betteridge, «What is oxidative stress?,» *Metabolism*, vol. 49, n. 2, pp. 3-8, 2000.
- [15] I. M. Iancu, H. I. Tănase, C. M. Dobrescu e M. L. Dorobăț, «The mechanism and biochemistry in oxidative stress a brief overview,» *Current Trends in Natural Sciences*, vol. 12, n. 24, pp. 84-96, 2023.
- [16] Î. Gulcin, «Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview,» *Archives of toxicology*, vol. 94, n. 3, pp. 651-715, 2020.

- [17] K. Hosohata, T. Harnsirikarn e S. Chokesuwattanaskul, «Ferroptosis: a potential therapeutic target in acute kidney injury,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, n. 12, p. 6583, 2022.
- [18] M. Valko, C. J. B. Rhodes, J. Moncol, M. M. Izakovic e M. Mazur, «Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer,» *Chemico-biological interactions*, vol. 160, n. 1, pp. 1-40, 2006.
- [19] C. Y. Liu, C. F. Lee e Y. H. Wei, «Role of reactive oxygen species-elicited apoptosis in the pathophysiology of mitochondrial and neurodegenerative diseases associated with mitochondrial DNA mutations,» *Journal of the Formosan Medical Association*, vol. 108, n. 8, pp. 599-611, 2009.
- [20] I. EL, «Specie chimiche reattive e radicali liberi,» *Convegno "Radicali liberi e antiossidanti in medicina nello sport"*.
- [21] J. Chen, Y. Liu, Z. Zhao e J. Qiu, «Oxidative stress in the skin: Impact and related protection,» *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 43, n. 5, pp. 495-509, 2021.
- [22] E. M. Atta, N. H. Mohamed e A. A. Abdelgawad, «Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types,» *Eur. Chem. Bull*, vol. 6, n. 8, pp. 365-375, 2017.
- [23] A. Ivanova, E. Gerasimova e E. Gazizullina, «Study of antioxidant properties of agents from the perspective of their action mechanisms,» *Molecules*, vol. 25, n. 18, p. 4251, 2020.
- [24] S. Dontha, «A review on antioxidant methods,» *Asian J. Pharm. Clin. Res*, vol. 9, n. 2, pp. 14-32, 2016.
- [25] I. Mirończuk-Chodakowska, A. M. Witkowska e M. E. Zujko, «Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body,» *Advances in medical sciences*, vol. 63, n. 1, pp. 68-78, 2018.
- [26] A. M. Pisoschi e A. Pop, «The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review,» *European journal of medicinal chemistry*, vol. 97, pp. 55-74, 2015.
- [27] H. Anwar, G. Hussain e I. Mustafa, «Antioxidants from natural sources,» *Antioxidants in foods and its applications*, 2018.
- [28] I. G. Munteanu e C. Apetrei, «Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review,» *International journal of molecular sciences*, vol. 22, n. 7, p. 3380, 2021.
- [29] J. Flieger, W. Flieger, J. Baj e R. Maciejewski, «Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles,» *Materials*, vol. 14, n. 15, p. 4135, 2021.
- [30] N. Tena, J. Martín e A. G. Asuero, «State of the art of anthocyanins: Antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health,» *Handbook of Analysis and Extraction Methods of Anthocyanins*, pp. 3-33, 2025.
- [31] Z. Liu, T. S. De Souza, B. Holland, F. Dunshea, C. Barrow e H. A. Suleria, «Valorization of food waste to produce value-added products based on its bioactive compounds,» *Processes*, vol. 11, n. 3, p. 840, 2023.
- [32] S. M. Gomes, F. Campos, M. C. L. Martins, C. Monteiro e L. Santos, «Exploring the Bioactive Potential and Biocompatibility of Extracts from Agro-Industrial Residues for Cosmetic Applications,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 26, n. 18, p. 9169, 2025.
- [33] A. M. Martins, A. T. Silva e J. M. Marto, «Advancing cosmetic sustainability: Upcycling for a circular product life cycle,» *Sustainability*, vol. 17, n. 13, p. 5738, 2025.

- [34] M. Krzyżostan, A. Wawrzyńczak e I. Nowak, «Use of waste from the food industry and applications of the fermentation process to create sustainable cosmetic products: A review,» *Sustainability*, vol. 16, n. 7, p. 2757, 2024.
- [35] T. Laranjeira, A. Costa, C. Faria-Silva, D. Ribeiro, J. M. P. F. de Oliveira, S. Simoes e A. Ascenso, «Sustainable valorization of tomato by-products to obtain bioactive compounds: Their potential in inflammation and cancer management,» *Molecules*, vol. 27, n. 5, p. 1701, 2022.
- [36] M. Dorais, D. L. Ehret e A. P. Papadopoulos, «Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer,» *Phytochemistry reviews*, vol. 7, n. 2, pp. 231-250, 2008.
- [37] Z. Lu, J. Wang, R. Gao, F. Ye e G. Zhao, «Sustainable valorisation of tomato pomace: A comprehensive review,» *Trends in Food Science & Technology*, vol. 86, pp. 172-187, 2019.
- [38] A. V. Rao e L. G. Rao, «Carotenoids and human health,» *Pharmacological research*, vol. 55, n. 3, pp. 207-216, 2007.
- [39] E. Maciejczyk, A. Wajs-Bonikowska, M. Batory e E. Budzisz, «Tomato Pomace: Underestimated Sustainable Cosmetic/Pharmaceutical,» *Molecules*, vol. 31, n. 1, p. 53, 2025.
- [40] V. Nour, T. D. Panaite, M. Ropota, R. Turcu, I. Trandafir e A. R. Corbu, «Nutritional and bioactive compounds in dried tomato processing waste,» *CyTA - Journal of Food*, vol. 16, n. 1, pp. 222-229, 2018.
- [41] V. Sorrenti, I. Burò, V. Consoli e L. Vanella, «Recent advances in health benefits of bioactive compounds from food wastes and by-products: Biochemical aspects,» *International journal of molecular sciences*, vol. 24, n. 3, p. 2019, 2023.
- [42] G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci e A. Bitto, «Oxidative stress: harms and benefits for human health,» *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2017, n. 1, p. 8416763, 2017.
- [43] G. Ozkan, D. Günal-Köroğlu, A. Karadag, E. Capanoglu, S. M. Cardoso, B. Al-Omari e W. C. Cho, «A mechanistic updated overview on lycopene as potential anticancer agent,» *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 161, p. 114428, 2023.
- [44] D. C. Jiménez Bolaño, D. Insuasty, J. D. Rodríguez Macías e C. D. Grande-Tovar, «Potential use of tomato peel, a rich source of lycopene, for cancer treatment,» *Molecules*, vol. 29, n. 13, p. 3079, 2024.
- [45] G. Pataro, D. Carullo, M. Falcone e G. Ferrari, «Recovery of lycopene from industrially derived tomato processing by-products by pulsed electric fields-assisted extraction,» *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 63, p. 102369, 2020.
- [46] A. G. Amorim, J. M. Souza, R. C. Santos, B. Gullon, A. Oliveira, L. F. Santos e J. R. Leite, «HPLC-DAD, ESI-MS/MS, and NMR of lycopene isolated from *P. guajava* L. and its biotechnological applications,» *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 120, n. 3, p. 1700330, 2018.
- [47] C. M. Stinco, F. J. Heredia, I. M. Vicario e A. J. Melendez-Martinez, «In vitro antioxidant capacity of tomato products: Relationships with their lycopene, phytoene, phytofluene and alpha-tocopherol contents, evaluation of interactions and correlation with reflectance measurements,» *LWT*, vol. 65, pp. 718-724, 2016.
- [48] S. S. Alvi, D. Iqbal, S. Ahmad e M. S. Khan, «Molecular rationale delineating the role of lycopene as a potent HMG-CoA reductase inhibitor: in vitro and in silico study,» *Natural product research*, vol. 30, n. 18, pp. 2111-2114, 2016.

- [49] A. Bertelli, M. Biagi, M. Corsini, G. Bainsi, G. Cappellucci e E. Miraldi, «Polyphenols: From theory to practice,» *Foods*, vol. 10, n. 11, p. 2595, 2021.
- [50] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy e L. Jiménez, «Polyphenols: food sources and bioavailability,» *The American journal of clinical nutrition*, vol. 79, n. 5, pp. 727-747, 2004.
- [51] R. K. Singla, A. K. Dubey, A. Garg, R. K. Sharma, M. Fiorino, S. M. Ameen e M. Al-Hiary, «Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures,» *Journal of AOAC International*, vol. 102, n. 5, pp. 1397-1400, 2019.
- [52] S. Kumar e A. K. Pandey, «Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview,» *The scientific world journal*, vol. 2013, n. 1, p. 162750, 2013.
- [53] N. B. Rathod, N. Elabed, S. Punia, F. Ozogul, S. K. Kim e J. M. Rocha, «Recent developments in polyphenol applications on human health: A review with current knowledge,» *Plants*, vol. 12, n. 6, p. 1217, 2017.
- [54] S. Lafay e A. Gil-Izquierdo, «Bioavailability of phenolic acids,» *Phytochemistry Reviews*, vol. 7, n. 2, pp. 301-311, 2008.
- [55] R. Martí, S. Roselló e J. Cebolla-Cornejo, «Tomato as a source of carotenoids and polyphenols targeted to cancer prevention,» *Cancers*, vol. 8, n. 6, p. 58, 2016.
- [56] I. Martínez-Valverde, M. J. Periago, G. Provan e A. Chesson, «Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*),» *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 82, n. 3, pp. 323-330, 2002.
- [57] S. R. Muir, G. J. Collins, S. Robinson, S. Hughes, A. Bovy, C. H. V. Ric De Vos e M. E. Verhoeven, «Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols,» *Nature biotechnology*, vol. 19, n. 5, pp. 470-474, 2001.
- [58] A. J. Stewart, S. Bozonnet, W. Mullen, G. I. Jenkins, M. E. Lean e A. Crozier, «Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products,» *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 48, n. 7, pp. 2663-2669, 2000.
- [59] R. Tsao, «Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols,» *Nutrients*, vol. 2, n. 12, pp. 1231-1246, 2010.
- [60] G. Tommonaro, R. De Prisco, G. R. Abbamondi e B. Nicolaus, «Bioactivity of tomato hybrid powder: Antioxidant compounds and their biological activities,» *Journal of medicinal food*, vol. 16, n. 4, pp. 351-356, 2013.
- [61] M. Owureku-Asare, I. Oduro, F. K. Saalia, C. Tortoe e R. K. Ambrose, «Physicochemical and nutritional characteristics of solar and sun-dried tomato powder,» *Journal of Food Research*, vol. 7, n. 6, pp. 1-15, 2018.
- [62] S. Srivastava e K. Kulshreshtha, «Nutritional content and significance of tomato powder,» *Annals of Arid Zone*, vol. 52, n. 2, pp. 121-124, 2013.
- [63] A. Selimović, S. Merzić, A. Mušić, A. Huskić, H. Junuzović e A. Selimović, «Antioxidant Activity of Tomato Powder Dehydrated at Different Temperatures,» *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology*, 2023.
- [64] U. Choe, J. Sun, E. Bailoni, P. Chen, Y. Li, B. Gao e L. Yu, «Chemical composition of tomato seed flours, and their radical scavenging, anti-inflammatory and gut microbiota modulating properties,» *Molecules*, vol. 26, n. 5, p. 1478, 2021.

- [65] S. L. J. Paulino, Á. T. G. Adrián, E. A. L. Gabriela, V. M. Maribel e M. G. Sergio, «Nutraceutical potential of flours from tomato by-product and tomato field waste,» *Journal of Food Science and Technology*, vol. 57, n. 9, pp. 3525-3531, 2020.
- [66] N. B. Rizvi, A. Fatima, R. Busquets, M. R. Khan, S. Ashraf, M. S. Khan e F. Oz, «Effect of the media in the Folin-Ciocalteu assay for the analysis of the total phenolic content of olive products.,» *Food Analytical Methods*, vol. 16, n. 11, pp. 1627-1634, 2023.
- [67] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier e C. L. W. T. Berset, «Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity,» *LWT-Food science and Technology*, vol. 28, n. 1, pp. 25-30, 1995.
- [68] M. Mesías, M. Navarro, V. Gökmen e F. J. Morales, «Antiglycative effect of fruit and vegetable seed extracts: inhibition of AGE formation and carbonyl-trapping abilities,» *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 93, n. 8, pp. 2037-2044, 2013.
- [69] I. Grzegorzczak-Karolak, K. Gołąb, J. Gburek, H. Wysokińska e A. Matkowski, «Inhibition of advanced glycation end-product formation and antioxidant activity by extracts and polyphenols from *Scutellaria alpina* L. and *S. altissima* L.,» *Molecules*, vol. 21, n. 6, p. 739, 2016.
- [70] H. Li, Z. Deng, R. Liu, J. C. Young, H. Zhu, S. Loewen e R. Tsao, «Characterization of phytochemicals and antioxidant activities of a purple tomato (*Solanum lycopersicum* L.),» *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 59, n. 21, pp. 11803-11811, 2011.
- [71] K. Zhou e L. Yu, «Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado,» *LWT-Food Science and Technology*, vol. 39, n. 10, pp. 1155-1162, 2006.
- [72] S. Gahler, K. Otto e V. Böhm, «Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, n. 27, pp. 7962-7968, 2003.
- [73] E. Fuentes, R. Carle, L. Astudillo, L. Guzmán, M. Gutiérrez, G. Carrasco e I. Palomo, «Antioxidant and antiplatelet activities in extracts from green and fully ripe tomato fruits (*Solanum lycopersicum*) and pomace from industrial tomato processing,» *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, n. 1, p. 867578, 2013.
- [74] I. B. Chabi, O. J. Omiyalé, S. E. C. A. Dèdèhou, B. P. Ayégnon, I. Idrissou, B. Boya e A. P. P. Kayodé, «Tomato seed (*Solanum lycopersicum*) meal derived from agrifood waste as functional ingredient: Nutritional value, antioxidant and antimicrobial activities, and functional properties,» *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 2024, n. 1, p. 8824581, 2024.
- [75] T. E. H. N. I. A. T. Shahzad, I. J. A. Z. Ahmad, S. H. A. H. N. A. Z. Choudhry, M. K. Saeed e M. N. Khan, «DPPH free radical scavenging activity of tomato, cherry tomato and watermelon: Lycopene extraction, purification and quantification,» *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 6, n. 2, pp. 223-228, 2014.