



**UNIVERSITA' DELLA CALABRIA**

*Corso di Dottorato in:*

**"Metodologie per lo sviluppo di molecole d'interesse farmacologico"**

*(MDMP, XXII ciclo)*

**Semisynthetic pathways for the preparation of metabolites of secoiridoids of**

*Olea europaea*

CHTM/06 CHIMICA ORGANICA

*Coordinatore*

**Prof. Bartolo Gabriele**

*Supervisore*

**Prof. Giovanni SINDONA**

*Dottoranda*

**Dott.ssa Maria Anna CARAVITA**

A.A. 2009

# Sommario

CAPITOLO I.....	5
<i>Strategie e processi sintetici nella Green Chemistry</i> .....	5
1.1 Introduzione.....	5
1.2 Che cos'è la Green Chemistry.....	5
1.3 Importanti settori di sviluppo per la Green Chemistry.....	7
1.3.1 <i>Uso di materiali di stoccaggio alternativi</i> .....	8
1.3.2 <i>Analisi dei processi sintetici</i> .....	8
1.3.3 <i>Condizione di reazione e solventi utilizzati</i> .....	9
1.3.4 <i>Riduzione del consumo di energia</i> .....	10
1.4 <i>Prospettive future</i> .....	10
CAPITOLO II.....	12
<i>Importanza della catalisi nella Green Chemistry e la reattività dell'Er (III)</i> .....	12
2.1 Introduzione.....	12
2.2 Attività catalitica dei triflati metallici in H <sub>2</sub> O.....	14
2.3 Uso della spettrometria di massa tandem nello studio dell'acidità di Lewis di lantanidi (III).....	20
2.4 Erblio (III) triflato.....	22
CAPITOLO III.....	23
<i>L'olivicoltura</i> .....	23
3.1 La storia dell'Olio di Oliva.....	23
3.2 Caratteristiche della pianta.....	24
3.2.1 <i>Le cultivar</i> .....	27
3.3 Epoca di raccolta e qualità dell'olio.....	27
3.4 L'olio di oliva.....	29
3.4.1 <i>Composizione</i> .....	29
3.4.2 <i>Classificazione</i> .....	31
3.4.3 <i>Olio da agricoltura biologica</i> <sup>46</sup> .....	33
3.4.4 <i>Le relazioni con la salute</i> .....	34
3.4.5 <i>Sicurezza e Qualità</i> .....	36
3.5 Situazione dell'olivicoltura.....	37
3.5.1 <i>L'Olivicoltura nel mondo</i> .....	37
3.5.2 <i>L'olivicoltura in Italia</i> .....	37
CAPITOLO IV.....	39
<i>Manipolazione chimica dell'oleuropeina</i> .....	39
4.1 Introduzione.....	39
4.2 Derivati agliconici di secoiridoidi.....	41
4.3 Conclusioni.....	48
CAPITOLO V.....	49
<i>Parte sperimentale</i> .....	49
5.1 Strumentazione e reagenti.....	49
5.2 Manipolazione chimica dell'oleuropeina.....	50
5.2.1. a <i>Estrazione dell'oleuropeina da foglie d'ulivo secche</i> .....	50
5.2.1. b <i>Procedura di sintesi dell'aglicone</i> .....	50
5.2.1. c <i>Procedura di sintesi della aglicone dell'oleuropeina etilato</i> .....	51
5.2.1. d <i>Procedura di sintesi dell'aglicone dell'oleuropeina metilato</i> .....	53
5.2.1. e <i>Procedura di sintesi dell'aglicone dell'oleuropeina O-Fenile</i> .....	54

<i>5.2.1. f Procedura di sintesi dell'aglicone dell'oleuropeina O-Benzile</i> .....	55
<i>5.2.1. g Procedura di sintesi dell'aglicone palmitoil oleuropeina</i> .....	55
<i>5.2.1. h Procedura di sintesi dell'aglicone oleil-oleuropeina</i>	56
<i>5.3.1. a Estrazione della demetiloleuropeina da drupe invaiate.</i> .....	57
<i>5.3.1.b Procedura di sintesi dell'aglicone della demetioleuropeina (oleopentadiale)</i> .....	58
<b>Bibliografia</b> .....	59



# CAPITOLO I

## ***Strategie e processi sintetici nella Green Chemistry***

### ***1.1 Introduzione***

Le problematiche ambientali hanno focalizzato le attenzioni delle diverse nazioni, impegnate ormai da qualche anno nella promozione di uno sviluppo eco-compatibile.

Secondo questa linea di tendenza, la progettazione e il raggiungimento di tale sviluppo passa anche attraverso l'utilizzo di varie discipline chimiche e di scienze molecolari, ovvero tramite la cosiddetta Green Chemistry.

La Green Chemistry si prefigge di raggiungere contemporaneamente obiettivi economici e ambientali attraverso l'uso di sani e importanti principi scientifici. Recentemente è stata proposta una strategia di base per creare rapporti tra industria e mondo scientifico, dando così origine a ricerche che costituiscano il motore dello sviluppo economico. Questo concetto è definito da alcune scuole di economia come la filosofia del "*triple bottom line*", ritenendo che un'iniziativa possa essere economicamente sostenibile allorché vengano soddisfatti gli obiettivi di protezione ambientale, i benefici sociali e i vantaggi di mercato. L'obiettivo futuro dell'industria chimica è, quindi, di non applicare tecnologie eco-compatibili se economicamente svantaggiose ma nello stesso tempo evitare un mercato che ignori completamente le esigenze ambientali.

Per questo motivo anche l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), già da qualche anno, si sta profondamente impegnando nella promozione della Green Chemistry.

Attraverso la strada della Green Chemistry, infatti, la IUPAC si sta adoperando per spostare l'attenzione di organizzazioni multinazionali sul problema dell'ambiente attraverso la promozione di regole prioritarie, indispensabili per tale settore della chimica.

### ***1.2 Che cos'è la Green Chemistry***

La filosofia di base della *Green Chemistry* può essere definita come:

*Creazione, progettazione e applicazione di prodotti e processi chimici che riducano od eliminino l'uso e la formazione di*

*sostanze pericolose.*

Il termine sostanza pericolosa non si limita solo a sostanze fisicamente pericolose, quali esplosivi, infiammabili e corrosivi, ma include anche sostanze di acuta e cronica tossicità, sostanze cancerogene e di tossicità ecologica.

Inoltre tale termine tratta tutte quelle sostanze che mettono in pericolo l'intero sistema globale alterando per esempio l'ozono stratosferico o altre risorse chimiche persistenti.

La Green Chemistry si pone come obiettivo lo sviluppo di processi e tecnologie chimiche incapaci di produrre inquinamento. A tal punto, con l'intento di sviluppare regole che possano sostenere lo sviluppo industriale e il suo impatto ambientale, nel 1990 gruppi di ambientalisti pongono, insieme a Paul Anastas, il concetto di tale filosofia al centro dell'attenzione della ricerca e dello sviluppo. Si da origine quindi a principi necessari all'economia e nel rispetto dell'ambiente. I principi, articolati da Anastas e Warner, sono:

1. Evitare la produzione di reflui piuttosto che trattarli o depurarli una volta formati.
2. Progettare metodi sintetici che incorporino nel prodotto finale tutti i materiali nel processo stesso.
3. Progettare, nei modi possibili, metodologie sintetiche che usino e generino sostanze con bassa o nulla tossicità per la salute umana e l'ambiente.
4. Progettare prodotti che preservino l'efficacia della funzione abbassandone la tossicità.
5. Evitare sostanze ausiliari (es. solventi, prodotti per la separazione ecc.) o che siano innocue quando necessario l'utilizzo.
6. Riconsiderare il consumo dell'energia alla luce del suo impatto ambientale ed economico. Condurre quindi i metodi sintetici a temperatura e pressione ambientale.
7. Cercare di ottenere materiale di scarto o stoccato rimovibile piuttosto che disperderlo nell'ambiente, ogni volta fattibile sia da un punto di vista tecnico che economico.
8. Evitare, ogni qualvolta sia possibile, derivatizzazioni (gruppi bloccanti, protezioni-deprotezioni, modifiche temporanee di processi chimico-fisici).
9. Progettare metodi sintetici per l'uso di reagenti utilizzabili in quantità catalitiche (selettivi quanto più possibili) piuttosto che

reagenti in quantità stechiometriche.

10. Progettare prodotti chimici che alla fine del loro utilizzo non persistano nell'ambiente e diano prodotti di degradazione innocui.
11. Dare contributi allo sviluppo di metodologie analitiche in grado di monitorare in tempo reale i processi prevedendone la formazione di sostanze pericolose.
12. Usare sostanze che in un processo chimico minimizzino i potenziali incidenti chimici (rilascio nell'ambiente, esplosioni, incidenti).

Tali principi motivano la chimica sotto ogni aspetto, dalla ricerca all'educazione, dando origine a diverse iniziative utili ad illustrare le grosse potenzialità della Green Chemistry.

### **1.3 Importanti settori di sviluppo per la Green Chemistry**

La Green Chemistry è un campo in cui l'esigenza di adottare tecnologie eco-compatibili e le esigenze di mercato riescono a convivere. Pertanto attività come la *Sustainable Chemistry* (Parigi, Febbraio 1998), appoggiate da diverse nazioni, promuovono lo sviluppo di prodotti e processi eco-compatibili dando una identificazione alle aree di sviluppo della Green Chemistry. Attraverso diverse iniziative infatti vengono stipulate linee programmatiche di chimica eco-compatibile discusse ad un Workshop a Venezia (Ottobre 1998) in presenza di università, industrie e 22 rappresentanze nazionali e approvate a Parigi in un Meeting dell'OECD "Risk Management Programme" (6 Giugno 1999).

Le aree di sviluppo della Green Chemistry sono identificate nel seguente modo:

- ◆ Uso di materiali di stoccaggio alternativi;
- ◆ Uso di reagenti innocui;
- ◆ Impiego di processi naturali;
- ◆ Uso di solventi alternativi;
- ◆ Programmazione di una sicurezza chimica;
- ◆ Sviluppo di condizioni di reazione alternativi;
- ◆ Minimizzo dell'uso di energia.

Tuttavia uno dei punti fondamentali per un minor spreco di reagenti chimici è la sostituzione nella sintesi organica classica di reagenti inorganici usati in quantità stechiometriche con reagenti usati in quantità catalitiche. Le reazioni inoltre diventano sempre più efficienti se propongono una maggiore selettività del prodotto di reazione e se danno ottime rese. La loro efficienza viene valutata usando un nuovo parametro espresso nel concetto di "*atom economy*".

Il concetto di “*atom economy*” si sviluppa in aggiunta al concetto di “*reaction efficiency*” che si basa essenzialmente sulla resa effettiva di una reazione.

Come espresso da Trost,<sup>4</sup> una trasformazione sintetica con una resa del 100% ma accompagnata da una quantità sostanziale di spreco, non è atom economical.

*Atom economy è il rapporto tra il peso molecolare della molecola target e la somma dei pesi molecolari di tutte le sostanze prodotte in quantità stechiometriche coinvolte nella reazione.*

Dal punto di vista della Green Chemistry quindi, reazioni che hanno un atom economy pari a 1.0 hanno una efficiente trasformazione sintetica, facilmente individuabili perchè non danno origine a sottoprodotti.

### *1.3.1 Uso di materiali di stoccaggio alternativi*

Le sintesi e l'uso di alcune sostanze chimiche avvengono attraverso la scelta di materiali di partenza che danno più efficacia alla sintesi stessa. Spesso però tale scelta può essere uno dei più importanti fattori che determinano l'impatto ambientale del processo chimico in questione. Lo smaltimento, per esempio, di alcuni sottoprodotti o la purificazione di altri, possono implicare processi chimici poco eco-compatibili. La scelta quindi di una sostanza non necessariamente pericolosa, la cui sintesi però o l'isolamento causano rischi o implicano l'uso di sostanze tossiche, deve essere effettuata tenendo conto anche di tali fattori.

Il ricorrere, per esempio, all'uso di risorse presenti in natura, può in qualche modo dare maggiore eco-compatibilità rispetto all'uso di altre risorse come per esempio la petrolchimica. Cosicché l'oleochimica, una branca della chimica che usa oli e grassi vegetali assume particolare importanza sia nella cosmesi, che nella sintesi polimerica e nella produzione di lubrificanti.

Un'utile alternativa invece all'uso di catalizzatori tossici in diverse trasformazioni sintetiche sembra essere la luce. Oltre all'uso dell'ultravioletto viene promosso l'uso della luce solare, dando rilievo al campo della fotochimica. Vengono quindi promossi tutti quei catalizzatori abili sotto radiazioni nel campo del visibile o sotto raggi solari.

### *1.3.2 Analisi dei processi sintetici*

Oltre alla tossicità dei reagenti in gioco, spesso in un processo sintetico assume particolare importanza l'analisi oggettiva degli step di reazione coinvolti. È



importante quindi chiedersi se una trasformazione sintetica necessita di reagenti tossici o può il composto finale essere ottenuto tramite step di reazioni alternativi che permettono l'uso di reagenti meno tossici. È necessario quindi un'analisi oggettiva che tenga conto di vari punti necessari alla Green Chemistry tra cui:

1. Cercare di avere meno spreco possibile;
2. Servirsi di processi sintetici che siano selettivi evitando processi di purificazione successivi;
3. Usare, in un processo sintetico di catalisi, reagenti che siano efficienti in quantità veramente catalitiche, e che siano recuperabili dopo il processo stesso. Questo implicherebbe una catalisi efficiente (oltre che efficace). Un vasto numero infatti di processi industriali avvengono attraverso l'uso di acidi inorganici o minerali. In condizioni di catalisi, alcuni richiedono (esempio il processo catalitico di acilazione con  $\text{AlCl}_3$ ) quantità stechiometriche di catalizzatore con conseguenti processi di neutralizzazione, di purificazione che non favoriscono né il costo né l'impatto ambientale del processo stesso. L'uso quindi di catalizzatori che siano utilizzabili in quantità veramente catalitiche e recuperabili dopo il processo chimico da un grosso contributo a ciò che rappresenta la Green Chemistry.

### *1.3.3 Condizione di reazione e solventi utilizzati*

L'utilizzo di solventi nell'industria chimica è quasi sempre una prerogativa necessaria in qualunque processo chimico. Anche su questo punto la Green Chemistry ha posto dei punti salienti che rendono sempre di più un processo eco-compatibile. Un solvente deve cercare di essere il meno tossico possibile e poco nocivo alla salute dell'uomo (quali i solventi clorurati). Si deve inoltre evitare spreco di solvente, usandone solo la quantità necessaria al processo sintetico, e l'uso di solventi che provochino danni all'ambiente. Grande importanza assumono quindi quelle aree di ricerca che prevedono l'utilizzo di solventi alternativi quali fluidi supercritici, applicazioni acquose, liquidi ionici e tanti altri. Negli ultimi anni, per esempio, l'uso di solventi supercritici ha dato un notevole numero di benefici. Uno di questi è la contemporanea realizzazione della reazione con processi di separazione, dimostrabile con l'abilità di poter gestire il solvente attraverso variazioni di temperatura e pressione. In questo contesto, il diossido di carbonio, grazie alle sue caratteristiche chimico-fisiche ( $T_c = 31.1\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $P_c = 74\text{ bar}$ ) è quello più facilmente utilizzabile rispetto a tant'altri (

l'acqua per esempio ha  $T_c = 374 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $P_c = 221 \text{ bar}$ ). Come solvente di conseguenza, oltre a non esser tossico e non infiammabile, ha il vantaggio di esser facilmente separabile.

L'uso dell'acqua come mezzo di reazione è un'ulteriore sviluppo di notevole importanza nell'ambito della Green Chemistry. Passi da gigante sono stati fatti sull'uso di solventi acquosi, evitando così la realizzazione di condizioni di reazione estremamente anidre che coinvolgono sia sprechi energetici che economici. Molti di questi processi sintetici ultimamente sono processi catalici. L'uso di catalizzatori in mezzi acquosi, esempio ne sono i triflati metallici esposti da Kobayashi, , da origine infatti ad una efficienza sintetica non indifferente.

#### *1.3.4 Riduzione del consumo di energia*

Per poter garantire un miglior impatto ambientale, la progettazione di un processo sintetico dev'essere effettuata cercando di minimizzare ogni forme di energie, dalle termiche alle meccaniche.

L'area della catalisi è spesso considerata il "pilastro fondamentale" della Green Chemistry. Questo in quanto i processi catalitici, oltre a minimizzare la quantità di reagenti necessaria, permettono di evitare processi di separazione per la loro elevata selettività, minimizzando quindi di gran lunga consumo energetico.

L'uso quindi di processi catalitici coinvolge molte aree promosse dalla Green Chemistry diventando a tal punto l'area di maggiore interesse per molti studiosi.

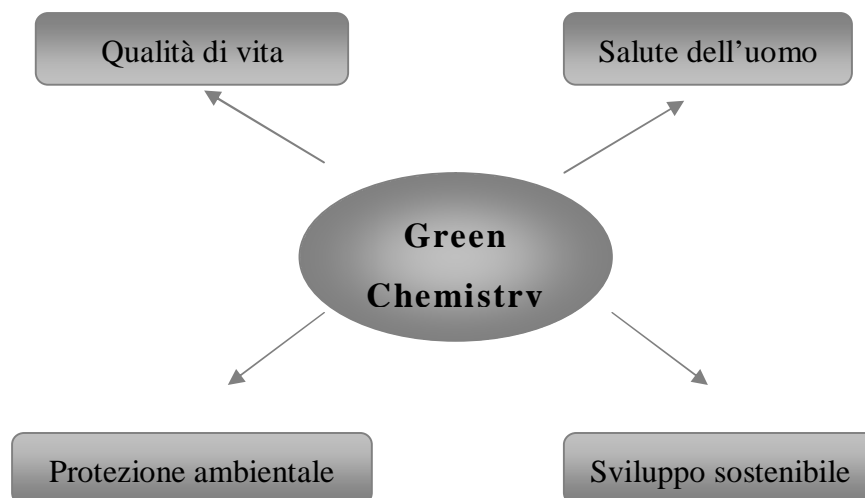
### **1.4 Prospettive future**

Le prospettive future per un maggiore coinvolgimento della Green Chemistry alla risoluzione dei problemi di sviluppo tecnologico-scientifico riguardano diversi aspetti proprio per la complessità dei principi cardini della stessa Green Chemistry.

Tali principi sono anche un inizio sostanziale per la chimica nel tentare di trattare quel contesto etico nel quale l'umanità è stata messa al potere da scienza e tecnologia.

Così, anche se la Green Chemistry, intraprende diverse attività che riguardino la protezione ambientale, lo Schema 1.1 mostra che i suoi interessi si sviluppano in un contesto molto più complesso e vasto.

La filosofia della Green Chemistry apporta notevoli contributi alla qualità della vita, alla salute dell'uomo, e allo sviluppo sostenibile.



Schema 1.1: La Green Chemistry rivolta alle maggiori aree di sviluppo nella chimica moderna.

Prima che la Green Chemistry possa contribuire pienamente a queste aree, deve essere parte integrante nella disciplina della chimica stessa. Ciò comporta un grosso numero di prospettive nell'ambito della chimica che partono dalla ricerca, alla progettazione. Il tutto tenendo conto della sostenibilità economica e di un maggiore sviluppo eco-compatibile.

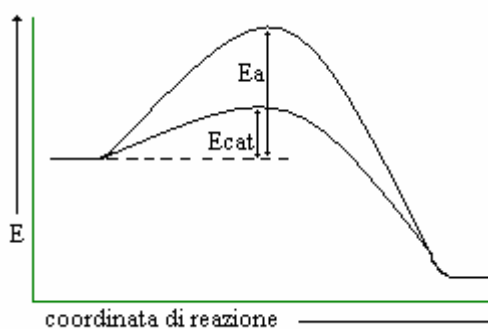
## CAPITOLO II

### ***Importanza della catalisi nella Green Chemistry e la reattività dell'Er (III)***

#### **2.1 Introduzione**

E' noto che esistono molte reazioni che pur avendo costanti di equilibrio di elevato valore, procedono con velocità estremamente basse. Per rendere di pratica utilità tali reazioni, particolarmente per processi industriali, è importante trovare una via per aumentarne la velocità. E' proprio questo il problema affrontato dalla catalisi.

In accordo con la definizione formale abituale, un catalizzatore è una specie (o qualsiasi sostanza) che aumenta la velocità di reazione chimica senza subire trasformazioni, e senza essere presente in quantità stechiometriche di reazione. Essi riescono a far aumentare la velocità di reazione permettendo nuovi cammini di reazione. A tal fine offrono ai reagenti e ai prodotti la possibilità di interconvertirsi secondo un nuovo percorso caratterizzato da un'energia di attivazione ( $E_{cat}$ ) minore a quello originario ( $E_a$ ) (Figura 2.1).



**Figura 2.1**

In Figura 2.1, il processo non catalizzato e quello catalizzato sono mostrati entrambi come costituiti da un unico evento con un'unica barriera di attivazione. Nella realtà, accade spesso che le reazioni catalizzate procedono attraverso la successione di più eventi, tutti con energia di attivazione ridotta.

L'aumento della selettività di reazione è un altro aspetto che si riscontra spesso nei processi catalizzati. Il loro impiego consente lo svolgimento di molte trasformazioni a temperature più moderate e in condizioni più blande.

Tutti questi vantaggi fanno in modo che la catalisi diventi una delle basi

fondamentali per l'impiego e lo sviluppo della Green Chemistry.

Una delle catalisi più importanti che ha avuto molta attenzione nella sintesi organica è la catalisi acida di Lewis.

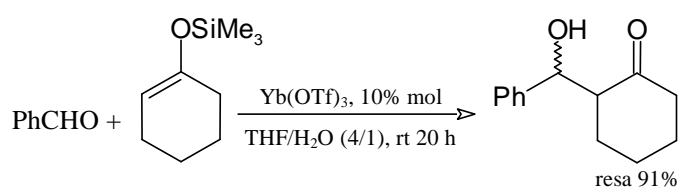
Negli ultimi anni sono stati sviluppati e applicati nell'industria chimica vari tipi di catalizzatori acidi di Lewis. Naturalmente le caratteristiche chimiche richieste a questi catalizzatori sono molto importanti, in quanto essi devono essere usati in particolari condizioni di reazione. Generalmente per il loro uso sono richieste condizioni strettamente anidre. La presenza infatti, anche in minima quantità di acqua, blocca la reazione, poiché la reazione dell'acido di Lewis con l'acqua è favorita e immediata rispetto a quella con il substrato.

In aggiunta, ciò che è richiesto ad un catalizzatore è la capacità di essere recuperato alla fine del processo.

Questi svantaggi riducono l'utilizzo degli acidi di Lewis nella sintesi organica, a scapito delle loro potenzialità d'applicazione.

D'altra parte, nel corso di ricerche per sviluppare nuove metodologie sintetiche, è stato trovato che i triflati metallici [ $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ ,  $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ , ecc.] possono essere utilizzati come catalizzatori acidi di Lewis in solventi contenenti acqua.

Un esempio di attività catalitica di triflati metallici in mezzi acquosi è la reazione dei sililenol eteri con benzaldeide; questo tipo di condensazione (condensazione alcolica di Mukaiyama) è condotta utilizzando come catalizzatore acido di Lewis l' $\text{Yb}(\text{OTf})_3$  in acqua e THF in rapporto 1:4 per dare il corrispondente addotto aldolico in alte rese (schema 2.1).



### Schema 2.1

Quando la stessa reazione è condotta in THF anidro la resa è molto bassa. Ciò dimostra che il catalizzatore non solo riesce ad essere compatibile con l'acqua ma è l'acqua stessa ad attivarlo, probabilmente per dissociazione del controione dall'acido metallico. L'intero processo inoltre permette un recupero e un riutilizzo del catalizzatore senza particolare difficoltà.

Tutte queste caratteristiche permettono di:

- ◆ non anidrificare i solventi e i substrati, minimizzando i costi del processo;

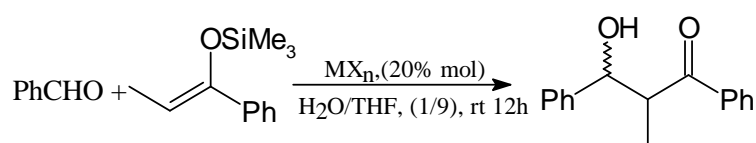
- ◆ avere una maggiore ecocompatibilità dovuta all'uso dell'acqua come mezzo di reazione con conseguente notevole contributo allo sviluppo della Green Chemistry;
- ◆ rendere molte reazioni di catalisi enzimatica più efficienti e stereoselettive grazie all'elevato valore di costante dielettrica dell'acqua.

Utilizzando le caratteristiche chimico fisiche dell'acqua è possibile dare origine a una serie di processi chimici catalitici non ottenibili in condizioni di reazioni anidre.

## 2.2 Attività catalitica dei triflati metallici in H<sub>2</sub>O

Come sopra menzionato, Sc(OTf)<sub>3</sub>, Y(OTf)<sub>3</sub>, e triflati lantanidi (Ln(OTf)<sub>3</sub>) come Yb(OTf)<sub>3</sub>, mostrano una forte attività catalitica in solventi acquosi. Tuttavia questi sistemi catalitici necessitano di un co-solvente (come il THF nella reazione precedentemente citata) necessario per la solubilità del substrato organico. Questo dettaglio mostra il vantaggio di un facile ed efficiente recupero del catalizzatore riutilizzabile in processi sintetici successivi.

Per poter testare l'attività catalitica di molti acidi di Lewis e cercare di capire la loro compatibilità con l'acqua, uno studio sistematico dell'attività dei cationi metallici ha previsto uno screening dei cloruri prima, perclorati e triflati dopo, dei metalli appartenenti ai gruppi 1-15, testandoli sulla reazione di condensazione aldolica di Makaiyama (schema 2.2).



**Schema 2.2**

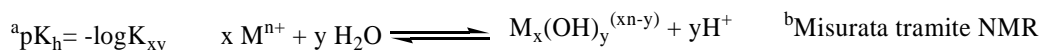
In particolare per quel che riguarda perclorati e triflati è stato scoperto che diversi catalizzatori metallici sono sia stabili che attivi in H<sub>2</sub>O. Esiste inoltre una correlazione fra l'attività catalitica in H<sub>2</sub>O e due particolari costanti caratteristiche dei cationi metallici: la costante d'idrolisi, K<sub>h</sub>, e la WERC (costante di velocità di scambio di molecole di H<sub>2</sub>O nella sfera di coordinazione del metallo).<sup>7</sup> La tabella 2.1 mostra i valori delle costanti per ogni catione metallico.

**Tabella 2.1.** Valori di  $K_h^a$  e WERC<sup>b</sup>

		M <sup>+2</sup>											Be <sup>+3</sup>		
		pK <sub>h</sub>											WERC		
Li <sup>+1</sup> 13.64 4.7x10 <sup>7</sup>	-												-	-	-
Na <sup>+1</sup> 14.18 1.9x10 <sup>8</sup>	Mg <sup>+2</sup> 11.44 5.3x10 <sup>5</sup>												Al <sup>+3</sup> 4.97 1.6x10 <sup>0</sup>	Si <sup>+4</sup> -	P <sup>+5</sup> -
K <sup>+1</sup> 14.46 1.5x10 <sup>8</sup>	Ca <sup>+2</sup> 12.85 5x10 <sup>7</sup>	Sc <sup>+3</sup> 4.3 4.8x10 <sup>7</sup>	Ti <sup>+4</sup> ≤2.3	V <sup>+3</sup> 2.26 1x10 <sup>3</sup>	Cr <sup>+3</sup> 4.0 58 <sup>-7</sup>	Mn <sup>+2</sup> 3.1 4x10 <sup>7</sup>	Fe <sup>+2</sup> 9.5 3.2x10 <sup>6</sup>	Co <sup>+2</sup> 9.65 2x10 <sup>5</sup>	Ni <sup>+2</sup> 9.86 5x10 <sup>8</sup>	Cu <sup>+2</sup> 7.53 2x10 <sup>8</sup>	Zn <sup>+2</sup> 8.96 5x10 <sup>8</sup>	Ga <sup>+3</sup> 2.6 7.6x10 <sup>2</sup>	Ge <sup>+4</sup> -	-	
-	-	Y <sup>+3</sup> 7.7 1.3x10 <sup>7</sup>	Zr <sup>+4</sup> 0.22	Nb <sup>+5</sup> (0.6)	Mo <sup>+5</sup> -	-	Ru <sup>+3</sup> -	Rh <sup>+3</sup> 3.4 3x10 <sup>-8</sup>	Pd <sup>+2</sup> 2.3	Ag <sup>+1</sup> 12 >5x10 <sup>6</sup>	Cd <sup>+2</sup> 10.08 >2x10 <sup>8</sup>	In <sup>+3</sup> 4 40 x10 <sup>4</sup>	Sn <sup>+4</sup> -	Sb <sup>+5</sup> -	
-	Ba <sup>+2</sup> 13.47 >6x10 <sup>7</sup>	Ln <sup>+3</sup> 7.6-8.5 10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup>	Hf <sup>+4</sup> 0.25	Ta <sup>+5</sup> (-1)	W <sup>+6</sup> -	Re <sup>+5</sup> -	Os <sup>+3</sup> -	Ir <sup>+3</sup> -	Pt <sup>+2</sup> 4.8	Au <sup>+1</sup> -	Hg <sup>+2</sup> 3.40 2x10 <sup>9</sup>	Tl <sup>+3</sup> 0.62 7x10 <sup>5</sup>	Pb <sup>+2</sup> 7.71 7.5x10 <sup>9</sup>	Bi <sup>+3</sup> 1.09 -	

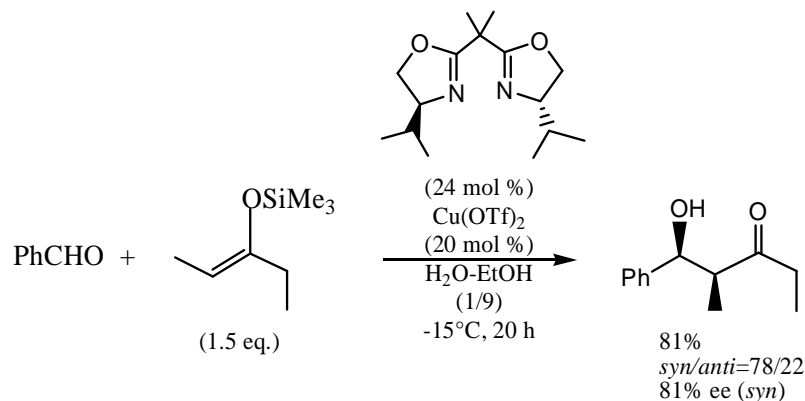
La <sup>+3</sup> 8.5 2.1x10 <sup>8</sup>	Ce <sup>+3</sup> 8.3 2.7x10 <sup>8</sup>	Pr <sup>+3</sup> 8.1 3.1x10 <sup>8</sup>	Nd <sup>+4</sup> 8.0 3.9x10 <sup>8</sup>	-	Sm <sup>+3</sup> 7.9 5.9x10 <sup>-7</sup>	Eu <sup>+3</sup> 7.8 6.5x10 <sup>8</sup>	Gd <sup>+3</sup> 8.0 6.3x10 <sup>7</sup>	Tb <sup>+3</sup> 7.9 7.8x10 <sup>7</sup>	Dy <sup>+3</sup> 8.0 6.3x10 <sup>7</sup>	Ho <sup>+3</sup> 8.0 6.1x10 <sup>7</sup>	Er <sup>+3</sup> 7.9 1.4x10 <sup>8</sup>	Tm <sup>+3</sup> 7.7 6.4x10 <sup>6</sup>	Yb <sup>+3</sup> 7.7 8x10 <sup>7</sup>	Lu <sup>+3</sup> 7.6 6x10 <sup>7</sup>
--	--	--	--	---	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--



$$K_{xy} = \frac{[M_x(OH)_y^{(xn-y)}][H^+]^y}{[M^{n+}]^x}$$

Composti metallici che danno, nella reazione di Makaiyama, una resa superiore al 50 % hanno  $4,3 < pK_h < 10,8$  e una  $WERC > 3,2 \cdot 10^6 M^{-1} s^{-1}$ .

I cationi con valori di  $pK_h$  minore di quattro danno elevate quantità di protoni con conseguente decomposizione del silil enol etere (schema 2.2), diversamente valori di  $pK_h$  maggiori di dieci danno una scarsa acidità di Lewis da non riuscire a catalizzare la reazione in esame. Sono inoltre necessari alti valori di WERC per poter consentire una efficiente velocità di scambio del catione metallico tra molecole di acqua e molecole di aldeide da attivare. Queste scoperte hanno indotto ad investigare gli acidi di Lewis in acqua con più attenzione, cercando di paragonarne i risultati con quelli ottenuti in condizioni anidre, in particolar modo su processi catalitici di reazioni asimmetriche. È stato visto che la combinazione di  $Cu(OTf)_2$  e bis(ossazolona) al 24mol% in etanolo acquoso da, anche per aldeidi semplici come la benzaldeide, il prodotto aldolico con buona enantioselettività (schema 2.3), mentre lo stesso processo condotto in solventi anidri diventa efficiente sol per aldeidi bidentate.



**Schema 2.3**

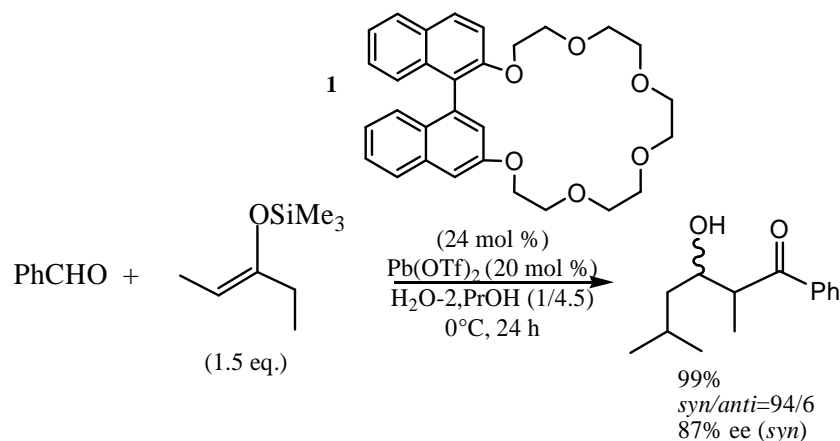
La stessa reazione condotta in etanolo o diclorometano anidro avviene in basse rese e con cattiva selettività (resa del 10 %, syn/anti = 70/30, 41% ee (syn) in etanolo; resa dell'11%, syn/anti = 68/32, 20% ee (syn) in diclorometano).

Questi risultati indicano che le molecole di acqua non solo accelerano la reazione ma giocano un ruolo essenziale nell'enantioselettività del processo in esame.

Tuttavia è poco chiaro il ruolo dell'acqua nel meccanismo di reazione, ma si ipotizzano diversi fattori che ne caratterizzano il processo:

- (1) La coordinazione delle molecole di acqua al metallo con conseguente dissociazione del controione, implica una diversa struttura del catalizzatore e una diversa reattività rispetto a condizioni di reazioni anidre;
- (2) La formazione dello stadio intermedio di reazione caratterizzata dalla formazione del complesso metallo aldolato, è favorita da una maggiore solubilità dello stesso in acqua, favorendone l'attività catalitica rispetto a solventi anidri;
- (3) I cationi silili, prodotti nella reazione alcolica, sono spesso responsabili di prodotti di racemizzazione diminuendo l'enantioselettività del processo stesso. La loro facile idrolisi in solventi acquosi evita tali inconvenienti.

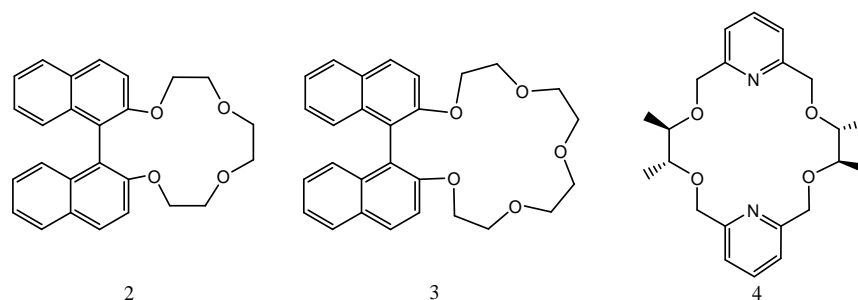
Un altro esempio di reazione aldolica asimmetrica in mezzi acquosi è l'uso di Pb(OTf)<sub>2</sub> con composti eterici a corona (Schema 2.4).



**Schema 2.4**



In tal caso, la perfetta combinazione tra il catione metallico e l'anello a corona è il principale fattore per una buona stereoselettività, pertanto le dimensioni del catione metallico e la struttura dell'etere corona sono le principali componenti per garantire una perfetta combinazione e un'efficiente stereoselettività del processo catalitico. Altri legandi eteri-corona testati nella reazione tra benzaldeide e il silinol etere sono rappresentati in figura 2.2. la dimensione e la struttura di tali leganti, con il raggio ionico dei cationi metallici testati, influenzano tantissimo la stereoselettività della reazione.



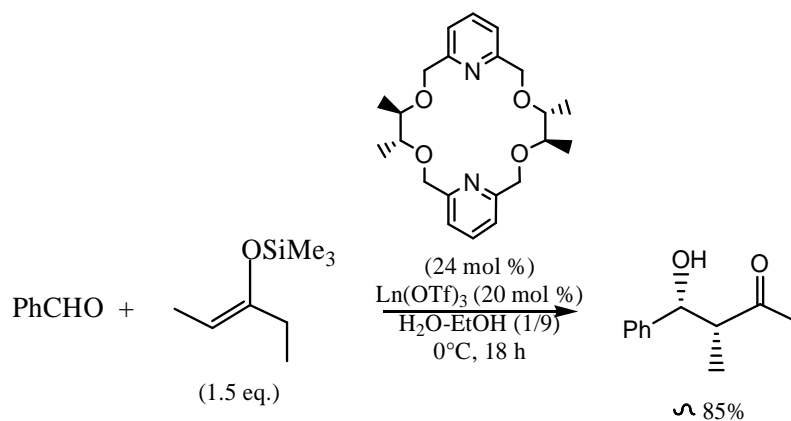
**Figura 2.2**

L'uso dei leganti 1, 2, 3 mostrano un'elevata stereoselettività ma solo l'uso di Pb(II) combinato al legante 1 mostra particolare enantioselettività, come mostrano i risultati in tabella 2.2

**Tabella 2.2:** Effetti stereoselettivi dell'addotto metallo-legante sulla reazione aldolica asimmetrica.

$\text{MX}_n$	legante	resa %	syn/anti	ee (% , sin)
Zn(OTf) <sub>2</sub>	1	88	69/31	2
Cu(OTf) <sub>2</sub>	1	86	87/13	0
Sc(OTf) <sub>3</sub>	2	75	52/48	1
Yb(OTf) <sub>3</sub>	2	74	63/37	1
AgOTf	1	61	75/25	5
Pb(OTf) <sub>2</sub>	1	62	90/10	55
Pb(OTf) <sub>2</sub>	2	78	89/11	0
Pb(OTf) <sub>2</sub>	3	92	89/11	0

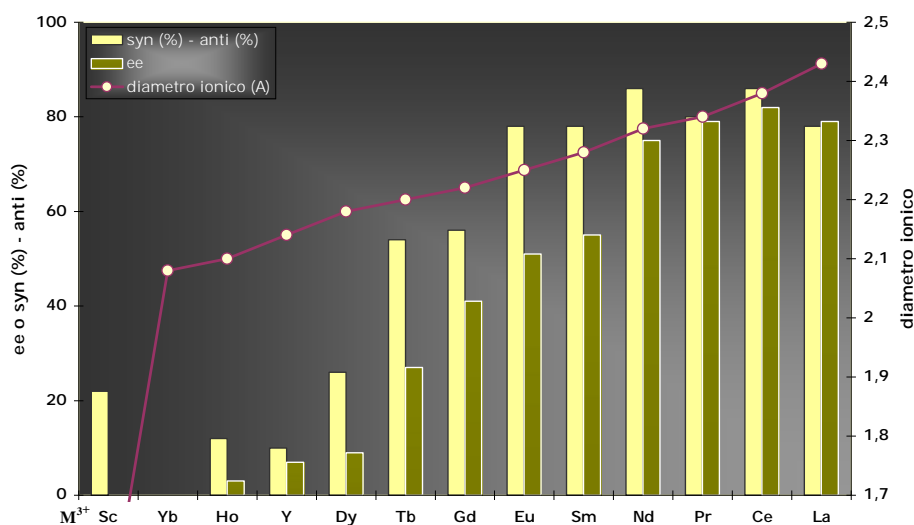
Uno screening su triflati metallici che mostri come la dimensione del catione metallico influenzi la stereoselettività e l'enantioselettività di un processo catalitico è stato condotto sulla reazione aldolica di Mukaiyama dove triflati metallici  $\text{M}^{3+}$  vengono usati come ottimi catalizzatori stereoselettivi combinati con il bis-piridino-18-corona-6 (4). (Schema 2.5).



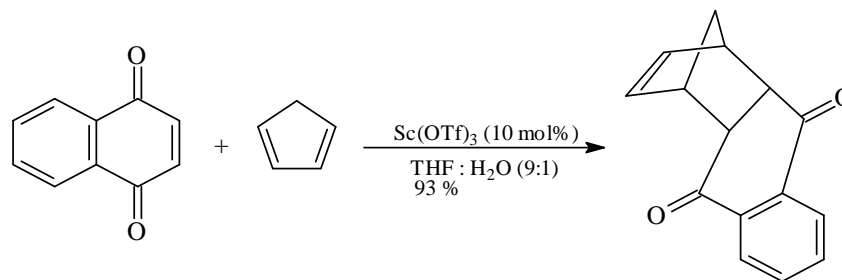
**Schema 2.5**

Come si può evincere dalla Figura 2.3, cationi metallici con largo raggio ionico come La, Ce, Pr e Nd, mostra sia un'alta stereoselettività e un'alta enantioselettività. Cationi invece con piccolo raggio ionico, quali Sc e Yb, non mostrano alcuna enantioselettività (ee).

**Figura 2.3:** Enantio- e diastereoselettività di triflati metallici  $\text{M}^{3+}$  nella reazione alcolica. Ee: ((2R,3R)%-(2S,3S)%). Resa: 49-95%.



Un altro esempio di attività catalitica di triflati metallici in mezzi acquosi è la reazione di Diels-Alder tra il naftochinone e il ciclopentadiene in cui il rapporto THF/ $\text{H}_2\text{O}$  è 9/1. In questa reazione è utilizzato come catalizzatore acido di Lewis lo  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  per dare il corrispondente addotto in alte rese e con un'elevata selettività verso l'addotto endo (endo/exo=100:0) (schema 2.6).



**Schema 2.6**

Altro esempio di particolare rilievo è la reazione di Friedel-Crafts, sulla quale sono basati molti processi industriali. Anche in questo caso i comuni catalizzatori acidi di Lewis usati in passato in questo processo, come per esempio  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{TiCl}_4$ ,  $\text{SnCl}_4$ , sono stati sostituiti in modo eccellente da triflati di lantanidi, che si sono dimostrati particolarmente utili nella reazione di formazione del legame carbonio-carbonio in mezzo acquoso. Questi catalizzatori come è evidente nelle reazioni sopra esemplificate, non solo sono compatibili con l'acqua, ma sono attivati dalla presenza dell'acqua stessa. Probabilmente ciò si deve alla dissociazione dell'anione dal metallo dell'acido di Lewis. Ciò consente che possano essere recuperati alla fine della reazione e riutilizzati.<sup>17</sup>

Infine, i triflati metallici si sono sostituiti in modo eccellente ai comuni catalizzatori acidi di Lewis usati in reazioni selettive su molecole multifunzionali che impongono l'impiego di gruppi protettori. A titolo di esempio valga la reazione d'acetilazione, uno dei processi sintetici maggiormente utilizzato in sintesi organica per proteggere alcoli sia semplici che carboidrati.<sup>18</sup> La reazione usa generalmente anidride acetica come agente acetilante, la cui scissione è promossa da un acido di Lewis.  $\text{In}(\text{OTf})_3$  (0,1 mol %),<sup>19</sup> il  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  (0,1 mol %), lo  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  (0,5 mol %) il  $\text{TMSOTf}$  (2 mol %) sono catalizzatori efficienti in reazioni di acetilazione di diverse tipologie di alcoli. Le rese sono molto elevate e in molti casi, il catalizzatore può essere quantitativamente recuperato e riutilizzato senza perdita della sua attività catalitica.

L'attività catalitica dei lantanidi (III) quindi ha assunto un particolare interesse nella chimica organica e diversi sono gli studi che permettono di valutarne le loro potenzialità catalitiche e la loro relativa acidità. Spesso la spettrometria di massa tandem permette di valutare reattività di composti organici, pertanto tale metodo è stato applicato anche per poter valutare la reattività dei lantanidi.

### 2.3 Uso della spettrometria di massa tandem nello studio dell'acidità di Lewis di lantanidi (III)

Composti lantanidi come il  $\text{CeCl}_3$ ,  $\text{Yb}(\text{OTf})_3$  e  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  sono frequentemente usati come reagente catalitici grazie alla loro elevata acidità di Lewis. Le loro proprietà chimiche, tuttavia, inclusa la reattività, rimangono poco chiare.

Recentemente, tramite spettrometria di massa, si è cercato di dare una valutazione dell'acidità di Lewis di lantanidi. Tramite tale metodologia di analisi viene riscontrata una frammentazione riproducibile di ioni precursori derivati da una serie di complessi di lantanidi (III) triflati usando spettrometria di massa tandem per decomposizione collisione-attivata (CAD). D'altronde, il rapporto dell'intensità dello ione dovuto alla perdita del gruppo triflato e lo ione dovuto alla perdita di un legante, quale l'esametilfosforammide (Figura 2.4) mostra una notevole differenza tra i lantanidi in esame.

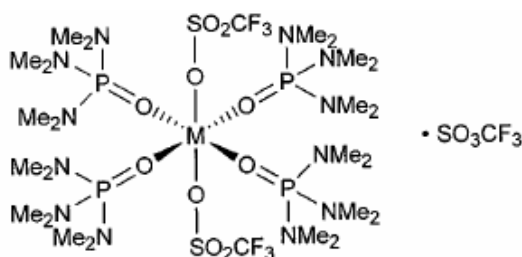
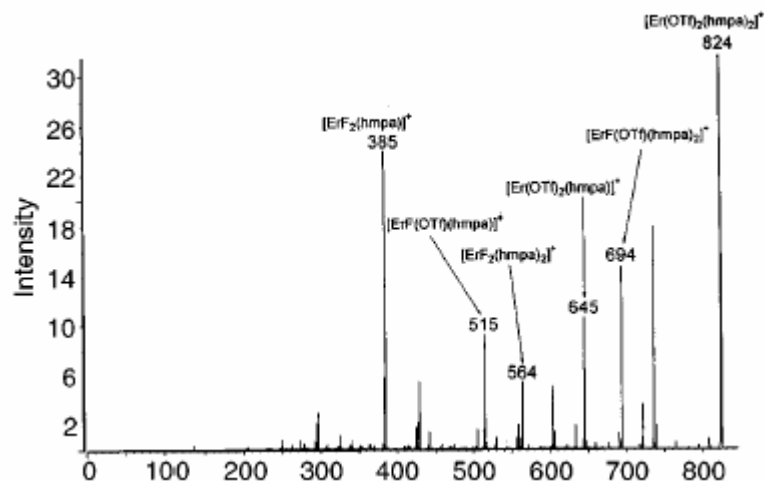


Figura 2.4

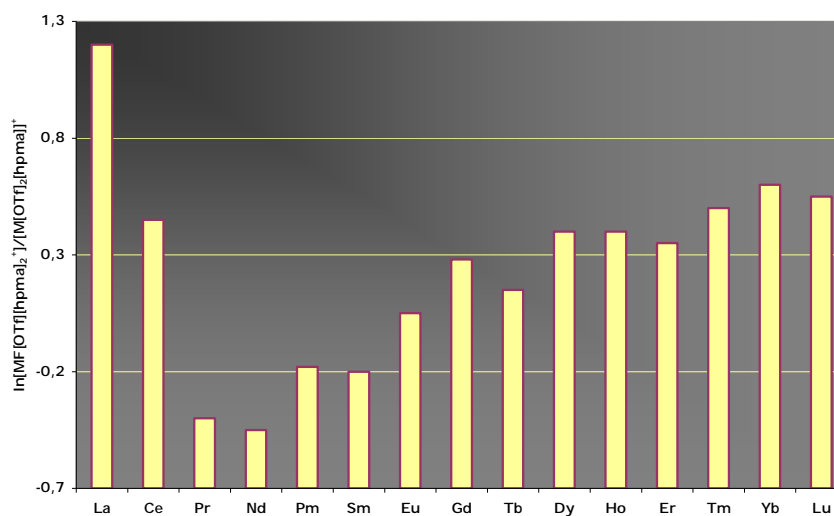
La stabilità degli ioni derivati riflette molto le proprietà elettriche dell'atomo centrale del complesso. Sono stati sintetizzati un totale di 48 composti consistente di tre serie di complessi di lantanidi,  $\text{M}(\text{OTf})_3(\text{hmpa})_4$  (hmpa = esametilfosforammide),  $\text{M}(\text{OTf})_3(\text{tepo})_4$  (trietilfosfina ossido) e  $\text{M}(\text{OTf})_3(\text{tmp})_4$  (tmp = trimetilfosfato), (M = Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb o Lu). Le misure sono condotte tramite EB/EB, JMS-700T (JEOL), usando Xe come gas di collisione con una variabile di voltaggio 0.5-3.0 kV. Il FAB con NBA come matrice è usato per la ionizzazione. Per tutti i complessi lo ione  $[\text{M}(\text{OTf})_3(\text{hmpa})_2]^+$  è il picco base. Lo spettro ionico MS FAB del frammento  $[\text{Er}(\text{OTf})_2(\text{hmpa})_2]^+$  è mostrato in figura 2.5.



**Figura 2.5:** Spettro MS/MS di  $[\text{Er}(\text{OTf})_2(\text{hmpa})_2]^+$  ( $m/z = 824$ ).

In questo spettro viene focalizzata l'attenzione su  $[\text{ErF}(\text{OTf})(\text{hmpa})_2]^+$  e  $[\text{Er}(\text{OTf})_2(\text{hmpa})]^+$  ottenuti dalla perdita rispettivamente di OTf e hmpa. Il logaritmo del rapporto tra le intensità ioniche di tali frammenti è diverso a secondo del metallo in questione (figura 2.6).

Nella perdita di OTf, uno ione fluoruro rimane attaccato all'atomo centrale. Nelle successive frammentazioni si continua ad osservare la perdita o del legante o di (OTf-F). La ritenzione dell'atomo di fluoro è ascritta alla forte affinità del Ln(III) per il fluoro.



**Figura 2.6:**  $\ln \left\{ \frac{[\text{MF}(\text{OTf})(\text{hmpa})_2]^+}{[\text{M}(\text{OTf})_2(\text{hmpa})]^+} \right\}$

I differenti valori logaritmici mostrano le differenti proprietà elettroniche dei metalli in termini di diversa affinità con l'ossigeno e il fluoro.

Lo stesso andamento di affinità dei lantanidi nei confronti dell'ossigeno è riscontrato per i complessi  $\text{M}(\text{OTf})_3(\text{tepo})_4$  e  $\text{M}(\text{OTf})_3(\text{tmp})_4$  e anche in tal caso viene riscontrata la discordanza di Gd, ma l'elevata acidità di Lewis di Sc(III), Y(III) e Yb(III). Questo risultato potrebbe essere dovuto al piccolo raggio ionico

di Sc(III) e Yb(III) mentre la più alta acidità di Yb(III) rispetto a Lu(III) è probabilmente dovuta ad un incompleto numero di elettroni (13) nell'orbitale 4f che rende l'Y più elettrone attrattore.

I risultati riportati in letteratura riguardo lo studio della reattività dei lantanidi e gli scarsi esempi di reattività di alcuni di essi hanno dato modo di sviluppare metodologie di sintesi che coinvolgessero triflati di cerio prima e di erbio dopo per mostrare anche in questo caso, in concordanza con i risultati ottenuti tramite spettrometria di massa, le diverse reattività dei due lantanidi e le loro diverse affinità elettroniche in soluzioni acquose e non acquose.

## **2.4 Erbio (III) triflato**

L'Erbio (III) è uno dei cationi più attivi. Infatti, i suoi valori di  $pK_h$  e di WERC sono 7.9 e  $1.4 \cdot 10^8$  rispettivamente, e sono in perfetto accordo con gli studi di Kobayashi,<sup>1</sup> fatti sulla catalisi acida dei triflati. Tuttavia, il triflato di l'erbio (III) è stato inspiegabilmente trascurato finora, nonostante alcuni suoi ottimi risultati in reazioni riportate in letteratura.

Tutto ciò ha portato il gruppo di ricerca, presso il quale ho svolto questo lavoro di tesi, a studiare la sua attività come catalizzatore acido di Lewis.

L'Er(OTf)<sub>3</sub> può essere riutilizzato senza significativa perdita di attività. Dopo il work-up, la fase acquosa può essere svaporata a pressione ridotta per fornire il sale di Er(III) come solido di colore rosa, che può essere riutilizzato dopo anidificazione per tutta la notte su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Le condizioni sono praticamente neutre: una soluzione 0.1 M di Er(OTf)<sub>3</sub> in acqua è solo debolmente acida (pH 5.9), e lo strato acquoso dopo il work-up risulta anche meno acido (pH 6.6).

Per queste caratteristiche, è stato utilizzato come efficiente catalizzatore per le deprotezioni di acetali e chetali.

## CAPITOLO III

### *L'olivicoltura*

#### **3.1 La storia dell'Olio di Oliva**

In tutte le civiltà sorte nel bacino del mediterraneo, l'olivo è stato sempre ritenuto un albero sacro e l'olio estratto dai suoi frutti veniva utilizzato non solo come alimento ma anche a scopo religioso e rituale<sup>37</sup>: gli Egizi lo consideravano un dono degli dei, i Fenici lo diffusero con il loro commercio, definendolo "oro liquido"; i Greci ed i romani lo usavano per scopi medicamentosi e come combustibile nelle lampade votive; gli Ebrei lo adoperavano per ungere il loro RE; i Cristiani da sempre lo impiegano nei riti più significativi.

Adamo, oramai prossimo alla morte, lo ricevette direttamente da Dio; mentre è proprio un ramoscello d'olivo portato nel becco di una colomba ad annunciare a Noè la fine del diluvio. Ma la leggenda più nota è la sfida tra Atena e Poseidone<sup>38</sup>. Per decisione di Zeus, il possesso della città di Atene e della regione dell'Attica, verrà aggiudicata al dio che fornirà il dono più utile: Poseidone fa venir fuori dalla foresta un meraviglioso cavallo; mentre Atena fa nascere dalle viscere della Terra un nuovo albero, l'**olivo**. Zeus giudica vincitrice la dea sua figlia sostenendo che il cavallo è per la guerra mentre l'olivo è il simbolo della pace. Ma le leggende non finiscono qui, si ricorda: Aristeo, pastore e nomade, che fu il primo ad ottenere l'olio spremendo le olive; un'altra racconta di come Latana partorì i gemelli Diana e Apollo sotto i primi rami di olivo che da allora divenne oggetto di venerazione. Impossibile, infine non menzionare i sacri olivi di Olimpia, con i cui serti (ghirlande) si incoronavano i vincitori delle Olimpiadi.



Quella dell'olio d'oliva è una storia lunga 6000 anni, epoca in cui gli alberi venivano coltivati nell'area siro-palestinese dove sono state rinvenute le più antiche testimonianze di coltivazione. In epoca storica la coltura perfezionata dagli innesti passa dal Nord dell'attuale Siria all'Egitto ed alle

isole greche, soprattutto Cipro, Rodi, Creta, per poi passare alla Grecia ed all'Asia Minore. Il codice babilonese regolava già il commercio dell'olio di oliva; mentre i Fenici e i Greci costruivano apposite navi per il trasporto delle grandi anfore-contenitore. E pare proprio che in Italia la cultura dell'olivo sia stata introdotta dai Greci che lo consideravano un dono della dea Atena. I Romani si specializzarono nell'immagazzinamento e distribuzione dell'olio e razionalizzarono la gestione delle grandi quantità ottenute dai popoli sottomessi.

L'olivo si usava per cosmesi, medicina ed illuminazione, ma il suo posto d'onore era già la cucina, in ricette che si avvicinavano molto a quelle della nostra attuale "dieta mediterranea". Ciò è testimoniato dai leggendari trattati di Apiculus, uno dei primi gastronomi della storia, che già nel primo secolo dopo Cristo rese l'olio onnipresente nelle sue ricette per conservare, condire e cuocere. Dopo un lungo periodo di declino, dovuto alla caduta dell'impero romano ed alle invasioni barbariche, la coltura dell'olivo, sopravvissuta nei monasteri, riacquista un posto preminente dal dodicesimo secolo, quando l'olio torna protagonista dei commerci.

Ai giorni nostri, sono soprattutto gli anni Cinquanta a segnare l'espansione nel resto del mondo della "cultura dell'olio", grazie alla scoperta delle sue ineguagliabili proprietà nutritive.

### **3.2 Caratteristiche della pianta**

L'**olivo**, o ulivo, è una delle piante arboree coltivate più importanti del bacino del Mediterraneo; la principale area di diffusione si stende tra il 30° e il 45° parallelo, una fascia di clima temperato<sup>39</sup>. La pianta predilige terreni asciutti, ben soleggiati, ed al riparo dalle gelate. L'olivo coltivato (*Olea europaea*) appartiene alla famiglia delle Oleaceae (tribù Olineae), questa specie è suddivisa in due sottospecie<sup>40</sup>:

1. *Olea europaea* (oleastro) di taglia bassa e frutti piccoli;
2. *Olea europaea sativa* (olivo coltivato).

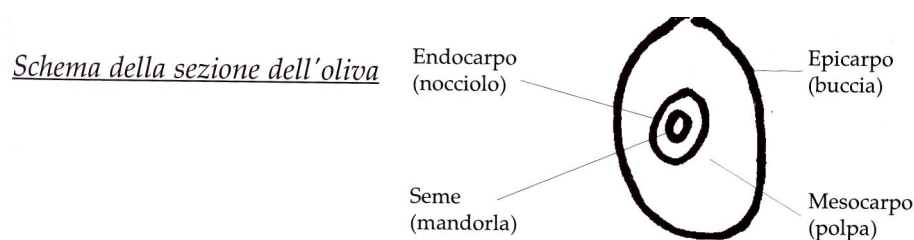
L'olivo è una pianta molto longeva che può raggiungere nelle zone più predisposte anche un'età di centinaia di anni, ed è una pianta sempreverde; l'altezza dell'albero può variare da 3 a 20 m. Nella pianta si distinguono un tronco, nel quale sono inserite le branche che costituiscono lo scheletro principale della chioma: branche principali che si originano direttamente dal tronco, e le branche secondarie che si originano da quelle principali. Le foglie



sono coriacee con picciolo corto. Le gemme sono di tipo ascellare ed il fiore è in genere di tipo ermafrodito con calice di quattro sepali<sup>41,42</sup>. I fiori dell'olivo sono raggruppati in infiorescenze a grappolo, chiamate "mignole". Esistono numerose varietà di olivo, ciò dipende dalla conformazione del terreno che li ospita e dalle tecniche agricole adoperate. Alcune varietà di olivi hanno conformazione a cespuglio, altre presentano uno sviluppo in verticale, in alcune varietà la chioma si sviluppa orizzontalmente ed infine esistono forme di allevamento a cono. Le più importanti forme di allevamento sono: vaso, vaso cespugliato, siepone e monocono.

Il frutto dell'olivo è l'oliva, anche chiamata **drupa**.

La drupa può essere di forma ovoidale più o meno allungata o rotondeggiante. Essa è costituita da un'epidermide (buccia) o epicarpo (circa 1,3-3,5% del peso totale), dalla polpa (parte carnosa) o mesocarpo (65-83%), dal nocciolo o endocarpo (13-30%) e dal seme (1,5-5%).



La composizione chimica della drupa è:

-acqua	~ 50%
-grasso	~20-25%
-proteine	~1,6%
-carboidrati	~19,1%
-cellulosa	~5,8%
-ceneri	~1,5%

L'olio è contenuto quasi totalmente nella polpa (circa il 95% della sostanza grassa) ed in minima parte nel seme (0,5-1%); il nocciolo, cioè la parte legnosa, non contiene olio.

Nell'epicarpo, che assume con la maturazione un colore scuro, si osservano cellule globose distanziate tra loro e saldate dalla cutina che protegge l'interno dell'oliva. La forma di queste cellule cambia in senso centripeto: esse assumono una forma allungata e costituiscono una palizzata, mentre intorno al nocciolo riacquistano la forma tondeggiante, ma hanno dimensioni più ridotte rispetto alle

cellule dell'epidermide. Al di sopra della cuticola si forma la pruina cerosa, nella quale rimane inglobata la microflora che adempie alle funzioni di limitare la traspirazione e di proteggere la drupa dalla pioggia, che altrimenti provocherebbe il marciume.

All'inizio della maturazione, l'olio è sottoforma di piccole goccioline disperse e separate da un film lipoproteico; successivamente si ha l'ingrossamento di queste goccioline fino alla loro unione in una massa unica che addirittura sposta il nucleo<sup>41</sup>. L'olio intercellulare è di più facile estrazione e si distribuisce tra cellula e cellula. Le cellule sono cementate da sostanze pectiche che tendono a passare dalla forma insolubile a quella solubile; infatti, con la maturazione la drupa pone sempre minore resistenza allo schiacciamento. Il contenuto di acqua varia dal 45% al 60% in funzione dello stadio di maturazione, delle condizioni meteorologiche e delle cultivar.

Nelle olive si possono distinguere tre stadi di maturazione:

stadio erbaceo: ingrossamento della drupa verde, all'interno della quale si ha il processo della fotosintesi clorofilliana con produzione di amido, sintesi di zuccheri e di acidi organici, come acido tartarico, acido malico, acido citrico, etc. In questa fase non si distingue bene il nocciolo.

invaiatura: variazione del colore della drupa da verde al giallo e, successivamente, la formazione di macchie rosso-vinato che iniziano dalla parte opposta al picciolo e si diffondono a tutto il frutto, fino ad arrivare a tonalità scure (nere) che molte volte sono mascherate dalla pruina grigiastrea. In questo stadio si forma la pruina e si ha l'inizio del processo di inolizione (formazione dell'olio) che per ora è un liquido biancastro; questo colore è dovuto alla presenza di antociani e flavoni.

maturazione: la maturazione biologica non può essere definita ed individuata perfettamente, mentre quella industriale si raggiunge quando si ottiene la massima resa in olio. Solitamente a maturazione, la colorazione è nera e la superficie della drupa tende a diventare rugosa per la perdita di acqua. In generale la loro maturazione avviene, comunque, tra ottobre e dicembre.

In base al peso del frutto ed alle cultivar, le drupe si possono classificare in :

- drupe microcarpiche, con peso inferiore a 1,5 gr.
- drupe mesocarpiche, con peso intermedio tra 1,5 gr a 4 gr.
- drupe macrocarpiche, con peso superiore a 4 gr.

Le drupe possono essere destinate alla produzione di olio o di olive da mensa. La resa più basse è generalmente quella delle drupe macrocarpiche che costituiscono appunto le olive da mensa; la resa più alta è data dalle olive mesocarpiche per il loro alto rapporto polpa/nocciolo.

### *3.2.1 Le cultivar*

L'olio di oliva come prodotto del metabolismo della pianta è fortemente influenzato dal genotipo. Il genotipo ha un ruolo molto importante sulle caratteristiche dei frutti (dimensioni, rapporto polpa-nocciolo, maturazione), sul processo di inolizione e sui componenti principali e secondari dell'olio (contenuto lipidico, rapporto oleico-linoleico, grado di maturazione, etc.) in modo più intenso che non le stesse condizioni ambientali<sup>43</sup>. Solamente nel nostro Paese si possono contare ben 500 varietà di olivo autoctone. Le principali cultivar di olivo da olio coltivate in Italia sono: Frantoio (Toscana, autofertile, l'olio che si ottiene è di qualità e la resa è del 20-24%), Leccino (presente nell'Italia centrale, autosterile, la resa in olio è circa del 20%), Ogliarola Barese (diffusa in Puglia soprattutto in provincia di Bari, la resa in olio è circa del 24-26%), Coratina (diffusa in Puglia zona di Corato(BA), la resa in olio è del 24-25% con un colore molto verde), Bosana (Sarda, la resa in olio è molto elevata), Carolea (tipica della Calabria, la resa in olio è circa del 20%), Nocellara Messinese (Siciliana, la produttività è ottima ed è la pianta impollinatrice della Carolea), etc.

### **3.3 Epoca di raccolta e qualità dell'olio**

La raccolta delle olive da olio avviene in diversi periodi dell'anno: ciò dipende dalle condizioni climatiche delle varie regioni, può andare da ottobre-novembre a dicembre –gennaio o nel caso di climi più miti anche a fine marzo. La maturazione dell'olivo è del tipo completo e perfetto, cioè i diversi parametri si sviluppano nel tempo e raggiungono l'equilibrio contemporaneamente all'abscissione; il periodo di maturazione è molto ampio: dai 3 ai 5 mesi. Con la resistenza al distacco diminuisce la consistenza della polpa, si attenua e sparisce la clorofilla, variano i livelli degli zuccheri riduttori diminuiscono i principi amari o astringenti, appaiono nuovi pigmenti (prima nella buccia e poi nella polpa), e si dovrebbe avere la formazione di aromi. I singoli fenomeni possono svilupparsi in maniera sfasata e nelle diverse cultivar essi possono avere effetti e dinamica

differenti. La formazione e l'accumulo dell'olio non sono caratteristiche strettamente legate alla maturazione, mentre, sono possibili variazioni e nella distribuzione di acidi grassi specifici come risulta dal rapporto insaturi /saturi tra olive raccolte precocemente e molto tardivamente, o dalle variazioni nel rapporto tra acido oleico ed acido palmitico. Il periodo di maturazione è diverso per ogni cultivar e dipende in parte dal carico e dalle condizioni ambientali; si possono, comunque, definire a maturazione compatta quelle cultivar che registrano una rapida variazione della resistenza al distacco, ma l'aspetto che maggiormente e per primo risalta di ogni frutto è l'ammorbidimento della polpa. Anticipando la raccolta si ottiene un olio migliore dalle olive non in fase di maturazione avanzata, in quanto queste contengono una quantità minore di acidi polinsaturi<sup>44</sup>; inoltre, gli oli provenienti da queste olive, sono più ricchi di composti antiossidanti (si ossidano meno facilmente). Esistono due tipi di raccolta differente:

- ◆ *Tradizionale*: brucatura (raccolta delle olive dalla pianta, con l'ausilio di scale) è un tipo di raccolta manuale, le drupe non vengono lesionate la pianta non subisce danni e il prodotto viene raccolto per intero; abbacchiatura dove le olive vengono fatte cadere su delle reti stese sotto le piante facendo uso di pertiche, che può provocare lesioni alle drupe; con la pettinatura le olive dall'albero vengono fatte cadere mediante grossi pettini di legno su reti o teloni distesi al di sotto; mediante raccattatura le olive (stramature) cadute per effetto naturale e vengono raccolte direttamente da terra.
- ◆ *Meccanica*: il distacco delle olive dalla pianta viene provocato da particolari scuotitori o da pettini vibranti. Sottoponendo il tronco e le branche all'azione di questi le olive cadono al suolo andando a finire in apposite reti o teloni, oppure in appositi ombrelli.

### **3.4 L'olio di oliva**

#### *3.4.1 Composizione*

L'olio di oliva è un grasso vegetale ed è composto da una frazione saponificabile (trigliceridi) e da una frazione insaponificabile (componenti minori come cere, squalene, clorofilla, caroteni, alcoli, antociani, aromi, steroli, tocoferoli e polifenoli).

La frazione saponificabile costituisce circa il 98% dell'olio; comunque gli acidi grassi, che compongono i trigliceridi, presentano una certa variabilità a seconda della regione di provenienza.

I limiti della composizione acidica fissati dalla COI (Consiglio Oleicolo Internazionale) sono i seguenti:

Acido palmitico	7,5-20%
Acido palmitoleico	0,3-3,5%
Acido stearico	0,5-5,0%
Acido oleico	55,0-83%
Acido linoleico	3,5-21%
Acido linolenico	0,1-1,5%

L'acido oleico è un acido grasso monoinsaturo, poi vi sono acidi grassi saturi, come l'acido palmitico e l'acido stearico, mentre acidi grassi polinsaturi sono l'acido linoleico e l'acido linolenico. Gli acidi grassi, non potendo essere sintetizzati, debbono essere forniti con la dieta perciò l'olio di oliva costituisce una buona fonte alimentare di questi acidi grassi essenziali. Nell'olio d'oliva i doppi legami presenti in alcuni acidi grassi conferiscono ad esso delle particolari qualità biologiche, ma lo rendono anche attaccabile dall'ossigeno, determinando il fenomeno dell'autossidazione. L'autossidazione procede con una velocità proporzionale al numero dei doppi legami esistenti ed è contrastato dalla concentrazione delle sostanze anti-ossidanti. La sua composizione acidità presenta un'insaturazione non troppo elevata ed inoltre l'olio di oliva contiene numerose sostanze anti-ossidanti che gli consentono di mantenere una particolare stabilità. Queste sostanze, insieme ad altri componenti minori, fanno parte della frazione insaponificabile dell'olio di oliva. I tocoferoli sono presenti per il 90% nella loro forma alfa, che è la più attiva biologicamente, costituiscono un elemento stabilizzante importante sui processi di autossidazione ed una preziosa fonte vitaminica alimentare<sup>45</sup>. L'alfa-tocoferolo insieme al delta-tocoferolo costituisce la vitamina E. Un'altra azione anti-ossidante importante viene svolta

dai composti fenolici (fenoli, acidi fenolici e polifenoli) questi si trovano anche in quantità abbastanza rilevante nell'olio di oliva, soprattutto quello vergine.

L'oleuropeina è tra i componenti della frazione insaponificabile ed è quella sostanza che conferisce il sapore amarognolo alle olive e passa nell'olio dandogli il caratteristico sapore piccante ed amaro. Essa contiene radicali aromatici e molecole di glucosio ed inoltre reagisce con sostanze alcaline trasformandosi in prodotti che perdono il sapore amaro (su questa reazione si basa la preparazione delle olive da mensa).

Nell'olio di oliva sono contenuti anche altri componenti minori, alcuni dei quali dotati di interesse biologico:

- ◆ Steroli: l'olio di oliva è l'unico olio che possiede una alta concentrazione di  $\beta$ -sitosterolo, una sostanza che si oppone all'assorbimento intestinale del colesterolo; dal punto di vista chimico essi sono degli steroidi;
- ◆ Idrocarburi: possono essere saturi ed insaturi e probabilmente si formano come prodotti collaterali durante la sintesi degli acidi grassi;
- ◆ Alcoli terpenici: sono presenti liberi oppure esterificati con gli acidi grassi (alcol cerilico e alcol miricilico); le cere sono esteri di un alcol alifatico monovalente con un acido grasso ad alto peso molecolare e provengono dalla pruina, durante la conservazioni degli oli queste subiscono idrolisi (si decompongono) per dare alcoli liberi;
- ◆ Fosfolipidi: sono presenti in bassa quantità, come la fosfatidicolina;
- ◆ Sostanze coloranti: rappresentate dai carotenoidi e soprattutto dalla clorofilla; quest'ultima ha una colorazione verde tanto più intensa quanto meno avanzata e la maturazione, durante la conservazione dell'olio, inoltre, si degrada ed il colore dell'olio vira al giallo. Questo pigmento biologicamente svolge un'azione di eccitamento del metabolismo, di stimolo sulla crescita cellulare e sulla produzione del sangue e di accelerazione di processi di cicatrizzazione i carotenoidi sono presenti sottoforma di  $\beta$ -carotene, cioè come provitamina A;
- ◆ Sostanze aromatiche: influenzano positivamente la digestione.

La densità dell'olio è inferiore a quella dell'acqua ed è tanto minore quanto maggiore è il numero degli atomi di carbonio degli acidi grassi; generalmente la densità dell'olio di oliva è  $0,91 \text{ Kg/m}^3$  a  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ .

L'olio di oliva risulta essere, così, l'alimento grasso più povero di steroli, in quanto costituiscono il 20-30% delle sostanze insaponificabili, e ciò ha un grande rilievo tra i suoi pregi dietetici. Inoltre la presenza di piccole quantità di

sostanze fenoliche assicura all'olio vergine una forte resistenza all'irrancimento (causato soprattutto da muffe e batteri e consiste nella formazione di composti che tonici).

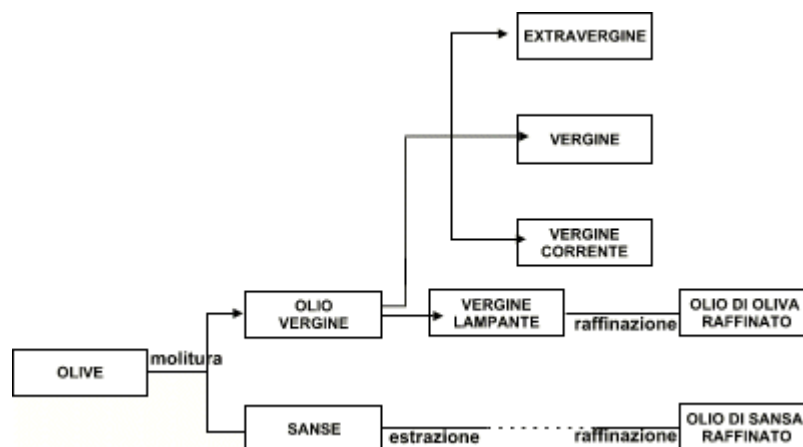
Quindi si può riassumere tutto mediante la seguente tabella:

ACIDI GRASSI		
Acido miristico	(C14:0)	0-0,1%
Acido palmitico	(C16:0)	7,0-20%
Acido palmitoleico	(C16:1)	0,3-3,5%
Acido stearico	(C18:0)	1,4-4%
Acido oleico	(C18:1)	56,0-84,0%
Acido linoleico	(C18:2)	3,0-21,0%
Acido linolenico	(C18:3)	0,2-1,5%
Altri Acidi		2,5-3,0%
STEROLI (80-260mg/100 di olio)		
Sitosterolo	(C29 H50 O)	65,0-88,5%
Campesterolo	(C28 H48 O)	2,0-4,0%
Colesterolo	(C27 H46 O)	0-0,3%
Stigmasterolo	(C29 H48 O)	0,3-2,5%
Avenasterolo	(C28 H48 O)	5,0-31,0%
IDROCARBURI		300-600 mg/Kg
CAROTENOIDI		0,5-10 mg/Kg
CAROTENE E TOCOFEROLI		3-35 mg/Kg
CLOROFILLA		1-10 mg/Kg
FENOLI		50-500 mg/Kg
FOSFOLIPIDI		45-150 mg/Kg

### 3.4.2 Classificazione

Le olive, quando vengono portate al frantoio, devono essere molite nel più breve tempo possibile affinché non ne vengano alterate le qualità merceologiche e organolettiche: ne viene fatta una prima spremitura alla pressione di 10-12 Kg/cm<sup>2</sup> che consente di ottenere l'olio più pregiato perché purissimo, ma con bassa resa quantitativa (olio di prima spremitura); seguirà poi una seconda

spremitura intorno ai 60 Kg/cm<sup>2</sup> dalla quale si ricava un olio meno puro e più abbondante. Entrambi le spremiture vengono effettuate a freddo intorno ai 37-40 °C.



Una volta macinate le olive lasciano la “ sansa” che costituisce il 40% del peso originario e che nel passato veniva usata per il riscaldamento(infatti contiene frammenti di noccioli e residui polposi che sono degli ottimi combustibili); ai giorni nostri con l’aiuto di solventi chimici,da questi resti viene estratto “l’olio di sansa”, a qualità più bassa. Fino a pochi decenni fa questo tipo di olio era destinato quasi esclusivamente alla produzione di sapone e candele,ma da quando l’industria dei saponi si è trasformata in industria chimica utilizzando le sostanze sintetiche,anche questo residuo della lavorazione delle olive viene sfruttato per produrre olio che è reso commestibile mediante rettifica e opportunamente mescolato con oli vergini.La normativa europea che attualmente regola la classificazione degli oli di oliva è quella prevista dal Reg. CE 1989/2003 del 6 Novembre 2003,e dalle successive modifiche ed integrazioni. La normativa vigente prevede che l’olio vergine di oliva può essere classificato in base alla sua qualità e la stessa stabilisce, per ciascuna categoria, i valori massimi che possono assumere i parametri collegati con la qualità dell’olio:

Olio extravergine	Prima spremitura, di gusto “assolutamente perfetto”, con acidità inferiore all’ 0,8% (espressa in acido oleico: 0,8 grammi per ogni 100 gr.); non è sottoposto a nessun processo di lavorazione né raffinazione.
Olio vergine	Prima spremitura, di gusto perfetto, con acidità inferiore al 2% (compresa tra 1-1,5 gradi di acidità); l’olio non è raffinato.



Olio di oliva	Il massimo grado di acidità è dell'1,5%; è composto da olio di oliva raffinato al quale viene aggiunto olio di oliva vergine per migliorarne il gusto (non è previsto un minimo di oli vergini da aggiungere).
Olio di sansa di oliva	Ha un livello di acidità minore di 1,0%; ed è costituito dall'olio di sansa cui viene aggiunto dell'olio extravergine d'oliva (non è previsto un minimo di oli extravergini da aggiungere).

### 3.4.3 Olio da agricoltura biologica<sup>46</sup>

L'olio extravergine per le sue caratteristiche nutritive è uno degli alimenti principe per una corretta alimentazione in grado di migliorare le condizioni di salute. Esso contiene acidi grassi simili a quelli presenti nel corpo umano e una elevata quantità di antiossidanti e di vitamine. Difende il corpo da alterazioni cutanee, da disturbi digestivi e da fenomeni di invecchiamento cellulare e aiuta a migliorare il benessere del corpo e la qualità della vita. Preservarlo dai residui di pesticidi diventa un obbligo. L'olio da agricoltura biologica risponde a questo: nessun residuo e nemmeno il sospetto che possa essere inquinato, perché segue precise regole.

È biologico solo l'olio ottenuto e prodotto con olive provenienti da oliveti coltivati secondo il metodo dell'agricoltura biologica. Ma per essere venduto con l'etichettatura consentita deve risultare adatto all'alimentazione umana, cioè può essere solo extravergine (acidità inferiore al 1%) o vergine (acidità inferiore al 2%), privo di difetti e sapori anomali. Per questo vanno controllate tutte le attività di raccolta e conservazione delle olive, estrazione dell'olio, conservazione e confezionamento dell'olio.

Queste operazioni devono avvenire nel rispetto della buona pratica di frantoio e in cicli di lavorazione nettamente separati da quelli delle olive non biologiche.

Per potersi fregiare del marchio con l'indicazione "Prodotto ottenuto da agricoltura biologica" è necessario che tutti gli operatori coinvolti (olivicoltori, frantoiani, imbottiglieri e commercianti) siano assoggettati al regime di controllo di un organismo riconosciuto dallo Stato, mediante l'invio di un apposito modulo (detto notifica) alla regione e all'organismo prescelto. Tutte le operazioni compiute nella propria azienda e i movimenti delle merci e materie

prime utilizzate devono essere riportati su appositi registri verificabili da chiunque. Infatti solo se il consumatore avrà chiaro tutti gli sforzi che si sono dovuti sopportare per ottenere quell'olio, potrà riconoscere al produttore il giusto valore del prodotto.

I maggiori controlli quindi servono non solo per evitare frodi e concorrenza sleale, ma anche per stabilire un rapporto di reciproca fiducia tra il produttore ed il consumatore.

Il Reg. CEE 2092/91 stabilisce un periodo di conversione per le colture arboree di tre anni dal momento della compilazione ed invio di notifica di produzione biologica all'organismo certificatore. Tecnicamente questo tempo può diminuire se l'azienda presenta dati oggettivi e documenti sull'agroecosistema e sull'etichetta deve essere riportato prodotto: "in conversione da agricoltura biologica".

Anche l'agricoltore deve aggiornarsi con corsi di formazione e così l'olivicoltura biologica diventa per lui momento di crescita culturale, ed è lui che entra in un sistema che garantisce l'informazione e il consumatore.

#### *3.4.4 Le relazioni con la salute*

Da millenni l'olio di oliva è protagonista della alimentazione mediterranea, inoltre è, fra tutti gli oli vegetali, quello a più alta digeribilità da parte dell'organismo umano.

Infatti se si considera la composizione dell'olio di oliva, questa è costituita da:

- 65-80% di acido oleico (grasso insaturo)
- 4-12% di acido linoleico (grasso insaturo)
- 7-15% di acido palmitico (grasso saturo)
- 2-6% di acido stearico (grasso saturo)

E la composizione del grasso umano è invece così suddivisa:

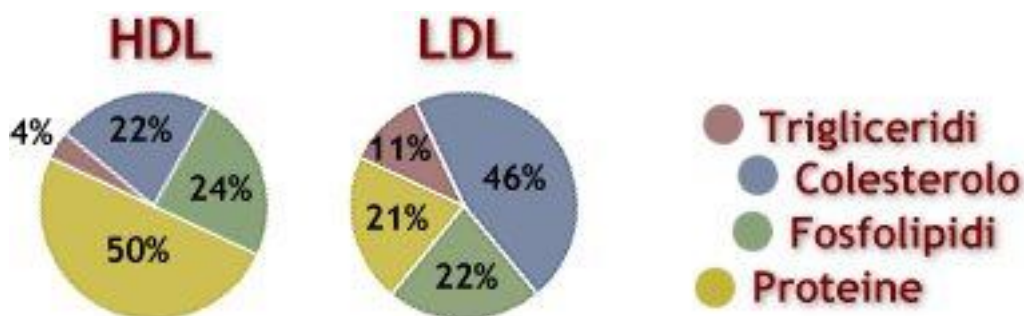
- 65-87% di acido oleico
- 17-21% di acido palmitico
- 5-6,5% di acido stearico

Si nota subito l'affinità composita dei due elementi e questo spiega la facilità con cui l'organismo umano assimila questo elemento che è superiore a quella di

qualsiasi altro olio o grasso.

L'attuale scienza medica sta così dimostrando un sempre maggiore interesse nei suoi confronti a causa del suo alto valore biologico. L'olio di oliva protegge lo stomaco e l'intestino rivestendone le pareti interne di una fine emulsione, facilita lo svuotamento dello stomaco ed il transito intestinale, inoltre previene e cura l'ulcera gastrica. Esso è di stimolo della secrezione biliare ed in questo senso favorisce la digestione anche di altri grassi.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'olio di oliva riduce i fattori LDL (Low Density Lipoproteine) e VLD (Very Low Density Lipoproteine), che provocano depositi di colesterolo "cattivo" sulle pareti delle arterie<sup>47</sup>, e potenzia invece il fattore HDL (anche grazie alla presenza di acido oleico), il "colesterolo buono" che rimuove il colesterolo dalle pareti delle arterie e lo riporta al fegato dove contribuisce alla formazione della bile.



Nel complesso riduce il rischio coronario e l'ictus cerebrale, inoltre facilita lo svuotamento della cistifellea<sup>48</sup>. Come sostengono i nutrizionisti l'olio extravergine di oliva è un prodotto che, quindi, aiuta la digestione ed è ottimamente assorbito in ogni età, grazie alle sue percentuali di acidi grassi di origine vegetale; grazie alla presenza di elevate percentuali di acido oleico la struttura dell'olio di oliva resta praticamente inalterata fino a 200 °C.

L'olio extravergine di oliva è così un alimento fondamentale per tutte le diete: per i bambini, per il grande apporto di acido oleico presente anche nel latte materno; per gli sportivi perché è una fonte di energia prontamente digeribile e nell'età senile in quanto limita la perdita di calcio nelle ossa. Il suo contenuto di acidi grassi e sostanze antiossidanti lo fa rientrare nella ricerca per la prevenzione e la cura dei tumori.

Infine l'extravergine di oliva rientra nelle composizioni di vari prodotti cosmetici, come detersivi, emulsioni e shampoo.

### 3.4.5 Sicurezza e Qualità

Uno dei grandi problemi alimentari della nostra epoca è la sofisticazione dei prodotti destinati al consumo di massa. La maggior parte dei consumatori spesso ignora ciò che c'è dietro ad un prodotto e le sue scelte di acquisto e di consumo sono spesso determinate dalla convenienza del prezzo piuttosto che dalla qualità del prodotto stesso ed è quello che accade anche per l'olio.

Nella prima ipotesi il problema è determinato dal fatto che le leggi italiane garantiscono norme molto attente sulle modalità di coltivazione e di raccolta delle olive mentre non lo sono sempre le leggi di altri paesi, soprattutto quelli extracomunitari, dove, inoltre, le spese di coltivazione per i produttori sono molto meno onerose. L'olio extravergine di oliva prodotto con olive italiane è molto più extravergine degli oli provenienti dal Marocco o dalla Tunisia, paesi da cui l'Italia importa il doppio delle ulive prodotte nel nostro Paese, ci basta pensare agli inevitabili guasti che quelle olive subiscono da un paese all'altro prima di essere molite in Italia, ne deriverà un olio che presenta un'acidità più elevata che potrà così essere corretto artificialmente ed immesso sul mercato come extravergine di prima spremitura. Poiché l'Unione Europea, con un Regolamento Olivicolo Comunitario, permette di riconoscere come Italiano l'olio prodotto negli oleifici italiani anche se con olive extracomunitarie, diventa facile immaginare quale spietata concorrenza di prezzo si possa fare su questo prodotto a scapito della qualità.

A tutela del loro prodotto, insidiata da una produzione industriale non del tutto corretta e da una speculazione commerciale poco rispettosa dei diritti dei consumatori, gli olivicoltori italiani hanno chiesto, per anni, ed ottenuto dall'UE, da pochi anni, il riconoscimento del **DOP** (Denominazione di Origine Protetta) e dell'**IGP** (Indicazione Geografica dei Prodotti agroalimentari) che dovrebbero garantire la qualità, la genuinità e l'origine del prodotto. La normativa comunitaria già nel 1991, con il regolamento CEE 2568/91, e successive modificazioni ed integrazioni, prevedeva gli oli DOP, ma l'Italia le direttive comunitarie sono state recepite con la legge 169/1992.

Infatti il marchio DOP identifica la denominazione di un prodotto la cui produzione, trasformazione ed elaborazione devono avere luogo in un'area geografica ben delimitata e con una perizia riconosciuta ed approvata.

Il marchio IGP identifica la provenienza di un prodotto da una ben determinata area geografica richiedendo che almeno una delle fasi della produzione, della trasformazione o dell'elaborazione abbia luogo in quel territorio.

### **3.5 Situazione dell'olivicoltura**

Secondo le statistiche, si possono stimare 500 milioni di olivi nei diversi territori di coltura<sup>49</sup>: l'Europa è la più grande produttrice di olio di oliva con circa l'80%, di cui la Spagna il 42%, l'Italia il 24% e la Grecia il 12%; il resto lo si ritrova in Oriente, Nord –Africa, Sud-America e Sud-Ovest degli Stati Uniti.

La produzione olearia Italiana, da due milioni e settecentotrentamila quintali del 1950-54 sale a 3,5 milioni di quintali nel 1960, di cui 430 mila quintali estratti dalle sanse. Attualmente l'Italia produce circa 5 milioni di quintali di olio medi annui: il 30% è olio extravergine, il 20% è olio vergine mentre il restante 50% è classificato come olio lampante. Visto che gli italiani consumano in media 12 Kg. di olio di oliva a testa per anno, siamo costretti ad importarne specialmente dai paesi del mediterraneo; tali importazioni sono certamente necessarie per coprire il fabbisogno, ma spesso scoraggiano le produzioni nazionali in quanto gli oli di importazioni vengono offerti sul mercato italiano a prezzi concorrenziali.

#### *3.5.1 L'Olivicoltura nel mondo*

La coltura dell'olivo è diffusa nel mondo su una superficie di circa 10 milioni di ettari, e secondo alcune stime il numero di piante di olivo è di oltre 800 milioni in massima parte destinate alla produzione di olio. Nella produzione di olio il 98% corrisponde ai paesi mediterranei e quella comunitaria è pari all'80%. Nei paesi CEE è presente il 70% degli oliveti e il 96% dell'esportazione mondiale proviene dai paesi del mediterraneo che sono membri del Coi (Consiglio oleicolo internazionale). Tra i paesi di nuova olivicoltura vanno ricordati: Argentina, Cile, Sud Africa ed Australia.

In generale le tendenze Internazionali fanno valutare una produzione mondiale in ripresa.

#### *3.5.2 L'olivicoltura in Italia*

In Italia l'olivicoltura si estende su di una superficie di quasi due milioni di ettari in cui il patrimonio di olivi è stimato in 150 milioni di piante ed è presente in 18 regioni su 20. Questa è diffusa principalmente nelle regioni meridionali ed insulari dove si realizza il 90% della produzione; le regioni più interessate sono: Puglia, Calabria, Sicilia, Campania, Sardegna, Lazio, Abruzzo, Basilicata, Toscana, Liguria, Umbria, etc.

Considerando la distribuzione per fasce altimetriche l'olivicoltura è presente per i 2/3 in collina e solo per il 25-30% in pianura, è, poi, estremamente varia a causa della diversità delle condizioni pedo-climatiche, delle pratiche colturali adottate e delle cultivar presente.

Emerge un'alta percentuale di aziende coinvolte nella produzione di oli con certificazione: per gli oli DOP/IGP si raggiunge il massimo livello tra le aziende liguri, toscane, lombardo-venete ed umbre; mentre per gli oli biologici si segnalano le aziende lucane e molisane. Circa il 20% dell'olio prodotto è destinato al fabbisogno familiare del produttore (soprattutto nel Lazio dove circa la metà della produzione non entra nei circuiti di commercializzazione, così come in Abruzzo e Toscana). Il 38% dell'olio nazionale è destinato alle vendite dirette ai ristoratori o ai consumatori, in particolar modo nel Centro-Nord dove riguarda in media oltre la metà dell'olio prodotto, ma anche al meridione con le aziende siciliane e le aziende lucane. La quota maggiore di olio prodotto è quindi destinato al mercato all'ingrosso o direttamente all'industria di confezionamento. L'olio, in prevalenza, viene venduto "sfuso" ciò accade in misura maggiore al sud dove riguarda oltre i 3/4 delle vendite; mentre al contrario nelle regioni centro-settentrionali prevale il confezionamento.

# CAPITOLO IV

## ***Manipolazione chimica dell'oleuropeina***

### **4.1 Introduzione**

E' noto che lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nell'invecchiamento e nell'insorgenza di diverse patologie umane. Fin'ora, sono state identificate numerose molecole che mediano lo stress ossidativo tra cui l'ossido nitrico o nitrossido (NO.), un radicale libero di azoto. Il nitrossido è un mediatore chimico rilasciato da molte cellule dell'organismo che svolge un ruolo importante nella regolazione di molti processi fisiopatologici.<sup>42</sup> Il radicale nitrossido (NO<sup>•</sup>), è implicato in processi infiammatori, tumori, e altre condizioni patologiche. Alcuni degli effetti tossici dell'NO<sup>•</sup> sembrano essere legati alla sua rapida reazione con il radicale superossido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) per dare il perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Questo radicale secondario e/o i suoi prodotti di decomposizione, inducono la perossidazione dei lipidi, ossidano la metionina e i residui -SH delle proteine, impoverendo le riserve di antiossidanti naturali e provocando seri danni al DNA.<sup>43</sup> A livello del Sistema Nervoso Centrale, l'ossido nitrico gioca un duplice ruolo: è sia un importante messaggero fisiologico, coinvolto nella modulazione dello sviluppo del cervello, plasticità sinaptica, secrezione neuroendocrina e neurotrasmissione sia un agente neuropatologico coinvolto nell'epilessia e malattie neurogenerative, quali il Parkinson e l'Alzheimer. Infatti, diverse evidenze riportano che l'ossido d'azoto contribuisce alla morte cellulare eccitotossica e al danno cellulare d'origine neuroinfiammatoria.<sup>44</sup>

L'identificazione di agenti antiossidanti in grado di neutralizzare i radicali liberi tra cui l'ossido nitrico, rappresenta un utile traguardo sia nella prevenzione dell'insorgenza di patologie, sia nell'attenuazione della loro sintomatologia. Recentemente, è stato riportato che le componenti fenoliche presenti nella frazione polare dell'olio d'oliva vergine (acido caffeinico, oleuropeina, tirosolo ed idrossitirosolo) presentano attività anti-ossidanti e possono contribuire alla prevenzione di malattie cardiovascolari e trombotiche.<sup>45</sup> L'effetto di queste componenti fenoliche nella neurotrasmissione nitregica ed il loro coinvolgimento in malattie neurodegenerative non è ancora del tutto chiaro.<sup>46</sup> C'è quindi molto interesse nell'identificare queste componenti dotate d'attività, antiossidante, presenti negli alimenti della nostra comune dieta alimentare mediterranea. Infatti, tali componenti possono non solo migliorare il nostro stato

di salute ma anche avere un effetto protettivo nei confronti di alcuni tipi di malattie quali alcuni tipi di cancro, malattie coronariche ed eventualmente in malattie neurodegenerative.

In un modello animale sperimentale di arteriosclerosi, è stato verificato che una dieta ricca di olio extra-vergine d'oliva riduce l'incremento dello stress ossidativo dei tessuti e aumenta la capacità di difesa del sistema GSH/GST.<sup>48</sup>

L'idrossitirosolo, componente fenolico contenuto nelle foglie d'ulivo, ha manifestato un alto effetto protettivo contro la nitrificazione, perossinitrito-dipendente, della tirosina e i danni al DNA causati dallo stesso perossinitrito.<sup>49</sup>

Idrossitirosolo sono buoni scavenger diretti dell'NO<sup>•</sup> che porterebbe alla formazione di perossinitrito ONO<sub>2</sub><sup>•</sup>, il vero responsabile dell'ossidazione lipidica.<sup>50</sup> D'altro canto, è stata riconosciuta all'oleuropeina anche la capacità di promuovere un aumento della produzione di NO<sup>•</sup> attraverso un incremento dell'espressione dell'NO-sintetasi inducibile (iNOS),<sup>51</sup> che aumenta la risposta mediata dai macrofagi aumentando la produzione di nitrossido che sembra essere, in questo caso, benefica per la protezione di cellule e organismo.<sup>51</sup>

Idrossitirosolo e oleuropeina, inoltre, riducono la presenza di 8-iso PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , un biomarker dei processi di perossidazione lipidica, nelle secrezioni urinarie dell'uomo.<sup>52</sup> L'oleuropeina potrebbe essere considerata come un agente potenzialmente citostatico in malattie infiammatorie e anti-tumorali.<sup>53</sup>

L'olio extra-vergine d'oliva è l'alimento lipidico principale della dieta Mediterranea, la sua quantità di polifenoli varia sensibilmente (100-800 mg/Kg) in funzione della cultivar, del suolo, del clima e del grado di maturazione dei frutti premuti a freddo per ottenerne l'olio. L'oleuropeina, glucoside dell'acido elenolico esterificato con l'idrossitirosolo, è il principale componente fenolico delle olive e si trova nelle foglie e nei frutti della specie *Olea europaea L.* in quantità che vanno dai 20 ai 100 mg/g di estratto asciutto;<sup>54</sup> durante il periodo di raccolta e di lavorazione l'oleuropeina viene idrolizzato nella sua forma agliconica e in diversi derivati dell'idrossitirosolo.

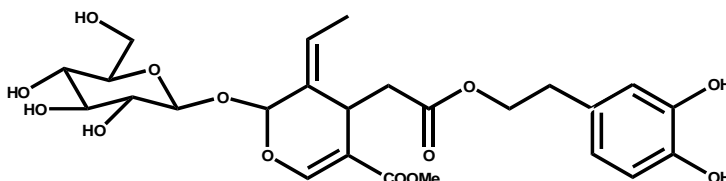
Questi componenti minori dell'olio extra-vergine d'oliva, che ne costituiscono la sua cosiddetta "parte polare", prevengono l'autoossidazione dell'olio stesso e gli conferiscono la sua particolare stabilità.

L'Oleuropeina è un glucoside con componente fenolica, amaro presente nelle foglie e nei frutti *Ola europaea L.* (Oleaceae) (figura 4.1).

La complessità dei profili cromatografici della frazione polare dell'estratto dalle foglie d'ulivo indica la presenza nella matrice naturale dei diversi componenti

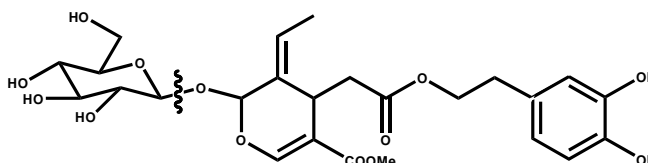


fenolici caratterizzati<sup>55</sup> attraverso spettrometria di massa. In particolare l'aglicone è stato determinato con le stesse procedure analitiche nei suoi diversi isomeri e derivati.<sup>56</sup>



**Figura 4.1**

La formazione dell'aglicone deriva dall'idrolisi glucosidica in condizioni enzimatiche durante i processi di lavorazione industriale delle cultivar.



**Figura 4.2**

Gli obiettivi posti a tal punto sono stati: ottenere l'aglicone in una delle sue forme isomeriche, la determinazione quantitativa di principi attivi nell'olio extra vergine d'oliva, nelle olive o nelle foglie, manipolare i derivati polifenolici per la determinazione del potere antiossidante degli stessi.

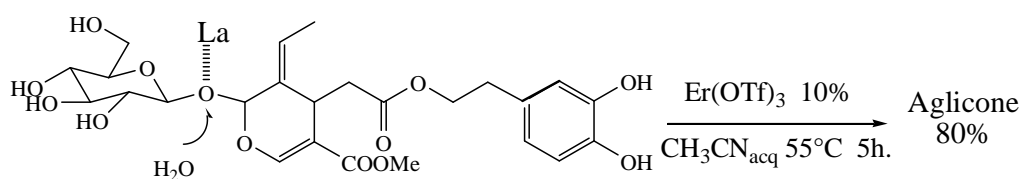
## ***4.2 Derivati agliconici di secoiridoidi***

Sfruttando l'efficacia della catalisi acida di Lewis e in particolar modo gli ottimi risultati dell'Erbio triflato nelle reazioni di deprotezione di acetali,<sup>57</sup> e acilazioni di alcol e fenoli,<sup>58</sup> si ottengono buoni risultati sintetici per derivati agliconici diversamente funzionalizzati. Il primo screening consiste nell'estrazione dell'oleuropeina da foglie d'ulivo con metodologie diverse da quelle riportate in letteratura. Le foglie utilizzate sono prima disidratate in stufa a 50°C per 48h. A questo punto la stessa oleuropeina viene sottoposta a diverse trasformazioni

sintetiche catalitiche capaci di ottenere in ottime rese e in tempi brevi, derivati modificati chimicamente testati nelle loro proprietà neuroprotettive.

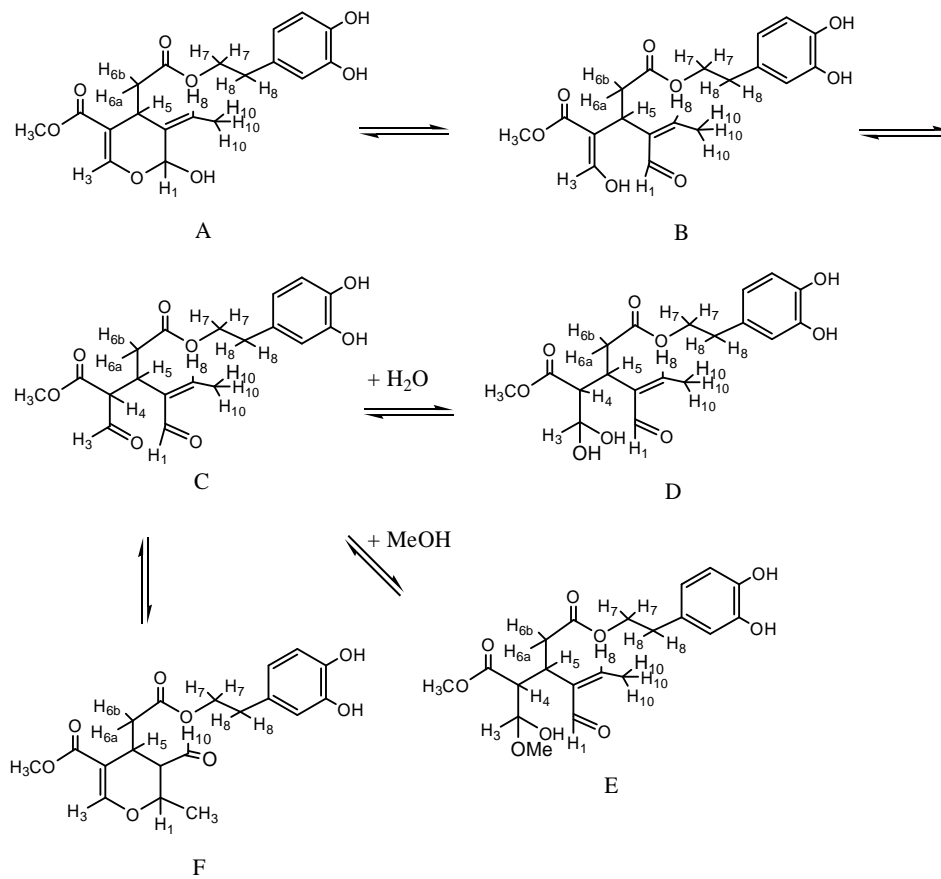
Sulla base dei risultati ottenuti dalla deprotezione di acetali e chetali con  $\text{Er}(\text{OTf})_3$  si sviluppa un metodo che porti alla formazione della forma agliconica dell'oleuropeina. Il miglior solvente di reazione in questo caso risulta l'acetonitrile acquoso. Il nitrometano acquoso infatti, ritenuto ottimo per la deprotezione degli acetali con erbio (III) triflato, porta alla formazione dell'aglicone in tempi più lunghi e con rese minori.

In una soluzione acquosa di acetonitrile, a refluxo, dopo 5 h, si ottiene l'aglicone in un ottime rese (schema 4.1).



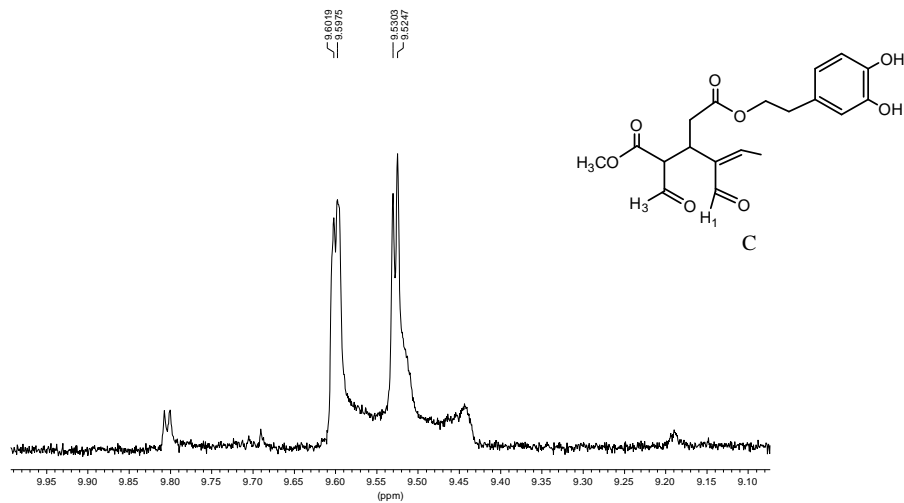
**Schema 4.1**

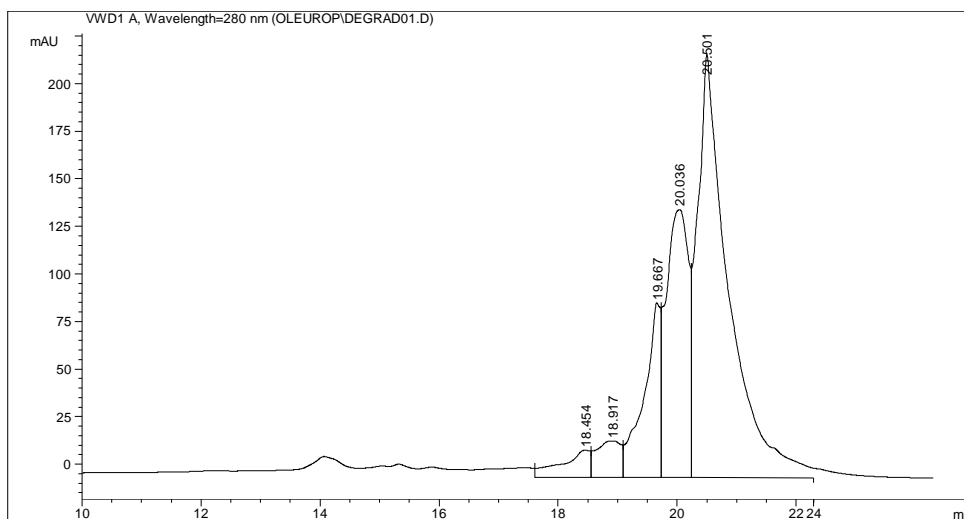
I dati spettroscopici ottenuti, paragonati con quelli riportati in letteratura,<sup>59</sup> mostrano la formazione dell'aglicone nelle sue forme isomeriche e derivate (figura 4.3).



**Figura 4.3**

L'analisi spettroscopica  $^1\text{H-NMR}$  mostra infatti due doppietti elettronici a  $\delta=9.53$  e  $\delta=9.60$  indice della presenza della forma dialdeica ( forma C) così come evince nell'analisi spettroscopica per HPLC.

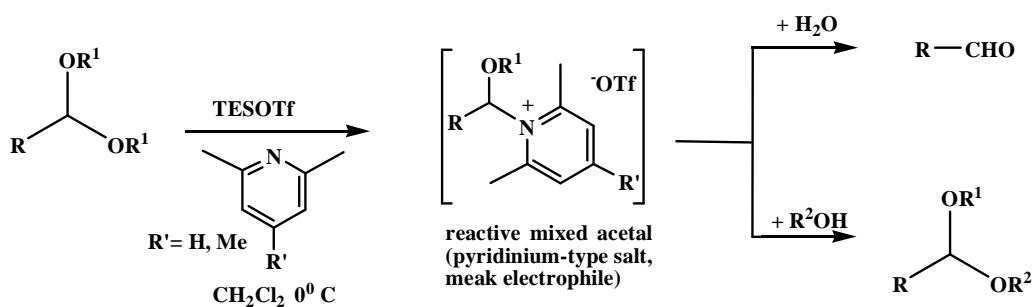




A tal punto l'interesse si è rivolto alla sintesi di una forma aglicone capace di non isomerizzare, utile per una eventuale analisi quantitativa di tale polifenolo in tutte le matrici olearie.

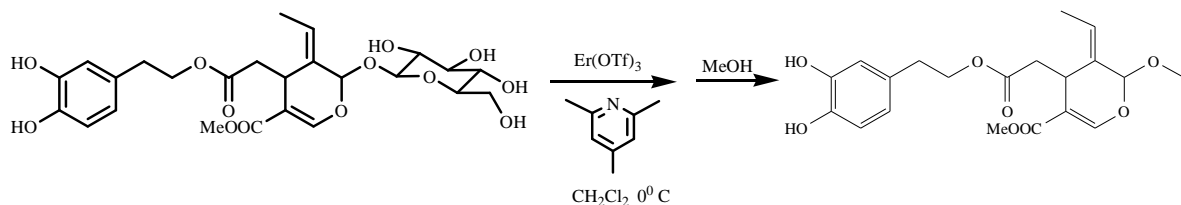
Attraverso reazioni di transacetilazione riportate in letteratura<sup>60</sup> si è pensato di ottenere agliconi derivati dall'oleuropeina che sostituissero la forma glucosidica con diversi gruppi funzionali. Il più semplice di tali gruppi poteva a tal punto essere il metile.

La reazione di transacetilazione mostrata nel seguente schema (schema 4.1) prevede l'uso di tritilsilil trifluorometanesolfonato (4.0 equiv) and 2,6-lutidine (6.0 equiv) per ottenere, attraverso la formazione di un sale piridinio, il prodotto trans acetilato.<sup>60</sup>



**Schema 4.2**

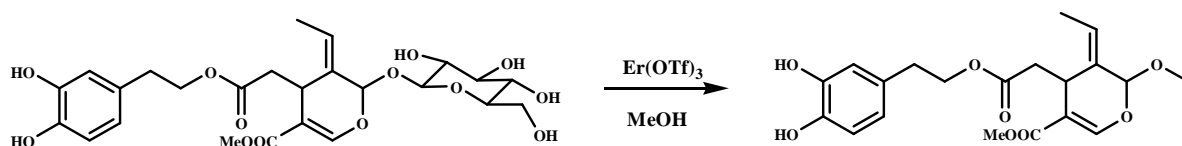
Tenendo conto del meccanismo di reazione in presenza di catalisi acida per successiva reazione con un nucleofilo, si è cercato di sfruttare le potenzialità catalitiche dell'Erbio triflato per una eventuale transacetilazione in presenza di nucleofili alcolici. Il substrato di nostro interesse come si evince è l'oleuropeina .



**Schema 4.3**

La procedura sintetica sull'oleuropeina ha dato scarsi risultati anche variando la temperatura di reazione. Inoltre il processo sintetico ha dato difficoltà nel monitorare l'andamento della reazione stessa per l'elevata quantità di base che si richiede.

Si è pensato quindi di fare delle variazioni sulla procedura sintetica, eliminando il solvente e la base, per una maggiore applicabilità di quella che è definita Green Chemistry.



**Schema 4.4**

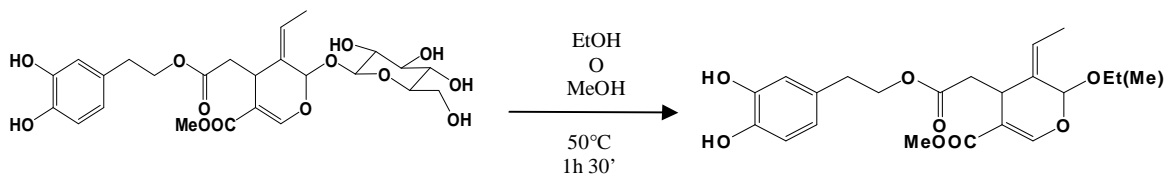
Il nucleofilo, in tal caso il metanolo, funge anche da solvente.

Le rese di reazioni, dopo uno screening sulle migliori condizioni di reazione, ha dato ottimi risultati con il solo 5% di catalizzatore.

Substrato	Er(OTf) <sub>3</sub> %	Temperatura	Resa %
oleuropeina	20	0 °C	0
oleuropeina	20	25 °C	0
oleuropeina	20	50 °C	80
oleuropeina	10	50 °C	80
oleuropeina	5	50 °C	80

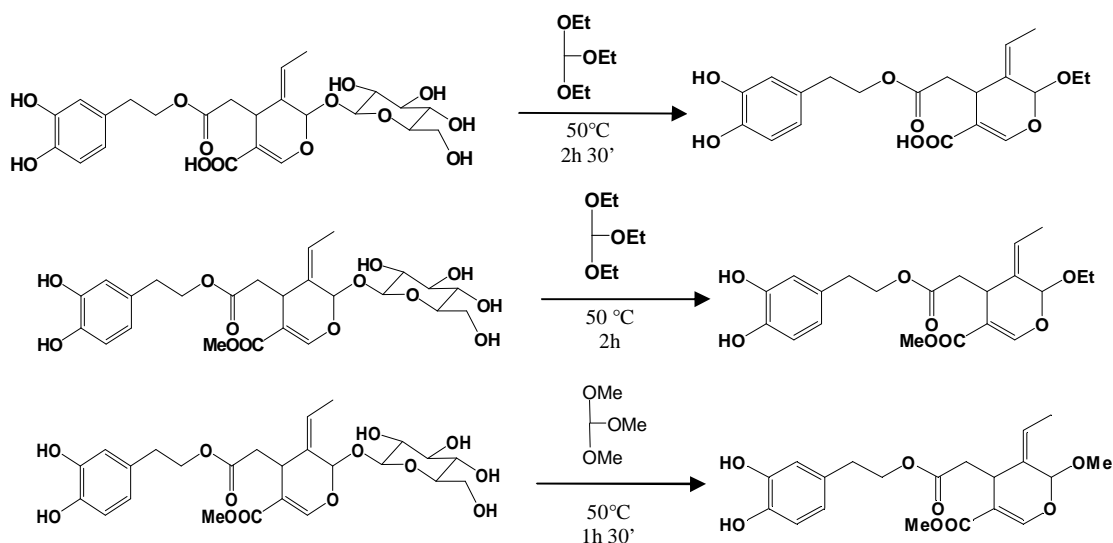
Da come si evince dalla precedente tabella si è ottenuta la forma agliconica in una sola forma isomerica quale quella acetlica con rese ottime, in breve tempo di reazione e in condizioni blande.

La stessa reazione, condotta in solventi alcolici quali EtOH e MeOH da ottimi risultati in stereoselettività sull'oleuropeina.

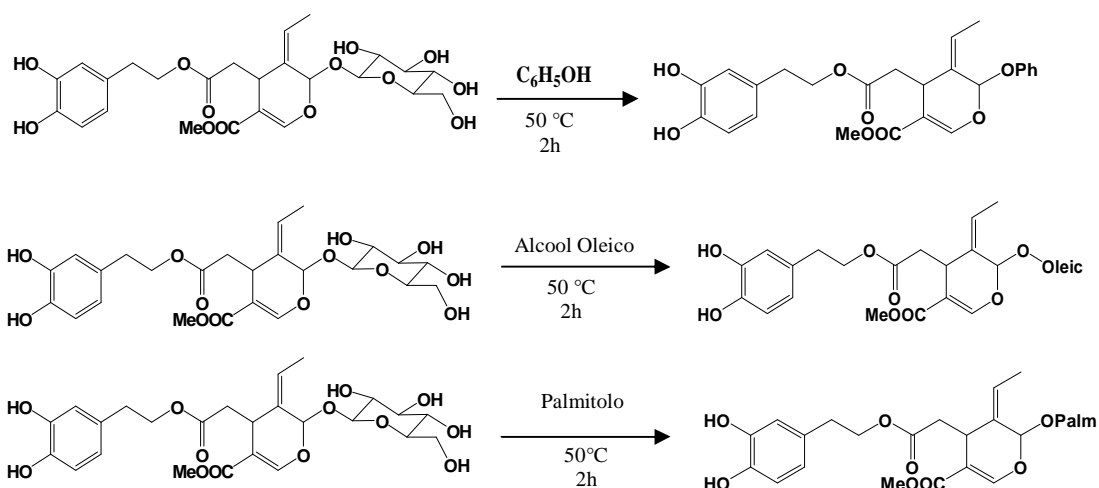


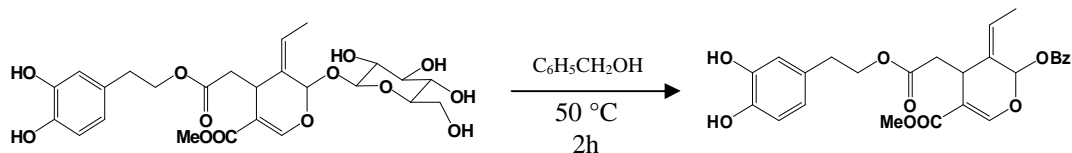
**Schema 4.5**

Sfruttando le proprietà di opportuni ortoformiati e mantenendo le stesse procedure sintetiche, si è riusciti a ottenere semplice esterificazione sia sull'oleuropeina che sulla demetiloleuropeina evitando un eventuale processo di decarbossilazione ottenuto per apertura dell'anello acetalico.



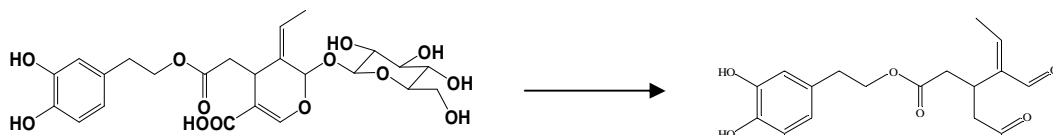
A questo punto, sfruttando la reattività di substrati alcolici si è pensato i sintetizzare molecole agliconiche legate a particolari catene alifatiche, quali per esempio, derivati alcolici di acidi grassi, che potessero essere utili nell'industria cosmetica.



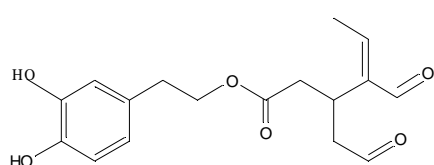


Il primo tentativo di reazione è stato condotto usando l'alcol oleico come nucleofilo. La metodologia sintetica ha dato ottimi risultati permettendo la formazione di derivati agliconici costituiti da catene idrofile e idrofobe che permetterebbero il loro test nella cosmesi.

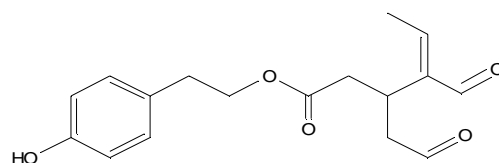
Infine è stato possibile sintetizzare, utilizzando le stesse semplici procedure, l'aglicone della demetiloleuropeina che è stata estratta dalle drupe invaiate della cultivar Coratina.<sup>61</sup>



Il prodotto ottenuto è la dialdeide dell'aglicone della demetiloleuropeina, soprannominato “oleopentadiale”, e la sua struttura risulta essere molto simile alla dialdeide aglicone ligstroside, composto noto anche come oleocantale:



OLEOPENTADIALE



OLEOCANTALE

L'olecantale è noto per le sue proprietà anti-infiammatorie ed è presente nell'olio di oliva in quantità inferiore rispetto l'oleopentadiale.<sup>59</sup>

Tutte le reazioni sono state condotte in condizioni neutre ed il catalizzatore può essere recuperato quasi quantitativamente senza significativa perdita di attività.

### **4.3 Conclusioni**

In questo lavoro di tesi sono stati sviluppati ottimi esempi di chimica ecocompatibile (la cosiddetta “green chemistry”), infatti, le reazioni mostrano:

1. Un facile e consistente recupero del catalizzatore, quindi un trascurabile rilascio nell’ambiente.
2. Utilizzo di catalizzatori acidi di Lewis a bassissima tossicità.
3. Bassi costi.

Inoltre le metodologie sintetiche precedentemente riportate sono molto efficienti se si considera la complessità dei substrati, la loro non facile reperibilità ma la loro importanza nella food chemistry.



# **CAPITOLO V**

## ***Parte sperimentale***

### ***5.1 Strumentazione e reagenti***

Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  sono stati registrati con uno strumento Bruker WM 300, a 300 MHz; i campioni sono stati preparati utilizzando come solvente dimetilsolfossido o cloroformio deuterato, e tetrametilsilano come standard interno. I “chemical shift” dei segnali sono riportati in parti per milione (ppm) rispetto allo standard interno e le costanti di accoppiamento (J) sono riportate in Hertz.

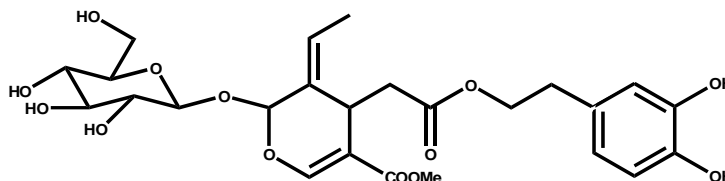
I reagenti utilizzati o sono prodotti commerciali forniti dalla Aldrich Italia o sono stati sintetizzati con i metodi di letteratura.

I prodotti identificati sono stati purificati mediante cromatografia flash su colonna corta utilizzando Kieselgel 60H senza gesso. La demetiloleuropeina è stata purificata attraverso un sistema VersaFlash<sup>TM</sup> HTFP System utilizzando octadecyl-functionalized silica gel della Sigma Aldrich.

Le cromatografie su strato sottile sono state eseguite su lastre commerciali senza indicatore di fluorescenza.

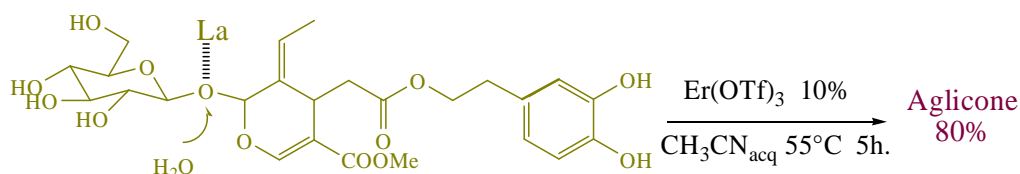
## 5.2. Manipolazione chimica dell'oleuropeina

### 5.2.1. a Estrazione dell'oleuropeina da foglie d'ulivo secche



In un pallone sono posti 100 grammi di foglie d'ulivo secche in 500 ml di una soluzione MeOH/H<sub>2</sub>O (4/1) e sono lasciate a refluire per circa otto ore. Si separa la soluzione dalle foglie che verranno ritratte allo stesso modo. La seconda soluzione ottenuta, per TLC, mostra una bassissima percentuale di oleuropeina, pertanto non viene aggiunta alla prima. Si tira a secco. Si ottiene così un grezzo contenente diversi derivati tra cui l'oleuropeina che viene purificata per flash cromatografia usando una miscela eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (8/2). Si ottengono circa 1,25 grammi di oleuropeina.

### 5.2.1.b Procedura di sintesi dell'aglicone



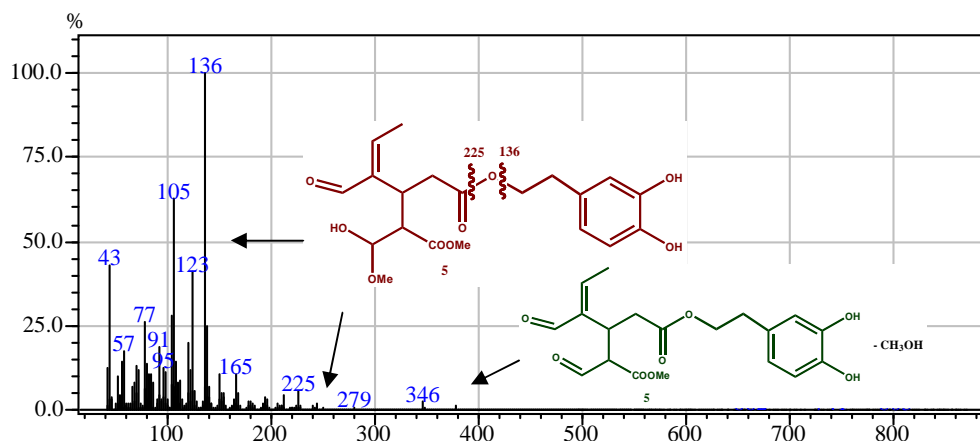
In un pallone a due colli da 100 ml si pone 0.5 grammi di oleuropeina (28,73 mmoli), 10.0 ml di CH<sub>3</sub>CN acquoso, e 10% di Er(OTf)<sub>3</sub> (0,30 mmoli). Si porta a riflusso sotto agitazione magnetica. La reazione viene monitorata per TLC (miscela eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (8/2)). Dopo 5 ore si osserva la scomparsa del prodotto iniziale. Si lascia raffreddare, si tratta la soluzione con qualche ml di acqua e si estrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase organica viene così seccata su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrata a pressione ridotta. Si purifica il prodotto per flash cromatografia, miscela eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9.5/0.5) ottenendo una resa dell'80% di prodotto.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.40 (d, 3H, CH<sub>3</sub> (F), *J* H<sub>CH<sub>3</sub>H<sub>1</sub></sub> = 6.63), 1.40 (d, 3H, H<sub>10</sub> (C), *J* H<sub>10</sub>H<sub>8</sub> = 6.75), 2.13-2.28 (m, 2H, H<sub>6</sub> (F), H<sub>6a</sub> (F)), 2.50-2.63 (m, 2H, H<sub>6</sub> (C), H<sub>6a</sub> (C)), 2.78-2.85 (t, 2H, H<sub>7</sub> (C), *J* H<sub>7</sub>H<sub>8</sub> = 5.77), 2.87 (t, 2H, H<sub>7</sub>, *J* H<sub>7</sub>H<sub>8</sub> =

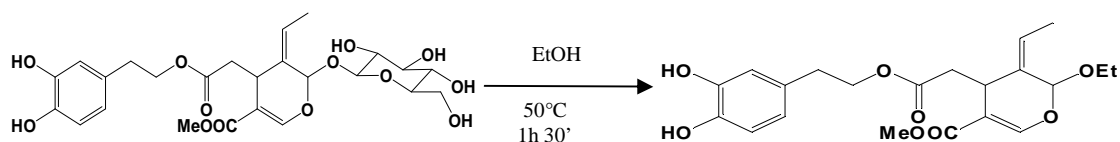
5.85), 3.35 (m, 1H, H<sub>4</sub> (C), *J* H<sub>4</sub>H<sub>5</sub>= 8.89), 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub> (F)), 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub> (C)), 4.10-4.50 (m, 6H, H<sub>5</sub> (F), H<sub>5</sub> (C), 2H<sub>8</sub> (F), 2H<sub>8</sub> (C)), 6.62(m, 2H, H<sub>aromatic</sub>(C)), 6.75 (m, 2H, H<sub>aromatic</sub>(F)), 7.26 (s, 2H, H<sub>aromatic</sub> (C, F)), 7.58 (s, 1H, H<sub>3</sub>(F)), 9.52 (s, 1H, H<sub>1</sub>(C)), 9.60 (s, 1H, H<sub>3</sub> (C)), 9.80 (s, 1H, H<sub>10</sub> (F)).

Lo spettro <sup>1</sup>H-NMR mostra in piccolo quantità la presenza della forma B.

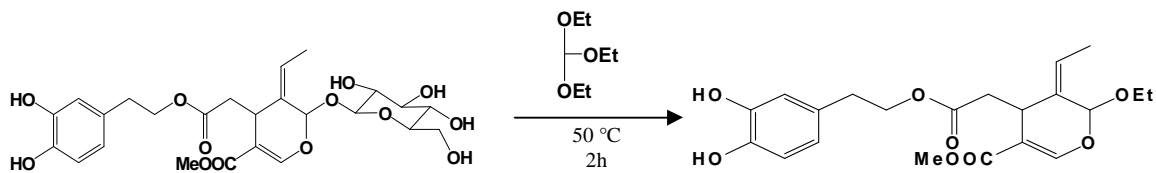
### MS/EI



#### 5.2.1. c Procedura di sintesi della aglicone dell'oleuropeina etilato

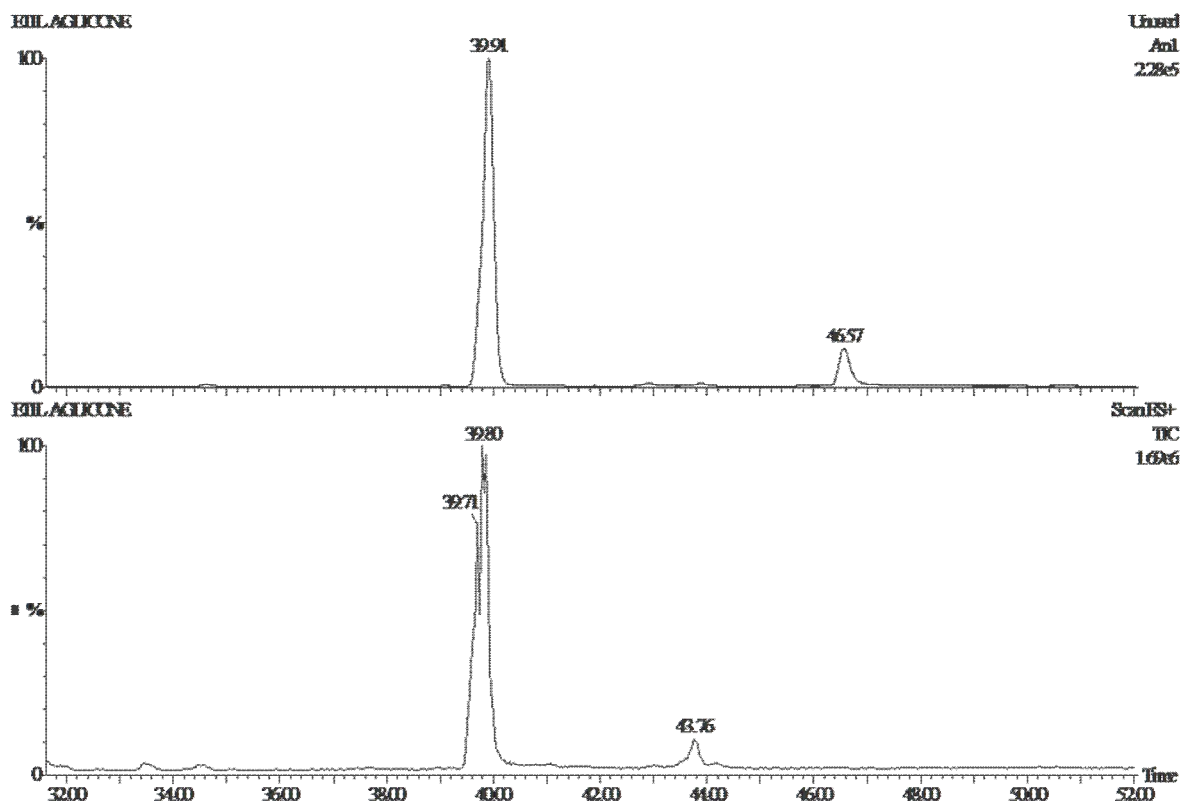


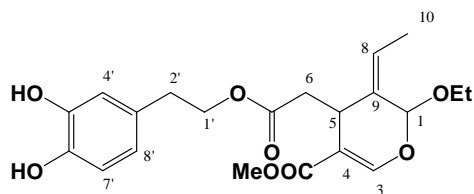
In un pallone da 100 ml si pone 0.5 gr dell'oleuropeina, 3 ml di EtOH con Er(OTf)<sub>3</sub> 5%. Si lascia sotto agitazione magnetica. La reazione viene monitorata per TLC (miscela eluente CH<sub>3</sub>Cl/MeOH (9/1)). Dopo circa 1 ora e 30 minuti si osserva la scomparsa del prodotto iniziale. Si lascia raffreddare e si evapora il solvente a pressione ridotta e il residuo viene ripreso con una soluzione di cloroformio. Si purifica il prodotto per flash cromatografia, miscela eluente CH<sub>3</sub>Cl/MeOH (9.25/0.25) ottenendo una resa del 80%.



In un pallone da 100 ml si pone 0.5 gr dell'oleuropeina, 0,75 gr. di trietilortofornato con  $\text{Er}(\text{OTf})_3$  5% e 5 ml di  $\text{CH}_3\text{CN}$  acquoso. Si lascia sotto agitazione magnetica. La reazione viene monitorata per TLC (miscela eluente  $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$  (9/1)). Dopo circa 2 ore si osserva la scomparsa del prodotto iniziale. Si lascia raffreddare e si evapora il solvente a pressione ridotta e il residuo viene ripreso con una soluzione di cloroformio. Si purifica il prodotto per flash cromatografia, miscela eluente  $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$  (9.25/0.25) ottenendo una resa del 80%.

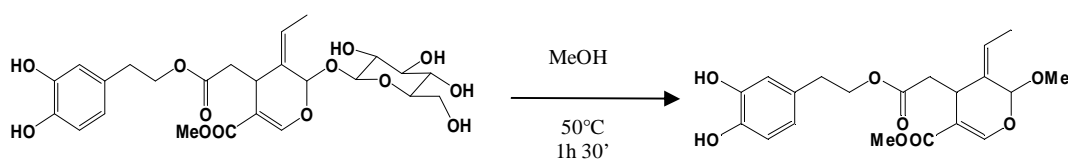
Gli spettri di massa condotti sull'aglicone etilato, mostra una corrente ionica indice di due prodotti con stessi picchi molecolari ma di diversa intensità. Il meccanismo ipotizzato prevede la formazione dello ione ossonio con conseguente formazione di due diastereoisomeri



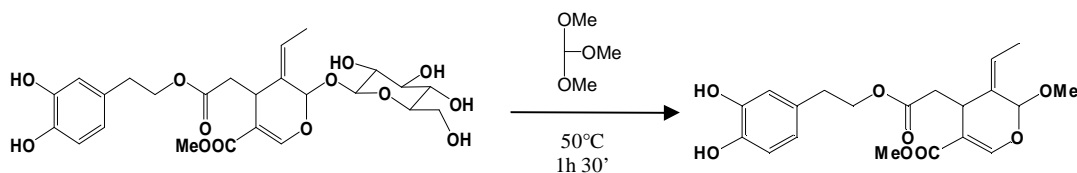


$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.51$  s,  $\text{H}_3$ ;  $\delta = 7.03$  d,  $\text{H}_{4'}$ ,  $^4\text{J}_{4',8'} = 2.17$ ;  $\delta = 6.80$  dd,  $\text{H}_{8'}$ ,  $^4\text{J}_{8',7'} = 8.08$ ;  $^4\text{J}_{8',4'} = 2.17$ ;  $\delta = 6.62$  dd,  $\text{H}_{7'}$ ,  $^4\text{J}_{7',8'} = 8.08$ ,  $^4\text{J}_{7',\text{OH}} = 1.97$ ;  $\delta = 5.73$  qt,  $\text{H}_8$ ,  $^3\text{J}_{8,10} = 6.90$ ;  $\delta = 5.21$  s,  $\text{H}_1$ ;  $4.10 < \delta < 4.30$  m,  $\text{H}_{1'}$ ;  $\delta = 3.90$  dd,  $\text{H}_5$ ,  $^3\text{J}_{5,6b} = 10.06$ ,  $^3\text{J}_{5,6a} = 3.55$ ;  $\delta = 3.80$  s, Me;  $3.50 < \delta < 3.65$  m,  $\text{CH}_2$ , Et;  $\delta = 2.93$  dd,  $\text{H}_{6b}$ ,  $^2\text{J}_{6b,6a} = 14.59$ ,  $^3\text{J}_{6b,5} = 10.06$ ;  $\delta = 2.82$  t,  $\text{H}_2$ ,  $^3\text{J}_{2',1'} = 6.11$ ;  $\delta = 2.70$  dd,  $\text{H}_{6a}$ ,  $^2\text{J}_{6a,6b} = 14.59$ ,  $^3\text{J}_{6a,5} = 3.55$ ;  $\delta = 1.59$  d,  $\text{H}_{10}$ ,  $^3\text{J}_{10,8} = 6.90$ ;  $1.18 < \delta < 1.28$  m,  $\text{CH}_3$ , Et.

### 5.2.1. d Procedura di sintesi dell'aglicone dell'oleuropeina metilato



In un pallone da 100 ml si pone 0.5 gr dell'oleuropeina, 3 ml di MeOH con  $\text{Er}(\text{OTf})_3$  5%. Si lascia sotto agitazione magnetica. La reazione viene monitorata per TLC (miscela eluente  $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$  (9/1)). Dopo circa 1 ora e 30 minuti si osserva la scomparsa del prodotto iniziale. Si lascia raffreddare e si evapora il solvente a pressione ridotta e il residuo viene ripreso con una soluzione di cloroformio. Si purifica il prodotto per flash cromatografia, miscela eluente  $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$  (9.25/0.25) ottenendo una resa del 80%.

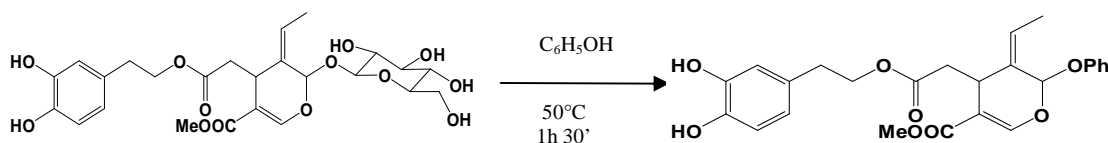


In un pallone da 100 ml si pone 0.5 gr dell'oleuropeina, 0,75 gr. di trimetilortoformiato con  $\text{Er}(\text{OTf})_3$  5% e 5 ml di  $\text{CH}_3\text{CN}$  acquoso. Si lascia sotto

agitazione magnetica. La reazione viene monitorata per TLC (miscela eluente CH<sub>3</sub>Cl/MeOH (9/1)). Dopo circa 2 ore si osserva la scomparsa del prodotto iniziale. Si lascia raffreddare e si evapora il solvente a pressione ridotta e il residuo viene ripreso con una soluzione di cloroformio. Si purifica il prodotto per flash cromatografia, miscela eluente CH<sub>3</sub>Cl/MeOH (9.25/0.25) ottenendo una resa del 83%.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ= 7.49 s, H<sub>3</sub>; δ= 6.99 d, H<sub>4'</sub>, <sup>4</sup>J<sub>4',7'</sub>= 2.00; δ= 6.78 dd, H<sub>8'</sub>, <sup>4</sup>J<sub>8',7'</sub>= 8.00; δ= 6.62 dd, H<sub>7'</sub>, <sup>4</sup>J<sub>7',8'</sub>= 8.00, <sup>4</sup>J<sub>7',4'</sub>= 2.00; δ= 5.70 qt, H<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J<sub>8,10</sub>= 6.93; δ= 5.21 s, H<sub>1</sub>; 4.10<δ<4.30 m, H<sub>1'</sub>; δ= 3.90 dd, H<sub>5</sub>, <sup>3</sup>J<sub>5,6b</sub>= 10.06, <sup>3</sup>J<sub>5,6a</sub>= 3.55; δ= 3.80 s, Me; δ=3.55 s, CH<sub>3</sub>, OMe; δ= 2.93 dd, H<sub>6b</sub>, <sup>2</sup>J<sub>6b,6a</sub>= 14.59, <sup>3</sup>J<sub>6b,5</sub>= 10.06; δ= 2.82 t, H<sub>2'</sub>, <sup>3</sup>J<sub>2',1'</sub>= 6.11 ; δ= 2.70 dd, H<sub>6a</sub>, <sup>2</sup>J<sub>6a,6b</sub>= 14.59, <sup>3</sup>J<sub>6a,5</sub>= 3.55; δ= 1.59 d, H<sub>10</sub>, <sup>3</sup>J<sub>10,8</sub>= 6.90.

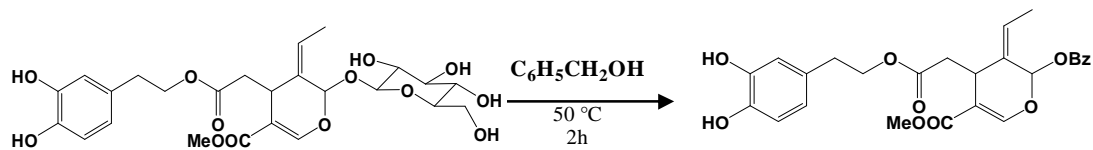
### 5.2.1. e Procedura di sintesi dell'aglicone dell'oleuropeina O-Fenile



In un pallone da 100 ml si pone 0.5 gr dell'oleuropeina, 0,75 gr. di fenolo con Er(OTf)<sub>3</sub> 5% e 5 ml di CH<sub>3</sub>CN acquoso. Si lascia sotto agitazione magnetica. La reazione viene monitorata per TLC (miscela eluente CH<sub>3</sub>Cl/MeOH (9/1)). Dopo circa 1 ora e 30 minuti si osserva la scomparsa del prodotto iniziale. Si lascia raffreddare e si evapora il solvente a pressione ridotta e il residuo viene ripreso con una soluzione di cloroformio. Si purifica il prodotto per flash cromatografia, miscela eluente CH<sub>3</sub>Cl/MeOH (9.25/0.25) ottenendo una resa del 45%.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ= 7.49 s, H<sub>3</sub>; 6.73<δ<6.80 5H<sub>Ph</sub>; δ= 6.59 dd, H<sub>8'</sub>, <sup>4</sup>J<sub>8',7'</sub>= 8.01, <sup>4</sup>J<sub>8',4'</sub>= 2.00; δ= 6.58 d, H<sub>7'</sub>, <sup>4</sup>J<sub>7',8'</sub>= 8.01 ; δ= 6.52 d, H<sub>4'</sub>; δ= 5.93 s, I H<sub>1</sub>; δ= 5.93 s, II H<sub>1</sub>; 4.11<δ<4.21 m 2H<sub>1'</sub>; δ= 3.76 s, Me; 3.37<δ<3.45 m H<sub>8</sub>; δ= 2.74 t, H<sub>2'</sub>, <sup>3</sup>J<sub>2',1'</sub>= 6.24; δ= 2.49 dd, H<sub>6b</sub>, <sup>2</sup>J<sub>6b,6a</sub>= 15.07, <sup>3</sup>J<sub>6b,5</sub>= 5.07; δ= 2.39 dd, H<sub>6a</sub>, <sup>2</sup>J<sub>6a,6b</sub>= 15.07, <sup>3</sup>J<sub>6a,5</sub>= 4.47; δ= 1.37 d, I H<sub>10</sub>, <sup>3</sup>J<sub>10,8</sub>= 7.18; δ= 1.27 d, II H<sub>10</sub>, <sup>3</sup>J<sub>10,8</sub>= 7.07

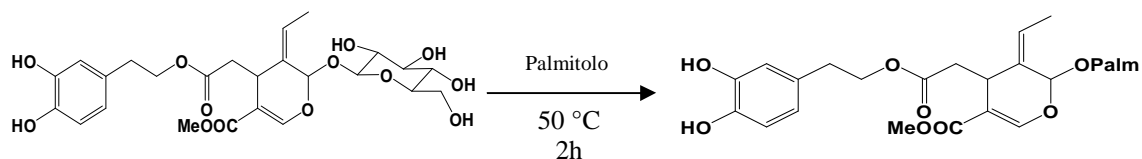
### 5.2.1. f Procedura di sintesi dell'aglicone dell'oleuropeina O-Benzile



In un pallone da 100 ml si pone 0.5 gr dell'oleuropeina, 0,75 gr. di benzolo con  $\text{Er}(\text{OTf})_3$  5% e 5 ml di  $\text{CH}_3\text{CN}$  acquoso. Si lascia sotto agitazione magnetica. La reazione viene monitorata per TLC (miscela eluente  $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$  (9/1)). Dopo circa 2 ore si osserva la scomparsa del prodotto iniziale. Si lascia raffreddare e si evapora il solvente a pressione ridotta e il residuo viene ripreso con una soluzione di cloroformio. Si purifica il prodotto per flash cromatografia, miscela eluente  $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$  (9.25/0.25) ottenendo una resa del 78%.

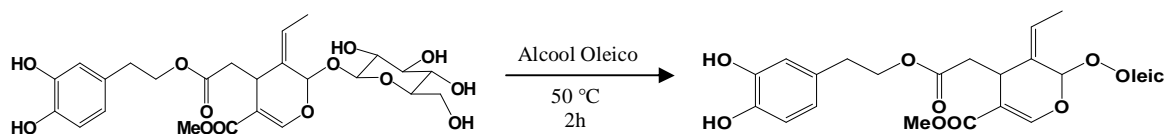
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $7.50 < \delta < 7.59$   $5\text{H}_{\text{Bz}}$ ;  $\delta = 7.26$  s,  $\text{H}_3$ ;  $6.60 < \delta < 6.83$   $5\text{H}_{\text{Ph}}$ ;  $5.55 < \delta < 5.80$  m,  $\text{H}_1$ ;  $4.35 < \delta < 4.45$  m,  $\text{CH}_2_{\text{Bz}}$ ;  $4.18 < \delta < 4.25$  m,  $\text{H}_1$ ;  $3.49 < \delta < 3.51$  m,  $\text{H}_5$ ;  $2.70 < \delta < 2.90$  m,  $\text{H}_6$ ;  $2.50 < \delta < 2.70$  m,  $\text{H}_2$ ;  $\delta = 2.03$  d,  $\text{H}_{10}$ ,  $^3\text{J}_{10,8} = 6.90$ .

### 5.2.1. g Procedura di sintesi dell'aglicone palmitoil oleuropeina



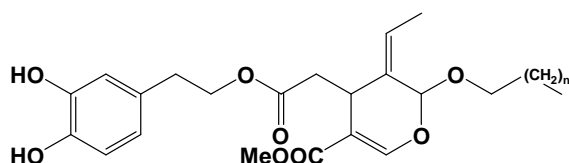
In un pallone da 100 ml si pone 0.5 gr dell'oleuropeina, 0,75 gr. di palmitolo con  $\text{Er}(\text{OTf})_3$  5% e 5 ml di  $\text{CH}_3\text{CN}$  acquoso. Si lascia sotto agitazione magnetica. La reazione viene monitorata per TLC (miscela eluente  $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$  (9/1)). Dopo circa 2 ore si osserva la scomparsa del prodotto iniziale. Si lascia raffreddare e si evapora il solvente a pressione ridotta e il residuo viene ripreso con una soluzione di cloroformio. Si purifica il prodotto per flash cromatografia, miscela eluente  $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$  (9.25/0.25) ottenendo una resa del 60%.

### 5.2.1. h Procedura di sintesi dell'aglicone oleil-oleuropeina



In un pallone da 100 ml si pone 0.5 gr dell'oleuropeina, 0,75 gr. di alcol oleico con  $\text{Er}(\text{OTf})_3$  5% e 5 ml di  $\text{CH}_3\text{CN}$  acquoso. Si lascia sotto agitazione magnetica. La reazione viene monitorata per TLC (miscela eluente  $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$  (9/1)). Dopo circa 2 ore si osserva la scomparsa del prodotto iniziale. Si lascia raffreddare e si evapora il solvente a pressione ridotta e il residuo viene ripreso con una soluzione di cloroformio. Si purifica il prodotto per flash cromatografia, miscela eluente  $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$  (9.25/0.25) ottenendo una resa del 70%.

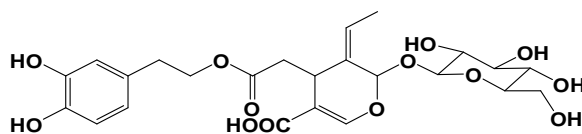
I dati spettroscopici per gli ultimi due prodotti sono:



$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.51$  s,  $\text{H}_3$ ;  $\delta = 6.98$ ,  $\text{H}_4$ ,  $^4\text{J}_{4',7'} = 1.88$ ;  $\delta = 6.80$  d,  $\text{H}_8$ ,  $^4\text{J}_{8',7'} = 8.01$ ;  $\delta = 6.61$  dd,  $\text{H}_7$ ,  $^4\text{J}_{7',8'} = 8.01$ ,  $^4\text{J}_{7',4'} = 1.88$ ;  $\delta = 5.72$  qt,  $\text{H}_8$ ,  $^3\text{J}_{8,10} = 6.94$ ;  $\delta = 5.21$  s,  $\text{H}_1$ ;  $4.10 < \delta < 4.28$  m  $2\text{H}_{1'}$ ;  $\delta = 3.88$  dd,  $\text{H}_5$ ,  $^3\text{J}_{5,6b} = 14.95$ ,  $^3\text{J}_{5,6a} = 3.95$ ;  $\delta = 3.78$  s,  $\text{COOMe}$ ;  $3.47 < \delta < 3.62$  m  $\text{OCH}_2$ ;  $\delta = 2.39$  dd,  $\text{H}_{6a}$ ;  $\delta = 2.74$  t,  $\text{H}_2$ ,  $^3\text{J}_{2',1'} = 6.24$ ;  $\delta = 2.68$  dd,  $\text{H}_{6b}$ ,  $^2\text{J}_{6b,6a} = 14.48$ ;  $\delta = 1.80$  m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $\delta = 1.58$  d,  $\text{H}_{10}$ ,  $^3\text{J}_{10,8} = 6.95$ ;  $\delta = 1.60$  m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $\delta = 1.25$  s,  $\text{CH}_{2(12)}$ ;  $\delta = 0.87$  t,  $\text{CH}_3$ .

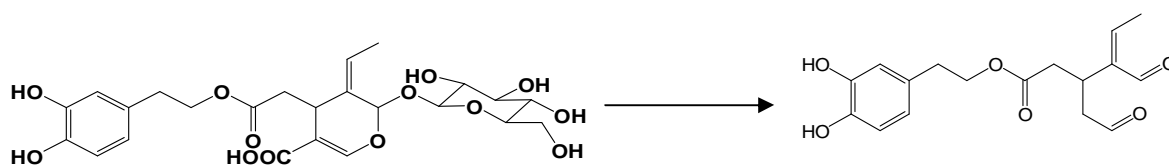


5.3.1. a Estrazione della demetiloleuropeina da drupe invaiate.



In un becker 250 grammi di polpa di olive (cv. Coratina) vengono omogeneizzati con 500 ml di metanolo e riscaldati in bagno d'acqua fino ad ebollizione. Separata per filtrazione alla pompa la soluzione alcolica, la polpa è fatta macerare altre due volte con metanolo. Le soluzioni alcoliche riunite sono state evaporate fino ad ottenere una consistenza sciropposa. Questa massa viene diluita con 1,2 litri di acqua e per centrifugazione, a 4100 giri per 10 minuti, viene allontanato un solido giallastro insolubile presente sulla superficie, oleoso. La soluzione acquosa, che presenta una colorazione scura, viene estratta in imbuto separatore con acetato di etile (200ml per 20 volte). L'estratto organico viene evaporato e portato a secco. Si ottiene così un grezzo contenente diversi derivati tra cui la demetiloleuropeina che viene purificata per flash cromatografia (Versa Flash-Sigma Aldrich) usando come eluente l'acqua. Si ottengono circa 0,27 grammi di demetiloleuropeina.

### 5.3.1.b Procedura di sintesi dell'aglicone della demetioleuropeina (oleopentadiale)



La procedura di sintesi è riportata nel brevetto internazionale riportato in bibliografia.

Dati spettroscopici:

300 H-NMR della demetiloleuropeina e dell' oleopentadiale.						
protoni	DEMÉTIL OLEUROPEINA	molteplicità	J,Hz	OLEO PENTADIALE	molteplicità	J,Hz
1	5.91	s		9.20	d	1.88
3	7.53	s		9.63	s	
4a				2.97	ddd	17.36; 8.12; 1.06
4b				2.63	dd	15.78
5	3.97	dd	9.20; 4.06	3.64	m	
6a	2.45	dd	14.07; 9.47	2.63	dd	15.78
6b	2.45	dd	14.07; 9.47	2.77	dd	15.78
8	6.00	m		7.30	s	
10	1.66	d	6.49	2.08	d	7.06
1'	4.15	m		4.21	m	
2'	2.75	t	7.31	2.79	t	6.12
4'	6.67	d	1.90	6.73	d	2
7'	6.70	d	8.29	6.80	d	8.13
8'	6.55	dd	7.85; 1.90	6.65	dd	8.13; 2.00

## Bibliografia

1. J. Elkington, < <http://www.sustainability.co.uk/sustainability.htm>>.
2. P. T. Anastas and J. C. Warner. *Green Chemistry: Frontiers in Chemical Synthesis and Processes*, Oxford Science Publications, Oxford **1998**.
3. *OECD Environment Health and Safety Publications, Series on Risk Management N°10* (1999), Proceeding of the OECD workshop on sustainable chemistry” Venice, 15-17 October **1998**, pp 204-205.
4. (a) B. M. Trost. *Science* **1991**, 254, 1471; (b) B. M. Trost. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl* **1995**, 34, 259.
5. (a) Leitner, W.; *Appl. Organomet. Chem.* **2000**, 14, 809; (b) Giles, M. R.; Griffiths, R. M. T.; Aguiar-Ricardo, A. I.; Silva, M. M. C. G.; Howdle, S. M. *Macromolecules*, **2001**, 34, 20. (c) Fu, H.; Coelho, L. A. F.; Matthews, M. A. *J. Supercritical Fluids*, **2000**, 18 (2), 141.
6. (a) Li, C.-J. *Green Chemical Syntheses and Processes*; (b) Breslow R. *Frontiers in Benign Chemical Syntheses and Processes*; (c) Anastas, P. T.; Williamson, T. C.; *American Chemical Society: Washington, DC*, **2000**; Capitolo 6.
7. Kobayashi, S. ; Nagayama, M.; Busujima, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 8287.
8. Kobayashi, S. ; Hachiya, I. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3560
9. (a) Kobayashi, S. ; Nagayama, M.; Busujima, L. *Chem. Lett.*, **1999**, 71.(b) Kobayashi, S. ; Nagayama, M.; Busujima, L. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 8739.
10. Evans, D. A.; Kozlowski, M. C.; Murry, J. A.; Burgey C. S.; Campos, K. R.; Connell, B. T.; Staples, R. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 669.
11. (a) Kyba, E. P.; Helheson, R. C.; Madan, K.; Gokel, G. W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 2564. (b) Kobayashi, S. ; Nagayama, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11531.
12. (a) Bradshaw, J. S.; Huszthy, P.; McDaniel, C. W.; Zhu, C. Y.; Dalley, N. K.; Izatt, R. M.; Lifson, S. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 3129. (b) Kobayashi, S. ; Nagayama, M.; Manabe, K. *Org. Lett.*, **2001**, 3, 165.

13. Kazuaki, I.; Manabu, K.; Hideki, K.; Hisashi, Y. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4560.
14. Lee, J. C.; Tai, C. A.; Hung, S. C. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 851.
15. Procopiou, P. A.; Baugh, S. P. D.; Flack, S. S.; Inglis, C. G. A., *Chem. Comm.* **1996**, 2625.
16. Barret, A. G. M.; Braddock, D. C. *Chem. Comm.*, **1997**, 351.
17. Khalafi-Nezhad, A.; Alamdari, R. F. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6805.
18. Hwu, J. R.; Jain, M. L.; Tsay, S.; Hakimelahi, G. H. *Chem. Comm.* **1996**, 545.
19. Hough, L.; Richardson, A. C. *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*, Coffey, S. Ed. Elsevier, New York, **1967**.
20. Imamoto, T.; Koide, Y.; Hiyama, S. *Chem Lett.* **1990**, 1445.
21. Iranpoor, N.; Shekarrize, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 455.
22. Iranpoor, N.; Shekarrize, M. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *56*, 5209.
23. Bartoli, G.; Cupone, G.; Dalpozzo, R.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Procopio, A.; Sambri, L.; Tagarelli, A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5945.
24. Dalpozzo, R.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Procopio, A.; Tagarelli, A.; Sindona, G.; Bartoli G. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 9093.
25. Chaundary, S. K.; Hernandez, O. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *95*, 99.
26. Kanai, K.; Sakamoto, I.; Ogawa, S.; Suami, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 1529.
27. R. C. Cooks and P. S. H. Wong, *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *26*, 28.
28. Tsuruta, H.; Yamaguchi, K.; Imamoto, T. *Chem. Comm.* **1999**, 1703.
29. Ministero Politiche Agricole e Forestali, *L'olio d'oliva: Storia, Pregi e Virtù*.
30. Guida olio, La storia dell'olio.
31. Lavee S., Evolution of cultivation techniques in olive growing. *Olive Oil Quality*, Firenze, **1992**, 37-44.
32. Zohary D., The wild genetic resources of the cultivated olive, *Acta Horticulturae*, **1994**, *356*, 62-65.
33. Morettini A., *Olivicoltura*. REDA, Roma. **1972**.
34. Troncoso A., Ricerche sulla differenziazione delle gemme a fiore nell'olivo (*Olea europaea* L.), *Frutticoltura*, **1967**, *10*, 535-542.
35. Lombardo N., Descrizione delle principali cultivar di olivo da olio e da tavole italiane. *Olea-Trattato di olivicoltura*, *9*, 169-192.

36. Pannelli G., Servili M., Osservazioni poliennali sulle variazioni di parametri agronomici durante la maturazione dei frutti di cultivar precoci e tardive di olivo. Atti convegno "Definizione di qualità per l'olio di oliva". Accademia Nazionale dell'Olio, Spoleto, 24 aprile **2000**, 69-92.
37. Baldioli M., Servili M., Perretti G., Montedoro G.F., Antioxidant Activity of Tocopherols and Phenolic Compound of Virgin Olive Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1996**, 73, 1589-1593.
38. "Le sette regole d'oro per produrre olio di oliva biologico" edito dal C.I.Bi. con il patrocinio della Comunità Europea - Fondo europeo agricolo di orientamento e garanzia - P.O.P. di Puglia, e della Regione Puglia - Assessorato agricoltura, foreste, caccia e pesca - servizi di sviluppo agricolo.
39. Visioli F., Bellomo G., Montedoro G. F., Galli C., Low Density Lipoprotein Oxidation is Inhibited in Vitro by Olive Oil Constituents, *Atherosclerosis*, **1995**, 117, 25-32.
40. Petroni A., Blasevich M., Salami M., Papini N., Montedoro G. F., Galli C., Inhibition of Platelet Aggregation And Eicosanoid Production by Phenolic Component of Olive Oil, *Thrombosis Research*, **1996**, 78, 151-160.
41. Curci V., L'olio d'oliva, Edizioni Prometeo, **1998**, 7-16.
42. Ho, T. L., *Tetrahedron* **1985**, 41, 1.
43. Doboszewski, B.; Blaton, N.; Herdewijn, P., *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7909.
44. N., R., Williams; J., D., *Wander The Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Academic Press; New York, **1980**, 761.
45. a) Descotes, G.; Martin, J. C. *Carbohydr. Res.* 1977, 56, 168; b) Klaffke, W.; Pudlo, P.; Springer, D.; Thiem, J. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 6, 509.
46. (a) Grynkievich, G.; Priebe, W.; Zamojski, A. *Carbohydr. Res.* **1979**, 68, 33; (b) Bhate, P.; Horton, D.; Priebe, W. *Carbohydr. Res.* **1985**, 144, 331.
47. (a) Dawe, R. D.; Fraser-Reid, B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 1180; (b) Toshima, K.; Ishizuka, T.; Matsuo, G.; Nakata, M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5673.

48. (a) Toshima, K.; Miyamoto, N.; Matsuo, G.; Nakata, M.; Matsumura, S. *Chem. Commun.* **1996**, 1379; (b) Shanmugasundaram, B.; Bose, A. K.; Balasubramanian, K. K. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6795; (c) deOliveira, R. N.; de Freitas Filho, J. R.; Svivastava, R. M. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2141.
49. Masson, C.; Soto, J.; Bessodes, M. *Synlett* **2000**, 1281.
50. (a) Babu, B. S.; Balasubramanian, K. K. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1271; (b) Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Raman, J. V.; Niranjan, N.; Kumar, S. K.; Kunwar, A. C. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2095; (c) Das, S. K.; Reddy, K. A.; Abbineni, C.; Roy, J.; Rao, K. V. L. N.; Sachwani, R. H.; Iqbal, J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4057; (d) Das, S. K.; Reddy, K. A.; Roy, J. *Synlett* **2003**, 1607.
51. (a) Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Murthy, C. V. S. R.; Kumar, G. M. *Synlett* **2000**, 1450; (b) Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Chand, P. K. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4057; (c) Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Geetha, V. *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 717.
52. (a) Takhi, M.; Abdel-Rahman, A. A.-H.; Schmidt, R. R. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4053. (b) Takhi, M.; Abdel-Rahman, A. A.-H.; Schmidt, R. R. *Synlett* **2001**, 427.
53. Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Reddy, J. S. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 2390.
54. Srinivas Hotha, Ashish Tripathi *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 4555.
55. Moncada S., Palmer R. M., Higgs E. A. (1991) "Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology". *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.
56. J. S. Beckman et al *Meth. Enzymol.* **1994**, *233*, 229-24
57. Dalpozzo, R.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Nardi, M.; Procopio, A.; Tagarelli, A. *Synthesis.* **2004**, *4*, 496.
58. Dalpozzo, R.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Procopio, A.; Russo, B.; Sindona, G. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 1465.G
59. Beauchamp G.K., Keast R.S.J., Morel D., Lin J., Pika J., Han Q., Lee C-H, Smith A. B., Breslin, P.A.S. *Nature* **2005**, *437*, 45-46.
60. Takashi Okitsu, Hiromichi Fujioka, Yasuyuki Kita, Nobutaka Murata, Yoshinari Sawama, *Journal American Chemical Society*, Vol. 128, N<sup>o</sup>. 17, **2006**, pags. 5930-5938

61. Procopio, A.; Sindona, G.; Gaspari, M.; Costa, N.; Nardi, M. Metodo Chimico-Catalitico per la manipolazione dell'oleuropeina per la sintesi del suo aglicone. Italian **Patent MI2007A000904**; (b) A. Procopio, Sindona, G.; Gaspari, M.; Costa, N.; Nardi "Chemical-catalytic method for the peracylation of oleuropein and its products of hydrolysis" Italian **Patent MI2007A000903**, request **International Patent. PCT/IT2008/000303**.