



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di dottorato di ricerca in
Scienze Biochimiche e Tecnologiche Applicate agli Alimenti
ed alla Nutrizione
XXIV ciclo anno 2009

**Cereali per la salute dell'uomo: disponibilità dei composti
antiossidanti nella granella e nei prodotti derivati.**

Federica Taddei

Coordinatore
Prof.ssa Laura De Gara

Tutor
Dott.ssa Maria Grazia D'Egidio

11 Aprile 2012

Federica Taddei

INDICE

1	Introduzione.....	5
1.1	<i>I cereali: caratteristiche principali</i>	5
1.1.1	Il Frumento.....	6
1.1.1.1	Morfologia della cariosside	6
1.1.1.1.1	Tegumenti.....	6
1.1.1.1.2	Endosperma.....	7
1.1.1.1.3	Embrione	7
1.1.1.2	Composizione chimica di base della cariosside	8
1.1.1.2.1	Carboidrati.....	8
1.1.1.2.1.1	Amido	9
1.1.1.2.2	Proteine	10
1.1.1.2.2.1	Proteine citoplasmatiche.....	10
1.1.1.2.2.2	Le proteine di riserva.....	11
1.1.1.2.3	Lipidi	12
1.1.1.2.4	Vitamine e sali minerali	13
1.1.1.2.5	La fibra	13
1.1.1.2.6	Composti antiossidanti	14
1.1.1.2.6.1	I carotenoidi.....	14
1.1.1.2.6.2	Tocoli	14
1.1.1.2.6.3	I composti fenolici	15
1.2	<i>Ruolo degli Antiossidanti</i>	19
1.2.1	I radicali liberi e gli antiossidanti.....	19
1.2.2	Gli antiossidanti ed il loro meccanismo d'azione.....	21
1.2.3	Determinazione dell'attività antiossidante.....	23
1.3	<i>Analisi dei singoli composti antiossidanti tramite cromatografia.....</i>	27
1.4	<i>Tecnologie di trasformazione del frumento.....</i>	29
1.4.1	La macinazione.....	29
1.4.2	La pastificazione.....	30
1.4.3	La decorticazione dei cereali.....	32
1.4.3.1	Effetti del trattamento pre-macinazione sulle caratteristiche delle cariossidi e delle semole di frumento duro.....	33
2	Obiettivi del lavoro.....	34
3	Materiali e metodi	35
3.1	<i>Materiale vegetale</i>	35

3.2	<i>Preparazione dei campioni</i>	35
3.2.1	Macinazione Integrale.....	35
3.2.2	Macinazione su impianto pilota.....	36
3.2.3	Pastificazione	36
3.2.4	Decorticazione	36
3.3	<i>Analisi della capacità antiossidante totale</i>	36
3.3.1	Metodo diretto	36
3.3.2	Standardizzazione della metodica e sua descrizione.....	37
3.4	<i>Analisi degli acidi fenolici</i>	37
3.4.1	Messa a punto del metodo di estrazione.....	37
3.4.1.1	Messa a punto dell'estrazione degli acidi fenolici liberi.....	38
3.4.1.2	Messa a punto dell'estrazione degli acidi fenolici coniugati	39
3.4.1.3	Messa a punto dell'estrazione degli acidi fenolici legati	39
3.4.2	Determinazione degli acidi fenolici mediante HPLC	40
3.4.3	Analisi statistica dei dati	40
4	Risultati e Discussione	42
4.1	<i>Analisi della capacità antiossidante totale:determinazione e standardizzazione delle condizioni sperimentali:</i>	42
4.2	<i>Analisi della TAC nelle diverse specie di cereali</i>	44
4.2.1	Analisi della varianza: influenza dell'anno, della specie e dell'ambiente	46
4.3	<i>Analisi della TAC in frumento duro</i>	47
4.3.1	Valutazione di diversi genotipi in un unico ambiente.....	47
4.3.2	Analisi della TAC: valutazione dell'influenza dell'ambiente e dell'anno.....	48
4.3.3	Analisi della TAC in orzo.....	51
4.4	<i>La trasformazione del frumento duro</i>	53
4.4.1	Variabilità della TAC nelle frazioni di macinazione in funzione del tempo e delle modalità di conservazione.....	53
4.4.2	Variabilità della TAC durante la trasformazione del frumento duro: da sfarinato integrale a pasta 54	
4.4.3	La decorticazione	55
4.5	<i>Determinazione degli acidi fenolici</i>	57
4.5.1	Validazione del metodo	57
4.5.2	Influenza del genotipo e dell'ambiente	59
4.5.3	Influenza dei processi tecnologici	62
4.5.4	Acidi fenolici e decorticazione.	63

Tesi di dottorato in Scienze biochimiche e tecnologiche applicate agli alimenti ed alla nutrizione, di Federica Taddei, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/04/2012.

La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte

5	Conclusioni e prospettive.....	65
6	Bibliografia	67

Cereali per la salute dell'uomo: disponibilità dei composti antiossidanti nella granella e nei prodotti derivati.

1 Introduzione

1.1 I cereali: caratteristiche principali

I cereali comprendono diverse specie, quasi tutte appartenenti alla famiglia della *Graminaceae*, che producono semi amidacei, farinosi, commestibili utilizzati sia nell'alimentazione umana che animale.

I cereali rappresentano il gruppo di colture più importante nell'economia agricola mondiale e nell'alimentazione umana e animale.

Tra i cereali più coltivati al mondo si trovano il frumento, il riso e il mais, seguono poi a distanza orzo, avena, segale, sorgo e miglio.

A livello nutrizionale, i cereali rappresentano un'ottima fonte energetica essendo ricchi in carboidrati; sono anche una discreta fonte di proteine, sali minerali, vitamine e fibre ed hanno un basso contenuto in lipidi.

Nel corso degli ultimi trent'anni si è verificata una profonda trasformazione del concetto di alimentazione; infatti mentre nel passato gli alimenti erano considerati quasi esclusivamente come fattori indispensabili per lo sviluppo e la crescita del corpo, oggi viene riconosciuto loro un ruolo chiave nella determinazione della qualità della vita. Si è andato così sviluppando il concetto di alimenti funzionali cioè di alimenti capaci di svolgere, al di là dei normali effetti nutrizionali, un'azione benefica su una o più funzioni dell'organismo, per il miglioramento dello stato di salute e di benessere.

I cereali, da sempre prodotti base della dieta mediterranea, possono rivestire un ruolo importante anche nella società moderna come materia prima per alimenti funzionali, in quanto contengono alcuni componenti regolatori di importanti funzioni vitali, quali fibre, sostanze antiossidanti, fitosteroli ecc. Attualmente c'è un crescente interesse verso i cereali integrali proprio per la presenza dei numerosi composti bioattivi presenti nella cariosside.

I cereali pur nella variabilità tra specie ed entro specie, presentano caratteristiche simili sia per composizione che per morfologia. Di seguito viene descritto in dettaglio il frumento, uno dei cereali maggiormente utilizzati nell'alimentazione umana.

1.1.1 Il Frumento

Con il termine frumento si identificano diverse specie appartenenti al genere *Triticum*, le quali vengono distinte in base al numero di cromosomi in:

- diploidi con $2n=2x=14$. Contengono il genoma A (es. *Triticum monococcum*);
- tetraploidi con $2n=4x=28$. Contengono i genomi AB (es. *T. turgidum* ssp *durum*, *T. turgidum* ssp *dicoccum*, *T. turgidum* ssp *polonicum*) oppure AG (es. *T. timopheevii* meno utilizzato nell'alimentazione);
- esaploidi con $2n=6x=42$. Contengono i genomi ABD (*T. aestivum* e *T. aestivum* ssp *spelta*) oppure AAG (*T. zhukowskyi*).

Di particolare interesse è il frumento duro, cereale importante per l'Italia in considerazione del fatto che il nostro paese ha la leadership mondiale nella produzione ed esportazione di pasta, uno dei principali prodotti di trasformazione di questa specie.

1.1.1.1 Morfologia della cariosside

La cariosside, è un frutto secco indeiscente nella cui struttura anatomica si distinguono tre regioni principali (Fig.1): i tegumenti (sia del frutto che del seme), l'embrione (comunemente definito germe) e l'endosperma amilaceo o mandorla farinosa. Ognuna di queste parti è composta da più strati e possiede un'organizzazione strutturale ed una composizione chimica diversa e specifica per meglio rispondere alla propria funzione biologica.

1.1.1.1.1 Tegumenti

I tegumenti sono un insieme di rivestimenti fibrosi (glume e glumette) che ricoprono ogni cariosside. Generalmente vengono facilmente eliminati con la trebbiatura, poiché non strettamente aderenti al chicco, fatta eccezione per alcuni cereali, cosiddetti vestiti, che hanno i rivestimenti strettamente adesi alla cariosside e devono essere perciò eliminati con mezzi idonei. Al di sotto di tali strutture (Fig.1), ad ulteriore protezione del seme dagli attacchi di patogeni fungini ed insetti e da scambi di umidità, sono presenti più strati cellulari fortemente compressi, le cui cellule presentano pareti robuste e mancanza di spazi intercellulari, e si dividono in:

- tegumenti del frutto e del pericarpo: costituiti da epidermide, ipodermide, 'cross cell', 'tube cells';

- tegumenti del seme: costituiti da testa e tessuto nucellare; uno degli strati centrali del tegumento può contenere particolari pigmenti influenzando il colore del chicco.

1.1.1.1.2 Endosperma

L'endosperma o mandorla farinosa, è la parte preponderante del chicco sia per massa (80-82% del peso), che per volume; in tale regione vengono in particolare accumulate le principali sostanze di riserva, amido e proteine.

Nell'endosperma si possono distinguere tre tipi di cellule:

- Cellule dello strato aleuronico (fig.1): sono riunite in uno strato unico di forma cubica (35-40 μm) (Hoseney et al 1992), che rappresenta il 7% circa del chicco, e che riveste l'intero endosperma, ad eccezione del germe. Queste cellule contengono prevalentemente granuli di proteine funzionali, tra cui alcuni enzimi che vengono sintetizzati ed attivati al momento della germinazione. Sebbene lo strato aleuronico sia una parte anatomica dell'endosperma, viene rimosso durante la macinazione, in quanto, in virtù della sua peculiare composizione, mostra un comportamento analogo a quello degli strati tegumentali.
- Cellule periferiche: immediatamente sotto lo strato aleuronico, hanno forma cubica e leggermente allungata. Sono relativamente povere di amido, in quanto in questa zona è ancora abbastanza alta la percentuale di proteine. (Fig 1.).
- Cellule prismatiche: si estendono al centro dei lobi ed hanno forma allungata con asse disposto verso il centro del lobo. Lo spessore della parete cellulare tende ad aumentare dalla regione centrale alla periferia. All'interno di queste cellule sono particolarmente abbondanti i granuli di amido distribuiti in una popolazione bimodale, sia per forma che per dimensione, ma equivalenti per composizione e caratteristiche fisiche (Fig 1.).

1.1.1.1.3 Embrione

E' collocato alla base del seme (Fig.1), dalla parte opposta della barbetta e costituisce l'apparato germinativo del chicco, di cui rappresenta il 3% circa in peso. È ricco di proteine, di sostanze minerali e di grassi (circa il 25%) e viene separato durante la macinazione unitamente ai crusconi. Morfologicamente è costituito dal germe e da un tessuto che lo protegge, detto scutello che ha la funzione di fornire enzimi idrolitici che rendono disponibili sostanze di riserva dell'endosperma.

Le proteine dell'embrione differiscono dalle proteine di riserva dell'endosperma in quanto costituite quasi esclusivamente da albumine e globuline, piuttosto che prolamine e glutenine.

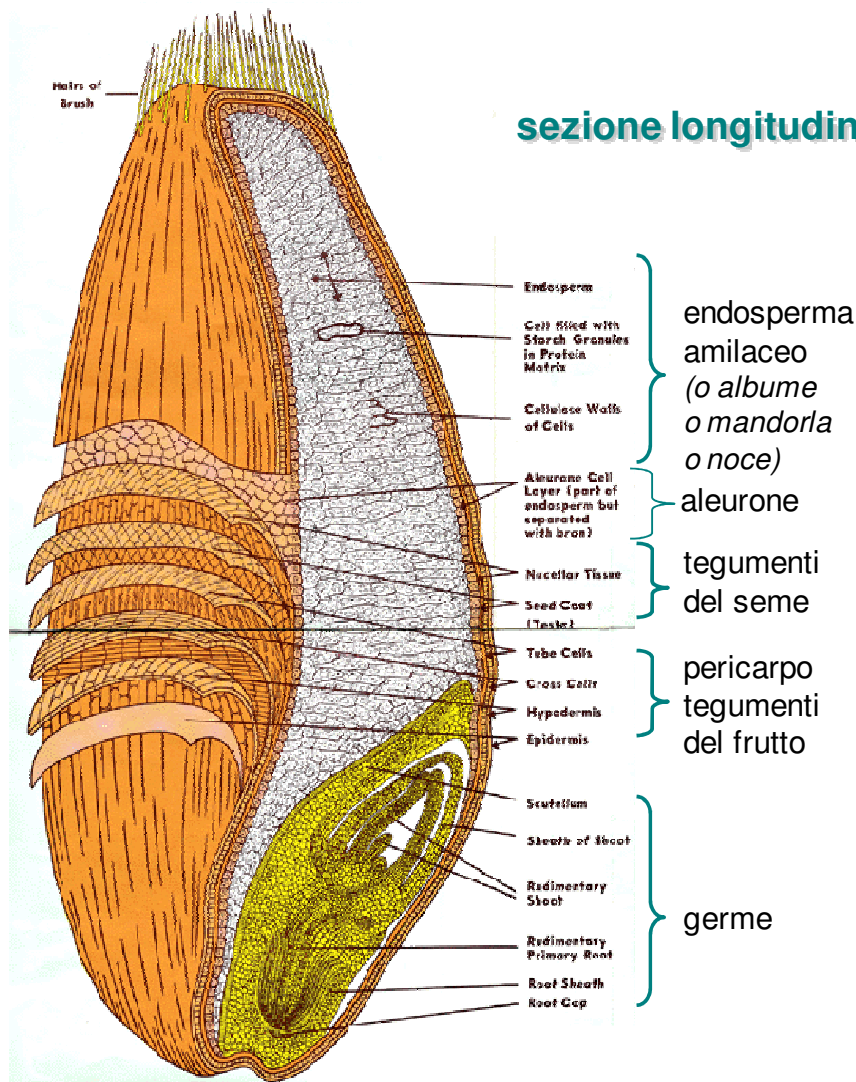


Fig.1: Schema descrittivo della morfologia della cariosside

1.1.1.2 Composizione chimica di base della cariosside

1.1.1.2.1 Carboidrati

I carboidrati sono i composti più importanti da un punto di vista quantitativo e sono presenti come monosaccaridi, disaccaridi, oligosaccaridi e polisaccaridi. Le prime tre classi sono rappresentate principalmente da glucosio, fruttosio, maltosio e saccarosio; tali molecole presentano un'elevata solubilità, sia in acqua sia in una soluzione acquosa di etanolo ed hanno un importante ruolo metabolico e fisiologico. Gli zuccheri riducenti

(glucosio, fruttosio, ecc.) mostrano elevata reattività verso gruppi amminici, qualora il sistema venga riscaldato dando origine alla reazione di Maillard (Resmini et al.1999). I polisaccaridi si distinguono in polisaccaridi di riserva (amido) e strutturali, rappresentando questi ultimi un gruppo eterogeneo così definito a causa del ruolo determinante che svolgono nella parete cellulare, tra cui si ritrovano cellulosa ed emicellulose.

1.1.1.2.1.1 Amido

L'amido è il principale polisaccaride di riserva dei cereali; esso viene stoccato all'interno delle cellule dell'endosperma in organelli detti amiloplasti, dove si accumula a partire da un punto detto ilo, dando origine ai granuli secondo vie metaboliche che hanno come precursore il saccarosio (Duffus, 1987).

Nel granulo di amido sono presenti due polimeri:

- Amilosio: macromolecola lineare costituita da circa 10^3 molecole di glucosio (P.M. 10^5 - 10^6 Da) e rappresentante il 18-20% dell'amido. Il legame α 1-4 fra le diverse unità di glucosio permette alla catena di assumere in particolari situazioni una conformazione tridimensionale ad elica con i gruppi OH delle unità saccaridiche rivolti verso l'esterno, così da creare una cavità interna idrofobica (Blueon et al. 1990).
- Amilopectina: macromolecola ramificata, costituita da 10^4 - 10^5 molecole di glucosio (P.M. 10^7 - 10^9 Da) e rappresentante l'80-82% del granulo di amido; ha la stessa composizione chimica dell'amilosio, ma presenta oltre ai legami α 1-4 anche legami α 1-6, da cui prendono origine le ramificazioni, ognuna delle quali è mediamente lunga 20-25 molecole di glucosio. Questa complessa struttura assume una configurazione cosiddetta a "grappolo" dove si può osservare un'alternanza di zone amorfe (punti di ramificazione) e zone cristalline, dette micelle (Ring et al. 1987); in queste ultime zone si formano legami -H tra le catene vicine.

Nei granuli di amido di tutti i cereali, si osserva un elevato grado di cristallinità, responsabile delle proprietà di birifrangenza, alla luce polarizzata, derivante dal particolare ordine assunto dai due polimeri amilosio e amilopectina. A temperatura ambiente l'amido risulta insolubile in acqua, sia per l'elevato peso molecolare dei suoi costituenti, sia per la stabilizzazione mediante legami -H tra i numerosi gruppi

ossidrilici; quando viene posto in acqua a temperature superiori a 50-55°C, si osserva il fenomeno della gelatinizzazione, che consiste nel rigonfiamento del granulo di amido fino al collasso dell'ordine molecolare con irreversibile cambiamento delle proprietà, quali perdita di cristallinità e di birifrangenza e solubilizzazione di una parte delle molecole di amilosio a cui segue un aumento di viscosità.

Quando l'amido gelatinizzato viene raffreddato si osserva il fenomeno della retrogradazione (soprattutto a carico dell'amilosio), cioè la riassociazione di diverse molecole in una nuova struttura ordinata.

1.1.1.2.2 Proteine

1.1.1.2.2.1 Proteine citoplasmatiche

Le proteine presenti nella cariosside sono generalmente classificate in proteine citoplasmatiche (con attività enzimatica, proprietà emulsionanti e schiumogene) e proteine di riserva; queste ultime hanno un ruolo tecnologico importante in quanto sono in grado di strutturarsi nel complesso del glutine (Pogna *et al.* 1990). Le proteine citoplasmatiche rappresentano il 15-20% delle proteine totali, e sono costituite essenzialmente da albumine (solubili in acqua) e da globuline (solubili in soluzioni saline); esse si trovano soprattutto nello strato aleuronico e nell'embrione dove rappresentano fino al 50% delle proteine totali (albumine 30%, globuline 15-20%). Le proteine citoplasmatiche hanno una composizione in amminoacidi ricca in lisina, acido aspartico, treonina, alanina e valina e sono povere in glutammina (Lásztitj, 1984), caratteristiche che assicurano solubilità ed un più elevato valore biologico. Tra le proteine citoplasmatiche si trovano anche numerosi enzimi tra i quali si ricordano:

- le α -amilasi, un gruppo di endoenzimi ad azione destrinizzante, in grado di idrolizzare i legami α -1,4 delle molecole di amido, producendo glucosio, maltosio, malto-triosio e destrine di vario peso molecolare;
- le β -amilasi, un gruppo di isoenzimi in grado di idrolizzare l'amido a partire dall'estremità riducente della molecola liberando esclusivamente maltosio per cui non sono in grado di agire sui legami α -1,6 e l'attacco all'amilopectina libera maltosio e β -destrine. Le β -amilasi sono il gruppo enzimatico presente in maggior quantità nell'endosperma della cariosside; la loro azione è ridotta sul granulo d'amido integro ma è molto veloce quando lo stesso è stato attaccato precedentemente dalle α -amilasi.

- le proteasi, sintetizzate nello strato aleuronico e secrete nell'endosperma, si dividono in endoproteasi che attaccano l'interno della catena peptidica ed esoproteasi che rompono le proteine e i peptidi all'estremità della catena.
- le ossidasi (lipossigenasi) sono enzimi responsabili dell'ossidazione delle molecole contenenti una doppia insaturazione cis-cis 1,4 pentadiene, come i carotenoidi; la loro attività è localizzata soprattutto nell'embrione e nello scutello ed è causa della perdita della colorazione giallo della semola durante le operazioni di impastamento ed estrusione nella produzione della pasta.
- le polifenolossidasi sono un gruppo di enzimi che catalizzano la reazione di ossidazione dei lipidi insaturi tramite il perossido di idrogeno; sono implicati nei meccanismi di degradazione dei carotenoidi presenti nelle cariossidi producendo imbrunimenti del colore della pasta.
- la pullulanasi è un enzima deramificante che idrolizza i legami α -(1,6)-D-glucosidici presenti nelle molecole di amilopectina, β -destrine, e α -destrine.

1.1.1.2.2.2 Le proteine di riserva

Questo gruppo di proteine mostra proprietà funzionali uniche, che consentono agli sfarinati di frumento impastati con acqua di dare vita ad un impasto con particolari proprietà viscoelastiche, permettendone la trasformazione in pasta o in prodotti lievitati. Queste proteine recentemente sono state suddivise in tre famiglie principali (Gianibelli *et al.* 2001):

- gliadine
- subunità gluteniniche a basso peso molecolare (LMW)
- subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW)

Esse costituiscono la parte preponderante del glutine, una massa proteica elastica le cui proprietà reologiche influenzano profondamente le caratteristiche di elasticità ed estensibilità degli impasti di frumento.

Le gliadine costituiscono il 40% circa delle proteine dell'endosperma e sono una miscela eterogenea di proteine monomeriche solubili in alcool. Sulla base della loro mobilità elettroforetica vengono classificate in α , β , γ , e ω gliadine.

Le subunità gluteniniche LMW e HMW si estraggono in soluzioni acide come l'acido acetico e si legano tra loro mediante ponti disolfuro per formare nell'endosperma grandi polimeri ramificati.

Le proteine di riserva, definite anche insolubili, rappresentano circa l'80% del totale della frazione proteica ed hanno una composizione aminoacidica peculiare, caratterizzata da un'alta percentuale di glutamina (41% nelle gliadine e 34% nelle glutenine) e di prolina (14% nelle gliadine e 11% nelle glutenine); sono inoltre presenti in buona parte anche aminoacidi idrofobici, mentre è basso il contenuto di aminoacidi basici come la lisina, l'arginina e l'istidina (Pomeranz, 1987). Tale composizione aminoacidica determina da un lato il basso valore biologico di queste proteine e contemporaneamente una elevata capacità di aggregazione tra le diverse catene.

Tra queste frazioni proteiche sono identificabili alcune differenze: le gliadine sono molecole relativamente piccole (10^4 - 10^5 Da), con struttura con struttura globulare quindi con un' area superficiale ridotta, che limita i potenziali punti di interazione con altre proteine; sono caratterizzate dalla presenza di legami disolfuro intercatena. L'insieme di queste proprietà assicura caratteristiche di facile deformabilità e dunque di estensibilità. Le glutenine sono molecole polimeriche grandi (10^5 - 10^6 Da) con struttura fibrillare che determina una elevata superficie e di conseguenza favorisce le interazioni molecolari; le catene peptidiche sono legate tra di loro da legami disolfuro, che determinano proprietà di elasticità e tenacità dell'impasto. Durante l'impastamento, grazie alla presenza di acqua ed alla somministrazione di energia, gliadine e glutenine interagiscono tra loro e con alcune molecole lipidiche formando il complesso viscoelastico del glutine.

Il glutine riveste un ruolo determinante per la produzione di pasta, o durante la lievitazione dei prodotti da forno. Nella valutazione della qualità del frumento le caratteristiche del glutine hanno pertanto un ruolo importante: una semola con glutine forte e tenace dà un impasto capace di sopportare gli stress fisici presenti nel processo di pastificazione, in particolare nella fase di essiccazione, e al momento della cottura (D'Egidio, 1986; Feillet e Dexter, 1996).

1.1.1.2.3 Lipidi

I lipidi sono presenti in quantità ridotta nella cariosside (circa il 2-3%), si ritrovano principalmente nel germe dove possono raggiungere il 15%; possono interagire con le proteine del glutine migliorando le proprietà viscoelastiche, e catalizzando la formazione di ponti disolfuro, nonché presentare interazioni con l'amido. I lipidi presenti nella cariosside di frumento sono sia di tipo polare (glicolipidi e fosfolipidi) sia di tipo non polare (soprattutto trigliceridi). Una parte dei lipidi è legata all'amido a

formare gli amido-lipidi (Morrison, 1995), un'altra parte si lega alle proteine durante la lavorazione dell'impasto ed è di determinante importanza nel definirne le caratteristiche reologiche.

1.1.1.2.4 Vitamine e sali minerali

Nella cariosside di frumento, in particolare negli strati più esterni, sono presenti anche altri costituenti quali sali minerali e vitamine, queste ultime presenti in alta percentuale nel germe. Tra le vitamine si trovano la tiamina, la riboflavina, la niacina, la vitamina B6, e l'acido folico; tra i sali minerali sono presenti potassio, magnesio, fosforo, ferro, rame e zinco. Questi composti subiscono generalmente una forte riduzione con la macinazione.

1.1.1.2.5 La fibra

La fibra alimentare non è una sostanza singola, ma una miscela estremamente complessa di polisaccaridi diversi, quali cellulosa, emicellulose, lignina, pectine, gomme, mucillagini, galattomannani, β glucani, polisaccaridi di alghe (agar e carragenine) ecc. Pur non potendosi considerare un nutriente, la fibra alimentare esercita effetti di tipo funzionale e metabolico che la fanno ritenere un'importante componente della cariosside. La fibra è convenzionalmente classificata in due categorie in relazione alla solubilità in acqua: fibra dietetica insolubile (cellulosa, parte delle emicellulose e lignina) e fibra dietetica solubile (pectine, gomme e mucillagini). L'effetto fisiologico principale connesso all'assunzione della fibra insolubile è il miglioramento della peristalsi intestinale, legato alla capacità di trattenere acqua, ed all'influenza sulla viscosità (Schneeman, 1999). La fibra solubile ha molteplici funzioni: rappresenta un buon substrato per alcuni ceppi di batteri lattici e bifidobatteri, che sono benefici per la salute intestinale svolgendo, quindi, un'azione prebiotica (Grizard e Barthelemy, 1999), è in grado di controllare l'indice glicemico (Tudorica et al., 2002) e di ridurre il colesterolo plasmatico (Brown et al., 1999). Il meccanismo d'azione delle diverse sostanze componenti la fibra non è ancora completamente noto, tuttavia l'introduzione di fibra con gli alimenti è stata messa in relazione alla riduzione del rischio per importanti malattie cronico-degenerative, in particolare tumori al colon-retto, diabete e malattie cardiovascolari, nonché all'aumento del senso di sazietà e al miglioramento della funzionalità intestinale e dei disturbi ad essa associati (stipsi, diverticolosi).

1.1.1.2.6 Composti antiossidanti

Nella cariosside dei cereali sono presenti diversi gruppi di composti antiossidanti tra cui:

- Carotenoidi
- Tocoli
- Composti Fenolici

1.1.1.2.6.1 I carotenoidi

Sono pigmenti naturali delle piante, delle alghe, di molti batteri e funghi e di molti animali. Essi sono di struttura terpenica (in particolare tetraterpeni) e conferiscono colorazioni variabili dal rosso al giallo. Tradizionalmente sono classificati in due grandi gruppi strutturali: i caroteni, che presentano una struttura molecolare idrocarburica (β -carotene e licopene) e le xantofille, che presentano nella molecola diverse funzioni ossigenate (luteina, zeaxantina, luteoxantina, neoxantina).

Hanno funzione nutrizionale e fisiologica dovuta al loro ruolo di antiossidanti e di provitamina A (α - e β -carotene); per la loro particolare struttura molecolare, sono capaci di legare ed eliminare i radicali liberi e giocano in questo senso un ruolo importante nel sistema immunitario dei vertebrati.

Il contenuto in carotenoidi, negli sfarinati integrali di frumento duro è in media pari a circa 3,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. (Borrelli et al. 2003; Fratianni et al., 2005), ma è stata osservata una significativa variabilità genetica soprattutto nel contenuto in β -carotene e luteina, principali componenti del colore giallo degli sfarinati e della pasta (Fratianni et al., 2005). Valutando diversi genotipi di frumento duro e tenero, Adom et al. (2003) hanno osservato variazioni pari a 5, 3 e 12 volte nel contenuto in luteina, zeaxantina e β -criptoxantina, rispettivamente; pur essendo un carattere fortemente influenzato dal genotipo, è stata riscontrata anche un'influenza dell'ambiente ed in particolare un incremento nel contenuto in carotenoidi con il deficit idrico e la concimazione solfatica (Panfili et al., 2005).

1.1.1.2.6.2 Tocoli

Chimicamente, sono derivati del benzodidropirano: presentano in posizione 6 un ossidrile e in posizione 2 un gruppo metilico e una catena isoprenoide a 16 atomi di carbonio. I tocoli sono distinti in tocoferoli (catena isoprenoide satura) e tocotrienoli (catena isoprenoide insatura). Ogni tocolo include quattro derivati (α , β , γ and δ) che si differenziano per la presenza di diversi sostituenti metilici sull'anello. Gli organismi

animali ed i batteri non sono in grado di sintetizzarli e devono introdurli con gli alimenti (Hidalgo et al., 2006). I tocoli (vitamina E) sono presenti in concentrazioni significative nel frumento ed in altri cereali come orzo e farro (Carcea et al., 2001); il loro contenuto varia in relazione al genotipo, al grado di maturazione ed alle condizioni ambientali di coltivazione. I tocoli sono localizzati negli strati più esterni della cariosside, in particolare i tocotrienoli nello strato aleuronico e sub-aleuronico ed i tocoferoli nel germe, cioè negli strati che abitualmente vengono scartati durante la macinazione del cereale. In frumento duro il β -tocotrienolo risulta essere il composto di gran lunga preponderante fra gli antiossidanti lipofili (media pari a 13,75 $\mu\text{g g}^{-1}$), pur presentando nell'ambito della stessa cultivar un'ampia variabilità a seconda della provenienza geografica dei campioni (Carcea et al., 2001); il γ -tocoferolo, invece, è presente in minima quantità (0,22 $\mu\text{g g}^{-1}$) ed il δ -tocoferolo solo in tracce. È stato riscontrato che l' α -tocoferolo, è in grado di inibire l'attività lipossigenasica (Pastore et al., 2000b); da un punto di vista delle proprietà salutistiche i tocotrienoli, si presentano come efficaci antiossidanti a livello di membrana con attività ipocolesterolemica ed antitumorale.

1.1.1.2.6.3 I composti fenolici

Sono una classe di composti organici naturali caratterizzati dalla presenza di almeno un anello aromatico, mono o pluri-sostituito da gruppi ossidrilici. In funzione del numero degli anelli fenolici e degli elementi strutturali ad essi legati, possono essere distinti in flavonoidi, acidi fenolici, stilbeni e lignani (Carratù 2005; Rowland 1999). Le sostanze fenoliche sono i prodotti del metabolismo secondario delle piante e provvedono a funzioni essenziali come crescita e riproduzione, agiscono nei meccanismi di difesa contro patogeni e parassiti, e contribuiscono al colore della pianta.

I polifenoli vengono assunti quotidianamente nella nostra dieta. Considerando un consumo giornaliero di frutta, verdura e cereali, la quantità introdotta è di circa 1g/giorno, molto più alta di tutti gli altri antiossidanti alimentari: circa 10 volte più alta della vitamina C, e circa 100 volte più alta della vitamina E e dei carotenoidi (Zdunczyk et al. 2006; Scalbert A. et al 2000). Nei cereali il gruppo più abbondante di polifenoli è costituito dagli acidi fenolici; si ritrovano anche piccole quantità di flavonoidi e significativi livelli di lignani. I polifenoli, che nella frutta e nella verdura si trovano soprattutto in forma libera e in forma coniugata (come glicosidi), nei cereali (cariossidi) sono presenti per più del 60% nella forma insolubile legata alle molecole della parete cellulare.

Esistono numerosi lavori in letteratura sulla composizione di fitochimici nei cereali integrali e soprattutto nel frumento. In un lavoro di Adom et al. (2005) effettuato su numerose

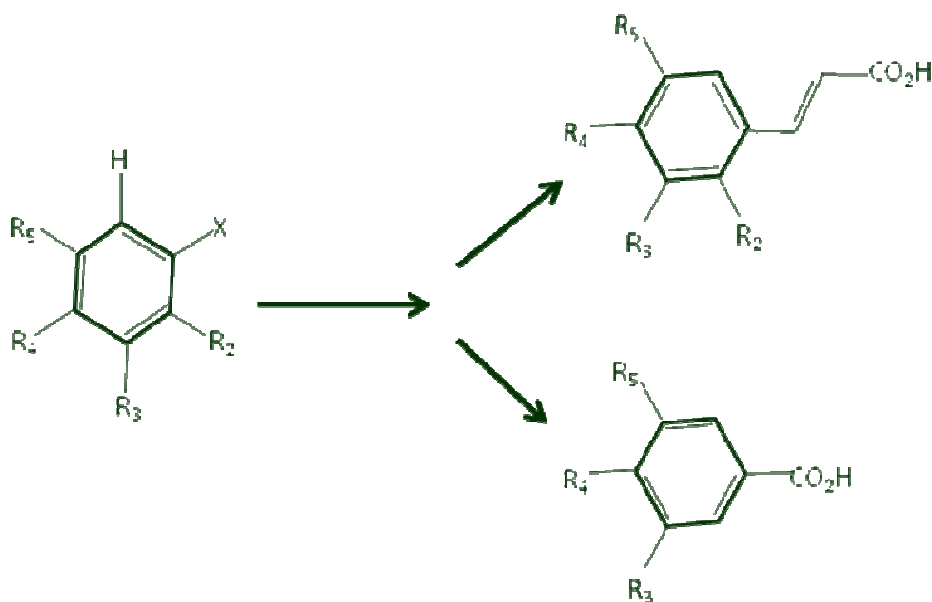
varietà di frumento, è stata valutata, la distribuzione dei fitochimici (fenoli totali, acidi fenolici, flavonoidi) e l'attività antiossidante idrofilica e lipofilica nelle frazioni dei cereali derivate dalla macinazione (crusca/germe e endosperma). I risultati hanno mostrato che il loro contenuto nella crusca e nel germe è estremamente più alto (15-18 volte) rispetto a quello dell'endosperma. Anche per i flavonoidi il contenuto nella crusca e nel germe è maggiore rispetto all'endosperma (10-15 volte in più). I dati sulla capacità antiossidante idrofilica e lipofilica confermano che il contributo maggiore deriva dalla frazione crusca/germe. Recentemente, numerosi studi hanno valutato il profilo degli acidi fenolici nelle diverse forme (libera, coniugata solubile e legata insolubile), e la capacità antiossidante di questi composti in alcune specie di cereali. I risultati mostrano che nonostante ci sia variabilità tra una specie e l'altra, la maggior parte degli acidi fenolici si trova nella forma legata. Inoltre, la capacità antiossidante totale è diversa per le differenti frazioni: il maggior contributo alla capacità antiossidante totale (TAC) è dato dagli acidi fenolici legati e varia tra le specie dal 60 all'80% del totale (Adom, 2002; Lyiana-Pathirana 2006; Pellegrini N. et al. 2006; Zhou K. et al. 2004). I composti fenolici contribuiscono in maniera dominante alla capacità antiossidante dei cereali integrali, anche se il contenuto in fenoli totali (TPC) non può essere correlato alla capacità antiossidante totale, data la presenza di diversi composti antiossidanti con caratteristiche chimiche anche molto diverse tra loro, che possono influenzare questo parametro (Yu L. et al. 2002).

Alcuni lavori in letteratura hanno fatto conoscere i meccanismi attraverso cui i composti fenolici svolgono i loro effetti biologici (Rowland 1999); studiando la relazione struttura-funzione dei polifenoli è stato evidenziato che le caratteristiche strutturali influiscono sulle loro proprietà biologiche, quali biodisponibilità, attività antiossidante e interazione specifica con recettori cellulari (Rice-Evans et al. 1996). Il ruolo protettivo esercitato dai polifenoli e dai fitochimici in genere contro l'insorgenza delle patologie croniche degenerative, è stato attribuito prevalentemente all'azione antiossidante. I polifenoli, grazie alla loro struttura chimica, funzionano attivamente da "scavenger" per stabilizzare i radicali liberi, agenti riducenti, chelanti di metalli pro-ossidanti e "quencher" della formazione dell'ossigeno singoletto, principali responsabili del danno ossidativo presente in numerose malattie infiammatorie e degenerative, causato appunto dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS), su DNA, lipidi e proteine.

1.1.1.2.6.3.1 Gli acidi fenolici

Tra i composti fenolici presenti nella cariosside di frumento, particolare rilievo hanno gli acidi fenolici che si trovano in maggior quantità negli strati più esterni del chicco in

particolare nello strato dell'aleurone (Mateo Anson et al. 2008). Tra gli acidi fenolici il più abbondante è l'acido ferulico, seguito dal p-cumarico, sinapico e caffeico, ed è circa 50-70 volte più concentrato nella porzione crusca/germe rispetto all'endosperma. Gli acidi fenolici da un punto di vista chimico si dividono in due classi: acidi cinnamici ed acidi benzoici. Nel primo gruppo si distinguono l'acido cumarico (orto, meta e para), caffeico, ferulico e sinapico; nel secondo gruppo si distinguono l'acido meta e para-idrossibenzoico, protocatecuico, vanillico, siringico come presentato in figura 2. Tra gli acidi fenolici quello maggiormente ritrovato nella cariosside di frumento è l'acido ferulico.



Derivati degli acidi cinnamici

R₂=OH Acido o-cumarico
R₃=OH Acido m-cumarico
R₄=OH Acido p-cumarico
R₃=R₄=OH Acido caffeico
R₃=OCH₃, R₄=OH Acido Ferulico
R₃=R₅=OCH₃, R₄=OH Acido sinapico

Derivati degli acidi benzoici

R₃=OH Acido m-idrossibenzoico
R₄=OH Acido p-idrossibenzoico
R₃=R₄=OH Acido protocatecuico
R₃=OCH₃, R₄=OH Acido vanillico
R₃=R₅=OCH₃, R₄=OH Acido siringico

Fig.2: Strutture chimiche dei principali acidi fenolici.

1.1.1.2.6.3.1.1 L'acido ferulico

L'acido ferulico è un fenolo della classe degli acidi cinnamici (Fig 3). E' presente ubiquitariamente nella struttura delle pareti cellulari vegetali dove svolge un ruolo strutturale di conservazione dell'integrità della parete. E' presente in elevate quantità nelle crusche di frumento e di mais dove può rappresentare sino al 4 % del peso secco. I

gruppi ferulici possono dimerizzare formando legami a ponte fra le diverse catene polisaccaridiche oppure legarsi con la lignina attraverso legami etere-estere formando così una struttura protettiva contro l'attacco enzimatico delle catene di xilano. I cambiamenti strutturali della parete cellulare legati all'età o l'attacco microbico alle cellule delle piante possono condurre ad aumenti nel contenuto di acido ferulico.

L'acido ferulico è un composto bioattivo che presenta diverse proprietà (Srinivasan et al. 2007).

In vitro sono state riscontrate attività di scavenging di diversi radicali liberi: $O_2^{\bullet-}$, $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$. La presenza di acido ferulico consente inibizione dell'ossidazione delle lipoproteine (LDL) da parte dei radicali presenti in soluzione. I dati suggeriscono che l'acido ferulico possa avere delle applicazioni nella prevenzione dello sviluppo precoce dell'arteriosclerosi e di altri problemi di salute associati ai danni causati da radicali liberi. Come altri biofenoli, l'acido ferulico ha mostrato attività inibitorie nei confronti di diverse specie microbiche; possiede inoltre un'elevata capacità di assorbire radiazioni ultraviolette grazie all'elevato grado di coniugazione che conferisce alla molecola un'azione protettiva contro i raggi UV. Ha mostrato inoltre effetti positivi sia sulla vitalità che sulla mobilità degli spermatozoi di soggetti sani e con problemi di fertilità a concentrazioni di 0,1-0,2 mM. L'acido ferulico viene assorbito e risulta significativamente attivo nell'abbassamento della pressione sistolica in maniera dose dipendente (da 1 a 100 mg/kg di peso corporeo). Sono stati evidenziati inoltre effetti dell'acido ferulico (20-80 μ M) su colture cellulari di muscolo liscio che fanno ipotizzare effetti protettivi di tale molecola nei confronti delle malattie cardiovascolari. Effetti antinfiammatori e analgesici erano già attribuiti all'acido ferulico dalla medicina tradizionale orientale.

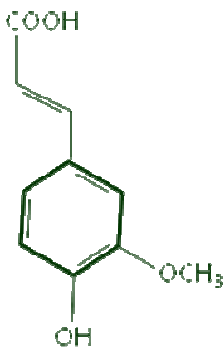


Fig.3: Struttura chimica dell'acido ferulico

1.2 Ruolo degli Antiossidanti

1.2.1 I radicali liberi e gli antiossidanti

In ogni cellula dell'organismo umano avvengono processi biochimici che consumano ossigeno per produrre energia. Tuttavia, dal processo di utilizzazione dell'ossigeno (ossidazione), vitale per la cellula, hanno origine anche prodotti "di scarto" potenzialmente dannosi: i radicali liberi. Dal punto di vista biochimico, i radicali liberi sono molecole particolarmente instabili in quanto presentano uno o più elettroni spaiati nell'orbitale più esterno. Questo induce i radicali liberi alla ricerca del proprio equilibrio chimico tramite acquisizione degli elettroni mancanti da altre molecole che, di conseguenza, diventano a loro volta instabili e cercano un altro elettrone da altre molecole, innescando così un meccanismo di instabilità a "catena". L'alta reattività dei radicali liberi può causare reazioni spesso indesiderate e lesive per le cellule e, quindi, per i tessuti e per gli organi (Mitscher et al., 1997; Cestaro, 1994; Wiseman e Halliwell, 1996; Berliner e Heinecke, 1996). Tra le molecole altamente reattive rientrano le "specie reattive dell'ossigeno" (ROS) che, tra l'altro, includono il radicale superossido, il radicale idrossilico, il radicale perossidico e l'ossido d'azoto, nonché specie non radicaliche, come il perossido d'idrogeno, l'ossigeno singoletto, l'acido ipocloroso e l'ozono. Il radicale idrossilico è il ROS più reattivo e dannoso nei sistemi biologici, tale radicale è generato dalla reazione dello ione ferroso (Fe^{++}) con il perossido d'idrogeno; in questo processo, noto come reazione di Fenton, la quantità di radicale prodotto è direttamente proporzionale alla concentrazione di ferro o rame. La produzione endogena di ROS ha luogo principalmente nei mitocondri, dove avvengono i processi ossidativi con trasporto di elettroni (respirazione cellulare) e nei quali l'ossigeno funge da accettore finale di elettroni per la produzione di energia. L'ossigeno, quando svolge azione ossidante, viene esso stesso sottoposto ad una serie di riduzioni in cui sottrae elettroni da altre molecole, dando luogo ad una serie di intermedi radicalici. I ROS sono prodotti anche dal metabolismo degli acidi grassi poliinsaturi a partire dall'acido arachidonico durante la produzione degli eicosanoidi (prostaglandine, trombossani e leucotrieni), molecole che svolgono importanti funzioni a livello dell'apparato vascolare. La produzione di radicali liberi può essere considerata fisiologica ed utile all'organismo, nel caso dei macrofagi, in cui il radicale superossido viene utilizzato come "killer" contro batteri e virus patogeni. Oltre ai meccanismi endogeni, i fattori che

causano la produzione di radicali liberi sono: stress, diete sbilanciate, alcool, fumo, intenso esercizio fisico, inquinamento e raggi solari.

Un eccesso cellulare di ROS contribuisce ai processi di invecchiamento ed è implicato nello sviluppo di malattie croniche, neurodegenerative, cardiovascolari e cancro, quali: ischemia, sclerosi multipla, arteriosclerosi, cataratta, diabete, epatiti, morbo di Parkinson, Alzheimer, dermatiti e distrofia muscolare. (Ames, 1983; Halliwell e Gutteridge, 1990; Ames e Shigenaga, 1992; Cestaro, 1994; Chen et al., 1995; Stocker, 1999; Benzie, 2000). Anche un'eccessiva e non regolata (patofisiologica) sintesi di ossido nitrico (NO) è considerata causa di molte malattie, alcune delle quali anche letali. In condizioni normali, il danno da radicali liberi non si evidenzia per la presenza, nei sistemi biologici, di fonti generatrici di antiossidanti, quali: enzimi (es. superossido dismutasi, glutazione perossidasi e catalasi); macro molecole (es. albumina, ceruloplasmina, ferritina ed altre proteine); micro molecole (es. acido ascorbico, glutazione, acido urico, tocoferoli, carotenoidi e (poli)-fenoli); ormoni (es. estrogeni, angiotensina, melatonine, etc.).

Ad esempio, i ROS sono trasformati in perossido d'idrogeno per azione di enzimi citoplasmatici e mitocondriali, come la superossido-dismutasi (SOD), la catalasi e il glutazione; il perossido d'idrogeno, essendo esso stesso tossico e dannoso per le strutture cellulari, grazie alla catalasi ed alla glutazione-perossidasi, viene poi scisso in ossigeno ed acqua.

Alcune proteine, pur non agendo direttamente sui radicali, svolgono un'attività di prevenzione sul manifestarsi dei fenomeni ossidativi, per la formazione di complessi stabili con i metalli di transizione che fungono da catalizzatori, principalmente ferro e rame (es: albumina, ferritina e transferrina per il ferro; albumina, ceruloplasmina e metallotioneina per il rame) (Geletii et al., 2002). L'altro importante meccanismo di difesa delle cellule avviene per azione degli antiossidanti. Sono considerati antiossidanti gli agenti con potenziale di riduzione negativo in grado di fornire ai radicali liberi gli elettroni di cui sono privi, ripristinando così l'equilibrio chimico del sistema in cui agiscono. Presupposto per funzionare da antiossidanti è che una volta ossidati, la forma radicalica di tali composti sia non reattiva o poco reattiva nei confronti delle altre molecole. Gli antiossidanti devono essere introdotti con la dieta ed esplicano la loro azione a certi livelli di concentrazione, generalmente piuttosto bassi; quando le concentrazioni aumentano, alcuni composti possono diventare pro ossidanti favorendo la formazione di radicali (Shahidi e Naczk, 1995).

1.2.2 *Gli antiossidanti ed il loro meccanismo d'azione*

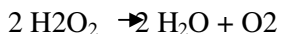
Con il termine “antiossidanti” vengono definiti tutti quei composti che sono in grado di contrastare il processo di ossidazione di idrocarburi, polimeri e acidi grassi. La loro azione si può esplicare sia ostacolando il processo di iniziazione della catena ossidativa, sia impedendo la propagazione della catena radicalica che sostiene il fenomeno ossidativo.

Gli antiossidanti possono essere classificati in base al loro meccanismo d'azione in antiossidanti preventivi, molecole che impediscono la formazione degli iniziatori radicalici, come gli enzimi, in grado di degradare i possibili iniziatori e in antiossidanti “chain- breaking”, cioè interruttori di catena, molecole facilmente ossidabili che intrappolano i radicali presenti nel sistema, propaganti la catena stessa.

Gli antiossidanti preventivi costituiscono la prima linea di difesa delle cellule perché sono in grado di inibire o contrastare la formazione dei radicali. In questa classe possiamo inserire tutti gli enzimi che sono in grado di decomporre i perossidi e gli idroperossidi e pertanto sono considerati "preventivi", in quanto prevengono il fenomeno ossidativo impedendo la fase di "iniziazione".

Di particolare rilevanza sono:

- la superossido dismutasi (SOD): catalizza il disproporzionamento del superossido a perossido d'idrogeno. $2O_2 + 2H \rightarrow H_2O_2 + O_2$ SOD
- la catalasi (CAT): è un enzima che reagisce molto velocemente con il perossido di idrogeno convertendolo ad acqua :



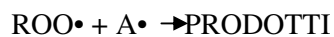
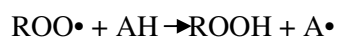
Normalmente l'eccesso di H_2O_2 , a basse concentrazioni, viene anche controllato da un altro antiossidante preventivo, la glutatione perossidasi (GPX), ma quando la concentrazione aumenta, il ruolo della catalasi è fondamentale. Tra gli antiossidanti preventivi trovano posto anche i composti chelanti. E' noto che gli ioni metallici, in particolare Fe^{2+} e Cu^{2+} , sono cofattori enzimatici essenziali in molti sistemi ossido-riduttivi. Essi agiscono facilitando il trasferimento elettronico a molecole biologiche e possono quindi catalizzare il processo ossido-riduttivo, determinando così la formazione di specie radicaliche. Un esempio del ruolo degli ioni metallici si ha nella reazione di Fenton, in cui gli ioni ferrosi agiscono da donatori e il perossido d'idrogeno da elettrone-accettore. Utilizzando composti chelanti è quindi possibile ridurre la concentrazione di ioni metallici liberi e di conseguenza rallentare la formazione di specie radicaliche. Tra gli antiossidanti preventivi ad azione chelante in vivo possiamo annoverare la

transferrina e la ferritina, due enzimi in grado di complessare selettivamente il Fe^{2+} e il Cu^{2+} . E' d'obbligo menzionare anche l'acido etilendiamminotetracetico (EDTA), che forma complessi forti con la maggior parte degli ioni metallici ed è molto utilizzato soprattutto nell'industria alimentare come conservante e l'acido citrico, anche questo utilizzato in campo alimentare come conservante in quanto inibisce stati di ossidazione. Anche i polifenoli possiedono spesso un'azione preventiva in quanto sono in grado di intrappolare i metalli di transizione (Fe^{2+} , Cu^{2+}). A questo gruppo appartengono anche le molecole in grado di decomporre gli idroperossidi, con un meccanismo non radicalico, molto usate in miscele con altri antiossidanti interruttori di catena, come i fosfiti e i solfuri.

Gli antiossidanti "interruttori di catena" si differenziano da quelli preventivi per il diverso meccanismo d'azione. Essi impediscono uno o più passaggi dello stadio di propagazione, intrappolando i radicali liberi che si formano durante la reazione di ossidazione. Le caratteristiche fondamentali degli antiossidanti chain breaking sono due:

- reagire più velocemente con i radicali propagatori di catena rispetto alla velocità di reazione di quest'ultimi con il substrato;
- dare origine a radicali stabili che non diano a loro volta origine a catene ossidative.

Il radicale che a normali concentrazioni di ossigeno viene intercettato dagli antiossidanti è il radicale perossile, $ROO\cdot$, l'unico effettivamente intrappolabile. Gli antiossidanti interruttori di catena possono, a loro volta, essere suddivisi in due categorie: quelli che agiscono per trasferimento d'idrogeno e quelli che agiscono per trasferimento elettronico. Per quanto riguarda i primi, possiamo rappresentare lo schema di reazione come segue:



dove AH è l'antiossidante, $A\cdot$ il radicale che da esso si origina per trasferimento di idrogeno, $ROO\cdot$ il radicale perossile responsabile della propagazione della catena ossidativa, ROOH l'idroperossido formato come prodotto di reazione del radicale perossile. Supponendo che l'antiossidante in questione sia un fenolo, seguendo la sequenza di eventi schematizzata in precedenza, si ha la sottrazione dell'atomo di idrogeno fenolico (O-H) da parte del radicale perossile con conseguente formazione dell'idroperossido, mentre il fenolo, perdendo l'idrogeno, si trasforma nel rispettivo

radicale fenossile. Questo, se è sufficientemente persistente, potrà ricombinarsi con un'altra unità di perossile ROO• dando origine ad un prodotto non radicalico (Lucarini et al 1996; Burton et al. 1985). E' importante notare che in base a questa sequenza di reazioni una molecola di antiossidante riesce ad intrappolare due unità di perossile. Un esempio di questa classe di antiossidanti è l' α -tocoferolo (vitamina E), appartenente alla famiglia dei tocoferoli, che agisce interrompendo la perossidazione lipidica donando un atomo di idrogeno al radicale perossilico. La vitamina E si trasforma a sua volta in un radicale stabile per risonanza, il quale viene rigenerato grazie all'azione riduttiva della vitamina C. (Burton et al.; 1982; Suarna et al 1993). Le caratteristiche fondamentali di un antiossidante che agisce per trasferimento di idrogeno possono essere così riassunte:

- deve contenere un idrogeno facilmente estraibile per rottura omolitica di un legame X-H;
- deve dare luogo, per reazione con i radicali perossili ad un radicale a lungo tempo di vita, che inoltre, non deve essere reattivo nei confronti dell'ossigeno, né del substrato ossidabile presente, non deve cioè essere in grado di propagare la catena.

Gli antiossidanti che agiscono per trasferimento elettronico, sono molecole ricche di elettroni che pur non possedendo idrogeni facilmente trasferibili sono ugualmente in grado di interrompere la catena di autossidazione. Questi, infatti, agiscono trasferendo un elettrone al radicale perossile per trasformarsi in radicale catione: si forma quindi un anione perossile e un radicale catione della molecola coinvolta, E' il caso del dipiridamolo, per il quale si è trovata evidenza sperimentale che reagisce con i radicali perossili con un meccanismo di trasferimento elettronico ad una velocità fortemente dipendente dal solvente in cui avviene l'autossidazione; in solventi polari l'attività antiossidante del dipiridamolo aumenta rispetto all'attività in solventi apolari come il benzene, ma la sua attività maggiore si ha in vescicole dove raggiunge quasi quella dell' α -tocoferolo (Pedulli et al.1999).

1.2.3 Determinazione dell'attività antiossidante

La determinazione in vitro dell'attività antiossidante di un composto sfrutta la rapida e irreversibile reazione di queste sostanze con i radicali liberi, come mostrato nell'equazione sottostante,



in cui R è un generico radicale che viene scelto sia in base alla facilità con cui può essere generato e studiato, sia alla rilevanza che esso ha nei sistemi biologici reali.

I metodi più comunemente usati per i test di attività antiossidante in vitro sono basati sul decadimento di radicali stabili di sintesi che assorbono intensamente nell'UV-visibile. Da un punto di vista del meccanismo, questi metodi sono basati o su una reazione di trasferimento elettronico (SET) o una reazione di trasferimento di un atomo di idrogeno (HAT) tra un ossidante e un radicale libero.

I metodi basati sul meccanismo HAT (eq. 2 e 3, FL = sonda fluorescente) come l'ORAC e il TRAP, utilizzano un radicale iniziatore per generare un radicale perossile ROO^{\bullet} ; quest'ultimo sottrae un atomo di H alla molecola di antiossidante e come risultato, la reazione tra il radicale ROO^{\bullet} e la molecola bersaglio (la sonda) è ritardata o inibita. Poiché questi metodi sono basati su differenti meccanismi di reazione, possono fornire valori diversi di attività antiossidante quando applicati allo stesso campione. Dallo studio comparativo di un lavoro di Boxin Ou e coll., (2002), su una serie numerosa di campioni (927 vegetali comuni) analizzati con due diverse procedure, ORAC e FRAP, si evidenzia come i risultati ottenuti non abbiano una buona correlazione tra di loro. Nei metodi basati sul meccanismo SET (eq. 1, M = ione metallico), come il FRAP e il TEAC, gli antiossidanti sono ossidati da agenti ossidanti, come il Fe (III) o l' $ABTS^{+}$; come risultato, un singolo elettrone è trasferito dalla molecola antiossidante all'ossidante. Il cambio di assorbanza dell'antiossidante o dell'ossidante è misurato tramite spettrometria UV-visibile e il valore di assorbanza è usato come misura quantitativa della capacità riducente di un antiossidante.



Di seguito vengono descritti alcuni dei principali metodi utilizzati per la valutazione della capacità antiossidante totale:

- Saggio ORAC (Oxygen Radicals Absorbance Capacity)

E' un saggio largamente utilizzato per determinare l'attività antiossidante totale di sostanze naturali, estratti vegetali ed alimenti. Il meccanismo d'azione consiste nella perdita di fluorescenza di un idoneo substrato quando viene attaccato dai radicali perossili prodotti dalla decomposizione di un azoiniziatore, di solito il 2,2'-azobis(2-amidinopropano) diidrocloreto, AAPH, a 37°C. Come sonde si usano la ficoeritrina

(PE), una proteina isolata da *Porphyridium Cruentum* e la diclorofluoresceina, la sonda più comunemente utilizzata oggi. La perdita di fluorescenza della sonda è indice dell'estensione del danno dovuto alla sua reazione con i radicali perossili. In presenza di un antiossidante, la diminuzione di fluorescenza è inibita per un certo periodo di tempo. L'effetto protettivo di un antiossidante è misurato considerando l'area sotto la curva di decadimento della fluorescenza (AUC) del campione paragonata a quella del bianco in cui l'antiossidante non è presente. Il metodo ORAC presenta un lato negativo in quanto esso indica la quantità di radicali intrappolati, non la velocità con cui il processo avviene, che è il parametro fondamentale per misurare l'efficacia di un antiossidante. Tutto questo non viene misurato attraverso il saggio ORAC.

- Metodo di Perossidazione lipidica

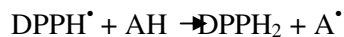
Questo metodo sfrutta la capacità degli antiossidanti di intrappolare i radicali che propagano la catena ossidativa della perossidazione lipidica. I radicali possono essere generati dalla reazione di Fenton tra ioni Cu^{++} e H_2O_2 o, per ottenere una reazione a velocità controllata, dalla decomposizione termica di un opportuno azoiniziatore. Il substrato è costituito da acidi grassi polinsaturi (ac. Linoleico) o da loro esteri, da fosfolipidi o da idrocarburi insaturi (es. stirene, cumene). Se gli esperimenti sono condotti in ambiente acquoso si utilizzano micelle e liposomi per l'inclusione della soluzione. Il decorso della reazione viene seguito monitorando il cambiamento della concentrazione delle specie coinvolte; l'ossigeno, nel caso si utilizzano soluzioni acquose può essere monitorato con un elettrodo di Clark (Amorati et al 2001); la formazione di dieni coniugati o la formazione di perossidi, può essere misurata tramite HPLC-UV, oppure con saggi enzimatici (glutazione perossidasi/glutazione reduttasi).

- Test del radicale DPPH (DPPH[•])

Nel 1958, Blois osservò per primo che il radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH[•]) in una soluzione di etanolo si decolorava da violetto a giallo e poteva rappresentare un metodo vantaggioso per misurare la concentrazione totale di antiossidanti nei materiali biologici. Questo radicale è intensamente colorato ($\lambda_{\text{max}} = 512\text{-}530 \text{ nm}$) a causa della presenza del gruppo picrico (1,3,5-nitrobenzene) ed è stabilizzato sia dall'ingombro sterico dei sostituenti aromatici sia dalla delocalizzazione della carica del radicale su di essi. La scomparsa di questo radicale può essere valutata per via spettrofotometrica, in corrispondenza del suo massimo di assorbimento (516 nm). Questo metodo viene comunemente usato per saggi su cibi ed estratti vegetali, a causa della sua facilità e rapidità. Purtroppo il DPPH[•] reagisce con gli antiossidanti molto più lentamente dei

radicali perossili ROO^\bullet (circa 1000 volte). I metodi riportati in letteratura e basati sull'impiego di DPPH per la determinazione della capacità antiossidante, si distinguono principalmente in due classi: cinetici e di titolazione. Nei primi, meno usati, si osserva la velocità di decadimento di pseudo prim'ordine del DPPH^\bullet in seguito all'aggiunta di una quantità in eccesso di antiossidante; la costante cinetica ottenuta (k_{inh}) dipende dalla struttura dell'antiossidante, dalla BDE (entalpia di dissociazione del legame) del legame OH e può essere confrontata con la k_{in} per la reazione con i radicali perossili. I metodi di titolazione, molto più diffusi, consistono nell'incubare il DPPH e l'antiossidante per un tempo sufficiente affinché l'assorbimento UV rimanga costante (circa 30 minuti); la quantità di antiossidante che rimane è indice dell'attività antiossidante. I metodi di "titolazione" non consentono però di ottenere le relazioni struttura-attività, essendo dipendenti solo grossolanamente dalla struttura dell'antiossidante e non viene inoltre considerata la velocità con cui avviene la decolorazione del radicale, ma solo quando essa avviene. I valori ottenuti vengono riferiti al Trolox, un analogo sintetico idrosolubile dell' α -tocoferolo.

La reazione a cui dà luogo il radicale DPPH[•] può essere così schematizzata:



L'uso del DPPH[•] rappresenta comunque un rapido e facile metodo per valutare le attività anti-radicaliche di diversi antiossidanti, ma nell'interpretazione dei dati deve essere considerato che l'interazione di un potenziale antiossidante con il DPPH dipende dalla sua struttura, che alcuni composti reagiscono molto rapidamente con il DPPH, riducendone un numero di molecole corrispondente al numero di ossidrilici disponibili.

- Test di decadimento del radicale ABTS ($\text{ABTS}^{+\bullet}$)

Il test della decolorazione dell' 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic) acid ($\text{ABTS}^{+\bullet}$), un radicale catione stabile, è un altro metodo ampiamente usato per la valutazione dell'attività antiossidante di vari composti, riportato per la prima volta da Miller et al (1993). Esso è basato sul decadimento dell' $\text{ABTS}^{+\bullet}$ caratterizzato da un intenso assorbimento a circa 700 nm; questo radicale viene generato in situ per reazione della molecola neutra con un sistema ossidante, come il potassio persolfato o la miscela met-mioglobina ed acqua ossigenata ed è un metodo applicabile sia a composti idrofili che lipofili. Dopo l'aggiunta dell'antiossidante si aspetta il termine della reazione, misurando la diminuzione dell'assorbimento del cromoforo all'ultravioletto. Il risultato viene espresso in relazione a una uguale quantità di Trolox, da cui il nome di TEAC

(Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Questo metodo può essere applicato alle molecole idrofile, quindi adatto a misure in ambiente acquoso e all'analisi di campioni come liquidi biologici e bevande. Gli svantaggi sono che se usato con il metodo di titolazione, i risultati dipendono marginalmente dalla velocità di reazione con i radicali. L' ABTS inoltre è un radicale catione con una reattività e struttura notevolmente differente dai radicali che si formano in situazioni fisiologiche, come i perossili ROO^{\bullet} . Il metodo dell'ABTS, come del resto tutti i metodi descritti fino ad ora, non riesce a dare una idea effettiva e completa della capacità antiossidante che gli alimenti in toto possiedono, sia perché sono saggi effettuati 'in vitro' e sia perché gli antiossidanti presenti nei cereali sono sia lipofili che idrofili. Ognuno dei metodi sopra citati prevede una fase iniziale di estrazione di tali composti dalla matrice, che comporta la scelta di solventi adatti ad estrarre la parte lipofila e di altri specifici per la parte idrofila. Gli estratti poi vengono analizzati per la loro capacità antiossidante separatamente. Finora non sono noti in letteratura metodi che consentano un'estrazione unica dei composti antiossidanti, per cui i metodi per la determinazione della capacità antiossidante totale spesso non stimano la quota di antiossidanti non estratti con il solvente utilizzato e l' eventuale sinergia che alcuni di questi (lipofili e idrofili) possono presentare. Serpen et al. nel 2007 hanno proposto la liofilizzazione e la polverizzazione degli estratti prima dell'analisi TEAC; più recentemente (Serpen et al. 2008) hanno sviluppato un metodo di misurazione diretta della TAC che consiste nel mettere a contatto la matrice solida direttamente con la soluzione radicalica. Questa metodica presenta il notevole vantaggio di non effettuare alcun tipo di trattamento di estrazione degli antiossidanti; è tuttavia di particolare importanza la scelta del solvente nel quale il campione solido deve essere immerso insieme al radicale.

1.3 Analisi dei singoli composti antiossidanti tramite cromatografia

Oltre alla valutazione della capacità antiossidante totale è di grande interesse valutare sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo la composizione in antiossidanti in una determinata matrice. Tale determinazione può risultare utile in campo alimentare anche al fine di selezionare varietà o specie particolarmente ricche in alcuni composti noti per avere particolare valore salutistico.

I metodi cromatografici sono metodi di elezione per la quantificazione e il riconoscimento di tali composti.

La cromatografia rappresenta un metodo chimico-fisico di separazione basato su ripetute azioni di distribuzione degli analiti tra due fasi. Una di queste è stazionaria e può essere costituita sia da uno strato depositato su un supporto, sia da un materiale contenuto in una colonna. La fase mobile può invece essere costituita da un liquido (cromatografia liquida) o da un gas (gascromatografia).

La gas cromatografia presenta la fase mobile costituita da un gas che fluisce attraverso una colonna in cui si trova la fase stazionaria costituita da un solido granulare poroso oppure da un liquido, adsorbito su un supporto solido inerte. I meccanismi di ripartizione sono essenzialmente due: ripartizione ed adsorbimento. La maggiore limitazione di questa tecnica è la necessità di rendere volatili tutti i composti che devono essere analizzati.

Nella cromatografia liquida le sostanze che compongono il campione sono trasportate attraverso la fase stazionaria da un liquido. Durante tale percorso, una serie di interazioni selettive, ovvero differenti per ciascun componente del campione, rallentano le singole sostanze con il risultato che queste attraversano il letto di fase stazionaria a velocità diverse e sono pertanto separate. Unica eccezione a questo meccanismo separativo è costituita dalla cromatografia per esclusione sterica in cui la separazione avviene, in linea teorica, unicamente in base al diverso ingombro sterico delle molecole che costituiscono la miscela di analiti.

La cromatografia liquida può essere realizzata in diversi modi, in funzione della tipologia della fase stazionaria (es. strato sottile o colonna). In base alla natura della fase stazionaria e al processo di separazione, la cromatografia può essere ulteriormente suddivisa in diverse tipologie la cui denominazione è riferita al meccanismo sul quale è basata la separazione stessa:

ad esclusione dimensionale (o sterica), a scambio ionico, di affinità, di ripartizione, di adsorbimento, a fase inversa.

La tecnica di cromatografia liquida maggiormente utilizzata in chimica analitica e di larga applicazione per la determinazione dei composti antiossidanti è la cromatografia a fase inversa (Reversed Phase Chromatography o RPC) che utilizza una fase mobile polare e una fase stazionaria apolare. La fase mobile è generalmente costituita da una miscela di acqua ed un solvente organico, con questa miscibile, meno polare in cui può essere disciolto un agente mediante il quale controllare l'equilibrio protonico (tamponi). I solventi organici maggiormente utilizzati sono acetonitrile, metanolo, tetraidrofurano o diossano. Nella scelta della fase mobile vari fattori devono essere considerati:

innanzitutto il campione deve essere facilmente solubile nella fase mobile ed in caso d'impiego di rivelatore spettrofotometrico, il solvente deve essere trasparente alle radiazioni UV.

La fase stazionaria è costituita da un composto apolare chimicamente legato al supporto cromatografico, generalmente costituito da un polimero o da silice micro particellare di forma sferica e diametro di 3-5 μm . Solubilità degli analiti ed efficienza della colonna sono direttamente proporzionali alla temperatura, mentre tempo di ritenzione e viscosità della fase mobile sono inversamente proporzionali.

I componenti fondamentali di un sistema cromatografico in fase liquida sono rappresentati da una o più pompe che alimentano la colonna con la fase mobile ad un valore di flusso costante nel tempo (unità per HPLC); un dispositivo che permette l'introduzione del campione (valvola d'iniezione); una colonna riempita (impaccata o monolitica) con il supporto cromatografico, alla superficie del quale è legata la fase stazionaria; un dispositivo (rivelatore) che permette di evidenziare i composti separati per la loro identificazione e quantificazione che possono essere di più tipi: rivelatore spettroscopico UV e Visibile, a fluorescenza, ad indice di rifrazione, elettrochimico. Il sistema cromatografico è inoltre dotato di un'interfaccia che lo collega ad un computer per la gestione mediante software delle diverse componenti del cromatografo e delle risposte del rivelatore, visualizzate sotto forma di grafico: il cromatogramma.

1.4 Tecnologie di trasformazione del frumento

Il frumento viene utilizzato nell'alimentazione umana dopo la trasformazione in sfarinati (semola per frumento duro e farina per frumento tenero) da cui poi si ottengono i prodotti finiti.

1.4.1 La macinazione

Prima tappa della trasformazione del frumento è la macinazione. Questa operazione prevede un pretrattamento della cariosside detto condizionamento che consiste in un'umidificazione della granella; è un'operazione molto importante perché consente di ridurre la friabilità che le parti tegumentali presentano allo stato secco, evitandone una eccessiva frammentazione, e migliora la friabilità della mandorla farinosa.

Dopo essere stato umidificato, il grano viene sottoposto alla macinazione vera e propria che consente di:

- separare le diverse parti anatomiche che compongono la cariosside (endosperma, tegumenti, ecc)
- frammentare l'endosperma in particelle più o meno fini.

La macinazione consiste essenzialmente di:

- Operazioni di rottura, che consentono mediante il passaggio attraverso rulli rigati la separazione della mandorla farinosa dalla parte corticale della cariosside senza polverizzare la crusca;
- Operazioni di svestimento, condotte con rulli finemente rigati o lisci al fine di rimuovere le particelle di crusca aderenti ai piccoli frammenti di endosperma;
- Operazioni di rimacina, che consentono una macinazione ripetitiva durante la quale la mandorla farinosa, essendo friabile, si lascia frantumare e tritare, mentre le parti corticali, a causa della loro struttura fibrosa, oppongono maggiore resistenza all'azione meccanica dei rulli macinanti.

Il chicco viene così trasformato in semole o farine e cruscami attraverso una serie di passaggi di macinazione parziale, ognuno dei quali non può essere considerato a sé stante, perché perfeziona i prodotti del passaggio precedente e condiziona quelli dei passaggi successivi.

Dalla macinazione, nel caso del frumento duro, si ottiene come principale prodotto la semola, nel caso del frumento tenero la farina.

1.4.2 La pastificazione

Il principale prodotto finito ottenuto dal frumento duro è la pasta. Il processo di pastificazione consente di trasformare una massa senza coesione (sfarinato) in un impasto omogeneo, caratterizzato da forma propria (pasta fresca) che può essere stabilizzato con il processo di essiccamento (pasta secca). Le fasi della pastificazione sono: dosaggio, miscelazione, impastamento, compressione ed estrusione, essiccamento.

L'attuale tecnologia di produzione è caratterizzata da un processo industriale continuo, grazie all'impiego delle 'presse continue', capaci di compiere da sole le prime fasi di lavorazione (dal dosaggio all'estrusione).

Il dosaggio e miscelazione consistono nell'aggiunta di acqua ad una determinata quantità di semola fino a che la massa che si ottiene raggiunge circa il 30% di umidità;

Nella fase di impastamento si completa l'idratazione della semola che favorisce l'esposizione dei gruppi idrofilici delle proteine e quindi una loro interazione mediante legami di diversa natura (Graveland et al., 1987; Bloksma et al., 1988), dando luogo alla formazione del glutine, il complesso proteico che costituisce l'impalcatura della pasta. L'operazione di impastamento avviene nella pressa; l'impasto viene quindi spinto attraverso una vite senza fine ed estruso dai fori della trafilatura in bronzo o teflon.

Il lavoro meccanico eseguito dalla vite, attraverso il contatto forzato delle singole particelle, consente la trasformazione della semola umidificata in un prodotto uniforme, amalgamato e compatto. La pasta estrusa presenta una struttura compatta con granuli d'amido inglobati nella matrice proteica.

In generale, le proprietà della pasta trafilata rispecchiano le caratteristiche qualitative della semola utilizzata; questo significa che in caso di sfarinati di modesta qualità, il processo di pressione/estrusione può dare luogo a rotture e lacerazioni della maglia proteica dell'impasto con conseguenze negative sul comportamento in cottura del prodotto (Dalbon, 1996; Pagani et al., 1986). Pressioni di estrusione elevate sembrano tuttavia indispensabili per conferire al prodotto la compattezza necessaria affinché la pasta non si sfaldi durante la cottura (Pagani et al., 1996). All'uscita della trafilatura la pasta ha un contenuto di umidità intorno al 30% (pasta fresca); tale condizione, corrisponde a valori di attività dell'acqua (a_w) vicini ad 1 e, se mantenuta, può far insorgere degradazioni enzimatiche o crescite microbiche e fermentazioni incompatibili con una lunga shelf-life. L'essiccazione rappresenta il punto cruciale del processo di pastificazione, in quanto da essa dipendono la conservabilità e le caratteristiche sensoriali e nutrizionali del prodotto finale. Inoltre, essendo la fase più lunga, determina la velocità dell'intero ciclo produttivo e di conseguenza, la sua economicità. L'essiccamento consente di ridurre il contenuto di umidità dal 30% circa al 12.5%, valore massimo imposto dalla legge italiana, condizione che garantisce una facile conservazione della pasta secca. Tale fase inoltre influenza in modo significativo la qualità del prodotto finito per quanto riguarda il colore, la tenuta di cottura, il sapore e il valore nutrizionale, nonché i costi di processo.

Il ciclo di essiccazione può essere per semplicità distinto in più fasi:

- fase di pre-essiccazione o di incartamento;
- fase di essiccazione vera e propria;
- stabilizzazione;

- raffreddamento.

Durante la fase di incartamento si assiste ad una veloce evaporazione dell'acqua dalla superficie del prodotto che viene così 'asciugata' con formazione di una sottile crosta, detta appunto 'carta' (Ceschina, 1907), caratteristica che facilita il mantenimento della forma ottenuta con la transazione. In questa fase può venir allontanato circa il 50% dell'acqua da eliminare nell'intero processo, raggiungendo tassi di umidità nel prodotto pari al 19-17%. La perdita di umidità in questo stadio è molto rapida, in quanto l'evaporazione dell'acqua avviene alla stessa velocità con la quale essa si sposta dall'interno del prodotto alla superficie (Paraventi, 1984). Terminato l'incartamento, segue l'essiccazione vera e propria, fase in cui il prodotto presenta una distribuzione di umidità non omogenea; più precisamente la parte esterna è molto più secca (15%) rispetto a quella interna, dove il contenuto di acqua si mantiene pressoché uguale a quello riscontrato al termine dell'estrusione (28-30%). L' esposizione continua della pasta al calore ed alla ventilazione provocherebbe fessurazioni nel prodotto secco (bottature) a seguito delle tensioni che si vengono a creare fra le due zone a diversa umidità, pertanto il prodotto viene sottoposto a "fasi di riposo" in ambiente saturo di umidità (rinvenimento): alternando quindi fasi di essiccazione e di riposo si consente all'acqua di migrare dall'interno del prodotto alla superficie e di distribuirsi in maniera omogenea nel prodotto (Paraventi, 1984). Al termine dell'essiccazione, la pasta viene raffreddata a temperatura ambiente in modo da consentire il passaggio da condizioni di prodotto plastico a vitreo senza fenomeni di condensa. Tale aspetto è fondamentale al fine di permettere un adeguato confezionamento del prodotto finito.

1.4.3 La decorticazione dei cereali

Il processo di sbramatura o decorticazione della cariosside è applicato tradizionalmente ai cereali vestiti, quali farro, orzo, avena e riso, allo scopo di allontanare le glume e le glumelle, strati protettivi che racchiudono la cariosside.

La decorticazione può essere applicata anche a cariossidi nude quali quelle del frumento, allo scopo di allontanare le parti periferiche (pericarpo) della cariosside stessa.

In tempi recenti tale processo ha riscosso un crescente interesse tra gli operatori del settore e viene inserito prima della fase di macinazione (Bottega et al 2009). L'eliminazione preventiva degli strati tegumentali mediante azioni di abrasione e

frizione condotte sulla granella, con macchine simili a quelle utilizzate nella lavorazione di cereali vestiti, può consentire di semplificare il diagramma di macinazione e di ottenere diversi vantaggi sulla qualità dei prodotti semilavorati e finiti quali maggiore resa in semola, migliore raffinazione della stessa, più basso tenore in ceneri (Dexter e Wood, 1996).

1.4.3.1 Effetti del trattamento pre-macinazione sulle caratteristiche delle cariossidi e delle semole di frumento duro

Il processo di decorticazione del frumento, non può sostituire il complesso diagramma di macinazione, ma permette di allontanare parte dei tessuti tegumentali. L'efficacia del trattamento di decorticazione sul frumento duro dipende dalle condizioni di processo adottate e, in particolare, dalla durata del trattamento e dal tasso di umidità della granella. L'idratazione dei tegumenti prima della decorticazione favorisce il distacco dei tegumenti stessi e assicura una minore fragilità del chicco, migliorando l'aspetto e la composizione degli scarti nonché la resa di decorticazione. E' comunque la durata del trattamento il parametro da gestire al meglio per identificare il livello ottimale di decorticazione in funzione degli obiettivi prefissati (Bottega et al. 2009). Tra i vantaggi della decorticazione, vi sono anche quelli che riguardano i sottoprodotti. Il processo, consente l'asportazione progressiva degli strati tegumentali che si ritrovano normalmente nella crusca, permettendo così l'allontanamento di quelli più esterni su cui può verificarsi la presenza di composti tossici (es. fitofarmaci, metalli pesanti, micotossine). D'altro canto i diversi strati del tegumento sono caratterizzati da una peculiare composizione chimica, per cui è possibile ottenere una vasta gamma di coprodotti con ben definite proprietà chimico-fisiche e nutrizionali.

2 Obiettivi del lavoro

Scopo del lavoro è di identificare le possibili strategie per ottenere prodotti a base di cereali con alto livello di antiossidanti, considerando il largo uso di tali prodotti nell'alimentazione quotidiana.

Al riguardo sono state scelte due vie:

- Individuare i fattori che maggiormente influenzano l'accumulo di antiossidanti nei cereali, con particolare attenzione al frumento duro
- Individuare le strategie più idonee durante la trasformazione tecnologica della materia prima al fine di preservarne la naturale dotazione di antiossidanti ed altri nutrienti

Per quanto riguarda la valutazione di composti antiossidanti è stata considerata principalmente la capacità antiossidante totale, quindi è stato approfondito lo studio su una specifica classe di composti antiossidanti, gli acidi fenolici.

3 Materiali e metodi

3.1 *Materialie vegetale*

Per l'analisi della Capacità Antiossidante Totale, sono state considerate cinque specie di cereali: *Triticum monococcum* (cvs. Monlis, Stendhal, ID331), *Avena sativa* (cvs. Donata, Abel, Konradin), *Hordeum vulgare* (cvs. Ketos, Mattina, Sonora), *Triticum aestivum* (cvs. Artico, Aubusson, Bramante), *Triticum durum* (cvs. Creso, Duilio, Minosse) e *Triticum dicoccum*; per quest'ultima specie sono state considerate sia varietà disponibili in commercio (Davide, Mosè, Padre Pio) sia linee sperimentali (Ersa6, Filosini e linea 5558). Tutte le specie sono state coltivate nel campo sperimentale di Montelibretti (RM) del CRA-Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali nelle annate agrarie 2008-2009, 2009-2010 e 2010-2011. Per il frumento duro, sempre nell'arco delle 3 annate agrarie sono state analizzate diverse cultivar (20) nell'ambito delle prove sperimentali della Rete nazionale di confronto varietale di frumento duro, cresciute in 1 ambiente afferente a Montelibretti (Roma). Per valutare l'effetto congiunto dell'anno, dell'ambiente e delle cultivar sulla capacità antiossidante totale, è stato considerato un set di 10 cultivar presenti nei tre anni e nei tre ambienti: Anco Marzio, Ciccio, Claudio, Creso, Duilio, Dylan, Iride, Latinur, Saragolla, Simeto. Per la caratterizzazione degli acidi fenolici, tra le 10 cultivar presenti nei tre ambienti nel 2011 sono state scelte 3cv: Svevo, Simeto, Saragolla.

Per l'orzo, sono state analizzate 21 cultivar (Estival, Sixtine, Atomo, Aliseo, Sfera, Marjorie, Amillis, Flanelle, Dingo, Shangrila, Lutece, Cometa, Aldebaran, Campagne, Explora, Mattina, Ketos, Sonora, Alce, Marado e Calanque) coltivate in prove sperimentali nell'ambito della rete nazionale orzo a Montelibretti (Roma) nelle annate agrarie 2009-2010 e 2010-2011.

Per valutare gli effetti dei trattamenti tecnologici (moltura, pastificazione, decorticazione), sulla capacità antiossidante totale e sulla composizione in acidi fenolici, è stata presa in considerazione una cultivar (Duilio) coltivata nel campo di Montelibretti nell'anno 2010.

3.2 *Preparazione dei campioni*

3.2.1 *Macinazione Integrale*

Tutti i campioni sono stati macinati con un molinetto da laboratorio (Cyclotec, PBI), vaglio 1mm, ottenendo così uno sfarinato integrale; per le varietà di orzo, che hanno le

glume strettamente adese alla cariosside, la macinazione integrale è stata preceduta da una decorticazione.

3.2.2 Macinazione su impianto pilota

La cultivar di frumento duro Duilio è stata sottoposta, dopo condizionamento per una notte, a macinazione su un impianto pilota Buhler MLU 202 con tre passaggi di rottura e tre di svestimento, ottenendo le diverse frazioni (semola, crusca, cruschetto, farinetta) analizzate per l'analisi della TAC e degli acidi fenolici.

3.2.3 Pastificazione

La semola è stata mescolata con acqua per ottenere un impasto con un contenuto in acqua del 32-33%, sottoposto poi a pastificazione mediante una pressa sperimentale NAMAD-Italia con una capacità di 1,5-5 kg. Le condizioni di estrusione sono state: temperatura $50 \pm 5^\circ\text{C}$, pressione 60 ± 10 atm e vuoto 700mmHg. La pasta, formato spaghetti con diametro 1,65 mm, è stata essiccata mediante ciclo a bassa temperatura (50°C) per circa 20 ore su un impianto pilota (AFREM-Francia).

3.2.4 Decorticazione

La granella di orzo è stata decorticata per eliminare le glume strettamente adese alla cariosside su un decortatore SB-SA (Costruzioni Meccaniche Colombini Sergio & C.) per un tempo di 100 s.

La granella di frumento duro (cultivar Duilio) è stata umidificata con il 3%(p/v) di acqua e sottoposta a decorticazione sperimentale con il decortatore SB-SA (Costruzioni Meccaniche Colombini Sergio & C.); sulle cariossidi sono state effettuate sia decorticazioni non in sequenza a diversi tempi (30, 60, 90, 120, 150, 180 secondi), sia decorticazioni successive di 15 secondi ognuna. Ad ogni passaggio sono stati recuperati separatamente gli scarti e la granella.

3.3 Analisi della capacità antiossidante totale

3.3.1 Metodo diretto

E' stato utilizzato il metodo di Serpen et al. (2008) che prevede il contatto diretto del campione con una soluzione contenente il composto radicalico ABTS⁺. Il radicale è stato preparato seguendo la procedura descritta da Re et al. (1999): 7mM di ABTS insieme a 2,45 mM di KPS vengono disciolti in acqua e la soluzione viene lasciata al

buio per 12-16 ore prima dell'uso; successivamente la soluzione contenente il radicale viene diluita con il solvente scelto per l'analisi fino ad ottenere un valore di assorbanza pari a 0,7 a 734nm.

3.3.2 Standardizzazione della metodica e sua descrizione

Oltre al solvente proposto (etanolo 50%) da Serpen et al. (2008) sono stati testati altri solventi per valutare quello più adatto per l'analisi degli sfarinati di cereali. 100mg di macinato integrale/ semola sono stati trattati con 60 ml alternativamente con metanolo, metanolo 50% in acqua, etanolo, etanolo 50% in acqua. I campioni sono stati tenuti in agitazione per 1 ora a 190 giri al minuto (rpm), valutando la variazione di assorbanza nel tempo a 734nm. Sono state valutate anche le condizioni di analisi e cioè tempo e temperatura di incubazione: 100 mg di macinato integrale/ semola sono stati mescolati con 60 ml del solvente di reazione ed incubati per 1, 2, 4 ore a 25°C e 37°C, valutando successivamente l'assorbanza a 734 nm.

La misura della TAC è stata effettuata seguendo, come già detto, il metodo diretto di Serpen *et al* (2008) che prevede il contatto del campione solido (100mg) con una soluzione acquosa di etanolo al 50%, contenente il radicale 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), per un periodo di 50 minuti in un agitatore orbitale. La lunghezza d'onda per la lettura è di 734 nm ed è stato utilizzato uno spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 3B. Per ottenere un'assorbanza nel range valido della curva di calibrazione, i campioni sono stati diluiti con cellulosa in polvere in rapporto 1:10 w/v. La misura della TAC è stata ottenuta determinando il decremento di assorbanza del radicale libero in soluzione rispetto al valore di assorbanza iniziale; sono state effettuate tre repliche per campione. La TAC è espressa in millimoli TEAC per kg di campione.

3.4 Analisi degli acidi fenolici

3.4.1 Messa a punto del metodo di estrazione

Il metodo di riferimento è stato quello di Li Li et al. del 2008 la cui procedura è illustrata nella fig.4; da questo si è partiti per l'ottimizzazione delle condizioni di estrazione e la scelta dello standard interno.

Come standard interno è stato utilizzato l'acido 3,5-dicloro-4-idrossibenzoico; la quantità di standard interno da aggiungere generalmente dipende dal tipo di estrazione

che si deve effettuare e dalla quantità relativa dei composti da quantificare presenti nella matrice. Dopo prove preliminari è stata scelta una concentrazione di 37.5 µg per l'estrazione degli acidi fenolici in forma libera e di 150 µg per l'estrazione di acidi coniugati e legati. Sono state utilizzate soluzioni di standard di acidi fenolici per effettuare le prove di validazione dell'analisi cromatografica, determinando le rette di taratura, i tempi di ritenzione, la lunghezza d'onda di massimo assorbimento dei singoli acidi, il limite minimo di rilevabilità (LOD) e il limite minimo di quantificazione (LOQ) (Tab. 6 e Fig.23)

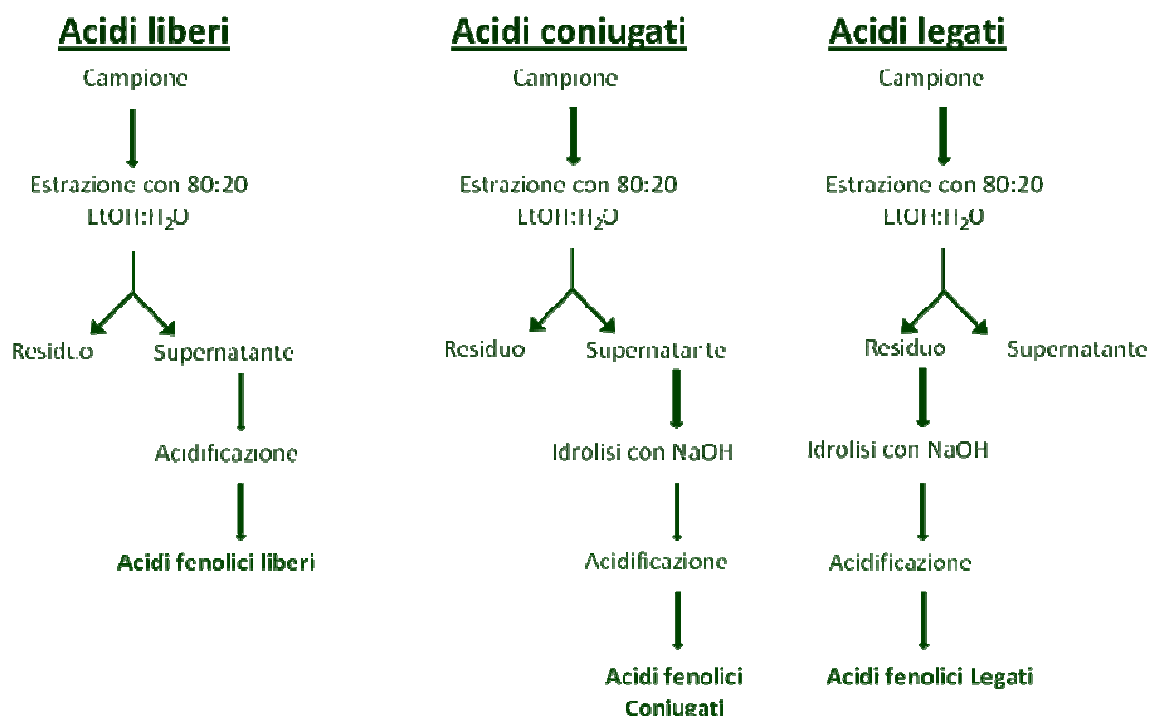


Fig 4: procedura di estrazione degli acidi fenolici (Li Li et al 2008)

3.4.1.1 Messa a punto dell'estrazione degli acidi fenolici liberi

Le prove sono state effettuate partendo da 250 mg di sfarinato integrale di frumento duro (cv Svevo). Sulla matrice solida è stato aggiunto lo standard interno (37.5 µg), dopodiché, ai campioni è stata aggiunta una soluzione di etanolo/ acqua (80:20). La quantità di soluzione etanolica aggiunta ai campioni è stata di 1 ml e ripetuta due volte. Per ogni estrazione etanolica è stata effettuata una sonicazione della durata di 10 minuti per facilitare la solubilizzazione di tutti i composti facilmente estraibili. Ogni step di estrazione è stato seguito da centrifugazione a 10500 rpm per 10 minuti; i supernatanti

etanolici sono stati raccolti ed evaporati sotto flusso di azoto, per evitare il fenomeno di ossidazione dei composti estratti, fino al dimezzamento del volume circa e successivamente congelato e liofilizzato. Dopo la liofilizzazione sono stati aggiunti 500 µl di una soluzione acquosa al 2% di acido acetico e 2 µl di acido cloridrico 12 M. Dopo agitazione, ai campioni sono stati aggiunti 500 µl di etilacetato e dopo una breve centrifugazione (5 minuti, 10500rpm) è stato prelevato e raccolto il sovrinatante (questa operazione è stata ripetuta due volte) e portato a secco con azoto. I campioni successivamente sono stati solubilizzati in metanolo acidificato ed iniettati in HPLC per la successiva quantificazione; l'identificazione degli acidi fenolici è stata verificata mediante spettrometria di massa.

3.4.1.2 Messa a punto dell'estrazione degli acidi fenolici coniugati

Come per gli acidi fenolici liberi, si è partiti da 250 mg di sfarinato integrale (cv Svevo). Sulla matrice solida è stato aggiunto lo standard interno (150 µg). Dopo di che nella prima fase si è proceduto come per gli acidi fenolici liberi. dopo la liofilizzazione, i campioni sono stati idrolizzati con 400 µl di NaOH 2M per 4 ore; successivamente la soluzione è stata acidificata con 80 µl di HCl 12M e gli acidi fenolici liberi e coniugati sono stati estratti per due volte con 500 µl di etilacetato; dopo una breve centrifugazione (5 minuti, 10500rpm) è stata prelevata e raccolta la fase sopranatante e portata a secco con azoto. I campioni successivamente sono stati solubilizzati in metanolo acidificato ed iniettati in HPLC per la quantificazione. L'identificazione degli acidi fenolici è stata verificata mediante spettrometro di massa.

3.4.1.3 Messa a punto dell'estrazione degli acidi fenolici legati

Le prove, come per le estrazioni degli acidi fenolici liberi e coniugati sono state effettuate partendo da 250 mg di sfarinato integrale (cv Svevo). Come per le fasi degli acidi fenolici liberi e coniugati è stata utilizzata una soluzione di etanolo - acqua (80:20) nelle stesse quantità e modalità. Ogni step di estrazione è stato seguito da centrifugazione a 10500 rpm per 10 minuti, i supernatanti etanolici sono stati eliminati mentre è stato recuperato il residuo solido cui è stato aggiunto lo standard interno (150 µg). La matrice solida è stata idrolizzata con 400 µl di NaOH 2M per 4 ore; successivamente la soluzione è stata acidificata con 120 µl di HCl 12M e gli acidi fenolici legati sono stati estratti per due volte con 800 µl di etilacetato e dopo una breve

centrifugazione (5 minuti, 10500rpm) è stata prelevata e raccolta la fase soprastante e portata a secco con azoto. I campioni successivamente sono stati solubilizzati in metanolo acidificato ed iniettati in HPLC per la quantificazione e l'identificazione mediante spettrometro di massa degli acidi fenolici.

3.4.2 Determinazione degli acidi fenolici mediante HPLC

La determinazione degli acidi fenolici è stata eseguita mediante cromatografia liquida a fase inversa (RP-HPLC) in associazione ad un rivelatore spettrofotometrico a serie di fotodiodi (PDA). E' stata utilizzata una colonna a fase inversa RP-C18 narrowbore (dimensione 150x2mm e 5µm) con precolonna. Questo tipo di colonna, avendo un diametro interno ridotto (2,0 mm) permette di poter analizzare piccole quantità di materiale ed avere una separazione dei picchi migliore rispetto alle colonne con diametri interni convenzionali (4,0 – 4,6 mm), inoltre può essere facilmente utilizzato quando il sistema di HPLC è accoppiato ad uno spettrometro di massa.

Per mettere a punto il sistema di analisi cromatografica (tempi di ritenzione, ripetibilità, riproducibilità, limiti di rilevabilità ed accuratezza), sono stati utilizzati diversi standard di acidi fenolici: acido p-idrossibenzoico, vanillico, caffeico, siringico, p-cumarico, ferulico, sinapico, o-cumarico(ditta SIGMA).

L'analisi cromatografica è stata effettuata utilizzando un gradiente che va da un 5% di acetonitrile (soluzione B) e 95% di acqua acidificata al 2% con acido acetico (soluzione A) al tempo 0, al 25% di soluzione B e 75% di soluzione A dopo 40 minuti. E' stato applicato un flusso di 0.2 ml/min e la temperatura della colonna è stata settata a 30°C. Per l'identificazione dei picchi cromatografici è stato accoppiato alla HPLC uno spettrometro di massa con un sistema di ionizzazione per elettrovaporizzazione (ESI) che consente di ionizzare molecole non volatili con massa fino a 200.000 Da, ed un analizzatore a quadrupolo.

3.4.3 Analisi statistica dei dati

Per valutare la significatività dei dati ottenuti sono state effettuate analisi della varianza (ANOVA) a due vie per la valutazione dell' influenza della specie e dell'annata agraria sulla capacità antiossidante totale e a tre vie al fine di valutare, nell'ambito della specie, l'influenza del genotipo, dell'ambiente e dell'anno. L'analisi della varianza è stata anche applicata per verificare l'effetto delle tecnologie di trasformazione e di conservazione. Sono stati inoltre utilizzati strumenti grafici per l'analisi statistica (boxplot), per meglio identificare visivamente le differenze tra le specie e tra i genotipi

e l'influenza dell' ambiente o dell'anno sia sul parametro della capacità antiossidante totale che sulla composizione in acidi fenolici. Le analisi sono state effettuate utilizzando sia il software MSTAT C, sia il programma di analisi matematiche e statistiche MathLab. Quest'ultimo è stato anche utilizzato per effettuare un'analisi cluster.

4 Risultati e Discussione

4.1 Analisi della capacità antiossidante totale: determinazione e standardizzazione delle condizioni sperimentali:

- Solvente di reazione

Sulla base delle prove preliminari effettuate, il solvente ritenuto più adatto per l'analisi TEAC dei cereali è risultato l'etanolo 50%, in quanto fornisce sia a livello di sfarinato integrale che semola i valori più elevati rispettivamente 36.5 e 34.5 mmol TEAC/kg, confermando quanto già riscontrato da Serpen et al. 2008 (Fig. 5 e 6),. Il metanolo, riportato in molti lavori di letteratura, non sembra essere il più adatto per gli sfarinati di cereali poiché fornisce valori di TAC molto più bassi (fig.5 e 6), verosimilmente perché è un solvente più adatto per composti idrofobi che idrofili. Il metanolo 50%, presenta valori più alti che il metanolo assoluto, ma comunque inferiori a quelli ottenuti con etanolo 50% . I valori della TAC ottenuti utilizzando come solventi l'etanolo assoluto e l'acqua non sono stati ritenuti validi essendo risultati più bassi.

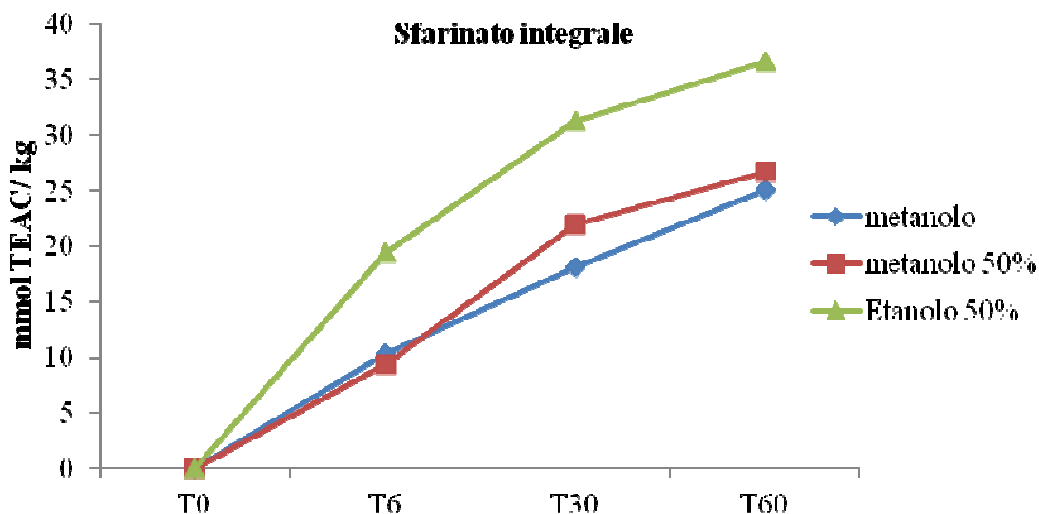


Fig.5: Valutazione dell'andamento della TAC (da 0 a 60 minuti) dello sfarinato integrale con diversi solventi di reazione: metanolo, metanolo 50% ed etanolo 50%

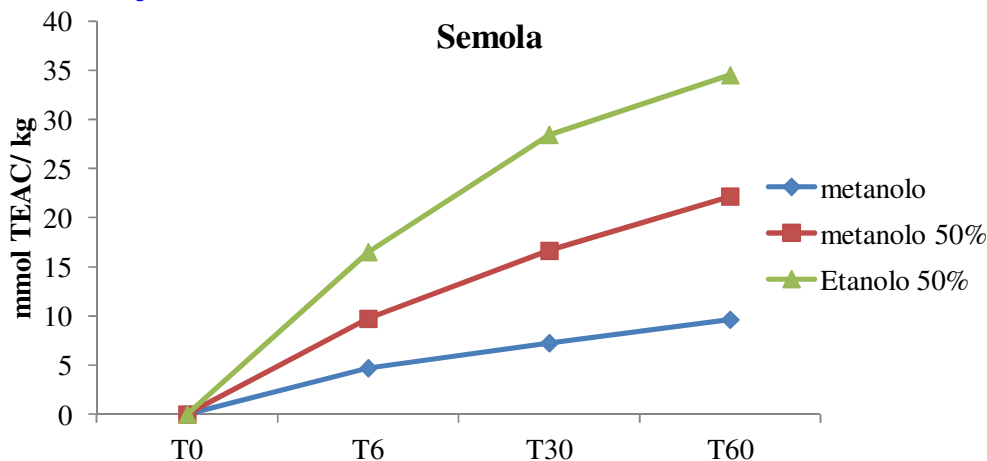


Fig.6: Valutazione dell'andamento della TAC (da 0 a 60 minuti) della semola con diversi solventi di reazione: metanolo, metanolo 50% ed etanolo 50%

- Temperatura e tempo di reazione

I risultati sperimentali hanno messo in evidenza che la temperatura non influenza la TAC, mentre il tempo di contatto del campione con il radicale ne determina un aumento dei valori (fino a 55 mmol TEAC/kg nella seconda ora e fino a 58 mmol TEAC/kg nella quarta ora). Si è scelto di operare alla temperatura di 25° C e per un tempo di 50 minuti, cioè il tempo più vicino alla parte della curva con maggiore pendenza (fig.7).

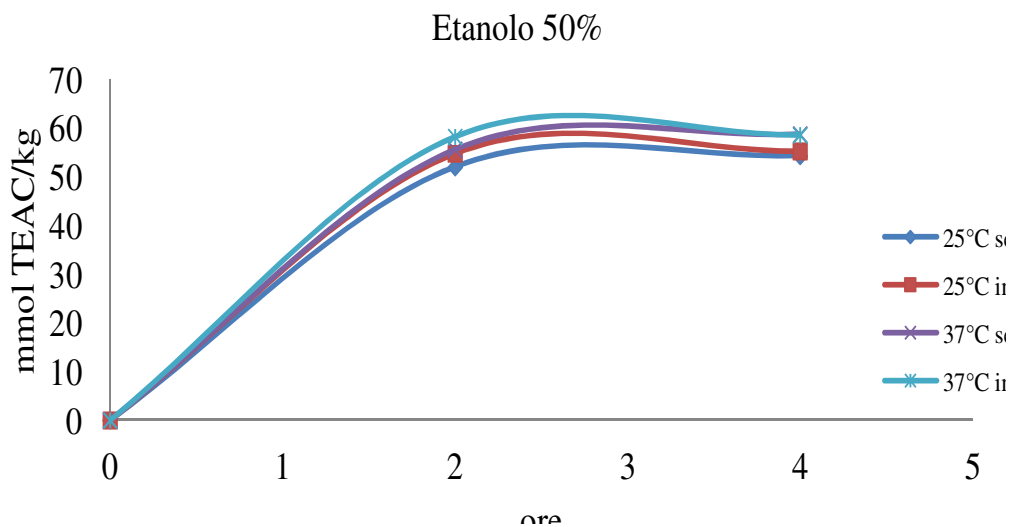


Fig.7: Andamento della TAC dello sfarinato e della semola in funzione del tempo (da 1 a 4 ore) e della temperatura (25° e 37°C)

4.2 Analisi della TAC nelle diverse specie di cereali

L'analisi della capacità antiossidante totale, degli sfarinati integrali delle diverse specie di cereali, coltivate nei campi sperimentali del CRA-QCE di Montelibretti (Roma) negli anni 2009, 2010 e 2011 ha messo in evidenza che il grano duro, il grano tenero, l'avena e il farro (varietà commerciali), presentano valori medi di TAC paragonabili tra loro (rispettivamente 38.50-38.22- 43.18 e 45.95 millimoli TEAC/Kg), ma inferiori rispetto al grano monococco che presenta un valore medio di TAC di 51.49 mmol TEAC/Kg e alle linee di farro (53,06 millimoli TEAC/Kg). Nelle condizioni sperimentali adottate, il cereale con capacità antiossidante totale più elevata risulta essere l'orzo che presenta un valore medio nei tre anni pari a 59.19 millimoli TEAC/Kg)(Tab.1). L'andamento delle specie negli anni si mantiene simile, risultando sempre più alto l'orzo e più bassi i frumenti duro e tenero; solo l'avena mostra un andamento discordante, in particolare nel 2010 mostra dei valori significativamente più alti rispetto al 2009 e al 2011. L'analisi sulle linee di *Triticum dicoccum* è stata effettuata solo per due anni (Fig.9) ed i dati ottenuti sono molto simili e vicini a quelli ottenuti su *Triticum monococcum* e significativamente più elevati di quelli ottenuti per le varietà commercialmente disponibili di dicocco.

L'analisi cluster effettuata sulle specie e sulle varietà mette in evidenza che, entro specie, le varietà si dispongono tutte vicine e che frumento tenero, frumento duro e avena sono molto vicini, poco più distanti si dispongono i frumenti monococco e dicocco mentre l'orzo si distanzia nettamente dalle altre specie(Fig. 10). In figura 8 è mostrata un'analisi boxplot dove viene presentata in rosso la linea corrispondente alla mediana al di sopra ed al di sotto della mediana sono rappresentati i percentili (ossia la percentuale di campioni che si dispongono al di sopra ed al di sotto del valore mediano); con le linee tratteggiate sono indicati i valori massimi ed i minimi. Da questa rappresentazione grafica risulta che per tutte le specie la mediana è circa nel mezzo di entrambi i percentili, ad eccezione del *Triticum aestivum* che presenta la maggior parte dei valori al di sotto della mediana; è anche evidente l'ampia variabilità presentata dall'*Avena sativa* verosimilmente dovuta al fatto che nell'anno 2010 ha mostrato valori molto più alti rispetto agli altri due anni (Fig.8);

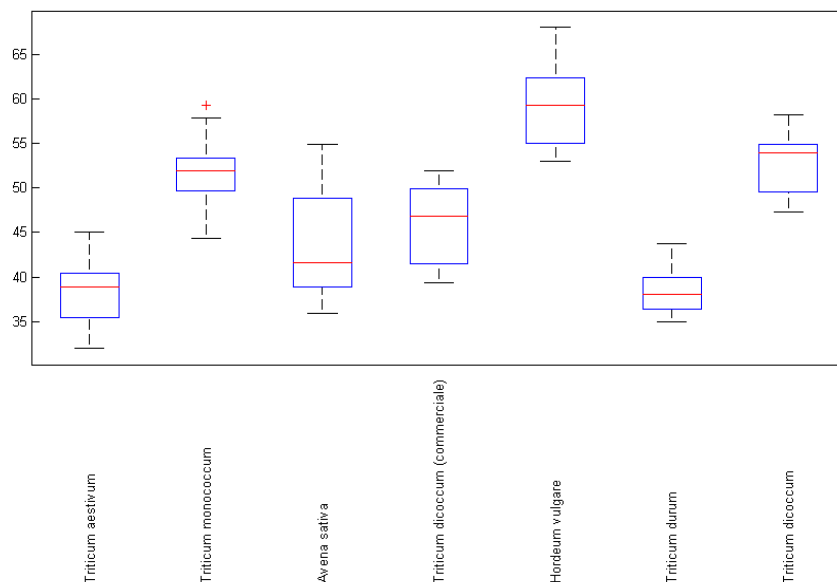


Fig.8: Boxplot delle diverse specie nel triennio. Con il segno “+” in rosso è indicato un ‘outlyer’ cioè un valore che si distanzia significativamente dagli altri valori

Tab.1: Capacità antiossidante totale delle diverse specie di cereali: valori medi e deviazioni standard nei tre anni

Specie	Genotipo	2011		2010		2009		media	
		TAC±	DS	TAC±	DS	TAC±	DS	TAC±	DS
Frumento Tenero	Bramante	43,46±	1,7	33,73±	1,4	40,45±	1,48	38,23±3,39	
	Aubusson	38,21±	0,85	33,17±	1,27	39,68±	1,52		
	Artico	39,96±	0,10	35,69±	1,28	39,68±	1,33		
Frumento Monococco	ID331	50,88±	1,26	53,96±	1,4	50,81±	1,52	51,49±3,69	
	Stendhal	58,23±	0,95	52,42±	0,68	52,91±	1,63		
	Monlis	45,21±	0,76	51,3±	0,76	47,73±	0,92		
Frumento Dicocco (linee sperimentali)	Ersa 6	nd		57,39±	0,96	49,55±	1,37	53,061±3,65	
	Linea 5558	nd		54,38±	0,53	47,87±	0,49		
	Filosini	nd		55,64±	1,71	53,54±	0,44		
Avena	Donata	37,23±	0,76	46,96±	3,14	36,95±	1,70	43,19±5,75	
	Konradin	42,69±	1,28	52,56±	2,55	39,33±	0,42		
	Abel	41,29±	0,99	51,09±	1,26	40,59±	1,72		
Frumento Dicocco	Davide	46,96±	1,33	50,6±	0,48	40,59±	1,05	45,96±4,27	
	Mosè	46,05±	8,7	50,11±	0,53	40,73±	1,37		
	Padre Pio	47,59±	0,61	50,32±	1,95	40,66±	0,85		
Orzo	ketos	53,68±	0,64	58,09±	1,83	61,1±	0,53	59,19±3,95	
	sonora	53,68±	0,48	64,11±	3,46	58,3±	3,65		
	mattina	58,51±	0,68	60,4±	4,82	64,88±	0,74		
Frumento Duro	Duilio	39,47±	0,79	41,22±	1,11	36,46±	1,83	38,51±2,29	
	Creso	38,07±	0,84	35,48±	0,24	37,79±	1,58		
	Minosse	42,69±	0,92	38,35±	1,49	37,02±	1,11		

Tab.2 Analisi della varianza (ANOVA) a tre vie sulle diverse specie di cereali: influenza dell'anno, della specie e del genotipo sulla capacità antiossidante totale

Source	Gradi di libertà	Somma dei quadrati	Media dei quadrati	Valore F	Prob
Replica	2	16,35	8,17	3,08	0,05
Anni (A)	2	231,33	115,67	43,65	0,00
Specie (S)	5	9094,38	1818,88	686,38	0,00
AxS	10	1374,44	137,44	51,87	0,00
Genotipo (G)	2	8,18	4,09	1,54	0,22
AXG	4	3,87	0,97	0,37	
SXG	10	387,6	38,76	14,63	0,00
AXSXG	20	350,77	17,53	6,62	0,00
errore	106	280,89	2,65		
Totale	161	11747,81			

4.2.1 Analisi della varianza: influenza dell'anno, della specie e dell'ambiente

L'analisi della varianza ha messo in evidenza che la variabile che maggiormente influenza la TAC è la specie, seguita dall'anno, e, a livelli ridotti dal genotipo. L'interazione "anno x specie", risulta influenzare significativamente il parametro, comunque con un peso molto basso rispetto alla specie e all'anno (Tab.2). Nell'analisi della varianza non sono state considerate le linee sperimentali di frumento dicocco (Ersa6, Fillosini, linea 5558), essendo le stesse state analizzate solo per due anni anziché tre, come tutte le altre specie.

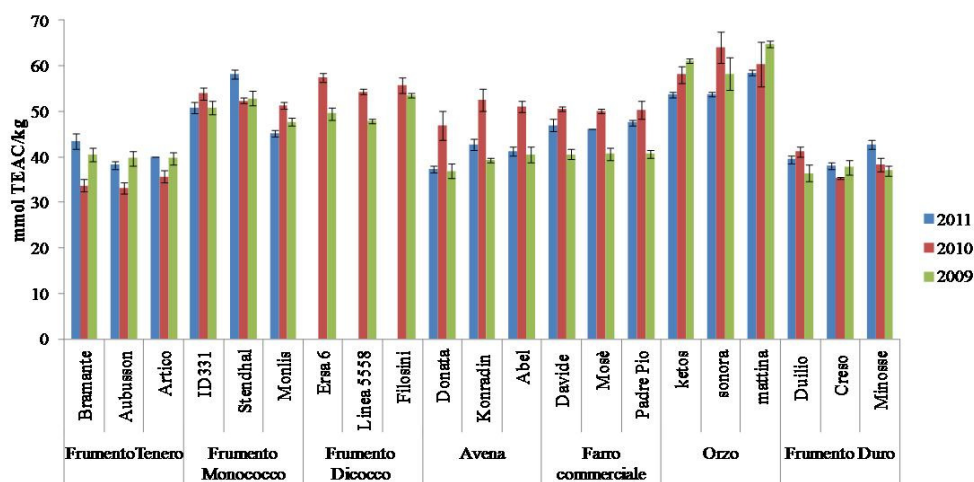


Fig 9: Capacità antiossidante totale di più specie cerealicole (tre varietà per ogni specie) durante il triennio 2009-2011; per le linee sperimentali di frumento dicocco lo studio ha riguardato solo un biennio 2009-2010. Le barre indicano le deviazioni standard

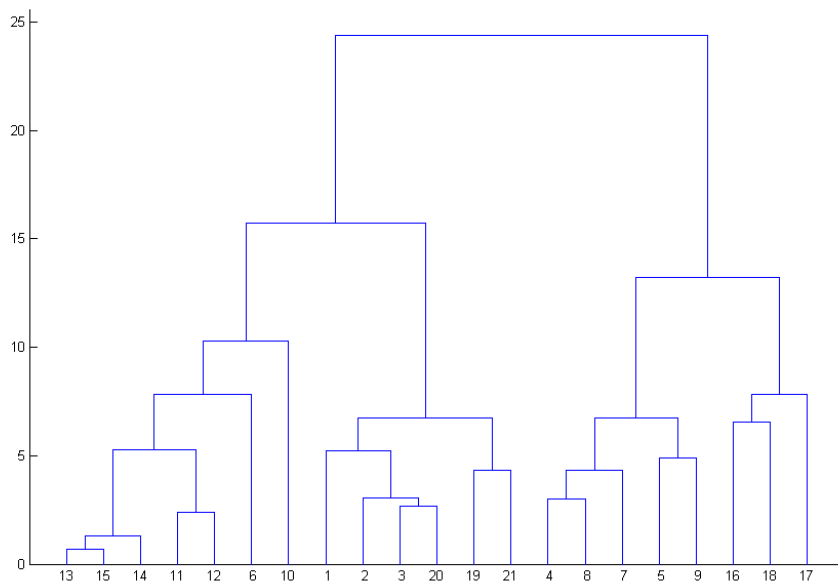


Fig.10: Analisi cluster di tre varietà per ogni specie:1)Bramante 2) Aubusson 3) Artico 4) ID331 5)Stendhal 6) Monlis 7)Ersa6 8)linea 5558 9)Filosini 10)Donata 11)Konradin 12)Abel 13)Davide 14)Mosè 15)Padre Pio 16)Ketos 17)Sonora 18)Mattina 19)Duilio 20)Creso 21)Minosse.

4.3 *Analisi della TAC in frumento duro*

4.3.1 *Valutazione di diversi genotipi in un unico ambiente*

Il valore medio delle 20 cultivar coltivate nell'ambiente di Montelibretti nel triennio è stato di 43.64 ± 3.03 ; il valore più alto è di Trionfo (49.64 mmol TEAC/kg nel 2009), quello più basso di Alemanno nel 2010 (35.78 mmol TEAC/kg). Le diverse cultivar hanno mostrato un comportamento diverso in funzione degli anni; ad esempio la cv Trionfo presenta un valore TAC che oscilla tra 51.4 mmol TEAC/kg nel 2009 e 46,00 nel 2010, la cv Minosse invece presenta valori simili nel 2009 e nel 2011(48.54 e 48.32 mmol TEC/kg rispettivamente) ed un valore nettamente inferiore (43.40 mmol TEC/kg) nel 2010. Dalla figura 12 si nota che nell'annata 2009 sono stati registrati i valori più alti di TAC per tutte le cultivar, anche se le differenze tra le medie degli anni sono comunque limitate. Avendo le cultivar un comportamento diverso tra loro e negli anni, si deduce che il genotipo può influenzare la TAC, anche se in misura minore rispetto all'anno.

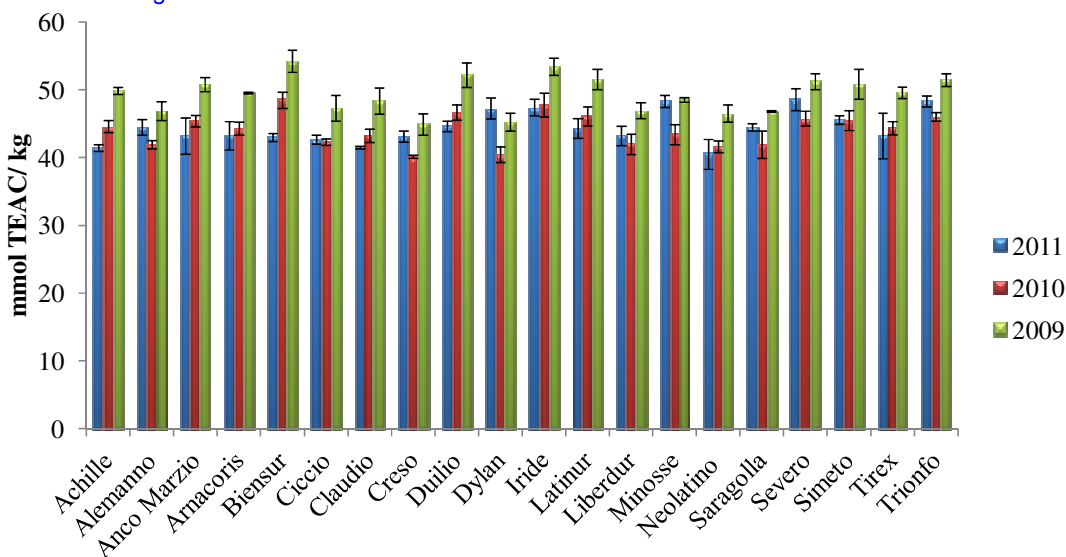


Fig 11: TAC delle cultivar di frumento duro coltivate nella località di Montelibretti (RM) nel triennio 2009-2011

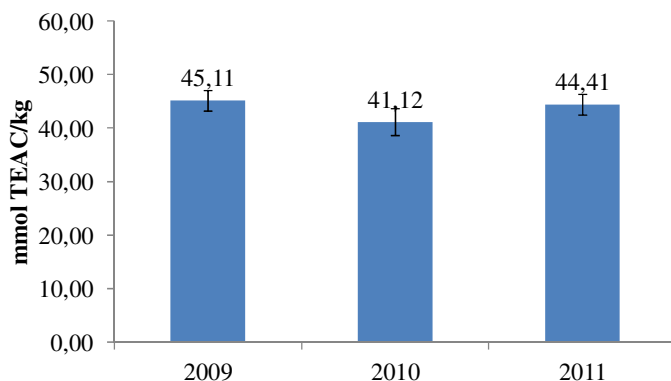


Fig 12: Valori medi di TAC nell'ambiente di Montelibretti nel triennio 2009-2011

4.3.2 Analisi della TAC: valutazione dell'influenza dell'ambiente e dell'anno.

L'analisi della Varianza (ANOVA) a tre vie, effettuata con il programma MathLab, indica che l'anno è la variabile che maggiormente influenza il parametro della TAC in frumento duro, seguito dall'ambiente di coltivazione e successivamente dal genotipo. L'interazione "anni x località" risulta particolarmente significativa, anche se con un peso inferiore rispetto alle singole variabili (Tab.3).

Gli ambienti presentano un comportamento differente tra gli anni (Fig. 13), ad eccezione di Montelibretti, dove il parametro risulta abbastanza stabile soprattutto se si confrontano le mediane e i percentili. I valori minimi e massimi di TAC variano nel triennio e la maggiore differenza si riscontra nel 2009, anno in cui le cultivar hanno

presentato un'ampia variabilità. Per le località di Jesi e Foggia i valori della TAC nell'anno 2011 risultano inferiori rispetto alle altre due annate; si riscontra comunque, un' ampia variabilità come evidenziata dai valori minimi e massimi e dai percentili al di sopra e al di sotto della mediana. Nel 2011 la variabilità tra i genotipi è risultata minore rispetto agli altri due anni per tutti i tre ambienti. Analizzando i comportamenti delle singole varietà negli anni (Fig. 14), si nota che alcune varietà presentano una variabilità piuttosto ampia in relazione all' ambiente (es. Creso e Duilio), mentre altre (Dylan) molto più contenuta. Analizzando dunque il comportamento delle singole cultivar negli ambienti (Fig.15), si possono individuare quelle caratterizzate da maggiore stabilità, ottenendo così indicazioni utili per la scelta di varietà ad alto contenuto in TAC . Dalla figura 15, è evidente che quasi tutte le cultivar presentano variabilità tra gli anni, ad indicare che l'anno ha una forte influenza sul parametro, come del resto già visto con l'analisi della varianza.

Tab.3: Analisi della varianza : Influenza dell'anno, dell'ambiente e del genotipo in Frumento duro

'Source'	Somma dei quadrati	Gradi di libertà	Media dei quadrati	Valore F	'Prob>F'
Anni (A)	891,49	2	445,75	111,24	3,53E-32
Località (L)	422,50	2	211,25	52,72	9,51E-19
Varietà (V)	562,83	9	62,54	15,61	1,08E-18
AxL	370,24	4	92,56	23,10	2,02E-15
AxV	401,28	18	22,29	5,56	2,55E-10
LxV	354,34	18	19,69	4,91	6,34E-09
AxLxV	620,59	36	17,24	4,30	3,25E-11
Errore	721,27	180	4,01		
Totale	4344,53	269			

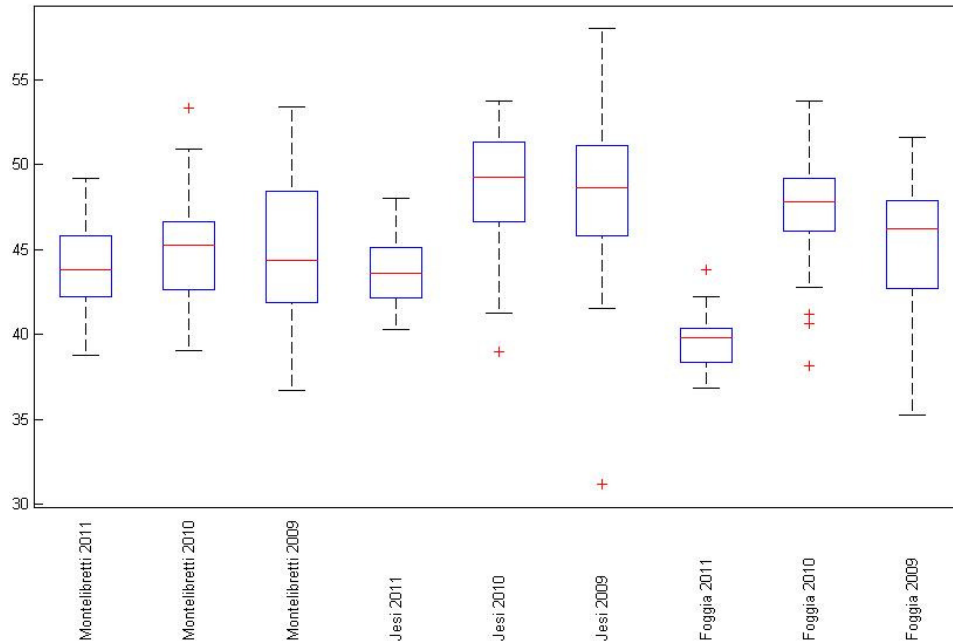


Fig. 13: Boxplot: comportamento del frumento duro negli ambienti e negli anni

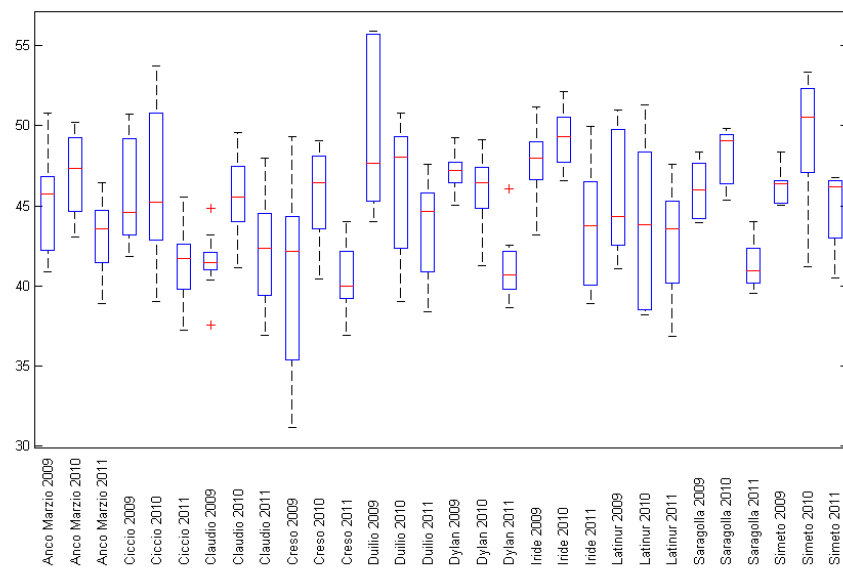


Fig.14: Boxplot: comportamento delle cultivar di frumento duro per ciascun anno; ogni varietà è presentata come media degli ambienti.

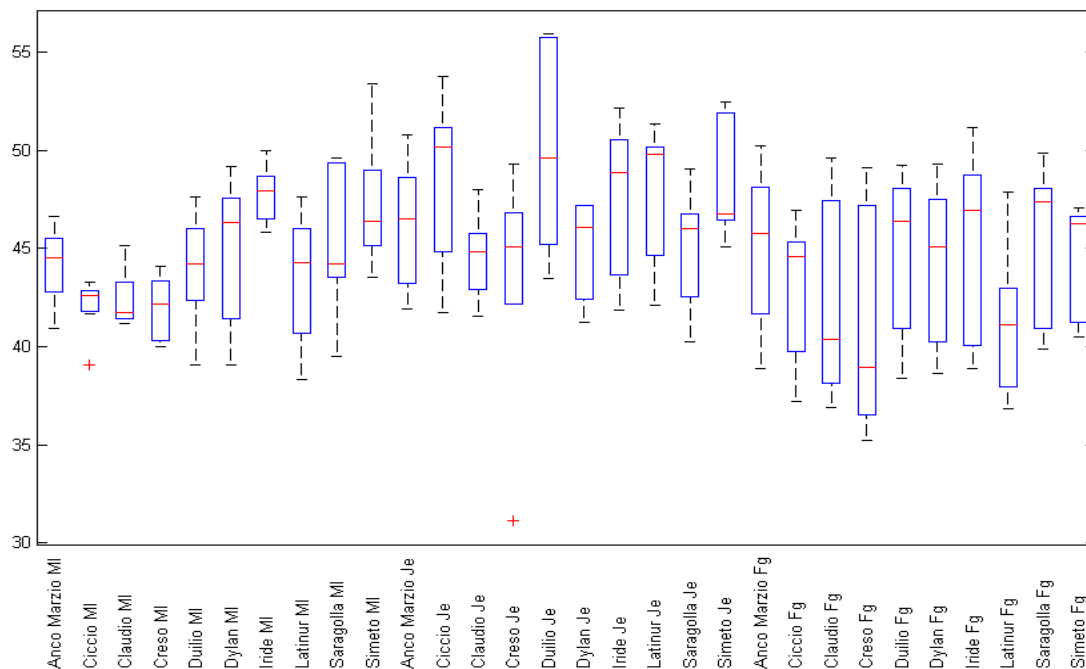


Fig.15: Boxplot delle cultivar di frumento duro per ciascun ambiente; ogni varietà è presentata come media dei tre anni .

4.3.3 Analisi della TAC in orzo

Sulla base dei risultati del primo anno di sperimentazione che hanno messo in evidenza per l'orzo (*Hordeum vulgare*) valori di capacità antiossidante totale più elevata rispetto alle altre specie, nel biennio 2010-2011, sono stati analizzati diversi genotipi di orzo, al fine di meglio valutare la variabilità genetica. Nel 2010 i valori della TAC sono risultati mediamente più elevati rispetto al 2011, anche se per diverse varietà i valori sono paragonabili nei due anni. Aldebaran, Campagne ed Explora sono le cultivar con i valori medi del biennio più elevati, presentando comunque un' alta deviazione standard. Nel grafico (Fig.18) è riportata insieme alle cultivar di orzo anche una cultivar di frumento duro (Duilio) per meglio evidenziare le differenze. L'analisi della varianza ha confermato quanto già riscontrato in precedenza e cioè che il parametro è influenzato in misura preponderante dall'anno e che l'influenza del genotipo è molto più bassa (Tab. 4). L'analisi boxplot relativa agli anni (fig. 16) mette in evidenza che in generale l'anno 2011 presenta un valore mediano più basso rispetto al 2010 e comunque una variabilità elevata. La figura 17 mostra il comportamento delle singole varietà, confermando l'elevata influenza dell'anno per la maggior parte delle cultivar analizzate; solo poche

cultivar (Sfera, Marjorie, Calanque, Atomo ed Estival) presentano una bassa variabilità in relazione all'anno.

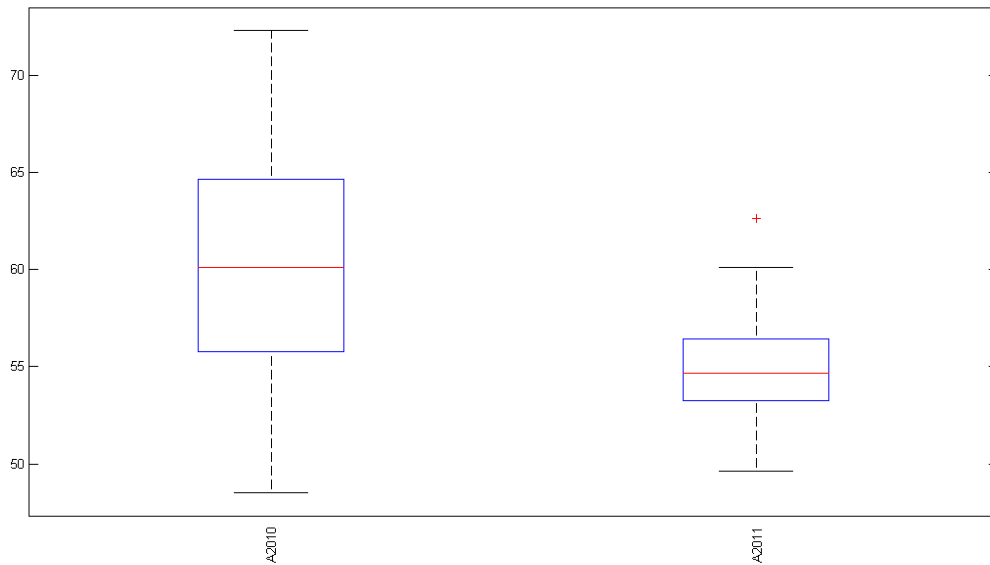


Fig 16: Analisi Boxplot: variabilità della specie (orzo) nel biennio 2010-2011.

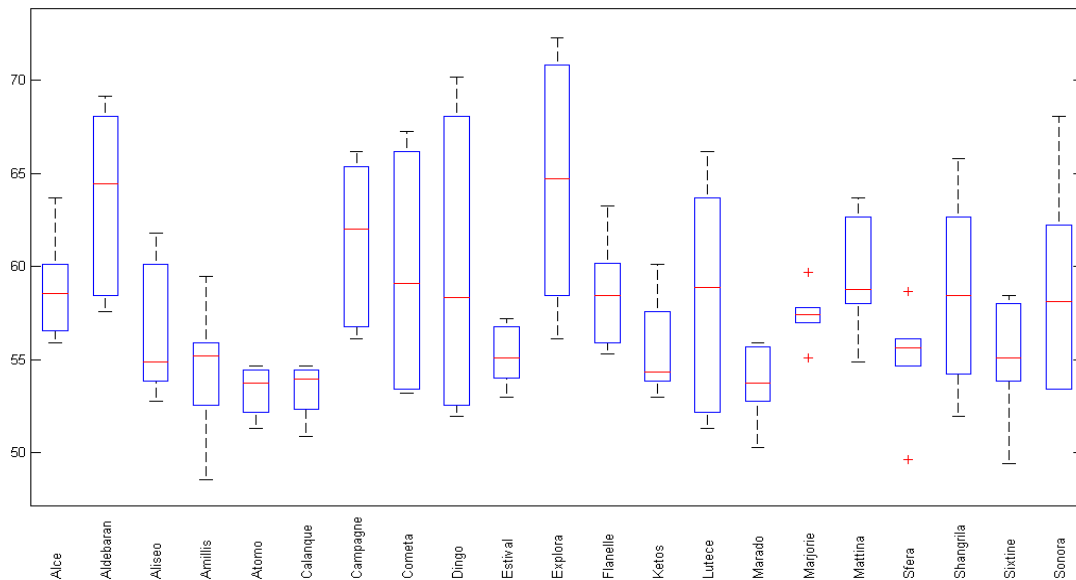


Fig.17: Analisi boxplot: Variabilità delle cultivar di orzo nel biennio 2010-2011

Tab4: Analisi della varianza in orzo: Influenza dell'anno e del genotipo

Source	Somma dei quadrati	Gradi di libertà	Media dei quadrati	Valore F	'Prob>F'
Anni (A)	903,97	1	903,97	170,33	6,55E-22
Varietà (V)	1230,85	20	61,54	11,60	1,40E-16
AxV	740,97	20	37,05	6,98	6,92E-11
Errore	445,80	84	5,31		
Totale	3321,59	125			

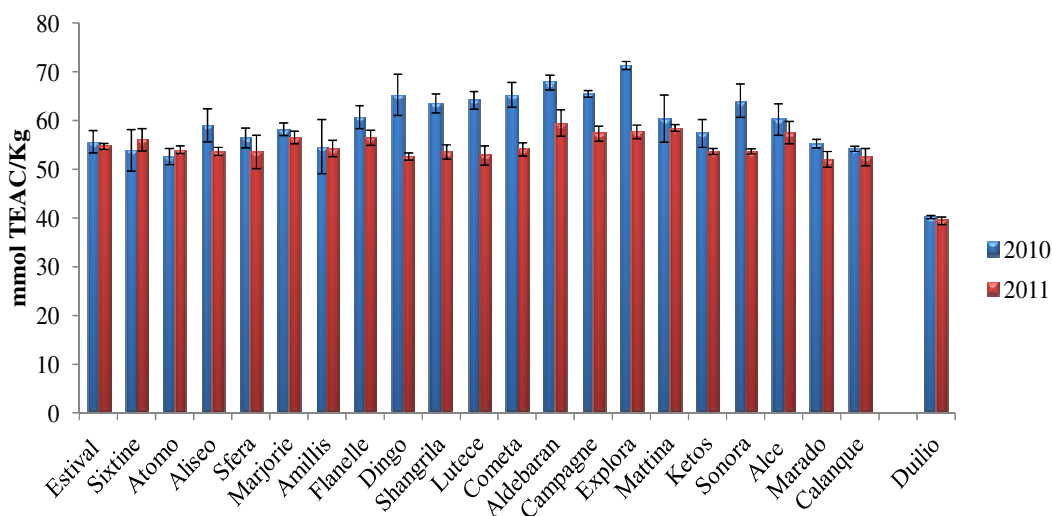


Fig. 18: Capacità antiossidante totale in diversi genotipi di orzo coltivato a Montelibretti per due anni

4.4 La trasformazione del frumento duro

4.4.1 Variabilità della TAC nelle frazioni di macinazione in funzione del tempo e delle modalità di conservazione

L'analisi della TAC sulle diverse frazioni di macinazione, conservate a 4°C e a temperatura ambiente per un periodo di circa due mesi, ha messo in evidenza che le condizioni di conservazione non influenzano sensibilmente il livello di TAC, che comunque varia nel tempo (Fig.19), con una diminuzione più o meno significativa. I sottoprodotti della macinazione (crusca e cruschello) presentano valori di TAC sempre più elevati rispetto alla granella di partenza (sfarinato integrale), mentre la semola valori sempre inferiori indipendentemente dalle modalità di conservazione. Tali risultati sono confermati dell'analisi della varianza riportata in tabella 5.

Tab.5: Analisi della varianza: Influenza della temperatura, dei tempi e delle frazioni di macinazione Sulla capacità antiossidante totale

source	Gradi di libertà	media dei quadrati	
Temperatura (°C)	1	102.32	***
R(T)	4	3.336	ns
Tempi (T)	6	229.193	***
°CxT	6	11.028	***
Frazioni (F)	5	<u>3350.012</u>	***
°CxF	5	3.427	ns
TxF	30	8.899	***
°CxTxF	30	5.568	ns
errore	174	6.933	

*** Livello di significatività $P \leq 0.001$; ns non significativo

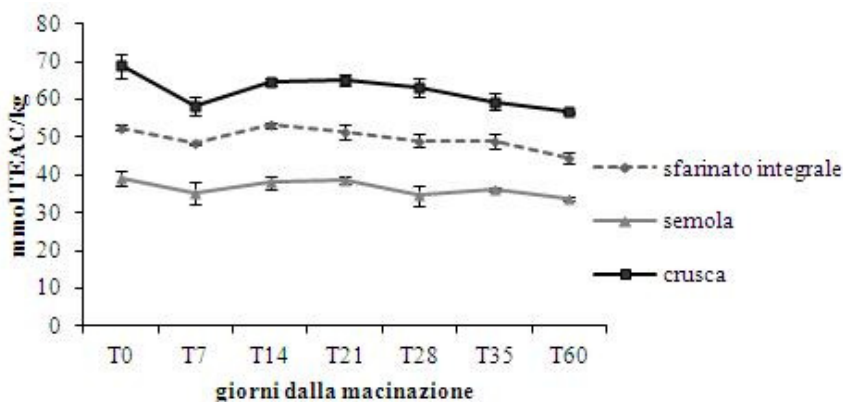


Fig.19. Andamento della capacità antiossidante totale nelle principali frazioni di macinazione conservate a temperatura ambiente in confronto con lo sfarinato integrale

4.4.2 Variabilità della TAC durante la trasformazione del frumento duro: da sfarinato integrale a pasta

Il processo di macinazione causa un sensibile decremento della TAC; dalla granella di partenza (sfarinato integrale) alla semola si riscontra una netta diminuzione (26% ca.) ed un corrispondente aumento nei sottoprodotti della macinazione, crusca e cruschetto rispettivamente del 31% e 16% circa (Fig.20). Il processo di pastificazione determina un ulteriore decremento della TAC, quantificabile intorno al 37%ca nel passaggio da

semola a pasta secca, a cui si aggiunge un successivo decremento di 8.5% con la cottura (Fig.20). Prendendo in esame la pasta integrale, ottenuta utilizzando lo sfarinato integrale, si riscontrano invece valori di TAC simili allo sfarinato di partenza, senza quindi perdite significative; il successivo processo di cottura provoca una diminuzione della TAC di circa il 21%. In sintesi dalla cariosside (sfarinato integrale) alla pasta di semola dopo cottura, si verifica una diminuzione del 71.5 % della TAC, mentre dallo sfarinato integrale alla pasta cotta integrale la diminuzione è solo del 21%. Tale risultato sottolinea che l'utilizzazione dello sfarinato integrale preserva la dotazione naturale di antiossidanti del frumento duro.

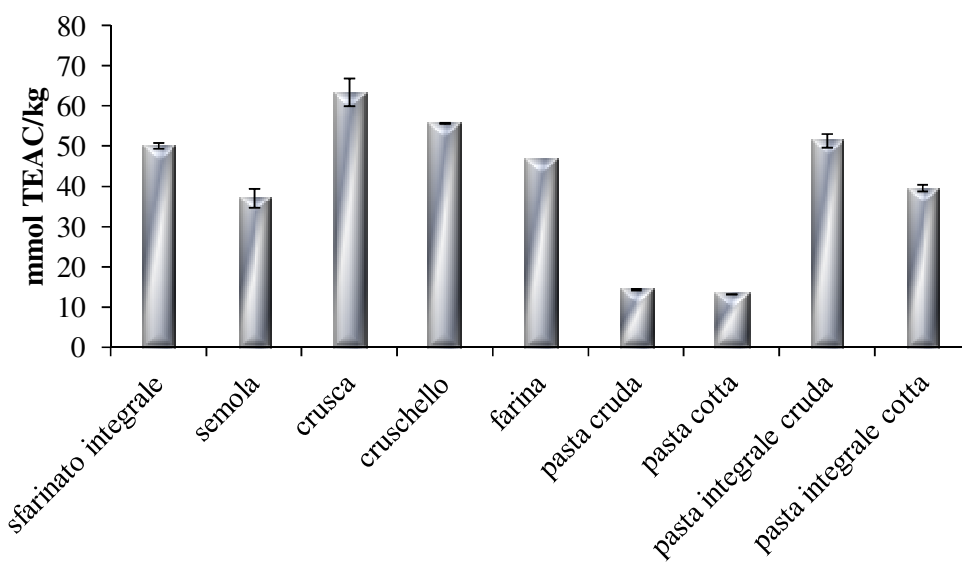


Fig.20. Valori medi e deviazioni standard della TAC nelle frazioni di macinazione e nella pasta (secca e cotta) in confronto con lo sfarinato integrale

4.4.3 La decorticazione

In figura 21 e 22 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi della capacità antiossidante totale applicando il processo di decorticazione alle cariossidi di frumento duro. L'analisi della TAC per diversi tempi mette in evidenza un leggero, ma significativo decremento nella granella decorticata a partire dall'inizio del processo (fig.21) ed un corrispondente aumento negli scarti. Le decorticazioni successive sullo stesso campione di granella (Fig.22) mostrano che il valore della TAC aumenta sensibilmente negli "scarti" procedendo verso gli strati più interni fino ad un valore massimo, dopo di che

ridiscende. Tale andamento mette in evidenza che gli strati tegumentali asportati hanno una concentrazione di antiossidanti maggiore, man mano che si procede verso lo strato aleuronico dove si ritrovano i valori più alti; verosimilmente, con l'asportazione dello strato aleuronico e man mano che ci si avvicina all'endosperma, i valori di TAC ridiscendono. In tale situazione è ipotizzabile un'alta facilità di reazione tra il radicale e i composti antiossidanti presenti nei singoli strati.

Nella granella decorticata non si riscontrano invece sensibili variazioni con il procedere della decorticazione. Ciò potrebbe essere attribuito ad una compensazione tra l'allontanamento degli strati tegumentali più esterni con più bassa concentrazione di antiossidanti e l'aumento, in proporzione, dello strato aleuronico più ricco in antiossidanti; man mano che procede la decorticazione, verosimilmente nella granella potrebbero rendersi disponibili all'attacco del radicale composti antiossidanti inizialmente meno accessibili o soggetti ad interferenze con componenti dei tegumenti.

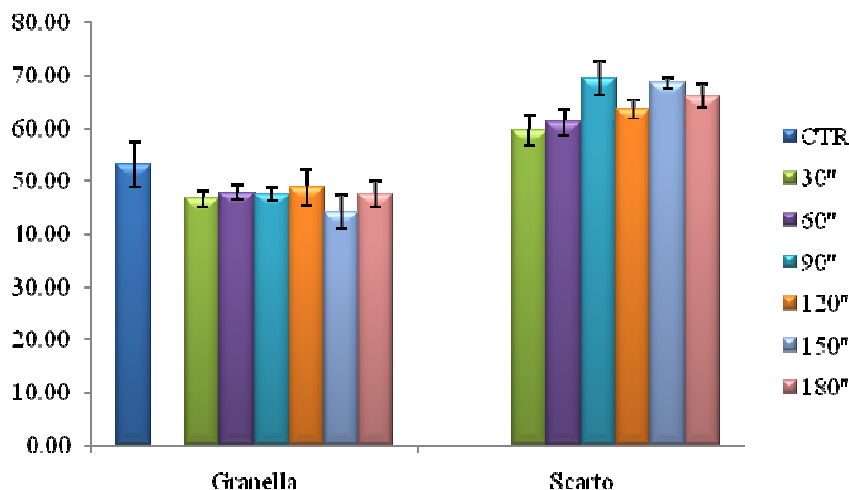


Fig.21. valori della TAC di diverse frazioni di decorticazione (scarto e granella) effettuate sulla cv Duilio a diversi tempi:30, 60, 90, 120, 150, 180 secondi

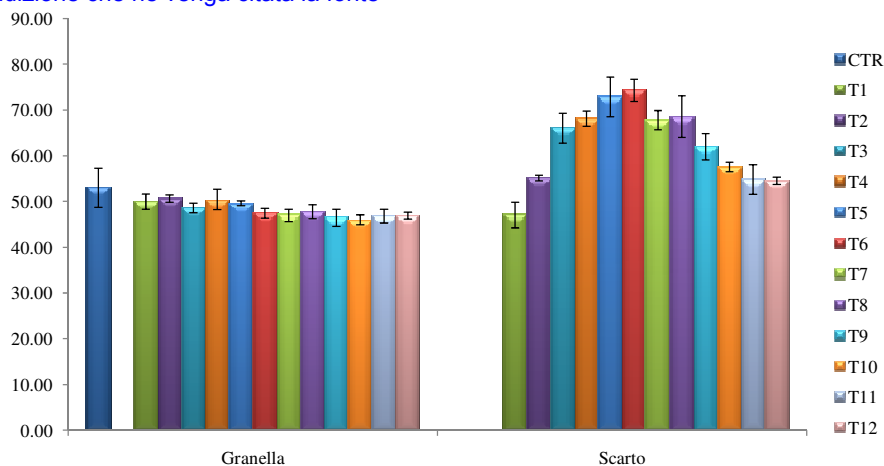


Fig.22: valori della TAC ottenuti da decorticazioni successive effettuate sulla cv Duilio

4.5 Determinazione degli acidi fenolici

4.5.1 Validazione del metodo

In tabella 6 sono riportati le rette di taratura con i coefficienti di correlazione, le lunghezze d'onda di massimo assorbimento, i LOD e i LOQ, i tempi di ritenzione dei diversi acidi fenolici analizzati. In figura 23 è riportato il cromatogramma degli standard di acidi fenolici che rende evidente la buona separazione dei picchi cromatografici in base al sistema eluente utilizzato. In figura 24 sono riportati tre cromatogrammi dove è evidenziato il profilo di acidi fenolici liberi (Fig 24A), coniugati (Fig.24B) e legati (Fig. 24C) in un campione di frumento duro. Si nota in generale che gli acidi fenolici in forma libera sono quantitativamente inferiori rispetto alle altre due forme, coniugata e legata che sono maggiormente rappresentate; tale evidenza si evince dalla diversa scala nei cromatogrammi delle tre forme

Tab. 6: tabella riportante i diversi parametri utilizzati per la validazione del metodo cromatografico per l'analisi degli acidi fenolici

Analita	tempo di ritenzione min	RDS %	λ	LOD mg/L	LOQ mg/L	Range Conc. mg/L	Equazione	Coefficiente Correlazione
Acido p-idrossibenzoico	11,81 ± 0,25	2,16	254	0.18	0.6	0,5-8	$y = 0,194x + 0,008$	R=0,999
Acido vanillico	15,51 ± 0,24	1,55	254	0.1	0.32	1,25-20	$y = 0,089x + 0,01$	R=0,999
Acido caffeico	17,96 ± 0,35	1,93	320	0.03	0.1	0,1-0,8	$y = 0,584x + 0,008$	R=0,994
Acido siringico	19,43 ± 0,38	1,99	280	0.2	0.6	0,6-10	$y = 0,097x + 0,003$	R=0,999
Acido p-cumarico	28,07 ± 0,32	1,12	320	0.09	0.4	0,4-6	$y = 0,083x + 0,091$	R=0,962
Acido ferulico	30,92 ± 0,16	0,51	320	0.04	0.13	5-80	$y = 0,180x - 0,24$	R=0,999
Acido sinapico	31,50 ± 0,13	0,41	320	0.1	0.7	12,5-200	$y = 0,135x - 0,185$	R=0,999
Acido o-cumarico	34,04 ± 0,45	1,32	280	0.12	0.6	2-10	$y = 0,021x - 0,005$	R=0,995

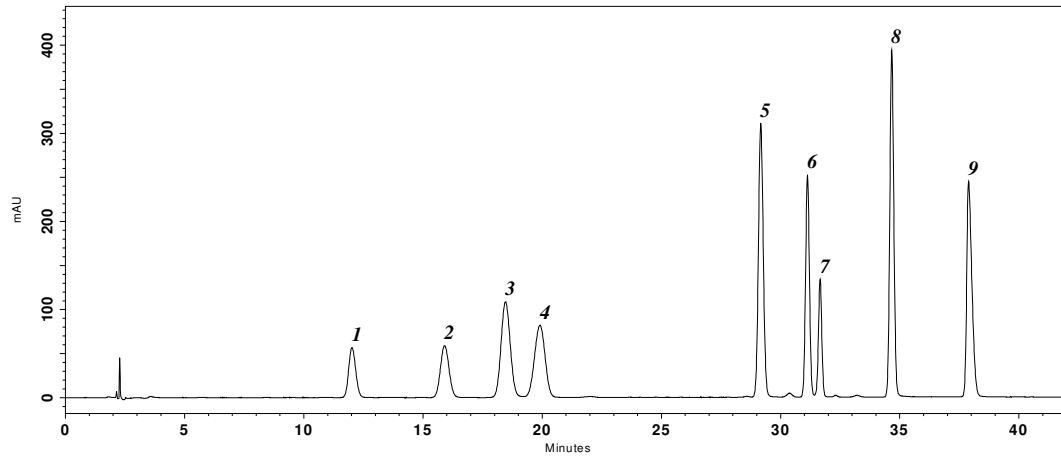


Fig.23: Cromatogramma di standard di acidi fenolici: 1)Acido p-idrossibenzoico, 2) Acido vanillico, 3) Acido caffeico, 4) Acido sirigico, 5) Acido p-cumarico, 6) Acido ferulico, 7) Acido sinapico, 8) Acido o-cumarico, 9) Acido 3,5-dicloro-4-idrossibenzoico (standard interno)

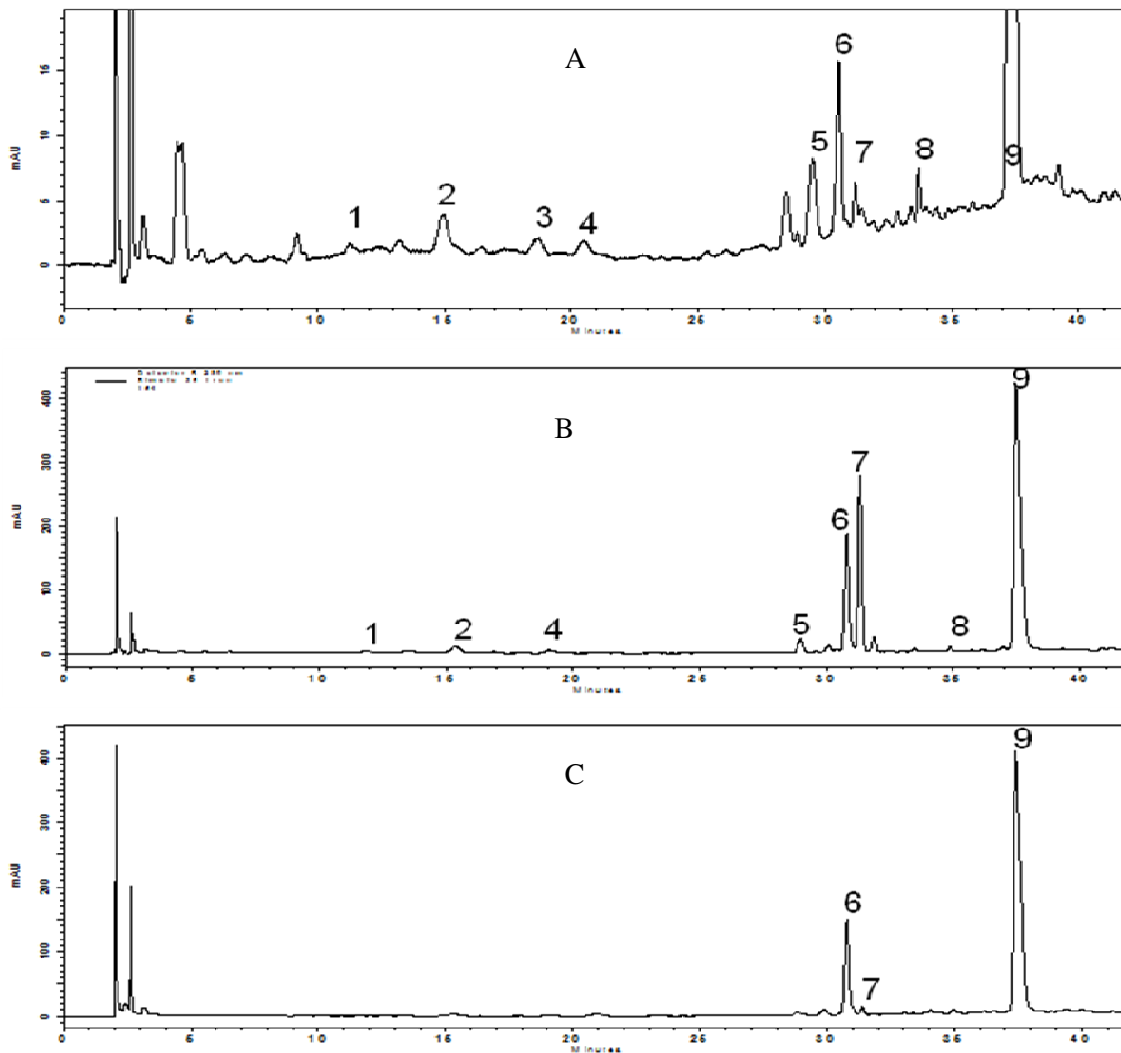


Fig.24: Cromatogramma delle tre frazioni di acidi fenolici libera (A), coniugata (B) e legata (C) di un campione di frumento duro.

4.5.2 *Influenza del genotipo e dell'ambiente*

La determinazione di acidi fenolici tramite HPLC di 3cv di frumento duro (Svevo, Simeto e Saragolla) in tre ambienti (Montelibretti, Jesi e Foggia), mette in evidenza la presenza preponderante di acido ferulico (da 32.74 a 44.57 mg/kg) nella frazione legata in tutti e tre gli ambienti di coltivazione seguito dall'acido sinapico e dal p-cumarico (Fig. 26,27,28). Nella frazione coniugata invece l'acido ferulico è presente in quantità comparabili con gli altri due acidi (sinapico e p-cumarico). La frazione libera è quantitativamente inferiore rispetto alle altre due frazioni, ma presenta una maggiore diversificazione di acidi fenolici (Fig. 26,27,28) e l'acido sinapico risulta essere il più abbondante. Analizzando i diversi boxplot per i singoli acidi fenolici, si nota che l'acido o-cumarico presenta un'ampia variabilità in tutte le tre frazioni (Fig. 25), verosimilmente dovuta all'influenza delle varietà e dell'ambiente. L'acido p-cumarico invece è presente in tracce nella frazione libera ed è relativamente abbondante nelle altre due forme; presenta in genere una bassa variabilità rispetto all'ambiente e al genotipo. L'acido caffeico è presente in maggior quantità nella forma coniugata; l'acido idrossibenzoico presenta un'ampia variabilità nella forma coniugata, mentre nelle altre due forme ha una variabilità molto bassa. L'acido vanillico è presente in piccole quantità nella frazione coniugata con un'ampia variabilità, come del resto nella forma libera dove però i livelli sono più alti. L'acido ferulico, il più abbondante acido fenolico nella granella di frumento duro, è particolarmente abbondante nella frazione legata rispetto alla frazione coniugata e libera (circa 10 volte), rimanendo comunque anche in queste due frazioni uno degli acidi più abbondanti. L'acido sinapico risulta essere mediamente il più abbondante nella frazione coniugata; si trova in quantità pressoché simili nella frazione legata e decresce nella frazione libera. L'acido siringico si trova maggiormente nella frazione libera, anche se con un'ampia variabilità; nella frazione legata e coniugata è presente solo in tracce.

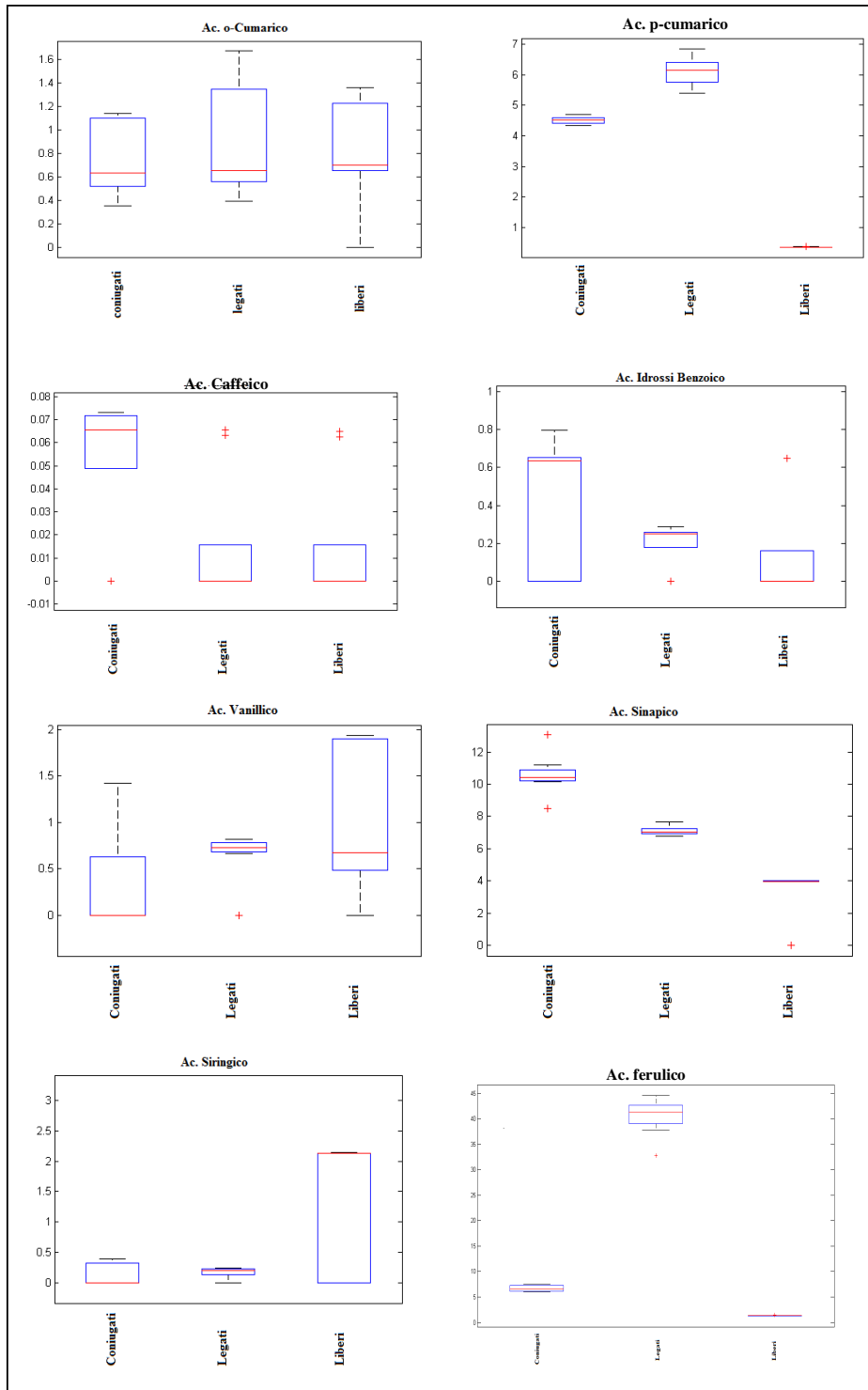


Fig.25: Boxplot dei singoli acidi fenolici (liberi, coniugati e legati): Acido o-cumarico, p-cumarico, caffeico, idrossibenzoico, vanillico, sinapico, siringico, ferulico.

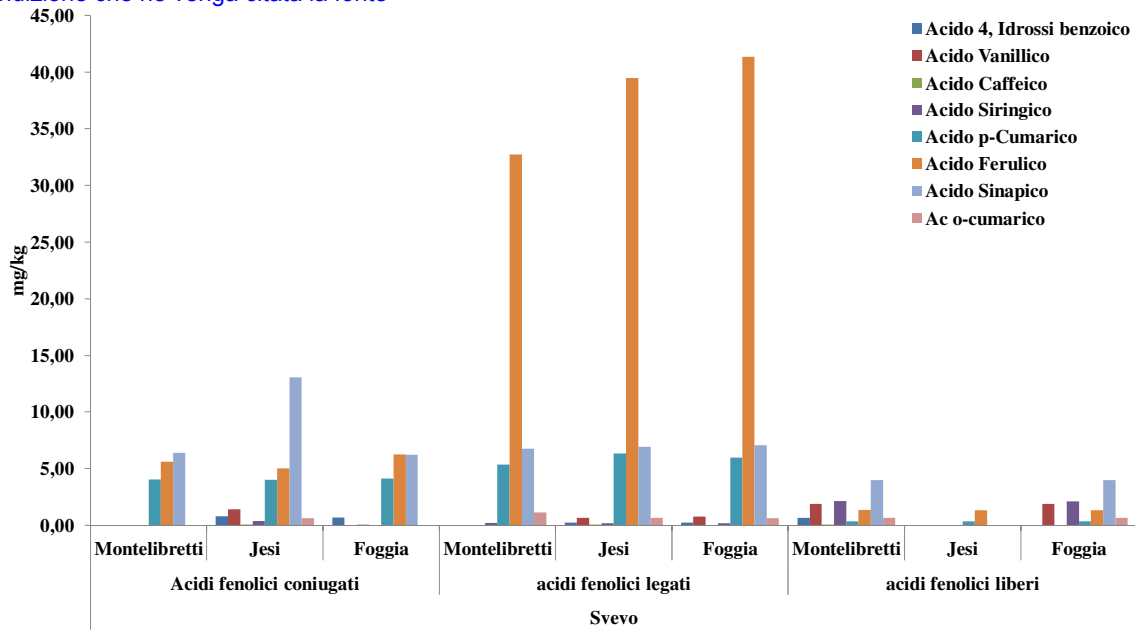


Fig.26: Contenuto in acidi fenolici (liberi, coniugati e legati) nella cultivar Svevo coltivata in tre ambienti (Montelibretti, Jesi, Foggia)

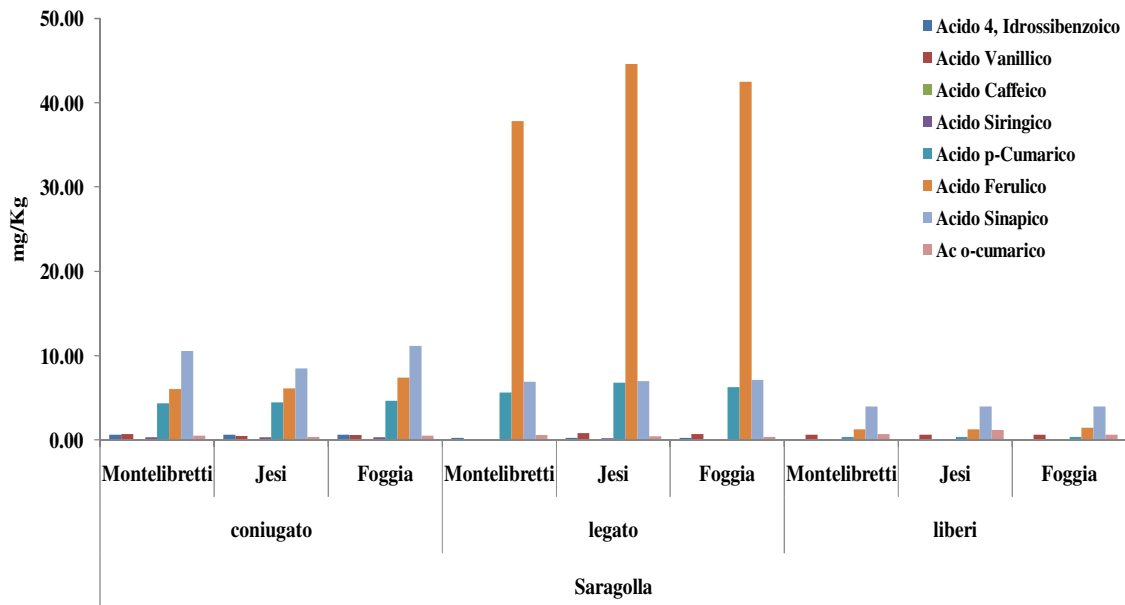


Fig.27: Contenuto in acidi fenolici (liberi, coniugati e legati) nella cultivar Saragolla coltivata in tre ambienti (Montelibretti, Jesi, Foggia)

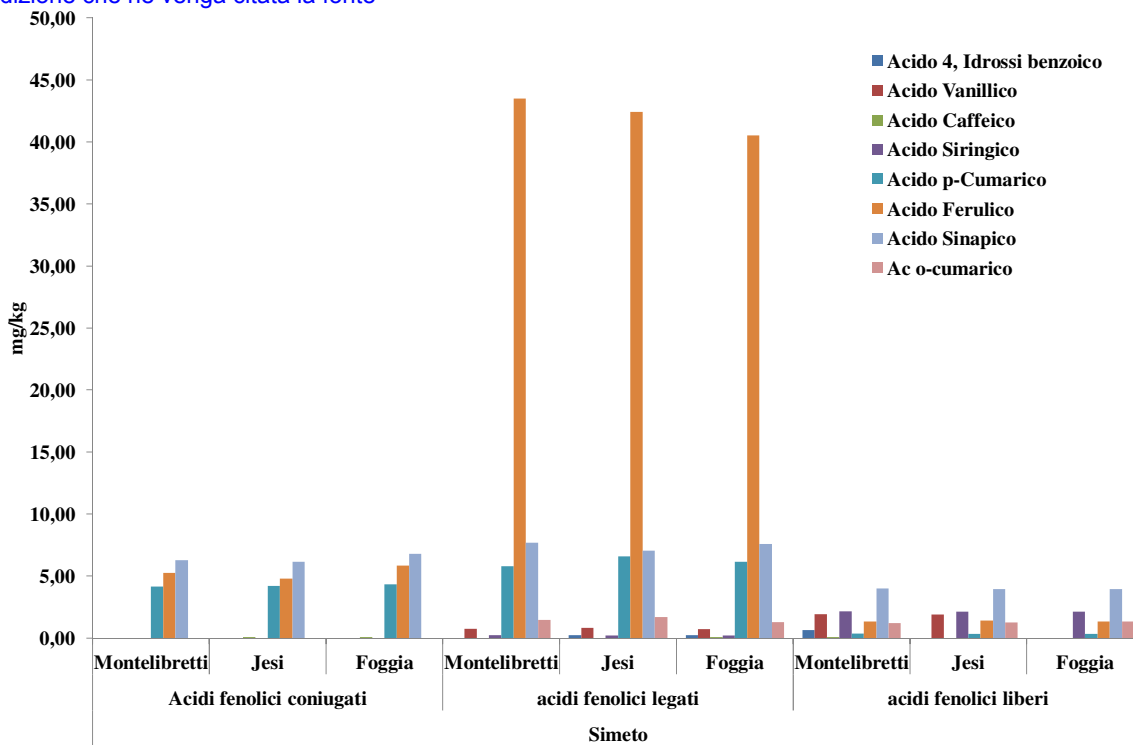


Fig.28: Contenuto in acidi fenolici (liberi, coniugati e legati) nella cultivar Simeto coltivata in tre ambienti (Montelibretti, Jesi, Foggia)

4.5.3 Influenza dei processi tecnologici

L'analisi degli acidi fenolici nelle frazioni di macinazione mette in evidenza che, analogamente a quanto già osservato per gli sfarinati integrali, la forma coniugata e soprattutto la forma legata sono presenti in quantità sensibilmente più elevate rispetto alla frazione libera (Fig.29). Della figura si rileva che il processo di macinazione è il passaggio tecnologico che causa il maggior decremento dell'acido ferulico legato; tale risultato è attribuibile al fatto che con la macinazione viene rimosso completamente lo strato aleuronico, particolarmente ricco in questo acido. Nel passaggio da sfarinato integrale a pasta integrale invece, non effettuando la rimozione degli strati tegumentali esterni, la quantità di acido ferulico legato rimane pressoché invariata. Il processo di pastificazione (semola-pasta), non causa sensibili variazioni degli acidi fenolici legati né da un punto di vista quantitativo che nel profilo (Fig.29). Nella frazione coniugata si nota un lieve decremento dell'acido ferulico con la macinazione, mentre l'acido sinapico e il p-cumarico rimangono pressoché simili; nel passaggio da sfarinato

integrale a pasta integrale si riscontra un lieve decremento dell'acido sinapico, una stabilità dell'acido ferulico e un sostanziale decremento dell'acido p-cumarico; nel passaggio tra semola e pasta si nota un'ulteriore lieve diminuzione dei tre acidi (ferulico, sinapico e p-cumarico). Per la frazione libera, la macinazione causa un decremento di tutti gli acidi fenolici; non si notano differenze di composizione tra lo sfarinato integrale e la pasta integrale, mentre esistono differenze tra semola e pasta di semola che sono ancora oggetto di studio. L'acido sinapico è quello presente in maggior concentrazione, ma va comunque messo in evidenza, che nella frazione libera i livelli sono in genere molto bassi.

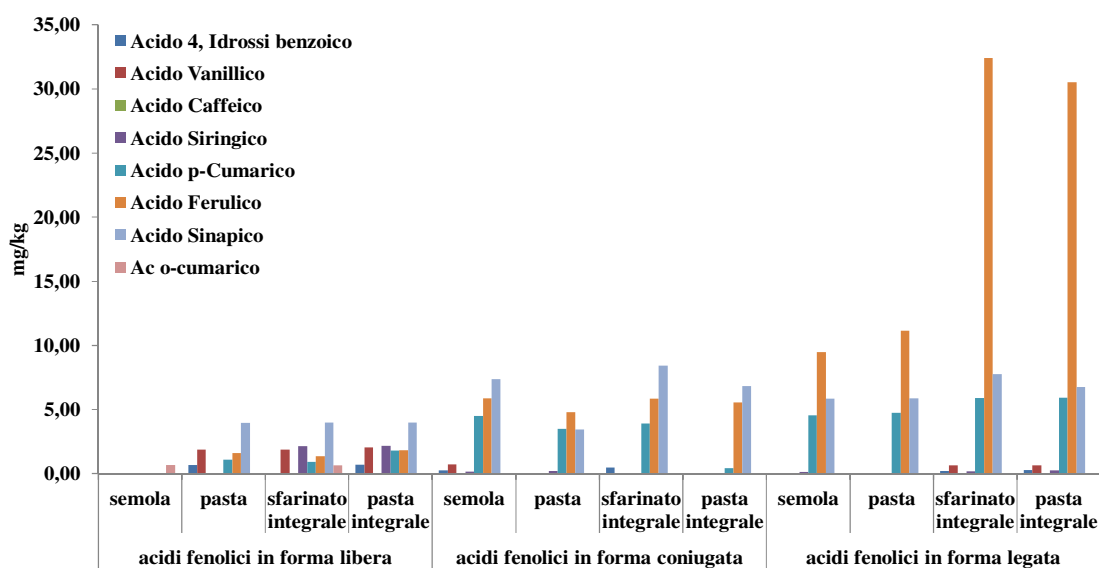


Fig.29: Contenuto in acidi fenolici liberi, coniugati e legati nello sfarinato integrale, nella semola e nella pasta e pasta integrale

4.5.4 Acidi fenolici e decorticazione.

L'analisi degli acidi fenolici è stata effettuata sulla granella decorticata e sugli scarti delle decorticazioni successive, ritenendo questa condizione particolarmente utile per valutare il profilo in acidi fenolici dei diversi strati tegumentali. L'analisi degli acidi fenolici liberi sia sulla granella che sugli scarti non ha al momento evidenziato differenze significative né nella composizione né nei contenuti (Fig.30); La frazione coniugata invece mostra delle differenze notevoli nel livello di acidi fenolici presenti confrontando la granella decorticata e gli scarti di decorticazione; tale differenza è

soprattutto legata alla presenza preponderante di acido sinapico negli scarti di decorticazione (Fig.30). Nella granella decorticata l'acido sinapico è il più abbondante nella frazione libera e coniugata, mentre l'acido ferulico lo è nella frazione legata. Per quanto riguarda gli scarti di decorticazione, le condizioni adottate per l'estrazione degli acidi fenolici in tutti i campioni analizzati, non sono risultate idonee e non hanno consentito di avere materiale adatto per le analisi cromatografiche, ciò è dovuto verosimilmente alla natura degli scarti stessi (grande volume rispetto al peso, elevata durezza per la presenza di lignina e cellulosa, scarsa assorbibilità per l'acqua). Dovranno pertanto proseguire gli studi per definire ed ottimizzare le condizioni di estrazione più idonee e completare il profilo degli acidi fenolici nei successivi tempi di decorticazione, al fine di identificare lo strato più interessante per la presenza di composti bioattivi.

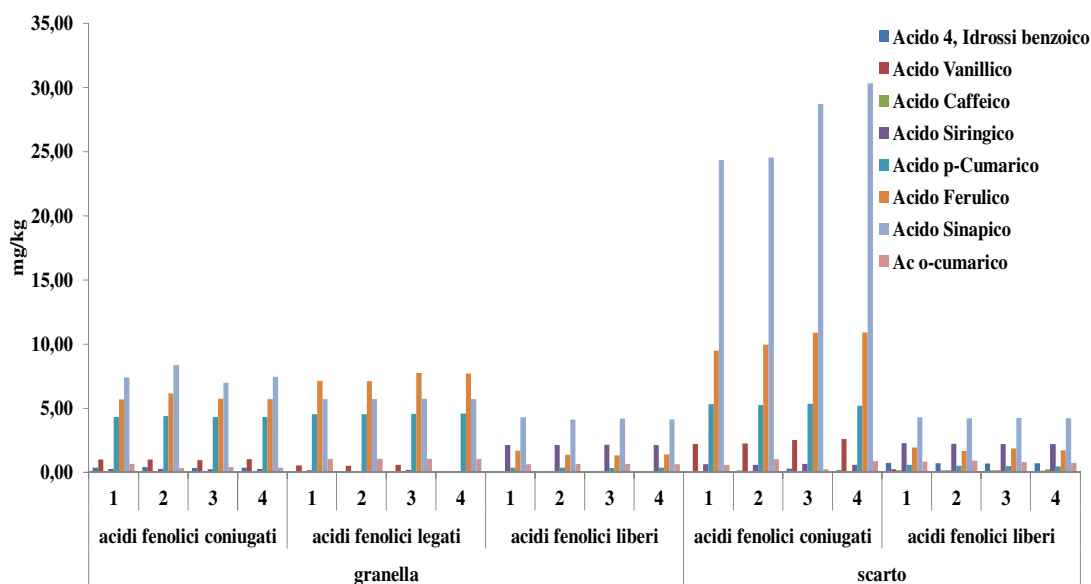


Fig. 30: Acidi fenolici presenti nella granella e negli scarti delle frazioni di decorticazioni successive; ogni tempo di decorticazione è di 15 s.

5 Conclusioni e prospettive

Il lavoro svolto nell'arco del triennio ha permesso di classificare le specie di cereali per la capacità antiossidante totale. E' stato possibile valutare l'influenza dei diversi fattori (anno, ambiente, genotipo) sulla capacità antiossidante totale sia nelle diverse specie, che più approfonditamente in frumento duro: l'anno, è il fattore che influenza maggiormente il parametro seguito dall'ambiente e dal genotipo. E' stata inoltre esaminata in frumento duro l'influenza dei processi tecnologici; dalla materia prima (cariossidi) alla pasta cotta, prodotto che arriva al consumatore, si assiste ad un drastico decremento della TAC pari al 71.5% circa; mentre utilizzando lo sfarinato integrale per la produzione di pasta il decremento è notevolmente ridotto e pari al 21% e si verifica solo durante la cottura. Tale risultato permette di affermare che la maggiore perdita di capacità antiossidante totale avviene con la macinazione e suggerisce che un'ottimizzazione del processo stesso può preservare una quota degli strati periferici della cariosside particolarmente ricchi in sostanze bioattive, quale lo strato aleuronico. Il processo di decorticazione mostra che possono essere scelte condizioni di processo utili per mantenere nella cariosside un buon livello di composti bioattivi e procedere poi con una macinazione integrale senza incorrere nel rischio di ritrovare sostanze indesiderate (micotossine, metalli pesanti, ecc.), presenti negli strati più esterni. In aggiunta la decorticazione consente di recuperare singole frazioni di scarto in cui sono concentrati i composti antiossidanti di maggiore interesse.

La caratterizzazione degli acidi fenolici ha messo in evidenza che la frazione più abbondante nei cereali è quella legata, e che in tale frazione predomina l'acido ferulico. Il profilo di acidi fenolici nelle cultivar al momento analizzate è simile, ma sono in corso ulteriori studi per approfondire l'influenza che il genotipo e l'anno possono avere su tale profilo, sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo. L'analisi degli acidi fenolici nei prodotti semilavorati e finiti ottenuti dal processo tecnologico mostra che il profilo e la quantità di acidi fenolici legati si mantengono pressoché inalterati nel passaggio da sfarinato integrale a pasta integrale, mentre diminuiscono nella fase di macinazione. Anche nei prodotti di macinazione la frazione legata è quella predominante ed è sempre caratterizzata da un alto livello di acido ferulico. Per quanto riguarda il processo di decorticazione, devono essere riviste le condizioni di estrazione della frazione legata al fine di caratterizzare il profilo degli acidi fenolici negli scarti ed individuare quelli più interessanti per fini applicativi.

In conclusione i dati ottenuti suggeriscono che l'obiettivo di realizzare prodotti a base di cereali con un alto livello di composti antiossidanti, può essere raggiunto sia con l'individuazione di materie prime (specie o cultivar) con alti livelli di TAC, sia per via tecnologica con l'utilizzazione di uno sfarinato meno "raffinato" o con un arricchimento della semola con frazioni periferiche della cariosside particolarmente ricche in composti bioattivi. Sarà comunque opportuno verificare la reale biodisponibilità degli acidi fenolici nei prodotti, al fine di individuare le strategie più idonee per gli aspetti applicativi.

6 Bibliografia

1. Adom K.K., Liu R.H. 2002. *Antioxidant activity of grains*. J. Agric. Food Chem., 50:6182-6187.
2. Adom K.K., Sorrells M.E., Liu R.H. 2003. *Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties*. J. Agric. Food Chem., 51:7825-7834.
3. Adom K.K., Sorrells M.E., Liu R.H., 2005. *Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (6), 2297-2306
4. Ames B.N. 1983 *Dietary carcinogens and anticarcinogens*. Science, 221: 1256-1264.
5. Ames B.N., Shigenaga M.K. 1992 *Oxidants are a major contributor to aging*. Ann. N.Y. Acad. Sci.663: 85-96.
6. Amorati R, Pedulli GF, Valgimigli L, Attanasi OA, Filippone P, Fiorucci C, Saladino R 2001. *Absolute Rate Constants for the Reaction of Peroxyl Radicals with Cardanol Derivatives*. J. Chem. Soc. Perkin Trans., 2: 2142-2146.
7. Benzie I.F. 2000 *Evolution of antioxidant defence mechanisms*. Eur. J. Nutr. 39: 53-61.
8. Berliner J.A., Heinecke J.W. 1996 *The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis*. Free Rad.Biol. Med., 20: 770-777.
9. Bloksma, A.H. and Bushuk, W. 1988. *Rheology and chemistry of dough. Wheat: Chemistry and Technology*, Vol. 2, (Y. Pomeranz, ed.) pp. 131-217, American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN.
10. Borrelli G.M., De Leonardis A., Stoppelli M.C., Platani C., Di Fonzo N., D'Egidio M.G. 2003. *Genetic and environmental effects on the characteristics affecting antioxidant properties of durum wheat*. Proc. of the 2nd International Workshop on "Durum wheat and pasta quality: recent achievements and new trends". Roma, 2002. Roma: Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura C.R.A. ed. 215-218.
11. Bottega G., Cecchini C., D'Egidio M.G., Marti A., Pagani M.A. 2009. *Debarnning process to improve quality and safety of wheat and wheat products*. Tecnica Molitoria International 60, 10/A 79-88.
12. Boxin Ou, Dejian Huang, Maureen Hampsch-Woodill, Judith A. Flanagan, Elisabeth K. Deemer, " *Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables*

- Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study*” J. Agric. Food Chem. 2002 ; 50 (11); 3122-3128.
13. Brown L., Rosner B., Willett W.W., Sacks F.M. 1999. *Cholesterol- lowering effects of dietary fiber: a metaanalysis*. Am. J. Clin. Nutr., 69:30-42.
 14. Burton G. W., Doba T., Gabe E., Hughes L., Lee F. L., Prasad L., and Ingold K.U. 1985 *Autoxidation of biological molecules. 4. Maximizing the antioxidant activity of phenols* Journal of the American Chemical Society 107 (24), 7053-7065
 15. Burton GW, Joyce A, Ingold KU. *First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma* 1982. Lancet. Aug 7;2(8293):327–327
 16. Carcea M., De Luca C., Bruschi L., Francisci R., Quattrucci E. 2001. *Hydrophilic and lipophilic antioxidants in cereal kernels*. In: *Bioactive micronutrients in Mediterranean diet and health*. Proc. of an European scientific conference of COST Action, 916:39-40.
 17. Carratù B., Sanzini E. 2005. *Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale*. Ann. Ist. Super. Sanità 41(1): 7-16.
 18. Cassidy A. 1996. *Physiological effects of phytoestrogens in relation to cancer and other human health risks*. Proc. Symp. On Physiologically Active Substances in Plant Foods (Non-Nutritive Nutrient). London, 1996. London: Cambridge University Press.
 19. Ceschina G., 1907. Primo contributo allo studio dell'essiccazione delle paste alimentari. Tipografia e litografia degli ingegneri, Milano
 20. Cestaro B. 1994 *Per una vita inossidabile*. Etas Libri-RCS Medicina.
 21. Chen Q., Fischer A., Reagan J.D., Yan L.J., Ames B.N. 1995 *Oxidative damage and senescence of human diploid fibroblast cells*. Proc. Nat. Acad. Sci. 92: 4337-4341.
 22. D'Egidio M.G., De Stefanis E., Fortini S., Nardi S., Sgrulletta D., Volpi M., 1986 *Modificazioni indotte dalle proteine del glutine con la pastificazione e possibili legami con la qualità della pasta*. Tecnica Molitoria 37, 89.
 23. Dalbon, G., Grivon, D., and Pagani, M. A. 1996. *Pasta: Continuous manufacturing process*. Pages 13-58 in: *Pasta and Noodle Technology*. J. E.

- Kruger, R. B. Matsuo, and J. W. Dick, eds. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN.
24. Dexter, J.E. and Wood P.J. 1996. *Recent application of debranning of wheat before milling*. Trends Food Sci. & Technology, 7:35-41
 25. Duffus C.M., 1987 Physiological aspects of enzymes during grains development and germination. 'Enzymes and their role in cereal technology', L.E. Kruger, D.R. Lineback, C.E. Stauffer (eds), 117. AACC Inc St.Paul, MN.
 26. Feillet, P. and Dexter, J.E. 1996. *Quality requirements of durum wheat for semolina milling and pasta production*. Pasta and Noodle Technology. Ed. Matsuo R.B. and Dick J.W. AACC, St. Paul, Minnesota.
 27. Fratianni A., Irano M., Panfili G., Acquistucci R. 2005. *Estimation of color of durum wheat. Comparison of WSB, HPLC, and reflectance colorimeter measurements*. J. Agric. Food Chem., 53:2373-2378.
 28. Geletii Y.V., Balavoine G.G.A., Efimov O.N., Kulikova V.S. 2002 *The Determination of Total Concentration and Activity of Antioxidants in Foodstuffs*. Russian Journal of Bioorganic Chemistry 28 (6): 501–514.
 29. Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F, Wrigley CW 2001 Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. Cereal Chem 78: 635–646
 30. Graveland, A. & Henderson, M.H. 1987. *Structure and functionality of gluten proteins*. In: Proceedings of the 3rd International Gluten Workshop, Budapest, Hungary, 9-12 May (edited by R.Laszity & F.Bekes). Pp. 238–246. Singapore: World Scientific.
 31. Grizard D., Barthomeuf C. 1999. *Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health*. Reprod. Nutr. Dev., 39:563-88.
 32. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1990 *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: overview*. Methods Enzymol. 186: 1-85.
 33. Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C., and Piscozzi, R. 2006. Carotenoid and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *Monococcum* L.). J. Cereal Sci. 44:182-193.
 34. Hosney R.C., Faubion J.M., 1992 Physical properties of cereal grains in storage of cereal grains and their products savers. AACC Inc.

35. Li, L., Shewry, P. R., & Ward, J. L. 2008. *Phenolic acids in wheat varieties in the HEALTHGRAIN diversity screen*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(21), 9732–9739.
36. Lintas, C. and D'Apollonia, B.L. 1973. *Effect of spaghetti processing on semolina carbohydrates*. Cereal Chem., 50: 563.
37. Liyana-Pathirana, C. M., & Shahidi, F. 2006. *Importance of insoluble bound phenolics to antioxidant properties of wheat*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 1256–1264.
38. Lucarini, M., Pedrielli, P., Pedulli, G.F., Cabiddu, S. & Fattuoni, C. 1996 *Bond dissociation energies of O-H bonds in substituted phenols from equilibrations studies*. J. org. Chem., 61 , 9259–9263.
39. Mateo Anson N., Berg v.d.R., Havenaar R., Bast A., Haenen, G.R.M.M., 2008. *Ferulic acid from aleurone determines the antioxidant potency of wheat grain (Triticum aestivum L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, 5589–5594.
40. Mitscher L.A., Young M., Shankel D., Dou j.H., Steele L., Pillai S.P. 1997 *Chemoprotection: A review of the Potential Therapeutic Antioxidant Properties of Green Tea (Camelia sinensis) and Certain its Constituents*. Med. Res. Rev., 17: 327-365.
41. Morrison, W.R., 1995. *Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality*. Cereal Foods World, 40, 43-46.
42. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. 2001 *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*. J. Agric. Food Chem., 49, 4619-4626.
43. Pagani M.A., De Noni I., Pellegrino L., D'Egidio M.G., Cecchini C. 2000. *Decorticazione del grano. Riduzione dell'attività α -amilasica della semola e del danno termico della pasta secca*. Tecnica Molitoria, 11, 1170-1175
44. Pagani M.A., De Noni I., Resmini P. and Pellegrino L. 1986. *Processing and heat damage of dry pasta*. Tec. Molitoria, 47:345.
45. Pagani M.A., De Noni I., Resmini P. and Pellegrino L. 1996. *Filiera produttiva e danno termico della pasta alimentare secca*. Tec. Molitoria, 47(4):345
46. Panfili G., Fratianni A., Di Criscio T., Giuzio L., Flagella Z. 2005. *Influenza dello stress idrico e della concimazione azotata e solfatica sul contenuto di antiossidanti lipidici nel frumento duro*. Atti XXXVI Conv. SIA "Ricerca ed

- innovazione per le produzioni vegetali e la gestione delle risorse agro-ambientali". Foggia, 2005. Foggia: Facoltà di Agraria. 342-343.
47. Paraventi R., 1984. *L'attività dell'acqua nel processo di essiccazione della pasta*. Tecnica Molitoria 35, 626.
 48. Pastore D., Trono D., Padalino L., Di Fonzo N., Passarella S. 2000a. *P-Nitrosodimethylaniline (RNO) bleaching by soybean lipoxygenase-I. Biochemical characterization and coupling with oxodienes formation*. Plant Physiol. Biochem., 38:845-852
 49. Pastore D., Trono D., Padalino L., Simone S., Valenti D., Di Fonzo N., Passarella S. 2000b. *Inhibition by α -Tocopherol and L-Ascorbate of Linoleate Hydroperoxidation and β -Carotene Bleaching Activities in Durum Wheat Semolina*. J. Cereal Sci., 31:41-54.
 50. Pedulli, G.F., Lucarini, M., Marchesi, E., Paolucci, F., Roffia, S., Fiorentini, D., Landi, L., 1999. *Medium effects on the antioxidant activity of dipyrindamole*. Free Radic. Biol. Med. 26, 295.
 51. Pellegrini N., Serafini M., Salvatore S., Del Rio D., Bianchi M., & Brighenti F., 2006. *Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays*. Molecular Nutrition and Food Research, 50,1030–1038.
 52. Pogna N. E., Autran J.C., Mellini F., Lafiandra D. e Feillet P. 1990. *Chromosome 1B-encoded gliadin and glutenin subunits in durum wheat genetics and relationship to gluten strength*, J. Cereal Sci. 11 :15-34.
 53. Pomeranz Y. 1987 *Wheat processing, milling 'Modern cereal science and technology'*. AACC Inc. St.Paul, MN
 54. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biology and Medicine 26, 1231–1237.
 55. Resmini, P., Uberti, A., Pellegrino, L.1999 *Composti azotati che si formano durante il trattamento termico del latte non conseguiti alla reazione di Maillard*. Istituto di industrie Agrarie – Università degli studi di Milano. 61-85.
 56. Rice-Evans C. A.; Miller N. J.; Paganga, G., 1996. *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Radic. Biol. Med. 20:933–956

57. Ring S.G., Colonna P., L'Anson K.J., Kalichevsky M.T., Miles M.J., Morris V.J., Orford P.D., 1987 *The gelation and crystallization of amylopectin*. Carbohydrates Res., 162, 277.
58. Rowland I., 1999. *Optimal nutrition: fibre and phytochemicals*. Proceedings of the Nutrition Society, 58, 415–420.
59. Scalbert A., & Williamson G., 2000. *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. Journal of Nutrition, 130, 2073–2085.
60. Schneeman B.O. 1999. *Building scientific consensus: the importance of dietary fiber*. Am. J. Clin. Nutr., 25:691-699.
61. Serpen A., Capuano E., Fogliano V., Gokmen V., 2007. *A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 7676–7681
62. Serpen, A., Gokmen, V., Pellegrini, N., & Fogliano, V. 2008. *Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products*. Journal of Cereal Science, 48, 816–820.
63. Shahidi F.,Naczki M. 1995 *Food Phenolics, sources chemistry effects applications*. Technomic Publishing Company, USA, 109-114, 171-191, 235-273, 281-313.
64. Srinivasan M., Sudheer A.R., Menon V.P., 2007. *Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property*. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 40, 92–100.
65. Stocker R. 1999 *Dietary and pharmacological antioxidants in atherosclerosis*. Curr. Opin. Lipidol. 10: 589–597.
66. Suarna, C., Hood, R. L., Dean, R. T. & Stocker, R. 1993 *Comparative antioxidant activity of tocotrienols and other natural lipid-soluble antioxidants in a homogeneous system, and in rat and human lipoproteins*. Biochim. Biophys. Acta 1166: 163–170.
67. Thompson L.U. 1994. *Antioxidant and hormone-mediated health benefits of whole grains*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 34:473-497.
68. Tudorica C.M., Kuri V., Brennan C.S. 2002. *Nutritional and physicochemical characteristics of dietary fiber enriched pasta*. J. Agric. Food Chem., 50:347-356.
69. Wasserman T., Ferrel R.E., Pence J.W., 1970. *Mechanical debranning of whole kernel wheat*. 'Engelberg and Mc Gill rice mills'. Cereal Sci. today 15, 134-138.

70. Wiseman H., Halliwell B. 1996 *Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progressive to cancer*. *Biochem. J.*, 313: 17-29.
71. Yu L., Haley S., Perret J., Harris M., Wilson J., & Qian M. 2002. *Free radical scavenging properties of wheat extracts*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1619–1624
72. Zdunczyk Z., Flis M., Zielinski H., Wroblewska M., Antoszkiewicz Z., & Juskiewicz J., 2006. *In vitro antioxidant activities of barley, husked oat, naked oat, triticale, and buckwheat wastes and their influence on the growth and biomarkers of antioxidant status in rats*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4168–4175.
73. Zhou K., Laux J. J., & Yu L. 2004. *Comparison of Swiss red wheat grain and fractions for their antioxidant properties*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1118–1123.

Ringraziamenti

Voglio dire grazie alle molte persone che in questi tre anni ed in diversi modi mi hanno aiutato e sostenuto perché sono convinta che il lavoro prende significato e valore solo quando è il risultato di collaborazioni ed interazioni umane.

Prima di tutti voglio dire grazie alla mia tutor Maria Grazia D'Egidio che mi ha dato la possibilità ed i mezzi per poter svolgere il lavoro di dottorato, la ringrazio perché mi ha fatto appassionare e conoscere più approfonditamente la tecnologia dei cereali e del frumento, per il suo supporto scientifico e la sua pazienza (soprattutto in questo ultimo periodo).

Ringrazio il Dott. Danilo Corradini, la Dott.ssa Isabella Nicoletti e la Dott.ssa Antonella De Rossi del CNR-IMC per la loro enorme disponibilità e l'indispensabile supporto per la realizzazione delle analisi cromatografiche.

Grazie anche a tutto il personale del CRA- Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali in particolare la Dott.ssa Cristina Cecchini, la Dott.ssa Daniela Sgrulletta e il Dott. Roberto Ciccoritti, la Dott.ssa Ester De Stefanis, Alessandra Arcangeli, Roberto Mortaro e Ester Gosparini, Stefano Pucciarmati, Alessandro Cammerata, il Dott. Norberto Pogna, la Dott.ssa Marina Pasquini, la Dott.ssa Laura Gazza, la Dott.ssa Angela Iori, le Dott.sse Francesca Nocente, Elena Galassi, Valentina Petrangeli, Gloria Gazzelloni, Carla Casale, il Dott. Antonio Matera, Lorian Sereni e Carla Cristofori, sia per il loro supporto scientifico o tecnico sia per il sostegno morale.

Infine ringrazio mio padre Franco e mia madre Anna per il sostegno, l'esempio di amore e il sentimento del dovere nel lavoro, mio fratello Andrea e mia cognata Serena per avermi sostenuto in questi ultimi anni caratterizzati da grandi cambiamenti.