



TESI PRESENTATA PER IL CONSEGUIMENTO
DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI

XXIII Ciclo

SSD AGR/15



***VALUTAZIONE DI COMPOSTI BIOATTIVI AD
ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE IN ALIMENTI DI
ORIGINE VEGETALE***

Tutor

Chiar.mo Prof. Gianfranco Panfili

Dottoranda

Dott.ssa Rossella Mignogna

Co-Tutor

Dott.ssa Alessandra Fratianni



TESI PRESENTATA PER IL CONSEGUIMENTO
DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI

XXIII Ciclo

SSD AGR/15

**VALUTAZIONE DI COMPOSTI BIOATTIVI AD
ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE IN ALIMENTI DI
ORIGINE VEGETALE**

Tutor

Chiar.mo Prof. Gianfranco Panfili

Co-Tutor

Dott.ssa Alessandra Fratianni

Dottoranda

Dott.ssa Rossella Mignogna
Laureata c/o Università degli Studi
del Molise, 25/10/2006

Coordinatore del Dottorato

Chiar.mo Prof. Emanuele Marconi

Commissione esaminatrice:
Prof. Salzano Giovanni
Prof. Di Luccia Aldo
Prof. Cinquanta Luciano

INDICE

RIASSUNTO	pag
SUMMARY	1
INTRODUZIONE	3
	5

Sezione I

VALUTAZIONE DELLA LUTEINA IN FRUTTA E VERDURA

Cap 1 La luteina	10
1.1 I carotenoidi	10
1.2 La luteina	15
1.2.1 Ruolo della luteina nella salute umana	19
1.2.2 Fattori che influenzano il contenuto in luteina in frutta e verdura	25
1.2.3 Biodisponibilità della luteina	29
Cap 2 La luteina in frutta e verdura	34
2.1 Generalità	34
2.2 Contenuto in luteina in frutta e verdura	36
2.3 Forme della luteina presenti in frutta e verdura	39
Cap 3 Scopo	42
Cap 4 Materiali e Metodi	43
4.1 Materiali	43
4.2 Metodi	44
4.2.1 Procedure di estrazione e determinazione della luteina	44
4.2.2 Prove di recupero	47
4.2.3 Analisi statistica	47
Cap 5 Risultati e discussioni	48
5.1 Contenuto in luteina di frutta e verdura	48
Cap 6 Conclusioni	58
Bibliografia	60

Sezione II

VALUTAZIONE DI POLIFENOLI E DELLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE IN PRODOTTI ORTOFRUTTICOLI UTILIZZATI NELLA RISTORAZIONE OSPEDALIERA

Cap 1 I polifenoli	1
1.1 Biodisponibilità e metabolismo dei polifenoli	7
1.2 Ruoli funzionali svolti dai polifenoli	9
Cap 2 I polifenoli in frutta e verdura	14
2.1 Effetto dei trattamenti tecnologici di frutta e verdura sui polifenoli	20

Sezione I

Cap 3	La ristorazione ospedaliera	25
3.1	I sistemi di ristorazione	29
3.2	I menù e le diete	32
Cap 4	Scopo	36
Cap 5	Materiali e Metodi	38
5.1	Campionamento e preparazione del campione	38
5.2	Estrazione e determinazione dei polifenoli e della capacità antiossidante	39
5.3	Analisi statistica	44
Cap 6	Risultati e discussione	45
6.1	Contenuto in polifenoli dei prodotti ortofrutticoli	45
6.2	Capacità antiossidante dei prodotti ortofrutticoli	52
6.3	Confronto tra il contenuto in polifenoli e la relativa capacità antiossidante	58
6.4	Contenuto in polifenoli e relativa capacità antiossidante per porzione di frutta e verdura	59
Cap 7	Conclusioni	62
	Bibliografia	63

Sezione III **MESSA A PUNTO DI UN'UNICA METODOCA DI ESTRAZIONE DI ANTIOSSIDANTI LIPOSOLUBILI E IDROSOLUBILI IN GRANO DURO**

Cap 1	Antiossidanti in grano duro	1
1.1.	Il grano duro	1
1.1.1	Struttura e composizione della cariosside di grano duro	2
1.2	Composti antiossidanti nel grano duro	5
1.2.1	I composti fenolici	7
1.2.2	I tococromanoli	11
1.2.3	I carotenoidi	17
Cap 2	Metodiche di estrazione e di dosaggio delle principali sostanze antiossidanti e della capacità antiossidante nel grano	21
2.1	Campionamento e preparazione del campione	21
2.2	Estrazione dei composti antiossidanti	23
2.3	Dosaggio degli antiossidanti	27
2.4	Dosaggio della capacità antiossidante	28
Cap 3	Scopo	32
Cap 4	Materiali e Metodi	33
4.1	Materiali	33
4.2	Procedure di estrazione	33

4.2.1	Estrazione degli antiossidanti liposolubili e idrosolubili in sfarinato integrale di grano duro e semola (metodo B.E.M.)	33
4.2.2	Estrazione degli antiossidanti idrosolubili in sfarinato integrale di grano duro e semola (Adom <i>et al.</i> , 2005 modificato)	35
4.2.3	Estrazione degli antiossidanti liposolubili in sfarinato integrale di grano duro e semola (Panfili <i>et al.</i> , 2003 e 2004)	37
4.3	Procedure di dosaggio	38
4.3.1	Determinazione del contenuto in antiossidanti idrosolubili in estratti di sfarinato integrale e semola mediante il Folin-Ciocalteu	38
4.3.2	Determinazione della capacità antiossidante in estratti di sfarinato integrale di grano duro e semola con il metodo TEAC	38
4.3.3	Determinazione degli antiossidanti liposolubili mediante HPLC in sfarinato integrale di grano duro e semola	40
4.3.4	Determinazione degli antiossidanti idrosolubili mediante HPLC in sfarinato integrale di grano duro e semola	40
4.4	Prove di recupero	41
4.5	Analisi statistica	41
Cap 5	Risultati e discussione	42
5.1	Prove di recupero	42
5.2	Valutazione della capacità estrattiva degli antiossidanti idrosolubili dei metodi applicati	43
5.3	Valutazione della capacità estrattiva degli antiossidanti liposolubili dei metodi applicati	48
5.4	Valutazione della capacità antiossidante della fase idrosolubile e liposolubile estratte con i metodi utilizzati	51
5.5	Valutazione della ripetibilità e della riproducibilità del B.E.M	53
Cap 6	Conclusioni	55
	Bibliografia	57
	Elenco delle pubblicazioni inerenti il dottorato	65

RIASSUNTO

Negli alimenti di origine vegetale sono naturalmente presenti alcuni *composti bioattivi*, cioè composti aventi o no valore nutrizionale e dotati di attività biologica che si esplica nel ridurre il rischio di sviluppo di numerose malattie croniche, svolgendo, quindi, una fondamentale azione protettiva sulla nostra salute. All'interno di questo gruppo di composti si inseriscono gli antiossidanti, definiti come sostanze che, in basse concentrazioni rispetto al substrato ossidabile e sotto specifiche condizioni, sono in grado di ritardare o prevenire l'ossidazione del substrato stesso.

L'importanza degli antiossidanti contenuti negli alimenti è da associare sia alla capacità di preservare la shelf-life degli alimenti, ritardando l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, sia di esplicare *in vivo*, nell'organismo umano, effetti benefici contro le malattie cronico-degenerative indotte dallo stress ossidativo e dall'età.

Sono principalmente annoverate come sostanze antiossidanti le vitamine, i polifenoli, i carotenoidi, tra cui la luteina, i sali minerali; il loro contenuto negli alimenti vegetali può essere influenzato da diversi fattori sia varietali, pedoclimatici e tecnologici.

Alla luce di queste considerazioni, l'attività di ricerca di dottorato è stata indirizzata alla valutazione dei composti bioattivi, con particolare riferimento agli antiossidanti, negli alimenti di origine vegetale, sia cereali che prodotti ortofrutticoli, sviluppandola in tre sezioni:

- la valutazione del contenuto in luteina totale di diversi prodotti ortofrutticoli e delle forme in cui può essere presente in essi, ossia luteina libera, esterificata ad acidi grassi e legata alla matrice, utilizzando una procedura analitica caratterizzata da saponificazione e successiva estrazione con solventi e analisi in HPLC, ponendo particolare attenzione alla luteina legata non considerata nei lavori di letteratura. I risultati hanno evidenziato che è opportuno applicare una metodica di saponificazione della matrice seguita da estrazione con solventi per risalire al contenuto di luteina legata, che alla luce dei risultati ottenuti è risultata una parte rilevante della luteina totale;

- la valutazione del contenuto in polifenoli e stima della relativa capacità antiossidante di prodotti ortofrutticoli diversamente trattati prelevati presso due mense ospedaliere in tempi diversi. I risultati hanno evidenziato come i prodotti ortofrutticoli somministrati negli ospedali, pur non essendo freschi ma surgelati, sono in grado di fornire un buon apporto di polifenoli e contribuire positivamente al recupero dei soggetti ospedalizzati in quanto la ristorazione ospedaliera riveste un ruolo importante sia come strumento terapeutico, sia come strumento di educazione alimentare;

- la messa a punto di una metodica di estrazione unica, valida ed affidabile di antiossidanti sia lipofili (carotenoidi e tocoli) che idrofilo (polifenoli liberi e legati), capace di estrarre contemporaneamente entrambe le frazioni (idrosolubile e liposolubile) di cereali come il grano duro, considerando che le metodiche presenti in letteratura si basano sull'estrazione separata di tali antiossidanti. Dai risultati è emerso che il metodo messo a punto ha permesso l'estrazione di entrambe le componenti, non mostrando differenze significative nella capacità estrattiva con i metodi presenti in letteratura in grado di separare singolarmente le diverse frazioni.

SUMMARY

In plant-derived products there are naturally some bioactive compounds, that is substance with or without nutritional value, having biological activity in prevention of the developing of several chronic diseases, so protecting human health. In this group there are antioxidants, molecules that, when present at low concentrations compared with those of an oxidizable substrate and under specific assay conditions, can delay or prevent oxidation of that substrate.

The importance of antioxidants in foods is connected both to the protection of the shelf-life of food, delaying polyunsaturated fatty acids oxidation, and to delaying *in vivo*, in human body, of chronic-degenerative diseases caused by oxidative stress and age.

Mainly antioxidants include vitamins, polyphenols, carotenoids, such as lutein, and minerals; whose content in plant foods can be influenced by several factors such as variety, pedoclimatic conditions and technological processes.

In the light of this considerations, the research activity of PhD is aimed at the evaluation of bioactive compounds, in particular antioxidants, in plant-derived products, both cereals and fruits and vegetables, developing in three sections:

- evaluation of lutein content of different fruits and vegetables and of forms in which it can be present in foods, like free, esterified with fatty acids and bound to matrix by using of an extraction method characterized by saponification followed by extraction with solvents and HPLC analysis, particular attention has been focused on bound lutein not estimated in literature. The obtained results confirm the needing to carry out a saponification step of vegetables matrix followed by extraction with solvents, in order to obtain the amount of lutein bound to matrix, which represents a considerable part of total lutein content;
- evaluation of polyphenol content and related antioxidant capacity of differently treated fruits and vegetables sampled in two different hospital canteens at different seasons. The obtained results demonstrated that fruits and vegetables, even deep-frozen and not fresh, provide a good contribution of polyphenols and positively contribute in recovering of hospitalized subjects;

- development of unique, valid and reliable extraction method of both lipid-soluble (carotenoids and tocopherols) and water-soluble antioxidants (free and bound polyphenols), able to extract at the same time both fractions (lipid-soluble and water-soluble) of cereals like durum wheat, considering that the literature methods separately extract these two fractions. The developed method allowed the extraction of both components of cereals, without showing significant differences in the extraction capacity as to literature methods.

INTRODUZIONE

La società moderna è orientata sempre di più verso un modello di dieta occidentale a cui spesso si associa una vita sedentaria, che comporta un aumento di obesità e di malattie associate. Una sana alimentazione, considerata come mezzo per preservare lo stato di salute del nostro organismo, prevede l'assunzione di molteplici quantità di alimenti di origine vegetale ed un limitato apporto di grassi e sale, poiché studi epidemiologici effettuati sull'uomo indicano che un'elevata assunzione di calorie si associa al rischio di andare incontro a numerose patologie croniche, mentre una dieta ricca di prodotti di origine vegetale, quali cereali, frutta e verdura, e povera di grassi esercita un ruolo di protezione.

Infatti, tali alimenti svolgono un ruolo di primaria importanza nella regolazione di diverse funzioni fisiologiche dell'organismo, in quanto in essi sono naturalmente presenti alcuni *composti bioattivi*, cioè composti aventi o no valore nutrizionale e dotati di attività biologica che si esplica nel prevenire il rischio di sviluppo di numerose malattie croniche (Cabras and Martelli, 2004) e quindi in grado di svolgere una fondamentale azione protettiva sulla nostra salute (Adom *et al.*, 2005, Ninfali and Bacchiocca, 2003; Robards, 2003). Tali benefici si raggiungono grazie all'interazione di questi "ingredienti" con una o più funzioni fisiologiche dell'organismo.

I composti bioattivi presenti negli alimenti di origine vegetale o "phytochemicals" si possono dividere in cinque categorie (Cabras and Martelli, 2004):

- Vitamine
 - Minerali
- } Composti nutritivi
- Antiossidanti
 - Fitoestrogeni
 - Fibra alimentare
- } Composti non nutritivi

Oggetto di studio della presente tesi di dottorato sono stati gli antiossidanti presenti negli alimenti di origine vegetale.

Con il termine “antiossidante” si definiscono tutte le sostanze in grado di contrastare i fenomeni ossidativi. La definizione più largamente usata è quella di Halliwell and Whiteman (2004) secondo il quale gli antiossidanti sono “sostanze che, in basse concentrazioni rispetto al substrato ossidabile, e sotto specifiche condizioni, sono in grado di ritardare o prevenire l’ossidazione del substrato stesso”.

Una sostanza ad attività antiossidante, sia essa naturalmente presente, prodotta o introdotta con la dieta, generalmente agisce sull’attività delle specie radicaliche in modo diretto, donando ad esse elettroni o atomi d’idrogeno e stabilizzandosi, al contempo, in altre forme non reattive, o in modo indiretto legando ioni metallici come il rame o il ferro coinvolti nella catalisi del meccanismo ossidativo dei lipidi (Kaur and Kapoor, 2001).

L’importanza degli antiossidanti contenuti negli alimenti è da associare sia alla capacità di preservare la shelf-life degli alimenti, ritardando l’ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, sia di esplicare *in vivo*, nell’organismo umano, effetti benefici contro le malattie cronico – degenerative indotte dallo stress ossidativo e dall’età (Shi *et al.*, 2001).

Presenti in maggiore quantità in alimenti di origine vegetale, (cereali, frutta e verdura), ma anche in carne, uova, latte e formaggi, questi composti (principalmente sali minerali, vitamine C, E, β -carotene e i carotenoidi, flavonoidi, acidi fenolici, alcaloidi, derivati della clorofilla, aminoacidi) sono in grado di agire anche se presenti in piccole quantità e molti di loro presentano anche il non trascurabile vantaggio di resistere alla cottura o ad altri trattamenti tecnologici (Kaur and Kapoor, 2001).

Gli antiossidanti dal punto di vista chimico si suddividono in:

Naturali: componenti abituali degli alimenti dove svolgono azione protettiva (composti fenolici tocoferoli, flavonoidi, acidi fenolici, composti azotati alcaloidi, derivati della clorofilla, aminoacidi, ammine, carotenoidi e acido ascorbico).

Sintetici: molecole prodotte in laboratorio e largamente impiegate nell'industria alimentare, cosmetica e farmaceutica. Rivestono particolare importanza il butilidrossianisolo (BHA) e il butilidrossitoluene (BHT).

Un'altra classificazione prende in considerazione i meccanismi d'azione degli antiossidanti e in base a questi possiamo distinguerli in antiossidanti che "interrompono i meccanismi radicalici a catena o *chain-breaking*" e in antiossidanti "preventivi" (Somogyi *et al.*, 2007).

Gli **antiossidanti chain-breaking** agiscono da inattivatori di radicali liberi donando idrogeno o trasferendo un singolo elettrone alle specie radicaliche. Sono composti che, grazie al potenziale di riduzione negativo, sono in grado di fornire ai radicali liberi gli elettroni di cui sono privi, ripristinando così l'equilibrio chimico del sistema in cui agiscono. La loro efficacia dipende dalla stabilità dei radicali nei quali si trasformano; pertanto, più efficiente è la delocalizzazione degli elettroni spaiati prodotti nella reazione con i radicali liberi, maggiore è il loro potere antiossidante.

Gli antiossidanti "chain-breaking" rimuovono le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e includono sia composti idrosolubili, come i polifenoli, la vitamina C o il glutatione, che liposolubili, come la vitamina E, i caroteni, l'acido lipoico e il coenzima Q₁₀ (Somogyi *et al.*, 2007).

Gli **antiossidanti "preventivi"** hanno molteplici meccanismi di azione, tutti coinvolti nel rallentare la velocità di ossidazione (fase di iniziazione in particolare), anche se non convertono i radicali in composti più stabili (Somogyi *et al.*, 2007). Tra questi rientrano i "metal scavengers" che prevengono la formazione di radicali liberi agendo da chelanti dei metalli (acido citrico, EDTA).

Gli antiossidanti sono ulteriormente classificabili in **idrofilo**, se sono solubili in acqua, o **idrofobo** (o **lipofilo**), se nei lipidi. In generale, gli antiossidanti idrosolubili reagiscono con gli ossidanti nel citoplasma cellulare e nel plasma, mentre quelli liposolubili proteggono le membrane cellulari dalla perossidazione lipidica.

Negli alimenti di origine vegetale (cereali e prodotti ortofrutticoli) sono principalmente annoverate come sostanze antiossidanti le vitamine sia di natura idrofila che lipofila, i polifenoli, i carotenoidi, tra cui la luteina, e i sali minerali (Nicita-Mauro and Basile, 2005). Il contenuto in antiossidanti in tali alimenti può essere influenzato da diversi fattori, come la varietà, le condizioni climatiche e colturali, maturità alla raccolta, condizioni di stoccaggio (Podsdek, 2007) e anche i processi tecnologici di conservazione (Ninfali and Bacchiocca, 2003) e tecnologici (Nicoli, 1999).

Alla luce di queste considerazioni, l'attività di ricerca di dottorato è stata indirizzata alla valutazione di composti bioattivi, con particolare riferimento agli antiossidanti, negli alimenti di origine vegetale, sia cereali che prodotti ortofrutticoli, e sviluppata in tre sezioni:

- la valutazione del contenuto in luteina totale di diversi prodotti ortofrutticoli e delle forme in cui può essere presente in frutta e vegetali, ossia luteina libera, esterificata ad acidi grassi e legata a proteine, utilizzando una procedura analitica caratterizzata da saponificazione e successiva estrazione con solventi e analisi in HPLC ponendo particolare attenzione alla luteina legata non considerata nei lavori di letteratura che applicano esclusivamente una estrazione con solventi seguita da saponificazione e analisi in HPLC;
- la valutazione del contenuto in polifenoli e stima della relativa capacità antiossidante di prodotti ortofrutticoli diversamente trattati prelevati presso due mense ospedaliere in tempi diversi, in quanto la ristorazione ospedaliera riveste un ruolo importante sia come strumento terapeutico, sia come strumento di educazione alimentare;
- la messa a punto di una metodica di estrazione unica di antiossidanti, sia lipofili che idrofili, che possa essere facile da applicare, rapida, e soprattutto capace di estrarre una buona percentuale di entrambe le frazioni (idrosolubile e liposolubile), permettendo la quantificazione della relativa attività antiossidante mediante un unico metodo di dosaggio. In particolar modo tale metodica è stata applicata ad uno sfarinato integrale di grano duro e alla relativa semola; su tali campioni sono stati determinati il contenuto in fenoli liberi e legati

(frazione idrosolubile), carotenoidi e tocoli (frazione lipofila) e la capacità antiossidante delle relative frazioni.

SEZIONE I

**VALUTAZIONE DELLA LUTEINA IN FRUTTA E
VERDURA**

CAPITOLO 1

LA LUTEINA

1.1 I CAROTENOIDI

La luteina è una xantofilla appartenente alla famiglia dei carotenoidi.

I carotenoidi devono il loro nome al carotene, una sostanza giallo-arancio trovata per la prima volta (nel 1831) nella radice di *Daucus carota*, cioè nella comune carota (www.plantamedica.it).

I carotenoidi sono importanti sia per la loro larga distribuzione, sia per la loro diversità strutturale, che per le loro diverse funzioni. Diversi studi epidemiologici, infatti, hanno dimostrato che un aumento nel consumo di alimenti ricchi in carotenoidi, come frutta e verdura, è correlato con una riduzione del rischio di sviluppo di diverse malattie cronico degenerative (Stahl and Sies, 1999, Holden *et al.*, 1999).

I carotenoidi sono un gruppo di pigmenti, di colore dal giallo all'arancio, dal rosso al violetto molto diffusi in natura, responsabili della colorazione di vegetali, frutti, fiori, radici, ma anche di invertebrati, pesci e uccelli; ricorrono anche in alghe, batteri, muffe e lieviti (Takyi, 2001).

Nelle piante e negli animali i carotenoidi si trovano sottoforma di cristalli o solidi amorfi, in soluzione in mezzo lipidico, in dispersione colloidale, o combinati con proteine. Precisamente, nei vegetali a foglia verde, i carotenoidi sono organizzati in complessi pigmento-proteina localizzati nei cloroplasti cellulari (dove il loro colore è mascherato da quello verde predominante della clorofilla); in altri vegetali e frutti le molecole sono localizzate nei cromoplasti cellulari, spesso fuse a goccioline lipidiche o legate a proteine (Takyi, 2001).

Lo scheletro della loro molecola consiste generalmente di una porzione centrale, con 22 atomi di carbonio e due terminali di 9 atomi di carbonio ciascuna. I carotenoidi sono generalmente tetraterpenoidi (C₄₀), formati da 8 unità isopreniche (C₅), collegati testa-coda, eccetto al centro

dove il legame coda-coda inverte l'ordine, dando una molecola simmetrica (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004). Le unità terminali possono essere acicliche, come nel licopene, oppure tutte e due cicliche, come nell' α e β -carotene, o una ciclica e l'altra aciclica, come nel γ -carotene (www.plantamedica.it). Le unità terminali cicliche possono essere anelli a 5 o a 6 atomi (Stahl and Sies, 1999) e possono inoltre presentare un'ampia varietà di gruppi, per esempio alcolici, chetonici, epossidici, benzenici, ecc. La combinazione di questi gruppi terminali, con l'aggiunta di gruppi funzionali contenenti ossigeno e i cambiamenti nel livello di idrogenazione, generano la maggioranza delle strutture dei carotenoidi (Figura 1).

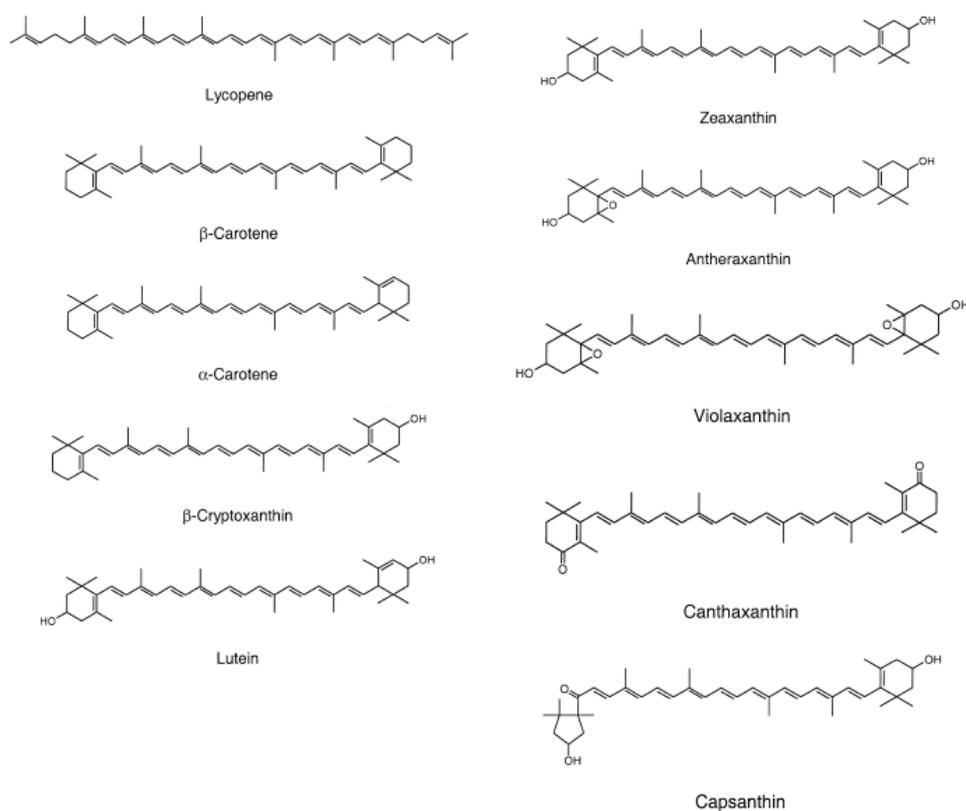


Figura 1. Alcuni esempi di struttura di carotenoidi (Oliver and Palou, 2000)

Alla famiglia dei carotenoidi appartengono:

Sezione I

CAROTENI: carotenoidi non ossigenati come ad es. β -CAROTENE, α -CAROTENE, LICOPENE e altri; a loro volta i caroteni possono essere classificati in aciclici (es. licopene), monociclici (es. gamma-carotene) e biciclici (es. α e β -carotene);

XANTOFILLE: derivati ossigenati dei caroteni come ad es. LUTEINA, ZEAXANTINA, β -CRIPTOXANTINA, ASTAXANTINA, CAPSANTINA, e altre; nei vegetali le xantofille possono trovarsi in forma libera o esterificate con acidi grassi (www.chelab.it).

Un'importante caratteristica strutturale distintiva dei carotenoidi è l'esteso sistema a doppi legami coniugati, che consiste in un alternarsi di doppi e singoli legami carbonio-carbonio (usualmente chiamato catena polienica); questa porzione della molecola costituisce il cromoforo, ed è responsabile della capacità dei carotenoidi di assorbire la luce nella regione del visibile dello spettro (Takyi, 2001). Il cromoforo assorbente la luce, quindi, dà ai carotenoidi il loro colore attrattivo e fornisce lo spettro di assorbimento visibile che serve come base per la loro identificazione e quantificazione (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004).

Sono necessari minimo sette doppi legami coniugati per impartire il colore ai carotenoidi: il fitofluene, con cinque di tali legami, è il meno colorato. Il colore si fa più intenso con l'aumentare del sistema a doppi legami coniugati, così il licopene (11 doppi legami) è rosso. La ciclizzazione causa alcune limitazioni; infatti, benché il β -carotene e l' α -carotene hanno lo stesso numero di doppi legami coniugati (11) come il licopene, essi sono, rispettivamente, di colore arancione e arancione-rosso.

L'intensità del colore nel cibo dipende da quali carotenoidi sono presenti, dalla loro concentrazione, dal loro stato fisico, così come dalla presenza o assenza di molti altri pigmenti delle piante, come la clorofilla (Takyi, 2001) e dai trattamenti tecnologici subiti.

Lo scheletro di base può essere modificato in molti modi, includendo ciclizzazione, idrogenazione, deidrogenazione, introduzione di un atomo di ossigeno, riarrangiamento, migrazione di doppi legami, isomerizzazione, riduzione o estensione delle catene o una

combinazione di questi processi, ottenendo una moltitudine di strutture (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004).

In natura i carotenoidi esistono principalmente in forme molto stabili, all-trans (o all-E), ma piccole quantità possono trovarsi come isomeri cis (o Z) (www.plantamedica.it).

I carotenoidi sono sostanze insolubili in acqua, solubili nei grassi e nei solventi dei grassi come alcool, acetone, etere etilico e cloroformio; sono rapidamente solubili in etere di petrolio ed esano, mentre le xantofille, in particolare, si dissolvono meglio in metanolo ed etanolo (Takyi, 2001). Inoltre cristallizzano facilmente e quando sono in soluzione, soprattutto in presenza di luce, ossigeno, elevate temperature e acidi vanno incontro ad ossidazione ed isomerizzazione e si trasformano in composti incolore; sono invece molto stabili quando la pressione d'ossigeno è bassa, al buio e a basse temperature. Di conseguenza per esposizione alla luce e ad altri agenti, i carotenoidi naturali, in cui i doppi legami non ciclici sono sempre nella configurazione trans, possono trasformarsi in una miscela di stereoisomeri nei quali uno o più doppi legami si sono spostati in posizione cis (isomerizzazione trans-cis).

Il sistema cromoforo è infatti responsabile oltre che del colore anche della grande instabilità dei carotenoidi, che si ossidano facilmente all'aria e in presenza di luce e che sono notevolmente modificati dalla presenza di acidi (www.plantamedica.it). Sono stati isolati e caratterizzati più di 600 carotenoidi da fonti naturali, come piante, alghe, batteri e alcuni animali; solo una frazione dei carotenoidi identificati sono stati riscontrati negli alimenti.

Importanti fonti alimentari dei carotenoidi sono i vegetali come spinaci, lattuga, broccoli, prezzemolo, carote, pomodori, zucca, peperoni, i cereali come mais, frumento e la frutta come arancia, mango, anguria, fragola, ecc. (Stahl and Sies, 1999).

Nelle matrici vegetali sono responsabili, per fare qualche esempio, della colorazione rossa dei pomodori (licopene), di quella arancio delle carote (β -carotene) e del mais (zeaxantina) e di quella gialla delle calendule (violaxantina ed auroxantina) e delle foglie autunnali (luteina).

Sezione I

Sono presenti anche nelle foglie, negli steli e nell'erba, dove il loro colore, come già detto, viene mascherato da quello della clorofilla. Infatti, il tipico colore delle foglie di molte piante caduche in autunno è dovuto alla colorazione dei carotenoidi; nelle piante superiori, infatti, questi pigmenti sono normalmente presenti in quantità inferiori rispetto alla clorofilla e in condizioni normali il colore predominante di questi vegetali è il verde. Quando però nei mesi freddi la pianta interrompe la crescita e si prepara a perdere le foglie, la clorofilla si degrada rapidamente lasciando come pigmenti predominanti i carotenoidi, che donano alle foglie il tipico colore rossastro dei mesi autunnali (www.wikipedia.it).

I carotenoidi, nelle piante, non solo partecipano alla fotosintesi, ma sono anche essenziali nella protezione delle stesse dalla grande produzione di radicali liberi che si verifica durante tale processo. Infatti prendono parte alla catena di trasporto dell'energia e proteggono il centro di reazione dall'ossidazione. Negli organismi non fotosintetici, invece, sembrano avere un ruolo importante nei meccanismi anti-ossidativi. Nei fiori e nei frutti hanno inoltre, tra le altre, una funzione di richiamo (Cultrera and Pavolini, 1965).

Alghe, funghi, batteri, e altre sorgenti naturali di carotenoidi come pomodori e fiori sono usate per isolare carotenoidi per la produzione di integratori, alimenti, e additivi alimentari (Stahl and Sies, 1999).

I carotenoidi sono stati trovati anche in molti organismi animali dove sono tuttavia presenti a livelli molto bassi: colorano il tuorlo delle uova, conferiscono colorazione rossa alla corazza delle aragoste e vari colori alle penne di numerosi uccelli; in alcuni animali costituiscono un indicatore dello stato di salute e un riferimento utile per la scelta del partner durante il corteggiamento (www.wikipedia.it). Gli animali, compreso l'uomo, non sono, però, in grado di sintetizzare questi composti e se ne riforniscono quindi dal mondo vegetale, attraverso l'alimentazione, e poi li modificano.

Alcuni di questi pigmenti, infatti, sono importanti come provitamine A: tra i 600 carotenoidi identificati, solo 50 sono precursori della vitamina A, per la presenza di un anello β -iononico

non sostituito (importante prerequisito per questa proprietà). Di particolare importanza per l'uomo è la trasformazione degli α , β e γ -caroteni, soprattutto del β -carotene, in vitamina A, a livello della mucosa intestinale, che ci permette di ottenere questa molecola indispensabile per il nostro organismo. Poiché il β -carotene possiede 2 β -anelli, può essere scisso in due molecole di retinale nella mucosa intestinale e presenta quindi la più alta attività provitaminica A (Schieber and Carle, 2005) e può essere utilizzato, quindi, come fonte di vitamina A da parte dell'organismo umano.

Molti altri carotenoidi, come il licopene, la luteina e la zeaxantina, hanno però dimostrato di possedere, in misura maggiore, proprietà altrettanto importanti, per esempio quella antiossidante (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004).

Infatti, sono stati attribuiti ai carotenoidi numerosi effetti biologici, come l'attività antiossidante, il miglioramento della risposta immunitaria, il controllo della crescita cellulare e della differenziazione (Stahl and Sies, 1999), la promozione di proprietà antinfiammatorie e antitumorali (Khachik *et al.*, 1999), la diminuzione del rischio di malattie cardiovascolari (Stahl and Sies, 1999), l'azione epitelio protettiva (Alves-Rodrigues and Shao, 2004), l'azione positiva sulla salute dell'occhio (Calvo, 2005).

1.2 LA LUTEINA

Nel 1782 un pigmento di colore giallo fu individuato nella macula da un oftalmologo milanese, Francesco Buzzi. Più di dieci anni dopo, un'osservazione simile venne fatta da Everard Home e Samuel Thomas von Soemmering. Nel 1869, Johann Ludwig Wilhelm Thudichum, chimico all'ospedale St. Thomas di Londra, trovò che parti di piante e animali contenevano una sostanza gialla cristallizzabile, che egli chiamò "luteine". Nel 1929, un nuovo carotenoide chiamato zeaxantina fu isolato dal mais e caratterizzato dal biochimico svizzero Paul Karrer. Nel 1945, George Wald osservò che il pigmento maculare negli uomini aveva lo stesso spettro di assorbimento della xantofilla cristallina delle foglie delle piante e

Sezione I

notò che erano presenti anche altre xantofille, ma a concentrazione più bassa. Con l'estrazione del pigmento giallo dalla macula umana si ottenne un carotenoide idrossilato, così Wald ipotizzò che tale pigmento fosse la luteina o la stessa xantofilla delle foglie (Semba and Dagnelie, 2003).

La luteina e il suo stereo-isomero zeaxantina fanno parte della famiglia delle xantofille. La presenza di due caratteristici gruppi idrossile, uno in ciascun anello terminale della molecola, aiuta a distinguere le xantofille dagli altri carotenoidi e inoltre gioca un ruolo critico nella loro funzione biologica (Figura 2) (Alves-Rodrigues and Shao, 2004).

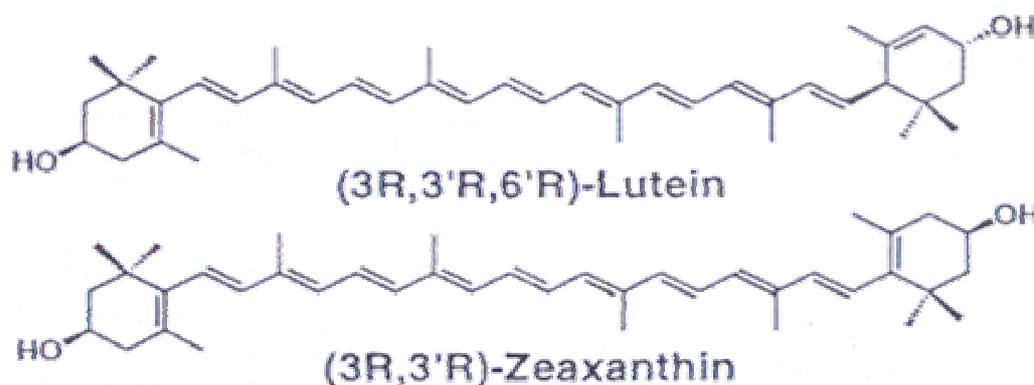


Figura 2. Struttura chimica di luteina e zeaxantina (Alves-Rodrigues and Shao, 2004)

Luteina e zeaxantina sono sintetizzate in vegetali e frutta e la loro presenza in altri alimenti è dovuta alla loro ingestione da parte degli animali.

Il pathway biosintetico per la produzione della luteina nei vegetali è mostrato nella Figura 3. Benché sia stato accertato che i vegetali contengano carotenoidi nella forma all-trans, alcuni ricercatori sono riusciti ad individuare la presenza di piccole quantità di cis-isomeri della luteina in alcuni vegetali freschi, probabilmente a causa di derivati della clorofilla che agiscono inducendo l'isomerizzazione. Gli isomeri della luteina trovati sono: 9-cis, 9'-cis, 13-cis, 13'-cis-luteina.

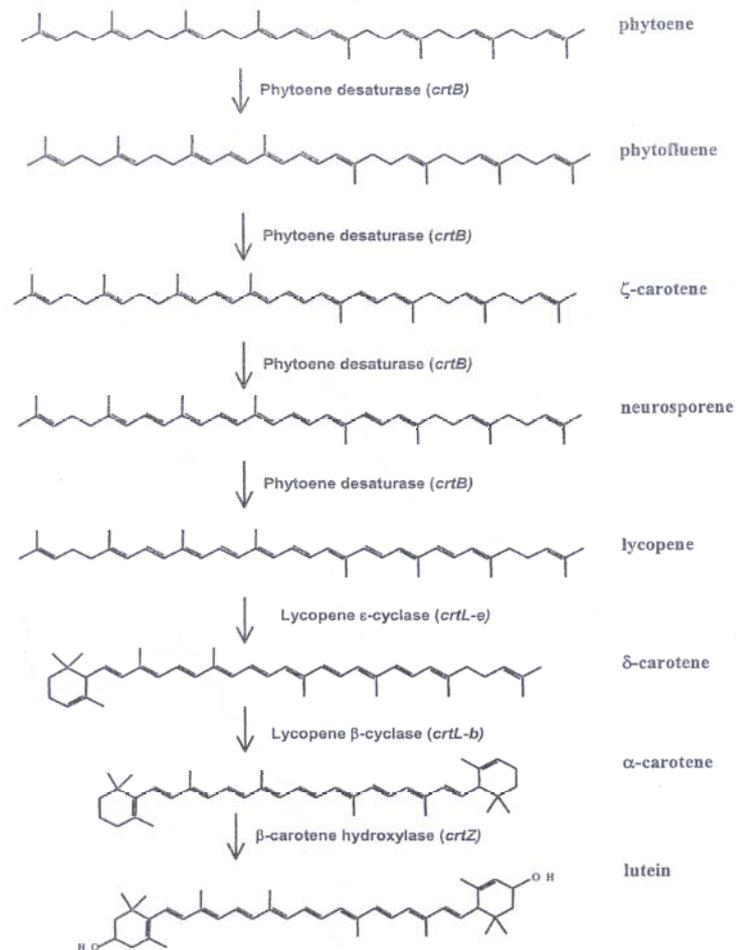


Figura 3. Pathway biosintetico per la produzione di luteina nei vegetali (Calvo, 2005)

Poiché la luteina porta, come già detto, due gruppi idrossile in ognuno dei due anelli iononici, essa può essere esterificata con acidi grassi nelle cellule delle piante, dando derivati mono- e di-acilati; generalmente è esterificata con acidi grassi a lunga catena. Inoltre la luteina, insieme ad altri carotenoidi, può essere legata a proteine formando i complessi caroteno-proteine. Nelle cellule vegetali è localizzata, come gli altri carotenoidi, nei cromoplasti o nei cloroplasti (Calvo, 2005).

Gli alimenti ricchi in luteina e zeaxantina sono i vegetali verdi come spinaci, piselli, broccoli, lattuga, prezzemolo, sedano e i prodotti di colore giallo come mais, grano duro, arance, limoni, banane, peperoni, tuorlo d'uovo e ancora si possono trovare, anche se in minor concentrazione rispetto ai precedenti, nei vegetali giallo-bianchi come zucchine, cetrioli,

Sezione I

patate, cipolle e in quelli rossi e arancio come pomodori, fragole, angurie, albicocche, zucche, carote (Calvo, 2005; Semba and Dagnelie, 2003).

Alcuni carotenoidi sono usati come pigmenti nell'industria alimentare. L'uso della luteina come colorante (E161b) è permesso dall'Unione Europea. Essa può essere usata ad esempio nelle confetture, gelatine e marmellate e in altre preparazioni di frutta analoghe, nei gelati, nei prodotti da forno fini, in bevande analcoliche aromatizzate e in prodotti della confetteria (Reg. CE n. 1333/2008).

Inoltre la luteina e altri carotenoidi come il β -carotene possono essere usati, per distinguere le diverse varietà di oli, in base ai loro differenti rapporti esistenti nelle singole varietà di olive (Calvo, 2005).

In commercio esiste la luteina purificata cristallina, il cui uso è stato associato ad un miglioramento delle funzioni visive in pazienti con malattie oculari. Negli USA essa è stata aggiunta come ingrediente supplementare di alcuni alimenti (ad esempio in cereali da colazione, crackers, yogurt e latte fermentato, succhi di frutta, zuppe in scatola, acqua imbottigliata, chewing gum) per aumentare l'intake di luteina (Alves-Rodrigues and Shao, 2004).

Secondo alcuni autori luteina e zeaxantina non soddisfano i criteri per essere considerati nutrienti essenziali, in quanto questi carotenoidi non sono richiesti per la crescita, la salute e la sopravvivenza dell'organismo e la loro assenza dalla dieta o un intake inadeguato non portano a malattie caratteristiche da carenza e morte (Semba and Dagnelie, 2003), come accade invece per le vitamine (Alves-Rodrigues and Shao, 2004). Sempre secondo questi ricercatori luteina e zeaxantina, però, soddisfano i criteri per essere considerati nutrienti condizionatamente essenziali. I tre criteri per la condizionale essenzialità sono:

- 1) declino del livello del nutriente nel plasma al di sotto di un range limite;
- 2) comparsa di anomalie chimiche, strutturali o funzionali;

- 3) correzione di entrambi attraverso un supplemento del nutriente con la dieta (Semba and Dagnelie, 2003).

Tuttavia, anche se la luteina non è considerata un nutriente essenziale, le ricerche indicano che essa è richiesta nella dieta in particolare per la salute dell'occhio e che una dieta carente in luteina può risultare in una diminuzione dell'MPD (macular pigment density) con le relative conseguenze. Inoltre il fatto che luteina e zeaxantina siano gli unici carotenoidi trovati nella macula suggerisce che esse abbiano una specifica funzione in questo tessuto. Quindi sono necessari ulteriori studi per stabilire l'essenzialità della luteina (Alves-Rodrigues and Shao, 2004).

Intanto è fortemente raccomandato l'aumento dell'assunzione di frutta e verdura per introdurre questi carotenoidi (Semba and Dagnelie, 2003).

1.2.1 Ruolo della luteina nella salute umana

È stato ipotizzato che la luteina (e il suo stereoisomero zeaxantina) gioca un ruolo simile negli uomini e nelle piante: agisce da potente antiossidante e ripara efficacemente dalla luce blu ad alta energia.

Nei vegetali la luteina funziona da antiossidante e protegge dal danno dei radicali liberi foto-indotti. La luce blu è la più alta forma di energia della luce visibile, e induce danno foto-ossidativo generando specie reattive dell'ossigeno (ROS). La luteina ha il suo picco d'assorbimento a 446 nm, che corrisponde alla lunghezza d'onda della luce blu nello spettro della luce visibile quindi, oltre a fungere da antiossidante, funge da schermo per la luce blu proteggendo le piante, mentre permette il passaggio di altre lunghezze d'onda critiche per la fotosintesi.

L'importanza di luteina e zeaxantina per l'uomo è dovuta principalmente al fatto che esse sono altamente concentrate nella macula, una piccola area della retina, e sono gli unici

Sezione I

carotenoidi presenti in questo tessuto. Inoltre, come gli altri carotenoidi, hanno anche altre importanti funzioni.

I dati disponibili indicano che l'intake di luteina in Europa è approssimativamente di 2,2mg al giorno, e in USA è di circa 1,7mg al giorno. Questi dati suggeriscono che il consumo di luteina è di gran lunga al di sotto del livello di 6-14mg al giorno, che è stato associato con una riduzione di più del 50% del rischio di malattie oculari. Questi livelli di intake inferiori sono probabilmente dovuti ad una diminuzione nel consumo di vegetali a foglia verde (Alves-Rodrigues and Shao, 2004).

Numerosi studi hanno confermato gli effetti positivi della luteina sull'uomo; tuttavia sono necessarie ancora ulteriori e più approfondite ricerche per rafforzare le conoscenze sulla luteina.

Comunque è importante sottolineare l'importanza del consumo di vegetali e frutta in generale, in cui oltre alla luteina e agli altri carotenoidi sono presenti altri composti bioattivi, che insieme possono avere effetto sinergico (Calvo, 2005).

Luteina ed effetto antiossidante

Alcuni carotenoidi sono potenti antiossidanti e svolgono un importante ruolo di difesa del nostro organismo dai radicali liberi.

Infatti, l'azione dei carotenoidi contro le malattie è stata attribuita alle proprietà antiossidanti, specificamente, alla loro capacità di spegnere l'ossigeno singoletto e interagire con i radicali liberi, che si formano durante i processi fisiologici.

I carotenoidi agiscono contro l'ossigeno molecolare allo stato di singoletto e i radicali perossidici, agendo come scavenger (Figura 4). Infatti i carotenoidi sono in grado di ricevere l'energia molecolare dell'ossigeno singoletto (1O_2) producendo ossigeno stabilizzato e caroteni allo stato eccitato, che dissipano l'energia in eccesso nel mezzo in cui si trovano.

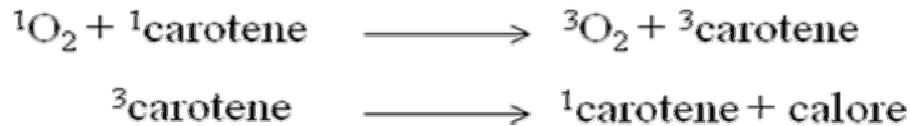


Figura 4. Meccanismo d'azione dei carotenoidi

Nel processo di spegnimento dell'ossigeno singoletto la molecola di carotenoide non è distrutta. Essa può subire ulteriori cicli di spegnimento dell'ossigeno singoletto, agendo così come un catalizzatore. Nel processo di spegnimento può avvenire, però, la sua isomerizzazione (Stahl and Sies, 1999). La capacità dei carotenoidi di spegnere l'ossigeno singoletto è stata legata al sistema di doppi legami coniugati e sembra aumentare proporzionalmente al numero dei doppi legami (Calvo, 2005). I carotenoidi con 7 o meno doppi legami non sono efficaci, a causa dell'incapacità della catena coniugata di delocalizzare gli elettroni spaiati guadagnati dall'ossigeno singoletto (Cuppert *et al.*, 1997).

La massima efficienza è stata mostrata dai carotenoidi con 9 o più doppi legami coniugati. Il licopene, carotenoide aciclico, si è dimostrato essere più efficiente rispetto al β -carotene (efficacia addirittura doppia rispetto al β -carotene), malgrado entrambi i composti posseggono 11 doppi legami coniugati (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004). Il licopene è, infatti, il più efficiente scavenger di ossigeno singoletto tra i carotenoidi biologicamente più frequenti (Stahl and Sies, 1999).

È stato inoltre dimostrato che i carotenoidi in associazione con vitamine C ed E (altre importanti molecole antiossidanti) rappresentano il meccanismo più efficiente per contrastare il deterioramento fisico indotto dai radicali liberi, cioè il risultato che deriva dalla sinergia di questi composti è superiore rispetto a quello ottenuto con gli stessi da soli.

Carotenoidi come luteina e zeaxantina, assorbendo la luce visibile e spegnendo l'ossigeno singoletto e i radicali perossidici, proteggono dai danni causati dalla luce e dall'ossigeno

Sezione I

(Semba and Dagnelie, 2003), riducendo quindi il rischio di danni causati dai radicali liberi (Calvo, 2005).

Comunque, alcuni autori, comparando l'attività antiossidante di differenti composti lipofili presenti nei vegetali, hanno mostrato che la luteina ha un'attività antiossidante più bassa rispetto al licopene, β -carotene, zeaxantina, α -carotene e criptoxantina. Inoltre, la luteina è più efficiente nello spegnimento dei radicali perossidici che in quello dell'ossigeno singoletto (Calvo, 2005).

Luteina e salute della vista

Il meccanismo della visione è legato al corretto funzionamento di particolari recettori localizzati sulla retina, la parte del bulbo oculare in grado di trasformare gli stimoli luminosi, provenienti dall'esterno, in impulsi nervosi da inviare al cervello, permettendoci di percepire l'immagine (www.plantamedica.it).

La macula lutea, di caratteristico colore giallo, è una piccola regione circolare di 5-6mm di diametro, localizzata nella parte posteriore della retina, che possiede la più alta concentrazione di recettori fotosensibili, bastoncelli e soprattutto coni, responsabili della visione centrale e dell'alta acutezza visiva. Essa contiene inoltre dei caratteristici pigmenti maculari gialli, la luteina e il suo stereoisomero zeaxantina, che sono gli unici carotenoidi presenti in questo tessuto: ciò significa che questi composti svolgono una funzione specifica (Alves-Rodrigues and Shao, 2004).

I pigmenti carotenoidi maculari, luteina e zeaxantina, funzionano innanzitutto come un filtro colorato, attraverso cui la luce passa inevitabilmente prima di colpire le cellule fotorecetrici, proteggendo i fotorecettori di questa zona, dove arrivano le terminazioni nervose del nervo ottico, dagli effetti di un'entrata massiva di luce nell'occhio.

Essi assorbono, fungendo da schermo, in modo particolare la luce blu (che sembra danneggiare la retina in misura anche 20 volte superiore rispetto alla luce rossa), proteggendo le cellule sensibili dei tessuti oculari esposti.

Neutralizzano inoltre, comportandosi da scavengers, i radicali liberi, in particolare l'ossigeno singoletto e tripletto, prodotti nella retina per fotoeccitazione e chemioeccitazione, contribuendo quindi alla protezione della retina dai danni causati dai radicali liberi, formati durante i processi metabolici della visione, ma anche a seguito di esposizioni ad agenti esterni (illuminazione artificiale, computer, inquinamento) e a causa del naturale invecchiamento cellulare. I radicali dell'ossigeno reagiscono infatti con i lipidi delle membrane cellulari, rendendole instabili: per questo i due carotenoidi con la loro attività antiradicalica, fungono anche da stabilizzatori di tali strutture.

La degenerazione maculare senile o AMD (age-related macular degeneration) è una progressiva degradazione delle strutture della macula, in particolare dei suoi fotorecettori, causata dai danni ossidativi (Calvo, 2005). Essa si manifesta come una graduale e irreversibile perdita della capacità visiva, a cominciare dalla visione notturna, ed è caratterizzata dalla incapacità sempre più marcata della visione centrale, cioè gli individui distinguono solo i contorni delle immagini ma non il loro contenuto. Questa è la principale causa di cecità irreversibile in persone al di sopra dei 65 anni; ne è stata osservata però la comparsa anche in individui di 30-40 anni, probabilmente a seguito di continui stimoli stressanti cui sono stati sottoposti gli occhi (www.plantamedica.it).

Studi condotti nel corso degli anni da diversi ricercatori, hanno dimostrato che c'è una correlazione inversa tra un aumento nel consumo di vegetali e frutta contenenti luteina e zeaxantina, o comunque introduzione di integratori di luteina, e rischio di insorgenza di AMD. Infatti, aumentando l'intake di queste due xantofille, si ha aumento della loro concentrazione nel siero e conseguentemente anche aumento della loro densità maculare o MPD (macular pigment density), con riduzione del rischio di AMD nei soggetti sani e con miglioramento o rallentamento della malattia nei soggetti già colpiti.

Un altro tessuto oculare critico per la visione è il cristallino. Il cristallino è costituito da una lente biconvessa posta dietro l'iride e avente la prerogativa di variare la propria curvatura in

Sezione I

base alla distanza dell'oggetto ed è la prima linea di difesa per l'occhio contro il danno foto-ossidativo. Anche per il cristallino gli unici carotenoidi presenti sono luteina e zeaxantina. Benché in concentrazione più bassa rispetto alla macula anche qui esse hanno funzione di schermo per la luce blu ad alta energia e funzione antiossidante.

La cataratta, altra disfunzione dell'occhio frequente tra le persone anziane, è causata dall'ossidazione foto-indotta di alcune proteine, con seguente precipitazione di queste proteine danneggiate nel cristallino. Si manifesta con presenza di opacità oculare parziale o totale. Anche per la cataratta vari studi hanno mostrato un'associazione inversa tra aumento nell'introduzione di luteina e zeaxantina e riduzione del rischio di cataratta.

Comunque i dati derivanti dai numerosi studi effettuati suggeriscono che la luteina non è importante solo contro l'AMD e la cataratta, ma gioca un ruolo importante nella salute generale dell'occhio (Alves-Rodrigues and Shao, 2004).

Insieme a luteina e zeaxantina anche il β -carotene svolge un ruolo importante nel prevenire alcuni disturbi dell'apparato visivo, essendo convertito dall'organismo in vitamina A, fondamentale nel meccanismo di visione crepuscolare.

Inoltre le vitamine C ed E possono contribuire a preservare intatte le strutture coinvolte nella dinamica della visione, contrastando la perossidazione lipidica delle membrane cellulari retiniche e facilitando l'assorbimento, l'accumulo epatico e l'utilizzazione della vitamina A stessa.

Luteina e cancro

La luteina e gli altri carotenoidi, avendo un'azione antiossidante agiscono diminuendo i danni derivanti dalle ossidazioni che avvengono anche a carico del DNA e conferiscono una più alta attività riparatrice. In vari studi scientifici effettuati nel corso degli anni l'aumento dell'intake di carotenoidi, ed anche in particolare di luteina, generalmente è stato correlato positivamente con la prevenzione di vari tipi di cancro (del polmone, della laringe, del seno, della prostata, del colon, della pelle). Inoltre secondo Molnar *et al.* (2004) alcuni carotenoidi come la luteina

non solo possono avere un effetto preventivo ma possono anche inibire l'azione di alcune particolari proteine, presenti nella maggior parte dei tumori umani, che hanno effetto farmacoresistente e che quindi sono un'importante causa dei fallimenti terapeutici (Calvo, 2005).

I risultati degli studi fin ora effettuati hanno bisogno comunque di approfondimenti, in quanto non sempre i vari studi hanno dato gli stessi risultati positivi; alcuni sono stati condotti solo su animali ed è necessario conoscere meglio gli effetti sugli uomini; è necessario esaminare i reali effetti dei singoli carotenoidi e conoscere la forma e i fattori di biodisponibilità in cui essi sono più efficaci; è necessario conoscere l'interazione con gli altri nutrienti benefici presenti nei vegetali, per capire se l'azione di questi influenza quella dei carotenoidi o viceversa (Calvo, 2005).

Luteina e malattie cardiovascolari

Uno dei segni nella patogenesi delle malattie cardiovascolari (aterosclerosi, malattie coronariche, ischemia e infarto) è l'adesione di placche aterosclerotiche sulla parete delle arterie a causa dell'ossidazione delle LDL, con relativo ispessimento.

Sono stati fatti vari studi, sia in vitro con colture di cellule di arterie, sia su topi, che su gruppi di individui tenuti sotto controllo, che hanno dimostrato che un aumento della concentrazione in particolare di luteina più che di altri carotenoidi, diminuisce il rischio di ispessimento delle pareti delle arterie; il più importante studio che è stato pubblicato a riguardo è quello di Dwyer *et al.*, (2001) (Alves-Rodrigues and Shao, 2004). Questo effetto positivo della luteina sembra essere dovuto alla sua capacità di aumentare la resistenza all'ossidazione delle LDL (low density lipoprotein), prevenendo così la formazione delle placche (Calvo, 2005).

1.2.2 Fattori che influenzano il contenuto in luteina degli alimenti di origine vegetale

La composizione qualitativa e quantitativa dei carotenoidi, e quindi anche della luteina, negli alimenti è influenzata da diversi fattori:

- specie;

Sezione I

- cultivar/varietà;
- parte dell'alimento consumato e irregolare distribuzione dei carotenoidi nell'alimento;
- stadio di maturazione;
- condizioni pedo-climatiche di produzione;
- manipolazione durante la raccolta e post-raccolta;
- tecnologie di trasformazione e conservazione (Rodriguez-Amaya, 2000).

Nei vegetali esistono differenze nel tipo e nel contenuto di carotenoidi tra le specie e, all'interno della stessa specie, tra le varietà. Per esempio sono riportate concentrazioni differenti di luteina + zeaxantina in tre specie diverse di zucca, dimostrando che esiste una relazione tra il colore giallo o arancio della zucca fresca e il contenuto di carotenoidi. Infatti le specie e le varietà di zucca analizzate che presentano un colore più giallo, mostrano un contenuto maggiore di luteina. Inoltre, esistono differenze nel contenuto di carotenoidi tra le diverse parti della pianta. In generale le foglie più esterne, la buccia di vegetali e frutti hanno più alti livelli di carotenoidi rispetto alle parti più interne. Per esempio, le foglie più esterne di un cavolo presentano un contenuto di luteina 150 volte maggiore di quello presente nelle parti più interne (Calvo, 2005).

Lo stadio di maturazione è uno dei fattori che decisamente ha effetto sulla composizione in carotenoidi (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004). Durante la maturazione ci sono cambiamenti di colore in alcuni vegetali dovuti a modifiche di alcuni componenti come i carotenoidi (Calvo, 2005). Infatti, la maturazione dei vegetali e il ripenio nei frutti sono generalmente accompagnati dalla maggiore sintesi dei carotenoidi. Per esempio i livelli di tali composti nelle foglie di lattuga e indivia aumentano di tre o quattro volte durante la maturazione. Nei frutti i carotenoidi aumentano marcatamente sia in numero che in quantità durante il ripenio (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004). I cambiamenti nell'attività fotosintetica durante la maturazione possono determinare cambiamenti nella concentrazione di luteina; tali cambiamenti differiscono a seconda del vegetale; in alcuni casi, è stato

riportato un aumento della concentrazione di luteina, mentre in altri casi è stata osservata una sua diminuzione (Calvo, 2005).

Per quanto riguarda le condizioni climatiche, in generale temperature elevate e grandi esposizioni alla luce del sole incrementano la biosintesi dei carotenoidi nei frutti. Similmente i vegetali a foglie prodotti in serre o nel terreno coperto con tetti di plastica mostrano alte concentrazioni di carotenoidi in estate. Al contrario, i livelli di carotenoidi nei vegetali a foglia coltivati in campi all'aperto sono significativamente più alti in inverno che in estate, suggerendo che la fotodegradazione prevale sull'aumento della sintesi dei carotenoidi (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004). Inoltre nelle foglie verdi di cavolo, lattuga e porro il carotenoide maggiormente predominante è il β -carotene durante l'estate e la luteina durante le altre stagioni; la variazione stagionale può essere dovuta, infatti, sia a fattori ambientali, come temperatura e radiazione solare, sia a fattori fisiologici e variare quindi nei diversi prodotti. Sono state riportate differenze anche tra stesse specie di vegetali ma coltivati in paesi diversi. Alcuni pesticidi e fertilizzanti usati in agricoltura possono influenzare il contenuto di carotenoidi nei vegetali (Calvo, 2005): in alcuni studi non si sono osservate variazioni significative nel contenuto in carotenoidi, mentre in altri si è osservata una diminuzione della concentrazione degli stessi (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004; Calvo, 2005).

La biosintesi dei carotenoidi può continuare anche dopo la raccolta, aumentando il contenuto in carotenoidi nei frutti, nei vegetali a frutto e nelle radici, purché i tessuti della pianta siano intatti, in modo da preservare gli enzimi responsabili della carotenogenesi. Nelle foglie e in altre parti di vegetali la degradazione post-raccolta dei carotenoidi può prevalere, specialmente ad alte temperature di conservazione e sotto condizioni che favoriscono l'appassimento (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004). Le condizioni di stoccaggio, in particolare, possono influenzare il contenuto di luteina negli alimenti; infatti, l'esposizione alla luce durante lo stoccaggio può portare alla degradazione della luteina. Alcuni autori

Sezione I

hanno evidenziato una perdita del 25% del contenuto in luteina degli spinaci conservati alla luce per 8 giorni, mentre non si assiste a cambiamenti se stoccati al buio (Calvo, 2005).

La maggior causa di distruzione dei carotenoidi durante la lavorazione e la conservazione è l'ossidazione enzimatica e non enzimatica.

I carotenoidi sono protettori naturali dei tessuti vegetali (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004) e come risultato della loro attività antiossidante, sono soggetti ad ossidazione, fenomeno che viene accelerato da catalizzatori organici ed inorganici e da fattori fisici come radiazioni luminose e temperatura. Pertanto una perdita rilevante di questi composti può aver luogo durante le operazioni di trasformazione tecnologica, laddove intervengono trattamenti termici e condizioni favorevoli ai processi ossidativi.

I trattamenti tecnologici a cui vengono sottoposti i vegetali comprendono trattamenti preliminari, come cernita e allontanamento di parti non edibili, lavaggio, frazionamento e trattamenti di conservazione e stabilizzazione, come congelamento, surgelazione e cottura (Cappelli and Vannucchi, 2005); inoltre tagliare, spezzettare spremere e ridurre in purea i frutti e i vegetali aumenta l'esposizione all'ossigeno e mette ulteriormente in contatto i carotenoidi con gli enzimi che ne catalizzano l'ossidazione (dando una sostanziale perdita spesso superiore a quella avuta con trattamento con calore).

Inoltre i carotenoidi hanno di per sé differente suscettibilità alla degradazione, e la loro stabilità differisce nei diversi alimenti, anche quando sono usate le stesse condizioni di lavorazione e processi. Così, le condizioni ottimali per la protezione di tali composti durante preparazioni/processi variano da un alimento all'altro (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004).

L'isomerizzazione dei trans-carotenoidi (configurazione usuale in natura) a cis-isomeri si può verificare soprattutto durante i trattamenti termici e porta ad alterazione delle loro proprietà biologiche e chimico-fisiche (stabilità, intensità di colorazione, biodisponibilità, attività pro-vitaminica, capacità antiossidante) (Schieber *et al.*, 2005; Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004).

1.2.3 Biodisponibilità della luteina

Il termine biodisponibilità può essere definito come l'insieme dei seguenti fenomeni:

- a) bioaccessibilità (disponibilità per l'assorbimento),
- b) assorbimento,
- c) distribuzione tissutale,
- d) bioattività.

Il profilo dei carotenoidi nel plasma dipende dal livello di intake nella dieta. Usando tecniche analitiche avanzate, sono stati ritrovati nel plasma e nel latte materno 34 carotenoidi, inclusi stereoisomeri, metaboliti e forme esterificate.

I composti presenti negli alimenti, per essere assorbiti, devono essere rilasciati dalla matrice alimentare ed essere accessibili all'orletto a spazzola dell'intestino tenue in una forma che può essere assimilata dagli enterociti, attraverso un sistema di diffusione passiva o di trasporto attivo.

Nello stomaco inizia il trasferimento dei carotenoidi dalla matrice vegetale alla fase lipidica del pasto (Calvo, 2005); poi i carotenoidi e le altre molecole liposolubili, dopo essere stati emulsionati dai sali biliari, sono assorbiti dalla mucosa del piccolo intestino, principalmente nel duodeno (Alves-Rodrigues and Shao, 2004), dalle micelle lipidiche (Takyi, 2001). Alcuni autori hanno dimostrato che la luteina presenta una bioaccessibilità maggiore nell'intestino tenue rispetto al β -carotene e al licopene, mentre diminuisce nell'intestino crasso (Goni *et al.*, 2006). Non sono stati individuati nell'intestino carriers o trasportatori attivi per i carotenoidi (Alves-Rodrigues and Shao, 2004), infatti l'assorbimento dei carotenoidi avviene per diffusione passiva e oscilla tra il 5 e il 50% dei carotenoidi ingeriti (Fidanza and Liguori, 1995). Con l'assorbimento i carotenoidi passano dal lume intestinale agli enterociti, dove sono incorporati nei chilomicroni e quindi raggiungono il circolo sanguigno attraverso la vena cava inferiore. Una volta raggiunti gli epatociti, i carotenoidi sono incorporati in lipoproteine. Nel corpo umano i principali carriers dei carotenoidi sono le lipoproteine a bassa densità

Sezione I

(LDL) e le lipoproteine ad alta densità (HDL). Diversamente dai carotenoidi, idrocarburi che si trovano principalmente nelle LDL, gli ossicarotenoidi più polari come luteina e zeaxantina, si trovano sia nelle LDL che nelle HDL.

Benché ci siano numerosi studi dimostranti che la luteina introdotta con la dieta è assorbita, i dati quantitativi sull'assorbimento sono scarsi. Alcuni dati indicano che la concentrazione di luteina raggiunge il picco nei chilomicroni in 2 ore e nel siero in 16 ore.

Numerosi fattori sono in grado di influenzare la biodisponibilità dei carotenoidi e quindi della luteina. Il termine "SLAMENGGHI" descrive e racchiude i fattori che influiscono sulla biodisponibilità: Species: specie di carotenoidi, Linkages: legame molecolare, Amount: contenuto in luteina nella dieta, Matrix: matrice alimentare, Effectors: effettori, Nutrient status: stato nutrizionale dell'individuo, Genetics: aspetti genetici, Host-related factor: fattori relativi all'individuo, Interactions: interazioni tra queste variabili (van het Hof *et al.*, 2000).

I legami dei carotenoidi a livello molecolare possono dare differenze nella loro biodisponibilità. Il rilascio del carotenoide da un complesso pigmento-proteina è più difficoltoso della sua liberazione da una gocciolina lipidica (Takyi, 2001). Anche la forma in cui si trova la luteina può influenzare la sua biodisponibilità: il suo legame con proteine sembrerebbe aumentarne la biodisponibilità; la luteina-estere prima di essere assorbita richiede de-esterificazione da parte di enzimi intestinali (Calvo, 2005); secondo Perez and Minguéz-Mosquera (2005) la biodisponibilità degli esteri della luteina somministrata è maggiore (62%) rispetto a quella della luteina libera. Ciò sembrerebbe dovuto alla minore solubilità della luteina libera rispetto a quella esterificata.

L'efficienza di assorbimento, per i carotenoidi in generale, diminuisce all'aumentare della loro concentrazione nella dieta. Questa relazione inversa può essere dovuta a diversi fattori, incluse la solubilità, la capacità di incorporazione all'interno delle micelle e all'interno dei chilomicroni e la loro seguente secrezione (Alves-Rodrigues and Shao, 2004). Bisogna precisare, inoltre, che la conversione della provitamina A a retinolo negli enterociti è

influenzata dalla concentrazione nel siero di retinolo: un sufficiente livello di retinolo nel siero ha un effetto inibitorio sull'enzima che converte questi carotenoidi in retinolo, mentre la carenza di vitamina A ne aumenta la conversione. Ciò non riguarda la luteina che non ha attività provitaminica A (Takyi, 2001).

Un altro fattore della dieta che influenza l'assorbimento dei carotenoidi è la digeribilità della matrice alimentare (Alves-Rodrigues and Shao, 2004). Nelle foglie verdi i carotenoidi sono organizzati in complessi pigmento-proteina localizzati nei cloroplasti cellulari; in altri vegetali e frutti, essi sono localizzati nei cromoplasti cellulari, spesso fusi a goccioline lipidiche o legati a proteine. Per diventare biodisponibile, il carotenoide deve essere liberato dalla matrice e dai suoi legami e le cellule quindi devono essere distrutte (Takyi, 2001). Alcuni autori affermano che i cloroplasti sono meno efficientemente distrutti nel tratto intestinale rispetto ai cromoplasti (van het Hof *et al.*, 2000). Anche la biodisponibilità della luteina varia significativamente in base alla natura della sua fonte. L'assorbimento di luteina da un integratore di carotenoidi (contenente luteina purificata in forma cristallina) è risultato essere quasi doppio di quello derivante da una sorgente vegetale, come gli spinaci (Alves-Rodrigues and Shao, 2004). La biodisponibilità della luteina nei vegetali a foglia verde sembra essere più bassa rispetto a quella negli altri vegetali, anche se tale differenza è meno pronunciata della biodisponibilità del β -carotene (van het Hof *et al.*, 2000). Inoltre, secondo alcuni autori, le xantofille presenti nei frutti sembrano avere una maggiore bioaccessibilità, variando dal 50% al 100% delle xantofille ingerite, rispetto alla bioaccessibilità delle xantofille presenti nei vegetali a foglia verde (spinaci e broccoli), che mostra valori compresi tra 19 e 38% (O'Connel *et al.*, 2007). Secondo lo stesso autore questo è dovuto alla diversa localizzazione dei carotenoidi e alla composizione diversa della matrice.

Tra i fattori legati alla dieta, l'interazione tra i carotenoidi ha ricevuto molta attenzione; i carotenoidi possono reagire tra loro in qualsiasi punto durante l'assorbimento, il metabolismo e il processo di trasporto. Per la luteina la maggior parte degli studi si è focalizzata sulla sua

Sezione I

interazione con il β -carotene. Alcuni studi mostrano numerose contraddizioni rispetto alla natura e all'estensione di questa interazione; altri suggeriscono che singole dosi e integrazioni di carotene a lungo termine possono inibire l'assorbimento di luteina; secondo altri ancora è la luteina ad inibire l'assorbimento del β -carotene (Alves-Rodrigues and Shao, 2004). La dieta, inoltre, visto che i carotenoidi vengono assorbiti dalle micelle lipidiche, dovrebbe apportare una quantità sufficiente e un giusto tipo di grassi per la formazione delle micelle stesse; in particolare i lipidi insaturi sono più efficienti di quelli saturi. Bisogna considerare poi che alcuni componenti degli alimenti, come la fibra, la pectina, la cellulosa, la clorofilla, possono inibire l'assorbimento dei carotenoidi.

I processi tecnologici sono un importante fattore facilitante la bioaccessibilità dei carotenoidi; la disponibilità per l'assorbimento è infatti aumentata attraverso la cottura (Alves-Rodrigues and Shao, 2004), soprattutto con un riscaldamento moderato o con la sbollentatura (Takyi, 2001) e il trasferimento dei carotenoidi in una fase lipidica durante la cottura in presenza di olio (Alves-Rodrigues and Shao, 2004); ancora è aumentata con il taglio, la riduzione in particelle, la macinazione, l'omogeneizzazione (Takyi, 2001) e la masticazione, poiché sono processi che consentono la distruzione della matrice cellulare (Alves-Rodrigues and Shao, 2004). Comunque, poiché un sostanziale trattamento della matrice può distruggere anche i carotenoidi e/o provocarne isomerizzazione, deve essere raggiunto un compromesso tra effetto distruttivo della matrice e minima distruzione e/o isomerizzazione dei carotenoidi (Takyi, 2001).

Durante la conservazione post-raccolta avvengono diversi processi fisiologici e biochimici che, in base alle condizioni di conservazione quali il tempo, la temperatura, la presenza di luce e ossigeno, possono causare modificazioni dei carotenoidi influenzando così la loro biodisponibilità.

Anche fattori strettamente relativi all'individuo possono influenzare la biodisponibilità (Takyi, 2001). Alcuni di essi sono: età, sesso, BMI (body mass index), fumo, consumo di

alcol, maldigestione e malassorbimento dei grassi, malattie del fegato e dei reni (Alves-Rodrigues and Shao, 2004), scarsa sintesi di enzimi digestivi e/o di sali biliari per fattori genetici, infezioni gastrointestinali come quella da *Helicobacter pylori* e da parassiti.

Inoltre tutti i fattori discussi possono interagire tra loro nell'influenzare la biodisponibilità.

In sintesi la biodisponibilità dei carotenoidi è influenzata da complessi e vari fattori ed è difficile da prevedere (Takyi, 2001).

Sono stati riportati risultati contraddittori sulla biodisponibilità della luteina, comunque molti di questi riportano una bassa biodisponibilità della stessa. Così alcuni autori hanno proposto l'utilizzo di integratori di luteina o la sua addizione negli alimenti (Calvo, 2005). Chiaramente sono necessarie ulteriori ricerche per meglio chiarire questo aspetto.

CAPITOLO 2

LA LUTEINA IN FRUTTA E VERDURA

2.1 GENERALITÀ

Gli ortaggi comprendono piante spesso coltivate da millenni e loro parti edibili. Negli ultimi anni, si è assistito a una netta rivalutazione dell'importanza nutrizionale di frutta e verdura. Troppo spesso assenti nei rapidi pranzi consumati fuori casa, dovrebbero invece essere inserite abitualmente nella dieta quotidiana per l'apporto in vitamine, sali minerali, fibra, acidi organici e per il senso di sazietà che conferiscono, pur con un limitato apporto calorico.

Esistono numerosi criteri di classificazione degli ortaggi: in base alla famiglia botanica di appartenenza (Solanacee, Liliacee, Composite ecc.), al nutriente più rappresentato (acquose, amidacee), alla parte della pianta utilizzata.

La composizione chimica del vegetale varia a seconda della parte edibile: le foglie sono in genere più ricche in β -carotene, ferro, e a volte, di vitamine C e del gruppo B; nei tuberi (che hanno funzione di riserva), si ritrova amido in rilevante concentrazione, così come nei semi, oltre a discrete quantità di proteine e vitamine del complesso B. Nello stesso ortaggio, la disposizione dei nutrienti non è omogenea: per esempio, la parte corticale della carota è ricca di materiali di riserva, in particolare amido, mentre al centro prevalgono lignina e suberina, con funzioni di sostegno.

L'Unione Europea ha emanato nel corso degli ultimi anni vari regolamenti inerenti norme di qualità di numerosi prodotti ortofrutticoli freschi. In particolare, per ciascuno vengono date disposizioni per:

- definizione del prodotto (varietà);
- caratteristiche minime;
- maturazione dei frutti;

- calibratura;
- categorie merceologiche: extra, prima e seconda;
- imballaggio.

A garanzia della qualità, alcuni prodotti ortofrutticoli presentano un marchio adottato dai produttori riuniti in cooperative o consorzi (Melinda, Prodotti di Puglia, Alma Verde). I consumatori riescono così a identificare subito una determinata frutta o verdura, con la garanzia di caratteristiche qualitative il più possibile costanti. Tra i marchi pubblici e privati, vi sono quelli utilizzati per gli ortofrutticoli prodotti con metodi dell'agricoltura biologica, che danno ulteriore garanzia di salubrità.

In base alla parte della pianta utilizzata nell'alimentazione, gli ortaggi si suddividono in:

1. **ortaggi da frutto** (pomodori, melanzane, peperoni e cetrioli);
2. **ortaggi da fiore** (carciofi e cavoli);
3. **ortaggi da foglia** (insalate, bietole, spinaci);
4. **ortaggi da fusto** (sedani, finocchi, asparagi);
5. **ortaggi di radice** (carote, barbabietole);
6. **ortaggi da bulbo** (aglio, cipolla, porro, scalogno);
7. **ortaggi da tubero** (patata).

Altri vegetali da considerare sono i legumi che appartengono alla famiglia delle Papilionacee. Quelli più consumati sono fagiolo, fava, pisello, cece, lenticchia, soia, arachide. Si tratta di frutti che, aprendosi a maturità in due valve, mettono in evidenza la parte edibile, cioè il seme. I legumi rappresentano una delle più importanti riserve di proteine a livello mondiale. La maggior parte dei legumi è coltivata per il contenuto proteico ed amidaceo.

I legumi possono essere consumati freschi, al momento della raccolta, surgelati, sterilizzati in scatola, oppure secchi: in tal modo si conservano molto a lungo e si trasportano facilmente.

È opportuno evidenziare la presenza di numerosi composti tossici, farmacologici e antinutrizionali quali aflatossine, lectine, fitati, inibitori di proteasi, glucosidi cianogenetici,

Sezione I

allergeni (glicoproteine a basso peso molecolare), fattori di flatulenza (oligosaccaridi) e saponine (con attività antimicrobica, antinfiammatoria, antineoplastica, ipocolesteroleinizzante) (Cappelli and Vannucchi, 2005).

Relativamente alla frutta, le tipologie presenti in commercio sono numerose e includono anche prodotti esotici che hanno reso più varia la scelta. Dal punto di vista bromatologico, si può suddividere la frutta in:

1. **acidulo-zuccherina** (mele, pere, pesche, fragole);
2. **acidula** (agrumi);
3. **zuccherina** (fichi, banane, ananas, cachi);
4. **farinosa** (castagne);
5. **oleosa** (arachidi, noci, nocciole, mandorle);
6. **frutti esotici** (kiwi, papaya, mango, avocado);

Fatta eccezione per la frutta oleosa, tutti gli altri tipi risultano avere un'elevata quantità d'acqua; minimo, invece, è il contenuto proteico e lipidico.

La frutta ha una composizione chimica affine alla verdura e, salvo eccezioni, apporta poche calorie. A differenza degli ortaggi, che sono consumati prevalentemente cotti, la frutta viene mangiata quasi sempre cruda, assicurando così l'introduzione di tutti i principi contenuti. Per poter apprezzare in pieno il suo valore nutrizionale e le sue caratteristiche organolettiche, è opportuno che la frutta venga consumata al giusto grado di maturazione; acerba è meno digeribile e può svolgere un'azione irritante per la mucosa intestinale a causa dell'eccessiva quantità di acidi organici (Cappelli and Vannucchi, 2005).

2.2 CONTENUTO IN LUTEINA IN FRUTTA E VERDURA

Gli effetti benefici del consumo di una dieta ricca in carotenoidi sono stati ampiamente documentati in letteratura (Humphries and Khachik, 2003). I carotenoidi quali luteina e zeaxantina sono presenti in molti frutti e vegetali (Updike and Schwartz, 2003) e in

bibliografia, diverse sono le pubblicazioni che riportano il contenuto di tali composti nei diversi alimenti di origine vegetale (Holden *et al.*, 1999).

In generale, la luteina è maggiormente presente nei vegetali verdi (lattuga, broccoli, prezzemolo, piselli e spinaci) rispetto ai vegetali giallastro-bianchi (cetrioli, patate, cipolle e cavolo-cappuccio), che a loro volta presentano un contenuto maggiore in luteina dei vegetali rosso-arancioni (pomodori e carote). Anche se in alcuni casi, come nelle patate, dove la concentrazione della luteina è più bassa che in altri vegetali, questo carotenoide è quello predominante (Calvo, 2005).

In Tabella 1 è riportato il contenuto in luteina di alcuni vegetali.

Tabella 1. Contenuto in luteina (mg/100g tal quale) di diversi vegetali sottoposti a differenti trattamenti (Calvo, 2005 modificata)

Campione	Trattamento	Contenuto	Fonte
Broccoli	Freschi	2,83	Khachik <i>et al.</i> , 1992b
	Cotti a vapore (5 min)	3,25	Khachik <i>et al.</i> , 1992b
	Microonde (5 min)	3,28	Khachik <i>et al.</i> , 1992b
	Freschi	1,61	Hart and Scott, 1995
	Cotti	1,95	Hart and Scott, 1995
	Freschi	2,36	Huck <i>et al.</i> , 2000
	Freschi	1,51	Humphries and Khachik, 2003
	Freschi	8,36 ^b	Updike and Schwartz, 2003
	Bolliti (5-15 min)	0,31-0,35	Sà and Rodriguez-Amaya, 2003
Piselli	Congelati	1,63	Hart and Scott, 1995
	Cotti	1,02	Hart and Scott, 1995
	Freschi	0,47-0,99	De la Cruz-Garcia, 1997
	Bolliti (30 min)	1,61-2,50	De la Cruz-Garcia, 1997
	Freschi	1,3	Edelenbos <i>et al.</i> , 2001
	Bolliti (3 min)	1,8	Edelenbos <i>et al.</i> , 2001
	In scatola	0,7	Humphries and Khachik, 2003
	Freschi	4,1 ^b	Updike and Schwartz, 2003
	In scatola	5,8 ^b	Updike and Schwartz, 2003

Sezione I

Zucchine	Fresche	0,13	Hart and Scott, 1995
	Cotte	0,14	Hart and Scott, 1995
	Cotte con la buccia	1,36	Perry <i>et al.</i> , 2009
Mela	Fresca	0,084	Hart and Scott, 1995
Prezzemolo	Fresco	4,33	Perry <i>et al.</i> , 2009
	Fresco	13,78	Muller, 1997
	Liofilizzato	0,15 ^b	Ben-Amotz and Fishler, 1998
	Fresco	10,82	Humphries and Khachik, 2003
Spinaci	Freschi	4,18	Tee and Lim, 1991
	Freschi	4,22	Granado <i>et al.</i> , 1992
	Bolliti (10 min)	6,42	Granado <i>et al.</i> , 1992
	Freschi	3,92	Huck <i>et al.</i> , 1992
	Freschi	9,50	Khachik <i>et al.</i> , 1992b
	Microonde (1,5 min)	0,71	Khachik <i>et al.</i> , 1992b
	Cotti a vapore (3 min)	0,61	Khachik <i>et al.</i> , 1992b
	Crudi	5,87	Hart and Scott, 1995
	Cotti	7,41	Hart and Scott, 1995
	In scatola	92,3 ^b	Konings and Roomans, 1997
	Freschi	9,54	Muller, 1997
	Freschi	5,0b	Humphries and Khachik, 2003
	Freschi	88,1 ^b	Updike and Schwartz, 2003
	Sedano	Fresco	0,00
0,232			Holden <i>et al.</i> , 1999

^b: mg/100g di sostanza secca

Le concentrazioni di luteina riportate in Tabella differiscono tra loro sia perché sono tratte da diversi autori, sia perché i prodotti sono sottoposti a diversi trattamenti; possono sussistere, inoltre, differenze per lo stesso prodotto dovute a fattori quali cultivar, varietà, stadio di maturazione, raccolta effettuata in diversi periodi dell'anno, paese di coltivazione, parte della pianta utilizzata, acquisto in diverse località, nonché variabilità nelle procedure analitiche di estrazione e di determinazione del composto. La Tabella riporta anche il contenuto in luteina dei vegetali sottoposti a diversi trattamenti termici: come già precisato nel capitolo 2, ci sono

informazioni contraddittorie sull'effetto dei trattamenti termici sulla concentrazione della luteina nei vegetali (Calvo, 2005).

Un contenuto ridotto in luteina della lattuga, in confronto agli altri vegetali verdi è stato attribuito parzialmente alla presenza di lactucaxantina, che è stata trovata solo in un ristretto gruppo tassonomico di piante e può sostituire la luteina nel ciclo delle xantofille nel pathway fotosintetico. Il valore nutrizionale della lactucaxantina non è al momento conosciuto, benché questo carotenoide sia stato identificato nel siero umano e nella retina a basse concentrazioni (Humphries and Khachik, 2003).

Nella Tabella il contenuto in luteina del sedano è pari a zero, tuttavia alcuni autori (Holden *et al.*, 1999) riportano un contenuto in luteina+zeaxantina pari a 0,232mg/100g di parte edibile.

2.3 FORME DELLA LUTEINA PRESENTI IN FRUTTA E VERDURA

Diversi studi scientifici hanno evidenziato la presenza della luteina negli alimenti prevalentemente nella forma trans, tuttavia fattori come luce, temperatura ecc, possono indurre l'isomerizzazione della luteina e determinare la presenza di cis isomeri, quali 9-cis, 9'-cis, 13-cis e 13'-cis (Calvo, 2005). Tuttavia, la luteina può essere presente anche nella forma libera, esterificata ad acidi grassi (luteina estraibile in solventi organici) o legata alla matrice, in particolar modo alle proteine (luteina non estraibile con solventi). Infatti nei vegetali a foglia verde i carotenoidi sono organizzati in complessi pigmento-proteina localizzati nei cloroplasti cellulari, mentre in altri vegetali e nei frutti sono presenti nei cromoplasti fusi a goccioline lipidiche o legati a proteine (Takyi, 2001). È stato riportato che i complessi caroteni-proteine possono incrementare la biodisponibilità dei carotenoidi, anche se in modo marginale perché il contenuto di carotenoidi legati a proteine è basso (Calvo, 2005). Inoltre i carotenoidi possono anche essere legati alla fibra alimentare della matrice vegetale (Hervert-Hernandez *et al.*, 2010). Sia la luteina libera che esterificata ad acidi grassi può essere determinata analiticamente per estrazione con solventi organici e successiva

Sezione I

saponificazione dell'estratto, mentre quella legata alla matrice richiede una procedura di saponificazione del residuo dell'estrazione.

Vista la presenza di un gruppo idrossilico su ognuno degli anelli della luteina, questa può essere esterificata ad acidi grassi nelle cellule delle piante, generando mono e diacil-derivati: solitamente è esterificata ad acidi grassi a lunga catena.

Sebbene non frequentemente, piccole quantità di diesteri della luteina si trovano nella frazione di carotenoidi di diversi frutti e vegetali.

Sono stati condotti pochi studi scientifici sugli esteri della luteina presenti in frutti e vegetali; questo perché solitamente gli studi sul contenuto di questa sostanza riguardano anche altri carotenoidi.

In alcune specie di piante superiori, vi è la necessità di conoscere meglio le reazioni biochimiche coinvolte nella formazione degli esteri dei carotenoidi nelle piante e, allo stesso modo, individuare gli enzimi implicati in tali reazioni. Ciò è importante in quanto gli esteri della luteina potrebbero avere effetti benefici sulla salute umana; per esempio, è stato notato che quando la luteina è stata isolata dalla pianta, essa è biologicamente attiva in ambedue le forme, vale a dire quella libera ed esterificata (Calvo, 2005).

Le vie ed i meccanismi di questo processo di esterificazione non sono conosciuti, sebbene sia stato supposto che le xantofille vengano esterificate tramite l'acil coenzima A. Tramite l'esterificazione, il sistema metabolico della pianta, che è associato con specifici obiettivi per la pianta stessa, incrementa la liposolubilità delle xantofille. Infatti, l'esterificazione è connessa con la senescenza della pianta e il ripenio del frutto, durante il quale prende posto la degradazione della clorofilla, la scomparsa dei cloroplasti e la generazione dei cromoplasti. Le membrane dei tilacoidi sono distrutte e il contenuto è liberato nello stroma, dove i carotenoidi sono più solubili quando esterificati. Inoltre, gli enzimi coinvolti nella biosintesi dei carotenoidi sono legati a membrane; così, una più alta liposolubilità facilita la biogenesi dei carotenoidi dai loro composti d'origine. Infine, la natura lipofila delle xantofille aiuta

l'accumulo di tali composti in plastoglobuli ricchi in grasso, incrementandone la capacità colorante.

Anche se l'esterificazione non cambia le proprietà del cromoforo dei carotenoidi, può modificare, come già detto, la liposolubilità della luteina e altre attività chimiche, dipendendo dal tipo di acido grasso legato alla xantofilla. L'efficienza dell'azione antiossidante è legata alla presenza di acidi grassi saturi o insaturi legati ai carotenoidi, poiché il legame con acidi grassi polinsaturi potrebbe determinare un potenziale antiossidante minore rispetto alla forma libera. Ciò non è dovuto al fatto che il gruppo idrossilico, coinvolto nel legame estereo, non partecipa ai meccanismi antiossidanti, ma all'aumento del potenziale pro-ossidante dell'ambiente cellulare. Quando, invece, gli acidi grassi saturi sono legati alle xantofille, l'attività antiossidante è simile a quella mostrata dalle corrispondenti forme libere.

I più comuni frutti e vegetali che contengono xantofille esterificate sono la mela (*Malus domestica* Borkh), albicocca (*Prunus armeniaca* L), avocado (*Persea americana* Mill), chili (*Capsicum frutescens* L), clementine (*Citrus reticulata* Blanco), mango (*Mangifera indica* L), arancia (*Citrus sinensis* Pers), papaya (*Carica papaya* L), pesca (*Prunus persica* L), pepe giallo e rosso (*Capsicum annuum* L), patata (*Solanum tuberosum* L) e zucca (*Cucurbita pepo* L). Tra frutti e vegetali che non contengono xantofille esterificate vi sono la banana (*Musa paradisiaca* L), broccoli (*Brassica oleracea* L), carota (*Daucus carota* L), frumento (*Zea mays* L), limone (*Citrus limon* L), spinacio (*Spinacia oleracea* L) e pomodoro (*Lycopersicon esculentum*).

Visto il notevole contributo delle xantofille esterificate alla dieta, si è avuto un incremento dell'interesse riguardo possibili modificazioni del comportamento chimico di questi carotenoidi ed il loro assorbimento nell'organismo umano (Pérez-Galvez and Minguez-Mosquera, 2005).

CAPITOLO 3

SCOPO

Da studi di letteratura è emerso che la luteina è presente nei vegetali a foglia verde e gialli (spinaci, lattuga, broccoli, prezzemolo, piselli, zucca, cetriolo) (Calvo, 2005) e nei frutti come mango, arancia, anguria (Stahl and Sies, 1999). Di solito la luteina è presente nei prodotti ortofrutticoli nella forma libera, esterificata ad acidi grassi (luteina estraibile con solventi), ma può essere anche legata a proteine a formare pigmento caroteni-proteina (luteina non estraibile) (Calvo, 2005). Questo legame può influenzare la biodisponibilità e l'attività della luteina. Per determinare sia la luteina esterificata che la luteina legata, è necessario applicare una procedura di saponificazione per idrolizzare tali legami. Tuttavia, in letteratura, gli studi scientifici volti a valutare il contenuto in luteina dei campioni ortofrutticoli applica una estrazione con solventi seguita da saponificazione e determinazione cromatografica, determinando la luteina esterificata e non quella legata alla matrice.

Alla luce di tali premesse, l'obiettivo di questa attività è stata la valutazione del contenuto in luteina totale e delle forme in cui può essere presente (legata, esterificata e libera) di differenti prodotti ortofrutticoli ponendo particolare attenzione alla luteina legata non considerata nei lavori di letteratura. Di conseguenza, un metodo precedentemente messo a punto per l'estrazione e determinazione dei carotenoidi da campioni cerealicoli è stato utilizzato per la determinazione delle diverse forme di luteina in frutta e verdura. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti utilizzando un metodo già presente in letteratura per la determinazione della forma libera ed esterificata.

CAPITOLO 4

MATERIALI E METODI

4.1 MATERIALI

I prodotti ortofrutticoli utilizzati per le prove sperimentali sono stati scelti tenendo conto dei dati riportati in letteratura ed acquistati presso diversi rivenditori locali. Tre campioni per ogni alimento sono stati analizzati a seconda delle esigenze e della disponibilità. Gli alimenti analizzati sono stati i seguenti:

- Prezzemolo (*Petroselinum crispum* L.);
- Lattuga Romana (*Lactuca sativa* L.);
- Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*);
- Sedano (*Apium graveolens* L. var. *dulce*);
- Piselli (*Pisum sativum* var. *sativum*)
- Spinaci (*Spinacia oleracea* L.);
- Zucchine (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*)
- Mela (*Malus domestica*).

I campioni considerati sono stati trattati immediatamente dopo l'acquisto.

Per ogni campione è stata effettuata una selezione eliminando le parti più esterne e quelle danneggiate o che presentavano una colorazione brunastra. Si è proceduto al lavaggio e all'asciugatura delle parti considerate. I campioni, singolarmente, sono stati prima tritati con le forbici, poi pestati in mortaio con aggiunta di azoto liquido e, se necessario, è stata eseguita anche una veloce triturazione al macinino. Le procedure di preparazione sono state effettuate al riparo dalla luce al fine di prevenire l'isomerizzazione e la fotodegradazione dei carotenoidi.

Sezione I

I campioni triturati sono stati conservati in congelatore e sottoposti alla determinazione della luteina. Ogni determinazione è stata eseguita in triplo.

4.2 METODI

4.2.1 Procedure di estrazione e determinazione della luteina

Estrazione della luteina da vegetali secondo il metodo di Panfili *et al.*, (2004)

Determinazione della luteina totale: la luteina totale è stata estratta mediante saponificazione a caldo ed estrazione con solvente secondo la metodica riportata da Panfili *et al.*, (2004).

Si pesano esattamente 2,0g di campione in provette Pyrex con tappo a vite. Nel caso di campioni di spinaci, si pesa esattamente 1g. A quest'aliquota si aggiungono:

- 10 palline di vetro, per evitare un'ebollizione tumultuosa;
- 5ml di pirogallolo etanologico al 6%, per evitare l'ossidazione dei carotenoidi;
- 3ml di etanolo al 95%,
- 1ml di NaCl all'1%;
- 2ml di KOH al 60%, per la saponificazione;
- si insuffla azoto per 45 secondi, per eliminare l'ossigeno presente;
- si agitano i tubi tappati su vortex;
- si pongono i tubi tappati a bagnomaria a 70°C per 45 minuti, per favorire la saponificazione del campione; i tubi vengono agitati ogni 5-10 minuti;
- dopo la saponificazione si fanno raffreddare i tubi in un bagno di ghiaccio;
- si procede aggiungendo 15ml di NaCl all'1%, per prevenire la formazione di emulsioni e favorire la separazione delle fasi nel sistema di estrazione;
- la sospensione è estratta con diverse porzioni di 15ml di una soluzione di n-esano:etilacetato (9:1), fino ad assenza di colore;
- la fase organica raccolta è portata a secco con evaporatore rotante;

- l'estratto è solubilizzato con 2ml di una soluzione di alcool isopropilico al 10% in esano per HPLC; se necessario è possibile recuperare con più ml di fase mobile, fino a che il pallone di raccolta risulta incolore.

Il campione limpido o eventualmente filtrato, è pronto per essere iniettato in HPLC.

Per la determinazione delle diverse forme di luteina sono state apportate alcune modifiche al protocollo.

Determinazione della luteina libera: la luteina libera è stata estratta mediante la procedura senza saponificazione seguita da estrazione con solventi. Tale metodica è uguale a quella dell'estrazione con saponificazione, eccetto che per i 2ml di idrossido di potassio (KOH) al 60%, addizionati alla miscela estraente, che sono invece sostituiti con 2 ml di acqua distillata. Un'aliquota di quest'estratto (pari a circa 0,2g di campione) è stata portata a secco tramite evaporatore rotante e solubilizzata con 2ml di una soluzione di alcool isopropilico al 10% in esano per HPLC; o se necessario con più ml di soluzione, fino a che il pallone di raccolta risulta incolore.

Determinazione della luteina esterificata: sul rimanente estratto (pari a circa 1,8g di campione) di cui al paragrafo precedente, viene effettuata una procedura di estrazione a freddo, eseguita allo stesso modo di quella della saponificazione a caldo, tranne che per il passaggio in bagnomaria a 70°C, che è stato eliminato lasciando i tubi a temperatura ambiente per lo stesso periodo di tempo (45min). In questo modo otterremo un estratto che è la somma della luteina libera ed esterificata (indicata con il termine di luteina lipidica). La differenza tra tale somma e la luteina libera dà il contenuto in luteina esterificata.

Determinazione della luteina legata: la differenza tra il valore della luteina totale e luteina lipidica dà il valore di luteina legata presente nel campione ortofruitticolo.

Estrazione della luteina in vegetali secondo il metodo di Updike and Schwartz (2003)

Il metodo di confronto considerato per l'estrazione dei carotenoidi, con particolare attenzione alla luteina, è stato quello di Updike and Schwartz (2003) che prevede una estrazione con

Sezione I

solventi e successiva saponificazione seguita dall'analisi cromatografica. Il protocollo originario è stato modificato aggiungendo il pirogallolo come antiossidante, nella stessa concentrazione aggiunta nel Panfili *et al.* (2004), per rendere i due metodi confrontabili. Il protocollo adottato è il seguente:

- si pesano 2g di campione in tubi da idrolisi alcalina;
- si aggiungono:
 - 1g di Carbonato di Calcio
 - 4g di Celite
 - 50ml di Acetone
 - 5,4ml di Pirogallolo al 55% in Etanolo;
- si miscela per 1min all'agitatore, si omogeneizza con Ultraturrax in ghiaccio per un altro minuto e si attende la separazione delle fasi;
- si recupera la fase superiore e si filtra con filtri di carta Whatman n.1 e successivamente con filtri Whatman n.42;
- si riestrae il residuo con altri 50mL di acetone, si miscela per 1min e si omogeneizza per un altro minuto, si recupera e si filtra come sopra. L'estrazione con acetone è ripetuta fino a quando il residuo è incolore. Generalmente sono sufficienti due estrazioni;
- si aggiungono altri 5,4ml di Pirogallolo al 55% in etanolo agli estratti filtrati;
- si aggiungono 75ml di una soluzione di idrossido di potassio metanolica (KOH) al 30% (w/v) a temperatura ambiente per 30min sotto agitazione costante al fine di saponificare e allontanare la clorofilla;
- si aggiungono 50mL di una soluzione di esano:dietiletere (70:30 v/v) dopo lavaggio con acqua deionizzata fino a separazione delle fasi;
- si raccoglie la fase organica contenente i carotenoidi. Questa procedura di estrazione è ripetuta fino a che la fase organica è incolore;

- si filtra la fase organica separata attraverso sodio solfato anidro per rimuovere l'acqua e si raccoglie in un pallone;
- si porta a secco e si recupera con 2ml di alcool isopropilico al 10% in esano per HPLC. Anche in questo caso sono stati utilizzati più ml di fase mobile.

Determinazione dei carotenoidi mediante cromatografia liquida ad alta prestazione

(HPLC)

Per la determinazione cromatografica del contenuto in carotenoidi è stato utilizzato un HPLC Dionex, costituito da una pompa P680, un loop da 25 µL e un rivelatore UVD 170U, utilizzando una colonna in silice Kromasil Phenomenex (5µm I.D., 4,6 * 250 mm), in condizioni isocratiche, con un flusso di 1,5 mL/min, utilizzando come fase mobile una soluzione di n-esano-isopropilico al 5% (v/v) per una durata di 20 minuti, impostando allo spettrofotometro una lunghezza d'onda pari a 450nm (Panfili *et al.*, 2004). L'elaborazione dei dati è stata effettuata tramite software Chromeleon versione 6.6 della Dionex. L'analisi qualitativa e quantitativa è stata effettuata tramite standard esterni.

4.2.2 Prove di recupero

Per verificare la validità del metodo di estrazione della luteina (Panfili *et al.*, 2004) è stata effettuata una prova di recupero aggiungendo 40µg di una soluzione standard di luteina (100µg/ml) su un campione di sedano. Il campione è stato sottoposto in triplo all'intera procedura di saponificazione, estrazione e determinazione cromatografica.

4.2.3 Analisi statistica

Sui risultati ottenuti è stata applicata un'analisi della varianza con il test di Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$) al fine di valutare la significatività dei dati.

CAPITOLO 5

RISULTATI E DISCUSSIONE

Preliminarmente all'esecuzione delle analisi sui campioni di frutta e verdura, è stata effettuata un'attenta ricerca bibliografica volta a valutare i prodotti ortofrutticoli con il maggiore contenuto in luteina, nonché i metodi di estrazione utilizzati per la sua determinazione. Da questa analisi sono stati individuati i campioni di frutta e verdura che hanno il contenuto in luteina maggiore (spinaci, prezzemolo, lattuga, piselli, broccoli, sedano, zucchine, mela). Relativamente ai metodi di estrazione è emerso che le procedure di estrazione di analiti da alimenti comportano l'uso di vari tipi di solventi, combinazioni di solventi e procedure. Inizialmente i metodi presi in considerazione per lo scopo della tesi, sono stati quelli riportati da Khachik *et al.*, (1986), Taungbodhitham *et al.*, (1998), Granado *et al.*, (2001), Humphries and Khachik, (2003) e Updike and Schwartz, (2003). Quest'ultimo è stato scelto come metodo di confronto in quanto richiede rispetto agli altri, tempi di analisi minori, solventi meno tossici e mostra fasi e solventi simili e confrontabili al metodo di estrazione di Panfili *et al.*, (2004).

5.1 CONTENUTO IN LUTEINA DI FRUTTA E VERDURA

La Figura 5 mostra un tipico cromatogramma HPLC di uno standard di luteina e di un campione di vegetali.

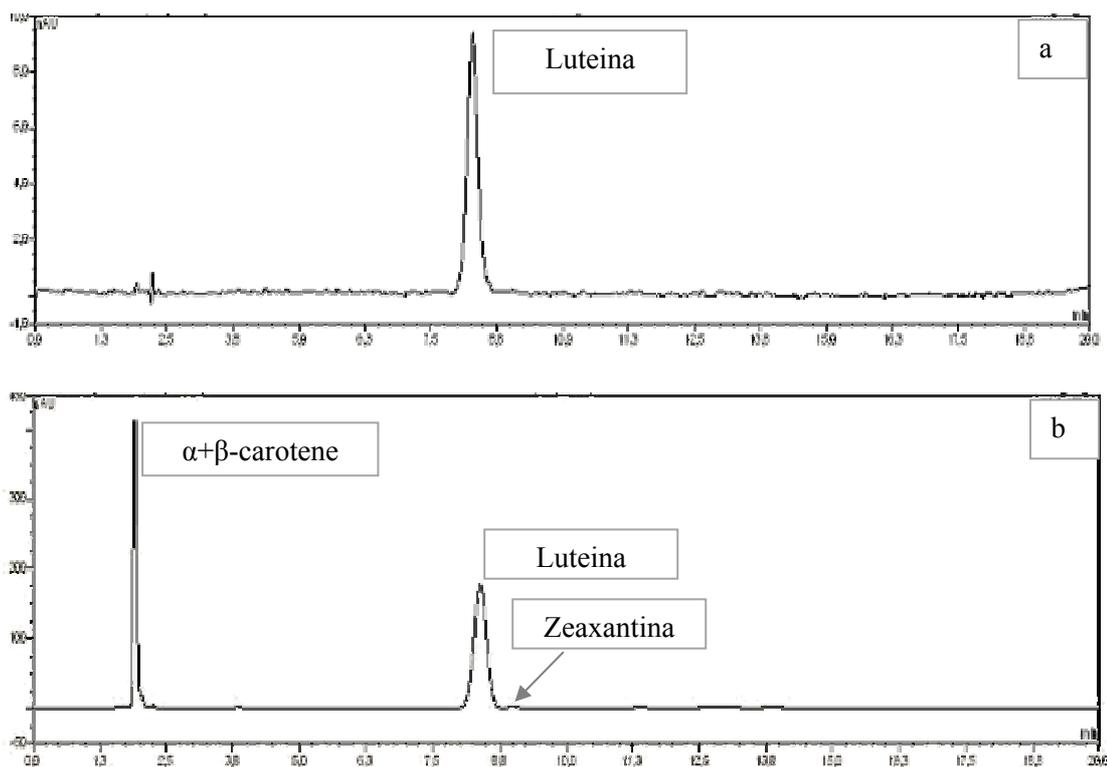


Figura 5. Cromatogrammi HPLC di uno standard di luteina (a) e di carotenoidi di un campione vegetale (b)

Inizialmente è stata applicata una modifica al metodo di estrazione di Updike su un campione di prezzemolo, effettuando un' estrazione in assenza di antiossidante (come prevede il protocollo originario) e una con aggiunta di antiossidante (per poterlo confrontare con il metodo di estrazione di Panfili *et al.*, (2004)); l'antiossidante aggiunto è lo stesso utilizzato nella metodica estrattiva di Panfili e nella stessa concentrazione (pirogallolo).

Nella Tabella 2 sono riportati i valori di luteina lipidica espressi come mg/Kg su sostanza fresca in un campione di prezzemolo estratto con il metodo Updike con aggiunta di antiossidante (Updike+pirogallolo) e con il metodo originario Updike senza antiossidante (Updike senza pirogallolo).

Tabella 2. Tenore in luteina lipidica (mg/Kg s.f.) in un campione di prezzemolo (media \pm DS di tre determinazioni)

	Luteina	CV%
Metodo Updike+pirogallolo	79,0 \pm 5,76 ^a	7,3
Metodo Updike senza pirogallolo	50,6 \pm 3,59 ^b	7,1

^{a,b} Differenti lettere indicano differenze significative ($p < 0,05$)

Dall'analisi della Tabella 2 si evince come il metodo Updike con aggiunta di antiossidante estrae di più rispetto al metodo Updike senza antiossidante ($p < 0,05$), in quanto il pirogallolo svolge la sua funzione di protezione nei confronti dei carotenoidi durante la fase di estrazione evitando così la degradazione di tali composti. Per tale motivo, tutte le estrazioni della luteina con il metodo Updike successive sono state eseguite con aggiunta di pirogallolo.

La Tabella 3 riporta il contenuto in luteina lipidica (luteina libera e esterificata) dei differenti vegetali estratta con il metodo di Panfili *et al.* (2004). I valori sono comparati con quelli ottenuti con il metodo di confronto di Updike and Schwartz (2003). Non si osservano differenze significative nei valori di luteina lipidica estratta con i due metodi ($p > 0,05$).

Tabella 3. Contenuto in luteina lipidica di differenti vegetali estratta con i due metodi testati (mg/Kg s.f.) (media \pm DS di tre determinazioni).

	Luteina lipidica	
	Panfili <i>et al.</i>, (2004)	Updike and Schwartz, (2003)
Spinaci	57,8 \pm 0,34 ^a	64,6 \pm 5,24 ^a
Prezzemolo	83,9 \pm 0,06 ^a	85,5 \pm 0,90 ^a
Broccoli	14,0 \pm 1,25 ^a	13,9 \pm 0,30 ^a
Lattuga	10,2 \pm 0,92 ^a	12,4 \pm 1,87 ^a
Sedano	2,0 \pm 0,15 ^a	2,2 \pm 0,01 ^a
Piselli	7,1 \pm 0,00 ^a	8,4 \pm 1,06 ^a

^aDifferenti lettere nello stesso campione indicano differenze significative ($p < 0,05$)

Allo scopo di verificare la validità del metodo Panfili *et al.*, (2004) è stata effettuata una prova di recupero su un campione di sedano soggetto all'intera procedura di saponificazione e estrazione. La Tabella 4 riporta i risultati ottenuti. Si può osservare un recupero quantitativo di luteina pari al 95% con una buona ripetibilità (CV%=3,2). Tale dato dimostra che la procedura di saponificazione non porta ad una perdita o distruzione elevata di carotenoidi e può essere applicata per la determinazione della luteina in frutta e verdura, contrariamente a quanto riportato in letteratura che propone di evitare il passaggio di saponificazione, ove possibile, per evitare perdite di luteina (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004).

Tabella 4. Valori di recupero di luteina aggiunta ad un campione di sedano (media±DS di tre determinazioni)

	Teorica (naturale+aggiunta)	Trovata	Recupero
	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(%)
Luteina	23,9	22,7±0,89	95,0±3,02

Alla luce di tali risultati il metodo Panfili *et al.*, (2004) (saponificazione della matrice e estrazione con solventi) è stato utilizzato per la determinazione della luteina totale e, mediante opportune modifiche (come indicato al punto 4.2.1) delle diverse forme in cui la luteina può essere presente nei prodotti ortofrutticoli (luteina libera, esterificata e legata) in diversi campioni ortofrutticoli per avere un maggiore screening del contenuto in luteina.

La Tabella 5 riporta i risultati relativi al contenuto in luteina totale dei campioni di frutta e verdura analizzati, espressi come media di tre determinazioni dello stesso campione, media di tre campioni, coefficiente di variazione e valore minimo e massimo.

Il contenuto in luteina totale va da un minimo di 0,20 mg/Kg della mela ad un massimo di 148,77 mg/Kg del prezzemolo. I valori trovati sono in accordo con i dati di letteratura (Perry *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2009; Calvo 2005). Considerando il valore medio dei tre campioni analizzati, il prezzemolo e gli spinaci presentano il maggiore contenuto in luteina totale

Sezione I

(137,09 e 101,00 mg/Kg, rispettivamente) seguiti dai broccoli (20,83 mg/Kg), dalle zucchine (13,47 mg/Kg) e dai piselli (11,23 mg/Kg). Il sedano e la mela presentano i valori in luteina totale più bassi (3,11 mg/Kg e 0,22 mg/Kg, rispettivamente). Nell'ambito dello stesso prodotto ortofrutticolo, la variabilità, espressa dal CV% tra il contenuto in luteina dei tre campioni analizzati, rientra nel range di circa 9-16% per tutti i prodotti ortofrutticoli ad eccezione del sedano che presenta una variabilità maggiore pari al 31% e ai piselli che mostrano una variabilità minore pari al 3%. Tale variabilità potrebbe essere dovuta a diversi fattori tra cui la varietà/cultivar e le condizioni agronomiche, oppure alla diversa distribuzione della luteina nei tessuti del vegetale e alla diversa attività fotosintetica degli stessi. Infatti i diversi campioni di sedano, che hanno mostrato una maggiore variabilità, presentavano al momento dell'acquisto intensità di colore diverse.

Tabella 5. Contenuto in luteina totale dei campioni di frutta e verdura (mg/Kg s.f.)

		Luteina totale				
		Media ± DS (n=3)*	Media	CV%	Min	Max
Spinaci	1)	113,00±0,930				
	2)	96,00±0,600	101,00	10	94,00	113,00
	3)	94,00±0,420				
Prezzemolo	1)	119,00±2,260				
	2)	143,50±6,250	137,09	16	119,00	148,77
	3)	148,77±3,370				
Broccoli	1)	18,00±1,400				
	2)	22,90±1,100	20,83	12	18,00	22,90
	3)	21,60±2,800				
Lattuga	1)	13,30±0,300				
	2)	11,20±0,850	12,47	9	11,20	13,30
	3)	12,90±0,400				
Sedano	1)	3,96±0,360				
	2)	2,05±0,050	3,11	31	2,05	3,31
	3)	3,31±0,260				
Piselli	1)	11,21±0,275				
	2)	11,60±0,224	11,23	3	10,87	11,60
	3)	10,87±0,850				
Zucchine	1)	12,79±0,443				
	2)	12,40±0,311	13,47	11	12,40	15,24
	3)	15,24±0,138				
Mela	1)	0,20±0,017				
	2)	0,24±0,022	0,22	10	0,20	0,24
	3)	0,23±0,018				

*n=3 tre determinazioni dello stesso campione

Sezione I

La Tabella 6 riporta il contenuto delle diverse forme di luteina, come media di tre campioni e coefficiente di variazione, mentre la Figura 6 mostra il contenuto percentuale di luteina libera, esterificata e legata.

Non si osserva la presenza di luteina esterificata in tutti i campioni ad eccezione della mela. Relativamente ai broccoli, spinaci e mela, la letteratura conferma i risultati ottenuti (Perez-Galvez and Minguez-Mosquera, 2005), mentre per gli altri vegetali analizzati non ci sono sufficienti dati di riferimento. La letteratura riporta presenza di luteina esterificata nei frutti come mela, albicocca, mango e in alcuni vegetali come zucca e patata (Perez-Galvez and Minguez-Mosquera, 2005). Negli spinaci, prezzemolo, broccoli e lattuga la luteina è presente prevalentemente nella forma libera (rapporto libera/legata >1), mentre negli altri prodotti ortofrutticoli (sedano, piselli, zucchine e mela) la quota di luteina legata è presente in quantità rilevante rappresentando il 45-58% della luteina totale (Figura 6) (rapporto libera/legata ≤ 1). Relativamente alla variabilità del contenuto delle diverse forme di luteina, espressa dal CV%, per la luteina libera va da un minimo del 7% dei piselli ad un massimo del 38% del sedano, mentre per la luteina legata va da un minimo del 13% dei piselli ad un massimo del 50% della mela (Tabella 6).

Tabella 6 Contenuto in luteina di frutta e verdura (mg/Kg s.f.) (media±DS di tre campioni).

	Luteina Libera	CV%	Luteina Esterificata*	CV%	Luteina legata**	CV%	Libera/Legata
Spinaci	70,70±8,017	11	0,00	0	30,30±4,095	14	2,3
Prezzemolo	83,33±21,306	26	0,00	0	53,76±9,596	18	1,6
Broccoli	13,36±1,582	12	0,00	0	7,47±2,318	31	1,8
Lattuga	8,52±2,586	30	0,00	0	3,94±1,566	40	2,1
Sedano	1,47±0,554	38	0,00	0	1,63±0,735	45	0,9
Piselli	4,71±0,311	7	0,00	0	6,53±0,827	13	0,7
Zucchine	6,09±1,542	25	0,00	0	6,51±1,268	19	0,9
Mela	0,09±0,015	17	0,03±0,004	13	0,10±0,05	50	0,9

* calcolata come differenza tra luteina lipidica e luteina libera; **calcolata come differenza tra luteina totale e luteina lipidica

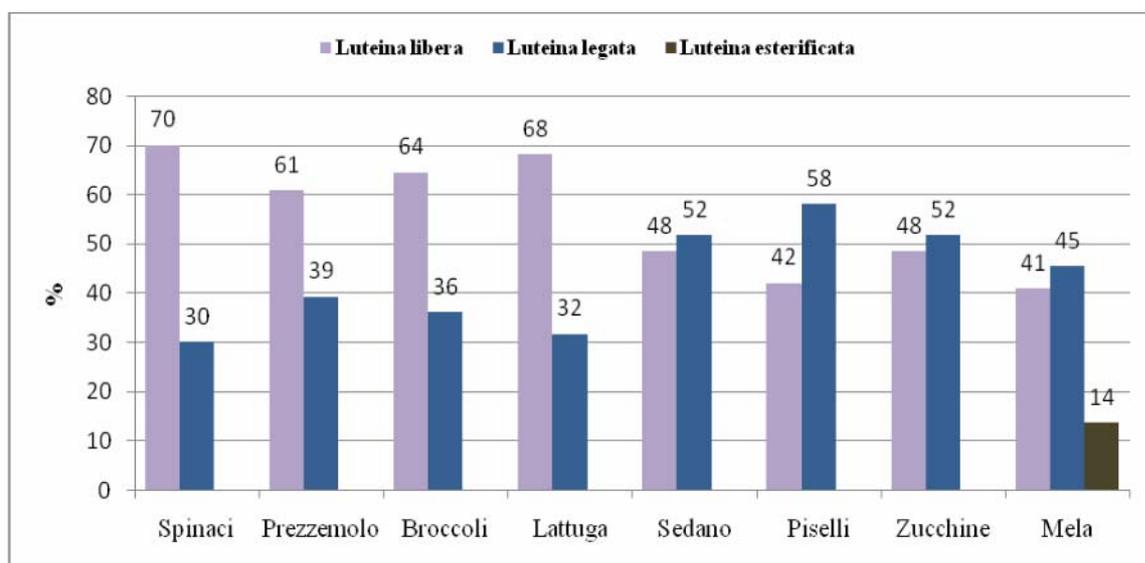


Figura 6. Contenuto percentuale delle diverse forme di luteina in frutta e verdura.

La Tabella 7 mostra il contenuto in luteina totale calcolata per porzione media di frutta e verdura. La porzione media di frutta e verdura, che corrisponde a un certo quantitativo in grammi, a crudo e al netto degli scarti, è tratta dalle Linee guida per una sana alimentazione INRAN del 2003. L'apporto maggiore di luteina è fornito dagli spinaci, seguito dai broccoli, piselli e dalle zucchine. La mela e il sedano apportano, invece, i quantitativi più bassi in luteina per porzione. Considerando le porzioni consigliate di frutta e verdura (3-5 porzioni/die), con l'ingestione di spinaci, broccoli, zucchine e piselli si riuscirebbe a coprire il livello di assunzione di luteina associato con la riduzione del 50% del rischio di insorgenza di malattie oculari di 6-14 mg/die (Alves-Rodrigues and Shao, 2004).

Tabella 7. Contenuto in luteina totale dei prodotti ortofrutticoli per porzione media

	Porzione (g)*	Luteina totale (mg/porzione)
Spinaci	250	25,25
Prezzemolo	10**	1,37
Broccoli	250	5,21
Lattuga	50	0,62
Sedano	40**	0,12
Piselli	250	2,81
Zucchine	250	3,37
Mela	150	0,03

* fonte: INRAN, 2003

** fonte: www.nal.usda.gov: 10g corrispondenti a 10 rametti; 40g corrispondente a un gambo di media grandezza

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni diversi studi scientifici sugli effetti salutistici della luteina hanno rivelato l'importanza di tale composto bioattivo presente in diversi alimenti, e in particolar modo in frutta e verdura. Diversi sono anche i lavori di letteratura che valutano il contenuto in tale antiossidante in frutta e verdura; tuttavia, molti di questi riportano la somma di luteina + zeaxantina negli alimenti, oppure valutano la distribuzione degli isomeri trans-cis di questa xantofilla. Tali lavori, inoltre, applicano una procedura di estrazione con solventi seguita da saponificazione dell'estratto, determinando unicamente la luteina libera e la luteina esterificata con acidi grassi e non considerando quella legata alla matrice e in particolar modo alle proteine.

Di conseguenza, in questa attività sperimentale è stato valutato il contenuto in luteina totale, libera, esterificata e legata presente in diversi prodotti ortofrutticoli applicando una procedura di saponificazione seguita da estrazione con solventi e successiva analisi cromatografica.

Dai dati ottenuti, è emerso che i prodotti ortofrutticoli con il maggiore contenuto in luteina totale sono gli spinaci e il prezzemolo, mentre i broccoli, i piselli e le zucchine presentano un contenuto minore ma comunque apprezzabile. Il sedano e la mela esibiscono i valori minori. Relativamente alle forme di luteina, nei vegetali a foglia verde come spinaci, lattuga, broccoli e prezzemolo la luteina è presente prevalentemente nella forma libera, mentre nei campioni come piselli, sedano, zucchine e mela i valori di luteina libera e legata si equivalgono o prevale quella legata. La luteina esterificata è risultata assente in tutti i campioni ad eccezione della mela.

Dai risultati emersi si conferma, quindi, la necessità di effettuare una procedura di saponificazione della matrice vegetale seguita da estrazione con solventi per ottenere dati più

precisi sul contenuto in luteina totale e considerare l'ammontare di luteina legata alla matrice, non presa in considerazione nei lavori di letteratura, che riportano i risultati ottenuti applicando esclusivamente un'idrolisi dell'estratto e non della matrice.

Questo dato assume particolare importanza nell'ottica della valutazione dell'effettiva quota di luteina assunta con frutta e verdura. Tuttavia, sarebbe opportuno effettuare studi scientifici “*in vitro*” e “*in vivo*” al fine di valutare la biodisponibilità e la bioaccessibilità della luteina legata che potrebbe contribuire ad aumentare l'intake di tale composto bioattivo nel nostro organismo.

Inoltre i risultati evidenziano che il metodo di estrazione Panfili *et al.*, (2004) ha dimostrato di essere un metodo valido ed affidabile per l'estrazione della luteina da frutta e verdura e di essere sufficientemente rapido ed accurato da poter essere applicato per l'estrazione *routinaria* della luteina, con il vantaggio di ridurre notevolmente i tempi di analisi, di limitare l'uso dei solventi e di ottenere estratti più puliti.

Un obiettivo futuro potrebbe essere quello di valutare, attraverso tale metodica, il contenuto in luteina libera, esterificata e legata in altre matrici alimentari e come variano in seguito ai trattamenti tecnologici.

BIBLIOGRAFIA

- 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**: 2297-2306.
- Alves-Rodrigues A. and Shao A. (2004). The science behind lutein. *Toxicology Letters*, **150**: 57-83.
- Cabras P. and Martelli A. (2004). *Chimica degli alimenti*. Piccin Nuova Libreria, Padova.
- Calvo M.M. (2005). Lutein: a valuable ingredient of fruit and vegetables. *Critical Reviews in Food Scienze and Nutrition*, **45**: 671-696.
- Cappelli P. and Vannucchi V. (2005). *Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazione*. Zanichelli, Bologna.
- Cultrera R. and Pavolini T. (1965). *I costituenti organici dei vegetali*. Cedam, Padova.
- Cuppett S., Schnepf M., Hall C.III. 1997). Natural antioxidant-Are they a reality?. In: *Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications*. Shahidi F. (Eds), AOCS Press.
- Dias G.M., Camoes M.F.G.F.C., Oliveira L. (2009). Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. *Food Chemistry*, **113**: 808-815.
- Fidanza F. and Liguori G. (1995). *Nutrizione umana*. Idelson, Napoli.
- Goni I., Serrano J., Saura-Calixto F. (2006). Bioaccessibility of β -carotene, lutein, and lycopene from fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 5382-5387.
- Granado F., Olmedilla B., Gil-Martinez E., Blanco I. (2001). A fast, reliable and low-cost saponification protocol for analysis of carotenoids in vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, **14**: 479-489.

- Halliwell B. and Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, **142**: 231-55.
- Hervert-Hernandez D., Garcia O.P., Rosado J.L., Goni I. (2010). The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a mexican rural diet: importance of fruit and vegetable variety. *Food Research International*, doi: 10.1016/j.foodres.2010.09.021 (in press).
- Holden J.M., Eldridge A.L., Beecher G.R., Buzzard M., Bhagwat S., Davis C.S., Douglass L.W., Gebhardt S., Haytowitz D., Schakel S. (1999). Carotenoid content of U.S. foods: an update of the database. *Journal of Food Composition and Analysis*, **12**: 169-196.
- Humphries J.M. and Khachik F. (2003). Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 1322-1327.
- Kaur C. and Kapoor H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. *International Journal of Food Science and Technology*, **36**: 703-725.
- Khachik F., Beecher G.R., Whittaker N.F. (1986). Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **34**: 603-616.
- Khachik F., Bertram J.S., Huang M.T., Fahey J.W., Talalay P. (1999). Dietary carotenoids and their metabolites as potentially useful chemoprotective agents against cancer. In: *Antioxidant Food Supplements In Human Health*. Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T. (Eds), Academic Press, San Diego.

Sezione I

- Nicita-Mauro V. and Basile G. (2005). Stile di vita, invecchiamento e longevità. *Giornale di Gerontologia*, **35**: 340-349.
- Nicoli M.C., Anese M., Parpinel M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, **10**: 94-100.
- Ninfali P. and Bacchiocca M.. (2003). Poliphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 2222-2226.
- O'Connell O.F., Ryan L., O'Brien N.M. (2007). Xanthophylls carotenoids are more accessible from fruits than dark green vegetables. *Nutrition Research*, **27**: 258-264.
- Oliver J. and Palou A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*, **881**: 543-555.
- Panfili G., Fratianni A., Irano M. (2004). Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 6373-6377.
- Pérez-Galvez A. and Minguez-Mosquera M.I. (2005). Esterification of xanthophylls and its effect on chemical behavior and bioavailability of carotenoids in the human. *Nutrition Research*, **25**: 631-640.
- Regolamento CE 1333/2008 relativo agli additivi alimentari. GUCE L354/16 del 16 dicembre 2008.
- Robards K. (2003). Strategies for the determination of bioactive compounds phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, **1000**: 657-691.
- Rodriguez-Amaya D.B. and Kimura M. (2004). HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. *HarvestPlus Technical Monograph Series 2. Breeding Crops for Better Nutrition*, Washington.

- Rodriguez-Amaya D.B. (2000). Some considerations in generating carotenoid data for food composition tables. *Journal of Food Composition and Analysis*, **13**: 641-647.
- Schieber A. and Carle R. (2005). Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: technological, analytical, and nutritional implication. *Trends in Food Science e Technology*, **16**: 416-422.
- Semba R.D. and Dagnelie G. (2003). Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health?. *Medical Hypotheses*, **61**: 465- 472.
- Shahidi F. (1997). Natural antioxidant: an overview. In: *Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications*. Shahidi F. (Eds), AOCS Press.
- Shi H., Noguchi N., Niki E. (2001). Introducing natural antioxidants. In: *Antioxidants in food. Practical applications*. Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (Eds), CRC Press, New York.
- Somogyi A., Rosta K., Pusztai P., Tulassay Z., Nagy G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, **28**: R41-R55.
- Stahl W and Sies H. (1999). Carotenoids: occurrence, biochemical activities, and bioavailability. In: *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T. (Eds), Academic Press, San Diego.
- Takyi E.E.K. (2001). Bioavailability of carotenoids from vegetables versus supplements. In: *Vegetables, Fruits, and Herbs in Health Promotion*. Watson R.R., Ph.D. (Eds), CRC Press, New York.
- Taungbodhitham A.K., Jones G.P., Wahlqvist M.L., Briggs D.R. (1998). Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, **63**(4): 577-584.

Sezione I

- Updike A.A. and Schwartz S.J. (2003). Thermal processing of vegetables increases cis isomers of lutein and zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 6184-6190.
- van het Hof K., West C.E., Weststrate J.A., Hautvast J.G.A.J. (2000). Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *The Journal of Nutrition*, **130**: 503-506.

Siti Internet consultati:

- www.chelab.it
- www.plantamedica.it
- www.wikipedia.it
- www.inran.it/648/linee_guida.html
- www.nal.usda.gov

SEZIONE II

VALUTAZIONE DI POLIFENOLI E DELLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE IN PRODOTTI ORTOFRUTTICOLI UTILIZZATI NELLA RISTORAZIONE OSPEDALIERA

CAPITOLO 1

I POLIFENOLI

I polifenoli sono i più abbondanti antiossidanti presenti nella nostra dieta, considerando l'introito medio giornaliero di circa 1 grammo, quantità 10 volte maggiore di quella della vitamina C, 100 volte della vitamina E e 500 volte dei carotenoidi (Georgé *et al.*, 2005); sono, infatti, i principali antiossidanti presenti in frutta e vegetali (>90% della capacità antiossidante totale) (Hervert-Hernandez *et al.*, 2010).

I polifenoli sono particolarmente noti per la loro azione positiva sulla salute umana (non a caso, sono talvolta indicati con il termine vitamina P). Numerosi studi epidemiologici, infatti, hanno dimostrato che i polifenoli esercitano un ruolo nella prevenzione di numerose patologie cronico-degenerative come aterosclerosi e patologie cardiovascolari.

Da un punto di vista chimico, tutti i composti fenolici contengono almeno un anello aromatico con uno o più gruppi –OH, che derivano dalla L-fenilalanina e tirosina (Petti and Scully, 2009; Naczki and Shahidi, 2006). Una classificazione generale delle principali classi di composti fenolici prende in considerazione lo scheletro carbonioso che costituisce l'asse fondamentale per la loro differenziazione (Tabella 1 e Figura 1 con relativi esempi)

Tabella 1. Classi dei composti fenolici presenti nelle piante e scheletro carbonioso (Harborne, 1989)

Classi fenoliche	Struttura
Fenoli semplici, benzochinoni	C_6
Acidi idrossibenzoici	C_6-C_1
Acidi fenilacetici	C_6-C_2
Acidi idrossicinnamici, fenilpropanoidi (cumarine, isocumarine, cromoni, cromeni)	C_6-C_3
Naftochinoni	C_6-C_4
Xantoni	$C_6-C_1-C_6$
Stilbeni, antrachinoni	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoidi, isoflavonoidi	$C_6-C_3-C_6$
Lignani, neolignani	$(C_6-C_3)_6$
Biflavonoidi	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Lignine	$(C_6-C_3)_n$
Tannini condensati	$(C_6-C_3-C_6)_n$

I tannini sono considerati metaboliti fenolici dei vegetali con un peso molecolare più alto di 500 e con l'abilità di far precipitare gelatine o altre proteine da una soluzione, dando una tipica reazione con il $FeCl_3$ con produzione di una colorazione blu. Sono ulteriormente classificabili in idrolizzabili e condensati (Apak *et al.*, 2007).

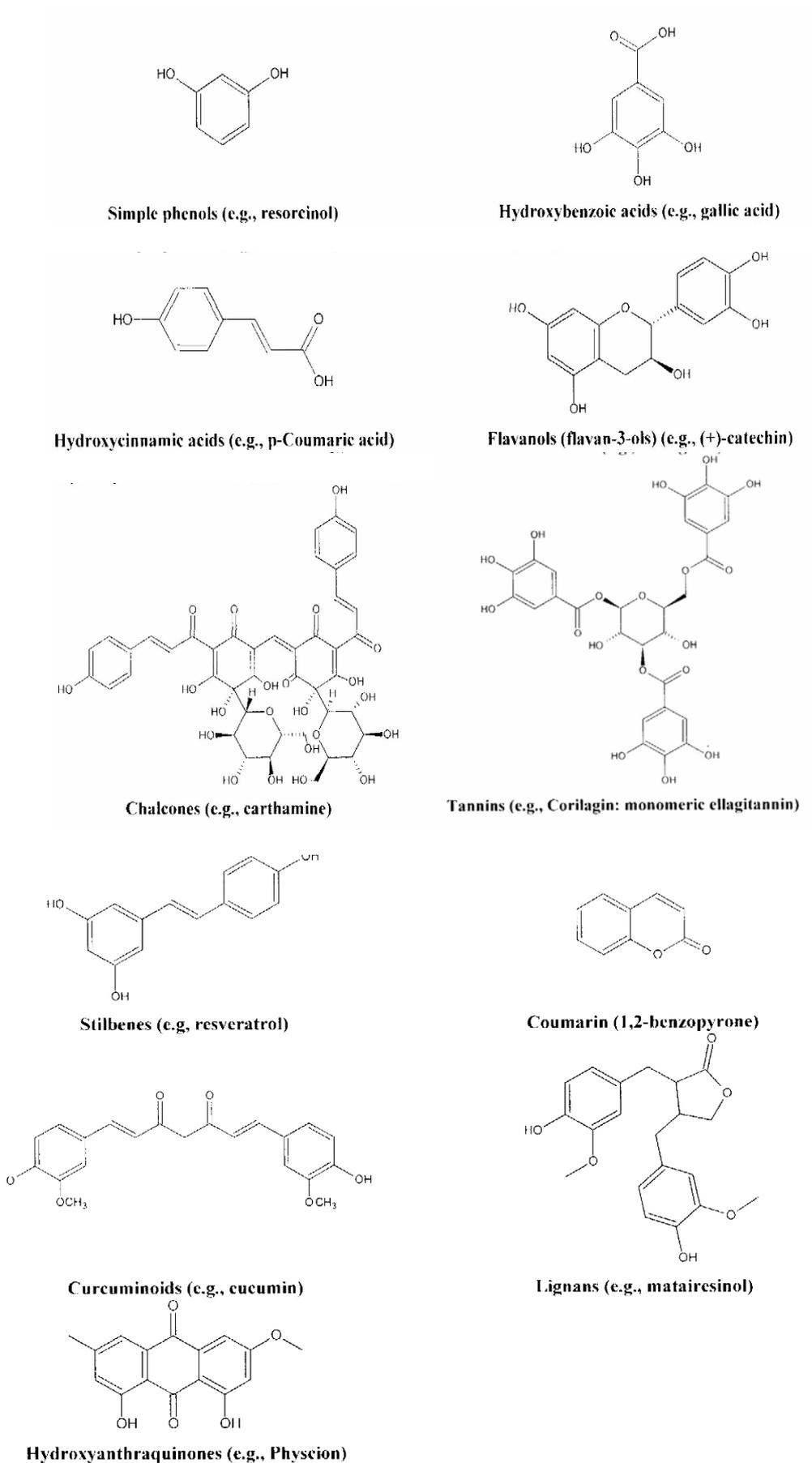


Figura 1. Struttura chimica di base di fenoli in frutta e verdura (Apak *et al.*, 2007)

Sezione II

Sulla base del peso molecolare dei composti menzionati, le sostanze fenoliche si possono distinguere in composti a basso, intermedio ed alto peso molecolare (Tabella 2).

Tabella 2. Classificazione dei composti fenolici in base al peso molecolare

Peso molecolare	Struttura	Classe fenolica
Basso	C_6-C_1	Acidi idrossibenzoici
	C_6-C_3	Acidi idrossicinnamici
Intermedio	$C_6-C_3-C_6$	Flavonoidi
Alto	$(C_6-C_3)_n$	Tannini idrolizzabili
	$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tannini condensati

In generale possiamo classificare i polifenoli in due gruppi: FLAVONOIDI e NON FLAVONOIDI.

Fra i non flavonoidi vi sono l'acido gallico, gli idrossicinnammati quali l'acido p-cumarico, l'acido caffeico e l'acido caftarico e gli stilbeni quali il trans- e il cis-resveratrolo

Fenoli semplici. Sono caratterizzati dalla presenza di un solo anello benzenico e pertanto rappresentano le strutture più semplici dei polifenoli. Si trovano principalmente negli oli essenziali ricavati dalle piante. Un esempio è il timolo e il resorcinolo.

Acidi idrossibenzoici. Sono così chiamati per la struttura di base derivata dall'acido idrossibenzoico. L'acido gallico e l'acido vanillico sono i composti idrossibenzoici maggiormente presenti e studiati per la loro distribuzione nel mondo vegetale. L'acido gallico, inoltre, è insieme all'acido ellagico il monomero base dei tannini idrolizzabili.

Acidi idrossicinnamici. Sono fenilpropanoidi derivanti dall'acido p-cumarico (o p-idrossicinnamico). Sono comuni in natura quattro varianti della loro formula di base C_6-C_3 : acido caffeico, cumarico, ferulico e sinapico. Si trovano nel regno vegetale legati chimicamente ad altri composti, dove svolgono azione antibiotica e varie funzioni connesse all'inibizione della crescita e della germinazione.

I flavonoidi sono un gruppo di composti polifenolici ubiquitari, presenti in frutti e vegetali, e costituiscono una categoria di sostanze polifunzionali ad elevata bioattività, che comprende più di 5000 composti, derivanti dal benzo- γ -pirone e formati da due anelli aromatici (A e B) e un eterociclo di collegamento (C) (Figura 2). In base al tipo di eterociclo, allo stato di ossidazione, al numero e alla posizione dei vari sostituenti, la famiglia include flavani, flavanoni, antocianidine, flavoni, flavonoli, isoflavoni e tannini (Figura 3) (Apak *et al.*, 2007). Il grado di ossidazione dell'anello eterociclico, il numero e le specifiche posizioni dei gruppi OH o la natura dei gruppi funzionali, determinano la funzione dei flavonoidi come agenti antiossidanti, agenti antinfiammatori, agenti citotossici e agenti mutageni *in vitro* o *in vivo*, a dimostrazione di come piccole differenze di struttura determinano grandi diversità nelle attività biologiche (Carratù and Sanzini, 2005).

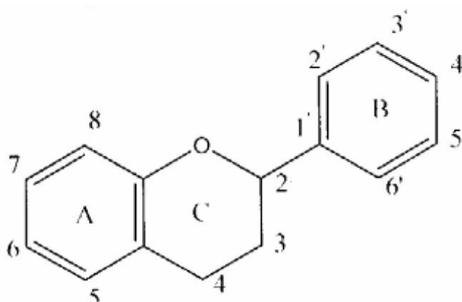


Figura 2. Struttura generica dei flavonoidi

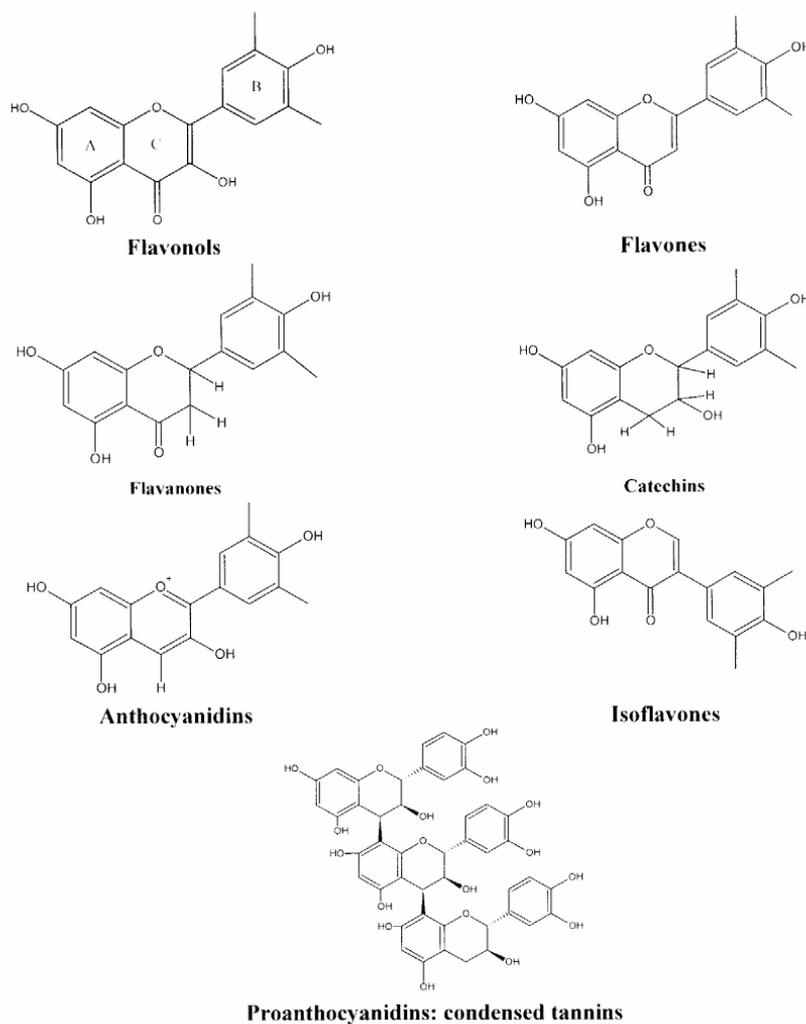


Figura 3. Classi rappresentative dei flavonoidi (Apak *et al.*, 2007)

Tannini. Non rappresentano una vera e propria classe di composti, ma piuttosto un gruppo di composti fenolici, variamente combinati tra loro, caratterizzati da alto peso molecolare e da proprietà colloidali. Tendono a legarsi con alcaloidi, gelatine e altre proteine, dando luogo a precipitati. Si distinguono due tipologie di tannini: idrolizzabili e condensati. I tannini idrolizzabili sono poliesteri che, per idrolisi acida o alcalina, liberano acido gallico ed il suo dimero (acido diidrossifenoico), che per lattonizzazione forma l'acido ellagico. I tannini condensati sono, invece, oligomeri o polimeri derivanti dalla condensazione o polimerizzazione ossidativa dei flavan-3-oli e dei 3,4 flavan-dioli, uniti con legame covalente.

Sezione II

dell'intestino, sia per la resistenza all'idrolisi dovuta al pH e agli enzimi gastrici. Quando è coinvolta la flora intestinale l'efficienza dell'assorbimento è spesso ridotta in quanto la flora può degradare anche gli agliconi e produrre acidi aromatici semplici. Ha inoltre in questa fase una funzione importante anche lo stato fisiologico dell'organismo, quando ad esempio vengono assunti farmaci. L'aglicone libero può passare nella cellula epiteliale passivamente o per diffusione facilitata. Le forme acilate sembrano passare come tali attraverso la membrane e sono pertanto assorbite senza deconiugazione o idrolisi, mentre la forma glucosidica può essere trasportata anche intatta all'interno della cellula attraverso un carrier e poi essere idrolizzata dalle beta-glucosidasi presenti nel citosol. Nelle cellule dell'intestino tenue avviene la coniugazione a glucoronide e in minor misura a forme solfate e metilate. Le antocianidine rappresentano una eccezione perché è stata riscontrata la presenza nel plasma e nelle urine della forma glicosilata immodificata, fatto che implicherebbe il coinvolgimento di recettori di trasporto di glucosio durante l'assorbimento. Alcuni flavonoidi, come ad esempio la rutina, non vengono deglicosilati e raggiungono l'ileo terminale e l'intestino crasso. La quercetina è rapidamente idrolizzata dalla flora del colon in composti fenolici a basso peso molecolare pertanto viene assorbita meno efficientemente rispetto all'intestino tenue. Nel fegato i flavonoidi coniugati vengono deglucoronidati dalle beta-glucuronidasi e trasformati nelle forme solfate, mentre i glucuronidi intatti sono metilati; invece gli agliconi che raggiungono il fegato come tali vengono ivi coniugati. I coniugati sono secreti attraverso le vie biliari nel duodeno dove sono soggetti all'azione degli enzimi batterici e poi assorbiti (circolo enteroepatico).

La biodisponibilità ed il metabolismo dei tannini condensati sono invece ancora oscuri. Si ritiene che alcuni oligomeri siano assorbiti dall'organismo in maniera simile alle loro forme monometriche. Alcuni studi evidenziano che la permeabilità cellulare dei tannini condensati sia funzione inversa del grado di polimerizzazione (Carratù and Sanzini, 2005).

I polifenoli sono stati riscontrati in diversi tessuti, ma principalmente nella mucosa del tratto digestivo e, soprattutto nella mucosa orale. I polifenoli maggiormente assorbiti sono gli isoflavoni e l'acido gallico, seguiti dai flavanoni, catechine e quercetina glicosidata (Petti and Scully, 2009).

L'assunzione con la dieta di flavonoli, flavoni e flavanoli monomerici è relativamente bassa e le concentrazioni plasmatiche raramente eccedono 1 mmoli/l a causa dell'assorbimento limitato e della rapida eliminazione. Invece i flavanoni ed isoflavoni, anche se sono contenuti solo negli agrumi e nella soia, sono i flavonoidi con il profilo di biodisponibilità migliore: infatti, la concentrazione plasmatica può raggiungere le 5 mmoli/l. Le proantocianidine e analogamente le antocianine non sono assorbite o assorbite molto poco e pertanto la loro attività è limitata all'enterocita. I bassi livelli di polifenoli riscontrati nel plasma rispetto ai 10-100 mg di ogni singolo composto assunti con la dieta mettono in evidenza i complessi meccanismi che regolano la biodisponibilità; si stima che l'emivita dei polifenoli in circolo sia compresa tra le 2 e le 6 ore. Sono necessarie, tuttavia, ulteriori informazioni sulla influenza della microflora intestinale, sulla natura dei metaboliti e sulla distribuzione nei tessuti (Carratù and Sanzini, 2005).

1.2 RUOLI FUNZIONALI SVOLTI DAI POLIFENOLI

Lo studio della relazione struttura-funzione dei polifenoli ha evidenziato che le caratteristiche strutturali influiscono sulle loro proprietà biologiche, sulle biodisponibilità, sull'attività antiossidante e sull'interazione specifica con recettori cellulari.

Essendo metaboliti secondari, i polifenoli svolgono nelle piante diverse funzioni. Per esempio, sono responsabili della pigmentazione dei fiori, frutti e semi, attirando in questo modo gli impollinatori e i dispersori di semi; promuovono la fertilità della pianta e la germinazione del polline; agiscono come molecola-segnale nell'interazione tra pianta e microrganismo; proteggono contro la luce ultravioletta e altre funzioni difensive, tra cui la

Sezione II

difesa contro i microrganismi patogeni (i polifenoli, interagiscono con le proteine di membrana, gli enzimi e i lipidi dei microrganismi, attraverso diversi modi, alterando la permeabilità delle loro cellule e determinando la perdita di protoni, ioni e macromolecole) e i predatori delle piante (i polifenoli disturbano la digestione, il metabolismo degli animali e l'assorbimento degli amminoacidi, amido e lipidi attraverso diversi meccanismi) (Petti and Scully, 2009).

Il ruolo protettivo esercitato dai polifenoli contro l'insorgenza delle patologie croniche degenerative è stato attribuito prevalentemente al loro ruolo come antiossidanti. Infatti studi *in vitro* hanno dimostrato che i polifenoli si comportano come antiossidanti e sono agenti riducenti, ed insieme ad altri composti introdotti con la dieta (come la vitamina C, vitamina E e carotenoidi) contribuiscono al potenziale antiossidante degli alimenti.

Non è stato evidenziato un accumulo di polifenoli, pertanto solo il consumo abituale e quotidiano di alimenti ricchi di questi composti può contribuire a prevenire le numerose patologie umane legate al danno ossidativo.

Attività Antiossidante.

I polifenoli proteggono le cellule dai danni causati dai radicali liberi, che si sviluppano con il normale metabolismo cellulare e a causa di diversi fattori come radiazioni, fumo, agenti inquinanti, raggi UV, stress emotivo o fisico, additivi chimici, attacchi virali e batterici ecc.

Alcuni polifenoli sono altamente reattivi nel (1) “spegnere” (quencer) l'ossigeno singoletto (Kahkonen *et al.*, 1999) (2) neutralizzare i radicali liberi ($R\cdot$) donando un atomo di idrogeno (RH) o un elettrone (R^-), (3) nel chelare gli ioni metallici in soluzioni acquose (Petti and Scully, 2009). La loro attività antiossidante *in vitro* è considerata superiore a quella delle vitamine (Wang *et al.*, 1996).

L'efficacia antiossidante dei polifenoli è dovuta alla presenza di gruppi idrossilici legati alle strutture aromatiche ed alla geometria della molecola. Condizione fondamentale affinché sia esplicita l'attività antiossidante dei polifenoli è la formazione di radicali fenolici stabili,

attraverso la delocalizzazione elettronica sulle strutture aromatiche ed alifatiche (Halliwell *et al.*, 1990) (Figura 5).

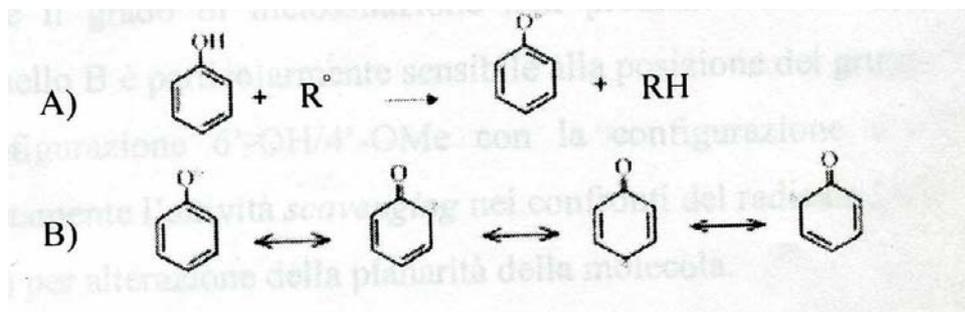


Figura 5. Reazione generica di un composto fenolico con un radicale libero (A); la delocalizzazione dell'elettrone dell'ossigeno sull'anello aromatico contribuisce alla stabilizzazione della nuova specie radicalica formata (B).

L'attività antiossidante dei flavonoidi ed il loro metabolismo *in vitro* dipendono anche dalla posizione dei gruppi funzionali del composto (Heim *et al.*, 2002). La configurazione idrossilica dell'anello B è significativamente determinante per l'azione scavenging nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, in quanto gli idrossili di tale anello cedono idrogeno o un elettrone ai radicali idrossilici, perossilici e perossinitriti, stabilizzandoli e trasformandosi in un radicale flavonoide relativamente stabile. Tuttavia, gli ossidrili presenti sull'anello A hanno un'attività antiossidante decisamente più blanda rispetto a quelli dell'anello B. Anche l'eterociclo contribuisce all'attività antiossidante con la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 3, in quanto permette la coniugazione tra i due anelli aromatici A e B.

Le capacità chelanti dei flavonoidi e dei tannini contribuiscono all'attività antiossidante. In questo modo i flavonoidi inibiscono il danno ossidativo rimuovendo e neutralizzando gli ioni ferro negli epatociti. La chelazione dello ione bivalente non necessariamente neutralizza il flavonoide, che può mantenere la propria funzione di scavenger nei confronti delle specie

Sezione II

reattive dell'ossigeno. All'interno delle varie classi di polifenoli, hanno maggiore attività antiossidante l'acido gallico, il resveratrolo e la (+)-catechina.

Oltre a contrastare i radicali liberi, i composti fenolici svolgono numerose attività biologiche come la protezione dei capillari sanguigni, l'azione antinfiammatoria, antibatterica, immunostimolante, anti-allergenica, antivirale, estrogenica ed anticancerogena. È stata inoltre dimostrata la loro azione inibente nei confronti di alcuni enzimi, quali la fosfolipasi A2, la ciclossigenasi, la lipossigenasi, la glutatione reduttasi e la xantina ossidasi (Waladkhani and Clemens, 2001).

Attività Anticancerogena.

L'attività anticancerogena dei polifenoli è dovuta all'abilità di tali molecole di inibire gli enzimi coinvolti nella carcinogenesi e nello sviluppo dei tumori (Petti and Scully, 2009). In generale hanno influenza sullo step di iniziazione dello sviluppo del cancro, proteggendo le cellule contro l'attacco diretto da carcinogeni o alterando il loro meccanismo di attivazione (*in vitro*). Queste prove scientifiche spiegano la classica evidenza epidemiologica secondo cui esiste una correlazione tra consumo di vegetali freschi e ridotta incidenza di alcuni tipi di cancro (pelle, polmoni, stomaco, esofago, pancreas, fegato, seno e colon).

Attività Antiaterogena.

È ampiamente riportato come l'ossidazione dei lipidi ed in particolare delle LDL (low density lipoprotein) sia la causa dello sviluppo dell'aterosclerosi e delle malattie ad essa correlate (ictus, trombosi e malattie cardiovascolari in genere). Studi epidemiologici suggeriscono che un elevato intake di flavonoidi decresce la mortalità dovuta alle malattie cardiovascolari di circa il 65% e generalmente diminuisce il rischio di ictus cerebrale, come pure il cancro al polmone e al retto (Petti and Scully, 2009). Il primo meccanismo di azione è la riduzione della coagulazione delle piastrine e delle LDL; altri meccanismi sono l'inibizione dell'ossidazione delle lipoproteine, l'azione "radical scavenger" e la modulazione del metabolismo degli eicosanoidi. I flavonoidi, più che gli acidi fenolici, hanno un notevole effetto protettivo nei

confronti delle LDL. Questo è dovuto sia all'azione diretta dei polifenoli come scavenger di radicali, sia alla rigenerazione della vitamina E nelle LDL a partire da un radicale α -chromanossi (Zhou *et al.*, 2000).

Attività Antinfiammatoria.

L'attività antiossidante dei flavonoidi potrebbe essere alla base dell'attività antinfiammatoria e antiplastrinica (Robak and Grygliwski, 1996), sia grazie alla struttura dei flavonoidi sia alla loro capacità di penetrare la membrana lipidica della cellula (Saija *et al.*, 1995).

Attività Antibatterica ed antivirale.

Havsteen (2002) ha osservato che i polifenoli posseggono attività antivirali nei confronti dell'HIV, dell'Herpes Simplex, di vari virus influenzali e del Rhinovirus. La presunta attività anti-HIV potrebbe essere dovuta all'inibizione di enzimi, come la trascrittasi inversa, proteinasi e integrasi e del recettore CD4 (Petti and Scully, 2009). Mentre l'attività polifenolica contro virus influenzali umani e aviari sembra essere dovuta all'inibizione delle emagglutinine virali, l'azione contro il citomegalovirus è correlata all'inibizione del recettore del fattore di crescita epidermico (Petti and Scully, 2009).

Gli effetti benefici dei polifenoli condotti su animali o *in vitro* sono generalmente non confermati da studi condotti sull'uomo. Questa discrepanza potrebbe essere spiegata dal fatto che il meccanismo di azione dei polifenoli *in vivo* potrebbe essere differente dal meccanismo *in vitro*. Infatti, la classica attività antiossidante dei polifenoli non è molto probabilmente la principale spiegazione degli effetti benefici sugli uomini, ma piuttosto sono coinvolti meccanismi di modulazione e inibizione di proteine/enzimi, recettori e molecole di trascrizione (Petti and Scully, 2009). Sono necessari, quindi, studi ulteriori per confermare tali attività.

CAPITOLO 2

I POLIFENOLI IN FRUTTA E VERDURA

Nel mondo vegetale i polifenoli sono composti ubiquitari e fondamentali nella fisiologia della pianta, contribuendo alla resistenza nei confronti di microrganismi e insetti, alla pigmentazione e alle caratteristiche organolettiche. È noto infatti che frutta e vegetali necessitano di una molteplicità di composti per preservare la loro integrità dovuta alla continua esposizione a avverse condizioni ambientali, compresi i raggi UV e le alte temperature. Questi fattori stimolano la sintesi di composti protettivi come le antocianine; ne sono ad esempio particolarmente ricchi vegetali e frutta tipici dell'area mediterranea.

I polifenoli costituiscono i principi attivi di molte piante medicinali e i meccanismi d'azione responsabili della loro attività farmacologica non sono ancora completamente conosciuti (Carratù and Sanzini, 2005).

È comunque assodato che esiste una correlazione negativa tra l'intake totale di frutta e verdura e lo sviluppo di malattie cardio e cerebrovascolari per la presenza in tali alimenti di composti bioattivi e in particolar modo di antiossidanti (Kaur and Kapoor, 2001).

Frutta, ortaggi, legumi, cioccolato e bevande derivate da prodotti vegetali (te, vino, birra, caffè) ne costituiscono le maggiori fonti alimentari. Alcuni polifenoli come la quercetina sono stati evidenziati in frutta, verdura, cereali, leguminose, succhi di frutta, te, vino, infusi. Altri polifenoli sono contenuti prevalentemente in altri alimenti, come ad esempio i flavononi negli agrumi, gli isoflavoni nella soia (Manach *et al.*, 2004). La Tabella 3 riporta i principali alimenti di origine vegetale fonte di composti fenolici.

La quantità e la qualità dei polifenoli presenti negli alimenti di origine vegetale possono variare significativamente a causa di fattori intrinseci ed estrinseci come il genere, la specie e la cultivar, la composizione del suolo e le condizioni di crescita, stato di maturazione e

condizioni post-raccolta (Faller and Fialho, 2010); tali fattori sono stati già descritti nel capitolo 1 della sezione I, relativa alla luteina.

Tabella 3. Alimenti di origine vegetale fonti di polifenoli (Dimitrios, 2006)

	Antioxidants	References
<i>Fruits</i>		
Berries	Flavanols hydroxycinnamic acids, hydroxybenzoic acids, anthocyanins	Hakkinen <i>et al.</i> (1998), Belitz and Grosch (1999), Wang and Lin (2000), Yanishlieva-Maslarova and Heinonen (2001), and Manach <i>et al.</i> (2004)
Cherries	Hydroxycinnamicacids, anthocyanins	Belitz and Grosch (1999), Yanishlieva-Maslarova <i>et al.</i> , (2001), and Manach <i>et al.</i> (2004)
Blackgrapes	Anthocyanins, flavanols	Belitz and Grosch (1999), Yanishlieva-Maslarova <i>et al.</i> (2001), and Manach <i>et al.</i> (2004)
Citrus fruits	Flavanones, flavanols, phenolic acids	Yanishlieva-Maslarova <i>et al.</i> (2001), Beecher (2003), and Manach <i>et al.</i> (2004)
Plums, prunes, apples, pears, kiwi	Hydroxycinnamic acids, catechins	Belitz and Grosch (1999), Yanishlieva-Maslarova <i>et al.</i> (2001), and Manach <i>et al.</i> (2004)
<i>Vegetables</i>		
Aubergin	Anthocyanins, , hydroxycinnamic acids	Manach <i>et al.</i> (2004)
Chicory, artichoke	Hydroxycinnamic acids	Manach <i>et al.</i> (2004)
Parsley	Flavones	Manach <i>et al.</i> (2004), and Beecher (2003)
Rhubarb	Anthocyanins	Manach <i>et al.</i> (2004)
Sweet potato leaves	Flavanols, flavones,	Chu <i>et al.</i> (2000)
Yellow onion, curly	Flavanols	Manach <i>et al.</i> (2004)
Kale, leek		
Parsley	Flavones	Manach <i>et al.</i> (2004)
Beans	Flavanols	Manach <i>et al.</i> (2004)
Spinach	Flavonoids, <i>p</i> -coumaric acid	Bergman <i>et al.</i> (2001)
<i>Flours</i>		
Oats, wheat, rice	Caffeic and ferulic acids	Yanishlieva-Maslarova <i>et al.</i> (2001), and Manach <i>et al.</i> (2004)
<i>TEAS</i>		
Black, green	Flava-3-ols, flavanols	Manach <i>et al.</i> (2004), and Beecher (2003)
<i>Alcoholic drinks</i>		
Red wine	Flavan-3-ols, flavanols, anthocyanins	Manach <i>et al.</i> (2004), and Beecher (2003)
Cider	Hydroxycinnamic acids	Manach <i>et al.</i> (2004)
<i>Other drinks</i>		
Orange juice	Flavanols	Manach <i>et al.</i> (2004)
Coffee	Hydroxycinnamic acids	Manach <i>et al.</i> (2004) Sanchez-Gonzales <i>et al.</i> (2005)
Chocolate	Flavanols	Beecher (2003), and Manach <i>et al.</i> (2004)
<i>Herbs and spices</i>		
Rosemary	Carnosic acid, carnosol, Rosmarinic acid rosmanol	Yanishlieva-Maslarova <i>et al.</i> (2001) Ibanez <i>et al.</i> (2003)
Sage	Carnosol, Carnosic acid, lateolin, rosmanol, rosmarinic acid	Yanishlieva-Maslarova <i>et al.</i> (2001)
	Rosmarinic acid,	Zheng and Wang (2001)
Oregano	Rosmarinic acid, phenolic acids, flavonoids	Yanishlieva-Maslarova <i>et al.</i> (2001) Exarchou <i>et al.</i> (2002), and Belhatab <i>et al.</i> (2004)
Thyme	Thymol, carvacrol, Flavonoids, lubeolin	Yanishlieva-Manach <i>et al.</i> (2004) Zheng <i>et al.</i> (2001) and Exarchou <i>et al.</i> (2002)
Summer savory	Rosmarinic, carnosol, carvacrol, flavonoids	Yanishlieva-Maslarova <i>et al.</i> (2001)
Ginger	Gingerd and related companids	Yanishlieva-Maslarova <i>et al.</i> (2001) Moure <i>et al.</i> (2001)

Relativamente ai frutti, le diverse varietà di mela presentano gli acidi idrossicinnamici, flavan-3-oli (monomerici e oligomerici), flavonoli e loro coniugati, diidrossicalconi e procianidine. Tra gli acidi idrossicinnamici, l'acido clorogenico è il composto fenolico

Sezione II

maggior mente presente, rappresentando più dell'87% dell'ammontare totale. Le antocianine sono state trovate nei vacuoli delle cellule epidermiche e subepidermiche della buccia delle mele rosse. Le procianidine presenti nella mela sono una miscela di oligomeri e polimeri costituiti da unità di (-)-epicatechina e (+)-catechina. Anche i mirtilli sono fonti di acidi fenolici, catechine, flavonoli, antocianine e proantocianidine, così come sono stati riscontrati l'acido gallico, caffeico, p-cumarico, ferulico e ellagico. Gli acidi fenolici come l'acido caftarico (acido *trans*-cafferiltartarico), l'acido cutarico (acido p-cumarictartarico) e il transferarico, i flavonoli e flavanoni sono i polifenoli caratteristici del chicco d'uva, mentre i vinaccioli e la buccia sono fonti eccellenti di proantocianidine, flavoni e flavan-3-oli. Il melograno è una frutto ricco di tannini idrolizzabili e antocianine. Negli agrumi i composti fenolici maggiormente presenti sono i derivati dell'acido cinnamico, cumarine e flavonoidi (Naczk and Shahidi, 2006). Il potenziale antiossidante dei frutti comunemente consumati decresce nell'ordine prugna>kiwi>mela>pera (Du *et al.*, 2009).

Aglione, broccoli, cavolo bianco, cavolfiore, fagiolo comune presentano un'alta capacità antiossidante. Oltre a questi vegetali, anche spinaci, cavolo verde, bieta, cipolla, cavoletti di Brussel, mais e cocomero sono fonti di polifenoli. Alti livelli di quercetina sono stati riscontrati nella cipolla, cavolo, pomodoro e alcune varietà di lattuga (Kaur and Kapoor, 2001). Infatti, la lattuga è una buona fonte di flavonoidi ma anche di acidi cafferiltartarico e clorogenico (Naczk and Shahidi, 2006).

Gli acidi fenolici (acido p-idrossibenzoico, acido sirigico e acido clorogenico) e le isocumarine sono, invece, i fenoli predominanti della carota e sono localizzati nel tessuto peridermico della radice.

Gli spinaci sono considerati "brain food" ovvero "alimenti cervello", in quanto necessari per evitare la perdita di memoria e l'Alzheimer; infatti si ritiene che i composti bioattivi presenti in questi estratti hanno la capacità di aumentare la fluidità delle membrane delle cellule, consentendo il passaggio di importanti nutrienti e segnali chimici, riducendo in tal modo i

processi infiammatori nei tessuti (Kaur and Kapoor, 2001). Secondo Naczk and Shahidi (2006) raccolti estivi hanno un contenuto in polifenoli maggiore rispetto a quelli cresciuti autunnali. Nel pomodoro i flavonoli, polifenoli predominanti, sono localizzati nella buccia; inoltre i pomodori ciliegino contengono una quantità maggiore di flavonoidi rispetto alle varietà di maggiori dimensioni (Naczk and Shahidi, 2006).

In frutta e verdura sono stati individuati, in base alla loro solubilità, due gruppi di composti fenolici: i polifenoli estraibili, costituiti da un mix complesso di composti a basso peso molecolare solubili in solventi organici e polifenoli non estraibili, che include i polifenoli polimerici, come le proantocianidine e i polifenoli idrolizzabili, associati ai costituenti della parete cellulare, come polisaccaridi e proteine (Hervert-Hernandez *et al.*, 2010), alla fibra alimentare e composti indigeribili (Saura-Calixto *et al.*, 2007). Per la determinazione dei polifenoli non estraibili, è necessario applicare un'idrolisi acida del residuo dopo estrazione dei polifenoli estraibili. Secondo un lavoro condotto da Hervert-Hernandez *et al.*, (2010), i polifenoli estraibili esibiscono una capacità antiossidante, determinata con il FRAP (circa il 50%) e ABTS (circa il 70%) più alta rispetto alle proantocianidine e ai polifenoli idrolizzabili. Ciò può essere correlato al numero e alla posizione dei gruppi idrossili nell'anello aromatico, alle forme libere o esterificate analizzate, e ai sostituenti metossi in posizione orto.

La distribuzione dei polifenoli a livello dei tessuti, cellule e subcellule delle piante non è omogenea; infatti, gli strati più esterni delle piante presentano un maggiore contenuto in polifenoli rispetto agli strati più interni; infatti alcuni frutti presentano un contenuto in polifenoli maggiore nella buccia rispetto alla polpa. Inoltre i fenoli insolubili sono localizzati nelle pareti delle cellule, mentre quelli solubili nei vacuoli cellulari. I primi, legati ai diversi componenti della cellula, contribuiscono alla resistenza meccanica della cellula come pure regolano la crescita e la morfogenesi della pianta e la risposta ai patogeni e allo stress della cellula. L'acido ferulico e il p-cumarico sono gli acidi fenolici maggiormente presenti nella parete cellulare, in cui possono essere esterificati a pectine e arabinoxylani o legati ai

Sezione II

polisaccaridi della parete cellulare a formare dimeri. Tale legame gioca un ruolo significativo nell'adesione cellula-cellula (Naczki and Shahidi, 2006).

I dati di letteratura relativi alle quantità di polifenoli e alla capacità antiossidante, riportati in Tabella 4 e 5, risultano spesso discordanti a causa delle metodiche analitiche utilizzate che si diversificano per strumentazione, procedimento estrattivo, specificità e sensibilità; va inoltre sottolineata l'importanza delle procedure di campionamento che dovrebbero garantire il massimo della rappresentatività statistica (Carratù and Sanzini, 2005).

Tabella 4. Valori di letteratura relativi al contenuto in polifenoli in campioni ortofrutticoli diversamente trattati

Campione	Trattamento	Autori	Fenoli (Folin-Ciocalteu) (mg catechina/Kg)
Bieta	fresca	Ninfali and Bacchiocca, 2003	850
Cavolfiori	freschi	Vinson <i>et al.</i> , 1998	522
		Stratil <i>et al.</i> , 2006	140
Mela	fresca	Duda-Chodak <i>et al.</i> , 2007	345-702
		Apak <i>et al.</i> , 2007	480
		Cieslik <i>et al.</i> , 2006	1230-1410
Lattuga	fresca	Vinson <i>et al.</i> , 1998	232
		Stratil <i>et al.</i> , 2006	268
Spinaci	freschi	Apak <i>et al.</i> , 2007	720
		Vinson <i>et al.</i> , 1998	493
		Stratil <i>et al.</i> , 2006	155
Broccoli	freschi	Bacchiocca <i>et al.</i> , 2006	1090
		Podsedek, 2007	822
	surgelati	Cieslik <i>et al.</i> , 2006	2440-3570
		Bacchiocca <i>et al.</i> , 2006	600
scottati(blanching)	Gebczynsky and Lisiewska, 2006	707	
Zucchine	fresche	Cieslik <i>et al.</i> , 2006	360-400

Tabella 5. Valori di letteratura relativi alla capacità antiossidante di campioni ortofrutticoli diversamente trattati

Campione	Trattamento	Autori	Capacità antiossidante (TEAC) (μmol Trolox/Kg)
Bieta	fresca	Ninfali and Bacchiocca, 2003	5000
Cavolfiori	freschi	Pellegrini <i>et al.</i> , 2003	1100
Mela	fresca	Scalzo <i>et al.</i> , 2005	800-2450
		Pellegrini <i>et al.</i> , 2003	1590
		Zitnanova <i>et al.</i> , 2006	7000
Lattuga	fresca	Pellegrini <i>et al.</i> , 2003	1300
		Apak <i>et al.</i> , 2007	140
Spinaci	freschi	Pellegrini <i>et al.</i> , 2003	8490
		Hunter and Fletcher, 2002	7020
		Bacchiocca <i>et al.</i> , 2006	2732
		Petti and Scully, 2009	8500
	surgelati	Bacchiocca <i>et al.</i> , 2006	3673
		Hunter and Fletcher, 2002	5367
Broccoli	freschi	Miglio <i>et al.</i> , 2008	1430
		Petti and Scully, 2009	3000
	cotti al vapore	Miglio <i>et al.</i> , 2008	4563
Zucchine	fresche	Pellegrini <i>et al.</i> , 2003	2860
		Miglio <i>et al.</i> , 2008	400
	cotte al vapore	Miglio <i>et al.</i> , 2008	700

La Tabella 5 riporta i dati di letteratura relativi alla capacità antiossidante dosata con il metodo TEAC. La descrizione dei metodi presenti in letteratura utilizzati per dosare la capacità antiossidante degli alimenti sono riportati nella terza sezione di questa tesi di dottorato.

2.1 EFFETTO DEI TRATTAMENTI TECNOLOGICI DI FRUTTA E VERDURA SUI POLIFENOLI

La presenza e la disponibilità delle sostanze fitochimiche è in funzione oltre che dei fattori menzionati nel paragrafo precedente, anche del trattamento tecnologico eventualmente subito dagli alimenti vegetali, sia esso domestico, artigianale o industriale. Alcuni trattamenti possono essere responsabili di diminuzioni, incrementi o cambiamenti nel contenuto e nella funzionalità (Carratù and Sanzini, 2005).

Le tabelle di composizione degli alimenti, necessarie per studi nutrizionali ed epidemiologici, riportano prevalentemente i dati relativi al contenuto in antiossidanti di alimenti consumati crudi e non prendono in considerazione come possa cambiare la concentrazione di tali nutrienti e la loro attività biologica in seguito a trattamenti tecnologici (Nicoli, 1999).

In genere, gli effetti dei trattamenti tecnologici sull'attività antiossidante degli alimenti sono il risultato di differenti condizioni, che possono manifestarsi consecutivamente o simultaneamente (Nicoli, 1999). La Tabella 6 mostra i cambiamenti che si possono verificare a carico delle proprietà antiossidanti in seguito ai trattamenti tecnologici e allo stoccaggio.

Tabella 6. Cambiamenti sulle proprietà antiossidanti in seguito a trattamenti tecnologici (Nicoli, 1999)

Nessun cambiamento	nessuna variazione del contenuto in antiossidanti naturali perdita di antiossidanti naturali bilanciata dalla contemporanea formazione di composti con nuove o maggiori proprietà antiossidanti
Aumento	miglioramento delle proprietà antiossidanti di composti naturalmente presenti formazione di nuovi composti dotati di attività antiossidante (es. prodotti della reazione di Maillard)
Diminuzione	perdita di antiossidanti naturali formazione di nuovi composti dotati di attività pro-ossidanti

Di seguito verranno descritti gli effetti sui polifenoli da parte dei trattamenti più comuni eseguiti su frutta e verdura.

Frammentazione.

Quando l'alimento viene sottoposto ad un trattamento di frammentazione subisce delle modifiche che possono portare ad una maggiore utilizzazione di alcuni composti. Studi recenti hanno suggerito che polifenoli parzialmente ossidati durante il trattamento possono mostrare un'attività antiossidante più elevata delle corrispondenti forme originarie; così come, durante la produzione di succhi, centrifugati, concentrati e del vino, le operazioni di macerazione facilitano la solubilizzazione dei polifenoli nel succo rendendoli disponibili per l'organismo umano.

Operazioni di mondatura, di taglio e di porzionatura inducono un impoverimento di diversi antiossidanti (Kaur and Kapoor, 2001).

A questo proposito Manach *et al.*, (2004) riportano che, durante la produzione di marmellate e conserve di frutta, il trattamento di frammentazione dei tessuti vegetali comporta una degradazione ossidativa dei polifenoli per effetto di una decompartmentazione e contatto dei substrati fenolici presenti nei vacuoli con le ossidasi citoplasmatiche (Carratù and Sanzini, 2005).

Il trattamento di blanching rappresenta uno strumento utile per prevenire l'imbrunimento enzimatico, che è la principale causa di perdita di antiossidanti e che viene applicato prevalentemente nella tecnologia di produzione dei vegetali surgelati. Frutta e verdura sottoposti al blanching conservano la maggior parte delle proprietà antiossidanti originali (Nicoli, 1999).

Fermentazione.

Il trattamento di fermentazione può rendere attivi alcuni composti per effetto di una modifica chimica della molecola. Questo procedimento è necessario per la produzione soprattutto dei derivati della soia, quali tofu, miso, salse di soia, yogurt e succedanei della carne; durante il

Sezione II

trattamento avviene l'idrolisi delle forme gluconate degli isoflavoni che si trasformano in molecole più attive. Anche durante la fase di fermentazione della vinificazione, i polifenoli presenti nella buccia dell'uva, vengono vantaggiosamente rilasciati nel mosto. Inoltre, durante la fermentazione delle foglie di tè verde, necessaria per la preparazione del tè nero, le catechine presenti si ossidano in sostanze aromatiche rendendo il tè più gradevole ma meno ricco in polifenoli (Carratù and Sanzini, 2005).

Trattamento termico.

La temperatura è uno dei fattori quasi sempre presente nei trattamenti di un alimento ed è il principale responsabile delle modificazioni a carico delle sostanze fitochimiche. In letteratura sono presenti diversi studi scientifici che valutano gli effetti della cottura sulle sostanze antiossidanti di frutta e vegetali; i risultati di tali lavori sono contraddittori, in quanto il contenuto in polifenoli e la relativa attività antiossidante può sia aumentare che diminuire rispetto agli alimenti freschi (Faller and Fialho, 2009); questo perché sono tanti i fattori che intervengono e influenzano il contenuto in polifenoli di un alimento.

La scottatura, che è un pretrattamento abbastanza comune a partire dal materiale crudo prima delle operazioni successive, provoca la denaturazione degli enzimi prevenendo così la distruzione enzimatica di alcuni fitocomposti che sono invece termoresistenti. Secondo Hunter and Fletcher (2002) gli spinaci subiscono con il blanching una perdita del 50% dell'attività antiossidante del prodotto crudo, mentre in seguito nel prodotto surgelato le proprietà antiossidanti rimangono costanti. Lo stesso effetto è stato riscontrato nei piselli, in cui la perdita dell'attività antiossidante è di circa il 20%.

La quercetina è sensibile alla temperatura: si è visto infatti che cipolle e pomodori perdono il 75-80% del contenuto iniziale dopo bollitura per 15 minuti, il 65% dopo cottura a microonde e il 30% dopo frittura. Similmente gli acidi fenolici subiscono una perdita nelle patate durante la preparazione industriale di frittura. La temperatura, mentre è causa della diminuzione del contenuto di vitamina C nei pomodori, aumenta la quantità di licopene e la capacità

antiossidante totale e lascia inalterati i livelli di polifenoli e flavonoidi totali. Gli isoflavoni della soia non vengono distrutti dal calore, ma piuttosto sono soggetti ad una conversione fra forme differenti; inoltre, le eventuali perdite riscontrate durante la cottura sarebbero il risultato del procedimento di lisciviazione e non della temperatura. Anche Coward *et al.*, (1998) non hanno trovato modificazioni significative nel contenuto totale di isoflavoni della soia in seguito alla cottura in forno o alla frittura, ma piuttosto un cambiamento nel loro profilo. Un'alterazione è stata riscontrata solo a temperature e tempi maggiori di quelli usualmente utilizzati nei trattamenti tecnologici (temperature comprese fra i 95 e 215 °C per più di 90 minuti) (Carratù and Sanzini, 2005).

La letteratura indica che la cottura domestica determina significative perdite nei contenuti e nella biodisponibilità dei composti, in particolar modo per l'acido ascorbico e i carotenoidi che sono altamente sensibili al calore. Al contrario i polifenoli e flavonoidi hanno mostrato una maggiore stabilità se esposti ad alte temperature (Faller and Fialho, 2009).

Alte pressioni.

Nel panorama dei trattamenti subiti dagli alimenti, bisogna anche considerare la tecnologia dell'alta pressione che viene utilizzata come valida alternativa ai metodi convenzionali di pastorizzazione e sterilizzazione. Studi condotti su carote, pomodori e broccoli hanno dimostrato che il loro contenuto in antiossidanti e la capacità antiossidante non subisce modifiche anche dopo un trattamento di pressurizzazione di 60 minuti; tuttavia, si possono produrre alterazioni strutturali fisico-chimiche che potrebbero alterarne la biodisponibilità.

Inoltre, per effetto della luce e/o dell'ossigeno atmosferico si può avere anche un depauperamento per modificazioni della struttura chimica; il trattamento può poi favorire o accelerare reazioni redox tra antiossidanti, ossigeno e/o altri costituenti (Carratù and Sanzini, 2005).

Congelamento.

Il congelamento produce una leggera diminuzione dell'attività antiossidante ma durante lo stoccaggio dei prodotti congelati non si verificano cambiamenti nelle proprietà antiossidanti (Kaur and Kapoor, 2001). In uno studio condotto da Ninfali and Bachiocchia, (2003) alcuni vegetali come la bieta, gli spinaci e la cipolla subiscono una riduzione sia del contenuto in polifenoli che dell'attività antiossidante, mentre i broccoli congelati conservano le proprietà antiossidanti rispetto ai prodotti freschi, probabilmente perché subiscono un trattamento di blanching più blando ed efficace rispetto agli altri vegetali.

Comunque le conseguenze del trattamento sul destino delle sostanze fitochimiche differisce in dipendenza dal tipo di trattamento che viene applicato, dalla concentrazione, dalla struttura chimica, dallo stato ossidativo, dalla localizzazione nella struttura vegetale e dalle possibili interazioni con altri componenti dell'alimento (Carratù and Sanzini, 2005).

CAPITOLO 3

LA RISTORAZIONE OSPEDALIERA

La ristorazione ospedaliera ha come obiettivo prioritario quello di garantire a tutti i degenti una nutrizione sana, equilibrata e variata, nonché mirata alle esigenze clinico-metaboliche dei singoli soggetti. Per raggiungere tale obiettivo sono necessarie adeguate scelte nel settore sanitario e nel settore amministrativo-gestionale.

Attualmente i settori coinvolti nella organizzazione e gestione del vitto all'interno delle strutture sanitarie sono molteplici:

- la Direzione Sanitaria, con relativi Servizi di Dietetica e Nutrizione Clinica o, in loro carenza, con i dietisti alla diretta dipendenza della Direzione Sanitaria;
- la Direzione Amministrativa con la Ripartizione Provveditorato ed Economato, da cui solitamente dipende il personale addetto alla preparazione e stoccaggio degli alimenti, se è presente una gestione a conduzione diretta, o la supervisione con responsabilità di verifica e controllo, se è presente una gestione di appalto.

I ruoli che la ristorazione ospedaliera è chiamata a svolgere sono i seguenti:

- mantenere e/o raggiungere uno stato di nutrizione adeguato alle condizioni cliniche e all'età del malato ricoverato;
- essere compendio o strumento di terapia nelle patologie necessitanti di interventi dieto-terapici specifici;
- garantire comfort e servizio alberghiero proporzionali al tenore di vita attuale della nostra popolazione;
- fornire elementi di educazione alimentare atti a far conoscere il valore di una alimentazione adeguata nel mantenimento di un buono stato di salute (Ciappellano, 2009).

Sezione II

Il pasto non assolve solo il compito di soddisfare il bisogno primario di nutrirsi, ma anche la necessità di un momento di convivialità e di comunicazione interpersonale recuperando con il cibo un rapporto positivo. Il momento del pasto, vissuto in modo consapevole, può diventare un momento forte di educazione alimentare, può consentire di valutare attentamente le proprie esigenze nutritive e di constatare la varietà e la stagionalità degli alimenti utilizzabili al fine di assicurare un'alimentazione sana e bilanciata. Non di minore importanza è la tradizione gastronomica della popolazione di riferimento, in particolare in un'epoca culturalmente e religiosamente multietnica (Decreto n.5250 del 26/05/09).

A seguito dell'entrata in vigore del cosiddetto "Pacchetto Igiene" e di ulteriori normative specifiche, gli operatori che appartengono o interagiscono con la filiera agroalimentare si trovano oggi ad affrontare un ampio spettro di responsabilità, che prescindono da ruoli, dimensione ed organizzazione; la complessità di tale situazione genera incertezze e costi per adeguare le procedure e le certificazioni. Per questi motivi chi si occupa di ristorazione ospedaliera deve mirare a raggiungere la qualità totale, intesa come sintesi degli elementi sopraccitati, qualità perseguibile mediante:

- l'implementazione del servizio dietetico ospedaliero;
- lo sviluppo di menù vari ed appetibili;
- l'attenzione ai sapori della tradizione locale;
- il soddisfacimento dei fabbisogni energetici e nutrizionali dei fruitori in considerazione delle patologie da cui sono affetti.

Il mantenimento e/o raggiungimento di uno stato di nutrizione adeguato è un problema pesantemente reale considerando:

- il forte aumento della malnutrizione per eccesso e delle patologie ad essa strettamente correlate – obesità, diabete mellito di tipo II, ipertensione arteriosa, dislipidemia – sindrome metabolica;

- l'elevata incidenza della malnutrizione per difetto o malnutrizione proteico-energetica conseguente all'invecchiamento della popolazione e al derivante incremento di patologie croniche a carattere invalidante.

La malnutrizione ospedaliera è infatti considerata una “malattia nella malattia”, con ricadute assai pesanti su tempi e costi di degenza (Decreto n.5250 del 26/05/09). Uno studio condotto dal Ministero della Salute svedese nel 2000 ha rilevato un aumento del tempo di degenza del 10-15% nei pazienti malnutriti, con un aumento dei costi annuali di ricovero ospedaliero che vanno dai 40-50 milioni di Euro per pazienti con malnutrizione lieve ai 100-150 milioni di Euro per i pazienti con malnutrizione severa (dati presentati al Congresso Espen, Bruxelles 2005) (www.regione.piemonte.it/sanita/index.htm).

Gli studi epidemiologici tratti dalla letteratura scientifica, dai più datati ai più recenti, evidenziano nei pazienti ricoverati valori di prevalenza di malnutrizione proteico-energetica fino al 30-40% e una copertura media di fabbisogni in termini energetici e di nutrienti in pazienti, stimabile intorno al 75%; viceversa, numerosi studi condotti sulla supplementazione nutrizionale e sul miglioramento della densità nutrizionale della dieta di pazienti ricoverati, hanno evidenziato una riduzione significativa della degenza media e delle complicanze a breve termine.

Fra i fattori che concorrono al peggioramento dello stato nutrizionale durante il ricovero gioca un ruolo determinante l'inadeguatezza del vitto ospedaliero, con conseguente elevato spreco di cibo. Un'indagine condotta nei principali ospedali di Parigi nel 2004 ha rilevato che il 40% del cibo preparato per i pazienti viene gettato via, perché consumato parzialmente (non gradito o non adatto ai pazienti) o richiesto ma non servito per problemi organizzativi (pazienti già dimessi o in regime di digiuno) (www.regione.piemonte.it/sanita/index.htm).

In particolare, nel campo della neuro-riabilitazione, carenze marginali di vitamine antiossidanti potrebbero influire sullo stato cognitivo di soggetti in età geriatrica e la

Sezione II

somministrazione di composti antiossidanti potrebbe rivestire un importante ruolo nel trattamento dell'ischemia cerebrale.

Da tali premesse emerge che la popolazione ospedaliera presenta una percentuale marcata di malnutrizione sia per eccesso che per difetto. In entrambe le situazioni un adeguato intervento nutrizionale costituisce – o potrebbe costituire qualora fosse attivato – un valido supporto alla terapia, se non la terapia stessa; l'intervento valutativo ed il trattamento nutrizionale al momento della diagnosi assumono grande importanza, rendendo necessaria una corretta gestione del pasto ospedaliero dalla valutazione iniziale del paziente alla consegna del pasto appropriato sino al suo consumo. È quindi importante organizzare e programmare idonei interventi rivolti a far sì che la ristorazione ospedaliera possa svolgere le funzioni precedentemente delineate.

La carenza di consapevolezza sull'importanza della nutrizione clinica e sullo stato nutrizionale suggerisce la necessità di un'educazione specifica e l'attuazione di protocolli condivisi. Su questa tematica è intervenuto, nel novembre 2003 a Strasburgo, il Comitato dei Ministri del Consiglio d'Europa, il quale, considerando gli effetti benefici di una corretta alimentazione, e ricordando l'elevata percentuale di pazienti denutriti negli ospedali europei, raccomanda che i governi degli stati membri:

- redigano ed implementino raccomandazioni nazionali sull'alimentazione e sulla terapia nutrizionale negli ospedali pubblici e nelle strutture sanitarie private;
- promuovano l'applicazione di tali raccomandazioni nelle strutture pubbliche e private;
- promuovano la diffusione di tali raccomandazioni tra tutte le parti coinvolte: autorità pubbliche, personale ospedaliero, servizi di medicina primaria, pazienti, ricercatori e organizzazioni non governative attive in questo campo.

Alcune regioni italiane, tra cui la Regione Lombardia, in seguito ad un'indagine conoscitiva condotta nel periodo tra il 2005 e 2007, in collaborazione con l'Università del Studi di Milano (Dipartimento di scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare), sulla

ristorazione nelle strutture ospedaliere pubbliche ha elaborato ed emanato con il Decreto n.5250 del 26/05/09 le *Linee Guida della Regione Lombardia per la ristorazione ospedaliera*. Ciò si è reso necessario anche sotto la spinta degli sviluppi normativi sia per quanto riguarda la legislazione in materia di sicurezza alimentare sia per quanto riguarda le normative in materia organizzativa del sistema sanitario. L'obiettivo delle Linee Guida è quello di costituire uno strumento utile per le strutture sanitarie per la definizione di metodi di lavoro, l'articolazione dei ruoli e delle responsabilità, le procedure gestionali ed operative fondamentali per un'efficace attuazione del servizio, nel rispetto delle norme e dei vincoli di budget.

3.1 I SISTEMI DI RISTORAZIONE

Il vitto ospedaliero, tra le sue peculiarità ha quella di fornire adeguate garanzie di carattere microbiologico, nutrizionale e chimico, senza alterazioni sostanziali delle caratteristiche organolettiche e, non in ultimo, dispone di elementi in grado di rendere gradevole la presentazione delle pietanze in modo da favorirne il consumo. La produzione di alimenti destinati a pazienti ricoverati, deve tener conto di diversi fattori controllabili e fondamentali per le caratteristiche attese del prodotto finito. In particolare, in ambito ospedaliero la ristorazione è frequentemente legata ad un servizio in conto "terzi", gestito da società esterne. È quindi indispensabile che tali alimenti siano oggetto di un preciso schema produttivo legato a flussi e metodologie produttive, con rischi accettabili, scaturiti da una attenta valutazione delle caratteristiche nutrizionali, microbiologiche e chimiche delle materie prime, semilavorati e prodotti finiti.

La preferenza verso l'impiego di alimenti freschi, in particolare delle verdure, trova maggiormente riscontro nella ristorazione scolastica e ancor di più negli asili nido e meno negli altri tipi di ristorazione. Tuttavia, i prodotti alimentari offerti oggi dal mercato quali sostituti dei prodotti freschi sono preparati utilizzando tecnologie sempre più controllate, volte

Sezione II

al contenimento delle inevitabili perdite di alcuni micronutrienti (prevalentemente vitamine) proprie dei processi di trasformazione e conservazione come nel caso delle verdure e della frutta di IV gamma e delle verdure surgelate sia in foglia (spinaci, erbe) che in pezzi (zucchine, melanzane) (Ciappellano, 2009).

Esistono diverse modalità di preparazione e di distribuzione dei pasti. La scelta del sistema migliore deve essere frutto di considerazioni di tipo economico, organizzativo, logistico relative alla specificità della struttura.

La preparazione dei pasti può avvenire:

1. *Cucina convenzionale in loco*: è la classica “gestione casalinga” ancora utilizzata soprattutto in piccole realtà.

Vantaggi:

- rapido passaggio del cibo dal luogo di produzione al luogo di somministrazione, con ridotta possibilità di sviluppo microbico e miglior conservazione delle caratteristiche organolettiche;
- distribuzione del pasto nelle vicinanze della cucina con possibilità di feedback immediato sul gradimento e su eventuali disservizi;
- maggiore scambio di informazioni, minore “disumanizzazione” del ciclo produttivo.

Svantaggi:

- può esserci una lievitazione dei costi rispetto ad organizzazioni complesse che si avvantaggiano di un utilizzo ottimale delle diverse figure professionali comunque indispensabili a garantire tutti gli aspetti di qualità del servizio.

2. *Cucina centralizzata*: è il centro di cottura, solitamente gestito da grandi aziende di ristorazione collettiva, che mediante una rete distributiva trasporta i pasti alle varie strutture.

Vantaggi:

- ottimizzazione dell’impiego del personale e abbattimento dei costi;
- maggiore professionalità a disposizione;

- possibilità di fornire un servizio anche a strutture decentrate che non potrebbero permettersi una cucina;
- possibilità di investimenti in strutture, tecnologie ed impianti moderni ed efficienti (abbattitore, macchine sottovuoto, controlli microbiologici).

Svantaggi:

- aumento dei problemi di gestione e di trasporto;
- tempi maggiori tra la preparazione dei pasti e il loro consumo con difficoltà di mantenere la catena del freddo e del caldo;
- difficoltà a mantenere le caratteristiche organolettiche degli alimenti con conseguente limitazioni nella scelta del menu;
- spersonalizzazione del rapporto “utente operatore del servizio” (www.regione.piemonte.it/sanita/index.htm).

I principali sistemi oggi utilizzati per la produzione di pasti nella ristorazione collettiva sono qui di seguito elencati:

- sistema fresco-caldo o convenzionale;
- sistema *cook & chill* o refrigerato;
- sistema *cook & freeze* o surgelato;
- sistema di cottura sottovuoto;
- sistema misto.

Per poter garantire, oltre alle caratteristiche nutrizionali e dietetiche, anche comfort, igiene e rispetto delle temperature previste per legge, il sistema di confezionamento e porzionatura deve prevedere l'utilizzo di vassoi termici personalizzati, quale che sia il metodo adottato per la preparazione dei pasti. L'utilizzo, ancor diffuso, di carrelli pluriporzione andrebbe superato per motivi igienico-sanitari, non adeguata garanzia delle temperature all'atto di somministrazione, controllo dell'adeguatezza della porzionatura e assenza di garanzia reale della possibilità di scelta da parte del malato (Ciappellano, 2009).

3.2 I MENÙ E LE DIETE

La ristorazione ospedaliera deve necessariamente prevedere:

- un menù base, storicamente denominato “vitto comune” o “dieta libera”, destinato a tutti coloro che non presentano particolari problematiche dietetico-nutrizionali;
- menù dietetici rivolti a pazienti con specifiche patologie dieta-correlate, che fanno riferimento a schemi dietetici predeterminati negli apporti: le cosiddette "Diete Standard" che compongono il Dietetico Ospedaliero, cioè una raccolta di diete a composizione bromatologica definita;
- diete speciali personalizzate, formulate individualmente per ogni singolo paziente con fabbisogni particolari o problematiche nutrizionali complesse, per cui non è possibile l'utilizzo di diete standard, né di menù predeterminati.

La valutazione, al momento del ricovero, del bisogno di alimentazione del paziente nonché della capacità di soddisfazione di questo bisogno, risulta essere lo snodo decisionale fondamentale per stabilire quale tipo di scelta effettuare al fine di soddisfare le sue effettive necessità dietetico-nutrizionali. Questo consente di ottimizzare l'alimentazione e ridurre gli sprechi. Nel contempo, la valutazione del rischio nutrizionale del paziente al momento del ricovero ed il successivo monitoraggio consentono di contrastare l'instaurarsi di stati di malnutrizione ospedaliera e/o di correggere situazioni di malnutrizione precedenti.

La prima valutazione del rischio nutrizionale, svolta secondo una procedura validata, deve costituire la prassi ed essere effettuata da personale individuato in base alle modalità organizzative di ciascuna Unità Operativa.

Indipendentemente dalle scelte organizzative adottate, i menù e le relative ricette devono seguire i criteri di seguito indicati.

Le **ricette** sono standardizzate ed hanno una composizione bromatologica prestabilita. Quindi sono definite negli ingredienti e nelle loro grammature unitarie, nelle modalità di preparazione

e cottura dei cibi, nel rispetto di presupposti di cucina dietetica che garantiscano la massima valorizzazione gustativa.

Il **menu** è articolato su un periodo minimo di due settimane (da estendere a quattro nel caso di strutture per lungodegenti), sia per la stagione estiva sia per quella invernale, rispettando nei limiti del possibile la stagionalità degli alimenti, in particolare per quanto riguarda ortaggi e frutta.

La **distribuzione della tipologia degli alimenti** (cereali, verdure, carne bianca, pesce...) nella giornata e nella settimana risponde alle frequenze di consumo contenute nei LARN.

La **formulazione del menù** tiene presente per quanto possibile la differenziazione della cultura alimentare di una popolazione di utenti sia per quanto riguarda l'età sia per quanto riguarda l'etnia e gli orientamenti etico-religiosi.

I **criteri** e le **modalità di approvvigionamento delle materie prime** vengono definiti privilegiando una logica di filiera corta, favorendo l'utilizzo di prodotti che esprimano la tipicità delle produzioni agroalimentari del territorio a marchio garantito. Questo per assicurare e sperimentare modelli ecosostenibili, valorizzando nel contempo la qualità e di conseguenza il soddisfacimento dell'utente.

Quotidianamente ogni portata prevede alcuni piatti fissi e due alternative, una più elaborata dal punto di vista culinario, l'altra cucinata in modo semplice.

Il menu base può essere modificato applicando opportune *griglie di correzione* per soddisfare le esigenze di pazienti con particolari necessità dietetico-nutrizionali (alimentazione di facile digeribilità o a consistenza modificata) in funzione di trattamenti diagnostici e/o terapeutici effettuati ed in particolare:

- a seguito di alcuni accertamenti diagnostici o di terapie fisiche o farmacologiche;
- nel periodo che precede o immediatamente successivo ad interventi chirurgici;
- in presenza di deficit della masticazione e/o della deglutizione (non gravi);

Sezione II

In questi casi i pazienti potranno comporre la propria giornata alimentare solo in modo guidato dal personale di reparto, personale che applica al menù base la griglia riduttiva o accrescitiva opportuna, stabilita su indicazione del personale medico e/o infermieristico. Di seguito sono riportati alcuni esempi di “griglie di correzione”.

Per tutti i pazienti con patologie sensibili a correzioni dietetiche precise (patologie dieta-correlate) si ricorre alle “*diete standard*” raccolte nel Dietetico Ospedaliero; per i pazienti con problematiche nutrizionali complesse (associazione di più patologie, co-presenza di sintomatologia dieta sensibile...) si richiede una “*dieta speciale personalizzata*” impostata su consulenza del Servizio Dietetico.

Le diete che ogni struttura ospedaliera garantisce per assicurare adeguati livelli di sicurezza nutrizionale sono:

- dieta ipocalorica a contenuto controllato in zuccheri semplici, grassi saturi e colesterolo;
- dieta iposodica;
- dieta ipoproteica;
- dieta senza glutine;
- dieta a basso residuo e senza lattosio;
- diete per rialimentazione.

I criteri di stesura di tali menù devono attenersi a queste indicazioni:

- *modificare il menù di base* secondo le differenti necessità dietetiche, mantenendolo comunque come punto di riferimento principale, al fine di rendere più agevole la programmazione dell’approvvigionamento delle derrate alimentari e di facilitare le procedure di cucina. Questa strategia, fra l’altro, favorisce l’accettazione della restrizione dietetica da parte del paziente;
- *applicare le correzioni dietetiche* utilizzando protocolli validati dalle evidenze epidemiologiche indicate nelle Linee Guida delle Società Scientifiche che si occupano

rispettivamente dei vari ambiti di patologia (diabete, obesità, nefropatie, celiachia, ipertensione...);

- *applicare le indicazioni dietetiche*, sia rispetto alle tecniche di manipolazione e cottura degli alimenti, sia rispetto all'utilizzo di alimenti a composizione speciale (alimenti per celiaci, alimenti aproteici);
- *valutare* sempre la qualità sensoriale e di gradevolezza della ricetta finita (Decreto n.5250 del 26/05/09).

CAPITOLO 4

SCOPO

Le ricerche svolte per trovare la causa di alcune tra le più diffuse malattie del nostro tempo e per cercare di scoprire le cause dell'invecchiamento hanno messo in evidenza che gran parte dei danni provocati alle cellule è dovuta a fenomeni ossidativi contro cui l'organismo è in grado di difendersi grazie a sostanze che, naturalmente presenti o introdotte con la dieta, offrono protezione dall'azione dei radicali liberi o dagli altri agenti che inducono lo stress ossidativo: gli antiossidanti.

Gli alimenti di origine vegetale (frutta, verdura, per eccellenza), svolgono un ruolo di primaria importanza nella regolazione e/o prevenzione dei meccanismi ossidativi, essendo i principali apporti di sostanze antiossidanti (soprattutto polifenoli, le vitamine A, C, E, i carotenoidi).

Vari studi scientifici riguardano la caratterizzazione di questi composti presenti in frutta e vegetali; essi possono variare, in termini di quantità, in seguito a diversi fattori, come la varietà, epoca e modalità di coltivazione e il tipo di trattamento tecnologico a cui vanno incontro.

Considerando la particolare importanza che assume il servizio di ristorazione ospedaliero come strumento terapeutico e di educazione alimentare, per lo stretto legame tra alimentazione e salute, obiettivo della presente attività di ricerca è stata la determinazione del contenuto in polifenoli e stima della relativa capacità antiossidante in campioni ortofrutticoli diversamente trattati, prelevati in tempi diversi con frequenza bimestrale, in due mense ospedaliere, per un totale di 3 prelievi per ogni mensa.

In particolare sono stati campionati e analizzati i prodotti ortofrutticoli, ritenuti più rappresentativi, sia prima che dopo la fase di preparazione, fino al momento della somministrazione al paziente, valutando anche l'evoluzione dei composti fenolici in seguito al trattamento di cottura.

Quest'attività di ricerca fa parte di un progetto multidisciplinare dal titolo Sicurezza Alimentare 8.1.f-8.2.e-*“Sicurezza alimentare e ristorazione ospedaliera: valutazione dei rischi nella neuro-riabilitazione”* finanziato dal Ministero della Sanità, che va a analizzare i rischi nella filiera della ristorazione ospedaliera affrontando aspetti legati sia alla sicurezza alimentare sia alla sicurezza nutrizionale del paziente ricoverato, con l'obiettivo finale di elaborare linee guida e procedure/protocolli in grado di determinare un miglioramento della sicurezza igienico-sanitaria e nutrizionale da applicarsi nella ristorazione ospedaliera.

Lo stesso progetto ha previsto oltre alla valutazione chimico-nutrizionale dei pasti proposti anche quella microbiologica, nonché la valutazione nutrizionale dei pazienti affetti da neuropatologie arruolati nella sperimentazione e l'attuazione di audit programmati per la valutazione dell'efficacia del servizio/prodotti erogati.

CAPITOLO 5

MATERIALI E METODI

5.1 CAMPIONAMENTO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Presso due mense ospedaliere indicate in seguito con A e B sono stati prelevati differenti prodotti ortofrutticoli. Sono stati effettuati per ogni mensa 3 prelievi in periodi diversi.

I prodotti ortofrutticoli prelevati sono stati scelti in seguito alla somministrazione di una check-list appositamente redatta, in modo da individuare e definire le tipologie di materie prime e di prodotti finiti più ricorrenti nelle pietanze somministrate da entrambe le mense ospedaliere nell'arco del progetto.

I campioni prelevati e analizzati sono indicati in Tabella 7.

Tabella 7. Prodotti ortofrutticoli prelevati nelle mense ospedaliere A e B

1°-2° Prelievo mensa A	1°-2° Prelievo mensa B	3° Prelievo mensa A	3° Prelievo mensa B
Bieta surgelata	Bieta surgelata	Spinaci surgelati	Spinaci surgelati
Bieta cotta	Bieta cotta	Spinaci cotti	Spinaci cotti
Zucchine surgelate	Zucchine surgelate		
Zucchine cotte	Zucchine cotte		
Cavolfiori surgelati	Cavolfiori surgelati	Broccoli surgelati	Broccoli surgelati
Cavolfiori cotti	Cavolfiori cotti	Broccoli cotti	Broccoli cotti
Mela fresca	Mela fresca	Mela fresca	Mela fresca
Mela cotta	Mela cotta	Mela cotta	Mela cotta
Lattuga	Lattuga	Lattuga	Lattuga

Bieta (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*); Cavolfiori (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*); Zucchine (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*); Lattuga romana (*Lactuca sativa* L.); Mela (*Malus domestica*); Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*); Spinaci (*Spinacia oleracea* L.)

Tutti i prodotti ortofrutticoli cotti, ad eccezione della mela sono stati sottoposti ad un processo di cottura al vapore ($T > 100^{\circ}\text{C}$), mentre la mela ha subito, intera non porzionata, una cottura al forno ($T \sim 200^{\circ}\text{C}$).

I campioni considerati sono stati trattati immediatamente dopo il prelievo.

Relativamente ai campioni surgelati essi sono stati sminuzzati con le forbici, mentre nel caso della mela e della lattuga si è proceduto ad una prima parziale riduzione della matrice con l'ausilio di un coltello/forbice; il campione è stato quindi omogeneizzato in mortaio con aggiunta di azoto liquido, al fine di ridurlo in particelle piccolissime e di evitare l'ossidazione enzimatica. In alcuni casi è stata necessaria anche una veloce triturazione al macinino. Le procedure di preparazione sono state eseguite al riparo dalla luce, al fine di prevenire l'isomerizzazione e la fotodegradazione dei composti antiossidanti.

Sia i campioni solo triturati che i campioni omogeneizzati in mortaio con azoto liquido sono stati conservati a -18°C e analizzati in triplo per la determinazione del contenuto in polifenoli e stima della capacità antiossidante.

5.2 ESTRAZIONE E DETERMINAZIONE DEI POLIFENOLI E DELLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE

Il metodo di estrazione (A), dosaggio dei polifenoli totali (B) e nei campioni ortofrutticoli adottato è quello riportato da Georgé *et al.*, (2005) che ottimizza il classico saggio spettrofotometrico dei polifenoli totali con il Folin-Ciocalteu, coniugando una rapida estrazione in fase solida (cartuccia C_{18} OASIS HLB), con stima del contenuto in sostanze interferenti riducenti non fenoliche; per quanto riguarda la determinazione della capacità antiossidante totale a partire dallo stesso estratto si è scelto di operare secondo il metodo TEAC (C) (Re *et al.*, 1999) (Figura 6).

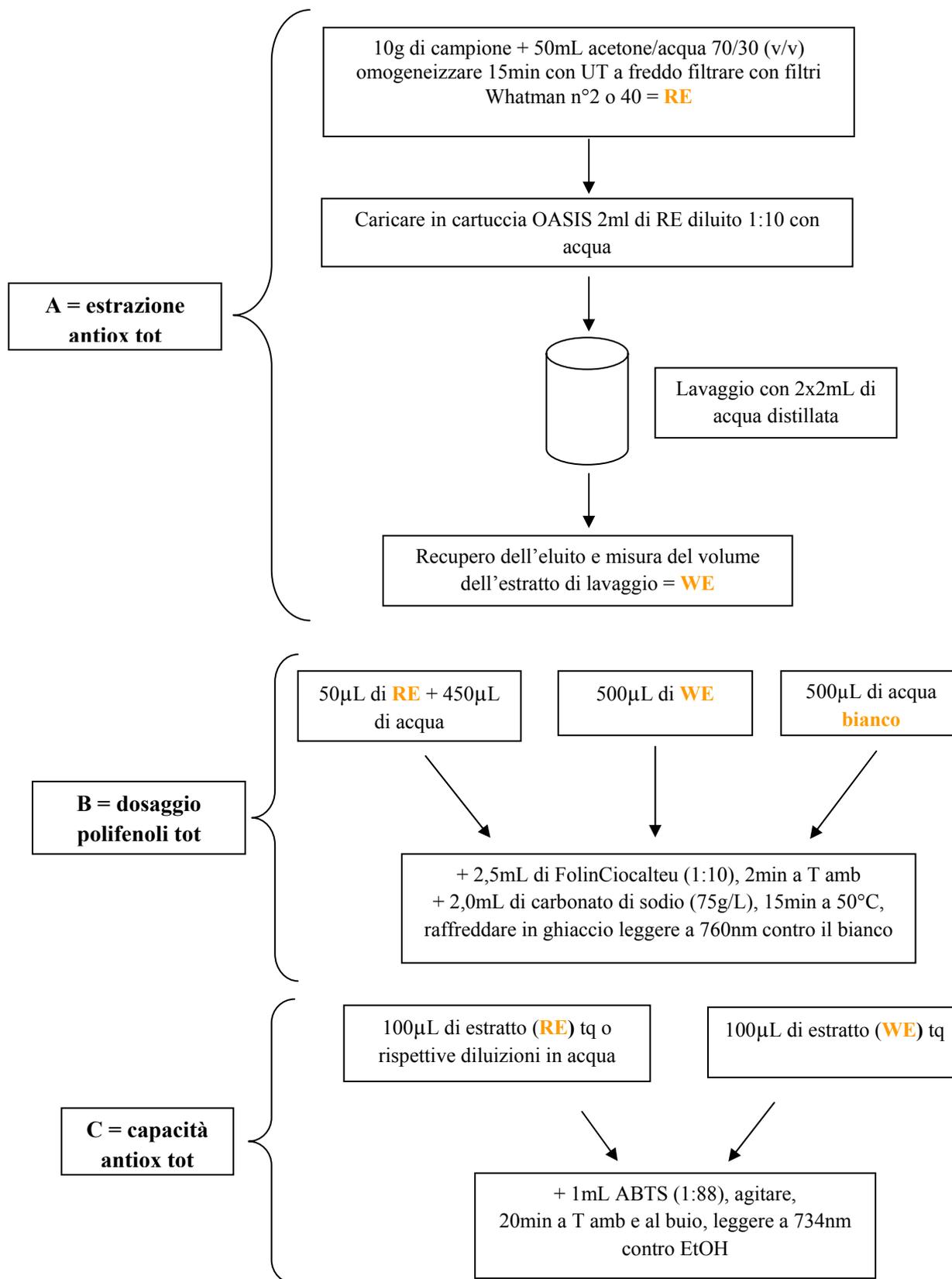


Figura 6. Estrazione e dosaggio dei polifenoli totali e capacità antiossidante in campioni ortofruitticoli (Georgé *et al.*, 2005)

A) Estrazione dei fenoli totali con il metodo riportato da Georgé *et al.*, (2005)

A 10 g di campione opportunamente preparato sono aggiunti 50mL di soluzione di estrazione acetone/acqua 70/30 (v/v), omogeneizzando per 15min con Ultraturax (UT) in ghiaccio e al buio e filtrando con filtri Whatman n°2 o 40 = RE (Raw Extract). Segue il passaggio in cartuccia C₁₈ OASIS di 2mL di RE, diluito 1:10 (per evitare che l'acetone della soluzione di estrazione possa danneggiare la cartuccia), ed il lavaggio con 2x2mL di acqua al fine di ottenere il WE (Water Extract), ossia l'insieme delle sostanze interferenti di natura idrofila, (eccetto quelle di natura fenolica trattenute in cartuccia) soprattutto la vitamina C, che verranno considerate e detratte dal calcolo finale del contenuto in fenoli totali.

B) Determinazione dei fenoli totali mediante Folin-Ciocalteu

I fenoli totali (RE-WE) sono quantizzati con il saggio colorimetrico del Folin-Ciocalteu. Questo prevede la preparazione del campione (RE) diluendone 50µL in 450µL di acqua e dell'estratto dopo cartuccia OASIS (WE), prelevandone 500µL. Ai 500µL finali di RE, WE e del bianco (500µL di acqua) sono aggiunti 2,5mL del reattivo Folin-Ciocalteu (diluito 1:10) a temperatura ambiente e, dopo 2min, 2mL di carbonato di sodio (75g/L), il quale è fatto reagire per 15min a 50°C. Dopo aver raffreddato in ghiaccio, sono allestite le letture allo spettrofotometro a 760nm contro il bianco.

Il contenuto in fenoli è calcolato in termini di RE-WE ed espresso come mg catechina/Kg campione mediante la seguente formula:

$$\text{RE-WE} = \text{valore finale in fenoli totali/Kg campione}$$

$$\text{RE (mg catechina/Kg campione)} = (\text{Abs/m}) * \text{Vi/Pi}$$

nel caso specifico:

$$m = 0,001 = \text{coefficiente angolare retta di taratura con catechina come std } (\mu\text{g/ml})^{-1}$$

$$\text{Vi/Pi} = 50\text{mL (soluzione di estrazione)}/10\text{g (pesata campione iniziale)}$$

Sezione II

$$\text{WE (mg catechina/Kg campione)} = [(\text{Abs/m}) * \text{Vi/Pi}]/10$$

nel caso specifico:

$m = 0,001$ = coefficiente angolare retta di taratura con catechina come std

$\text{Vi/Pi} = 4/0,04 = 100$

dove 100 deriva da:

$$10\text{g}/50\text{mL} = 0,2\text{g/mL}$$

RE diluito 1:10 – 0,02g/mL

$$\text{Caricati } 2\text{mL (RE 1:10)} - (0,02 * 2) = 0,04\text{g}$$

$$0,04\text{g in } 4\text{mL (volume finale WE)} = 100$$

Il fattore 10 deriva dal fatto che:

avendo pipettato 500 μL per il dosaggio del WE (e non 50 μL in 450 μL di acqua come per RE), dobbiamo dividere i g/mL ottenuti per un fattore 10, quindi $100/10 = 10$ = fattore di moltiplicazione per il calcolo finale del WE

La retta di taratura allestita è stata effettuata utilizzando la catechina come standard.

C) Determinazione della capacità antiossidante con il metodo TEAC

Il metodo TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) selezionato per la determinazione della capacità antiossidante totale è basato sulla neutralizzazione del catione radicalico ABTS^+ , formato dall'ossidazione di un cromoforo di origine sintetica, l'ABTS, dalla forte capacità assorbente (700-750nm), in accordo con la reazione $\text{ABTS} - e^- \Rightarrow \text{ABTS}^+$. Il radicale è preparato a partire da una reazione di ossidazione dell'ABTS con il persolfato di potassio. Il radicale reagisce velocemente con un donatore di elettroni/ioni idrogeno a formare l'ABTS incolore. Un aumento della concentrazione di ABTS è linearmente dipendente dalla

concentrazione degli antiossidanti, incluso il Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), standard usato per la calibrazione.

Il TEAC valuta la capacità degli antiossidanti di ridurre il catione radicalico ABTS⁺ effettuata misurando il grado di inibizione (I%) del valore di assorbanza a 734nm. In dettaglio 44μL di una soluzione di persolfato di potassio 140mM (0,378g del sale sciolti in 10mL di acqua distillata) sono addizionati ad una soluzione acquosa di ABTS 7mM (1 tablets da 10mg sciolta in 2,5mL di acqua distillata). La soluzione ottenuta, al fine di garantire il raggiungimento di un valore stabile di assorbanza, viene conservata al buio e a 4°C per almeno 12 ore. Al momento dell'analisi la soluzione è diluita con etanolo (circa 1:88 v/v) e sottoposta ad una lettura di assorbanza a 734nm contro etanolo assoluto, verificandone una densità ottica pari a 0,700-0,750. Le letture sono eseguite tutte dopo 20 minuti dalla preparazione del campione (stabilità del plateau di reazione), costituito da 1mL della soluzione diluita di ABTS (1:88), da un volume noto di campione (eventualmente diluito) e dal complemento a 100μL della soluzione in cui il campione è risospeso (volume finale 1,1mL), sempre contro etanolo assoluto.

I risultati finali sono espressi come nmoli di Trolox/g campione, ottenuti dai seguenti passaggi:

$$\text{nmoli Trolox/g campione} = \text{nmoli Trolox calcolate/ Pf}$$

dove:

$$\text{nmoli Trolox} = (\text{I\%/4,5698}) * \text{f.d}$$

$$\text{I\%} = (1 - \text{Af/Ai}) * 100$$

Ai = Abs iniziale del catione radicalico;

Af = Abs misurata 20 minuti dopo l'aggiunta dell'antiox

4,5698 = coefficiente angolare derivante dalla taratura con Trolox (antiox di sintesi) (nmol⁻¹)

f.d. = fattore di diluizione eventualmente allestita

Sezione II

Nel caso specifico il Pf (quantità di campione finale in cuvetta) riporta ad un g di campione le nmoli di Trolox calcolate per i campioni ortofrutticoli.

$$Pf = (Pi * mL \text{ pipettati dosaggio}) / Vi = (10g * 0,100mL) / 50mL = 0,02g$$

dove: Pi = quantità iniziale di campione

Vi = volume iniziale di omogeneizzato

Per uniformare i dati della capacità antiossidante con quelli dei polifenoli i dati sono stati espressi come **µmoli Trolox/Kg** campione.

Anche per l'applicazione del TEAC è stata allestita una retta di taratura utilizzando il Trolox (antiossidante di sintesi) come standard. Inoltre è stato valutato l'intervallo di linearità del metodo.

5.3 ANALISI STATISTICA

Sui risultati ottenuti è stata applicata un'analisi della varianza con il test di Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$) al fine di valutare la significatività dei dati.

CAPITOLO 6

RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 CONTENUTO IN POLIFENOLI DEI PRODOTTI ORTOFRUTTICOLI

I risultati relativi al contenuto in polifenoli dei campioni ortofrutticoli diversamente trattati prelevati presso le mense ospedaliere A e B sono riportati in Tabella 8 e 9, rispettivamente. I valori sono espressi come media e deviazione standard dei campioni per ogni prelievo, media dei prelievi e coefficiente di variazione, che può dare un'indicazione della variabilità del contenuto in polifenoli nei diversi campionamenti. Poiché nel terzo prelievo di entrambe le mense sono stati campionati alcuni prodotti ortofrutticoli diversi dai precedenti, le Tabelle 8 e 9 riportano solo i risultati relativi al 1° e 2° campionamento, fatta eccezione per la mela e la lattuga, per i quali sono presenti in Tabella anche i risultati del terzo prelievo. Il contenuto in polifenoli dei broccoli e spinaci diversamente trattati campionati nel terzo prelievo sono riportati in Tabella 10.

I valori in polifenoli riscontrati sono in accordo con quanto riportato in letteratura dai diversi autori (Tabella 4).

Relativamente alla mensa ospedaliera A (Tabella 8), la mela fresca e cotta presentano il più alto contenuto in polifenoli (1223,4 e 1202,8 mg catechina/Kg su sostanza fresca, rispettivamente), seguiti dalla bieta, cavolfiori e zucchine, sia surgelati che cotti; i campioni di lattuga presentano in assoluto il contenuto più basso in polifenoli (122,8 mg catechina/Kg sostanza fresca).

Nell'ambito dello stesso prodotto ortofrutticolo, la variabilità del contenuto in polifenoli durante i prelievi nella mensa A, espressa dal CV%, ha mostrato valori più bassi nella mela fresca, cotta e nelle zucchine cotte (8-10-13%, rispettivamente), raggiungendo valori più alti nell'intervallo di 24-37% per gli altri prodotti ortofrutticoli. Questa maggiore variabilità potrebbe essere dovuta a diversi fattori, come la varietà e il periodo di campionamento.

Tabella 8. Contenuto in polifenoli di campioni ortofruitticoli diversamente trattati prelevati presso la mensa ospedaliera A

Mensa A		Polifenoli (mg catechina/Kg s.f.)			
			Media±DS	Media	CV%
Bieta	surgelata	1)	561,5±9,55	738,0	34
		2)	914,5±11,31		
Bieta	cotta	1)	537,0±1,59	704,3	34
		2)	871,5±35,36		
Zucchine	surgelate	1)	271,3±57,98	220,1	33
		2)	168,8±6,72		
	cotte	1)	249,4±65,23	228,5	13
		2)	207,6±25,65		
Cavolfiori	surgelati	1)	242,8±18,03	327,9	37
		2)	412,9±67,00		
	cotti	1)	201,3±13,79	242,7	24
		2)	284,0±28,38		
Mela	fresca	1)	1142,8±59,47	1223,4	8
		2)	1197,4±4,77		
		3)	1330,0±98,38		
	cotta	1)	1064,3±39,60	1202,8	10
		2)	1237,8±39,42		
		3)	1306,3±100,61		
Lattuga	fresca	1)	171,3±20,15	122,8	34
		2)	102,1±3,71		
		3)	95,1±6,34		

Relativamente alla mensa B (Tabella 9), sono confermati i dati riscontrati nella mensa A; infatti la mela fresca e cotta presentano il contenuto più alto in polifenoli (1481,5 e 1398,8 mg catechina/Kg tal quale), seguiti dalla bieta, la lattuga, che ha mostrato un contenuto maggiore rispetto alla mensa A, e dai cavolfiori, mentre le zucchine sia surgelate che cotte hanno evidenziato i valori più bassi.

Tabella 9. Contenuto in polifenoli di campioni ortofrutticoli prelevati presso la mensa ospedaliera B

Mensa B		Polifenoli (mg catechina/Kg s.f.)			
			Media±DS	Media	CV%
Bieta	surgelata	1)	1342,4±58,87	1204,0	16
		2)	1065,6±52,86		
	cotta	1)	1215,0±7,07	1107,3	14
		2)	999,5±92,98		
Zucchine	surgelate	1)	299,1±19,27	232,1	41
		2)	166,0±13,44		
	cotte	1)	274,8±22,27	235,6	24
		2)	196,4±19,27		
Cavolfiori	surgelati	1)	276,1±12,2	356,3	32
		2)	436,4±33,41		
	cotti	1)	255,3±16,62	309,2	25
		2)	363,0±9,55		
Mela	fresca	1)	1738,8±130,46	1481,5	15
		2)	1336,8±109,25		
		3)	1369,1±24,22		
	cotta	1)	1464,6±129,99	1398,8	5
		2)	1402,3±57,28		
		3)	1329,5±3,89		
Lattuga	fresca	1)	394,5±61,52	345,3	13
		2)	328,1±86,04		
		3)	313,4±22,40		

Relativamente alla variabilità del contenuto in polifenoli nel corso dei campionamenti, espressa dal CV%, i valori più bassi si pongono nell'intervallo tra il 5-16% per mela, lattuga e bieta, mentre per le zucchine e i cavolfiori sia surgelati che cotti si osservano valori più alti (intervallo tra 24-41%).

Sezione II

Relativamente ai broccoli e agli spinaci, presenti solo nel 3° campionamento delle due mense, i due prodotti ortofrutticoli hanno presentato un contenuto piuttosto alto in polifenoli, attestandosi intorno a valori di 892,3 e 660,8 mg catechina/Kg, rispettivamente (Tabella 10).

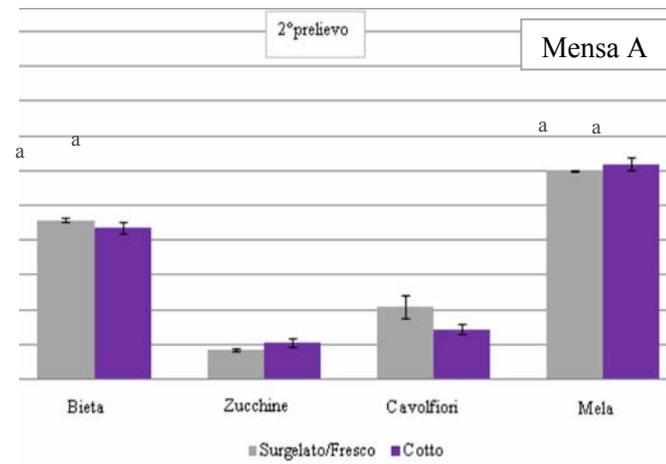
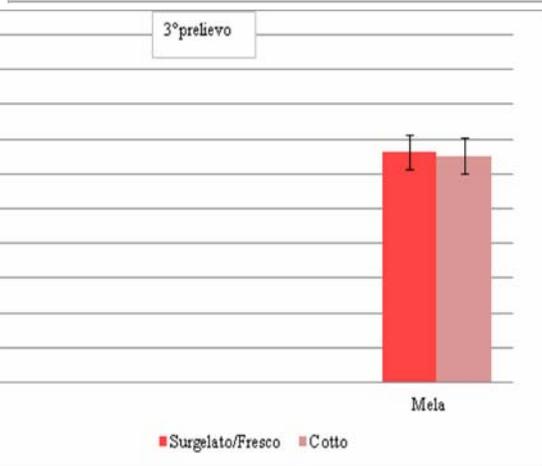
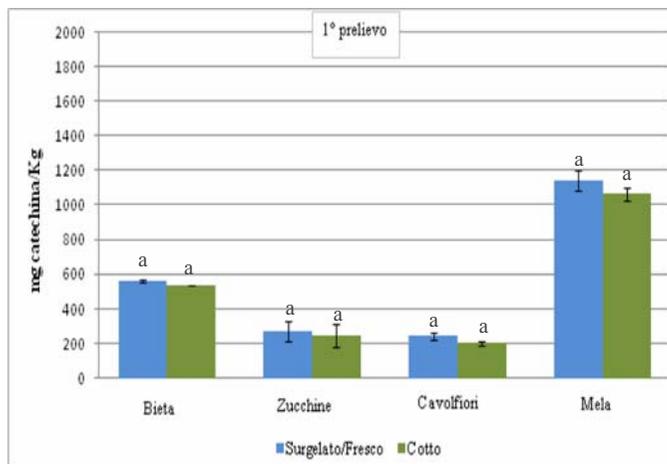
In questi campioni la variabilità del contenuto in polifenoli tra le due mense si mantiene su valori piuttosto bassi (CV= 2-6%).

Tabella 10. Contenuto in polifenoli dei campioni ortofrutticoli del 3° prelievo delle mense A e B

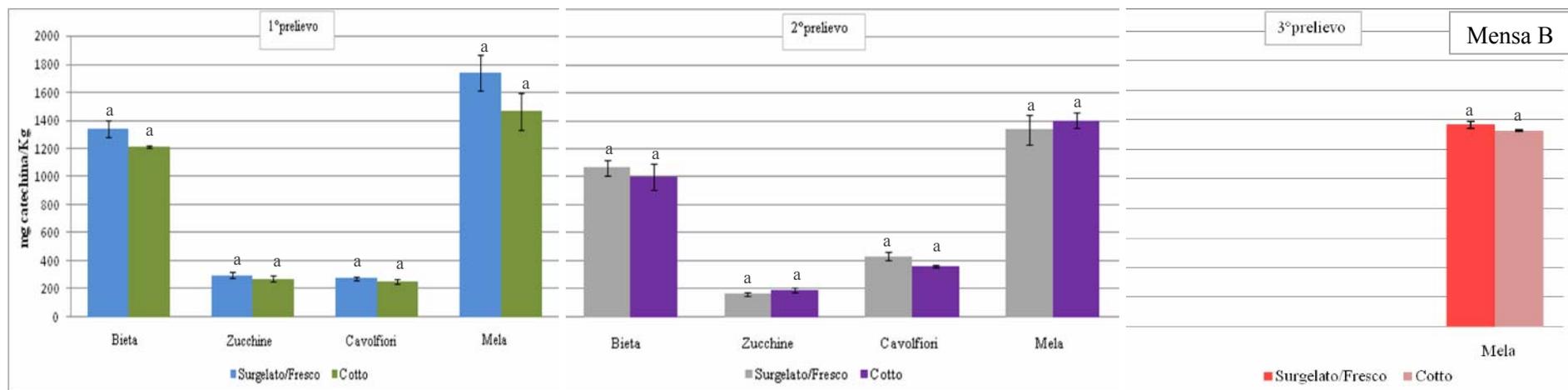
		Polifenoli (mg catechina/Kg s.f.)			
		Media ± DS	Media	CV%	
Broccoli	surgelati	3) Mensa A	914,7±45,76 ^a	892,3	4
		3) Mensa B	869,9±25,28 ^a		
	cotti	3) Mensa A	832,5±24,83 ^a	816,2	3
		3) Mensa B	796,8±8,84 ^a		
Spinaci	surgelati	3) Mensa A	689,1±56,39 ^a	660,8	6
		3) Mensa B	632,5±51,97 ^a		
	cotti	3) Mensa A	636,8±45,25 ^a	645,3	2
		3) Mensa B	653,8±20,51 ^a		

^a Differenti lettere nello stesso campione indicano differenze significative (p<0,05)

Il confronto tra il contenuto in polifenoli tra i prodotti ortofrutticoli surgelati/freschi e cotti tra le due mense ospedaliere A e B è rappresentato in Figura 7.



Sezione II



^{a,b} Differenti lettere nello stesso campione e nello stesso campionamento indicano differenze significative ($p < 0,05$)

Figura 7. Contenuto in polifenoli dei prodotti ortofrutticoli diversamente trattati prelevati presso le mense ospedaliere A e B

Non si osservano variazioni significative nel contenuto in polifenoli durante la cottura per tutti i prodotti ortofrutticoli ($p \geq 0,05$). La letteratura riporta risultati contrastanti riguardo gli effetti dei trattamenti tecnologici su frutta e verdura, in quanto diversi sono i fattori che influenzano il contenuto in antiossidanti negli alimenti di origine vegetale. L'assenza di cambiamenti nel contenuto di polifenoli potrebbe essere spiegata dal fatto che i prodotti surgelati hanno già subito un processo di blanching, per prevenire l'ossidazione enzimatica, prima di subire il trattamento di surgelazione. Infatti Hunter and Fletcher (2002) riportano una perdita di antiossidanti in seguito al trattamento di blanching degli spinaci e dei piselli mentre nel prodotto surgelato le proprietà antiossidanti rimangono costanti. In letteratura pochi studi scientifici considerano gli effetti del trattamento di cottura sui prodotti surgelati.

È da sottolineare che nella mela, la cottura in forno non ha determinato alcun effetto significativo, probabilmente anche perché il frutto è stato cotto senza subire operazioni di taglio che avrebbero potuto determinare fenomeni di ossidazione enzimatica e, quindi, perdita di polifenoli.

Le Tabelle 11 e 12 riportano il contenuto medio in polifenoli, il coefficiente di variazione, valori minimi e massimi dei prodotti ortofrutticoli surgelati/freschi e cotti, rispettivamente, tra le due mense A e B.

Il contenuto medio in polifenoli va da un minimo di 226,1 mg catechina/Kg delle zucchine surgelate ad un massimo di 1352,5 mg catechina/Kg della mela. Nell'ambito dello stesso alimento, il contenuto medio in polifenoli tra le due mense presenta valori simili nella maggior parte dei campioni, essendo il CV% compreso nell'intervallo tra 4-14% per zucchine, cavolfiori, mela, broccoli e spinaci; bieta e lattuga, invece, hanno mostrato una variabilità nel contenuto molto più elevata, presentando un CV% pari a 34 e 67%, rispettivamente.

Tabella 11. Contenuto medio in polifenoli dei prodotti ortofrutticoli surgelati prelevati nelle mense ospedaliere A e B

Prodotti ortofrutticoli freschi/surgelati	Polifenoli (mg catechina/Kg s.f.)			
	Media	CV%	Min	Max
Bieta	971,0	34	561,5	1342,4
Zucchine	226,1	4	166,0	299,1
Cavolfiori	342,1	6	242,8	436,4
Mela	1352,5	14	1142,8	1738,8
Lattuga	234,1	67	95,1	394,5
Broccoli*	892,3	4	869,9	914,7
Spinaci*	660,8	6	632,5	689,1

*solo un campionamento per entrambe le mense

Relativamente ai prodotti ortofrutticoli cotti, è confermato quanto descritto per i rispettivi prodotti surgelati/freschi, sia per quanto riguarda i valori minimi e massimi del contenuto medio sia per quanto riguarda la variabilità tra le due mense (Tabella 12).

Tabella 12. Contenuto medio in polifenoli dei prodotti ortofrutticoli cotti prelevati tra le mense ospedaliere A e B

Prodotti ortofrutticoli cotti	Polifenoli (mg catechina/Kg s.f.)			
	Media	CV%	Min	Max
Bieta	905,8	31	537,0	1215,0
Zucchine	232,1	2	196,4	274,8
Cavolfiori	276,0	17	201,3	363,0
Mela	1300,8	11	1064,3	1464,6
Broccoli*	814,7	3	796,8	832,5
Spinaci*	645,3	2	636,8	636,8

*solo un campionamento per entrambe le mense

6.2 CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE DEI PRODOTTI ORTOFRUTTICOLI

Le Tabelle 13 e 14 riportano i risultati relativi alla capacità antiossidante dei campioni ortofrutticoli diversamente trattati prelevati presso le mense ospedaliere A e B, rispettivamente. I valori sono espressi come media e deviazione standard dei campioni prelevati nei singoli campionamenti, media dei prelievi e coefficiente di variazione, che può dare un'indicazione della variabilità della capacità antiossidante nel corso dei campionamenti. Poiché nel terzo prelievo di entrambe le mense sono stati campionati alcuni prodotti ortofrutticoli diversi dai precedenti, le Tabelle 13 e 14 riportano solo i risultati relativi al 1° e 2° campionamento, fatta eccezione per la mela e la lattuga, per i quali sono presenti in Tabella anche i risultati del terzo prelievo. La capacità antiossidante dei broccoli e spinaci diversamente trattati campionati nel 3° prelievo è riportata in Tabella 15.

I valori riscontrati sono in accordo con i dati di letteratura sulla capacità antiossidante dei diversi prodotti ortofrutticoli riportati in Tabella 5.

Relativamente alla mensa ospedaliera A (Tabella 13), come per il contenuto in polifenoli la mela fresca e cotta hanno presentato la maggiore capacità antiossidante (4730,0 e 5206,3 $\mu\text{mol Trolox/Kg}$ tal quale, rispettivamente), mentre i rimanenti campioni hanno mostrato una capacità antiossidante che si assesta intorno ai 2000 $\mu\text{mol Trolox/Kg}$ di sostanza fresca.

Nell'ambito dello stesso prodotto ortofrutticolo, la variabilità del valore di capacità antiossidante, espressa dal CV%, ha mostrato valori più bassi nella mela sia fresca che cotta, nei cavolfiori cotti e nella bieta surgelata e cotta (CV% compreso tra 3 e 19%), raggiungendo valori più alti nell'intervallo di 20-37% per gli altri prodotti ortofrutticoli. Come indicato in precedenza per i polifenoli questa maggiore variabilità potrebbe essere dovuta ad una diversa presenza di composti ad attività antiossidante dovuta a diversi fattori, come la varietà e il periodo di campionamento e le tecniche colturali.

Tabella 13. Capacità antiossidante di campioni ortofrutticoli prelevati presso la mensa A

Mensa A		Capacità antiossidante ($\mu\text{mol Trolox/Kg s.f.}$)			
			Media \pm DS	Media	CV%
Bieta	surgelata	1)	2414,6 \pm 195,46	2591,4	10
		2)	2768,2 \pm 139,20		
	cotta	1)	1884,7 \pm 164,00	2185,8	19
		2)	2483,8 \pm 198,25		
Zucchine	surgelate	1)	2654,1 \pm 64,20	2106,7	37
		2)	1559,2 \pm 94,55		
	cotte	1)	2770,8 \pm 125,26	2242,6	33
		2)	1714,4 \pm 303,5		
Cavolfiori	surgelati	1)	2239,4 \pm 89,45	1967,0	20
		2)	1694,5 \pm 48,11		
	cotti	1)	1501,9 \pm 56,65	1424,8	8
		2)	1347,6 \pm 38,70		
Mela	fresca	1)	4832,7 \pm 164,54	4730,0	4
		2)	4849,6 \pm 160,46		
		3)	4507,6 \pm 443,60		
	cotta	1)	5315,2 \pm 477,32	5206,3	3
		2)	5038,2 \pm 21,84		
		3)	5265,6 \pm 158,32		
Lattuga	fresca	1)	2601,2 \pm 4,24	2097,8	26
		2)	1519,4 \pm 107,00		
		3)	2172,8 \pm 111,53		

Relativamente alla mensa B (Tabella 14), sono confermati i dati riscontrati nella mensa A per quanto riguarda il campione con la maggiore capacità antiossidante (mela fresca e mela cotta con 6694,4 e 6284,5 $\mu\text{mol Trolox/Kg}$, rispettivamente); la bieta al contrario ha presentato una capacità antiossidante più elevata rispetto a quella della mensa A, attestandosi intorno a valori di 4000 $\mu\text{mol Trolox/Kg}$ (contro circa 2000 $\mu\text{mol Trolox/Kg}$ nella mensa A), mentre gli altri

campioni hanno mostrato una capacità antiossidante più bassa. Relativamente alla CV%, la variabilità dei valori di capacità antiossidante va da un minimo dell'8% della mela cotta e della bieta cotta ad un massimo del 57% delle zucchine surgelate.

Tabella 14. Capacità antiossidante di campioni ortofrutticoli prelevati presso la mensa B

Mensa B		Capacità antiossidante ($\mu\text{moli Trolox/Kg s.f.}$)			
			Media \pm DS	Media	CV%
Bieta	surgelata	1)	3562,4 \pm 302,85	3928,7	13
		2)	4294,9 \pm 128,23		
	cotta	1)	3722,7 \pm 193,08	3940,9	8
		2)	4159,0 \pm 27,51		
Zucchine	surgelate	1)	918,4 \pm 260,86	1550,1	57
		2)	2181,8 \pm 137,73		
	cotte	1)	1335,3 \pm 149,95	1752,6	34
		2)	2169,9 \pm 106,79		
Cavolfiori	surgelati	1)	1823,3 \pm 168,36	2085,2	18
		2)	2347,0 \pm 53,46		
	cotti	1)	1308,1 \pm 122,48	1631,3	28
		2)	1954,5 \pm 24,65		
Mela	fresca	1)	7014,6 \pm 204,11	6694,4	11
		2)	7222,3 \pm 326,5		
		3)	5846,4 \pm 244,01		
	cotta	1)	6821,2 \pm 302,99	6284,5	8
		2)	6363,7 \pm 375,96		
		3)	5668,6 \pm 221,46		
Lattuga	fresca	1)	2103,9 \pm 161,76	2024,8	9
		2)	2153,5 \pm 97,74		
		3)	1817,0 \pm 133,95		

Sezione II

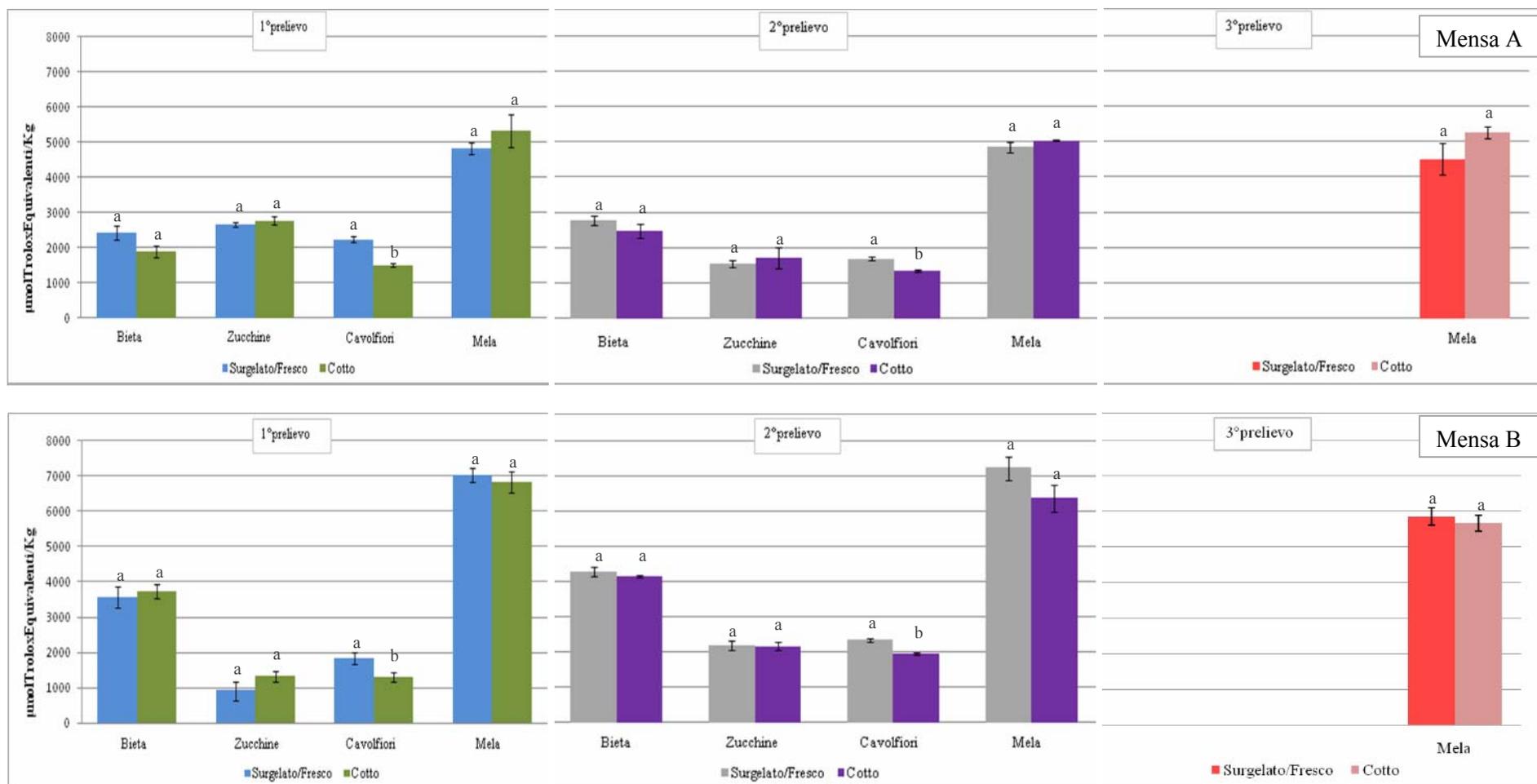
Relativamente ai broccoli e agli spinaci, presenti solo nel 3° campionamento delle due mense, tali campioni surgelati hanno presentano una buona capacità antiossidante, attestandosi intorno a valori medi di 3923,4 e 3140,1 $\mu\text{moliTrolox/Kg}$, rispettivamente. In tali campioni la variabilità del contenuto in polifenoli tra le due mense rientra nell'intervallo tra il 8-18% (Tabella 15).

Tabella 15. Capacità antiossidante dei campioni ortofrutticoli del 3° prelievo campionati nelle mense A e B

		Capacità antiossidante ($\mu\text{moliTrolox/Kg s.f.}$)			
		Media \pm DS	media	CV%	
Broccoli	surgelati	3) Mensa A	3700,3 \pm 43,76 ^a	3923,4	8
		3) Mensa B	4146,4 \pm 144,48 ^a		
	cotti	3) Mensa A	2630,7 \pm 21,67 ^b	2831,9	10
		3) Mensa B	3033,0 \pm 65,85 ^b		
Spinaci	surgelati	3) Mensa A	3349,7 \pm 53,31 ^a	3140,1	9
		3) Mensa A	2930,5 \pm 241,44 ^a		
	cotti	3) Mensa B	3461,1 \pm 55,20 ^a	3062,5	18
		3) Mensa B	2663,9 \pm 188,02 ^a		

^a Differenti lettere indicano differenze significative ($p < 0,05$)

L'effetto della cottura sui prodotti ortofrutticoli surgelati/freschi è rappresentato in Figura 8. Non si osservano variazioni significative nella capacità antiossidante con la cottura per tutti i prodotti ortofrutticoli ($p > 0,05$), ad eccezione dei cavolfiori (Figura 8) e dei broccoli (Tabella 15) ($p < 0,05$), per i quali si osserva una riduzione della capacità antiossidante in media pari al 25% e al 30%, rispettivamente. Questa diminuzione della capacità antiossidante non accompagnata da una simile riduzione del contenuto in polifenoli può essere dovuta alla perdita durante la cottura di composti non polifenolici dotati di proprietà antiossidanti.



^{a,b} Differenti lettere nello stesso campione e nello stesso campionamento indicano differenze significative ($p < 0,05$)

Figura 8. Capacità antiossidante dei prodotti ortofrutticoli diversamente trattati prelevati presso le mense ospedaliere A e B

Sezione II

Le Tabelle 16 e 17 riportano i valori medi in polifenoli, il coefficiente di variazione, valori minimi e massimi della capacità antiossidante dei prodotti ortofrutticoli surgelati/freschi e cotti, rispettivamente, tra le due mense A e B.

Come per il contenuto medio in polifenoli, le zucchine surgelate e la mela fresca rappresentano i prodotti ortofrutticoli con il più basso e il più alto valore di capacità antiossidante, rispettivamente. Nell'ambito dello stesso alimento, bieta, zucchine e mela hanno presentato una maggiore variabilità dei valori di capacità antiossidante tra le mense A e B (CV% = 22-29%), mentre per gli altri prodotti ortofrutticoli la variabilità rientra nel range tra 3-9%.

Tabella 16. Capacità antiossidante media dei prodotti ortofrutticoli surgelati/freschi prelevati presso le mense ospedaliere A e B

Prodotti ortofrutticoli freschi e surgelati	Capacità antiossidante (μmolTrolox/Kg s.f.)			
	Media	CV%	Min	Max
Bieta	3260,1	29	2414,6	4294,9
Zucchine	1828,4	22	918,4	2654,1
Cavolfiori	2026,1	4	1525,0	2256,1
Mela	5712,2	24	4507,6	7222,3
Lattuga	2061,3	3	1519,4	2601,2
Broccoli*	3923,4	8	3700,3	4146,4
Spinaci*	3140,1	9	2930,5	3349,7

*solo un campionamento per entrambe le mense

Relativamente ai prodotti cotti (Tabella 17) è confermato quanto descritto per i rispettivi prodotti surgelati/freschi, sia per quanto riguarda i valori minimi e massimi della capacità antiossidante media sia per quanto riguarda la variabilità tra le due mense.

Tabella 17. Capacità antiossidante media dei prodotti ortofrutticoli cotti prelevati presso le mense ospedaliere A e B

Prodotti ortofrutticoli cotti	Capacità antiossidante ($\mu\text{moliTrolox/Kg s.f.}$)			
	Media	CV%	Min	Max
Bieta	3062,6	40	1884,7	4159,0
Zucchine	1997,0	17	1335,3	2770,8
Cavolfiori	1528,1	10	1308,1	1954,5
Mela	5745,4	13	5038,2	6821,2
Broccoli*	2831,9	10	2630,7	3033,0
Spinaci*	3062,5	18	2663,9	3461,1

*solo un campionamento per entrambe le mense

6.3 CONFRONTO TRA IL CONTENUTO IN POLIFENOLI E LA RELATIVA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE DEI PRODOTTI ORTOFRUTTICOLI

In Tabella 18 è riportato il *range* del contenuto in polifenoli e relativa attività antiossidante per i diversi campioni ortofrutticoli analizzati.

Tabella 18. Contenuto in polifenoli (mg catechina/Kg) e capacità antiossidante ($\mu\text{moliTrolox/Kg}$) dei campioni analizzati

	Polifenoli		Capacità antiossidante	
	mg catechina/Kg		$\mu\text{moliTrolox/Kg}$	
	Min	Max	Min	Max
Bieta surgelata	550	1400	2400	4500
Zucchine surgelate	150	300	900	2700
Cavolfiori surgelati	200	450	1500	2500
Mela	1000	1800	4000	7500
Lattuga	90	400	1500	2800
Broccoli surgelati	800	950	3500	4200
Spinaci surgelati	600	800	2900	3500

Sezione II

La Figura 9 mostra il confronto tra il contenuto in polifenoli e la capacità antiossidante dei prodotti ortofrutticoli analizzati. Il contenuto in polifenoli e capacità antiossidante risultano correlate positivamente per tutti i campioni, sia essi surgelati che cotti. Infatti la mela, che presenta il più alto contenuto in polifenoli manifesta la capacità antiossidante maggiore.

In letteratura questa correlazione tra il contenuto in polifenoli e capacità antiossidante è confermata da alcuni autori (Du *et al.*, 2009; Velioglu *et al.*, 1998), in quanto affermano che gli acidi fenolici e i flavonoidi sono i principali composti fitochimici responsabili della capacità antiossidante di frutta e verdura.

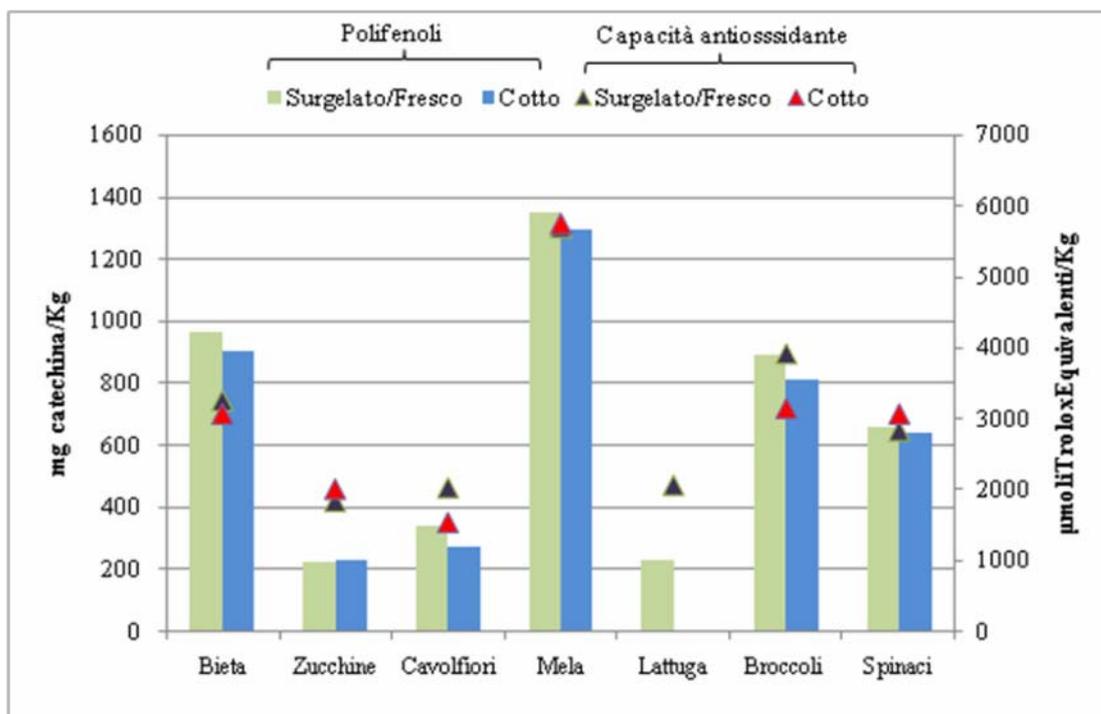


Figura 9. Confronto tra il contenuto in polifenoli medio e capacità antiossidante media dei prodotti ortofrutticoli

6.4 CONTENUTO IN POLIFENOLI E RELATIVA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE PER PORZIONE DI FRUTTA E VERDURA

Il concetto di “porzione” che viene riferito ai diversi alimenti è difficile da quantificare data la notevole variabilità di abitudini alimentari, le differenti tradizioni culinarie e gastronomiche

regionali. Una porzione, presa come "unità pratica di misura della quantità di alimento consumata", corrisponde a un certo quantitativo in grammi, a crudo e al netto degli scarti, che si è cercato di ricavare sulla base dei consumi medi di alimenti della popolazione italiana, degli alimenti e pietanze tipici della nostra tradizione e delle grammature di alcuni prodotti confezionati.

Le Tabelle 19 e 20 riportano il contenuto in polifenoli e capacità antiossidante dei prodotti ortofrutticoli surgelati e cotti, rispettivamente, calcolata per porzione media di frutta e verdura.

Bieta, broccoli e spinaci, sia surgelati che cotti e la mela, sia cruda che cotta, forniscono il più alto contenuto in polifenoli e capacità antiossidante per porzione media di frutta e verdura.

Tabella 19. Contenuto in polifenoli e capacità antiossidante dei prodotti ortofrutticoli freschi e surgelati per porzione media di frutta e verdura

	Polifenoli		Capacità antiossidante
	porzione (g)*	mg catechina/porzione	µmoli Trolox Equivalenti/porzione
Bieta	250	242,8	815,0
Zucchine	250	56,6	457,1
Cavolfiori	250	85,5	506,5
Mela	150	202,9	856,3
Lattuga	50	11,7	103,0
Broccoli	250	223,1	980,9
Spinaci	250	165,2	708,0

* Fonte: INRAN, 2003

Tabella 20. Contenuto in polifenoli e capacità antiossidante dei prodotti ortofrutticoli cotti
per porzione media di frutta e verdura

	Polifenoli		Capacità antiossidante
	porzione (g)*	mg catechina/porzione	µmolTroloxEquivalenti/porzione
Bieta	215	194,7	658,4
Zucchine	225	52,2	449,5
Cavolfiori	225	62,1	343,8
Mela	135	175,6	775,6
Broccoli	225	183,3	706,5
Spinaci	215	138,7	658,4

* Fonte: INRAN, 2003

CAPITOLO 7

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti confermano che frutta e verdura contengono un alto contenuto in antiossidanti, se comparati con altri alimenti. Inoltre, ogni tipo di prodotto ortofrutticolo presenta differente capacità antiossidante, data da differenti componenti antiossidanti.

In particolare, la mela, i broccoli e la bieta forniscono il maggiore contenuto in polifenoli ed evidenziano una elevata capacità antiossidante, sia in valore assoluto che per porzione media di frutta e verdura.

Relativamente agli effetti del trattamento tecnologico subito dai campioni nella fase di preparazione dei pasti nelle mense, nelle nostre condizioni sperimentali, la maggior parte dei prodotti di origine vegetale non risente del processo di cottura; per altri (cavolfiori e broccoli) si assiste ad una diminuzione della capacità antiossidante. Di conseguenza tali alimenti, pur non essendo freschi ma surgelati, sono in grado di fornire un buon apporto di polifenoli e possono contribuire positivamente al recupero dei soggetti ospedalizzati. Inoltre, i risultati suggeriscono l'indicazione a realizzare vitti ospedalieri variati nella scelta delle matrici alimentari e nelle preparazioni.

Infine, la valutazione del contenuto in polifenoli nei pasti può essere un primo passo per la stima dell'intake di tali composti bioattivi nei pazienti ospedalizzati e nella valutazione della loro biodisponibilità.

BIBLIOGRAFIA

- Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoğlu B., Berker K.I., Özyurt D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, **12**: 1496-1547.
- Bacchiocca M., Biagiotti E., Ninfali P. (2006). Nutritional and technological reasons for evaluating the antioxidant capacity of vegetables products. *Italian Journal of Food Science*, **2**(18): 209-217.
- Carratù B. and Sanzini E. (2005). Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Annuario Istituto Superiore della Sanità*, **41**(1): 7-16.
- Ciappellano S. (2009). *Manuale della ristorazione*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- Cieslik E., Greda A., Adamus W. (2006). Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food chemistry*, **94**: 135-142.
- Decreto n°5250 del Direttore Generale Sanità del 26/05/09, Linee Guida per la ristorazione ospedaliera, allegato 1.
- Dimitrios B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, **17**: 505-512.
- Du G., Li M., Liang D. (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenols and Vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry*, **113**: 557-562.
- Duda-Chodak A. and Tarko T. (2007). Antioxidant properties of different fruit seeds and peels. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. **6**(3): 29-36.
- Faller A.L.K. and Fialho E. (2010). Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**: 561-568.

- Faller A.L.K. and Fialho E. (2009). The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Research International*, **42**: 210-215.
- Gebezynski P. and Lisiewska Z. (2006). Comparison of the level of selected antioxidative compounds in frozen broccoli produced using traditional and modified methods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **7**: 239-245.
- Geog e S., Brat P., Alter P., Amiot M.J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 1370-1373.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: overview. *Methods in Enzymology*, **186**: 1-85.
- Harborne E. (1989). Phytochemicals in plant cell cultures. In: *Cell culture and somatic cell genetics of plants serves*. Constabel F. and Vasil I.K (Eds), Academic Press, San Diego.
- Havsteen B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, **96**(2-3): 67-202.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**(10): 572-584.
- Hervert-Hernandez D., Garcia O.P., Rosado J.L., Goni I. (2010). The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable intake. *Food Research International*, doi: 10.1016/j.foodres.2010.09.021 (in press).
- Hunter K.J. and Fletcher J.M. (2002). The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred and canned vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **3**: 399-406.

Sezione II

- Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 3954-3962.
- Kaur C. and Kapoor H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. *International Journal of Food Science and Technology*, **36**: 703-725.
- Manach C.M., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, **79**: 727-47.
- Miglio C., Chiavaro E., Visconti A., Fogliano V., Pellegrini N. (2008). Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 139-147.
- Naczki M. and Shahidi F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**: 1523-1542.
- Nicoli M.C., Anese M., Parpinel M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, **10**: 94-100.
- Ninfali P. and Bacchiocca M. (2003). Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 2222-2226.
- Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvadori S., Bianchi M., Brighenti F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Molecular Nutrition & Food Research*, **113**: 2812-2819.
- Petty S. and Scully C. (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*, **37**: 413-423.

- Podsedek A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT- Food Science and Technology*, **40**: 1-11.
- 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.
- Robak J and Gryglewski R.J. (1996). Bioactivity of flavonoids. *Polish Journal of Pharmacology*, **48**(6): 555-564.
- Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F., Castelli F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine*, **19**: 481-486.
- Saura-Calixto F., Serrano J., Goni I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, **101**: 492-501.
- Scalzo J., Politi A., Pellegrini N., PhD., Mezzetti B., PhD., Battino M., PhD. (2005). Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, **21**: 207-213.
- Stratil P., Klejdus B., Kuban V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 607-616.
- Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 4113-4117.
- Vinson J.A., Hao Y., Su X., Zubik L. (1998). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 3630-3634.

Sezione II

- Waladkhani A.R. and Clemens M.R. (2001). Effect of dietary phytochemicals on cancer development. In: *Vegetables, Fruits, and Herbs in Health Promotion*. Watson R. R., Ph.D. (Eds), CRC Press
- Wang H., Cao G., Prior R.L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**: 701-705.
- Zitnanova I., Ranostajova S., Sobotova H., Demelova D., Pechan I., Durackova Z. (2006). Antioxidative activity of selected fruits and vegetables. *Biologia, Bratislava*, **61**(3): 279-284.
- Zhou J.F., Cai D., Zhu Y.G., Yang J.L., Peng C.H., Yu Y.H. (2000). A study on relationship of nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation with chronic chole-cystitis. *World Journal of Gastroenterology*, **6**(4): 501-507.

Siti Internet consultati:

- www.inran.it/648/linee_guida.html
- www.regione.piemonte.it/sanita/index.htm
- www.sanita.regione.lombardia.it

SEZIONE III

MESSA A PUNTO DI UN'UNICA METODICA DI ESTRAZIONE DI ANTIOSSIDANTI LIPOSOLUBILI E IDROSOLUBILI IN GRANO DURO

CAPITOLO 1

ANTIOSIDANTI NEL GRANO DURO

1.1 IL GRANO DURO

Il frumento o grano è il cereale più coltivato e consumato in Italia. Appartiene al genere *Triticum* che, a sua volta, si suddivide in tre gruppi in base al numero dei cromosomi. Esistono, infatti, frumenti diploidi ($2n=14$), tetraploidi ($2n=28$), tra cui compare il *Triticum durum*, ed esaploidi ($2n=42$), a cui appartiene il grano tenero o *Triticum vulgare*. Altre possibili classificazioni riguardano l'aderenza o meno delle glume e glumelle alle cariossidi mature (frumenti nudi o vestiti) o la presenza della resta (frumenti aristati, semiaristati e mutici). Le specie più coltivate sono il grano duro (Italia meridionale e insulare) e quello tenero (Italia centrale e settentrionale). Le differenze bromatologiche tra i due tipi di grano sono minime; oltre al diverso numero di cromosomi, il grano duro ha un contenuto lievemente superiore di proteine. Notevoli, invece, risultano le differenze nei prodotti della loro macinazione: il grano duro dà origine a semole e semolati dai granuli grossi, con spigoli netti e colore leggermente ambrato, da destinare prevalentemente alla produzione della pasta; dal grano tenero si ottengono le farine, con granuli piccoli, tondeggianti e di colore bianco, dalla cui lavorazione si ricava il pane e i prodotti da forno. Viene impropriamente definito semiduro il grano tenero da cui si producono farine di forza di ottima qualità, ricche di proteine insolubili. Spesso tali farine vengono mescolate a quelle ottenute da grani teneri comuni, con minore contenuto in gliadina e glutenine, per migliorarne la panificabilità (Cappelli and Vannucchi, 2005).

Secondo il D.L. 187/2001 è denominato semola di grano duro o semplicemente semola “*il prodotto granulare a spigolo vivo ottenuto dalla macinazione e conseguente abburattamento del grano duro, liberato dalle sostanze estranee e dalle impurità*”, mentre con farina di grano

Sezione III

tenero si intende “*il prodotto ottenuto dalla macinazione e conseguente abburattamento del grano tenero liberato dalle sostanze estranee e dalle impurità*”.

1.1.1 Struttura e composizione della cariosside di grano

La cariosside del grano ha forma ovoidale, lunga da 6 a 8mm e larga 3-4mm, la faccia dorsale è convessa, quella ventrale è attraversata da un solco longitudinale.

Nella cariosside si distinguono varie parti (Figura 1):

- esternamente, *il pericarpo*, formato a sua volta da diversi strati di cellule (epicarpo, cellule intermedie, cellule incrociate e cellule tubolari), seguito dallo spermoderma e dal perisperma. Tutti questi strati costituiscono l’involucro esterno del chicco, conosciuto comunemente come crusca. Sono costituiti prevalentemente da fibra, sali minerali e composti antiossidanti;
- internamente, *l’endosperma*, la parte più importante della cariosside ai fini alimentari. Comprende lo strato aleuronico, costituito da cellule monostratificate ricche in proteine ad alto valore biologico, lipidi, vitamine, sali minerali ed enzimi. Al centro, troviamo l’endosperma amilifero, con cellule contenenti granuli di amido (60-70%) e proteine di riserva (8-18%). La forma e le dimensioni dei granuli di amido sono tipiche di ogni cereale, tanto che, è possibile, mediante l’esame microscopico, riconoscere la provenienza della farina. La grandezza dei granuli aumenta procedendo verso il centro del chicco, mentre diminuisce progressivamente il contenuto proteico. L’endosperma contiene inoltre, piccole percentuali di lipidi, sostanze minerali, polisaccaridi non amidacei e composti fenolici;
- *l’embrione o germe* separato dall’endosperma da un rivestimento esterno detto scutello (nelle cui cellule cilindriche si depositano, durante la maturazione, le sostanze nutritive necessarie al momento della germinazione), rappresenta la parte da cui si

forma una nuova pianta quando si verificano le condizioni per la germinazione. Ha un elevato tenore in proteine e lipidi.

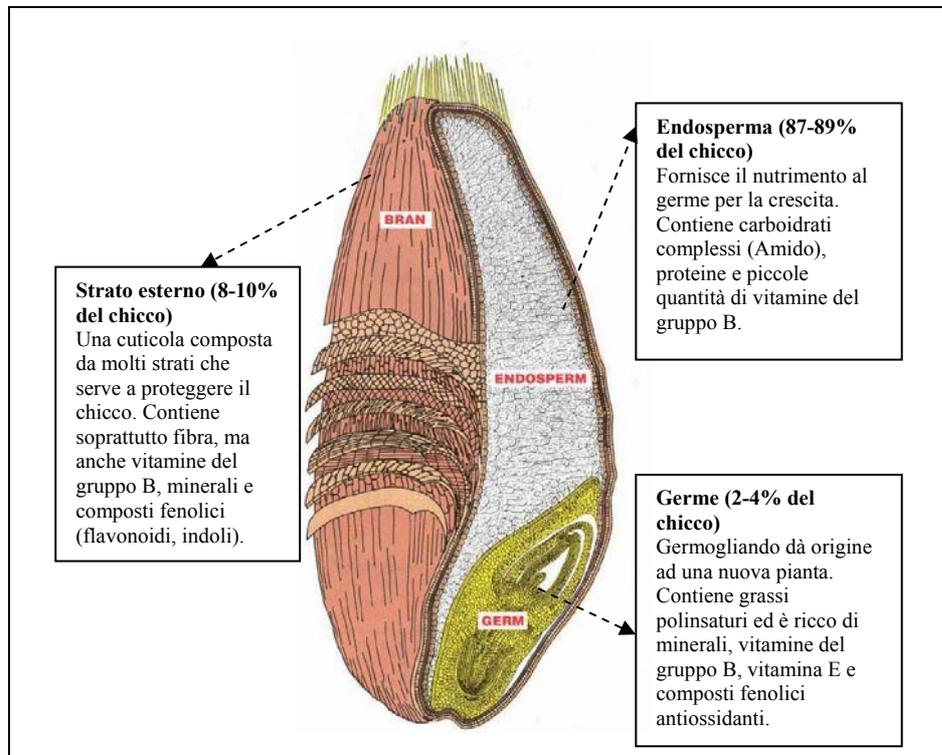


Figura 1. Struttura della cariosside di frumento duro (Flagella *et al.*, 2006)

La composizione chimica della cariosside di grano è influenzata da numerosi fattori: la specie di appartenenza, il terreno e il clima, i trattamenti a cui la pianta è stata sottoposta, lo stato di conservazione.

La composizione chimica della cariosside è riportata in Tabella 1.

Tabella 1. Composizione della cariosside di grano e delle sue regioni anatomiche

(dati espressi per 100 g di sostanza secca; Lucisano and Pagani, 1997)

Regione anatomica della cariosside	% cariosside	Amido e altri carboidrati (%)	Proteine (%)	Lipidi (%)	Cellulosa, emicellulosa, pentosani (%)	Sali minerali (%)
Pericarpo	4	14-16	10-14	1-3	60-74	3-5
Strato aleuronico	8	10-14	29-35	7-9	35-41	5-15
Germe	3	19-21	36-40	13-17	20-24	4-6
Endosperma	82	80-85	8-14	2-3	1-3	0,15-0,15

L'acqua è presente in quantità variabile dall'8 al 16-18% (mediamente il 12%), in relazione alla zona, più o meno umida, in cui il grano è stato coltivato. I glucidi rappresentano mediamente il 72% del peso della cariosside e sono caratterizzati dall'amido (60-68%), pentosani (6,5%), cellulosa e lignina (2,5%) e zuccheri riducenti (1,5%). Le proteine ammontano mediamente al 12% e si distinguono in base alla loro solubilità in albumine e globuline (proteine ad alto valore biologico) e prolamine (glutenine e gliadine, localizzate nell'endosperma). I lipidi presenti quasi esclusivamente nel germe sono costituiti da gliceridi esterificati ad acidi grassi insaturi per 80-84% e saturi per il 13%. I sali minerali rappresentati da fosfato di magnesio e potassio, sali di calcio, ferro, zinco sono situati nella parte esterna della cariosside (Cappelli and Vannucchi, 2005).

Inoltre, i cereali rappresentano una importantissima fonte di vitamine, soprattutto del gruppo B; in particolare niacina e piridossina, tendono a concentrarsi nello strato aleuronico (Panatta, 1995), la tiamina nello scutello, la vitamina E nell'embrione della cariosside. Le operazioni di macinazione con conseguente abburattamento (setacciatura e allontanamento delle frazioni esterne della cariosside) comportano un impoverimento vitaminico negli sfarinati.

Le Linee Guida per una Sana Alimentazione Italiana pubblicati dall'Istituto Nazionale per la Ricerca degli Alimenti e la Nutrizione (INRAN, 2003) stabiliscono che i cereali

(fondamentalmente pane e pasta) devono essere assunti in modo da conferire almeno il 45% delle calorie apportate giornalmente. Con riferimento ad altri nutrienti introdotti attraverso l'assunzione di prodotti derivati dal grano duro, sono da segnalare, come già accennato, il discreto contenuto in proteine e soprattutto nei prodotti integrali, di fibra alimentare. Notevole è anche l'apporto in elementi minerali (potassio, ferro e fosforo) ed in vitamine (tiamina e niacina).

Nonostante molto sia stato indagato sulle relazioni fra struttura e funzione dell'endosperma, minore interesse è stato rivolto alla composizione di germe e crusca, sebbene queste due componenti contribuiscano a circa il 20% del peso della frazione finale dopo la molitura tradizionale. Ciò è dovuto al fatto che queste frazioni costituiscono solo una piccola percentuale del totale valore economico del frumento molito, mentre all'endosperma è attribuito il 90% del valore (Fulcher and Duke, 2002). È ormai risaputo, tuttavia, che le frazioni di pericarpo e germe derivate dalla molitura convenzionale forniscono la maggioranza dei composti biologicamente attivi della granella. L'elevato valore nutrizionale e salutistico è dovuto, oltre che all'elevato contenuto in vitamine del gruppo B (tiamina, niacina, riboflavina ed acido pantotenico), minerali (calcio, magnesio, potassio, fosforo, sodio e ferro) ed amminoacidi essenziali (arginina e lisina), anche agli alti livelli di fibre alimentari e composti antiossidanti.

1.2 COMPOSTI ANTIOSSIDANTI NEL GRANO DURO

Fino ad ora le sostanze antiossidanti presenti nei cereali integrali non hanno ricevuto la stessa attenzione mostrata nei confronti dei prodotti fitochimici presenti in frutta e verdura. Negli ultimi anni studi epidemiologici hanno determinato che il consumo costante di cereali riduce l'incidenza di malattie cardiovascolari, diabete ed altre patologie. Inoltre si è avuta conferma che gli effetti salutari riscontrati sono da collegare ai composti biologicamente attivi (nutraceutici) tipici dei cereali e presenti nelle diverse parti della cariosside (pericarpo, germe

Sezione III

ed endosperma), (Figura 2) che hanno la capacità di determinare un rafforzamento della barriera cellulare nei confronti dei fenomeni di ossidazione (Flagella *et al.*, 2006; Duthie *et al.*, 1996). Sembra che il principale effetto positivo della granella integrale di cereali sia la capacità antiossidante totale.

Composti		Principale Localizzazione	Funzione
Composti fenolici	acidi fenolici e derivati flavonoidi lignani lignina	Endosperma e pericarpo	Ipocolesterolemica Antitumorale Antidiabetica Riduzione del rischio di malattie cardiovascolari e degenerative
Tocoli	tociferoli tocotrienoli	Germe Strato aleuronico e sub-aleuronico	
Carotenoidi	caroteni xantofille		
Fibre	solubili insolubili		Attività prebiotica Miglioramento peristalsi

Figura 2. Composti ad azione antiossidante e salutistica presenti nel grano duro

La maggior parte dei composti antiossidanti dei cereali è costituita da antiossidanti idrofili come i composti fenolici e da composti lipofili, quali tocoli e carotenoidi (Adom and Liu, 2002). Uno studio condotto dagli stessi autori ha messo a confronto la capacità antiossidante totale della granella integrale di diverse specie cerealicole (mais, frumento, avena, riso) evidenziando che il frumento è al secondo posto preceduto dal mais e seguito da avena e riso. Oltre ai fenoli, tocoli e carotenoidi i cereali sono ricchi di lignani, potenti antiossidanti che esercitano un'azione anticancerogena, riducendo la produzione dei ROS. Anche i fitosteroli, seppur presenti in minima parte nei cereali, hanno un effetto benefico sulla salute, abbassando il livello di colesterolo ematico e riducendo il rischio di patologie croniche.

1.2.1 I composti fenolici

La granella dei cereali è ricca in acidi fenolici le cui quantità totali possono arrivare a 800 mg/kg (Tabella 2), mentre i flavonoidi sono presenti in piccole quantità.

Infatti gli acidi fenolici rappresentano la forma più presente dei composti fenolici, nonché il maggiore e più complesso gruppo di composti bioattivi presenti nei cereali.

Tabella 2. Contenuto in fenoli liberi e legati estratti con diversi metodi riportati in letteratura e dosati mediante HPLC e Folin-Ciocalteu in sfarinato integrale di grano duro

Autori	Fenoli HPLC (mg/Kg)		Fenoli (Folin- Ciocalteu) (mg catechina/Kg)	
	liberi	legati	liberi	legati
Zhou et al., 2004*	55	/	2000	/
Adom and Liu, 2002**	/	/	circa 300	1020
Moore et al., 2005	0,5-1,5	400-500	/	/
Ward et al., 2008°	7-22	300-800	/	/
Li et al., 2008**	Circa 20	Circa 600	/	/

*estratti con una soluzione acetone 50%, senza acidificazione

**estratti con etanolo 80%

° estratti con etanolo/acqua ed esano etilacetato 8:2 (v/v), saponificazione a caldo

Adom and Liu (2002) e Carcea *et al.*, (2002) hanno riportato che l'acido ferulico è il principale composto fenolico presente nel frumento, presente in concentrazioni 50-70 volte maggiori nella porzione crusca/germe rispetto all'endosperma. Oltre all'acido ferulico sono presenti gli acidi p-cumarico, vanillico, siringico e caffeico (Okarter *et al.*, 2010; Liu, 2007; Naczki and Shahidi, 2006).

Questa classe di antiossidanti può essere presente sotto forma di *fenoli liberi solubili, solubili coniugati*, quest'ultimi esterificati a zuccheri e altri composti a basso peso molecolare e i

Sezione III

fenoli insolubili legati. Quest'ultimi, che rappresentano 80-95% del contenuto totale, sono legati a polimeri della parete cellulare, in particolare arabinoxilani (Serpen *et al.*, 2008; Lampi *et al.*, 2008; Liu, 2007), ma anche a stanoli e steroli (Naczk and Shahidi, 2006). La crusca di frumento contiene anche diidrodimeri dell'acido ferulico (DiFA), che rafforzano le pareti dello strato aleuronico durante la maturazione del grano attraverso la formazione di ponti tra le catene di arabinoxilani, fornendo una barriera fisica contro l'attacco di insetti e microrganismi (Naczk and Shahidi, 2006). Inoltre, i dimeri dell'acido ferulico, potenti antiossidanti, sono legati ai polisaccaridi delle pareti cellulari della pianta e quindi non assorbiti dall'intestino umano in questa forma, ma solo dopo idrolisi degli enzimi intestinali (Li *et al.*, 2008). Fino a pochi anni fa il contenuto di antiossidanti nei cereali veniva sottostimato, poiché le tecniche di estrazione utilizzate non testavano la porzione legata ma determinavano solo quella libera e coniugata. Ultimamente sono stati eseguiti numerosi studi che hanno valutato l'intero profilo di fitochimici nella forma libera, coniugata-solubile e legata-insolubile, e la capacità antiossidante di questi composti, in numerose specie di cereali. I risultati mostrano che nonostante ci sia variabilità tra una specie e l'altra, la maggior parte dei composti fenolici si trova nella forma legata (Tabella 3).

Il rapporto tra acido ferulico in forma libera, solubile-coniugata e legata nel mais e nel frumento è generalmente di 0,1:1:100 (Liu, 2007). I composti fenolici legati sono i principali responsabili dell'attività antiossidante totale della granella (90%) (Adom and Liu, 2002) mentre i fenoli liberi e coniugati contribuiscono in misura molto minore (meno dello 0,6% e 7%, rispettivamente) (Liu, 2007).

Tabella 3. Contenuto in singoli acidi fenolici di differenti specie di frumento (mg/Kg di sostanza secca) (Li *et al.*, 2008)

	winter wheat (n = 130) <i>T. aestivum</i> var. <i>aestivum</i>		spring wheat (n = 20) <i>T. aestivum</i> var. <i>aestivum</i>		durum wheat (n = 10) <i>T. turgidum</i> var. <i>durum</i>	
	mean	range	mean	range	mean	range
4-hydroxybenzoic acid						
free	0.1 ± 0.024	0-1.8				
conjugated	5.4 ± 0.14ab	2.3-11.1	6.3 ± 0.34abd	3.6-9.6	10.9 ± 0.85c	6.0-16.2
bound	2.1 ± 0.12abc	0.2-8.3	2.8 ± 0.35ab	0.8-6.5	2.0 ± 0.76abc	0.4-8.6
vanillic acid						
free	2.3 ± 0.059ad	0-4.4	1.7 ± 0.076bcd	1.2-2.5	1.9 ± 0.13abcd	1.1-2.5
conjugated	14.1 ± 0.29ab	8.8-24.5	14.0 ± 0.69abc	8.2-22.7	15.2 ± 0.77ab	11.6-18.3
bound	4.5 ± 0.10ab	2.1-9.0	3.8 ± 0.25abc	2.4-5.9	3.3 ± 0.56ac	1.8-8.1
syringic acid						
free	2.0 ± 0.072ac	0-4.0	2.4 ± 0.22ac	0.8-5.1	2.3 ± 0.32ac	1.0-4.1
conjugated	10.9 ± 0.35ab	3.9-22.0	11.2 ± 0.71ab	6.7-18.8	5.8 ± 0.42ac	3.7-7.9
bound	4.7 ± 0.20abc	1-13.4	3.8 ± 0.35abcd	1.5-6.7	1.2 ± 0.20ade	0.6-2.8
syningaldehyde						
free	0.1 ± 0.027	0-1.6				
conjugated	0.4 ± 0.07	0-2.9				
bound	0.4 ± 0.05	0-2.0				
caffeic acid						
free	0.4 ± 0.080	0-3.3				
conjugated	nq	nq	nq	nq	nq	nq
bound	nq	nq	nq	nq	nq	nq
2,4-dihydroxybenzoic acid						
free	0.3 ± 0.055ab	0-4.6	0.2 ± 0.08 ab	0-1.6	1.1 ± 0.33bc	0-2.5
conjugated	50.6 ± 1.51ab	7.6-116	57.1 ± 6.59abc	5.2-119	108.4 ± 6.82c	80.5-153.0
bound	76.4 ± 3.64ac	0-197.9	24.8 ± 4.52ab	3.1-74.6	23.9 ± 6.47ab	9.0-65.6
sinapic acid						
free	2.2 ± 0.34a	0-12.3			3.6 ± 1.48a	0-9.2
conjugated	55.5 ± 1.54ab	27.8-128	47.4 ± 3.5ab	21.5-83	86.6 ± 7.86ac	55.9-136.6
bound	23.2 ± 0.44a	12.9-40	20.3 ± 0.87a	15.1-30	23.8 ± 1.45a	18.4-34.7
ferulic acid						
free	3.3 ± 0.08ab	1.2-6.2	2.7 ± 0.132ac	1.9-4.1	2.9 ± 0.18abc	2.1-3.8
conjugated	29.3 ± 1.02ab	9.4-62.3	28.5 ± 2.14ab	11.6-51	44.9 ± 5.65bcd	26.2-87.8
bound	366.2 ± 10.60a	162-721	375.0 ± 25.2a	252-628	355.5 ± 43.1a	241.0-701
p-coumaric acid						
free	0.6 ± 0.04ab	0-2.2	0.6 ± 0.14abc	0-2.2	1.1 ± 0.22ac	0-2.3
conjugated	5.2 ± 0.14abc	3.0-12.1	6.3 ± 0.59ac	3.8-14.6	6.1 ± 0.52abc	4.9-10.5
bound	10.0 ± 0.30a	3.0-19.1	4.1 ± 0.49b	2.8-13.3	3.4 ± 0.074b	3.1-4.0
2-hydroxycinnamic acid						
free	0.03 ± 0.01	0-0.8			0.2 ± 0.11	0-1.1
conjugated	1.9 ± 0.03ab	1.3-3.6	2.2 ± 0.09ac	1.8-3.0	2.5 ± 0.10ac	2.0-3.1
bound	4.3 ± 0.09a	2.4-7.3	4.6 ± 0.22a	3.3-6.8	5.1 ± 0.36a	3.9-7.4

* Values with the same letter in a row are not significantly different ($P < 0.05$) from each other

Nel riso, l'acido fenolico presente in maggiori quantità risulta essere il p-idrossibenzoico, nell'avena il siringico e nel mais il p-cumarico. Il livello di esteri solubili e glucosidi degli acidi fenolici nelle farine dei vari cereali è di circa 2-5 volte più alto degli acidi fenolici in forma libera, con il mais che presenta il livello massimo (Krygier *et al.*, 1982b).

Durante la conservazione, gli acidi fenolici presenti nella farina di frumento subiscono una diminuzione, con possibilità di riduzioni in termini di concentrazione di circa un terzo rispetto ai valori di partenza (Sosulski *et al.*, 1982).

Sezione III

I composti fenolici, come gli altri composti fitochimici, sono maggiormente localizzati nella frazione germe/crusca (Figura 3). Infatti il contenuto fenolico è circa 15-18 volte più alto nella frazione germe/crusca piuttosto che nell'endosperma amilifero (Liu, 2007).

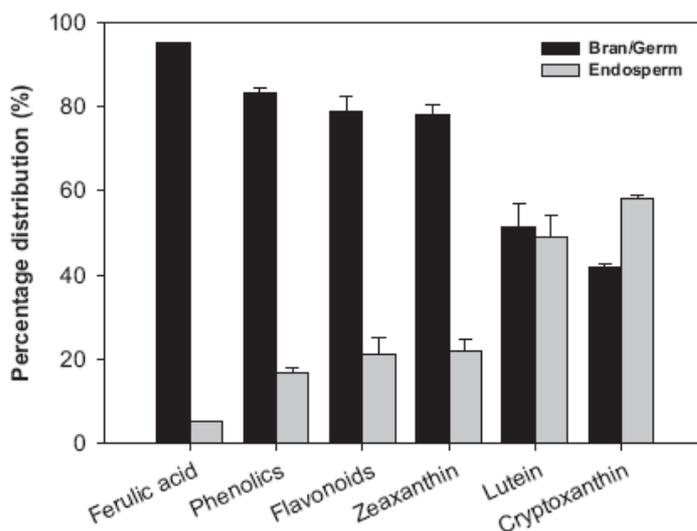


Figura 3. Distribuzione percentuale dei composti bioattivi nelle frazioni del grano (Liu, 2007)

Anche per i flavonoidi il contenuto nella crusca e nel germe è maggiore rispetto all'endosperma (10-15 volte in più). I flavonoidi nei cereali non sono molto abbondanti, i maggiori sottogruppi sono i flavanoli, i flavonoli e le antocianine. Come gli acidi fenolici, la maggior parte dei flavonoidi si trova in forma legata alle macromolecole della parete cellulare; sono comunque i maggiori polifenoli che si trovano in forma libera, soprattutto in cereali come orzo e avena (catechina, proantocianidina, quercitina).

Nella granella integrale di frumento duro, Pastore *et al.*, (2009) hanno osservato un'attività antiossidante totale pari a 44 e 67 μmol di equivalenti di Trolox/g in estratti acquosi e cloroformici rispettivamente, utilizzando un nuovo metodo basato sulla reazione fra lipossigenasi, LOX, e p-Nitrosodimetilanilina, RNO. Altri autori riportano una capacità antiossidante nel frumento duro pari a 1,64 μmol Trolox/g di sostanza secca determinata con il metodo TEAC in seguito ad estrazione con metanolo (Menga *et al.*, 2010). Questo dimostra

come i valori di capacità antiossidante come pure il contenuto in polifenoli totali variano da un autore all'altro dipendendo dalla metodica di estrazione e il metodo di dosaggio applicati (Tabella 4).

Tabella 4. Capacità antiossidante di estratti di sfarinato integrale riportate in letteratura e dosate con il metodo TEAC

Autori	Capacità antiossidante (TEAC)	
	(nmoli Trolox/g)	
	liberi	legati
Zhou <i>et al.</i>, 2004*	15000	/
Pellegrini <i>et al.</i>, 2006**	1990	2500
Moore <i>et al.</i>, 2005***	14000	/

*estratti con una soluzione acetone 50% (v/v)

**estratti metanolici

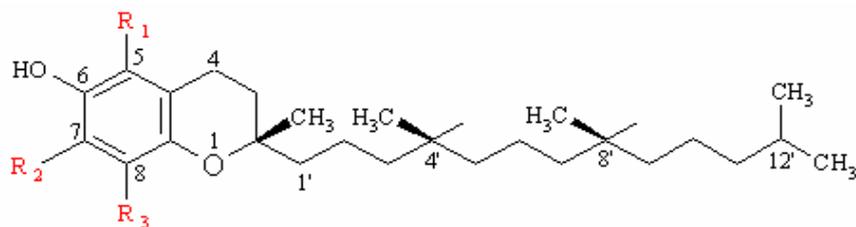
***estratti con acetone-acqua-metanolo

1.2.2 I tococromanoli

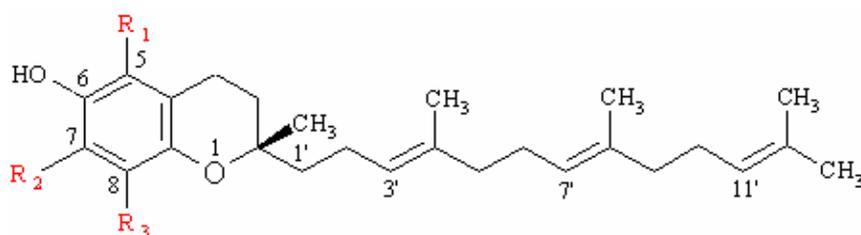
I **tocoli** (antiossidanti di natura lipofila), noti con il generico termine di vitamina E sono presenti in concentrazioni significative nel frumento e da tempo sono considerati efficaci antiossidanti a livello di membrana cellulare e con dimostrata attività ipocolesterolemica ed antitumorale. Con il termine tococromanoli o vitamina E si indica una famiglia di composti strutturalmente simili (vitameri), otto dei quali più noti dal momento che si trovano in natura. Gli otto isomeri si suddividono in due classi: *tocoferoli* e *tocotrienoli*; entrambi sono costituiti chimicamente da un anello biciclico sostituito, detto cromano, e da una lunga catena isoprenoide a sedici atomi di carbonio, chiamata fitile, che è satura nei tocoferoli mentre presenta tre doppi legami non coniugati nei tocotrienoli.

Sezione III

A seconda del numero e della posizione dei gruppi metilici sostituenti sull'anello cromanico si distinguono l' α -, β -, γ -, δ -tocoferolo e l' α -, β -, γ -, δ -tocotrienolo (Figura 4).



NOME COMUNE	R ₁	R ₂	R ₃	NOME CHIMICO
α -Tocoferolo	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	5-7-8-trimetiltocolo
β -Tocoferolo	-CH ₃	-H	-CH ₃	5-8-dimetiltocolo
γ -Tocoferolo	-H	-CH ₃	-CH ₃	7-8-dimetiltocolo
δ -Tocoferolo	-H	-H	-CH ₃	8-monometiltocolo



NOME COMUNE	-R ₁	-R ₂	-R ₃	NOME CHIMICO
α -Tocotrienolo	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	5-7-8-trimetiltocotrienolo
β -Tocotrienolo	-CH ₃	-H	-CH ₃	5-8-dimetiltocotrienolo
γ -Tocotrienolo	-H	-CH ₃	-CH ₃	7-8-dimetiltocotrienolo
δ -Tocotrienolo	-H	-H	-CH ₃	8-monometiltocotrienolo

Figura 4. Strutture e nomi comuni dei tocoferoli e tocotrienoli

La presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 6 e di un metile in posizione 2 è una caratteristica comune a tutti i vitameri che, pertanto, sono dei derivati del 2-metil-6-cromanolo. Il gruppo ossidrilico legato all'anello cromanico è un punto critico per l'attività antiossidante, ma svolgono un ruolo importante anche i gruppi metilici. L' α -tocoferolo, con tre gruppi metilici, è biologicamente più attivo degli altri omologhi (Lampi *et al.*, 2008), dotato di maggiore attività antiossidante, anche se il ruolo degli altri isomeri sta riscuotendo nuovi interessi (Panfili *et al.*, 2008). Infatti, l'attività antiossidante diminuisce nel seguente

ordine $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ (Ingold *et al.*, 1990). L'azione antiossidante dei tocoli si esplica attraverso la donazione di un atomo di idrogeno ai radicali perossidici, rallentando, in questo modo, il processo di ossidazione delle sostanze grasse; tuttavia i tocoli sono efficaci anche come quenchers dell'ossigeno singoletto e dei radicali dell'ossido d'azoto (Lampi *et al.*, 2008). Alcuni studi indicano che l' α -tocotrienolo è più efficiente come scavenger dei radicali perossidici rispetto al corrispondente tocoferolo (Panfili *et al.*, 2008).

Dal punto di vista nutrizionale i tocoferoli hanno una importanza notevole poiché esplicano nell'organismo diverse funzioni: funzione biologica, effetti ipocolesterolemici ed ipoglicemici e prevenzione di malattie cardiovascolari e del cancro (Lampi *et al.*, 2008; Panfili *et al.*, 2003).

Relativamente all'attività vitaminica E, in passato era definita in termini di Unità Internazionale (UI) ed 1 Unità Internazionale era equivalente ad 1 mg di α -tocoferolo acetato; attualmente l'attività della vitamina è definita in termini di Tocoferolo Equivalente (TE), dove un TE corrisponde a 1 mg di α -tocoferolo. Tale attività dipende dalla struttura chimica e fattori fisiologici (α -T > β -T > α -T3 > γ -T > β -T3 > δ -T) (Panfili *et al.*, 2008). Tra gli altri tocotrienoli, il γ -T3 e il δ -T3 presentano attività vitaminica non riconosciuta (Tabella 5).

Secondo il Decreto 18 marzo 2009 del Ministero del lavoro, della salute e delle politiche sociali che attua la Direttiva 2008/100/CE relativa all'etichettatura nutrizionale dei prodotti alimentari la razione giornaliera raccomandata (RDA) della Vitamina E è pari a 12mg per 100g di prodotto.

Essendo sostanze lipofile, i tocoli sono intimamente associate con i composti lipidici della matrice alimentare e quindi possono essere presenti in forma esterificata o legati alla matrice, oltre che libera; di conseguenza per la loro determinazione risulta necessario applicare una procedura di idrolisi della matrice, che idrolizzi gli esteri lipidici, seguita da estrazione con un solvente compatibile con il sistema cromatografico (Panfili *et al.*, 2003).

Tabella 5. Attività vitaminica E di tocoferoli e tocotrienoli (Eldin and Appelquist, 1996; Sheppard *et al.*, 1993; Kasperek, 1980)

Tococromanoli	Attività vitaminica	
	TE/mg	UI/mg
α -tocoferolo	1,0	1,5
β -tocoferolo	0,5	0,75
γ -tocoferolo	0,1	0,15
δ -tocoferolo	0,03	0,045
α -tocotrienolo	0,3	0,45
β -tocotrienolo	0,05	0,075
γ -tocotrienolo	Non conosciuto	Non conosciuto
δ -tocotrienolo	Non conosciuto	Non conosciuto

TE: Tocoferolo Equivalente; UI: Unità Internazionale

I tocoli proteggono l'integrità delle membrane cellulari grazie al mantenimento del normale contenuto di acidi grassi polinsaturi dei fosfolipidi, che sono suscettibili a perossidazione (Buttner, 1993). Infatti grazie alla loro struttura idrofobica, i tocoferoli si collocano all'interno delle membrane biologiche dei tessuti, oppure all'interno delle lipoproteine del plasma, vicino ai lipidi, e perciò in una posizione ideale per poter esercitare la loro azione antiossidante.

I tocotrienoli, inoltre, intervengono nel contenimento del colesterolo ematico agendo direttamente sulla sua sintesi nel fegato. In un lavoro condotto da Qureshi and Qureshi, (1993) è stato evidenziato che i tocotrienoli contenuti nell'orzo sono in grado di abbassare il livello di colesterolo totale e del LDL-colesterolo sia in animali da laboratorio che nell'uomo, molto probabilmente perché tali composti vanno ad inibire l'idrossimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasi, enzima coinvolto nella biosintesi del colesterolo nel fegato a partire dall'acetil-CoA (Qureshi *et al.*, 1985 e 1991).

Per quanto riguarda il ruolo dei tococromanoli nella prevenzione delle malattie cardiovascolari, è stato visto che essi agiscono prevenendo l'aterosclerosi per mezzo della

loro attività antiossidante dovuta essenzialmente ai tocoferoli. Più complessa e ancora non ben identificata è l'azione dei tococromanoli nella prevenzione del cancro. Probabilmente la loro azione è dovuta sia alle proprietà antiossidanti dei tocoferoli che riducono la formazione e la propagazione di radicali liberi (Bramley *et al.*, 2000; Thompson, 1994), fattori sicuramente coinvolti nello sviluppo del cancro, sia all'azione stimolante di questi composti sulle funzioni immunitarie, che provoca una maggiore sorveglianza e un migliore riconoscimento delle cellule tumorali (Liu, 2007; Meydani *et al.*, 1993 e 1997).

I cereali sono considerati fonti moderate di tocoli, pur apportando 50-80 mg di tocoli /Kg su sostanza secca (Panfili *et al.*, 2003). Anche se il contenuto in tocoli nei cereali è minore rispetto a quello degli oli vegetali e sottoprodotti, il consumo di cereali è molto più elevato, fornendo oltre ai tocoli altri composti bioattivi. Insufficienti sono le conoscenze relative alla biodisponibilità di tali composti dal frumento e dai prodotti derivati. Alcuni studi hanno dimostrato che il rilascio dei tocoli dal grano e dalle altre matrici cerealicole è difficoltoso ed inferiore alla biodisponibilità di tali composti nelle forme presenti negli oli vegetali (Lampi *et al.*, 2008).

Generalmente, i tocotrienoli sono gli isomeri maggiormente presenti, rappresentando più del 50% del contenuto totale di vitamina E in cereali come riso, orzo, grano e avena. In questi cereali i tocoferoli e il β -tocotrienolo sono principalmente localizzati nel germe, mentre gli altri tocotrienoli sono localizzati nel pericarpo, nello strato aleuronico e subaleuronico e nell'endosperma (Tiwari and Cummins, 2009). Il loro contenuto può variare in relazione al genotipo, al grado di maturazione ed alle condizioni ambientali di coltivazione (Tabella 6).

Tabella 6. Contenuto in tocoli di diversi cereali (Tiwari and Cummins, 2009)

Cereals	Tocopherols (mg/kg)				Tocotrienols (mg/kg)				Reference
	α -TP	β -TP	γ -TP	δ -TP	α -TT	β -TT	γ -TT	δ -TT	
Barley	7.7–10.6	0.2–0.9	1.7–5.6	0.0–0.7	24.9–40.3	1.9–10.6	4.4–16.0	0.2–2.3	Andersson <i>et al.</i> (2008), Panfili <i>et al.</i> (2003), Peterson (1994), Zieliński <i>et al.</i> (2001)
Barley-Hulled	8–12	0.3–0.7	1.2–2	0.1–8.5	26–45	3.0–18.0	5–14.0	0.2–2	Cavallero <i>et al.</i> (2004), Panfili <i>et al.</i> (2008)
Barley-Hull-less	8–11	0.3–1.1	3–5	0.3–1.1	25–39	3.0–8.0	7–11.0	0.7–1.2	Cavallero <i>et al.</i> (2004); Panfili <i>et al.</i> (2008)
Wheat	4–6.5	7.8	4.0–6.0	0.2–0.3	6.2	30.9			Nielson and Hansen (2008a), Zhou, Yin, & Yu (2005)
Durm Wheat	7.2–12.5	2.8–4.8			3.13–6.9	18.69–39.6			Panfili <i>et al.</i> (2003); Hidalgo <i>et al.</i> (2006)
Soft Wheat	15.9	9.5			6.4	42.5			Panfili <i>et al.</i> (2003)
Einkorn	8.1–16.9	2.0–8.9			6.8–24.9	29.5–83.5			Hidalgo <i>et al.</i> (2006)
Spelta	14.3–14.4	10.1–10.2			5.5–6.2	27.5–36.9			Hidalgo <i>et al.</i> (2006)
Oat	6.6–14.9	0.5–3.0	0.4	0.01	13.3–56.4				Panfili <i>et al.</i> (2003), Zieliński <i>et al.</i> (2001)
Rice	4.8–10.0				2.3–7.0		5.8–7.8		Heinemann <i>et al.</i> (2008)
Rye	6–20.1	1.3–5.8	0.1–0.6		5.4–27.4	4.2–17	0.2–0.3		Nyström <i>et al.</i> (2008), Ryyänen <i>et al.</i> (2004); Zieliński <i>et al.</i> (2007)
Corn	1.4–32.5	0.2	2.4–63.3	0.2–4.3	5.3		11.3	0.4	Kurilich and Juvik (1999), Panfili <i>et al.</i> (2003)

Realtivamente al frumento duro, sono presenti solo gli isomeri α e β dei tocoferoli e tocotrienoli e il β -tocotrienolo risulta essere il composto di gran lunga preponderante fra i tocoli (in media circa 30 mg/Kg) (Panfili *et al.*, 2003), pur presentando nell'ambito della stessa cultivar un'ampia variabilità a seconda della provenienza dei campioni. Relativamente alla localizzazione degli isomeri della vitamina E la Tabella 7 riporta la distribuzione degli isomeri nei diversi strati della cariosside. Essendo i tocoli maggiormente concentrati nel germe e negli strati esterni della cariosside, i processi di molitura determinano un significativo impoverimento di tali composti bioattivi negli sfarinati (Tiwari and Cummins, 2009). Tuttavia un'altra importante causa di diminuzione di questi composti è data dalla loro suscettibilità ai trattamenti tecnologici e ai processi ossidativi che possono verificarsi durante i processi di trasformazione (Hidalgo *et al.*, 2009; Tiwari and Cummins, 2009).

Tabella 7. Contenuto in tocoli delle frazioni di molitura del frumento (mg/Kg) (Tiwari and Cummins, 2009)

	α -TP ^a	β -TP ^a	γ -TP ^a	δ -TP ^a	α -TT ^b	β -TT ^b	δ -TT ^b
Bran	4,1-6,5		3,7-5,7	0,2-0,4			
Germ	177,7-181,6	65,6	6,2	0,1	2,6-3,0	15,6	0,1
Hull	20,1	8,0	26,5	0,3	9		0,2
Flour	9,6	4,5			3	15,7	

^a: TP=tocopherols; ^b: TT= tocotrienols

1.2.3 I carotenoidi

I carotenoidi sono un gruppo eterogeneo di pigmenti di colore giallo-arancio riscontrati nei principali sistemi biologici, che possono essere divisi in due classi generali: i caroteni e le xantofille.

Diverse matrici cerealicole e i loro sottoprodotti sono stati analizzati per il contenuto in singoli carotenoidi e carotenoidi totali da diversi autori (Hidalgo *et al.*, 2010; Panfili *et al.*,

Sezione III

2004). Secondo quanto riportato, il mais risulta essere il campione con il più alto livello in carotenoidi (11,14 mg/Kg s.s.); questo è dovuto principalmente al maggior contributo dell' α + β -carotene, della β -cryptoxantina (2,40 mg/Kg s.s.), non rilevabile negli altri cereali, e della zeaxantina (6,43 mg/Kg s.s.). Ad eccezione del mais, che mostra una tipica composizione in carotenoidi, il principale composto rilevato negli altri cereali risulta essere la luteina, seguita dalla zeaxantina e dall' α + β -carotene. Tra tutti i cereali il frumento duro è quello che mostra il maggior contenuto in luteina (2,65 mg/Kg s.s.), seguito dal dicocco (1,78 mg/Kg s.s.), dallo spelta (1,46 mg/Kg s.s.) e dal frumento tenero (1,31 mg/Kg s.s.); il suo rapporto con la zeaxantina è di circa 2. Il più alto valore dell' α + β -carotene è stato trovato nel mais (1,44 mg/Kg s.s.) per le altre specie rientra in un range con un minimo di 0,01 riscontrato nell'avena ed un massimo di 0,14 mg/Kg s.s. nel frumento duro (Tabella 8).

Tabella 8. Contenuto in carotenoidi di diversi cereali e loro derivati (Panfili *et al.*, 2004)

species	no. of samples	carotenoid (mg/kg of dw)				totals
		α + β -carotene	β -cryptoxanthin	lutein	zeaxanthin	
oat	1	0.01		0.23	0.12	0.36
spelt	3	0.04 ± 0.01		1.46 ± 0.44	0.12 ± 0.03	1.62 ± 0.45
dicoccon	3	0.05 ± 0.02		1.78 ± 0.37	0.19 ± 0.04	2.02 ± 0.41
durum wheat	14	0.14 ± 0.04	traces	2.65 ± 0.65	0.26 ± 0.04	3.05 ± 0.72
soft wheat	3	0.05 ± 0.01	traces	1.31 ± 0.10	0.14 ± 0.06	1.50 ± 0.16
maize	1	1.44	2.40	0.87	6.43	11.14
barley	3	0.05 ± 0.01		0.86 ± 0.12	0.30 ± 0.15	1.21 ± 0.27
flour	3	0.03 ± 0.01		1.43 ± 0.04	0.06 ± 0.03	1.52 ± 0.06
semolina	14	0.10 ± 0.06		2.48 ± 0.48	0.11 ± 0.02	2.69 ± 0.53
soft wheat germ	2	0.91 ± 0.08	traces	1.71 ± 0.05	2.96 ± 0.01	5.58 ± 0.44
durum wheat germ	2	0.68 ± 0.07	traces	2.60 ± 0.07	2.14 ± 0.01	5.42 ± 0.57

La luteina, a differenza degli altri antiossidanti, è presente uniformemente nei diversi strati all'interno della cariosside (Figura 5).

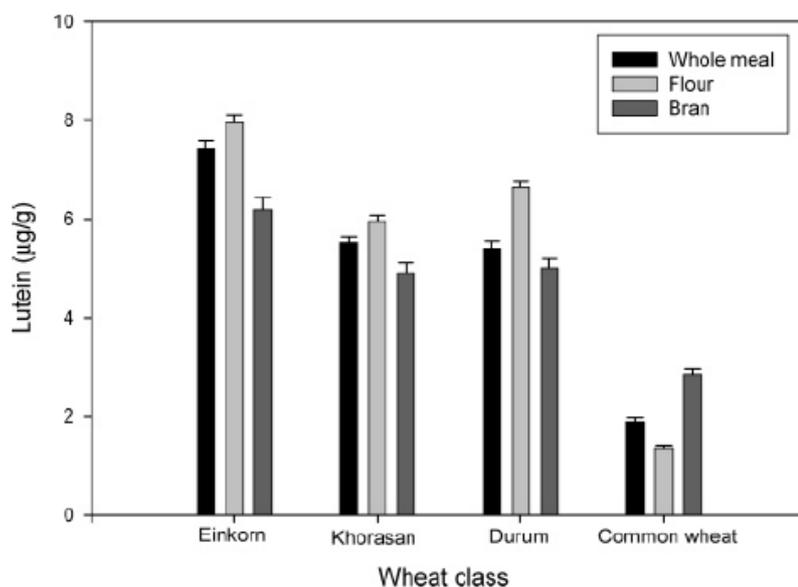


Figura 5. Distribuzione della luteina nelle frazioni della cariosside di frumento (Abdel-Aal *et al.*, 2007)

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. Borrelli *et al.* (2003) hanno osservato una significativa variabilità, sia genetica che ambientale, nel contenuto in β -carotene e luteina, anche se sono state individuate delle cultivar con maggiore stabilità nel contenuto in questi pigmenti nelle diverse zone di coltivazione. Recentemente è stato riscontrato un incremento nel contenuto in carotenoidi con il deficit idrico e la concimazione solfatica (Panfili *et al.*, 2005).

Come risultato della loro attività antiossidante, i carotenoidi sono soggetti ad ossidazione, fenomeno che viene accelerato da catalizzatori organici ed inorganici e da fattori fisici come radiazioni luminose e temperatura. Pertanto una perdita rilevante di questi composti nei derivati dei cereali può aver luogo durante le operazioni di trasformazione tecnologica, laddove intervengono trattamenti termici e condizioni favorevoli ai processi ossidativi. Al di là dei fattori chimico-fisici, altri fattori come quelli colturali, le caratteristiche del cereale di

Sezione III

partenza e i parametri di processo tecnologico possono influire sull'entità della perdita e la quantità residua dei componenti antiossidanti nel prodotto finale.

CAPITOLO 2

METODICHE DI ESTRAZIONE E DI DOSAGGIO DELLE PRINCIPALI SOSTANZE ANTIOSSIDANTI E DELLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE TOTALE NEL GRANO DURO

La determinazione dei composti antiossidanti comprende diversi aspetti e la strategia analitica da adottare dipende dal campione da analizzare, l'analita e la natura del problema (Robards, 2003). Negli alimenti di origine vegetale il sistema degli antiossidanti è veramente complesso e composto da sostanze con target, dimensioni ed interazioni con altri composti differenti (Kerchev and Ivanov, 2008). La strategia analitica coinvolge il campionamento e la preparazione del campione, l'estrazione dei composti antiossidanti dalla matrice, la separazione, identificazione e quantificazione degli stessi.

2.1 CAMPIONAMENTO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per ottenere dati analitici comprensibili e reali, i campioni devono essere rappresentativi dell'intero lotto sotto esame e devono essere adeguatamente preparati per l'analisi. Secondo alcuni autori, i principali passaggi nel campionamento sono:

- identificazione della popolazione dalla quale saranno ottenuti i campioni;
- selezione e prelievo di campioni validi da questa popolazione;
- riduzione in un campione di formato e dimensioni adatto all'analisi di laboratorio.

Lo scopo del campionamento è di assicurare che una porzione del materiale rappresenti in modo soddisfacente la totalità. Nel progettare un piano di campionamento, dovrebbero essere considerati i seguenti fattori:

- lo scopo dell'analisi (informazione richiesta);
- la natura della popolazione che deve essere studiata;

Sezione III

- la natura dell'analita (la sostanza che deve essere quantizzata) e le interazioni di tipo fisico-chimico con altre componenti;
- la distribuzione dell'analita all'interno della popolazione;
- l'accuratezza desiderata e la precisione dei risultati analitici;
- le analisi da eseguire.

Più il materiale è eterogeneo e maggiori sono le difficoltà per ottenere un campione rappresentativo. Poiché i campioni alimentari sono tipicamente eterogenei, idealmente dovrebbe essere analizzato un ampio numero di campioni oppure si può effettuare il campionamento randomizzato, che consiste nel prelievo di aliquote da parti differenti dell'intero lotto, da miscelare per ottenere un composto abbastanza omogeneo.

Al fine di ottenere un campione per analisi piccolo e omogeneo, mantenendo la sua rappresentatività, sono necessarie operazioni fisiche, come tagliare a pezzi, miscelare, macinare, frullare e setacciare, effettuate insieme con la riduzione del volume. Il processo può essere fatto manualmente o usando mulini, miscelatori, macinini e taglieri disponibili in commercio. Poiché l'alimento è di solito analizzato nella forma in cui è comunemente consumato, le parti non edibili sono rimosse prima della preparazione del campione.

Durante le fasi di preparazione del campione da analizzare, è opportuno sia evitare il surriscaldamento del campione con immersione in bagno di ghiaccio, sia l'esposizione alla luce ed escludere l'ossigeno lavorando sotto flusso di azoto, per scongiurare l'ossidazione degli antiossidanti.

Le procedure di preparazione del campione dovrebbero essere adattate alla natura dell'alimento, all'analita, al metodo analitico, come pure alla distribuzione dell'analita nell'alimento.

I problemi incontrati dagli analisti nella preparazione dei campioni includono:

- difficoltà nell'ottenere piccoli campioni rappresentativi dai grandi campioni;
- perdita di materiale vegetale;

- difficoltà nel rimuovere materiale estraneo dalle piante senza rimuovere costituenti che contengono l'analita;
- cambiamenti enzimatici prima e durante l'analisi;
- cambiamenti compositivi durante la macinazione;
- cambiamenti nei componenti instabili (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004).

2.2 ESTRAZIONE DEI COMPOSTI ANTIOSSIDANTI

Oltre alla preparazione del campione stesso, è di fondamentale importanza il tipo di solvente scelto per l'estrazione, così come lo sono il tempo e la temperatura di estrazione (Robards, 2003). Una buona estrazione dovrebbe rilasciare tutti gli antiossidanti dalla matrice alimentare e portarli in soluzione, senza alterarli ed essere adattata ai diversi alimenti analizzati.

Diversi autori utilizzano vari protocolli per l'estrazione dei principali antiossidanti presenti nelle matrici vegetali. Di solito, le frazioni idrosolubili sono estratte separatamente dalle frazioni liposolubili (Kerchev and Ivanov, 2008).

La maggior parte delle metodiche di estrazione delle sostanze idrosolubili presenti in letteratura suggerisce procedure alternative, molto simili tra loro, che vedono essenzialmente l'uso di due tipologie di soluzioni di estrazione:

- acetone-acqua da soli (Pellegrini *et al.*, 2003 e 2006; Wang *et al.*, 1996), o in combinazione 70/30 v/v (Georgé *et al.*, 2005);
- etanolo-acqua 70/30 (Ismail *et al.*, 2004) o 80/20 (Goupy *et al.*, 1999).

alle quali seguono dosaggi spettrofotometrici o cromatografici.

Si stanno diffondendo nuove tecniche di estrazione come l'SPE, la microestrazione in fase solida, l'estrazione ad alte pressioni, l'estrazione con microonde e l'estrazione con membrane, caratterizzate da automazione e minore utilizzo di solventi. Tuttavia le tecniche convenzionali continuano ad essere quelle maggiormente utilizzate nelle determinazioni analitiche.

Sezione III

L'estrazione con fluidi supercritici offre diversi vantaggi rispetto alle tecniche convenzionali, in particolar modo per i composti instabili termicamente e chimicamente (Robards, 2003).

Relativamente ai fenoli, la maggior parte degli studi presenti in letteratura riporta, per l'estrazione dei fenoli solubili dai vari cereali, varie soluzioni acquose di metanolo, etanolo e acetone (Serpen *et al.*, 2008; Liu, 2007) anche se sono stati utilizzati anche solventi come l'etil-acetato e il dimetilsolfossido (Robards, 2003). Il metanolo assoluto, per esempio, è stato utilizzato per l'estrazione dei polifenoli del tè, mentre l'uso di una soluzione al 50% di acetone per l'estrazione dei polifenoli nel grano è risultato più efficace rispetto all'estrazione con acqua. I solventi alcolici sono comunemente usati per l'estrazione dei polifenoli da fonti naturali, in quanto permettono un alto recupero di antiossidanti e sono altamente selettivi per i fenoli. In particolare, risultano più efficienti nell'estrazione dei polifenoli miscele di alcol-acqua rispetto ai corrispondenti solventi in purezza (Gironi and Piemonte, 2010).

Ci sono importanti distinzioni da fare a seconda se il campione da analizzare è fresco o essiccato. Infatti nel caso di utilizzo di soluzioni di estrazione acquose, il quantitativo di acqua richiesto nella miscela è minore nei campioni freschi e maggiore in quelli essiccati. Inoltre con i campioni essiccati, come i cereali, solventi a bassa polarità e l'etil-acetato trascinano i composti estraibili presenti nel campione, mentre solventi alcolici rompono le membrane delle cellule e aumentano l'estrazione dei componenti endocellulari (Robards, 2003).

Tali metodiche, però, tendono ad estrarre solo i fenoli solubili e non quelli legati insolubili (Adom and Liu, 2002). Tecniche di estrazione più esaustive per quantizzare anche i fenoli legati dai vari cereali prevedono, sul residuo dopo estrazione della frazione fenolica solubile, una fase di idrolisi con idrossido di sodio, seguita da una fase di aggiustamento del pH con acido debole e da una serie di estrazioni con etilacetato (Adom *et al.*, 2003 e 2005; Adom and Liu, 2002). Da uno studio comparativo sul contenuto in composti fenolici totali in mais, frumento, avena e riso di Adom and Liu (2002), è evidente la sottostima di tale valore riportata nelle pubblicazioni degli anni precedenti.

L'idrolisi alcalina è la principale procedura attuata per l'estrazione dei composti legati, in quanto l'idrolisi acida potrebbe degradare gli acidi idrossicinnamici e benzoici. Tuttavia una percentuale di polifenoli legati ai costituenti della parete cellulare rimangono intrappolati nella matrice rimanendo insolubili (Arranz and Saura-Calixto, 2010). Recentemente alcuni autori hanno applicato sui cereali una procedura di idrolisi acida in presenza di una soluzione di metanolo/acido solforico (90:10 v/v) sul residuo dopo estrazione con metanolo/acetone per la determinazione dei polifenoli legati. I risultati hanno dimostrato che il contenuto in polifenoli degli idrolizzati con acido solforico, sia di farina che di crusca di grano, è maggiore rispetto agli idrolizzati con soluzioni alcaline e che quindi l'idrolisi acida, di solito omessa nell'analisi dei polifenoli nei cereali, potrebbe essere applicata per ottenere dati più realistici (Arranz and Saura-Calixto, 2010).

Per quanto riguarda i carotenoidi e i tocoli (antiossidanti rappresentativi della frazione lipofila nei cereali), essendo gli stessi intimamente associati con diversi composti della matrice di partenza, i vari metodi di estrazione servono a liberare tali composti dalla matrice e ad estrarla in un solvente che sia compatibile con il sistema cromatografico, cercando di limitare la presenza di sostanze estranee che possono interferire durante l'analisi.

I sistemi di estrazione di tali composti possono appartenere ad una delle seguenti categorie (Lang *et al.*, 1992):

1. estrazione in **fase singola** con un solvente organico miscibile; è condotta sciogliendo il campione in un solvente organico idrosolubile come alcool o acetone. Con questo sistema i composti della matrice possono rimanere in soluzione e interferire durante l'analisi;
2. estrazione in **fase doppia** con un alcol e un solvente organico immiscibile con l'acqua; i carotenoidi e i tocoli, ad esempio, vengono estratti dalla fase acquosa con un solvente organico, come etanolo, metanolo o isopropanolo, successivamente si aggiunge un solvente immiscibile e dopo agitazione si attende la separazione delle fasi con estrazione di tali composti in quella non polare rispetto a quella polare;

3. **saponificazione**, capace di liberare gli esteri dei composti liposolubili e i composti dalla matrice e di ridurre il carico di sostanze estranee che possono interferire con la separazione cromatografica, semplificando la separazione cromatografica, l'identificazione e la quantificazione.

Molte procedure di estrazione prevedono l'uso di antiossidanti per proteggere l'analita da fenomeni di ossidazione che possono verificarsi durante le operazioni estrattive soprattutto nel caso di idrolisi (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004; Robards, 2003).

Quando la matrice lo permette può essere eseguita anche una saponificazione a freddo, anche se, nella maggior parte dei casi la saponificazione a caldo risulta una tappa irrinunciabile dell'analisi.

Per la determinazione degli antiossidanti sia idrofili che lipofili da matrici complesse, come i cereali, si applicano generalmente due metodiche estrattive che estraggono separatamente le componenti antiossidanti. Le difficoltà aumentano se si vuole estrarre con un'unica metodica entrambe le componenti, oltre che selezionare il giusto metodo di dosaggio senza nessuna sottostima. Pochi sono i riferimenti bibliografici a riguardo e, tra questi, non mancano difficoltà di procedura e lunghi tempi di analisi.

Tra i metodi riportati, quello di Goupy *et al.*, (1999) prevede l'uso di acetone al 70% (v/v) come soluzione di estrazione, seguito da successive estrazioni con acetone al 70% (v/v), ciascuna per 30min a 4°C. Dopo rimozione dell'acetone, è possibile separare gli antiossidanti liposolubili (carotenoidi e tocoli) con tre successive estrazioni con etere di petrolio; le tre fasi organiche vengono combinate, recuperate, filtrate e portate a secco e analizzate in HPLC. Gli antiossidanti idrosolubili (polifenoli totali) vengono estratti, invece, dal residuo acquoso con etilacetato per tre volte; le tre fasi organiche sono recuperate e trattate come per la fase liposolubile, fino al recupero finale in metanolo e iniezione in HPLC.

2.3 DOSAGGIO DEGLI ANTIOSSIDANTI

Tra le procedure di dosaggio (sia per i fenoli -liberi e legati-, sia per i carotenoidi e i tocoli) l'uso della cromatografia liquida ad alta prestazione -HPLC- (Panfili *et al.*, 2003 e 2004; Adom *et al.*, 2003 e 2005; Adom and Liu, 2002), che permette di identificare i singoli composti antiossidanti, è sicuramente la tecnica di analisi più affidabile.

Nella separazione cromatografica dei polifenoli si utilizza di solito una cromatografia in fase inversa con una colonna C₁₈ e diverse fasi mobili. Di solito le colonne presentano una lunghezza di 100-300mm con un impaccamento di 5-10 μ m, ed è di solito applicata una eluizione in gradiente. Le fasi mobili utilizzate sono diverse e comprendono un componente acquoso e un solvente organico meno polare, come acetonitrile o metanolo. Di solito è aggiunto ai solventi un acido (acetico, formico, fosforico) per mantenere costante la concentrazione di acidi durante la corsa cromatografica. La rilevazione viene di solito effettuata tramite spettrofotometro o fotodiodi o accoppiata alla spettroscopia di massa (Robards, 2003).

Relativamente ai composti liposolubili, sia carotenoidi che tocoli possono essere separati mediante cromatografia sia in fase normale che in fase inversa.

Per i tocoli, la cromatografia in fase normale è più efficiente nel separare β e γ -tocoferoli e tocotrienoli, vitameri presenti nei cereali (Panfili *et al.*, 2003). La rilevazione dei tocoli è effettuata di solito con l'ausilio di un fluorimetro.

Per i carotenoidi la maggior parte delle procedure di separazione prevede l'uso di HPLC in fase inversa, che è abile nel separare α - e β -carotene e i carotenoidi in generale, ma è meno efficiente della fase normale nella separazione di luteina, zeaxantina e altri isomeri geometrici. I profili HPLC completi dei carotenoidi degli alimenti di origine vegetale presenti in letteratura sono stati determinati utilizzando colonne in fase inversa, dando solo la concentrazione combinata di luteina, zeaxantina e altri loro isomeri geometrici. Relativamente

Sezione III

ai cereali, Panfili *et al.*, (2004) hanno utilizzato una separazione cromatografica in fase normale abbinata ad uno spettrofotometro o un fotodiodi.

I polifenoli possono essere quantificati anche con il saggio colorimetrico del Folin-Ciocalteu, che venne proposto la prima volta da Singleton *et al.*, (1999), per la determinazione del contenuto in polifenoli totali nel vino; da allora, numerose sono state le applicazioni in diverse matrici alimentari, al punto da essere oggi considerato il metodo di eccellenza nella determinazione dei polifenoli totali. Spesso lo si trova in combinazione con proposte di saggi per la determinazione della capacità antiossidante totale, per la forte correlazione positiva tra il contenuto in polifenoli totali e la capacità antiossidante. L'analisi risulta conveniente, semplice e riproducibile; lo svantaggio principale riguarda, invece, il dosaggio della frazione lipofila, per la maggiore presenza di interferenti (Huang *et al.*, 2005).

2.4 DOSAGGIO DELLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE

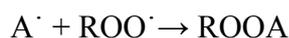
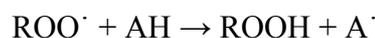
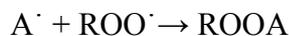
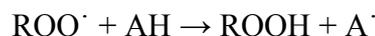
La capacità antiossidante totale (TAC) è un parametro che prende in considerazione tutte le interazioni sinergiche e cumulative tra antiossidanti noti, ma anche tra quelli non identificati presenti nel campione. Diversi sono i metodi sviluppati nel corso degli ultimi anni per misurare la TAC di campioni biologici, inclusi gli alimenti di origine vegetale.

Considerando una matrice complessa come quella dei cereali costituita sia da antiossidanti lipofili che idrofili, per risalire alla capacità antiossidante totale semplicemente si sommano i due risultati, (lipofila e idrofila) escludendo, però, le possibili interazioni sinergiche tra antiossidanti idro e liposolubili (Pellegrini *et al.*, 2003).

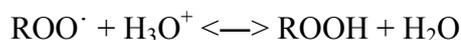
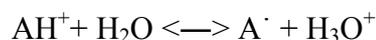
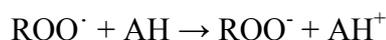
La determinazione della capacità antiossidante totale è ancora oggi un problema non totalmente risolto. Approssimativamente sono conosciute 20 metodiche analitiche differenti ed una esatta comparazione dei risultati ed una loro interpretazione generale sono praticamente impossibili, per l'enorme variabilità delle condizioni sperimentali e le differenze riguardo le proprietà fisico-chimiche dei substrati ossidabili utilizzati (Stratil *et al.*, 2006).

I principali dosaggi selezionati possono essere classificati in due categorie:

1. procedure basate su reazioni riguardanti il trasferimento di atomi di idrogeno:



2. procedure basate su reazioni riguardanti il trasferimento di elettroni:



Alla prima categoria, dove il substrato e l'antiossidante (AH) competono per la generazione di radicali perossilici attraverso la decomposizione di composti azotati, appartengono l'ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) ed il TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter).

Alla seconda categoria, invece, appartengono il TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), il FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power), il DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging Capacity Assay) e il FC (Folin-Ciocalteu). In questo caso si misura la capacità di un antiossidante di ridurre un ossidante (che cambia colore quando ridotto), reazione più lenta rispetto alla prima categoria e pH-dipendente. Il grado di variazione del colore è correlato alla concentrazione di antiossidanti nel campione (Huang *et al.*, 2005).

Di seguito viene riportato un elenco delle metodiche più ricorrenti per la determinazione della capacità antiossidante, indicandone, ove possibile, principali vantaggi e svantaggi (Tabella 9).

Tabella 9. Schema riassuntivo dei principali metodi di misura dell'attività antiossidante totale (Zulueta *et al.*, 2009; Somogyi *et al.*, 2007)

	ORAC(FL)	TRAP	TEAC	FRAP
Misure	Capacità antiossidante totale (TAC) di antiossidanti idrofili e lipofili	TAC	TAC	TAC
Composti rivelati	Fluoresceina, perdita dell'intensità di fluorescenza	R-phycoeritrina (R-PE), abbattimento di fluorescenza dell'R-PE	ABTS ⁺ , assorbanza a 734 nm rispettando il tempo di formazione dell'ABTS ⁺	Complesso tripiridiltriaina/ferroso colorato
Misure dirette	Inibizione dell'ossidazione della fluoresceina da parte del radicale perossile	R-phycoeritrina (R-PE)	Formazione del catione radicalico ABTS	Riduzione dello ione ferrico a ferroso
Principio del metodo, vantaggi/svantaggi	Trasferimento di atomi di idrogeno Possibilità di separare frazioni idrofile e lipofile di antiossidanti dal plasma Non è sufficiente per misurare solamente un singolo antiossidante; è influenzato dall'apporto degli antiossidanti fornito con la dieta; sensibile al pH; richiede apparecchiature costose	Trasferimento di atomi di idrogeno	Trasferimento di elettroni Metodo economico, rapido e facile da usare, pH stabile; genera radicali non stabili per lungo tempo; gli antiossidanti reagiscono sia con i reagenti che con i radicali liberi introdotti; no possibilità di paragonare la TAC tra differenti laboratori	Trasferimento di elettroni Non misura antiossidanti contenenti gruppi -SH; bassa sensibilità per l'attività degli antiossidanti "chain-breaking"

Tra le metodiche riportate per la determinazione della capacità antiossidante totale in campioni cerealicoli per avere risultati rapidi è possibile utilizzare le procedure TEAC, FRAP e TRAP, con, ancora oggi però, sottostima del reale contributo della frazione antiossidante liposolubile (meglio considerata solo dal TEAC), soprattutto per la mancanza di una idonea procedura di estrazione della stessa, insieme a quella idrosolubile. Per questo motivo la messa a punto di una metodica che minimizzi tale problematica sarebbe auspicabile.

CAPITOLO 3

SCOPO

I cereali contengono diversi composti ad attività antiossidante quali acidi fenolici, tococromanoli (o tocoli) e carotenoidi e numerosi studi hanno dimostrato che estratti di frazioni di frumento esibiscono capacità di scavenger nei confronti dei radicali liberi e sono in grado di sopprimere la perossidazione lipidica in diversi sistemi.

La presenza di componenti antiossidanti lipo e idrosolubili nelle matrici cerealicole, rende di particolare importanza la messa a punto di un metodo rapido, sensibile ed affidabile in grado di estrarre e determinare contemporaneamente il contributo all'attività antiossidante di entrambe le frazioni.

La letteratura offre una varietà di metodiche di estrazione e dosaggio dell'attività antiossidante che per la variabilità delle condizioni sperimentali e per le differenti proprietà chimico-fisiche dei vari substrati ossidabili coinvolti causa difficoltà nella comparazione dei risultati e nella loro interpretazione generale (Stratil *et al.*, 2006). Inoltre, relativamente alle frazioni liposolubili, più o meno presenti nei vari campioni, (in particolare in quelli cerealicoli), è da riscontrare o l'assenza di determinazione analitica o la determinazione separata rispetto a quella dei composti idrofili, determinando un'ulteriore difficoltà nell'interpretazione e comparazione dei dati di letteratura.

Scopo di questa attività di ricerca è stato la messa a punto di una metodica di estrazione unica che, a partire da campioni di cereali, possa essere facile da applicare, rapida, e soprattutto capace di estrarre una buona percentuale di entrambe le frazioni, idro e liposolubile, permettendo la quantificazione dei diversi antiossidanti e della relativa capacità antiossidante mediante un unico metodo di dosaggio.

La metodica è stata messa a punto e applicata ad un campione di sfarinato integrale di grano duro e alla relativa semola.

CAPITOLO 4

MATERIALI METODI

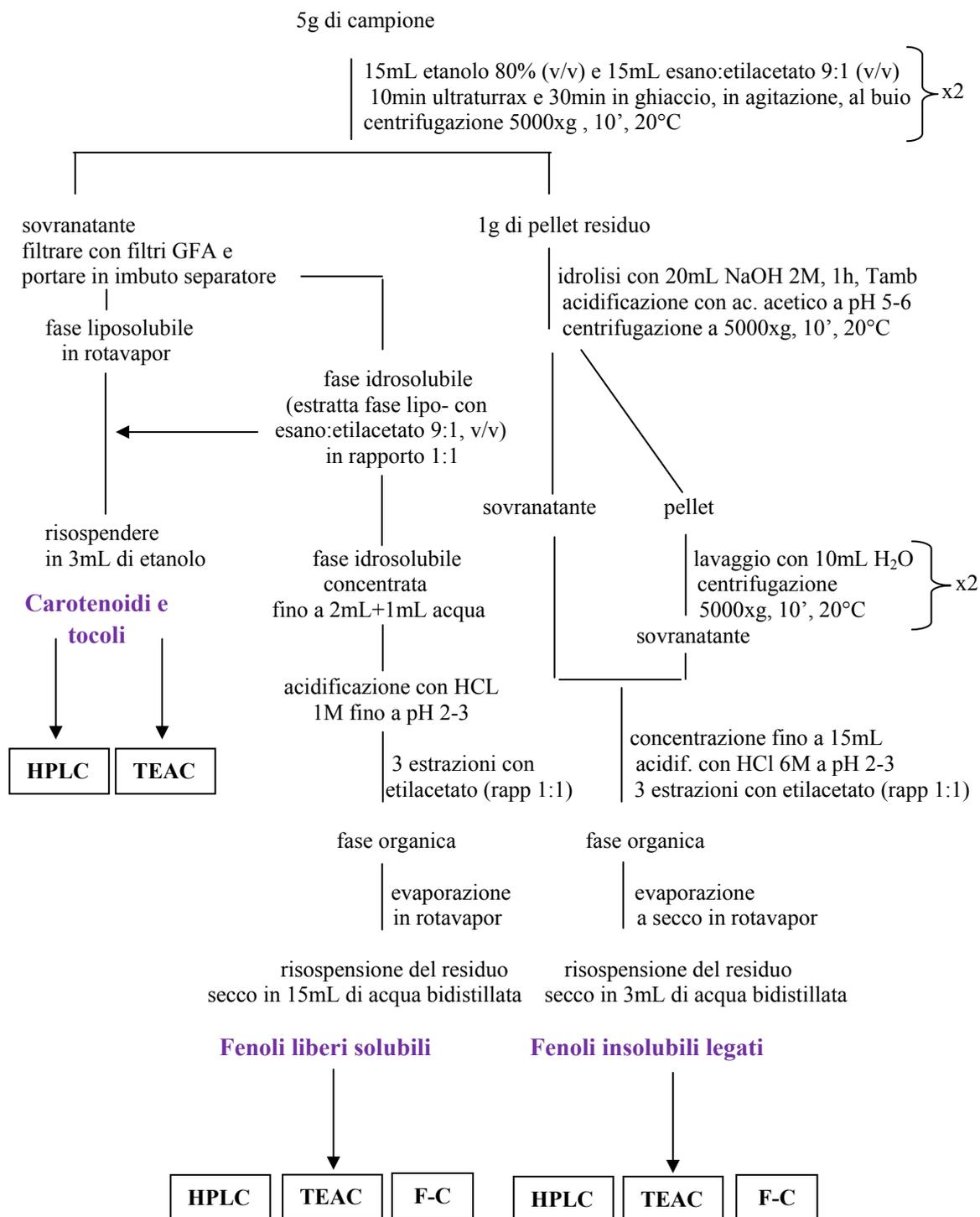
4.1 MATERIALI

La procedura di estrazione messa a punto, indicata con l'acronimo B.E.M. (*Biphasic Extraction Method*), è stata applicata ad un campione di grano duro e relativa semola forniti da un molino locale di Campobasso. La granella è stata macinata con un macinino da laboratorio refrigerato IKA Labortechnik A10. Su di esso è stata applicata la procedura di estrazione messa a punto ed è stato valutato il contenuto in polifenoli totali liberi e legati della frazione idrosolubile, il contenuto in tocoli e carotenoidi liberi della frazione liposolubile e le relative capacità antiossidanti. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti applicando il metodo Adom *et al.*, (2005) modificato, per quanto riguarda i composti fenolici e il metodo Panfili *et al.*, (2003) e (2004), per quanto riguarda i composti liposolubili. Sono state effettuate tre determinazioni per ogni campione. Ogni estrazione è stata condotta in triplo.

4.2 PROCEDURE DI ESTRAZIONE

4.2.1 Estrazione degli antiossidanti liposolubili e idrosolubili in sfarinato integrale di grano duro e semola (Metodo B.E.M.)

La metodica unica di estrazione di entrambe le componenti (idro e liposolubile) messa a punto (B.E.M.) ha previsto una serie di fasi schematizzate in Figura 6. Le singole sostanze antiossidanti così estratte sono state poi dosate in HPLC per quanto riguarda i tocoli e i carotenoidi (fase liposolubile) (Panfili *et al.*, 2003 e 2004, rispettivamente), mentre i fenoli liberi e legati sono stati determinati mediante HPLC secondo Zhou *et al.*, (2004) e con il Folin-Ciocalteu (F-C) secondo Georgé *et al.*, (2005); la misura della capacità antiossidante di entrambe le frazioni è stata valutata con il metodo TEAC (Re *et al.*, 1999).



4.2.2 Estrazione degli antiossidanti idrosolubili in sfarinato integrale di grano duro e semola (Adom et al., 2005 modificato)

Il metodo estrattivo di confronto dei fenoli selezionato in bibliografia è quello adottato da Adom *et al.*, (2005) (Figura 7) con lievi modifiche secondo Moore *et al.*, (2005), relativamente all'acidificazione del sovrinatante contenente i fenoli solubili liberi ottenuta dopo centrifugazione, per eliminare le sostanze che possono interferire con i diversi dosaggi, come le proteine, che precipitano a pH acido (Kerchev and Ivanov, 2008).

Anche in questo caso le singole sostanze antiossidanti di natura idrofila sono state quantizzate con i dosaggi sopra indicati.

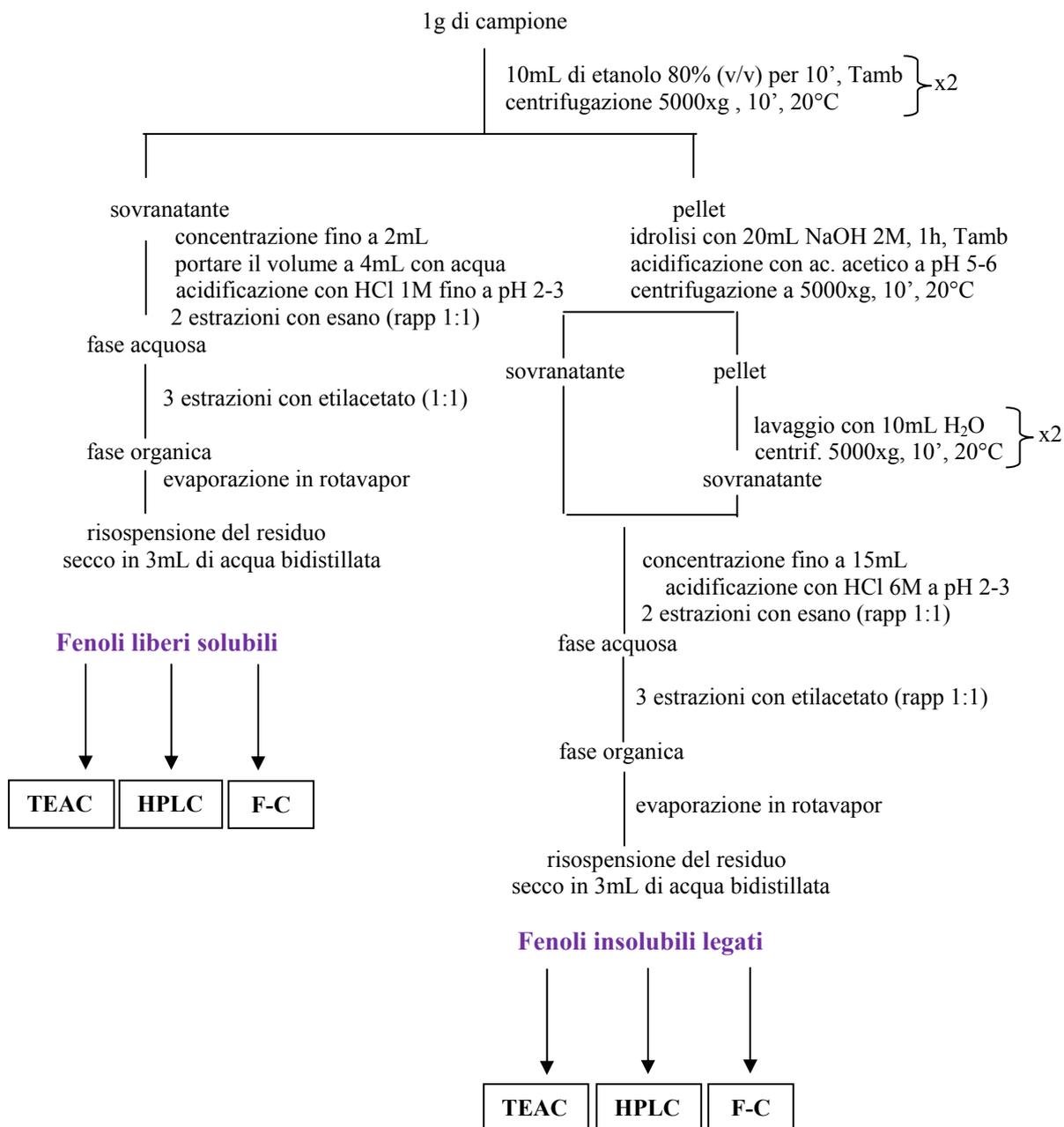


Figura 7. Procedura di estrazione dei fenoli liberi e legati da sfarinati di frumento duro secondo Adom *et al.*, (2005) modificato

4.2.3 Estrazione degli antiossidanti liposolubili in sfarinato integrale di grano duro e semola (Panfili *et al.*, 2003 e 2004)

Il metodo estrattivo di confronto relativamente ai tocoli e i carotenoidi (Panfili *et al.*, 2003 e 2004, rispettivamente) prevede una saponificazione a caldo ed estrazione con solvente e determinazione in HPLC, che permette di risalire al contenuto in antiossidanti lipofili totali.

Per la determinazione dei tocoli e carotenoidi liberi i campioni sono stati sottoposti ad una estrazione senza saponificazione e successiva analisi cromatografica.

In particolare si pesano esattamente 2,0g di campione in provette Pyrex con tappo a vite. A quest'aliquota si aggiungono:

- 5ml di pirogallolo etanolic al 6%, per evitare l'ossidazione dei componenti vitaminici;
- 2ml di NaCl all'1%, per evitare la formazione di emulsioni;
- 2ml di etanolo al 95%;
- 2ml di acqua distillata;
- 10 palline di vetro, per evitare un'ebollizione tumultuosa;
- si insuffla azoto per eliminare l'ossigeno presente e si pone a bagnomaria a 70-80°C per 45 minuti, per favorire la saponificazione del campione;
- dopo la saponificazione si fanno raffreddare i tubi in bagno di ghiaccio;
- si procede con l'estrazione aggiungendo 15ml di NaCl all'1%, per prevenire la formazione di emulsioni, e due porzioni di 15ml di una soluzione di n-esano:etilacetato 9:1 (v/v);
- si porta a secco con evaporatore rotante la fase superiore estratta, poi ripresa con 2ml di una soluzione di esano-isopropilico al 10%.

A questo punto il campione è pronto per essere iniettato in HPLC per la determinazione del contenuto in carotenoidi. La quantificazione dei tocoli, invece, prevede, prima dell'iniezione, una risospensione in una soluzione di esano-isopropilico al 1% (v/v).

Sezione III

I campioni sottoposti a saponificazione sono stati addizionati degli stessi reagenti con la sola eccezione dei 2mL di acqua sostituiti da 2mL di KOH al 60%.

4.3 PROCEDURE DI DOSAGGIO

4.3.1 Determinazione del contenuto in antiossidanti idrosolubili in estratti di sfarinati di grano duro e semola mediante il Folin-Ciocalteu

I fenoli liberi e legati estratti sono stati quantizzati con il saggio del Folin-Ciocalteu secondo quanto riportato da Georgé *et al.*, (2005), già descritto nel paragrafo 5.2 della sezione II.

Il contenuto in fenoli è espresso come mg catechina/Kg di campione e calcolato mediante la seguente formula:

$$\text{fenoli (mg catechina/Kg campione)} = (\text{Abs}/0,001) * V_i / P_i$$

nel caso specifico della procedura di estrazione messa a punto:

$m = 0,001$ = coefficiente angolare retta di taratura con catechina come std ($\mu\text{g}/\text{ml}$)⁻¹

V_i = volume della fase idrosolubile ottenuto a fine estrazione

P_i = peso in g del campione analizzato

4.3.2 Determinazione della capacità antiossidante in estratti di sfarinati integrale di grano duro e semola con il metodo TEAC

La capacità antiossidante totale è stata valutata sia nella frazione idrosolubile che liposolubile con il metodo TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), secondo Re *et al.*, (1999), che valuta la capacità degli antiossidanti di ridurre il catione radicalico ABTS⁺ effettuata misurando il grado di inibizione (I%) del valore di assorbanza a 734nm.

Le letture allo spettrofotometro sono state eseguite tutte dopo 20 minuti dalla preparazione del campione (stabilità del plateau di reazione), costituito da 1mL della soluzione diluita di ABTS

(circa 1:88), da un volume noto di campione (eventualmente diluito) e dal complemento a 100 μ L in acqua della soluzione in cui il campione è risospeso (volume finale 1,1mL), sempre contro etanolo assoluto. Per la fase liposolubile, invece, i complementi a 100 μ L delle diluizioni allestite e il bianco sono costituiti da EtOH.

I risultati finali sono espressi come nmoli di Trolox/g campione, ottenuti dai seguenti passaggi:

$$\mathbf{nmoli\ Trolox/g\ campione = nmoli\ Trolox\ calcolate/ Pf}$$

dove : nmoli Trolox = (I% calcolata/4,5698) * f.d

$$I\% = (1 - Af / Ai) * 100$$

Ai = Abs iniziale del catione radicalico;

Af = Abs misurata 20 minuti dopo l'aggiunta del campione

4,5698 = coefficiente angolare retta di taratura con Trolox (antiossidante di sintesi) in EtOH (nmol⁻¹)

f.d. = fattore di diluizione eventualmente allestita

Nel caso specifico della procedura di estrazione messa a punto il Pf (fattore che riporta ad un grammo di campione le nmoli di Trolox calcolate per i campioni cerealicoli) è pari a:

$$\underline{\text{fase liposolubile}} = (Pi * V \text{ pipettato per dosaggio}) / Vf \text{ fase liposolubile}$$

$$\underline{\text{fase idrosolubile}} = (Pi * Vi \text{ pipettato per dosaggio}) / Vf \text{ fase idrosolubile}$$

Per uniformare i dati i risultati della capacità antiossidante sono espressi come μ molTrolox/Kg

Sezione III

4.3.3 Determinazione degli antiossidanti liposolubili mediante HPLC in sfarinati di grano duro e semola

Per la determinazione cromatografica del contenuto in carotenoidi è stato utilizzato un HPLC Dionex, costituito da una pompa P680, un loop da 25 μ L e un rivelatore UVD 170U, utilizzando una colonna in silice Kromasil Phenomenex (5 μ m I.D., 4,6*250mm), in condizioni isocratiche, con un flusso di 1,5 mL/min, utilizzando come fase mobile una soluzione di n-esano-isopropilico al 5% (v/v) per una durata di 20 minuti, impostando allo spettrofotometro una lunghezza d'onda pari a 450nm (Panfili *et al.*, 2004). L'analisi qualitativa e quantitativa è stata effettuata tramite standard esterni.

Per la determinazione dei tocoli, invece, è stato usato un HPLC Dionex, dotato di una pompa P680 HPLC Pump, un loop da 50 μ L ed un rivelatore RF2000 Fluorescence Detector e la stessa colonna Kromasil Phenomenex. La determinazione dei tocoli è stata effettuata in condizioni isocratiche, con un flusso di 1,6 mL/min, utilizzando come fase mobile una soluzione di n-esano/etilacetato/ac.acetico 97,3/1,8/0,9 (v/v/v) per una durata di 25 minuti, impostando allo spettrofluorimetro una lunghezza d'onda di eccitazione di 285nm e una di emissione di 325nm (Panfili *et al.*, 2003). L'analisi quantitativa dei tocoferoli è stata effettuata utilizzando uno standard esterno, mentre quella dei tocotrienoli riferendosi, per ciascun tocotrienolo, all'area del rispettivo standard di tocoferolo, dal momento che l'intensità di fluorescenza e, cioè l'area del picco di ciascun tocotrienolo è identica a quella del corrispondente tocoferolo a parità di concentrazione.

4.3.4 Determinazione degli antiossidanti idrosolubili mediante HPLC in sfarinati di grano duro e semola

Per la determinazione del contenuto in fenoli liberi e legati della frazione idrosolubile di sfarinato integrale di grano duro ottenuta dalle due diverse procedure di estrazione è stato utilizzato un HPLC Dionex costituito da una pompa 680, un loop da 25 μ L e un rivelatore

UVD 170U; la colonna è una C₁₈ LUNA Phenomenex 5 μ 100A (5 μ m I.D., 4,6*250mm), con un flusso di 1,5 mL/min, utilizzando come fasi mobili per A una soluzione di acido acetico/acqua 2/98 (v/v) e per B una soluzione di acido acetico/acetonitrile/acqua 2/30/98 (v/v/v) e lavorando in gradiente (90% A e 10% B) per una durata di 47 minuti (Tabella 10), impostando allo spettrofotometro una lunghezza d'onda pari a 280nm (Zhou *et al.*, 2004). L'analisi qualitativa e quantitativa ho riguardato solo i composti identificati tramite standard esterni.

Tabella 10. Programma di eluizione in gradiente

Tempo (min)	Pompa A % v/v	Pompa B % v/v
0	90	10
42	0	100
47	90	0

4.4 PROVE DI RECUPERO

Per verificare la validità del metodo di estrazione di antiossidanti lipofili e idrofili messo a punto è stata effettuata una prova di recupero aggiungendo 3,5 μ g di una soluzione standard di acido ferulico (35ppm) e 48,5 μ g di α -tocoferolo (2,43 mg/ml) al campione di semola. Il campione è stato sottoposto in triplo all'intera procedura di estrazione del B.E.M. e successiva determinazione cromatografica. La prova di recupero è stata eseguita anche sulla metodica di confronto (Adom *et al.*, 2005) aggiungendo 3,5 μ g di standard di acido ferulico (35ppm).

4.5 ANALISI STATISTICA

Sui risultati ottenuti è stata applicata un'analisi della varianza con il test di Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$) al fine di valutare la significatività dei dati.

CAPITOLO 5

RISULTATI E DISCUSSIONE

La metodica di estrazione messa a punto, indicata con l'acronimo B.E.M. (*Biphasic Extraction Method*) è stata testata su uno sfarinato integrale di grano duro e sulla relativa semola. I risultati ottenuti, relativamente al contenuto in fenoli, sono stati confrontati con una metodica già presente in letteratura (Adom *et al.*, 2005 modificato), mentre i risultati del contenuto in tocoli e carotenoidi sono stati confrontati con quelli ottenuti applicando il metodo Panfili *et al.*, (2003) e (2004) senza saponificazione. Per convenienza il metodo B.E.M. è indicato con Mtd 1 mentre il metodo di confronto per i fenoli (Adom *et al.*, 2005 modificato) è indicato con Mtd 2 e il metodo di confronto per l'estrazione dei tocoli e carotenoidi (Panfili *et al.*, 2003 e 2004) è indicato con Mtd 3 e Mtd 4, rispettivamente.

5.1 PROVE DI RECUPERO

Allo scopo di verificare la validità del metodo di estrazione messo a punto (B.E.M.) sono state condotte prove di recupero dell'acido ferulico e dell' α -tocoferolo aggiunti al campione di semola soggetto all'intera procedura di estrazione del B.E.M.. La Tabella 11 riporta i risultati ottenuti. Per l' α -tocoferolo è stato riscontrato un recupero pari al 75% con una buona ripetibilità (CV%=0,4%), mentre per l'acido ferulico un recupero pari al 72%, con coefficiente di variazione pari a 0,1%. Relativamente all' α -tocoferolo, Panfili *et al.*, (2003) riporta che il metodo di estrazione senza saponificazione Panfili *et al.*, (2003) (metodo di confronto per il contenuto in tocoli) presenta un recupero per l' α -tocoferolo del 73% e quindi confrontabile con quello ottenuto con il metodo B.E.M.. Per quanto riguarda l'acido ferulico, il recupero ottenuto è confrontabile con i dati di letteratura che riportano percentuali di recupero per gli acidi fenolici (liberi, solubili coniugati e legati) compresi tra il 72% e l'87% (Stracke *et al.*, 2009).

Tabella 11. Percentuali di recupero di acido ferulico e di α -tocoferolo aggiunti al campione di semola (media \pm DS di tre determinazioni)

Mtd 1	Teorica (naturale \pm aggiunta) ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Trovata ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Recupero (%)
Acido ferulico	99,6	72,2 \pm 9,49	72 \pm 0,1
α-Tocoferolo	1118,0	835,1 \pm 11,90	75 \pm 0,3

Mtd 1: B.E.M.

La stessa prova di recupero dell'acido ferulico è stata eseguita sul campione di semola applicando il metodo di estrazione di confronto (Adom *et al.*, 2005 modificato), come indicato in materiali e metodi. Anche per il metodo di confronto si osserva un recupero non elevato, pari al 68% e leggermente inferiore al metodo B.E.M. (Tabella 12).

Tabella 12. Percentuali di recupero di acido ferulico aggiunto al campione di semola (media \pm DS di tre determinazioni)

Mtd 2	Teorica (naturale \pm aggiunta) ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Trovata ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Recupero (%)
Acido ferulico	374,3	251,6 \pm 8,25	68 \pm 1,6

Mtd 2: Adom *et al.*, (2005) modificato

5.2 VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ ESTRATTIVA DEGLI ANTIOSSIDANTI IDROSOLUBILI DEI METODI APPLICATI

La Figura 8 riporta un tipico cromatogramma di fenoli legati (b) confrontato con uno standard di riferimento (a).

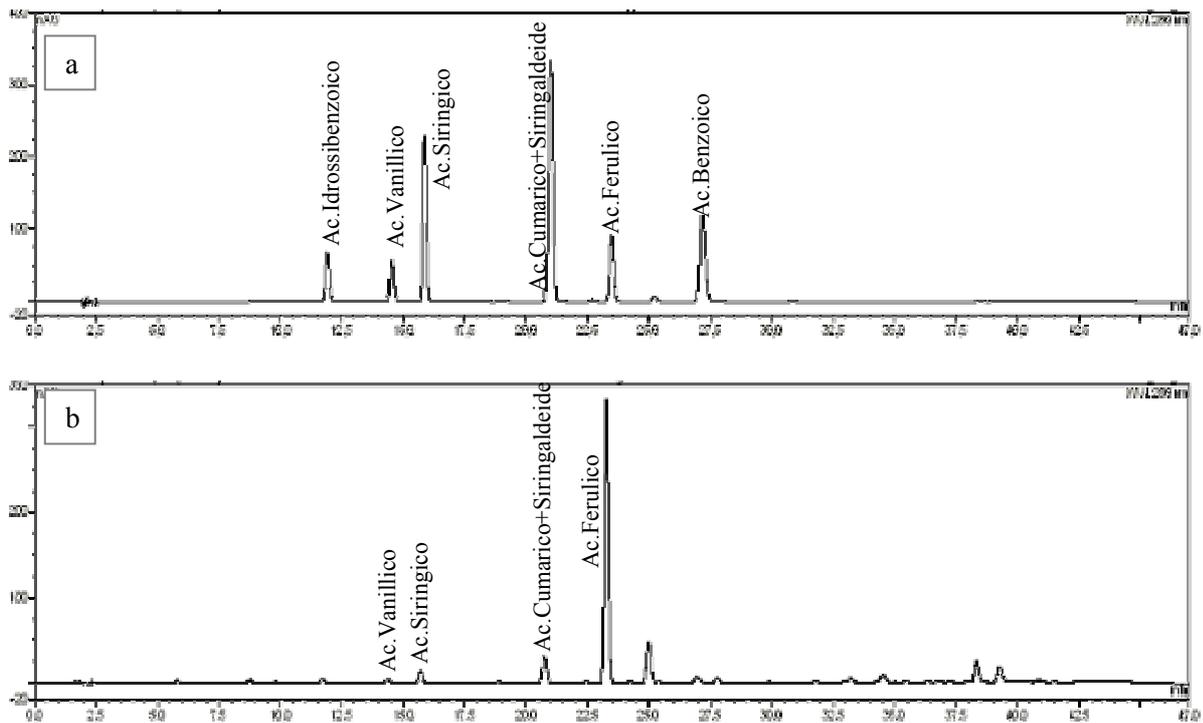


Figura 8. Tipico cromatogramma di uno standard di fenoli (a) e di fenoli legati (b) di uno sfarinato integrale estratti con il B.E.M.

In Tabella 13 e 14 sono riportati i risultati ottenuti dal confronto tra le due metodiche di estrazione (Mtd 1: BEM e Mtd 2: Adom *et al.*, 2005 modificato) in relazione al contenuto in fenoli liberi e legati nella frazione idrosolubile di un campione di sfarinato integrale di grano duro e di semola, rispettivamente. I fenoli sono stati dosati con il Folin-Ciocalteu e con il metodo HPLC.

Tabella 13. Contenuto in fenoli liberi e legati in sfarinato integrale di grano duro estratti utilizzando i due metodi (media \pm DS di tre determinazioni)

Sfarinato integrale di grano duro		Mtd 1	Mtd 2
Folin-Ciocalteu (mg catechina/Kg s.f.)	Fenoli liberi	26,0 \pm 2,26 ^a	30,4 \pm 4,38 ^a
	Fenoli legati	486,2 \pm 40,66 ^a	485,5 \pm 28,85 ^a
	Fenoli totali	512,2	515,9
HPLC (mg/Kg s.f.)	Fenoli liberi	1,7 \pm 0,16 ^a	1,9 \pm 0,17 ^a
	Fenoli legati	347,0 \pm 28,00 ^a	377,0 \pm 14,67 ^a
	Fenoli totali	348,7	378,9

Mtd 1: B.E.M.; Mtd 2: Adom *et al.*, (2005) modificato

^aDifferenti lettere nella stessa riga indicano differenze significative ($p < 0,05$)

Tabella 14. Contenuto in fenoli liberi e legati in semola estratti utilizzando i due metodi (media \pm DS di tre determinazioni)

Semola		Mtd 1	Mtd 2
Folin-Ciocalteu (mg catechina/Kg s.f.)	Fenoli liberi	11,6 \pm 0,77 ^a	12,7 \pm 1,58 ^a
	Fenoli legati	125,5 \pm 12,51 ^a	131,6 \pm 34,93 ^a
	Fenoli totali	137,1	144,3
HPLC (mg/Kg s.f.)	Fenoli liberi	0,7 \pm 0,13 ^a	0,8 \pm 0,14 ^a
	Fenoli legati	65,2 \pm 2,407 ^a	58,5 \pm 13,43 ^a
	Fenoli totali	65,9	59,3

Mtd 1: B.E.M.; Mtd 2: Adom *et al.*, (2005) modificato

^aDifferenti lettere nella stessa riga indicano differenze significative ($p < 0,05$)

Dalle Tabelle non si evidenziano differenze significative ($p > 0,05$) nella capacità estrattiva dei due metodi nei confronti dei composti fenolici liberi e legati dosati con il Folin e con l'HPLC, sia per quanto riguarda lo sfarinato che la semola.

I dati disponibili in letteratura relativamente ai fenoli dosati con il Folin sono spesso discordanti a causa dei diversi procedimenti estrattivi utilizzati e delle diverse modalità di quantificazione. Confrontando i dati ottenuti con i dati disponibili in letteratura (Tabella 2), il

Sezione III

contenuto in fenoli liberi nello sfarinato integrale riscontrato risulta inferiore; tuttavia, è da sottolineare che in molti lavori di confronto, i valori in fenoli liberi sono stati dosati sull'estratto grezzo iniziale e non sulla frazione idrosolubile acidificata, che è sicuramente più pulita in termini di sostanze interferenti. Relativamente ai fenoli legati, i metodi per la loro estrazione sono simili al metodo messo a punto e i valori riportati in alcuni casi concordano con quelli ottenuti; in altri lavori, seppure dello stesso ordine di grandezza, tali valori sono superiori. Anche per quanto riguarda la semola, i dati relativi al contenuto in fenoli liberi dosati con il Folin-Ciocalteu risultano inferiori ai pochi dati di letteratura (Yu *et al.*, 2004), probabilmente per le stesse motivazioni indicate per lo sfarinato integrale.

Confrontando i contenuti totali in fenoli liberi e legati dello sfarinato integrale e della semola dosati in HPLC, si osserva una riduzione nella semola pari al 57% per i fenoli liberi e all'80% per quelli legati, confermando che i fenoli sono prevalentemente localizzati negli strati esterni della cariosside e sono eliminati con il processo di molitura.

Relativamente alla forma presente nei campioni è da evidenziare che i fenoli liberi, dosati in HPLC, rappresentano circa l'1% sia per lo sfarinato che per la semola (Figura 9) confermando quanto indicato in letteratura (Adom *et al.*, 2002). I dati relativi ai fenoli liberi calcolati dopo analisi in HPLC risultano essere inferiori di circa un fattore dieci rispetto a quelli ottenuti con il dosaggio del Folin-Ciocalteu. È da tenere presente, tuttavia, che il dato HPLC considera, tra i diversi picchi rilevabili, soltanto quelli relativi ai principali composti fenolici noti e quantificabili tramite uno standard esterno; in più va considerata anche l'esigua quantità di fenoli liberi presenti nel campione che ha reso difficoltosa l'identificazione dei picchi ed il relativo dosaggio in HPLC; inoltre, il dosaggio allo spettrofotometro è aspecifico e potrebbe rilevare altri composti non determinati dalla tecnica cromatografica utilizzata o eventuali sostanze interferenti. I dati relativi ai fenoli legati, quando dosati in HPLC rispetto al Folin-Ciocalteu, presentano lo stesso ordine di grandezza, probabilmente perché il passaggio di idrolisi allontana le sostanze interferenti.

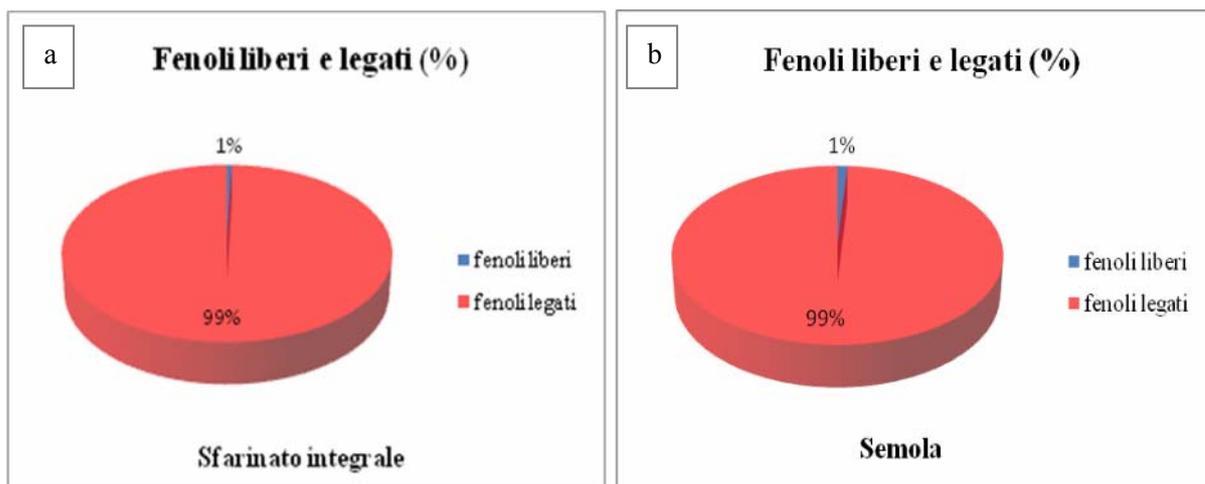


Figura 9. Rapporto percentuale tra il contenuto in fenoli liberi e legati di uno sfarinato integrale di grano duro (a) e di una semola (b) estratti con il B.E.M. e dosati in HPLC

Dall'analisi dei dati cromatografici, si evidenzia che il principale acido fenolico presente sia in forma libera che in forma legata è l'acido ferulico sia nello sfarinato integrale sia nella semola. Tali risultati sono confermati dai dati di letteratura (Li *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2005). In particolare, nello sfarinato integrale i principali fenoli liberi oltre all'acido ferulico (46% del contenuto totale di fenoli liberi), sono l'acido benzoico (21%), vanillico (20%), cumarico+siringaldeide (7%) e siringico (6%). Nel caso dei fenoli legati, l'acido ferulico rappresenta il 98% del contenuto totale di fenoli legati, seguito dagli acidi cumarico+siringaldeide (1%), dall'acido vanillico (0,6%) e siringico (0,4%).

Relativamente ai rapporti percentuali nella semola si confermano i dati ottenuti nello sfarinato integrale; infatti l'acido ferulico rappresenta il 37% e il 95% del contenuto totale in fenoli liberi e legati. Gli altri acidi fenolici presenti nella forma libera sono in ordine decrescente l'acido benzoico (27%), l'acido vanillico (20%), l'acido cumarico+siringaldeide e siringico (entrambi l'8%). Nella forma legata sono presenti oltre all'acido ferulico, anche l'acido vanillico (2%) e cumarico+siringaldeide (2%) e l'acido siringico (1%) (dato non riportato).

5.3 VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ ESTRATTIVA DEGLI ANTIOSSIDANTI LIPOSOLUBILI DEI METODI APPLICATI

La Figura 10 riporta un tipico cromatogramma di carotenoidi (a) e tocoli (b) dello sfarinato integrale di grano duro.

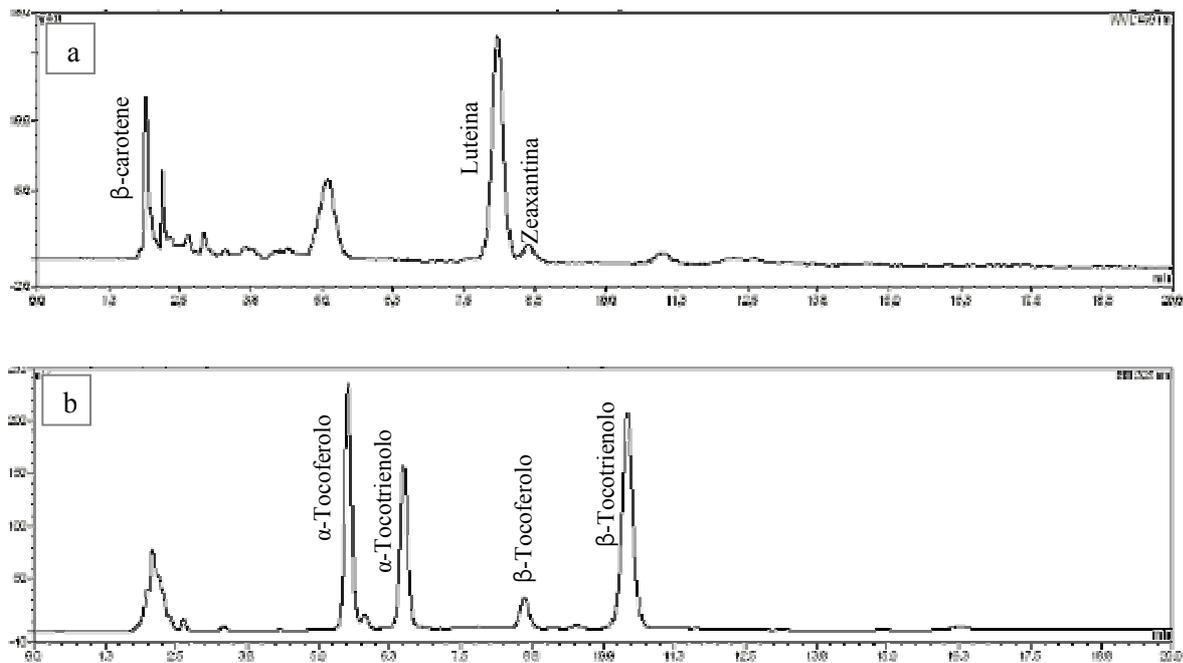


Figura 10. Cromatogrammi tipici di carotenoidi (a) e tocoli (b) nella frazione liposolubile del campione di sfarinato integrale di frumento duro estratto con il B.E.M.

Le Tabelle 15 e 16 riportano il contenuto in tocoli e carotenoidi liberi dello sfarinato integrale e della semola estratti sia con il metodo B.E.M. (Mtd 1) messo a punto, sia con il metodo di confronto Panfili *et al.*, (2003) e (2004) (Mtd 3 e 4), rispettivamente.

Tabella 15. Contenuto in tocoli liberi (mg/Kg s.f.) della fase liposolubile di sfarinato integrale di grano duro e semola estratta utilizzando i due metodi (media \pm DS di tre determinazioni)

Tocoli	Mtd 1	Mtd 3
Sfarinato integrale di grano duro	23,3 \pm 0,12 ^a	25,2 \pm 0,45 ^a
Semola	14,0 \pm 2,35 ^b	12,8 \pm 1,57 ^b

Mtd 1: B.E.M.; Mtd 3: Panfili *et al.*, (2003) senza saponificazione

^{a,b} Differenti lettere indicano differenze significative (p<0,05)

Tabella 16. Contenuto in carotenoidi liberi (mg/Kg s.f.) della fase liposolubile di sfarinato integrale di grano duro e semola estratta utilizzando i due metodi (media \pm DS di tre determinazioni)

Carotenoidi	Mtd 1	Mtd 4
Sfarinato integrale di grano duro	1,2 \pm 0,01 ^a	1,3 \pm 0,12 ^a
Semola	1,7 \pm 0,16 ^a	1,8 \pm 0,22 ^a

Mtd 1: B.E.M.; Mtd 4: Panfili *et al.*, (2004) senza saponificazione

^a Differenti lettere indicano differenze significative (p<0,05)

Confrontando i dati relativi ai componenti liposolubili liberi delle Tabelle, non si osservano differenze significative nel contenuto in carotenoidi e tocoli liberi estratti con il metodo B.E.M. rispetto al contenuto degli stessi antiossidanti lipofili estratti con il metodo Panfili *et al.*, (2003) e (2004) (p>0,05).

I valori riscontrati di antiossidanti lipofili liberi in frumento duro sono in accordo con i dati riportati in letteratura (Tiwari and Cummins, 2009; Fratianni *et al.*, 2005; Panfili *et al.*, 2004 e 2003).

Inoltre confrontando il contenuto in carotenoidi e tocoli liberi tra lo sfarinato e la relativa semola si osserva che mentre i tocoli subiscono una riduzione del contenuto totale con la molitura pari al 40% (p<0,05), i carotenoidi non hanno subito variazioni significative (p>0,05). Tale dato conferma che i tocoli sono maggiormente localizzati nelle parti esterne della cariosside, che vengono allontanate durante la molitura, mentre i carotenoidi, in

particolar modo la luteina, che rappresenta il carotenoide maggiormente rappresentato, sono equamente distribuiti all'interno della cariosside (Tiwari and Cummins, 2009; Borrelli *et al.*, 2008; Panfili *et al.*, 2004).

Inoltre, analizzando i dati cromatografici, è confermato quanto riportato in letteratura secondo cui la luteina e il β -tocotrienolo rappresentano gli antiossidanti lipofili maggiormente presenti, essendo il 72% e il 60% del totale in carotenoidi e tocoli, rispettivamente nello sfarinato integrale (Tabella 17) e l'88% e il 74% dei carotenoidi e tocoli totali nella semola, rispettivamente (Tabella 18).

Tali risultati sono in accordo con i dati di letteratura (Tiwari and Cummins, 2009; Abdel-Aal *et al.*, 2007; Panfili *et al.*, 2003).

Tabella 17. Contenuto in singoli antiossidanti liposolubili (mg/Kg s.f.) dello sfarinato integrale di grano duro estratti con il B.E.M. (media \pm DS di tre determinazioni)

Sfarinato integrale di grano duro			
		media\pmDS	% Totale
Carotenoidi	β-carotene	0,15 \pm 0,058	12
	Luteina	0,87 \pm 0,044	72
	Zeaxantina	0,20 \pm 0,020	16
Tocoli	α-tocoferolo	4,51 \pm 0,309	19
	α-tocotrienolo	3,47 \pm 0,178	14
	β-tocoferolo	1,68 \pm 0,090	7
	β-tocotrienolo	14,31 \pm 0,352	60

Tabella 18. Contenuto in singoli antiossidanti liposolubili (mg/Kg s.f.) della semola di grano duro estratti con il B.E.M. (media±DS di tre determinazioni)

Semola		media±DS	% Totale
Carotenoidi	β-carotene	0,14±0,012	8
	Luteina	1,48±0,147	88
	Zeaxantina	0,06±0,008	4
Tocoli	α-tocoferolo	1,45±0,177	10
	α-tocotrienolo	1,58±0,276	11
	β-tocoferolo	0,64±0,140	5
	β-tocotrienolo	10,33±1,79	74

5.4 VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE DELLA FASE IDROSOLUBILE E LIPOSOLUBILE ESTRATTE CON I METODI UTILIZZATI

Nelle Tabelle 19 e 20 è riportato il confronto tra la capacità estrattiva del B.E.M. e quella di Adom *et al.*, (2005) modificato, in termini di capacità antiossidante, relativamente alla fase idrosolubile (fenoli liberi e legati) e alla fase liposolubile, dello sfarinato integrale e della relativa semola.

La capacità antiossidante dei fenoli liberi e legati estratti con il B.E.M. non presenta differenze significative ($p>0,05$) con i valori ottenuti con il metodo di riferimento (Mtd 2), sia nello sfarinato integrale che nella semola.

La capacità antiossidante della fase liposolubile, estratta solo con il metodo messo a punto, rappresenta circa il 30% e il 20% della capacità antiossidante totale dello sfarinato integrale e della semola, rispettivamente, contro il 70% e l'80% del contributo della fase idrosolubile.

Relativamente alla capacità antiossidante della frazione idrosolubile, questa è determinata principalmente (>90%) dalla frazione idrosolubile legata sia nello sfarinato che nella semola.

Tabella 19. Capacità antiossidante ($\mu\text{moliTrolox/Kg s.f.}$) della fase idrosolubile e della fase liposolubile estratte con il B.E.M. e con il metodo Adom *et al.*, (2005) modificato dello sfarinato integrale di grano duro (media \pm DS di tre determinazioni)

Sfarinato integrale di grano duro		
	Mtd 1	Mtd 2
Fenoli liberi	106,0 \pm 10,96 ^a	113,5 \pm 2,19 ^a
Fenoli legati	3037,7 \pm 233,06 ^a	3461,6 \pm 186,32 ^a
Fase liposolubile	1416,1 \pm 7,09	/
Totale	4559,8	3575,1

Mtd 1: B.E.M.; Mtd 2: Adom *et al.*, (2005) modificato

^a Differenti lettere nella stessa riga indicano differenze significative ($p < 0,05$)

Anche in questo caso, come per i valori sui fenoli discussi in precedenza, la capacità antiossidante relativa alla frazione dei fenoli liberi risulta minore rispetto ai dati di letteratura (Tabella 4); tale differenza potrebbe essere dovuta sia alle differenti tecniche di estrazione che di dosaggio degli antiossidanti presenti in letteratura che vengono applicate spesso all'estratto grezzo, senza ulteriori passaggi di purificazione, applicati, invece nel B.E.M.

Tabella 20. Capacità antiossidante ($\mu\text{moliTrolox/Kg s.f.}$) della fase idrosolubile e della fase liposolubile estratte con il B.E.M. e con il metodo Adom *et al.*, (2005) della semola (media \pm DS di tre determinazioni)

Semola		
	Mtd 1	Mtd 2
Fenoli liberi	45,3 \pm 6,09 ^a	32,8 \pm 5,43 ^a
Fenoli legati	726,1 \pm 63,53 ^a	781,6 \pm 124,29 ^a
Fase liposolubile	198,8 \pm 7,58	/
Totale	970,2	814,4

Mtd 1: B.E.M.; Mtd 2: Adom *et al.*, (2005) modificato

^a Differenti lettere nella stessa riga indicano differenze significative ($p < 0,05$)

Confrontando la capacità antiossidante tra lo sfarinato integrale e la semola si osserva una riduzione della capacità antiossidante della frazione idrosolubile pari al 60% per la forma libera e al 70% per la forma legata, mentre per la frazione liposolubile si registra una riduzione pari all'85%. Questo è in accordo con la diminuzione quantitativa dei composti antiossidanti, sia idrosolubili che liposolubili, discussa in precedenza. Complessivamente dopo il processo di molitura si ha soltanto un 20% della capacità antiossidante inizialmente presente nel prodotto integrale.

5.5 VALUTAZIONE DELLA RIPETIBILITÀ E DELLA RIPRODUCIBILITÀ DEL B.E.M.

Al fine di verificare l'affidabilità del metodo selezionato per l'estrazione delle sostanze antiossidanti sono state condotte prove di ripetibilità e di riproducibilità, dosando, nel campione di sfarinato integrale, la capacità antiossidante nelle frazioni idro e liposolubile, il contenuto in HPLC di tocoli e carotenoidi e il contenuto in fenoli (dosati con il metodo del Folin). Le prove di ripetibilità sono state condotte per un numero di 10 volte nell'ambito della stessa analisi, quelle di riproducibilità su campioni provenienti da estrazioni effettuate in tre giorni differenti.

I risultati sono espressi come CV% dato dai valori della deviazione standard/media*100 (Tabella 21).

Si osserva che il metodo B.E.M. messo a punto presenta un CV% compreso tra 2 e 6% per le prove di ripetibilità e 3 e 9% per le prove di riproducibilità.

Tabella 21. Ripetibilità e riproducibilità del B.E.M. su sfarinato integrale di grano duro

		Sfarinato integrale	
		Ripetibilità CV% (n=10)	Riproducibilità CV% (n=3)
Tocoli		2,5	3,5
Carotenoidi		2,2	3,3
Capacità antiossidante fase liposolubile		2,7	3,8
Capacità antiossidante fase idrosolubile	fenoli liberi	4,0	8,3
	fenoli legati	5,0	8,7
Fenoli Folin-Ciocalteu	fenoli liberi	6,1	8,7
	fenoli legati	4,7	8,4

n=10 misure sullo stesso estratto

n=3 ripetizioni su tre estratti

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI

Data la differente e complessa composizione in antiossidanti dei campioni cerealicoli per la presenza di componenti liposolubili ed idrosolubili, e la mancanza in letteratura di un'unica metodica capace di estrarre tutti i composti antiossidanti, l'obiettivo di quest'ultima attività di ricerca è stato quello di mettere a punto un metodo di estrazione rapido, sensibile ed affidabile in grado di estrarre con un sistema estrattivo unico gli antiossidanti contenuti in entrambe le frazioni liposolubili e idrosolubili e valutare il contributo delle stesse all'attività antiossidante. Dai risultati ottenuti è emerso che il metodo messo a punto, indicato con l'acronimo B.E.M., che sta per *Biphasic Extraction Method*, ha permesso di estrarre sia i composti idrosolubili che liposolubili. In particolare, dal confronto con il metodo di estrazione di componenti idrosolubili già presente in letteratura (Adom *et al.*, 2005 modificato) non si osservano differenze significative né in termini di contenuto medio in fenoli liberi e legati né in termini della relativa capacità antiossidante.

Anche relativamente ai composti liposolubili, non si sono osservate differenze significative nella capacità estrattiva di tocoli e carotenoidi tra il B.E.M. e il metodo di confronto.

L'affidabilità e la validità del metodo sono state valutate attraverso prove di ripetibilità e riproducibilità e prove di recupero di acido ferulico e α -tocoferolo, ottenendo nel primo caso coefficienti di variazione inferiori al 10%, mentre per le prove di recupero valori discreti, pari al 72 e 75% rispettivamente. Per un maggiore indagine sperimentale del B.E.M. saranno necessarie ulteriori prove per introdurre alcune modifiche che possano migliorare ed aumentare i valori di recupero.

Sezione III

I dati dimostrano che la frazione liposolubile contribuisce per il 20%, nella semola, e per il 30%, nell'integrale, alla capacità antiossidante totale degli sfarinati, confermando il ruolo salustico, non solo in termini vitaminici, di tale frazione negli alimenti.

Il confronto tra la farina integrale e semola dimostra, inoltre, che i processi tecnologici di molitura e raffinazione producono, al pari di quello verificato per altri nutrienti, quali vitamine, minerali e fibra alimentare, una riduzione dell'80% di composti antiossidanti. Il valore salutistico degli alimenti integrali viene ulteriormente confermato da questi dati.

Nel momento in cui la messa a punto del metodo sarà definitiva, esso potrà essere applicato con successo per l'estrazione e contemporanea determinazione degli antiossidanti di natura idrofila e lipofila da diverse matrici cerealicole e loro prodotti di trasformazione, nonché per una più precisa valutazione del contributo alla attività antiossidante totale di entrambe le frazioni.

BIBLIOGRAFIA

- 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**: 2297-2306.
- Adom K.K. and Liu R.H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 6182-6187.
- Adom K.K., Sorrells M.E., Liu R.H. (2003). Phytochemicals profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 7825-7834.
- Arranz S. and Saura-Calixto F. (2010). Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat flour and wheat bran and cereals of diet. *Journal of Cereal Science*, **51**: 313-318.
- Borrelli G.M., De Leonardis A., Platani C., Troccoli A. (2008). Distribution along durum wheat kernel of the components involved in semolina colour. *Journal of Cereal Science*, **48**: 494-502.
- Borrelli G.M., De Leonardis A., M., Fares C., Platani C., Di Fonzo N. (2003). Effects of modified processing conditions on oxidative properties of semolina dough and pasta. *Cereal Chemistry*, **80**(2): 225-231.
- Bramley P.M., Elmadfa I., Kafatos A., Kelly F.J., Manios Y., Roxborough H.E., Schuch W., Sheehy P.J.A., Wagner K.H. (2000). Vitamin E, reviews. *Journal of The Science of Food and Agricultural*, **80**: 913-938.
- Buttner G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **300**: 535-543.

Sezione III

- Cappelli P. and Vannucchi V. (2005). *Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazione*. Zanichelli, Bologna.
- Carcea M., Bruschi G., Salvatorelli S., Schiavoni E., Perenzin M., Vaccino P. (2002). Agrotecnica biologica o convenzionale e qualità chimico-nutrizionale del grano tenero e duro. *Tecnica Molitoria*, **53**(10): 1002-1012.
- Decreto 18 marzo 2009 “Norme per l’attuazione della direttiva 2008/100/CE, che modifica la direttiva 1990/496/CEE del Consiglio relativa all’etichettatura nutrizionale dei prodotti alimentari”. G.U. n. 120 del 26 maggio 2009.
- D.P.R. 9 febbraio 2001, n. 187 “Regolamento per la revisione della normativa sulla produzione e commercializzazione di sfarinati e paste alimentari, a norma dell’articolo 50 della legge 22 febbraio 1994, n. 146”. G.U. n. 117 del 22 maggio 2001.
- Duthie S.J. and Collins A.R. (1996). Antioxidant supplementation decrease oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Research*, **56**(6): 1291-1295.
- Eldin A.K. and Appelquist L.A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, **31**: 671-701.
- Flagella Z. (2006). Qualità nutrizionale e tecnologica del frumento duro. *Italian Journal of Agronomy*, **1**: 203-239.
- Fratianni A., Irano M., Panfili G., Acquistucci R. (2005). Estimation of color of durum wheat. Comparison of WSB, HPLC, and reflectance colorimeter measurements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 2373-2378.
- Fulcher R.G. and Rooney Duke T.K. (2002). *Whole-grain foods in health and disease*. Eagan Press, St Paul, Minnesota.
- Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot M.J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 1370-1373.

- Gironi F. and Piemonte V. (2010). Temperature and solvent effects on polyphenols extraction process from Chestnut tree wood. *Chemical Engineering Research and Design*, doi:10.1016/j.cherd.2010.11.003 (in press).
- Goupy P., Hugues M., Boivin P., Amiot M.J. (1999). Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **79**: 1625-1634.
- Hidalgo A., Brandolini A., Pompei C. (2010). Carotenoids evolution during pasta, bread and water biscuit preparation from wheat flours. *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.01.034 (in press).
- Hidalgo A., Brandolini A., Pompei C. (2009). Kinetics of tocopherols degradation during the storage of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) and breadwheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) flours. *Food Chemistry*, **116**: 821–827.
- Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005). Reviews – The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 1841-1856.
- Ingold K.V., Burton G.W., Foster D.O., Hughes L. (1990). Is methyl-branching in α -tocopherols “tail” important for its in vivo activity? Rat curative myopathy bioassay measurements of vitamin E activity of three 2rs-n-alkyl-2,5,7,8-tetramethyl-6-hydroxychromans. *Free Radical Biology and Medicine*, **9**: 205-210.
- Ismail A., Marjan Z.M., Foong C.W. (2004). Total activity and phenolic content in selected vegetable. *Food Chemistry*, **87**: 581-586.
- Kasperek S. (1980). Chemistry of tocopherols and tocotrienols. In: *Vitamin E, a comprehensive treatise*. Machlin L.J. (Eds.), Marcel-Dekker Inc., New York.
- Kerchev P. and Ivanov S. (2008). Influence of extraction techniques and solvents on the antioxidant capacity of plant material. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **22**: 556-559.

- Krygier K., Sosulski F., Hogge L. (1982b). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **30**: 330-334.
- Lampi A.M., Nurmi T., Ollilainen V., Piironen V. (2008). Tocopherols and tocotrienols in wheat genotypes in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 9716-9721.
- Lang K.J., Schillaci M., Irvin B. (1992). Vitamin E. In: *Modern Chromatographic Analysis of Vitamin*. De Lenheer A.P., Lambert W.E., Nelis H.J. (Eds), Chromatographic Science Series. Dekker, New York.
- 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**: 9732-9739.
- Liu H.R. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, **46**: 207-219.
- Lucisano M. and Pagani M.A. (1997). Cereali e derivati. In: *Gli alimenti: aspetti tecnologici e nutrizionali*. Daghetta A. (Eds), Istituto Danone, Milano.
- Menga V., Fares C., Troccoli A., Cattivelli L., Baiano A. (2010). Effect of genotype, location and baking on the phenolic content and some antioxidant properties of cereals species. *International Journal of Food Science and Technology*, **45**: 7-16.
- Meydani S.N., Meydani M., Blumberg J.B., Leka L.S., Siber G., Loszewski R., Thompson C., Pedrosa M.C., Diamond R.D., Stollar B.D. (1997). Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. *Journal of the American Medical Association*, **277**: 1380-1386.
- Meydani S.N., Tengerdy R.P. (1993). Vitamin E and immune response. In: *Vitamin E in health and disease*. Packer L., Fuchs J. (Eds.), Marcel-Dekker, New York.

- Moore J., Hao Z., Zhou K., Luther M., Costa J., Yu L.L. (2005). Carotenoid, tocopherol, phenolic acid, and antioxidant properties of Maryland-grown soft wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 9716-9721.
- Naczek M. and Shahidi F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**: 1523-1542.
- Okarter N., Liu C.S., Sorrells M.E., Liu R.H. (2010). Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **119**: 249-257.
- Panatta G. B. (1997). Cereali e patate. In: *Nutrizione Umana*. Fidanza F. and Liguori G. (Eds), Idelson, Napoli.
- Panfili G., Fratianni A., Di Criscio T., Marconi E. (2008). Tocol and β -glucan levels in barley varieties and in pearling by-products. *Food Chemistry*, **107**: 84-91.
- Panfili G., Fratianni A., Di Criscio T., Giuzio L., Flagella Z. (2005). Influenza dello stress idrico e della concimazione azotata e solfatica sul contenuto in antiossidanti lipidici nel frumento duro. Atti del XXXVI Convegno della S.I.A. "Ricerca ed innovazione per le produzioni vegetali e la gestione delle risorse agro-ambientali". Foggia, Settembre 2005.
- Panfili G., Fratianni A., Irano M. (2004). Improved normal-phase high performance liquid chromatography procedure for determination of carotenoids in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 3940-3944.
- Panfili G., Fratianni A., Irano M. (2003). Normal-phase high performance liquid chromatography method for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 6373-6377.
- Pastore D., Laus M.N., Tozzi D., Fogliano V., Soccio M., Flagella Z. (2009). New tool to evaluate a comprehensive antioxidant activity in food extract: Bleaching of 4-

- nitroso-*N,N*-dymethylalanine catalyzed by soybean lipoxygenase-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 9682-9692.
- 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 & Food Research*; **50**(11): 1030-1038.
 - Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatori S., Bianchi M., Brighenti F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, **133**(9): 2812-2819.
 - Qureshi N. and Qureshi A.A. (1993). Tocotrienols: novel hypocholesterolemic agents with antioxidant properties. In: *Vitamin E in health and disease*. Packer L., Fuchs J., Eds), Marcel-Dekker, Inc., New York.
 - Qureshi A.A., Chaudhary V., Weber F.E., Chicoye E., Qureshi N. (1991). Effects of brewer's grain and other cereals on lipid metabolism in chicken. *Nutrition Research*, **11**: 159-168.
 - Qureshi A.A., Burger W.C., Peterson D.M., Elson C. (1985). Suppression of cholesterologenesis by plant constituents. Review of Wisconsin contribution to NC-167. *Lipids*, **20**: 817-824.
 - 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.
 - Robards K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, **1000**: 657-691.

- Rodriguez-Amaya D.B. and Kimura M. (2004). HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. *HarvestPlus Technical Monograph Series 2. Breeding Crops for Better Nutrition*, Washington.
- Serpen A., Gokmen V., Pellegrini N., Fogliano V. (2008). Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal product. *Journal of Cereal Science*, **48**: 816-820.
- Sheppard A.J., Pennington J.A.T., Weihrauch J.L. (1993). Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods. In: *Vitamin E in health and Disease*; Packer L., Fuchs J. (Eds), Marcel-Dekker, New York.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**: 152-178.
- Somogyi A., Rosta K., Pusztai P., Tulassay Z., Nagy G. (2007). Antioxidant measurements. *Clinical Physics and Physiological measurement*, **28**: R41-R55.
- Sosulski F., Krygier K., Hogge L. (1982). Free, esterified, and insoluble bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **30**: 337-340.
- Stracke B.A., Eitel J., Watzl B., Mader P., Rufer C.E. (2009). Influence of the production method on phytochemical concentrations in whole wheat (*Triticum aestivum* L.): A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 10116-10121.
- Stratil P., Klejdus B., Kuban V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 607-616.
- Tiwari U. and Cummins E. (2009). Nutritional importance and effect of processing on tocopherols in cereals. *Trends in Food & Technology*, **20**: 511-520.

Sezione III

- Thompson U.L. (1994). Antioxidant and hormone-mediated health benefits of whole grains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **34**: 473-497.
- Wang H., Cao G., Prior R.L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**: 701-705.
- Ward J.L., Poutanen K., Gebruers K., Phronen V., Lampi A.M., Nystöm L., Andersson A.A.M., Åman P., Boros D., Rakszegi M., Bedő Z., Shewry P.R. (2008). The HEALTHGRAIN cereal diversity screen: Concept, results, and prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 9699-9709.
- Yu L., Haley S., Perret J., Harris M. (2004). Comparison of wheat flours grown at different location for their antioxidant properties. *Food Chemistry*, **86**: 11-16.
- Zhou K., Laux J.J., Yu L. (2004). Comparison of swiss red wheat grain and fraction for their antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 1118-1123.
- Zulueta A., Esteve M.J., Frigola A. (2009). ORAC and TEAC assay comparison to measure and antioxidant capacity of food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **114**: 310-316.

Siti internet consultati:

www.inran.it/648/linee_guida.html

Elenco delle pubblicazioni inerenti il Dottorato di ricerca

1. Fratianni A., Siconolfi T., Mignogna R., Panfili G. (2010). Valutazione di antiossidanti e di attività antiossidante in matrici cerealicole. *Tecnica Molitoria*. (in stampa).
2. Mignogna R. (2010). *Evaluation of antioxidants in fruits and vegetables*. Proceedings of 15th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology. Portici (NA), Italia, 15-17 settembre 2010, p. 103-107. ISBN: 978-88-95028-62-0.
3. Fratianni A., Siconolfi T., Mignogna R., Panfili G. (2009). *Valutazione di antiossidanti e di attività antiossidante in matrici cerealicole*. Atti del 9th CISETA-Congresso Italiano di Scienza e Tecnologia degli Alimenti. Fiera Milano, 11-12 giugno 2009, p. 180-184.
4. Mignogna R. (2009). *Evaluation of antioxidants in plant-derived products*. Proceedings of 14th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology. Oristano, Italia, 16-18 settembre 2009, p. 323-325.
5. Mignogna R. (2008). *Change in Carotenoid and Tocol Content during Technological Processes on Cereals*. Proceedings of 13th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology. Alba (CN), Italia, 10-12 settembre 2008, p. 532-533.