

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

---



DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI

XXVIII ciclo

SSD AGR/15

## **RISI PIGMENTATI: DETERMINAZIONE DI MOLECOLE BIOATTIVE PER LA VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ NUTRIZIONALE**

### **Tutor**

*Chiar.ma Prof.ssa Alessandra Fratianni*

### **Co-tutor**

*Dott.ssa Rita Acquistucci*

### **Dottoranda**

*Dott.ssa Valentina Melini*

### **Coordinatore del Dottorato**

*Chiar.mo Prof. Emanuele Marconi*



## INDICE

<b>INDICE.....</b>	<b>1</b>
<b>INDICE DELLE TABELLE .....</b>	<b>5</b>
<b>INDICE DELLE FIGURE .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DELLE ABBREVIAZIONI.....</b>	<b>11</b>
<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>16</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>19</b>
<b>1 IL RISO.....</b>	<b>21</b>
1.1 ORIGINE DEL RISO.....	21
1.2 PRODUZIONE DI RISO .....	21
1.3 CARATTERI BOTANICI E ANATOMIA DELLA CARIOSSIDE DEL RISO .....	24
1.4 PROCESSO DI LAVORAZIONE DEL RISO .....	26
1.5 CLASSIFICAZIONE DEL RISO LAVORATO .....	27
1.5.1 RISI PIGMENTATI .....	29
1.6 IL RISO COME ALIMENTO BASE.....	31
1.7 NUTRIENTI DEL RISO.....	32
1.7.1 CARBOIDRATI .....	33
1.7.2 PROTEINE.....	35
1.7.3 LIPIDI .....	35
1.7.4 VITAMINE.....	35
1.7.5 MINERALI.....	36
1.8 BIBLIOGRAFIA DEL CAPITOLO.....	37

<b>1.9</b>	<b>SITOGRAFIA.....</b>	<b>39</b>
<b>2</b>	<b><u>MOLECOLE BIOATTIVE: UNA PANORAMICA.....</u></b>	<b>41</b>
<b>2.1</b>	<b>CAROTENOIDI .....</b>	<b>41</b>
2.1.1	STRUTTURA, STEREOCHIMICA E NOMENCLATURA.....	41
2.1.2	PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE .....	44
2.1.3	PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI.....	45
2.1.4	RUOLO FUNZIONALE ED EFFETTI SULLA SALUTE.....	47
2.1.5	CAROTENOIDI NEI CEREALI.....	50
2.1.6	BIOACCESIBILITÀ E BIODISPONIBILITÀ .....	53
2.1.7	ANALISI DEI CAROTENOIDI NEGLI ALIMENTI.....	56
<b>2.2</b>	<b>COMPOSTI FENOLICI.....</b>	<b>61</b>
2.2.1	STRUTTURA E CLASSIFICAZIONE .....	61
2.2.2	PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE .....	63
2.2.3	PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI.....	64
2.2.4	RUOLO DEI COMPOSTI FENOLICI ED EFFETTO SULLA SALUTE .....	67
2.2.5	BIODISPONIBILITÀ E METABOLISMO .....	68
2.2.6	COMPOSTI FENOLICI NEI CEREALI .....	69
2.2.7	ANALISI DEI FENOLI.....	70
<b>2.3</b>	<b>ANTOCIANINE.....</b>	<b>72</b>
2.3.1	STRUTTURA E SOLUBILITÀ.....	72
2.3.2	STABILITÀ.....	74
2.3.3	ANTOCIANINE E COLORE .....	77
2.3.4	ANTOCIANINE NEI CEREALI .....	79
2.3.5	ASSORBIMENTO E BIODISPONIBILITÀ.....	80
2.3.6	EFFETTI SULLA SALUTE .....	81
2.3.7	ANALISI DELLE ANTOCIANINE NEGLI ALIMENTI .....	83
<b>2.4</b>	<b>PROANTOCIANIDINE.....</b>	<b>86</b>
2.4.1	STRUTTURA .....	86
2.4.2	BIODISPONIBILITÀ ED ASSORBIMENTO.....	88
2.4.3	EFFETTI SULLA SALUTE .....	89
2.4.4	ANALISI DELLE PROANTOCIANIDINE .....	89
<b>2.5</b>	<b>BIBLIOGRAFIA DEL CAPITOLO.....</b>	<b>93</b>

<b>2.6</b>	<b>SITOGRAFIA.....</b>	<b>101</b>
<b>3</b>	<b><u>MATERIALI E METODI .....</u></b>	<b><u>103</u></b>
<b>3.1</b>	<b>CAMPIONAMENTO.....</b>	<b>103</b>
<b>3.2</b>	<b>PREPARAZIONE DEI CAMPIONI CRUDI PER ANALISI .....</b>	<b>107</b>
<b>3.3</b>	<b>PREPARAZIONE DEI CAMPIONI COTTI PER ANALISI.....</b>	<b>107</b>
3.3.1	COTTURA DEI CAMPIONI DI RISO .....	107
3.3.2	LIOFILIZZAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI DI RISO COTTI .....	107
<b>3.4</b>	<b>CLASSIFICAZIONE MERCEOLOGICA .....</b>	<b>108</b>
<b>3.5</b>	<b>CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DI BASE .....</b>	<b>108</b>
3.5.1	DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN UMIDITÀ.....	108
3.5.2	DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO PROTEICO .....	108
3.5.3	DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN CENERI .....	109
<b>3.6</b>	<b>ANALISI DEL COLORE: MISURE IN RIFLETTANZA DIFFUSA.....</b>	<b>109</b>
<b>3.7</b>	<b>ANALISI DEI PIGMENTI GIALLI TOTALI .....</b>	<b>110</b>
<b>3.8</b>	<b>ANALISI DEI CAROTENOIDI .....</b>	<b>111</b>
3.8.1	ESTRAZIONE DEI CAROTENOIDI .....	111
3.8.2	ESTRAZIONE DELLA LUTEINA LIBERA .....	111
3.8.3	ANALISI CROMATOGRAFICA .....	112
3.8.4	PROVE DI RECUPERO DELLA LUTEINA TOTALE E LIBERA .....	112
<b>3.9</b>	<b>ANALISI DEI COMPOSTI FENOLICI.....</b>	<b>113</b>
3.9.1	ESTRAZIONE DEI FENOLI LIBERI .....	113
3.9.2	ESTRAZIONE DEI FENOLI LEGATI INSOLUBILI .....	114
3.9.3	DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI FENOLI LIBERI E FENOLI LEGATI INSOLUBILI .....	116
3.9.4	PROVE DI RECUPERO .....	116
<b>3.10</b>	<b>ANALISI DELLE ANTOCIANINE.....</b>	<b>116</b>
3.10.1	ESTRAZIONE .....	116
3.10.2	ANALISI SPETTROFOTOMETRICA.....	117
3.10.3	ANALISI CROMATOGRAFICA .....	117
<b>3.11</b>	<b>ANALISI DELLE PROANTOCIANIDINE .....</b>	<b>118</b>
3.11.1	ESTRAZIONE DELLE PROANTOCIANIDINE.....	118
3.11.2	ANALISI SPETTROFOTOMETRICA.....	118
3.11.3	ANALISI CROMATOGRAFICA .....	118

<b>3.12</b>	<b>ANALISI STATISTICA.....</b>	<b>119</b>
<b>3.13</b>	<b>BIBLIOGRAFIA DEL CAPITOLO.....</b>	<b>120</b>
<b>3.14</b>	<b>SITOGRAFIA.....</b>	<b>120</b>
<b>4</b>	<b><u>RISULTATI E DISCUSSIONI.....</u></b>	<b><u>122</u></b>
<b>4.1</b>	<b>CLASSIFICAZIONE MERCEOLOGICA.....</b>	<b>122</b>
<b>4.2</b>	<b>COMPOSIZIONE CENTESIMALE.....</b>	<b>122</b>
<b>4.3</b>	<b>ANALISI DEL COLORE .....</b>	<b>124</b>
<b>4.4</b>	<b>DETERMINAZIONE DEI CAROTENOIDI .....</b>	<b>125</b>
4.4.1	CAROTENOIDI TOTALI .....	125
4.4.2	LUTEINA LIBERA .....	136
4.4.3	CAROTENOIDI ED INDICI DI COLORE .....	142
<b>4.5</b>	<b>DETERMINAZIONE DEI PIGMENTI SOLUBILI IN BUTANOLO SATURO D'ACQUA .....</b>	<b>143</b>
<b>4.6</b>	<b>DETERMINAZIONE DEI COMPOSTI FENOLICI .....</b>	<b>149</b>
4.6.1	FENOLI LIBERI .....	149
4.6.2	FENOLI LEGATI INSOLUBILI .....	153
<b>4.7</b>	<b>DETERMINAZIONE DELLE ANTOCIANINE .....</b>	<b>157</b>
4.7.1	OTTIMIZZAZIONE DELLA PROCEDURA ESTRATTIVA .....	158
4.7.2	ANALISI SPETTROFOTOMETRICA: ANTOCIANINE TOTALI .....	162
4.7.3	ANALISI CROMATOGRAFICA DEGLI ESTRATTI ANTOCIANICI.....	163
<b>4.8</b>	<b>DETERMINAZIONE DELLE PROANTOCIANIDINE.....</b>	<b>167</b>
4.8.1	ANALISI SPETTROFOTOMETRICA DELLE PROANTOCIANIDINE TOTALI .....	167
4.8.2	ANALISI CROMATOGRAFICA .....	168
<b>4.9</b>	<b>CAMPIONI A CONFRONTO .....</b>	<b>171</b>
<b>4.10</b>	<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>178</b>
<b>4.11</b>	<b>BIBLIOGRAFIA DEL CAPITOLO.....</b>	<b>181</b>
<b>4.12</b>	<b>SITOGRAFIA.....</b>	<b>185</b>
	<b><u>DIVULGAZIONE SCIENTIFICA E PUBBLICAZIONI INERENTI IL DOTTORATO .....</u></b>	<b><u>186</u></b>
	<b><u>RINGRAZIAMENTI .....</u></b>	<b><u>187</u></b>

## INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1.1: produzione europea di riso per l'anno 2013 (dati disponibili più recenti) (FAOSTAT, download 14/12/2015).....	24
Tabella 1.2: classificazione del riso secondo il Regolamento UE n. 1308/2013.....	28
Tabella 1.3: contenuto di proteine, ferro, zinco e fibra nel riso bianco, integrale, pigmentato (rosso, viola e nero) (Nayar, 2014) .....	30
Tabella 1.4: consumo annuo <i>pro capite</i> dei sei principali <i>crop</i> . Fonte: FBS (FAO's Food Balance Sheets) 2011 (ultimo anno per il quale i dati sono disponibili), FAOSTAT. Downloaded 14.12.2015 .....	31
Tabella 1.5: nutrienti presenti nel riso integrale (brown rice), nel riso raffinato (white rice) e nella crusca di riso (bran). (Yu <i>et al.</i> , 2012).....	33
Tabella 2.1: prefissi che indicano modifiche strutturali della catena base dei carotenoidi .....	44
Tabella 2.2: contenuto di carotenoidi (in µg/100g s.s.) e in alcuni dei principali cereali (Mamatha <i>et al.</i> , 2011) .....	53
Tabella 2.3: lunghezze d'onda massime di assorbimento (nm) per i più comuni carotenoidi. Le lunghezze d'onda tra parentesi sono spalle (Rodriguez-Amaya <i>et al.</i> , 2001).....	58
Tabella 2.4: sostituenti sul catione flavilio nelle più comuni antocianidine .....	73
Tabella 3.1: caratteristiche dei campioni oggetto di studio .....	106
Tabella 3.2: procedure testate per estrarre i fenoli liberi da matrici cerealicole .....	114
Tabella 3.3: procedure testate per estrarre i fenoli legati insolubili da matrici cerealicole .....	115
Tabella 4.1: classificazione dei risi in base alla lunghezza del chicco espressa come media di dieci repliche e deviazione standard .....	122
Tabella 4.2: composizione centesimale dei campioni di riso. Lettere diverse in colonna indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) .....	123
Tabella 4.3: indici di colore $L^*a^*b^*$ . Lettere diverse in colonna indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) .....	124
Tabella 4.4: solubilità di luteina e $\beta$ -carotene in alcuni solventi organici (dati tratti da Craft e Soares, 1992).....	126
Tabella 4.5: carotenoidi identificati negli estratti non riuniti ottenuti sul campione di riso nero (valori medi).....	127
Tabella 4.6: carotenoidi identificati negli estratti non riuniti ottenuti su un campione di riso rosso (valori medi).....	128

Tabella 4.7: principali carotenoidi presenti nel residuo secco ripreso con MeOH:THF 95:5 v/v e MeOH 100% (valori medi). Lettere diverse in colonna indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).....	129
Tabella 4.8: recupero della luteina standard .....	129
Tabella 4.9: recupero della luteina addizionata alla matrice.....	130
Tabella 4.10: carotenoidi nei campioni di riso crudo. Lettere diverse in colonna indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).....	132
Tabella 4.11: luteina, zeaxantina e $\beta$ -carotene ( $\mu\text{g/g}$ ss) nei campioni di riso cotti. I dati sono espressi come media e deviazione standard (SD). La significatività delle differenze ( $p < 0,05$ ), in colonna, è espressa da lettere diverse in apice. n.d.=not detectable.....	134
Tabella 4.12: luteina e zeaxantina (media $\pm$ SD) nei campioni di riso crudo e cotto. Lettere maiuscole diverse, nella riga, per ciascun carotenoide, indicano una differenza significativa ( $p < 0,05$ ) in seguito a cottura .....	135
Tabella 4.13: luteina libera in due campioni di riso nero - valutazione del numero di estrazioni e del volume estraente. I dati sono medie di misure replicate ( $n=3$ ) .....	137
Tabella 4.14: significatività delle differenze di concentrazioni di luteina libera estratta con volumi diversi di miscela dai campioni N(IT)1 e N(IT)3. n.s= non significativa.....	138
Tabella 4.15: recupero della luteina libera addizionata al campione N(IT)3 .....	139
Tabella 4.16: luteina libera (LL) e totale (LT) espresse come media $\pm$ SD nei campioni di riso crudo. Lettere minuscole in colonna e lettere maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) .....	140
Tabella 4.17: luteina libera e totale nei risi cotti. Lettere diverse minuscole in colonna e lettere maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).....	141
Tabella 4.18: luteina libera in risi crudi e cotti espressa come media $\pm$ SD. Lettere maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).....	142
Tabella 4.19: rapporti tra quantità di campione (g) e volume di solvente (mL) testati per l'estrazione di un campione di riso con pericarpo nero (media di almeno due estrazioni) .....	144
Tabella 4.20: rapporti tra quantità di campione (g) e volume di solvente (mL) testati per l'estrazione di un campione di riso con pericarpo rosso (media di almeno due estrazioni).....	145
Tabella 4.21: pigmenti gialli in mg luteina/100 g ss (media di tre repliche $\pm$ SD). Lettere diverse in colonna indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).....	147
Tabella 4.22: fenoli liberi estratti utilizzando le tre procedure oggetto di studio. Lettere diverse minuscole in apice indicano valori statisticamente diversi ( $p < 0,05$ ) .....	151
Tabella 4.23: risultati dei test di recupero .....	152

Tabella 4.24: fenoli liberi (media±SD) nei campioni di riso crudo e di riso cotto. Per ciascuna colonna, lettere minuscole diverse riportate in apice indicano valori statisticamente diversi ( $p<0,05$ ). Per ciascuna riga, lettere maiuscole diverse riportate in apice indicano valori statisticamente diversi ( $p<0,05$ ). n.s.= non significativa .....	152
Tabella 4.25: fenoli legati insolubili (media di almeno tre repliche±SD). Lettere diverse indicano valori statisticamente diversi ( $p<0,05$ ).....	155
Tabella 4.26: risultati dei test di recupero .....	156
Tabella 4.27: contenuto in fenoli legati insolubili (media±SD) nei campioni di riso crudo e di riso cotto. Per ciascuna colonna, lettere minuscole diverse riportate in apice indicano valori statisticamente diversi ( $p<0,05$ ). Per ciascuna riga, lettere maiuscole diverse riportate in apice indicano valori statisticamente diversi ( $p<0,05$ ). .....	156
Tabella 4.28: assorbanza degli estratti delle antocianine ottenuti da un riso nero con le procedure estrattive K e S .....	159
Tabella 4.29: assorbanze di estratti delle antocianine da due campioni di riso nero .....	160
Tabella 4.30: assorbanza degli estratti delle antocianine ottenuti da un riso rosso con le procedure estrattive K e S (n.d. = not determined) .....	161
Tabella 4.31: TAC nei campioni crudi e cotti. Lettere diverse minuscole in colonna e maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p<0,05$ ). n.s. = non significativa; n.d.= not detectable .....	163
Tabella 4.32: antocianine nei campioni crudi e cotti. Lettere diverse minuscole in colonna e maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p<0,05$ ) .....	165
Tabella 4.33: TPAC nei risi crudi e cotti. TAC nei campioni crudi e cotti. Lettere diverse minuscole in colonna e maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p<0,05$ ) .....	167
Tabella 4.34: catechina (mg/100 g s.s.) nei campioni crudi e cotti. Lettere diverse minuscole in colonna e maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p<0,05$ ) .....	170

## INDICE DELLE FIGURE

Figura 1.1: principali produttori mondiali di riso (FAOSTAT, download 14/12/2015) .....	21
Figura 1.2: produzione mondiale di riso nel 2013 (dati disponibili più recenti) (FAOSTAT, download 14/12/2015) .....	22
Figura 1.3: produzione mondiale di riso dal 1961 al 2013 (FAOSTAT, download 14/12/2015).....	22
Figura 1.4: produzione di riso di Africa, America, Europa e Oceania dal 1961 al 2013 (FAOSTAT, download 14/12/2015).....	23
Figura 1.5: biodiversità della produzione mondiale di riso (Wani <i>et al.</i> , 2012) .....	23
Figura 1.6: sezione longitudinale della cariosside di riso (Jan A. Delcour e R. Carl Hosney, 2010). Resta (A), lemma (L), palea (P), pericarpo (Pe), tegumento seminale (SC), strato nucellare (N), aleurone (Al), crusca (B), subaleurone (Su), endosperma amilaceo (SE), endosperma(E), gluma inferiore (LG), gluma superiore (UG), rachilla (Rac), radichetta (Rad), piumetta (Pl), epiblasto (Ep), scutello (Sc), germe (G).....	25
Figura 1.7: Risone (I), riso integrale (II) e riso raffinato (III). Fonte: <a href="http://www.riseria.ch">www.riseria.ch</a> , ultimo accesso 15 dicembre 2015 .....	26
Figura 1.8: morfologia dei granuli di amido di riso misurati con microscopia elettronica a scansione a 2000x (a) e 6000x (b) (Wani <i>et al.</i> , 2012) .....	34
Figura 2.1: struttura base dei carotenoidi (Namitha e Negi, 2010) .....	41
Figura 2.2: caroteni e xantofille (Fonte: Oliver e Palou, 2000) .....	42
Figura 2.3: isomeri geometrici cis/trans .....	42
Figura 2.4: conformazioni <i>s-cis</i> e <i>s-trans</i> .....	43
Figura 2.5: ciclizzazione estremità catena lineare (IUPAC Nomenclature Of Carotenoids, 1974) .....	43
Figura 2.6: esempio di gruppo terminale dei carotenoidi .....	44
Figura 2.7: scissione del $\beta$ -carotene in vitamina A (Britton <i>et al.</i> , 2009).....	48
Figura 2.8: principali carotenoidi presenti nei cereali (Mellado-Ortega e Hornero-Méndez, 2015) ...	51
Figura 2.9: pathway della produzione di $\beta$ -carotene nel golden rice a partire da due molecole di geranilgeranildifosfato (Fonte: <a href="http://www.goldenrice.org">http://www.goldenrice.org</a> ) .....	52
Figura 2.10: carotenoidi inglobati nelle micelle(Britton <i>et al.</i> , 2009) .....	55
Figura 2.11: processo di assorbimento dei carotenoidi dalla matrice alimentare. 1,2 – rottura della matrice, 3 – rilascio dei Sali biliari dal dotto biliare, 4 – inglobamento dei carotenoidi nelle micelle, 5 – assorbimento della micella da parte dell'enterocita, 6 – rilascio del carotenoide nel circolo sanguigno (Saini <i>et al.</i> , 2015) .....	55

Figura 2.12: calcolo di %III/II dalla struttura fine dello spettro (Wrolstad, 2011).....	59
Figura 2.13: caratteristiche spettrali di all-trans $\beta$ -carotene (—), 9-cis- $\beta$ -carotene (---) e 15-cis $\beta$ -carotene (—) (Wrolstad, 2011) .....	59
Figura 2.14: principali gruppi di composti fenolici e loro struttura chimica (Giada, 2013) .....	62
Figura 2.15: interruzione della catena radicalica per trasferimento di idrogeno. (AH= antiossidante, A• = radicale dell'antiossidante, ROO• = radicale perossilico responsabile della propagazione della catena, ROOH = idroperossido, ROOA = prodotto di reazione del radicale perossilico e del radicale dell'antiossidante).....	64
Figura 2.16: interruzione della catena di radicali per accoppiamento radicalico .....	65
Figura 2.17: delocalizzazione per risonanza del radicale fenossile .....	65
Figura 2.18: reazione di trasferimento di idrogeno degli idrossifenoli .....	66
Figura 2.19: stabilizzazione del fenolo e del fenossile negli <i>o</i> -metossifenoli e nei catecoli .....	66
Figura 2.20: struttura dello scheletro C <sub>6</sub> C <sub>3</sub> C <sub>6</sub> (A), del catione 2-fenilbenzopirilio (B) e delle antocianine (C) (R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> = -H/-OH/-OMe; R <sub>3</sub> =glicosile, R <sub>4</sub> = -H o glicosile ).....	72
Figura 2.21: struttura delle principali antocianidine .....	73
Figura 2.22: strutture assunte dalle antocianine in funzione del pH (R <sub>1</sub> = glicosile, R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = -H/-OH/-OMe) (Castañeda-Ovando <i>et al.</i> , 2009).....	75
Figura 2.23: effetto del pH sulla struttura chimica (Damodaran <i>et al.</i> , 2007).....	76
Figura 2.24: assorbimento UV-VIS delle antocianidine in funzione del pH (Wrolstad <i>et al.</i> , 2005).....	77
Figura 2.25: effetto dei sostituenti del carione flavilio sulla colorazione delle antocianidine (Damodaran <i>et al.</i> , 2007) .....	78
Figura 2.26: frazione molare delle forme delle antocianine in equilibrio tra loro in funzione del pH del tratto GI (Fernandes <i>et al.</i> , 2014).....	81
Figura 2.27: spettro UV-Vis di antocianine 3-glicosilate (non acilate; linea tratteggiata) e 3,5-glicosilate (acilate, linea continua) (Wrolstad, 2011) .....	86
Figura 2.28: struttura del flavan-3-olo .....	87
Figura 2.29: struttura di alcune delle più diffuse proantocianidine.....	88
2.30: reazione della vanillina con epicatechina .....	91
Figura 3.1: campioni di riso con pericarpo nero oggetto di studio (N(IT)1, N(IT)2, N(IT)3, N(IT)4 = varietà italiane; N(TH)1 = varietà thailandese; N(CA)1 = varietà canadese) .....	104
Figura 3.2: campioni di riso con pericarpo rosso oggetto di studio (R(IT)1 = varietà italiana; R(FR)1 e R(FR)2 = varietà francesi; R(TH)1 = varietà thailandese).....	105
Figura 3.3: campioni di riso cotti e liofilizzati (A)= N(IT)2, (B)= R(IT)1 .....	108
Figura 3.4: diagramma di cromaticità.....	110

Figura 3.5: gradiente della miscela B e gradiente di velocità utilizzati per l'analisi cromatografica..	112
Figura 4.1: carotenoidi identificati mediante RP-HPLC .....	130
Figura 4.2: cromatogramma dell'estratto di un riso saponificato ed un riso non saponificato .....	139
Figura 4.3: correlazione tra luteina totale e indice di giallo b* .....	143
Figura 4.4: estratto in WSB di un riso nero (a sinistra) e di un riso rosso (a destra) .....	145
Figura 4.5: spettro nel visibile dell'estratto in WSB di un riso nero (—), di un riso rosso (- - -), di un riso bianco (⋯) e di luteina standard (—) .....	146
Figura 4.6: correlazione tra pigmenti gialli solubili in WSB e indice di giallo (b*) in tutti i campioni di riso oggetto di studio.....	148
Figura 4.7: correlazione tra pigmenti gialli solubili in WSB e indice di giallo (b*) nei campioni di riso nero .....	148
Figura 4.8: distribuzione dei fenoli ottenuti a seguito dell'applicazione delle procedure estrattive A, B e C.....	150
Figura 4.9: spettri di assorbimento degli estratti delle antocianine ottenuti da un riso nero con le procedure estrattive K e S .....	159
Figura 4.10: spettri di assorbimento degli estratti delle antocianine ottenuti da un riso rosso con le procedure estrattive K e S .....	161
Figura 4.11: stabilità degli estratti antocianici in atmosfera inerte, al buio e a -40°C .....	162
Figura 4.12: cromatogramma delle antocianine estratte da un campione di riso nero.....	164
Figura 4.13: cromatogramma dell'estratto metanolico del riso rosso Ermes .....	168
Figura 4.14: cromatogramma dell'estratto in metanolo del riso Ermes crudo (verde) e cotto (marrone).....	169
Figura 4.15: radar plot dei risi con pericarpo nero crudi .....	171
Figura 4.16: radar plot dei risi con pericarpo rosso e del riso N(IT)4 crudi .....	172
Figura 4.17: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione N(IT)1 .....	173
Figura 4.18: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione N(IT)2 .....	173
Figura 4.19: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione N(IT)3 .....	174
Figura 4.20: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione N(IT)4 .....	174
Figura 4.21: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione N(TH)1.....	175
Figura 4.22: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione N(CA)1.....	175
Figura 4.23: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione R(IT)1 .....	176
Figura 4.24: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione R(FR)1 .....	176
Figura 4.25: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione R(FR)2 .....	177
Figura 4.26: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione R(TH)1 .....	177

## **LISTA DELLE ABBREVIAZIONI**

AGE	Acido gallico equivalenti
BPC	Fenoli legati insolubili
C3G	Cianidina-3-O-glucoside
CV%	Coefficiente di variazione percentuale
FPC	Fenoli liberi
LL	Luteina libera
LT	Luteina totale
P3G	Peonidina-3-O-glucoside
SD	Deviazione standard
RP-HPLC	Cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa
TAC	Contenuto di antocianine totali
TPAC	Contenuto di proantocianidine totali
WSB	Butanolo saturo d'acqua

## RIASSUNTO

I risi pigmentati sono varietà di riso integrale che presentano un pericarpo con una colorazione distintamente scura, pressoché nera, o rosso-bruna per la presenza di pigmenti. Questi sono coltivati e consumati principalmente in Cina, Giappone, Corea e in alcune regioni nel nord-est dell'India, mentre in Italia e in Europa sono considerati un cereale di nicchia per produzione e consumo.

Negli ultimi anni, le varietà pigmentate di riso sono divenute oggetto di un crescente interesse per i potenziali effetti benefici associati al loro consumo. Infatti, oltre ai *phytochemicals* che derivano loro dal fatto di essere cereali integrali, i risi pigmentati contengono molecole che sono contemporaneamente responsabili della colorazione delle cariossidi e dotate di attività antiossidante.

La caratterizzazione nutrizionale dei risi pigmentati attualmente disponibile in letteratura si riferisce pressoché completamente a risi di origine asiatica e al loro profilo di antiossidanti idrofili, mentre mancano informazioni esaustive sulle varietà italiane ed europee e su antiossidanti lipofili come i carotenoidi. Inoltre, nonostante il riso sia consumato solo dopo cottura, spesso è trascurato lo studio dell'effetto di questo processo sulla stabilità delle molecole bioattive.

In tale contesto, è stato sviluppato il presente progetto di dottorato di ricerca finalizzato a valutare la qualità nutrizionale di varietà di risi pigmentati, italiane o disponibili sul mercato italiano, attraverso la determinazione di molecole bioattive. Inoltre, ci si è posti l'obiettivo di valutare l'effetto della cottura dei risi sulla stabilità delle molecole di interesse e la differente risposta varietale al trattamento.

Il lavoro si è articolato in due fasi. Nella prima sono state caratterizzate, da un punto di vista qualitativo, varietà di riso pigmentato di produzione nazionale ed estera attraverso la determinazione di carotenoidi, contenuto in composti fenolici, antocianine e proantocianidine sul campione tal quale. Le metodiche analitiche utilizzate sono state opportunamente valutate e ottimizzate. Nella seconda fase, è stato analizzato l'effetto della cottura sulla stabilità delle molecole bioattive oggetto di studio mediante la determinazione delle molecole bioattive sui risi cotti.

Da un punto di vista analitico, il lavoro ha consentito di delineare uno stato dell'arte delle metodiche più frequentemente utilizzate per la determinazione di molecole bioattive e di individuare le condizioni analitiche ottimali per ottenere dati sperimentali affidabili. Lo studio ha tracciato il profilo delle varietà italiane ed estere consentendo di individuare quelle più promettenti da un punto di vista tecnologico e nutrizionale. Inoltre, la valutazione dell'effetto della cottura sulle molecole

bioattive ha fornito dati più realistici del potenziale nutrizionale delle varietà di riso oggetto di studio.

Il lavoro può essere considerato il primo passo del lungo processo che porta a dichiarare un alimento come “funzionale”. Nella sua completezza, ha anche reso possibile un confronto più attendibile tra le varietà italiane ed estere fornendo le basi per una possibile promozione e tutela delle produzioni nazionali e aprendo, allo stesso tempo, possibili scenari verso strategie di miglioramento genetico.

## **ABSTRACT**

Rice is a staple food and is mainly consumed as white rice. Special rice varieties exist and show grains with a reddish or deep purple-black hue after hull removal due to the accumulation of pigments in the pericarp, seed coat and aleurone layer. Thus, they are referred to as “pigmented rice”.

This category of rice has been widely consumed and appreciated in Asia for a long time due to special features such as exclusive taste and aroma or medicinal value; on the other hand, in Europe pigmented rice has received attention only recently. The increasing interest of food scientists in pigmented rice is due to the unique phytochemicals and pigments that act as bioactive compounds and hence play an important role in improving human health and well-being. The World Health Organization identifies, in fact, nutrition as a significant and manageable determinant of chronic disease, and has more and more stressed the need for a shift in nutrient intake towards healthier foods.

An in-depth insight into the current literature shows that studies on pigmented rice are mainly focused on Asian varieties that were target of a comprehensive investigation, while little is known about Italian and European ones. Moreover, they mainly focus on the detection of anthocyanins and total phenolic compounds, while lipophilic pigment (e.g. carotenoids) content has been poorly investigated.

An additional gap also emerged from the investigation of the state of the art: the lack of an extensive investigation of the effect of cooking on bioactive molecules. As this cereal is always consumed after cooking, results overlooking the effect of this processing might hinder or mislead the evaluation of their real nutritional value.

The aim of this PhD research study was to fill in these gaps by characterizing Italian pigmented rice both prior and after cooking and thus evaluating the stability of the main phytochemicals, and assessing the nutritious potential of samples under investigation. In addition, foreign pigmented rice varieties available on Italian market were studied to get an overview into the phytochemical profile of all pigmented rice at Italian consumers’ disposal.

In details, bioactive molecules such carotenoids, free and insoluble-bound phenolic compounds, anthocyanins and proanthocyanins were detected by using spectrophotometric and chromatographic techniques, both on cooked and uncooked samples. All the analytical procedures were optimised prior to the application on rice samples.

Results provide a comprehensive portrait of Italian pigmented rice as concerns bioactive molecules, and enable a reliable and extensive assessment of the nutritional value of pigmented varieties thanks to the investigation of the effect of cooking as well. In addition, the assessment of the bioactive molecule profile might be the first step to claim foods as functional. This study, therefore, also enables a comparison between Italian and foreign pigmented rice varieties that enhances domestic rice crop and might hopefully encourage breeding programs for the development of improved rice varieties.

## INTRODUZIONE

I risi pigmentati sono varietà di riso che si differenziano dal riso comune in quanto presentano chicchi con una colorazione distintamente scura, variabile tra il viola e il nero, oppure rosso-bruna dovuta all'accumulo di pigmenti nel pericarpo, nello strato nucellare e nell'aleurone.

Le varietà pigmentate della specie *Oryza Sativa* sono state definite come "risi speciali" in quanto oltre alla caratteristica colorazione dei chicchi hanno generalmente un gusto, un aroma ed una composizione chimica peculiari. In base alla pigmentazione del chicco, i risi pigmentati sono suddivisi in "riso nero" (black rice) e "riso rosso" (red rice).

Le maggiori aree di diffusione dei risi pigmentati sono i Paesi asiatici. La consultazione dei *database* della *Chinese gene bank* e dell'*International Rice Research Institute* (IRRI, Filippine) ha messo in evidenza che il 62% dei risi neri è prodotto in Cina, cui seguono lo Sri Lanka (8,6%), l'Indonesia (7,2%), l'India (5,1%), le Filippine (4,3%) e il Bangladesh (4,1%) (Chaudhary, 2003).

Anche i risi rossi sono principalmente diffusi nei Paesi asiatici come Cina, Sri Lanka, Filippine, Corea, Giappone e India, dove oltre ad essere consumati tal quali, sono usati anche per la produzione di pane, gelato e liquori (Yoshida *et al.*, 2010; Abdel-Aal *et al.*, 2006), a scopi terapeutici e religiosoculturali (Ahuja *et al.*, 2007). Rispetto ai risi neri, le varietà di riso rosso sono in grado di crescere in ambienti ostili come suoli non fertili, acque profonde e zone montuose.

Oltre alle specie pigmentate di *Oryza sativa*, esistono alcune specie del genere *Zizania* che producono granelle simili al riso con una colorazione scura, variabile tra il verde e il nero. Per la loro forma che, sebbene più allungata, ricorda quella del riso, le granelle della specie *Zizania aquatica* sono note come "riso selvatico". Queste sono coltivate in USA, in Canada e in Ungheria, in terreni ricoperti da 50 a 100 cm di acqua (Chaudhary, 2003). Rispetto al genere *Oryza*, che è adatto a climi con temperature piuttosto elevate e relativamente costanti, il genere *Zizania* cresce generalmente a climi più freddi.

Negli ultimi anni, la richiesta di risi pigmentati e in particolare di "riso nero" è aumentata sia in Europa che in USA per il loro valore salutistico (Chaudhary, 2003). È stato evidenziato, infatti, che i risi neri e rossi non solo sono fonte di carboidrati, ma apportano una quantità di ferro, zinco, calcio, rame, proteine e antiossidanti maggiore di quella fornita dal riso bianco. Come cereali integrali, sono ricchi di *phytochemicals* dotati di attività antiossidante, inoltre i pigmenti responsabili della colorazione delle cariossidi svolgono anch'essi un'azione antiossidante (Goufo e Trindade, 2014; Gunaratne *et al.*, 2013; Min *et al.*, 2012) riducendo il rischio di danni ossidativi a carico delle macromolecole biologiche. Tale attività spiega perché un consumo dei risi pigmentati riduce il rischio

di insorgenza di patologie croniche legate a stress ossidativo come le malattie cardio-vascolari ed alcuni tipi di tumore.

Ai risi pigmentati sono stati attribuiti anche altri effetti benefici come la prevenzione del diabete mellito di II tipo (Yawadio *et al.*, 2007) e la riduzione del colesterolo, delle LDL e dei trigliceridi nei ratti (Zawistowski *et al.*, 2009).

In Italia e in Europa la coltivazione dei risi pigmentati è stata introdotta solo recentemente. Fino a qualche anno fa, infatti, non esistevano varietà che potessero crescere e sviluppare cariossidi ai nostri climi temperati. La prima varietà italiana di riso pigmentato, registrata col nome “Venere” è nata dall’incrocio naturale tra una varietà nera asiatica, messa a disposizione dall’IRRI, e una varietà italiana. Attualmente questa è coltivata esclusivamente in Piemonte, in provincia di Vercelli e Novara, e in Sardegna, nella provincia di Oristano. Altre varietà pigmentate sono nate dall’incrocio della varietà Venere con altre varietà.

La letteratura scientifica sulle caratteristiche nutrizionali dei risi pigmentati e sulle loro molecole bioattive si riferisce pressoché completamente alle varietà prodotte in Asia. Fino al 2013 erano presenti solo due pubblicazioni internazionali su varietà italiane di risi pigmentati (Finocchiaro *et al.*, 2010; Finocchiaro *et al.*, 2007). Pertanto, è stata evidenziata la mancanza di una valutazione della qualità nutrizionale delle varietà italiane e anche europee. Inoltre, la presenza di antiossidanti lipofili come i carotenoidi nei risi pigmentati è stata affrontata raramente, anche a livello internazionale. È stato, invece, dimostrato che le xantofille luteina e zeaxantina assunte con gli alimenti aiutano a prevenire le malattie senili dell’occhio come la degenerazione maculare e la cataratta.

Un altro aspetto da non sottovalutare è che molto spesso lo studio della composizione nutrizionale ha riguardato il riso tal quale ed è stato completamente trascurato l’effetto che il processo di cottura cui il riso è sottoposto per poter essere consumato, può esercitare sulle molecole bioattive.

In questo contesto, è stato sviluppato questo progetto di ricerca di dottorato con lo scopo di valutare la qualità nutrizionale e la funzionalità di varietà italiane di risi pigmentati o di varietà disponibili sul mercato nazionale, attraverso la determinazione di molecole bioattive sia idrofile che lipofile. Inoltre, ci si è posti l’obiettivo di valutare l’effetto della cottura sulla stabilità dei componenti antiossidanti, così da individuare possibili differenze di risposta/resistenza a tale processo sia da parte delle molecole che delle varietà.

I principali obiettivi del progetto hanno, pertanto, riguardato:

- l’ottimizzazione di metodiche analitiche per la determinazione delle principali molecole bioattive (carotenoidi, composti fenolici liberi e legati, antocianine, proantocianidine);
- la determinazione delle molecole bioattive nelle varietà pigmentate di riso campionate;

- la valutazione dell'effetto della cottura sulla stabilità delle molecole bioattive oggetto di interesse attraverso la loro determinazione sui campioni sottoposti a cottura;
- la valutazione della possibilità di utilizzare gli indici colorimetrici come parametri predittivi della presenza dei pigmenti dotati di attività antiossidante.

Il lavoro svolto nei tre anni di dottorato è descritto in questo elaborato che si articola in due parti.

Nella prima parte è delineato lo stato dell'arte sul riso, focalizzando l'attenzione su dati di produzione, sulla classificazione merceologica e sui principali nutrienti (capitolo 1). Segue, poi, una descrizione delle caratteristiche chimiche e delle proprietà delle molecole bioattive di interesse (carotenoidi, composti fenolici, antocianine e catechina) completata da una panoramica sui metodi analitici utilizzati per la loro determinazione e sui punti critici delle analisi (capitolo 2).

Nella seconda parte dell'elaborato è presentata la parte sperimentale dello studio. Sono descritti in dettaglio il campionamento e la preparazione dei campioni, nonché le procedure analitiche utilizzate per la determinazione delle molecole bioattive (capitolo 3). Infine, sono presentati e discussi l'ottimizzazione delle metodiche analitiche ed i risultati ottenuti dalla determinazione delle molecole bioattive (capitolo 4).

## BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Aal, E.-S.M., Young, J.C., Rabalski, I., 2006. Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple, and Red Cereal Grains. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4696–4704. doi:10.1021/jf0606609
- Ahuja, U., Ahuja, S.C., Chaudhary, N., Thakrar, R., 2007. Red Rices—Past, Present, and Future. *Asian Agri-History* 11, 291–304.
- Chaudhary, R.C., 2003. Speciality rices of the world: Effect of WTO and IPR on its production trend and marketing. *Food, Agriculture & Environment* Vol.1(2), 34–41.
- Finocchiaro, F., Ferrari, B., Gianinetti, A., 2010. A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. *Journal of Cereal Science* 51, 28–34. doi:10.1016/j.jcs.2009.09.003
- Finocchiaro, F., Ferrari, B., Gianinetti, A., Dall’asta, C., Galaverna, G., Scazzina, F., Pellegrini, N., 2007. Characterization of antioxidant compounds of red and white rice and changes in total antioxidant capacity during processing. *Mol Nutr Food Res* 51, 1006–1019. doi:10.1002/mnfr.200700011
- Goufo, P., Trindade, H., 2014. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols,  $\gamma$ -oryzanol, and phytic acid. *Food Sci Nutr* 2, 75–104. doi:10.1002/fsn3.86
- Gunaratne, A., Wu, K., Li, D., Bentota, A., Corke, H., Cai, Y.-Z., 2013. Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. *Food Chemistry* 138, 1153–1161. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.129
- Min, B., Gu, L., McClung, A.M., Bergman, C.J., Chen, M.-H., 2012. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours. *Food Chemistry* 133, 715–722. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.079
- Yawadio, R., Tanimori, S., Morita, N., 2007. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. *Food Chemistry* 101, 1616–1625. doi:10.1016/j.foodchem.2006.04.016
- Yoshida, H., Tomiyama, Y., Mizushina, Y., 2010. Lipid components, fatty acids and triacylglycerol molecular species of black and red rices. *Food Chemistry* 123, 210–215. doi:10.1016/j.foodchem.2010.04.010
- Zawistowski, J., Kopec, A., Kitts, D.D., 2009. Effects of a black rice extract (*Oryza sativa* L. indica) on cholesterol levels and plasma lipid parameters in Wistar Kyoto rats. *Journal of Functional Foods* 1, 50–56. doi:10.1016/j.jff.2008.09.008

## Capitolo 1

# IL RISO

---

Il riso e il frumento rappresentano le coltivazioni più importanti nella storia dell'uomo poiché soddisfano oltre il 50% delle esigenze nutrizionali. Al riso, in particolare, si può attribuire un'importanza primaria in quanto costituisce l'alimento base in 68 Paesi del mondo.

In questo capitolo sono trattati i seguenti argomenti:

- cenni relativi all'origine del riso;
  - produzione di riso;
  - caratteristiche morfologiche della cariosside;
  - processi di lavorazione del riso;
  - classificazione delle varietà di riso;
  - riso come alimento;
  - nutrienti del riso.
-

# 1 IL RISO

## 1.1 ORIGINE DEL RISO

Il riso coltivato appartiene alle specie *Oryza sativa* L. e *Oryza glaberrima* Steud.. Il primo, noto come “riso asiatico”, è coltivato in tutto il mondo, mentre la produzione del secondo, noto come “riso africano” è limitata alle zone tropicali dell’Africa occidentale.

Alla specie *Oryza sativa* L. appartengono le tre sottospecie indica, japonica e javanica: la maggior parte delle *cultivar* e varietà di riso coltivato appartengono alla sottospecie indica o japonica e sono state ottenute attraverso l’addomesticazione di varietà selvatiche. In un recente lavoro, Huang *et al.* (2012) hanno mappato le variazioni del genoma del riso dimostrando che la sottospecie *Oryza sativa* japonica è stata ottenuta da una popolazione di *Oryza rufipogon* in Cina meridionale, mentre l’*Oryza sativa* indica è stata sviluppata successivamente mediante incroci tra la japonica e varietà selvatiche locali dell’Asia Meridionale e sud-orientale.

## 1.2 PRODUZIONE DI RISO

Secondo il database FAOSTAT, i principali produttori di riso nel periodo 2010-2013 sono stati, in ordine decrescente di quantità, Cina, India, Indonesia, Bangladesh e Vietnam (Figura 1.1). Tali Paesi sono tutti situati in Asia cui spetta il 90% della produzione mondiale di riso (Figura 1.2).

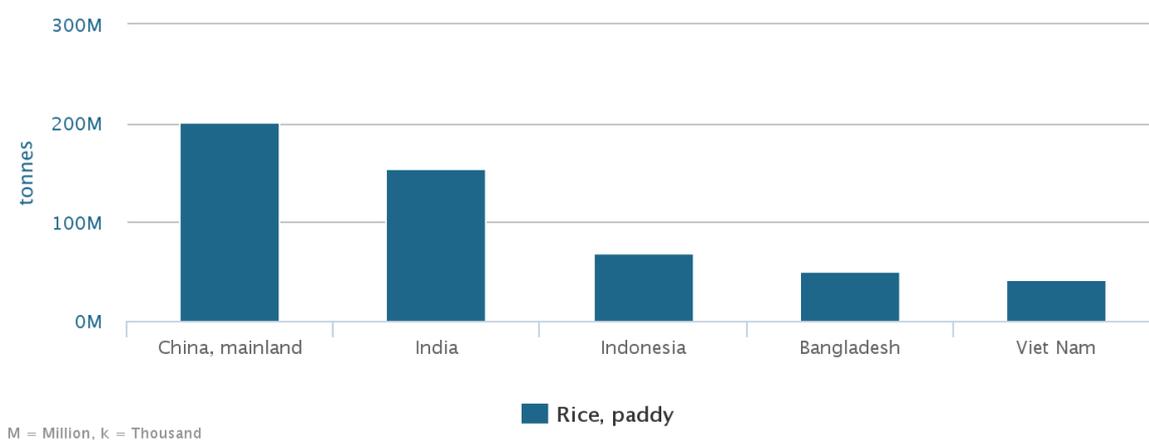


Figura 1.1: principali produttori mondiali di riso (FAOSTAT, download 14/12/2015)

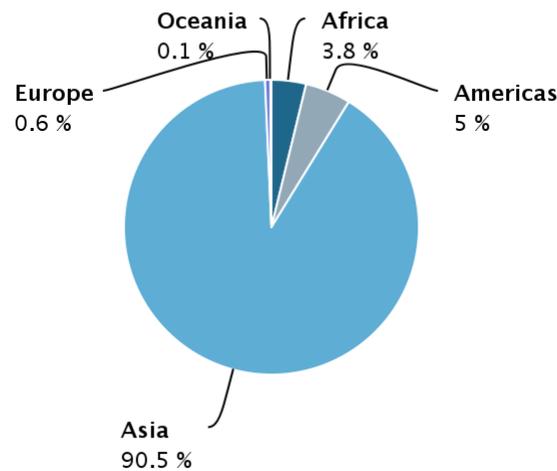


Figura 1.2: produzione mondiale di riso nel 2013 (dati disponibili più recenti) (FAOSTAT, download 14/12/2015)

Dal 1961 al 2013 la produzione mondiale di riso è aumentata di circa tre volte (Figura 1.3)

L’Africa è il continente in cui si è registrato il maggior incremento di produzione (5 volte), seguita da Asia e America (3 volte), Europa (2 volte) e Oceania (30%) (Figura 1.4). Tuttavia, in questo arco di tempo la disponibilità di riso pro capite non è aumentata proporzionalmente a causa dell’aumento della popolazione (Nayar, 2014).

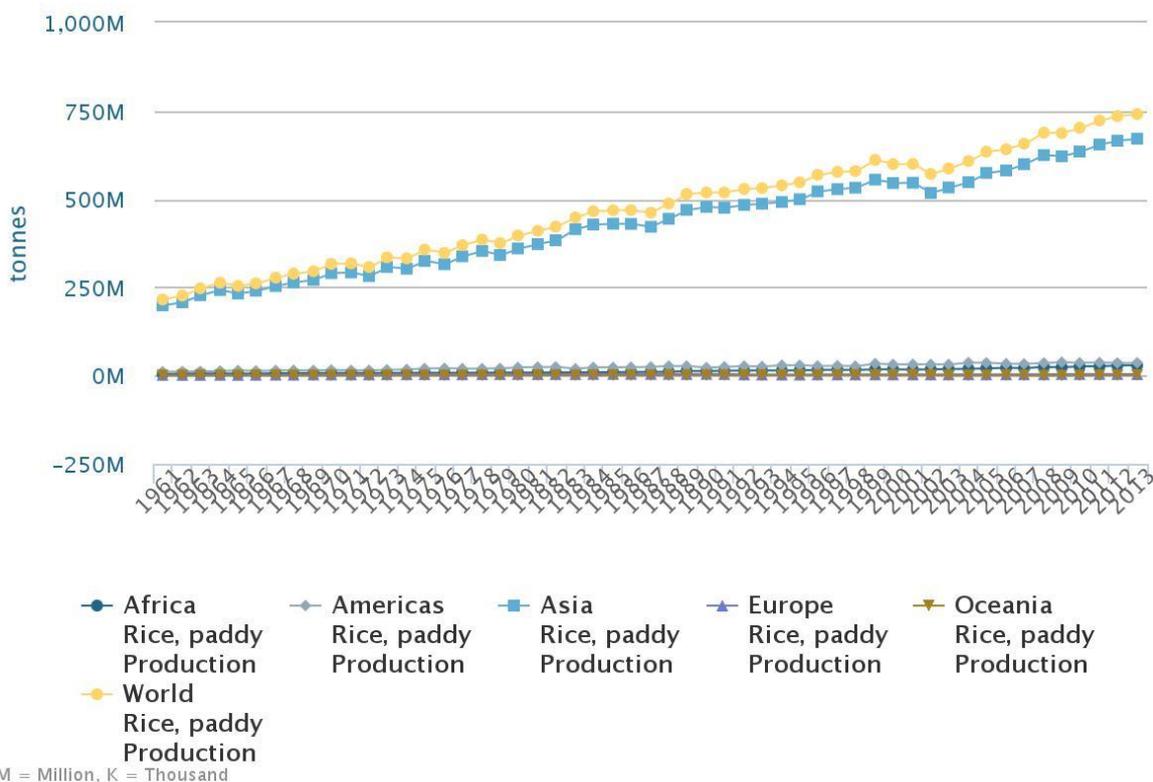


Figura 1.3: produzione mondiale di riso dal 1961 al 2013 (FAOSTAT, download 14/12/2015)

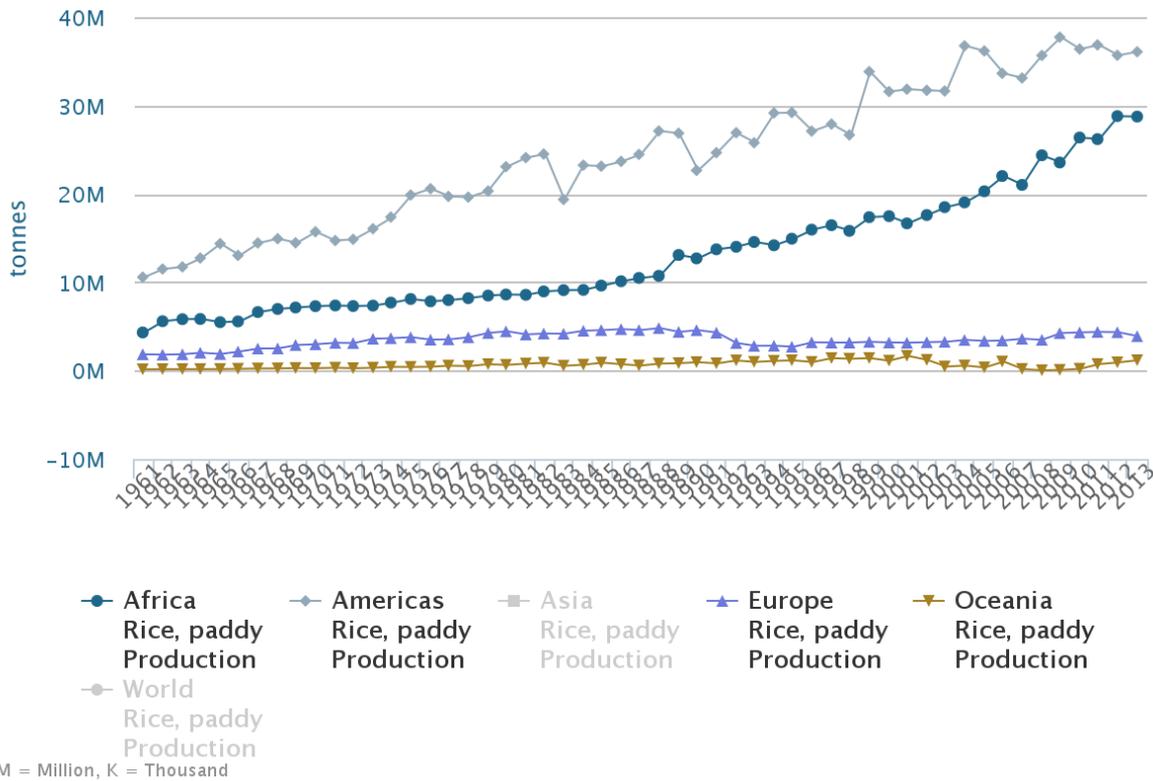


Figura 1.4: produzione di riso di Africa, America, Europa e Oceania dal 1961 al 2013 (FAOSTAT, download 14/12/2015)

In Figura 1.5 è riportata la biodiversità della produzione mondiale di riso.

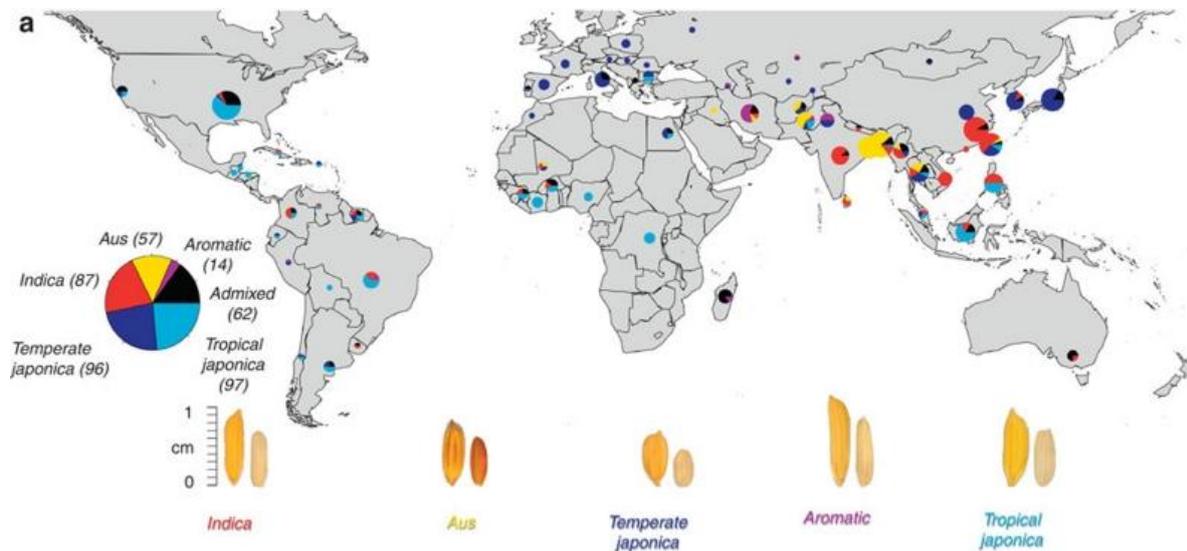


Figura 1.5: biodiversità della produzione mondiale di riso (Wani et al., 2012)

In Europa, la produzione di riso rappresenta soltanto lo 0,6% della produzione mondiale (Figura 1.2) e sono coltivate varietà di *Oryza sativa* L. della sottospecie japonica.

Tra i Paesi europei, l'Italia è il primo produttore seguito da Federazione russa e Spagna (FAOSTAT). La produzione italiana di riso nel 2013 è stata di 1339000 tonnellate (Tabella 1.1) pari al 34,4% della produzione europea.

Produttore	Riso prodotto	
	Tonnellate/anno	%
Bulgaria	54900	1,4
Francia	82000	2,1
Grecia	227000	5,8
Ungheria	9800	0,3
Italia	1339000	34,4
Macedonia	27921	0,7
Portogallo	168300	4,3
Romania	54646	1,4
Federazione Russia	934943	24,0
Spagna	851500	21,9
Ucraina	145050	3,7

Tabella 1.1: produzione europea di riso per l'anno 2013 (dati disponibili più recenti) (FAOSTAT, download 14/12/2015)

Le varietà di risone e le corrispondenti varietà di riso coltivate in Italia in ogni annata agraria sono pubblicate con DM in cui si riporta la denominazione delle varietà e la loro ripartizione in gruppi secondo la legge 18 marzo 1958, n. 325.

In data 20 novembre 2015 è stato pubblicato il DM relativo alla denominazione delle varietà di risone e delle corrispondenti varietà di riso per l'annata agraria 2015/2016.

Sono incluse in tale elenco quattro varietà di riso che presentano il pericarpo pigmentato: Venere (gruppo semifine), Artemide (gruppo superfine), Ermes (gruppo superfine) e Nerone (gruppo fine).

A differenza di quanto accade per le varietà di riso bianco, mancano database sulla produzione dei risi pigmentati sia a livello nazionale che mondiale.

### 1.3 CARATTERI BOTANICI E ANATOMIA DELLA CARIOSIDE DEL RISO

L'*Oryza sativa* L. è una pianta erbacea della famiglia delle Gramineae che presenta radici aventizie e embrionali caratterizzate dalla capacità di sviluppare dei parenchimi aeriferi che consentono al riso di vivere in ambiente acquatico.

Il fusto (o culmo) presenta internodi cavi e nodi pieni, le foglie sono di colore verde chiaro, a forma di guaina con peli bianchi, corti e spessi e la ligula è lunga e caratterizzata da auricole pelose.

L'infiorescenza è una pannocchia costituita da spighette uniflore con fiori ermafroditi a sei stami e ovario uniovulare con stimmi piumosi.

Botanicamente, il riso si distingue dagli altri cereali oltre che per il parenchima aerifero, anche per la presenza della foglia panicolare (foglia apicale che resta in posizione eretta anche dopo la fioritura).

Il frutto è una cariosside, di forma ellittica o sferica, costituita da (Figura 1.6):

- ▶ Crusca — rappresenta circa il 13% della cariosside. È, a sua volta, costituita da diversi tessuti che spostandosi dall'esterno verso l'interno sono: pericarpo (Pe), tegumento seminale (SC), strato nucellare (N), aleurone (A).
- ▶ Endosperma — rappresenta circa l'85% della cariosside. È costituito da subaleurone (Su) e endosperma amilaceo (SE).
- ▶ Germe o embrione — rappresenta poco più del 2% della cariosside. È costituito da radichetta (Rad), piumetta (Pl), epiblasto (Ep), scutello (Sc), germe (G).

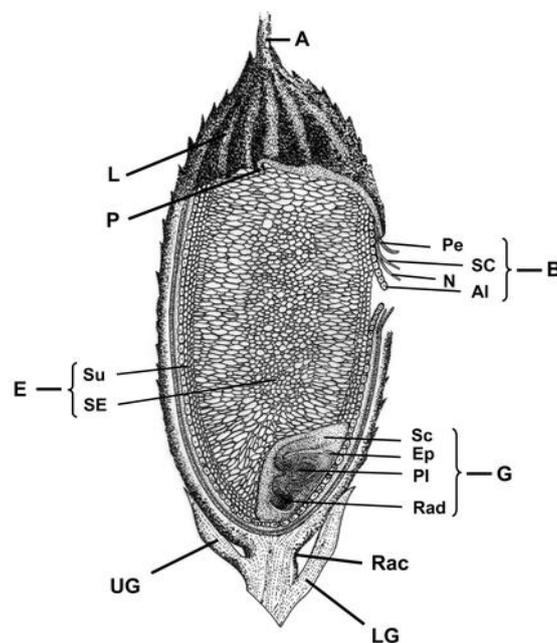


Figura 1.6: sezione longitudinale della cariosside di riso (Jan A. Delcour e R. Carl Hoseney, 2010). Resta (A), lemma (L), palea (P), pericarpo (Pe), tegumento seminale (SC), strato nucellare (N), aleurone (Al), crusca (B), subaleurone (Su), endosperma amilaceo (SE), endosperma (E), gluma inferiore (LG), gluma superiore (UG), rachilla (Rac), radichetta (Rad), piumetta (Pl), epiblasto (Ep), scutello (Sc), germe (G).

La cariosside matura, dopo la raccolta, presenta ancora aderenti glumelle e tegumenti e per questo è definita “vestita”. Le glumelle (che insieme alle glume vanno a formare la pula o lolla) sono costituite da lemma e palea (Figura 1.6) e rappresentano il 20% in peso del risone (Jan A. Delcour e R. Carl Hoseney, 2010). Queste hanno un alto contenuto in cellulosa (25%), lignina (30%), arabinoxilani (15%) e ceneri (21%).

## 1.4 PROCESSO DI LAVORAZIONE DEL RISO

Il riso maturo trebbiato ed essiccato e ancora avvolto da glumelle e tegumenti è definito risone o riso paddy (rough rice/paddy rice). Questo non può essere consumato come tale e per essere trasformato in riso commestibile è sottoposto ad un processo di lavorazione che consta delle seguenti fasi:

1. Pulitura: allontanamento dal risone di sostanze estranee come terra, sassi, semi ecc.
2. Sbramatura: consiste nel rimuovere dal risone la lolla, costituita da glume e glumelle, ottenendo riso semigreggio o integrale o sbramato (brown rice). Questo è formato da chicchi costituiti per il 2% da pericarpo, per il 5% da tegumento seminale, strato nucellare e aleurone, per il 2-3% dal germe e per l'89-94% dall'endosperma (Yu *et al.*, 2012).
3. Sbiancatura: i chicchi di riso sbramato sono sottoposti (da tre a cinque volte) all'azione abrasiva di macchine che allontanano via via le parti più esterne (pericarpo, germe, spermoderma, strato aleuronico) del chicco lasciando, nel prodotto che ha subito l'intero ciclo del trattamento, la mandorla farinosa. Il riso ottenuto è detto "sbiancato". L'allontanamento dei chicchi di dimensioni ridotte o difettosi consente di ottenere il riso mercantile o raffinato.
4. Brillatura od oleatura: il riso raffinato è trattato con talco e glucosio (brillatura) o con oli inodori e insapori, come quello di vaselina (oleatura), ottenendo chicchi più brillanti e lucenti. Il riso che si ottiene è detto commerciato o brillato.



Figura 1.7: Risone (I), riso integrale (II) e riso raffinato (III). Fonte: [www.riseria.ch](http://www.riseria.ch), ultimo accesso 15 dicembre 2015

La resa della lavorazione del riso è 62-64% di riso, 18-20% di lolla, 7-9% di rotture, 8-9% di farine (pula e farinaccio), 1% di grana verde (grani immaturi) e 1% di gemma (embrione) ([www.riseria.ch](http://www.riseria.ch)). I sottoprodotti vengono utilizzati in mangimistica o trovano impiego in altri settori alimentari e non. La lolla, ad esempio, può essere utilizzata come combustibile nelle stesse riserie; la pula può essere usata come mangime in zootecnia o come eccipiente nell'industria farmaceutica per l'estrazione di composti fosfororganici; i chicchi scartati e rotti sono usati per la preparazione di prodotti usati

soprattutto nella prima infanzia (semolino e crema di riso); rotture e grani verdi possono essere usati nell'industria della birra. I sottoprodotti della lavorazione possono restare anche nel riso sbramato dove è presente circa il 6-11% di crusca e il 2,5-3,8% di farinaccio (Juliano, 2003).

Sebbene il processo di lavorazione del riso renda tale cereale commestibile e ne aumenti la conservabilità, da un punto di vista nutrizionale provoca la perdita di alcuni nutrienti. Il *parboiling* consente di ovviare a questo inconveniente e allo stesso tempo di rendere il riso più facilmente conservabile (in seguito all'inattivazione enzimatica dovuta alle alte temperature di esercizio - sterilizzazione) e più resistente alla cottura. Tale processo consiste in un trattamento idrotermico (cottura a vapore ed essiccazione) del risone, preventivamente ammollato fino a completa saturazione, che consente ai componenti idrosolubili del germe e delle parti più esterne, in particolare le vitamine del gruppo B e il ferro, di diffondere all'interno della cariosside e di non disperdersi durante la cottura. Il riso ottenuto è detto "parboiled" o "converted".

## 1.5 CLASSIFICAZIONE DEL RISO LAVORATO

Nel commercio internazionale le più diffuse classificazioni del riso lavorato sono basate sulla lunghezza del chicco e/o sul rapporto tra lunghezza e larghezza dello stesso, oppure sul contenuto percentuale di grani rotti o di altri difetti e impurità ([www.entenazionale.risi.com](http://www.entenazionale.risi.com); ultimo accesso 16/12/2015). Tali classificazioni non tengono conto delle caratteristiche di qualità come comportamento in cottura o valore nutritivo.

Secondo il Regolamento UE n. 1308/2013, il riso è classificato in base alla lunghezza della cariosside lavorata e al rapporto lunghezza/larghezza (R). Si distingue pertanto riso a grani tondi, riso a grani medi e riso a grani lunghi secondo i parametri indicati di seguito e sintetizzati in Tabella 1.2:

1. "riso a grani tondi": riso i cui grani hanno una lunghezza pari o inferiore a 5,2 millimetri, con un rapporto lunghezza/larghezza inferiore a 2;
2. "riso a grani medi": riso i cui grani hanno una lunghezza superiore a 5,2 millimetri e pari o inferiore a 6,0 millimetri, con un rapporto lunghezza/larghezza inferiore a 3;
3. "riso a grani lunghi":
  - categoria A: riso di lunghezza superiore a 6,0 millimetri e con un rapporto lunghezza/larghezza superiore a 2 ed inferiore a 3;
  - categoria B: riso di lunghezza superiore a 6,0 millimetri e con un rapporto lunghezza/larghezza pari o superiore a 3.

Classificazione	Lunghezza (L)	Rapporto (R)
	della cariosside lavorata (mm)	lunghezza/larghezza
Grani tondi	$L \leq 5,2$	$R < 2$
Grani medi	$5,2 \leq L \leq 6,0$	$R < 3$
Grani lunghi	<i>Categoria A</i>	$L > 6$
	<i>Categoria B</i>	$L > 6$
		$2 < R < 3$
		$R \geq 3$

Tabella 1.2: classificazione del riso secondo il Regolamento UE n. 1308/2013

In Italia è ancora in uso anche la classificazione basata esclusivamente sulla lunghezza della cariosside lavorata, secondo la legge 18 marzo 1958 n. 325, modificata dalla legge del 5 giugno 1962, n. 586 tuttora in vigore nonostante l'introduzione successiva di normative comunitarie. Questa prevede la suddivisione dei risi in "comune o originario" (lunghezza del granello inferiore a 5,2 mm), "semifine" (lunghezza di 5,2 – 6,4 mm), "fine" (lunghezza superiore a 6,4 mm) e "superfine" (per i quali più che le dimensioni, vengono considerate le superiori caratteristiche organolettiche, di aspetto e di resistenza alla cottura e allo spappolamento del granello).

I chicchi di riso lavorato possono essere classificati non solo in base alle loro dimensioni, ma anche al loro aspetto. La presenza o assenza di una zona opaca, definita perlatura (chalkiness), all'interno dell'endosperma, determina la distinzione in grani cristallini e grani perlati. I primi, a differenza dei secondi, sono grani che ad occhio nudo non presentano alcuna inclusione biancastra (perla o striscia) dovuta alla presenza di spazi d'aria nell'endosperma (Jan A. Delcour e R. Carl Hosenev, 2010). Tale classificazione è eseguita a occhio nudo ponendo il campione su una superficie scura che permetta il contrasto con il candore dei chicchi per mettere in evidenza le zone perlate da quelle traslucide (Cormegna, Mauro e Simonelli, C., n.d.). Esistono anche metodi basati sull'immagine digitale (Riley, 2005). A seconda della forma e della dimensione all'interno della cariosside di riso, la perla può essere classificata come: assente, poco estesa in posizione centrale, estesa in posizione centrale, poco estesa in posizione centro-laterale, estesa in posizione centro-laterale.

La perlatura influenza non solo l'aspetto, ma anche il comportamento del riso alla cottura e alla masticazione. Gli spazi di aria presenti nelle cariossidi perlate, infatti, consentono un maggiore rigonfiamento dei granuli di amido durante la cottura quindi la cariosside di riso cotto risulta più morbida rispetto ai grani cristallini. Inoltre, i grani perlati sono particolarmente vulnerabili alle forze meccaniche generate durante il processo di lavorazione, pertanto si ha un aumento della percentuale di granelli rotti al termine della fase di sbiancatura della cariosside.

I risi possono essere classificati anche in base alle caratteristiche organolettiche. Si individuano due macro categorie: aromatici e non aromatici. I risi aromatici sono caratterizzati dal fatto che in

cottura sprigionano un forte aroma di pop-corn. Questi costituiscono un gruppo speciale di nicchia con una spiccata qualità.

### 1.5.1 Risi pigmentati

I risi pigmentati, detti anche “risi colorati”, sono varietà di riso che presentano chicchi con una colorazione distintamente scura, variabile tra il viola e il nero, oppure rosso-bruna: si parla rispettivamente di “riso nero” (black rice) e “riso rosso” (red rice).

In Italia, nell’articolo 1 della proposta di legge n. 3382 del 26/10/2015 sulla “Nuova disciplina del commercio interno del riso”, il riso pigmentato è definito come “il prodotto [...] derivato da particolari varietà di riso greggio che, per le loro caratteristiche ereditarie, presentano il pericarpo di colore rosso o nero o di un’altra intensa colorazione invece del normale colore biancastro”.

Il colore è dovuto alla presenza di pigmenti nel pericarpo, nello strato nucellare e nell’aleurone. I pigmenti responsabili del colore delle varietà di riso nero sono le antocianine (Escribano-Bailon *et al.*, 2004), mentre il colore dei risi rossi è dovuto alle proantocianine (Oki *et al.*, 2002).

I risi pigmentati sono nativi dei Paesi asiatici e legati alla tradizione dell’Oriente: il riso nero in Cina era definito “il riso dell’imperatore”, mentre il riso rosso era usato a scopi terapeutici e religiosi (Ahuja, 2007). Tutt’ora la maggiore area di diffusione dei risi pigmentati è l’Oriente. La consultazione dei *database* della *Chinese gene bank* e dell’*International Rice Research Institute* (IRRI, Filippine), ha messo in evidenza che il 62% dei risi neri è prodotto in Cina, cui seguono lo Sri Lanka (8,6%), l’Indonesia (7,2%), l’India (5,1%), le Filippine (4,3%) e il Bangladesh (4,1%) (Chaudhary, 2003). Analogamente, i risi rossi sono diffusi in Cina, Sri Lanka, Filippine, Corea, Giappone e India (Deng *et al.*, 2013). Champagne (2004) riporta che le varietà di riso pigmentato sono diffuse in regioni collinari e montuose, soprattutto nel nord-est dell’India. Oltre ad essere consumati tal quali, i risi pigmentati sono usati anche per la produzione di pane, gelato e liquori (Yoshida *et al.*, 2010; Abdel-Aal *et al.*, 2006). Ad alcune varietà sono state attribuite, inoltre, proprietà terapeutiche (Bhattacharya, 2011).

Oltre alle specie pigmentate di *Oryza sativa*, esistono specie del genere *Zizania* che producono granelle con una colorazione scura, variabile tra il verde e il nero, ed una forma che, sebbene più allungata, è simile a quella del riso. Per questo le granelle della specie *Zizania aquatica* sono note come “wild rice” o “riso selvatico”. Queste varietà sono coltivate sulle coste atlantiche degli USA, in alcune regioni del Canada e in Ungheria, generalmente in terreni ricoperti da 50 a 100 cm di acqua (Chaudhary, 2003), e sono adatte a climi più freddi rispetto al genere *Oryza*.

Negli ultimi anni, la richiesta di risi pigmentati e in particolare di “riso nero” è aumentata sia in Europa che in USA per il loro valore salutistico (Chaudhary, 2003). È stato evidenziato, infatti, che i

risi neri e rossi non solo sono fonte di carboidrati, ma apportano una quantità di proteine, ferro, zinco e fibra maggiore di quella fornita dal riso bianco (Tabella 1.3).

Tipo di riso	Proteine	Ferro	Zinco	Fibra
	<i>g/100 g</i>	<i>g/100 g</i>	<i>g/100 g</i>	<i>g/100 g</i>
Bianco	6,8	1,2	0,5	0,6
Integrale	7,9	2,2	0,5	2,8
Rosso	7,0	5,5	3,3	2,0
Viola	8,3	3,9	2,2	1,4
Nero	8,5	3,5	-	4,9

Tabella 1.3: contenuto di proteine, ferro, zinco e fibra nel riso bianco, integrale, pigmentato (rosso, viola e nero) (Nayar, 2014)

Come cereali integrali, i risi pigmentati sono ricchi di *phytochemicals* dotati di attività antiossidante (Goufo e Trindade, 2014), inoltre i pigmenti responsabili della colorazione delle cariossidi svolgono anch'essi un'azione antiossidante (Gunaratne *et al.*, 2013; Min *et al.*, 2012) riducendo il rischio di danni ossidativi a carico delle macromolecole biologiche. Tale attività spiega perché un consumo dei risi pigmentati riduce il rischio di insorgenza di patologie croniche legate a stress ossidativo come le malattie cardio-vascolari ed alcuni tipi di tumore.

Ai risi pigmentati sono stati attribuiti anche altri effetti benefici come la prevenzione del diabete mellito di II tipo (Yawadio *et al.*, 2007) e la riduzione del colesterolo, delle LDL e dei trigliceridi nei ratti (Zawistowski *et al.*, 2009).

Un'altra caratteristica speciale dei risi pigmentati è che, rispetto alle varietà comuni, sono più resistenti all'attacco di insetti durante lo stoccaggio. Kitano *et al.* (1993) riportano la presenza in Giappone di chicchi di un riso rosso conservato dal 1905. Le varietà rosse hanno, inoltre, il vantaggio di adattarsi a situazioni agro-climatiche avverse come terreni poco fertili, zone montuose, siccità e allagamenti (Chaudhary *et al.*, 2001).

In Italia e in Europa la coltivazione dei risi pigmentati è stata introdotta solo recentemente. Fino a qualche anno fa, infatti, non esistevano varietà che potessero crescere e fruttificare ai nostri climi temperati. La prima varietà italiana di riso pigmentato, registrata col nome "Venere" è nata dall'incrocio naturale tra una varietà nera asiatica, messa a disposizione dall'IRRI, e una varietà italiana. Questa è stata inserita nel registro della varietà di specie agrarie nel 1997 e attualmente è coltivata esclusivamente in Piemonte, nelle province di Vercelli e Novara, e in Sardegna, nella provincia di Oristano. Nel 2009 è stata istituita la Filiera Riso Venere (FRV) per garantire l'origine italiana, la tracciabilità e la qualità del prodotto.

Dall'incrocio tra il riso Venere ed un riso di tipo indica, a granello lungo e stretto e pericarpo bianco, sono nate due nuove varietà di riso: il riso Artemide che presenta chicchi di colore nero ed è stato inserito nel registro della varietà di specie agrarie nel 2005 ed il riso Hermes che ha chicchi di colore rosso ed è stato inserito nel registro della varietà di specie agrarie nel 2013.

## 1.6 IL RISO COME ALIMENTO BASE

La definizione standard di alimento base (*staple food*) data dall'Unione Europea è: "The most commonly or regularly eaten food in a country or community and which forms the mainstay of the total calorie supply, especially in the poorer populations and at times of food shortage" (<http://www.eionet.europa.eu>; ultimo accesso 16/12/2015), ossia "l'alimento maggiormente consumato e che fornisce il maggior apporto calorico". Tale definizione è in accordo con quella presente nel documento FAO "Dimensions of Need - Staples: What do people eat?" (1995) secondo cui un alimento acquista il valore di alimento base quando "è mangiato regolarmente e in quantità tali da costituire la parte dominante della dieta e fornire la maggior parte dell'energia e dei nutrienti" ("a staple food is one that is eaten regularly and in such quantities as to constitute the dominant part of the diet and supply a major proportion of energy and nutrient needs."). Più recentemente, la FAO ha corretto tale definizione assumendo come alimento base solo quegli alimenti che contribuiscono ad apportare almeno il 10% dell'energia totale.

Secondo i dati riportati in Tabella 1.4, tratti dai Food Balance Sheets della FAO e inerenti i consumi giornalieri *pro capite*, in grammi e in kcal, relativi ai sei principali raccolti per l'anno 2011 (ultimo anno per il quale i dati sono disponibili), il riso fornisce una quantità di energia pari al 19,0% dell'energia totale giornaliera (considerando un apporto calorico giornaliero di 2870 Kcal). Questo è, pertanto, un alimento base.

	Consumo <i>pro capite</i>	
	in kg/anno	in kcal/giorno
Riso (lavorato)	54,08	545
Frumento e derivati	65,26	524
Mais e derivati	17,59	145
Patate e derivati	34,64	64
Cassava e derivati	0,63	38
Banana	12,05	20

Tabella 1.4: consumo annuo *pro capite* dei sei principali *crop*. Fonte: FBS (FAO's Food Balance Sheets) 2011 (ultimo anno per il quale i dati sono disponibili), FAOSTAT. Downloaded 14.12.2015

Tuttavia, i consumi variano molto tra i diversi continenti e tra i diversi paesi di uno stesso continente. Come riportato da Nayar (2014) il riso fornisce almeno il 10% delle calorie consumate in 68 su 193 Paesi del mondo. In alcuni di questi, il consumo annuo pro capite è addirittura superiore a 100 kg: Bangladesh (160 kg/annui; 69,8% delle calorie totali), Cambogia (152 kg/annui; 64,1% delle calorie totali), Guinea (128 kg/annui; 37,5% delle calorie totali), Laos (163 kg/annui, 64,2% delle calorie totali), Madagascar (102 kg/annui; 48,1% delle calorie totali), Myanmar (157 kg/annui; 54,4% delle calorie totali), Filippine (129 kg/annui; 49,6% delle calorie totali), Thailandia (103,1 kg/annui; 40,3% delle calorie totali), e Vietnam (166 kg/annui; 57,8% delle calorie totali). Nei paesi sviluppati i consumi sono significativamente minori: in Giappone sono pari a 56,6 kg/annui (21,6% delle calorie totali), nel Regno Unito sono di 5,6 kg/annui (2,1% delle calorie totali) e negli USA sono pari a 8,3 kg/annui(2,3% delle calorie totali).

## 1.7 NUTRIENTI DEL RISO

Per crescere normalmente e preservare la sua salute nel corso della vita, l'uomo ha bisogno di consumare quantità relativamente grandi di carboidrati, proteine e lipidi, piccole quantità di macroelementi, tracce di microelementi (Fe, Zn, Cu, I, Se) e vitamine (Welch e Graham, 2004).

Il riso contiene la maggiorparte di questi componenti: alcuni sono presenti in grandi quantità, altri in piccole (Tabella 1.5).

Nutrient <sup>1</sup>	Units	Brown rice (long-grain) <sup>2</sup>	White rice (long-grain) <sup>2</sup>	Rice bran <sup>2</sup>
<b>Proximates</b>				
Water	g	10.37	11.62	6.13
Energy	kcal	370	365	316
Energy	kJ	1548	1527	1322
Protein	g	7.94	7.13	13.35
Total lipid (fat)	g	2.92	0.66	20.85
Ash	g	1.53	0.64	9.98
Carbohydrate	g	77.24	79.95	49.69
Total dietary fiber	g	3.5	1.3	21
Total sugars	g	0.85	0.12	0.9
Sucrose	g	0.85	-	0.5
Glucose	g	-	-	0.2
Fructose	g	-	-	0.2
<b>Minerals</b>				
Calcium, Ca	mg	23	28	57
Iron, Fe	mg	1.47	0.8	18.54
Magnesium, Mg	mg	143	25	781
Phosphorus, P	mg	333	115	1677
Potassium, K	mg	223	115	1485
Sodium, Na	mg	7	5	5
Zinc, Zn	mg	2.02	1.09	6.04
Copper, Cu	mg	0.277	0.22	0.728
Manganese, Mn	mg	3.743	1.088	14.21
Selenium, Se	µg	23.4	15.1	15.6

<b>Vitamins</b>				
Thiamin	mg	0.401	0.07	2.753
Riboflavin	mg	0.093	0.049	0.284
Niacin	mg	5.091	1.6	33.995
Pantothenic acid	mg	1.493	1.014	7.39
Vitamin B-6	mg	0.509	0.164	4.07
Total folate	µg	20	8	63
Total choline	mg	30.7	5.8	32.2
Lutein + zeaxanthin	µg	0	0	220
Vitamin E (alpha-tocopherol)	mg	1.2	0.11	4.92
Vitamin K (phylloquinone)	µg	1.9	0.1	1.9
<b>Lipids</b>				
Fatty acids (total saturated)	g	0.584	0.18	4.171
12:00	g	0.003	0	0.019
14:00	g	0.011	0.004	0.078
16:00	g	0.498	0.161	3.557
18:00	g	0.052	0.012	0.373
Fatty acids (total monounsaturated)	g	1.056	0.206	7.549
16:1 undifferentiated	g	0.01	0.002	0.075
18:1 undifferentiated	g	1.046	0.203	7.475
Fatty acids (total polyunsaturated)	g	1.044	0.177	7.459
18:2 undifferentiated	g	1	0.146	7.143
18:3 undifferentiated	g	0.044	0.031	0.316

<b>Nutrient<sup>1</sup></b>	<b>Units</b>	<b>Brown rice (long-grain)<sup>2</sup></b>	<b>White rice (long-grain)<sup>2</sup></b>	<b>Rice bran<sup>2</sup></b>
<b>Amino acids</b>				
Tryptophan	g	0.101	0.083	0.108
Threonine	g	0.291	0.255	0.555
Isoleucine	g	0.336	0.308	0.568
Leucine	g	0.657	0.589	1.022
Lysine	g	0.303	0.258	0.65
Methionine	g	0.179	0.168	0.306
Cystine	g	0.096	0.146	0.317
Phenylalanine	g	0.41	0.381	0.635
Tyrosine	g	0.298	0.238	0.411
Valine	g	0.466	0.435	0.881
Arginine	g	0.602	0.594	1.058
Histidine	g	0.202	0.168	0.355
Alanine	g	0.463	0.413	0.97
Aspartic acid	g	0.743	0.67	1.308
Glutamic acid	g	1.618	1.389	1.854
Glycine	g	0.391	0.325	0.875
Proline	g	0.372	0.335	0.668
Serine	g	0.411	0.375	0.662

Tabella 1.5: nutrienti presenti nel riso integrale (brown rice), nel riso raffinato (white rice) e nella crusca di riso (bran). (Yu *et al.*, 2012)

### 1.7.1 Carboidrati

Tra tutti i nutrienti che costituiscono il riso, i carboidrati rappresentano il principale componente della cariosside del riso e si trovano sotto forma di amido. Questo nei risi integrali varia tra il 72% e l'82% sul peso secco (Frei *et al.*, 2003), mentre nel riso raffinato è pari al 90%.

L'amido è presente nell'endosperma della cariosside impacchettato in granuli la cui grandezza e forma sono influenzate essenzialmente dal germoplasma, oltre che dalle condizioni climatiche e dalle pratiche agronomiche.

I granuli possono essere ovali con superficie irregolare o liscia, ma generalmente sono poliedrici (o angolari) e lisci (Figura 1.8).

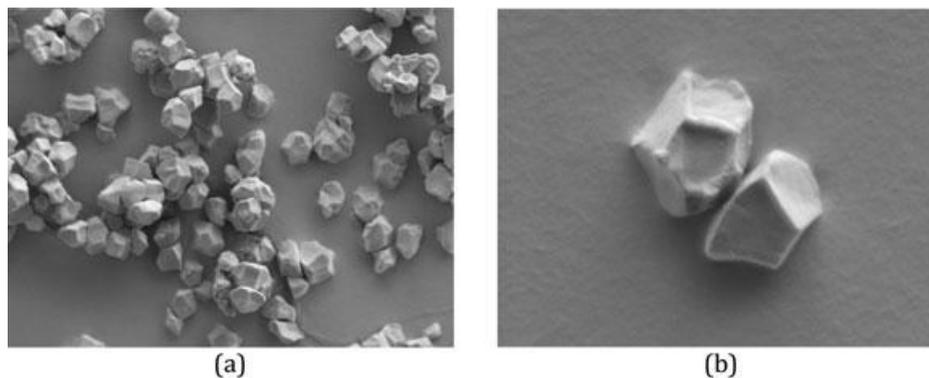


Figura 1.8: morfologia dei granuli di amido di riso misurati con microscopia elettronica a scansione a 2000x (a) e 6000x (b) (Wani *et al.*, 2012)

Le loro dimensioni variano tra 2  $\mu\text{m}$  e 7  $\mu\text{m}$  (Vandeputte e Delcour, 2004), confermandosi i più piccoli tra i granuli di amido dei cereali.

La grandezza dei granuli, nonché il rapporto amilosio/amilopectina ed il contenuto in minerali, influenza le proprietà dell'amido: gelatinizzazione, *pasting properties*, suscettibilità agli enzimi, cristallinità, *swelling* e solubilità (Wani *et al.*, 2012).

La sezione orizzontale dei granuli mette in evidenza che questi sono organizzati in aree semicristalline alternate concentricamente a regioni amorfe.

Come altri amidi, l'amido di riso è un co-polimero costituito da catene lineari (amilosio) e ramificate (amilopectina). Questi due componenti principali influenzano significativamente le proprietà funzionali degli amidi di riso (Wani *et al.*, 2012). Altri componenti minori sono lipidi, proteine, calcio, potassio, magnesio e sodio in forma ionica (Vandeputte e Delcour, 2004). Gli amidi di cereale contengono circa l'1% di lipidi e lo 0,25% di proteine (Baldwin, 2001). Nei risi non waxy il contenuto in lipidi oscilla tra lo 0,9% e l'1,3%, mentre nei risi waxy il contenuto è trascurabile (Wani *et al.*, 2012). Le proteine dell'amido sono proteine di riserva o enzimi biosintetici o degradativi (Baldwin, 2001).

### 1.7.2 Proteine

Le proteine, dopo l'amido, sono il secondo costituente più abbondante presente nel riso raffinato. Il contenuto è generalmente calcolato moltiplicando il contenuto di azoto Kjeldahl per il fattore 5,95. Tale fattore si basa sul contenuto di azoto (16,8%) nelle gluteline del riso.

Nel riso raffinato, il contenuto medio di proteine, riportato nelle tabelle composizionali, è pari al 7,3% (Juliano, 2003). Per il riso integrale, invece, è riportato un contenuto medio maggiore del riso raffinato e pari a 9,5% (Champagne *et al.*, 2004). Circa il 10% delle proteine è rappresentato da albumine, il 5% da globuline, il 20% da prolamine ed il 65% da gluteline (Yu *et al.*, 2001). Le albumine (proteine solubili in acqua) e le globuline (proteine solubili in NaCl) sono presenti maggiormente nei tessuti esterni della cariosside, mentre le gluteline (proteine solubili in NaOH) si trovano nell'endosperma. Le prolamine (proteine insolubili in alcool) sono una frazione minore in tutti i tessuti della cariosside. Le proteine del riso contengono i dieci aminoacidi essenziali e, come in tutti i cereali, la lisina è l'aminoacido limitante (Shewry, 2007). Sono state individuate differenze per quanto riguarda la composizione aminoacidica tra risone, riso integrale, riso lavorato, crusca, embrione.

Il risone ha una composizione aminoacidica simile al riso integrale in quanto le glumelle hanno un basso contenuto proteico, comunque superiore a quello delle altre parti della cariosside (Champagne, 2004). I tessuti con una minore concentrazione di lisina hanno, invece, un maggior contenuto di acido glutamico.

Il riso integrale, a sua volta, ha un maggior contenuto proteico del riso lavorato per il contributo fornito dallo strato subaleuronic.

### 1.7.3 Lipidi

Nel riso i lipidi sono maggiormente presenti nell'embrione e nello strato aleuronic oltre che nello strato subaleuronic e nell'endosperma amidaceo. Nel riso integrale il contenuto lipidico varia da 2,76 a 3,84% su base secca ed è influenzato dalla varietà e dalle condizioni di crescita (Kitta *et al.*, 2005). I principali acidi grassi presenti sono l'acido oleico (18:1), l'acido linoleico (18:2) e l'acido palmitico (16:0) che costituiscono più del 90% degli acidi grassi totali (Kitta *et al.*, 2005).

Le varietà di riso nero hanno un contenuto in lipidi più alto delle varietà con pericarpo rosso o incolore (Frei e Becker, 2005).

### 1.7.4 Vitamine

Le principali vitamine presenti nel riso sono tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina, acido pantotenico, folati e vitamina E. Sono, invece, assenti le vitamine A, C e D.

Queste sono presenti maggiormente nella crusca, pertanto nella fase di lavorazione vengono perse con la conseguenza che il riso raffinato ha un contenuto di vitamine minore del riso integrale.

Il contenuto di tiamina in 79 varietà di riso è stato trovato compreso nell'intervallo tra 0,12-1,74 mg/100 g, con un valore medio pari a 0,457 mg/100 g; la riboflavina variava da 0,011 a 0,403 mg/100 g (media 0,087 mg/100 g) e la niacina oscillava tra 1,972-9,218 mg/100 g, con una media di 5,322 mg/100 g (Yu *et al.*, 2012).

### **1.7.5 Minerali**

Il riso contiene un insieme di minerali classificabili come macro- e micro-elementi. Il potassio, il calcio, il sodio e il magnesio sono macro elementi presenti nel riso lavorato rispettivamente nelle seguenti concentrazioni: 804,83 µg/g, 119,50 µg/g, 20,78 µg/g e 194,79 µg/g. Micronutrienti come ferro, zinco, rame e manganese hanno concentrazioni medie pari, rispettivamente a 5,40 µg/g, 25,97 µg/g, 9,96 µg/g, e 10,73 µg/g (Jiang *et al.*, 2009). Per quanto riguarda il contenuto in selenio, in alcune varietà Chen *et al.* (2002) hanno trovato valori pari a  $0,25 \pm 0,011$  µg/g.

## 1.8 BIBLIOGRAFIA DEL CAPITOLO

- Abdel-Aal, E.-S.M., Young, J.C., Rabalski, I., 2006. Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple, and Red Cereal Grains. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4696–4704. doi:10.1021/jf0606609
- Ahuja, U., Ahuja, S.C., Chaudhary, N., Thakrar, R., 2007. Red Rices—Past, Present, and Future. *Asian Agri-History* 11, 291–304.
- Baldwin, P.M., 2001. Starch Granule-Associated Proteins and Polypeptides: A Review. *Starch/Stärke* 53, 475–503. doi:10.1002/1521-379X(200110)53:10<475::AID-STAR475>3.0.CO;2-E
- Bhattacharya, K.R., 2011. *Rice Quality: A Guide to Rice Properties and Analysis*. Elsevier.
- Champagne, E.T., 2004. RICE: Chemistry and Technology, Grain Science References. American Association of Cereal Chemists, Inc.
- Champagne, E.T., Bett-Garber, K.L., McClung, A.M., Bergman, C., 2004. Sensory Characteristics of Diverse Rice Cultivars as Influenced by Genetic and Environmental Factors. *Cereal Chemistry Journal* 81, 237–243. doi:10.1094/CCHEM.2004.81.2.237
- Chaudhary, R.C., Tran, D.V., Duffy, R., 2001. *Speciality Rices of the World: Breeding, Production, and Marketing*. Science Publishers.
- Chaudhary, R.C., 2003. Speciality rices of the world: Effect of WTO and IPR on its production trend and marketing. *Food, Agriculture & Environment* Vol.1(2), 34–41.
- Chen, L., Yang, F., Xu, J., Hu, Y., Hu, Q., Zhang, Y., Pan, G., 2002. Determination of Selenium Concentration of Rice in China and Effect of Fertilization of Selenite and Selenate on Selenium Content of Rice. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5128–5130. doi:10.1021/jf0201374
- Cormegna, Mauro, Simonelli, C., n.d. Grani cristallini e tipo di perla: validazione del metodo analitico [http://www.academia.edu/3334811/Grani\\_cristallini\\_e\\_tipo\\_di\\_perla\\_validazione\\_del\\_metodo\\_analitico](http://www.academia.edu/3334811/Grani_cristallini_e_tipo_di_perla_validazione_del_metodo_analitico) (accessed 12.15.15).
- Deng, G.-F., Xu, X.-R., Zhang, Y., Li, D., Gan, R.-Y., Li, H.-B., 2013. Phenolic compounds and bioactivities of pigmented rice. *Crit Rev Food Sci Nutr* 53, 296–306. doi:10.1080/10408398.2010.529624
- Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., 2004. Anthocyanins in cereals. *J Chromatogr A* 1054, 129–141.
- Frei, M., Becker, K., 2005. Fatty acids and all-trans- $\beta$ -carotene are correlated in differently colored rice landraces. *J. Sci. Food Agric.* 85, 2380–2384. doi:10.1002/jsfa.2263
- Frei, M., Siddhuraju, P., Becker, K., 2003. Studies on the in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. *Food Chemistry* 83, 395–402. doi:10.1016/S0308-8146(03)00101-8
- Goufo, P., Trindade, H., 2014. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols,  $\gamma$ -oryzanol, and phytic acid. *Food Sci Nutr* 2, 75–104. doi:10.1002/fsn3.86
- Gunaratne, A., Wu, K., Li, D., Bentota, A., Corke, H., Cai, Y.-Z., 2013. Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. *Food Chemistry* 138, 1153–1161. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.129
- Huang, X., Kurata, N., Wei, X., Wang, Z.-X., Wang, A., Zhao, Q., Zhao, Y., Liu, K., Lu, H., Li, W., Guo, Y., Lu, Y., Zhou, C., Fan, D., Weng, Q., Zhu, C., Huang, T., Zhang, L., Wang, Y., Feng, L., Furuumi, H., Kubo, T., Miyabayashi, T., Yuan, X., Xu, Q., Dong, G., Zhan, Q., Li, C., Fujiyama, A., Toyoda,

- A., Lu, T., Feng, Q., Qian, Q., Li, J., Han, B., 2012. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature* 490, 497–501. doi:10.1038/nature11532
- Jan A. Delcour, R. Carl Hosney, 2010. *Principles of Cereal Science and Technology*, Textbooks. AACC International, Inc.
- Jiang, S., Shi, C., Wu, J., 2009. Studies on mineral nutrition and safety of wild rice (*Oryza L.*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60, 139–147. doi:10.1080/09637480802498838
- Juliano, B.O., 2003. *Rice chemistry and quality*. Philippine Rice Research Institute, Muñoz, Philippines.
- Kim, G.R., Jung, E.S., Lee, S., Lim, S.-H., Ha, S.-H., Lee, C.H., 2014. Combined Mass Spectrometry-Based Metabolite Profiling of Different Pigmented Rice (*Oryza sativa L.*) Seeds and Correlation with Antioxidant Activities. *Molecules* 19, 15673–15686. doi:10.3390/molecules191015673
- Kitano, H., Futsuhara, Y., and Satoh, H. 1993. Morphological variation in rice cultivars. In: *Science of the Rice Plant* (Matsuo, T. and Hoshikawa, K., eds.). Vol. 1. Food and Agricultural Policy Research Center, Tokyo, Japan. pp. 79–88.
- Kitta, K., Ebihara, M., Iizuka, T., Yoshikawa, R., Isshiki, K., Kawamoto, S., 2005. Variations in lipid content and fatty acid composition of major non-glutinous rice cultivars in Japan. *Journal of Food Composition and Analysis, The International Year of Rice 2004* 18, 269–278. doi:10.1016/j.jfca.2004.10.001
- Min, B., Gu, L., McClung, A.M., Bergman, C.J., Chen, M.-H., 2012. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa L.*) of different bran colours. *Food Chemistry* 133, 715–722. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.079
- Nayar, N.M., 2014. *Origins & Phylogeny of Rices*. Elsevier.
- Oki, T., M. Masuda, M. Kobayashi, Y. Nishiba, S. Furuta, I. Suda and T. Sato, 2002. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *J. Agr. Food Chem.*, 50: 7524-7529.
- Riley, A.P., 2005. *Food Policy, Control, and Research*. Nova Publishers.
- Shewry, P.R., 2007. Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science, The Contribution of Cereals to a Healthy Diet* 46, 239–250. doi:10.1016/j.jcs.2007.06.006
- Vandeputte, G.E., Delcour, J.A., 2004. From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: a focus on rice starch. *Carbohydrate Polymers* 58, 245–266. doi:10.1016/j.carbpol.2004.06.003
- Wani, A.A., Singh, P., Shah, M.A., Schweiggert-Weisz, U., Gul, K., Wani, I.A., 2012. Rice Starch Diversity: Effects on Structural, Morphological, Thermal, and Physicochemical Properties—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11, 417–436. doi:10.1111/j.1541-4337.2012.00193.x
- Welch, R.M., Graham, R.D., 2004. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *J. Exp. Bot.* 55, 353–364. doi:10.1093/jxb/erh064
- Yawadio, R., Tanimori, S., Morita, N., 2007. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. *Food Chemistry* 101, 1616–1625. doi:10.1016/j.foodchem.2006.04.016

- Yoshida, H., Tomiyama, Y., Mizushima, Y., 2010. Lipid components, fatty acids and triacylglycerol molecular species of black and red rices. *Food Chemistry* 123, 210–215. doi:10.1016/j.foodchem.2010.04.010
- Yu, J., Vasanthan, T., Temelli, F., 2001. Analysis of Phenolic Acids in Barley by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4352–4358. doi:10.1021/jf0013407
- Yu, L.L., Tsao, R., Shahidi, F., 2012. *Cereals and Pulses: Nutraceutical Properties and Health Benefits.* John Wiley & Sons.
- Zawistowski, J., Kopec, A., Kitts, D.D., 2009. Effects of a black rice extract (*Oryza sativa* L. indica) on cholesterol levels and plasma lipid parameters in Wistar Kyoto rats. *Journal of Functional Foods* 1, 50–56. doi:10.1016/j.jff.2008.09.008

## 1.9 SITOGRAFIA

[www.eionet.europa.eu](http://www.eionet.europa.eu)

[www.entenazionalerisi.com](http://www.entenazionalerisi.com)

[www.fao.org](http://www.fao.org)

[www.faostat3.fao.org](http://www.faostat3.fao.org)

[www.riseria.ch](http://www.riseria.ch)

## Capitolo 2

# MOLECOLE BIOATTIVE: UNA PANORAMICA

---

Le molecole bioattive sono composti naturalmente presenti negli alimenti e che possono modulare uno o più processi metabolici promuovendo lo stato di benessere e salute dell'uomo. Lo studio di tali molecole occupa attualmente un posto di rilievo nella *Food Science* proprio per gli effetti salutistici che esercitano.

In questo capitolo sono considerate quattro classi di componenti bioattivi, quali carotenoidi, antocianine, composti fenolici e proantocianidine, naturalmente presenti nei cereali pigmentati.

Per ogni gruppo, sono descritte le caratteristiche strutturali, le proprietà chimico-fisiche, il ruolo funzionale e salutistico, la presenza nei cereali ed i fattori che ne influenzano la bioaccessibilità e la biodisponibilità. Inoltre, è presentato lo stato dell'arte sui metodi di analisi di tali molecole in matrici alimentari.

---

## 2 MOLECOLE BIOATTIVE: UNA PANORAMICA

### 2.1 CAROTENOIDI

#### 2.1.1 Struttura, stereochimica e nomenclatura

I carotenoidi sono una classe di composti la cui struttura presenta come caratteristica comune una catena lineare con un esteso sistema di doppi legami coniugati (Figura 2.1). Questa è costituita da otto unità isopreniche unite da legami “testa-coda”, eccetto al centro dove il legame del tipo “coda-coda” inverte l’ordine dando una molecola simmetrica in cui i due metili centrali hanno una relazione posizionale 1,6, mentre i restanti hanno una relazione posizionale 1,5 (Namitha e Negi, 2010).

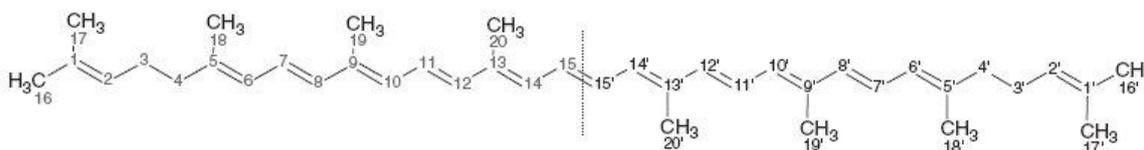


Figura 2.1: struttura base dei carotenoidi (Namitha e Negi, 2010)

Tale catena può subire modifiche come ciclizzazione di una o entrambe le estremità, idrogenazione, deidrogenazione, migrazione dei doppi legami e/o introduzione di atomi di ossigeno. Ne deriva una miriade di strutture diverse; in natura sono stati identificati più di 700 carotenoidi (Saini *et al.*, 2015). Negli alimenti ne sono stati individuati un centinaio (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2001). Generalmente un alimento possiede da uno a cinque carotenoidi principali ed una serie di carotenoidi minori presenti in piccole quantità o in tracce. Invece, il 95% dei carotenoidi presenti nel sangue umano è rappresentato da  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -criptoxantina, licopene, luteina e zeaxantina (Maiani *et al.*, 2009).

In base agli atomi che entrano nella struttura della molecola, i carotenoidi possono essere classificati in caroteni e xantofille. I primi sono costituiti solo da atomi di carbonio e idrogeno, mentre le seconde da atomi di carbonio, idrogeno e ossigeno. Quest’ultimo può essere presente come gruppi idrossi-, cheto- o eposs. Alcuni esempi di caroteni sono il licopene, l’ $\alpha$ -carotene ed il  $\beta$ -carotene. Esempi di xantofille sono la luteina, la zeaxantina e la  $\beta$ -criptoxantina (Figura 2.2).

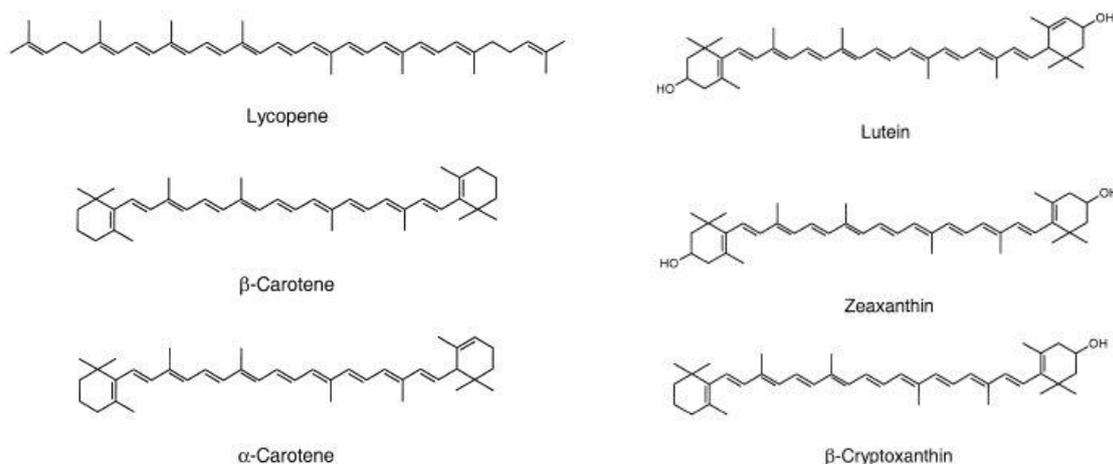


Figura 2.2: carotenoidi e xantofille (Fonte: Oliver e Palou, 2000)

Uno stesso carotenoide può esistere come stereoisomero geometrico, conformazionale e/o ottico. Affinché ci sia isomeria geometrica, in una molecola deve essere presente un doppio legame in cui ognuno dei due atomi di carbonio coinvolti nel doppio legame ha due sostituenti diversi tra loro. Se i sostituenti diversi sono dalla stessa parte rispetto al doppio legame l'isomero è definito *cis*, se sono da parti opposte è detto *trans* (Figura 2.3). Gli isomeri geometrici possono essere definiti anche come isomeri E/Z. L'isomero Z presenta i gruppi a priorità maggiore dalla stessa parte del doppio legame, mentre nell'isomero E i gruppi a priorità maggiore sono da parti opposte. Nel caso della catena polienica dei carotenoidi, ognuno dei doppi legami può teoricamente esistere nella configurazione *cis* o *trans*, tuttavia in natura sono state individuate principalmente le forme *trans* in quanto più stabili delle *cis* per il minor ingombro sterico che si crea tra i sostituenti. Nei carotenoidi generalmente la configurazione *cis* equivale alla Z e la *trans* alla E.



Figura 2.3: isomeri geometrici *cis/trans*

Per uno stesso carotenoide con una definita configurazione *cis/trans*, possono esistere più isomeri conformazionali. Infatti, la rotazione intorno ai legami semplici della catena polienica di un carotenoide in configurazione *cis* o *trans* fa sì che questo possa esistere come *s-cis* o *s-trans* (Figura 2.4). Poiché l'ingombro sterico è minore nella forma *s-trans*, i carotenoidi si trovano principalmente in questa conformazione. Fanno eccezione i carotenoidi con estremità cicliche. In questo caso,

infatti, la rotazione intorno al legame C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> dà luogo a due strutture: 6-*s-cis* e 6-*s-trans*. La prima risulta energeticamente favorita, in quanto una distorsione di 40° rispetto al piano della molecole consente di diminuire l'ingombro sterico tra il metile del C<sub>5</sub> sull'anello e l'idrogeno del C<sub>8</sub> della catena (Britton, 1995).



Figura 2.4: conformazioni *s-cis* e *s-trans*

La maggior parte dei carotenoidi contiene anche almeno un elemento stereogenico come un centro chirale o un asse chirale, pertanto esistono come isomeri ottici.

Occorre notare che la diversa struttura tridimensionale degli isomeri condiziona la loro possibilità di interagire con le strutture cellulari e quindi ne determina le funzioni biologiche. Come per altri composti, l'attività può essere specifica per un isomero piuttosto che per un altro.

La nomenclatura dei carotenoidi usata attualmente è stata approvata nel 1974 dalla IUPAC *Commission on Nomenclature of Organic Chemistry* e dalla IUPAC—IUB *Commission on Biochemical Nomenclature*. Secondo le regole redatte, ogni carotenoide deve essere indicato con il termine "carotene" che designa la struttura riportata in Figura 2.1, preceduto da due lettere greche che descrivono i due gruppi terminali sui C<sub>9</sub>. In Figura 2.5 sono riportate le strutture dei gruppi terminali e le relative lettere greche da anteporre al termine "carotene". Queste devono essere indicate in ordine alfabetico, separate dal termine "carotene" da un trattino e tra loro da una virgola.

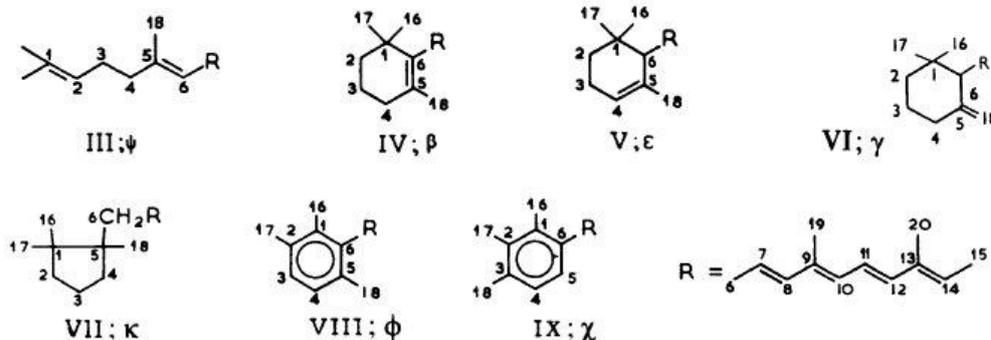


Figura 2.5: ciclizzazione estremità catena lineare (IUPAC Nomenclature Of Carotenoids, 1974)

Nel caso in cui un'estremità possa derivare da più gruppi terminali, si sceglie quello il cui nome viene prima in ordine alfabetico. Ad esempio l'estremità riportata in Figura 2.6 deriva dal gruppo β e non ε.

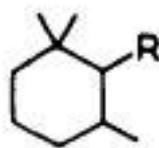


Figura 2.6: esempio di gruppo terminale dei carotenoidi

Le modifiche strutturali della catena base dei carotenoidi sono indicate dai prefissi riportati in Tabella 2.1.

Prefisso	Modifica
deidro-	Rimozione di idrogeni
nor-	Rimozione di gruppi CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> , o CH
seco-	Scissione di legami
retro-	Spostamento di tutti i legami semplici e doppi tra due carboni
apo-	Interruzione della catena di doppi legami

Tabella 2.1: prefissi che indicano modifiche strutturali della catena base dei carotenoidi

Oltre alla nomenclatura IUPAC sono ancora utilizzati nomi comuni attribuiti ai carotenoidi in base alla fonte da cui sono stati isolati. Il  $\beta$ -carotene è, ad esempio, il nome comune del  $\beta,\beta$ -carotene, il licopene del  $\Psi,\Psi$ -carotene.

### 2.1.2 Proprietà chimico-fisiche

La geometria della molecola è essenziale per assicurare che i carotenoidi agiscano efficacemente a livello cellulare e subcellulare (Britton, 1995). Le molecole acicliche come il licopene sono lunghe e lineari, mentre la ciclizzazione determina un accorciamento della molecola ed un aumento sia dell'ingombro sterico delle estremità che dello spazio occupato.

La forma e la grandezza variano anche a seconda della configurazione che i carotenoidi assumono. Gli isomeri *trans* sono molecole lineari e rigide, mentre gli isomeri *cis* sono ripiegati. Ciò influenza la loro capacità di formare strutture sovramolecolari e di interagire con gli enzimi (Rodriguez-Amaya, 2015).

#### 2.1.2.1 Solubilità

I carotenoidi sono molecole estremamente idrofobiche e per questo scarsamente o per nulla solubili in acqua, ma solubili in solventi organici come acetone, alcol, etere etilico, cloroformio ed acetato di etile.

La solubilità nei solventi organici varia da molecola a molecola a seconda dei sostituenti presenti. I caroteni sono solubili in etere di petrolio, esano e toluene, mentre le xantofille dissolvono più facilmente in metanolo ed etanolo.

Il  $\beta$ -carotene e la luteina hanno un'eccellente solubilità anche nel tetraidrofurano (Craft e Soares, 1992).

Per il loro carattere idrofobico nelle cellule i carotenoidi si trovano generalmente nelle membrane citoplasmatiche, tuttavia l'associazione con complessi proteici consente loro di accedere ad ambienti acquosi (Britton, 1995).

#### 2.1.2.2 Assorbimento dell'energia luminosa e colore

La peculiarità dei carotenoidi è l'esteso sistema di doppi legami coniugati che conferisce a queste molecole specifiche proprietà e funzioni.

Tale sistema è caratterizzato da un'estesa delocalizzazione su tutta la catena. L'assorbimento della radiazione luminosa provoca transizioni  $\pi \rightarrow \pi^*$  in cui uno degli elettroni del doppio legame coniugato passa dall'orbitale di legame  $\pi$  a quello di non legame  $\pi^*$ . Poiché gli elettroni  $\pi$  sono altamente delocalizzati e lo stato eccitato ha un'energia relativamente bassa, la quantità di energia necessaria a tale transizione è relativamente piccola e corrisponde alla luce nella regione del visibile, nel range 400-500 nm. È per questo motivo che i carotenoidi forniscono un'intensa colorazione giallo, arancio e rosso. Pertanto il sistema di doppi legami coniugati rappresenta il cromoforo che conferisce ai carotenoidi il loro caratteristico colore e fornisce uno spettro visibile usato per l'identificazione e la quantificazione di tali molecole.

Occorre sottolineare che affinché il colore sia percettibile sono necessari sette doppi legami coniugati, mentre il fitoene (tre legami coniugati) ed il fitofluene (cinque legami coniugati) sono incolori (Rodriguez-Amaya, 2015). A parità di numero di doppi legami coniugati, carotenoidi con struttura diversa possono dare colori diversi. Ad esempio, il  $\gamma$ -carotene (monociclico) ed il  $\beta$ -carotene (biciclico), pur avendo lo stesso numero di doppi legami del licopene (11 doppi legami), sono rispettivamente rosso-arancio e giallo-arancio invece che rossi. La ciclizzazione, infatti, porta gli elettroni  $\pi$  dell'anello al di fuori del piano su cui giace la catena a causa dell'ingombro sterico tra i metili del  $C_5$  dell'anello e gli idrogeni del  $C_8$  della catena lineare.

Al contrario la presenza di un numero diverso di gruppi  $-OH$  non influenza il cromoforo, quindi l' $\alpha$ -carotene ed il suo diidrossiderivato luteina, hanno entrambe un colore giallo.

#### 2.1.3 Proprietà antiossidanti

Si definisce antiossidante una molecola che, anche in piccole concentrazioni, è in grado di ritardare o prevenire l'ossidazione di un substrato. I carotenoidi hanno proprietà antiossidanti importanti sia

per il mantenimento delle qualità dell'alimento in cui sono contenuti che per l'uomo. Tali molecole, infatti, sono in grado di promuovere la stabilità di un alimento e di migliorarne la conservabilità. Nell'uomo, invece, intervengono nella modulazione di funzioni fisiologiche riducendo il rischio di insorgenza di malattie cronico-degenerative.

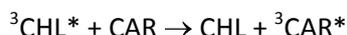
L'azione antiossidante dei carotenoidi si esplica per mezzo di due meccanismi diversi: *quenching* dell'ossigeno singoletto e *scavenging* di radicali liberi.

### 2.1.3.1 *Quenching dell'ossigeno singoletto*

I fotosensibilizzatori come le clorofille, la riboflavina e la mioglobina possono assorbire energia dalla radiazione luminosa e passare allo stato eccitato (stato di tripletto). L'energia assorbita può essere trasferita all'ossigeno atmosferico che si trova allo stato di tripletto ( $^3\text{O}_2$ ) determinando la formazione dell'ossigeno singoletto ( $^1\text{O}_2$ ), specie altamente reattiva.

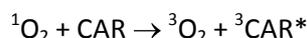
I carotenoidi possono interferire con questo processo sia deattivando i fotosensibilizzatori allo stato di tripletto, in modo da prevenire la formazione dell'ossigeno singoletto, che convertendo l'ossigeno singoletto in ossigeno tripletto.

Nel primo caso i carotenoidi si comportano da *quencher* dei fotosensibilizzatori allo stato di tripletto ( $^3\text{CHL}^*$ ) assorbendo energia e passando allo stato di tripletto ( $^3\text{CAR}^*$ ), come indicato nella seguente reazione:



In questo modo prevenendo la formazione dell'ossigeno singoletto.

Alternativamente, i carotenoidi si comportano da *quencher* dell'ossigeno singoletto. In particolare, l'energia è trasferita dall'ossigeno singoletto ( $^1\text{O}_2$ ) al carotenoide (CAR). Quindi l'ossigeno singoletto torna allo stato fondamentale di tripletto ( $^3\text{O}_2$ ), mentre il carotenoide passa allo stato eccitato ( $^3\text{CAR}^*$ ) come indicato di seguito:



Il carotenoide allo stato eccitato dissipa l'energia sotto forma di interazioni rotazionali e vibrazionali tra il carotenoide ed il solvente, pertanto torna allo stato fondamentale producendo energia termica. Il carotenoide, rigenerato attraverso questo meccanismo di dissipazione dell'energia, può così ricominciare un nuovo ciclo di disattivazione dell'ossigeno singoletto. È assodato che i carotenoidi possono estinguere circa 1000 molecole di  $^1\text{O}_2$ , prima di incorrere in reazioni di degradazione.

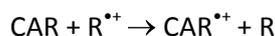
La capacità di *quenching* varia da carotenoide a carotenoide ed è influenzata dalla loro struttura chimica. In particolare aumenta all'aumentare del numero di doppi legami coniugati ed è massima nei carotenoidi con nove o più doppi legami (Rodriguez-Amaya, 2015).

### 2.1.3.2 Scavenging di radicali liberi

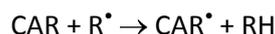
Nei sistemi biologici possono formarsi diversi tipi di radicali in grado di causare seri danni alle molecole biologiche. Alcuni esempi sono l'anione radicale superossido  $O_2^{\bullet-}$ , il radicale idrossilico  $\bullet OH$ , i perossiradicali  $ROO^{\bullet}$  e il radicale dell'ossido nitrico  $NO^{\bullet}$ .

I carotenoidi possono comportarsi da *scavenger* di radicali liberi con tre meccanismi diversi (Skibsted, 2012) che causano l'interruzione della propagazione della catena delle reazioni radicaliche.

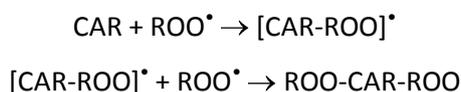
Uno dei meccanismi d'azione prevede il trasferimento di elettroni tra carotenoide e radicale. In particolare, la specie radicalica ( $R^{\bullet+}$ ) strappa un elettrone al carotenoide (CAR) formando il catione radicale del carotenoide ( $CAR^{\bullet+}$ ) come indicato di seguito:



Un altro meccanismo prevede il trasferimento di un protone dal carotenoide (CAR) alla specie radicalica ( $R^{\bullet}$ ) la quale in seguito alla reazione diventa neutra e stabilizzata per risonanza:



I carotenoidi possono, infine, neutralizzare i radicali liberi attraverso una reazione di addizione. I perossi- e gli idrossi-radicali, ad esempio, si aggiungono alla catena polienica dei carotenoidi formando un addotto ( $[CAR-ROO]^{\bullet}$ ) che può reagire con un altro perossiradicale terminando la catena della reazione radicalica:



I meccanismi di reazione tra carotenoidi e radicali liberi dipendono dalla natura e dall'ambiente in cui si trova (acquoso o lipidico) il radicale e in misura minore dalla struttura del carotenoide.

## 2.1.4 Ruolo funzionale ed effetti sulla salute

### 2.1.4.1 Fotosintesi

I carotenoidi prendono parte alla fotosintesi coadiuvando la clorofilla nella captazione della luce. Questi, infatti, sono componenti essenziali dell'apparato fotosintetico delle piante in grado di assorbire le lunghezze d'onda che non possono essere captate dalla clorofilla. L'energia assorbita determina il passaggio dei carotenoidi allo stato eccitato e viene poi trasferita alla clorofilla.

I cloroplasti e tutti i tessuti verdi delle piante superiori contengono gli stessi carotenoidi nella stessa percentuale: 20-25% di  $\beta$ -carotene, 40-45% di luteina, 10-15% di violaxantina e 10-15% di neoxantina.

## 2.1.4.2 Attività di provitamina A

I carotenoidi aventi come gruppo terminale l'anello  $\beta$ -iononico, privi di gruppi funzionali ossigenati e con una catena polienica di almeno 11 carboni, sono precursori della vitamina A (attività provitaminica). Questi sono solo il 10% dei carotenoidi noti ed i più rappresentativi sono il  $\beta$ -carotene e la  $\beta$ -criptoxantina (Fernandes *et al.*, 2014). Il primo è considerato la provitamina A per eccellenza, in quanto viene metabolizzato in due molecole di Vitamina A. La conversione del  $\beta$ -carotene in vitamina A nei mammiferi può avvenire secondo due diversi cammini metabolici (Britton *et al.*, 2009): 1) la rottura centrale del carotenoide per azione dell'enzima  $\beta$ -carotene 15,15'-ossigenasi porta alla formazione di due molecole di retinale trasformate poi in retinolo ed acido retinoico; 2) per azione dell'enzima  $\beta$ -carotene 9,10-ossigenasi si forma come intermedio di reazione la molecola 10'-apo- $\beta$ -caroten-10'-ale da cui si ottiene una molecola di retinale (e quindi di retinolo) ed una di acido retinoico (Figura 2.7).

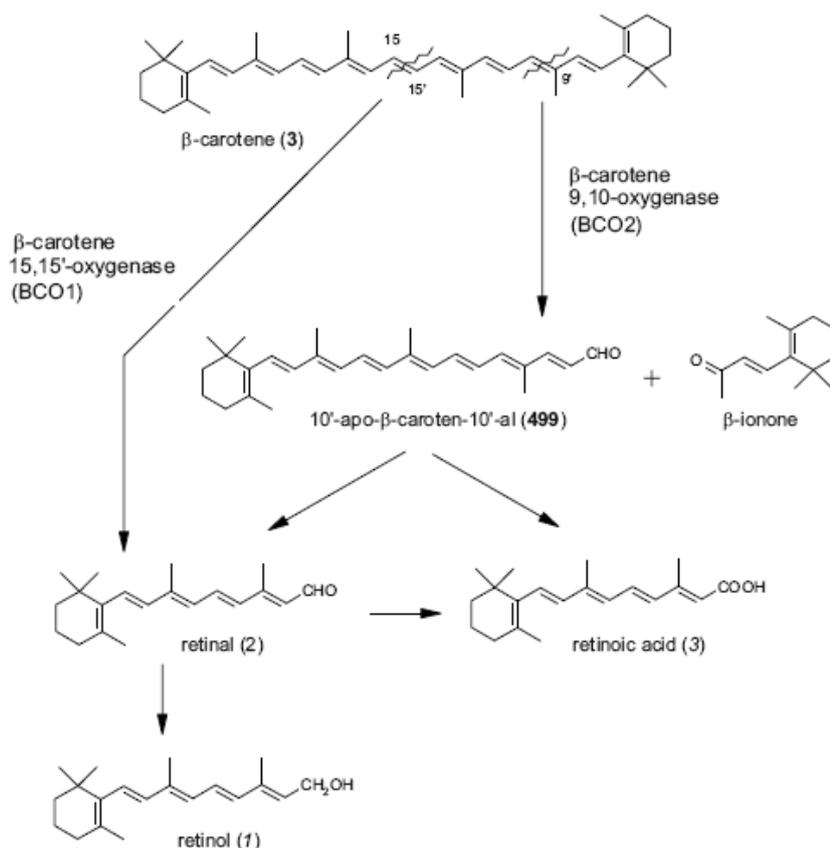


Figura 2.7: scissione del  $\beta$ -carotene in vitamina A (Britton *et al.*, 2009)

Carenze di tale vitamina determinano alterazioni della vista come cecità notturna e xeroftalmia, disfunzioni della risposta immunitaria con conseguente aumento dell'incidenza o della severità di

infezioni respiratorie e gastrointestinali, degenerazione degli organi riproduttivi, deformazione delle ossa e inibizione della crescita.

Poiché i livelli di vitamina A sono minori di quelli raccomandati, la produzione di alimenti ricchi di  $\beta$ -carotene, come il Golden rice, potrebbe aiutare a ridurre gli stati di carenza di vitamina A (West *et al.*, 2002).

#### 2.1.4.3 Protezione da malattie cronico-degenerative

##### 2.1.4.3.1 Protezione dal cancro

Studi epidemiologici e d'intervento hanno evidenziato che i carotenoidi hanno un'azione antitumorale (Rodriguez-Amaya, 2015). Questi sono associati all'inibizione di diversi tipi di cancro come quello della cervice, del polmone, della prostata, del colon e del retto, dello stomaco, del pancreas e dell'esofago. Uno dei possibili meccanismi responsabili dell'azione di tali molecole nei confronti di questa malattia è la stimolazione della comunicazione a livello delle giunzioni gap (dette anche "comunicanti") la cui alterazione determina una proliferazione cellulare incontrollata (Davies, 2009). La stimolazione indotta dai carotenoidi consiste nel promuovere l'espressione della connessina 43, una subunità proteica presente nelle membrane cellulari, che favorisce la comunicazione tra una cellula e l'altra.

Rao e Rao (2007) hanno dimostrato che l'assunzione di pomodoro, ricco in licopene, è stato associato ad una diminuzione del rischio di malattie croniche come il cancro. L'assunzione di luteina e zeaxantina è stata associata ad un ridotto rischio di cancro alla prostata (Cohen *et al.*, 2000).

##### 2.1.4.3.2 Protezione da malattie cardiovascolari

Le malattie cardiovascolari come l'infarto del miocardio o gli episodi ischemici sono associati alla presenza di placche aterosclerotiche sulla parete delle arterie che determinano il restringimento del lume vasale. Alti livelli di colesterolo e l'ossidazione delle LDL (lipoproteine a bassa densità) sono eventi connessi all'insorgere di aterosclerosi.

In un recente lavoro (Voutilainen *et al.*, 2006), è stato discusso il ruolo di licopene,  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -criptoxantina, luteina e zeaxantina nella prevenzione delle malattie cardiovascolari. Osganian *et al.* (2003) hanno osservato una relazione inversa tra l'assunzione di  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotene e rischio di cardiopatia coronarica, mentre luteina, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina e licopene non avevano alcun effetto. Calvo (2005) ha dimostrato, invece, che la luteina riduce l'ossidazione delle LDL, prevenendo la formazione di placche aterosclerotiche.

#### 2.1.4.3.3 Protezione da cataratta e degenerazione maculare

Studi epidemiologici hanno dimostrato un'associazione inversa tra i livelli di luteina e zeaxantina presenti nei tessuti dell'occhio e malattie degenerative dell'occhio associate all'età come la degenerazione maculare senile e la cataratta (Koushan *et al.*, 2013).

La degenerazione maculare senile è una patologia caratterizzata da una progressiva degradazione dei fotorecettori della macula a causa di danni ossidativi (Calvo, 2005) che si manifesta come una graduale e irreversibile perdita della capacità visiva, ad iniziare da quella notturna.

La cataratta è causata dalla precipitazione nel cristallino di proteine ossidate in seguito a foto-induzione. Alves-Rodrigues e Shao (2004) hanno evidenziato che l'azione protettiva della luteina è dovuta sia alla sua capacità di assorbire la luce blu, proteggendo le cellule sensibili dei tessuti oculari esposti, che all'azione di *quencher* e *scavenger* dei radicali liberi dell'ossigeno prodotti nella retina per fotoeccitazione.

### 2.1.5 Carotenoidi nei cereali

Le quantità di carotenoidi presenti nei cereali sono relativamente piccole se confrontate alla maggior parte di frutta e verdura. Tuttavia, il consumo quotidiano di alimenti a base di cereali fa sì che questi contribuiscano significativamente all'assunzione di carotenoidi (Mellado-Ortega e Hornero-Méndez, 2015). Va sottolineato, inoltre, che rispetto alla frutta e la verdura, i cereali e gli alimenti a base di cereali hanno una conservabilità maggiore e per questo possono diventare un'importante fonte di carotenoidi.

Generalmente i carotenoidi più abbondanti nei cereali sono le xantofille, prima tra tutte la luteina seguita da zeaxantina e  $\beta$ -criptoxantina. I caroteni ( $\alpha$ -carotene e  $\beta$ -carotene) (Figura 2.8) sono, invece, presenti in quantità minore delle xantofille.

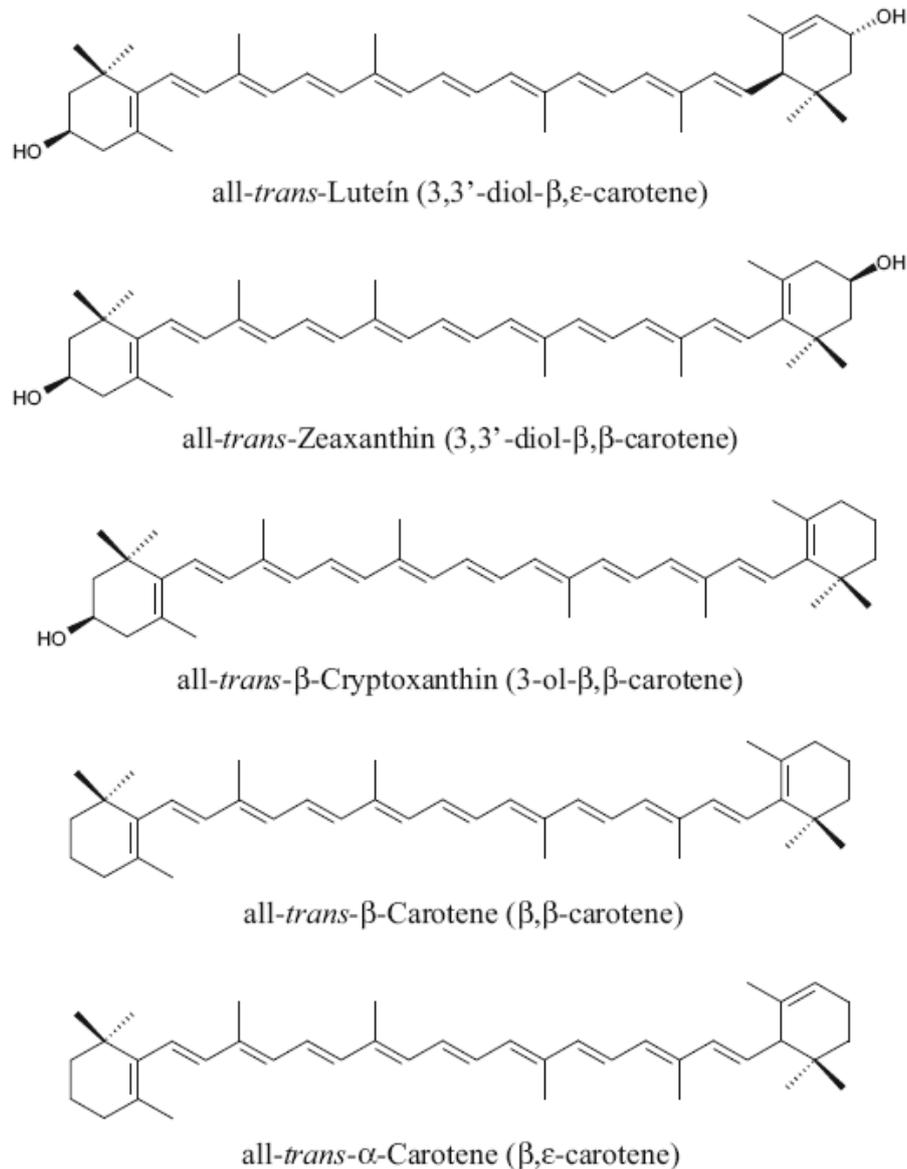


Figura 2.8: principali carotenoidi presenti nei cereali (Mellado-Ortega e Hornero-Méndez, 2015)

Come altri componenti bioattivi, nei cereali i carotenoidi sono concentrati nel germe e nella crusca. Le variazioni del loro contenuto dipendono, come per gli altri fitochimici, da fattori intrinseci quali il tipo di cereale, la *cultivar*, le condizioni di coltivazione e lo stato di sviluppo alla raccolta, nonché da fattori post-raccolta come le condizioni di conservazione delle granelle e/o degli sfarinati e i trattamenti per la preparazione di prodotti appetibili (Liu, 2007; Hidalgo e Brandolini, 2008; Van Hung e Hatcher, 2011).

Per quanto riguarda la variabilità intrinseca al tipo di cereale, è stato osservato che il mais giallo presenta la più alta concentrazione di carotenoidi rispetto agli altri cereali. In particolare contiene zeaxantina e piccole quantità di  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -carotene e  $\beta$ -carotene (Moros *et al.*, 2002). Per quanto riguarda il frumento, il *Triticum monococcum* è la varietà a più alto contenuto in carotenoidi,

circa 2-4 volte maggiore di altre varietà di frumento. Tra le varietà di frumento duro, i frumenti tetraploidi hanno 5-6  $\mu\text{g/g}$  di carotenoidi (Mellado-Ortega e Hornero-Méndez, 2015).

Nel riso (*Oryza sativa* L.) i carotenoidi sono concentrati quasi esclusivamente nella crusca che viene rimossa con la sbramatura (Tan *et al.*, 2005), pertanto questo cereale consumato principalmente come riso bianco, non apporta carotenoidi. L'introduzione e l'espressione di tre geni eterologhi – *psy* (phytoene synthase) e *lcy-b* (lycopene  $\beta$ -ciclastasi) dal narciso (*Narcissus pseudonarcissus*), e *crt 1* (carotene desaturase) da *E.uredovora* – hanno consentito nel 2001 a Ingo Potrykus e Peter Beyer di introdurre nell'alimentazione umana il "Golden rice" o "riso dorato" così definito per la sua intensa colorazione gialla dovuta alla presenza di luteina, zeaxantina,  $\alpha$ -carotene e  $\beta$ -carotene. L'introduzione dei suddetti geni ha portato all'espressione di enzimi necessari per la biosintesi dei carotenoidi. Nel 2005 Paine ha introdotto il Golden rice di II generazione in cui è stato usato il gene PSY del mais per aumentare ulteriormente il contenuto in  $\beta$ -carotene.

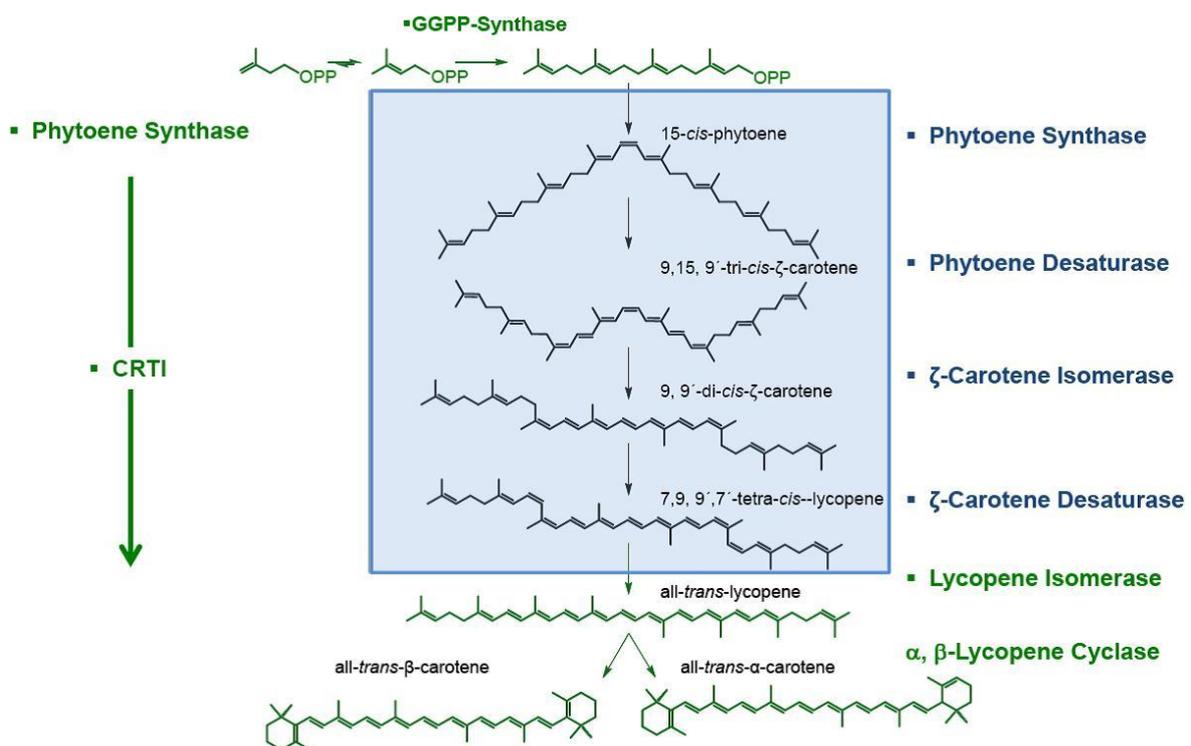


Figura 2.9: pathway della produzione di  $\beta$ -carotene nel golden rice a partire da due molecole di geranilgeranildifosfato (Fonte: <http://www.goldenrice.org>)

In Tabella 2.2 è elencato il contenuto in carotenoidi di alcuni cereali.

Name	Botanical name	Zea-				Neo-xanthin	Viola-xanthin	Total carotenoid
		Lutein	xanthin	$\alpha$ -Carotene	$\beta$ -Carotene			
<b>Cereals</b>								
Pearl millet	<i>Pennisetum typhoideum</i>	93.0	0.4	ND	7.6	0.001	0.002	101.0
Barley	<i>Hordeum vulgare</i>	21.7	ND	11.5	ND	ND	0.012	33.2
Flaxseed	<i>Linum usitatissimum</i>	185.1	0.5	ND	ND	0.011	0.010	185.6
Foxtail	<i>Setaria italica</i>	100.5	0.2	ND	2.8	0.002	0.001	103.5
Sorghum	<i>Sorghum vulgare</i>	28.1	ND	ND	ND	ND	ND	28.1
Maize	<i>Zea mays</i>	78.8	0.1	4.0	10.5	0.001	ND	93.4
Finger millet	<i>Eleusine coracana</i>	87.5	0.2	4.8	3.2	0.001	0.003	95.7
Rice (polished)	<i>Oryza sativa</i>	28.7	0.5	ND	ND	ND	0.004	29.2
Rice, (red parboiled polished)	<i>Oryza sativa</i>	7.8	ND	ND	ND	ND	ND	7.8
Rice, (red parboiled unpolished)	<i>Oryza sativa</i>	22.4	0.2	ND	67.6	ND	ND	90.2
Wheat (Punjab)	<i>Triticum aestivum</i>	77.3	0.2	ND	6.3	0.001	0.004	83.8
Wheat (soft)	<i>Triticum aestivum</i>	72.5	0.3	ND	12.7	0.001	0.003	85.5

Tabella 2.2: contenuto di carotenoidi (in  $\mu\text{g}/100\text{g}$  s.s.) e in alcuni dei principali cereali (Mamatha *et al.*, 2011)

Per uno stesso cereale la distribuzione dei carotenoidi varia anche all'interno del chicco. Zeaxantina,  $\alpha$ -carotene e  $\beta$ -carotene sono concentrati essenzialmente nel germe e nella crusca, mentre la luteina è distribuita in modo più omogeneo (Panfili *et al.*, 2004; Borrelli *et al.*, 2008; Ndolo e Beta, 2013).

### 2.1.6 Bioaccessibilità e biodisponibilità

Per biodisponibilità di un nutriente si intende l'efficienza con cui un componente alimentare può essere usato a livello sistemico attraverso i normali sistemi metabolici (Aggett, 2010). Alternativamente, Jackson (1997) ha definito la biodisponibilità come la frazione o percentuale di nutriente assunto con la dieta che può essere usata per le funzioni fisiologiche dell'organismo o accumulata.

La biodisponibilità dei carotenoidi è influenzata da fattori chimico-alimentari come il tipo di carotenoide, i legami molecolari, la quantità assunta in un pasto, la matrice nella quale il carotenoide è incluso e la co-assunzione di altri alimenti. Anche altri elementi come lo stato nutrizionale dell'individuo, i fattori genetici e le interazioni possono influenzare la biodisponibilità (Namitha e Negi, 2010).

West e Castenmiller (1998) hanno suggerito l'acronimo "SLAMENGI" per riassumere e ricordare tutti i fattori che determinano la biodisponibilità dei carotenoidi. Di seguito sono elencati tali fattori.

<b>S</b>	<b>Species of carotenoids</b>	Tipo di carotenoide
<b>L</b>	<b>Linkages at molecular level</b>	Legami a livello molecolare
<b>A</b>	<b>Amount of carotenoid</b>	Quantità di carotenoide
<b>M</b>	<b>Matrix</b>	Matrice
<b>E</b>	<b>Effectors</b>	Effettori
<b>N</b>	<b>Nutrient status</b>	Stato nutrizionale dell'individuo
<b>G</b>	<b>Genetics</b>	Aspetti genetici
<b>H</b>	<b>Host-related factors</b>	Fattori propri dell'individuo
<b>I</b>	<b>Interactions among these variables</b>	Interazioni tra le variabili descritte

Tuttavia, il principale fattore limitante la biodisponibilità di un nutriente è il suo rilascio dalla matrice alimentare (Palafox-Carlos *et al.*, 2011). La biodisponibilità è pertanto strettamente connessa alla bioaccessibilità, definita come frazione o percentuale di nutriente ingerito che viene rilasciato dalla matrice alimentare durante la digestione.

Il rilascio dei carotenoidi dalla matrice alimentare dipende dalla degradazione della matrice stessa. La sua riduzione in piccole particelle, che avviene con la masticazione, consente di aumentare l'area superficiale in grado di venire in contatto con le lipasi pancreatiche ed i sali biliari, aumentando così la bioaccessibilità dei carotenoidi. È stato osservato, ad esempio, che la biodisponibilità del  $\beta$ -carotene è maggiore negli spinaci tagliati a pezzi che nelle foglie intere (Castenmiller *et al.*, 1999).

Anche i processi termici possono influenzare la bioaccessibilità e quindi la biodisponibilità dei carotenoidi. Ad esempio, la biodisponibilità del licopene nel pomodoro cotto è il doppio di quella nel pomodoro crudo (Namitha e Negi, 2010). Ciò è stato spiegato dall'isomerizzazione della forma *trans* in forma *cis* indotta dal calore (Unlu *et al.*, 2007).

Per la loro liposolubilità, i carotenoidi vengono assorbiti nell'intestino tenue in seguito all'incorporazione in micelle, costituite da colesterolo, acidi grassi, fosfolipidi e sali biliari. Queste sono caratterizzate da un cuore idrofobico dove si localizzano i caroteni e da un anello idrofilo dove si localizzano le xantofille (Figura 2.10).

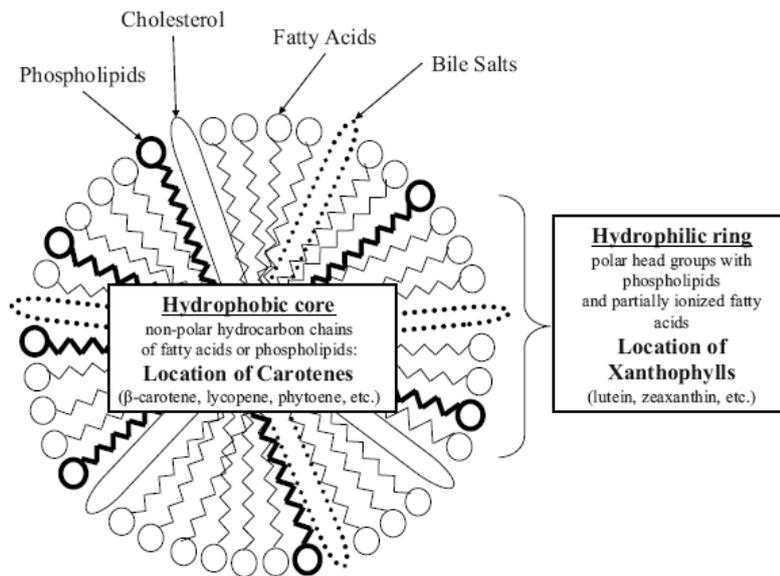


Figura 2.10: carotenoidi inglobati nelle micelle (Britton *et al.*, 2009)

Le micelle vengono quindi assorbite dai microvilli intestinali ed entrano nelle cellule della mucosa intestinale (enterociti). Quindi, entrano nel circolo linfatico e sanguigno (Figura 2.11).

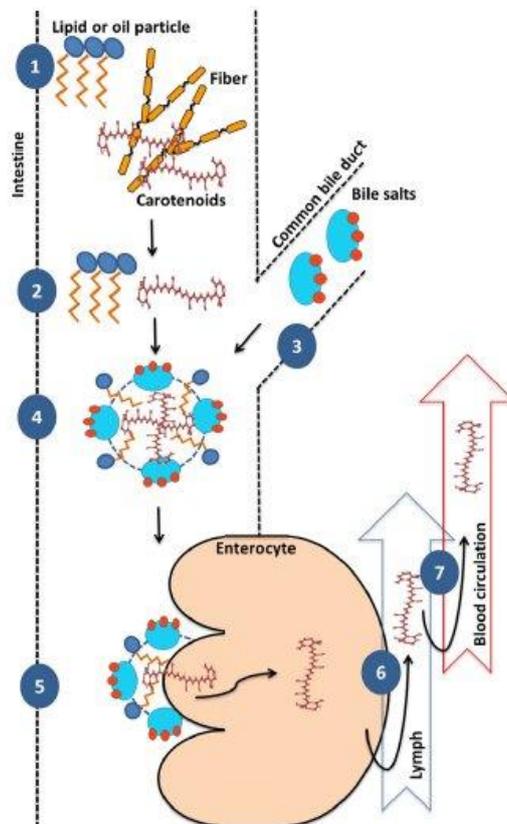


Figura 2.11: processo di assorbimento dei carotenoidi dalla matrice alimentare. 1,2 – rottura della matrice, 3 – rilascio dei Sali biliari dal dotto biliare, 4 – inglobamento dei carotenoidi nelle micelle, 5 – assorbimento della micella da parte dell’enterocita, 6 – rilascio del carotenoide nel circolo sanguigno (Saini *et al.*, 2015)

Pertanto i fattori che influenzano la formazione di micelle, condizionano l'assorbimento dei carotenoidi e quindi la loro biodisponibilità. Secondo Lemmens *et al.* (2014), la co-assunzione di grassi migliora la biodisponibilità dei carotenoidi in quanto i lipidi sono necessari per la formazione delle micelle e stimolano il rilascio di bile. Inoltre, l'aggiunta di acidi grassi a catena lunga come l'acido oleico promuove l'assorbimento dei carotenoidi più di quanto non facciano gli acidi grassi a catena corta (Colle *et al.*, 2013). Elementi come fibra alimentare e pectine che inibiscono la formazione delle micelle, al contrario, diminuiscono la biodisponibilità dei carotenoidi.

Degli oltre 700 carotenoidi individuati in natura, solo 40 sono digeriti, assorbiti e metabolizzati dal nostro organismo. Di questi solo 6 sono generalmente individuati nel plasma umano:  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, licopene,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina e luteina (Maiani *et al.*, 2009).

### 2.1.7 Analisi dei carotenoidi negli alimenti

L'analisi dei carotenoidi si compone generalmente delle seguenti fasi:

1. Preparazione del campione;
2. Estrazione;
3. Idrolisi alcalina e lavaggio;
4. Concentrazione o evaporazione del solvente;
5. Separazione cromatografica;
6. Identificazione e quantificazione.

#### 2.1.7.1 Preparazione del campione

I campioni raccolti durante un campionamento e condotti in laboratorio sono generalmente inadatti ad essere analizzati direttamente. Questi devono essere, infatti, trasformati in campioni più piccoli e omogenei, ma comunque rappresentativi.

L'omogeneizzazione ed il *sub-sampling* possono essere fatti contemporaneamente o sequenzialmente. Il *sub-sampling* viene generalmente effettuato con la quartatura, mentre l'omogeneizzazione prevede la riduzione del campione in particelle piccole e di dimensioni omogenee usando omogeneizzatori o mortaio e pestello. È preferibile effettuare la omogeneizzazione immediatamente prima o contemporaneamente all'estrazione per evitare l'azione di enzimi degradativi.

#### 2.1.7.2 Estrazione

L'estrazione dei carotenoidi da matrici alimentari solide quali il riso viene effettuata mediante estrazione solido-liquido.

Il solvente usato per l'estrazione deve essere scelto in base alla polarità dei pigmenti presumibilmente presenti nella matrice. I carotenoidi apolari (caroteni) o in forma esterificata sono generalmente estratti con esano. I carotenoidi polari come le xantofille sono, invece, estratti con etanolo o metanolo. I solventi apolari, invece, promuovono la cristallizzazione (Wrolstad, 2011). Nei casi in cui la polarità dei carotenoidi da estrarre non è nota si usano miscele acetone:esano (1:1 v/v). Nei campioni contenenti carotenoidi con polarità diversa è opportuno utilizzare una miscela di solventi apolari come l'esano e di solventi polari (o moderatamente polari) come l'etilacetato in quanto questa consente di co-solubilizzare entrambe le classi. Le xantofille, ad esempio, sono molto solubili in solventi polari come metanolo, etilacetato e acetone. Al contrario, il  $\beta$ -carotene è altamente solubile in esano, in etere etilico e in tetraidrofurano (THF) (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2001; Craft e Soares, 1992). Uno dei fattori che condiziona l'estrazione dei carotenoidi è il contenuto di acqua presente nel campione che deve essere preferibilmente inferiore al 10%.

L'estrazione dei carotenoidi può essere promossa da enzimi che digeriscono i tessuti vegetali o da ultrasuoni.

#### 2.1.7.3 Saponificazione

L'idrolisi alcalina è comunemente utilizzata quando si vogliono determinare i carotenoidi in matrici complesse o contenenti materiale lipidico (Fратиanni *et al.*, 2015). Questa è generalmente condotta con KOH e consente di semplificare la separazione rimuovendo sostanze come le clorofilla, lipidi o altri interferenti, di migliorare il recupero e di idrolizzare gli esteri dei carotenoidi (Rodriguez-Bernando e Costa, 2006). L'idrolisi alcalina dovrebbe essere usata anche nel caso in cui i carotenoidi sono presenti in forma legata alla matrice e l'applicazione di una sola estrazione non è sufficiente a determinare la precisa concentrazione dei carotenoidi (Fратиanni *et al.*, 2015).

Tuttavia, le xantofille possono essere degradate dall'idrolisi alcalina ed è pertanto necessario aggiungere antiossidanti, limitare l'esposizione all'aria e all'ossigeno e raffreddare rapidamente la soluzione dopo l'idrolisi stessa (Fратиanni *et al.*, 2015).

#### 2.1.7.4 Concentrazione

La concentrazione degli estratti è effettuata mediante evaporazione sotto vuoto a temperature inferiori a 40°C. Questa fase presenta criticità descritte più avanti.

#### 2.1.7.5 Separazione cromatografica

La separazione dei carotenoidi presenti in un estratto è generalmente effettuata mediante cromatografia su colonna secondo il metodo ufficiale AOAC (1990). L'isolamento delle molecole si basa sull'uso di solventi a diversa polarità. Nella procedura analitica standard il primo eluente è non

polare, solitamente esano o una miscela esano:acetone 90:10, che eluiscono i caroteni e le xantofille esterificate. Quindi si usa una miscela esano:acetone 80:20 per eluire i carotenoidi mediamente polari e una 60:40 per eluire quelli molto polari.

#### 2.1.7.6 Identificazione e quantificazione: determinazione mediante spettrofotometria UV/VIS

Il cromoforo dei carotenoidi è costituito dall'esteso sistema di doppi legami coniugati che determina l'assorbimento di tali molecole nella regione del visibile compresa tra 400-500 nm. Solo alcuni carotenoidi come ad esempio il fitoene (3 doppi legami coniugati) e il fitofluene (5 doppi legami coniugati) hanno massimi di assorbimento nella regione dell'UV. La maggior parte di tali pigmenti presenta tre massimi di assorbimento. Le lunghezze d'onda a cui avviene l'assorbimento aumentano proporzionalmente al numero di doppi legami coniugati e a parità di doppi legami variano in presenza di anelli e di funzioni ossigenate.

Inoltre la lunghezza d'onda massima di assorbimento dipende dal solvente di dissoluzione: risulta pressoché uguale in alcuni solventi (etere di petrolio, esano, dietilere, acetonitrile), ma può differire in altri (Britton, 1995) (Tabella 2.3).

	Licopene	Luteina	Zeaxantina	B-carotene	$\alpha$ -carotene	B-criptoxantina
Cloroformio	458 484 518	435 458 485	(433) 462 493	(435) 461 485	433 457 484	(435) 459 485
Etanolo	446 472 503	422 445 474	(428) 450 478	(425) 450 478	423 444 473	(428) 450 478
Etere petrolio	444 470 502	421 44 474	(424) 449 476	(425) 450 477	422 445 473	(425) 449 476

Tabella 2.3: lunghezze d'onda massime di assorbimento (nm) per i più comuni carotenoidi. Le lunghezze d'onda tra parentesi sono spalle (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2001)

Carotenoidi con lo stesso cromoforo hanno lo stesso spettro UV/VIS, ne sono un esempio il  $\beta$ -carotene ed il suo derivato idrossilato zeaxantina. Le differenze spettrali tra carotenoidi diversi sono comunque piccole, ma importanti per la loro identificazione. Lo spettro UV/VIS, in particolare la sua forma, fornisce informazioni sulla purezza del carotenoide isolato o dello standard utilizzato. La struttura fine di un carotenoide è misurata dal rapporto (%III/II) tra l'assorbanza alla lunghezza d'onda maggiore (III) e quella della banda centrale (II) (Figura 2.12)

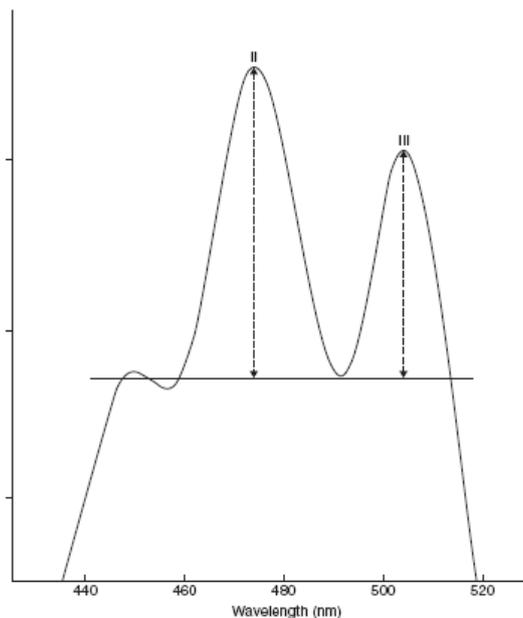


Figura 2.12: calcolo di %III/II dalla struttura fine dello spettro (Wrolstad, 2011)

Inoltre, lo spettro UV/VIS consente di differenziare gli isomeri *cis* e *trans* di uno stesso carotenoide. Le forme *cis* hanno, rispetto alle *trans*, un assorbimento massimo a  $\lambda$  minori, un'assorbanza minore e bande di assorbimento intorno a 340 nm e 280 nm (Wrolstad, 2011).

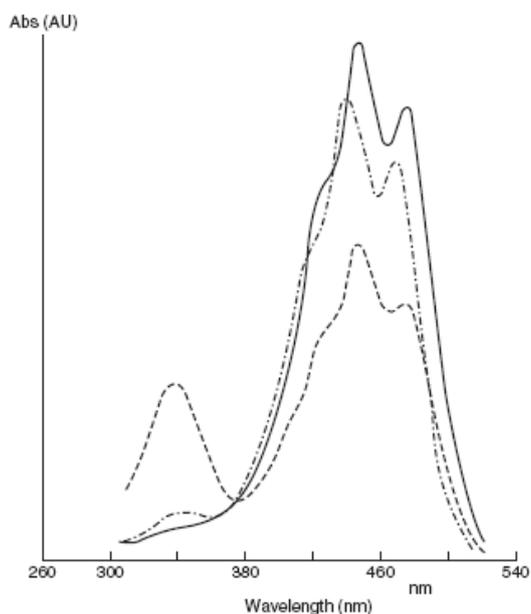


Figura 2.13: caratteristiche spettrali di all-*trans*  $\beta$ -carotene (—), 9-*cis*- $\beta$ -carotene (---) e 15-*cis*  $\beta$ -carotene (-.-) (Wrolstad, 2011)

I carotenoidi obbediscono alla legge di Lambert e Beer, per cui l'analisi spettrofotometrica consente di ottenere anche informazioni quantitative. L'assorbanza di una soluzione contenente carotenoidi e la sua concentrazione sono legate dal coefficiente di estinzione molare  $A^{1\%}$ , definito come

l'assorbanza di una soluzione di carotenoide a concentrazione 10 g/L, in un dato solvente e misurata con una cuvetta da 1 cm ad una specifica lunghezza d'onda.

Conoscendo il coefficiente di estinzione molare e misurando l'assorbanza posso risalire alla concentrazione della soluzione.

#### 2.1.7.7 Parametri critici dell'analisi dei carotenoidi e buone pratiche di laboratorio

L'analisi dei carotenoidi richiede particolare attenzione in quanto in presenza di luce, calore e ossigeno tali molecole sono instabili. Per tale motivo si lavora in condizioni di luce soffusa e quando possibile in atmosfera inerte (azoto). Nel caso in cui il lavoro è discontinuo, è necessario conservare i campioni in freezer. Poiché dopo l'estrazione i carotenoidi, non più protetti da antiossidanti naturali, diventano molto instabili, si aggiungono agli estratti antiossidanti come il BHT o i tocoferoli.

Occorre seguire delle buone pratiche di laboratorio durante la preparazione e lo stoccaggio per evitare effetti come degradazione, isomerizzazione, ri-arrangiamento strutturale ed altre reazioni fisico-chimiche (Wrolstad, 2011). Di seguito sono elencate alcune precauzioni necessarie per ottenere dati sperimentali riproducibili ed affidabili, indipendentemente dal metodo analitico scelto:

1. condurre la preparazione del campione e tutte le fasi dell'analisi in presenza di luce gialla/fluorescente in quanto la luce diretta del sole o la luce UV induce fotoisomerizzazione *trans-cis* o fotodegradazione dei carotenoidi;
2. eliminare l'ossigeno e conservare i campioni in assenza di atmosfera inerte (azoto). L'ossigeno può portare allo sbiancamento o alla formazione di artefatti come epossicarotenoidi e apocarotenali (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2001);
3. verificare l'assenza di perossidi nei solventi (THF e etere etilico);
4. usare vetreria ambrata o proteggere la vetreria contenente i campioni con fogli di alluminio;
5. condurre tutte le operazioni il più velocemente possibile;
6. pianificare il lavoro in modo tale da analizzare i campioni immediatamente dopo il campionamento;
7. concentrare i carotenoidi in evaporatori rotanti non scaldando a temperature maggiori di 40°C ed evitare di evaporare fino a secchezza. Se necessario, allontanare il solvente poi portare a secco con azoto o argon. Un'essiccazione eccessiva aumenta la possibilità di degradazione e può far aderire completamente i carotenoidi alla parete del pallone rendendo la ridissoluzione difficile.
8. non utilizzare contenitori in plastica perché i carotenoidi aderiscono facilmente a tale materiale.

## 2.2 COMPOSTI FENOLICI

### 2.2.1 Struttura e classificazione

Con il termine di composti fenolici si indica un ampio gruppo di molecole eterogenee, più di 8000 secondo Tsao (2010), strutturalmente accomunate dalla presenza di almeno un anello aromatico cui sono legati uno o più sostituenti ossidrilici.

Tali composti sono caratteristici dei tessuti vegetali dove sono sintetizzati come costituenti del tessuto stesso o in risposta a stress biotici o abiotici (Negro e Miceli, 2011). Alcune molecole sono, ad esempio, prodotte come difesa da infestanti e predatori (Tomás-Barberán e Espín, 2001), altre sono sintetizzate in condizioni fisiologiche normali per svolgere funzioni strutturali o per richiamare gli insetti favorendo l'impollinazione. Altri fenoli sono, invece, responsabili di caratteristiche sensoriali come il colore, l'aroma, il sapore e l'astringenza.

Da un punto di vista biochimico, i composti fenolici sono metaboliti secondari prodotti generalmente mediante il *pathway* metabolico dell'acido shikimico, da cui si formano fenilpropanoidi, o dell'acido acetico. Alcuni di questi (i flavonoidi), invece, sono prodotti dalla combinazione delle due vie (Giada, 2013).

Data la loro eterogeneità, i composti fenolici sono generalmente suddivisi in sottoclassi.

La classificazione più semplice divide tali composti in fenoli e polifenoli, a seconda che siano presenti rispettivamente un solo o più gruppi fenolici (Stalikas, 2007).

In base alle caratteristiche strutturali, possono essere individuati 16 principali sottogruppi (Giada, 2013) - fenoli semplici, benzochinoni, acidi fenolici, acetofenoni, acidi fenilacetici, acidi idrossicinnamici, fenilpropeni, cumarine e isocumarine, cromoni, naftochinoni, xantoni, stilbeni, antrachinoni, flavonoidi, lignani e neolignani ed infine lignine (Figura 2.14).

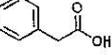
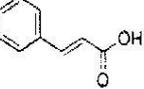
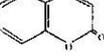
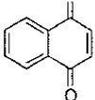
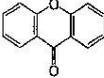
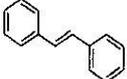
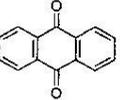
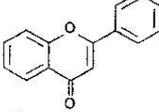
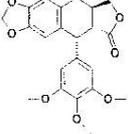
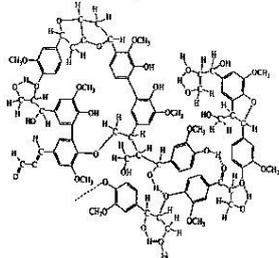
Class	Basic skeleton	Basic structure
Simple phenols	C <sub>6</sub>	
Benzoquinones	C <sub>6</sub>	
Phenolic acids	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	
Acetophenones	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Phenylacetic acids	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Hydroxycinnamic acids	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Phenylpropenes	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Coumarins, isocoumarins	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Chromones	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Naphthoquinones	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	
Xanthenes	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	
Stilbenes	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	
Anthraquinones	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	
Flavonoids	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	
Lignans and neolignans	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	
Lignins	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	

Figura 2.14: principali gruppi di composti fenolici e loro struttura chimica (Giada, 2013)

Un altro criterio di classificazione è la loro distribuzione in natura. I composti fenolici possono essere poco distribuiti (fenoli semplici, pirocatecoli, idrochinoni, resorcinoli aldeidi derivate dagli acidi benzoici), molto distribuiti (flavonoidi, cumarine, acidi fenolici) e polimeri (tannini e lignina) (Giada, 2013).

La classificazione più utile da un punto di vista nutrizionale consiste nel dividere i composti fenolici in liberi (o solubili), esterificati/eterificati solubili e legati (o insolubili) (Arranz e Saura Calixto, 2010). Questa suddivisione è effettuata in base al collocamento all'interno dei compartimenti cellulari vegetali ed alla loro struttura chimica. I composti fenolici liberi sono, infatti, presenti nei vacuoli delle cellule vegetali, mentre i legati insolubili formano complessi stabili insolubili con i polisaccaridi e le proteine della parete cellulare. Sono fenoli solubili i fenoli semplici, i flavonoidi e i tannini a basso e medio peso molecolare non legati alle membrane, sono insolubili i tannini, gli acidi fenolici ed altri composti fenolici a basso peso molecolare legati ad altri componenti.

Il destino metabolico dei composti fenolici assunti con la dieta e gli effetti fisiologici esercitati dipendono essenzialmente dalla loro solubilità. In particolare, i composti insolubili non sono digeriti, quindi raggiungono pressoché intatti il colon dove sono metabolizzati dalla microflora batterica intestinale. I fenoli solubili, invece, possono attraversare la barriera intestinale e raggiungere il circolo sanguigno intatti o sottoforma di metaboliti.

### 2.2.2 Proprietà chimico-fisiche

La presenza di gruppi  $-OH$  conferisce ai composti fenolici un carattere idrofilico e una natura acida. Infatti, un composto fenolico in soluzione acquosa tende a dissociarsi in fenossione ed  $H^+$ .

I composti fenolici sono normalmente solubili in solventi organici polari, purché non siano sottoforma di glicosidi o esteri. I composti con un numero limitato di gruppi ossidrilici sono solubili in metanolo, etanolo, cloroformio, etere ed etilacetato, mentre quelli con una o più catene alifatiche laterali sono solubili in solventi meno polari. Sono solubili anche in sodio idrossido ed in carbonato di sodio, sebbene l'ambiente alcalino favorisca la loro ossidazione. Gli acidi fenolici sono solubili anche in bicarbonato di sodio.

La presenza di gruppi ossidrilici aumenta la reattività chimica di tali molecole. Infatti, mediante i gruppi  $-OH$ , i composti fenolici possono formare legami idrogeno intramolecolari o con altre molecole, quali proteine ed alcaloidi. Inoltre, i gruppi fenolici, in particolare i gruppi ortodifenolici, vengono facilmente ossidati sotto l'azione catalitica delle polifenolossidasi ed i chinoni formati, a loro volta, possono polimerizzare producendo polimeri complessi (melanine). Gli ortodifenoli sono, anche, in grado di chelare metalli.

Grazie alla presenza di anelli aromatici, i composti fenolici presentano un intenso assorbimento nella regione UV e visibile dello spettro elettromagnetico e tale assorbanza viene notevolmente influenzata dal *pattern* di distribuzione dei gruppi ossidrilici sull'anello aromatico.

### 2.2.3 Proprietà antiossidanti

I composti fenolici esplicano un'azione antiossidante comportandosi da "interruttori di catena" (definiti anche "chain breaking") o da "antiossidanti preventivi" che differiscono per il meccanismo d'azione.

#### 2.2.3.1 Antiossidanti interruttori di catena

Sono definiti "interruttori di catena" (chain breaking antioxidant) gli antiossidanti che impediscono uno o più passaggi dello stadio di propagazione della catena di autoossidazione mediata da radicali, intrappolando i radicali stessi. Tali antiossidanti hanno due caratteristiche fondamentali:

1. la loro velocità di reazione con i radicali propagatori di catena è maggiore di quella tra i radicali stessi ed il substrato;
2. danno origine a radicali stabili che a loro volta non innescano catene ossidative.

Gli antiossidanti interruttori di catena possono agire con due meccanismi diversi: per trasferimento d'idrogeno e per trasferimento elettronico (Bendary *et al.*, 2013).

##### 2.2.3.1.1 Antiossidanti per trasferimento di idrogeno

L'azione dei fenoli come antiossidanti per trasferimento di idrogeno si basa sul trasferimento dell'idrogeno del gruppo -OH al radicale perossilico ( $\text{ROO}\cdot$ ) con conseguente formazione dell'idroperossido ( $\text{ROOH}$ ) e del radicale fenossile  $\text{A}\cdot$  (Figura 2.15). Il radicale fenossile non reagisce con altre specie che siano non-radicaliche.

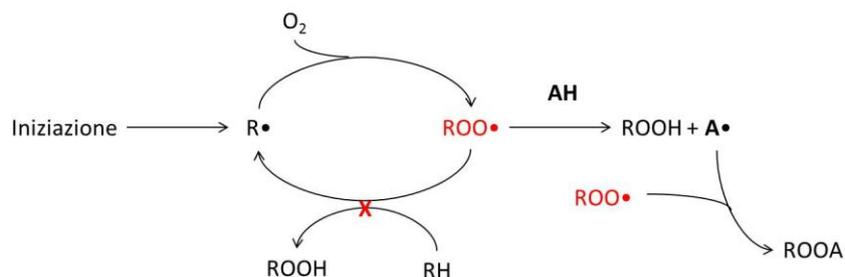


Figura 2.15: interruzione della catena radicalica per trasferimento di idrogeno. (AH= antiossidante,  $\text{A}\cdot$  = radicale dell'antiossidante,  $\text{ROO}\cdot$  = radicale perossilico responsabile della propagazione della catena,  $\text{ROOH}$  = idroperossido,  $\text{ROOA}$  = prodotto di reazione del radicale perossilico e del radicale dell'antiossidante)

Il radicale fenossile  $\text{A}\cdot$  potrà ricombinarsi con un'altra unità di perossile o un altro radicale ( $\text{R}\cdot$ ) dando origine ad un prodotto non radicalico ( $\text{RA}$  e  $\text{ROOA}$ ) (Lucarini *et al.*, 1996). Si ha, quindi, terminazione della catena per accoppiamento radicalico (Figura 2.16).

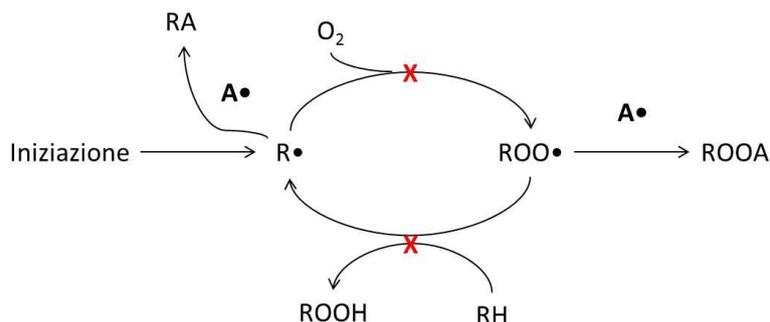


Figura 2.16: interruzione della catena di radicali per accoppiamento radicalico

Pertanto, una molecola di antiossidante è in grado di intrappolare due unità di perossile.

Il fenossile che si forma dalla reazione tra un composto fenolico ed un perossiradicalo è stabilizzato per risonanza (Figura 2.17) (Damodaran *et al.*, 2007)

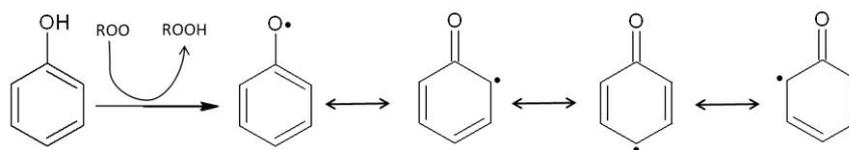


Figura 2.17: delocalizzazione per risonanza del radicale fenossile

Affinché possa esserci interruzione della catena è necessario che la BDE (Bond Dissociation Energy = energia di dissociazione omolitica) del legame O-H del composto fenolico sia minore della BDE dell'O-H del perossiradicalo.

Nei composti fenolici la BDE dipende dai sostituenti presenti sull'anello aromatico, soprattutto in posizione *orto* e *para*. In generale, i sostituenti elettron-attrattori stabilizzano il fenolo di partenza e destabilizzano il fenossile, facendo aumentare la BDE. I sostituenti elettron-donatori, al contrario, stabilizzano il fenossile e destabilizzano il fenolo di partenza, facendo diminuire la BDE.

I composti fenolici con due gruppi -OH, definiti polifenoli o più correttamente idrossifenoli, possono reagire due volte con i perossiradicali per trasferimento di idrogeno, come riportato in Figura 2.18. Dalla reazione si formano strutture chinoidi coniugate molto stabili.

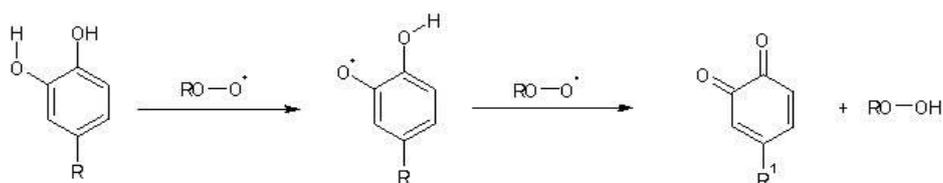
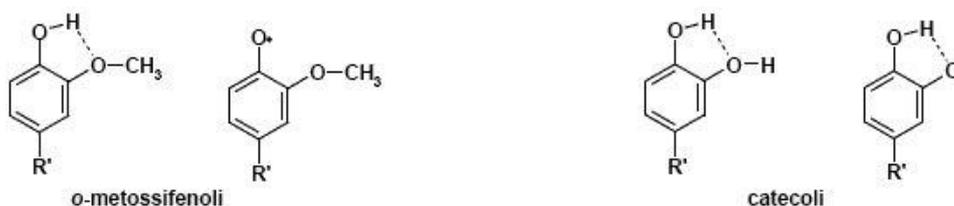


Figura 2.18: reazione di trasferimento di idrogeno degli idrossifenoli

Negli idrossifenoli, la presenza di legami idrogeno intramolecolari concorre alla stabilizzazione del fenolo o del fenossile. Ad esempio, nel caso dell'orto-metossifenolo, il legame idrogeno si forma solo nel fenolo di partenza, quindi la BDE del fenossile è più alta. Pertanto tale molecola è un cattivo antiossidante. Nei catecoli, invece, il legame idrogeno è presente sia nel fenolo che nel fenossile, pertanto questi risultano stabilizzati. La BDE rimane bassa e quindi la molecola è un buon antiossidante.

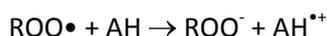
Figura 2.19: stabilizzazione del fenolo e del fenossile negli *o*-metossifenoli e nei catecoli

Altri fattori influenzano la capacità antiossidante dei composti fenolici. Affinchè avvenga la reazione tra la molecola di antiossidante ed i radicali, infatti, è necessario che queste molecole vengano a contatto. Gli urti più efficaci sono quelli che avvengono in prossimità del gruppo  $\text{-OH}$ . Nel caso di ingombro sterico, soprattutto in posizione *orto*, la percentuale di urti diminuisce e quindi diminuisce la reattività come antiossidante.

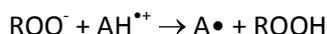
Concludendo, si può affermare che un antiossidante per trasferimento di idrogeno, per essere efficace, deve contenere un idrogeno di un legame X-H facilmente estraibile per rottura omolitica e deve formare, in seguito a reazione con i radicali perossilici, un radicale a lungo tempo di vita e non reattivo nei confronti dell'ossigeno né del substrato in modo da interrompere la catena di ossidazione.

#### 2.2.3.1.2 Antiossidanti per trasferimento elettronico

Gli antiossidanti per trasferimento elettronico sono molecole in grado di interrompere la catena di autoossidazione trasferendo un elettrone al radicale perossilico ( $\text{ROO}\bullet$ ). In seguito al trasferimento dell'elettrone si forma un radicale catione ( $\text{AH}^{*\bullet}$ ) dell'antiossidante e un anione perossilico ( $\text{ROO}^-$ ).



Il catione radicale formatosi reagisce con l'anione perossilico dando un anione dell'antiossidante e un composto stabile (ROOH).



### 2.2.3.2 Antiossidanti preventivi

Gli antiossidanti preventivi sono molecole che impediscono la formazione di radicali iniziatori della catena. I composti fenolici si comportano da antiossidanti preventivi chelando i metalli di transizione ed impedendo quindi la reazione di Fenton:



## 2.2.4 Ruolo dei composti fenolici ed effetto sulla salute

Studi epidemiologici hanno evidenziato una relazione inversa tra l'assunzione di alimenti ricchi in polifenoli e insorgenza di malattie croniche (Scalbert *et al.*, 2005; Arts e Hollman, 2005).

Il consumo di alimenti ricchi in polifenoli, infatti, determina un aumento della capacità antiossidante del plasma per la presenza dei polifenoli stessi e dei loro metaboliti (Pandey e Rizvi, 2009).

Tali composti bioattivi intervengono in più funzioni metaboliche esplicando effetti cardio-protettivi, anti-tumorali, anti-diabetici, anti-invecchiamento e neuroprotettivi.

### 2.2.4.1 Effetti cardio-protettivi

L'effetto di alimenti ricchi in polifenoli sui principali fattori di rischio responsabili delle malattie cardio-vascolari come ipertensione, metabolismo lipidico e attivazione delle piastrine, è stato evidenziato in studi di intervento sull'uomo (Del Rio *et al.*, 2013).

L'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) è uno dei meccanismi chiave dell'insorgenza dell'aterosclerosi. L'azione protettiva svolta dai polifenoli consiste nell'impedire tale fenomeno evitando la formazione di placche aterosclerotiche.

Altri meccanismi alla base dell'effetto cardio-protettivo dei polifenoli sono l'effetto antiossidante, antinfiammatorio e anti-aggregante sulle piastrine. Inoltre, tali molecole sono in grado di aumentare le HDL e di migliorare la funzione endoteliale (García-Lafuente *et al.*, 2009).

### 2.2.4.2 Effetti anti-tumorali

I polifenoli sono in grado di proteggere dall'insorgenza di tumore e di ridurre la crescita delle cellule tumorali (Yang *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 2005). Questi effetti sono stati osservati in vari siti come bocca, stomaco, duodeno, colon, fegato, polmone, ghiandola mammaria e pelle. I meccanismi di azione responsabili degli effetti di tali molecole sono diversi ed includono un'attività estrogenica e

anti-estrogenica, un'azione antiproliferativa, induzione dell'apoptosi delle cellule tumorali, prevenzione dall'ossidazione, induzione di enzimi detossificanti, regolazione del sistema immunitario, attività antinfiammatoria e regolazione della comunicazione cellulare (García-Lafuente *et al.*, 2009).

#### 2.2.4.3 Effetti anti-diabetici

Il diabete è un patologia che si manifesta con iperglicemia e che porta a severi effetti a lungo termine come retinopatia, nefropatia e neuropatia. Numerosi studi hanno riportato l'effetto anti-diabetico dei polifenoli (Del Rio *et al.*, 2013). Questo si esplica mediante diversi meccanismi tra cui l'inibizione dell'assorbimento del glucosio a livello intestinale, la disattivazione delle glucosidasi e l'inibizione dell'up-take del glucosio nei tessuti periferici (Matsui *et al.*, 2001).

#### 2.2.4.4 Effetto anti-invecchiamento

I radicali liberi e lo stress ossidativo sono ritenute le principali cause dell'invecchiamento. Una dieta ricca di antiossidanti riduce gli effetti dell'invecchiamento grazie alla combinazione delle proprietà antiossidanti e antinfiammatorie dei polifenoli assunti con la dieta (Pandey e Rizvi, 2009). Inoltre, grazie alla capacità di attraversare la barriera emato-encefalica, i composti fenolici sono in grado di ridurre gli effetti dell'invecchiamento sul sistema nervoso e sul cervello.

#### 2.2.4.5 Effetto neuro-protettivo

Il consumo di alimenti ricchi di composti fenolici protegge da malattie neurodegenerative come l'Alzheimer (Letenneur *et al.*, 2007) ed il morbo di Parkinson (Rossi *et al.*, 2008). Tale effetto è ascrivibile alla capacità di queste molecole di modulare diversi processi cellulari come la trasmissione dei segnali, la proliferazione, l'apoptosi, l'equilibrio redox e la differenziazione cellulare (Choi *et al.*, 2012). Il ruolo terapeutico delle catechine nel morbo di Parkinson è dovuto anche alla capacità di chelare il ferro (Pandey e Rizvi, 2009).

#### 2.2.4.6 Altri effetti

Oltre agli effetti sopra riportati, i composti fenolici sono in grado di apportare altri benefici alla salute dell'uomo. Assunti con gli alimenti, sono in grado di prevenire l'asma, sono utili nel prevenire l'osteoporosi, nel proteggere la pelle dai danni causati dai raggi UV ed infine hanno un'attività anti-HIV-1 in quanto inibiscono l'entrata del virus HIV-1 nelle cellule bersaglio (Pandey e Rizvi, 2009).

### 2.2.5 Biodisponibilità e metabolismo

Gli effetti benefici esercitati dai composti fenolici presenti negli alimenti dipendono dall'entità del loro assorbimento e dal metabolismo (Parr e Bolwell, 2000), che ne condizionano la

biodisponibilità, intesa come la frazione di nutriente o composto assunto con la dieta che raggiunge il circolo sistemico ed i siti specifici dove esercita azioni biologiche (Porrini e Riso, 2008).

I fattori che influenzano la biodisponibilità dei composti fenolici sono di natura diversa. Possono essere di natura ambientale, strutturale e tecnologica, cioè legata al *processing* dell'alimento, dipendenti dall'interazione con altri composti o influenzati dallo stato fisiologico dell'individuo (D'Archivio *et al.*, 2010).

Indipendentemente dai fattori ambientali che condizionano la quantità di fenoli prodotti dalle piante, dai processi di trasformazione degli alimenti e dalle caratteristiche della matrice alimentare, i composti fenolici non possono essere assorbiti nella loro forma nativa, fatta eccezione per le antocianine. Questi, infatti, sono generalmente presenti nell'alimento in forma glicosilata o come polimeri e possono essere assorbiti dall'intestino dopo idrolisi da parte degli enzimi intestinali o della microflora batterica intestinale. Gli enzimi addetti alla scissione dei glicosidi a livello intestinale sono la lattasi-floridizina idrolasi (LPH) e la  $\beta$ -glucosidasi citosolica (D'Archivio *et al.*, 2010). La rimozione della molecola di zucchero dal glucoside rende l'aglicone (molecole fenolica) più lipofilo e quindi in grado di attraversare, per diffusione passiva, le cellule dell'epitelio intestinale. I fenoli indicati come legati non sono solubili a livello dell'intestino tenue, pertanto arrivano inalterati nel colon dove sono idrolizzati dalla microflora batterica intestinale in agliconi e acidi fenolici semplici (Aura *et al.*, 2005) e trasformati in metaboliti attivi.

Oltre ad essere metabolizzati nell'intestino, i composti fenolici possono subire reazioni di coniugazione come metilazione, solfonazione e glucuronazione nel fegato (Yang *et al.*, 2001). Queste trasformazioni enzimatiche, però, producono metaboliti con una minore attività antiossidante (Manach *et al.*, 2004).

Piccole dosi di composti fenolici sono generalmente metabolizzate nell'intestino, mentre dosi maggiori nel fegato (Scalbert e Williamson, 2000).

### 2.2.6 Composti fenolici nei cereali

I cereali contengono un'ampia gamma di composti fenolici: derivati dell'acido benzoico e cinnamico, antocianidine, chinoni, flavonoli, calconi, flavoni e flavanoni (Adom e Liu, 2002). Alcuni di questi, come gli acidi fenolici e le antocianine, sono presenti anche in frutta e verdura (Kesarwani *et al.*, 2014), altri sono peculiari dei cereali.

La composizione quali-quantitativa è altamente variabile sia tra le diverse specie di cereali che all'interno di una stessa specie. Infatti, per una stessa specie il contenuto in fenoli è condizionato da fattori come la *cultivar*, le tecniche di coltivazione e le condizioni di crescita. Anche le modalità di conservazione e preparazione di un alimento possono variare la presenza e composizione dei fenoli (Naczek e Shahidi, 2006).

Nei cereali, i composti fenolici sono localizzati negli strati più esterni della cariosside (gluma, pericarpo e aleurone) i quali, nei tradizionali processi di macinazione, sono generalmente allontanati come crusca. Per tale motivo, il contenuto in fenoli nei cereali è condizionato anche dalla procedura di macinazione (Adom *et al.*, 2005).

Questi composti possono trovarsi in tre forme: libera, coniugata solubile e insolubile (Arranz e Saura Calixto, 2010). I primi sono compartimentalizzati nei vacuoli in forma non legata ad altri componenti, i secondi sono presenti come glicosidi o esteri, i terzi sono legati a costituenti della parte cellulare, polisaccaridi o proteine.

I principali acidi fenolici presenti nei cereali sono l'acido ferulico e il p-cumarico. Nel frumento il primo rappresenta il 90% degli acidi fenolici e si trova nello strato aleuronico esterificato con arabinosio, stanoli, steroli e glucosio (Naczek e Shahidi, 2004). Nel riso oltre agli acidi fenolici già menzionati si trova l'acido caffeico (Kesarwani *et al.*, 2014). Al contrario il sorgo ed il miglio hanno una grande varietà di acidi fenolici.

I fenoli si trovano principalmente in forma legata: nel riso e nel mais la frazione insolubile è pari, rispettivamente, al 74% e al 69% dei fenoli totali presenti (Adom e Liu, 2002).

## 2.2.7 Analisi dei fenoli

### 2.2.7.1 Estrazione

L'estrazione dei fenoli dipende dalla loro struttura chimica che può variare da fenoli semplici a molecole altamente polimerizzate. Per questo non esiste ad oggi una procedura ufficiale valida per l'estrazione di tali composti da matrici alimentari diverse.

Generalmente si usano solventi come metanolo, etanolo, propanolo, acetone, etilacetato, dimetilformammide o loro miscele acquose in proporzioni variabili (Ottles, 2011; Naczek e Shahidi, 2006). Arranz e Saura Calixto (2010), invece, utilizzano due miscele estraenti diverse per estrarre i composti fenolici da matrici cerealicole. Combinano, infatti, il potere estraente di una miscela metanolo:acqua 50:50 acidificata con HCl a pH=1 con quello di una miscela acetone:acqua 70:30.

Oltre al tipo di solvente, altri fattori condizionano l'estrazione. Uno dei principali è il tempo. In letteratura i tempi di estrazione utilizzati per estrarre i composti fenolici variano da 1 minuto a 24 ore (Naczek e Shahidi, 2006). Occorre notare, però, che all'aumentare dei tempi di estrazione aumentano le probabilità di ossidazione delle molecole fenoliche. Altro importante fattore da considerare è il rapporto tra peso di campione e volume di solvente. Inoltre, il numero di estrazioni deve essere tale da consentire una completa rimozione dei composti dalla matrice.

A differenza dei fenoli liberi che sono facilmente solubili nei solventi organici, i fenoli legati insolubili, per poter essere estratti, devono essere idrolizzati. Come riportato in Stalikas (2007), l'idrolisi può avvenire in condizioni acide, basiche o per via enzimatica.

L'idrolisi alcalina con idrossido di sodio ha il vantaggio di prevenire la degradazione degli acidi idrossicinnamici. Come osservato da Sosulski *et al.* (1982), infatti, l'acido cloridrico utilizzato nell'idrolisi acida può distruggere gli acidi idrossicinnamici in una percentuale compresa tra 15% e 95%. Inoltre, Verma *et al.* (2008) hanno osservato che i composti fenolici, liberati per idrolisi acida (HCl) da crusca di frumento, erano significativamente più bassi di quelli liberati per idrolisi alcalina.

Al contrario, secondo Arranz e Saura Calixto (2010), con l'idrolisi alcalina una quantità apprezzabile di polifenoli legati ai costituenti della parete cellulare potrebbe non idrolizzare e rimanere insolubile. Pertanto, questi suggeriscono un'idrolisi mediante MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 90:10 (v/v) a 85°C per 20 ore.

Tuttavia, in letteratura l'idrolisi alcalina è molto più frequente dell'idrolisi acida, plausibilmente perché più sicura dell'idrolisi acida da un punto di vista sperimentale.

Un'analisi della letteratura più recente mostra che la saponificazione dei fenoli legati insolubili è condotta in diverse condizioni: Adom e Liu (2002) idrolizzano con NaOH 2M agitando per un'ora a temperatura ambiente e in atmosfera inerte, Sompong *et al.* (2011) utilizzano NaOH 2M per 16 ore, Paiva *et al.* (2014), invece, saponificano con NaOH 4M per 4 ore sotto agitazione magnetica e Irakli *et al.* (2012) combinano all'azione di NaOH 4M il trattamento con ultrasuoni a 40°C e per 90 minuti.

#### 2.2.7.2 Quantificazione

La quantificazione dei composti fenolici è generalmente condotta per via spettrofotometrica o cromatografica. Recentemente, anche l'elettroforesi capillare ha trovato applicazione nella separazione e quantificazione dei composti fenolici (Naczek e Shahidi, 2006).

Il saggio più utilizzato per la determinazione quantitativa dei composti fenolici è il saggio di Folin-Ciocalteu che si basa sulla riduzione di una miscela di fosfotungstato e fosfomolibdato ad opera del gruppo ossidrilico dei composti fenolici con la conseguente formazione di un complesso che assorbe alla lunghezza d'onda massima di circa 760 nm. L'intensità dell'assorbimento è direttamente proporzionale alla concentrazione dei composti fenolici. Questo metodo ha il vantaggio di essere veloce ed economico, ma allo stesso tempo ha lo svantaggio di rispondere diversamente a composti diversi rendendo difficile il confronto tra estratti diversi e di reagire anche a sostanze di natura non fenolica (Wrolstad, 2011). Inoltre, questo saggio fornisce una stima del contenuto in fenoli totali senza dare informazioni quali-quantitative sui singoli composti (Ignat *et al.*, 2011).

Informazioni quali-quantitative sulla composizione degli estratti fenolici possono essere ottenute con tecniche cromatografiche. Tra queste l'HPLC rappresenta la tecnica maggiormente utilizzata. In

particolare la RP-HPLC è divenuta la tecnica analitica d'elezione per la separazione e identificazione dei composti fenolici con diode array detector o con spettrometri di massa. Tuttavia, i metodi HPLC presentano limitazioni nell'analisi di estratti complessi a causa della sensibilità strumentale. Pertanto, spesso è necessaria una fase di purificazione e pre-concentrazione degli estratti, generalmente condotta con cartucce SPE.

In alternativa alle tecniche cromatografiche più usuali, vengono utilizzate la High Speed Counter Chromatography, la cromatografia con fluido supercritico e l'elettroforesi capillare (Ignat *et al.*, 2011).

## 2.3 ANTOCIANINE

### 2.3.1 Struttura e solubilità

Le antocianine sono composti appartenenti al gruppo dei flavonoidi (polifenoli). Lo scheletro C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub> (Figura 2.20 A), tipico di tale classe, è costituito da due anelli fenolici (denominati A e B) collegati tra loro da un anello piranico eterociclico (anello C) (Figura 2.20 B). Chimicamente sono glicosidi il cui aglicone è un poli-idrossi e poli-metossi derivato del catione 2-fenilbenzopirilio, detto anche flavilio (Figura 2.20 C). Questo costituisce il cromoforo di tali molecole: i suoi doppi legami coniugati sono, infatti, responsabili dell'assorbimento della radiazione visibile intorno a 500 nm e del colore rosso che conferiscono ai tessuti e quindi agli alimenti.

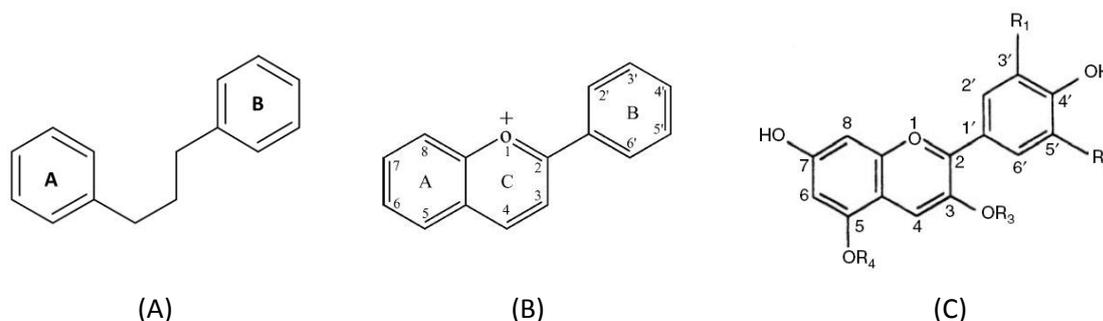


Figura 2.20: struttura dello scheletro C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub> (A), del catione 2-fenilbenzopirilio (B) e delle antocianine (C) (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = -H/-OH/-OMe; R<sub>3</sub>=glicosile, R<sub>4</sub>= -H o glicosile )

Quando il gruppo glicosidico di un'antocianina viene idrolizzato, l'aglicone è detto antocianidina. Finora, in natura sono state identificate 23 diverse antocianidine (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009), ma di queste solo sei sono le più diffuse e comuni negli alimenti: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, malvidina e petunidina (Clifford, 2000). Le loro strutture sono accomunate dalla presenza di gruppi ossidrilici in posizione 3, 5 e 7, mentre si differenziano per il numero e la posizione dei gruppi ossidrilici/metossilici sull'anello B (Tabella 2.4, Figura 2.21).

Antocianidine	Sostituenti sul catione flavilio
Delfinidina	3,5,7,3',4',5' -OH
Cianidina	3,5,7,3',4' -OH
Pelargonidina	3,5,7,4' -OH
Petunidina	3,5,7,3',4',5' -OH; 3' -OMe
Malvidina	3,5,7,4' -OH; 3',5' -OMe
Peonidina	3,5,7,4' -OH; 3' -OMe

Tabella 2.4: sostituenti sul catione flavilio nelle più comuni antocianidine

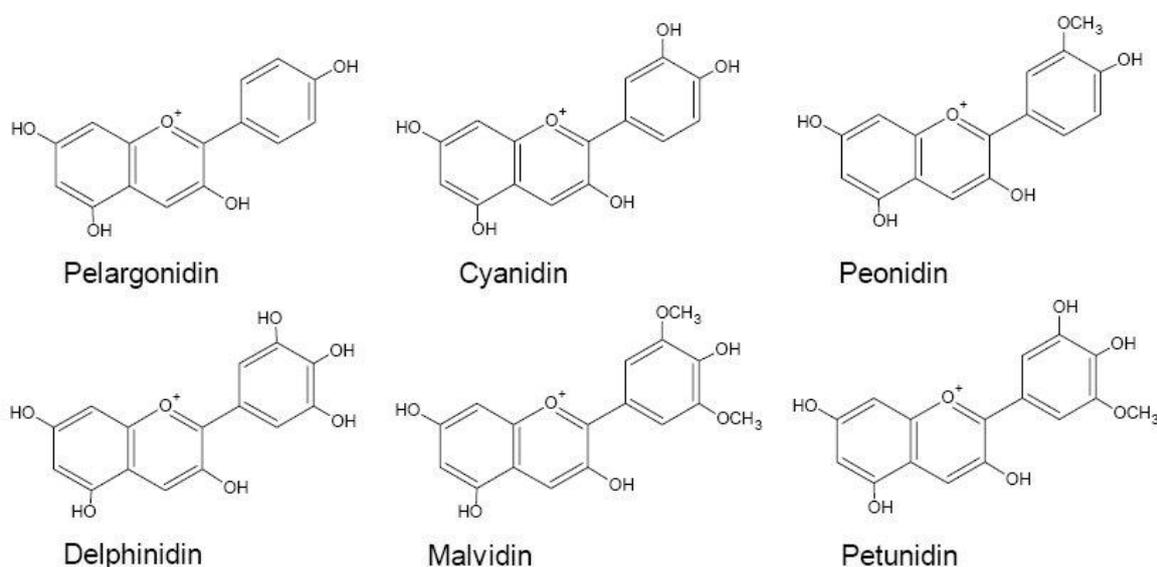


Figura 2.21: struttura delle principali antocianidine

Da queste deriva un gran numero di antocianine, più di 500 secondo Castañeda-Ovando *et al.* (2009), che si differenziano sia per il tipo ed il numero di zuccheri che per il tipo ed il numero di acidi alifatici o aromatici legati agli zuccheri.

Nei monoglucosidi, lo zucchero è sempre legato all'ossidrilico in posizione 3 dell'aglicone con un legame di tipo  $\alpha$  o  $\beta$ . Se sono presenti più zuccheri, questi sono legati agli ossidrili in C<sub>3</sub> e C<sub>5</sub> o più raramente a quelli in C<sub>3</sub> e C<sub>7</sub>. È anche possibile che gli zuccheri siano legati entrambi all' -OH in C<sub>3</sub>. Nei tri-glicosidi, generalmente due dei monosaccaridi sono in C<sub>3</sub> e l'altro in C<sub>5</sub> o C<sub>7</sub>, tuttavia in alcuni casi si hanno tre monosaccaridi legati in C<sub>3</sub>. La glicosilazione può avvenire anche sugli -OH dei carboni 3', 4' e 5' ("Maarit Rein: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins," n.d.). Gli zuccheri coinvolti nei legami glicosidici possono essere sia pentosi che esosi. Tra i primi i più comuni sono il glucosio e il galattosio, tra i secondi lo xilosio, l'arabinosio e il ramnosio. In alcuni casi

si trovano anche di- e tri-saccaridi come il rutinosio (6-O- $\alpha$ -ramnosil-D-glucopiranosio), il soforosio (2-O- $\beta$ -glucopiranosil-D-glucopiranosio), lo xilosilrutinosio e il glucosilrutinosio.

Le antocianine possono essere anche acilate con acidi alifatici (e.g. acido malonico, acetico, malico, succinico, ossalico), aromatici (e.g. acido p-cumarico, caffeico, ferulico, sinapico, gallico, p-idrossibenzoico) o una combinazione di questi (Damodaran *et al.*, 2007). L'acilazione coinvolge generalmente il gruppo –OH in posizione 6 dello zucchero o più raramente quello in posizione 4.

La presenza degli zuccheri e di gruppi ossidrilici e metossilici sul catione flavilio rende le antocianine piuttosto solubili in acqua, etanolo e metanolo.

### 2.3.2 Stabilità

Le antocianine isolate sono molto instabili e suscettibili alla degradazione (Giusti e Wrolstad, 2001). La loro stabilità è condizionata da diversi fattori come struttura chimica, pH, temperatura di conservazione, concentrazione, presenza di luce e ossigeno, solvente di dissoluzione, presenza di enzimi, flavonoidi, proteine e ioni metallici (“Maarit Rein: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins,” n.d.).

Di seguito è descritto l'effetto esercitato da alcuni di questi fattori comunemente presenti nelle condizioni di analisi.

#### 2.3.2.1 Stabilità e struttura chimica

Caratteristiche strutturali come numero e posizione dei gruppi ossidrilici e metossilici presenti sull'anello B del catione flavilio, tipo di zucchero coinvolto nel legame glicosidico e gruppi acilici legati all'aglicone condizionano la stabilità delle antocianine.

Questa aumenta all'aumentare del numero di gruppi metossilici e diminuisce all'aumentare di gruppi ossidrilici presenti sull'aglicone perché i primi sono meno reattivi dei secondi (Damodaran *et al.*, 2007). È possibile, quindi, stilare per le antocianidine più comuni il seguente ordine di stabilità decrescente: malvidina, peonidina, petunidina, cianidina e delfinidina. La presenza dei gruppi –OH e –OMe non influenza solo la stabilità delle antocianidine e antocianine, ma anche il colore. In particolare, all'aumentare del numero dei gruppi –OH il colore vira verso il blu (Damodaran *et al.*, 2007).

La glicosilazione del catione flavilio e l'acilazione degli zuccheri promuovono la stabilità delle antocianine. Infatti, in seguito a glicosilazione e acilazione, i gruppi –OH sono bloccati e la molecola risulta meno reattiva. Inoltre, le antocianine poli-acilate sono più stabili delle monoacilate. Tuttavia, la stabilità delle antocianidine risente anche della posizione della glicosilazione: ad esempio la glicosilazione in C<sub>3</sub> della petunidina produce un'antocianina più stabile della glicosilazione in 5, 7 e 4' (“Maarit Rein: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins,” n.d.).

Sebbene in generale l'acilazione delle antocianidine ne promuova la stabilità, il tipo di sostituente ne influenza l'entità. Le antocianine con sostituenti aromatici sono più stabili di quelle con sostituenti alifatici (Stintzing e Carle, 2004).

### 2.3.2.2 Stabilità e pH

Le antocianine sono stabili in ambiente acido piuttosto che in soluzioni alcaline.

A seconda del pH della soluzione in cui si trovano, queste assumono diverse strutture: catione flavilio (Figura 2.22 A), la base chinoidale (Figura 2.22 D), il carbinolo (Figura 2.22 E) ed il calcone (Figura 2.22 F).

A pH molto acido (pH=1), la specie predominante è il catione flavilio (colore rosso) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). A valori di pH compresi tra 2 e 4 predominano le specie chinoidali (B, C, D.). A valori di pH pari a 5 si forma il carbinolo pseudobase (E). Quando il pH aumenta ulteriormente (pH=6), l'anello del carbinolo si apre e dà origine al calcone (incolore).

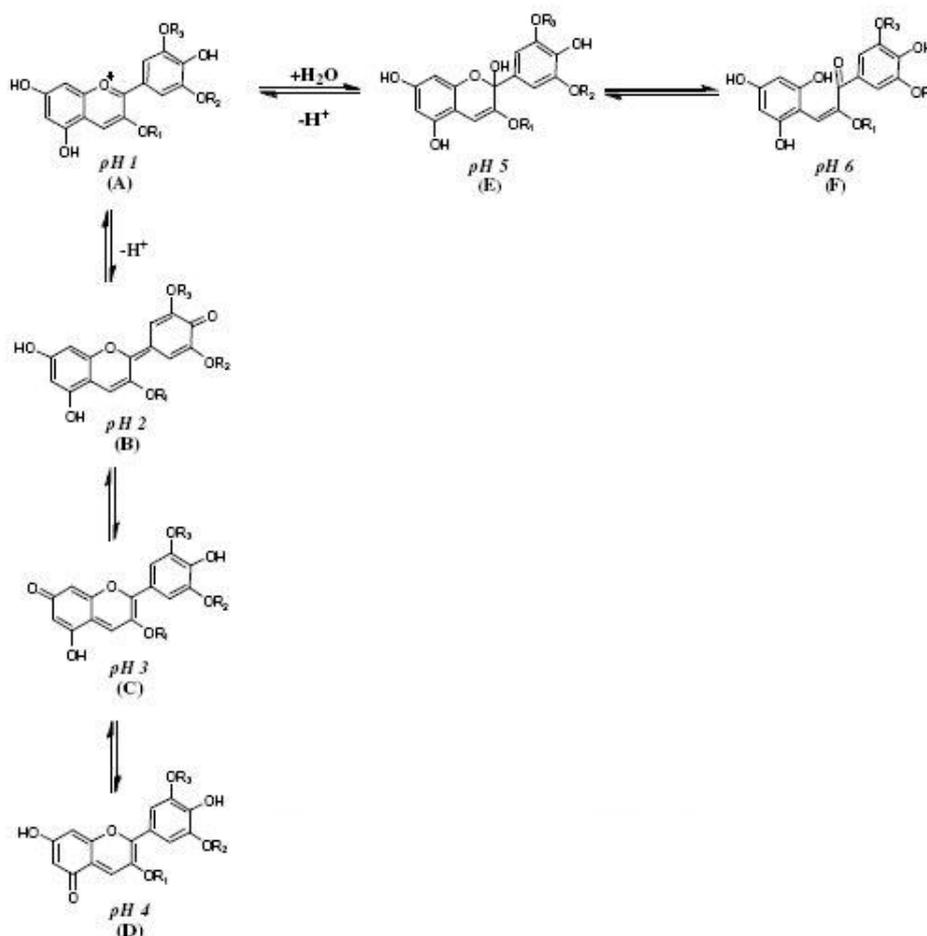


Figura 2.22: strutture assunte dalle antocianine in funzione del pH ( $R_1$  = glicosile,  $R_2$ ,  $R_3$  = -H/-OH/-OMe) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009)

L'equilibrio tra le varie forme dipende, oltre che dal pH, dalla struttura dell'antocianina stessa. In Figura 2.23 si riportano, ad esempio, le varie specie in equilibrio della malvidina-3-glucoside, 4',7-diidrossiflavilio cloruro e 40-metossi-4-metil-7-idrossiflavilio cloruro in funzione del pH.

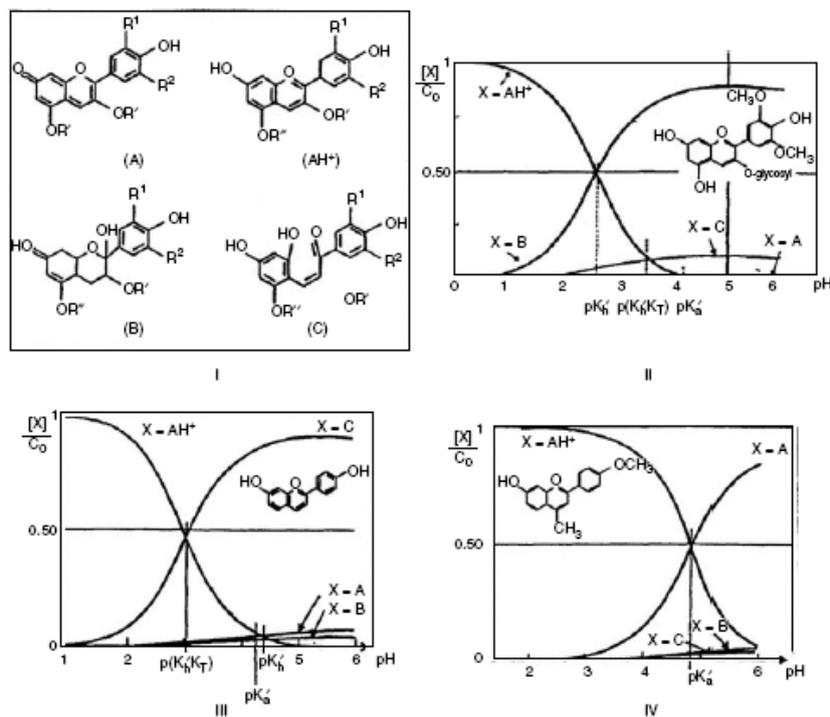


Figura 2.23: effetto del pH sulla struttura chimica (Damodaran *et al.*, 2007)

### 2.3.2.3 Stabilità e temperatura

La stabilità delle antocianine è influenzata dalla temperatura. In particolare un aumento della temperatura comporta un incremento della velocità di degradazione. Questa può determinare sia uno *shift* dell'equilibrio verso il calcone con conseguente perdita di colore (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009), che l'idrolisi del legame glicosidico con conseguente formazione dell'aglicone, molto meno stabile dell'antocianina ("Maarit Rein: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins," n.d.).

### 2.3.2.4 Stabilità: ossigeno e luce

L'ossigeno generalmente determina una degradazione delle antocianine per ossidazione diretta o indiretta. In quest'ultimo caso è un composto ossidato dall'ossigeno che reagendo con le antocianine dà luogo alla formazione di composti incolori.

Anche la luce, come l'ossigeno, determina una degradazione delle antocianine. Pertanto queste si preservano meglio se mantenute al buio.

### 2.3.3 Antocianine e colore

Il colore delle antocianine è dovuto al catione flavilio che costituisce il cromoforo e la cui risonanza determina l'intensità del colore stesso (Wrolstad *et al.*, 2005). Le trasformazioni strutturali a carico del catione flavilio in funzione del pH determinano variazioni di colore che possono essere misurate spettrofotometricamente.

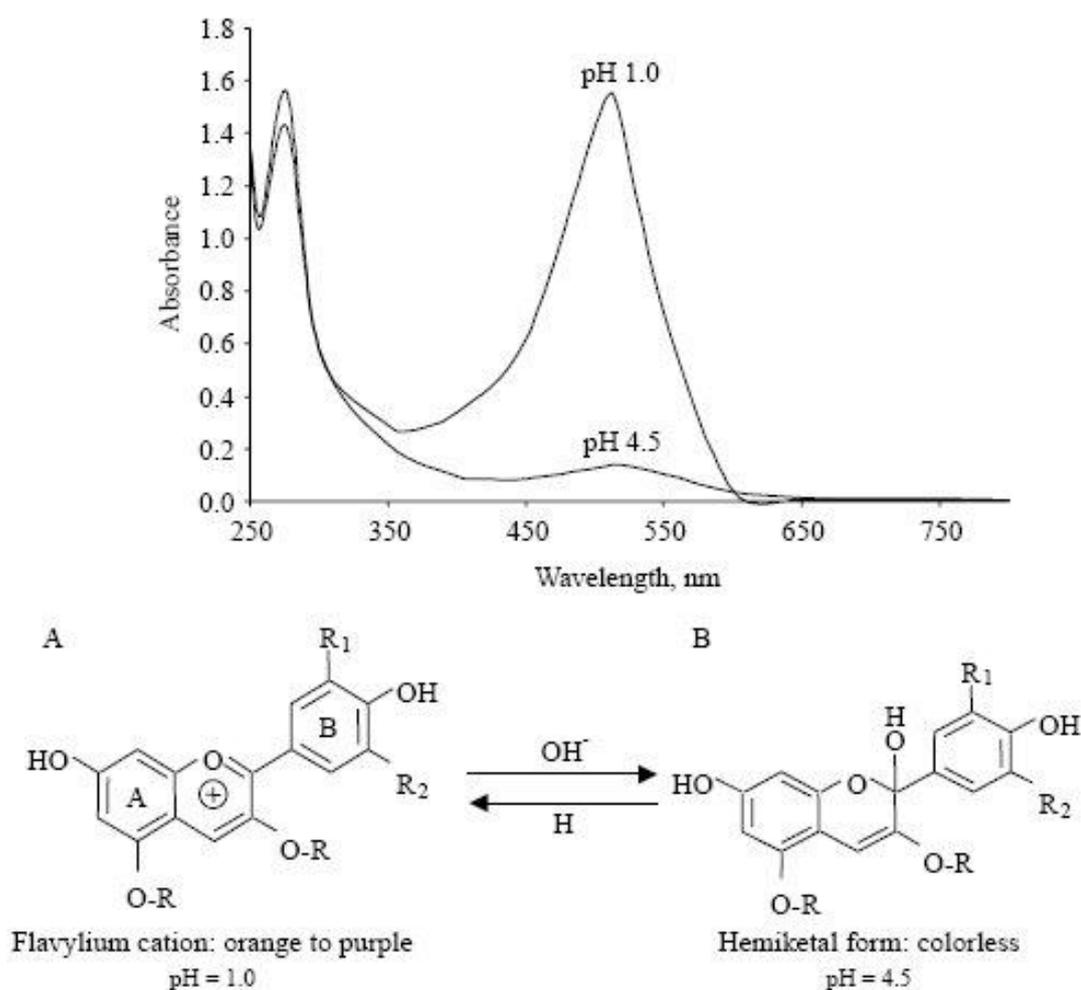


Figura 2.24: assorbimento UV-VIS delle antocianidine in funzione del pH (Wrolstad *et al.*, 2005)

In Figura 2.24, sono mostrati gli assorbimenti UV/VIS di una soluzione contenente antocianine a pH=1 e pH=4,5. La soluzione a pH=1 mostra un intenso assorbimento nel range 450-550 nm perché a tale pH prevale il catione flavilio. A pH=4,5 non si ha assorbimento perché prevale la forma emichetale (carbinolo) che non possiede il doppio legame coniugato tra gli anelli A e B quindi non assorbe la luce nel visibile.

La tinta (hue) e la saturazione (Chroma) del colore dipendono, oltre che dal pH, anche dai sostituenti sull'aglicone. Un aumento della sostituzione delle antocianidine con i gruppi -OH e -OMe determina una tinta più intensa a causa dell'effetto batocromico, cioè allo *shift* della banda di assorbimento

della radiazione luminosa da lunghezze d'onda più corte a lunghezze d'onda più lunghe. Tale effetto è causato da gruppi elettron-donatori (auxocromici). Poiché i gruppi  $-OMe$  sono maggiormente elettron-donatori dei gruppi  $-OH$ , le antocianidine metossi-sostituite hanno una colorazione porpora-blu (Damodaran *et al.*, 2007), mentre le idrossi-sostituite hanno un colore rosso-porpora. L'effetto dei sostituenti del catione flavilio sulla colorazione è illustrato in Figura 2.25.

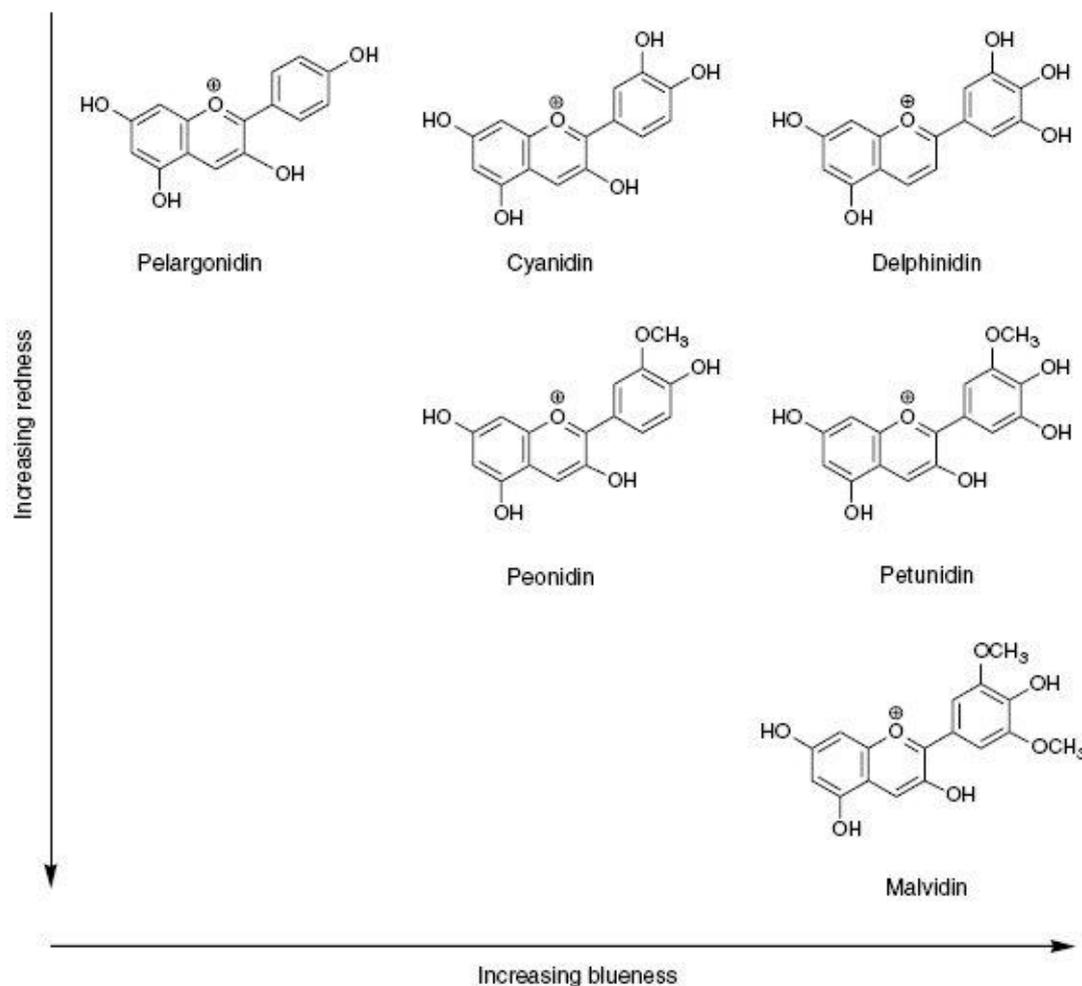


Figura 2.25: effetto dei sostituenti del catione flavilio sulla colorazione delle antocianidine (Damodaran *et al.*, 2007)

Nelle antocianine anche il tipo ed il numero di zuccheri influenza le caratteristiche del colore. La presenza di co-pigmenti e di ioni metallici promuove la persistenza del colore delle antocianine. I co-pigmenti sono sistemi ricchi in elettroni  $\pi$  in grado di associarsi al catione flavilio, al contrario piuttosto povero di elettroni, proteggendolo dall'attacco nucleofilo dell'acqua in posizione 2 o di altre specie come perossidi e diossido di zolfo in posizione 4 (Garcia-Viguera *et al.*, 1998). Generalmente i co-pigmenti sono molecole incolori presenti nelle cellule, la cui interazione con il catione flavilio produce un effetto ipercromico ed uno *shift* batocromico nello spettro d'assorbimento UV-VIS in seguito alla formazione di un complesso  $\pi$ - $\pi$ . Il catione flavilio risulta

stabilizzato da tale interazione e quindi il colore rosso è più intenso. L'effetto della presenza di co-pigmenti è più marcata a pH 4-6 quando le antocianine sono debolmente colorate (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Esempi di co-pigmenti sono flavonoidi, alcaloidi, aminoacidi, acidi organici, nucleotidi, polisaccaridi, metalli ed altre antocianine.

Per quanto riguarda l'effetto degli ioni metallici sul colore, occorre notare che le antocianine con gruppi ossidrilici in orto sull'anello B (i.e. cianidina, delphinidina e petunidina) formano complessi metallo-antocianina (Boulton, 2001) e l'antocianina è più stabile con maggiore persistenza del colore. Ne consegue che la presenza di ioni metallici può essere auspicabile sia dal punto di vista tecnologico per stabilizzare il colore che da un punto di vista salutare quando ad essere interessati all'interazione sono minerali essenziali.

### 2.3.4 Antocianine nei cereali

I cereali non sono una fonte tipica di antocianine, infatti solo alcune varietà di riso, mais, sorgo e frumento contengono antocianine che impartiscono loro colorazioni caratteristiche che variano dal porpora al blu intenso-nero e sono per questo note come "cereali pigmentati".

Alcuni esempi sono rappresentati dal riso rosso e dal riso nero, dal mais blu e mais rosso, dal *blue wheat* e *purple wheat*, dall'orzo, dalla segale, dal sorgo, dall'avena, dal miglio, dalla quinoa e dall'amaranto (Abdel-Aal e Wood, 2005).

Gli studi sulla presenza di antocianine e sul loro contenuto nei cereali sono aumentati solo negli ultimi decenni per gli effetti benefici associati a tali pigmenti e per la crescente domanda di alimenti ricchi di antiossidanti e coloranti naturali.

Nei cereali le antocianine sono localizzate generalmente negli strati esterni della cariosside, eccetto alcuni casi in cui si trovano in tessuti specifici. Ad esempio nel *purple wheat* queste si trovano a livello del pericarpo, mentre nel *blue wheat* si trovano nello strato aleuronico.

Le principali antocianine identificate nel riso nero e nel *purple wheat* sono la cianidina-3-glucoside e la peonidina-3-glucoside (E-S. M. Abdel-Aal, 2011). La prima rappresenta l'88% ed il 67% delle antocianine presenti rispettivamente nel riso nero e rosso. Seguono poi la peonidina-3-glucoside e la cianidina diglucoside. Nel riso sono state individuate anche altre antocianine aventi come aglicone la cianidina: cianidina-3-gentiobioside, cianidina-3-ramnoside, cianidina-3,5-diglucoside, cianidina-3-ramnoglucoside (Escribano-Bailón *et al.*, 2004).

Goufo e Trindade (2014) riportano che nel riso sono state individuate 18 antocianine, ma solo quattro sono state quantificate: cianidina-3-O-glucoside, peonidina-3-O-glucoside, cianidina 3-O-rutinoside e cianidina-3-O-galattoside.

Nel *blue wheat*, invece, la principale antocianina è la delphinidina-3-O-glucoside che costituisce il 37% delle antocianine totali. Nel mais blu, rosa e rosso sono state identificate da 18 a 27 antocianine e ad

eccezione del mais rosa, la cianidina-3-O-glucoside rappresenta, anche in questo caso, il pigmento più abbondante (E-S. M. Abdel-Aal, 2011).

### 2.3.5 Assorbimento e biodisponibilità

La condizione necessaria affinché una molecola bioattiva assunta con un alimento intervenga in alcune funzioni fisiologiche dell'organismo umano determinando effetti benefici sulla salute è che sia biodisponibile, cioè digerita, assorbita e metabolizzata.

Alcuni studi dimostrano che le antocianine assunte con gli alimenti sono assorbite dallo stomaco (Talavéra *et al.*, 2003; Passamonti *et al.*, 2003) e dall'intestino tenue (Wu *et al.*, 2006; Matuschek *et al.*, 2006) e solo una piccola percentuale è escreta con le urine.

La principale differenza tra l'assorbimento delle antocianine e di altri flavonoidi è che le prime sono assorbite intatte, cioè come glicosidi (McGhie e Walton, 2007).

L'assorbimento a livello dello stomaco avviene rapidamente ed è reso possibile dall'azione della bilitranslocasi, un trasportatore di membrana espresso a livello dell'epitelio gastrointestinale (Nicolin *et al.*, 2005). Dallo stomaco sono metabolizzate nel fegato e quindi entrano nel circolo sistemico.

La presenza del trasportatore è necessaria in quanto le antocianine a pH acido sono presenti come catione flavilio (Figura 2.26) e quindi essendo molecole polari e cariche non sono in grado di attraversare le membrane plasmatiche.

La porzione di glicosidi antocianici non assorbita dallo stomaco raggiunge invece l'intestino tenue dove, a causa del pH, prevalgono le pseudobasi carbinoliche. A livello del digiuno, si ha un ulteriore assorbimento delle antocianine. Secondo Faria *et al.* (2009), questo avviene grazie ai trasportatori GLUT2, mentre Gee *et al.* (2000) hanno suggerito che alcune idrolasi determinano la scissione del legame glicosidico e l'aglicone formatosi viene assorbito per diffusione passiva, come avviene per altri flavonoidi.

Le antocianine non assorbite nello stomaco e nel tenue, invece, raggiungono il colon dove subiscono una degradazione spontanea in condizioni fisiologiche (Woodward *et al.*, 2009) o sono metabolizzate dalla microflora batterica. Questa determina una rapida demetilazione e deglicosilazione dei glicosidi antocianici liberando l'aglicone, il quale è instabile a pH neutro e viene rapidamente degradato ad acidi fenolici ed aldeidi per la rottura dell'anello C (McGhie e Walton, 2007).

Secondo Vitaglione *et al.* (2007) la cianidina-3-glucoside viene metabolizzata nell'uomo in acido protocatecuico il quale si forma per degradazione chimica nelle condizioni fisiologiche del circolo sistemico o nella mucosa intestinale per azione della microflora batterica.

Una *review* sulla biodisponibilità delle antocianine nell'uomo (Faria *et al.*, 2013) ha evidenziato che tali molecole sono assorbite rapidamente, tuttavia nel plasma e nelle urine raggiungono concentrazioni massime piuttosto basse, pertanto la loro biodisponibilità risulta limitata. Le

concentrazioni rilevate nel plasma e nelle urine potrebbero, tuttavia, essere sottostimate. Gli attuali metodi di analisi, infatti, si basano sulla determinazione del catione flavilio, ma le antocianine una volta metabolizzate non possono essere ri-convertite nella forma cationica per acidificazione e per questo non sono determinabili.

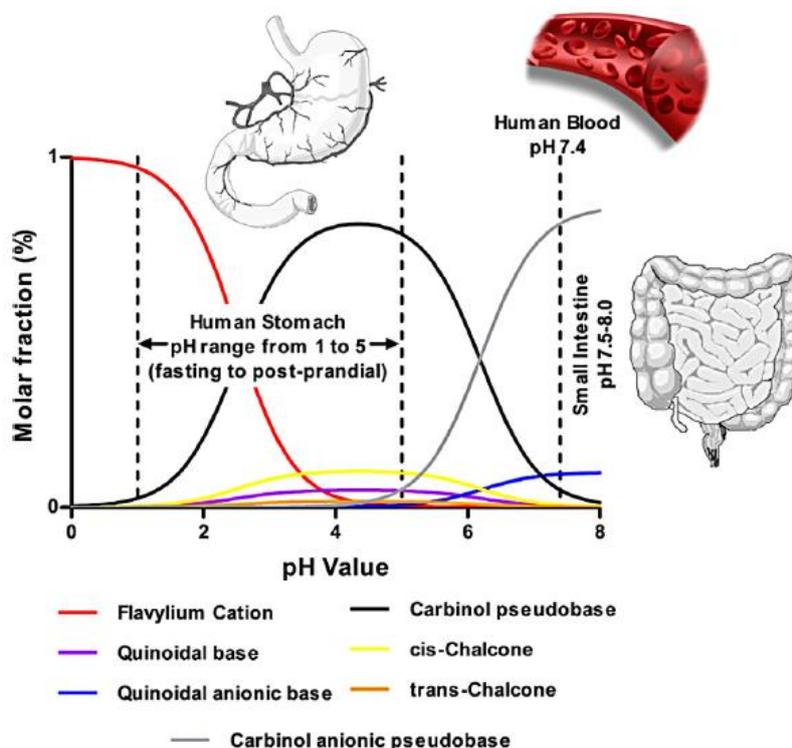


Figura 2.26: frazione molare delle forme delle antocianine in equilibrio tra loro in funzione del pH del tratto GI (Fernandes *et al.*, 2014).

In uno studio sull'assorbimento delle antocianine di mirtillo in cellule monolayer Caco-2 (Yi *et al.*, 2006), è stato osservato, inoltre, che antocianine che differiscono per l'aglicone o per la molecola di saccaride sono assorbite diversamente. In particolare, l'efficienza di trasporto della malvidina-3-glucoside è maggiore di quella della delphinidina-3-glucoside. Per uno stesso aglicone, invece, i glucosidi sono trasportati più efficacemente dei galattosidi.

### 2.3.6 Effetti sulla salute

Le antocianine hanno sulle funzioni fisiologiche dell'organismo diversi effetti che sono stati dimostrati con sistemi *in vitro*, esperimenti animali e *trial* sull'uomo. In particolare è stato dimostrato che le antocianine hanno un'azione antiossidante mediante la quale inibiscono l'ossidazione delle LDL e del metil linoleato, promuovono l'acuità della vista, hanno un effetto antidiabetico, un effetto vasoprotettore e fungono da agenti antitumorali (E-S. M. Abdel-Aal, 2011).

### 2.3.6.1 Azione antiossidante

Numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che le antocianine e le antocianidine sono potenti antiossidanti efficaci contro i radicali liberi e l'ossidazione delle LDL nell'uomo. La loro capacità antiossidante è comparabile, o talvolta maggiore, a antiossidanti come l' $\alpha$ -tocoferolo, l'acido ascorbico, la rutina, il BHT ed il BHA. I meccanismi mediante i quali le antocianine esplicano la loro azione antiossidante sono complessi e tuttora poco chiari (E-S. M. Abdel-Aal, 2011).

L'attività antiossidante delle antocianine è influenzata dalla loro struttura, in particolare dalla glicosilazione e dal numero/tipo di sostituenti acilici. La capacità di fungere da *radical scavenger* è massima quando è presente un gruppo -OH libero sull'anello B. Quindi le antocianidine hanno una maggiore attività dei rispettivi glicosidi.

L'attività antiossidante nei confronti dei radicali dell'ossigeno (ROS) è stata osservata sia *in vitro* che *in vivo*. In particolare, l'inibizione dell'ossidazione delle LDL da parte delle antocianine impedisce la formazione di placche aterosclerotiche a livello delle arterie e quindi previene l'insorgenza di malattie cardiovascolari, tuttavia il meccanismo non è noto (Shipp e Abdel-Aal, 2010).

### 2.3.6.2 Acuità visiva

Il primo effetto benefico riportato per le antocianine è stato quello sulla vista. La maggior parte dei dati inerenti l'effetto delle antocianine sulla vista è stata ottenuta da *trial* randomizzati, a doppio cieco, con placebo e *cross-over* (Shipp e Abdel-Aal, 2010).

In particolare queste sono in grado di modulare *in vitro* gli effetti avversi dell'A2E, pigmento che si accumula nelle cellule epiteliali della retina danneggiandole. Tali danni evolvono in degenerazione maculare senile.

### 2.3.6.3 Proprietà anti-diabetiche

Diversi studi sia *in vitro* che su animali hanno evidenziato che le antocianine possiedono attività antidiabetica e possono aiutare nel prevenire l'obesità.

In particolare, uno studio *in vitro* volto a valutare il rilascio di glucosio dalle cellule  $\beta$  del pancreas, in seguito a stimolazione con antocianine ed antocinidine, ha evidenziato che tali molecole promuovono la produzione di insulina (Jayaprakasam *et al.*, 2005). La capacità di secernere tale ormone varia da molecola a molecola. A concentrazioni di glucosio comprese tra 4-10 mmol/L, la più potente è risultata la delfinidin-3-glucoside, mentre a concentrazioni minori la più attiva è la cianidina-3-glucoside. Uno studio condotto da Matsui *et al.* (2001) ha evidenziato che estratti contenenti antocianine possono inibire, sia *in vitro* che nei ratti, l' $\alpha$ -glucosidasi, enzima addetto alla scissione del glucosio.

Oltre ad avere attività antidiabetica, le antocianine sono risultate importanti anche nella prevenzione dell'obesità. Guo *et al.* (2007) hanno dimostrato che estratti di riso nero, ricchi di antocianine, sono in grado di eliminare l'intolleranza al glucosio e l'iperlipidemia in ratti sottoposti per quattro settimane a diete ricche di fruttosio.

#### 2.3.6.4 Effetto antitumorale

Studi *in vitro* hanno suggerito che l'attività antitumorale delle antocianine può essere dovuta al loro effetto anti-proliferativo, pro-ossidante e apoptotico oltre che alla loro capacità di regolare l'espressione genica (E-S. M. Abdel-Aal, 2011). Studi sugli animali e sull'uomo sono invece limitati. Hagiwara *et al.* (2001) hanno studiato l'effetto del mais rosso, ricco di antocianine, in ratti affetti da carcinoma colon-rettale ed è emerso che nei ratti alimentati per 36 settimane con mais rosso l'incidenza della patologia era significativamente ridotta. Anche Kang *et al.* (2003) hanno trovato una riduzione di adenomi cecali in topi alimentati con diete addizionate di antocianine.

### 2.3.7 Analisi delle antocianine negli alimenti

L'analisi delle antocianine in matrici alimentari solide, quali i cereali, richiede una fase di estrazione dal campione e purificazione dell'estratto. Questo è, poi, sottoposto ad analisi quali-quantitativa mediante cromatografia.

#### 2.3.7.1 Estrazione e purificazione

L'estrazione delle antocianine è generalmente effettuata usando metanolo o etanolo acidificati con acido cloridrico 1,0 M (15%) così da ottenere l'aglicone nella forma di catione flavilio, altamente stabile in mezzi acidi (Shipp e Abdel-Aal, 2010).

Poiché l'acido cloridrico può causare l'idrolisi parziale del legame glicosidico o dei gruppi acilici, soprattutto nei casi in cui le antocianine sono acilate con acidi dicarbossilici come l'acido malonico, alcuni autori suggeriscono di utilizzare acidi deboli come acido tartarico e acido citrico (Escribano-Bailón *et al.*, 2004). Occorre notare, inoltre, che sebbene l'acido stabilizzi le antocianine, questo può determinare dei cambiamenti della loro forma nativa rompendo i legami con metalli, co-pigmenti ed altre molecole (Wrolstad, 2011).

L'uso di acidi deboli come l'acido trifluoroacetico consentirebbe invece di aumentare l'efficacia di estrazione (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Il pH ha un grande influenza sul colore delle antocianine, sull'assorbanza e sulla loro estraibilità. A pH>5, l'estraibilità del *blue e purple wheat* diminuisce del 94% rispetto all'estrazione a pH=1. Al contrario innalzando la temperatura di estrazione da 25°C a 60°C l'assorbanza aumenta del 15% (Shipp e Abdel-Aal, 2010).

Per quanto riguarda la scelta tra metanolo ed etanolo, Abdel-Aal e Hucl (1999) hanno riportato che non ci sono differenze significative nell'assorbanza o nell'efficienza di estrazione tra i due solventi, per cui è preferibile usare etanolo per la minore tossicità.

Al contrario, Escribano-Bailón *et al.* (2004) riportano che l'estrazione con etanolo è meno efficiente di quella con metanolo. Questo dato è in accordo con Kapasakalidis *et al.* (2006).

L'etanolo presenta anche altri inconvenienti: è rimosso per evaporazione più difficilmente del metanolo, inoltre, se l'estrazione è condotta in presenza di calore, possono avvenire reazioni di esterificazione con gruppi carbossilici liberi che producono artefatti.

In alternativa all'etanolo e al metanolo, per l'estrazione di antocianine da frutti rossi è stato utilizzato anche l'acetone (Garcia-Viguera *et al.* 1998; Gil *et al.*, 2000).

Awika *et al.* (2005) hanno confrontato l'efficacia dell'estrazione di antocianine dal sorgo nero con metanolo acidificato (0,1% HCl) e con acetone acidificato (70%). Nell'estratto acetone non sono state identificate antocianine, plausibilmente perché queste avevano subito significative modifiche strutturali. Tale dato è confermato da Lu e Foo (2001) che hanno osservato la formazione di piranoantocianine a partire da antocianine mediata da acetone.

Wrolstad (2011) riporta, invece, l'uso di acetone per l'estrazione delle antocianine seguito da partizione con cloroformio. Tale metodo consente di allontanare lipidi, clorofille ed altri composti insolubili in acqua dalle antocianine, dando rese di estrazione molto alte che richiedono una minima concentrazione e purificazione dell'estratto. Anche in questo caso occorre acidificare l'acetone non solo per la maggiore stabilità delle antocianine a pH acido, ma anche perché le miscele acetone/cloroformio, a contatto con alcali, sono esplosive.

In presenza di materiale lipidico o sostanze liposolubili (cere, clorofille) nell'estratto, è opportuno effettuare un lavaggio con esano per rimuovere i composti indesiderati.

Recentemente sono state introdotte altre tecniche per l'estrazione di sostanze fenoliche, che possono essere usate anche per le antocianine, come l'estrazione con liquidi pressurizzati (PLE) e l'estrazione con fluidi supercritici (SFE) (Escribano-Bailón *et al.*, 2004).

I metodi estrattivi descritti non sono specifici per le antocianine per cui l'estratto grezzo che si ottiene contiene anche altre sostanze come zuccheri e acidi organici (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Pertanto è necessario purificare l'estratto.

L'estrazione in fase solida (SPE) su C18 o Sephadex è la tecnica di purificazione degli estratti antocianici più utilizzata (Kraemer-Schafhalter *et al.*, 1998). Le antocianine si legano fortemente al materiale adsorbente mediante i loro gruppi ossidrilici liberi e poi sono eluite con una serie di solventi a polarità crescente. Quando la separazione delle antocianine è effettuata in HPLC con colonne C<sub>18</sub>, la purificazione con SPE non è sempre necessaria.

### 2.3.7.2 Separazione, identificazione e quantificazione mediante HPLC

La tecnica utilizzata più comunemente per la separazione e quantificazione delle antocianine è la cromatografia ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC) poiché consente simultaneamente di separare, identificare e quantificare le antocianine presenti in un estratto (Shipp e Abdel-Aal, 2010).

La separazione prevede l'impiego di colonne con una lunghezza variabile da 100 a 300 mm e con diametro interno da 4,6 mm. L'eluizione è ottenuta con sistemi binari usando solventi organici come metanolo e acetonitrile acidificati con acido acetico, perclorico o formico.

L'identificazione delle antocianine si basa sul confronto degli spettri UV-VIS e dei tempi di ritenzione con quelli di composti standard. Queste molecole hanno un ampio *range* di assorbimento della parte terminale blu dello spettro visibile con un massimo di assorbimento tra 500-535 nm. Tutte le antocianine presentano, tuttavia, due distintive bande di assorbimento: una nella regione UV (260-280 nm) ed un'altra nella regione del visibile (490-550 nm) (Wrolstad, 2011). Lo spettro UV-VIS di un'antocianina fornisce informazioni sulla natura dell'antocianidina, del glicosile e su eventuali gruppi acilici (da Costa *et al.*, 2000).

La pelargonidina, ad esempio, ha un massimo di assorbimento compreso tra 502-506 nm, la cianidina tra 512-520 nm, la peonidina tra 517-520 nm, la delphinidina a 525 nm, la petunidina tra 526-529 e la malvidina a 544 nm (Abdel-Aal *et al.*, 2006).

Il rapporto tra l'assorbanza a 440 nm e l'assorbanza massima ( $A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ ) di un'antocianina avente il gruppo glicosidico sul C<sub>3</sub> è quasi il doppio di quella della stessa antocianidina sostituita in posizione 5 oppure in posizione 3 e 5. In particolare se il rapporto è maggiore di 0,3 il picco corrisponde ad un'antocianina glicosilata in 3, mentre se è minore di 0,2 è un composto 3,5-glicosilato (Wrolstad, 2011). La presenza di acilazioni con acido cinnamico dà una terza banda di assorbimento nel *range* 310-360 nm. Inoltre, il rapporto tra l'assorbanza di tale banda e quella alla massima lunghezza d'onda fornisce il numero di gruppi acilici (Wrolstad, 2011). Se il rapporto è compreso tra 0,5 e 0,7 c'è una singola acilazione, altrimenti se il rapporto è compreso tra 0,8 e 1,1 sono presenti due gruppi acilici.

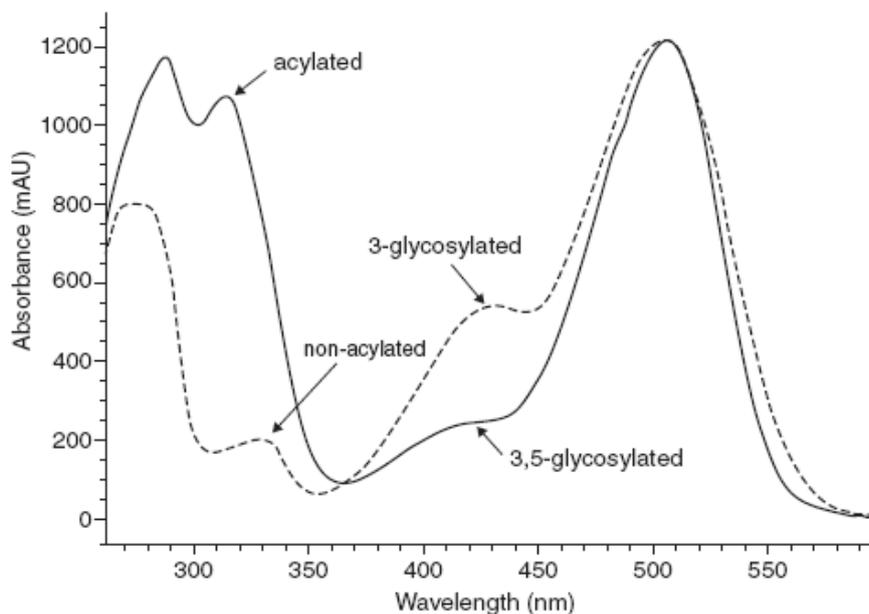


Figura 2.27: spettro UV-Vis di antocianine 3-glicosilate (non acilate; linea tratteggiata) e 3,5-glicosilate (acilate, linea continua) (Wrolstad, 2011)

I tempi di ritenzione dipendono, invece, dalla polarità delle antocianidine, dal numero di zuccheri legati all'aglicone e dai gruppi acilici legati agli zuccheri. Agliconi con un maggior numero di gruppi ossidrilici sono più polari e quindi hanno tempi di ritenzione minori. L'ordine di eluizione delle sei antocianidine più comuni è pertanto il seguente: delphinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina, malvidina (Shipp e Abdel-Aal, 2010). Per quanto riguarda l'effetto del numero di molecole di zucchero legato all'aglicone sui tempi di ritenzione, è stato osservato che i tri-glucosidi sono eluiti prima dei di-glucosidi i quali a loro volta sono eluiti prima dei mono-glucosidi in quanto più polari. Inoltre, i glucosidi degli esosi sono eluiti prima dei glucosidi dei pentosi. Ad esempio, i 3-galattosidi eluiscono prima dei 3-arabinosidi (Wrolstad, 2011).

L'acilazione degli zuccheri decresce la polarità e quindi aumentano i tempi di ritenzione.

## 2.4 PROANTOCIANIDINE

### 2.4.1 Struttura

Le proantocianidine sono una classe dei composti fenolici conosciuta anche con il nome di tannini condensati. Il nome deriva dal fatto che tali sostanze, se ossidate in ambiente fortemente acido, si trasformano in antocianidine da cui si differenziano per essere incolori.

Chimicamente sono oligomeri o polimeri dei flavan-3-oli (Pérez-Jiménez e Torres, 2011) (Figura 2.28).

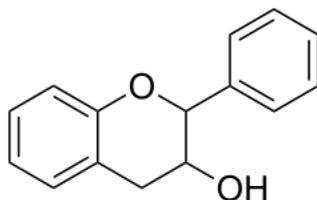


Figura 2.28: struttura del flavan-3-olo

Le proantocianidine sono una classe eterogenea di composti: presentano, infatti, notevoli differenze strutturali a seconda del grado di idrossilazione degli anelli aromatici, della stereochimica del C dell'anello centrale, della presenza di sostituenti derivati dell'acido gallico e del tipo di legame tra le molecole flavanoliche (Monagas *et al.*, 2010).

Le più diffuse sono le procianidine e le prodelfinidine. Le prime sono costituite da (+) – catechina, (-) – epicatechina ed i rispettivi esteri gallici; invece, le seconde hanno come unità monomeriche (+) – gallo catechina, (-) – epigallo catechina ed i rispettivi esteri gallici. Le unità flavanoliche possono essere legate con legami C4→C8 o C4→C6, definiti di tipo B. In alcuni casi possono formarsi anche legami C2→O7 e C2→O5, detti di tipo A (Hellström e Mattila, 2008).

Le procianidine più diffuse in natura sono dimeri e sono rappresentate da procianidina B1, procianidina B2, procianidina B3 e procianidina B4, caratterizzate da un legame C4→C8. Le procianidine indicate come B5, B6, B7, B8 e B9 sono dimeri legati da legami C4→C6 e sono meno diffuse delle prime quattro. Le procianidine C sono, invece, dei trimeri.

Le prodelfinidine risultano più polari poiché contengono unità monomeriche triidrossilate (Figura 2.29).

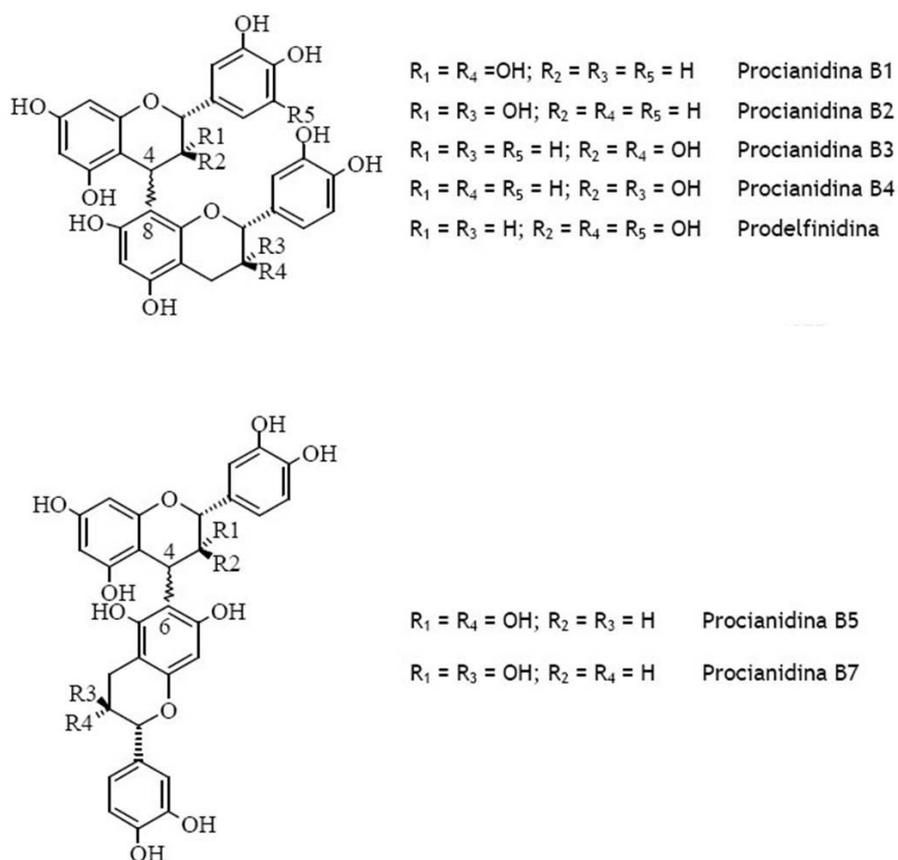


Figura 2.29: struttura di alcune delle più diffuse proantocianidine

Le proantocianidine sono presenti negli alimenti soprattutto in forma libera, cioè non legata (Hellström e Mattila, 2008). In questa forma sono dette “estraibili” e si differenziano dalle proantocianidine non-estraibili che invece sono legate alla parete cellulare o a proteine (Pérez-Jiménez e Torres, 2011). Il legame con la parete cellulare può essere dovuto a legami idrogeno o ad interazioni idrofobiche. L’adsorbimento sulla parete cellulare dipende, pertanto, dal numero di legami –OH in grado di formare legami idrogeno, dal numero di sostituenti arilici in grado di dare interazioni idrofobiche, dal grado di sostituzione con derivati dell’acido gallico o del rapporto tra (+)-catechina e (-)-epicatechina (Le Bourvellec *et al.*, 2005).

#### 2.4.2 Biodisponibilità ed assorbimento

Molti studi sugli animali e sull’uomo indicano che le proantocianidine oligomeriche o polimeriche non sono affatto assorbite (Del Rio *et al.*, 2013).

In uno studio recente (Kahle *et al.*, 2007) è stato dimostrato che tali molecole arrivano inalterate nell’intestino crasso dove sono catabolizzate dalla microflora batterica intestinale, producendo acidi fenolici e componenti aromatici che sono assorbiti dal sistema circolatorio e sono espulsi con le urine. Secondo un modello *in vitro* dell’ambiente gastrointestinale (Kahle *et al.*, 2011), le

proantocianidine sono degradate a flavan-3-oli facilmente assorbibili; tuttavia, tali risultati non sono confermati da studi *in vivo* (Rios *et al.*, 2002; Tsang *et al.*, 2005).

I potenziali effetti benefici delle procianidine sono generalmente attribuiti ad acidi fenolici e valerolattoni ottenuti dalla loro rottura a livello intestinale (Del Rio *et al.*, 2013). Tuttavia, alcuni suggeriscono che tracce di procianidine inibiscono l'aggregazione piastrinica *in vitro* e sopprimono la sintesi del peptide vasocostrittore endotelina-1, a differenza di (-)-catechina ed (+)-epicatechina (Corder, 2008).

### 2.4.3 Effetti sulla salute

Le proantocianidine sono potenti *scavenger* dei radicali liberi e contribuiscono agli effetti benefici apportati dal consumo di alimenti che ne sono ricchi (Prior e Gu, 2005). La capacità antiossidante di tali molecole è circa 20 volte più grande di quella della vitamina C e 50 volte più grande di quella della vitamina E (Ahmed, 2007). Queste complesse molecole hanno un'attività anti-tumorale concentrazione-dipendente (Seiler *et al.*, 2006) e sono in grado di inibire la crescita batterica (Shan *et al.*, 2007). Le forme oligomeriche delle proantocianidine possiedono anche effetti immunomodulatori (Foo *et al.*, 2000). Alcuni studi hanno mostrato che il consumo di cibi ricchi in tali molecole bioattive migliora il circolo sanguigno, sia a breve che a lungo termine (Santos-Buelga e Scalbert, 2000). Altri effetti benefici sul sistema cardio-vascolare sono rappresentati da vasodilatazione, diminuzione dell'aggregazione piastrinica (Vitseva *et al.*, 2005), ridotta ossidazione delle LDL (Shafiee *et al.*, 2003) e modulazione di reazioni associate all'infiammazione (Beecher, 2004).

### 2.4.4 Analisi delle proantocianidine

Estrarre e quantificare le proantocianidine presenti negli alimenti è un compito complesso a causa della difficoltà di separare tali molecole da altri composti fenolici. A questo si aggiunge il fatto che l'ampia gamma di proprietà chimiche e di pesi molecolari di questi composti ne rendono difficile la purificazione. Di seguito sono riportate le fasi del processo analitico e le problematiche connesse ad ognuna di esse.

#### 2.4.4.1 Estrazione e purificazione

##### 2.4.4.1.1 Proantocianidine estraibili

Le proantocianidine estraibili possono essere estratte con diversi solventi organici come metanolo assoluto, etanolo, metanolo acidificato, acetone, acqua o con loro miscele (Naczek e Shahidi, 2004).

Recentemente, Hellström e Mattila (2008) hanno confrontato le efficienze estrattive di tre miscele usate comunemente: 1) acetone:acqua 80:20, 2) acetone:acqua:acido acetico 70:29,5:0,5 e 3)

acetone:metanolo:acqua 2:2:1. Dalle prove sperimentali è emerso che la miscela acetone:metanolo:acqua è la più efficace. Infatti, combina i vantaggi dell'acetone, che è un forte *breaker* dei legami idrogeno, ed è migliore di altri solventi per estrarre proantocianidine polimeriche (Rohr *et al.*, 2000), a quelli del metanolo. Quest'ultimo è efficace nell'estrazione delle catechine (Arts e Hollman, 1998) e delle proantocianidine oligomeriche (Alonso-Salces *et al.*, 2005). Inoltre, il metanolo può impedire la perdita per ossidazione dei flavan-3-oli in quanto inattiva gli enzimi ossidativi (Kähkönen *et al.*, 2001).

Negli estratti organici così ottenuti possono essere presenti zuccheri e fenoli interferenti che devono essere rimossi prima dell'analisi quantitativa. Generalmente la purificazione degli estratti è eseguita mediante SPE con colonne C18 (De Rijke *et al.*, 2006). Tuttavia, Hellström e Mattila (2008) hanno trovato che la capacità delle colonne C18 di adsorbire le proantocianidine può essere seriamente limitata dalla presenza di altri composti fenolici, pertanto è preferibile utilizzare colonne poliammidiche.

#### 2.4.4.1.2 Proantocianidine non estraibili

Nel residuo ottenuto dopo estrazione delle proantocianidine estraibili sono presenti le proantocianidine non estraibili. Pertanto, per la determinazione di queste ultime, il residuo da cui sono state estratte le proantocianidine solubili viene lavato, liofilizzato e sottoposto ad idrolisi. Questa può essere condotta in condizioni acide, in presenza di butanolo:HCl, in condizioni alcaline o per via enzimatica (Pérez-Jiménez e Torres, 2011). In alternativa è possibile eseguire una depolimerizzazione acido-catalizzata, in presenza di nucleofili come toluene o benzilmercaptano.

#### 2.4.4.2 Quantificazione

##### 2.4.4.2.1 Quantificazione per via spettrofotometrica

Per quantificare le proantocianidine possono essere usati i seguenti metodi spettrofotometrici: saggio del butanolo acido e saggio della vanillina.

##### 2.4.4.2.1.1 Saggio del butanolo acido

Questo saggio si basa sulla conversione delle proantocianidine in antocianidine. In un acido minerale diluito, generalmente HCl, le proantocianidine sono, infatti, scisse in carbocationi e nell'unità flavanolica terminale. I carbocationi sono convertiti rapidamente in antocianidine che presentano assorbimento caratteristico intorno ai 550 nm e che possono essere determinate spettrofotometricamente. Tale metodo presenta, tuttavia, dei limiti: la trasformazione delle proantocianidine in antocianine monomeriche può non essere completa e questo condiziona lo sviluppo del colore che dipende dalla struttura delle antocianidine, dal grado di polimerizzazione

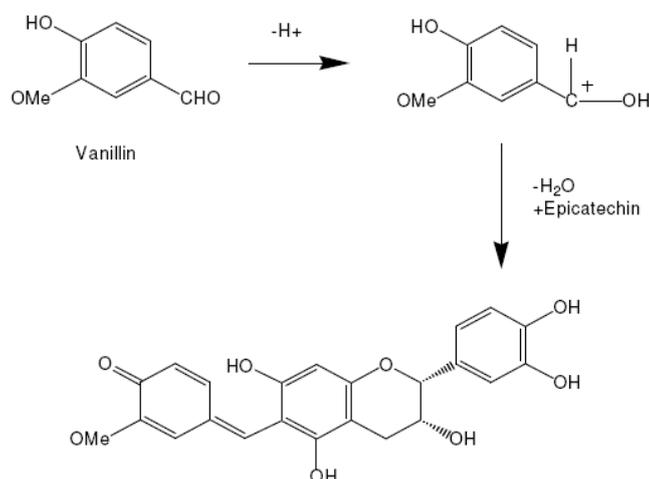
delle proantocianidine e da altre reazioni che possono avvenire (Scalbert, 1992). Inoltre, le procianidine con maggior grado di polimerizzazione producono più antocianidine dei dimeri e questo porta ad una sovrastima dei composti presenti (Hümmer e Schreier, 2008). Inoltre, la struttura delle proantocianidine influenza la resa e la cinetica di reazione (Hümmer e Schreier, 2008).

Per ovviare a questi inconvenienti, Porter *et al.* (1986) hanno suggerito di usare ioni ferrici sottoforma di  $\text{FeCl}_3$  per accelerare l'ossidazione dei carbocationi. Occorre, inoltre, tener presente che l'acetone, ampiamente utilizzato in miscela con acqua per l'estrazione delle proantocianidine, interferisce e pertanto non può essere utilizzato a meno che l'estratto non sia completamente essiccato ed il residuo ridisciolto in un solvente compatibile con il saggio (Gessner e Steiner, 2005).

Tale saggio è più specifico del saggio della vanillina (Santos-Buelga e Scalbert, 2000).

#### 2.4.4.2.1.2 Saggio della vanillina

Tale saggio si basa sull'uso del reagente vanillina che reagisce con i flava-3-oli o con le unità terminali delle proantocianidine dando un complesso che ha assorbimento massimo a 510 nm. Questo è specifico per un ristretto numero di procianidine e diidrocalconi che hanno gruppi -OH in *meta* e un singolo legame in posizione 2,3 e sull'anello A (Hageman *et al.*, 1997). Di conseguenza, altri composti con sostituenti appropriati sull'anello fenolico possono potenzialmente reagire con la vanillina. Le antocianine possono interferire con il saggio a causa del loro assorbimento massimo a 520 nm.



2.30: reazione della vanillina con epicatechina

#### 2.4.4.2.2 Quantificazione per via cromatografica

La determinazione delle proantocianidine per cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) presenta degli inconvenienti dovuti al fatto che tali molecole si trovano frequentemente in miscele complesse, il che rende difficile la loro separazione. In RP-HPLC, la presenza di molti isomeri determina la sovrapposizione dei tempi di ritenzione di proantocianidine differenti e la separazione

di grandi polimeri ( $DP > 4$ ) non è sempre possibile (Rohr *et al.*, 2000). Per questo le proantocianidine sono spesso depolimerizzate prima dell'analisi in HPLC. La depolimerizzazione acido-catalizzata, in presenza di un adatto reagente nucleofilo come il benzilmercaptano o il floroglucinolo, converte le unità di flavan-3-olo nel corrispondente tioetere (o addotto floroglucinolo), mentre le unità terminali sono rilasciate come flavan-3-oli monomerici (Guyot *et al.*, 2001). Questo permette di determinare la natura e la proporzione delle unità costitutive delle proantocianidine, nonché di calcolare il loro grado di polimerizzazione. Tuttavia, nessuna informazione sulle proporzioni delle singole proantocianidine può essere ottenuta.

Nella quantificazione per via cromatografica i rivelatori a fluorescenza sono spesso preferiti agli UV/VIS. La quantificazione con detector UV/VIS si basa, infatti, sul coefficiente di estinzione molare di un unico composto e quindi può indurre a sottostimare. L'uso dei detector a fluorescenza consente di evitare questo inconveniente in quanto composti simili emettono alle stesse lunghezze d'onda.

## 2.5 BIBLIOGRAFIA DEL CAPITOLO

- Abdel-Aal, E.-S.M., Hucl, P., 1999. A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. *Cereal Chemistry Journal* 76, 350–354. doi:10.1094/CCHEM.1999.76.3.350
- Abdel-Aal, E., Wood, P.J., 2005. Specialty Grains for Food and Feed. American Association of Cereal Chemists.
- Adom, K.K., Liu, R.H., 2002. Antioxidant Activity of Grains. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6182–6187. doi:10.1021/jf0205099
- Adom, K.K., Sorrells, M.E., Liu, R.H., 2005. Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2297–2306. doi:10.1021/jf048456d
- Aggett, P.J., 2010. Population reference intakes and micronutrient bioavailability: a European perspective. *American Journal of Clinical Nutrition* 91, 1433S–1437S. doi:10.3945/ajcn.2010.28674C
- Ahmed, I., 2007. Study of enantioselective epoxidation, asymmetric reduction and synthesis of bioactive oligomeric flavonoids.
- Alonso-Salces, R.M., Barranco, A., Corta, E., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F., 2005. A validated solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues Comparison with pressurised liquid extraction. *Talanta* 65, 654–662. doi:10.1016/j.talanta.2004.07.051
- Alves-Rodrigues, A., Shao, A., 2004. The science behind lutein. *Toxicol. Lett.* 150, 57–83. doi:10.1016/j.toxlet.2003.10.031
- Arranz, S., 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 the diet. *Journal of Cereal Science* 51, 313–318. doi:10.1016/j.jcs.2010.01.006
- Arts, I.C.W., Hollman, P.C.H., 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 317S–325S.
- Arts, I.C.W., Hollman, P.C.H., 1998. Optimization of a Quantitative Method for the Determination of Catechins in Fruits and Legumes. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5156–5162. doi:10.1021/jf9805092
- Aura, A.-M., Martin-Lopez, P., O’Leary, K.A., Williamson, G., Oksman-Caldentey, K.-M., Poutanen, K., Santos-Buelga, C., 2005. In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur J Nutr* 44, 133–142. doi:10.1007/s00394-004-0502-2
- Awika, J.M., Rooney, L.W., Waniska, R.D., 2005. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 90, 293–301. doi:10.1016/j.foodchem.2004.03.058
- Beecher, G.R., 2004. Proanthocyanidins: Biological Activities Associated with Human Health. *Pharmaceutical Biology* 42, 2–20. doi:10.3109/13880200490893474
- Bendary, E., Francis, R.R., Ali, H.M.G., Sarwat, M.I., El Hady, S., 2013. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences* 58, 173–181. doi:10.1016/j.aos.2013.07.002
- Borrelli, G.M., De Leonardis, A.M., Platani, C., Troccoli, A., 2008. Distribution along durum wheat kernel of the components involved in semolina colour. *Journal of Cereal Science* 48, 494–502. doi:10.1016/j.jcs.2007.11.007

- Boulton, R., 2001. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 67–87.
- Britton, G., 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9, 1551–1558.
- Britton, G., Pfander, H., Liaaen-Jensen, S. (Eds.), 2009. *Carotenoids*. Birkhäuser Basel, Basel.
- Calvo, M.M., 2005. Lutein: A Valuable Ingredient of Fruit and Vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 671–696. doi:10.1080/10408690590957034
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., Galán-Vidal, C.A., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113, 859–871. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.001
- Castenmiller, J.J.M., West, C.E., Linssen, J.P.H., Hof, K.H. van het, Voragen, A.G.J., 1999. The Food Matrix of Spinach Is a Limiting Factor in Determining the Bioavailability of  $\beta$ -Carotene and to a Lesser Extent of Lutein in Humans. *J. Nutr.* 129, 349–355.
- Choi, D.-Y., Lee, Y.-J., Hong, J.T., Lee, H.-J., 2012. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin* 87, 144–153. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.11.014
- Clifford, M.N., 2000. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1063–1072. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1063::AID-JSFA605>3.0.CO;2-Q
- Cohen, J.H., Kristal, A.R., Stanford, J.L., 2000. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 61–68.
- Colle, I.J.P., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Met, K., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E., 2013. Processing tomato pulp in the presence of lipids: The impact on lycopene bioaccessibility. *Food Research International* 51, 32–38. doi:10.1016/j.foodres.2012.11.024
- Corder, R., 2008. Red wine, chocolate and vascular health: developing the evidence base. *Heart* 94, 821–823. doi:10.1136/hrt.2008.143909
- Craft, N.E., Soares, J.H., 1992. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and .beta.-carotene in organic solvents. *J. Agric. Food Chem.* 40, 431–434. doi:10.1021/jf00015a013
- da Costa, C.T., Horton, D., Margolis, S.A., 2000. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 881, 403–410.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Sczzocchio, B., Masella, R., 2010. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences* 11, 1321–1342. doi:10.3390/ijms11041321
- Davies, K., 2009. *Annual Plant Reviews, Plant Pigments and their Manipulation*. John Wiley & Sons.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., 2013. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 1818. doi:10.1089/ars.2012.4581
- De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.T., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr A* 1112, 31–63. doi:10.1016/j.chroma.2006.01.019
- Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., 2004. Anthocyanins in cereals. *J Chromatogr A* 1054, 129–141.

- E-S. M. Abdel-Aal, 2011. Anthocyanin-Pigmented Grain Products, in: *Advances in Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 77–109.
- Faria, A., Pestana, D., Azevedo, J., Martel, F., de Freitas, V., Azevedo, I., Mateus, N., Calhau, C., 2009. Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells - Putative involvement of GLUT2. *Mol Nutr Food Res* 53, 1430–1437. doi:10.1002/mnfr.200900007
- Faria, P.A., Fernandes, I., Mateus, N., Calhau, C., 2013. Bioavailability of Anthocyanins, in: Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M. (Eds.), *Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 2465–2487.
- Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R., 2007. *Fennema's Food Chemistry*, Fourth Edition. Taylor & Francis.
- Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., Mateus, N., 2014. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods* 7, 54–66. doi:10.1016/j.jff.2013.05.010
- Fратиани, A., Mignogna, R., Niro, S., Panfili, G., 2015. Determination of Lutein from Fruit and Vegetables Through an Alkaline Hydrolysis Extraction Method and HPLC Analysis. *Journal of Food Science* 80, C2686–C2691. doi:10.1111/1750-3841.13122
- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M.A., Martínez, J.A., 2009. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res.* 58, 537–552. doi:10.1007/s00011-009-0037-3
- García-Viguera, C., Zafrilla, P., Tomás-Barberán, F.A., 1998. The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochem. Anal.* 9, 274–277. doi:10.1002/(SICI)1099-1565(199811/12)9:6<274::AID-PCA416>3.0.CO;2-G
- Gee, J.M., DuPont, M.S., Day, A.J., Plumb, G.W., Williamson, G., Johnson, I.T., 2000. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J. Nutr.* 130, 2765–2771.
- Gessner, M., Steiner, D., 2005. Acid butanol assay for proanthocyanidins (condensed tannins), in: *Methods to Study Litter Decomposition*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Giada, M. de L.R., 2013. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. doi:10.5772/51687
- Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4581–4589.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy, in: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
- Goufo, P., Trindade, H., 2014. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols,  $\gamma$ -oryzanol, and phytic acid. *Food Sci Nutr* 2, 75–104. doi:10.1002/fsn3.86
- Guo, H., Ling, W., Wang, Q., Liu, C., Hu, Y., Xia, M., Feng, X., Xia, X., 2007. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. indica) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. *Plant Foods Hum Nutr* 62, 1–6. doi:10.1007/s11130-006-0031-7
- Guyot, S., Marnet, N., Drilleau, J., 2001. Thiolysis-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. *J. Agric. Food Chem.* 49, 14–20.

- Hageman, A., Zhao, Y., Johnson, S., 1997. Methods for determination of condensed and hydrolysable tannins in Antinutrients and phytochemicals in foods. American Chemical Society, pp. 170–181.
- Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T., 2001. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.* 171, 17–25.
- Hellström, J.K., Mattila, P.H., 2008. HPLC determination of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant materials. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7617–7624. doi:10.1021/jf801336s
- Hümmer, W., Schreier, P., 2008. Analysis of proanthocyanidins. *Mol Nutr Food Res* 52, 1381–1398. doi:10.1002/mnfr.200700463
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126, 1821–1835. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.026
- IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry, IUPAC—IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Nomenclature Of Carotenoids (Rules Approved 1974).
- Jackson, M.J., 1997. The assessment of bioavailability of micronutrients: introduction. *Eur J Clin Nutr* 51 Suppl 1, S1–2.
- Jayaprakasam, B., Vareed, S.K., Olson, L.K., Nair, M.G., 2005. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *J. Agric. Food Chem.* 53, 28–31. doi:10.1021/jf049018+
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Heinonen, M., 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4076–4082.
- Kahle, K., Huemmer, W., Kempf, M., Scheppach, W., Erk, T., Richling, E., 2007. Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10605–10614. doi:10.1021/jf071942r
- Kahle, K., Kempf, M., Schreier, P., Scheppach, W., Schrenk, D., Kautenburger, T., Hecker, D., Huemmer, W., Ackermann, M., Richling, E., 2011. Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *Eur J Nutr* 50, 507–522. doi:10.1007/s00394-010-0157-0
- Kang, S.-Y., Seeram, N.P., Nair, M.G., Bourquin, L.D., 2003. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 194, 13–19.
- Kapasakalidis, P.G., Rastall, R.A., Gordon, M.H., 2006. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4016–4021. doi:10.1021/jf052999l
- Kesarwani, A., Chiang, P.-Y., Chen, S.-S., Kesarwani, A., Chiang, P.-Y., Chen, S.-S., 2014. Distribution of Phenolic Compounds and Antioxidative Activities of Rice Kernel and Their Relationships with Agronomic Practice, Distribution of Phenolic Compounds and Antioxidative Activities of Rice Kernel and Their Relationships with Agronomic Practice. *The Scientific World Journal*, The Scientific World Journal 2014, 2014, e620171. doi:10.1155/2014/620171, 10.1155/2014/620171

- Koushan, K., Rusovici, R., Li, W., Ferguson, L.R., Chalam, K.V., 2013. The Role of Lutein in Eye-Related Disease. *Nutrients* 5, 1823–1839. doi:10.3390/nu5051823
- Kraemer-Schafhalter, A., Fuchs, H., Pfannhauser, W., 1998. Solid-phase extraction (SPE)—a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from aronia melanocarpa var Nero. *J. Sci. Food Agric.* 78, 435–440. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199811)78:3<435::AID-JSFA139>3.0.CO;2-Q
- Lambert, J.D., Hong, J., Yang, G.-Y., Liao, J., Yang, C.S., 2005. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 284S–291S.
- Le Bourvellec, C., Bouchet, B., Renard, C.M.G.C., 2005. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta* 1725, 10–18. doi:10.1016/j.bbagen.2005.06.004
- Lemmens, L., Colle, I., Van Buggenhout, S., Palmero, P., Van Loey, A., Hendrickx, M., 2014. Carotenoid bioaccessibility in fruit- and vegetable-based food products as affected by product (micro)structural characteristics and the presence of lipids: A review. *Trends in Food Science & Technology* 38, 125–135. doi:10.1016/j.tifs.2014.05.005
- Liu, R.H., 2007. Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science, The Contribution of Cereals to a Healthy Diet* 46, 207–219. doi:10.1016/j.jcs.2007.06.010
- Lucarini, M., Pedrielli, P., Pedulli, G.F., Cabiddu, S., Fattuoni, C., 1996. Bond Dissociation Energies of O–H Bonds in Substituted Phenols from Equilibration Studies. *J. Org. Chem.* 61, 9259–9263. doi:10.1021/jo961039i
- Maarit Rein: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins [WWW Document], n.d. URL <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/rein/> (accessed 11.9.15).
- Maiani, G., Castón, M.J.P., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I.G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., Schlemmer, U., 2009. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res* 53 Suppl 2, S194–218. doi:10.1002/mnfr.200800053
- Mamatha, B.S., Sangeetha, R.K., Baskaran, V., 2011. Provitamin-A and xanthophyll carotenoids in vegetables and food grains of nutritional and medicinal importance. *International Journal of Food Science & Technology* 46, 315–323. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02481.x
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747.
- Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., Matsumoto, K., 2001. alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. alpha-Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1952–1956.
- Matuschek, M.C., Hendriks, W.H., McGhie, T.K., Reynolds, G.W., 2006. The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. *J. Nutr. Biochem.* 17, 31–36. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.04.005
- McGhie, T.K., Walton, M.C., 2007. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 702–713. doi:10.1002/mnfr.200700092
- Mellado-Ortega, E., Hornero-Méndez, D., 2015. Carotenoids in cereals: an ancient resource with present and future applications. *Phytochem Rev* 1–18. doi:10.1007/s11101-015-9423-3

- Monagas, M., Quintanilla-López, J.E., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Lebrón-Aguilar, R., 2010. MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins. *J Pharm Biomed Anal* 51, 358–372. doi:10.1016/j.jpba.2009.03.035
- Moros, E.E., Darnoko, D., Cheryan, M., Perkins, E.G., Jerrell, J., 2002. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5787–5790.
- Naczki, M., Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Nutraceuticals Analysis* 41, 1523–1542. doi:10.1016/j.jpba.2006.04.002
- Naczki, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 1054, 95–111.
- Namitha, K.K., Negi, P.S., 2010. Chemistry and Biotechnology of Carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50, 728–760. doi:10.1080/10408398.2010.499811
- Ndolo, V.U., Beta, T., 2013. Distribution of carotenoids in endosperm, germ, and aleurone fractions of cereal grain kernels. *Food Chem* 139, 663–671. doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.014
- Negro C., Miceli A., 2011. *Metaboliti secondari e proprietà nutraceutiche*. aracne editrice.
- Nicolin, V., Grill, V., Micali, F., Narducci, P., Passamonti, S., 2005. Immunolocalisation of bilirubin translocase in mucosecretory and parietal cells of the rat gastric mucosa. *J. Mol. Histol.* 36, 45–50. doi:10.1007/s10735-004-2920-0
- Oliver, J., Palou, A., 2000. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *J Chromatogr A* 881, 543–555.
- Osganian, S.K., Stampfer, M.J., Rimm, E., Spiegelman, D., Manson, J.E., Willett, W.C., 2003. Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1390–1399.
- Otles, S., 2011. *Methods of Analysis of Food Components and Additives*, Second Edition. CRC Press.
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J.F., González-Aguilar, G.A., 2011. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science* 76, R6–R15. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2, 270–278.
- Panfili, G., Fratianni, A., Irano, M., 2004. Improved Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography Procedure for the Determination of Carotenoids in Cereals. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6373–6377. doi:10.1021/jf0402025
- Parr, A.J., Bolwell, G.P., 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* 80, 985–1012. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<985::AID-JSFA572>3.0.CO;2-7
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., Mattivi, F., 2003. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett.* 544, 210–213.
- Pérez-Jiménez, J., Torres, J.L., 2011. Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12713–12724. doi:10.1021/jf203372w
- Porrini, M., Riso, P., 2008. Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: a critical appraisal. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18, 647–650. doi:10.1016/j.numecd.2008.08.004
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G., 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25, 223–230. doi:10.1016/S0031-9422(00)94533-3

- Prior, R.L., Gu, L., 2005. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry* 66, 2264–2280. doi:10.1016/j.phytochem.2005.03.025
- Rao, A.V., Rao, L.G., 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* 55, 207–216. doi:10.1016/j.phrs.2007.01.012
- Rios, L.Y., Bennett, R.N., Lazarus, S.A., Rémésy, C., Scalbert, A., Williamson, G., 2002. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 1106–1110.
- Rodriguez-Amaya, D.B., 2015. *Food Carotenoids: Chemistry, Biology and Technology*. John Wiley & Sons.
- Rodriguez-Amaya, D.B., Institute, I.L.S., (Project), O., 2001. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. ILSI Press.
- Rodriguez-Bernando A, Costa HS. 2006. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: a review. *J Food Comp Anal* 19:97–111.
- Rohr, G.E., Meier, B., Sticher, O., 2000. Analysis of procyanidins, in: Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products (Part B)*. Elsevier, pp. 497–570.
- Rossi, L., Mazzitelli, S., Arciello, M., Capo, C.R., Rotilio, G., 2008. Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 33, 2390–2400. doi:10.1007/s11064-008-9696-7
- Saini, R.K., Nile, S.H., Park, S.W., 2015. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International* 76, Part 3, 735–750. doi:10.1016/j.foodres.2015.07.047
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A., 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1094–1117. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1094::AID-JSFA569>3.0.CO;2-1
- Scalbert, A., 1992. Quantitative Methods for the Estimation of Tannins in Plant Tissues, in: Hemingway, R.W., Laks, P.E. (Eds.), *Plant Polyphenols, Basic Life Sciences*. Springer US, pp. 259–280.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45, 287–306. doi:10.1080/1040869059096
- Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073S–85S.
- Seiler, N., Chaabi, M., Roussi, S., Gossé, F., Lobstein, A., Raul, F., 2006. Synergism between apple procyanidins and lysosomotropic drugs: potential in chemoprevention. *Anticancer Res.* 26, 3381–3385.
- Shafiee, M., Carbonneau, M.-A., Urban, N., Descomps, B., Leger, C.L., 2003. Grape and grape seed extract capacities at protecting LDL against oxidation generated by Cu<sup>2+</sup>, AAPH or SIN-1 and at decreasing superoxide THP-1 cell production. A comparison to other extracts or compounds. *Free Radic. Res.* 37, 573–584.
- Shan, B., Cai, Y.-Z., Brooks, J.D., Corke, H., 2007. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5484–5490. doi:10.1021/jf070424d
- Shipp, J., Abdel-Aal, E.-S.M., 2010. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *Food Science Journal* 4, 7–22. doi:10.2174/1874256401004010007

- Skibsted, L.H., 2012. Carotenoids in antioxidant networks. Colorants or radical scavengers. *J. Agric. Food Chem.* 60, 2409–2417. doi:10.1021/jf2051416
- Stalikas, C.D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Science* 30, 3268–3295. doi:10.1002/jssc.200700261
- Stintzing, F.C., Carle, R., 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology* 15, 19–38. doi:10.1016/j.tifs.2003.07.004
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, J.-L., Rémésy, C., 2003. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J. Nutr.* 133, 4178–4182.
- Tan, J., Baisakh, N., Oliva, N., Parkhi, V., Rai, M., Torrizo, L., Datta, K., Datta, S.K., 2005. The screening of rice germplasm, including those transgenic rice lines which accumulate  $\beta$ -carotene in their polished seeds, for their carotenoid profile. *International Journal of Food Science & Technology* 40, 563–569. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.00971.x
- Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 81, 853–876. doi:10.1002/jsfa.885
- Tsang, C., Auger, C., Mullen, W., Borner, A., Rouanet, J.-M., Crozier, A., Teissedre, P.-L., 2005. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br. J. Nutr.* 94, 170–181.
- Unlu, N.Z., Bohn, T., Francis, D., Clinton, S.K., Schwartz, S.J., 2007. Carotenoid absorption in humans consuming tomato sauces obtained from tangerine or high-beta-carotene varieties of tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1597–1603. doi:10.1021/jf062337b
- Van Hung, P.V., Hatcher, D.W., 2011. Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) quantification of carotenoids in durum wheat: Influence of genotype and environment in relation to the colour of yellow alkaline noodles (YAN). *Food Chemistry* 125, 1510–1516. doi:10.1016/j.foodchem.2010.10.078
- Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A., Scalfi, L., Fogliano, V., 2007. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J. Nutr.* 137, 2043–2048.
- Vitseva, O., Varghese, S., Chakrabarti, S., Folts, J.D., Freedman, J.E., 2005. Grape seed and skin extracts inhibit platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 46, 445–451.
- Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J., Rissanen, T.H., 2006. Carotenoids and cardiovascular health. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1265–1271.
- West, C.E., Castenmiller, J.J., 1998. Quantification of the “SLAMENGI” factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. *Int J Vitam Nutr Res* 68, 371–377.
- West, C.E., Eilander, A., van Lieshout, M., 2002. Consequences of revised estimates of carotenoid bioefficacy for dietary control of vitamin A deficiency in developing countries. *J. Nutr.* 132, 2920S–2926S.
- Wrolstad, 2011. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* Late Subscriber Order. John Wiley & Sons Inc.
- Wrolstad, R.E., Durst, R.W., Lee, J., 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology, Pigments in Food* 3rd International Congress on Pigments in Food 16, 423–428. doi:10.1016/j.tifs.2005.03.019

- Wu, X., Pittman, H.E., Prior, R.L., 2006. Fate of anthocyanins and antioxidant capacity in contents of the gastrointestinal tract of weanling pigs following black raspberry consumption. *J. Agric. Food Chem.* 54, 583–589. doi:10.1021/jf052108+
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L., 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 21, 381–406. doi:10.1146/annurev.nutr.21.1.381
- Yi, W., Akoh, C.C., Fischer, J., Krewer, G., 2006. Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by caco-2 human intestinal cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5651–5658. doi:10.1021/jf0531959

## **2.6 SITOGRAFIA**

[www.goldenrice.org](http://www.goldenrice.org)

## Capitolo 3

# **MATERIALI E METODI**

---

In questo capitolo sono descritti i materiali ed i metodi utilizzati nella fase sperimentale del lavoro. Per quanto riguarda i materiali, sono riportati il piano di campionamento, la preparazione e la conservazione dei campioni. Sono descritte, poi, le procedure analitiche utilizzate per definire la composizione centesimale, i parametri del colore ed il contenuto in molecole bioattive.

---

## 3 MATERIALI E METODI

### 3.1 CAMPIONAMENTO

Il campionamento è stato condotto con lo scopo di raccogliere campioni di riso di varietà differenti con pericarpo pigmentato disponibili sul mercato italiano, sia di produzione nazionale che estera.

Inizialmente, attraverso la consultazione dei registri nazionali delle varietà agrarie ([www.assosementi.it](http://www.assosementi.it)) sono state individuate le varietà di riso pigmentato coltivate in Italia e, successivamente, si è proceduto a reperire i campioni che sono stati forniti dall'Ente Nazionale Risi, da alcune aziende agricole produttrici o acquistate in negozi specializzati.

In totale sono state campionate dieci varietà di riso: cinque varietà italiane, due varietà francesi, una varietà canadese e due varietà thailandesi. Delle dieci varietà, sei avevano pericarpo di colore nero (Figura 3.1) e quattro di colore rosso-bruno (Figura 3.2). Nove delle varietà selezionate appartengono alla specie *Oryza sativa* L., mentre una appartiene alla specie *Zizania aquatica* ed è definito "riso selvatico" o "wild" (Tabella 3.1).

L'Ente risi ha fornito lotti da 10 kg di campione ciascuno conservati in sacchi di tela, mentre per ogni varietà proveniente da aziende agricole o dai negozi specializzati sono state raccolte almeno due confezioni appartenenti a lotti diversi. Queste sono state miscelate al fine di ottenere campioni primari (batch) che sono stati conservati al buio, a 4°C e in atmosfera inerte per prevenirne eventuali fenomeni ossidativi ed eventuali reazioni di isomerizzazione a carico delle molecole oggetto di studio. I campioni primari sono stati etichettati, in base alla colorazione del pericarpo e della provenienza, con le sigle riportate in (Tabella 3.1). Attraverso la consultazione del database "DOOR" dell'Unione Europea (<http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html>), per le varietà italiane ed europee è stata accertata l'eventuale denominazione di prodotto IGP o DOP: solo uno dei campioni oggetto di studio, il Riz Rouge de Camargue, ha ricevuto la denominazione IGP, la cui registrazione è stata pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale Europea il 06/06/2000.



Figura 3.1: campioni di riso con pericarpo nero oggetto di studio (N(IT)1, N(IT)2, N(IT)3, N(IT)4 = varietà italiane; N(TH)1 = varietà thailandese; N(CA)1 = varietà canadese)

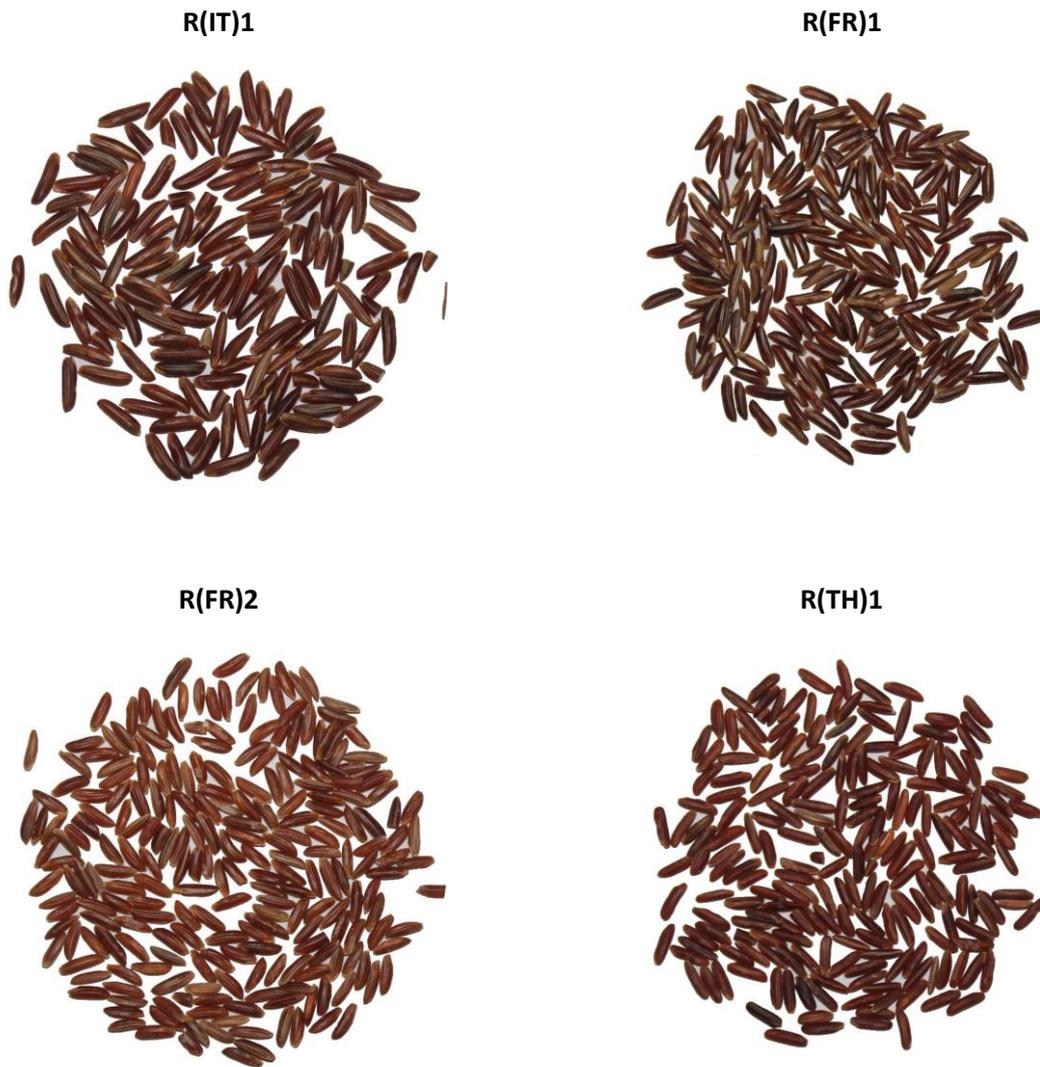


Figura 3.2: campioni di riso con pericarpo rosso oggetto di studio (R(IT)1 = varietà italiana; R(FR)1 e R(FR)2 = varietà francesi; R(TH)1 = varietà thailandese)

Campione	Specie	Varietà	Colore del chicco	Sigla	Nome commerciale	Fornitore	Origine
1	<i>Oryza sativa</i> L.	Otello	Nero	N(IT)1	Riso Nero di Baraggia	Azienda agricola Zaccaria Silvio Salussola (BI) www.risozaccaria.com	Italia
2	<i>Oryza sativa</i> L.	Venere	Nero	N(IT)2	-	Ente Nazionale Risi www.enterisi.it	Italia
3	<i>Oryza sativa</i> L.	Nerone	Nero	N(IT)3	Riso Nerone Integrale	Fior di loto www.fiordiloto.it	Italia
4	<i>Oryza sativa</i> L.	Artemide	Nero	N(IT)4	Artemide	Azienda agricola Luigi e Carlo Guidobono Cavalchini Casalbeltrame (NO) www.risobuono.it	Italia
5	<i>Oryza sativa</i> L.	Thai	Nero	N(TH)1	Riso thai nero	Bottega solidale www.bottegasolidale.com	Tailandia
6	<i>Zizania aquatica</i>	Selvatico canadese	Nero-verde scuro	N(CA)1	Riso selvatico canadese	Baule volante www.baulevolante.it	Canada
7	<i>Oryza sativa</i> L.	Ermes	Rosso	R(IT)1	-	Ente Nazionale Risi www.enterisi.it	Italia
8	<i>Oryza sativa</i> L.	Riso Camargue	Rosso	R(FR)1	Riz Rouge de Camargue	Gallo www.risogallo.it	Francia
9	<i>Oryza sativa</i> L.	-	Rosso	R(FR)2	Riso Rosso lungo semintegrale	Baule volante www.baulevolante.it	Francia
10	<i>Oryza sativa</i> L.	Thai	Rosso	R(TH)1	Riso thai rosso	Fior di loto www.fiordiloto.it	Tailandia

Tabella 3.1: caratteristiche dei campioni oggetto di studio

## **3.2 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI CRUDI PER ANALISI**

I campioni per analisi sono stati ottenuti a partire dai campioni primari mediante il metodo della quartatura a superficie. Le granelle di ogni campione primario sono state disposte su un piano a formare un quadrato che è stato diviso in quattro parti seguendo le due diagonali. Due delle parti opposte sono state scartate e le altre due nuovamente miscelate. Quindi si è proceduto ripetutamente alla formazione di un nuovo quadrato e allo scarto di due delle parti, fino ad ottenere un campione da laboratorio di circa 200 grammi. Prima di ciascuna analisi, una quantità del campione da laboratorio, sufficiente ad eseguire ciascun test e le necessarie repliche, è stata macinata con un macinello refrigerato ad acqua (Janke&Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Germania) fino ad ottenere uno sfarinato omogeneo che è stato setacciato con un setaccio avente luce di maglie da 250  $\mu\text{m}$ .

## **3.3 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI COTTI PER ANALISI**

### **3.3.1 Cottura dei campioni di riso**

I campioni cotti per analisi sono stati preparati a partire dai campioni da laboratorio crudi. La cottura è stata eseguita in modo da simulare una preparazione di tipo “risotto” nella quale l’acqua è aggiunta sottoforma di brodo e viene completamente riassorbita dai chicchi di riso. Pertanto, le granelle sono state pesate e collocate in una bottiglia di vetro pyrex. È stata aggiunta acqua distillata alla temperatura di 80°C e la bottiglia è stata chiusa e posta in bagno d’acqua a 90°C. Il rapporto tra il peso del campione (g) ed il volume di acqua (mL) scelto per la cottura, dopo prove preliminari, è stato di 1:2. Quindi si è proceduto alla cottura del campione fino a completo assorbimento dell’acqua aggiunta. Per controllare lo stato di cottura, alcuni chicchi sono stati posti tra due vetrini e schiacciati per verificare la scomparsa del nucleo amilaceo. Poi i campioni sono stati poi trasferiti su piastre in acciaio INOX, sono stati lasciati raffreddare e congelati rapidamente.

### **3.3.2 Liofilizzazione e conservazione dei campioni di riso cotti**

I campioni di riso cotti e congelati sono stati liofilizzati (Figura 3.3), poi sminuzzati in porzioni grossolane con mortaio e pestello ed infine macinati con un macinello refrigerato ad acqua (Janke&Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Germania) fino ad ottenere uno sfarinato omogeneo setacciato con un setaccio avente luce di maglie da 250  $\mu\text{m}$ . I campioni così ottenuti sono stati conservati in essiccatore fino all’esecuzione delle analisi.



(A)



(B)

Figura 3.3: campioni di riso cotti e liofilizzati (A)= N(IT)2, (B)= R(IT)1

### 3.4 CLASSIFICAZIONE MERCEOLOGICA

In base alla legge del 18 marzo 1958 n. 325, modificata dalla legge del 5 giugno 1962 n. 586, tuttora in vigore, il riso può essere classificato in base alla lunghezza dei chicchi.

In questo studio, da un campione di laboratorio sono stati selezionati casualmente dieci chicchi e ne è stata misurata la lunghezza utilizzando un calibro. Le lunghezze sono state espresse in millimetri e ciascuna varietà è stata classificata in base alla media delle lunghezze misurate.

### 3.5 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DI BASE

#### 3.5.1 Determinazione del contenuto in umidità

La determinazione del contenuto in umidità è stata effettuata secondo il metodo standard ICC No. 110/1 (ICC Standard Methods, 2003). In dettaglio, una quantità nota di campione per analisi, pari a circa 10 g, è stata posta in un pesafiltro pre-condizionato in stufa a 130°C. Il campione è stato essiccato in stufa a 130°C fino al raggiungimento del peso costante.

#### 3.5.2 Determinazione del contenuto proteico

Il contenuto proteico è stato determinato secondo il metodo standard ICC No. 105/2 (ICC Standard Methods, 2003).

La procedura descritta è una modifica del metodo Kjeldhal che prevede una fase di mineralizzazione dell'azoto organico presente nel campione con acido solforico concentrato, in presenza di solfato di rame come catalizzatore. Durante tale fase, l'azoto organico presente nel campione è trasformato in azoto inorganico sottoforma di solfato di ammonio. Quest'ultimo viene distillato in corrente di vapore in presenza di idrossido di sodio al 40% liberando ammoniaca che viene raccolta in acido borico così da ottenere borato d'ammonio.

L'azoto ammoniacale presente come borato d'ammonio viene poi titolato con acido solforico 0,1 N. Il contenuto proteico del campione è ottenuto moltiplicando il contenuto di azoto totale per un fattore di conversione pari a 5,95.

La determinazione del contenuto proteico è stata eseguita in modo semiautomatico utilizzando una unità di digestione Büchi Digestion Unit K-435 e un distillatore Büchi Kjelflex – K 360 (BÜCHI Italia s.r.l., Milano, Italia).

### 3.5.3 Determinazione del contenuto in ceneri

Il contenuto in ceneri di un alimento è la quantità di sostanze inorganiche (minerali) che residuano dopo la completa combustione della materia organica. Poiché nei cereali le sostanze minerali sono presenti in misura significativa negli strati corticali esterni della cariosside, la percentuale in ceneri è espressione del livello di integralità della matrice. Questa determinazione è eseguita secondo il metodo UNI EN ISO 2171:2010. Circa 10 g di campione sono posti in una capsula di platino, precedentemente tarata, e bagnati con 1-2 mL di alcol etilico per favorire l'inizio della combustione. La capsula è, quindi, posta in forno a muffola a  $550\pm 10^\circ\text{C}$  fino al completo incenerimento del campione. Il processo è completo quando si ottiene un residuo bianco (ceneri bianche). Nel caso in cui rimangano dei residui carboniosi, il campione viene posto nuovamente in forno a muffola. Poi le capsule contenenti i residui sono raffreddate in essiccatore e pesate. Il peso del residuo, riferito a 100 g di campione, rappresenta il contenuto in ceneri.

### 3.6 ANALISI DEL COLORE: MISURE IN RIFLETTANZA DIFFUSA

L'analisi del colore è stata condotta sulle granelle intere dei campioni di riso utilizzando un colorimetro Konica Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing Europe B.V., Cinisello Balsamo (MI), Italia). Il sistema è stato calibrato su una piastra di ceramica standard ( $Y= 93,00$ ;  $X=0,3160$ ;  $y= 0,3319$ ). Il campione (circa 10 g) è stato posto in un apposito cilindro, avente la superficie piana in vetro a bassa riflettanza, così da impedire la dispersione del campione e l'infiltrazione di materiale nello strumento di misura. Sulla superficie piana del cilindro viene posta la testa di misura e le determinazioni sono effettuate utilizzando come sorgente un illuminante standard  $D_{65}$  che corrisponde alla luce del giorno media (inclusa la regione degli UV), e un osservatore standard a  $10^\circ$ . Per ogni campione sono state effettuate 5 repliche.

Il colore è stato espresso dagli indici  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  dello spazio di colore tridimensionale CIELab. Il sistema CIELab deriva da un processo di normalizzazione matematica dello spazio tridimensionale, che trasforma i valori tristimolo  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$  nelle funzioni  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ .

In questo spazio,  $L^*$  indica la luminosità che può assumere valori compresi tra 0 (nero) e 100 (bianco). Gli indici  $a^*$  e  $b^*$  rappresentano, invece, le coordinate di cromaticità:  $a^*$  esprime il grado di

rosso-verde, mentre  $b^*$  è il grado di giallo-blu. Come mostrato nel diagramma di cromaticità (Figura 3.4),  $a^*$  può assumere valori compresi tra -60 (verde) e +60 (rosso), mentre  $b^*$  varia da -60 (blu) a +60 (giallo). Le misure sono assolute.

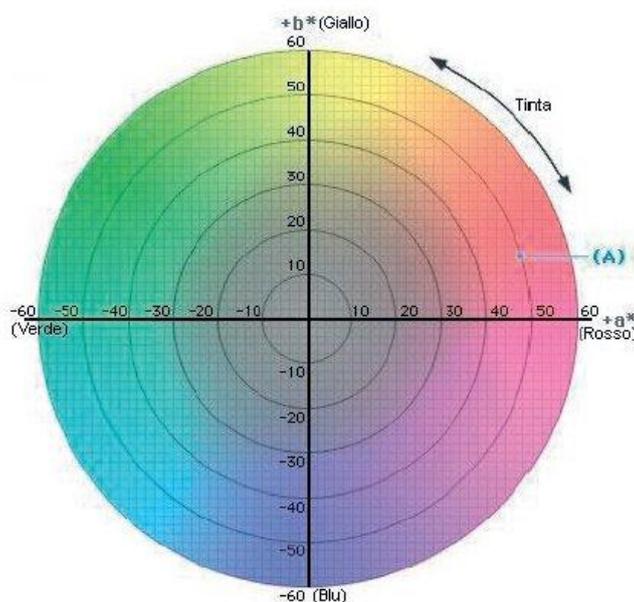


Figura 3.4: diagramma di cromaticità

### 3.7 ANALISI DEI PIGMENTI GIALLI TOTALI

Il metodo utilizzato per la determinazione dei pigmenti gialli nei campioni di riso deriva da un'ottimizzazione del metodo standard ICC No. 152 (*ICC Standard Methods*, 2003) che viene usato per quantificare i pigmenti gialli nella farina e nella semola di grano duro.

In dettaglio i pigmenti gialli totali sono stati determinati per via spettrofotometrica dopo estrazione solido-liquido in butanolo saturo d'acqua. Una quantità nota di campione è stata posta in beuta a smeriglio e addizionata con un volume di butanolo saturo d'acqua tale per cui il rapporto tra il peso del campione ed il volume di solvente fosse 5:100 per i risi neri e 30:100 per i risi rossi. Quindi la beuta è stata sottoposta ad agitazione per quattro ore e lasciata al buio per altre 16-18 ore. Il campione è stato, poi, filtrato su filtri Whatman No. 1 e la fase organica raccolta. I pigmenti gialli sono stati determinati mediante lettura spettrofotometrica a 444 nm utilizzando uno spettrofotometro Beckman DU 640 a singolo raggio (Beckman Coulter srl, Cassina de Pecchi, Milano – Italia) e una cuvetta in quarzo con cammino ottico di 10 mm.

Per la quantificazione è stata utilizzata una soluzione di luteina a concentrazione nota ed i risultati espressi come mg di luteina equivalenti su 100 g di sostanza in peso secco (mg/100 g s.s.).

## 3.8 ANALISI DEI CAROTENOIDI

### 3.8.1 Estrazione dei carotenoidi

Per estrarre i carotenoidi dai campioni di riso sono state valutate due procedure: la procedura A che è riportata nel lavoro di Panfili *et al.* (2004) e la procedura B riportata nel lavoro di Lamberts e Delcour (2008).

#### 3.8.1.1 Procedura A

Per la determinazione dei carotenoidi, una quantità nota di campione pari a circa 2 g è stata posta in una provetta pyrex dotata di tappo a vite. Sono stati aggiunti 5 mL di pirogallolo in etanolo 60 g/L (antiossidante), 2 mL di etanolo 95%, 2 mL di sodio cloruro 10 g/L e 2 mL di potassio idrossido 600 g/L. Dopo trattamento con azoto per rimuovere l'ossigeno, le provette sono state poste in bagno a 70°C per 45 min per saponificare i carotenoidi, agitando con vortex ogni 5-10 minuti. Terminata la saponificazione, le provette sono state raffreddate velocemente in ghiaccio, quindi è stato aggiunto sodio cloruro 10 g/L (15 mL) e l'idrolisato è stato estratto con esano:etilacetato 9:1 v/v (15 mL). L'estrazione con la miscela organica è stata ripetuta due volte e gli estratti sono stati riuniti. La miscela organica è stata rimossa con un evaporatore rotante Büchi Rotavapor® R-200 (BÜCHI Italia s.r.l., Milano, Italia). Il residuo ottenuto è stato conservato a -40°C fino all'analisi in HPLC.

#### 3.8.1.2 Procedura B

Per la determinazione dei carotenoidi, una quantità nota di campione pari a circa 2 g è stata posta in una provetta pyrex dotata di tappo a vite. È stato aggiunto acido ascorbico come antiossidante (0,300 g), 15 mL di etanolo 95% e 3 mL di sodio cloruro 10 g/L. La soluzione è stata agitata con un vortex e posta in bagno d'acqua a 85°C per 5 minuti. Poi, sono stati aggiunti 3 mL di potassio idrossido 600 g/L e le provette sono state poste di nuovo in bagno d'acqua a 85°C per 20 minuti facendo attenzione ad agitare ogni 7 minuti. Terminata la saponificazione, le provette sono state raffreddate velocemente in ghiaccio, quindi è stato aggiunto sodio cloruro 10 g/L (15 mL) e l'idrolisato è stato estratto con esano:etilacetato 9:1 v/v (15 mL). L'estrazione è stata ripetuta due volte e gli estratti sono stati riuniti. La miscela organica è stata rimossa con azoto a 40°C ed il residuo ottenuto è stato conservato a -40°C fino all'analisi in HPLC.

### 3.8.2 Estrazione della luteina libera

La luteina libera è stata estratta secondo una procedura che si differenzia dalla procedura A riportata nel paragrafo 3.8.1.1 per la sostituzione del potassio idrossido con acqua distillata. Questo ha consentito di evitare la saponificazione della luteina esterificata.

### 3.8.3 Analisi cromatografica

I carotenoidi estratti dai campioni di riso sono stati identificati e quantificati mediante analisi in RP-HPLC. Questa è stata condotta utilizzando un apparecchio Varian ProStar (SpectraLab Scientific Inc., Markham, Ontario, Canada) dotato di un sistema binario di erogazione del solvente (pompa ProStar 210), un sistema di *degasser* ed un rivelatore PDA ProStar 335 operante nell'intervallo 300-600 nm. Il volume di iniezione è stato di 20  $\mu$ L. Per la separazione dei carotenoidi è stata utilizzata una colonna YMC C30 250x4,6 mm, 5  $\mu$ m (YMC CO. LTD, Giappone) ed una *guard carriage* C18 termostata a 30°C. L'eluizione è stata ottenuta con un gradiente di 30 minuti, utilizzando come fase mobile metanolo assoluto (solvente A) e una miscela quaternaria di metanolo:diclorometano:acetonitrile:acqua 58:30:10,5:1,5 (solvente B), come riportato in Acquistucci *et al.* (2013). Tutti i solventi utilizzati erano di grado HPLC e sono stati filtrati attraverso un filtro da 0,45  $\mu$ m. La velocità di flusso variava tra 1,000 mL/min e 1,300 mL/min come riportato in Figura 3.5.

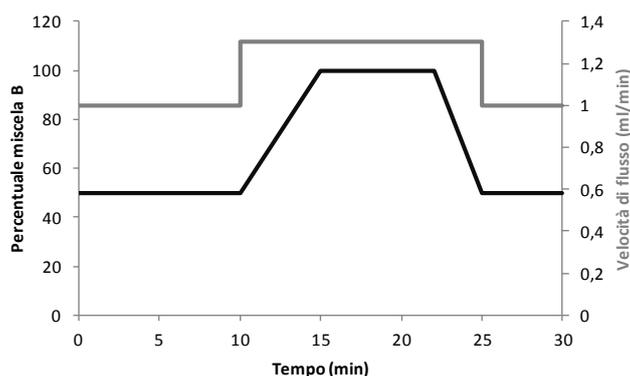


Figura 3.5: gradiente della miscela B e gradiente di velocità utilizzati per l'analisi cromatografica

L'identificazione dei carotenoidi è stata ottenuta confrontando i tempi di ritenzione e gli spettri dei picchi dei cromatogrammi dei campioni con quelli di carotenoidi standard. Per la quantificazione sono state usate rette di taratura di soluzioni di composti standard. Questi sono stati acquistati presso Entrasyntèse (Genay, Francia).

L'elaborazione dei cromatogrammi è stata effettuata tramite il software Galaxie Chromatography Workstation versione 1.7.

### 3.8.4 Prove di recupero della luteina totale e libera

Per verificare l'affidabilità del metodo di estrazione dei carotenoidi e della luteina libera, riportato rispettivamente nel paragrafo 3.8.1.2 e nel paragrafo 3.8.2, sono state effettuate prove di recupero aggiungendo una quantità esattamente nota di una soluzione standard di luteina a concentrazione nota, ad un campione di riso. Il campione è stato sottoposto in triplo alla procedura di

saponificazione, estrazione e determinazione cromatografica dei carotenoidi e della luteina libera. Il recupero percentuale è stato calcolato con la seguente formula:

$$R\% = \frac{C_{\text{fortified}} - C_{\text{matrix}}}{C_{\text{spike}}} \times 100$$

dove  $C_{\text{fortified}}$  è il contenuto di luteina totale o libera nel campione cui è stata aggiunta luteina standard,  $C_{\text{matrix}}$  è la concentrazione di luteina totale o libera presente nel campione di riso e  $C_{\text{spike}}$  è la concentrazione di luteina standard aggiunta.

### 3.9 ANALISI DEI COMPOSTI FENOLICI

Nello studio sono stati determinati i fenoli liberi ed i fenoli legati insolubili. Di seguito sono riportate le procedure di estrazione e determinazione utilizzate.

#### 3.9.1 Estrazione dei fenoli liberi

L'estrazione dei fenoli liberi dai campioni di riso è stata condotta secondo la metodica riportata in Arranz e Saura Calixto (2010). In dettaglio, ad una quantità nota di campione (0,5 g) posta in una provetta dotata di tappo a vite, sono aggiunti 20 mL di una miscela metanolo:acqua 50:50 (v/v) acidificata a pH 1 con HCl. La soluzione è posta in agitazione magnetica a 250 rpm per 1 h a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  al riparo dalla luce, quindi è centrifugata a  $1000 \times g$  per 10 minuti ed il surnatante rimosso e conservato. Il residuo è estratto nuovamente con 20 mL di una miscela acetone:acqua 70:30 nelle stesse condizioni riportate sopra. Gli estratti organici sono riuniti ed i fenoli liberi (FPC) determinati utilizzando il metodo colorimetrico di Folin-Ciocalteu, come indicato nel paragrafo 3.9.3.

##### 3.9.1.1 Scelta della metodica per l'estrazione dei fenoli liberi

Nello studio sono state prese in considerazione e confrontate tre diverse metodiche per estrarre i fenoli liberi riportate in Tabella 3.2.

Procedura estrattiva	Solvente	Condizioni estrattive	Riferimento bibliografico
Procedura A	MeOH:H <sub>2</sub> O 85:15 (v/v)	Agitazione magnetica a 250 rpm per 1 h a 23±1°C al riparo dalla luce	Sompong <i>et al.</i> (2011)
Procedura B	MeOH:H <sub>2</sub> O 85:15 (v/v)	Trattamento con ultrasuoni a 37 MHz per 15 min a 23±1°C al riparo dalla luce	Sompong <i>et al.</i> (2011) Irakli <i>et al.</i> (2012)
Procedura C	MeOH:H <sub>2</sub> O 50:50 (v/v) pH= 1 (con HCl) + CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O 70:30 (v/v)	Agitazione magnetica a 250 rpm per 1 h a 23±1°C al riparo dalla luce	Arranz e Saura Calixto (2010)

Tabella 3.2: procedure testate per estrarre i fenoli liberi da matrici cerealicole

In generale, una quantità nota di campione (circa 0,5 g) è stata posta in una provetta dotata di tappo a vite. Sono stati aggiunti 20 mL di miscela estraente e l'estrazione è stata condotta nelle condizioni proprie di ciascuna procedura, secondo quanto riportato in Tabella 3.2. Quindi, la soluzione è stata centrifugata a 1000 x *g* per 10 minuti ed il surnatante ripreso e conservato. Il residuo è stato nuovamente estratto e le fasi organiche riunite.

I fenoli liberi (FPC) sono stati determinati sugli estratti combinati, utilizzando il metodo colorimetrico di Folin-Ciocalteu, come indicato nel paragrafo 3.9.3.

### 3.9.2 Estrazione dei fenoli legati insolubili

Il residuo solido rimasto dopo l'estrazione dei fenoli liberi è stato lavato con acqua distillata (50 mL) (per rimuovere i residui di solvente organico) e poi filtrato con filtri Whatman No. 1. Dopo essiccazione a 30°C per 8 ore, il residuo è stato conservato a 4°C fino alla procedura idrolitica. Quindi, una quantità nota di residuo (0,2 g) è stata posta in provetta pyrex dotata di tappo a vite e sono stati aggiunti 10 mL di sodio idrossido 2M. La soluzione è stata posta a trattamento con ultrasuoni usando un bagno Elmasonic S100 Elma (Elma GmbH & Co KG Kolpingstr. 1-7 D-78224 Singen, Germania) a 40°C per 90 minuti. All'idrolisato ottenuto è stato aggiunto HCl fino a pH=2 e i fenoli sono stati estratti con 20 mL di etilacetato (2x). Quindi il solvente organico è stato rimosso con un evaporatore rotante Büchi Rotavapor® R-200 (BÜCHI Italia s.r.l., Milano, Italia). Il residuo secco è stato ricostituito con 1,2 mL di MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v) immediatamente prima della determinazione colorimetrica di Folin-Ciocalteu.

## 3.9.2.1 Ottimizzazione dell'estrazione dei fenoli legati insolubili

Per la determinazione dei fenoli legati insolubili sono state confrontate quattro diverse procedure di idrolisi, riportate in Tabella 3.3.

Procedura di idrolisi	Condizioni di idrolisi			
	Concentrazione NaOH	Riferimento bibliografico	Trattamento	Riferimento bibliografico
Procedura D	NaOH 2M	Sompong <i>et al.</i> (2011) Adom e Liu (2002)	Agitazione magnetica a 250 rpm per 16 h a 23±1°C al riparo dalla luce	Sompong <i>et al.</i> (2011)
Procedura E	NaOH 4M	Irakli <i>et al.</i> (2012) Paiva <i>et al.</i> (2014)	Agitazione magnetica a 250 rpm per 16 h a 23±1°C al riparo dalla luce	Sompong <i>et al.</i> (2011)
Procedura F	NaOH 2M	Sompong <i>et al.</i> (2011) Adom e Liu (2002)	Trattamento con ultrasuoni a 37 MHz per 90 min a 40±1°C al riparo dalla luce	Irakli <i>et al.</i> (2012)
Procedura G	NaOH 4M	Irakli <i>et al.</i> (2012) Paiva <i>et al.</i> (2014)	Trattamento con ultrasuoni a 37 MHz per 90 min a 40±1°C al riparo dalla luce	Irakli <i>et al.</i> (2012)

Tabella 3.3: procedure testate per estrarre i fenoli legati insolubili da matrici cerealicole

Il residuo solido rimasto dopo l'estrazione dei fenoli liberi è stato lavato con acqua distillata (50 mL) (per rimuovere i residui di solvente organico) e poi filtrato con filtri Whatman No. 1. Dopo essiccazione a 30°C per 8 ore, il residuo è stato conservato a 4°C per poi essere sottoposto ad idrolisi.

Questa è stata condotta in presenza di NaOH 2M (10 mL) (Sompong *et al.*, 2011; Adom e Liu, 2002) o 4M (Irakli *et al.*, 2012; Paiva *et al.*, 2014) sotto agitazione magnetica (Sompong *et al.*, 2011) o trattamento con ultrasuoni (Irakli *et al.*, 2012). All'idrolisato ottenuto è stato aggiunto HCl fino a pH=2 e i fenoli sono stati estratti con etilacetato. Quindi il solvente organico è stato rimosso per evaporazione ed il residuo secco ricostituito con 1,2 mL di MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v) immediatamente prima della determinazione colorimetrica di Folin-Ciocalteu.

### 3.9.3 Determinazione del contenuto di fenoli liberi e fenoli legati insolubili

La determinazione quantitativa dei fenoli liberi e legati è stata eseguita con il metodo colorimetrico di Folin -Ciocalteu come riportato in Sompong *et al.* (2011), con piccole modifiche. In dettaglio, a 1,2 mL di estratto, posto in un matraccio da 25 ml, sono stati aggiunti 6 ml di reagente di Folin Ciocalteu (FCR) diluito 1:10 con acqua distillata. Dopo tre minuti, è stato aggiunto  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  75 g/L per portare il pH di reazione a 10-10,5. Quindi è stata aggiunta acqua distillata fino a volume.

Dopo 90 minuti di incubazione a temperatura ambiente al riparo dalla luce, è stata letta l'assorbanza della soluzione a 753 nm contro un bianco preparato aggiungendo i reagenti a 1,2 mL di acqua distillata, come descritto sopra. Le misure spettrofotometriche sono state eseguite usando uno spettrofotometro UV/VIS Beckman DU 640 a raggio singolo (Beckman Coulter srl, Cassina de Pecchi, Milano – Italia), in una cuvetta con cammino ottico da 10 mm.

Come standard è stato utilizzato l'acido gallico ed i risultati sono stati espressi come mg di acido gallico equivalenti (AGE) per 100 g di campione su sostanza secca (ss).

### 3.9.4 Prove di recupero

Il campione di riso è stato diviso in due porzioni di circa 0,5 g ciascuna e ad una delle due è stata aggiunta una quantità nota di una soluzione standard di acido gallico. I fenoli liberi e legati sono stati estratti secondo le procedure descritte precedentemente e il recupero percentuale è stato calcolato come indicato di seguito:

$$R\% = \frac{C_{\text{fortified}} - C_{\text{matrix}}}{C_{\text{spike}}} \times 100$$

dove  $C_{\text{fortified}}$  è il contenuto di fenoli liberi (FPC) o fenoli legati insolubili (BPC) nel campione cui è stato aggiunto acido gallico,  $C_{\text{matrix}}$  è FPC o BPC nel campione di riso e  $C_{\text{spike}}$  è la concentrazione di acido gallico aggiunta.

## 3.10 ANALISI DELLE ANTOCIANINE

### 3.10.1 Estrazione

Le antocianine sono state estratte dai campioni di riso utilizzando la procedura riportata in Kim *et al.* (2010) opportunamente modificata ed ottimizzata come riportato di seguito.

In dettaglio, ad una quantità nota di campione di riso pigmentato è stata aggiunta una miscela metanolo:acqua (85:15 v/v) acidificata a pH=1 con HCl 1,0 N. Per i risi con pericarpo nero è stato

utilizzato un rapporto tra la quantità di campione (g) ed il volume di miscela estraente (mL) pari a 1:400, mentre per i risi con pericarpo rosso tale rapporto è di 1:100.

La soluzione ottenuta è stata trattata con ultrasuoni (37 MHz) per 1 minuto. Quindi, la soluzione è stata posta in bagno d'acqua a 38°C per 30 min agitando con vortex ogni 5-10 min. La sospensione è stata poi centrifugata a 1000 x *g* per 10 minuti ed il surnatante è stato conservato per la determinazione delle antocianine totali (analisi spettrofotometrica) e per la caratterizzazione qualitativa (analisi cromatografica).

La prima è stata determinata sull'estratto tal quale, mentre una quantità di estratto pari a 10 mL è stata evaporata con un evaporatore rotante Büchi Rotavapor® R-200 (BÜCHI Italia s.r.l., Milano, Italia) ed il residuo ottenuto è stato conservato a -40°C fino all'analisi in HPLC.

### 3.10.2 Analisi spettrofotometrica

Le antocianine totali sono state determinate per via spettrofotometrica. In dettaglio, una quantità di estratto pari a 10 mL è stata sottoposta ad analisi spettrofotometrica usando uno spettrofotometro Beckman DU 640 a singolo raggio (Beckman Coulter srl, Cassina de Pecchi, Milano – Italia) provvisto di cuvetta in quarzo con cammino ottico di 10 mm. L'assorbanza è stata letta a 528 nm contro un bianco costituito dalla miscela metanolo:acqua (85:15 v/v) acidificata a pH=1 con HCl 1,0 N.

Noti l'assorbività molare di una soluzione di cianidina-3-O-glucoside al suo massimo di assorbimento ( $\lambda=538$  nm), la sua assorbanza e quella dell'estratto a 528 nm è stata espressa la concentrazione dell'estratto come mg di cianidin-3-O-glucoside equivalenti su 100 g di campione in peso secco (mg C3G/100 g ss). Lo standard di cianidi-3-O glucoside è stato fornito da Extrasynthèse (Genay, Francia).

### 3.10.3 Analisi cromatografica

L'analisi cromatografica è stata condotta utilizzando un apparecchio Varian ProStar munito di un modulo di pompe ProStar 210, dotato di detector PDA ProStar 335 operante nel range 300-650 nm e di un loop da 20  $\mu$ L.

La separazione cromatografica delle antocianine è stata ottenuta usando una colonna Phenomenex Luna 250x4,6 mm i.d. 5 $\mu$ m ed una *guard-cartridge* C18. L'eluizione è stata effettuata in gradiente utilizzando una soluzione acquosa di acido formico (10% v:v) (soluzione A) e una soluzione di metanolo (soluzione B), secondo i tempi riportati di seguito: gradiente lineare di 20 minuti dal 5% al 60% di soluzione B; 5 minuti di gradiente lineare dal 60% al 100% di B; mantenere per 5 minuti al 100% di B e poi far riequilibrare la colonna. Le antocianine sono state identificate confrontando i tempi di ritenzione e lo spettro UV/VIS dei picchi dei cromatogrammi dei campioni con quello di soluzioni standard di cianidna-3-O-glucoside, peonidina-3-O-glucoside e malvidina. Gli standard sono

stati acquistati presso Extrasynthèse (Genay, Francia). La quantificazione è stata ottenuta usando rette di taratura per ciascuno standard.

L'elaborazione dei cromatogrammi è stata effettuata tramite il software Galaxie Chromatography Workstation Version 1.7.

### **3.11 ANALISI DELLE PROANTOCIANIDINE**

#### **3.11.1 Estrazione delle proantocianidine**

Le proantocianidine sono state estratte dai campioni di riso mediante estrazione solido-liquido secondo la procedura riportata in Finocchiaro *et al.* (2010) con lievi modifiche.

In dettaglio, una quantità di campione pari a 0,6 g è stata posta in una provetta provvista di tappo a vite e addizionata di 6 mL di metanolo. La provetta è stata collocata in bagno ad acqua Grant OLS 200 (Keison International Ltd, UK) e sottoposta a 220 oscillazioni al minuto alla temperatura di  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . La sospensione è stata centrifugata a  $1000 \times g$  ed il surnatante raccolto. Il residuo è stato re-estratto due volte nelle stesse condizioni. Successivamente, il residuo è stato estratto con una miscela acetone:acqua 70:30 (6 mL 3x) nelle stesse condizioni usate per l'estrazione in metanolo e gli estratti sono stati combinati.

#### **3.11.2 Analisi spettrofotometrica**

Le proantocianidine totali sono state quantificate secondo il saggio del butanolo acido come riportato da Finocchiaro *et al.* (2010) con lievi modifiche. L'acetone è stato rimosso dall'estratto ed il residuo ripreso con la frazione in metanolo dell'estratto in modo da ottenere un'unica soluzione. Poi, a 1 mL dell'estratto così combinato sono stati aggiunti 6 mL di butanolo acidificato con acido cloridrico concentrato (95:5 v/v) e 100  $\mu\text{L}$  di ammonio ferro solfato idrato in acido cloridrico 2M al 2% (peso/volume). La soluzione ottenuta è stata posta in bagno a  $95,0\pm 1,0^\circ\text{C}$  per 50 min. Quindi, è stata letta l'assorbanza a 528 nm usando uno spettrofotometro UV/VIS Beckman DU 640 a raggio singolo (Beckman Coulter srl, Cassina de Pecchi, Milano – Italia), in una cuvetta con cammino ottico da 10 mm. I risultati sono stati espressi come mg di C3G equivalenti/100 g (s.s.).

#### **3.11.3 Analisi cromatografica**

L'analisi cromatografica è stata condotta utilizzando un apparecchio Varian ProStar munito di un modulo di pompe ProStar 210, dotato di detector PDA ProStar 335 operante nel range 300-650 nm e di un loop da 20  $\mu\text{L}$ .

La separazione cromatografica è stata ottenuta usando una colonna Phenomenex Luna 250x4,6 mm i.d.  $5\mu\text{m}$  e l'eluzione effettuata in gradiente utilizzando una miscela di acqua:acido formico (100:0,3 v/v) (miscela A) ed una metanolo:acido formico (100:0,1 v/v) (miscela B) come riportato in

Gunaratne *et al.* (2013). Il gradiente utilizzato è: 0-5 min, 5% B; 5-14 min, 5%-35% B; 14-20 min, 35-45% B; 20-30 min, 45-55% B; 30-40 min, 55-100% B; 40-45 min, 100% B. La velocità di flusso è di 0,8 mL/min.

L'identificazione è stata effettuata confrontando i tempi di ritenzione e lo spettro UV/VIS dei picchi dei cromatogrammi dei campioni con quello di soluzioni standard di (+)-catechina.

Lo standard è stato acquistato presso Extrasynthèse (Genay, Francia).

L'elaborazione dei cromatogrammi è stata effettuata tramite il software Galaxie Chromatography Workstation Version 1.7.

### **3.12 ANALISI STATISTICA**

I risultati sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard (SD) di almeno due estrazioni indipendenti. La significatività delle differenze dei dati sperimentali è stata valutata applicando un'analisi della varianza ad una via mediante il software Microsoft Office Excel 2010. I dati sono stati poi sottoposti a confronti multipli con il test HSD di Tukey mediante il software MathWorks® Matlab 8.2. Sono state considerate significative le differenze per  $p < 0,05$ .

### 3.13 BIBLIOGRAFIA DEL CAPITOLO

- Acquistucci, R., Melini, V., Carbonaro, M., Finotti, E., 2013. Bioactive molecules and antioxidant activity in durum wheat grains and related millstream fractions. *Int J Food Sci Nutr* 64, 959–967. doi:10.3109/09637486.2013.825696
- Adom, K.K., Liu, R.H., 2002. Antioxidant Activity of Grains. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6182–6187. doi:10.1021/jf0205099
- Arranz, S., 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 the diet. *Journal of Cereal Science* 51, 313–318. doi:10.1016/j.jcs.2010.01.006
- Finocchiaro, F., Ferrari, B., Gianinetti, A., 2010. A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. *Journal of Cereal Science* 51, 28–34. doi:10.1016/j.jcs.2009.09.003
- Gunaratne, A., Wu, K., Li, D., Bentota, A., Corke, H., Cai, Y.-Z., 2013. Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. *Food Chemistry* 138, 1153–1161. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.129
- ICC Standard Methods, 2003. . ICC - International Association for Cereal Science and Technology, Vienna.
- Irakli, M.N., Samanidou, V.F., Biliaderis, C.G., Papadoyannis, I.N., 2012. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in rice using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection. *J Sep Sci* 35, 1603–1611. doi:10.1002/jssc.201200140
- Lamberts, L., Delcour, J.A., 2008. Carotenoids in raw and parboiled brown and milled rice. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11914–11919. doi:10.1021/jf802613c
- Paiva, F.F., Vanier, N.L., Berrios, J.D.J., Pan, J., Villanova, F. de A., Takeoka, G., Elias, M.C., 2014. Physicochemical and nutritional properties of pigmented rice subjected to different degrees of milling. *Journal of Food Composition and Analysis* 35, 10–17. doi:10.1016/j.jfca.2014.05.003
- Panfili, G., Fratianni, A., Irano, M., 2004. Improved Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography Procedure for the Determination of Carotenoids in Cereals. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6373–6377. doi:10.1021/jf0402025
- Sompong, R., Siebenhandl-Ehn, S., Linsberger-Martin, G., Berghofer, E., 2011. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chemistry* 124, 132–140. doi:10.1016/j.foodchem.2010.05.115

### 3.14 SITOGRAFIA

<http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html>  
[www.assosementi.it](http://www.assosementi.it)  
[www.baulevolante.it](http://www.baulevolante.it)  
[www.bottegasolidale.com](http://www.bottegasolidale.com)  
[www.enterisi.it](http://www.enterisi.it)  
[www.fiordiloto.it](http://www.fiordiloto.it)  
[www.risobuono.it](http://www.risobuono.it)  
[www.risogallo.it](http://www.risogallo.it)  
[www.risozaccaria.com](http://www.risozaccaria.com)

## Capitolo 4

# RISULTATI E DISCUSSIONI

---

In questo capitolo sono riportati i risultati delle prove sperimentali condotte sui campioni di riso pigmentato oggetto di studio.

Sono dapprima presentati i valori relativi alla composizione centesimale dei campioni e gli indici colorimetrici  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . Segue la discussione sulla determinazione del contenuto in carotenoidi e in pigmenti gialli totali. Sono, infine, presentati i risultati relativi al contenuto in fenoli liberi e legati e quelli relativi alla composizione in antocianine e in proantocianidine.

---

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONI

### 4.1 CLASSIFICAZIONE MERCEOLOGICA

Il riso lavorato può essere classificato in “comune o originario”, “semifine”, “fine” e “superfine”, in base alla lunghezza dei chicchi. Questa classificazione merceologica è normata dalla legge del 18 marzo 1958 n. 325, successivamente modificata dalla legge n. 586 del 5 giugno 1962, tuttora in vigore, nonostante l'introduzione del Regolamento UE n. 1308/2013.

In Tabella 4.1 è riportata la classificazione dei risi pigmentati oggetto di studio, in base alla normativa italiana.

Campione	Lunghezza (media)	Classificazione
	<i>mm</i>	
N(IT) 1	6,3±0,7	semifine
N(IT) 2	6,0±0,2	semifine
N(IT) 3	6,7±0,1	fine
N(IT) 4	7,9±0,3	fine
N(TH) 1	7,0±0,2	fine
N(CA)1	14,9±1,6	fine
R(IT) 1	7,9±0,6	fine
R(FR) 1	7,2±0,5	fine
R(FR) 2	7,9±0,1	fine
R(TH) 1	7,2±0,2	fine

Tabella 4.1: classificazione dei risi in base alla lunghezza del chicco espressa come media di dieci repliche e deviazione standard

I campioni di riso delle varietà italiane con pericarpo nero indicati come N(IT)1 e N(IT)2 sono classificati come “semifine” in quanto i chicchi hanno una lunghezza media compresa tra 5,2 mm e 6,4 mm. Tutti gli altri, invece, appartengono alla categoria “fine” in quanto hanno chicchi con una lunghezza superiore a 6,4 mm.

### 4.2 COMPOSIZIONE CENTESIMALE

I campioni di riso crudi sono stati sottoposti alla determinazione del contenuto in umidità, del contenuto in ceneri e del contenuto proteico secondo i metodi descritti nel capitolo 3.

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 4.2.

Campione	Umidità	Proteine	Ceneri
	<i>g/100 g</i>	<i>g/100 g s.s.</i>	<i>g/100 g s.s.</i>
N(IT) 1	11,76±0,01 <sup>a</sup>	9,91±0,05 <sup>a</sup>	1,88±0,00 <sup>a</sup>
N(IT) 2	13,46±0,07 <sup>b</sup>	7,44±0,02 <sup>b</sup>	1,63±0,00 <sup>b</sup>
N(IT) 3	13,36±0,01 <sup>b</sup>	11,34±0,02 <sup>c</sup>	1,83±0,01 <sup>c</sup>
N(IT) 4	13,30±0,05 <sup>b</sup>	11,19±0,07 <sup>c</sup>	1,84±0,00 <sup>c</sup>
N(TH) 1	12,28±0,05 <sup>c</sup>	9,56±0,23 <sup>a</sup>	1,58±0,03 <sup>d</sup>
N(CA)1	10,26±0,03 <sup>d</sup>	14,01±0,03 <sup>d</sup>	1,61±0,01 <sup>d</sup>
R(IT) 1	13,02±0,04 <sup>e</sup>	8,21±0,07 <sup>e</sup>	1,55±0,01 <sup>d</sup>
R(FR) 1	12,91±0,00 <sup>e</sup>	9,41±0,01 <sup>f</sup>	1,84±0,02 <sup>c</sup>
R(FR) 2	13,34±0,00 <sup>b</sup>	10,15±0,16 <sup>a</sup>	1,86±0,01 <sup>c</sup>
R(TH) 1	13,26±0,00 <sup>b</sup>	9,80±0,04 <sup>a</sup>	1,40±0,04 <sup>e</sup>

Tabella 4.2: composizione centesimale dei campioni di riso. Lettere diverse in colonna indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )

Il contenuto in umidità dei campioni oscilla tra 10,26 e 13,46 g/100 g. L'ANOVA ha messo in evidenza che le differenze tra i campioni sono significative ( $p < 0,05$ ) e con il test HSD di Tukey sono stati effettuati confronti multipli tra i valori medi. Il minor contenuto è stato trovato nel campione N(CA)1, mentre il maggiore nel campione N(IT)2.

Per quanto riguarda il contenuto proteico, i valori variano tra 7,44% e 14,01% (s.s.). Le differenze sono statisticamente significative ( $p < 0,05$ ): il contenuto minimo è stato ottenuto per il campione della varietà Venere (N(IT)2) ed il massimo per il campione di riso selvatico canadese (N(CA)1). Le variazioni del contenuto proteico tra i campioni non seguono il colore del pericarpo: ad esempio la varietà Riz Rouge de Camargue e la varietà di riso Thai rosso (R(TH)1) hanno un contenuto proteico statisticamente uguale ai campioni della varietà di riso nero Otello (N(IT)1) e di Thai nero.

Occorre notare che, ad eccezione del campione N(IT)2, i valori sperimentali trovati sono significativamente superiori a quelli riportati in letteratura: Champagne (2004) riporta un contenuto proteico nel riso che oscilla tra 5,8% e 7,7%, mentre Juliano (1993) indica un valore medio pari al 7,0%. Secondo dati FAO ([www.fao.org](http://www.fao.org)), il contenuto proteico nel riso sbramato oscilla tra 7,1% - 8,3% e nel riso bianco tra 6,3%-7,1%.

I valori sperimentali trovati nei risi pigmentati sono, al contrario, in linea con quelli riscontrati nella crusca di riso. Fabian e Ju (2011) riportano valori proteici nella crusca di riso pari a circa il 10-15%. Questo conferma il carattere di integralità dei campioni di riso con pericarpo pigmentato. Inoltre, i valori trovati sono in linea con quelli di altri cereali come il mais e l'orzo: (Shewry, 2007) riporta un contenuto proteico compreso tra 9-11% nel primo e tra 8-15% nel secondo. Le differenze

quantitative tra le varietà sono, secondo Shewry (2007), imputabili a fattori di crescita piuttosto che al genotipo.

Il contenuto in ceneri dei campioni oggetto di studio varia tra 1,40% e 1,88% (s.s.). Questi dati sono in accordo con i valori osservati da Yodmanee *et al.* (2011) in risi pigmentati thailandesi.

Tale parametro è indice del grado di raffinazione cui è stato sottoposto il riso. La concentrazione dei minerali diminuisce, infatti, spostandosi dagli strati esterni della crusca verso l'endosperma (Lamberts *et al.*, 2007). È stato osservato, infatti, che dopo aver rimosso la crusca e gli strati esterni dell'endosperma, il contenuto di minerali rimane costante.

Tra i campioni sono state trovate differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ). In particolare, il minor contenuto in ceneri è stato trovato nel campione R(TH)1 ed il maggiore nel N(IT)1.

I valori trovati confermano il carattere di integralità dei campioni, già emerso dalla valutazione del contenuto proteico, e sono in accordo con dati di letteratura. Juliano (1993), infatti, riporta per il riso integrale un contenuto in ceneri compreso tra 1,0-1,5%; allo stesso modo Lamberts *et al.* (2007) riportano un contenuto in ceneri nel riso integrale pari a 1,6%. Al contrario, il riso raffinato (milled) ha valori significativamente minori, compresi tra 0,3-0,8%.

### 4.3 ANALISI DEL COLORE

La colorazione del pericarpo dei risi pigmentati rappresenta una caratteristica specifica della varietà e per completare la caratterizzazione delle cariossidi, sui campioni oggetto dello studio, sono stati misurati gli indici di colore  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . I risultati sono riportati in Tabella 4.3.

Campioni	$L^*$	$a^*$	$b^*$
N(IT) 1	28,2±1,6 <sup>a</sup>	5,8±1,2 <sup>a</sup>	3,4±1,8 <sup>ac</sup>
N(IT) 2	26,2±0,8 <sup>a</sup>	3,2±0,8 <sup>b</sup>	2,1±0,5 <sup>a</sup>
N(IT) 3	26,0±1,0 <sup>a</sup>	4,0±0,8 <sup>b</sup>	2,8±0,7 <sup>a</sup>
N(IT) 4	27,0±0,6 <sup>a</sup>	2,6±0,2 <sup>b</sup>	0,2±0,1 <sup>b</sup>
N(TH) 1	29,0±1,9 <sup>a</sup>	6,2±0,7 <sup>a</sup>	4,6±0,9 <sup>cd</sup>
N(CA)1	28,1±1,3 <sup>a</sup>	3,3±0,5 <sup>b</sup>	5,8±1,1 <sup>d</sup>
R(IT) 1	35,6±1,0 <sup>b</sup>	8,7±0,5 <sup>c</sup>	12,0±0,7 <sup>e</sup>
R(FR) 1	37,2±1,9 <sup>b</sup>	10,5±0,9 <sup>d</sup>	15,1±1,2 <sup>f</sup>
R(FR) 2	36,5±1,9 <sup>b</sup>	7,7±0,4 <sup>c</sup>	12,7±1,0 <sup>e</sup>
R(TH) 1	32,8±1,1 <sup>c</sup>	10,8±0,8 <sup>d</sup>	11,6±0,9 <sup>f</sup>

Tabella 4.3: indici di colore  $L^*a^*b^*$ . Lettere diverse in colonna indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )

I valori relativi ai parametri colorimetrici misurati sui risi neri sono risultati sempre inferiori a quelli osservati sui campioni con pericarpo rosso. Questo dato è in linea con quanto espresso dagli indici colorimetrici che descrivono le variazioni di colore in termini di componenti gialle, rosse, blu e verdi. Nei risi neri i valori relativi al parametro  $L^*$  oscillano tra 26,0 e 29,0, mentre per le varietà di riso rosso variano tra 32,8 e 37,2. Per quanto concerne l'indice  $a^*$  che esprime la componente rossa o verde a seconda del valore assunto, i dati oscillano tra 2,6 e 6,2 nei risi neri e tra 7,7 e 10,8 nei risi rossi. I campioni di riso nero N(IT)1 e N(TH)1 hanno un valore di  $a^*$  significativamente più alto degli altri risi neri. I campioni R(FR)1 e R(TH)1 mostrano un valore di  $a^*$  maggiore degli altri risi rossi. Questi hanno, pertanto, una maggiore componente rossa rispetto a tutti gli altri campioni. Per l'indice  $b^*$ , che esprime la componente gialla, nei risi neri i valori oscillano tra 0,2 e 5,8, mentre nei secondi variano tra 12,0 e 15,1. Ciò indica che il colore del pericarpo dei risi rossi ha una maggiore componente gialla. Il campione di riso selvatico (N(CA)1) mostra una componente gialla ( $b^* = 5,8$ ) maggiore degli altri risi neri, nonostante il valore di  $L^*$  non risulti significativamente diverso dalla media.

#### 4.4 DETERMINAZIONE DEI CAROTENOIDI

Il numero di studi sui risi pigmentati in cui è stata definita la composizione quali-quantitativa in carotenoidi è piuttosto limitato e nessuno di quelli condotti su varietà italiane di riso pigmentato (Zaupa *et al.*; 2015; Bordiga *et al.*, 2014; Finocchiaro *et al.*, 2010; Finocchiaro *et al.*, 2007) ha riguardato tali molecole bioattive.

Per questi motivi, uno degli obiettivi di tale studio è stato quello di valutare la presenza dei carotenoidi in risi pigmentati appartenenti a varietà italiane o estere.

Poiché i carotenoidi possono trovarsi sia in forma libera che esterificata, sono stati determinati sia i carotenoidi totali, intesi come insieme dei carotenoidi liberi, esterificati e legati alla matrice, che la luteina libera.

##### 4.4.1 Carotenoidi totali

###### 4.4.1.1 Scelta e ottimizzazione della metodica di idrolisi e di estrazione dei carotenoidi totali

Nella prima fase è stata valutata l'adeguatezza delle procedure analitiche disponibili in letteratura alla matrice risicola.

Per la determinazione dei carotenoidi totali sono state confrontate due metodiche estrattive: la metodica riportata in Panfili *et al.* (2004) e la metodica di Lamberts e Delcour (2008). La prima è stata messa a punto dagli autori per la determinazione dei carotenoidi in diverse matrici cerealicole come avena, spelta, frumento, mais e orzo e nei relativi prodotti di prima trasformazione, mentre la

seconda è stata utilizzata su campioni di riso integrale. Le due si differenziano essenzialmente per l'uso del tipo di antiossidante, pirogallolo nella metodica di Panfili *et al.* (2004) e acido ascorbico in quella di Lamberts e Delcour (2008), oltre che per le diverse temperature ed i tempi di saponificazione: Panfili saponifica a 70°C per 45 min, mentre Lamberts a 85°C per 20 min.

In questo studio, un campione di riso nero (N(IT)1) ed uno di riso rosso (R(IT)1) sono stati estratti in doppio con entrambe le metodiche ed i carotenoidi determinati per via cromatografica. Dalle prove sperimentali è emerso che applicando la metodica di Lamberts e Delcour (2008) si ottenevano risultati non riproducibili. È evidente che la procedura presenta punti critici, presumibilmente costituiti dal tipo di antiossidante o dal trattamento termico. Al contrario, l'altra procedura forniva dati riproducibili. Si è scelto, quindi, di utilizzare la metodica riportata da Panfili *et al.* (2004) secondo cui l'idrolisato ottenuto dal trattamento del campione con potassio idrossido è estratto con una miscela di esano:etilacetato 9:1 v/v. È opportuno utilizzare una miscela di solventi apolari come l'esano e di solventi polari (o moderatamente polari) come l'etilacetato in quanto questa consente di co-solubilizzare carotenoidi con polarità diversa presenti nei campioni. Xantofille e caroteni hanno, infatti, una diversa polarità per la presenza/assenza di gruppi -OH e quindi sono diversamente solubili nei vari solventi organici. Le xantofille sono molto solubili in solventi polari come metanolo, etilacetato e acetone. Al contrario, il  $\beta$ -carotene è altamente solubile in esano, in etere etilico e in THF come mostrato in Tabella 4.4 (Craft e Soares, 1992).

Solvente	Luteina mg/L	$\beta$ -carotene mg/L
Acetone	800	200
Esano	20	600
Etanolo	300	30
Etere etilico	2000	1000
Etilacetato	800	500
Metanolo	200	10
THF	8000	10000

Tabella 4.4: solubilità di luteina e  $\beta$ -carotene in alcuni solventi organici (dati tratti da Craft e Soares, 1992)

Nonostante caroteni e xantofille siano entrambi altamente solubili in etere etilico ed etilacetato non è consigliabile utilizzarli per l'estrazione in quanto possono formare perossidi che degradano rapidamente le molecole bioattive (Rivera e Canela, 2012). Allo stesso tempo è opportuno evitare di

lasciare i carotenoidi in acetone poiché quest'ultimo può provocare la loro degradazione (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2001).

È da sottolineare che si è scelto di utilizzare una miscela di esano:etilacetato 9:1 v/v in quanto il  $\beta$ -carotene è presente nei risi pigmentati come componente minore (Pereira-Caro *et al.*, 2013a) e questi sono i solventi in cui esso ha la più alta solubilità, dopo il THF e l'etere etilico. Inoltre, ad eccezione del THF e dell'etere etilico per i motivi già riportati, l'etilacetato è uno dei solventi in cui la luteina è maggiormente solubile.

È stato, poi, valutato il numero di ripetizioni necessarie a garantire un'estrazione quantitativa e riproducibile dei carotenoidi dai campioni di riso pigmentato. A tale scopo, un campione di riso con pericarpo nero (R(IT)1) (1 g) ed un campione con pericarpo rosso (R(FR)2) (2 g) sono stati idrolizzati in doppio nelle condizioni descritte nel capitolo 3 e sottoposti a quattro estrazioni con aliquote di esano:etilacetato 9:1 v/v pari a 20 mL ciascuna. Occorre sottolineare che le prove sono state condotte su tali risi in quanto in uno *screening* preliminare avevano mostrato un alto contenuto in carotenoidi. Ognuno dei quattro estratti è stato poi sottoposto ad analisi cromatografica per la determinazione quali-quantitativa.

Come riportato nel paragrafo successivo, negli estratti dei campioni di riso pigmentato sono stati identificati tre principali carotenoidi: *all-trans* luteina, *all-trans* zeaxantina e  $\beta$ -carotene.

In Tabella 4.5 sono riportati i valori medi delle aree dei picchi dei carotenoidi identificati negli estratti del campione di riso nero.

Estratto	Luteina		Zeaxantina		$\beta$ -carotene	
	Area (mAU*min)	% estratta	Area (mAU*min)	% estratta	Area (mAU*min)	% estratta
1°	15,0	80	0,4	100	0,1	100
2°	3,4	18	-	-	-	-
3°	0,3	2	-	-	-	-
4°	-	-	-	-	-	-

Tabella 4.5: carotenoidi identificati negli estratti non riuniti ottenuti sul campione di riso nero (valori medi)

Dai dati sperimentali emerge che per estrarre quantitativamente la luteina presente in circa 1,0 g di riso nero occorrono tre estrazioni con 20 mL di una miscela di esano:etilacetato 9:1 v/v ciascuna.

In particolare, con due sole estrazioni si riesce ad estrarre il 98% della luteina estraibile. Per una completa estrazione della zeaxantina e del  $\beta$ -carotene è necessaria, invece, una sola estrazione.

In Tabella 4.6 sono riportati i valori medi delle aree dei picchi identificati come carotenoidi negli estratti del campione di riso rosso.

Estratto	Luteina		Zeaxantina		β-carotene	
	Area (mAU*min)	% estratta	Area (mAU*min)	% estratta	Area (mAU*min)	% estratta
1°	7,7	82	0,3	100	0,1	100
2°	1,4	15	-	-	-	-
3°	0,2	2	-	-	-	-
4°	0,1	1	-	-	-	-

Tabella 4.6: carotenoidi identificati negli estratti non riuniti ottenuti su un campione di riso rosso (valori medi)

Dai dati sperimentali emerge che per avere un'estrazione quantitativa della luteina da circa 2,0 g di campione di riso rosso occorrono almeno tre estrazioni con 20 mL di una miscela di esano:etilacetato 9:1 v/v ciascuna. Queste assicurano, infatti, di estrarre il 99% della luteina estraibile. Per la zeaxantina ed il β-carotene, analogamente a quanto osservato per il campione di riso nero, è necessaria, invece, una sola estrazione.

Da queste prove è emerso che per avere un'estrazione quantitativa della luteina totale, della zeaxantina e del β-carotene da due grammi di riso pigmentato sono necessarie tre estrazioni da 20 mL ciascuna con esano:etilacetato 9:1 v/v.

#### 4.4.1.2 Analisi in RP-HPLC

Gli estratti dei carotenoidi ottenuti in esano:etilacetato 9:1 v/v sono stati evaporati a pressione ridotta e a 40°C così da ottenere un residuo secco conservato a -40°C e ripreso in MeOH:THF 95/5 v/v (Acquistucci *et al.*, 2013) immediatamente prima dell'analisi cromatografica.

La scelta di tale miscela è dovuta al fatto che questa garantisce una buona solubilizzazione sia delle xantofille che del β-carotene e allo stesso tempo migliora l'efficienza della separazione.

Tuttavia, alla luce delle considerazioni fatte precedentemente sulla possibile presenza nel THF di perossidi che degradano i carotenoidi, è stato valutato l'effetto dell'aggiunta di tale solvente sulla concentrazione di queste molecole bioattive. In particolare, l'estratto in esano:etilacetato di un campione di riso nero è stato diviso in due aliquote esattamente uguali in peso e la miscela organica è stata rimossa per evaporazione a pressione ridotta a 40°C. Uno dei due residui secchi è stato ripreso con metanolo:tetraidrofurano 95:5 v/v, l'altro con solo metanolo. Entrambi sono stati sottoposti ad analisi cromatografica. Le prove sono state eseguite in doppio.

In Tabella 4.7 sono riportate le aree dei picchi (valori medi) di luteina, zeaxantina e β-carotene, normalizzate rispetto al peso del campione e ottenute dall'analisi cromatografica dei due estratti ri-solubilizzati nei due solventi oggetto di valutazione.

Solvente per iniezione	Luteina	Zeaxantina	$\beta$ -carotene
	Area/peso (mAU*min/g)	Area/peso (mAU*min/g)	Area/peso (mAU*min/g)
MeOH:THF 95:5	16,33 $\pm$ 1,70 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,17 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>
MeOH 100%	16,60 $\pm$ 3,80 <sup>a</sup>	0,47 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>

Tabella 4.7: principali carotenoidi presenti nel residuo secco ripreso con MeOH:THF 95:5 v/v e MeOH 100% (valori medi). Lettere diverse in colonna indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )

I dati ottenuti mostrano che le aree non sono statisticamente diverse, per cui, nelle condizioni sperimentali utilizzate, è possibile avvalersi del THF per ottenere una separazione efficiente senza incorrere nella decomposizione dei carotenoidi.

#### 4.4.1.3 Prove di recupero della luteina totale

La qualità di una procedura analitica, in termini di efficacia, è spesso valutata con il test di recupero percentuale. In questo studio le prove di recupero sono state condotte sia sullo standard tal quale in assenza di matrice che sul campione addizionato di una quantità esattamente nota di luteina standard. Una quantità nota di luteina standard è stata sottoposta a trattamento idrolitico e poi estratta come descritto precedentemente con esano:etilacetato 9:1 v/v. L'estratto è stato portato a secco e poi ripreso in MeOH:THF 95:5 v/v per l'analisi in RP-HPLC. In Tabella 4.8 sono riportati i risultati delle prove di recupero condotte sulla luteina tal quale. Nota la quantità di luteina sottoposta alla procedura (luteina addizionata) e quella della luteina estratta è stato calcolato il recupero. Il valore ottenuto dalla media di tre repliche è pari al 94% (SD=1,43; CV%=1,54).

Replica	Luteina estratta	Luteina addizionata	Recupero
	$\mu g$	$\mu g$	%
1	1,35	1,42	95
2	2,05	2,23	92
3	1,82	1,92	95
Media			94
SD			1,43
CV%			1,54

Tabella 4.8: recupero della luteina standard

Sono state condotte prove di recupero della luteina anche in presenza di matrice. In particolare al campione di riso selvatico canadese sono state aggiunte quantità esattamente note di luteina e la soluzione è stata sottoposta a idrolisi, estrazione ed analisi cromatografica. I risultati sono riportati in Tabella 4.9.

Replica	C fortified	C matrix	C spike	Recupero
	$\mu\text{g/g s.s.}$	$\mu\text{g/g s.s.}$	$\mu\text{g/g s.s.}$	%
1	3,26	2,90	0,45	82
2	3,77	2,83	1,09	85
3	4,56	3,39	1,47	80
Media				82
SD				2
CV%				3

Tabella 4.9: recupero della luteina addizionata alla matrice

Dalle prove è emerso che in presenza della matrice, il recupero medio della luteina è pari all'85%. È possibile concludere, quindi, che le prove non hanno evidenziato particolari problemi connessi alla procedura analitica utilizzata.

#### 4.4.1.4 Carotenoidi totali nei campioni di riso crudo

In Figura 4.1 è riportato il cromatogramma ottenuto dall'analisi cromatografica dell'estratto di un riso nero. I principali carotenoidi identificati nei campioni di riso pigmentato crudo sono la luteina, la zeaxantina ed il  $\beta$ -carotene.

Nelle condizioni sperimentali utilizzate, le due xantofille eluiscono rispettivamente a 8,0 min e 9,5 min, mentre il  $\beta$ -carotene eluisce a 22,8 min. Sono presenti, inoltre, altri picchi non assegnati, probabilmente dovuti a forme isomeriche dei principali carotenoidi.

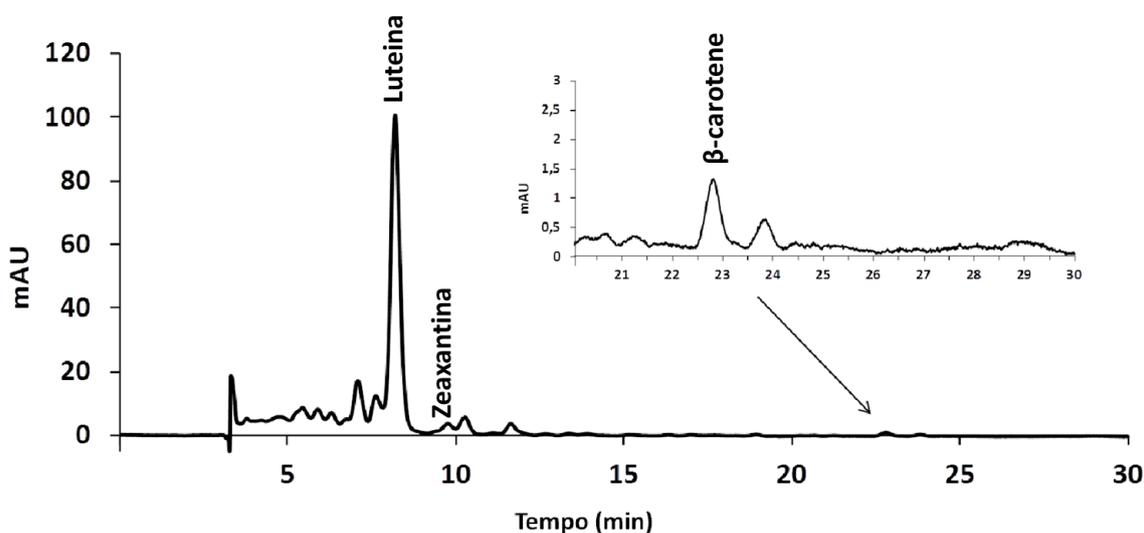


Figura 4.1: carotenoidi identificati mediante RP-HPLC

La separazione è stata ottenuta con una colonna YMC C<sub>30</sub>. Le colonne C<sub>30</sub> sono state sviluppate agli inizi degli anni '90 (Sander *et al.*, 1994) e sono andate ad aggiungersi alle colonne C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub> ancora usate per la separazione dei carotenoidi (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014). Tuttavia, rispetto alle fasi C<sub>18</sub>, le colonne C<sub>30</sub> hanno il vantaggio di garantire una migliore separazione ed una più alta risoluzione degli isomeri geometrici, soprattutto del  $\beta$ -carotene (Rimmer *et al.*, 2005). Tale proprietà è interessante, oltre che da un punto di vista analitico, anche da un punto di vista nutrizionale poiché gli isomeri *cis*- e *trans*- dei carotenoidi possiedono diverse proprietà biologiche e una diversa biodisponibilità (Schieber e Carle, 2005). Allo stesso tempo, però, l'uso delle colonne C<sub>30</sub> comporta tempi di analisi più lunghi (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014). Tale svantaggio è comunque compensato dalla maggiore efficienza separativa.

In Tabella 4.10 sono riportate le concentrazioni in  $\mu\text{g/g}$  (s.s.) di luteina, zeaxantina e  $\beta$ -carotene osservate nei risi crudi. Il carotenoide presente in maggiore quantità è la luteina che rappresenta più del 90% del contenuto in carotenoidi totali intesi come somma di luteina, zeaxantina e  $\beta$ -carotene. Le concentrazioni di luteina oscillano tra 0,64 e 4,11  $\mu\text{g/g}$  (s.s.) nei risi con pericarpo nero e tra 0,19 e 0,88  $\mu\text{g/g}$  (s.s.) nei risi rossi. Il campione N(IT)4 che corrisponde alla varietà italiana Artemide, ha il maggior contenuto in luteina tra tutti i campioni analizzati. Seguono poi i due campioni N(IT)1 e N(IT)3 appartenenti rispettivamente alle varietà italiane Otello e Nerone. Il contenuto più basso è stato riscontrato, invece, nel campione di riso Thai nero (N(TH)1). È stato osservato che i campioni di riso rosso hanno un contenuto medio (0,45  $\mu\text{g/g}$  s.s.) di gran lunga inferiore a quello presente nei risi neri (2,20  $\mu\text{g/g}$  s.s.). Fa eccezione, il campione francese R(FR)2 che ha una concentrazione di luteina confrontabile a quella presente nella varietà Venere N(IT)2.

Per quanto riguarda la zeaxantina, i valori oscillano tra 0,01 e 0,07  $\mu\text{g/g}$  (s.s.). A differenza di quanto osservato per la luteina, i valori di questa xantofilla sembrano variare in maniera indipendente dal colore del chicco. Il campione N(IT)1 ha, ad esempio, una concentrazione di zeaxantina confrontabile a quella osservata nel riso rosso R(FR)1. Anche tra i campioni aventi il pericarpo della stessa colorazione il contenuto di zeaxantina mostra una grande variabilità: ad esempio il campione N(IT)2 ha soltanto il 14% della zeaxantina presente nel campione N(IT)1. Lo stesso è stato osservato tra i campioni con pericarpo rosso R(IT)1 e R(FR)1.

Anche per quanto riguarda il  $\beta$ -carotene, tra i campioni di riso nero è stata osservata una grande variabilità. I valori oscillano, infatti, tra 0,03  $\mu\text{g/g}$  (s.s.) e 0,45  $\mu\text{g/g}$  (s.s.). Nei campioni di riso rosso le concentrazioni sono sempre inferiori a 0,03  $\mu\text{g/g}$  (s.s.) e le differenze tra le varietà non sono significative.

Campione	Luteina $\mu\text{g/g ss}$	Zeaxantina $\mu\text{g/g ss}$	B-carotene $\mu\text{g/g ss}$
N(IT)1	2,81±0,04 <sup>a</sup>	0,07±0,02 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>a</sup>
N(IT)2	1,03±0,10 <sup>b</sup>	0,01±0,00 <sup>b</sup>	0,04±0,01 <sup>a</sup>
N(IT)3	2,74±0,31 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>b</sup>	0,11±0,01 <sup>b</sup>
N(IT)4	4,11±0,11 <sup>c</sup>	0,04±0,01 <sup>b</sup>	0,45±0,03 <sup>c</sup>
N(TH)1	0,64±0,06 <sup>d</sup>	0,02±0,00 <sup>b</sup>	0,07±0,02 <sup>b</sup>
N(CA)1	1,88±0,14 <sup>e</sup>	0,06±0,01 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>a</sup>
R(IT)1	0,33±0,00 <sup>f</sup>	0,01±0,00 <sup>b</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>
R(FR)1	0,42±0,03 <sup>f</sup>	0,07±0,02 <sup>a</sup>	0,03±0,01 <sup>a</sup>
R(FR)2	0,88±0,05 <sup>b</sup>	0,02±0,00 <sup>b</sup>	0,03±0,01 <sup>a</sup>
R(TH)1	0,19±0,00 <sup>g</sup>	0,01±0,00 <sup>b</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>

Tabella 4.10: carotenoidi nei campioni di riso crudo. Lettere diverse in colonna indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )

Il tenore in luteina e  $\beta$ -carotene osservato nei vari campioni oggetto di studio è in accordo con i dati di letteratura. Pereira-Caro *et al.* (2013b) hanno trovato, infatti, in una varietà giapponese di riso nero un contenuto in luteina e  $\beta$ -carotene pari rispettivamente a 3,05  $\mu\text{g/g}$  (s.s.) e 0,14  $\mu\text{g/g}$  (s.s.). Kim *et al.* (2010) hanno trovato in cinque varietà thailandesi di riso nero valori di luteina compresi tra 4,41 e 6,42  $\mu\text{g/g}$  (s.s.) e in due di riso rosso concentrazioni variabili tra 0,14 e 0,22  $\mu\text{g/g}$  (s.s.). I valori di  $\beta$ -carotene osservati dagli stessi autori erano compresi tra 0,21 e 0,48  $\mu\text{g/g}$  (s.s.) nei risi neri e tra 0,05 e 0,07  $\mu\text{g/g}$  (s.s.) nei rossi.

Al contrario, i valori di zeaxantina trovati nei campioni oggetto di studio sono inferiori a quelli riportati in letteratura. Pereira-Caro *et al.* (2013b) trovano in una varietà giapponese di riso nero una concentrazione di zeaxantina pari a 0,65  $\mu\text{g/g}$  (s.s.), mentre Kim *et al.* (2010) hanno osservato in risi thailandesi valori compresi tra 0,02 e 0,15  $\mu\text{g/g}$  (s.s.). Le differenze nel contenuto dei carotenoidi osservate tra i campioni sono, con certezza, attribuibili ad un effetto variatale. Le caratteristiche fisiologiche, genetiche e biochimiche della pianta, infatti, influenzano il contenuto in carotenoidi (Maiani *et al.*, 2009). Inoltre, altri fattori come la stagionalità, la maturazione al raccolto, le condizioni di stoccaggio e le tecniche di trasformazione possono influenzare il contenuto di tali molecole bioattive (Britton *et al.*, 2009).

Occorre notare che i valori di luteina trovati nei risi pigmentati oggetto di studio sono confrontabili con quelli trovati in altri cereali. Panfili *et al.* (2004), ad esempio, hanno trovato nel frumento duro, nel frumento tenero e nell'orzo un contenuto di luteina pari rispettivamente a 2,65, 1,31 e 0,86  $\mu\text{g/g}$  (s.s.). Per gli stessi campioni, il contenuto in zeaxantina era pari rispettivamente a 0,26, 0,14 e 0,30  $\mu\text{g/g}$  (s.s.). Anche i valori riportati da Fratianni *et al.* (2005) per alcune varietà di frumento duro sono confrontabili con quelli osservati nei risi pigmentati analizzati. Infatti, è riportato un contenuto

medio in luteina, zeaxantina e  $\beta$ -carotene pari rispettivamente a 2,25  $\mu\text{g/g}$  (s.s.), 0,26 e 0,14  $\mu\text{g/g}$  (s.s.).

Il confronto tra il contenuto in carotenoidi osservato nei risi oggetto di studio e quello di alcune verdure come spinaci e bietola ha evidenziato nei cereali valori di gran lunga inferiori. Tuttavia, questi sono confrontabili con quelli trovati in carciofi e in alcuni tipi di frutta come le mele e le albicocche (Fратиanni *et al.*, 2015). È importante sottolineare che, rispetto alla frutta e alla verdura che sono legate alla stagionalità, i cereali lavorati hanno il vantaggio di avere tempi di conservazione più lunghi e per questo possono rappresentare una fonte sempre disponibile di carotenoidi.

#### 4.4.1.5 Carotenoidi totali nei campioni di riso cotto

La determinazione del contenuto in carotenoidi nei campioni studiati ed il confronto delle concentrazioni rilevate con quelle osservate in alcuni tipi di frutta e verdura, ha messo in evidenza che i risi pigmentati possono rappresentare una discreta fonte di tali molecole bioattive.

Rispetto alla frutta e alla verdura, il riso lavorato ha una maggiore conservabilità, ma allo stesso tempo, a differenza della frutta e della verdura che vengono consumati freschi e senza essere stati sottoposti a processi di trasformazione, il riso viene consumato solo dopo cottura.

È noto che i trattamenti termici provocano cambiamenti nella composizione in carotenoidi di un alimento a causa di ossidazioni enzimatiche e non enzimatiche, isomerizzazione geometrica o formazione di epossidi (Britton *et al.*, 2009). L'entità della degradazione dei carotenoidi è tanto maggiore quanto più lunghi sono i tempi di cottura e più alte le temperature.

In questo studio, è stata valutata l'entità della degradazione dei carotenoidi indotta da un processo di cottura tipo risotto. Rispetto alla bollitura, questo metodo consente di ridurre la perdita di nutrienti idrosolubili per lisciviazione nell'acqua di cottura e, quindi, di conservare maggiormente le proprietà nutrizionali.

I principali carotenoidi identificati nei campioni di riso cotto sono stati le xantofille luteina e zeaxantina. Per quanto riguarda il  $\beta$ -carotene, in seguito a cottura, le quantità già basse presenti nei campioni tal quali scendono al di sotto del limite di rivelabilità del metodo e, quindi, non sono rilevabili. Solo nel campione N(IT)4 è stato possibile identificare e quantificare tale carotenoide. In Tabella 4.11 sono riportate le concentrazioni, espresse come  $\mu\text{g/g}$  su sostanza secca (s.s.), dei carotenoidi identificati nei campioni di riso cotti.

Campione	Luteina $\mu\text{g/g ss}$	Zeaxantina $\mu\text{g/g ss}$	$\beta$ -carotene $\mu\text{g/g ss}$
N(IT)1	1,19±0,11 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	n.d.
N(IT)2	0,55±0,06 <sup>b</sup>	0,01±0,00 <sup>b</sup>	n.d.
N(IT)3	0,91±0,08 <sup>c</sup>	0,01±0,00 <sup>b</sup>	n.d.
N(IT)4	2,89±0,09 <sup>d</sup>	0,03±0,00 <sup>a</sup>	0,24±0,05
N(TH)1	0,36±0,04 <sup>eb</sup>	0,01±0,00 <sup>b</sup>	n.d.
N(CA)1	0,61±0,09 <sup>b</sup>	0,02±0,00 <sup>ab</sup>	n.d.
R(IT)1	0,17±0,03 <sup>f</sup>	0,01±0,00 <sup>b</sup>	n.d.
R(FR)1	0,20±0,01 <sup>f</sup>	0,01±0,00 <sup>ab</sup>	n.d.
R(FR)2	0,27±0,01 <sup>g</sup>	0,01±0,00 <sup>b</sup>	n.d.
R(TH)1	0,08±0,01 <sup>h</sup>	0,01±0,00 <sup>c</sup>	n.d.

Tabella 4.11: luteina, zeaxantina e  $\beta$ -carotene ( $\mu\text{g/g ss}$ ) nei campioni di riso cotti. I dati sono espressi come media e deviazione standard (SD). La significatività delle differenze ( $p < 0,05$ ), in colonna, è espressa da lettere diverse in apice. n.d.=not detectable

Come già osservato per i risi crudi, la luteina è il carotenoide principale sia nei risi neri che nei rossi. Questa, infatti, rappresenta il 92-99% dei carotenoidi identificati. Nei risi neri i valori di tale carotenoide oscillano tra 0,36  $\mu\text{g/g ss}$  e 2,89  $\mu\text{g/g ss}$ , mentre nei risi rossi le concentrazioni variano tra 0,08  $\mu\text{g/g ss}$  e 0,27  $\mu\text{g/g ss}$ . Il campione N(IT)4 è risultato il più ricco in luteina, mentre l'N(TH)1 il più povero. Occorre osservare che il campione della varietà Venere, indicato come N(IT)2, ha una concentrazione di luteina comparabile al campione di riso nero thailandese N(TH)1.

Ad eccezione dei campioni R(IT)1 e R(FR)1, il contenuto in luteina nei risi rossi cotti è risultato significativamente diverso ( $p < 0,05$ ). È interessante notare che i valori di luteina trovati nei campioni di riso nero cotti sono confrontabili con quelli determinati in altri cereali crudi (Panfili *et al.*, 2004; Fratianni *et al.*, 2005). Mamatha *et al.* (2011), ad esempio, riportano un contenuto di luteina nell'orzo pari a 0,22  $\mu\text{g/g ss}$  che è confrontabile a quello riscontrato nei risi rossi cotti.

Per quanto riguarda il contenuto in zeaxantina, i valori oscillano tra 0,01  $\mu\text{g/g ss}$  e 0,03  $\mu\text{g/g ss}$ . I campioni N(IT)1, N(IT)4 e N(CA)1 mostrano un contenuto di zeaxantina significativamente maggiore di tutti i restanti campioni sia con pericarpo nero che rosso.

#### 4.4.1.6 Valutazione dell'effetto della cottura sulla stabilità dei carotenoidi

I valori di luteina e zeaxantina trovati nei campioni cotti sono stati confrontati con quelli presenti nei corrispettivi campioni crudi (Tabella 4.12) per poter valutare l'entità della degradazione dei carotenoidi in seguito alla cottura di tipo risotto.

	Luteina totale			Zeaxantina		
	Risi crudi $\mu\text{g/g ss}$	Risi cotti $\mu\text{g/g ss}$	Perdita %	Risi crudi $\mu\text{g/g ss}$	Risi cotti $\mu\text{g/g ss}$	Perdita %
N(IT)1	2,81±0,04 <sup>A</sup>	1,19±0,11 <sup>B</sup>	58	0,07±0,01 <sup>A</sup>	0,02±0,00 <sup>B</sup>	72
N(IT)2	1,03±0,10 <sup>A</sup>	0,55±0,06 <sup>B</sup>	46	0,01±0,00 <sup>A</sup>	0,01±0,00 <sup>B</sup>	19
N(IT)3	2,74±0,31 <sup>A</sup>	0,91±0,08 <sup>B</sup>	67	0,03±0,00 <sup>A</sup>	0,01±0,00 <sup>B</sup>	53
N(IT)4	4,11±0,19 <sup>A</sup>	2,89±0,09 <sup>B</sup>	30	0,04±0,01 <sup>A</sup>	0,03±0,00 <sup>A</sup>	33
N(TH)1	0,64±0,06 <sup>A</sup>	0,36±0,04 <sup>B</sup>	44	0,02±0,00 <sup>A</sup>	0,01±0,00 <sup>B</sup>	35
N(CA)1	1,88±0,14 <sup>A</sup>	0,61±0,09 <sup>B</sup>	67	0,06±0,01 <sup>A</sup>	0,02±0,00 <sup>B</sup>	67
R(IT)1	0,33±0,00 <sup>A</sup>	0,17±0,03 <sup>B</sup>	48	0,01±0,00 <sup>A</sup>	0,01±0,00 <sup>A</sup>	24
R(FR)1	0,42±0,03 <sup>A</sup>	0,20±0,01 <sup>B</sup>	53	0,07±0,01 <sup>A</sup>	0,01±0,00 <sup>B</sup>	80
R(FR)2	0,88±0,05 <sup>A</sup>	0,27±0,01 <sup>B</sup>	69	0,02±0,00 <sup>A</sup>	0,01±0,00 <sup>B</sup>	60
R(TH)1	0,19±0,00 <sup>A</sup>	0,08±0,01 <sup>B</sup>	57	0,01±0,00 <sup>A</sup>	0,01±0,00 <sup>B</sup>	47

Tabella 4.12: luteina e zeaxantina (media±SD) nei campioni di riso crudo e cotto. Lettere maiuscole diverse, nella riga, per ciascun carotenoide, indicano una differenza significativa ( $p<0,05$ ) in seguito a cottura

È evidente che in seguito a cottura si ha una diminuzione statisticamente significativa ( $p<0,05$ ) di luteina per tutti i campioni. Nei risi neri la percentuale di luteina che si degrada oscilla tra il 30% del campione Artemide e il 67% del campione N(CA)1, con una media pari al 52%.

Poiché tutti i campioni sono stati sottoposti allo stesso trattamento termico, è possibile ipotizzare che l'entità della degradazione sia condizionata essenzialmente dall'effetto varietale. In particolare il diverso corredo enzimatico dei campioni potrebbe spiegare il diverso effetto della cottura sui carotenoidi: le varietà di riso aventi enzimi ossidanti più termostabili siano soggette a perdite di carotenoidi più consistenti. Allo stesso tempo, la minore degradazione dei carotenoidi riscontrata in alcune varietà potrebbe essere dovuta sia alla co-presenza di altri antiossidanti che alla struttura dei tessuti vegetali: l'acqua può rompere e ammorbidire i tessuti favorendo il rilascio di carotenoidi (Pasaporte *et al.*, 2014).

Per quanto riguarda il contenuto di zeaxantina, la diminuzione è significativa per tutti i campioni eccetto che per il riso nero N(IT)4 e per il riso rosso R(IT)1. La degradazione media è pari al 60%, mentre il valore massimo è stato registrato nel riso R(FR)1 ed è pari all'80%. Una significativa diminuzione del contenuto in zeaxantina in seguito a trattamento termico è stato osservato anche in altre matrici come le verdure (Pasaporte *et al.*, 2014). Questa potrebbe essere attribuibile all'isomerizzazione della *all-trans* zeaxantina alla conformazione *cis* (Milanowska e Gruszecki, 2005).

#### 4.4.2 Luteina libera

I carotenoidi possono presentarsi in forma libera, esterificata o legati alla matrice, in particolare alle proteine. Dati di letteratura mostrano che nella frutta e nella verdura i carotenoidi esistono prevalentemente in forma esterificata ad acidi grassi e legati alla matrice (Oliver e Palou, 2000; Fratianni *et al.*, 2015). Il grado di esterificazione di tali molecole dipende, essenzialmente, dal numero di gruppi idrossilici presenti sulle xantofille e sui caroteni: diidrossicarotenoidi come la luteina e la zeaxantina possono esistere come mono- e di-esteri.

L'esterificazione con gli acidi grassi ne modifica la liposolubilità e di conseguenza anche l'assorbimento nell'intestino da parte degli enterociti. Secondo Fernández-García *et al.* (2007) le xantofille esterificate hanno una maggiore liposolubilità delle xantofille in forma libera oltre che dei caroteni. Chitchumroonchokchai e Failla (2006) hanno dimostrato, inoltre, che gli esteri delle xantofille devono essere incorporati in micelle per poter essere assorbiti dalle membrane degli enterociti.

Nonostante siano necessari complessi studi per comprendere l'effetto dell'esterificazione sulla bioaccessibilità e biodisponibilità dei carotenoidi, valutare in quale forma i carotenoidi sono presenti in un alimento è importante per comprenderne il valore nutrizionale.

In questo studio la luteina libera è stata determinata come descritto nel capitolo 3. La procedura estrattiva è la stessa utilizzata per i carotenoidi totali salvo l'uso dell'acqua distillata in sostituzione dell'idrossido di potassio. Analogamente a quanto fatto per i carotenoidi totali, è stato valutato il numero estrazioni con esano:etilacetato 9:1 v/v necessarie ad estrarre quantitativamente la luteina libera.

##### 4.4.2.1 Ottimizzazione della metodica: valutazione del numero di estrazioni

Un'aliquota del campione di riso nero di Baraggia e Nerone pari a 2 g è stata sottoposta a trattamento a caldo (70°C) per 45 minuti in presenza di pirogallolo e la sospensione ottenuta è stata estratta ripetutamente (4 volte) con 20 mL di esano:etilacetato 9:1 v/v. I primi tre estratti sono stati riuniti, mentre il quarto è stato conservato singolarmente. Dopo completa rimozione della fase organica, il residuo secco degli estratti riuniti e del quarto estratto è stato ripreso con metanolo:tetraidrofurano 95:5 v/v e sottoposto ad analisi cromatografica.

I risultati, riportati in Tabella 4.14, mostrano che per estrarre quantitativamente la luteina libera dalla matrice cerealicola sono necessarie 4 estrazioni con 20 mL di miscela esano:etilacetato 9:1 v/v. Effettuando solo tre estrazioni si avrebbe, infatti, una perdita del 10% per il campione N(IT)3 e del 16% per il campione N(IT)1. I dati ottenuti confermano l'adeguatezza della procedura sia in termini quantitativi che in termini di riproducibilità dei risultati.

Occorre sottolineare che l'estrazione quantitativa della luteina libera è ottenuta con quattro estrazioni, mentre quella della luteina totale con tre. Tale differenza è attribuibile alla diversa quantità di campione utilizzata. Inoltre, i risi pigmentati sono caratterizzati dalla presenza di un pericarpo la cui integrità viene persa in seguito all'uso dell'idrossido di potassio nella determinazione della luteina totale.

Al fine di ridurre il consumo di solvente, è stata valutata anche la possibilità di utilizzare 15 mL di miscela estraente invece di 20 mL. Pertanto, sono stati analizzati gli stessi campioni della prova precedente estraendo per tre volte con 15 mL di miscela organica e riunendo gli estratti. Inoltre, come per le prove riportate sopra, è stata effettuata un'ulteriore estrazione al fine di verificare la necessità di ripetere l'estrazione quattro volte.

Dai dati sperimentali riportati in Tabella 4.13 e in Tabella 4.14 è emerso che la riduzione del volume estraente a 15 mL consente di avere un'estrazione quantitativa di luteina libera in entrambi i campioni, pur restando la necessità di ripetere l'estrazione fino a quattro volte.

Campione	Volume estraente <i>mL</i>	N° estrazioni	Luteina libera		
			<i>μg/g ss</i>	CV %	% 4a estrazione
N(IT)1	20	3 estrazioni riunite	1,19	0,8	16
		solo 4a estrazione	0,22	12,0	
		Totale	1,41	1,4	
N(IT)1	15	3 estrazioni riunite	1,18	2,6	17
		solo 4a estrazione	0,24	8,3	
		Totale	1,42	0,8	
N(IT)3	20	3 estrazioni riunite	1,85	4,5	10
		solo 4a estrazione	0,20	5,7	
		Totale	2,06	3,9	
N(IT)3	15	3 estrazioni riunite	1,79	1,8	
		solo 4a estrazione	0,22	7,1	11
		Totale	2,01	1,0	

Tabella 4.13: luteina libera in due campioni di riso nero - valutazione del numero di estrazioni e del volume estraente. I dati sono medie di misure replicate (n=3)

Campioni	Volume estraente <i>mL</i>	N° determinazioni	Luteina libera <i>μg/g ss</i>	Livello significatività	P<0,05
N(IT)1	20	3	1,41	t sper=- 0,3771	n.s.
N(IT)1	15	3	1,42	t crit= 2,9199	
N(IT)3	20	3	2,06	t sper= 0,8551	n.s.
N(IT)3	15	3	2,01	t crit= 2,9199	

Tabella 4.14: significatività delle differenze di concentrazioni di luteina libera estratta con volumi diversi di miscela dai campioni N(IT)1 e N(IT)3. n.s= non significativa

#### 4.4.2.2 Analisi in RP-HPLC

In Figura 4.2 è mostrato un tipico cromatogramma dell'estratto della luteina libera dei risi pigmentati oggetto di studio. Il confronto con il cromatogramma relativo alla luteina totale dello stesso campione mette in evidenza come, in assenza di saponificazione, sia rinvenibile un maggior numero di composti. Con la saponificazione, infatti, si riduce la quantità di sostanze organiche estraibili in quanto l'idrolisi scinde gli esteri a molecole più idrofile facendo sì che queste rimangano nella fase acquosa e non siano estratte dalla miscela esano:etilacetato (Panfili *et al.*, 2004).

In questo studio, per tutti i campioni analizzati, i picchi che differenziano maggiormente l'estratto non saponificato da quello saponificato sono il picco che esce immediatamente prima della luteina con un massimo di assorbimento a 466 nm e a 651 nm ed il picco con tempo di ritenzione 21,5 min con un massimo di assorbimento a 436 nm e 654 nm. Dallo spettro è possibile ipotizzare che si tratti di molecole appartenenti alla classe delle clorofille.

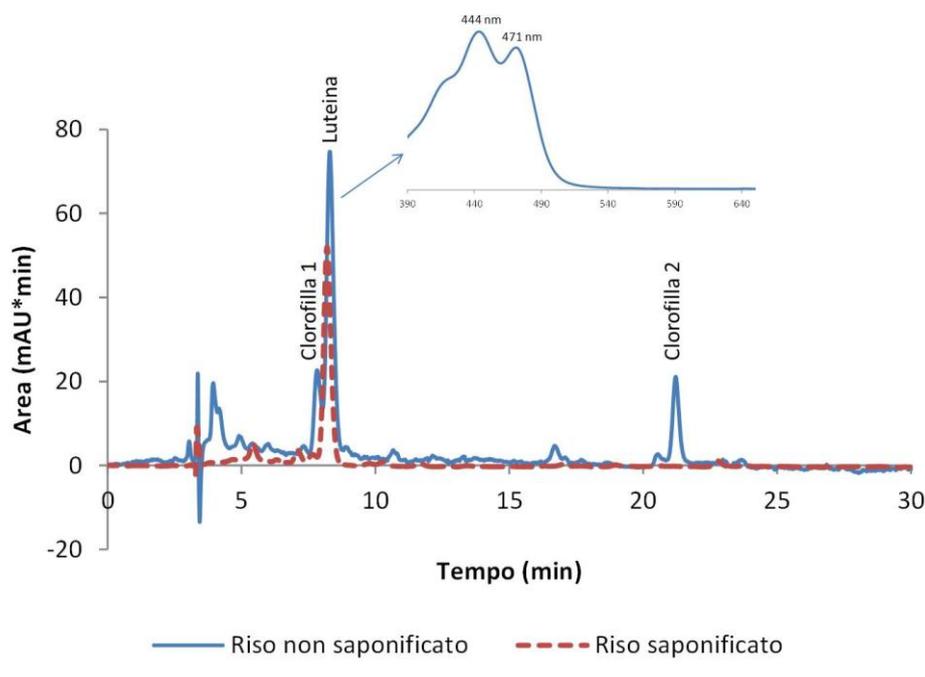


Figura 4.2: cromatogramma dell'estratto di un riso saponificato ed un riso non saponificato

#### 4.4.2.3 Prove di recupero della luteina libera

Per valutare l'affidabilità della procedura analitica sono state condotte prove di recupero aggiungendo ad una aliquota di campione N(IT)3 una quantità nota di una soluzione di luteina standard e sottoponendo la soluzione alla procedura estrattiva e all'analisi cromatografica. I risultati sono riportati in Tabella 4.15.

Campione	Replica	C matrix	C fortified	C spike	Recupero
		$\mu g$	$\mu g$	$\mu g$	%
N(IT)3	1	1,43	1,80	0,4	93
	2	1,43	3,39	2,2	89
	3	1,43	2,08	0,7	94
Media					92
SD					2
CV%					2

Tabella 4.15: recupero della luteina libera addizionata al campione N(IT)3

Nota la quantità di luteina addizionata (C spike), il contenuto di luteina nel campione (C matrix) e la quantità di luteina ottenuta nel campione addizionato di soluzione standard (C fortified) è stato calcolato il recupero percentuale. Il valore ottenuto dalla media di tre repliche è pari al 92%.

I valori di luteina libera determinata nei campioni di riso pigmentato crudo oggetto di studio sono riportati in Tabella 4.16.

	Luteina libera (LL)	Luteina totale (LT)	LL/LT
	Concentrazione ( $\mu\text{g/g ss}$ )	Concentrazione ( $\mu\text{g/g ss}$ )	%
N(IT) 1	1,42 $\pm$ 0,08 <sup>aA</sup>	2,81 $\pm$ 0,04 <sup>B</sup>	50
N(IT) 2	0,78 $\pm$ 0,01 <sup>bA</sup>	1,03 $\pm$ 0,10 <sup>B</sup>	76
N(IT) 3	2,06 $\pm$ 0,10 <sup>cA</sup>	2,74 $\pm$ 0,31 <sup>A</sup>	75
N(IT) 4	4,35 $\pm$ 0,18 <sup>dA</sup>	4,11 $\pm$ 0,19 <sup>A</sup>	106
N(TH) 1	0,75 $\pm$ 0,01 <sup>bA</sup>	0,64 $\pm$ 0,06 <sup>A</sup>	118
N(CA)1	0,76 $\pm$ 0,00 <sup>bA</sup>	1,88 $\pm$ 0,14 <sup>B</sup>	40
R(IT) 1	0,35 $\pm$ 0,00 <sup>eA</sup>	0,33 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>	107
R(FR) 1	0,28 $\pm$ 0,04 <sup>eA</sup>	0,42 $\pm$ 0,03 <sup>B</sup>	66
R(FR) 2	0,50 $\pm$ 0,01 <sup>fA</sup>	0,88 $\pm$ 0,05 <sup>B</sup>	57
R(TH) 1	0,18 $\pm$ 0,01 <sup>gA</sup>	0,19 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>	97

Tabella 4.16: luteina libera (LL) e totale (LT) espresse come media $\pm$ SD nei campioni di riso crudo. Lettere minuscole in colonna e lettere maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )

Per i risi neri la luteina libera oscilla tra 0,75 e 4,35  $\mu\text{g/g}$  (s.s.), mentre per i risi rossi tra 0,18 e 0,50  $\mu\text{g/g}$  (s.s.). Nel gruppo dei risi neri, il maggior contenuto è stato trovato nel campione della varietà Artemide (N(IT)4), mentre nei risi con pericarpo rosso la più alta concentrazione di luteina libera è stata trovata nel riso rosso lungo semintegrale (R(FR)2). Le due varietà pigmentate Thai (N(TH)1 e R(TH)1) hanno, invece, il minor contenuto in luteina libera.

Il confronto dei dati relativi al contenuto in luteina libera con quelli della luteina totale ha evidenziato che in tutti i campioni, eccetto quello della varietà canadese, tale carotenoide si trova prevalentemente in forma libera con una percentuale superiore al 50%. Nei campioni di riso Artemide (N(IT)4), Thai nero (N(TH)1) e riso Ermes (R(IT)1) la luteina si trova totalmente o quasi totalmente in forma libera.

Per valutare l'effetto della cottura sulla luteina libera, il contenuto è stato determinato non solo sui risi crudi ma anche sui cotti. I risultati sono riportati in Tabella 4.17.

	<b>Luteina libera</b>	<b>Luteina totale</b>	<b>Luteina libera residua</b>
	<i>Concentrazione</i>	<i>Concentrazione</i>	
	<i>(<math>\mu\text{g/g s.s.}</math>)</i>	<i>(<math>\mu\text{g/g s.s.}</math>)</i>	<i>%</i>
N(IT) 1	0,68±0,06 <sup>aA</sup>	1,19±0,11 <sup>B</sup>	57
N(IT) 2	0,18±0,02 <sup>bA</sup>	0,55±0,06 <sup>B</sup>	32
N(IT) 3	1,11±0,08 <sup>cA</sup>	0,91±0,08 <sup>A</sup>	121
N(IT) 4	0,99±0,06 <sup>cA</sup>	2,89±0,09 <sup>B</sup>	34
N(TH) 1	0,14±0,01 <sup>bA</sup>	0,36±0,04 <sup>B</sup>	39
N(CA)1	0,45±0,04 <sup>dA</sup>	0,61±0,09 <sup>B</sup>	73
R(IT) 1	0,04±0,00 <sup>eA</sup>	0,17±0,03 <sup>B</sup>	24
R(FR) 1	0,07±0,02 <sup>eA</sup>	0,20±0,01 <sup>B</sup>	36
R(FR) 2	0,09±0,00 <sup>eA</sup>	0,27±0,01 <sup>B</sup>	35
R(TH) 1	0,03±0,00 <sup>eA</sup>	0,08±0,01 <sup>B</sup>	37

Tabella 4.17: luteina libera e totale nei risi cotti. Lettere diverse minuscole in colonna e lettere maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )

Dopo cottura, i valori di luteina nei campioni neri oscillano tra 0,14 e 1,11  $\mu\text{g/g}$  (s.s.). Non ci sono differenze statisticamente significative tra i campioni N(IT)3 e N(IT)4 e tra N(IT)2 e N(TH)1. Tra i campioni di riso rosso le differenze sono statisticamente non significative, mentre i valori sono significativamente inferiori a quelli dei risi neri. La percentuale di luteina libera nei risi con pericarpo nero cotti mostra un'elevata variabilità: il campione di riso Nerone (N(IT)3) è l'unico in cui si trova tutta in forma libera.

Per valutare l'effetto della cottura sulla luteina libera, la concentrazioni riscontrate nei risi crudi sono state confrontate con quelle osservate nei campioni cotti (Tabella 4.18).

	<b>Luteina libera risi crudi</b>	<b>Luteina libera risi cotti</b>	<b>Luteina libera residua</b>
	<i>Concentrazione</i>	<i>Concentrazione</i>	
	<i>(<math>\mu\text{g/g ss}</math>)</i>	<i>(<math>\mu\text{g/g ss}</math>)</i>	<i>%</i>
N(IT) 1	1,42±0,08 <sup>A</sup>	0,68±0,06 <sup>B</sup>	48
N(IT) 2	0,78±0,01 <sup>A</sup>	0,18±0,02 <sup>B</sup>	22
N(IT) 3	2,06±0,10 <sup>A</sup>	1,11±0,08 <sup>B</sup>	54
N(IT) 4	4,35±0,18 <sup>A</sup>	0,99±0,06 <sup>B</sup>	23
N(TH) 1	0,75±0,01 <sup>A</sup>	0,14±0,01 <sup>B</sup>	19
N(CA)1	0,76±0,00 <sup>A</sup>	0,45±0,04 <sup>B</sup>	59
R(IT) 1	0,35±0,00 <sup>A</sup>	0,04±0,00 <sup>B</sup>	12

	Luteina libera risi crudi	Luteina libera risi cotti	Luteina libera residua
R(FR) 1	0,28±0,04 <sup>A</sup>	0,07±0,02 <sup>B</sup>	25
R(FR) 2	0,50±0,01 <sup>A</sup>	0,09±0,00 <sup>B</sup>	19
R(TH) 1	0,18±0,01 <sup>A</sup>	0,03±0,00 <sup>B</sup>	16

Tabella 4.18: luteina libera in risi crudi e cotti espressa come media±SD. Lettere maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )

Il confronto dei valori della luteina libera nei risi cotti con quelli presenti nei risi crudi consente di valutare l'entità della degradazione della luteina libera indotta dalla cottura. La concentrazione di luteina libera diminuisce significativamente in tutti i campioni ma con entità diverse. Il campione di riso selvatico è quello che risente di meno della cottura, infatti mantiene il 59% della luteina presente nel rispettivo campione crudo, mentre nel Thai nero ne rimane solo il 19%. La variabilità della degradazione della luteina tra i campioni è attribuibile al diverso corredo enzimatico delle varietà (Pasaporte et al., 2014), alla struttura dei chicchi o alla presenza di altri antiossidanti.

#### 4.4.3 Carotenoidi ed indici di colore

I carotenoidi sono molecole bioattive che svolgono anche la funzione di pigmenti conferendo ai tessuti vegetali una caratteristica colorazione giallo-arancio. L'analisi cromatografica ha messo in evidenza che nei risi pigmentati, sia con pericarpo nero che rosso, sono presenti luteina, zeaxantina e  $\beta$ -carotene. Poiché queste molecole sono responsabili della colorazione gialla dei tessuti vegetali, nonostante il numero limitato di campioni, è stata valutata la possibile correlazione tra il contenuto in luteina, principale carotenoide presente nei risi, e l'indice di giallo  $b^*$ . Il diagramma riportato in Figura 4.3 mostra la correlazione tra i due parametri: è presente una discreta correlazione ( $R^2 = 0,5762$ ), ma negativa come indicato dal valore del coefficiente angolare della retta di regressione. Questo indica che i campioni con un contenuto di luteina maggiore hanno un indice di  $b^*$  più basso.

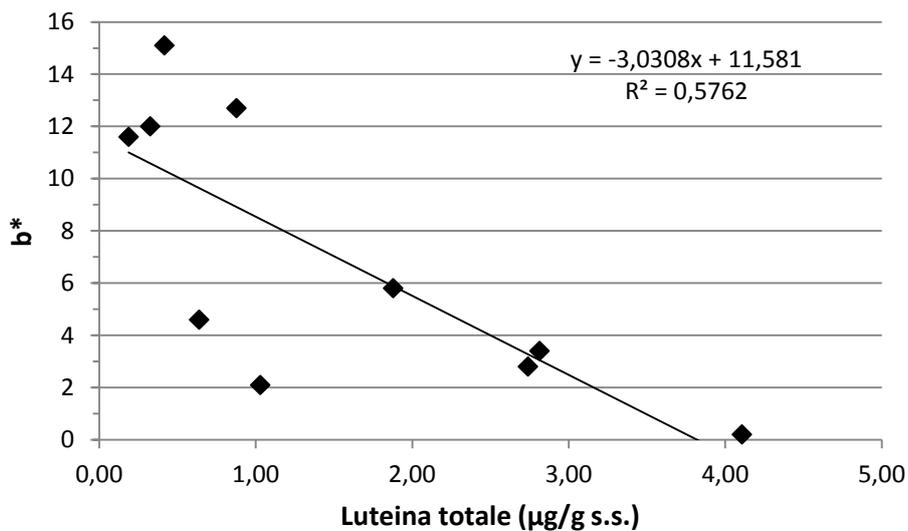


Figura 4.3: correlazione tra luteina totale e indice di giallo b\*

Nel frumento duro è stata osservata, al contrario, una significativa correlazione positiva tra l'indice di giallo b\* ed il contenuto in luteina totale (Fратиани *et al.*, 2005): a campioni con un valore di b\* più grande corrispondeva un maggiore contenuto di tale carotenoide. Il diverso comportamento tra il frumento duro ed i risi pigmentati potrebbe essere dovuto al fatto che ci sono altri fattori oltre alla quantità di pigmenti che influenzano il grado di giallo e quindi l'indice b\* (Fратиани *et al.*, 2005). Inoltre, a differenza della zeaxantina e del  $\beta$ -carotene che si trovano principalmente negli strati esterni della cariosside, la luteina ha una distribuzione più omogenea (Hentschel *et al.*, 2002). Aumentando il numero di campioni a disposizione, sarebbe possibile valutare più dettagliatamente questa correlazione aprendo la strada all'uso dell'indice di colore b\* come parametro predittivo rapido, in grado di fornire una stima del contenuto in carotenoidi nei risi pigmentati.

#### 4.5 DETERMINAZIONE DEI PIGMENTI SOLUBILI IN BUTANOLO SATURO D'ACQUA

La colorazione dei risi pigmentati è dovuta a componenti che, oltre a fungere da pigmenti, sono responsabili delle proprietà nutraceutiche riconosciute a questi alimenti.

Attraverso la determinazione degli indici di colore, sono state ottenute informazioni sulle componenti del colore e, analogamente a quanto viene fatto per il frumento (metodo standard ICC No 152), nei risi sono stati estratti i pigmenti con butanolo saturo d'acqua (WSB). Quindi è stata tentata una correlazione tra gli indici di colore e la concentrazione in pigmenti solubili in WSB poiché la possibilità di estrapolare il contenuto in pigmenti attraverso la misura di tali indici aprirebbe la strada ad un impiego delle misure in riflettanza diffusa come test di *screening* rapido per la determinazione quantitativa di questi componenti.

La prima fase del lavoro è consistita nell'adattare il metodo alla matrice in oggetto. È stato, quindi, valutato il rapporto tra quantità di campione (g) e volume di solvente estraente (mL) tali da assicurare un'estrazione quantitativa dei pigmenti gialli. Il metodo standard, infatti, prevede di estrarre circa 10 g di campione con 50 mL di butanolo saturo d'acqua per 16-18 ore al buio. Su un campione di riso nero (N(IT)1) e su un campione di riso rosso (R(IT)1) sono state condotte prove di estrazione utilizzando un diverso rapporto tra quantità di campione e volume di solvente estraente. Quindi, sono state estratte cinque aliquote di campione a partire da un rapporto 20:100 (g/mL) previsto dal metodo standard ICC No 152 (Tabella 4.19).

L'analisi spettrofotometrica (Tabella 4.19) ha messo in evidenza che per rapporti superiori a 15:100 si avevano valori di assorbanza al di fuori dell'intervallo di linearità della legge di Lambert-Beer. Al contrario, per rapporti uguali o inferiori a 1:100 i valori di assorbanza erano trascurabili. Pertanto i rapporti 5:100 e 10:100 si sono rivelati come adeguati per ottenere valori di assorbanza nel *range* di linearità della legge di Lambert-Beer. Per verificare che, nelle condizioni adottate, si ottenesse un'estrazione quantitativa, il residuo rimasto dopo la prima estrazione è stato nuovamente estratto e le letture spettrofotometriche effettuate hanno dimostrato l'assenza di pigmenti gialli residui dopo la prima estrazione. Pertanto è stato concluso che il rapporto ottimale per estrarre i pigmenti con WSB da un campione di riso nero è compreso tra 5:100 e 10:100.

Campione	WSB	Rapporto	Abs <sub>450 nm</sub>
g	mL	g/mL	
3,0	15	20:100	1,90±0,00
2,3	15	15:100	1,40±0,00
1,5	15	10:100	0,95±0,00
0,8	15	5:100	0,44±0,00
0,2	15	1:100	0,07±0,00

Tabella 4.19: rapporti tra quantità di campione (g) e volume di solvente (mL) testati per l'estrazione di un campione di riso con pericarpo nero (media di almeno due estrazioni)

Una volta definito il rapporto ottimale, per le determinazioni è stata utilizzata una quantità di campione che consentisse l'utilizzo di soli 15 mL di solvente (volume necessario all'analisi spettrofotometrica con cuvette con cammino ottico 1 cm) in modo da ottenere l'estrazione esaustiva dei pigmenti e contemporaneamente ridurre la quantità di solvente utilizzato riducendo i costi di analisi e migliorando l'impatto dell'analisi sull'ambiente.

Analogamente ai risi neri, anche per i risi rossi è stato studiato il rapporto tra quantità di campione (g) e volume di solvente (mL) tale da ridurre al minimo il volume di miscela estraente ed avere una completa estrazione dei pigmenti gialli. I rapporti testati sono riportati in Tabella 4.20.

Campione	WSB	Rapporto	Abs <sub>450 nm</sub>
g	mL	g/mL	
3,75	15	25:100	0,29±0,01 <sup>a</sup>
3,00	15	20:100	0,14±0,00 <sup>b</sup>
2,30	15	15:100	0,12±0,00 <sup>c</sup>
1,50	15	10:100	0,08±0,00 <sup>d</sup>
0,80	15	5:100	0,06±0,00 <sup>e</sup>
0,20	15	1:100	0,02±0,00 <sup>f</sup>

Tabella 4.20: rapporti tra quantità di campione (g) e volume di solvente (mL) testati per l'estrazione di un campione di riso con pericarpo rosso (media di almeno due estrazioni)

A differenza di quanto osservato per i risi neri, per i risi rossi è necessario utilizzare un rapporto tra quantità di campione (g) e volume di solvente (mL) pari almeno a 20:100 che è lo stesso utilizzato per l'estrazione delle semole, in quanto per rapporti inferiori si hanno valori di assorbanza trascurabili. È possibile anche aumentare la quantità di campione di riso rosso da estrarre fino ad un rapporto 25:100, così da ottenere valori ben al di sopra del limite di quantificazione.

Durante la fase di ottimizzazione del metodo è stato osservato che le fasi organiche ottenute dall'estrazione di un riso nero e di un riso rosso avevano colorazioni diverse: nel primo caso l'estratto aveva una colorazione rosso porpora, nel secondo una colorazione gialla (Figura 4.4).



Figura 4.4: estratto in WSB di un riso nero (a sinistra) e di un riso rosso (a destra)

L'analisi spettrofotometrica degli estratti nella regione spettrale compresa tra 330 nm e 700 nm ha messo in evidenza che questi presentano andamenti spettrali diversi (Figura 4.5).

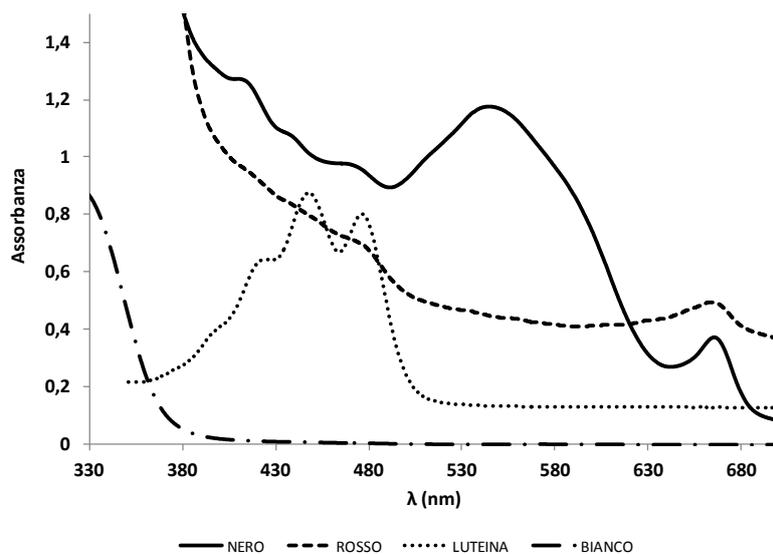


Figura 4.5: spettro nel visibile dell'estratto in WSB di un riso nero (-), di un riso rosso (- - -), di un riso bianco (.....) e di luteina standard (---)

L'estratto in WSB del riso con pericarpo nero mostra un massimo di assorbimento intorno a 550 nm, regione nella quale assorbono tipicamente i composti antocianici. Questo spiega il colore rosso porpora assunto dall'estratto. Nella regione spettrale intorno a 450 nm, per entrambe le tipologie di riso, si ha un assorbimento non attribuibile ai soli carotenoidi. Il confronto tra lo spettro di una soluzione di luteina standard solubilizzata in WSB e quello degli estratti dei campioni dimostra quanto affermato. Questo evidenzia, quindi, la assoluta assenza di selettività del butanolo saturo d'acqua nei confronti dei pigmenti gialli. Anche Fratianni *et al.* (2005) riportano che tale metodo non è applicabile a farine di frumento integrali in quanto il contenuto in carotenoidi totali è aumentato dalla presenza di pigmenti interferenti.

L'estratto in WSB di un riso bianco (varietà Ronaldo), al contrario, non mostra alcun assorbimento nella regione spettrale compresa tra 330 e 700 nm, a conferma che la quasi totalità dei pigmenti è localizzata nelle parti più esterne del chicco, come il pericarpo (Pereira-Caro *et al.*, 2013a).

Sebbene l'analisi spettrofotometrica degli estratti in WSB dei risi N(IT)1 e R(IT)1 abbia messo in evidenza l'assenza di selettività del solvente utilizzato nei confronti dei pigmenti gialli e in particolare dei carotenoidi, si è proceduto ad analizzare i restanti campioni di riso e a determinare i pigmenti estraibili in tale solvente.

Sebbene nel metodo standard ICC il contenuto in pigmenti gialli sia espresso come mg di  $\beta$ -carotene equivalenti su 100 g (s.s.), in questo studio i risultati sono stati espressi come mg di luteina equivalenti su 100 g (s.s.), poiché i principali carotenoidi presenti nei risi pigmentati sono le

xantofille luteina e zeaxantina (Kim *et al.*, 2010; Pereira-Caro *et al.*, 2013a). Per tale motivo le letture spettrofotometriche degli estratti in WSB sono state effettuate alla lunghezza d'onda di 444 nm.

Il contenuto in pigmenti estraibili in WSB nei risi neri è significativamente superiore a quello dei risi rossi. I primi mostrano, infatti, valori che oscillano tra 0,79 e 4,58 mg di luteina equivalenti/100 g (s.s.) (Tabella 4.21), mentre i secondi tra 0,05 e 0,14 mg di luteina equivalenti/100 g (s.s.).

Campione	Pigmenti
	<i>mg luteina /100 g ss</i>
N(IT) 1	2,65±0,04 <sup>a</sup>
N(IT) 2	3,18±0,15 <sup>b</sup>
N(IT) 3	3,65±0,16 <sup>b</sup>
N(IT) 4	4,58±0,15 <sup>c</sup>
N(TH) 1	1,43±0,11 <sup>d</sup>
N(CA)1	0,79±0,00 <sup>e</sup>
R(IT) 1	0,09±0,00 <sup>f</sup>
R(FR) 1	0,14±0,00 <sup>g</sup>
R(FR) 2	0,10±0,00 <sup>f</sup>
R(TH) 1	0,05±0,00 <sup>h</sup>

Tabella 4.21: pigmenti gialli in mg luteina/100 g ss (media di tre repliche ± SD). Lettere diverse in colonna indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )

Il diagramma di correlazione tra il contenuto in pigmenti estraibili in butanolo saturo dei campioni e l'indice colorimetrico  $b^*$  (Figura 4.6) mette in evidenza una correlazione negativa tra le due grandezze. Pertanto, all'aumentare dei valori dell'indice colorimetrico  $b^*$  diminuisce il contenuto in pigmenti gialli. Va sottolineato che i risultati ottenuti sui risi neri non si riferiscono unicamente ai carotenoidi, come accade per il frumento, ma a molecole di diversa natura comunque solubili nel solvente utilizzato. Questo spiega l'apparente anomalia che emerge confrontando i dati riportati in Tabella 4.21 con gli indici di colore ed in particolare con l'indice  $b^*$  che risulta superiore nei risi rossi rispetto ai neri. Questo risultato conferma ancora una volta la aspecificità del butanolo.

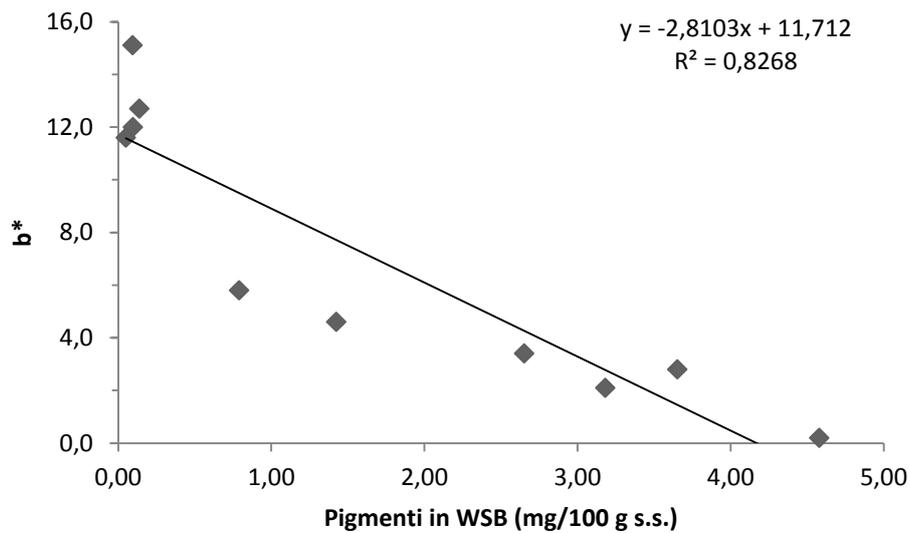


Figura 4.6: correlazione tra pigmenti gialli solubili in WSB e indice di giallo ( $b^*$ ) in tutti i campioni di riso oggetto di studio

Tale risultato è dovuto al maggior peso esercitato dai campioni di riso nero rispetto a quelli di riso rosso che presentano valori di pigmenti estratti molto più bassi e vicini tra loro come è si evidenzia dalla Figura 4.7 in cui sono stati considerati solo campioni di riso nero.

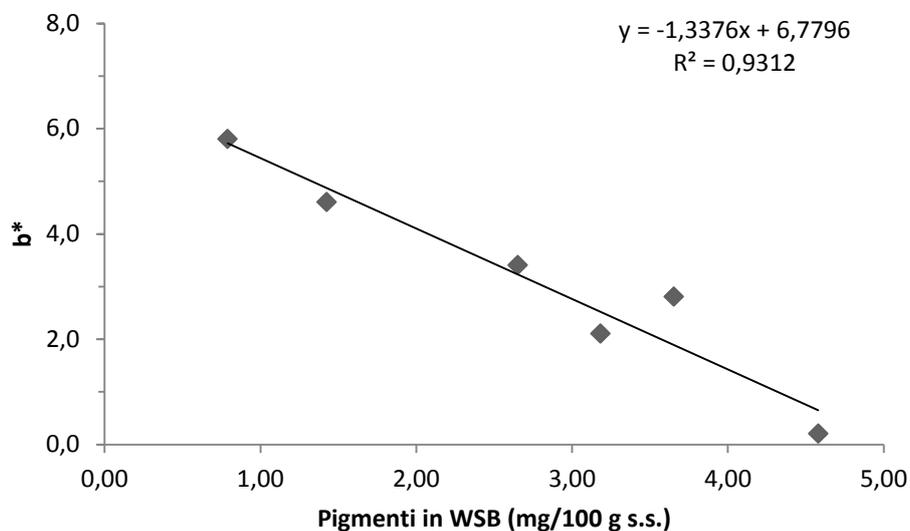


Figura 4.7: correlazione tra pigmenti gialli solubili in WSB e indice di giallo ( $b^*$ ) nei campioni di riso nero

Per i risi rossi è stato osservato, invece, un andamento positivo anche se, a causa della ridotta numerosità dei campioni, la correlazione ottenuta non è risultata significativa. In questo caso, essendo assenti altre componenti che possono interferire con il colore, nell'estratto butanologico sono presenti quasi esclusivamente pigmenti gialli. Anche Lamberts e Delcour (2008) hanno osservato una

correlazione positiva tra il contenuto in pigmenti gialli estratti in butanolo saturo e l'indice b\* in risi integrali.

## 4.6 DETERMINAZIONE DEI COMPOSTI FENOLICI

L'evoluzione del concetto di nutrizione da mezzo per soddisfare il fabbisogno energetico a mezzo per mantenere e promuovere lo stato di salute e benessere dell'uomo ha fatto sì che negli ultimi decenni, gli studi siano stati rivolti alla ricerca e determinazione di molecole bioattive negli alimenti, tra cui i composti fenolici. Una dimostrazione di ciò è il fatto che nel database "scopus" il numero di studi che riguardano i composti fenolici nel riso negli ultimi 10 anni è quintuplicato.

Nei cereali i composti fenolici sono localizzati principalmente nei tessuti esterni del chicco come crusca, pericarpo e strato aleuronico (Naczki e Shahidi, 2006) e sono ritenuti responsabili degli effetti salutari esercitati dal consumo di cereali integrali (Ortega *et al.*, 2015; Borneo e León, 2012). I risi pigmentati sono cereali integrali, in quanto il pericarpo non viene rimosso durante la fase di lavorazione, a differenza di quanto accade nella produzione del riso bianco, e pertanto contribuiscono all'apporto di composti fenolici.

Un'analisi degli studi condotti finora sulla determinazione dei composti fenolici nei risi pigmentati ha messo in evidenza alcune criticità rappresentate in primo luogo dall'uso di metodiche di estrazione diverse che disorientano chi si accinge ad effettuare la determinazione analitica di tali composti e rendono difficile il confronto dei dati sperimentali. Inoltre, molti studi hanno preso in considerazione soltanto i fenoli liberi tralasciando i fenoli legati insolubili, con conseguente sottostima dei composti fenolici totali (Adom e Liu, 2002; Zhang *et al.*, 2010).

Ad oggi mancano studi che riportano l'effetto dell'estrazione sulla determinazione dei composti fenolici nei risi pigmentati, pertanto una delle attività di questo progetto di dottorato è consistita nel confrontare l'efficacia di alcune metodiche utilizzate in letteratura per l'estrazione dei fenoli liberi e legati insolubili in un campione di riso nero.

### 4.6.1 Fenoli liberi

Per la determinazione dei fenoli liberi (FPC) sono state confrontate tre metodiche estrattive diverse indicate come Procedura A, Procedura B e Procedura C, descritte nel capitolo 3. Nella procedura A il campione di riso è stato estratto con una miscela di metanolo:acqua 85:15 v/v in agitazione magnetica e a temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) (Sompong *et al.*, 2011). Nella Procedura B è stata usata la stessa miscela estrattiva della Procedura A sostituendo, però, all'agitazione magnetica un trattamento con ultrasuoni a 37 MHz per 15 min (Irakli *et al.*, 2012b). Nella Procedura C sono state usate, invece, due miscele estraenti diverse: metanolo acquoso 50:50 v/v acidificato a pH 1 con HCl e acetone:acqua 70:30.

Al contempo è stato stimato il numero di estrazioni necessarie ad estrarre completamente i composti fenolici. Pertanto, per ogni procedura e per ciascuna replica, il campione è stato estratto cinque volte. Il primo ed il secondo estratto sono stati riuniti, mentre gli altri tre conservati singolarmente. Il contenuto in fenoli liberi è stato determinato sull'estratto combinato e sui restanti tre estratti. I risultati sono mostrati in Figura 4.8.

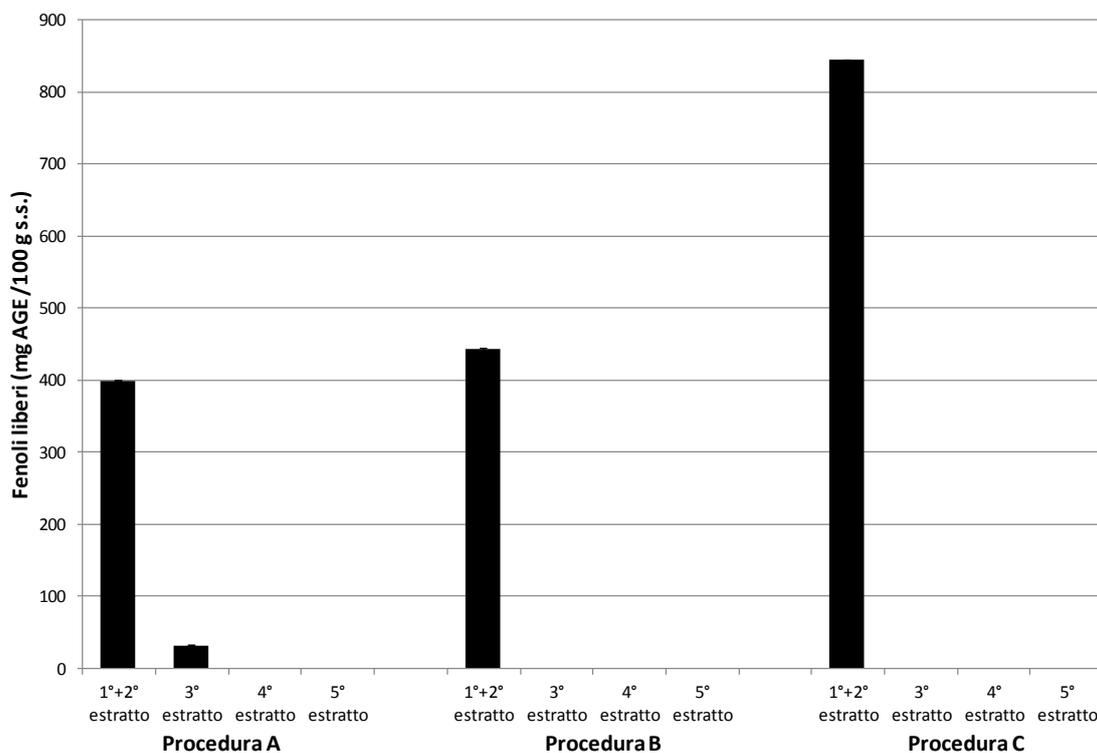


Figura 4.8: distribuzione dei fenoli ottenuti a seguito dell'applicazione delle procedure estrattive A, B e C

Per quanto concerne la Procedura A, dopo le prime due estrazioni, nella matrice rimane l'8% dei fenoli liberi, mentre, come risulta dai valori di assorbanza, il quarto e quinto estratto non contengono composti fenolici. Per quanto riguarda la procedura B, le prime due estrazioni sono sufficienti a garantire una completa rimozione dei fenoli liberi, infatti i valori delle assorbanze associate al terzo, quarto e quinto estratto sono risultati inferiori a 0,05 AU. Pertanto, a parità di miscela estraente, gli ultrasuoni consentono la completa estrazione dei composti fenolici con due sole ripetizioni estrattive. Analogamente a quanto visto per la Procedura B, anche la Procedura C consente la completa estrazione dei fenoli liberi con due soli *step* estrattivi.

In Tabella 4.22 sono riportate le concentrazioni di fenoli liberi ottenute applicando le tre diverse procedure estrattive oggetto di studio.

Procedura di estrazione	Fenoli liberi
	<i>mg AGE /100 g ss</i>
Procedura A	431,2 ± 27,8 <sup>a</sup>
Procedura B	443,2 ± 30,9 <sup>a</sup>
Procedura C	844,3 ± 23,7 <sup>b</sup>

Tabella 4.22: fenoli liberi estratti utilizzando le tre procedure oggetto di studio. Lettere diverse minuscole in apice indicano valori statisticamente diversi ( $p < 0,05$ )

Sebbene dal punto di vista quantitativo le procedure A e B siano confrontabili, gli ultrasuoni consentono di ridurre il numero di estrazioni con la conseguente riduzione dei tempi di analisi e della quantità di solvente usato, con vantaggi economici ed ambientali. Inoltre, nella procedura B, ogni fase estrattiva dura 15 minuti invece di 60 min. L'uso degli ultrasuoni, infatti, favorisce simultaneamente il processo di idratazione delle particelle di campione ed il trasferimento dei soluti al solvente di estrazione (Wang *et al.*, 2008).

Il confronto del contenuto in fenoli liberi ottenuto con la Procedura C e quello registrato con la Procedura B, mostra che il primo è significativamente maggiore del secondo ( $p < 0,05$ ) (53%). Questo risultato è probabilmente dovuto all'uso di due miscele estraenti diverse che favoriscono la solubilizzazione di composti fenolici di natura diversa. Da non sottovalutare è anche la possibile estrazione di antocianine, una sottoclasse dei composti fenolici, che si ha usando metanolo acidificato con HCl a pH=1 (Kim *et al.*, 2010). Allo stesso tempo, Goufo e Trindade (2014) sottolineano che con l'uso di HCl una parte dei composti fenolici insolubili potrebbe essere rilasciata e determinata come fenoli liberi. In definitiva, in questo lavoro si è scelto di utilizzare la Procedura C per determinare i fenoli liberi in tutti i campioni di riso sia crudo che cotto in quanto è risultata quella in grado di massimizzare l'estrazione dei composti fenolici.

Per valutare la qualità della Procedura C scelta per la determinazione dei fenoli liberi da campioni di riso pigmentato è stato condotto, in triplo, il test di recupero percentuale aggiungendo una quantità nota di acido gallico al campione di riso della varietà Nerone (N(IT)3) e sottoponendo la matrice fortificata all'intera procedura estrattiva.

Il recupero percentuale, espresso come media di tre repliche (Tabella 4.23), per tale procedura è pari a 97,9%. La riproducibilità tra le repliche evidenzia la precisione della metodica selezionata per la determinazione dei fenoli liberi.

Replica	C <sub>matrix</sub>	C <sub>spike</sub>	C <sub>fortified</sub>	Recupero
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	%
1	4,48	3,02	7,38	96,0
2	4,75	3,02	7,76	99,7
3	4,33	3,02	7,29	98,0
Media				97,9
SD				1,5
CV%				1,5

Tabella 4.23: risultati dei test di recupero

I risultati relativi al contenuto in fenoli liberi nei campioni di riso crudi e cotti è riportata in Tabella 4.24.

	Campioni crudi	Campioni cotti	Diminuzione
	mg AGE/100 g ss	mg AGE/100 g ss	%
N(IT)1	679,3±9,4 <sup>aA</sup>	528,4±51,9 <sup>aB</sup>	22,2
N(IT)2	796,7±11,2 <sup>bA</sup>	624,4±60,2 <sup>aB</sup>	21,6
N(IT)3	849,7±21,7 <sup>bA</sup>	803,7±1,6 <sup>bB</sup>	5,4
N(IT)4	1508,3±29,2 <sup>cA</sup>	1384,8±19,9 <sup>cB</sup>	8,2
N (TH)1	422,3±3,4 <sup>dA</sup>	474,0±23,7 <sup>aB</sup>	0,0
N(CA)1	286,6±5,0 <sup>eA</sup>	268,1±10,9 <sup>dA</sup>	n.s.
R(IT)1	583,3±9,8 <sup>fA</sup>	325,0±4,3 <sup>eB</sup>	44,3
R(FR)1	544,1±14,8 <sup>fA</sup>	376,5±7,6 <sup>fB</sup>	30,8
R(FR)2	580,5±10,8 <sup>fA</sup>	388,5±3,0 <sup>fB</sup>	33,1
R(TH)1	547,3±14,3 <sup>fA</sup>	413,5±5,1 <sup>gB</sup>	24,4

Tabella 4.24: fenoli liberi (media±SD) nei campioni di riso crudo e di riso cotto. Per ciascuna colonna, lettere minuscole diverse riportate in apice indicano valori statisticamente diversi ( $p < 0,05$ ). Per ciascuna riga, lettere maiuscole diverse riportate in apice indicano valori statisticamente diversi ( $p < 0,05$ ). n.s.= non significativa

Per i risi neri del genere *Oryza* i valori oscillano tra 422,3 mg AGE/100 g (s.s.) e 1508,3 mg AGE/100 g (s.s.), mentre per i risi rossi è compreso tra 544,1 mg AGE/100 g (s.s.) e 583,3 mg AGE/100 g (s.s.). Le differenze nel contenuto in fenoli liberi tra i campioni di riso nero sono sempre significative ( $p < 0,05$ ) eccetto tra i campioni N(IT)2 e N(IT)3. Al contrario, per i campioni di riso rosso le differenze sono non significative ( $p < 0,05$ ). Occorre notare che il campione appartenente al genere *Zizania aquatica* (N(CA)1) ha un contenuto in fenoli liberi significativamente inferiore sia ai risi con pericarpo nero che

ai risi con pericarpo rosso. I dati ottenuti sono in accordo con uno studio recente condotto da Bordiga *et al.* (2014) che in tre varietà italiane di riso nero hanno riscontrato valori di fenoli liberi totali compresi tra 550 e 1187 mg AGE/100 g (s.s.) e in due varietà di riso rosso hanno trovato un contenuto in fenoli liberi totali compreso tra 276 e 399 mg AGE/100 g (s.s.).

Per i risi neri cotti del genere *Oryza* il contenuto in fenoli liberi oscilla tra 474,0 mg AGE/100 g (s.s.) e 1384,8 mg AGE/100 g (s.s.), mentre per i risi rossi è compreso tra 325,0 mg AGE/100 g (s.s.) e 413,5 mg AGE/100 g (s.s.). Il campione N(IT)4 ha il più alto contenuto di fenoli liberi tra tutti i campioni, seguito dal campione N(IT)3. Le differenze tra i campioni N(IT)1, N(IT)2 e N(TH)1, invece, sono non significative ( $p < 0,05$ ). Anche dopo cottura il campione appartenente al genere *Zizania aquatica* (N(CA)1) mostra il minor contenuto in fenoli tra tutti i campioni analizzati, sia con pericarpo rosso che nero.

Tra i campioni di riso rosso, il campione con il maggior contenuto è il Thai rosso (R(TH)1) e quello a contenuto minore è il campione della varietà Ermes (R(IT)1). Le due varietà di origine francese hanno, invece, un contenuto comparabile.

Il confronto del contenuto in fenoli liberi prima e dopo cottura consente di valutare l'effetto di tale trattamento su ciascuna varietà. In tutti i campioni di riso, eccetto nel campione di riso selvatico (N(CA)1) e nel Thai nero (N(TH)1), si osserva una diminuzione significativa del contenuto dei fenoli liberi. Nel campione Thai nero si osserva, in controtendenza, un aumento dei fenoli liberi che potrebbe essere spiegato da una maggiore estraibilità dei composti in seguito a modifiche della matrice indotte dalla cottura stessa (Fares *et al.*, 2010). Tra gli altri campioni di riso nero, il più resistente alla cottura è il campione della varietà Nerone (N(IT)3) il quale perde soltanto il 5% dei fenoli liberi. Per i restanti, la perdita percentuale oscilla tra l'8,2% ed il 22,2%. Zaupa *et al.* (2015) hanno osservato in risi con pericarpo nero una riduzione media del contenuto di acidi fenolici pari al 33,5% con una cottura di tipo risotto e del 37,9% in seguito a bollitura. Nei campioni con pericarpo rosso le perdite percentuali sono significativamente più alte. Queste variano tra il 24% ed il 44%. Al contrario, Zaupa *et al.* (2015) hanno trovato perdite inferiori nei risi rossi pari al 27,0% in seguito a cottura di tipo risotto e a 27,8% in seguito a bollitura. La variabilità delle perdite percentuali è da attribuirsi alla diversa composizione in composti fenolici i quali hanno una diversa stabilità.

#### 4.6.2 Fenoli legati insolubili

Per "fenoli legati insolubili" si intendono tannini condensati, acidi fenolici e altri composti con struttura fenolica a basso peso molecolare che sono legati ai polisaccaridi della parete cellulare o a proteine, e che formano complessi stabili insolubili. Questi possono essere estratti in acqua o in miscele organiche solo dopo essere stati idrolizzati a composti fenolici liberi.

Secondo Stalikas (2007), l'idrolisi dei composti fenolici può essere condotta in condizioni acide, alcaline o per via enzimatica. Un'analisi della letteratura recente indica che i composti fenolici legati vengono idrolizzati principalmente con idrossido di sodio. L'idrolisi in condizioni basiche ha il vantaggio di prevenire la degradazione degli acidi idrossicinnamici. Come osservato da Sosulski *et al.* (1982), infatti, l'acido cloridrico utilizzato nell'idrolisi acida può distruggere gli acidi idrossicinnamici in una percentuale compresa tra 15% e 95%. Inoltre, Verma *et al.* (2008) hanno osservato che i composti fenolici, liberati per idrolisi acida (HCl) da crusca di frumento, erano significativamente più bassi di quelli liberati per idrolisi alcalina.

Al contrario, secondo Arranz e Saura Calixto (2010), con l'idrolisi alcalina una quantità apprezzabile di polifenoli legati ai costituenti della parete cellulare potrebbe non idrolizzare e rimanere insolubile. Pertanto, questi suggeriscono un'idrolisi mediante MeOH:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 90:10 (v/v) a 85°C per 20 ore.

Tuttavia, in letteratura la saponificazione è molto più frequente dell'idrolisi acida, plausibilmente perché più sicura da un punto di vista sperimentale.

Un'analisi degli studi più recenti, mostra che la saponificazione dei fenoli legati insolubili è condotta in diverse condizioni: Adom e Liu (2002) idrolizzano con NaOH 2M agitando per un'ora a temperatura ambiente e in atmosfera inerte, Sompong *et al.* (2011) utilizzano NaOH 2M per 16 ore, Paiva *et al.* (2014), invece, saponificano con NaOH 4M per 4 ore sotto agitazione magnetica e Irakli *et al.* (2012) combinano all'azione di NaOH 4M il trattamento con ultrasuoni a 40°C e per 90 minuti.

Pertanto, sono state confrontate quattro procedure di idrolisi: Procedura D, Procedura E, Procedura F, Procedura G. Nella prima e nella seconda la saponificazione è condotta usando rispettivamente sodio idrossido 2M e sodio idrossido 4M, in condizioni di agitazione magnetica a 250 rpm per 16 ore a temperatura ambiente. Nella Procedura F e nella Procedura G il campione è saponificato rispettivamente con sodio idrossido 2M e 4M e sottoposto, in entrambi i casi, al trattamento con ultrasuoni per 90 min a 40°C. Inoltre, è stato valutato l'effetto del lavaggio del residuo solido, rimasto dopo l'estrazione dei fenoli liberi, sulla capacità estrattiva ed è stato determinato il numero di estrazioni necessarie ad estrarre completamente i fenoli dall'idrolisato.

Il lavaggio del residuo prima di aggiungere NaOH non è generalmente riportato in letteratura (Irakli *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2004; Adom e Liu, 2002; Adom *et al.*, 2005; Sompong *et al.*, 2011), tuttavia prove sperimentali preliminari hanno consentito di osservare la formazione di un'emulsione, immediatamente dopo l'aggiunta della soluzione di NaOH al residuo solido non lavato. I valori di concentrazione dei fenoli legati insolubili ottenuti per le repliche in cui si è osservata la formazione dell'emulsione (non rotta neanche dall'azione meccanica di palline di vetro) non sono riproducibili, plausibilmente perché gli analiti di interesse rimangono intrappolati nell'emulsione e non

idrolizzano. Pertanto, si è reso necessario lavare, con acqua distillata, il residuo solido prima dell'aggiunta di NaOH, come riportato da Paiva *et al.* (2014).

Per ognuna delle quattro procedure considerate, è stato valutato anche il numero di estrazioni della soluzione idrolizzata, necessario a rimuovere completamente i fenoli legati insolubili. Circa 0,100 g di campione sono stati estratti tre volte con etilacetato (30 mL). Dei tre estratti ottenuti, il primo ed il secondo sono stati riuniti ed il terzo conservato singolarmente. Il contenuto in fenoli è stato determinato sull'estratto combinato e sul terzo estratto, mediante il saggio di Folin-Ciocalteu. L'assorbanza del terzo estratto era trascurabile, pertanto è stato concluso che due estrazioni con 30 mL di etilacetato ciascuna sono sufficienti ad estrarre completamente i fenoli idrolizzati nelle condizioni di analisi utilizzate. Per quanto riguarda il confronto delle procedure idrolitiche, in Tabella 4.25 è riportato il contenuto in fenoli legati insolubili ottenuto.

Procedura di estrazione	Fenoli legati insolubili <i>mg AGE /100 g s.s.</i>
Procedura D	114,01 ± 6,26 <sup>a</sup>
Procedura E	93,2 ± 0,05 <sup>b</sup>
Procedura F	116,19 ± 2,15 <sup>a</sup>
Procedura G	89,16 ± 1,03 <sup>b</sup>

Tabella 4.25: fenoli legati insolubili (media di almeno tre repliche ± SD). Lettere diverse indicano valori statisticamente diversi ( $p < 0,05$ )

I fenoli legati insolubili determinati con la procedura D non sono significativamente diversi da quelli ottenuti con la procedura F che si differenzia dalla prima per l'uso degli ultrasuoni (90 min) invece dell'agitazione magnetica (16 ore). La procedura F è, tuttavia, preferibile alla D in quanto più veloce. Per quanto riguarda le procedure E e G, accomunate dall'uso di NaOH 4M, ma differenti per l'uso dell'agitazione magnetica e degli ultrasuoni, non sono state individuate differenze significative. La procedura G ha, tuttavia, il vantaggio di essere più veloce della procedura E. Occorre sottolineare che tempi di analisi più brevi hanno in vantaggio di ridurre eventuali fenomeni di ossidazione delle molecole fenoliche (Naczki e Shahidi, 2004).

Il confronto delle quattro procedure di idrolisi mostra che, indipendentemente dalle condizioni utilizzate (agitazione magnetica o ultrasuoni), con l'impiego di NaOH 2M si ottengono quantità di fenoli legati insolubili più alte. In definitiva, la procedura selezionata per efficacia e tempi di analisi ridotti è la procedura F.

Per tale procedura è stato eseguito il test di recupero percentuale aggiungendo ad un'aliquota del campione della varietà Nerone un volume noto di una soluzione di acido gallico a concentrazione esattamente nota. Le prove sono state eseguite in triplo ed i risultati riportati in Tabella 4.26.

Il recupero percentuale medio è pari a 96,9%.

Il test di recupero ha consentito di valutare la resistenza dell'acido gallico sia al trattamento con ultrasuoni che al trattamento termico (40°C). La riproducibilità tra le repliche evidenzia la precisione della metodica selezionata per la determinazione dei fenoli legati insolubili.

Replica	C <sub>matrix</sub> μg/mL	C <sub>spike</sub> μg/mL	C <sub>fortified</sub> μg/mL	Recupero %
1	4,24	3,13	7,27	96,8
2	5,79	3,13	8,84	97,4
3	5,59	3,13	8,61	96,5
Media				96,9
SD				0,4
CV%				0,4

Tabella 4.26: risultati dei test di recupero

I risultati relativi al contenuto in fenoli legati insolubili nei campioni di riso crudo e cotto sono riportati in Tabella 4.27.

	Campioni crudi mg AGE/100 g ss	Campioni cotti mg AGE/100 g ss
N(IT)1	92,8±4,1 <sup>aA</sup>	73,0±5,7 <sup>aB</sup>
N(IT)2	67,0±2,1 <sup>aA</sup>	65,1±4,5 <sup>aA</sup>
N(IT)3	116,2±2,2 <sup>bA</sup>	68,7±4,7 <sup>aB</sup>
N(IT)4	84,0±1,6 <sup>abA</sup>	83,8±8,5 <sup>abA</sup>
N (TH)1	76,8±5,1 <sup>aA</sup>	68,2±2,2 <sup>aA</sup>
N(CA)1	52,0±2,9 <sup>cA</sup>	93,8±8,1 <sup>bB</sup>
R(IT)1	66,0±2,4 <sup>aA</sup>	99,5±3,8 <sup>bB</sup>
R(FR)1	71,2±3,1 <sup>aA</sup>	114,4±6,2 <sup>bB</sup>
R(FR)2	72,2±3,1 <sup>aA</sup>	96,0±2,3 <sup>bB</sup>
R(TH)1	69,5±4,2 <sup>aA</sup>	109,7±6,9 <sup>bB</sup>

Tabella 4.27: contenuto in fenoli legati insolubili (media±SD) nei campioni di riso crudo e di riso cotto. Per ciascuna colonna, lettere minuscole diverse riportate in apice indicano valori statisticamente diversi (p<0,05). Per ciascuna riga, lettere maiuscole diverse riportate in apice indicano valori statisticamente diversi (p<0,05).

Nei risi neri crudi i valori oscillano tra 52,0 mg AGE/100g (s.s.) e 116,2 mg AGE /100g (s.s.). Il contenuto più alto è stato trovato nel campione N(IT)3 ed il più basso nel campione N(CA)1. È stato già osservato che quest'ultimo mostra anche il minor contenuto in fenoli liberi.

Per quanto riguarda i risi con pericarpo rosso, la concentrazione di fenoli legati insolubili oscilla tra 66,0 mg AGE/100g (s.s.) e 72,2 mg AGE/100g (s.s.), ma le differenze non sono statisticamente significative ( $p < 0,05$ ). Inoltre, i valori osservati sono comparabili a quelli di alcuni campioni di riso nero.

Dal confronto tra il contenuto in fenoli liberi e legati risulta che questi ultimi sono appena il 5-15% dei primi indipendentemente dal tipo di campione considerato. Sebbene alcuni studi riportino che nei cereali il contenuto in fenoli legati insolubili è generalmente superiore a quello dei fenoli liberi (Adom e Liu, 2002; Pérez-Jiménez e Saura-Calixto, 2005), i dati sperimentali ottenuti concordano con quelli di Min *et al.* (2012) che hanno riscontrato in una varietà di riso con pericarpo rosso ed una con pericarpo nero un contenuto in fenoli legati insolubili pari rispettivamente a 0,86 mg AGE/g(s.s.) e 0,95 mg AGE/g(s.s.).

Dopo cottura, nei campioni con pericarpo nero il contenuto in fenoli legati insolubili varia tra 65,1 mg AGE/100g (s.s.) e 93,8 mg AGE/100g(s.s.), mentre per i risi rossi oscilla tra 96,0 mg AGE/100g(s.s.) e 114,4 mg AGE/100g(s.s.). I campioni di riso rosso hanno un contenuto in fenoli legati non statisticamente diverso e confrontabile a quello dei campioni N(CA)1 e N(IT)4. Negli altri campioni con pericarpo nero i valori sono significativamente minori. Il confronto tra il contenuto in fenoli legati insolubili nei campioni crudi e nei cotti ha evidenziato una diminuzione significativa ( $p < 0,05$ ) nei campioni N(IT)1 e N(IT)3, mentre per le restanti varietà di riso nero italiane e per la thailandese la differenza non è statisticamente significativa. Per tutti i campioni con pericarpo rosso e per il campione N(CA)1 si è osservato, invece, un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) dei fenoli legati insolubili. Ciò è spiegabile considerando che l'azione dell'acqua durante la cottura potrebbe aver agito sulla matrice rendendo i fenoli legati insolubili più facilmente accessibili e quindi suscettibili all'azione idrolitica di sodio idrossido. Anche Fares *et al.* (2010) hanno osservato un aumento del contenuto in acidi fenolici nella pasta dopo cottura.

#### 4.7 DETERMINAZIONE DELLE ANTOCIANINE

Le antocianine sono presenti in molti cereali pigmentati come l'orzo, il mais, l'avena, il riso, il sorgo ed il miglio (Abdel-Aal e Hucl, 1999). Secondo alcuni autori (Kim *et al.*, 2008; Mazza e Gao, 2005; Moreno *et al.*, 2005), tali molecole, nelle varietà di riso pigmentato, rappresentano i pigmenti principali.

In questo lavoro le antocianine sono state determinate sia per via spettrofotometrica, come antocianine totali (TAC), che mediante RP-HPLC.

#### 4.7.1 Ottimizzazione della procedura estrattiva

Poiché il presupposto per ottenere un buon dato analitico è una buona preparazione del campione, la prima fase del lavoro ha riguardato l'ottimizzazione della preparazione degli estratti antocianici, da utilizzare sia per l'analisi spettrofotometrica che cromatografica.

Sono state confrontate due procedure estrattive: quella riportata in Kim *et al.* (2010) e quella riportata in Sompong *et al.* (2011). La prima, indicata come procedura K, prevede di aggiungere ad una quantità nota di campione di riso pigmentato (50 mg) 0,8 mL di metanolo:acqua (85:15 v/v) acidificato a pH=1 con HCl e di sottoporre la soluzione a trattamento con ultrasuoni per 1 minuto. Poi si pone la soluzione in bagno d'acqua a 38°C per 30 min agitando con vortex ogni 5-10 min. Il rapporto tra quantità di campione (g) e volume di solvente (mL) utilizzato è pari a 1:16. La seconda procedura presa in considerazione, indicata come procedura S, prevede, invece, di estrarre il campione di riso pigmentato con metanolo:acqua 85:15 v/v acidificato con HCl 1 M, per 30 min sotto agitazione magnetica. Il rapporto tra quantità di campione (g) e volume di solvente (mL) utilizzato è pari a 1:10. In questo caso gli autori ripetevano l'estrazione altre due volte dopo aver allontanato il solvente dal residuo solido per centrifugazione.

Per valutare il rapporto tra quantità di campione e volume estraente e confrontare l'efficienza delle due procedure estrattive, una quantità pari a circa 0,100 g di campione di riso nero (N(IT)2) ed uno di riso rosso (R(IT)1) sono stati estratti per tre volte consecutive (fino a decolorazione dell'estratto) con 3 mL di solvente, secondo le modalità riportate dalla procedura K e dalla procedura S. Gli estratti ottenuti con la procedura K, indicati come KC1, KC2, KC3 non sono stati riuniti e sono stati sottoposti ad analisi spettrofotometrica. Analogamente per gli estratti SC1, SC2, SC3 ottenuti con la procedura S. I risultati delle prove sperimentali sono riportati in Figura 4.9 e in Tabella 4.28.

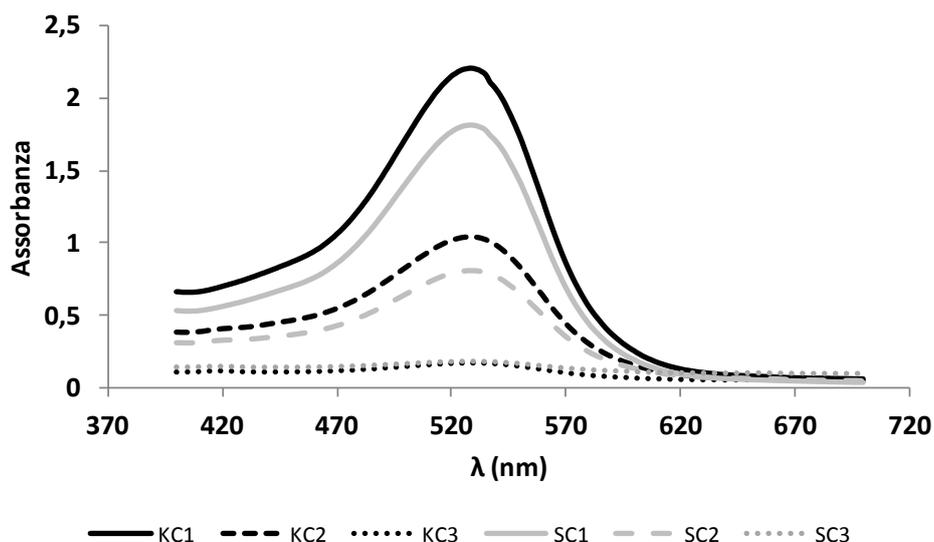


Figura 4.9: spettri di assorbimento degli estratti delle antocianine ottenuti da un riso nero con le procedure estrattive K e S

La Figura 4.9 mostra, per ognuna delle due procedure, gli spettri di assorbimento dei tre estratti. L'estratto presenta un massimo di assorbimento a 528 nm, regione dello spettro UV-VIS dove assorbono i pigmenti di tipo antocianico. È evidente, però, che le soluzioni sono molto concentrate e quindi l'assorbanza cade al di fuori dell'intervallo di linearità previsto dalla legge di Lambert-Beer. È, pertanto, necessario diminuire questo rapporto.

Procedura	Estrazione	Estratto	Abs <sub>528 nm</sub>	Peso N(IT)1	Abs/peso
				g	Unità di assorbanza/g
Procedura K	1a	KC1	2,209	0,1245	18
Procedura K	2a	KC2	1,045	0,1245	8
Procedura K	3a	KC3	0,169	0,1245	1
Procedura S	1a	SC1	1,808	0,0983	18
Procedura S	2a	SC2	0,806	0,0983	8
Procedura S	3a	SC3	0,187	0,0983	2

Tabella 4.28: assorbanza degli estratti delle antocianine ottenuti da un riso nero con le procedure estrattive K e S

Per quanto riguarda l'efficienza estrattiva delle due metodiche, il confronto delle assorbanze normalizzate rispetto al peso del campione estratto (Tabella 4.28), indica che nelle condizioni adottate, le due metodiche sono confrontabili.

Sono state, quindi, eseguite ulteriori prove estrattive sui campioni N(IT)1 e N(IT)2. Una quantità di campione pari a circa 0,100 g è stata estratta con 10 mL di miscela estraente secondo la procedura K.

L'estratto è stato poi portato a 20 mL e le assorbanze ottenute rientravano nell'intervallo di linearità della legge di Lambert-Beer (Tabella 4.29). Dalla ripetizione dell'estrazione si otteneva un estratto incolore e con assorbanza trascurabile, pertanto si è concluso che una sola estrazione consentiva di estrarre quantitativamente le antocianine.

Le prove sono state ripetute anche seguendo la procedura S, tuttavia una sola estrazione non era sufficiente ad estrarre quantitativamente il campione. Gli ultrasuoni, infatti, esercitano un effetto meccanico che consente una maggiore penetrazione del solvente nel campione, aumentando l'area superficiale di contatto tra campione solido e fase liquida (Wang *et al.*, 2008). Di conseguenza il soluto diffonde rapidamente dalla fase solida al solvente (Rostagno *et al.*, 2003) migliorando il potere estraente. Ne consegue che la procedura scelta per estrarre le antocianine da un campione di riso nero è quella riportata da Kim *et al* (2010).

Campione	Replica estrazione	Peso <i>g</i>	Volume estraente <i>mL</i>	Abs 528 nm
N(IT)1	1	0,1048	20	0,784
N(IT)1	2	0,1303	20	0,976
N(IT)1	3	0,1005	20	0,788
N(IT)2	1	0,1531	20	1,223
N(IT)2	2	0,1305	20	1,253
N(IT)2	3	0,1007	20	0,962

Tabella 4.29: assorbanze di estratti delle antocianine da due campioni di riso nero

Analogamente, le due procedure sono state testate anche su un campione di riso rosso. L'analisi spettrofotometrica ha evidenziato che, indipendentemente dalla procedura estrattiva, gli estratti non hanno massimi di assorbimento nella regione spettrale in cui assorbono i pigmenti antocianici. Piuttosto presentano un massimo di assorbimento a 451 nm (Figura 4.10; Tabella 4.30).

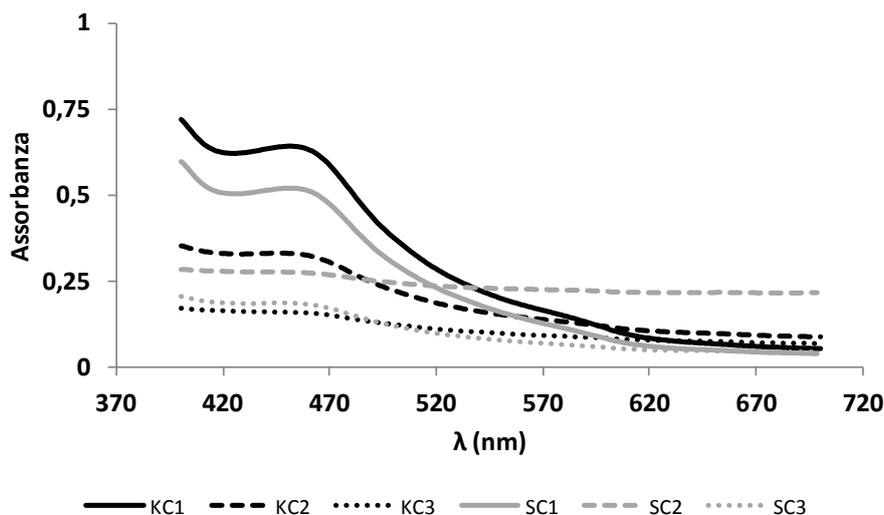


Figura 4.10: spettri di assorbimento degli estratti delle antocianine ottenuti da un riso rosso con le procedure estrattive K e S

Procedura	Estrazione	Estratti	Abs <sub>528 nm</sub>	Abs <sub>451 nm</sub>
Procedura K	1a	KC1	n.d.	0,641
Procedura K	2a	KC2	n.d.	0,329
Procedura K	3a	KC3	n.d.	0,160
Procedura S	1a	SC1	n.d.	0,522
Procedura S	2a	SC2	n.d.	0,187
Procedura S	3a	SC3	n.d.	0,185

Tabella 4.30: assorbanza degli estratti delle antocianine ottenuti da un riso rosso con le procedure estrattive K e S (n.d. = not determined)

Si può, quindi, ipotizzare che nei risi rossi le antocianine siano assenti o comunque presenti in quantità trascurabili e non misurabili per via spettrofotometrica.

Dopo essere state estratte dalla matrice, le antocianine sono altamente instabili e molto suscettibili alla degradazione (Giusti e Wrolstad, 2003). I fattori che ne condizionano la stabilità sono molteplici: pH, temperatura di conservazione, struttura chimica, concentrazione, luce, ossigeno, solventi, presenza di enzimi, di flavonoidi, di proteine e ioni metallici (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Poiché non sempre è possibile completare le determinazioni quantitative in poche ore dall'estrazione, è stata valutata la stabilità degli estratti riportati in Tabella 4.29 in un periodo di 16 giorni. Come

riportato in Figura 4.11, gli estratti conservati in atmosfera inerte, al buio e a -40°C sono stabili per un periodo non inferiore a 16 giorni.

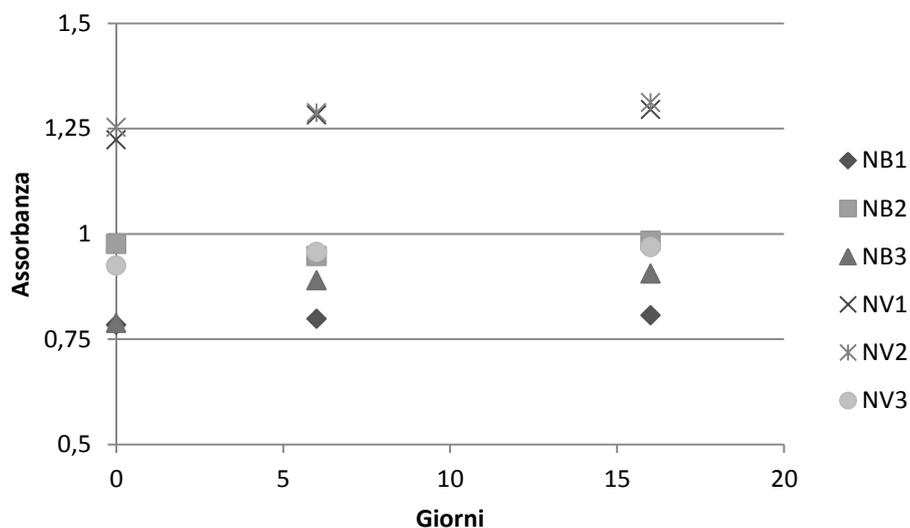


Figura 4.11: stabilità degli estratti antocianici in atmosfera inerte, al buio e a -40°C

In definitiva, l'estrazione delle antocianine è stata condotta secondo la metodica riportata da Kim *et al.* (2010) usando un rapporto tra quantità di campione (g) e volume di estraente (mL) pari a 1:200. Si è scelto di preparare estratti del volume di 20 mL. Di questi, un'aliquota pari a 10 mL è stata utilizzata per la determinazione delle antocianine totali, la restante è stata concentrata mediante evaporazione sotto vuoto ed il residuo ottenuto è stato conservato al buio in atmosfera inerte a -40°C fino ad analisi in HPLC.

#### 4.7.2 Analisi spettrofotometrica: antocianine totali

Un'aliquota degli estratti in metanolo dei campioni di riso crudi e cotti è stata sottoposta ad analisi spettrofotometrica determinando l'assorbanza a 528 nm. Il contenuto in antocianine totali è stato calcolato utilizzando una retta di taratura della C3G ed i risultati sono stati espressi come mg di C3G equivalenti in 100 g di sostanza (s.s.). I dati sperimentali così ottenuti sono riportati in Tabella 4.31.

Campione	TAC campioni crudi mg C3G/100 g s.s.	TAC campioni cotti mg C3G/100 g s.s.	Diminuzione TAC %
N(IT) 1	287,8±6,4 <sup>aA</sup>	150,4±15,1 <sup>aB</sup>	48
N(IT) 2	369,7±0,8 <sup>bA</sup>	215,7±19,0 <sup>bB</sup>	42
N(IT) 3	428,2±27,1 <sup>cA</sup>	202,0±18,2 <sup>bB</sup>	53
N(IT) 4	466,2±51,0 <sup>cA</sup>	267,7±25,0 <sup>bB</sup>	43
N(TH) 1	105,6±9,3 <sup>dA</sup>	84,0±7,9 <sup>cA</sup>	n.s.
N(CA)1	3,3±0,6 <sup>e</sup>	n.d.	n.d.
R(IT) 1	n.d.	n.d.	n.d.

Campione	TAC campioni crudi	TAC campioni cotti	Diminuzione TAC
R(FR) 1	n.d.	n.d.	n.d.
R(FR) 2	n.d.	n.d.	n.d.
R(TH) 1	n.d.	n.d.	n.d.

Tabella 4.31: TAC nei campioni crudi e cotti. Lettere diverse minuscole in colonna e maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ). n.s. = non significativa; n.d.= not detectable

L'analisi spettrofotometrica ha confermato quanto visto precedentemente, ossia l'assenza di massimi di assorbimento a 528 nm in tutti i campioni di riso con pericarpo rosso oggetto di studio. Questo risultato ha fatto presupporre l'assenza di antocianine in tali varietà, confermata poi dall'analisi cromatografica.

Per i risi con pericarpo nero, il contenuto in antocianine totali varia tra 3,3 e 466,2 mg C3G equivalenti/100 g di campione (s.s.). Le differenze tra i campioni sono statisticamente significative eccetto che tra i campioni delle varietà Nerone (N(IT)3) e Artemide (N(IT)4). Il minor contenuto è stato osservato nel campione di riso selvatico canadese. La presenza di un massimo di assorbimento della regione intorno a 528 nm conferma la presenza di antocianine in tale varietà, sebbene in concentrazioni molto basse. I dati ottenuti sono in accordo con i valori di TAC osservati da Chen *et al.* (2012) in varietà di riso nero giapponesi. Abdel-Aal *et al.* (2006) riportano che il contenuto in TAC varia significativamente tra le diverse specie di riso con pericarpo nero. Jeng *et al.* (2012), infatti, in alcune varietà di riso con pericarpo nero coltivate a Taiwan riportano valori di TAC compresi tra 15,5 e 635  $\mu\text{g/g}$ .

In seguito a cottura, il TAC diminuisce significativamente ( $p < 0,05$ ) in tutti i campioni, eccetto nel Thai nero. I valori osservati nei risi cotti sono compresi tra 84,0 e 267,7 mg C3G/100 g (s.s.): le varietà Thai nero (N(TH)1) e Otello (N(IT)1) mostrano un contenuto significativamente inferiore alle restanti varietà. La diminuzione media del contenuto in antocianine totali è pari al 46%. Anche Hiemori *et al.* (2009) in una varietà di riso nero prodotta in California sottoposta a diversi metodi di cottura hanno osservato una diminuzione del TAC compresa tra il 65 e 79%.

#### 4.7.3 Analisi cromatografica degli estratti antocianici

La composizione quali-quantitativa degli estratti antocianici è stata ottenuta mediante analisi in RP-HPLC. In Figura 4.12 è riportato il cromatogramma dell'estratto antocianico di un campione di riso nero ottenuto nelle condizioni operative descritte nel capitolo 3. Dal confronto dei tempi di ritenzione e degli spettri di assorbimento UV-VIS di ciascun picco con quello di soluzioni di standard, nei campioni di riso nero sono stati identificati tre composti di tipo antocianico: la cianidina-3-O-glucoside (C3G), la peonidina-3-O-glucoside (P3G) e la malvidina che hanno tempi di ritenzione pari rispettivamente a 13,8 min, 16,2 min e 23,3 min.

Nel cromatogramma è presente anche un altro picco la cui area è pari al 7% dell'area totale, ma che non è stato possibile identificare con certezza per la mancanza di uno standard di riferimento.

Poiché il picco eluisce dopo la peonidina-3-glucoside e prima della malvidina è possibile ipotizzare che si tratti di malvidina-3-galattoside o malvidina-3-glucoside, le quali sono state identificate in alcune varietà di riso (Escribano-Bailón *et al.*, 2004). Il legame con gli zuccheri aumenta, infatti, la polarità della antocianidina e la molecola che ne risulta è eluita più velocemente in colonne C18 (Wu e Prior, 2005). Oppure potrebbe trattarsi di glucosidi della cianidina e della peonidina con ramnosio (Escribano-Bailón *et al.*, 2004).

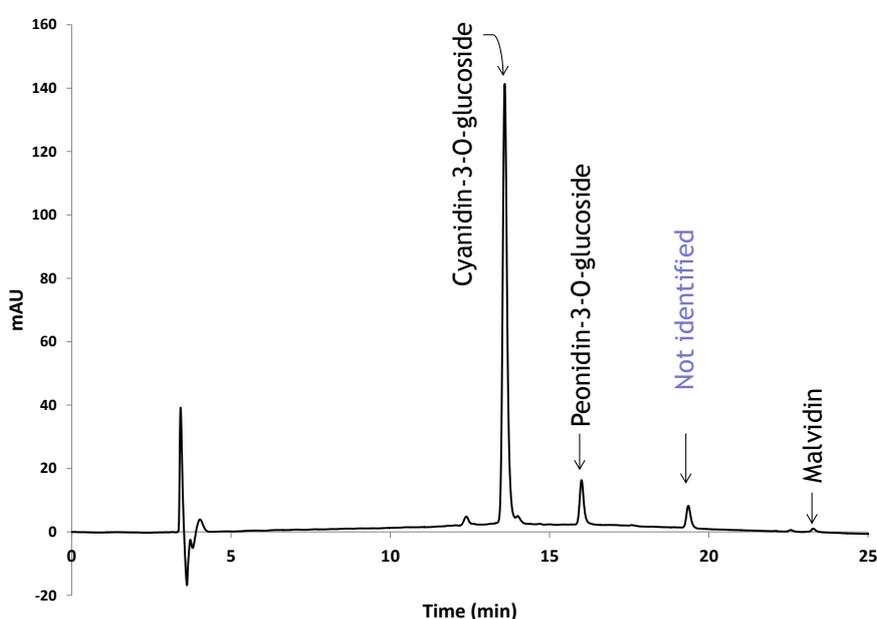


Figura 4.12: cromatogramma delle antocianine estratte da un campione di riso nero

In Tabella 4.32 è riportato il contenuto di C3G e di P3G nei campioni oggetto di studio, sia prima che dopo cottura. La malvidina è stata identificata solo in un campione di riso nero (N(IT)3) e in uno di riso rosso (R(FR)2), pertanto non è stata considerata ai fini dell'analisi quantitativa.

	C3G		P3G	
	Risi crudi <i>mg/100 g s.s.</i>	Risi cotti <i>mg/100 g s.s.</i>	Risi crudi <i>mg/100 g s.s.</i>	Risi cotti <i>mg/100 g s.s.</i>
N(IT) 1	71,5±8,0 <sup>aA</sup>	65,5±5,4 <sup>aA</sup>	9,2±0,7 <sup>aA</sup>	3,3±0,3 <sup>aB</sup>
N(IT) 2	81,7±16,5 <sup>aA</sup>	93,5±8,2 <sup>bA</sup>	5,0±0,3 <sup>bA</sup>	4,2±0,6 <sup>abA</sup>
N(IT) 3	130,5±7,9 <sup>bA</sup>	63,1±7,0 <sup>abB</sup>	16,2±2,3 <sup>cA</sup>	5,8±0,5 <sup>bB</sup>
N(IT) 4	198,6±13,2 <sup>cA</sup>	100,6±3,8 <sup>bB</sup>	10,9±1,1 <sup>aA</sup>	6,7±0,8 <sup>bB</sup>

	C3G		P3G	
N(TH) 1	14,2±1,5 <sup>dA</sup>	24,7±1,4 <sup>cB</sup>	9,8±0,5 <sup>aA</sup>	5,3±0,3 <sup>bB</sup>
N(CA)1	0,3±0,0 <sup>eA</sup>	0,3±0,0 <sup>dA</sup>	n.r.	n.r.
R(IT) 1	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
R(FR) 1	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
R(FR) 2	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
R(TH) 1	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

Tabella 4.32: antocianine nei campioni crudi e cotti. Lettere diverse minuscole in colonna e maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )

Queste sono state identificate e quantificate solo nei campioni di riso con pericarpo nero. Secondo Kim *et al.* (2008) e Gunaratne *et al.* (2013), infatti, nei campioni di riso rosso non sono presenti antocianine. Al contrario, Pereira-Caro *et al.* (2013a) nel riso rosso *cultivar* Tam Tam hanno trovato un valore di C3G pari a 0,3 mg/100 g e Chen *et al.* (2012) in alcune varietà giapponesi di riso rosso hanno osservato la presenza di malvidina in concentrazioni comprese tra 7,9 e 34,4 mg/100 g di sostanza. In questo studio, l'unica antocianina identificata in un campione di riso rosso (R(FR)2) è la malvidina. Questa è stata trovata anche nella varietà nella varietà Nerone (N(IT)3).

In accordo con i dati di letteratura (Goufo e Trindade, 2014; Abdel-Aal *et al.*, 2006; Escribano-Bailón *et al.*, 2004), la principale antocianina identificata nei risi neri è la C3G, con una percentuale superiore all'88,6% nelle varietà italiane e al 52,2% nel Thai Nero. Nel campione di riso selvatico (N(CA)1) questa è presente in quantità trascurabili, ma allo stesso tempo rappresenta l'unica antocianina identificata. La concentrazione della C3G nei restanti campioni oscilla tra 14,2 e 198,6 mg/100 g (s.s.) e le differenze individuate sono statisticamente significative eccetto che tra i campioni N(IT)1 e N(IT)2. C'è, quindi, un'alta variabilità tra i campioni: alcuni di questi presentano un contenuto in C3G comparabile a quello di altri alimenti ritenuti ricchi in antocianine. Il campione N(IT)4, ad esempio, ha un contenuto di C3G significativamente non diverso da quello riportato da Wu *et al.* (2006) per le more e più alto di quello rilevato nelle ciliegie e nelle prugne nere.

I valori di C3G osservati concordano con quanto riportato da Bordiga *et al.* (2014) che per le varietà Artemide, Nerone e Venere riporta un contenuto pari rispettivamente a 1004±83,9 mg/kg, 593±32,5 mg/kg e 512±53,1 mg/kg.

I valori della P3G variano tra 5,0 e 16,2 mg/100 g (s.s.): nel riso selvatico canadese questa antocianina non è rivelabile, nei risi italiani rappresenta il 5,5-11,4 % della somma delle antocianine identificate, mentre nel campione N(TH)1 rappresenta più del 40%. Bordiga *et al.* (2014) per le

varietà Artemide, Nerone e Venere riportano un contenuto di P3G pari rispettivamente a  $124 \pm 7,71$  mg/kg,  $66,4 \pm 1,83$  mg/kg e  $59,4 \pm 2,48$  mg/kg.

I valori ottenuti sono in linea con quelli trovati da Kim *et al.* (2010) in risi neri coreani per i quali il contenuto di P3G varia tra 1,28 e 11,87 mg/100 g (s.s.).

Nei risi cotti, il contenuto di C3G oscilla tra 0,30 e 100,6 mg/100g (s.s.). I campioni N(IT)1 e N(IT)3 hanno una concentrazione statisticamente non diversa, come pure i campioni N(IT)2 e N(IT)4. La varietà di riso Thai nero, ha, invece, un contenuto significativamente più basso di tutti gli altri eccetto il riso selvatico canadese. Il confronto tra il contenuto in C3G prima e dopo della cottura consente di valutare l'effetto di tale trasformazione su questi pigmenti. Dopo cottura, si osserva una variazione significativa della C3G solo nelle varietà italiane Nerone (N(IT)3) e Artemide (N(IT)4) e nel Thai nero (N(TH)1). La diminuzione di tale antocianina è per entrambe le varietà italiane pari a circa il 50%. Nel caso della varietà N(TH)1, si osserva, invece, in seguito a cottura un aumento della C3G. Questo comportamento si potrebbe spiegare in un aumento dell'estraibilità delle molecole in seguito a cottura, come già osservato per i composti fenolici.

Hiemori *et al.* (2009) riportano che durante la cottura la C3G si trasforma in acido protocatecuico. Tale conversione è dovuta al pH a cui avviene la cottura: nelle condizioni di neutralità cui sono cotti i risi, il catione flavilio cianidina non è stabile e quindi si scinde in floroglucinaldeide e acido protocatecuico. Quest'ultimo ha proprietà antiossidanti (Masella *et al.*, 1999) e antitumorali (Yin *et al.*, 2009).

Anche Zaupa *et al.* (2015) hanno osservato una diminuzione del contenuto della C3G nella varietà Venere, pari al 27,8% per una cottura di tipo risotto e del 62,4% per cottura per bollitura.

In seguito a cottura, anche il contenuto di P3G diminuisce significativamente in tutti i campioni eccetto il campione N(IT)2. L'entità della degradazione di questa molecola oscilla tra un minimo del 38,6% della varietà Artemide (N(IT)4) ad un massimo del 64,3% della varietà Nerone (N(IT)3).

## 4.8 DETERMINAZIONE DELLE PROANTOCIANIDINE

### 4.8.1 Analisi spettrofotometrica delle proantocianidine totali

Come composti fenolici, le proantocianidine possono trovarsi in forma libera, quindi solubile, oppure legate alla parete cellulare e a proteine da cui non sono rimosse facilmente (Pérez-Jiménez e Torres, 2011). In questo studio sono state determinate le proantocianidine solubili totali per via spettrofotometrica ed è stata determinata la (+)-catechina per via cromatografica. Le prove sperimentali sono state condotte sui campioni di riso rosso e sulla varietà Artemide in quanto, come è noto dalla letteratura, tali molecole sono state individuate solo nei risi con pericarpo rosso, mentre sono assenti nei risi con pericarpo nero (Yu *et al.*, 2012) ad eccezione della varietà Artemide (Finocchiaro *et al.*, 2007).

Come riportato in McCallum e Walke (1990), infatti, i pigmenti responsabili della colorazione dei risi rossi sono i flobafeni derivati dall'ossidazione delle proantocianidine.

Poiché l'acetone può interferire con la determinazione delle proantocianidine totali (Gessner e Steiner, 2005), tale solvente è stato rimosso dagli estratti e il residuo combinato con l'estratto in metanolo.

In Tabella 4.33 sono riportati i valori delle proantocianidine totali sia nei risi crudi che cotti.

	TPAC risi crudi	TPAC risi cotti	Perdita PA
	mg di C3G eq./100 g	mg di C3G eq./100 g	%
R(IT)1	8,3±0,5 <sup>aA</sup>	3,9±0,2 <sup>aB</sup>	53,0
R(FR)1	6,6±0,5 <sup>aA</sup>	3,7±0,2 <sup>aB</sup>	43,6
R(FR)2	7,5±0,6 <sup>aA</sup>	4,1±0,2 <sup>aB</sup>	45,4
R(TH)1	5,9±0,4 <sup>aA</sup>	3,4±0,1 <sup>aB</sup>	42,8
N(IT)4	11,6±0,7 <sup>bA</sup>	5,3±0,3 <sup>bB</sup>	54,3

Tabella 4.33: TPAC nei risi crudi e cotti. TAC nei campioni crudi e cotti. Lettere diverse minuscole in colonna e maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )

Nei risi crudi con pericarpo rosso i valori oscillano tra 5,9 e 8,3 mg di C3G equivalenti/100 g (s.s.) e le differenze sono statisticamente non significative ( $p > 0,05$ ). Il campione della varietà Artemide (N(IT)4) presenta, invece, un contenuto significativamente più alto dei risi rossi e pari a 11,6 mg di C3G equivalenti/100 g (s.s.). I dati ottenuti sono in accordo con Finocchiaro *et al.* (2007) che nella varietà Artemide ha osservato un contenuto di proantocianidine totali pari a 153,1 mg C3G/kg e in alcune varietà di riso rosso ha trovato valori compresi tra 93,9 e 118,6 mg C3G/kg.

La cottura determina una diminuzione significativa delle proantocianidine in tutti i campioni, mediamente pari a 47,6%. Secondo Satoshi et al. (2001) le proantocianidine sono composti antiossidanti stabili al calore, al contrario Porter (1993) suggerisce che in seguito a trattamento termico le proantocianidine possono essere trasformate in flobatannini, composti fenolici insolubili in acqua e questo potrebbe spiegare la diminuzione osservata.

#### 4.8.2 Analisi cromatografica

Un'aliquota degli estratti in metanolo e in acetone:acqua utilizzati per la determinazione delle proantocianidine totali è stata conservata a -40°C, concentrata per evaporazione, poi filtrata su filtri da 0,45 µm e sottoposta ad analisi cromatografica. Nelle condizioni cromatografiche utilizzate, il cromatogramma dell'estratto in acetone:acqua mostrava picchi non risolti. Il cromatogramma dell'estratto metanolico di un campione di riso rosso crudo è, invece, riportato in Figura 4.13.

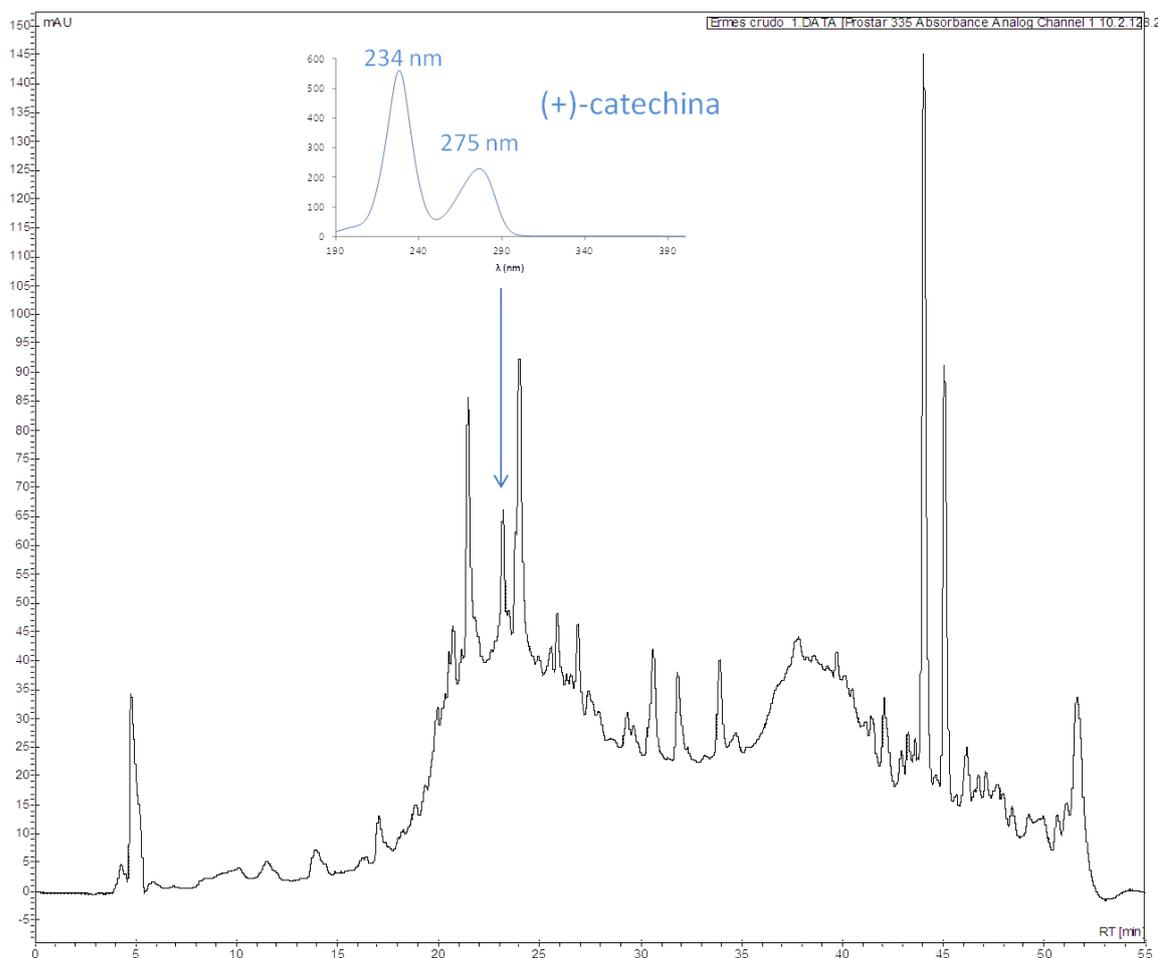


Figura 4.13: cromatogramma dell'estratto metanolico del riso rosso Ermes

È evidente l'analogia con lo spettro ottenuto da Gunaratne *et al.* (2013) per la presenza di gobbe non risolte. È stato possibile assegnare il picco del flavan-3-olo catechina che ha un tempo di ritenzione

pari a 23,3 minuti e della cianidina-3-O-glucoside a 24,0 minuti. Per poter assegnare il picco della catechina, oltre al confronto dello spettro di assorbimento dei picchi del campione con quello di una soluzione standard, si è reso necessario aggiungere un'aliquota di catechina standard all'estratto del campione.

Tale molecola, è stata assegnata inequivocabilmente solo nel campione Ermes (R(IT)1) e nel campione di riso selvatico canadese (N(CA)1), mentre nei cromatogrammi degli altri campioni di riso con pericarpo rosso e del riso Artemide il picco non era identificabile, plausibilmente perché la concentrazione era al di sotto del limite di rivelabilità.

L'estratto in metanolo dei risi sottoposti a cottura ha fornito, invece, un cromatogramma più "pulito". In Figura 4.14 sono messi a confronto i cromatogrammi degli estratti in metanolo del riso Ermes tal quale e del riso Ermes cotto. È evidente che con il trattamento termico vengono meno le molecole interferenti con polarità simile alla catechina.

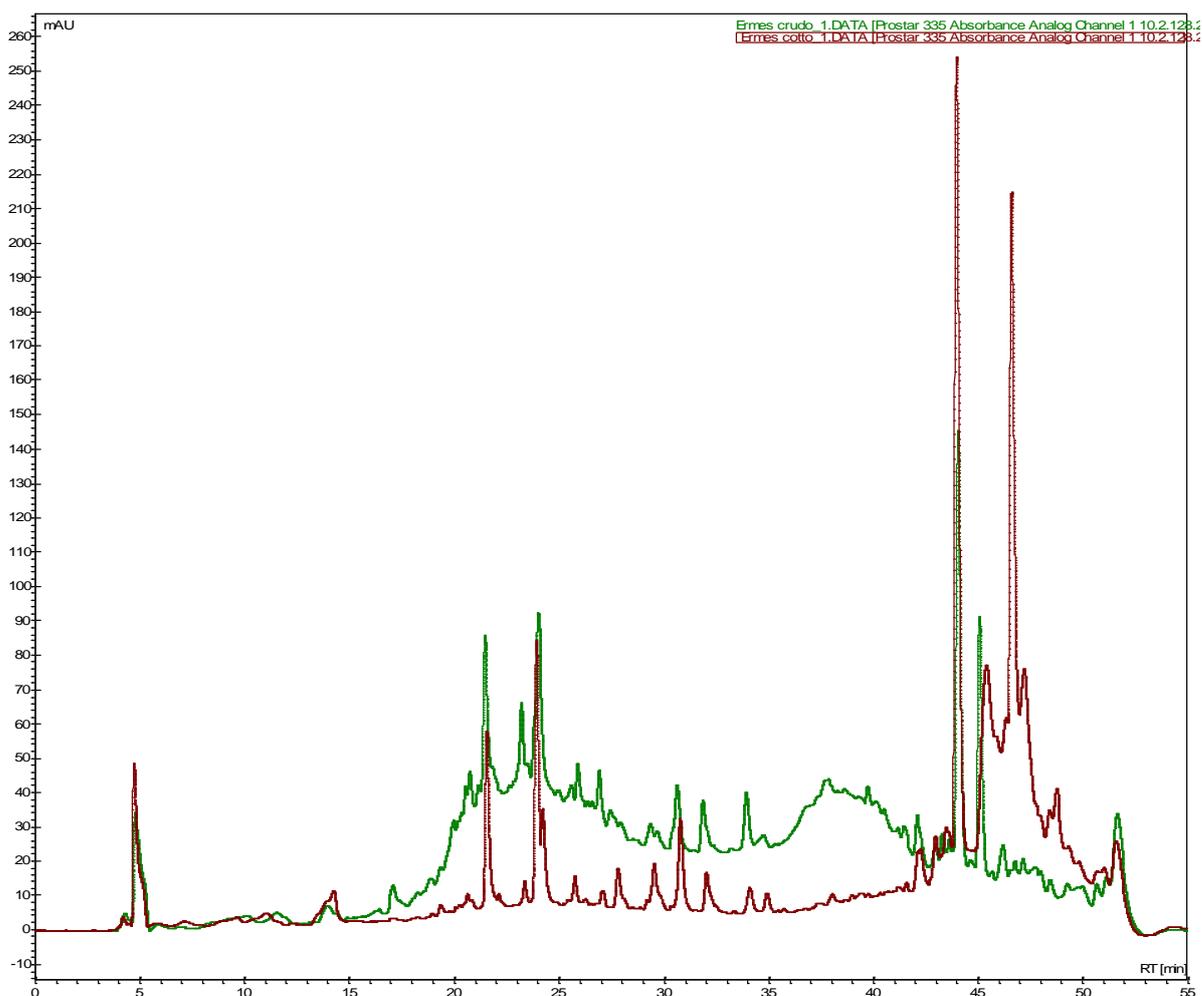


Figura 4.14: cromatogramma dell'estratto in metanolo del riso Ermes crudo (verde) e cotto (marrone)

In Tabella 4.34 sono riportate le concentrazioni di catechina per i campioni di riso con pericarpo rosso, per il riso Artemide ed il riso selvatico canadese.

Nei risi crudi, la catechina è stata identificata e quantificata solo nei campioni R(IT)1 e N(CA)1. Nei campioni cotti le concentrazioni di catechina oscillano tra 0,08 mg/100 g (s.s.) e 0,48 mg/100 g (s.s.).

I due campioni francesi ed il Thai rosso non presentano differenza significative.

	<b>Risi crudi</b>	<b>Risi cotti</b>	<b>Perdita</b>
	<i>mg/100 g (s.s.)</i>	<i>mg/100 g (s.s.)</i>	<i>%</i>
R(IT) 1	0,84±0,04 <sup>aA</sup>	0,30±0,01 <sup>aB</sup>	36
N(CA)1	0,25±0,01 <sup>bA</sup>	0,08±0,01 <sup>bB</sup>	30
R(FR) 1	n.d.	0,38±0,02 <sup>c</sup>	
R(FR) 2	n.d.	0,41±0,03 <sup>c</sup>	
R(TH) 1	n.d.	0,39±0,02 <sup>c</sup>	
N(IT)4	n.d.	0,48±0,01 <sup>d</sup>	

Tabella 4.34: catechina (mg/100 g s.s.) nei campioni crudi e cotti. Lettere diverse minuscole in colonna e maiuscole in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )

Le concentrazioni di catechina osservate sono in accordo con Zaupa *et al.* (2014) che nel riso Ermes crudo hanno osservato una concentrazione di catechina pari a 4,0 µg/g (s.s.), mentre dopo cottura il valore è sceso a 1,8 µg/g (s.s.).

La degradazione della catechina osservata nei due campioni di riso per i quali è stato possibile identificare il composto prima e dopo cottura oscilla tra il 30% ed il 36%, mentre Zaupa *et al.* (2014) hanno osservato una degradazione pari al 55%.

#### 4.9 CAMPIONI A CONFRONTO

In questo studio sono state determinate le principali molecole bioattive presenti in dieci varietà di riso pigmentato. I valori ottenuti per ciascun componente sono stati tabulati e discussi nelle sezioni dedicate alle classi di componenti considerate. In questo paragrafo, si vuole presentare una sinossi della composizione di ciascuna varietà utilizzando un metodo che, diversamente dalla tabulazione, possa essere immediato: i radar plot.

Questo tipo di rappresentazione, inizialmente utilizzato nell'ambito economico, può essere uno strumento utile in tutte le situazioni in cui si vogliono rappresentare un grande numero di variabili o quando le grandezze considerate hanno scale diverse (Saary, 2008).

In questi grafici, le variabili sono rappresentate ognuna su un asse che parte da uno stesso punto. I valori di ogni variabile sono poi connessi tra loro delimitando un'area. Nel caso della rappresentazione delle molecole bioattive tale area fornisce una misura del contenuto complessivo di tali molecole. Allo stesso tempo il grafico consente di individuare i componenti che caratterizzano meglio un determinato campione.

In Figura 4.15 è riportato il radar plot per i risi con pericarpo nero crudi. Sugli assi sono state riportate le concentrazioni di luteina totale ( $\mu\text{g/g s.s.}$ ), zeaxantina ( $\mu\text{g/g s.s.}$ ),  $\beta$ -carotene ( $\mu\text{g/g s.s.}$ ), luteina libera ( $\mu\text{g/g s.s.}$ ), C3G x100 (mg/100 g), P3G x100 (mg/100 g), TPAC x100 (mg C3G eq./100 g s.s.), FPC x100 (mg/100 g) e BPC x100 (mg/100 g).

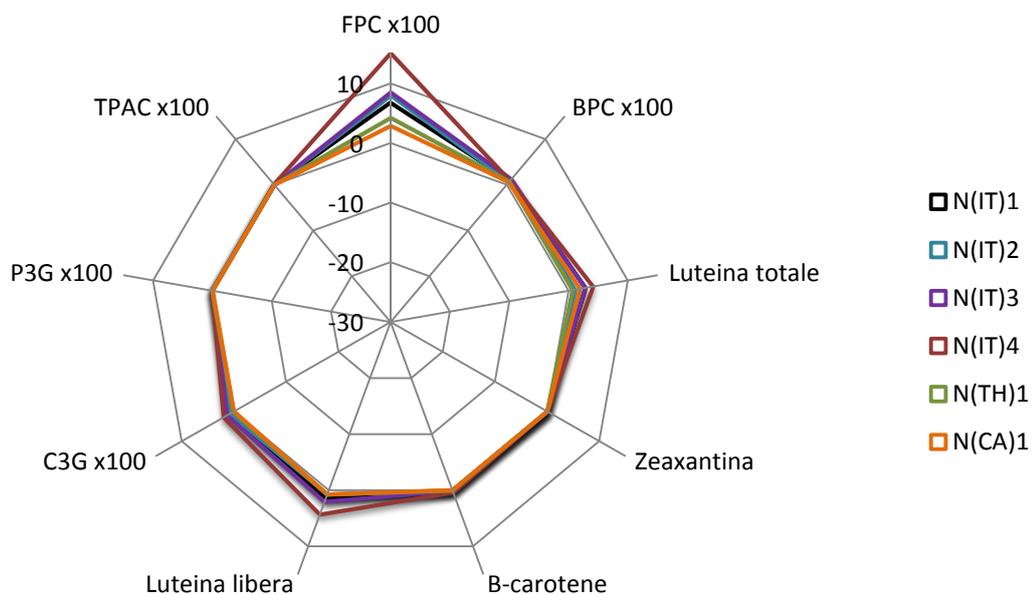


Figura 4.15: radar plot dei risi con pericarpo nero crudi

Dal grafico emerge che i componenti bioattivi che più caratterizzano e differenziano i campioni sono i fenoli liberi e la luteina libera. Tra i campioni, quelli che si distinguono per il maggiore contenuto in molecole bioattive sono la varietà Artemide (N(IT)4) seguita dalla varietà Nerone (N(IT)3).

In Figura 4.16 è riportato il radar plot dei campioni con pericarpo rosso, analogamente a quanto fatto per i risi neri.

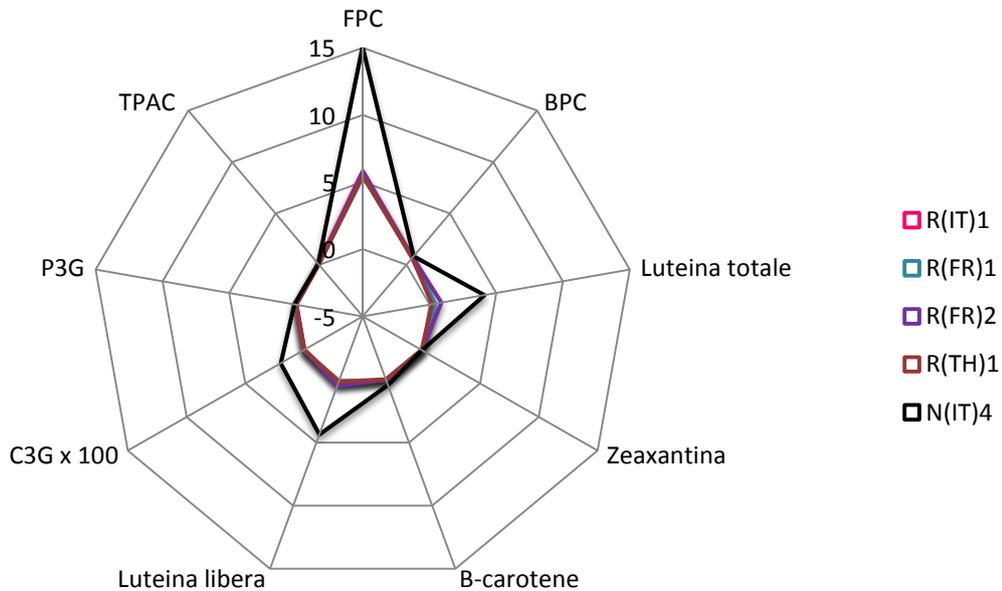


Figura 4.16: radar plot dei risi con pericarpo rosso e del riso N(IT)4 crudi

È stato riportato anche il campione N(IT)4 che mette in evidenza come il contenuto in molecole bioattive nei risi rossi sia significativamente inferiore. Inoltre, è possibile individuare i componenti che maggiormente differenziano i risi rossi dal campione nero e che sono i fenoli liberi, la luteina totale, la luteina libera e la C3G.

I radar plot riportati di seguito mostrano l'effetto complessivo della cottura sul contenuto in molecole bioattive.

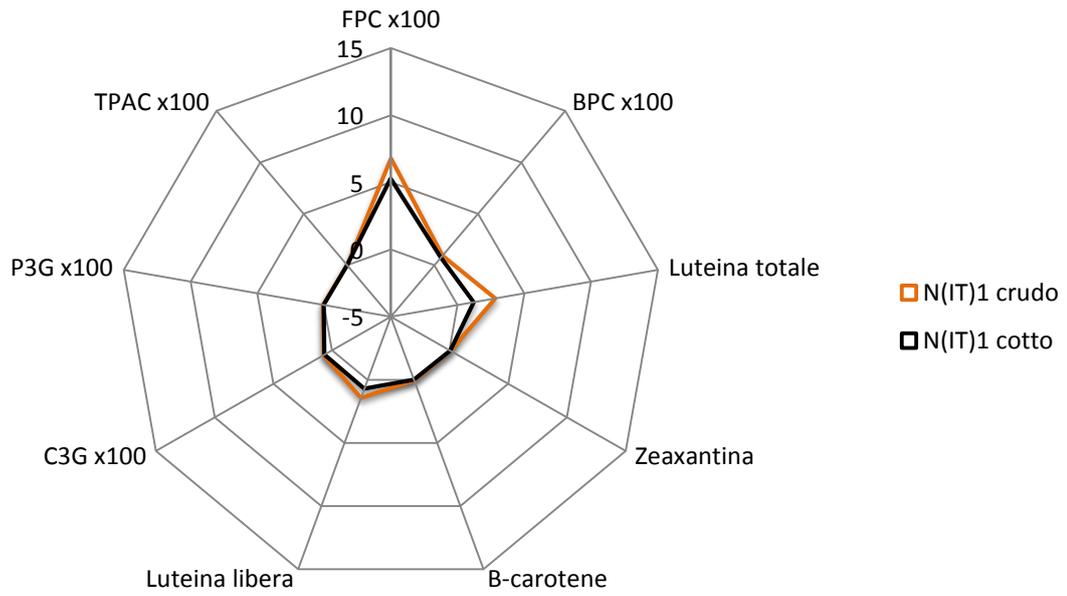


Figura 4.17: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione N(IT)1

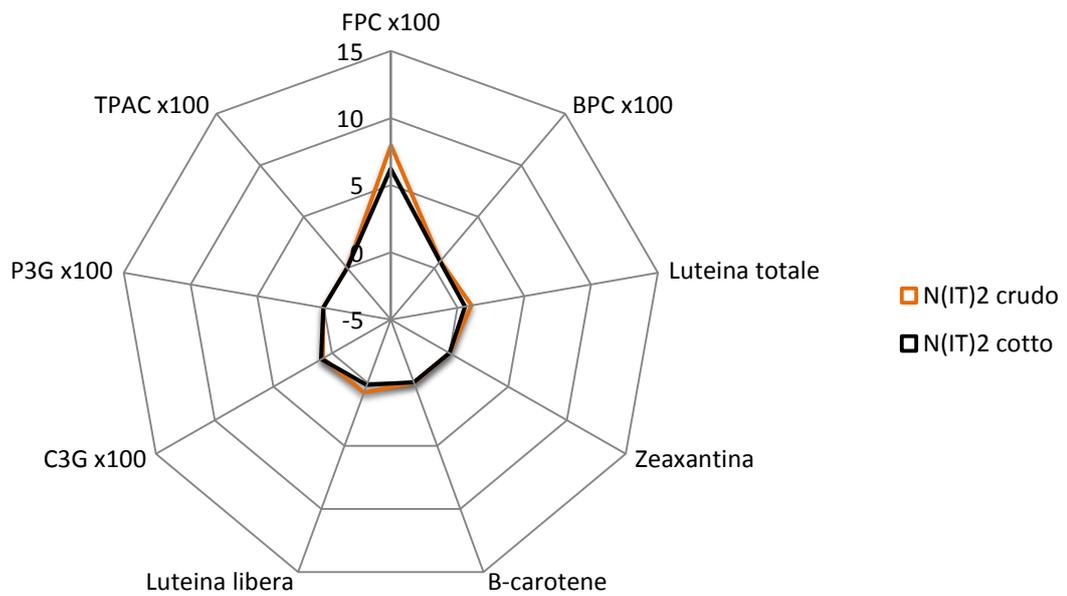


Figura 4.18: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione N(IT)2

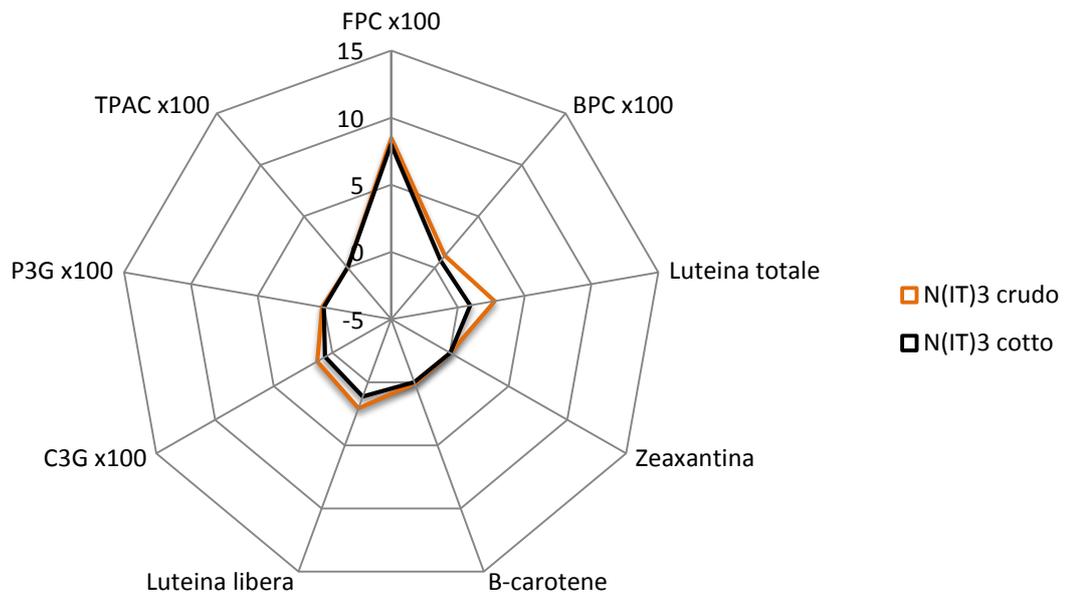


Figura 4.19: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione N(IT)3

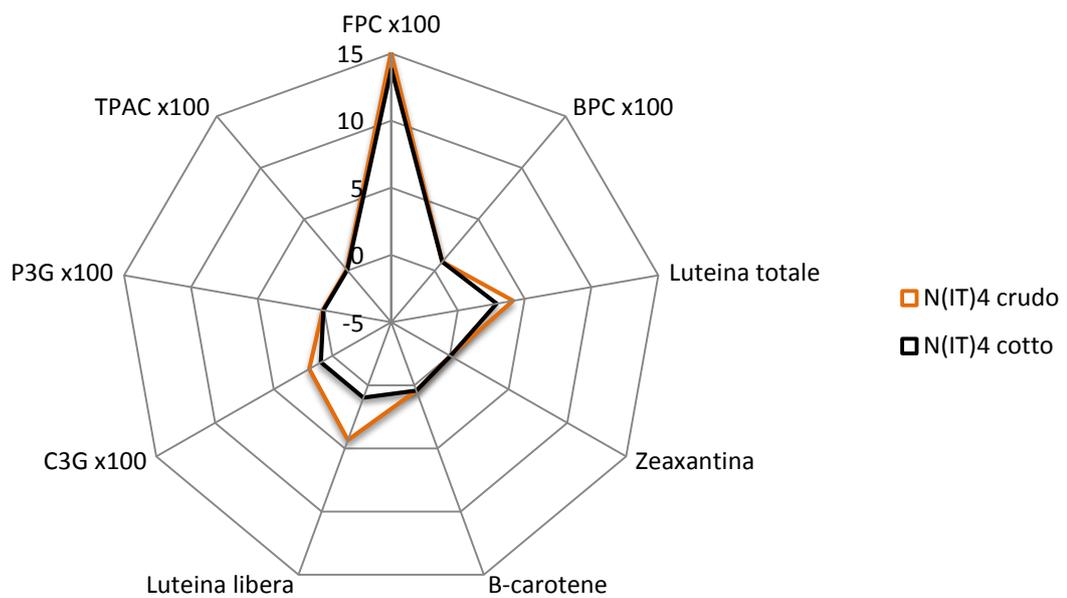


Figura 4.20: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione N(IT)4

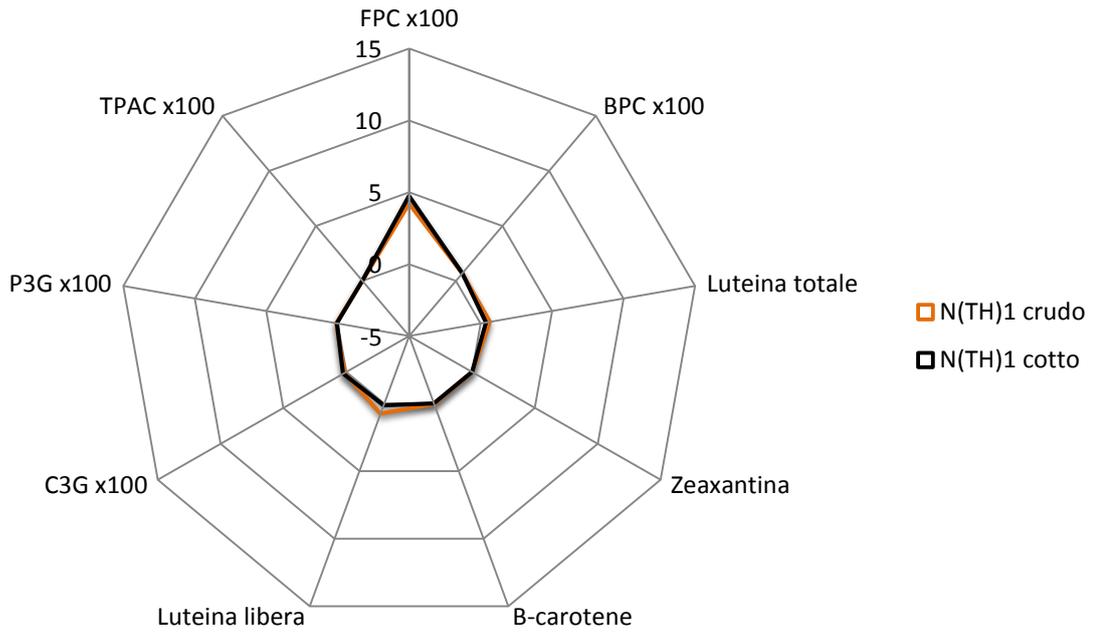


Figura 4.21: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione N(TH)1

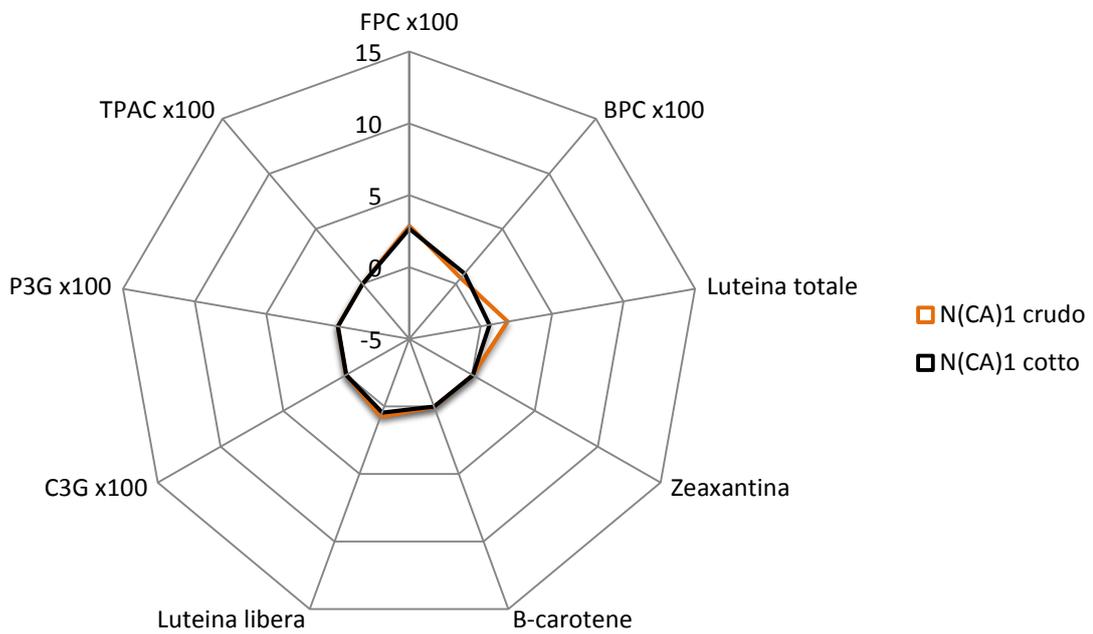


Figura 4.22: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione N(CA)1

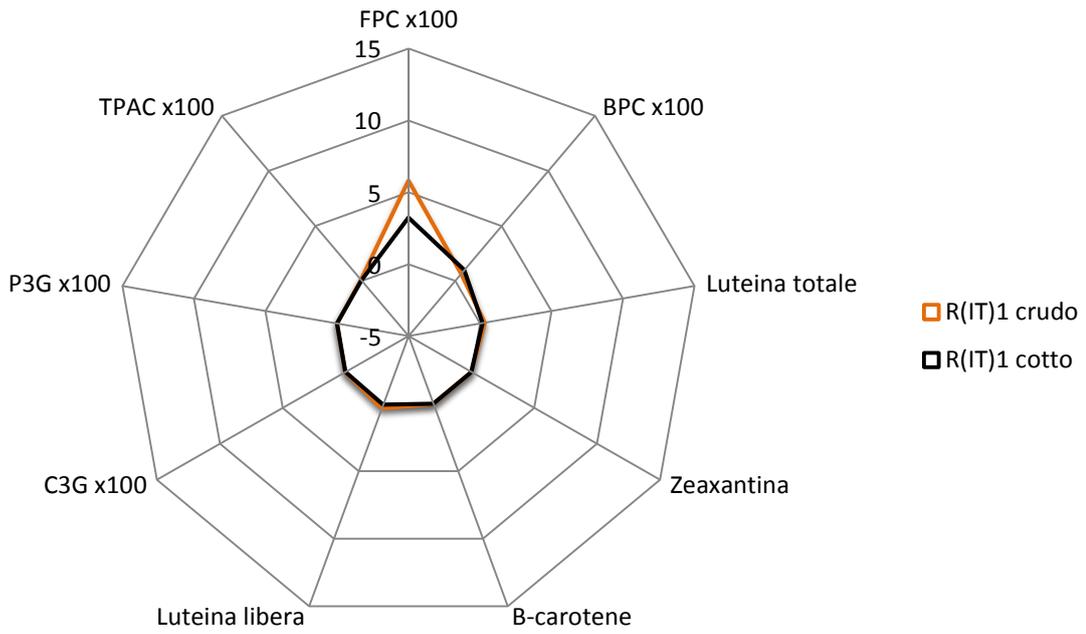


Figura 4.23: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione R(IT)1

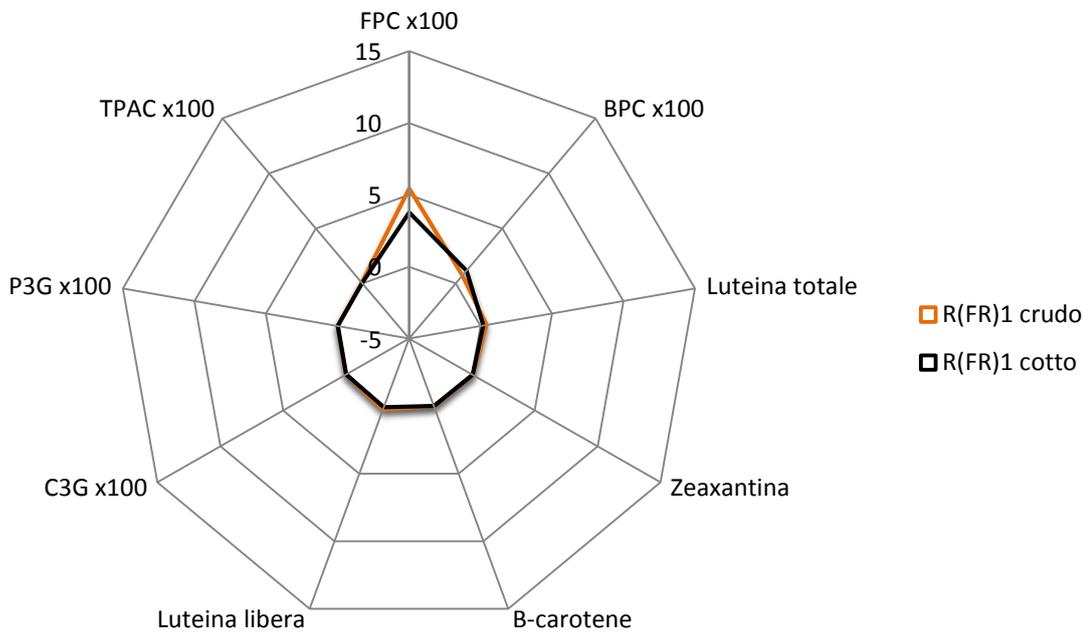


Figura 4.24: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione R(FR)1

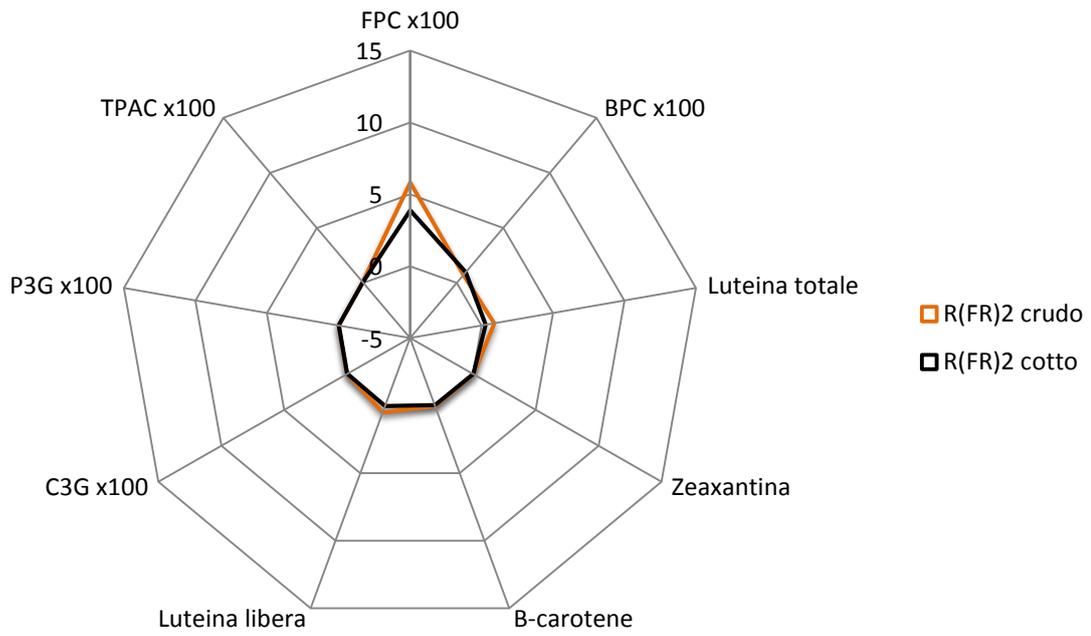


Figura 4.25: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione R(FR)2

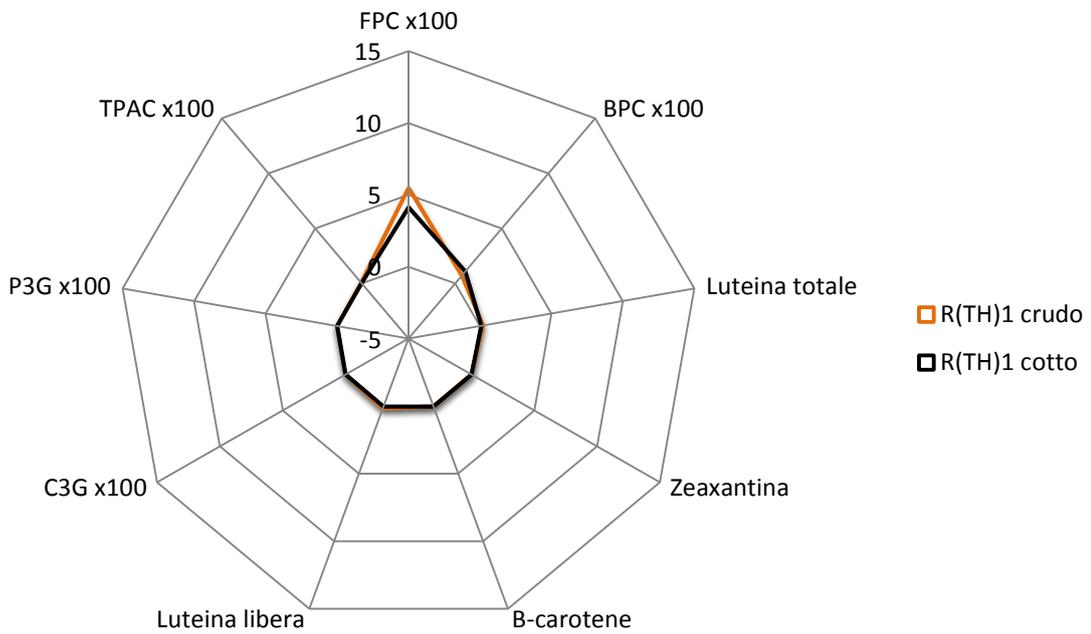


Figura 4.26: effetto della cottura su tutti i componenti bioattivi nel campione R(TH)1

## 4.10 CONCLUSIONI

Nello studio condotto, attraverso la determinazione analitica di molecole bioattive di natura idrofila e lipofila, sono state caratterizzate alcune varietà di riso pigmentato disponibili sul mercato italiano che si differenziano per il colore dei chicchi e per la specie di appartenenza.

Ad oggi, tale lavoro rappresenta il primo studio italiano sui risi pigmentati in cui sono state prese in considerazione e confrontate un numero relativamente elevato di varietà, cinque delle quali prodotte in Italia. Il carattere di novità della ricerca è conferito anche dal fatto che sono studiate e confrontate contemporaneamente sia molecole bioattive di natura lipofila come i carotenoidi che idrofila come i composti fenolici. Inoltre, è stato valutato l'effetto di una cottura tipo risotto su ciascuno dei composti di interesse. A differenza di altri studi, sono state considerate diverse metodiche analitiche per la determinazione dei componenti bioattivi e si è proceduto alla loro ottimizzazione. È stata vagliata, inoltre, la possibilità di utilizzare gli indici di colore come parametro predittivo del contenuto in molecole bioattive.

Dalle prove eseguite è emerso che:

- i principali carotenoidi identificati sono luteina, zeaxantina e  $\beta$ -carotene. La prima è presente nei risi pigmentati in una percentuale maggiore del 90% rispetto ai carotenoidi totali, mentre gli altri due sono presenti in quantità ridotte. Per quanto riguarda il contenuto in luteina, è stata evidenziata un'ampia variabilità tra i campioni attribuibile alle caratteristiche fisiologiche, genetiche e biochimiche della pianta oltre che a fattori come la stagionalità, la maturazione al momento del raccolto, le condizioni di stoccaggio e le tecniche di trasformazione. È stato, tuttavia, osservato che i risi con pericarpo nero hanno un contenuto medio superiore ai risi con pericarpo rosso. Le quantità presenti in alcune varietà sono, inoltre, comparabili a quelle trovate in altri cereali e in alcuni tipi di frutta e verdura. Rispetto a queste ultime i risi pigmentati hanno il vantaggio di avere una *shelf-life* più lunga e di non essere legati alla stagionalità. A differenza di quanto osservato per la luteina, la zeaxantina ed il  $\beta$ -carotene presentano una grande variabilità tra i campioni non riconducibile al colore del pericarpo. In seguito a cottura tipo risotto, è stata osservata una riduzione significativa di tutti i carotenoidi. Per la luteina la degradazione media è stata superiore al 50% sia nei risi neri che nei risi rossi, tuttavia, anche dopo cottura, le quantità erano confrontabili con quelle presenti in altri cereali crudi. Le differenze di resistenza osservate nelle varietà sono attribuibili al diverso corredo enzimatico, alla diversa struttura dei tessuti vegetali e alla presenza di altri antiossidanti;
- più del 40% della luteina presente nei campioni si trova in forma non esterificata né legata a proteine, ossia come luteina libera. L'importanza di tale valutazione nei risi pigmentati, e nei

- cereali in generale, risiede nel fatto che la biodisponibilità dipende dalla forma in cui tale carotenoide si trova negli alimenti: la luteina libera ha una biodisponibilità inferiore a quella legata a proteine ed esterificata. La cottura modifica la percentuale di luteina libera rispetto alla luteina totale. In generale la frazione di luteina libera diminuisce dopo tale trattamento. I risi rossi presentano un contenuto mediamente inferiore ai risi neri;
- data la presenza di carotenoidi nei risi pigmentati e l'esistenza di un metodo ufficiale per determinare i pigmenti gialli nel frumento duro attraverso un'estrazione in butanolo saturo d'acqua, è stata vagliata la possibilità di applicare tale metodo anche al riso. I risultati hanno, però, dimostrato che l'uso di questo metodo per tale matrice presenta limitazioni dovute alla aspecificità del solvente per i pigmenti gialli. Il contenuto in pigmenti totali è stato correlato con l'indice colorimetrico  $b^*$  ed è stata evidenziata una correlazione negativa tra i due parametri;
  - i composti fenolici sono stati determinati sia nella loro forma libera che legata-insolubile avvalendosi di procedure analitiche che sono state ottimizzate nel corso dello studio. Dalle prove sperimentali è emerso che nei risi pigmentati i fenoli si trovano essenzialmente in forma libera. I fenoli legati insolubili rappresentano, infatti, appena il 5-15% dei fenoli liberi, indipendentemente dal tipo di campione considerato. Le varietà italiane con pericarpo nero hanno un contenuto in fenoli liberi significativamente maggiore di tutte le altre varietà, mentre la canadese e la thailandese hanno un contenuto inferiore anche ai risi rossi. Questi ultimi non presentano differenze statisticamente significative. In seguito a cottura, tutti i campioni, eccetto il Thai nero, mostrano una diminuzione significativa del contenuto in fenoli liberi. Occorre notare che la diminuzione percentuale media è maggiore nei risi rossi, piuttosto che nei neri dove sono state osservate diminuzioni minime pari al 5,4%. Per quanto riguarda i fenoli legati insolubili, è stato osservato, invece, un diverso comportamento delle varietà con pericarpo nero e rosso. Nei risi rossi si è assistito, infatti, ad un aumento del contenuto in fenoli legati insolubili, attribuibile ad un aumento della loro estraibilità in seguito all'effetto dell'acqua e della temperatura sulla matrice. Nei risi neri, invece, sono state osservate diminuzioni significative solo in due dei campioni. In generale è emersa una maggiore stabilità dei fenoli legati insolubili rispetto ai fenoli liberi;
  - per quanto riguarda i pigmenti di tipo antocianico, l'analisi spettrofotometrica degli estratti ha messo in evidenza l'assorbimento caratteristico di tali molecole solo nei risi con pericarpo nero. I dati sono stati confermati dall'analisi cromatografica da cui è emerso che le principali antocianine presenti nei campioni sono la cianidina-3-O-glucoside e la peonidina-3-O-glucoside. La malvidina, che alcuni autori hanno individuato in varietà di riso rosso, è stata identificata in un campione di riso rosso e in un campione di riso nero. Il contenuto di cianidina-3-O-glucoside,

dopo cottura, diminuisce significativamente in tutti i campioni ad eccezione delle varietà Otello e Venere. L'entità media della perdita è pari al 46%, tuttavia la quantità di cianidina-3-O-glucoside residua è confrontabile a quella presente in alcuni tipi di frutta e verdura ritenuti a medio contenuto di antocianine. Per tutte le varietà considerate, la peonidina-3-O-glucoside mostra lo stesso comportamento della cianidina-3-O-glucoside in seguito a cottura;

- il contenuto in proantocianidine totali è stato determinato per via spettrofotometrica nei risi rossi e nella varietà Artemide, poiché da dati di letteratura questo riso nero presenta proantocianidine. Non sono state trovate differenze statisticamente significative tra i campioni ed è emerso che anche tali molecole sono suscettibili all'effetto della cottura. L'analisi cromatografica degli estratti ha consentito di identificare in alcuni dei campioni il monomero costituente le proantocianidine cioè la catechina.

In definitiva, con lo studio sono state colmate alcune delle lacune presenti nella letteratura scientifica nazionale e internazionale. Sono stati forniti dati sperimentali utili per la tutela e la promozione dei prodotti nazionali o da cui poter avviare programmi di miglioramento genetico. I risultati sono anche il primo passo del processo che porta allo sviluppo di ingredienti e alimenti funzionali o all'avviamento di studi per l'inserimento di *health claims* in etichetta.

Questo lavoro, quindi non è da intendersi come un punto di arrivo, ma un punto di partenza per ulteriori nuovi e interessanti studi scientifici.

#### 4.11 BIBLIOGRAFIA DEL CAPITOLO

- Abdel-Aal, E.-S.M., Hucl, P., 1999. A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. *Cereal Chemistry Journal* 76, 350–354. doi:10.1094/CCHEM.1999.76.3.350
- Abdel-Aal, E.-S.M., Young, J.C., Rabalski, I., 2006. Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple, and Red Cereal Grains. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4696–4704. doi:10.1021/jf0606609
- Acquistucci, R., Melini, V., Carbonaro, M., Finotti, E., 2013. Bioactive molecules and antioxidant activity in durum wheat grains and related millstream fractions. *Int J Food Sci Nutr* 64, 959–967. doi:10.3109/09637486.2013.825696
- Adom, K.K., Liu, R.H., 2002. Antioxidant Activity of Grains. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6182–6187. doi:10.1021/jf0205099
- Amorim-Carrilho, K.T., Cepeda, A., Fente, C., Regal, P., 2014. Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 56, 49–73. doi:10.1016/j.trac.2013.12.011
- Bordiga, M., Gomez-Alonso, S., Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J.D., Hermosin-Gutierrez, I., Arlorio, M., 2014. Phenolics characterization and antioxidant activity of six different pigmented *Oryza sativa* L. cultivars grown in Piedmont (Italy). *Food Research International, Advances and new trends in natural pigments in foods: chemistry, biochemistry, technology and health* 65, Part B, 282–290. doi:10.1016/j.foodres.2014.03.007
- Borneo, R., León, A.E., 2012. Whole grain cereals: functional components and health benefits. *Food Funct* 3, 110–119. doi:10.1039/c1fo10165j
- Britton, G., Pfander, H., Liaaen-Jensen, S. (Eds.), 2009. *Carotenoids*. Birkhäuser Basel, Basel.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., Galán-Vidal, C.A., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113, 859–871. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.001
- Champagne, E.T., 2004. *RICE: Chemistry and Technology*, Grain Science References. American Association of Cereal Chemists, Inc.
- Chen, X.Q., Nagao, N., Itani, T., Irifune, K., 2012. Anti-oxidative analysis, and identification and quantification of anthocyanin pigments in different coloured rice. *Food Chem* 135, 2783–2788. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.098
- Chitchumroonchokchai, C., Failla, M.L., 2006. Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellization and uptake of the xanthophyll by Caco-2 human intestinal cells. *J. Nutr.* 136, 588–594.
- Craft, N.E., Soares, J.H., 1992. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and .beta.-carotene in organic solvents. *J. Agric. Food Chem.* 40, 431–434. doi:10.1021/jf00015a013
- Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., 2004. Anthocyanins in cereals. *J Chromatogr A* 1054, 129–141.
- Fabian, C., Ju, Y.-H., 2011. A review on rice bran protein: its properties and extraction methods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51, 816–827. doi:10.1080/10408398.2010.482678
- Fares, C., Platani, C., Baiano, A., Menga, V., 2010. Effect of processing and cooking on phenolic acid profile and antioxidant capacity of durum wheat pasta enriched with debranning fractions of wheat. *Food Chemistry* 119, 1023–1029. doi:10.1016/j.foodchem.2009.08.006

- Fernández-García, E., Mínguez-Mosquera, M.I., Pérez-Gálvez, A., 2007. Changes in composition of the lipid matrix produce a differential incorporation of carotenoids in micelles. Interaction effect of cholesterol and oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4th International Congress on Pigments in Food: Pigments in Food - A Challenge to Life Sciences 8, 379–384. doi:10.1016/j.ifset.2007.03.016
- Finocchiaro, F., Ferrari, B., Gianinetti, A., 2010. A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. *Journal of Cereal Science* 51, 28–34. doi:10.1016/j.jcs.2009.09.003
- Finocchiaro, F., Ferrari, B., Gianinetti, A., Dall'asta, C., Galaverna, G., Scazzina, F., Pellegrini, N., 2007. Characterization of antioxidant compounds of red and white rice and changes in total antioxidant capacity during processing. *Mol Nutr Food Res* 51, 1006–1019. doi:10.1002/mnfr.200700011
- Fратиани, A., Irano, M., Panfili, G., Acquistucci, R., 2005. Estimation of color of durum wheat. Comparison of WSB, HPLC, and reflectance colorimeter measurements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2373–2378. doi:10.1021/jf040351n
- Fратиани, A., Mignogna, R., Niro, S., Panfili, G., 2015. Determination of Lutein from Fruit and Vegetables Through an Alkaline Hydrolysis Extraction Method and HPLC Analysis. *Journal of Food Science* 80, C2686–C2691. doi:10.1111/1750-3841.13122
- Gessner, M., Steiner, D., 2005. Acid butanol assay for proanthocyanidins (condensed tannins), in: *Methods to Study Litter Decomposition*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Goufo, P., Trindade, H., 2014. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols,  $\gamma$ -oryzanol, and phytic acid. *Food Sci Nutr* 2, 75–104. doi:10.1002/fsn3.86
- Gunaratne, A., Wu, K., Li, D., Bentota, A., Corke, H., Cai, Y.-Z., 2013. Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. *Food Chemistry* 138, 1153–1161. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.129
- Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M.G., Böhm, V., Bitsch, R., 2002. Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6663–6668.
- Hiemori, M., Koh, E., Mitchell, A.E., 2009. Influence of cooking on anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L. japonica var. SBR). *J. Agric. Food Chem.* 57, 1908–1914. doi:10.1021/jf803153z
- Irakli, M.N., Samanidou, V.F., Biliaderis, C.G., Papadoyannis, I.N., 2012. Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. *Food Chemistry* 134, 1624–1632. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.046
- Jeng, T.L., Lai, C.C., Ho, P.T., Shih, Y.J., Sung, J.M., 2012. Agronomic, molecular and antioxidative characterization of red- and purple-pericarp rice (*Oryza sativa* L.) mutants in Taiwan. *Journal of Cereal Science* 56, 425–431. doi:10.1016/j.jcs.2012.05.015
- Juliano, B.O., 1993. Rice in Human Nutrition. *Int. Rice Res. Inst.*
- Kim, J.K., Lee, S.Y., Chu, S.M., Lim, S.H., Suh, S.-C., Lee, Y.-T., Cho, H.S., Ha, S.-H., 2010. Variation and correlation analysis of flavonoids and carotenoids in Korean pigmented rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12804–12809. doi:10.1021/jf103277g

- Kim, M.-K., Kim, H., Koh, K., Kim, H.-S., Lee, Y.S., Kim, Y.H., 2008. Identification and quantification of anthocyanin pigments in colored rice. *Nutrition Research and Practice* 2, 46–49. doi:10.4162/nrp.2008.2.1.46
- Lamberts, L., De Bie, E., Vandeputte, G.E., Veraverbeke, W.S., Derycke, V., De Man, W., Delcour, J.A., 2007. Effect of milling on colour and nutritional properties of rice. *Food Chemistry* 100, 1496–1503. doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.042
- Lamberts, L., Delcour, J.A., 2008. Carotenoids in raw and parboiled brown and milled rice. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11914–11919. doi:10.1021/jf802613c
- Maiani, G., Castón, M.J.P., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I.G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., Schlemmer, U., 2009. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res* 53 Suppl 2, S194–218. doi:10.1002/mnfr.200800053
- Mamatha, B.S., Sangeetha, R.K., Baskaran, V., 2011. Provitamin-A and xanthophyll carotenoids in vegetables and food grains of nutritional and medicinal importance. *International Journal of Food Science & Technology* 46, 315–323. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02481.x
- Masella, R., C.D. Modesti, C.L. Gennaro and B.E. Coni, 1999. Antioxidant activity of 3,4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: A comparative assessment with other olive oil biophenols. *Redox Rep.*, 4: 113-121.
- Mazza, G., Gao, L., 2005. Blue and purple grains, in: *Specialty Grains for Food and Feed* Edited by Elsayed Abdel-Aal and Peter Wood. American Association of Cereal Chemists, St. Paul. USA, pp. 45–67.
- McCallum, J., Walke, J., 1990. Proanthocyanidins in Wheat Bran. *Cereal Chemistry* 67, 282–285.
- Milanowska, J., Gruszecki, W.I., 2005. Heat-induced and light-induced isomerization of the xanthophyll pigment zeaxanthin. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 80, 178–186. doi:10.1016/j.jphotobiol.2005.05.004
- Moreno, Y.S., Sánchez, G.S., Hernández, D.R., Lobato, N.R., 2005. Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *J Chromatogr Sci* 43, 483–487.
- Naczki, M., Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Nutraceuticals Analysis* 41, 1523–1542. doi:10.1016/j.jpba.2006.04.002
- Oliver, J., Palou, A., 2000. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *J Chromatogr A* 881, 543–555.
- Ortega, R.M., Aparicio Vizuete, A., Jiménez Ortega, A.I., Rodríguez Rodríguez, E., 2015. [Wholegrain cereals and sanitary benefits]. *Nutr Hosp* 32 Suppl 1, 25–31. doi:10.3305/nh.2015.32.sup1.9475
- Panfili, G., Fratianni, A., Irano, M., 2004. Improved Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography Procedure for the Determination of Carotenoids in Cereals. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6373–6377. doi:10.1021/jf0402025
- Pasaporte, M.S., Rabaya, F.J.R., Toleco, M.M., Flores, D.M., 2014. Xanthophyll content of selected vegetables commonly consumed in the Philippines and the effect of boiling. *Food Chem* 158, 35–40. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.090

- Pereira-Caro, G., Cros, G., Yokota, T., Crozier, A., 2013a. Phytochemical profiles of black, red, brown, and white rice from the Camargue region of France. *J. Agric. Food Chem.* 61, 7976–7986. doi:10.1021/jf401937b
- Pereira-Caro, G., Watanabe, S., Crozier, A., Fujimura, T., Yokota, T., Ashihara, H., 2013b. Phytochemical profile of a Japanese black-purple rice. *Food Chem* 141, 2821–2827. doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.100
- Pérez-Jiménez, J., Torres, J.L., 2011. Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12713–12724. doi:10.1021/jf203372w
- Porter, L.J., 1993. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman and Hall, London, pp: 23-55.
- Rimmer, C.A., Sander, L.C., Wise, S.A., 2005. Selectivity of long chain stationary phases in reversed phase liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 382, 698–707. doi:10.1007/s00216-004-2858-9
- Rivera, S., Canela, R., 2012. Influence of Sample Processing on the Analysis of Carotenoids in Maize. *Molecules* 17, 11255–11268. doi:10.3390/molecules170911255
- Rodriguez-Amaya, D.B., Institute, I.L.S., (Project), O., 2001. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. ILSI Press.
- Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G., 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J Chromatogr A* 1012, 119–128.
- Saary, M.J., 2008. Radar plots: a useful way for presenting multivariate health care data. *J Clin Epidemiol* 61, 311–317. doi:10.1016/j.jclinepi.2007.04.021
- Sander, L.C., Sharpless, K.E., Craft, N.E., Wise, S.A., 1994. Development of Engineered Stationary Phases for the Separation of Carotenoid Isomers. *Anal. Chem.* 66, 1667–1674. doi:10.1021/ac00082a012
- Satoshi, K., T. Madoka and M. Teruyoshi, 2001. Effect of heat and pH on the radical-scavenging activity of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds and production of konjac enriched with proanthocyanidin. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 48(8): 591-597
- Schieber, A., Carle, R., 2005. Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. *Trends in Food Science & Technology, Pigments in Food 3rd International Congress on Pigments in Food* 16, 416–422. doi:10.1016/j.tifs.2005.03.018
- Shewry, P.R., 2007. Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science, The Contribution of Cereals to a Healthy Diet* 46, 239–250. doi:10.1016/j.jcs.2007.06.006
- Sompong, R., Siebenhandl-Ehn, S., Linsberger-Martin, G., Berghofer, E., 2011. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chemistry* 124, 132–140. doi:10.1016/j.foodchem.2010.05.115
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X., 2008. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry* 106, 804–810. doi:10.1016/j.foodchem.2007.06.062
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L., 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4069–4075. doi:10.1021/jf060300l

- Wu, X., Prior, R.L., 2005. Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2589–2599. doi:10.1021/jf048068b
- Yin, M.C., C.C. Lin, H.C. Wu, S.M. Tsao and C.K. Hsu, 2009. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix and prostate cancer cells: Potential mechanisms of action. *J. Agr. Food Chem.*, 57: 6468-6473.
- Yodmanee, S., Karrila, T.T., Pakdeechanuan, P., 2011. Physicochemical and nutritional properties of pigmented rice subjected to different degrees of milling. *International Food Research Journal* Vol. 18, 901.
- Yu, L.L., Tsao, R., Shahidi, F., 2012. *Cereals and Pulses: Nutraceutical Properties and Health Benefits.* John Wiley & Sons.
- Zaupa, M., Calani, L., Del Rio, D., Brighenti, F., Pellegrini, N., 2015. Characterization of total antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of differently pigmented rice varieties and their changes during domestic cooking. *Food Chem* 187, 338–347. doi:10.1016/j.foodchem.2015.04.055
- Zhang, M.W., Zhang, R.F., Zhang, F.X., Liu, R.H., 2010. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7580–7587. doi:10.1021/jf1007665

#### **4.12 SITOGRAFIA**

[www.fao.org](http://www.fao.org)

## **DIVULGAZIONE SCIENTIFICA E PUBBLICAZIONI INERENTI IL DOTTORATO**

### **Relazioni orali**

- Melini V., Fratianni A. and Acquistucci R., “Bioactive compounds in raw and cooked pigmented rice” - 20<sup>th</sup> Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology, 23-25 settembre 2015, Perugia (IT);
- Melini V., Fratianni A., Marconi E., Panfili G., Acquistucci R., “Pigmented rice: phytochemical profile and thermal processing” – 10<sup>th</sup> AISTEC Conference Grains for feeding the world Jointly organized with ICC on the occasion of the World Expo Milan 2015, 1-3 luglio 2015, Milano (IT). Book of abstract pag. 37;
- Melini V., Cecconi S., Acquistucci R., “*Risi pigmentati: componenti bioattive e colore*”, 9° Convegno AISTEC, 12-14 giugno 2013, Bergamo (IT), Book of abstract pag. 40.

### **Atti di convegno**

- Melini V., Acquistucci R., “Valutazione nutrizionale di risi pigmentati italiani attraverso la determinazione di componenti bioattivi”, XXXVI Congresso Nazionale 2015 della Società Italiana di Nutrizione Umana – SINU, 2-4 dicembre 2015, Firenze (Italia). Poster, atti di convegno pag 106 (ISBN 978-88-9743-26-9);
- Melini V., Fratianni A. and Acquistucci R., “Bioactive compounds in raw and cooked pigmented rice” – 20<sup>th</sup> Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology, 23-25 settembre 2015, Perugia (IT). Atti di convegno pagg. 331-335 (ISBN 978-88-99407-02-5);
- Melini V., Fratianni A., Marconi E., Panfili G., Acquistucci R., “Pigmented rice: phytochemical profile and thermal processing” – 10<sup>th</sup> AISTEC Conference Grains for feeding the world Jointly organized with ICC on the occasion of the World Expo Milan 2015, 1-3 luglio 2015, Milano (IT). Atti di convegno pagg 50-53 (ISBN 978-88-906680-4-3).
- Melini V., Fratianni A., Acquistucci R., Main Achievements in the Determination of Bioactive Components and Colour Measurement in Pigmented Rice – 19<sup>th</sup> Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology, Bari 24-26 settembre 2014, Poster, atti di convegno pagg. 175-176 (ISBN 978-88-88793-48-1)
- Melini V., Fratianni A., Acquistucci R., PhD dissertation project: “Bioactive components and colour in pigmented rice” – 18<sup>th</sup> Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology, 25-27 settembre 2013, Conegliano (TV), pagg 353-354, ISBN 978-88-97385-71-4;
- Melini V., Cecconi S., Acquistucci R. (2013) - *Risi pigmentati: componenti bioattive e colore*. In: Atti estesi del 9° Convegno AISTEC “Un mondo di cereali: potenzialità e sfide”, Bergamo, 12-14 giugno 2013, pp. 66-70, 2013. (ISBN 978-88-906680-1-2).

---

## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare la Dott.ssa Rita Acquistucci del Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (CREA-AN, Roma) per avermi dato l'opportunità di iniziare, portare avanti e concludere questo progetto di dottorato. Grazie per il costante supporto e l'esempio mostrato in ogni momento del percorso.

Ringrazio la Prof.ssa Alessandra Fratianni ed il Prof. Gianfranco Panfili dell'Università degli Studi del Molise per aver contribuito alla realizzazione di questo studio e per la continua disponibilità mostrata.