



UNIVERSITA' CATTOLICA DEL SACRO CUORE

MILANO

Dottorato di ricerca in Biotecnologie degli Alimenti

ciclo XIX

S.S.D: AGR/15; ING-IND/25

**EFFETTI DEGLI ANTIOSSIDANTI NATURALI SULLO SVILUPPO DI
FUNGHI TOSSIGENI NELLE MATERIE PRIME PER PREPARAZIONI
ALIMENTARI**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Marco De Faveri

Tesi di Dottorato di : VINCENZA PISACANE

Matricola: 3280010

Anno accademico 2005/2006

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
1.1 IL MAIS	8
1.1.1 Morfologia e composizione delle cariossidi di mais	10
1.1.2 Usi della granella di mais	12
1.1.3 Contaminazione da micotossine della granella di mais	14
1.2 GLI ANTIOSSIDANTI	16
1.2.1 I Carotenoidi	17
1.2.2 La Vitamina E	20
1.3 LE MICOTOSSINE	23
1.3.1 Le micotossine nei cereali	26
1.3.1.1 <i>Fusarium</i>	26
1.3.1.2 <i>Aspergillus</i>	27
1.3.1.3 <i>Penicillium</i>	28
1.4 EFFETTI DELLE MICOTOSSINE SUI SISTEMI ANTIOSSIDANTI	30
1.5 LA PROTEZIONE DAI RADICALI LIBERI: GLI ANTIOSSIDANTI COME RADICAL SCAVENGERS	31
2. SCOPO DELLA RICERCA	35
3. MATERIALI E METODI	39
3.1 MATERIALI	41
3.2 METODI DI ESTRAZIONE	44
3.2.1 Protocollo di estrazione di carotenoidi in farine e trasformati di mais	44
3.2.2 Ottimizzazione del protocollo di estrazione di tocoli in cereali e trasformati di cereali	46

3.2.3	Protocolli di estrazione di micotossine da farina di mais	48
3.2.3.1	Fumonisine e Aflatossina B1	48
3.2.3.2	Zearalenone (ZEA)	48
3.2.3.3	Deossinivalenolo (DON)	49
3.3	PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI STANDARD E RETTE DI CALIBRAZIONE	50
3.3.1	Carotenoidi e xantofille	50
3.3.2	Tocoli	52
3.4	ANALISI HPLC DEGLI ANTIOSSIDANTI	53
3.4.1	Condizioni operative	53
3.4.2	Analisi dei carotenoidi	54
3.4.3	Ottimizzazione del metodo NP-HPLC per l'analisi di tocoli	56
3.5	TEST IMMUNO-ENZIMATICO (ELISA) PER L'ANALISI QUANTITATIVA DELLE MICOTOSSINE (RIDASCREEN® TEST)	57
3.5.1	Condizioni operative	57
3.5.2	Analisi delle Fumonisine	57
3.5.3	Analisi dell'Aflatossina B1	58
3.5.4	Analisi dello Zearalenone (ZEA)	59
3.5.5	Analisi del Deossinivalenolo (DON)	59
3.6	ANALISI STATISTICA	61
3.7	TEST IN VITRO	62
3.8	PROTOCOLLO PER LA VALUTAZIONE DELLA % DI SOSTANZA SECCA	65
3.9	VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' ANTIOSSIDANTE TOTALE (TAC)	66
4.	RISULTATI	68
4.1	ANALISI DEGLI ANTIOSSIDANTI NELLA FARINA INTEGRALE DI MAIS	70

4.1.1	Carotenoidi	70
4.1.2	Tocoli	73
4.2	ANALISI DELLE MICOTOSSINE	76
4.3	ANALISI STATISTICA	77
4.4	INIBIZIONE DELLA CRESCITA DEL FUNGO	80
4.5	ANALISI DEI CAROTENOIDI NELLE FRAZIONI DELLA LAVORAZIONE DELLA GRANELLA DI MAIS	84
4.6	RESA ALLA MACINAZIONE	87
4.7	ANALISI DEI TOCOLI NELLE FRAZIONI DELLA LAVORAZIONE DELLA GRANELLA DI MAIS DEL GENOTIPO n° 1	89
4.8	ANALISI DEGLI ANTIOSSIDANTI NELLA PASTA	90
4.9	CAPACITA' ANTIOSSIDANTE TOTALE (TAC)	92
4.10	ANALISI DEGLI ANTIOSSIDANTI NELLA PASTA DOPO COTTURA	93
5.	CONCLUSIONI	95
6.	ELENCO DELLE TABELLE E DELLE FIGURE	98
6.1	ELENCO DELLE TABELLE	99
6.2	ELENCO DELLE FIGURE	102
7.	BIBLIOGRAFIA	104
	<i>Ringraziamenti</i>	114

RIASSUNTO

Il verificarsi della presenza di micotossine nella granella di mais è di interesse mondiale perché la loro presenza negli alimenti è spesso associata a malattie acute e croniche nel bestiame e nell'uomo.

Le micotossine sono metaboliti fungini secondari tossici per i vertebrati.

Molti composti naturali e sintetici con proprietà antiossidanti sembrano avere una potenziale efficacia nella protezione contro gli effetti tossici delle micotossine.

Questo lavoro ha avuto come obiettivo lo studio degli effetti degli antiossidanti naturali di mais (carotenoidi e tocoli) sulla crescita di funghi (*Fusarium verticillioides*) e sull'accumulo di micotossine in preparati alimentari a base di mais e su alcuni sottoprodotti della lavorazione del mais.

SUMMARY

The occurrence of mycotoxins in cereal grains is of great concern worldwide, because their presence in feeds and foods is often associated with chronic or acute mycotoxicoses in livestock and also in human.

Mycotoxins are fungal secondary metabolites that are toxic to vertebrates.

Several natural and synthetic compounds with antioxidant properties seem to be potentially efficient in protecting against the toxic effects of micotoxins.

This work was aimed to study the effects of natural maize antioxidant (carotenoids and tocols) on fungi (*Fusarium verticillioides*) growth and on micotoxins accumulation in maize-based food products and in maize by-products.

1.

INTRODUZIONE

1.1 IL MAIS

Dopo il frumento e il riso, il mais è tra i cereali maggiormente coltivati nel mondo.

E' una materia prima di fondamentale importanza per l'alimentazione umana e viene utilizzato per la preparazione di numerosi alimenti tradizionali.

Nel nostro paese il mais è coltivato su circa 1,1 milioni di ettari, pari oltre al 25% della superficie a cereali e la produzione rappresenta circa il 50% di quella di tutti i cereali. Le superfici sono costantemente aumentate e la crescita delle rese ha condotto la produzione totale di granella a valori superiori a 10 milioni di tonnellate/anno. La contrazione delle rese nel 2003 a causa della siccità ha portato ad un calo significativo delle disponibilità (tabella 1).

I consumi, d'altra parte, si attestano a 10 milioni di tonnellate. La maggior disponibilità di prodotto nazionale incoraggia il volume delle esportazioni che per l'attuale campagna di commercializzazione viene stimato a 1 milione di tonnellate (Fonte EUROSTAT, 2003).

La granella di mais, al di là di essere apprezzata essenzialmente per il suo valore energetico a fini zootecnici (80%), è anche una pianta preziosa, perché assicura la materia prima da impiegarsi per una molteplicità di prodotti alimentari e industriali; ciò è evidenziato dalle riguardevoli quantità di granella di mais che tutti gli anni vengono lavorate dalle industrie di trasformazione.

Anno	Nord ovest	Nord est	Centro	Sud e isole	Italia
2001	4,578	5,084	718	292	10,673
2002	4,345	5,261	758	313	10,677
2003	3,899	4,865	737	305	9,806
2003 (%)	39,8%	49,6%	7,5%	3,1%	100%

Tabella 1: Produzione totale di granella di mais in Italia (milioni di tonnellate), negli anni 2001-2003 (Fonte: Elaborazioni su dati congiunturali ISTAT)

1.1.1 Morfologia e composizione delle cariossidi di mais

La cariosside del mais è essenzialmente composta da endosperma (80%) e da embrione (10%), racchiusi da un rivestimento duro e fibroso, il pericarpo, costituito principalmente da cellulosa ed emicellulosa. La composizione chimica delle principali parti che compongono il seme di mais varia notevolmente ed è influenzata da tipo di allevamento, condizioni climatiche, irrigazione, etc.

L'endosperma del seme maturo è formato prevalentemente da amido (70-75%) ed in misura minore da proteine (8-10%) (tabella 2).

Composizione chimica	Pericarpo	Endosperma	Embrione
Proteine	3,7	8,0	18,4
Estratto etereo	1,0	0,8	33,2
Fibra grezza	86,7	2,7	8,8
Ceneri	0,8	0,3	10,5
Amido	7,3	70,0	8,3
Zucchero	0,3	0,6	10,8

Tabella 2: composizione chimica medie delle principali parti che costituiscono la cariosside di mais

L'amido è formato da due tipi di strutture molecolari: l'amilosio, molecola lineare composta da 200 a 2000 unità di D-glucosio legate con legami α 1-4, e

l'amilopectina, molecola ramificata che contiene fino a 200.000 unità di D-glucosio legate sia con legami α 1-4 sia con legami α 1-6 nei punti di ramificazione (White, 2001).

Le proteine della cariosside del mais sono distribuite per il 16% nell'embrione, per l'80% nell'endosperma e per il 4% nei tegumenti (cf. Wilson, 1987).

La maggior parte dei lipidi presenti nella cariosside di mais è concentrata nello scutello embrionale (85%) dove essi sono depositati in corpi oleosi (Earle et al, 1946; Weber, 1987a).

Il mais, nella specie *Zea Mays*, è dotata di notevole polimorfismo sia di tipo vegetativo e fisiologico, che per la forma e la caratteristica delle cariossidi che porta a dividere, il mais coltivato, in 7 gruppi descritti nella tabella 3 (Giardini, 1989).

<i>Zea mays indentata</i>	Mais dentato (dent corn)
<i>Zea mays indurata</i>	Mais vitreo (flint corn)
<i>Zea mays amilacea</i>	Mais tenero (soft corn)
<i>Zea mays saccharata</i>	Mais dolce (sweet corn)
<i>Zea mays everta</i>	Mais da scoppio (pop-corn)
<i>Zea mays ceratina</i>	Mais ceroso (waxy corn)
<i>Zea mays tunicata</i>	Mais vestito (pod corn)

Tabella 3: sottospecie di *Zea mays*

1.1.2 Usi della granella di mais

L'americana Corn Industries Researches Foundation ha schedato ben 500 prodotti di consumo quotidiano fabbricati con mais e suoi derivati. Tra questi si annoverano: olio, semolati per polenta, farine (per pane, biscotti e pasta), corn-flakes, whisky, destrine, ed etanolo.

L'interesse rivolto a questa coltura da parte del settore industriale è riassumibile in tre punti:

- 1) è il cereale che produce maggiori quantità di sostanza secca e di granella per unità di superficie;
- 2) è una preziosa e duttile fonte di materie prime per molte industrie;
- 3) la genetica, che da oltre 80 anni studia questa specie, è in grado, anche con gli apporti delle tecniche genetiche avanzate, di mettere a punto dei "tipi" adatti a numerosissime esigenze industriali di alto valore aggiunto, sia per la qualità dei prodotti sia per la maggior resa nei processi di trasformazione, recuperando la redditività della coltura. Un esempio è lo studio di genotipi con diversi contenuti, in percentuale, di amilosio (tabella 4).

Provenienza	% amilosio	% amilopectina
Mais	25	75
Mais waxy	< 1	> 99
Mais ae	55-70	45-30

Tabella 4: contenuto % della frazioni amilosio e amilopectina in diversi tipi di mais (mais, mais waxy, mais amylose extender)

La granella è generalmente utilizzata come mangime per gli animali e per la produzione di farina, amido, olii da cucina, alcool industriali, bevande alcoliche, snacks, tortillas, alimenti per la prima colazione e altri prodotti. L'uso del mais in prodotti "pronti da mangiare" come corn-flakes, snack e altre miscele, ha fatto aumentare l'attenzione dei consumatori verso cibi che associano ai fattori nutrizionali il miglioramento dello stato di salute.

1.1.3 Contaminazione da micotossine della granella di mais

La granella di mais, durante la stagione di coltivazione e durante il periodo di stoccaggio, può essere contaminata da funghi e da parassiti che possono indurre metaboliti tossigeni quali aflatossine, fumonisine, zearalenone, e altro ancora; pertanto molta attenzione deve essere posta per limitare il livello di contaminazione provocato da questi.

L'Unione Europea ha fino ad oggi fissato limiti massimi per le aflatossine negli alimenti ad uso umano e zootecnico (Regolamenti UE n. 466/01, 2174/03 e 683/04); per quanto riguarda deossinivalenolo, zearalenone e fumonisine, il Regolamento n. 856/05 fissa i limiti negli alimenti per l'uomo.

I limiti fissati per il mais e i prodotti derivanti, destinati al consumo umano e zootecnico, sono riportati in tabella 5.

PRODOTTI	TOSSINA	CONTENUTI MASSIMI AMMISSIBILI ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Cereali (compreso il grano saraceno) e prodotti derivati	Aflatossine	B1 2,0; B1+B2+G1+G2 4,0
Frumento duro, avena e mais	Deossinivalenolo (DON)	1750
Farine di cereali (compreso mais), mais spezzato (grits), semola di mais		750
Biscotti, snacks e cereali da colazione		500
Prodotti a base di cereali per neonati e bambini		200
Mais	Zearalenone (ZEA)	200
Farine di mais, mais spezzato (grits) e olio di mais raffinato		200
Biscotti, snaks e cereali da colazione		50
Prodotti a base di cereali per neonati e bambini		20
Mais	Fumonisine B1+B2	2000
Farine di mais, mais spezzato (grits)		1000
Prodotti a base di mais per il consumo diretto		400
Prodotti a base di mais per neonati e bambini		200

Tabella 5: Livelli massimi di aflatossine (previsti da regolamenti UE n. 466/01, 2174/03 e 683/04), deossinivalenolo, zearalenone e fumonisine (previsti dal regolamento UE n 856/05) in mais e prodotti derivati o a base di mais

1.2 GLI ANTIOSSIDANTI

Gli antiossidanti sono una classe di composti eterogenei: ne fanno parte vitamine, minerali, aminoacidi essenziali.

Tali composti hanno una capacità fondamentale, riescono a diminuire la velocità di ossidazione dei metaboliti nell'organismo. Gli antiossidanti proteggono queste sostanze evitando meccanismi di ossidazione dei costituenti lipidici e fanno in modo che gli acidi grassi saturi non si scompongano e si combinino con altre molecole diventando nocive per l'organismo (Langeseth, 1995).

L'ossidazione del grasso dà origine a radicali liberi, molecole che hanno perduto, nella loro orbita più esterna, un elettrone. Poiché essi tendono spontaneamente a raggiungere una condizione di equilibrio reagiscono con altri atomi o molecole trasferendo questa condizione di instabilità ad altre specie molecolari. Questa reazione a catena è considerata responsabile dei processi di invecchiamento e di conseguenza problemi all'organismo (Palace et al, 1999).

Il mais, è una ottima fonte di antiossidanti naturali quali carotenoidi e tocoli che, come dimostrato da numerosi studi, possono prevenire numerose malattie quali cataratta, diabete, tumore e patologie del tratto intestinale, cronico-degenerative, renali e cardiovascolari (Basu et al, 2001).

1.2.1 I carotenoidi

I carotenoidi sono pigmenti, di colore dal giallo al violetto, molto diffusi in natura (ne sono stati caratterizzati più di 600), privi di azoto nella molecola e solubili nei grassi (Moss et al, 1976).

L'intensità del loro colore è dovuta al sistema cromoforico, costituito da un elevato numero di doppi legami coniugati, responsabili anche della grande instabilità dei carotenoidi, che si ossidano facilmente all'aria e sono notevolmente modificati dalla presenza di acidi minerali. Per esposizione alla luce e ad altri agenti, i carotenoidi naturali, in cui i doppi legami non ciclici sono sempre nella configurazione *trans*, possono trasformarsi in una miscela di stereoisomeri (isomerizzazione *trans-cis*), nei quali uno o più doppi legami si sono spostati in posizione *cis* (Moss et al, 1976).

Lo scheletro della molecola dei carotenoidi consiste, generalmente, di una porzione centrale, con 22 atomi di carbonio, e due terminali di 9 atomi di carbonio ciascuna. Le unità terminali possono essere acicliche, come nel licopene, oppure tutte e due cicliche, come nell' α e β -carotene, o una ciclica e l'altra ciclica, come nel γ -carotene (Goodwin, 1980).

Alla famiglia dei carotenoidi appartengono: i caroteni (α -carotene, β -carotene, licopene) che sono costituiti solo da carbonio ed idrogeno, e le xantofille o ossicarotenoidi che presentano ossigeno all'interno di un gruppo funzionale idrossilico (luteina, zeaxantina, criptoxantina), chetonico (cantaxantina), epossidico (violaxantina), metossilico o carbossilico (Bender, 1992; Groff et al, 1995).

I carotenoidi sono stati isolati dalle piante, dalle alghe, dai batteri e dal mondo animale. Sono responsabili, per esempio, della colorazione rossa dei pomodori (licopene), di quella arancio delle carote (β -carotene), del giallo del seme di mais (zeaxantina), etc. (Goodwin, 1976).

I carotenoidi, nelle piante, sono localizzati nell'apparato fotosintetico e quindi coinvolti nel sistema di trasporto della radiazione luminosa ma sono anche essenziali nella protezione delle stesse dalla produzione di radicali liberi che si verifica durante il processo fotosintetico (fotossidazione) (Goodwin, 1977).

Le specie animali, compreso l'uomo, non sono in grado di sintetizzare questi composti e se ne riforniscono dal mondo vegetale, assumendoli con la dieta, e poi li modificano. Alcuni di questi pigmenti sono quindi importanti come provitamine A e quindi di essere utilizzato come fonte di vitamina A da parte dell'organismo umano (Sandmann, 2001).

I carotenoidi maggiormente contenuti nella granella di mais sono zeaxantina, luteina, β -carotene e β -criptoxantina (Weber, 1987b; Sies et al, 1995) (figura 1).

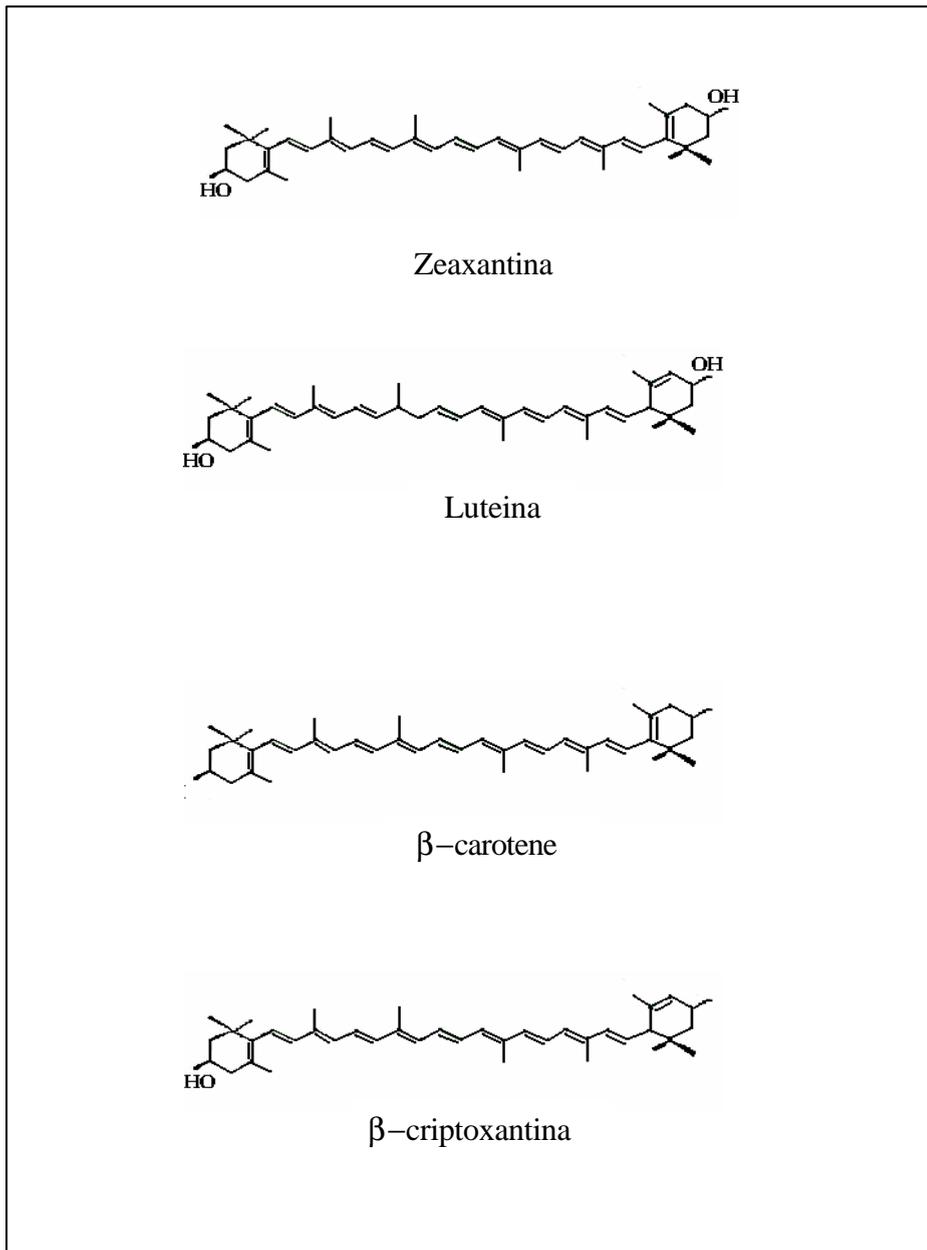


Figura 1: formula di struttura dei principali carotenoidi contenuti nella granella di mais

1.2.2 La vitamina E

Il termine vitamina E indica generalmente i tocoli, che consistono di due classi di molecole: i tocoferoli e i tocotrienoli.

Sia i tocoferoli che i tocotrienoli sono rappresentati da quattro omologhi, α , β , γ e δ (Rupérez et al, 2001) di cui si rappresenta la formula di struttura nella figura 2.

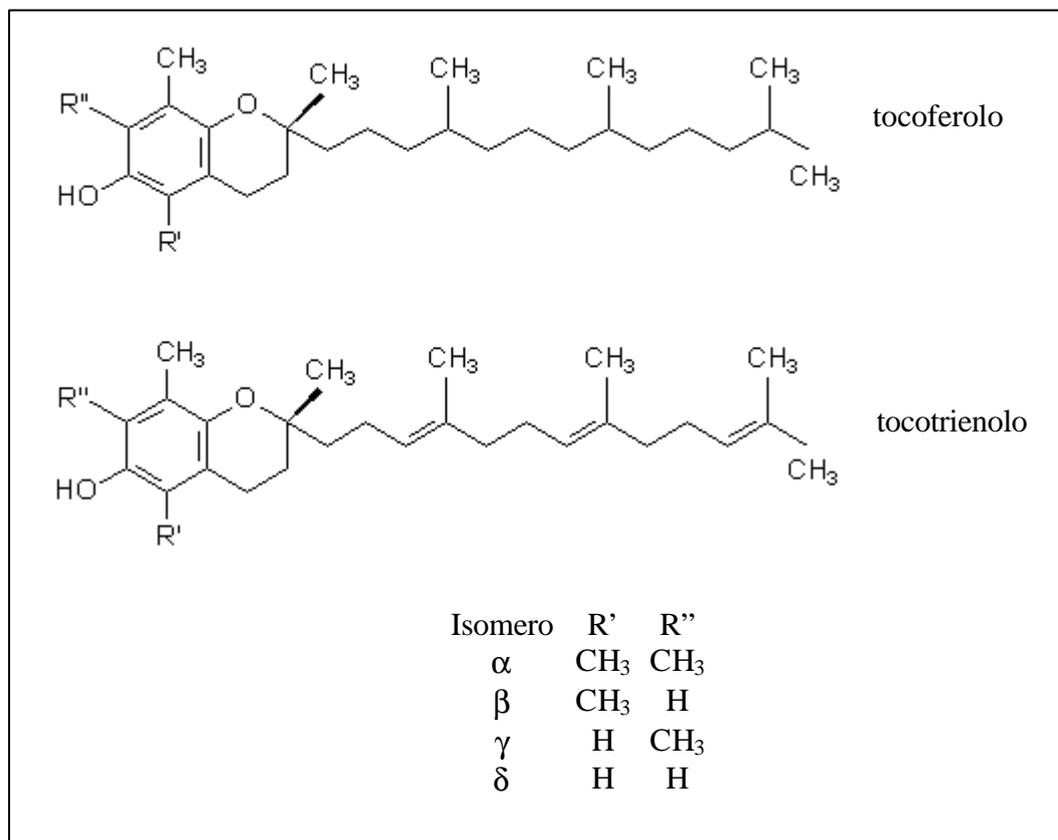


Figura 2: struttura chimica dei quattro isomeri di tocoferoli e tocotrienoli

Non tutte le forme hanno la stessa attività biologica. Infatti nel plasma umano sembra sia presente e attivo il solo α -tocoferolo; ciò dipende dal fatto che la proteina che trasporta la vitamina E (α -TTP) riconosce selettivamente l'alfa-tocoferolo (Suarna et al, 1993; Serbinova et al, 1991).

La vitamina E è un potente antiossidante, fondamentale nella lotta ai radicali liberi (Christen et al, 1997). Grazie a questa sua fondamentale caratteristica svolge diverse funzioni (Combs, 1992; Azzi et al, 1995; Dowd et al, 1995; Meydani, 1995):

- Protegge la vitamina A dalla scomposizione, la vitamina C e quelle del gruppo B dall'ossidazione e migliora la trasportabilità dell'ossigeno da parte dei globuli rossi.
- È coinvolta anche nei processi energetici, aumentando la resistenza del soggetto. Dal punto di vista cardiovascolare, è un leggero vasodilatatore, svolge attività antitrombotica e rinforza le pareti dei capillari.
- Protegge dall'ossidazione diversi ormoni e consente un corretto utilizzo da parte dell'organismo dell'acido linoleico; consente una riduzione del fabbisogno di vitamina A.
- Stimolando la diuresi, migliora la situazione di soggetti cardiopatici e/o ipertesi.
- Migliora la messa a fuoco della vista nelle persone di mezza età.

Da questo breve quadro si comprende come possa essere notevolmente attiva nella difesa della salute e soprattutto nella prevenzione dell'invecchiamento.

Come le altre vitamine liposolubili, viene assorbita in presenza di sali biliari e grassi. Assimilata nell'intestino è trasportata al fegato, dove viene immagazzinata; è

anche depositata in altri organi (tessuti grassi, nel cuore, nei muscoli, nei testicoli, nell'utero, nel sangue e nelle ghiandole surrenali e pituitaria) (Burton et al, 1990).

La vitamina E viene distrutta dal calore della cottura, dai raggi ultravioletti e dall'ambiente alcalino (come il bicarbonato di sodio). Gli alimenti che contengono grandi quantità di vitamina C possono favorire l'assorbimento della vitamina E (Eberlein-Konig, 1998).

I tocoli maggiormente contenuti nella granella di mais sono α -, δ - e γ -tocoferolo (Weber, 1987b; Grams et al, 1970)

1.3 LE MICOTOSSINE

Le micotossine sono delle sostanze chimiche ad azione tossica nei confronti dell'uomo e degli animali (micotossicosi acute e croniche). Queste vengono prodotte, in particolari condizioni ambientali, da numerose specie di funghi filamentosi microscopici. Le muffe tossigene più diffuse in Europa appartengono al genere *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Attualmente, le micotossine rappresentano uno degli aspetti più rilevanti e preoccupanti della contaminazione di alimenti e mangimi, 25% delle derrate alimentari (FAO/WHO, 1995). La loro elevata tossicità e diffusione, il numero crescente delle derrate alimentari passibili di contaminazione e l'impatto delle micotossine sulla salute dell'uomo e degli animali e sull'economia rappresentano alcuni dei parametri causali di questo rischio emergente (Wood, 1992)

Finora sono state identificate più di 300 micotossine (Betina, 1984), ma solo per alcune sono stati riconosciuti effetti tossici.

Le micotossine maggiormente significative per la contaminazione di alimenti e mangimi (Devegowda et al, 1998) troviamo: le aflatossine (AFLs), l'ocratossina A (OTA), le fumonisine (FBs), i tricoteceni, lo zearalenone (ZEA).

La sintesi delle micotossine è strettamente connessa alla crescita fungina (senza crescita del fungo tossigeno, la produzione di tossine non avviene). Le condizioni che influenzano la biosintesi delle micotossine sono peculiari per le singole specie e includono condizioni geografiche ed ambientali, pratiche di coltivazione, stoccaggio e tipo di substrato (Council for Agricultural Science and Tecnology, 2003).

Nella tabella 6 sono riportati i valori relativi ad alcuni fattori ambientali condizionanti lo sviluppo fungino. Una volta prodotte, le micotossine residuano nelle derrate alimentari anche laddove la muffa abbia cessato il suo ciclo vitale o sia stata rimossa dalle operazioni tecnologiche di lavorazione dell'alimento o del mangime. Inoltre, le principali micotossine sono resistenti alle normali operazioni di cottura degli alimenti.

Fattori ambientali	minimo	ottimo	massimo
Temperatura (°C)	- 3,0	20-35	60
Attività dell'acqua (a_w)	0,65	0,80-0,95	0,99
Ossigeno (%)	0,14	> 2,0	-
pH	2,0	4,5-6,5	8,0
Anidride carbonica (%)	-	< 10,0	> 15,0

Tabella 6: Fattori ambientali che influenzano la crescita fungina (Fonte Oldenburg, 1991)

Le matrici alimentari suscettibili all'attacco fungino includono sia materie prime quali cereali, semi oleaginosi, semi di caffè e cacao, spezie, frutta secca ed essiccata (contaminazione diretta), sia prodotti derivati e trasformati quali pasta, vino, birra, uvetta, cacao e cioccolata, caffè tostato e succhi di frutta (contaminazione indiretta).

Talvolta, si possono verificare alterazioni a carico del contenuto in micotossine di un alimento, soprattutto quando l'alimento viene sottoposto a processi di trasformazione. Ad esempio, la molitura dei cereali implica una concentrazione di micotossina nelle parti cruscali e una diminuzione nelle frazioni più raffinate, dipendente dal tipo di micotossina e di cereali. Anche il processo di caseificazione

comporta la concentrazione della aflatossina AFM 1 nei formaggi di un fattore peculiare per ogni tipo di formaggio.

Le derrate alimentari vengono, quindi, contaminate in modo preferenziale da parte di alcune specie fungine (tabella 7).

MICOTOSSINA	DERRATE ALIMENTARI
Aflatossine B1, B2, G1 e G2	Cereali, semi oleaginosi, spezie, frutta fresca e secca, mais, arachidi, cotone, mandorle, pistacchi, nocciole e noci
Aflatossina M 1	Latte e derivati
Ocratossina A	Cereali, spezie, cacao, caffè, carni suine ed avicole, vino, birra
Zearalenone	Mais
Deossinivalenolo, T-2, HT-2	Grano
Fumonisine	Mais

Tabella 7: esempi di derrate alimentari contaminate in modo preferenziale da parte di alcune specie fungine

1.3.1 Micotossine nei cereali

Anche per i cereali le micotossine che si riscontrano più frequentemente sono prodotte da funghi (Moretti et al, 2002) appartenenti ai generi:

- *Fusarium*
- *Aspergillus*
- *Penicillium*

Alcuni di questi organismi produttori di micotossine possono colpire i vari tipi di cereali in pieno campo, altri possono creare problemi alle materie prime mal conservate (Munkvold, 2003). Si può, inoltre, avere contemporaneamente la presenza di più tossine derivate da funghi diversi nella stessa derrata (Moretti et al, 2002). La presenza visibile di ammuffimenti è sempre indice di deterioramento della qualità e di probabile presenza di micotossine, mentre l'assenza visibile di ammuffimenti non garantisce la mancanza.

Nella tabella 8 vengono riportati i funghi produttori, micotossine prodotte e gli effetti clinici che le tossine causano nell'uomo e negli animali.

1.3.1.1 *Fusarium*

Abbiamo diversi funghi appartenenti al genere *Fusarium* che producono differenti tossine nel mais, questi sono:

- *Fusarium culmorum e graminearum* che producono Tricoteceni (DON) e Zearalenone (ZEA);

- *Fusarium verticillioides e proliferatum* che producono fumonisine;

I funghi appartenenti al genere *Fusarium* sono capaci di nutrirsi dei vegetali morti (vita saprofita) e si conservano nei residui delle piante rimaste nel campo dopo la raccolta.

In presenza di *Fusarium graminearum* i marciumi sono caratterizzati dalla comparsa sulle cariossidi di muffa rossastra (Moretti et al, 2002). La muffa può invadere totalmente le brattee e insinuarsi tra queste e la spiga. Questi patogeni possono attaccare anche lo stocco compromettendo la stabilità della pianta. Il fungo entra soprattutto attraverso le barbe della spiga, le setole (Reid et al, 1992).

In presenza di *Fusarium verticillioides e proliferatum* si manifesta, sulle cariossidi, una muffa quasi bianca con tenue sfumature rosa che con il passare del tempo diventano rossastre. In caso di infezione tardiva sulla corona delle cariossidi si manifestano tipiche striature biancastre (CAST, 2003).

1.3.1.2 Aspergillus

Abbiamo diversi funghi appartenenti al genere *Aspergillus* che producono differenti tossine nel mais, questi sono:

- *A. flavus* che produce Aflatossina B1 (nel latte trasformata in M1) e B2;
- *A. parasiticus* che produce Aflatossine (B1, B2, G1, G2);
- *A. ochraceus* e *A. niger* che producono Ocratossine.

Gli aspergilli sono muffe tipiche di località e stagioni con elevate temperature ed umidità relativa. Si sviluppano anche in magazzino in condizioni di umidità superiori al

15% causando deterioramento ed aumento del contenuto di micotossine, per garantire la conservazione del mais lo si deve essiccare portandone l'umidità a valori prossimi del 13% (CAST, 2003).

L'attacco fungino è favorito da danni causati alle spighe da larve di insetti, uccelli, grandine ecc., che provocano lesioni sulle cariossidi (Wildstrom, 1996).

1.3.1.3 *Penicillium*

I funghi di tipo *Penicillium*, detto "Blue eye" (occhio blu), producono Ocratossine. Il marciume da *Penicillium* è favorito dal danneggiamento delle spighe dovuto a lesioni meccaniche o insetti. La sintomatologia tipica è una muffa verde-bluastro sulla parte apicale o sul tutolo della spiga. Il tipico "occhio blu" è dovuto alle spore che si sviluppano sulle cariossidi e sull'embrione invasi dal fungo, che si scoloriscono. Gli aumenti di calore e un tasso di umidità superiore al 15% della granella immagazzinata favoriscono lo sviluppo di questo fungo (CAST, 2003).

<i>Fungo produttore</i>	<i>Cond. di sviluppo:</i> <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Temp. dell'aria</i> ▪ <i>% Um. Rel. Aria</i> ▪ <i>% Um. Granella</i> 	<i>Micotossina prodotta</i>	<i>Effetti clinici</i>
<i>Aspergillus flavus;</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Temp. 10-42°C opt. 32°C Um. Rel. Aria 82% Um. granella 16-30%	Aflatossine B1, B2, G1, G2	Nell'uomo: cancerogene; genotossiche Negli animali: tossiche per il fegato; riduzione crescita e produzioni.
<i>Aspergillus ochraceus;</i> <i>Penicillium s.p.</i>	Temp. 5-35°C opt. 28°C Um. Rel. Aria >80% Um. granella 16-20%	Ocratossina A	Nell'uomo: tossica per rene e sistema immunitario. Negli animali: disturbi digestivi, diarrea e emorragie; in polli e maiali causa nefropatia cronica primaria.
<i>Fusarium graminearum;</i> <i>culmorum</i>	Temp. 4-35°C opt. 25°C Um. Rel. Aria 94% Um. granella 20-21%	Deossinivalenolo (DON), Zearalenone (ZEA)	Nell'uomo: vomito. Negli animali: DON rifiuto del cibo, vomito e emorragie; ZEA turbe riproduttive.
<i>Fusarium verticillioides;</i> <i>proliferatum</i>	Temp. 4-36°C opt. 25°C Um. Rel. Aria 91% Um. granella 18-20%	Fumonisine	Nell'uomo: sospetto cancro all'esofago. Negli animali: meningite tossica (cavalli); pleuropolmoniti (maiali); epatite e immunodepressione (bovini).

Tabella 8: tabella riassuntiva sui funghi produttori, micotossine prodotte ed effetti clinici che le micotossine causano nell'uomo e negli animali

1.4 EFFETTI DELLE MICOTOSSINE SUI SISTEMI ANTIOSSIDANTI

Il delicato equilibrio tra antiossidanti e pre-ossidanti, nell'organismo in generale (e specialmente nelle cellule), è essenziale per la regolazione di vari percorsi metabolici indirizzati al mantenimento, crescita, sviluppo, e protezione dalle condizioni di stress (Groff et al, 1995). L'integrazione nella dieta di antiossidanti, quali vitamina E e carotenoidi, aiuta a mantenerne il corretto equilibrio nel metabolismo cellulare (Galvano et al, 2001). Le micotossine danneggiano e diminuiscono la presenza di tali antiossidanti (Surai et al, 2002).

In generale la sindrome da malassorbimento è un esito molto frequente di tutte le più comuni micotossicosi, le quali, oltre a stimolare la perossidazione lipidica (Yin et al, 1998), possono avere anche un effetto diretto sull'ossidazione cellulare (Abel et al, 1998; Gautier et al, 2001).

Non è ben chiaro se le micotossine stimolino la perossidazione lipidica direttamente aumentando la produzione di radicali liberi o se l'accresciuta suscettibilità dei tessuti alla perossidazione lipidica sia un risultato della compromissione del sistema antiossidante (Surai et al, 2005).

1.5 LA PROTEZIONE DAI RADICALI LIBERI: GLI ANTIOSSIDANTI COME RADICAL SCAVENGERS.

Un radicale libero può essere definito come un frammento di una molecola con uno o più elettroni spaiati, oppure con un numero dispari di elettroni, che può avere una vita indipendente (Pryor, 1976).

I radicali liberi vengono solitamente descritti come specie molto instabili e reattive, questo però non è vero per tutti in generale. La loro reattività dipende sicuramente dalla loro stabilità, ma anche dalla loro concentrazione nell'ambiente, dalla presenza di altre sostanze e dalla temperatura. Per rompere un legame chimico ed avere un radicale libero è necessario fornire alla molecola una certa quantità di energia: energia di dissociazione, che è diversa per legami differenti, e, per uno stesso legame, può variare a seconda della molecola considerata (Pryor, 1976).

L'anione superossido (una molecola di ossigeno cui è stato tolto un elettrone) è il radicale che si forma più comunemente nel metabolismo (Faber et al, 1990). Esso è indispensabile per lo svolgimento del complesso delle reazioni che portano alla produzione di ATP (la molecola che serve ad immagazzinare energia nelle cellule), aiuta a combattere i batteri e facilita la sintesi di estrogeni, testosterone e corticosteroidi. Sfortunatamente però, alcuni radicali sfuggono al controllo, e cercano di riequilibrare la loro struttura elettronica catturando elettroni altrui (Faber et al, 1990), a danno soprattutto di acidi grassi, proteine o DNA, che si trasformano a loro volta in radicali liberi, scatenando reazioni radicaliche incontrollate ed in successione (Muggli, 1993).

Il nostro organismo è costituito da circa 60000 miliardi di cellule che producono costantemente radicali liberi, e un buon 6% di essi sfugge ai meccanismi biologici di controllo, provocando un danno ossidativo. Sono molto numerosi i processi, fisiologici e patologici, negli organismi viventi, sia vegetali che animali, in cui si ha la formazione di specie reattive radicaliche (Halliuel et al, 1989).

L'aumento della produzione di specie radicaliche, o una diminuzione delle difese antiradicaliche, o entrambe le cose assieme, determinano l'attacco, da parte dei radicali formati, di molti costituenti cellulari ed il loro danneggiamento irreversibile. L'ossigeno, in particolare, essenziale per la maggior parte dei processi cellulari, può essere altamente tossico (Langeseth, 1995).

I radicali liberi dell'ossigeno sono potenzialmente in grado di danneggiare tutti i componenti cellulari, quali acidi nucleici, proteine, carboidrati e lipidi, compromettendone l'effettivo funzionamento.

In particolare, l'ossidazione incontrollata dei lipidi, costituenti le membrane (lipoperossidazione), è la più importante espressione della tossicità dell'ossigeno, causa di alterazioni funzionali e strutturali che si riscontrano anche durante intossicazioni da sostanze estranee all'organismo e in alcune fasi della cancerogenesi (Muggli, 1993).

La protezione naturale nei confronti dei radicali liberi si deve essenzialmente all'intervento di enzimi protettivi, quali per esempio: la tioredossina riduttasi, la riduttasi, la glutatione perossidasi, la superossido dismutasi, la catalasi, la lattoperossidasi, presenti sia a livello intracellulare che extracellulare (Halliuel et al, 1989).

Le reazioni radicaliche possono essere inibite anche da alcune sostanze che reagiscono con i radicali, bloccando la serie di reazioni a catena da essi innescata, o rallentandola attraverso la formazione di radicali più stabili. Un inibitore che abbassa la concentrazione di radicali liberi presenti è detto radical scavenger (Atroschi et al, 2002).

Gli antiossidanti sono degli inibitori, che, a basse concentrazioni, impediscono il deterioramento ossidativo di una vasta gamma di substrati (Pompella, 1997).

Alcuni carotenoidi sono potenti antiossidanti, e svolgono un importante ruolo di difesa del nostro organismo dai radicali liberi (Krinsky, 1989 e 1998). In particolare β -carotene, licopene e luteina proteggono la pelle dagli effetti dannosi della luce ultravioletta, inibiscono lo sviluppo di cellule cancerose e prevengono i disturbi circolatori e visivi, con efficacia provata sperimentalmente anche nell'uomo (Langeseth, 1995).

E' stato inoltre dimostrato che i carotenoidi in associazione con vitamine C ed E rappresentano un meccanismo più efficiente per contrastare il deterioramento fisico indotto dai radicali liberi, cioè il risultato che deriva dalla sinergia di questi composti è superiore rispetto a quello ottenuto con gli stessi da soli (Eberlein-Konig, 1998).

La vitamina E è il più potente antiossidante secondario dei sistemi biologici (Christen et al, 1997), ed esplica la sua azione prevalentemente a livello delle membrane plasmatiche e delle lipoproteine plasmatiche, è detto secondario poiché non previene le ossidazioni, ma le rallenta. Il radicale della vitamina E, infatti, possiede la specifica caratteristica degli scavengers, cioè di quelle molecole che interagendo con un radicale libero gli donano un elettrone, trasformandosi in specie radicaliche poco reattive (Esterbauer et al, 1991).

Anche i radicali poco reattivi devono però essere stabilizzati; il riciclaggio della vitamina E sembra avvenire principalmente ad opera della vitamina C (acido ascorbico). L'interazione del radicale vitamina E con l'acido ascorbico, riporta la vitamina E al suo stato molecolare iniziale, ma forma un radicale ascorbato. Due radicali ascorbato possono poi dismutare tra di loro dando luogo ad una molecola di acido ascorbico ed una di acido deidroascorbico, terminando la catena di reazioni (Eberlein-Konig, 1998).

2.

SCOPO DELLA RICERCA

Negli ultimi anni sono stati realizzati numerosi studi finalizzati a valutare il contenuto in antiossidanti nei prodotti vegetali freschi.

Il mais, è una ottima fonte di antiossidanti naturali quali carotenoidi e tocoli; l'interesse per questi composti è legato all'importanza medico-nutrizionale che questi composti hanno in quanto svolgono un ruolo importante nel prevenire alcune forme tumorali e patologie cronic-degenerative (Basu et al, 2001).

La granella di mais però, durante la stagione di coltivazione e durante il periodo di stoccaggio, può essere contaminata da funghi e da parassiti che possono produrre metaboliti altamente tossici quali aflatossine, fumonisine, zearalenone, e altro ancora; pertanto molta attenzione deve essere posta per limitare il livello di contaminazione provocato da queste.



Figura 3: contaminazione da micotossine in pieno campo

Sono inoltre da sottolineare le perdite economiche a livello mondiale in quanto la contaminazione può avvenire in tutti gli anelli della catena produttiva, ovvero dalla produzione, lavorazione, stoccaggio e distribuzione di cereali e/o mangimi fino alla produzioni di alimenti di origine animale (Bottalico, 1987; 1998).

Uno studio sugli antiossidanti condotto da Moreno e Kang, 1999, documenta che alcune componenti della granella di mais, come α -tocoferolo e β -carotene, possono inibire la crescita di funghi e quindi la produzione di micotossine. Inoltre gli antiossidanti hanno mostrato avere effetto sulla germinazione condiale, la crescita e la produzione di micotossina da specie aflatossigene quali *Aspergillus flavus* and *parasiticus* (Thompson, 1991).

Studi successivi effettuati da Thomposon (1992; 1994) e Thompson et al. (1993) mostrano come gli antiossidanti possono inibire la crescita di *Fusarium verticillioides* e *Penicillium* e la successiva produzione di tossine. In un recente articolo, di Torres et al. (2003), è stato valutato, su granella di mais irradiata, l'effetto di due antiossidanti, per la conservazione di alimenti, sulla produzione di fumonisina causata da *F. verticillioides* and *F. proliferatum*. Pertanto è di estrema importanza poter investigare sugli effetti degli antiossidanti naturali nella contaminazione da funghi tossigeni durante la semina, la crescita, raccolta e conservazione del mais.

Le proprietà protettive degli antiossidanti sono legate alla capacità a ridurre la velocità di propagazione della catena radicalica e quindi di proteggere la membrana cellulare dai danni causati dalle micotossine (Atroshi et al, 2002).

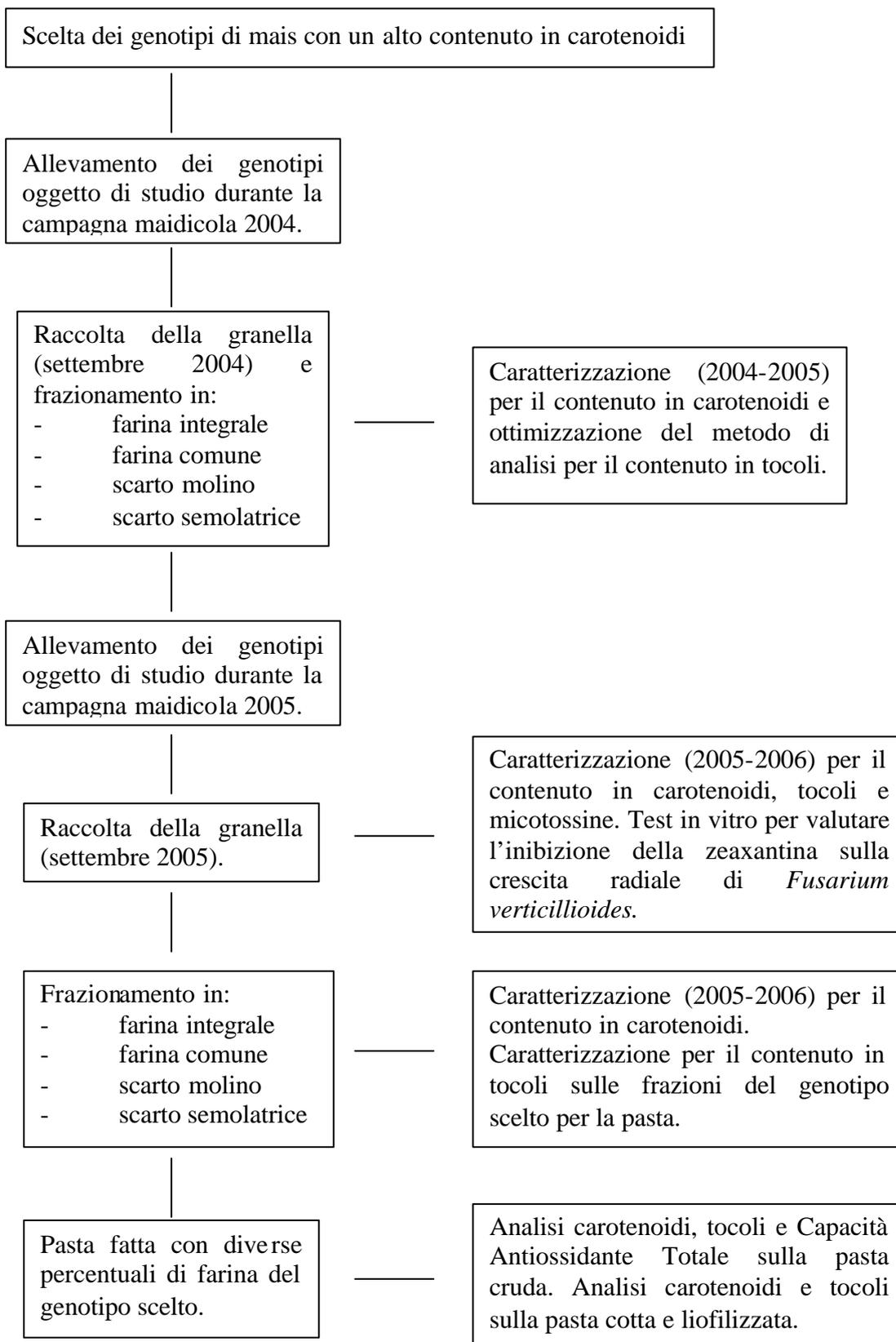
Il lavoro si è articolato nelle seguenti fasi:

- Selezione di genotipi di mais con un alto contenuto in antiossidanti;
- Produzione in campo dei genotipi scelti e oggetto di studio;
- Caratterizzazione del contenuto in antiossidanti (carotenoidi e tocoli) dei genotipi scelti;
- Valutazione della contaminazione da micotossine (fumonisina, zearalenone, DON e aflatoxina B1) dei genotipi scelti;
- Ricerca di una correlazione tra contenuto in antiossidanti e concentrazione in micotossine;
- Test in vitro per verificare la capacità di alcuni antiossidanti (zeaxantina) di inibire la crescita del fungo;
- Valutazione della distribuzione dei carotenoidi in alimenti (semola per polenta e pasta) e ingredienti (farina comune) a base di mais e sottoprodotti della lavorazione del mais (scarto del molino e scarto della semolatrice)

3.

MATERIALI E METODI

Il lavoro di dottorato si è svolto tra novembre 2003 e ottobre 2006.



3.1 MATERIALI

I materiali oggetto della ricerca sono stati 4 genotipi di mais (Figura 4a-d) per la produzione di granella.

Figura 4a: genotipo n° 1



Figura 4b: genotipo n° 2



Figura 4c: genotipo n° 3



Figura 4d: genotipo n° 4



Figura 4: genotipi oggetto di ricerca

I 4 genotipi sono stati allevati nell'azienda sperimentale del C.R.A. (Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura), Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura – Sezione di Bergamo, impiegando uno schema sperimentale a file, ogni fila costituita da un genotipo.

Le semine sono state eseguite, con eccesso di seme, e in ogni fila le piante sono state diradate all'investimento desiderato di 6,7 piante/m².

All'epoca della fioritura le piante di ciascuna fila sono state impollinate manualmente con polline proveniente dalle piante della stessa fila (Bertolini et al, 1999).

Dopo la raccolta la granella è stata stoccata in essiccatoio a 40 °C fino a peso costante (umidità pari a 8%).

Una parte della granella è stata macinata utilizzando un mulino (ZM200, Retsch) con un vaglio di 1 mm (farina integrale) e analizzata per il contenuto in antiossidanti (carotenoidi e tocoli) e in micotossine (fumonisine, zearalenone, DON e aflatossina B1).

La rimanente granella è stata sottoposta a macinazione a secco con un mulino sperimentale (Buhler MLU202) accoppiato ad una speciale semolatrice ottenendo 4 frazioni:

- farina comune (figura 5a);
- semola per polenta (figura 5b);
- scarto della lavorazione della farina comune (scarto molino) (figura 5c);
- scarto della lavorazione della semola per polenta (scarto semolatrice) (figura 5d).

Le quattro frazioni sono state analizzate per il contenuto in carotenoidi e in fumonisine.



Figura 5a: farina comune

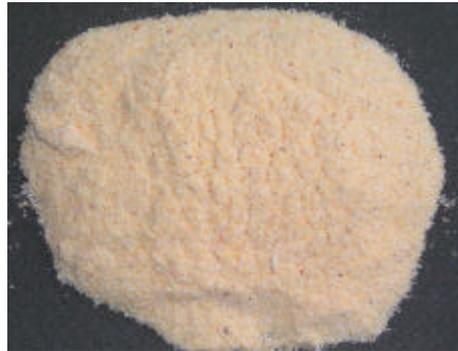


Figura 5b: semola per polenta



Figura 5c: scarto molino



Figura 5d: scarto se molatrice

Figura 5: frazione della lavorazione del mais

La farina comune del genotipo n° 1 è stata poi utilizzata in miscela con semola di frumento duro in due diversi rapporti (30:70 e 15:85) per la preparazione di spaghetti (figura 6), essiccati a bassa e alta temperatura. In totale si sono ottenuti 4 tipi di pasta.

Gli spaghetti sono stati valutati per il loro contenuto in carotenoidi e tocoli ed è stata valutata la Capacità Antiossidante Totale (TAC).



Figura 6: spaghetti ottenuti dalla miscelazione di semola di grano duro e farina di mais del genotipo n°1

3.2 METODI DI ESTRAZIONE

3.2.1 Protocollo di estrazione carotenoidi in farine e trasformati di mais (Buratti et al, 2001)

- preparare una soluzione stabilizzante 0,5% BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol- Merck) in Tetraidrofuraro (THF);
- pesare 5 g di campione in una provetta da centrifuga;
- valutare la concentrazione dello standard interno cantaxantina allo spettrofotometro a 480 nm (preparare due provette con 2980 µl di benzene e 20 µl di cantaxantina e leggere contro bianco di benzene);
- aggiungere al campione 70 µl dello standard interno cantaxantina e 2 ml di metanolo per idratarlo;
- mantenere le provette con il campione immerse in un bagnetto di ghiaccio e aggiungere 15 ml della soluzione stabilizzante, agitare brevemente con una bacchetta di vetro e omogeneizzare con Ultraturrax (Sorvall Omni-Mixer) o apparecchio equivalente per 1 minuto;
- centrifugare per 10 minuti a 4°C e 15000 rpm e trasferire il surnatante in un pallone da 50 ml mantenuto in ghiaccio e oscurato;
- ripetere le operazioni di estrazione per altre 2 volte (in totale il campione è sottoposto a tre trattamenti estrattivi) e raccogliere i 3 surnatanti;
- sostituire, mediante l'utilizzo di imbuti separatori, il solvente di estrazione (soluzione stabilizzante) con etere di petrolio. Versare l'estratto nel primo

imbuto separatore e aggiungere 20 ml di una soluzione di NaCl al 20% e 50 ml di etere di petrolio, agitare e recuperare il surnatante in un pallone. Procedere con altre due sostituzioni di solvente, la prima con 25 ml e la seconda con 15 ml di etere di petrolio;

- immergere il pallone in un bagnetto di ghiaccio per separare i grassi per congelamento e mantenerlo in agitazione per 45 minuti;
- trasferire la fase liquida in un pallone da rotavapor da 250 ml e rilavare i grassi rimasti con circa 10 ml di etere di petrolio, agitare velocemente e recuperare il surnatante;
- portare a secco l'estratto con rotavapor e bagnetto a 30°C;
- riprendere il secco con 20 ml di etere di petrolio e prelevarne 2 aliquote da 5 ml in provette pirex;
- portare a secco le due aliquote sotto flusso di azoto e conservare a -20°C fino al momento dell'analisi in HPLC, che non deve avvenire più di 6-7 giorni dopo il giorno dell'estrazione;
- prima dell'analisi HPLC prendere un'aliquota di estratto conservata a -20°C e riprendere il secco con 1 ml di metil tert butiletere;
- lasciare agli ultrasuoni per 1 minuto;
- filtrarlo con filtro da siringa in vial ambrata per l'analisi HPLC.

3.2.2 Ottimizzazione del protocollo di estrazione di tocoli per cereali e trasformati di cereali (Pisacane et al, 2004)

La seguente procedura di estrazione è il risultato dell'ottimizzazione del metodo descritto da Bryngelsson et al. (2002) al fine di ridurre il tempo totale di analisi e utilizzare il metodo modificato per valutare il contenuto di tocoli in diversi cereali:

- pesare 5 g di farina in una provetta da centrifuga;
- mantenere la provetta con il campione in un bagnetto di ghiaccio per tutta la durata dell'estrazione;
- aggiungere 20 ml di metanolo, agitare brevemente con una bacchetta di vetro e omogeneizzare con Ultraturrax (Sorvall Omni-Mixer) o apparecchio equivalente per 1 minuto;
- centrifugare per 25 minuti a 4°C e 15000 rpm;
- trasferire il surnatante in un matraccio da 50 ml oscurato e mantenuto in ghiaccio;
- ripetere le ultime tre operazioni una seconda volta utilizzando 15 ml di metanolo (in totale il campione è sottoposto a due trattamenti estrattivi utilizzando 35 ml di metanolo totali);
- trasferire le frazioni raccolte nelle due fasi estrattive in un pallone da rotavapor da 100 ml;
- portare a secco con rotavapor e bagnetto a 40°C;
- riprendere il secco con 1 ml di metanolo e suddividerlo in 4 aliquote da 250 µl in eppendorf da 1,5 ml;

- conservare le aliquote a -20°C fino al momento dell'analisi in HPLC.
- Prima dell'analisi HPLC, prendere un aliquota di estratto conservata a -20°C ed evaporare, sotto corrente di azoto, i 250 µl di metanolo;
- riprendere il secco con 980 µl di una soluzione composta dal 95% di esano e il 5% di 1,4 diossano (solvente della corsa cromatografica) e 20 µl di acetone (solventi per HPLC);
- centrifugare per 1 minuto a 4°C e 14000 rpm;
- prelevare il surnatante e filtrarlo con filtro da siringa in vial ambrata per l'analisi HPLC.

3.2.3 Protocolli di estrazione di micotossine da farina di mais (RIDASCREEN® test)

3.2.3.1 Estrazione di Fumonisine e Aflatossina B1

- pesare 5 g di campione macinato in una beuta o contenitore capiente e aggiungere 25 ml di metanolo al 70%;
- lasciare il campione in agitazione per tre minuti;
- filtrare l'estratto con carta da filtro Whatman No. 1;
- diluire il campione estratto 1:14 con acqua distillata;
- usare 50 µl del filtrato diluito per il RIDASCREEN® test per Fumonisine e Aflatossina B1 (R-Biopharm).

3.2.3.2 Estrazione di Zearalenone (ZEA)

- pesare 5 g di campione macinato in una beuta o contenitore capiente e aggiungere 25 ml di metanolo al 70%;
- lasciare il campione in agitazione per tre minuti;
- filtrare l'estratto con carta da filtro Whatman No. 1;
- diluire il campione estratto 1:1 con acqua distillata;
- usare 50 µl del filtrato diluito per il test RIDASCREEN® test per Zearalenone (R-Biopharm).

3.2.3.3 Estrazione di Deossinivalenolo (DON)

- pesare 5 g di campione macinato in una beuta o contenitore capiente e aggiungere 25 ml di acqua distillata;
- lasciare il campione in agitazione per tre minuti;
- filtrare l'estratto con carta da filtro Whatman No. 1;
- usare 50 µl del filtrato diluito per il test RIDASCREEN® test per DON (R-Biopharm).

3.3 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI STANDARD E RETTE DI CALIBRAZIONE

3.3.1 Carotenoidi e xantofille

Le concentrazioni reali degli standard sono state determinate mediante analisi spettrofotometrica (spettrofotometro UV/Vis, doppio raggio Perkin Elmer lambda 2), facendo uso del coefficiente di estinzione molare ($e^{\%}$) che è noto dalla letteratura ed è funzione di un particolare solvente (tabella 9).

Standard	Coefficiente di estinzione molare ($e^{\%}$)	Lunghezza d'onda di lettura allo spettrofotometro	Solvente
Cantaxantina	$e^{\%} = 2095$	480 nm	Benzene
β -criptoxantina	$e^{\%} = 2369$	452 nm	Etere di petrolio
Luteina	$e^{\%} = 2550$	445 nm	Etanolo
Zeaxantina	$e^{\%} = 2480$	452 nm	Etanolo
α -carotene	$e^{\%} = 2800$	444 nm	Etere di petrolio
β -carotene	$e^{\%} = 2592$	453 nm	Etere di petrolio

Tabella 9: caratteristiche spettrofotometriche degli standard dei carotenoidi

Le soluzioni degli standard iniettate nel sistema cromatografico, sono state preparate a partire dalle rispettive soluzioni madre, ottenuta sciogliendo con relativo solvente aliquote di ciascun composto, precedentemente preparate e conservate a secco

in provette pirex con tappo a tenuta a -20°C. La concentrazione della soluzione madre viene valutata in modo preciso mediante analisi spettrofotometrica, tale procedura è risultata necessaria per l'elevata instabilità dei composti.

Le concentrazioni opportune degli standard vengono poi preparate per diluizione e i cromatogrammi relativi all'analisi HPLC vengono letti a 450 nm, lunghezza d'onda di massimo assorbimento dei carotenoidi.

Le rette di calibrazione, ottenute attraverso analisi HPLC, sono riportate in tabella 10.

Composto	Range di linearità (mg/l)	Equazione della retta di calibrazione	Coefficiente di correlazione (R²)
cantaxantina	1-10	$y = 2,0055x$	0,998
β-criptoxantina	1-10	$y = 2,7854x + 0,0706$	0,998
Luteina	1-10	$y = 2,4034x$	0,999
Zeaxantina	1-10	$y = 2,2889x$	0,999
β-carotene	1-10	$y = 2,7009x + 0,1929$	0,999

Tabella 10: rette di calibrazione degli standard dei carotenoidi

Tutti i solventi utilizzati sono stati addizionati con lo 0,1% di BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol- Merck) che ha funzione stabilizzante.

3.3.2 Tocoli

Le soluzioni degli standard iniettate nel sistema cromatografico, sono state preparate a partire da una soluzione madre.

La concentrazione della soluzione madre è stata ottenuta attraverso il rilevamento del peso della massa di ogni singolo standard α -, β -, γ -, d-tocoferolo e α -, β -, γ -, d-tocotrienolo) con bilancia di precisione (Mettler AT261 DeltaRange) e successivamente sciogliendo con relativo solvente (esano per tocoferoli e acetone per tocotrienoli) a quantità nota.

E' stata prelevata un'aliquota di ciascuno standard, le otto aliquote sono state miscelate e portate ad un volume noto (1000 μ l) con una soluzione composta da esano:1,4-diossano (95:5 v/v) in modo da avere concentrazioni note (5 mg kg⁻¹ per ciascuno standard). La miscela degli otto standard è stata analizzata in HPLC e la rilevazione effettuata utilizzando un fluorimetro ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 294 nm e ad una lunghezza d'onda di emissione di 326 nm.

La concentrazione nei campioni è stata calcolata attraverso il fattore di risposta di ogni singolo standard con la formula:

$$F.R. = \text{conc./area}$$

3.4 ANALISI HPLC (High Performance Liquid Chromatography) DEGLI

ANTIOSSIDANTI

3.4.1 Condizioni operative

Il sistema HPLC utilizzato viene descritto di seguito:

- Autocampionatore: Perkin Elmer series 200 automatico termostato con accessorio a effetto Peltier;
- Pompe: Sistema di pompe binario Programmable Solvent Module 126 Beckman System Gold;
- Colonna per analisi carotenoidi: C₃₀ YMC-Pack Carotenoid (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) con pre-colonna C₁₈ Novapak (3,9 x 150 mm);
- Colonna per analisi tocoli: Inertsil 5 Silica (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) con pre-colonna ChromSep incorporato, Superchrom, Varian;
- Rivelatore per analisi carotenoidi: Programmable Detector Module 166 Beckman System Gold con lampada UV-VIS;
- Rivelatore per analisi tocoli: Perkin Elmer Fluorescence Detector series 200;
- Integrazione: software 32 Karat GOLD, Beckman Coulter.

All'inizio di ogni ciclo di analisi, viene prestata particolare attenzione al lavaggio dei condotti e all'allontanamento dell'aria presente, in modo da evitarne l'ingresso in colonna. Si ottiene così una buona conservazione delle caratteristiche delle colonne, intesa come ripetibilità dei tempi di ritenzione ed efficacia di separazione dei picchi.

3.4.2 Analisi dei carotenoidi (Buratti et al, 2001)

Il sistema eluente impiegato è costituito da due soluzioni a diversa polarità:

-soluzione A: 92% metanolo, 4% acqua

-soluzione B: 96% metil tert butiletere, 4% metanolo

L'eluizione è realizzata attraverso un gradiente di concentrazione riportato in tabella 11.

I solventi, tutti puri per HPLC (J.T. Baker), prima dell'analisi, vengono degasati con azoto a flusso costante.

Al termine di ciascuna corsa, la colonna viene lavata per 10 minuti con il 22% circa della soluzione A ed il 77% della soluzione B, successivamente viene condizionata con il 100% di soluzione A e ripreparata per l'iniezione successiva.

Ogni analisi ha una durata di 90 minuti e per ogni campione si fanno due repliche.

Ai campioni, prima della fase di estrazione, viene aggiunta un'aliquota di cantaxantina che viene utilizzata come standard interno; ciò permette di valutare la resa di estrazione, rappresentata dalla percentuale di cantaxantina $[(\text{reale}/\text{teorico}) * 100]$ ritrovata alla fine dell'analisi HPLC. La scelta di tale standard interno è dipesa dal fatto che tale sostanza è un carotenoide assente nella matrice analizzata.

Per tutti i campioni analizzati, il recupero è risultato compreso tra il 90 e il 100%.

Tempo (min)	Flusso (ml min⁻¹)	% solvente A	% solvente B
0	1,00	84,4	15,6
9	1,00	76,7	23,4
18	1,00	68,7	31,3
27	1,00	60,9	39,1
32	1,00	53,1	46,9
45	1,00	45,3	54,7
55	1,00	22,4	77,6
65	1,00	24,4	75,6
75	1,00	100	0
85	1,00	100	0
90	1,00	84,4	15,6

Tabella 11: gradiente di concentrazione della fase mobile nell'analisi dei carotenoidi

3.4.3 Ottimizzazione del metodo NP-HPLC per l'analisi di tocoli (Pisacane et al, 2004)

Le condizioni operative, adottate in questo metodo, sono il risultato dell'ottimizzazione della metodica riportata da Bryngelsson et al. (2002), al fine di ridurre i tempi operativi di analisi.

L'analisi dei tocoli è di tipo isocratico (flusso di $1,5 \text{ ml min}^{-1}$) e il sistema eluente impiegato è costituito da esano:1,4-diossano (95:5 v/v).

I solventi, tutti specifici per HPLC (J. T. Baker), prima dell'analisi, vengono degasati con azoto a flusso costante.

La rilevazione è stata effettuata utilizzando un fluorimetro ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 294 nm e ad una lunghezza d'onda di emissione di 326 nm.

I picchi sono stati identificati attraverso i tempi di ritenzione confrontandoli con quelli ricavati dall'analisi degli standard .

Ogni analisi ha una durata di 11 minuti e ogni campione è stato analizzato in duplicato.

**3.5 TEST IMMUNO-ENZIMATICO (ELISA) PER L'ANALISI
QUANTITATIVA DELLE MICOTOSSINE (RIDASCREEN® test)**

3.5.1 Condizioni operative:

Spettrofotometro utilizzato per le letture (450nm) : SIRIO – Lettore di micropiastre – SEAC – Radim Group.

3.5.2 Analisi delle Fumonisine

- pipettare 50 µl degli standard a diversa concentrazione (0 ppm, 0,222 ppm, 0,666 ppm, 2 ppm, 6 ppm) e i campioni in differenti pozzetti;
- aggiungere 50 µl di enzima coniugato in ogni pozzetto;
- aggiungere 50 µl di anticorpo in ogni pozzetto;
- agitare gentilmente a mano ed incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C);
- svuotare i pozzetti dal liquido;
- con una multicanale aggiungere ad ogni pozzetto 250 µl di acqua distillata e svuotare facendo attenzione a non lasciare liquido residuo nei pozzetti;
- ripetere l'operazione di lavaggio altre due volte;
- aggiungere 100 µl di substrato/cromogeno in ogni pozzetto;
- agitare gentilmente a mano ed incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (20-25°C) al buio;

- aggiungere 100 µl di soluzione stop in ogni pozzetto;
- agitare gentilmente a mano e leggere allo spettrofotometro a 450 nm entro 10 minuti.

3.5.3 Analisi dell'Aflatossina B1

- pipettare 50 µl degli standard a diversa concentrazione (0 ppb, 1 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 50 ppb) e i campioni in differenti pozzetti;
- aggiungere 50 µl di enzima coniugato in ogni pozzetto;
- aggiungere 50 µl di anticorpo in ogni pozzetto;
- agitare gentilmente a mano ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20-25°C);
- svuotare i pozzetti dal liquido;
- con una multicanale aggiungere ad ogni pozzetto 250 µl di acqua distillata e svuotare facendo attenzione a non lasciare liquido residuo nei pozzetti;
- ripetere l'operazione di lavaggio altre due volte;
- aggiungere 100 µl di substrato/cromogeno in ogni pozzetto;
- agitare gentilmente a mano ed incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (20-25°C) al buio;
- aggiungere 100 µl di soluzione stop in ogni pozzetto;
- agitare gentilmente a mano e leggere allo spettrofotometro a 450 nm entro 15 minuti.

3.5.4 Analisi dello Zearalenone (ZEA)

- pipettare 50 µl degli standard a diversa concentrazione (0 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 200 ppb, 400 ppb) e i campioni in differenti pozzetti;
- aggiungere 50 µl di enzima coniugato in ogni pozzetto;
- aggiungere 50 µl di anticorpo in ogni pozzetto;
- agitare gentilmente a mano ed incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C);
- svuotare i pozzetti dal liquido;
- con una multicanale aggiungere ad ogni pozzetto 250 µl di acqua distillata e svuotare facendo attenzione a non lasciare liquido residuo nei pozzetti;
- ripetere l'operazione di lavaggio altre due volte;
- aggiungere 100 µl di substrato/cromogeno in ogni pozzetto;
- agitare gentilmente a mano ed incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (20-25°C) al buio;
- aggiungere 100 µl di soluzione stop in ogni pozzetto;
- agitare gentilmente a mano e leggere allo spettrofotometro a 450 nm entro 10 minuti.

3.5.5 Analisi del Deossinivalenolo (DON)

- pipettare 50 µl degli standard a diversa concentrazione (0 ppm, 0,222 ppm, 0,666 ppm, 2 ppm, 6 ppm) e i campioni in differenti pozzetti;

- aggiungere 50 μ l di enzima coniugato in ogni pozzetto;
- aggiungere 50 μ l di anticorpo in ogni pozzetto;
- agitare gentilmente a mano ed incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (20-25°C);
- svuotare i pozzetti dal liquido;
- con una multicanale aggiungere ad ogni pozzetto 250 μ l di acqua distillata e svuotare facendo attenzione a non lasciare liquido residuo nei pozzetti;
- ripetere l'operazione di lavaggio altre due volte;
- aggiungere 100 μ l di substrato/cromogeno in ogni pozzetto;
- agitare gentilmente a mano ed incubare per 3 minuti a temperatura ambiente (20-25°C) al buio;
- aggiungere 100 μ l di soluzione stop in ogni pozzetto;
- agitare gentilmente a mano e leggere allo spettrofotometro a 450 nm entro 10 minuti.

3.6 ANALISI STATISTICA

Per l'analisi del coefficiente di correlazione semplice (r), tra il contenuto in antiossidanti (carotenoidi e tocoli) e l'accumolo di micotossine (Fumonisine, Aflatossina B1, DON e ZEA), è stato utilizzando il programma MSTATC (Michigan State University).

3.7 TEST IN VITRO

Il test *in vitro* è stato introdotto per testare l'effettiva efficacia dell'antiossidante zeaxantina sulla crescita del *Fusarium verticillioides*, su substrato specifico e in condizioni ottimali di temperatura.

Il ceppo di *Fusarium verticillioides* (ceppo MRC826, PRI, Wageningen) utilizzato per i test *in vitro* è stato fatto crescere su piastre contenenti PDA, Potate Dextrose Agar (Scharlau Micropoli), a 27°C e monitorato nella crescita con sottoculture settimanali.

Dalla piastra scelta per l'inoculo è stato prelevato un disco del diametro di 2 mm, con una pasteur tagliata, e disciolto in 1 ml di acqua sterile. La sospensione è stata filtrata con garza sterile e diluita in rapporto di 1:10 con acqua (10 µl in 100 µl). Da questa diluizione si sono prelevati 5 µl e si esegue un conteggio delle spore con camera di Burker al microscopio ottico. Il microscopio utilizzato è stato il DIAVERT (Leitz) corredato da macchina fotografia MPS 51S e Photoautomat MPS 45 (Wild). La conta delle spore è stata calcolata utilizzando la formula:

$$(2,5 * 10^5) * \text{media spore contate} * n = \text{numero di spore/ml}$$

Dove: $2,5 * 10^5$ rappresenta il fattore di conversione della camera di Burker utilizzata e n il fattore di diluizione (n=10).



Figura 7: spore di *Fusarium verticillioides* viste al microscopio ottico

Sono state poi preparate le piastre per il test di inibizione della crescita del fungo da parte della zeaxantina (Amadioha, 2000). Le piastre Petri utilizzate (5 cm di diametro) sono state riempite con 5 ml di PDA. Una volta solidificato il terreno, sulle piastre vengono stesi 150 μ l di zeaxantina (risospesa in etanolo) a diverse concentrazioni in modo da formare un sottile ed uniforme film sulla superficie. Le concentrazioni della zeaxantina sono state di 10, 15, 20, 25, e 27,7 mg kg⁻¹. Come controllo sono state utilizzate piastre sulle quali erano stati stesi 150 μ l di etanolo.

Dalla piastra, dove è stato fatto crescere il ceppo originario di *Fusarium verticillioides*, sono stati prelevati, con una pasteur tagliata, dischi del diametro di 2 mm e trasferiti al centro delle piastre trattate con zeaxantina.

Le piastre successivamente sono state incubate a 27°C e se ne è misurata e registrata periodicamente (3, 4, 5, e 6 giorni dopo l'inoculo) la crescita radiale del fungo e paragonata con la crescita del fungo nella piastra contenente solo etanolo (controllo). L'esperimento è stato replicato quattro volte per ogni trattamento e calcolato su questi il valore medio.

Con i dati ottenuti è stata calcolata la percentuale di inibizione della crescita del fungo, utilizzando la formula di Pandey et al (1982).

$$\text{Percentage Growth Inhibition} = \frac{\varnothing C - \varnothing T}{\varnothing C} \times \frac{100}{1}$$

Dove: $\varnothing C$ rappresenta la media del valore del diametro della colonia del fungo utilizzato come controllo e $\varnothing T$ la media del valore del diametro della colonia del fungo inoculato su piastre trattate con la zeaxantina.

3.8 PROTOCOLLO PER LA VALUTAZIONE DELLA % DI SOSTANZA

SECCA

(in uso presso i laboratori dell'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura – BG)

- numerare i barattolini di vetro (uno per campione) e mettere in stufa a 50-60° per 60 minuti circa
- togliere i barattolini dalla stufa e lasciare che si raffreddino nel deumidificatore
- pesare i barattolini e annotare il peso (tara)
- tarare
- pesare 2 g di campione (peso fresco)
- posizionare tutti i barattolini con i campioni in un vassoio senza coperchio
- lasciare in stufa a 105°C da 8 ore a tutta la notte
- coprire i barattolini e lasciarli raffreddare nel deumidificatore
- pesare e segnare il peso (peso stufa)
- utilizzare le seguenti formule per il calcolo della % di umidità:
 - « $\text{Peso stufa} - \text{tara} = \text{peso secco}$
 - « $(\text{Peso secco} / \text{peso fresco}) * 100 = \% \text{ s.s.}$
 - « $100 - \text{s.s.} = \% \text{ di umidità}$

3.9 VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' ANTIOSSIDANTE TOTALE (TAC)

La capacità antiossidante totale è stata valutata mediante l'analisi dell'ABTS test (Re at al, 1999).

Questo metodo sfrutta la capacità degli antiossidanti di interagire con l'ABTS⁺, un radicale catione cromoforo di colore blu-verde con assorbimento a 734 nm.

L'interazione tra antiossidanti e radicali diminuisce l'assorbanza, in funzione della capacità antiossidante, portando ad una decolorazione della soluzione.

L'ABTS (Sigma) è stato sciolto in acqua (7 mM) e miscelato con potassio per solfato (Carlo Erba) (2,45 mM concentrazione finale).

La miscela viene lasciata al buio a temperatura ambiente per 12-16 ore. Quindi la soluzione viene diluita in etanolo fino a leggere un'assorbanza a 734 nm di $0,7 \pm 0,02$ a 30°C e usando cuvette in vetro.

2 ml di tale soluzione vengono aggiunti a 20 µl di campione o di etanolo (bianco) leggendo l'assorbanza a 734 nm immediatamente (t = 0) e ogni minuto, fino a 6-7 minuti.

La concentrazione effettiva di estratto nelle cuvette risulta pari a :

$$\frac{20 \mu\text{l} * \text{conc}_{\text{campione}}}{2,02 \text{ ml} * 10^3 \mu\text{l/ml}} \quad (\text{g/L})$$

La TAC è calcolata come percentuale di inibizione:

$$\% \text{ inibizione} = \frac{A_{\text{bianco t6}} - A_{\text{campione t6}}}{A_{\text{ABTS t0}}} * 100$$

Dove: $A_{\text{bianco t6}}$ è l'assorbanza del bianco a 6 minuti; $A_{\text{campione t6}}$ è l'assorbanza del campione a 6 minuti; $A_{\text{ABTS t0}}$ è l'assorbanza del radicale al tempo 0.

La percentuale di inibizione è stata convertita in Trolox® mediante retta di taratura con soluzioni standard di Trolox®.

4.

RISULTATI

Le attività del lavoro di dottorato sono state influenzate dalla necessità di allevare e produrre, durante la campagna maidicola 2004 e 2005, i campioni di mais scelti per questo studio.

I 4 genotipi sono stati allevati impiegando uno schema sperimentale a file, ogni fila costituita da un genotipo.

Le semine (maggio 2004 e 2005) sono state eseguite con eccesso di seme e, in ogni fila, le piante sono state diradate all'investimento desiderato di 6,7 piante/m².

All'epoca della fioritura (luglio-agosto 2004 e 2005) le piante di ciascuna fila sono state impollinate manualmente con polline proveniente dalle piante della stessa fila (Bertolini et al, 1999).

Le piante sono state lasciate in campo fino a maturazione e raccolte (settembre 2004 e 2005) manualmente.

I campioni sono stati scelti in seguito ad un precedente studio, svolto presso l'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura di Bergamo, che aveva come finalità la caratterizzazione per il contenuto in carotenoidi di una "core collection" europea di mais (Pisacane et al, 2003) comprendente genotipi di mais provenienti da diversi paesi europei (Francia, Germania, Grecia, Italia, Portogallo e Spagna).

I risultati avevano mostrato che i campioni con concentrazione media in carotenoidi più elevata erano quelli di provenienza italiana.

Sono così stati scelti i materiali "migliori" di mais e utilizzati per questo lavoro di tesi.

4.1 ANALISI DEGLI ANTIOSSIDANTI NELLA FARINA INTEGRALE

DI MAIS

4.1.1 Carotenoidi

I dati dei campioni allevati durante la campagna maidicola 2004 hanno mostrato che il campione n° 3 presentava il più alto contenuto in carotenoidi totali (42,0 mg kg⁻¹ s.s.). In tutti i campioni luteina e zeaxantina sono stati i carotenoidi maggiormente significativi con valori compresi tra 0,9 e 14,5 mg kg⁻¹ per la luteina, e tra 9,3 e 20,9 mg kg⁻¹ per la zeaxantina.

Tutti i risultati sono mostrati come media di due repliche (tabella 12) e sono stati calcolati escludendo dal peso della farina la % di umidità (tabella 13).

Genotipo	luteina	zeaxantina	a criptoxantina	b criptoxantina	a carotene	b carotene	Carotenoidi totali
1	10,3	16,1	0,3	1,2	0,7	0,0	39,4
2	0,9	20,6	0,6	2,7	1,6	0,0	37,3
3	4,1	20,9	0,5	4,1	0,9	0,0	42,0
4	14,5	9,3	0,0	2,0	0,6	0,1	36,4

Tabella 12: contenuto in carotenoidi (mg kg⁻¹) nelle farine integrali dei 4 genotipi oggetto di studio allevati durante la campagna 2004

Genotipo	1	2	3	4
% Umidità	8,0	8,3	7,7	8,7

Tabella 13: percentuale di umidità dei campioni di farina integrale allevati durante la campagna 2004

I dati dei campioni allevati durante la campagna 2005 sono mostrati nella tabella 14 come media di due repliche.

Questi mostrano che il campione n° 2 presentava la concentrazione maggiore di carotenoidi totali (90,4 mg kg⁻¹ s.s.). In tutti i campioni analizzati la luteina e la zeaxantina sono stati i carotenoidi maggiormente rappresentativi con valori compresi, per la luteina tra 4,4 e 26,8 mg kg⁻¹ calcolati sulla sostanza secca e, per la zeaxantina, tra 10,1 e 27,7 mg kg⁻¹ s.s. Tutti i risultati sono stati calcolati al netto della % di umidità (tabella 15).

Genotipo	luteina	zeaxantina	a	b	a	b	Carotenoidi totali
			criptoxantina	criptoxantina	carotene	carotene	
1	26,8	19,6	0,7	1,2	0,0	0,0	58,6
2	25,3	27,7	1,1	3,3	0,8	1,2	90,4
3	4,4	22,2	1,0	4,0	0,0	0,6	48,1
4	22,9	10,1	0,0	1,0	0,6	0,5	53,6

Tabella 14: contenuto in carotenoidi (mg kg⁻¹) nelle farine integrali dei 4 genotipi oggetto di studio allevati durante la campagna 2005

Genotipo	1	2	3	4
% Umidità	8,8	9,3	7,8	8,9

Tabella 15: percentuale di umidità dei campioni di farina integrale allevati durante la campagna 2005

I risultati sui singoli carotenoidi dei genotipi oggetto di studio, e allevati negli anno 2004 e 2005, hanno evidenziato che luteina e zeaxantina sono i carotenoidi maggiormente presenti nella granella di mais. Questo risultato è in accordo con precedenti studi (Janick-Buckner et al, 2001).

4.1.2 Tocoli

Diversi metodi HPLC per l'analisi dei tocoli, sono riportati in letteratura. Pyca e Sliwiok (2001) hanno descritto la separazione di α -, β -, γ - e δ -tocoferolo utilizzando differenti tecniche cromatografiche e i problemi di interazione tra la struttura della molecola e le sue proprietà fisiche, chimiche e biologiche. In questo articolo, il confronto tra le diverse tecniche ha indicato la NP-HPLC (Normal Phase High Performance Liquid Chromatography) come la migliore tecnica di separazione dei tocoferoli. In un altro studio (Ruperéz et al, 2001) si è confermato che la cromatografia in fase normale dà una buona separazione di tutti gli isomeri.

Kamal-Eldin et al. (2000) hanno messo a confronto differenti colonne cromatografiche per cercare la colonna HPLC universale per tutti e otto i componenti dei tocoli.

Panfilì et al. (2003) hanno descritto una procedura rapida, usando una colonna in fase normale, per la determinazione simultanea di tutti gli isomeri di tocoferoli e tocotrienoli. Il risultato descritto è stato la separazione degli otto isomeri con NP-HPLC, estratti saponificati prima dell'iniezione in HPLC. Un altro studio ha riportato la descrizione di questa tecnica di estrazione (Lang et al, 1992).

La possibilità di utilizzare genotipi di mais con un alto contenuto in antiossidanti come materia prima per produrre alimenti e la possibilità di mettere a punto un metodo veloce per l'analisi simultanea di tutti e otto gli isomeri, ha spinto a studiare questi composti.

Le prove sperimentali, condotte su avena, hanno dimostrato di poter determinare e quantificare simultaneamente tocoferoli e tocotrienoli attraverso un'analisi NP-HPLC, senza trattamento di saponificazione dei campioni e con una corsa cromatografia totale di 11 minuti, pari ad una riduzione del tempo di analisi superiore al 100% (figura 8). L'autenticazione dei singoli componenti nelle analisi HPLC è stata ottenuta confrontando le molecole dei singoli tocoli con gli standard equivalenti allo stesso tempo di ritenzione. (Pisacane et al, 2004).

In seguito, si è verificata l'efficacia del metodo per la determinazione dei tocoli anche per l'analisi di mais, frumento (duro, tenero e gonococco), orzo e riso.

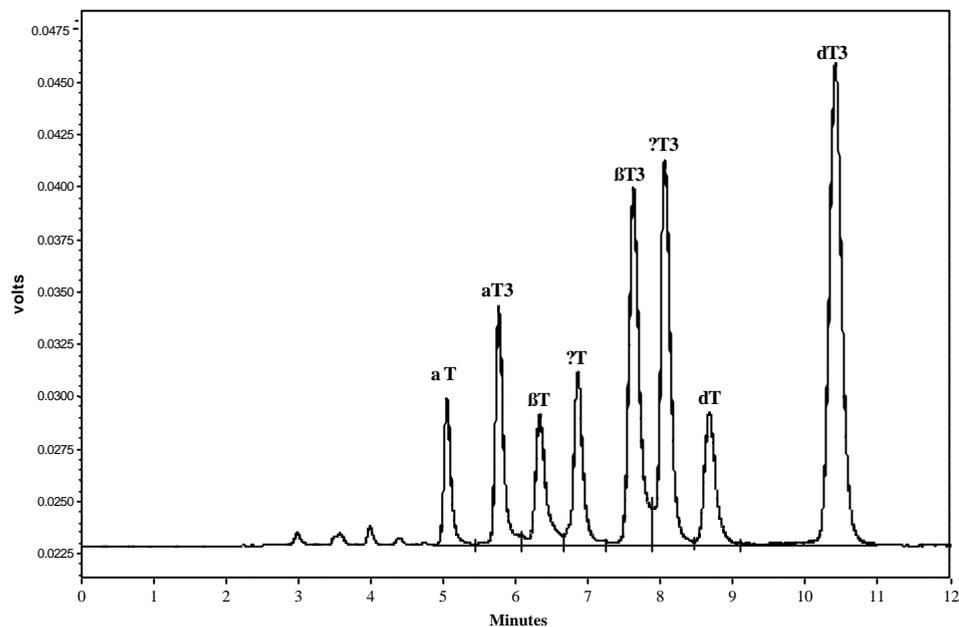


Figura 8: cromatogramma di riferimento degli otto standard di tocoli

Per i tocoli totali, delle farina integrali, sono stati analizzati solo i campioni allevati durante la campagna maidicola del 2005.

I risultati hanno mostrato che il valore più alto è stato trovato nel campione n° 1 (251,2 mg kg⁻¹ s.s.).

L'isomero γ -tocoferolo si è confermato (Kurilich e Juvik, 1999a e 1999b) tra i tocoli quello maggiormente rappresentativo per tutti i campioni, con valori di concentrazione compresi tra 66,4 e 176,0 mg kg⁻¹ s.s.

Anche α -tocoferolo (valori tra 20,3 e 32,8 mg kg⁻¹ s.s.), α -tocotrienolo (valori tra 11,2 e 19,0 mg kg⁻¹ s.s.) e β -tocotrienolo (valori tra 22,8 e 31,6 mg kg⁻¹ s.s.) hanno mostrato concentrazioni discrete.

Tutti i risultati sono stati calcolati sulla sostanza secca (tabella 15) e mostrati (tabella 16) come media di due repliche.

Genotipo	a - T	a - T3	b - T	g - T	b - T3	g - T3	d - T	d - T3	Tocoli totali
1	21,6	14,7	0,6	176,0	0,0	31,6	2,4	1,1	248,1
2	32,8	19,0	0,9	172,5	0,0	21,9	2,7	1,5	251,2
3	20,3	11,2	0,3	94,1	1,3	24,9	0,6	0,3	153,0
4	27,3	17,8	0,4	66,4	0,9	22,8	0,5	0,5	136,5

T = tocoferolo;
T3 = tocotrienolo

Tabella 16: contenuto in tocoli (mg kg⁻¹) nelle farine integrali dei 4 genotipi oggetto di studio allevati durante la campagna 2005

4.2 ANALISI DELLE MICOTOSSINE

I risultati delle analisi di micotossine, sui campioni allevati nell'anno 2005, hanno mostrato che DON e Aflatossina B1 sono sempre risultati assenti nei campioni analizzati.

Il contenuto di fumonisina ha, invece, presentato valori compresi tra 0,0 e 10,0 mg kg⁻¹ e lo zearalenone valori compresi tra 3,4 e 17,1 µg kg⁻¹ (tabella 17).

genotipo	Fumonisine (mg kg⁻¹)	Zearalenone (µg kg⁻¹)
1	1,0	17,1
2	0,0	13,3
3	3,0	12,7
4	10,0	3,4

Tabella 17: contenuto di fumonisina e zearalenone nei 4 genotipi oggetto di studio (i risultati sono le medie di due repliche)

4.3 ANALISI STATISTICA

Il coefficiente di correlazione semplice (r) tra antiossidanti e zearalenone non è mai risultato significativo.

Il coefficiente di correlazione semplice (r) tra antiossidanti e fumonisina non è risultato significativo con luteina, α - e β -carotene, α -, β - e γ -tocoferolo e tutti e quattro gli isomeri del tocotrienolo.

Le correlazioni negative significative sono riportate in tabella 18.

I valori nella tabella 18 mostrano che esiste una correlazione negativa significativa tra la concentrazione di fumonisina e zeaxantina ($r = -0,92$), α -criptoxantina ($r = -0,97$) e β -criptoxantina ($r = -0,70$).

Nella tabella 19 viene mostrata una correlazione negativa significativa tra il γ -tocoferolo e il contenuto in fumonisina ($r = -0,69$).

Antiossidanti	Fumonisina
zeaxantina	-0,92**
α -criptoxantina	-0,97**
β -criptoxantina	-0,70*
γ - tocoferolo	-0,69*
** = significativo con $p = 0,01$; * = significativo con $p = 0,05$	

Tabella 18: coefficiente di correlazione semplice (r) tra contenuto in antiossidanti e accumulo di fumonisina

Al fine di verificare l'esistenza di una correlazione negativa e significativa tra il contenuto in zeaxantina e l'accumulo in fumonisina, le analisi sono state ripetute su 16 campioni casuali di farina di genotipi differenti di mais. I risultati sono riportati in tabella 19.

N° campioni	Zeaxantina (mg kg⁻¹)	Fumonisina (µg ml⁻¹)
1	6,0	0
2	21,9	0
3	6,6	3
4	8,0	4
5	15,7	0
6	11,7	1
7	12,3	0
8	7,0	3
9	6,3	3
10	5,6	4
11	8,7	0
12	6,3	1
13	3,0	5
14	7,9	2
15	14,5	1
16	5,5	4

Tabella 19: contenuto di zeaxantina (mg kg⁻¹) e fumonisina (µg ml⁻¹) nei 16 genotipi di mais scelti per verifica

La correlazione nei 16 campioni analizzati come verifica, tra zeaxantina e fumonisina, ha mostrato un valore di -0,46 con p=0,025.

Questa correlazione è risultata ancora negativa, ma con un'intensità più bassa (-0,46) imputabile alla più bassa concentrazione di zeaxantina riscontrata nei genotipi analizzati come verifica.

Lo studio dell'influenza della concentrazione di zeaxantina sulla crescita radiale del *Fusarium verticillioides* è stata valutata con successivi test *in vitro*.

4.4 INIBIZIONE DELLA CRESCITA DEL FUNGO

L'effettiva efficacia degli antiossidanti sulla crescita del fungo è stata valutata attraverso test in vitro. Per questo test è stato scelto come antiossidante la zeaxantina, in quanto è l'antiossidante specifico del mais e per questo contenuto nei campioni a concentrazioni più elevate.

Prima di verificare l'efficacia della zeaxantina sulla crescita del fungo, sono state fatte prove di inibizione con il solo etanolo (solvente in cui è disciolto l'antiossidante), al fine di verificare se l'etanolo può causare un'inibizione. Questa prova ha dimostrato che l'etanolo, confrontato con piastre di controllo contenente acqua sterile, non causa inibizione della crescita del fungo quindi è stato possibile usarlo come controllo (figura 9).

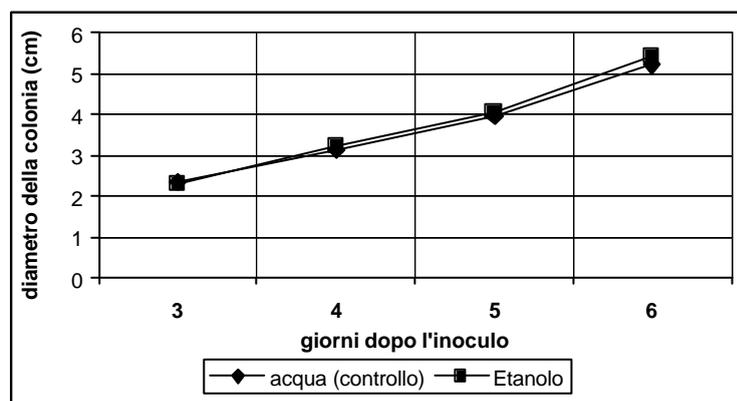


Figura 9: Effetto dell'etanolo sulla crescita radiale di *Fusarium verticillioides* (ceppo MRC826), a 3, 4, 5 e 6 giorni dopo l'inoculo, confrontate con acqua sterile (controllo)

Le piastre sono state osservate allo stereoscopio, modello Heerbrugg Plan 1x (WILD) corredato da macchina fotografia MPS 51S e Photoautomat MPS 45 (WILD).

I risultati ottenuti dai test in vitro hanno suggerito che mediamente la zeaxantina induce un'inibizione della crescita radiale del fungo. Un esempio di crescita e inibizione, 4 giorni dopo l'inoculo, viene riportato in figura 10.

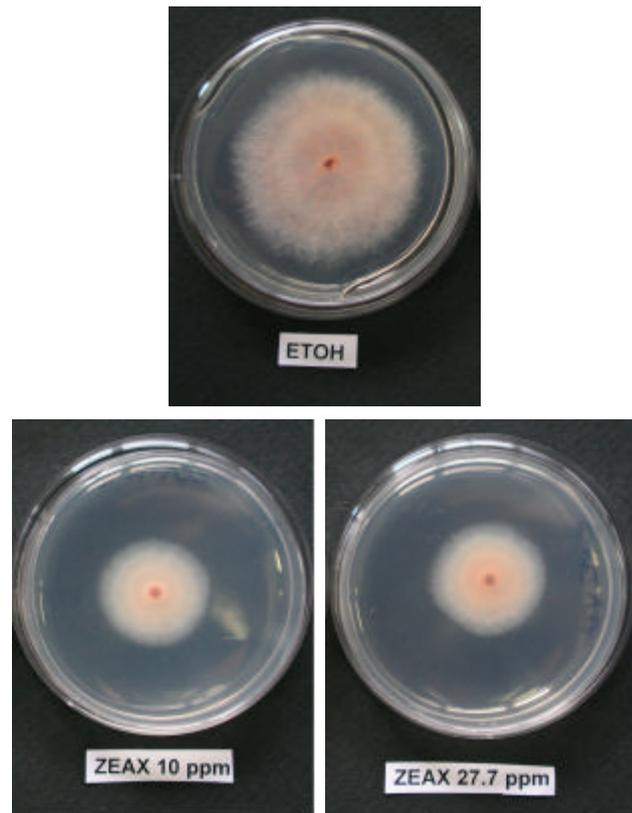


Figura 10: Esempio di crescita del *Fusarium verticillioides* in test in vitro (4 giorni dopo l'inoculo)

Le concentrazioni di zeaxantina testate hanno variato tra 10 e 27,7 mg kg⁻¹, essendo questo il range di valori riscontrato nel calcolo della concentrazione della zeaxantina nei campioni oggetto di studio. Più in dettaglio, 6 giorni dopo l'inoculo, il diametro della colonia del fungo cresciuto su etanolo (controllo) misurava 5 cm, mentre le colonie del fungo inoculato in presenza di zeaxantina, mostravano una riduzione del

diametro con una misura di finale di 3 cm (figura 11) e senza grandi differenze tra i campioni a diverse concentrazioni di zeaxantina.

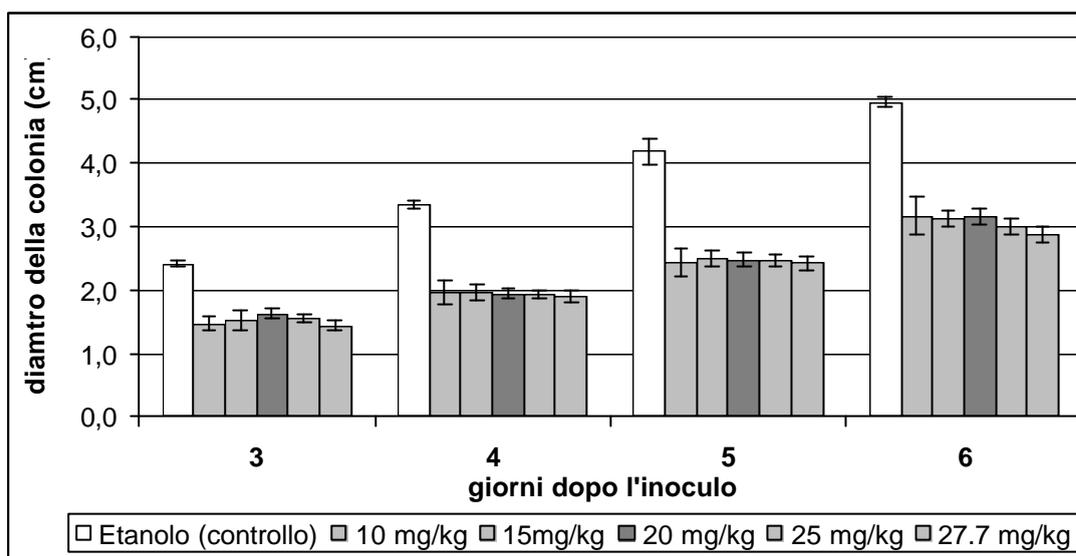


Figura 11: Effetto dei differenti livelli di zeaxantina sulla crescita radiale di *Fusarium verticillioides* (ceppo MRC826), inoculato su PDA, a 3, 4, 5 e 6 giorni dopo l'inoculo, confrontate con il controllo. Le barre di errore indicano \pm D.S.

La riduzione percentuale della crescita del fungo per effetto della zeaxantina (formula di Pandey et al, 1982), è stata calcolata con le concentrazioni di 10 e 27,7 mg kg⁻¹ e in media ha riportato valori di riduzione del 40,2% con la zeaxantina ad una concentrazione di 10 mg kg⁻¹ e 42% (valore medio) con la zeaxantina avente una concentrazione di 27,7 mg kg⁻¹ (Tabella 20).

Trattamento	3 giorni	4 giorni	5 giorni	6 giorni	Media totale della % di inibizione
Zeaxantina 10,0 mg kg⁻¹	39,7 ± 0,11	41,1 ± 0,19	41,8 ± 0,22	38,1 ± 0,31	40,2 ± 1,6
Zeaxantina 27,7 mg kg⁻¹	40,9 ± 0,08	43,3 ± 0,10	42,0 ± 0,11	41,9 ± 0,13	42,0 ± 0,9
I dati sono la media di quattro repliche					

Tabella 20: Percentuale di inibizione della crescita radiale (media ± DS) confrontata con il controllo (etanolo)

4.5 ANALISI DEI CAROTENOIDI NELLE FRAZIONI DELLA LAVORAZIONE DELLA GRANELLA DI MAIS

Le frazioni oggetto di studio, per ognuno dei genotipi allevati nell'anno 2004 e 2005, sono state:

- farina comune;
- semola per polenta;
- scarto della lavorazione della farina comune (scarto molino);
- scarto della lavorazione della semola per polenta (scarto semolatrice).

I dati sul contenuto totale di carotenoidi, nei campioni allevati nell'anno 2004, hanno mostrato che in tutte le frazioni di mais analizzate il genotipo numero 2 ha presentato i valori più alti eccetto che per lo scarto della farina comune (Tabella 21).

In tutti i campioni analizzati la luteina e la zeaxantina sono stati i carotenoidi più rappresentativi con concentrazioni che hanno variato per la luteina tra 0,0 e 11,1 mg kg⁻¹ calcolato sulla sostanza secca e, per la zeaxantina tra 0,0 e 13,9 mg kg⁻¹ calcolato sulla sostanza secca. Il range dei carotenoidi totali ha mostrato valori compresi tra 0,0 e 37,4. I valori sono la media di due repliche per campione.

I dati sul contenuto totale di carotenoidi, nei campioni allevati nell'anno 2005, hanno mostrato che in tutte le frazioni di mais analizzate il genotipo numero 2 ha rispecchiato l'andamento dell'anno precedente continuando a presentare i valori più alti eccetto che per lo scarto della farina comune (Tabella 22).

Anche la luteina e la zeaxantina hanno seguito l'andamento dimostrandosi i carotenoidi più rappresentativi con concentrazioni che hanno variato per la luteina, tra

0,0 e 32,9 mg kg⁻¹ calcolato sulla sostanza secca e, per la zeaxantina tra 0,0 e 35,1 mg kg⁻¹ calcolato sulla sostanza secca. Il range dei carotenoidi totali ha mostrato valori compresi tra 0,0 e 116,3. I valori sono la media di due repliche per campione.

Genotipo	Frazione	Luteina	Zeaxantina	Carotenoidi totali
1	Farina comune	6,5	7,5	20,1
2		9,3	10,1	29,4
3		2,0	6,0	12,6
4		10,6	6,2	25,2
1	Semola per polenta	4,9	5,8	15,1
2		6,7	8,2	21,7
3		1,7	5,3	11,2
4		7,2	4,0	16,1
1	Scarto del molino	0,0	0,0	0,0
2		0,0	0,0	0,0
3		0,0	0,0	0,0
4		1,1	0,5	2,2
1	Scarto della semolatrice	4,9	6,5	16,8
2		11,1	13,9	37,4
3		1,8	6,0	12,3
4		6,8	4,5	16,3

Tabella 21: contenuto (mg kg⁻¹) dei carotenoidi maggiormente rappresentativi e dei carotenoidi totali delle frazioni dei 4 genotipi di mais allevati nel 2004

Genotipo	Frazione	Luteina	Zeaxantina	Carotenoidi totali
1	Farina comune	9,4	35,1	83,5
2		32,9	31,1	116,3
3		17,2	16,5	56,1
4		31,2	13,5	75,3
1	Semola per polenta	4,5	19,1	44,7
2		18,6	23,3	74,1
3		14,2	16,6	50,8
4		18,9	8,3	44,6
1	Scarto del molino	0,0	0,8	1,2
2		1,3	1,5	4,2
3		0,8	0,0	1,3
4		3,5	1,5	7,8
1	Scarto della semolatrice	7,3	24,1	57,0
2		22,7	27,4	87,0
3		11,7	12,3	39,0
4		19,6	9,1	46,2

Tabella 22: contenuto (mg kg⁻¹) dei carotenoidi maggiormente rappresentativi e dei carotenoidi totali delle frazioni dei 4 genotipi di mais allevati nel 2005

4.6 RESA ALLA MACINAZIONE

Considerando l'alto contenuto in carotenoidi dello scarto prodotto dalla lavorazione della semola per polenta (scarto semolatrice), è stata calcolata la resa alla macinazione dei 4 genotipi allevati durante la campagna maidicola 2004 (tabella 23) e 2005 (tabella 24).

Genotipo	Produzione maidicola (t/ha)	Resa alla macinazione (%)				
		Farina comune	Semola per polenta	Scarto molino	Scarto semolatrice	Totale
1	1,86	19,9	76,1	1,3	2,7	100
2	3,33	17,3	78,4	1,2	3,1	100
3	3,22	14,3	50,2	1,2	4,3	100
4	2,02	23,3	70,8	1,4	4,5	100

Tabella 23: Produzione maidicola (t/ha) e resa alla macinazione (%) per i 4 genotipi allevati nel 2004

Genotipo	Produzione maidicola (t/ha)	Resa alla macinazione (%)				
		Farina comune	Semola per polenta	Scarto molino	Scarto semolatrice	Totale
1	2,69	14,9	79,2	3,9	2,0	100
2	2,67	14,7	78,8	3,3	3,2	100
3	3,02	15,5	81,1	2,6	0,8	100
4	3,75	17,9	77,1	2,9	2,1	100

Tabella 24: Produzione maidicola (t/ha) e resa alla macinazione (%) per i 4 genotipi allevati nel 2005

La produzione di sottoprodotti derivanti dalle lavorazioni di materiali agricoli, quali il mais, ha fatto aumentare l'interesse verso questi prodotti di scarto.

I dati ottenuti da questo studio e l'interesse per gli antiossidanti naturali e la possibilità di poterli recuperare ha portato ad evidenziare lo scarto della semolatrice come possibile fonte, a basso costo, di antiossidanti.

4.7 ANALISI DEI TOCOLI NELLE FRAZIONI DELLA LAVORAZIONE

DELLA GRANELLA DI MAIS DEL GENOTIPO n° 1

Le frazioni oggetto di studio, per il genotipo n°1 (scelto per un miglior comportamento durante le fasi di macinazione), allevato nell'anno 2005 sono state:

- farina comune;
- semola per polenta;

I dati sul contenuto totale di tocoli hanno mostrato che la frazione farina comune ha presentato i valori più alti (Tabella 25).

Il γ -tocoferolo si è dimostrato l'isomero più rappresentativo con concentrazioni che hanno variato tra 82,3 mg kg⁻¹ s.s. per la semola per polenta calcolato sulla sostanza secca, e 134,9 mg kg⁻¹ per la farina comune calcolato sulla sostanza secca. I valori sono la media di due repliche per campione.

Genotipo n°1	a - T	a - T3	b - T	g - T	b - T3	g - T3	d - T	d - T3	Tocoli totali
Farina comune	29,2	16,2	0,3	134,9	1,3	35,3	0,8	0,7	218,7
Semola per polenta	18,6	9,5	0,2	82,3	0,9	21,0	0,6	0,2	133,3

T = tocoferolo;
T3 = tocotrienolo

Tabella 25: contenuto in tocoli (mg kg⁻¹) nelle frazioni del genotipo n°1 allevato durante la campagna 2005

4.8 ANALISI DEGLI ANTIOSSIDANTI NELLA PASTA

I risultati sulla pasta, spaghetti, ottenuta miscelando in due diversi rapporti (30:70 e 15:85) la farina comune del genotipo n° 1, e essiccata a diverse temperature, sono stati confrontati con un campione di pasta contenente solo frumento duro.

Il contenuto in carotenoidi totali è risultato pari a 0,2 mg/100g s.s. per la pasta di sola semola di frumento duro. Valori più elevati, compresi tra 0,4 e 2,0 mg/100g s.s. sono stati registrati nelle altre tipologie di paste corrispondenti ad aggiunte del 15 o 30% di farina di mais, rispettivamente (tabella 26).

I diversi trattamenti termici a bassa e alta temperatura nella preparazione delle paste, arricchite con farina di mais, hanno evidenziato, come atteso, una riduzione nel contenuto in antiossidanti totali pari a circa il 40% imputabile a più elevate temperature di essiccazione.

Campione	Composizione pasta	Essiccazione	Carotenoidi totali (mg/100g s.s.)
Pasta di semola di frumento duro	100% semola di frumento duro	Alta temperatura	0,2
Pasta ottenuta con miscelazione di farina del genotipo n°1+frumento duro	15% mais + 85% frumento	Bassa temperatura	1,0
	15% mais + 85% frumento	Alta temperatura	0,4
	30% mais + 70% frumento	Bassa temperatura	2,0
	30% mais + 70% frumento	Alta temperatura	1,0

Tabella 26: contenuto in carotenoidi totali (mg/100g s.s.) su pasta di frumento duro e pasta ottenuta con miscelazione di farina del genotipo n°1 e semola di frumento duro

Il contenuto in tocoli totali ha seguito un andamento analogo. La pasta preparata con sola semola di frumento duro ha rivelato un contenuto in tocoli pari a 1,6 mg/100g s.s., l'aggiunta di farina di mais nella misura del 15 o 30% nella preparazione della pasta, fa aumentare il contenuto di questi composti a valori pari a 3,0 e 4,0 mg/100g s.s., rispettivamente (tabella 27). L'alta temperatura produce una riduzione nel contenuto in tocoli totali rispetto alla bassa temperatura, pari a circa il 38%; questo effetto è molto più evidente sulla pasta preparata con il 15% di aggiunta di farina di mais il cui contenuto in tocoli totali si riduce fino a 1,4 mg/100g s.s., valore inferiore anche alla pasta di farina di solo frumento duro.

Campione	Composizione pasta	Essiccazione	Tocoli totali (mg/100g s.s.)
Pasta di semola di frumento duro	100% semola di frumento duro	Alta temperatura	1,6
Pasta ottenuta con miscelazione di farina del genotipo n°1+frumento duro	15% mais + 85% frumento	Bassa temperatura	3,0
	15% mais + 85% frumento	Alta temperatura	1,3
	30% mais + 70% frumento	Bassa temperatura	4,1
	30% mais + 70% frumento	Alta temperatura	2,4

Tabella 27: contenuto in tocoli totali (mg/100g s.s.) su pasta di frumento duro e pasta ottenuta con miscelazione di farina del genotipo n°1 e semola di frumento duro

La pasta a più elevato contenuto in antiossidanti è stata ottenuta miscelando semola di frumento duro con farina di mais nel rapporto (70:30) e essiccata a bassa temperatura.

4.9 CAPACITA' ANTIOSSIDANTE TOTALE (TAC)

Il risultato sul contenuto in antiossidanti mostra che la pasta ottenuta miscelando semola di frumento duro con farina di mais nel rapporto (70:30) e essiccata a bassa temperatura è quella con la concentrazione più elevata, come è stato anche confermato dall'analisi sulla capacità antiossidante totale (TAC).

Il suddetto tipo di pasta ha mostrato il valore di TAC più alto, 0,61 TAA mmoliTrx/kg .

Nella tabella 28 si evince che l'essiccazione ad elevata temperatura riduce drasticamente la TAC delle paste con mais, che mostrano valori confrontabili con la pasta di semola di frumento duro (controllo). Al contrario, le paste essiccate a basse temperature mostrano valori di TAC più alti rispetto al controllo.

Campione	Composizione pasta	Essiccazione	TAA mmoliTrx/Kg	Dev.St.
Pasta di semola di frumento duro	100% semola di frumento duro	Alta temperatura	0,05	0,01
Pasta ottenuta con miscelazione di farina del genotipo n°1+frumento duro	15% mais + 85% frumento	Bassa temperatura	0,15	0,01
	15% mais + 85% frumento	Alta temperatura	0,08	0,02
	30% mais + 70% frumento	Bassa temperatura	0,61	0,18
	30% mais + 70% frumento	Alta temperatura	0,09	0,03

Tabella 28: capacità antiossidante totale (TAC)

4.10 ANALISI DEGLI ANTIOSSIDANTI NELLA PASTA DOPO COTTURA

Il contenuto in carotenoidi e tocoli nella pasta (spaghetti), ottenuta miscelando nel rapporto 30:70 la farina comune del genotipo n° 1 e frumento duro, e essiccata a diverse temperature, è stato determinato dopo cottura e liofilizzazione dei campioni.

Il contenuto in carotenoidi totali non ha dimostrato significative differenze in relazione alla temperatura di essiccazione della pasta. I valori sono risultati pari a 0,86 mg/100g s.s. per la pasta essiccata a bassa temperatura e 0,83 mg/100g s.s. per quella essiccata ad alte temperature (tabella 29).

Pasta con 30% mais + 70% frumento	Luteina	Zeaxantina	Totale carotenoidi
Bassa temperatura	0,29	0,30	0,86
Alta temperatura	0,33	0,27	0,83

Tabella 29: concentrazione di carotenoidi (mg/100g s.s.) in pasta ottenuta con miscelazione del 30% di farina del genotipo n°1 e semola di frumento duro, essiccata a diverse temperature, dopo cottura

Il contenuto in tocoli, come riportato in tabella 30, sembra essere influenzata dal trattamento termico. Per ogni isomero si osserva dopo trattamento ad alte temperature una concentrazione inferiore rispetto al processo a basse temperature.

I valori dei tocoli totali sono risultati pari a 1,92 mg/100g s.s. per la pasta essiccata a bassa temperatura e 1,51 mg/100g s.s. per quella essiccata ad alte temperature.

Pasta con 30% mais + 70% frumento	a - T	a - T3	b - T	g - T	b - T3	g - T3	d - T	d - T3	Tocoli totali
Bassa temperatura	0,57	0,13	0,19	0,19	0,60	0,22	0,00	0,02	1,92
Alta temperatura	0,42	0,09	0,13	0,12	0,41	0,12	0,00	0,02	1,51
T = tocoferolo; T3 = tocotrienolo									

Tabella 30: concentrazione di tocoli (mg/100g s.s.) in pasta ottenuta con miscelazione del 30% di farina del genotipo n°1 e semola di frumento duro, essiccata a diverse temperature, dopo cottura

Confrontando i risultati delle analisi sui carotenoidi e tocoli, prima e dopo la cottura della pasta, è stata osservata una diminuzione del contenuto degli antiossidanti imputabile alla degradazione termica (figura 12).

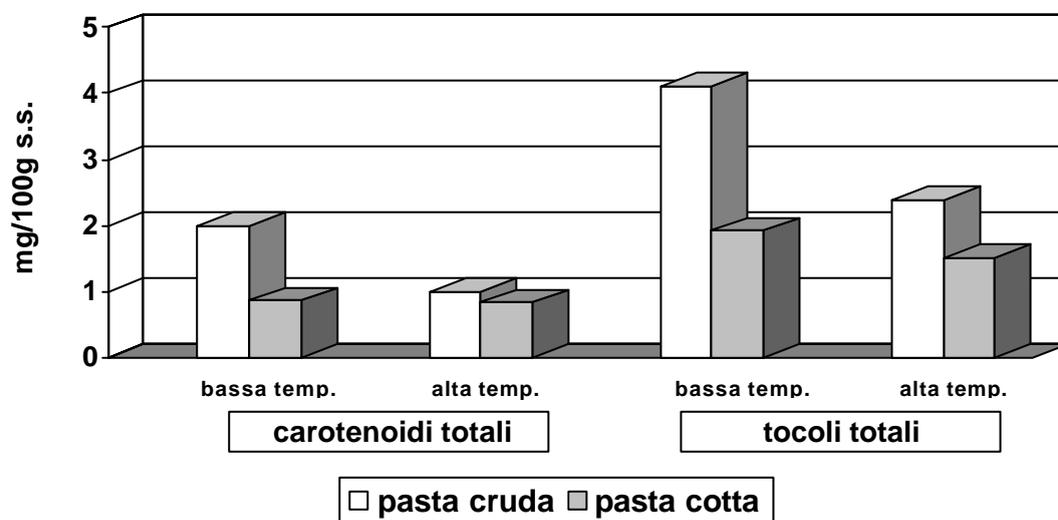


Figura 12: confronto tra la concentrazione totale di carotenoidi e tocoli (mg/100g s.s.) in pasta ottenuta con miscelazione del 30% di farina del genotipo n°1 e semola di frumento duro, essiccata a diverse temperature, prima e dopo la cottura

5.

CONCLUSIONI

Scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di monitorare alcuni genotipi di mais, selezionati per il loro elevato contenuto in carotenoidi, per quanto riguarda la relazione tra i valori di concentrazione di carotenoidi e tocoli (antiossidanti del mais) e la presenza di micotossine (fumonisine, aflatossina B1, zearalenone, deossinivalenolo).

Si è trovato che, nelle campagne maidicole 2004 e 2005, si è mantenuto l'elevato contenuto in carotenoidi, e nel 2005, dopo l'ottimizzazione del metodo di analisi, si è confermato anche l'elevato contenuto in tocoli.

Analizzando il contenuto in micotossine, si è osservata una correlazione significativa e negativa tra la presenza di zeaxantina e l'accumulo di fumonisina (correlazione confermata anche dall'analisi su ulteriori campioni di mais diversi da quelli oggetto di studio).

L'influenza della concentrazione di zeaxantina (l'antiossidante presente in maggiore quantità nel mais) sul livello di inibizione di crescita del fungo *Fusarium verticillioides* (responsabile della produzione di fumonisina nel mais) è stata valutata mediante test *in vitro*. Questi hanno confermato che, per concentrazioni di zeaxantina compresi tra 10 e 27,7 mg kg⁻¹ (range di concentrazione riscontrato nei genotipi di mais oggetto di studio), la crescita radiale del fungo viene ridotta. Rimane da investigare il limite minimo di concentrazione necessaria per inibire la crescita del fungo e l'eventuale correlazione tra crescita di *F. verticillioides* e la produzione di tossina.

Nell'ottica di una valorizzazione degli scarti della lavorazione del mais, si è analizzato il contenuto in antiossidanti delle diverse frazioni derivanti dal processo: farina comune e semola per polenta (prodotti nobili), scarto del molino e scarto della semolatrice (sottoprodotti). I risultati, insieme alle rese di macinazione, hanno

evidenziato l'interessante possibilità di recuperare la zeaxantina dallo scarto di lavorazione della semola per polenta.

Infine, dato il crescente interesse verso alimenti funzionali o, comunque, con un elevato contenuto in antiossidanti, si è investigato l'aggiunta di farina di mais a quella di frumento duro per la produzione di pasta secca. I risultati hanno dimostrato che la pasta addizionata con la farina comune di mais presenta un contenuto più alto sia in carotenoidi sia in tocoli, rispetto a quella prodotta con sola farina di frumento (2 mg/100 g s.s. contro 0.2 mg/100g s.s. per i carotenoidi, e 4.1 mg/100g s.s. contro 1.6 mg/100g s.s. per i tocoli).

Anche l'analisi della capacità antiossidante totale ha indicato valori più alti per la pasta contenente mais. Inoltre le paste analizzate erano state prodotte secondo due differenti sistemi di essiccazione, uno a bassa temperatura, ed uno ad alta temperatura. Dai dati è emerso chiaramente come le alte temperature portino ad una riduzione sia del contenuto in antiossidanti, sia dell'attività antiossidante. Tuttavia, analizzando i rispettivi campioni di pasta dopo cottura, si è osservata una sostanziale perdita di antiossidanti, decisamente più marcata nei prodotti essiccati a bassa temperatura, portando a valori finali simili per le due tipologie di pasta.

Questo sembra suggerire che il processo di essiccazione ad alta temperatura porti ad una riduzione maggiore in antiossidanti rispetto a quello a bassa temperatura, con un prodotto, però, in grado di trattenere meglio tali composti in fase di cottura. Tale ipotesi necessita di ulteriori studi di verifica.

6.

**ELENCO DELLE TABELLE E
DELLE FIGURE**

6.1 ELENCO DELLE TABELLE

- 1:** produzione totale di granella di mais in Italia (milioni di tonnellate), negli anni 2001-2003 (Fonte: Elaborazioni su dati congiunturali ISTAT) (pag. 9)
- 2:** composizione chimica delle principali parti che costituiscono la cariosside di mais (pag. 10)
- 3:** sottospecie di *Zea mays* (pag. 11)
- 4:** contenuto % della frazioni amilosio e amilopectina in diversi tipi di mais (mais, mais *waxy*, mais *amylose extender*) (pag. 12)
- 5:** livelli massimi di aflatossine (previsti da regolamenti UE n. 466/01, 2174/03 e 683/04), deossinivalenolo, zearalenone e fumonisine (previsti dal regolamento UE n 856/05) in mais e prodotti derivati o base di mais (pag. 15)
- 6:** fattori ambientali che influenzano la crescita fungina (pag. 24)
- 7:** esempi di derrate alimentari contaminate in modo preferenziale da parte di alcune specie fungine (pag. 25)
- 8:** tabella riassuntiva sui funghi produttori, micotossine prodotte e effetti clinici che le micotossine causano nell'uomo e negli animali (pag. 29)
- 9:** caratteristiche spettrofotometriche degli standard dei carotenoidi (pag. 50)
- 10:** rette di calibrazione degli standard dei carotenoidi (pag. 51)
- 11:** gradiente di concentrazione della fase mobile nell'analisi HPLC dei carotenoidi (pag. 55)
- 12:** contenuto in carotenoidi (mg kg^{-1}) nelle farine integrali dei 4 genotipi oggetto di studio allevati durante la campagna 2004 (pag. 70)

- 13:** percentuale di umidità dei campioni di farina integrale allevati durante la campagna 2004 (pag. 71)
- 14:** contenuto in carotenoidi (mg kg^{-1}) nelle farine integrali dei 4 genotipi oggetto di studio allevati durante la campagna 2005 (pag. 71)
- 15:** percentuale di umidità dei campioni di farina integrale allevati durante la campagna 2005 (pag. 72)
- 16:** contenuto in tocoli (mg kg^{-1}) nelle farine integrali dei 4 genotipi oggetto di studio allevati durante la campagna 2005 (pag. 75)
- 17:** contenuto di fumonisina e zearalenone nei 4 genotipi oggetto di studio (i risultati sono le medie di due repliche) (pag. 76)
- 18:** coefficiente di correlazione semplice (r) tra contenuto in antiossidanti e accumulo di fumonisine (pag. 77)
- 19:** contenuto di zeaxantina (mg kg^{-1}) e fumonisina ($\mu\text{g ml}^{-1}$) nei 16 genotipi di mais scelti per verifica (pag. 78)
- 20:** percentuale di inibizione della crescita radiale ($\text{media} \pm \text{DS}$) confrontata con il controllo (etanolo) (pag. 83)
- 21:** contenuto (mg kg^{-1}) dei carotenoidi maggiormente rappresentativi e dei carotenoidi totali delle frazioni dei 4 genotipi di mais allevati nel 2004 (pag. 85)
- 22:** contenuto (mg kg^{-1}) dei carotenoidi maggiormente rappresentativi e dei carotenoidi totali delle frazioni dei 4 genotipi di mais allevati nel 2005 (pag. 86)

- 23:** Produzione maidicola (t/ha) e resa alla macinazione (%) per i 4 genotipi allevati nel 2004 (pag. 87)
- 24:** produzione maidicola (t/ha) e resa alla macinazione (%) per i 4 genotipi allevati nel 2005 (pag. 87)
- 25:** contenuto in tocoli (mg kg^{-1}) nelle frazioni del genotipo n°1 allevato durante la campagna 2005 (pag. 89)
- 26:** contenuto in carotenoidi totali ($\text{mg}/100\text{g s.s.}$) su pasta di frumento duro e pasta ottenuta con miscelazione di farina del genotipo n°1 e semola di frumento duro (pag. 90)
- 27:** contenuto in tocoli totali ($\text{mg}/100\text{g s.s.}$) su pasta di frumento duro e pasta ottenuta con miscelazione di farina del genotipo n°1 e semola di frumento duro (pag. 91)
- 28:** capacità antiossidante totale (TAC) (pag. 92)
- 29:** concentrazione di carotenoidi ($\text{mg}/100\text{g s.s.}$) in pasta ottenuta con miscelazione del 30% di farina del genotipo n°1 e semola di frumento duro, essiccata a diverse temperature, dopo cottura (pag. 93)
- 30:** concentrazione di tocoli ($\text{mg}/100\text{g s.s.}$) in pasta ottenuta con miscelazione del 30% di farina del genotipo n°1 e semola di frumento duro, essiccata a diverse temperature, dopo cottura (pag. 94)

6.2 ELENCO DELLE FIGURE

1. formula di struttura dei principali carotenoidi contenuti nella granella di mais (pag. 19)
2. struttura chimica dei quattro isomeri di tocoferoli e tocotrienoli (pag. 20)
3. contaminazione da micotossine in pieno campo (pag. 36)
4. genotipi oggetto di ricerca (pag. 41)
 - a. genotipo n° 1
 - b. genotipo n° 2
 - c. genotipo n° 3
 - d. genotipo n° 4
5. frazioni della lavorazione del mais (pag. 43)
 - a. farina comune
 - b. semola per polenta
 - c. scarto molino
 - d. scarto semolatrice
6. spaghetti ottenuti dalla miscelazione di semola di grano duro e farina di mais del genotipo n°1 (pag. 43)
7. spore di *Fusarium verticillioides* fotografate al microscopio elettronico (pag. 63)
8. cromatogramma di riferimento degli otto standard di tocoli (pag. 74)
9. effetto dell'etanolo sulla crescita radiale di *Fusarium verticillioides* (ceppo MRC826), a 3, 4, 5 e 6 giorni dopo l'inoculo, confrontate con acqua sterile (controllo) (pag. 80)

10. esempio di crescita del *Fusarium verticillioides* in test *in vitro* (4 giorni dopo l'inoculo) (pag. 81)
11. effetto dei differenti livelli di zeaxantina sulla crescita radiale di *Fusarium verticillioides* (ceppo MRC826), inoculato su PDA, a 3, 4, 5 e 6 giorni dopo l'inoculo, confrontate con il controllo (pag. 82)
12. confronto tra la concentrazione totale di carotenoidi e tocoli (mg/100g s.s.) in pasta ottenuta con miscelazione del 30% di farina del genotipo n°1 e semola di frumento duro, essiccata a diverse temperature, prima e dopo la cottura (pag. 94)

7.

BIBLIOGRAFIA

- Abel S, Gelderblom WC. 1998. Oxidative damage and fumonisin B1-induced toxicity in primary rat hepatocytes and rat liver in vivo. *Toxicology*, 131:121-131.
- Amadioha AC. 2000. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachta indica*. *Crop Protection*, 19:287-290.
- Atroshi F, Rizzo A, Westermarck T, Ali-Wehmas T. 2002. Antioxidants nutrients and mycotoxins. *Toxicology*, 180:151-167.
- Azzi A, Boiscoboinik D, Marillehy D, Ozen NK, Staubler B, Tapinato A. 1995. Vitamin E: A Sensor and an Information Trasducer of the Cell Oxidation State. *Am J Clin Nutr*, 62(suppl):1337s-1346s.
- Basu HN, Del Vecchio A, Flider F, Orthoefer FT. 2001. Nutritional and potential disease prevention properties of carotenoids. *J Am Oil Chem Soc*, 78:665-675.
- Bender DA. 1992. Vit A: Retinol and β -carotene. In: *Nutritional and Biochemistry of the Vitamins*. Cambridge University Press, pp 9-50. U.K.
- Bertolini M, Berardo N, Previtali F, Verderio A, Ferrero M, Lorenzoni C, Motto M. 1999. Nuove linee di mais per la costituzione di ibridi ad elevato tenore in amilosio. *Rivista di Sementi Elette*, 2:13-17.
- Betina V. 1984. Biological effect of mycotoxins. In Betina V. (Ed.), *Mycotoxins production, Isolation, Separation and Purification*. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands, pp. 25-26.
- Bottalico A. 1987. Micotossine nelle piante e nelle derrate agrarie: origine e sviluppo delle contaminazioni. *Assazoo*, Quaderno n° 33.
- Bottalico A. 1998. *Fusarium* disease of cereals: species complex and related mycotoxin profile in Europe, *J of Plant Pathology*. 80(2):85-103.

- Bryngelsson S, Mannerstedt-Fogelfors B, Kamal.Eldin A, Andersson R, H Dimberg L. 2002. Lipids and antioxidants in groats and hulls of Swedish oats (*Avena sativa* L), J Sci Food Agric, 82:606-614.
- Buratti S, Pellegrini N, Brenna OV, Mannino S. 2001. Rapid electrochemical method for the evaluation of the antioxidants power of some lipophilic food extracts, J of Agr and Food Chem, 49:5136-5141.
- Burton GW, Traber MG. 1990. Vitamin E: antioxidants activity, biokinetics and bioavailability. Annu Rev Nutr, 10:357-382.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology). 2003. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems, Task Force Report, ISSN 0194, n. 139.
- Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, Southwell G, Keely PT, Duncan MW, Ames BN. 1997. α -tocopherol Trap Mutagenic Electrophiles Such as NO_x and Complementary α -tocopherol: Physiological Implication. Proc Natl Acad Sci, 94:3217-3222.
- Combs GF Jr. 1992. The vitamins. Academic Press. San Diego.
- Devegowda G, Raju MVLN, Swamy HVLN. 1998. Mycotoxins: novel solution for their counteraction. Feedstuff 70, December 7:12-15.
- Dowd P, Zheng ZB. 1995. On the Mechanism of the Anticlotting Action of Vitamin E Quinone. Proc Natl Acad Sci USA, 92:8171-8175.
- Earle FR, Curtis JJ, Hubbard JE. 1946. Composition of the component parts of the corn kernel. Cereal Chemistry, 23:504.

- Eberlein-Konig B. 1998. Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d-alpha tocopherol (vitamin E). *J Am Acad Dermatol*, 38:45-48.
- Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Stengl G, Waeg G. 1991. Role of Vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr*, 53:314s-321s.
- Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. 1990. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest*, Volume: 62, pp 670-679.
- FAO/WHO. 1995. Application of risk analysis to food standards issues. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, Geneva , 13-17 March.
- Galvano F, Piva A, Ritieni A, Galvano G. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J Food Protec*, 64:120-131.
- Gautier JC, Holzhaeuser D, Markovic J, Gremaud E, Schilter B, Turesky RJ. 2001. Oxidative damage and stress response from ochratoxin a exposure in rats. *Free Radic Biol Med*, 30:1089-1098.
- Giardini A 1989. Mais o granoturco (*Zea mays*). In: *Coltivazioni erbacee* (Ed. Patron), pp. 67-96. Bologna.
- Goodwin TW. 1976. Distribution of carotenoids. In: *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Goodwin TW ed. Vol 1, pp 225-261. New York.
- Goodwin TW. 1977. The prenyl lipids of the membranes of higher plants. In: *Lipids and lipid polymers in higher plants*. Tevini M, Lichtenthaler HK ed., pp 29-47. Berlin, Heidelberg, New York.

- Goodwin TW. 1980. Biochemistry of the carotenoids, 2nd ed. Vol I. London: Chapman & Hall. London.
- Grams GW, Blessin CW, Inglett GE. 1970. Distribution of Tocopherols Within the Corn Kernel. *J Am Oil Chem Soc*, 47:337-339.
- Groff JL, Gropper SS, Hunt SM. 1995. The Fat Soluble Vitamins. In: *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. West Publishing Co, pp 284-312. New York.
- Halliuel B, Gutteridge JMC. 1989. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press.
- Janick-Buckner D, O'Neal J, Joyce EK, Buckner B. 2001. Genetic and biochemical analysis of the y9 gene of maize, a carotenoid biosynthetic gene. *Maydica*, 46:41-46.
- Kamal-Eldin A, Görgen S, Pettersson J, Lampi AM. 2000. Normal-Phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols. Comparison of different chromatographic columns. *J Chromatogr A*, 881:217-227.
- Krinsky NI. 1989. Antioxidants function of carotenoids. *Free rad Biol Med*, 627-635.
- Krinsky NI. 1998. The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Ann NY Acad Sci*, 854:443-447.
- Kurilich AC, Juvik JA. 1999a. Quantification of Carotenoid and Tocopherol Antioxidants in *Zea Mays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:1948-1955.

- Kurilich AC, Juvik JA. 1999b. Simultaneous Quantification of Carotenoid and Tocopherol in Corn Kernel Extract by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Rel Technologies*, 22(19):2925-2934.
- Lang K, Schillaci M, Irvin B. 1992. Vitamin E. In: *Modern Chromatographic analysis of vitamins* (Ed. De Leenheer AP, Lambert WE and Neli HJ), Chromatographic Science Series, vol. 60.
- Langeseth L. 1995. Oxidants and antioxidants. ILSI Europe Concise Monograph Series. Washington, DC, ILSI Press.
- Meydani SN. 1995. Vitamin E Enhancement of T Cell-mediated Function in Heath Elderly: Mechanisms of Action. *Nutr Rev*, 53, S52.
- Moreno OJ, Kang MS. 1999. Aflatoxin in maize: The problem and genetic solution. *Plant Breeding*, 118:1-16.
- Moretti A, Corazza L, Balmas V, Santori A, Ritieni A. 2002. Funghi tossigeni e micotossine: filiera cerealicola. *Informatore fitopatologico*, 12:17-22.
- Moss GP, Weedon BCL. 1976. Chemistry of carotenoids. In: *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Goodwin TW ed. Vol 1, pp 149-224. New York.
- Muggli R. 1993. Free radicals tissue damage: the prospective role of antioxidant nutrients. In: *Free radicals and antioxidants in nutrition*, Richelieu Press, pp 189-201. London.
- Munkvold GP. 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review Phytopathology*, 41:99-116.

- Pandey DK, Tripathi NN, Tripathi RD, Dixit SN. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptis suaveolens*, *Z. Pflkrankh, Pflschutz.* 89:344-349.
- Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK. 1999. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 26:746-761.
- Panfili G, Frattiani A, Irano M. 2003. Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography Method for the determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals. *J Agric Food Chem*, 51(14):3940-3944.
- Pisacane V, Redaelli R, Motto M, Berardo N. 2003. Caratterizzazione per il contenuto in carotenoidi di una “core collection” europea di mais. 5 ° Convegno AISTEC, Porto Conte Ricerche, Tramariglio – Alghero, 26 – 28 Giugno 2003. p. 53.
- Pisacane V, Redaelli R, Berardo N. 2004. Reducing time analysis for the determination of tocopherols in cereals by Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography. *J Genet & Breed*, 58:253-258.
- Pompella A. 1997. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation *Int J Vit Nutr Res*, 67:289-297.
- Pryor WA. 1976. *Free radicals in biology*. Vol 1,3 Academic press, New York.
- Pyca A and Sliwiok J. 2001. Chromatographic separation of tocopherols. *J Chromatogr A*. 935: 71-76.

- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10):1231-1237.
- Regolamenti UE n° 466/01, 2174/03, 683/04 e 856/05.
- Reid LM, Bolton AT, Hamilton RI, Woldermariam T, Mather DE. 1992. Effect of silk age on resistance of maize to *Fusarium graminearum*. *Can. Journal of Plant Pathology*, 14:293-298.
- Rupérez FJ, Martín D, Herrera E, Barbas C. 2001. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. *J Chromatogr A*, 935:45-69.
- Sandmann G. 2001. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends in Plant Science*, 6:14-17.
- Serbinova E, Kagan V, Han D, Packer L. 1991. Free Radical Recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of α -tocopherol and α -tocotrienol. *Free Radical Biology & Medicine*, 10:263-275.
- Sies H, Stahl W. 1995. Vitamins E and C, β -carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *Am J Clin Nutr*, 62:1315s-1321s.
- Suarna C, Hood RL, Dean, RT, Stocker R. 1993. Comparative antioxidant activity of tocotrienols and other natural lipid-soluble antioxidants in a homogeneous system, and in rat and human lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1166:163-170.
- Surai PF, Dvorska JE, Sparks NHC, Jacques KA. 2002. Impact of mycotoxins on the body's antioxidant defence. *Proceedings of Alltech's 18th Annual*

Symposium: Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. May, Lexington, Kentucky, USA. (Lyons T.P. and Jacques K.A. ed) Nottingham University Press, p. 16.

- Surai PF, Dvorska JE. 2005. Effects of mycotoxins on antioxidants status and immunity. In: The Mycotoxins. Blue Book, Ed. By Duarte Diaz. Nottingham University Press, pp. 93-137.
- Thompson DP. 1991. Effects of butylated Hydroxyanisole on conidal germination of toxigenic species of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, 54:375-377.
- Thompson DP. 1992. Inhibition of mycelial growth of mycotoxigenic fungi by phenolic antioxidants. *Mycologia*, 54:791-793.
- Thompson DP. 1994. Minimum inhibitor concentration of esters of *p*-hydroxybenzoic acid (paraben) combinations against toxigenic fungi. *Journal of Food Prot*, 57:133-135.
- Thompson DP, Metevia L, Vessel T. 1993. Influence of pH alone and in combination with phenolic antioxidants on growth and germination of mycotoxigenic species of *Fusarium* and *Penicillium*. *Journal of Food Prot*, 56:134-138.
- Torres AM, Ramirez ML, Arroyo M, Chulze SN, Magan N. 2003. Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. *Int J of Food Microb*, 83:319-324.

- Weber EJ. 1987a. Lipids of the kernel. In: Corn chemistry and technology (Ed. S.A. Watson), pp. 311-349. American Ass. of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN, USA.
- Weber EJ. 1987b. Carotenoids and Tocols of Corn Grain Determined by HPLC. J Am Oil Chem Soc, 64:1129-1134.
- White PJ. 2001. Properties of corn starch. In: Specialty corn (Ed. A.R. Hallauer), pp. 33-62, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Widstrom NW. 1996. The aflatoxin problem with corn grain. In: Advances in agronomy. D. Sparks Ed., Academic press, New York, pp. 219-280.
- Wilson CM. 1987. Proteins of the kernel. In: Corn chemistry and technology (Ed. S.A. Watson). American Ass. of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN, USA, pp. 273-310.
- Wood GE. 1992. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. Journal of Animal Science 70: 3941-3949.
- Yin JJ, Smith MJ, Eppley RM, Page SW, Sphon JA. 1998. Effects of fumonisin B1 on lipid peroxidation in membranes. Biochim Biophys Acta, 1371:134-142.

Ringraziamenti

Grazie alla dr.ssa Giorgia Spigno, che mi ha seguito durante il lavoro di dottorato.

Un ringraziamento al C.R.A. – Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura di Bergamo dove questo lavoro di tesi è stato svolto ed in particolare alla dr.ssa Chiara Lanzanova per l'amicizia e l'affetto dimostratomi e le indispensabili indicazioni nei test *in vitro*, la signora Renata Agnesina per l'insostituibile aiuto nei test ELISA, il dott. Nicola Berardo e il direttore dott. Mario Motto per l'uso delle strutture e dei materiali dell'istituto.



Infine, ma non per ultimi, Roberto (il mio amato), Anna&Fabrizio, mammaRita&papàAlfonso, Vanna, ElenaFranco&Martina, Irina&Max, Silvia&Dedo, Viola, Gadda, MarcoBarba, Raul, Tiziana, Emilio, Mariangela&Elena, Francesca e tanti tanti altri perché mi vogliono bene.