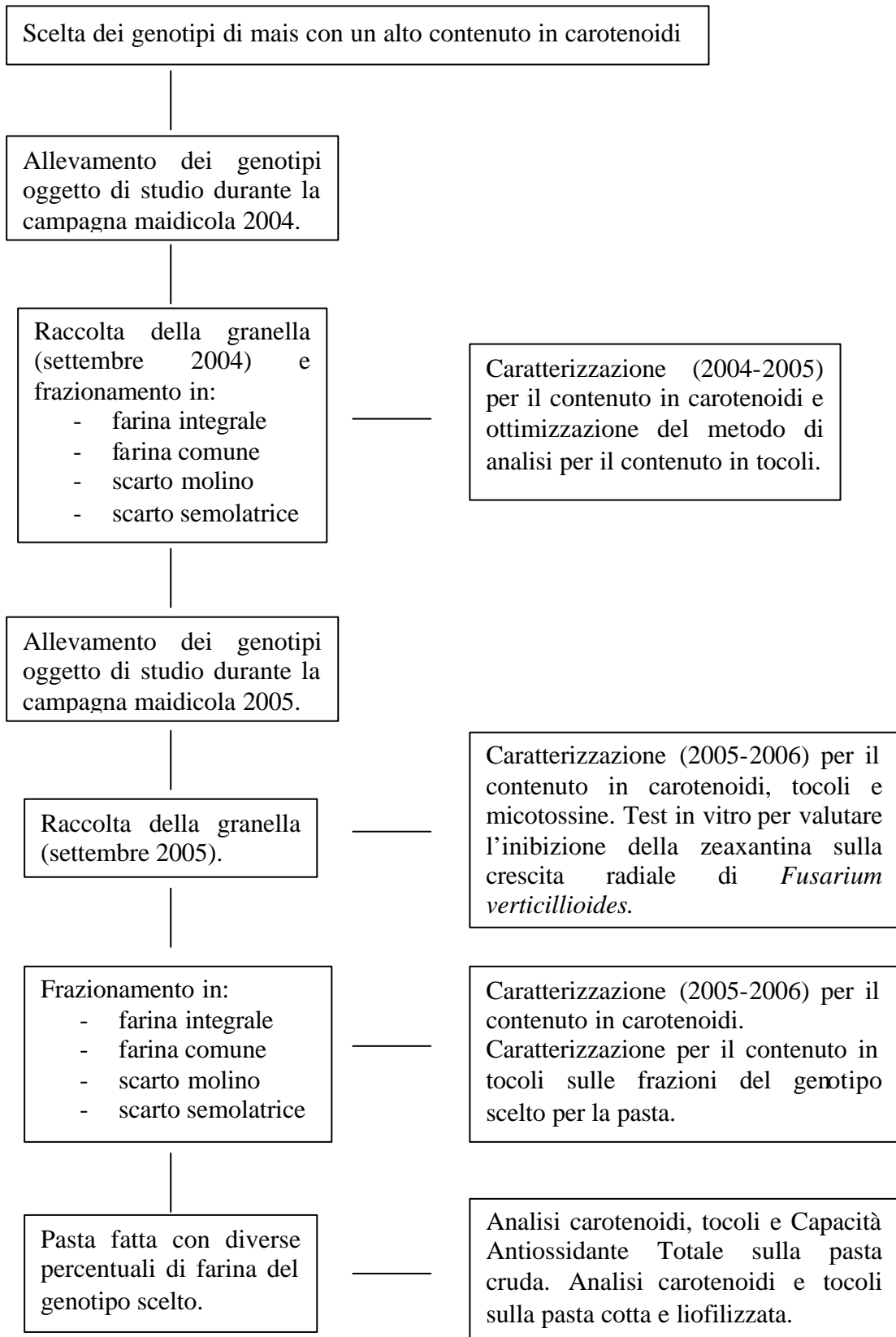


**3.**

## **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

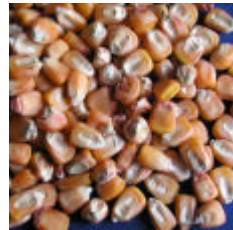


Figura 4c: genotipo n° 3



Figura 4d: genotipo n° 4

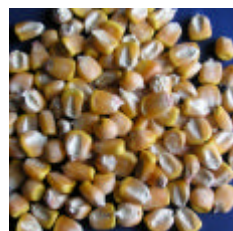


Figura 4: genotipi oggetto di ricerca

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/m<sup>2</sup>.

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

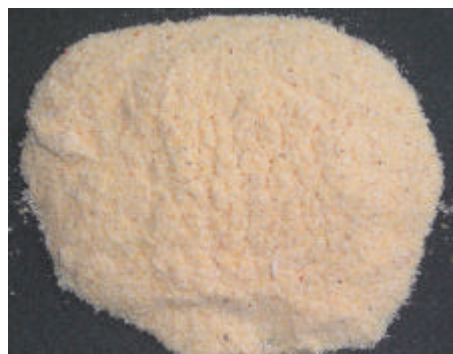


Figura 5b: semola per polenta



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).

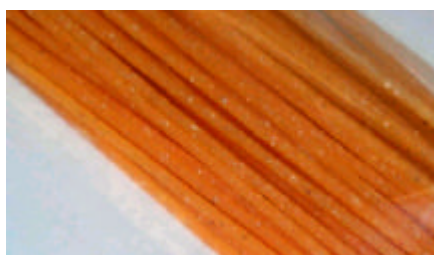


Figura 6: spaghetti ottenuti dalla miscelazione di semola di grano duro e farina di mais del genotipo n°1

## **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 Tetraidrofurano (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  $\mu$ l di benzene e 20  $\mu$ l di cantaxantina e leggere contro bianco di benzene);
- aggiungere al campione 70  $\mu$ l 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 imbuto 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 Ultraturax (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  $\mu$ l 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).

<b>Standard</b>	<b>Coefficiente di estinzione molare (<math>e^{\%}</math>)</b>	<b>Lunghezza d'onda di lettura allo spettrofotometro</b>	<b>Solvente</b>
Cantaxantina	$e^{\%} = 2095$	480 nm	Benzene
$\beta$ -criptoxantina	$e^{\%} = 2369$	452 nm	Etere di petrolio
Luteina	$e^{\%} = 2550$	445 nm	Etanolo
Zeaxantina	$e^{\%} = 2480$	452 nm	Etanolo
a-carotene	$e^{\%} = 2800$	444 nm	Etere di petrolio
$\beta$ -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.

<b>Composto</b>	<b>Range di linearità (mg/l)</b>	<b>Equazione della retta di calibrazione</b>	<b>Coefficiente di correlazione (R<sup>2</sup>)</b>
<b>cantaxantina</b>	1-10	$y = 2,0055x$	0,998
<b>β-criptoxantina</b>	1-10	$y = 2,7854x + 0,0706$	0,998
<b>Luteina</b>	1-10	$y = 2,4034x$	0,999
<b>Zeaxantina</b>	1-10	$y = 2,2889x$	0,999
<b>β-carotene</b>	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  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, d-tocoferolo e  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, 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  $\mu$ l) con una soluzione composta da esano:1,4-diossano (95:5 v/v) in modo da avere concentrazioni note (5 mg  $\text{kg}^{-1}$  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:

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

### **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: C<sub>30</sub> YMC-Pack Carotenoid (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) con pre-colonna C<sub>18</sub> 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%.



<b>Tempo (min)</b>	<b>Flusso (ml min<sup>-1</sup>)</b>	<b>% solvente A</b>	<b>% solvente B</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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l di enzima coniugato in ogni pozzetto;
- aggiungere 50  $\mu$ l 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  $\mu$ 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l di enzima coniugato in ogni pozzetto;
- aggiungere 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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<sup>-1</sup>. Come controllo sono state utilizzate piastre sulle quali erano stati stesi 150  $\mu$ 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<sup>+</sup>, 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®.