



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA NUTRIZIONE

**Varietà pigmentate di *Zea mays* L.:
caratterizzazione del profilo fenolico e
potenzialità di impiego nella dieta senza
glutine**

Dottorando:
Francesca COLOMBO

Tutor:
Prof.ssa Patrizia RESTANI

Coordinatore del dottorato:
Prof. Coordinator Luciano PINOTTI

2019 – XXXII



Celiac disease is an autoimmune disease triggered, in genetically-disposed individuals, by the ingestion of prolamins, a protein complex present in different cereals, such as wheat, rye, and barley. Some studies suggest that the oxidative stress is one of the mechanisms responsible for the gluten toxicity. The gluten-free diet is the only universally accepted treatment for celiac disease; although the dietetic offer for celiac subjects has improved significantly in quality and quantity, an improvement in the nutritional, sensorial and functional quality of gluten-free products is still necessary. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the diet are important for all consumers, but are particularly critical for celiac patients who show intestinal inflammation even when the gluten-free diet is followed.

Pigmented corns are naturally gluten free cereals mainly cultivated in South America and not widespread through Europe. They are rich in anthocyanins, active molecules with known antioxidant and antiradical activities; for the content in these active molecules, pigmented corns could be included among ingredients of new gluten-free products. To evaluate this possibility, different corn samples were included in this study: one purple corn (used for animal feeding), three yellow varieties (suitable for human consumption) and three pigmented varieties obtained by the crossbreeding between the purple and the yellow varieties. The crossbreeding process was performed in order to obtain pigmented varieties suitable for human diet and for the cultivation in temperate climate areas.

The first tier of the research plan consisted of the chemical characterization of cereal samples and the parallel evaluation of their antioxidant activity, applying both spectrophotometric and chromatographic (HPTLC, LC-MS e HPLC-DAD) techniques. The pigmented varieties were compared to both parental varieties (yellow and purple corns) for their phenolic profile in terms of free (phenolic acids and anthocyanins) and bound (phenolic acids) phenolic compounds. A good correlation between total polyphenol content and the antioxidant activity of samples was observed.

After the chemical characterization, the human gastro-intestinal digestion was mimicked by an *in vitro* model, in order to monitor the stability of anthocyanins at intestinal level. Finally, different cellular tests (cell agglutination test and the measure of transepithelial electrical resistance) were performed, confirming the safety of these new pigmented varieties for the celiac subjects.

The methods developed in this study are important tools to characterize corn samples and to investigate about the role of polyphenols in the modulation of chronic inflammatory conditions in celiac subjects. The results obtained in this project could contribute to inclusion of pigmented varieties among new functional naturally gluten-free ingredients. The novel products, obtained with the new varieties rich in polyphenols, could have a role in enhancing the quality of life in patients with celiac disease in term of both intestinal health and sensorial aspects.

La celiachia è una malattia autoimmune scatenata, in soggetti geneticamente predisposti, dall'ingestione di prolamine contenute in alcuni cereali quali frumento, orzo e segale. Recenti studi hanno messo in luce come tale condizione sia accompagnata da un quadro generale di stress ossidativo che, in alcuni casi, permane anche dopo il trattamento dietetico. In questo contesto risulta dunque importante identificare nuovi ingredienti senza glutine che possano contribuire a un miglioramento delle condizioni di salute dei soggetti affetti da celiachia.

I mais pigmentati, diffusi principalmente in Sud America e ancora poco utilizzati in Europa, potrebbero rappresentare degli ingredienti senza glutine innovativi in quanto sono ricchi in antociani, molecole ad elevata attività antiossidante, e sono naturalmente privi di glutine. In questo progetto sono stati inclusi differenti campioni di mais: un campione di mais viola (ad uso animale), tre varietà di mais giallo (ad uso umano) e tre varietà pigmentate, ciascuna ottenuta dall'incrocio di una varietà gialla con il mais viola. Il processo di incrocio è stato condotto al fine di ottenere varietà pigmentate ad uso umano adatte ad essere coltivate in climi temperati. Nella prima fase del lavoro differenti metodi spettrofotometrici e cromatografici (HPTLC, LC-MS e HPLC-DAD) sono stati sviluppati ed applicati al fine di caratterizzare le diverse varietà di mais incluse nello studio e valutarne parallelamente la relativa capacità antiossidante. Le varietà pigmentate, confrontate con i rispettivi mais parentali (mais viola e mais gialli), hanno mostrato un interessante profilo fenolico sia in termine di componente solubile (antociani e acidi fenolici), sia insolubile (acidi fenolici). Il contenuto di polifenoli è risultato proporzionale all'attività antiossidante valutata con le differenti metodiche spettrofotometriche e cromatografiche. Nella seconda fase del lavoro è stata applicata una digestione *in vitro* al fine di monitorare la stabilità delle antocianine nel tratto gastrointestinale. Infine, differenti test cellulari (test di agglutinazione e valutazione della resistenza elettrica trans-epiteliale) hanno permesso di confermare la sicurezza d'uso delle nuove varietà pigmentate per i soggetti affetti da celiachia.

I risultati derivanti da questo progetto potrebbero contribuire all'inclusione delle varietà pigmentate tra i nuovi ingredienti funzionali naturalmente privi di glutine. I prodotti alimentari, ottenuti con le nuove varietà ricche di polifenoli, potrebbero avere un ruolo nel migliorare la qualità della vita dei pazienti con malattia celiaca in termini sia di salute intestinale che di aspetti sensoriali

Sommario

1. INTRODUZIONE	10
1.1 REAZIONI AVVERSE AGLI ALIMENTI	11
1.2 DISTURBI CORRELATI AL GLUTINE	12
1.2.1 DISTURBI AUTOIMMUNI	13
1.2.2 DISTURBI ALLERGICI	13
1.2.3 SENSIBILITÀ AL GLUTINE NON CELIACA	14
1.3 MALATTIA CELIACA	14
1.3.1 STORIA	14
1.3.2 CLASSIFICAZIONE E SINTOMATOLOGIA	16
1.3.3 EPIDEMIOLOGIA	21
1.3.4 EZIOLOGIA	24
1.3.5 DIAGNOSI	28
1.3.6 TRATTAMENTO	35
1.4 ZEA MAIS L.	39
1.4.1 MORFOLOGIA E FISIOLOGIA	39
1.4.2 COMPOSIZIONE DELLA CARIOSSIDE	41
1.4.3 MIGLIORAMENTO GENETICO	42
1.4.4 ASPETTI NUTRIZIONALI	44
1.4.5 MONDO E MERCATO	46
1.4.6 COMPOSIZIONE FENOLICA DI <i>ZEA MAYS L.</i>	47
• Composti fenolici solubili	48
• Composti fenolici insolubili/legati	49
1.4.1 PROPRIETÀ SALUTISTICHE DEL MAIS VIOLA	50
• Attività antiossidante	50
• Attività antinfiammatoria	51
• Proprietà antimutagene	51
2. SCOPO	52
3. MATERIALI E STRUMENTAZIONE	55
3.1 CAMPIONI	56
3.2 SOLVENTI	56
3.3 ACIDI	57
3.4 SALI E REAGENTI	57
3.5 ENZIMI	58
3.6 STANDARD	58
3.6.1 ANALISI SPETTROFOTOMETRICHE	58
3.6.2 ACIDI FENOLICI	58
3.6.3 ANTOCIANI	59
3.7 PICCOLA STRUMENTAZIONE E DISPOSITIVI PER LA PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	59
3.8 MATERIALI E STRUMENTAZIONE PER ANALISI SPETTROFOTOMETRICHE	59
3.9 MATERIALI E STRUMENTAZIONE PER ANALISI IN HPTLC	59

3.10	STRUMENTAZIONE PER ANALISI IN LC-MS	60
3.11	STRUMENTAZIONE PER ANALISI IN HPLC-DAD	60
4.	METODI	61
<hr/>		
4.1	DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI POLIFENOLI TOTALI	62
4.1.1	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	63
•	Estrazione dei composti fenolici solubili	63
•	Estrazione dei composti fenolici insolubili	63
4.1.2	PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI STANDARD	64
4.1.3	PREPARAZIONE DEI REATTIVI	65
4.1.4	MODALITÀ OPERATIVE	65
4.2	VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE MEDIANTE TEST DEL DPPH	65
4.2.1	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	66
4.2.2	PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI STANDARD	66
4.2.3	PREPARAZIONE DEI REATTIVI	67
4.2.4	MODALITÀ OPERATIVE	67
4.3	VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE MEDIANTE TEST TEAC	67
4.3.1	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	68
4.3.2	PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI STANDARD	68
4.3.3	PREPARAZIONE DEI REATTIVI	69
4.3.4	MODALITÀ OPERATIVE	69
4.4	ANALISI SPETTROFOTOMETRICHE DEGLI ANTOCIANI TOTALI	69
4.4.1	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	70
4.4.2	PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI TAMPONE	70
4.4.3	MODALITÀ OPERATIVE	70
4.5	CARATTERIZZAZIONE DEGLI ACIDI FENOLICI MEDIANTE HPTLC	71
4.5.1	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	71
4.5.2	PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI STANDARD	72
4.5.3	MODALITÀ OPERATIVE	72
4.6	CARATTERIZZAZIONE DELLE ANTOCIANINE MEDIANTE HPTLC	72
4.6.1	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	72
4.6.2	PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI STANDARD	72
4.6.3	MODALITÀ OPERATIVE	73
4.7	QUANTIFICAZIONE ACIDI FENOLICI MEDIANTE HPLC-DAD	73
4.7.1	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	73
•	Estrazione dei composti fenolici solubili	73
•	Estrazione dei composti fenolici insolubili	74
4.7.2	PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI STANDARD	74
4.7.3	CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE	74
4.7.4	PARAMETRI DI VALIDAZIONE DEL METODO	75
•	Idoneità del sistema (<i>Sistem Suitability Test</i>)	75
•	Linearità	76
•	Sensibilità	76
•	Precisione	77
•	Stabilità	77
•	Recupero	77

4.8	CARATTERIZZAZIONE ANTOCIANINE MEDIANTE LC-MS	78
4.8.1	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	78
4.8.2	CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE	78
4.9	QUANTIFICAZIONE ANTOCIANINE MEDIANTE HPLC-DAD	79
4.9.1	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	79
4.9.2	PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI STANDARD	79
4.9.3	CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE	79
4.9.4	PARAMETRI DI VALIDAZIONE DEL METODO	80
	• Recupero antocianine	80
4.10	STABILITÀ ANTOCIANINE DOPO DIGESTIONE GASTRO-INTESTINALE <i>IN VITRO</i>	81
4.10.1	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	81
4.10.2	PROTOCOLLO DIGESTIVO	81
4.11	TRATTAMENTI CELLULARI	82
4.11.1	PROTOCOLLO DIGESTIVO PER LO STUDIO DELLA COMPONENTE PROTEICA	82
4.11.2	RESISTENZA ELETTRICA TRANS-EPITELIALE	83
	• Protocollo operativo	84
4.11.3	TEST DI AGGLUTINAZIONE CELLULARE	84
	• Protocollo operativo	84
5.	RISULTATI	86
<hr/>		
5.1	DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI POLIFENOLI TOTALI	87
5.1.1	RETTA DI CALIBRAZIONE	87
5.1.2	ANALISI DEI CAMPIONI	88
5.2	DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI ANTOCIANINE TOTALI	95
5.3	VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE	96
5.3.1	RETTA DI CALIBRAZIONE TEST DPPH	96
5.3.2	RETTA DI CALIBRAZIONE TEST TEAC	97
5.3.3	ANALISI DEI CAMPIONI	99
5.4	HPTLC	107
5.4.1	CARATTERIZZAZIONE DEI COMPOSTI FENOLICI	107
	• Sensibilità del metodo	107
	• Analisi dei campioni	108
5.4.2	CARATTERIZZAZIONE DEGLI ANTOCIANI	114
	• Sensibilità del metodo	114
	• Analisi dei campioni	114
5.5	QUANTIFICAZIONE ACIDI FENOLICI MEDIANTE HPLC-DAD	116
5.5.1	VALIDAZIONE DEL METODO ANALITICO	117
	• Idoneità del sistema	117
	• Linearità	118
	• Sensibilità	121
	• Precisione	121
	• Stabilità	122
	• Recupero	122
5.5.2	ANALISI DEI CAMPIONI	124
	• Polifenoli solubili	124
	• Polifenoli insolubili	131

5.6	CARATTERIZZAZIONE ANTOCIANINE MEDIANTE HPLC-MS	136
• 5.6.1	Analisi delle soluzioni standard	136
5.6.2	ANALISI DEI CAMPIONI	138
5.7	QUANTIFICAZIONE ANTOCIANINE MEDIANTE HPLC-DAD	143
5.7.1	VALIDAZIONE DEL METODO ANALITICO	143
•	Idoneità del sistema	143
•	Linearità	144
•	Sensibilità	148
•	Precisione	148
•	Stabilità	149
•	Recupero	152
5.7.2	ANALISI DEI CAMPIONI	153
5.8	STABILITÀ ANTOCIANINE DOPO DIGESTIONE GASTROINTESTINALE <i>IN VITRO</i>	159
5.9	TRATTAMENTI CELLULARI	166
5.9.1	RESISTENZA ELETTRICA TRANS-EPITELIALE	166
5.9.2	TEST DI AGGLUTINAZIONE CELLULARE	167
6.	CONCLUSIONI	169
7.	BIBLIOGRAFIA	172



1. INTRODUZIONE

1.1 Reazioni avverse agli alimenti

Con il termine “reazione avversa a un alimento” si intende ogni manifestazione indesiderata e imprevista conseguente all’assunzione di un alimento.

La classificazione attualmente in uso, condivisa a livello internazionale, prevede la distinzione tra reazioni tossiche e reazioni non tossiche (**Figura 1.1**).

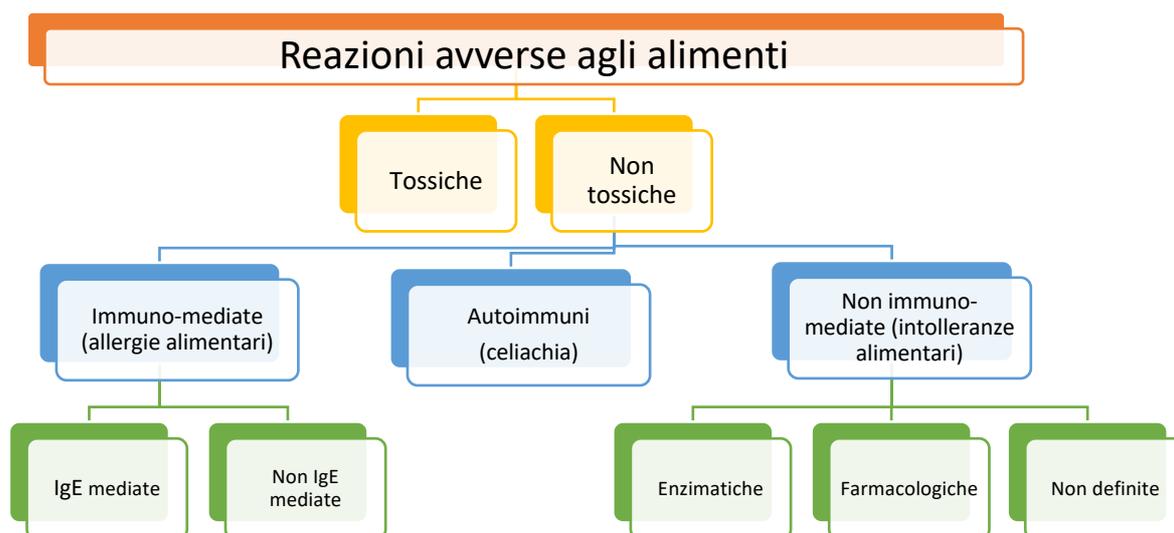


Figura 1.1. Classificazione delle reazioni avverse agli alimenti [EFSA, 2014]

Le **reazioni tossiche** sono associate all’assunzione da parte del soggetto di sostanze tossiche presenti negli alimenti. Tali sostanze possono essere composti naturali o di sintesi chimica; si parla più precisamente di *tossine* quando l’evento avverso è causato da composti presenti naturalmente nell’alimento (sostanze tossiche prodotte normalmente o in condizioni di stress da piante, animali e funghi, tossine batteriche e micotossine che hanno contaminato l’alimento in fase di trasformazione, conservazione o trasporto). Queste reazioni avverse sono comuni a tutti gli individui e direttamente dipendenti dalla dose e dal potenziale tossico della sostanza stessa.

Le **reazioni non tossiche** sono reazioni avverse che si manifestano in soggetti predisposti e sono correlate alla suscettibilità individuale. Come di può osservare dalla **Figura 1.1**, esse sono state ulteriormente suddivise, sulla base dei differenti meccanismi patologici che le determinano, in reazioni immuno-mediate (allergie alimentari), non immuno-mediate (intolleranze alimentari) e autoimmuni (celiachia) [EFSA, 2014].

L'*allergia alimentare* è caratterizzata da una reazione di tipo immunologico che può coinvolgere le immunoglobuline di classe IgE o essere non IgE mediata. La reazione allergica determina una risposta infiammatoria e danno tissutale in seguito all'esposizione ad uno specifico antigene (rappresentato generalmente da una proteina).

L'*intolleranza alimentare*, invece, non coinvolge il sistema immunitario ed è spesso associata a difetti metabolici. Le intolleranze alimentari vengono classificate, a seconda del meccanismo coinvolto, in: intolleranze di natura metabolica (galattosemia, intolleranza al lattosio e fenilchetonuria), farmacologiche (sensibilità a sostanze quali amine vasoattive o alcool etilico) e non definite (reazioni avverse riproducibili ma non riconducibili ad un meccanismo noto).

La *celiachia* è una malattia autoimmune che si manifesta in soggetti geneticamente predisposti in seguito all'ingestione di prolamine contenute in alcuni cereali quali frumento, segale e orzo.

1.2 Disturbi correlati al glutine

In **Figura 1.2** è illustrata la complessità dei disturbi correlati al glutine e la loro nomenclatura basata sul ruolo del sistema immunitario nello sviluppo delle patologie.

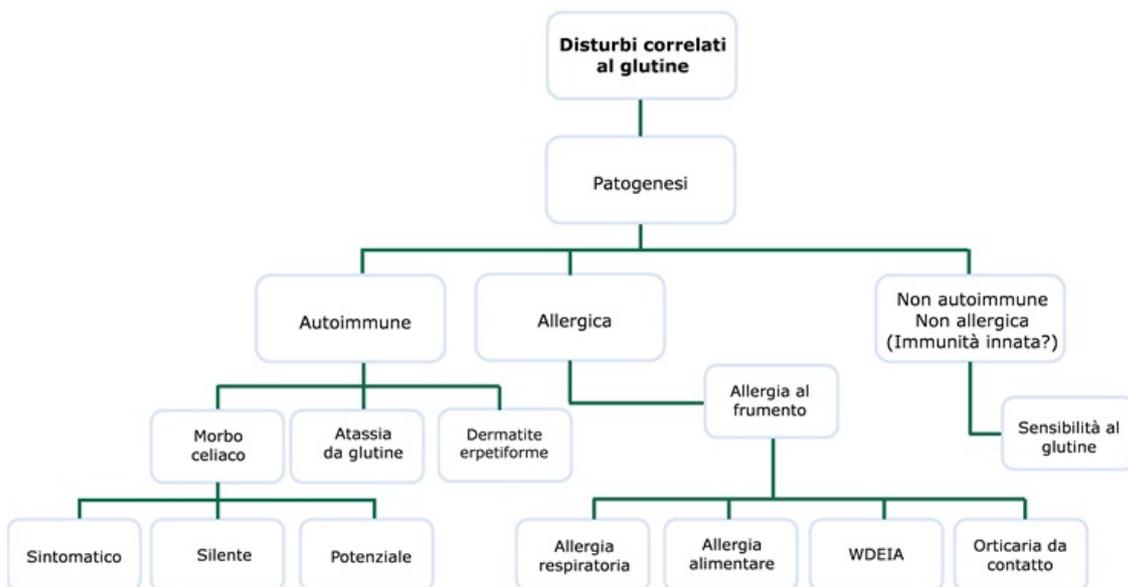


Figura 1.2. Classificazione dei disturbi correlati al glutine. (WDEIA: *Wheat-Dependent, Exercise-Induced Anaphylaxis*) [Sapone et al. 2012]

Come si può osservare dalla **Figura 1.2** le principali reazioni al glutine comprendono: reazioni allergiche (allergia al frumento), autoimmuni (celiachia, dermatite erpetiforme e atassia da glutine), altre condizioni cliniche in assenza delle due precedenti condizioni (sensibilità al glutine non celiaca).

1.2.1 Disturbi autoimmuni

Tra i disturbi correlati al glutine caratterizzati da una patogenesi autoimmune vi è la celiachia, l'atassia da glutine e la dermatite erpetiforme.

La **celiachia** è una malattia a patogenesi immuno-mediata scatenata, nei soggetti geneticamente predisposti, dall'ingestione di prolamine presenti in alcuni cereali. Tale patologia è caratterizzata dalla presenza di una combinazione variabile di manifestazioni cliniche glutine-dipendenti, anticorpi celiachia-specifici, aplotipo HLA-DQ2 o HLA-DQ8 ed enteropatia [Husby et al., 2012].

L'**atassia da glutine** è stata originariamente definita come atassia sporadica o idiopatica con markers sierologici positivi per la sensibilizzazione al glutine [Hadjivassiliou et al., 1998]. Come la celiachia, anche l'atassia da glutine è una patologia autoimmune caratterizzata da un danno cerebellare che si manifesta con atassia [Sapone et al., 2012].

La **dermatite erpetiforme** è una malattia infiammatoria della cute caratterizzata da polimorfismo eruttivo (eritema, pomfi, vescicole, bolle, papule, prurito) e da depositi cutanei di IgA [Salmi et al., 2011]. La dermatite erpetiforme viene attualmente considerata come l'espressione fenotipica cutanea di una enteropatia digiunale glutine-sensibile di lieve o media gravità, del tutto sovrapponibile alla malattia celiaca [Karpati, 2004]. Sebbene nella dermatite erpetiforme i sintomi intestinali non siano comuni, dalla biopsia intestinale è possibile osservare alterazioni della mucosa in quasi la totalità dei casi.

1.2.2 Disturbi allergici

L'**allergia al frumento** è una reazione avversa alle proteine contenute nel frumento, mediata dal sistema immunitario che coinvolge le immunoglobuline di classe IgE con conseguente rilascio di mediatori tra cui l'istamina dai basofili e dai mastociti [Sapone et al., 2012].

Si tratta di una classica allergia alimentare che può presentarsi con sintomi a livello cutaneo (orticaria da contatto), del tratto gastrointestinale (allergia alimentare) e respiratorio (allergia respiratoria). L'allergia alimentare al grano è più comune nei bambini, con una prevalenza di circa 1% [Jackson Allen, 2015], tuttavia sono spesso descritti in letteratura casi di anafilassi indotta da esercizio fisico (*Wheat-Dependent, Exercise-Induced Anaphylaxis* – WDEIA) e di asma professionale, una patologia occupazionale associata ad una frequente esposizione alla farina di frumento.

1.2.3 Sensibilità al glutine non celiaca

La sensibilità al glutine non celiaca (*Non Celiac Gluten sensitivity* – NCGS) è una reazione avversa al glutine che si verifica in soggetti in cui è stata esclusa la diagnosi di celiachia e di allergia al grano. La patologia è caratterizzata da sintomi sia intestinali sia extra-intestinali, che si manifestano in breve tempo dopo l'assunzione di glutine e che migliorano o scompaiono dopo la sua eliminazione. La prevalenza della NCGS non è stata ancora chiaramente definita, colpisce prevalentemente la popolazione adulta, in particolare donne con età compresa tra 30-50 anni [Catassi, 2015].

1.3 Malattia celiaca

1.3.1 Storia

L'introduzione del frumento nella dieta dell'uomo risale a circa 10000 anni fa, con l'avvento dell'agricoltura [Sapone et al., 2012], tuttavia la chiara associazione tra questo cereale e la patologia celiaca risale alla metà del ventesimo secolo.

Areteo di Cappadocia nel 250 d.C. fu il primo medico a riconoscere una forma patologica riconducibile alla celiaca, con l'uso del termine greco *koiliakos* a definire il paziente affetto da steatorrea, pallore e cronica perdita di peso. Nel 1856 Francis Adams tradusse questo termine dal greco all'inglese, coniando l'espressione "*coeliac*" [Adams, 1856]. Solo nel 1888 Samuel Gee descrisse i sintomi dettagliati di questa condizione sia negli adulti che nei bambini, intuendo che l'unico trattamento consisteva in una dieta adeguata povera di farinacei [Freeman, 2013].

In seguito, la malattia celiaca venne descritta da molti medici con varie denominazioni tuttavia, solo a metà del XX secolo fu scientificamente documentata l'associazione tra glutine e sintomatologia clinica; fu nel 1950 William-Karel Dicke, pediatra al *Wilhelmina Children's Hospital* di Utrecht, ad ipotizzare e dimostrare la correlazione tra la malattia celiaca e la farina di grano (**Figura 1.3**).

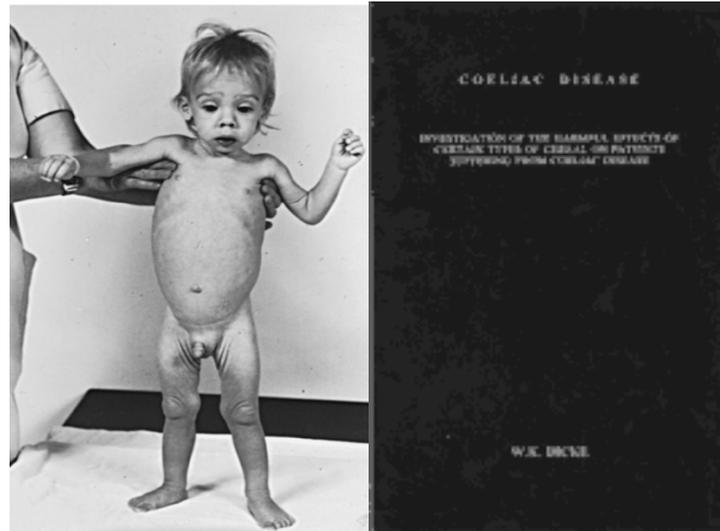


Figura 1.3. Tesi di W. Dicke, 1950

A seguito della grave carestia che si verificò in Olanda durante la Seconda guerra mondiale Dicke osservò un miglioramento dello stato di salute dei bambini, con sintomatologia correlabile alla celiachia, a seguito dello scarso approvvigionamento di cereali, quali la farina di frumento e di segale. A conferma, la riacutizzazione dei sintomi si verificò subito dopo la reintroduzione di tali farinacei nella dieta dei bambini [Dicke et al., 1953].

La diagnosi della patologia celiaca ha rappresentato un altro punto critico. Le caratteristiche istologiche delle lesioni intestinali nei pazienti celiaci furono descritte per la prima volta nel 1954 da John Paulley [1954] e nel 1956 da Margo Shiner (**Figura 1.4**). Solo successivamente la biopsia intestinale venne introdotta nell'iter diagnostico della malattia celiaca [Losowsky, 2008].

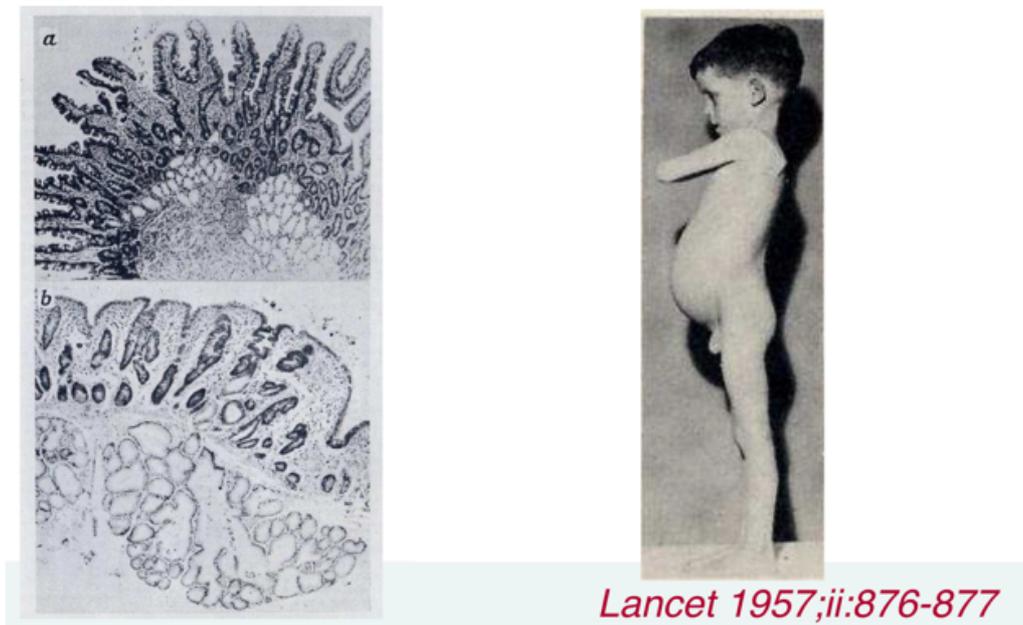


Figura 1.4. Primo soggetto celiaco con diagnosi di celiachia mediante biopsia [Sakula and Shiner, 1957]

1.3.2 Classificazione e sintomatologia

La celiachia è una patologia immuno-mediata sistemica scatenata dall'ingestione di glutine o prolamine analoghe che, in soggetti geneticamente predisposti, determina l'instaurarsi di un processo infiammatorio nell'intestino tenue con conseguente malassorbimento e manifestazioni sia intestinali sia extra-intestinali. La celiachia è anche definita enteropatia da glutine tuttavia la sintomatologia intestinale è solo una delle possibili manifestazioni cliniche.

Questa patologia viene spesso rappresentata dall' "iceberg celiaco" (**Figura 1.5**), in quanto la sua reale frequenza è superiore rispetto ai casi clinicamente diagnosticati sulla base di sintomi clinici ben definiti. Le indagini di screening della popolazione hanno dimostrato che per ogni caso diagnosticato di celiachia (parte emersa dell'iceberg) ve ne sono almeno altri 3-5 che sfuggono alla diagnosi per l'assenza di manifestazione cliniche caratteristiche (parte sommersa dell'iceberg) [AIC, 2018].

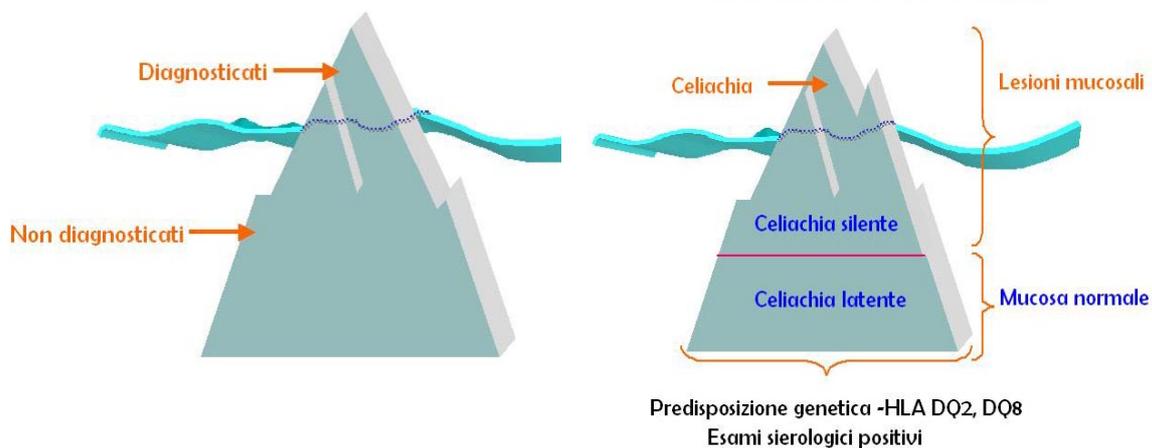


Figura 1.5. Iceberg della celiachia

Le manifestazioni cliniche della malattia celiaca sono estremamente variabili [Fasano e Catassi, 2001], ed è possibile distinguere diverse forme di celiachia: forma classica (maggiore), forma non classica (minore), forma silente (asintomatica) e forma potenziale (o latente); distinte a seconda delle modalità di presentazione clinica, delle alterazioni istologiche della mucosa intestinale (biopsia) e dei valori sierologici (anticorpi) [AIC, 2018].

Forma classica: La forma tipica della malattia generalmente si manifesta nei bambini di età compresa tra i 6 mesi di vita e i 2 anni d'età, dopo l'introduzione del glutine nella dieta. I principali sintomi sono rappresentati da rallentamento della crescita, dissenteria cronica, distensione addominale, astenia, ipotonia muscolare, inappetenza e irritabilità. La mucosa intestinale si presenta piatta con atrofia dei villi, situazione che si associa ad un grave malassorbimento. Nei casi più gravi, si può manifestare la "crisi celiaca", caratterizzata da diarrea acquosa severa, marcata distensione addominale, disidratazione, diselelettrolitemia, ipotensione e letargia.

Nell'adulto si parla di celiachia classica o maggiore in presenza di un quadro clinico caratterizzato da diarrea, steatorrea e calo ponderale; sintomi riconducibili al malassorbimento associato alla patologia.

Forma non classica: Negli ultimi anni si è assistito a un progressivo ritardo nell'esordio della patologia e un cambiamento nelle manifestazioni cliniche della celiachia [Fasano e Catassi, 2001]. Nei bambini si osservano sintomi intestinali atipici come dolori addominali ricorrenti

e stipsi o sintomi extra-intestinali. Negli adulti si parla di forma minore quando la celiachia viene diagnosticata in presenza di sintomi gastroenterici transitori o sintomi-extra intestinali.

L'anemia sideropenica rappresenta la manifestazione extra-intestinale più frequente sia nei bambini sia negli adulti [Bottaro et al., 1999]. La deficienza di ferro, refrattaria alla supplementazione, può essere l'unico sintomo di malattia celiaca presente in alcuni soggetti [Carroccio et al., 1998].

Diverse tipologie di anomalie dentarie sono state descritte in bambini con patologia celiaca; in oltre il 30% di pazienti con celiachia non trattata è presente severa ipoplasia dello smalto dentario [Aine et al., 1990].

La patologia celiaca è stata riscontrata nell'1.5-7.5% dei pazienti affetti da artrite reumatoide [O'Farelli et al., 1988; George et al., 1996; Lepore et al., 1996], i cui sintomi, sebbene indipendenti, sono stati descritti da Mäki [1988-a] come unico segno di presentazione di malattia celiaca in alcuni pazienti adolescenti.

Dall'analisi degli anticorpi antigliadina in pazienti con osteoporosi idiopatica è emersa un'incidenza di celiachia 10 volte più alta che nella popolazione generale [Lindh et al., 1992].

Poiché una prolungata atrofia dei villi intestinali è associata ad un basso assorbimento di calcio con conseguente bassa densità minerale ossea, i soggetti celiaci sono ad alto rischio per lo sviluppo di osteoporosi. Anche nei bambini ed adolescenti è stata osservata una riduzione della massa ossea, la quale regredisce con la dieta senza glutina [AIC, 2018]

Tra le varie problematiche extraintestinali, anche l'ipertransaminasemia, associata all'epatite "criptogenetica", è stata occasionalmente descritta come un sintomo di malattia celiaca.

Infine, un'ampia gamma di disturbi neurologici e psichiatrici è stata descritta in associazione con la celiachia. Uno studio condotto da Gobbi e collaboratori [1992] ha evidenziato un'associazione tra celiachia ed epilessia in pazienti con calcificazioni occipitali bilaterali. In tali pazienti la dieta senza glutine è stata in grado di modificare positivamente il decorso dell'epilessia quando iniziata precocemente dopo l'esordio della patologia.

Forma silente: Questa forma di celiachia viene riscontrata in individui asintomatici. Generalmente la diagnosi viene effettuata in gruppi a rischio per questa malattia, come familiari di primo grado o pazienti affetti da altre patologie autoimmuni. La forma silente è caratterizzata dalle stesse alterazioni sierologiche e istologiche osservate nei casi tipici. I soggetti affetti da celiachia silente presentano spesso un ridotto stato di benessere psicofisico: carenza di ferro, disturbi comportamentali (depressione, irritabilità e ridotto rendimento scolastico nei bambini) e ridotta densità minerale ossea [Mäki et al., 1988-b; Mustalahti et al., 1999].

Forma potenziale: la celiachia potenziale è caratterizzata da un quadro anatomo-patologico con mucosa duodenale non atrofica ma aumento dei linfociti intraepiteliali, tuttavia si riscontra positività negli anticorpi anti-endomisio. Il quadro clinico è variabile potendo essere identificato come forma maggiore, minore o silente.

La celiachia potenziale si osserva nel 10-15% di tutti i pazienti che saranno affetti da celiachia. I soggetti rientranti in questa classe devono essere sottoposti a una stretta sorveglianza sierologica e clinica in quanto la malattia può diventare attiva, soprattutto in seguito a un evento scatenante, come la gravidanza, il parto, un intervento chirurgico o un forte stress emotivo.

La celiachia è una patologia determinata sia da fattori genetici sia da fattori ambientali, tra cui il glutine, un complesso proteico presente in alcuni cereali quali frumento, orzo e segale. Il glutine del frumento è costituito da due frazioni proteiche: le gliadine, alcool-solubili, e le glutenine alcool-insolubili. L'omologa frazione proteica di orzo e segale solubile in alcool è rappresentata dalle ordeine e secaline, rispettivamente [Real et al., 2012]. Queste proteine vengono definite prolamine a causa del loro elevato contenuto di proline e glutammine [Shewry et al., 1995].

Nei pazienti affetti da celiachia il consumo di alimenti contenenti glutine scatena una reazione immunitaria a livello della lamina propria della mucosa del piccolo intestino, con conseguente atrofia dei villi intestinali, iperplasia delle cripte ed infiltrazione della lamina propria da parte dei linfociti mucosali [Fasano e Catassi, 2001]. Nei soggetti celiaci non diagnosticati si può frequentemente osservare quindi una profonda alterazione della mucosa dell'intestino tenue. Nei soggetti sani la mucosa intestinale presenta, a livello

microscopico, un andamento sinuoso con villi sottili e allungati che determinano la formazione di una serie di anse responsabili del corretto assorbimento dei nutrienti da parte dell'intestino. Nei pazienti celiaci non trattati, i villi tendono ad atrofizzarsi e la mucosa intestinale risulta piatta; questa modifica è responsabile della principale conseguenza della malattia: la malnutrizione dovuta a malassorbimento. In **Figura 1.6 A e B** è riportato il quadro microscopico di una biopsia di mucosa del digiuno ottenuta da un soggetto sano e da un paziente celiaco non trattato, rispettivamente.

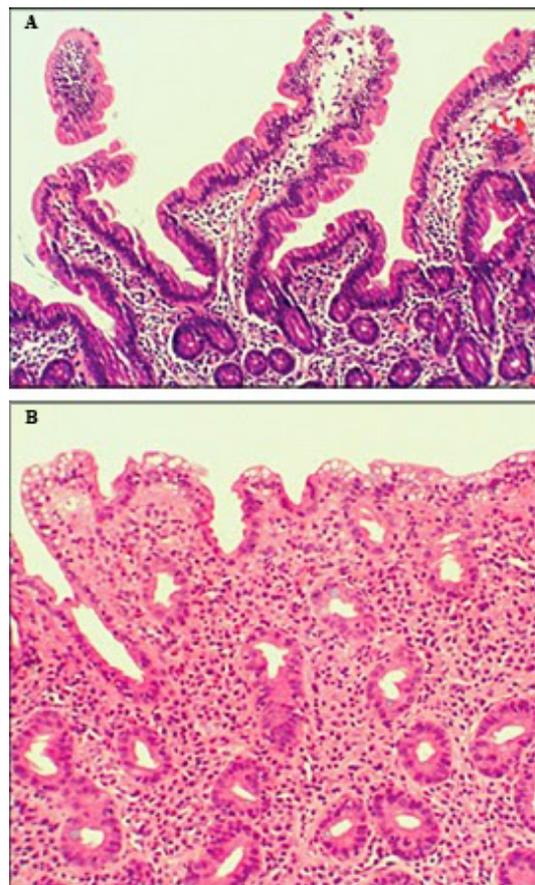


Figura 1.6. Biopsia intestinale di un soggetto sano (A) e di un paziente celiaco non trattato (B)
[Biagi e Calabrò, 2010]

La patologia celiaca può insorgere in qualsiasi periodo della vita, dallo svezzamento fino alla tarda età; generalmente, tuttavia, la diagnosi nelle donne viene effettuata entro la quarta decade di vita mentre negli uomini entro la quinta [Gasbarrini et al., 2009]. L'incidenza della patologia è maggiore nei gruppi di popolazione "a rischio" come i familiari del paziente celiaco (10-15%), i pazienti affetti da altre malattie autoimmuni (tiroidite di Hashimoto e diabete di tipo I, 5-10%) ed i soggetti con patologie di natura genetica, come la sindrome di Turner e la sindrome di Down (10%) [Catassi, 2005].

1.3.3 Epidemiologia

La celiachia è una patologia cronica e rappresenta una delle malattie correlate all'alimentazione più frequenti al mondo, nonostante ciò è ancora in larga misura sotto diagnosticata a causa della manifestazione clinica varia, spesso caratterizzata da sintomi non specifici, molto sfumati o assenti. La prevalenza della patologia nella popolazione adulta europea è pari all'1% con un intervallo di variabilità compreso tra lo 0.2% della Germania e il 2% della Finlandia [AIC, 2018].

Secondo uno studio epidemiologico pubblicato sulla rivista *Annals of Medicine* nel 2010, condotto su 29.212 soggetti (sia adulti che bambini) di nazionalità finlandese, italiana, tedesca ed inglese è emerso che la prevalenza di celiachia in Europa è dell'1%, e per ogni celiaco diagnosticato, ce ne sono 4 che non sanno di esserlo [Mustalahti et al., 2010]. I risultati dello studio sono elencati in **Tabella 1.1** e confermati da Kang e collaboratori (2013) (**Figura 1.7**).

Tabella 1.1 - Prevalenza della malattia celiaca in Europa [Mustalahti et al., 2010]

	Finlandia	Germania	Italia	Regno Unito
Prevalenza celiachia bambini (%)	Non riportata	Non riportata	1.1	0.9
Prevalenza celiachia adulti (%)	2	0.2-0.3	0.7	1.5



Figura 1.7. Prevalenza mondiale della malattia celiachia, valutata sulla base dei livelli di anticorpi anti-transglutaminasi [Kang et al, 2013]

Come illustrato in **Figura 1.7**, grazie alla globalizzazione dei consumi alimentari (fattore dietetico), la movimentazione delle popolazioni (predisposizione familiare alla patologia), e la diffusione della potenzialità diagnostica, la celiachia risulta distribuita in tutto il mondo. Negli Stati Uniti la prevalenza è di circa l'1% come in Europa. La frequenza della celiachia risulta elevata in aree in via di sviluppo quali l'Africa, il Medio Oriente e l'India. Un'area geografica caratterizzata da una forte disomogeneità è l'Africa: i dati della prevalenza variano tra lo 0.5% dell'Egitto all'1% della Libia, tuttavia in questo continente vi è anche la popolazione con la più alta prevalenza di celiachia al mondo, i Saharawi (5-6% nell'area di confine tra Mauritania, Marocco e Algeria). Ciò può essere attribuito sia all'elevato consumo di alimenti contenenti glutine (couscous), sia a un profilo genetico favorevole [AIC, 2018].

In Italia risiedono 206.561 celiaci, di cui 145.759 femmine e 60.802 maschi [Ministero della salute, 2017]. L'incidenza della patologia ha una distribuzione media pari a 1M:2F. La maggior incidenza nel sesso femminile è da ricondurre alla natura autoimmune della patologia. È noto che le patologie autoimmuni nelle donne sono più frequenti. Per quanto riguarda la genetica è importante sottolineare che molti tratti del DNA che regolano il sistema immunitario sono localizzati sul cromosoma X.

In **Figura 1.8** è rappresentata la distribuzione dei celiaci nelle diverse regioni italiane.

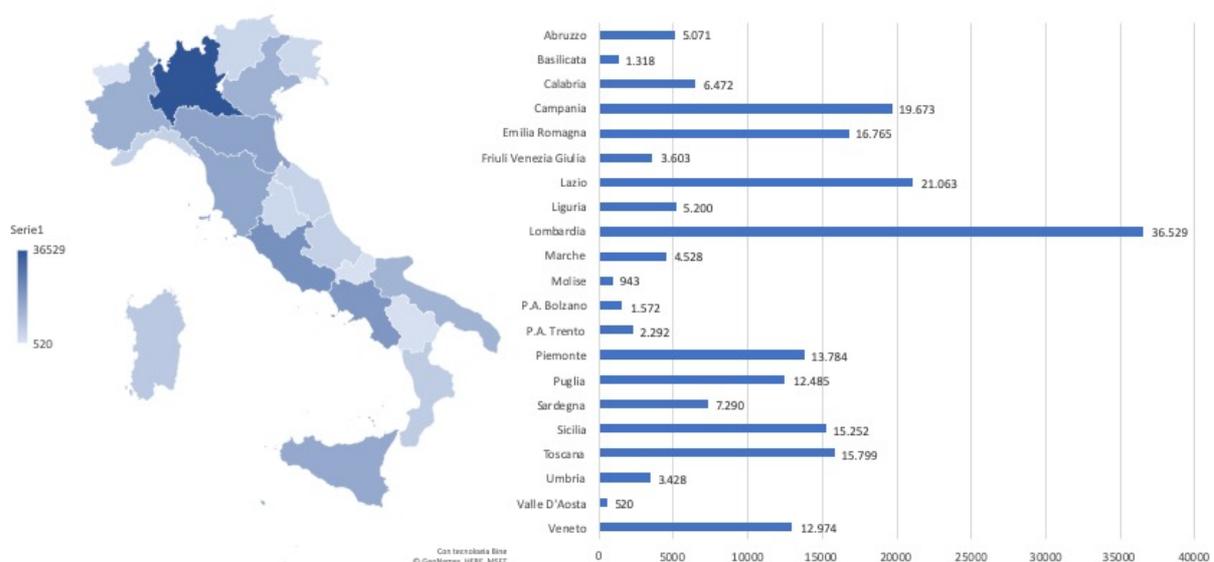


Figura 1.8. Distribuzione dei celiaci nelle diverse regioni italiane [Ministero della Salute, 2017]

Secondo la relazione annuale al Parlamento sulla celiachia del 2017, la regione italiana dove sono residenti più celiaci risulta essere la Lombardia (36.529), seguita da Lazio (21.063), Campania (19.673) ed Emilia Romagna (16.765) mentre quella che ne registra meno è la Valle d'Aosta (520) seguita dal Molise (943).

Nonostante la Lombardia risulti avere il numero maggiore di celiaci, ha una percentuale di celiaci rispetto alla sua popolazione, pari a quella del Lazio (0.36%) ma di gran lunga inferiore rispetto alla Sardegna (0.44%).

In **Figura 1.9** è illustrato l'andamento delle diagnosi dal 2012 al 2017.

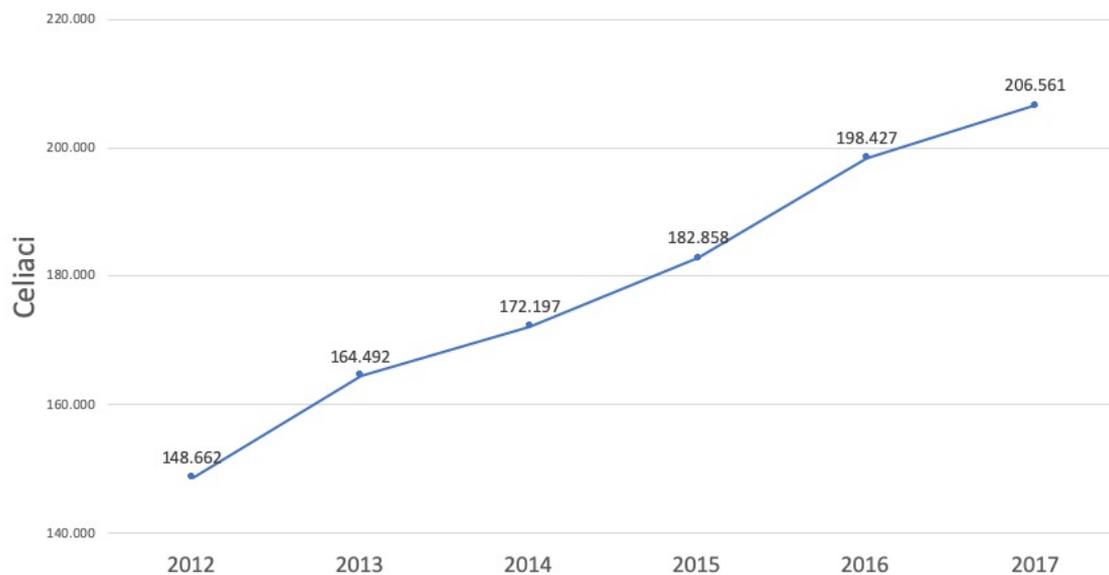


Figura 1.9. Andamento delle diagnosi di celiachia in Italia dal 2012 al 2017 [Ministero della salute, 2017]

Analizzando l'andamento delle diagnosi di celiachia in Italia (**Figura 1.9**) dal 2012 al 2017 sono state registrate 57.899 nuove diagnosi, con una media di circa 10.000 nuove diagnosi all'anno. Per quanto riguarda la distribuzione anagrafica della celiachia in Italia la fascia di età in cui si registrano più celiaci è quella dei 19-40 anni, che rappresenta il 35% circa dei celiaci totali (**Figura 1.10**).

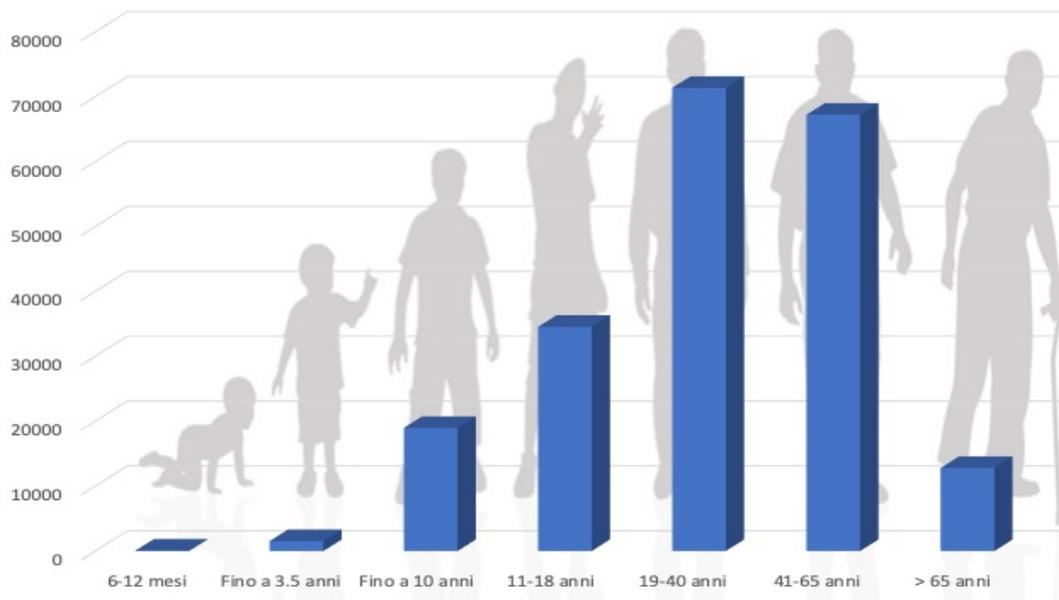


Figura 1.10. Distribuzione della celiachia per fasce di età [Ministero della salute, 2017]

1.3.4 Eziologia

La celiachia è una patologia multifattoriale caratterizzata da una complessa interazione tra fattori genetici ed ambientali [Sollid and Jabri, 2005; Van Heel and West, 2006]. Tra i principali stimoli ambientali coinvolti nell'insorgenza della malattia vi sono le prolamine di alcuni cereali, come la gliadina nel frumento, la secalina nella segale e l'ordeina nell'orzo [Van Heel and West, 2006; Wieser and Koehler, 2008]. La gliadina del frumento può essere suddivisa in quattro sottofrazioni elettroforetiche (α , β , γ e ω -gliadina), caratterizzate da pesi molecolari variabili tra 20 e 75 kDaltons.

Le prolamine sono caratterizzate da un elevato contenuto degli amminoacidi glutamina e prolina, caratteristica che ne giustifica, almeno in parte, le proprietà immunogeniche. L'elevato contenuto di prolina rende le proteine dei cereali tossici resistenti all'azione delle proteasi, con conseguente liberazione nell'intestino di peptidi con peso molecolare relativamente elevato (fino a 50 amminoacidi) e ricchi di glutamina. I peptidi ricchi di glutamina diventano i motori degli eventi infiammatori grazie anche all'intervento dell'enzima transglutaminasi tissutale (tTG).

In **Tabella 1.2** è riportato il contenuto di glutammina e prolina nelle prolammine di diversi cereali e la relativa tossicità per i pazienti celiaci.

Tabella 1.2 - Contenuto di glutammina e prolina nelle prolammine di diversi cereali e relativa tossicità per i pazienti celiaci [Evangelisti e Restani, 2011]

Cereale	Prolamina	Contenuto di glutammine e prolina	Tossicità
Frumento	Gliadine	36% Gln; 17-23% Pro	Altissima
Orzo	Ordeina	36% Gln; 17-23% Pro	Alta
Segale	Secalina	36% Gln; 17-23% Pro	Alta
Avena	Avenina	alto Gln; basso Pro	Bassa
Mais	Zeina	basso Gln; alto Ala e Leu	Non tossico
Riso	?	basso Gln; alto Ala e Leu	Non tossico

Gln: glutammina; Pro: prolina; Ala: alanina; Leu: leucina

Come si può osservare dalla **Tabella 1.2**, le sequenze ricche di glutammina e prolina sono presenti in tutte le prolammine dei cereali tossici (frumento, segale e orzo), mentre sono assenti nei cereali tollerati dai pazienti celiaci (mais e riso). L'avena si colloca sia dal punto di vista tassonomico sia per il contenuto di prolina e glutammina, in una situazione intermedia tra i cereali tossici e i cereali non tossici.

La predisposizione genetica ricopre un ruolo fondamentale nell'insorgenza della malattia [Godkin e Jewell,1998]; i principali geni coinvolti sono legati al complesso maggiore di istocompatibilità (HLA), in particolare alla combinazione allelica HLA-DQ2 e DQ8. Il 90% circa dei celiaci risulta HLA-DQ2 positivo (DQA1*0501/DQB1*0201), il 5% è HLA-DQ8 positivo (DQA1*0301/DQB1*0302), mentre la maggior parte dei casi rimanenti possiede almeno uno dei due componenti dell'eterodimero DQ2 (più frequentemente il DQB1*0201, talora il DQA1*0501).

Normalmente l'assenza di tali genotipi esclude la possibilità di sviluppare la patologia. Tuttavia, la componente genetica, da sola, non determina la comparsa della malattia, come dimostrato nella non totale concordanza nei gemelli omozigoti [Sollid e Lie, 2005]. L'importanza della componente genetica nell'eziologia di tale patologia è comunque confermata dall'elevata prevalenza della celiachia tra i familiari di I grado di celiaci (10-15%). Tale prevalenza raggiunge il 35% quando si considerano fratelli e sorelle con HLA identico.

A livello fisiopatologico lo sviluppo della celiachia dipende da una complessa risposta immunitaria che coinvolge sia l'immunità innata sia l'immunità acquisita [Koning et al., 2005; Jabri et al., 2005]. Le sequenze della gliadina contengono regioni in grado di esercitare attività citotossica e immunomodulatoria. Altre regioni, invece, sono in grado di determinare stress ossidativo e indurre il rilascio di citochine pro-infiammatorie [Shan et al., 2002; Ciccocioppo et al., 2005].

Generalmente, durante la digestione, le proteine sono degradate in piccoli peptidi e amminoacidi a opera delle peptidasi. L'elevato contenuto di prolina della gliadina rende questa proteina resistente a una completa digestione da parte delle proteasi. Alcuni peptidi derivanti dalla digestione della gliadina vengono trasportati, con meccanismi ancora non del tutto chiariti, dal lume intestinale alla lamina propria dove subiscono l'azione della tTG. Questo enzima è in grado di catalizzare la conversione della glutammina in acido glutammico, mediante una reazione di deamidazione; l'acido glutammico è un aminoacido carico negativamente che aumenta l'affinità dei peptidi del glutine per i recettori HLA-DQ2/DQ8 presenti sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APC), quali le cellule dendritiche, localizzate a livello della mucosa intestinale. Questo determina l'attivazione dei linfociti T, cui consegue la produzione di autoanticorpi e di citochine pro-infiammatorie (quali interferone- γ) ed, in ultima analisi, l'atrofia dei villi intestinali (**Figura 1.11**).

I peptidi derivanti dal glutine, tra cui il peptide 31-43 dell' α gliadina, determinano, inoltre, l'attivazione delle cellule dendritiche con conseguente produzione di interleuchina-15 (IL-15), aumento dei linfociti intraepiteliali e della permeabilità intestinale a livello delle giunzioni intercellulari, quest'ultimo mediato, a sua volta, dalla secrezione di zonulina (una proteina responsabile dell'incremento della permeabilità intestinale) [Stepniak e Koning, 2006; Drago et al., 2006, Koning, 2005].

Il danno della mucosa dei pazienti celiaci è dunque indotto da una duplice azione della gliadina: da un lato essa può attivare la risposta T-mediata (immunità acquisita) e dall'altra può indurre una risposta innata, mediata principalmente dall'IL-15. Gli effetti congiunti di questa duplice azione inducono le lesioni tipiche della mucosa celiaca.

In **Figura 1.11** sono schematizzati i principali eventi molecolari coinvolti nella patogenesi della malattia celiaca.

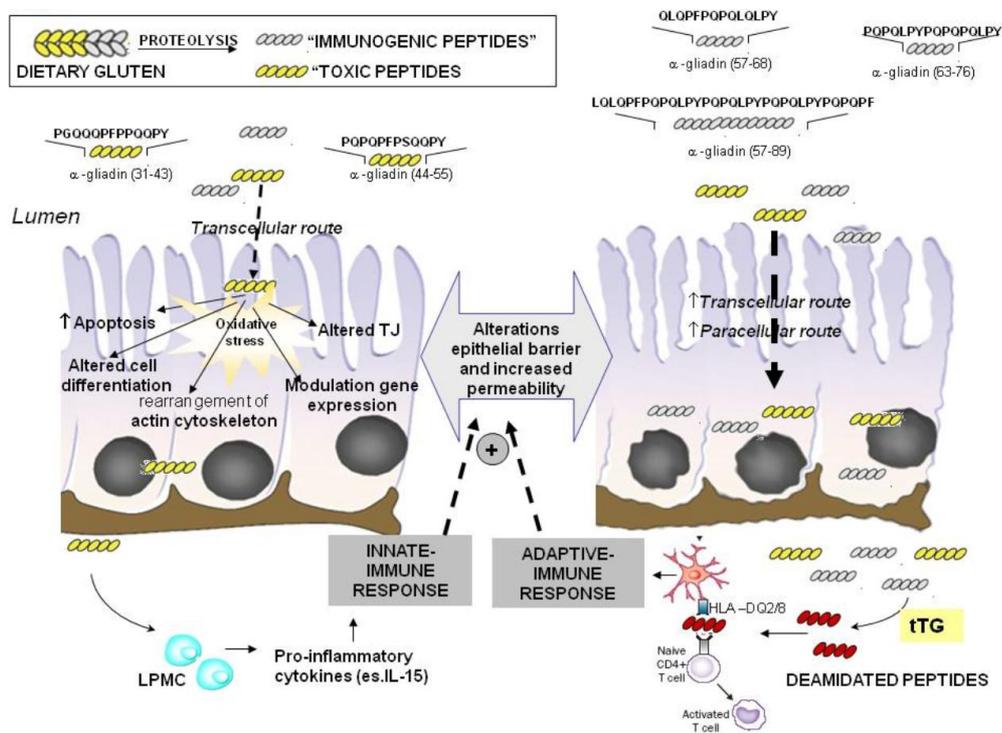


Figura 1.11. Rappresentazione degli eventi coinvolti nella patogenesi della malattia celiachia. LPMC: cellule mononucleate della lamina propria; tTG: Trasglutaminasi tissutale. [Ferretti et al, 2012]

In aggiunta agli effetti immunologici, i peptidi della gliadina possono influenzare direttamente la struttura e la funzione cellulare intestinale (**Figura 1.12**), come dimostrato da numerosi studi *in vitro* [Maiuri et al., 1996; Elli et al., 2003]. Come detto in precedenza, alcuni peptidi della gliadina, in particolare il frammento p31-43, sono in grado penetrare le cellule intestinali inducendo la produzione di citochine pro-infiammatorie ed enzimi tra cui l'ossido nitrico sintasi (iNOS), con conseguente aumento nella produzione di ossido nitrico (NO). L'ossido nitrico è un metabolita che promuove lo stress ossidativo contribuendo ad un aumento della permeabilità della mucosa intestinale. Lo stress ossidativo sembra essere uno dei meccanismi patogenetici della celiachia ed alcuni studi suggeriscono che questo stato si riduce solo parzialmente con la dieta senza glutine [Piątek-Guziewicz et al., 2017].

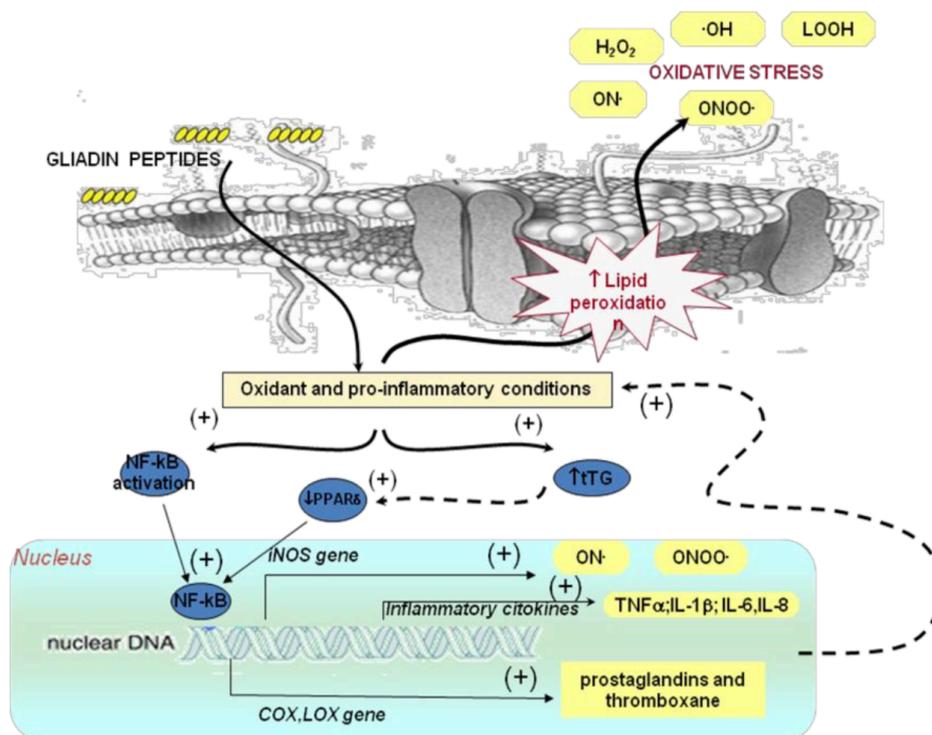


Figura 1.12. Effetto del glutine sullo stress ossidativo. NF-κB: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; COX: ciclossigenasi; LOX: liposigenasi; iNOS: ossido nitrico sintasi inducibile; PPARδ: recettori attivati da proliferatori perossisomiali; ONOO•: perossinitrito; LOOH: lipidi-idroperossidi; •OH: radicale idrossido; H₂O₂: perossido di idrogeno. [Ferretti et al, 2012]

1.3.5 Diagnosi

La diagnosi precoce della malattia celiaca è importante per ridurre il rischio di sviluppare complicanze fra cui: patologie autoimmuni ed idiopatiche a carico del sistema nervoso, dell'apparato cardiocircolatorio, del sistema endocrino, del fegato e della cute; gravi alterazioni della parete intestinale quali digiunoileite ulcerativa e sprue collagenosica o quadri di scarsa o assente risposta alla dieta (celiachia refrattaria) ed insorgenza di neoplasie (linfoma intestinale). Risulta dunque necessario predisporre un protocollo diagnostico semplice, applicabile su tutto il territorio nazionale e in grado di indentificare il maggior numero di soggetti celiaci.

La diagnosi di malattia celiaca viene effettuata sulla base di differenti test *in vitro* e *in vivo*, rappresentati dalla ricerca di specifici anticorpi sierici e dalla biopsia intestinale, rispettivamente [Volta, 2003]. Sebbene la biopsia intestinale rimanga il “*gold standard*” per la diagnosi di celiachia, l’impiego dei test sierologici ha segnato una svolta decisiva nella

diagnostica della malattia celiaca, consentendo di identificare i gruppi di pazienti a rischio e di incrementare il numero delle diagnosi.

I marker sierici della patologia celiaca includono un ampio spettro di anticorpi, alcuni dei quali come gli anticorpi antigliadina (AGA) sono test ormai superati e conservano solo poche indicazioni sul piano pratico, altri come gli anticorpi antiendomio (EmA) ed antitransglutaminasi tissutale (anti-tTG) sono test altamente predittivi ed utilizzati nell'uso di routine. Altri test, come gli anticorpi diretti verso i peptidi deamidati della gliadina (DGP-AGA), sono di recente introduzione con ottime prospettive per il futuro della diagnostica sierologica della celiachia (**Tabella 1.3**) [Volta et al., 2008].

Tabella 1.3 - *Markers* sierologici disponibili per la diagnosi di celiachia [Volta et al., 2008]

Marker	Caratteristiche diagnostiche		Caratteristiche tecniche	
	Sensibilità	Specificità	Riproducibilità	Metodica
Anti-tTG IgA	97%	91%	Elevata	ELISA (automatizzata)
EMA IgA	94%	100%	Medio-bassa (Variabilità inter-laboratori)	IFL (manuale)
AGA IgA	73%	87%	Elevata	ELISA (automatizzata)
DGP-AGA IgA	84%	90%	Elevata	ELISA (automatizzata)
DGP-AGA IgG	84%	99%	Elevata	ELISA (automatizzata)

Gli anticorpi specifici per la celiachia appartengono alle immunoglobuline di classe IgA e IgG tuttavia, solamente gli anticorpi di classe IgA sono generalmente considerati *markers* altamente sensibili e specifici per la malattia celiaca. La ricerca di anticorpi di classe IgG, a causa dell'elevata percentuale di falsi positivi, è limitata ai pazienti con deficit di IgA, condizione spesso associata alla malattia celiaca [Korponay-Szabo et al., 2003].

Gli **anticorpi antigliadina (AGA)** indicano la presenza di una reazione immunitaria nei confronti della gliadina e sono stati il primo marker sierologico ad entrare nella pratica clinica. Nonostante questo dosaggio sia considerato superato, è tuttora molto diffuso. Gli AGA sono dosati sia con una metodica ELISA sia mediante immunofluorescenza (IFL) indiretta.

La variabilità analitica di questo test è molto elevata a causa della mancanza di standard internazionali di riferimento e della variabilità inter-laboratorio. Questo test mostra una sensibilità del 73% ed una specificità del 87% [Volta et al., 2008]. Falsi positivi all'AGA sono frequenti nei soggetti affetti da altre malattie gastrointestinali. L'importanza di questo marker sierologico è diminuita dopo l'introduzione nella pratica clinica della ricerca degli anticorpi antipeptidi deamidati, anti-endomisio (EMA) ed anti-trasglutaminasi tissutale (anti-tTG) che, al momento, rappresentano i test più utilizzati per la diagnostica sierologica della celiachia.

Gli **anticorpi anti-endomisio (EMA)** indicano la presenza nel soggetto di una reazione immunologica nei confronti della matrice del collagene che riveste il muscolo liscio dell'intestino (endomiso). Gli EMA sono ricercati in IFL indiretta, utilizzando una porzione di tessuto derivante da esofago di scimmia o cordone ombelicale [Evangelisti e Restani, 2011]. Questo test è molto affidabile se condotto nei laboratori di riferimento, consentendo di identificare il 94% dei soggetti celiaci con una specificità praticamente assoluta [Volta et al., 2008].

La ricerca degli **anticorpi anti-trasglutaminasi (anti-tTG)** è un test di più recente introduzione condotto mediante metodica ELISA. Gli anti-tTG di classe IgA presentano una sensibilità più elevata di quella degli EMA (97% vs. 94%), tuttavia la specificità è inferiore (91% vs. 100%). L'uso della tecnica ELISA, semplice e standardizzata, garantisce una buona riproducibilità inter-laboratorio di questo marker sierologico, mentre al contrario il dosaggio degli EMA richiede personale altamente specializzato. Valori molto elevati al dosaggio degli anticorpi antitransglutaminasi permettono attualmente di evitare la biopsia nei bambini.

Ancora di più recente introduzione è il test per la ricerca degli **anticorpi** diretti verso i **peptidi deamidati della gliadina (DGP-AGA)** [Agardh, 2007]. Dal punto di vista patogenetico, la deamidazione dei peptidi di gliadina da parte della tTG rende più immunogenici i peptidi di gliadina modificati rispetto a quelli nativi. La sensibilità di questo test è pari all'84% sia per le immunoglobuline di classe IgA sia di classe IgG con una specificità che raggiunge il 99% per gli anticorpi di classe IgG. I DGP-AGA presentano dunque un'accuratezza diagnostica più elevata dei tradizionali AGA.

Per quanto riguarda i *markers* di classe IgG, esclusi i DGP-AGA, questi anticorpi sono di limitata utilità a causa dell'elevato numero di falsi positivi, sia in pazienti con altre patologie intestinali e autoimmuni, sia in controlli sani; la loro specificità, infatti, oscilla fra il 60 e l'80%. Tutti i *markers* di classe IgG (AGA, EmA, anti- tTG, DGP-AGA), tuttavia, sono utili per identificare la celiachia associata a deficit totale di IgA [Cataldo et al., 1998].

In conclusione, gli anticorpi anti-tTG IgA rappresentano il test di prima scelta non solo per la loro più elevata sensibilità, ma soprattutto per la loro più elevata riproducibilità in tutti i laboratori. Gli EmA IgA dovrebbero essere impiegati come test di conferma nei casi positivi per anti-tTG, data la loro elevata specificità. Infine, la ricerca degli anticorpi anti-tTG di classe IgG deve essere rivolta esclusivamente ai pazienti con deficit di IgA. È importante sottolineare che i DGP-AGA di classe IgG sembrano rappresentare un mezzo promettente per lo screening anticorpale della celiachia, tuttavia la validità di questo test deve ancora essere confermata, utilizzando un numero elevato di soggetti.

Generalmente, se i test sierologici risultano positivi la diagnosi viene confermata con la valutazione morfologica della biopsia intestinale. La Esofago-Gastro-Duodeno-Scopia (EGDS) è la metodica attualmente più diffusa per effettuare biopsie a livello del duodeno. Le lesioni della mucosa intestinale compatibili con una diagnosi di patologia celiaca vengono distinte in sei diversi stadi secondo la classificazione di Marsh, modificata successivamente da Oberhuber [Oberhuber et al., 1999].

I sei livelli previsti dalla classificazione secondo Marsh sono così definiti:

- **Stadio Marsch 0:** mucosa normale;
- **Stadio Marsch I:** lesione caratterizzata da linfocitosi intraepiteliale, non specifica di malattia celiaca;
- **Stadio Marsch II:** lesione caratterizzata da linfocitosi intraepiteliale associata ad ipertrofia delle cripte di Lieberkuhn;
- **Stadio Marsch III:** parziale o totale atrofia dei villi; la lesione di tipo III viene ulteriormente suddivisa in:
 - **3a:** villi con lieve atrofia e incremento dei linfociti intraepiteliali;
 - **3b:** atrofia dei villi di grado moderato, aumento dei linfociti intraepiteliali;
 - **3c:** atrofia totale dei villi e incremento dei linfociti intraepiteliali.

Al fine di semplificare questa classificazione è stata recentemente proposta da Corazza e Villanacci una diversa versione della classificazione istologica, che prevede la suddivisione delle lesioni che caratterizzano la malattia celiaca in due categorie [Corazza e Villanacci, 2005]:

- **Non-atrofica** (grado A), caratterizzata dall'aumento patologico del numero dei linfociti intraepiteliali;
- **Atrofica** (grado B), quest'ultima categoria è stata ulteriormente suddivisa in:
 - **Grado B1:** in cui il rapporto villo/cripta è inferiore a 3/1, con villi ancora individuabili;
 - **Grado B2:** in cui i villi non sono più individuabili.

In **Tabella 1.4** sono riportati i due sistemi classificativi a confronto.

Tabella 1.4 - Comparazione della classificazione secondo Marsh-Oberhuber e della classificazione di Corazza-Villanacci

Classificazione di Marsh-Oberhuber	Classificazione di Corazza-Villanacci
Tipo 1	Grado A
Tipo 2	
Tipo 3a	Grado B1
Tipo 3b	
Tipo 3c	Grado B2

Sebbene la valutazione morfologica della biopsia duodenale rappresenti un presidio fondamentale nella diagnostica della malattia celiaca, nei pazienti in età pediatrica ed adolescenziale, con quadro clinico di malassorbimento e sintomi correlati all'assunzione di glutine, in presenza di una positività per anticorpi anti- tTG IgA superiore ad almeno 10 volte il valore soglia, confermata dalla positività per gli EmA IgA e dalla presenza del profilo genetico compatibile (HLA-DQ2 e/o DQ8), la diagnosi di celiachia viene effettuata senza ricorrere alla biopsia duodenale [AIC, 2018].

Un altro esame che viene condotto nella pratica clinica è la tipizzazione degli antigeni di istocompatibilità (HLA), il quale ha un valore predittivo negativo pressoché assoluto. Questo esame è utile per escludere la malattia celiaca nei soggetti con dubbia diagnosi; tuttavia il test ha un basso valore predittivo positivo, infatti il 30-35% della popolazione generale e il 60-70% dei familiari di primo grado hanno questi antigeni senza presentare la malattia. L'HLA spiega soltanto il 30-40% del rischio genetico. La tipizzazione HLA può dunque rappresentare uno strumento utile per la diagnosi di celiachia nei casi di pattern sierologici e/o istologici ambigui e nell'ambito di una strategia di screening per individui asintomatici ma che appartengono a gruppi a rischio, quali i soggetti con sindrome di Down, sindrome di Turner e familiari di primo grado di soggetti celiaci.

Recentemente sono stati sviluppati test specifici ad uso domiciliare, acquistabili direttamente in farmacia, senza obbligo di ricetta, che permettono di effettuare una diagnosi precoce ed iniziale ("screening di primo livello") della malattia celiaca. L'accuratezza diagnostica dei test rapidi è indubbiamente inferiore a quella dei *markers* sierologici tradizionali, per cui il risultato di questi test dovrebbe essere sempre controllato con la ricerca degli anticorpi anti-tTG in ambito ospedaliero.

Tra i test rapidi disponibili in commercio, uno dei più diffusi è lo **Xeliac[®] Test PRO (Figura 1.13)**. Questo test è di facile e rapida esecuzione, fornisce il risultato in 5 minuti, e si effettua analizzando una goccia di sangue del paziente. Lo Xeliac[®] Test PRO è basato sul dosaggio di due tipi di anticorpi specifici associati alla celiachia, gli anticorpi anti-transglutaminasi di classe IgA ed IgG; fornendo, in questo modo, una garanzia di riscontro della malattia anche per i pazienti con deficit di IgA.



Figura 1.13. Xeliac® Test PRO

Per quanto riguarda il *follow-up* della malattia celiaca, è importante sottolineare che controlli periodici nei pazienti celiaci sono necessari a causa della possibile insorgenza di patologie associate e complicanze, soprattutto nei soggetti che non rispettano correttamente la dieta o sono stati diagnosticati in età avanzata [Catassi et al., 2002]. Il protocollo del *follow-up* della malattia celiaca, pubblicato nel supplemento della Gazzetta Ufficiale dello Stato italiano in data 19 agosto 2015, ha fatto chiarezza sulla necessità di predisporre controlli periodici per seguire i pazienti celiaci dopo la diagnosi.

Tale protocollo suggerisce di eseguire un primo controllo entro 6-12 mesi dalla diagnosi e, successivamente, ogni 1-2 anni presso un centro di riferimento per la malattia celiaca al fine di verificare la comparsa di malattia autoimmuni, alterazioni metaboliche e diagnosticare precocemente l'eventuale comparsa di complicanze.

Ad ogni controllo, i pazienti dovranno sottoporsi a visita medica, valutazione dietetica, controllo dell'emocromo e dosaggio degli anticorpi sierici anti-transglutaminasi. Infine, il protocollo di *follow-up* prevede l'esecuzione della densitometria ossea (MOC) dopo almeno 18 mesi di dieta senza glutine per valutare la presenza di eventuale osteopenia/osteoporosi e la ripetizione successiva dell'esecuzione di questo esame solo se patologica o in presenza di indicazione medica. Inoltre, il dosaggio del TSH (*Thyroid-Stimulating Hormone*) va eseguito, unitamente a quello degli anticorpi anti TPO (tireoperossidasi) alla diagnosi e se entrambi nella norma, va ripetuto ogni 3 anni.

1.3.6 Trattamento

Nonostante siano in sperimentazione numerosi approcci terapeutici per la patologia celiaca, la dieta senza glutine rappresenta attualmente l'unico trattamento disponibile per la celiachia. Il trattamento dietetico prevede una rigorosa esclusione degli alimenti contenenti glutine per tutta la vita e, se avviata precocemente, consente di ridurre il rischio di complicanze tardive [Fasano e Catassi, 2001]. Per la maggior parte dei soggetti celiaci, l'eliminazione del glutine dalla dieta, comporta la completa scomparsa dei sintomi clinici, sia intestinali sia extra-intestinali, la remissione delle lesioni intestinali e la normalizzazione dei livelli sierici degli auto-anticorpi glutine-dipendenti [Reunala and Collin, 1997; Fasano e Catassi, 2001].

La dieta senza glutine, inoltre, permette un miglioramento delle condizioni fisiche e psicologiche di tali pazienti, determinando un aumento del peso corporeo e della velocità di crescita, un aumento dell'appetito, il miglioramento dell'umore e del rendimento scolastico [Fabiani et al., 1996].

La mortalità dei soggetti celiaci diagnosticati in età pediatrica, e da allora in rigorosa dieta *gluten-free*, non risulta aumentata rispetto a quella della popolazione generale, tuttavia la mortalità dei celiaci diagnosticati in età adulta è pressoché raddoppiata [Logan et al., 1989]. Spesso, la causa di morte è rappresentata da una delle complicanze dovute ad una prolungata esposizione al glutine, a causa di una diagnosi tardiva o mancata di celiachia o di un'insufficiente aderenza alla dieta [Biagi e Calabrò, 2010]. Tra le principali complicanze troviamo diverse neoplasie, in particolare il linfoma intestinale alle cellule T e l'adenocarcinoma dell'intestino tenue e di altre sedi del tubo digerente, tra cui colon ed esofago.

La dieta senza glutine prevede l'eliminazione degli alimenti contenenti le proteine del frumento, dell'orzo e della segale (pane, pasta, pizza, ecc.). In sostituzione a tali cereali possono essere introdotti prodotti dietetici privi di glutine formulati mediante miscele di farine derivanti da cereali non tossici. Un discorso a parte va fatto per l'avena la quale, pur essendo considerata dalla normativa un cereale contenente glutine, rappresenta un caso particolare. Secondo le evidenze scientifiche disponibili l'avena può essere inserita nella

dieta della maggior parte dei celiaci senza effetti negativi per la salute. Infatti, prodotti a base di avena, specificatamente formulati per i celiaci, sono utilizzati da molto tempo nei paesi nordici e sono presenti anche nel Registro Nazionale dei prodotti erogabili. L'avena, per essere impiegata come ingrediente in tali prodotti, deve avere un contenuto di glutine inferiore ai 20 ppm, misurati mediante test ELISA basato sull'impiego di un anticorpo diretto contro il peptide R5. La presenza dell'avena nella dieta senza glutine resta comunque una questione ancora oggetto di studi e ricerche da parte della comunità scientifica [Ministero della Salute, 2017] e ci sono indicazioni che la tossicità sia varietà-dipendente [Ballabio et al., 2011]. In **Tabella 1.5** sono riportati i cereali contenenti proteine tossiche e i cereali o vegetali comunemente impiegati per la formulazione dei prodotti *gluten-free*.

Tabella 1.5 - Cereali contenenti proteine tossiche e vegetali che ne sono privi

Cereali contenenti proteine tossiche	Cereali e altri vegetali dai quali si ottengono farine <i>gluten-free</i>
Grano tenero	Amaranto (pseudocereale)
Grano duro	Castagne
Farro	Grano saraceno (pseudocereale)
Kamut	Legumi (ceci, soia, ecc.)
Orzo	Mais
Segale	Miglio
Spelta	Patata
	Quinoa (pseudocereale)
	Riso
	Sesamo
	Sorgo
	Tapioca

La totale eliminazione del glutine dalla dieta risulta difficile, in particolare a causa della contaminazione degli alimenti con tracce di questo complesso proteico [Collin et al., 2004]. I livelli massimi di glutine tollerabili da un soggetto celiaco e i relativi livelli massimi accettati negli alimenti sono stati a lungo discussi a livello internazionale. Il Regolamento Europeo n.

41/2009, abrogato e sostituito dal Regolamento Europeo n. 1169/2011, definisce “senza glutine” i prodotti con tenore residuo di glutine inferiore a 20 mg/kg (ppm). Tale limite permette un consumo rilevante di questi prodotti senza che venga superato il limite giornaliero di glutine considerato sicuro per i pazienti affetti da celiachia (10 mg/die) [Gibert et al., 2013]. Sono invece definiti a “bassissimo tenore di glutine” i prodotti con contenuto di glutine compreso tra 20 e 100 ppm.

Una garanzia di qualità dei prodotti destinati ai soggetti affetti da celiachia viene fornita dal Ministero della Salute che pubblica la lista dei prodotti *gluten-free* notificati ed elargibili gratuitamente. Dal 2017, con la revisione dei Livelli Essenziali di Assistenza (LEA), la celiachia e la sua variante clinica, la dermatite erpetiforme, sono state trasferite nell’elenco delle malattie croniche invalidanti. La nuova collocazione prevede il regime di esenzione sia per tutte le prestazioni sanitarie successive alla diagnosi, sia per gli alimenti “senza glutine specificatamente formulati per i celiaci” (es. pane, pasta, biscotti, pizza, cereali per la prima colazione e alimenti simili) che devono coprire il 35% del fabbisogno energetico totale giornaliero da carboidrati senza glutine.

Il celiaco, infatti, una volta ottenuta una diagnosi certificata deve seguire una dieta varia ed equilibrata ma rigorosamente senza glutine il cui apporto energetico giornaliero da carboidrati, come per tutti, deve essere di circa il 55% di cui però:

- il 35% deve derivare da alimenti senza glutine (alimenti trasformati che per tradizione nella loro composizione prevedono l’utilizzo di ingredienti contenenti glutine ma che sono stati prodotti, preparati e/o lavorati appositamente con ingredienti naturalmente senza glutine o con ingredienti deglutinati);

- il restante 20% deve provenire da alimenti naturalmente privi di glutine (alimenti e bevande non trasformati, quindi mono-ingrediente, che per loro natura non contengono glutine; alimenti e bevande trasformati che per natura, composizione e processo di produzione non prevedono l’utilizzo di ingredienti contenenti glutine; alimenti e bevande trasformati che per tradizione nella ricetta/formula di produzione possono prevedere l’utilizzo di ingredienti contenenti glutine ma che sono stati prodotti con ingredienti naturalmente privi di glutine).

In Europa, con l'entrata in vigore del Regolamento 609/2013 relativo agli alimenti destinati a gruppi specifici della popolazione, gli alimenti senza glutine sono usciti ufficialmente dalla categoria degli alimenti destinati ad un'alimentazione particolare. In Italia, per mantenere il regime di erogabilità di tali prodotti, è stato necessario modificare il Decreto Ministeriale (8 giugno 2001) relativo all'assistenza sanitaria integrativa dei prodotti destinati ad una alimentazione particolare adottando un nuovo decreto (DM del 17 maggio 2016).

Il nuovo decreto stabilisce che l'erogabilità è possibile solo per gli alimenti senza glutine classificabili come *“senza glutine”* *“specificamente formulati per persone intolleranti al glutine”* o *“specificamente formulati per celiaci”* ossia quegli alimenti sostitutivi di pane e pasta caratterizzati tradizionalmente dalla presenza di cereali contenenti glutine.

I prodotti appartenenti alle categorie sopraelencate possono essere erogati gratuitamente dal Servizio Sanitario Nazionale solo se inclusi nel Registro Nazionale dei prodotti senza glutine disponibile *on-line* sul sito del Ministero della Salute (www.salute.gov.it). I prodotti erogabili sono riconoscibili in etichetta da uno specifico logo illustrato in **Figura 1.14**.



Figura 1.14. Logo per il riconoscimento dei prodotti erogabili

In **Tabella 1.6** sono elencati i tetti di spesa per l'acquisto da parte dei soggetti celiaci dei prodotti in esenzione. I limiti di spesa sono stati valutati tenendo in considerazione il sesso, l'età, i fabbisogni energetici totali definiti dagli attuali Livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti ed energia LARN (2014), il secondo livello di attività fisica con un incremento del 30% per tener conto di particolari esigenze nutrizionali e degli attuali prezzi medi di mercato applicati nel canale di distribuzione prevalente (canale farmaceutico).

Tabella 1.6 - Limiti massimi di spesa per l'erogazione dei prodotti senza glutine

Fasce di età	Limite mensile (€)	
	Maschi	Femmine
6 mesi – 5 anni		56
6 – 9 anni		70
10 – 13 anni	100	90
14 – 17 anni	124	99
18 – 59 anni	110	90
≥ 60 anni	89	75

Seguire una dieta *gluten-free* a lungo termine è spesso difficile per la minor palatabilità degli alimenti privi di glutine, la ridotta possibilità di scelte alimentari, la difficile gestione dei pasti fuori casa, senza contare il pericolo di contaminazioni. Inoltre, la dieta senza glutine è spesso associata a squilibri nutrizionali (come fibre, vitamine e minerali) e ad una sbilanciata assunzione calorica [Vici et al., 2016]. Tutte queste considerazioni sottolineano l'importanza di selezionare nuovi ingredienti senza glutine al fine di implementare le proprietà funzionali e sensoriali dei prodotti *gluten-free*.

1.4 ZEA MAIS L.

1.4.1 Morfologia e fisiologia

Il mais (*Zea mays L.*) è una pianta appartenente alla famiglia delle *Poaceae* (ex *Graminaceae*), della classe delle Monocotiledoni [Maggiore, 2007].

In **Figura 1.15** sono illustrate le componenti botaniche del mais. La pianta è monoica: presenta sulla stessa pianta sia fiori maschili (**A**) sia femminili (**B**). I fiori femminili sono riuniti in spighe (**C**), che rappresentano l'infiorescenza. Il frutto, secco e indeiscente o cariosside (**D**), si inserisce sul rachide, formando la spiga (**E**), chiamata volgarmente pannocchia, posta all'ascella delle foglie e circondata da voluminose bratee (**F**).

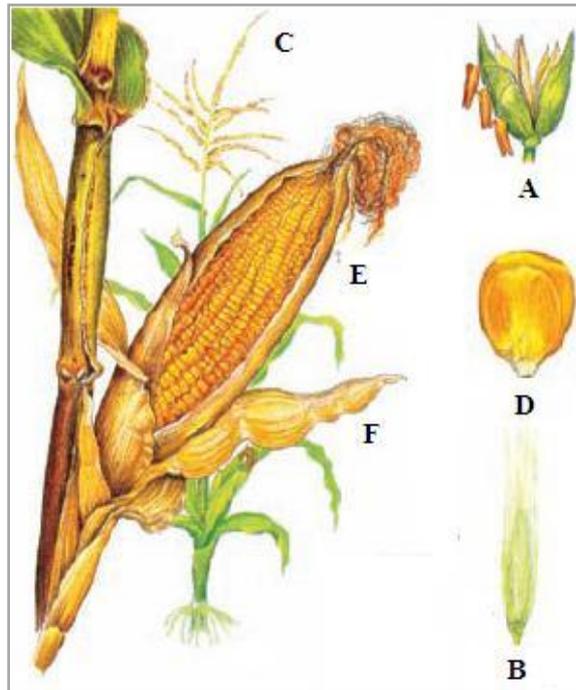


Figura 1.15. Componenti botaniche di *Zea mays* L.

Le diverse porzioni della cariosside sono illustrate in **Figura 1.16**: l'endosperma (85% del peso della cariosside matura), l'embrione (10%) ed il rivestimento esterno costituito dal pericarpo che insieme al pedicello costituiscono il 5% del peso. Nell'endosperma maturo, coperto dal pericarpo, si trova l'aleurone.

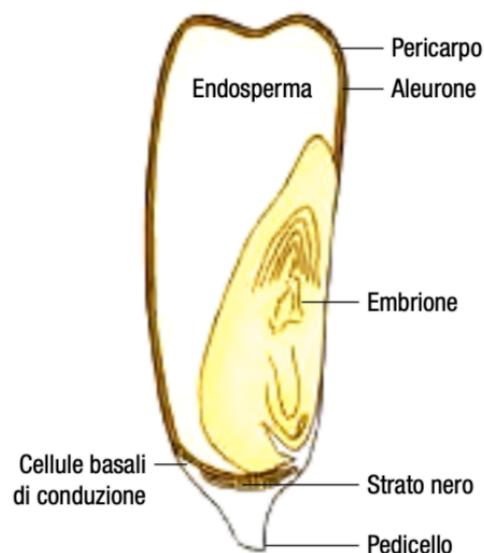


Figura 1.16. Componenti di una cariosside di mais

1.4.2 Composizione della cariosside

La cariosside contiene il 70-75% di amido, il quale rappresenta il composto di riserva della pianta. L'amido è presente sotto forma di amilosio e amilopectina. La struttura dell'amido è influenzata da fattori genetici, sono infatti coltivati mais a differente contenuto di amilosio e amilopectina (**Tabella 1.7**).

Tabella 1.7 - Contenuto di amilosio nell'amido di diversi tipi di mais [Maggiore, 2007]

Tipologia di mais	% amilosio
Normale	29
Mutante	
<i>Amylose-extender (ae)</i>	33
<i>Dull (du)</i>	55
<i>Sugary (su)</i>	65
<i>Waxy (wx)</i>	0
<i>ae du</i>	47
<i>du su</i>	70

Il mais ricco in amilosio è utilizzato per scopi alimentari (es produzione di pasta), il tipo ricco in amilopectina, invece, trova applicazione nell'industria degli adesivi, della carta e del tessile.

Le principali proteine contenute nella cariosside di mais sono proteine di riserva rappresentate dalle prolammine o zeine (55% delle proteine totali) e dalle gluteline (39%).

Le zeine sono proteine altamente idrofobiche, solubili in solventi alcolici, con un basso valore biologico, in quanto carenti degli amminoacidi essenziali lisina e triptofano.

Le gluteline sono solubili in soluzioni alcaline e presentano un valore biologico intermedio. Il restante 5% è rappresentato da proteine aventi funzione di riserva (albumine e globuline) caratterizzate da una buona composizione amminoacidica.

La cariosside contiene circa il 4% di olii caratterizzati dalla presenza di acidi grassi insaturi (acido oleico e linoleico), vitamine E e tocoferoli.

La colorazione delle cariossidi mature varia dal bianco al nero, i principali pigmenti responsabili della colorazione sono:

- i carotenoidi e le xantofille, che conferiscono il colore giallo;
- le antocianine, contenute nell'aleurone, che determinano la pigmentazione dal rosso al nero.

1.4.3 Miglioramento genetico

Negli ultimi anni l'interesse della ricerca per il miglioramento genetico del mais è aumentato. La ricerca genetica si pone l'obiettivo di fissare alcuni caratteri in linee pure omozigoti, controllando l'impollinazione attraverso ripetute autofecondazioni, in modo da ottenere varietà con profili migliori di quelli delle specie parentali. Tra i principali obiettivi della ricerca genetica vi è l'ottenimento di specie resistenti a molteplici fattori (freddo, batteri, parassiti, marciumi, malattie fogliari) e l'aumento della resa, intesa come produzione di granella ad ettaro.

Le prime pratiche di miglioramento genetico nel mais, attuate mediante il concetto di "selezione massale" risalgono al XIX secolo. Questa procedura consiste nel miglioramento di una popolazione operando una selezione dei fenotipi più promettenti (selezione massale positiva), oppure, eliminando quelli che possiedono caratteri indesiderati (selezione massale negativa). Pur trattandosi di una procedura semplice e poco costosa, presenta dei limiti rilevanti a causa delle influenze ambientali e dell'elevato livello di variabilità nella popolazione sottoposta a selezione [Acquaah, 2007]. Come si può osservare dalla **Figura 1.17**, la selezione del fenotipo non è necessariamente identica a quella del genotipo.

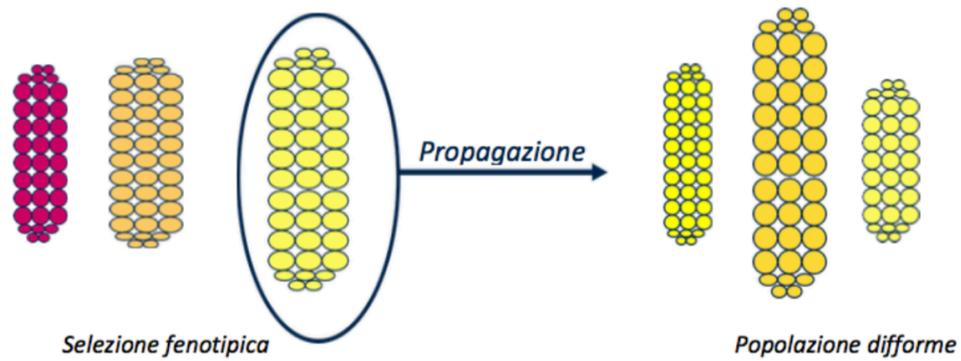


Figura 1.17. Selezione massale del mais

Un importante salto di qualità nel processo di selezione venne realizzato con l'introduzione del concetto di ibrido: le piante ibride (prima generazione filiale o F1) si ottengono per incrocio tra due linee pure e portano il corredo genetico di entrambe le varietà parenterali. I moderni ibridi hanno produttività più elevata rispetto alle vecchie piante di mais, in tutte le condizioni ambientali (**Figura 1.18**).

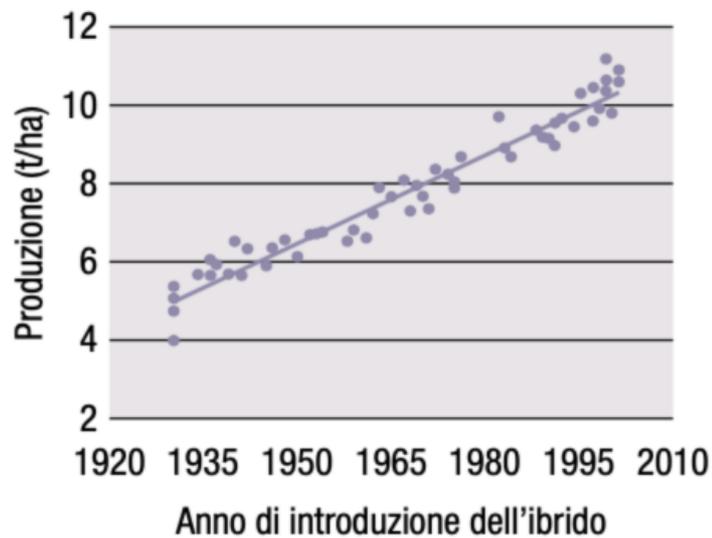


Figura 1.18. Andamento della produttività degli ibridi [Duvik, 2005]

Oltre alla maggior produttività, altri vantaggi associati agli ibridi sono:

- la resistenza alla piralide (insetti fitofagi del mais),

- l'aumento dell'attività dell'apparato fogliare, la quale assicura un'elevata attività fotosintetica fino alla maturazione della granella,
- la tolleranza a temperature relativamente basse, durante le prime fasi di vita della pianta, che consente una semina precoce con conseguente allungamento della stagione utile per la cultura.

I primi ibridi sono comparsi in Italia a partire dal 1950 e negli anni '70 gli ibridi sostituirono progressivamente le varietà tradizionali.

1.4.4 Aspetti nutrizionali

Il mais sta diventando la prima coltura alimentare al mondo, anche se solo il 10 % della produzione mondiale è direttamente destinata al consumo umano. Il mais per l'alimentazione umana è largamente utilizzato nel nostro paese: sotto forma di farina per la polenta, per la produzione di pop-corn, fiocchi tostati, gallette, ecc. Inoltre, essendo un alimento naturalmente privo di glutine, risulta idoneo per la formulazione di prodotti destinati a soggetti affetti da patologie correlate al glutine (allergie ad alcune proteine del frumento, celiachia, sensibilità al glutine non celiaca).

In **Tabella 1.8** è riportata la composizione chimica e il valore energetico del mais, riferiti a 100 g di parte edibile.

Tabella 1.8 - Composizione nutrizionale del mais [Maggiore, 2007]

Composizione chimica (%)	
Acqua	12.5
Carboidrati	75.1
Proteine	9.2
Lipidi	3.8
Fibra	2

Il mais è costituito dal 75.1% di carboidrati; l'endosperma è principalmente composto da granuli di amido dispersi in un reticolo proteico. L'amido del mais è generalmente costituito da una miscela di amilosio (25%) e amilopectina (75%). Tuttavia, la struttura dell'amido è influenzata da variazioni genetiche; sono infatti presenti sul mercato mais a elevato contenuto in amilosio (amilomais) e amilopectina (mais ceroso), utilizzati nell'industria alimentare.

L'amilopectina presenta una struttura ramificata che, durante il processo digestivo, viene scissa ad opera dell'amilasi pancreatica. L'amilosio, invece, ha una struttura lineare meno accessibile agli enzimi digestivi; esso viene scisso ad opera dell' α -amilasi con una velocità inferiore rispetto all'amilopectina, e viene inoltre metabolizzato dal microbiota intestinale, con conseguente produzione di acidi grassi a corta catena.

Le proteine (9.2%) sono prevalentemente costituite da zeine (55% delle proteine totali) e gluteline (39%). Solo il 5% delle proteine totali è rappresentato da proteine di riserva. Dal punto di vista nutrizionale è importante considerare il valore biologico delle proteine, misurato calcolando l'azoto utilizzato per la formazione dei tessuti rapportato all'azoto assorbito dagli alimenti. Il valore biologico è direttamente proporzionale al contenuto di amminoacidi essenziali e fornisce una misura dell'efficienza con cui il corpo utilizza le proteine assunte con la dieta [Hoffman and Falvo, 2004].

Nel mais le proteine di riserva (albumine e globuline) hanno una composizione amminoacidica favorevole; le zenine, invece, sono carenti degli amminoacidi essenziali triptofano e lisina. Le gluteline presentano un valore biologico intermedio [Maggiore, 2007].

Dal germe di mais si ricava l'olio di germe di mais costituito da acidi grassi polinsaturi (50.43%), monoinsaturi (30.66%), saturi (14.96%) e vitamina E (34.5 mg/100g) [Maggiore, 2007].

La cariosside del mais è inoltre ricca di carotenoidi (62 μ g retinolo equiv/100 g), vitamina B1 (0.36 mg/100 g) e minerali tra cui il ferro (2.4 mg/100 g).

1.4.5 Mondo e mercato

Il mais, il riso e il frumento sono i cereali che dominano il panorama agricolo mondiale. Tra questi cereali, il mais presenta la maggior produzione, essendo superiore a 650 milioni di tonnellate rispetto alle 600 milioni di tonnellate del riso e del frumento (**Figura 1.19**).

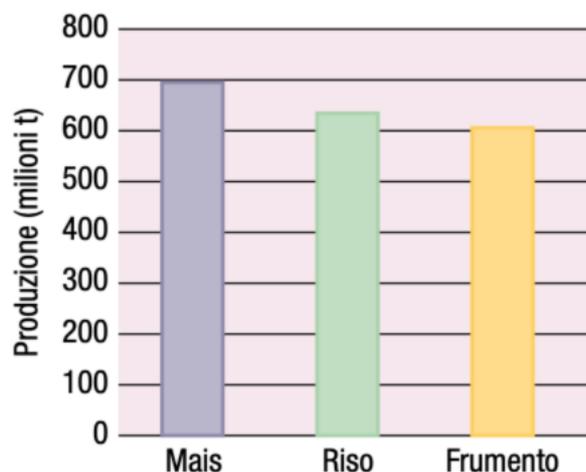


Figura 1.19. Produzione mondiale dei tre principali cereali [Maggiore, 2007]

In Italia, il mais rappresenta una delle grandi colture agricole: la sua produzione in granella è pari a 11 milioni di tonnellate. La produzione nazionale è principalmente concentrata al nord: le province di Cremona, Padova, Brescia e Mantova concentrano il 26% della produzione nazionale. La distribuzione della coltivazione del mais in Italia è illustrata in **Figura 1.20**.

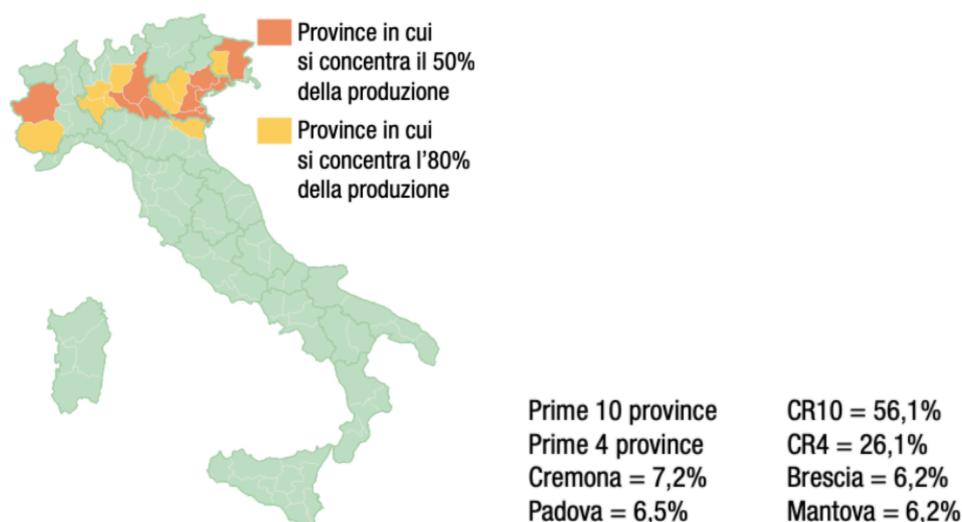


Figura 1.20. Concentrazione della produzione di mais in Italia per province [Maggiore, 2007]

1.4.6 Composizione fenolica di *Zea mays* L.

I composti fenolici sono metaboliti secondari delle piante, alcuni sono fondamentali per lo sviluppo della pianta e l'interazione con l'ambiente circostante mentre altri vengono prodotti in risposta a condizioni di stress quali infezioni e raggi ultravioletti [Nicholson and Hammerschmid, 1992; Boudet, 2007]. I composti fenolici sono presenti nel mondo vegetale in forma solubile e insolubile/legata a componenti della parete cellulare. Nel mais i composti fenolici sono principalmente presenti nella forma legata [Adom and Liu, 2002].

I composti fenolici possiedono almeno un anello aromatico con uno o più gruppi ossidrilici [Shahidi and Naczk, 2004] e variano da molecole semplici, come gli acidi fenolici, a composti polimerizzati come i tannini. I composti fenolici presenti nel mondo vegetale sono generalmente coniugati, a livello del gruppo idrossilico con uno zucchero, ovvero appaiono in forma glicosilata. In **Figura 1.21** viene illustrata la classificazione di questi composti proposta da Shahidi and Naczk (2004).

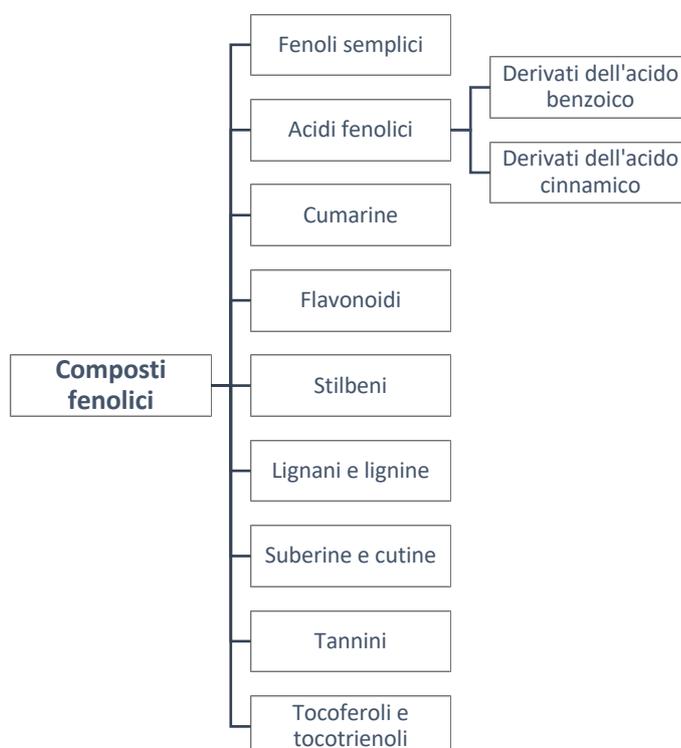


Figura 1.21. Classificazione generale dei composti fenolici [Shahidi and Naczk, 2004]

Gli acidi fenolici, in particolare l'acido ferulico e l'acido p-cumarico, sono i principali composti fenolici presenti nel mais, sia nella forma solubile sia in quella insolubile. L'acido ferulico o acido 3-metossi-4-idrossicinnamico, contenuto principalmente nell'aleurone e nel pericarpo, risulta essere il più abbondante; la forma legata alla parete cellulare è quella prevalente, e quando viene ossidato tende a formare dimere e trimeri. Tra i flavonoidi presenti nel mais vi sono i flavonoli (es. quercetina e kempferolo) [Das and Singh, 2015; Ramos et al., 2012], gli antociani e le proantocianidine. In **Figura 1.22** sono elencati i principali composti fenolici contenuti nel mais.

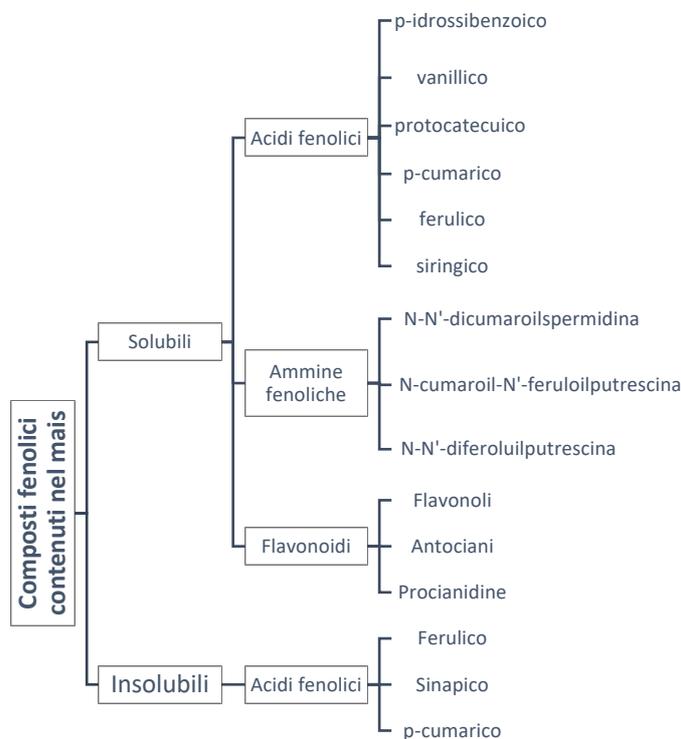


Figura 1.22. Principali composti fenolici contenuti nel mais giallo e pigmentato [Salinas-Moreno et.al, 2017]

• **Composti fenolici solubili**

I composti fenolici solubili sono estraibili in soluzione idroalcolica. Gli **acidi fenolici** sono presenti in questa frazione nella loro forma libera, glicosilati o esterificati [Salinas-Moreno et.al, 2017] e derivano dall'acido benzoico o cinnamico. La struttura chimica dei principali acidi fenolici contenuti nel mais è illustrata in **Figura 1.23**.

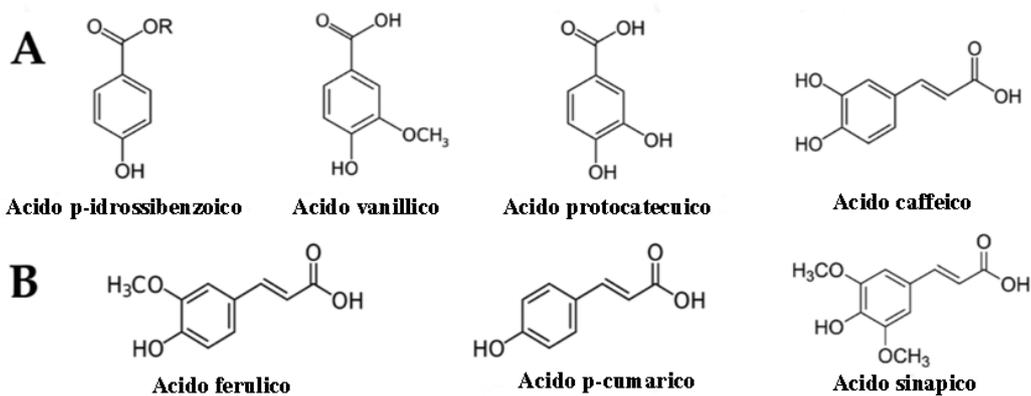
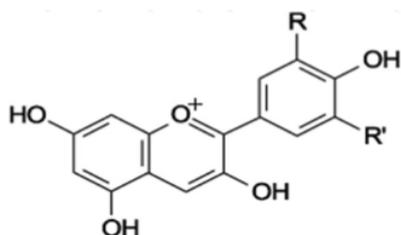


Figura 1.23. Acidi fenolici nel mais: derivati dell'acido benzoico (A) e cinnamico (B). [Salinas-Moreno et.al, 2017]

Come si può osservare dalla **Figura 1.23**, gli acidi p-idrossibenzoico, vanillico e protocatecuico derivano dall'acido benzoico mentre l'acido ferulico e cumarico derivano dall'acido cinnamico.

Gli antociani sono una classe idrosolubili di flavonoidi responsabili della colorazione tipica dei mais pigmentati. Nel mais sono localizzati a livello del pericarpo o dell'aleurone [Salinas-Moreno et al., 1999]. Le antocianine sono caratterizzate da uno zucchero legato all'anello B in posizione 3' e 5'. La **Figura 1.24** illustra la struttura di un'antocianina presente nel mais.



Agliconi	R1	R'
Pelargonidina	H	H
Malvidina	OCH3	OCH3
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH3	H

Figura 1.24. Struttura base di un antocianidina (aglicone) contenuta nel mais [Rodríguez and Wrolstad, 2001]

• **Composti fenolici insolubili/legati**

I composti fenolici insolubili del mais sono quelli ottenuti dall'idrolisi basica condotta sul campione residuo dopo estrazione dei composti fenolici solubili con miscela idroalcolica. Gli acidi fenolici nel mais si trovano principalmente nella forma legata e anche in questa frazione l'acido ferulico è il composto più abbondante. Esso si trova esterificato agli arabinoxilani dell'emicellulosa, in particolare a livello del pericarpo [Das and Singh, 2016].

L'acido cumarico è il secondo acido fenolico più abbondante nel mais. Esso è presente in entrambe le forme, solubile e insolubile. Nella frazione insolubile è principalmente legato alla lignina [Ralph et al., 1994].

1.4.1 Proprietà salutistiche del mais viola

Gli antociani rappresentano i principali pigmenti del mais viola e numerosi studi preliminari condotti *in vitro* ed *in vivo* hanno evidenziato la loro potenziale capacità di ridurre i fattori di rischio di malattie cardiovascolari, diabete, obesità, cancro e malattie croniche [Konczak and Zhang, 2004; He and Giusti, 2010]. Oltre agli antociani, altri composti fenolici presenti nel mais viola sembrano esercitare attività benefiche nei confronti di alcune malattie cronico-degenerative come ipertensione e diabete [Kim et al., 2013; Long et al., 2013].

• Attività antiossidante

Nei sistemi biologici i composti antiossidanti possono fornire protezione da danni di tipo ossidativo. L'attività antiossidante del mais viola è stata ampiamente studiata mediante test *in vitro* e studi *in vivo* condotti su animali.

La capacità antiossidante di numerosi estratti di mais viola è stata misurata *in vitro* mediante differenti test: DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), ABTS (*2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzylthiazoline-6-sulfonic acid)*), APPH (*2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) dihydrochloride*), ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) e FRAP (*ferric reducing antioxidant power*). Sia gli antociani che gli altri composti fenolici sembrano contribuire all'attività antiossidante degli estratti dei mais pigmentati. I composti fenolici del mais viola, comparati con la stessa quantità di composti fenolici derivanti dal mirtillo, esibiscono una maggior attività antiossidante e una cinetica di reazione più rapida. Questi dati suggeriscono che le molecole attive di questa varietà di mais potrebbero possedere un maggior numero di gruppi ossidrilici oppure una conformazione strutturale che permette di interagire al meglio con i radicali liberi [Cevallos-Casals and Cisneros-Zevallos, 2003].

Alcuni studi *ex vivo* condotti su tessuti di topo hanno evidenziato come i composti fenolici presenti nell'estratto di mais viola siano in grado di indurre la secrezione di enzimi ad azione

antiossidante come la superossido dimutasi, la catalasi e la perossidasi, contribuendo alla riduzione dello stress ossidativo indotto da radicali liberi [Ramos-Escudero et al., 2012]. Questi risultati sono stati confermati anche *in vivo*, dove l'inclusione del mais viola nella dieta di topi ha determinato un aumento della capacità antiossidante da parte degli organi deputati alla detossificazione, quali fegato e reni [Zhang et al., 2014].

• **Attività antinfiammatoria**

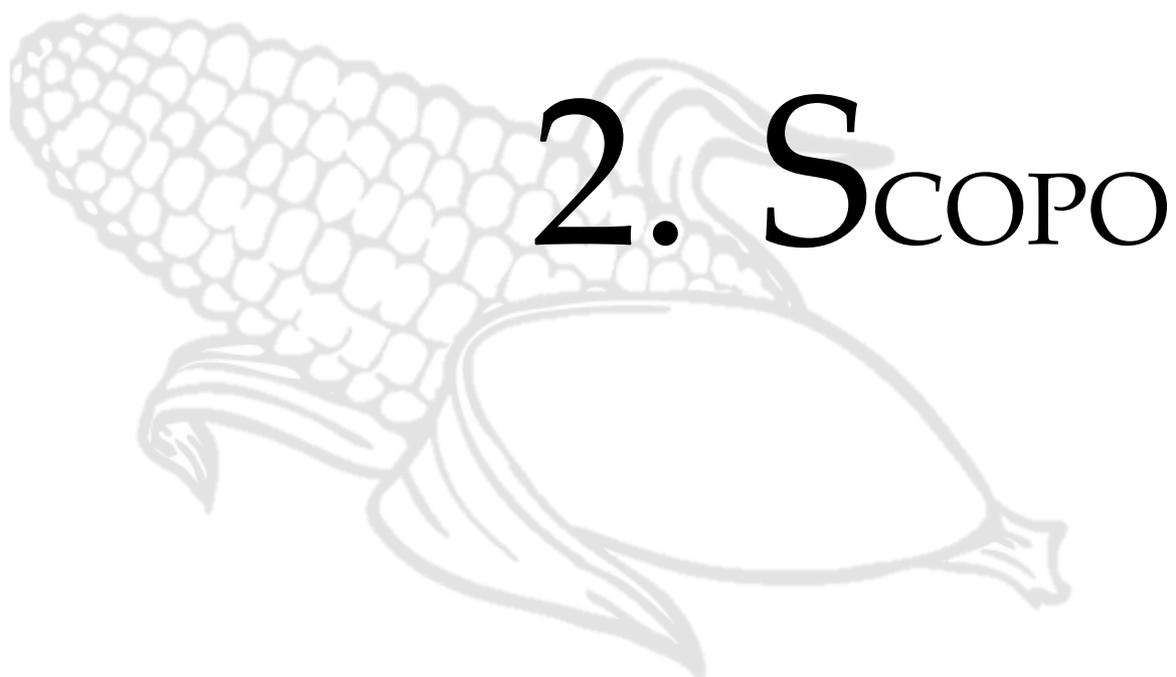
I processi infiammatori sono coinvolti nello sviluppo di alcune malattie cronico-degenerative [Lau et al., 2016].

Studi cellulari *in vitro* condotti su cellule renali murine esposte ad elevati livelli di glucosio hanno evidenziato, in presenza dell'estratto di mais viola, una riduzione della risposta infiammatoria mediata dall'Interleuchina-8 (IL-8) [Li et al., 2012].

Numerosi studi presenti in letteratura, condotti su diverse matrici alimentari, hanno evidenziato la forte attività antinfiammatoria associata alla cianidina-3-O-glucoside, l'antocianina più abbondante nel mais pigmentato. Quest'ultima esercita la sua funzione inibendo, ad esempio, l'attività enzimatica delle cicloossigenasi (COX-1 e COX-2), note proteine coinvolte nell'infiammazione [Reddy et al., 2005].

• **Proprietà antimutagene**

L'agente mutageno è un composto in grado di indurre mutazioni a livello genico. Numerosi studi condotti su differenti matrici vegetali hanno evidenziato come gli antociani e gli acidi fenolici siano in grado di contribuire alla protezione da eventi mutageni [Yoshimoto et al., 2001; Santos-Cervantes et al., 2007]. Le proprietà antimutagene del mais viola sono state valutate mediante il test di Ames: sia la frazione acquosa, ricca di antociani, sia la frazione organica, ricca di acidi fenolici, hanno evidenziato un'attività antimutagena dose dipendente nei confronti di Trp-P-1 [Pedreschi and Cinseros-Zevallos, 2006]. Durante i trattamenti tecnologici, come il processo di nixtamalizzazione, si assiste alla degradazione di alcuni pigmenti; tuttavia l'attività antimutagena nei confronti delle alterazioni indotte dal 2-amminoantracene viene mantenuta dal mais viola anche dopo il trattamento [Mendoza-Diaz et al., 2012].



2. SCOPO

La celiachia è una malattia autoimmune caratterizzata da lesioni a livello della mucosa intestinale, atrofia dei villi e da un ampio spettro di sintomi intestinali ed extra-intestinali. La predisposizione genetica e fattori ambientali, tra cui l'esposizione al glutine attraverso la dieta, determinano l'insorgenza della celiachia e la comparsa dei sintomi, anche se il meccanismo patogenetico alla base della patologia non è stato ancora del tutto chiarito. Lo stress ossidativo è considerato uno dei meccanismi responsabili della tossicità del glutine nei soggetti celiaci. Alcuni peptidi della gliadina, resistenti alla digestione gastro-intestinale, sono infatti in grado di causare stress ossidativo ed alterare l'integrità della barriera intestinale.

La dieta priva di glutine rappresenta l'unica terapia attualmente disponibile per questa patologia, tuttavia alcuni studi suggeriscono che tale dieta sia in grado di ridurre solo parzialmente lo stress ossidativo a livello della mucosa intestinale.

Numerosi componenti dietetici sono caratterizzati da proprietà antiossidanti e antiinfiammatori e potrebbero dunque contribuire alla protezione dell'epitelio intestinale dei soggetti affetti da questa patologia.

Tra i cereali, il mais rappresenta uno dei principali ingredienti utilizzati come alternativa al frumento per la formulazione di alimenti senza glutine. Numerosi studi in letteratura hanno evidenziato la potenziale proprietà antiossidante dei cereali, tanto più importante quanto più i cereali sono ricchi in polifenoli. Tra queste una particolare attenzione va posta alle varietà pigmentate, ricche in antociani, molecole caratterizzate da un'elevata attività antiossidante e anti-radicalica.

Considerando l'interessante profilo fenolico, le varietà pigmentate di mais potrebbero rappresentare nuove alternative per la formulazione di prodotti senza glutine, a cui si assocerebbe una potenziale protezione dell'intestino nei confronti dello stress-ossidativo nei soggetti affetti da celiachia.

In tale contesto, lo scopo di questo lavoro di tesi è stato lo studio di sette varietà, gialle e pigmentate, di *Zea mays* L: un mais viola (uso zootecnico), tre mais gialli e tre varietà pigmentate, ottenute dall'incrocio del mais viola con ciascuna varietà gialla. Il processo d'incrocio ha permesso di ottenere varietà pigmentate idonee per il consumo umano. Nella prima fase del lavoro il profilo fenolico delle diverse varietà di mais è stato caratterizzato mediante tecniche spettrofotometriche e cromatografiche (HPTLC, LC-MS, HPLC).

Parallelamente la capacità antiossidante dei campioni di mais è stata valutata mediante differenti saggi spettrofotometrici (test del DPPH e del TEAC) e cromatografici (HPTLC). L'impiego dell'HPTLC per la valutazione dell'attività antiossidante rappresenta una metodica innovativa in quanto consente di valutare la capacità antiossidante associata alle singole molecole contenute in un campione.

Nella seconda fase del lavoro è stata applicata una digestione gastrointestinale *in vitro* al fine di valutare la stabilità delle antocianine ai processi metabolici precoci. Infine, differenti test cellulari (test di agglutinazione e valutazione della resistenza elettrica trans-epiteliale) sono stati applicati per confermare la sicurezza d'uso delle nuove varietà pigmentate per i soggetti affetti da celiachia.

Le metodiche analitiche sviluppate e i dati raccolti in questo lavoro di tesi sono utili per sostenere l'ipotesi di includere i mais pigmentati tra gli ingredienti senza glutine "funzionali" grazie agli specifici effetti salutistici molto utili ai soggetti affetti da celiachia.



3. MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1 Campioni

In questo lavoro di tesi sono stati inclusi 7 campioni di mais forniti dalla Prof.ssa Petroni Katia del Dipartimento di Bioscienze (Università degli Studi di Milano):

- Un mais viola Reduno, ad uso zootecnico;
- Tre varietà gialle (Dolce, Scagliolo, Scoppio) ad uso umano;
- Tre varietà pigmentate (Sugary, Polenta, Pop) ciascuna ottenuta dall'incrocio di una varietà di mais giallo con il mais viola, adatte per il consumo umano.

In **Tabella 3.1** sono riassunti i dettagli di pigmentazione di ciascun campione incluso nello studio.

Tabella 3.1 – Pigmentazione dei campioni inclusi nello studio

Campione	Pigmentazione	
Reduno	Viola	
		Varietà corrispondente
Dolce	Gialla	Sugary
Scagliolo	Gialla	Polenta
Scoppio	Gialla	Pop

3.2 Solventi

- Acetone per HPLC (Labscan Ltd, Dublin, Irlanda);
- Acetonitrile (VWR Chemicals International; Fontenay-sous-Boys, Francia);
- Acqua per HPLC (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francia);
- 1-butanolo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany);
- Cloroformio (VWR Chemicals International; Fontenay-sous-Boys, Francia);
- Dietiletere (VWR Chemicals International; Fontenay-sous-Boys, Francia);
- Esano (Labscan Ltd, Dublin, Irlanda);

- Etanolo (Merck KGa, Darmstadt, Germania);
- Etilacetato (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francia);
- Metanolo (Merck KGa, Darmstadt, Germania);
- Toluene per HPLC (Labscan Ltd, Dublin, Irlanda).

3.3 Acidi

- Acido acetico glaciale (Merck, Darmstadt, Germany);
- Acido cloridrico 37% (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francia);
- Acido formico, purezza $\geq 97\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania).

3.4 Sali e reagenti

- ABTS (2,2'-Azino-bis (3 – ethylbenzothiazoline – 6 – sulfonic acid) diammonium salt), purezza $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA);
- Acido glucuronico purezza $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA);
- Acido urico purezza $\geq 99\%$, crystalline (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA);
- Ammonio cloruro (Merck, Darmstadt, Germany);
- Bicarbonato di sodio (Fluka AG, Switzerland)
- Bile (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA);
- Calcio cloruro (Merck, Darmstadt, Germany);
- Carbonato di sodio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania);
- Cloruro di sodio (Merck, Darmstadt, Germany);
- Cloruro di potassio (Merck, Darmstadt, Germany);
- Diidrogenofosfato di potassio (Merck, Darmstadt, Germany);
- Diidrogenofosfato di sodio NaH_2PO_4 (AnalytiCals, Farmitalia Carlo Erba S.p.a., Italy)
- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania);
- Glucosaminidrocloride purezza $\geq 99\%$, crystalline (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA);
- Glucosio (AnalytiCals, Farmitalia Carlo Erba S.p.a., Italy)
- Magnesio cloruro (Merck, Darmstadt, Germany);

- Mucina (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA);
- Potassio Persolfato (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA);
- Reattivo di Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania);
- Sieroalbumina Bovina (BSA) purezza $\geq 96\%$, crystalline (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA);
- Sodio acetato (Merck, Darmstadt, Germany);
- Sodio idrossido (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania);
- Solfato di sodio Na_2SO_4 (Merck, Darmstadt, Germany);
- Tiocianato di potassio (KSCN) purezza $\geq 99\%$, crystalline (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA);
- Urea (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania);

3.5 Enzimi

- Amilasi (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania);
- Lipasi (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania);
- Pancreatina (Merck, Darmstadt, Germany)
- Pepsina (Merck, Darmstadt, Germany)

3.6 Standard

3.6.1 Analisi spettrofotometriche

- Acido Gallico, purezza $\geq 97\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania)
- TROLOX, ((\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), purezza $\geq 97\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania)

3.6.2 Acidi fenolici

- Acido Caffeico, purezza $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA)
- Acido Caftarico, purezza $\geq 97\%$ (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA)
- Acido Clorogenico, purezza $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA)
- Acido p-cumarico, purezza 98% (ThermoFisher, Kandel, Germania)

- Acido Ferulico, purezza \geq 98% (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA)
- Acido vanillico, purezza \geq 97% (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA)

3.6.3 Antociani

- Cianidina-3-O-glucoside, purezza < 95% (Extrasynthese, Genay, Francia);
- Delfinidina-3-O-glucoside, purezza < 95% (Extrasynthese, Genay, Francia);
- Petunidina-3-O-glucoside, purezza < 95% (WuXi App Tec, Tianjin, Cina);
- Malvidina-3-O-glucoside, purezza < 95% (Extrasynthese, Genay, Francia);
- Pelargonidina-3-O-glucoside, purezza < 90% (Extrasynthese, Genay, Francia);
- Peonidina-3-O-glucoside, purezza < 95% (Extrasynthese, Genay, Francia).

3.7 Piccola strumentazione e dispositivi per la preparazione dei campioni

- Centrifuga (Avanti Centrifuge J-25, Beckman CoulterTM, Cassina De' Pecchi (MI), Italia)
- Liofilizzatore (Edwards, 5Pascal, Trezzano (MI), Italia)
- Rotavapor (Heidolph Instruments GmbH & CO. KG Walpersdorfer Str. 12, D-91126 Schwabach)
- Filtro da siringa 0.45 μ m in polipropilene, \varnothing 25 mm (VWR International, Fontenay-sous-Boys, Francia);
- Bagnetto termostato - Dubnoff Bath BSD/D (ISCO, Nebraska, USA)
- Phmetro (Hanna Instruments Italia srl, Italy)

3.8 Materiali e strumentazione per analisi spettrofotometriche

- Spettrofotometro (Cary 50 Scan, Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA)
- Cuvette in plastica (VWR International, Fontenay – sous -Boys, Francia).

3.9 Materiali e strumentazione per analisi in HPTLC

- HPTLC plates, silice gel 60 F254, 200.0 x 100.0 (Merck, Darmstadt, Germania)

- Depositore Linomat 5 (Camag, Muttenz, Svizzera)
- Rivelatore TLC Visualizer (Camag, Muttenz, Svizzera)
- Software Vision Cat (Camag, Muttenz, Svizzera)

3.10 Strumentazione per analisi in LC-MS

- Sistema cromatografico HPLC UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA);
- Analizzatore di massa LCQ fleet Ion Trap MSn (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA);
- Colonna Zorbax RX-C18 (2.1x150 mm-5 µm) (Agilent, Santa Clara, USA).

3.11 Strumentazione per analisi in HPLC-DAD

- Pompa PU - 980 per HPLC (Jasco, Tokyo, Giappone);
- Valvola di campionamento Rheodyne 7725i con loop da 20 µL (Cotati, CA, USA);
- Miscelatore a gradiente binario LG -1580 – 0.4 (Jasco, Tokyo, Giappone);
- Degasatore DG-2080 – 54 (Jasco, Tokyo, Giappone);
- Colonna Hibar® 250 – 4.6, LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm), (Merk KGa, Darmstadt; Germania);
- Rivelatore Diode Array Detector, MD – 2010 Plus (Jasco, Tokyo, Giappone);
- Software per integrazione dati cromatografici CromNAV (Jasco, Tokyo, Giappone);
- Siringa Vetro Hamilton - Serie 802 RN - µl 25 (Hamilton, Bonaduz, Svizzera).



4. METODI

4.1 Determinazione del contenuto di polifenoli totali

Il saggio spettrofotometrico di Folin-Ciocalteu viene utilizzato per la determinazione quantitativa dei composti fenolici. Esso prevede l'impiego di un reattivo contenente fosfomolibdato e fosfotungstato. In ambiente basico, ottenuto grazie all'utilizzo del carbonato, e in presenza di fenoli, avviene una reazione di ossidoriduzione: a pH 10 i composti fenolici si dissociano, cedendo un protone. L'anione formatosi è in grado di ridurre i metalli, che assumono una caratteristica colorazione blu [Ainsworth and Gillespie, 2007].

La valutazione quantitativa del contenuto di polifenoli totali si effettua registrando l'aumento dell'assorbanza a 765 nm rispetto al bianco (acqua per HPLC). L'aumento dell'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione dei polifenoli contenuti nel campione. La retta di calibrazione si costruisce utilizzando acido gallico come standard di riferimento, ponendo in ascissa la concentrazione delle soluzioni standard e in ordinata la differenza tra l'assorbanza dello standard e quella del bianco (A-A₀).

In **Figura 4.1** è illustrato il cambiamento di colorazione del reattivo di Folin-Ciocalteu in presenza di differenti concentrazioni di acido gallico.

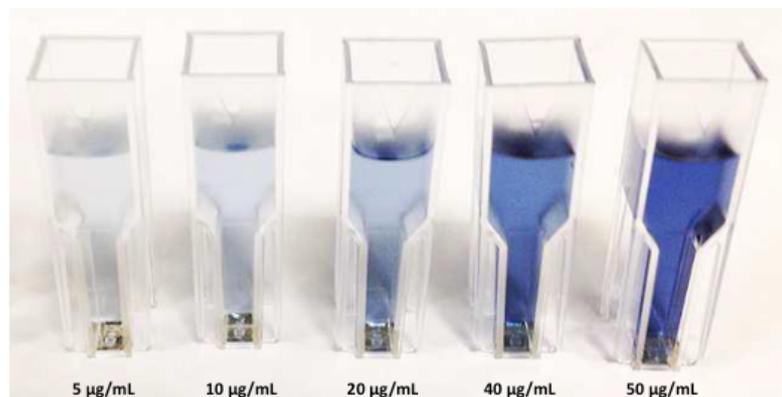


Figura 4.1. Soluzioni di acido gallico a concentrazione crescente, in presenza del reattivo di Folin-Ciocalteu

4.1.1 Preparazione dei campioni

I composti fenolici sono presenti nel mondo vegetale in forma solubile o legati a componenti della parete cellulare [Adom and Liu, 2002]. Considerando la natura dei composti fenolici del mais sono state sviluppate due metodiche di estrazione distinte, al fine di dosare sia la frazione solubile sia la frazione insolubile.

• Estrazione dei composti fenolici solubili

L'estrazione dei composti fenolici solubili si effettua seguendo la metodica riportata da Lopez-Martinez e collaboratori [2009], con alcune modifiche.

A 0.5 g di campione si aggiungono 10 mL di una miscela etanolo:acqua per HPLC 80:20 (v/v). Si mantiene la soluzione in agitazione, al buio, per 2 ore e si centrifuga a 2000 x g, 4°C, per 15 minuti. Si evapora il solvente con Rotavapor e si liofilizza la componente acquosa. Si recupera il residuo con 10 mL di acqua per HPLC, si sonica per 15 minuti e si filtra la soluzione con un apposito filtro in PVDF da 0.45 µm.

Al fine di valutare la riproducibilità dell'estrazione, si ripete il processo in triplicato per ciascuna varietà di mais.

• Estrazione dei composti fenolici insolubili

Gli acidi fenolici presenti nei cereali, oltre che nella forma solubile, si trovano esterificati con polisaccaridi o lignina. Al fine di rompere il legame di tali composti fenolici con la parete cellulare, generalmente si effettua un'idrolisi basica seguita da acidificazione ed estrazione con solvente organico [Lopez-Martinez et al., 2009].

I composti fenolici presentano numerosi gruppi ossidrilici legati all'anello aromatico. Sono molecole debolmente acide ($pK_a=10$), poiché l'anione idrossilato che si forma dalla dissociazione del gruppo fenolico è stabilizzato in parte dalla delocalizzazione sull'anello aromatico della carica negativa, come illustrato in **Figura 4.2**.

A pH fortemente acido ($pH \leq 2$) i composti fenolici sono presenti prevalentemente in forma indissociata, protonata, insolubile in acqua ma estraibile con solvente organico.

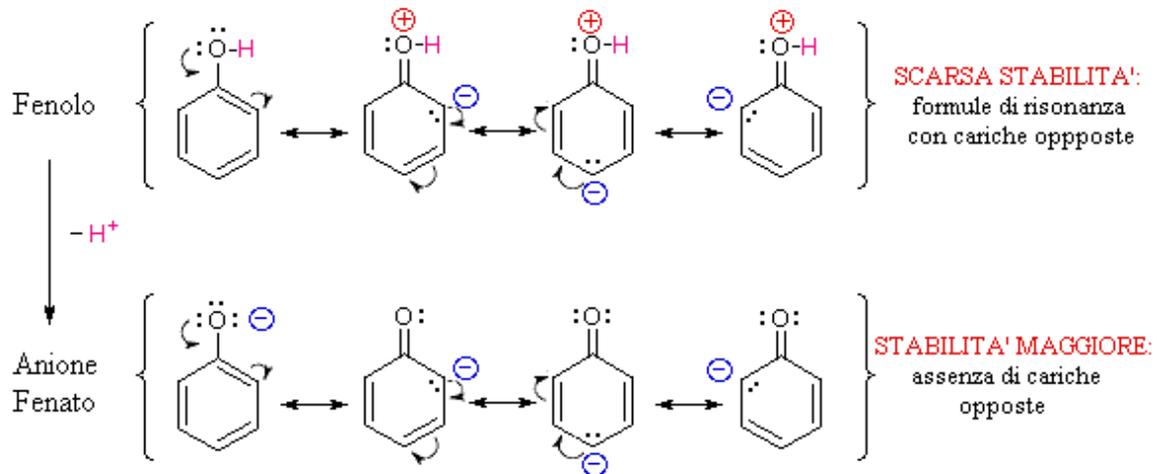


Figura 4.2. Formule di risonanza dell'anione fenato

Al residuo ottenuto dall'estrazione dei composti fenolici solubili (0.5 g) si aggiungono 10 mL di 2 N NaOH. Si mantiene la soluzione in agitazione, al buio, per 1 ora e si centrifuga a 2000 x g a 4°C per 15 minuti. Si acidifica il surnatante con 37% HCl (pH=1). Successivamente si trattano i surnatanti con 10 mL di esano, al fine di rimuovere la componente lipidica. Si centrifuga a 2000 x g a 4°C per 15 minuti. Si estraggono i composti fenolici con 10 mL di etilacetato e si centrifuga a 2000 x g a 4°C per 15 minuti per tre volte. Si ricombinano le porzioni di etilacetato e si allontana il solvente organico con Rotavapor. Si recupera il residuo con 10 mL di acqua per HPLC, si sonica per 15 minuti e si filtra la soluzione con un apposito filtro in PVDF da 0.45 µm.

Al fine di valutare la riproducibilità dell'estrazione, si ripete il processo in triplicato per ciascuna varietà di mais.

4.1.2 Preparazione delle soluzioni standard

Si prepara la soluzione madre di acido gallico in acqua per HPLC alla concentrazione finale di 500 µg/mL. Per la costruzione della retta di calibrazione si effettuano diluizioni in acqua per HPLC nell'intervallo di concentrazioni 5-50 µg/mL.

4.1.3 Preparazione dei reattivi

7.5% Carbonato di sodio: si pesano 7.5 g di Na_2CO_3 e si solubilizzano in 100 mL di acqua per HPLC.

Reattivo Folin-Ciocalteu: si diluisce il reattivo 1:10 (v/v), al fine di ottenere una soluzione 0.2 N.

4.1.4 Modalità operative

A 0.3 mL di campione (o soluzione standard) si aggiungono, in sequenza, 1.5 mL di reattivo di Folin-Ciocalteu e 1.2 mL di 7.5% Na_2CO_3 . Si lasciano reagire le miscele così preparate per 30 minuti al riparo dalla luce. Si procede quindi alla lettura dell'assorbanza a 765 nm. Parallelamente si analizza anche un bianco (acqua per HPLC) la cui assorbanza viene sottratta a quella di ogni campione o soluzione standard. Il contenuto di polifenoli totali dei campioni viene espresso in equivalenti di acido gallico (mg EAG/g).

4.2 Valutazione dell'attività antiossidante mediante test del DPPH

Il saggio spettrofotometrico del DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) consente di valutare l'attività antiossidante complessiva di un campione, grazie all'impiego del radicale azotato DPPH^\cdot , che presenta un'intensa colorazione viola e un massimo di assorbimento a 515-528 nm (**Figura 4.3**).

Grazie alla stabilizzazione per risonanza dell'elettrone spaiato le reazioni di dimerizzazione sono rallentate, contribuendo alla stabilità del radicale. Inoltre, la presenza di gruppi stericamente ingombranti (gruppo fenilico e nitro gruppo) rende difficile l'inserimento di altre molecole radicaliche [Molyneux and Songklanakarin, 2004], tuttavia il radicale DPPH^\cdot può facilmente ricevere un protone da un donatore, riducendosi e assumendo una caratteristica colorazione gialla (**Figura 4.3**).

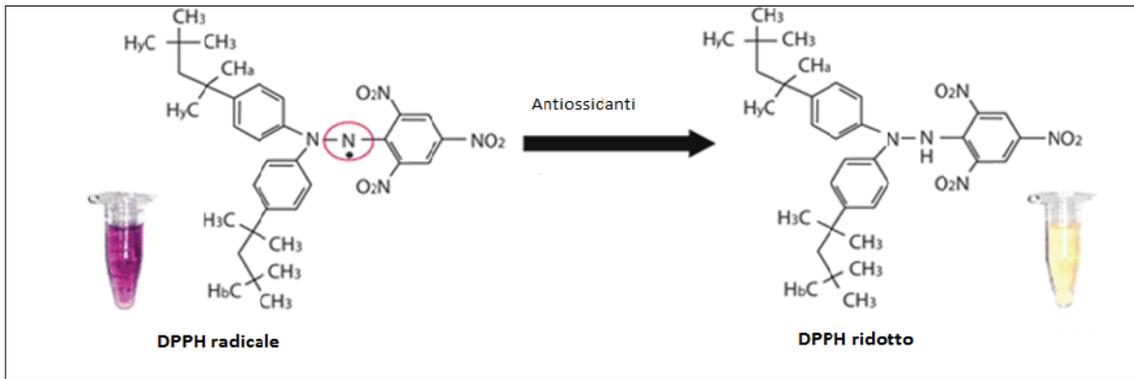


Figura 4.3. Reazione di riduzione del radicale DPPH, conseguente variazione dell'assorbanza a 515 nm e del colore del reattivo.

I composti antiossidanti eventualmente contenuti nei campioni, tra cui i polifenoli, possono facilmente agire come agenti riducenti sul DPPH'.

Con il test spettrofotometrico del DPPH si determina la capacità antiossidante dei campioni calcolando la riduzione di assorbanza del reattivo in presenza degli estratti rispetto a un bianco, che non contiene sostanze antiossidanti. La riduzione dell'assorbanza è direttamente proporzionale all'attività antiossidante dei campioni. La retta di calibrazione si costruisce utilizzando acido gallico come standard di riferimento, ponendo in ascissa la concentrazione delle soluzioni standard e in ordinata la differenza tra l'assorbanza del bianco e quella degli standard (A0-A).

4.2.1 Preparazione dei campioni

I composti fenolici solubili e insolubili contenuti nei campioni di mais sono stati estratti come descritto nel Paragrafo 4.1.1.

4.2.2 Preparazione delle soluzioni standard

Si prepara la soluzione madre di acido gallico in acqua per HPLC alla concentrazione finale di 100 µg/mL. Per la costruzione della retta di calibrazione si preparano diluizioni in acqua per HPLC nell'intervallo di concentrazioni 1-5 µg/mL.

4.2.3 Preparazione dei reattivi

0.005% DPPH in metanolo (p/v): si pesano 5 mg di polvere e si solubilizzano in 100 mL di metanolo.

4.2.4 Modalità operative

Il saggio spettrofotometrico del DPPH è stato condotto secondo le modalità descritte da Brand-Williams e collaboratori [1995].

A 0.5 mL di campione (o soluzione standard) si aggiunge 1 mL di reattivo di DPPH. Si lascia reagire la miscela per 30 minuti al riparo dalla luce. Si procede quindi alla lettura dell'assorbanza a 517 nm, dopo aver eseguito opportuno azzeramento dello strumento con metanolo. Parallelamente si analizza anche un bianco (acqua per HPLC), trattandolo nello stesso modo dei campioni. Dalla differenza dell'assorbanza del bianco (A₀) e l'assorbanza del campione (A), si calcola la riduzione dell'assorbanza, attribuita alla presenza di composti antiossidanti nel campione. Si esprime la capacità antiossidante come equivalenti di acido gallico (mg EAG/g).

4.3 Valutazione dell'attività antiossidante mediante test TEAC

Il test TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) consente di valutare l'attività antiossidante complessiva di un campione, grazie all'impiego del catione radicalico ABTS⁺ (acido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-solfonico)) il quale, in presenza di antiossidanti, si riduce ad ABTS, con conseguente variazione dell'assorbanza misurabile a 734 nm [Prior et al., 2005].

Il catione radicalico ABTS⁺ viene generato a partire dall'ABTS in presenza di agenti ossidanti, come K₂S₂O₈ (**Figura 4.4**). ABTS⁺ è un radicale stabile nel tempo caratterizzato da un'intensa colorazione verde-blu. La sua decolorazione è indicativa dell'avvenuta reazione di ossidoriduzione.

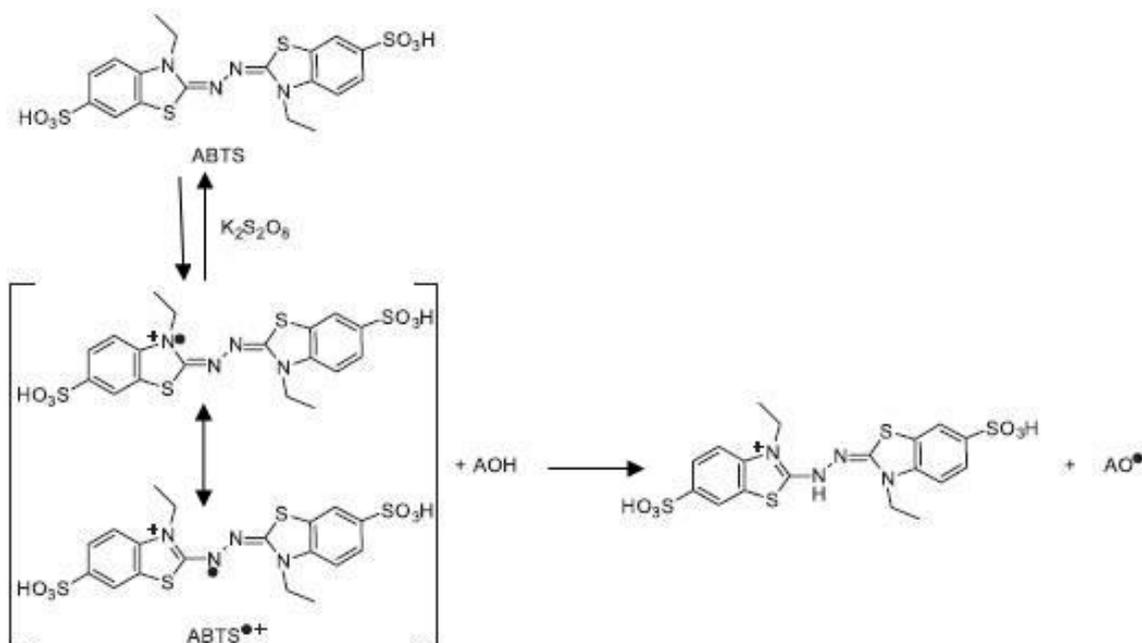


Figura 4.4. Ossidazione dell'ABTS da parte di K₂S₂O₈ e reazione del radicale corrispondente (ABTS^{•+}) con un composto antiossidante (AOH)

Si determina la capacità antiossidante dei campioni calcolando la riduzione di assorbanza del reattivo in presenza degli estratti rispetto a un bianco, che non contiene sostanze antiossidanti. La riduzione dell'assorbanza è direttamente proporzionale all'attività antiossidante dei campioni. La retta di calibrazione si costruisce utilizzando trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), un analogo idrosolubile della Vitamina E, come standard di riferimento, ponendo in ascissa la concentrazione delle soluzioni standard e in ordinata la percentuale di inibizione dell'assorbanza.

4.3.1 Preparazione dei campioni

I composti fenolici solubili e insolubili, contenuti nei campioni di mais, sono stati estratti come descritto nel Paragrafo 4.1.1.

4.3.2 Preparazione delle soluzioni standard

Si prepara la soluzione madre di trolox in una miscela di acqua per HPLC:metanolo 1:1 (v/v) alla concentrazione finale di 1 mg/mL. Per la costruzione della retta di calibrazione si preparano diluizioni in acqua per HPLC nell'intervallo di concentrazioni 10-30 µg/mL.

4.3.3 Preparazione dei reattivi

7 mM ABTS: si pesano 19.2 mg di ABTS e si solubilizzano in 5 mL di acqua per HPLC.

2.45 mM K₂S₂O₈: si pesano 3.3 mg di K₂S₂O₈ e si solubilizzano in 5 mL di acqua per HPLC.

Si uniscono le soluzioni di ABTS e K₂S₂O₈ 1:1 (v/v). Si mantiene la soluzione al riparo dalla luce per 12-16 h, al fine di consentire la formazione del radicale cationico ABTS⁺.

Si diluisce la soluzione di ABTS⁺ con etanolo, fino ad ottenere un'assorbanza a 734 nm compresa tra 0.68-0.72.

4.3.4 Modalità operative

Il saggio spettrofotometrico del TEAC è stato condotto secondo le modalità descritte da Re e collaboratori [1999], con opportune modifiche.

A 0.150 mL di campione (o soluzione standard) si aggiunge 1.5 mL della soluzione diluita di ABTS⁺. Si agitano i campioni per 30 secondi mediante l'impiego del vortex e si mantengono per 6 minuti al buio. Si procede quindi alla lettura dell'assorbanza a 734 nm. Parallelamente si analizza anche un bianco (acqua per HPLC), trattandolo nello stesso modo dei campioni. Dall'assorbanza del bianco (A₀) e del campione (A), si calcola la percentuale di inibizione dell'assorbanza: $[(1 - A)/A_0] * 100$. Si esprime la capacità antiossidante come equivalenti di trolox (mg TE/g).

4.4 Analisi spettrofotometriche degli antociani totali

Il contenuto di antociani totali viene valutato utilizzando il metodo spettrofotometrico del pH differenziale [AOAC, 2006]. Tale metodica è basata sulla capacità delle antocianine monomeriche di cambiare reversibilmente il colore in funzione del pH: a pH 1 si osserva la forma ossonia colorata mentre a pH 4.5 prevale la forma emichetolica incolore. La differenza dell'assorbanza dei pigmenti, misurata a 520 nm, è proporzionale alla loro concentrazione.

4.4.1 Preparazione dei campioni

L'estrazione delle antocianine è generalmente condotta utilizzando metanolo o etanolo acidificato con 1 M HCl al fine di ottenere l'aglicone nella forma di catione flavilio, altamente stabile in ambiente acido [Shipp e Abdel-Aal, 2010].

A 0.5 g di campione si aggiungono 10 mL di una miscela metanolo:1 M HCl 85:15(v/v). Si mantiene la soluzione in agitazione, al buio, per 30 minuti e si centrifuga a 8000 x g a 4°C per 20 minuti. Al termine del processo di centrifugazione si filtra il surnatante con un apposito filtro in PVDF da 0.45 µm.

Al fine di valutare la riproducibilità dell'estrazione, si ripete il processo in triplicato per ciascuna varietà di mais.

4.4.2 Preparazione delle soluzioni tampone

Tampone pH 1 (cloruro di potassio - KCl): si pesano 0.93 g di KCl e si aggiungono 490 mL di acqua per HPLC. Si aggiusta il pH a 1 con 37% HCl e si porta a volume a 500 mL.

Tampone pH 4.5 (sodio acetato – CH₃COONa): si pesano 16.41 g di sodio acetato e si aggiungono 480 mL di acqua per HPLC. Si aggiusta il pH a 4.5 con 37% HCl e si porta a volume a 500 mL.

4.4.3 Modalità operative

Si diluisce ciascun campione, estratto come descritto nel Paragrafo 4.4.1, 1:5 (v/v) con ciascuna soluzione tampone. Si determina l'assorbanza delle soluzioni così preparate, contro il bianco, a 520 nm e 700 nm.

Si effettua la lettura a 700 nm al fine di correggere il rumore di fondo.

I risultati si esprimono come equivalenti di cianidina-3-O-glucoside utilizzando la seguente relazione:

$$\text{cianidina-3-O-glucoside mg/L} = \frac{A \times PM \times FD \times V \times 10^3}{\varepsilon \times l \times p}$$

Dove:

A = (A₅₂₀ - A₇₀₀) pH1 - (A₅₂₀ - A₇₀₀) pH4.5; PM (peso molecolare) cianidina-3-O-glucoside = 449.2 g/mol; FD = Fattore di diluzione; V (volume di estrazione) = 10 mL; l = lunghezza della cella (cm); ε (coefficiente di estinzione molare) = 26 900 L x mol⁻¹ x cm⁻¹; p (peso campione) = 500 mg; 10³ = fattore di conversione da g a mg

4.5 Caratterizzazione degli acidi fenolici mediante HPTLC

In questo lavoro di tesi la cromatografia su strato sottile ad alte prestazioni (*Thin Layer Chromatography* - HPTLC) è stata applicata al fine di caratterizzare i campioni di mais inclusi nello studio.

L'HPTLC è un'evoluzione della cromatografia su strato sottile classica (*Thin Layer Chromatography*, o TLC), queste tecniche si basano sulla ripartizione degli analiti tra una fase stazionaria ed una fase mobile, in funzione della diversa affinità con esse. L'HPTLC è una metodica cromatografica più recente, in cui la deposizione dei campioni e degli standard è automatizzata; incrementando la riproducibilità delle analisi rispetto alla tradizionale TLC.

L'HPTLC consente di effettuare un'analisi semi-quantitativa e di ottenere il *fingerprint* dei campioni. In aggiunta, l'uso del DPPH come agente derivatizzante, permette la valutazione dell'attività antiossidante delle singole molecole contenute in un campione.

4.5.1 Preparazione dei campioni

L'estrazione dei polifenoli solubili e insolubili è condotta come descritto nel paragrafo 4.1.1. Per entrambe le frazioni, una volta evaporato il solvente, si recupera il residuo con etanolo al fine di ottenere una concentrazione finale di 1 g/mL.

4.5.2 Preparazione delle soluzioni standard

Si preparano le soluzioni madre di ciascun acido fenolico (acido gallico, caffeico, ferulico, clorogenico, caftarico, vanillico e p-cumarico) in metanolo alla concentrazione finale di 200 µg/mL.

4.5.3 Modalità operative

Tramite il depositore semiautomatico Linomat 5 (CAMAG, Svizzera), che utilizza la tecnica “*spry-on*”, si caricano 5 µL di ciascuna soluzione standard e 10 µL di campione in bande da 8 mm, separate da 2 mm, 8 mm dal fondo e 20 mm dai late della lastrina.

Per la separazione cromatografica si utilizzano 10 mL di una miscela toluene:acetone:acido formico 4.5:4.5:1 (v/v/v), i quali vengono inseriti in una camera TTC (*Twin Trough Chamber*) a doppio comparto. Dopo 20 minuti di saturazione la lastrina viene eluita fino al raggiungimento di un *Ratio frontis* pari a 8 cm.

Al termine della corsa cromatografica, si rileva la lastrina a 254 e 366 nm. Successivamente si derivatizza con una soluzione 0.05% DPPH in metanolo e si mantiene la lastra al buio per 30 minuti. Al termine si rileva la lastrina alla luce visibile.

4.6 Caratterizzazione delle antocianine mediante HPTLC

4.6.1 Preparazione dei campioni

L'estrazione delle antocianine è condotta come descritto nel paragrafo 4.4.1.

4.6.2 Preparazione delle soluzioni standard

Si preparano le soluzioni madre di ciascuna antocinidina (cianidina-3-O-glucoside, delphinidina-3-O-glucoside, petunidina-3-O-glucoside, malvidina-3-O-glucoside, pelargonidina-3-O-glucoside e peonidina-3-O-glucoside) in 0.1 N HCl alla concentrazione finale di 200 µg/mL.

4.6.3 Modalità operative

Tramite il depositore semiautomatico Linomat 5 (CAMAG, Svizzera), che utilizza la tecnica “*spry-on*”, si caricano 10 μL di ciascuna soluzione standard e 15 μL di campione in bande da 8 mm, separate da 2 mm, 8 mm dal fondo e 20 mm dai lati della lastrina.

Per la separazione cromatografica, 10 mL di una miscela N-Butanolo: acido acetico: acqua 4:1:5 (v/v/v) vengono inseriti in una camera TTC a doppio comparto. Dopo 20 minuti di saturazione la lastrina viene eluita fino al raggiungimento di un *Ratio frontis* pari a 8.5 cm.

Al termine della corsa cromatografica ed evaporazione del solvente residuo, si espone la lastrina alla luce visibile.

4.7 Quantificazione acidi fenolici mediante HPLC-DAD

Gli acidi fenolici, in particolare l'acido ferulico e l'acido p-cumarico, sono i principali composti fenolici presenti nel mais, sia nella forma solubile sia in quella insolubile. L'identificazione e la quantificazione dei diversi acidi fenolici contenuti nei campioni di mais analizzati è stata effettuata mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) accoppiata a rivelatore a serie di fotodiodi (DAD - *Diode Array Detector*)

4.7.1 Preparazione dei campioni

- Estrazione dei composti fenolici solubili

L'estrazione dei composti solubili è stata condotta utilizzando una miscela idroalcolica, come descritto nel Paragrafo 4.1.1.

Nella frazione solubile gli acidi fenolici sono presenti sia in forma libera sia in forma “coniugata” (glicosilazione ed esterificazione) [Salinas-Moreno et al., 2017]. Poiché gli standard relativi agli acidi fenolici glicosilati ed esterificati non sono commercialmente disponibili, al fine di valutare il contenuto totale di acidi fenolici dei campioni, è stata condotta un'ulteriore idrolisi sulla frazione solubile.

Come descritto da Lopez-Martinez e collaboratori [2009], ad un'aliquota dell'estratto idroalcolico si aggiunge 2 N NaOH in rapporto 1:20 (v/v) e si procede come descritto nel paragrafo 4.1.1. Al fine di ottimizzare l'estrazione dei composti fenolici, si utilizzano differenti solventi organici: etilacetato, dietilere:etilacetato 1:1 (v/v) e cloroformio. Dopo evaporazione del solvente organico mediante Rotavapor, l'estratto secco viene ripreso con acqua per HPLC alla concentrazione finale di 0.25 g/mL.

• Estrazione dei composti fenolici insolubili

L'estrazione dei composti fenolici insolubili è stata condotta dopo idrolisi basica come descritto nel Paragrafo 4.1.1. Al fine di ottimizzare l'estrazione dei composti insolubili, si utilizzano differenti solventi organici: etilacetato, dietilere:etilacetato 1:1 (v/v) e cloroformio

4.7.2 Preparazione delle soluzioni standard

Si preparano le soluzioni madre di acido vanillico, acido cumarico e acido ferulico come segue: si solubilizzano 2 mg di ciascun acido fenolico standard in 10 mL di metanolo:acqua 80:20 (v/v) al fine di ottenere una soluzione finale pari a 200 µg/mL.

Per la costruzione delle rette di calibrazione si preparano diluzioni in acqua nell'intervallo di concentrazioni 0.2-20 µg/mL per l'acido vanillico, 0.5-20 µg/mL per l'acido cumarico e 5.0-80 µg/mL per l'acido ferulico. Si inietta ciascuna concentrazione nel sistema cromatografico in triplicato.

4.7.3 Condizioni cromatografiche

La fase stazionaria è costituita da una colonna Hibar®250-4.6, LiChrosphere® 100 RP-18 (250 x 4.60 mm, 5 µm) (Merck, Darmstad, Germania).

L'eluizione è condotta utilizzando un sistema binario in gradiente (**Tabella 4.1**) a un flusso di 0.8 mL/min. Il volume di iniezione è pari a 20 µL e la rilevazione è condotta a 280 nm.

Tabella 4.1 - Gradiente binario utilizzato per l'analisi degli acidi fenolici

Tempo (min)	% Fase A	% Fase B
0	94	6
10	70	30
25	30	70
32	10	90
40	10	90
48	94	6

Dove:

Fase A: 96% Acqua – 3% Acetonitrile – 1% Acido formico

Fase B: 49% Acqua – 50% Acetonitrile – 1% Acido formico

4.7.4 Parametri di validazione del metodo

Il metodo analitico sviluppato è stato validato secondo le linee guida della *Food and Drug Administration* [FDA, 2018]. I parametri analitici considerati sono elencati di seguito:

- idoneità del sistema
- linearità
- sensibilità
- precisione
- stabilità
- recupero

• Idoneità del sistema (*Sistem Suitability Test*)

Il test di idoneità del sistema viene condotto al fine di valutare e garantire le prestazioni del sistema analitico.

I parametri considerati per un sistema cromatografico sono elencati di seguito:

- tempo di ritenzione (T_r): tempo che intercorre tra l'introduzione di un composto nel sistema cromatografico e l'eluizione della sua massima concentrazione (massimo del picco);

- fattore di ritenzione (K): $(Tr - T_0)/T_0$, dove Tr e T₀ sono il tempo di ritenzione dell'analita e quello del solvente, rispettivamente;
- fattore di separazione (α): $(Tr_2 - T_0)/(Tr_1 - T_0)$, dove Tr₂ e Tr₁ sono i tempi di ritenzione di due analiti adiacenti;
- fattore di simmetria;
- numero di piatti teorici (N).

• Linearità

La linearità di un metodo analitico, verificata attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione (R^2), è la sua idoneità a fornire risultati direttamente proporzionali alle concentrazioni degli analiti nei campioni, all'interno di un determinato intervallo di validità. Sono accettati coefficienti di correlazione uguali o superiori a 0.98 [Moreau e Siqueira, 2008].

• Sensibilità

La sensibilità di un metodo analitico viene definita attraverso due parametri:

- limite di determinazione (*Limit of Detection*, LOD) – equivale alla più bassa concentrazione di analita che può essere rilevata, ma non quantificata. Viene misurato attraverso iniezioni di soluzione standard a concentrazione nota, la quale viene progressivamente diluita fino a quando il picco osservato presenta un rapporto segnale:rumore di fondo (s/n) 3:1.
- limite di quantificazione (*Limit of Quantitation*, LOQ) - equivale alla più bassa concentrazione di analita che può essere quantificata con accuratezza e precisione. Viene misurato attraverso iniezioni di soluzione standard a concentrazione nota, la quale viene progressivamente diluita fino a quando il picco osservato presenta un rapporto segnale:rumore di fondo (s/n) 10:1.

• Precisione

La precisione di un metodo analitico misura la dispersione dei risultati [Cozzi et al., 2001] che può essere valutata attraverso il coefficiente di variazione (CV) che deve essere inferiore al 15%.

La precisione è valutata a tre concentrazioni differenti (bassa, media, alta) e richiede cinque determinazioni per ciascuna concentrazione. La precisione viene ulteriormente distinta in:

- precisione *within-day* - valutazione della precisione durante una singola seduta analitica
- Precisione *between-day* - valutazione della precisione in giorni differenti.

• Stabilità

Per stabilità chimica si intende il mantenimento da parte dell'analita della propria integrità fino al momento dell'analisi. La stabilità degli analiti si valuta a tre concentrazioni differenti (bassa, media, alta):

- a breve termine: si mantengono le soluzioni a T ambiente per un periodo compreso tra le 4-24 ore.
- a lungo termine: si mantengono le soluzioni a -20 °C per un periodo di 20 giorni.

• Recupero

Il recupero esprime l'efficienza di estrazione di un metodo analitico entro i limiti di variabilità, e deve essere coerente, preciso e riproducibile.

Il metodo di estrazione riportata Lopez-Martinez e collaboratori [2009], è stato ottimizzato al fine di identificare il solvente organico che garantisse un recupero adeguato. Facendo riferimento a quanto riportato in letteratura, il solvente di estrazione principalmente utilizzato risulta essere l'etilacetato [Lopez-Martinez et.al, 2009]; successivamente, sono state condotte ulteriori prove, utilizzando dapprima una miscela dietilere:etilacetato 1:1 (v/v) e, infine, cloroformio [Bento Silva et al., 2018].

4.8 Caratterizzazione antocianine mediante LC-MS

L'identificazione delle antocianine contenute nei diversi campioni di mais è stata condotta mediante la tecnica LC/MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*). Le analisi di caratterizzazione mediante spettrometria di massa sono state condotte collaborazione con la Prof.ssa Falletta Ermelinda (Dipartimento di Chimica, UNIMI).

4.8.1 Preparazione dei campioni

Al fine di caratterizzare le antocianine contenute nelle diverse varietà di mais, i campioni sono stati trattati come descritto nel Paragrafo 4.1.1.

4.8.2 Condizioni cromatografiche

La fase stazionaria è costituita da una colonna Zorbax RX-C18 (2.1x150 mm-5 µm) (Agilent, Santa Clara, USA).

L'eluizione è condotta utilizzando un sistema binario in gradiente (**Tabella 4.2**) a un flusso di 0.25 mL/min. La colonna viene mantenuta a 30°C e la rilevazione è condotta a 510 nm.

Tabella 4.2 - Gradiente binario utilizzato per l'analisi delle antocianine

Tempo (min)	% Fase A	% Fase B
0	95	5
10	80	20
25	50	50
32	50	50
45	0	100
50	95	5

Dove:

Fase A: 99% Acqua – 0.1% Acido formico

Fase B: 100% Metanolo

- **Parametri di analisi in massa**

Intervallo di rapporti m/z: 50-2000 m/z

Polarità: positivo

4.9 Quantificazione antocianine mediante HPLC-DAD

La quantificazione delle principali antocianine è stata condotta mediante la tecnica HPLC-DAD. Il metodo analitico è stato sviluppato a partire dalle condizioni cromatografiche descritte da Sangiovanni e collaboratori (2015).

4.9.1 Preparazione dei campioni

Al fine di dosare le antocianine contenute nelle diverse varietà di mais, i campioni sono stati estratti come descritto nel Paragrafo 4.4.1.

4.9.2 Preparazione delle soluzioni standard

Le soluzioni madre di cianidina-3-O-glucoside, pelargonidina-3-O-glucoside e peonidina-3-O-glucoside si preparano come segue: si solubilizzano 2 mg di ciascuna antocianina standard in 10 mL di 0.1 N HCl al fine di ottenere una concentrazione finale pari a 200 µg/mL.

Per la costruzione delle rette di calibrazione si preparano diluizioni in 0.1 N HCl nell'intervallo di concentrazioni 0.5-10 µg/mL.

4.9.3 Condizioni cromatografiche

La fase stazionaria è costituita da una colonna Synergy 4 µ MAX-RP 80A (250 x 4.60 mm, 4 µm) dotata di una precolonna Security Guard C12 4 x 3.0 mm ID (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

La fase stazionaria, selezionata per il presente lavoro di tesi, è costituita da particelle di silice legate a catene alchiliche da 12 atomi di carbonio (C12). La derivatizzazione dei gruppi ossidrilici liberi con trimetilclorosilano (TMS) conferisce alla fase stazionaria una maggiore polarità rispetto alla C18, generalmente utilizzata per l'analisi dei flavonoidi.

L'eluizione è condotta utilizzando un sistema binario in gradiente (**Tabella 4.3**) a un flusso di 0.8 mL/min. Il volume di iniezione è pari a 20 µL e la rilevazione è condotta a 520 nm.

Tabella 4.3 - Gradiente binario utilizzato per l'analisi delle antocianine

Tempo (min)	% Fase A	% Fase B
0	94	6
15	70	30
30	50	50
35	10	90
38	10	90

Dove:

Fase A: 96% Acqua – 3% Acetonitrile – 1% Acido formico

Fase B: 49% Acqua – 50% Acetonitrile – 1% Acido formico

4.9.4 Parametri di validazione del metodo

Il metodo analitico sviluppato è stato validato secondo le linee guida della *Food and Drug Administration* [FDA, 2018], come precedentemente indicato (Paragrafo 4.7.4). I parametri analitici considerati sono elencati di seguito:

- idoneità del sistema
- linearità
- sensibilità
- precisione
- stabilità
- recupero

• Recupero antocianine

A 0.5 g di mais giallo si aggiungono le antocianine standard a tre concentrazioni differenti (bassa, media, alta). Si procede all'estrazione come descritto nel Paragrafo 4.4.1. Si valuta il recupero confrontando gli estratti con i valori degli standard di riferimento.

4.10 Stabilità antocianine dopo digestione gastro-intestinale *in vitro*

Al fine di valutare la stabilità delle antocianine ai processi digestivi è stato applicato ai diversi campioni di mais un protocollo di digestione gastro-intestinale *in vitro* [Oomen et al., 2003; Versantvoort et al., 2005, Sangiovanni et al., 2015].

4.10.1 Preparazione dei campioni

Si estraggono 5 g di ciascun campione, precedentemente macinato, con 50 mL di una miscela etanolo:acqua 50:50 (v/v). Si mantiene la soluzione in agitazione, al buio, per 4 ore e si filtra il surnatante con carta da filtro. Si ripete l'estrazione sul residuo per 16 ore e si combinano i due surnatanti. Si evapora la frazione organica con Rotavapor e si liofilizza la componente acquosa.

4.10.2 Protocollo digestivo

In **Tabella 4.4** è riportata la composizione dei succhi digestivi. Il pH è stato aggiustato con 1 M NaOH o 37% HCl fino al raggiungimento dei valori ottimali per l'azione enzimatica (rispettivamente, pH 6.5, pH 1.1, pH 7.8 e pH 8.0 come descritto in **Tabella 4.4**).

Tabella 4.4 - Composizione dei succhi digestivi utilizzati nel protocollo di digestione gastrointestinale *in vitro*

Saliva (pH 6.5 ± 0.1)	Succo gastrico (pH 1.1 ± 0.1)	Succo duodenale (pH 7.8 ± 0.1)	Bile (pH 8.0 ± 0.1)
12 mM KCl	47 mM NaCl	120 mM NaCl	90 mM NaCl
2 mM KSCN	2.2 mM NaH ₂ PO ₄	40 mM NaHCO ₃	69 mM NaHCO ₃
7.4 mM NaH ₂ PO ₄	11 mM KCl	0.6 mM KH ₂ PO ₄	5 mM KCl
4 mM Na ₂ SO ₄	2.7 mM CaCl ₂	7.6 mM KCl	0.200 mL/L HCl (37%)
5 mM NaCl	5.7 mM NH ₄ Cl	0.25 mM MgCl ₂	250 mg/L urea
1.8 mM NaOH	8.3 ml/L 37% HCl	0.18 mL/L HCl (37%)	1.5 mM CaCl ₂
3.3 mM urea	3.6 mM glucosio	100 mg/L urea	1.8 g/L BSA
145 mg/L amilasi	0.1 mM acido glucuronico	1.36 mM CaCl ₂	6 g/L bile
89 mM acido urico	1.4 mM urea	1 g/L BSA	
50 mg/L mucina	1.5 mM glucosaminidrocloride	3 g/L pancreatina	
	1 g/L BSA	0.5 g/L lipasi	
	1 g/L pepsina		
	3 g/L mucina		

Di seguito è riportato il protocollo di digestione:

- A 100 mg di ciascun estratto si aggiungono 6 mL di saliva. Si mantiene la soluzione a 37 °C per 5 minuti.
- Successivamente si aggiungono 12 mL di succo gastrico e si porta a pH 1.5 ± 0.5 con 37% HCl o 2 M NaOH. Si mantengono i campioni in rotazione per 2 ore a 37°C.
- Al termine dell'incubazione si aggiungono 12 mL di succo duodenale e 6 mL di bile e si porta a pH 6.0 ± 0.5 con 37% HCl o 2M NaOH. Si mantengono i campioni in rotazione per 2 o 24 ore a 37°C.
- Al termine del processo digestivo si centrifugano i campioni a 3000 x g per 5 minuti a 4°C, si filtrano su carta e si liofilizza la componente acquosa.

Per l'analisi in HPLC si solubilizzano i campioni in 0.1 N HCl alla concentrazione finale di 25 mg/mL.

4.11 Trattamenti cellulari

Sebbene il mais rappresenti uno dei principali ingredienti utilizzati nella dieta senza glutine quando si introducono nuove varietà è importante confermare la loro idoneità per i soggetti celiaci. A tale scopo sono stati condotti una serie di test *in vitro* in collaborazione con il Dott. Marco Silano dell'Istituto Superiore di Sanità (Roma).

Prima dei trattamenti cellulari i campioni sono stati sottoposti a processo digestivo *in vitro*, come descritto nel Paragrafo 4.11.1.

4.11.1 Protocollo digestivo per lo studio della componente proteica

Due varietà pigmentate, mais viola Reduno e mais Polenta, sono state selezionate per lo studio preliminare e sono state sottoposte a digestione peptico-triptica *in vitro*. Il protocollo di digestione risulta diverso dal precedente in quanto in questo caso l'attenzione è focalizzata sulla frazione proteica. In parallelo, sono stati digeriti un campione di farina di grano tenero (controllo positivo) e un campione di farina di riso (controllo negativo).

Di seguito è riportato il protocollo di digestione:

- A 2.5 g di ciascun campione si aggiungono 25 mL di 0.1 N HCl contenenti 5 mg di pepsina. Si mantiene la soluzione in agitazione a 37 °C per 2 ore.
- Successivamente si porta a pH 8 con 0.2 M NaOH e si aggiungono 5 mg di tripsina. Si mantiene la soluzione in agitazione a 37 °C per 2 ore.
- Al termine del processo digestivo, i campioni vengono portati a pH 7 con 0.06 N HCl, e mantenuti a 100°C per 5 minuti allo scopo di bloccare l'azione enzimatica; si centrifugano quindi a 10000 rpm per 5 minuti.
- I campioni destinati ai trattamenti *in vitro* vengono liofilizzati.

4.11.2 Resistenza Elettrica Trans-Epiteliale

La Resistenza Elettrica Trans-Epiteliale (*Trans-Epithelial Electrical Resistance*, TEER) del monostrato cellulare è direttamente correlata al livello di integrità del monostrato stesso e quindi con la formazione delle *tight junctions* tra le cellule. La linea cellulare epiteliale T84, derivante da cellule di carcinoma del colon, è stata utilizzata al fine di valutare questo parametro. In queste cellule, gliadina-sensibili, la presenza del peptide tossico p31-43 causa un riarrangiamento del citoscheletro che determina un aumento della confluenza delle cellule con conseguente incremento della permeabilità del monostrato cellulare [Silano et al., 2014].

La misurazione del valore di resistenza trans-epiteliale (espressa in Ω ms/mm²) si effettua utilizzando un voltmetro Millicell ERS (Millipore, Bedford, MA, USA) (**Figura 4.5**).



Figura 4.5. Voltmetro Millicell ERS (Millipore, Bedford, MA, USA)

• Protocollo operativo

Si seminano le cellule T84 su inserti di policarbonato (0.45 mm diametro dei pori, 0.9 cm² area; BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) e si mantengono per 19 giorni fino a confluenza. Si valuta la corretta formazione del monostrato cellulare attraverso la misura della TEER: si considera un valore superiore o uguale a 800 Ω ms/mm² un buon indice dell'integrità del monostrato. Successivamente i diversi prodotti di proteolisi vengono addizionati alla cultura cellulare alla concentrazione di 1 mg/mL e si mantengono in incubazione a 37°C per 3 ore. Per valutare l'effetto di questi campioni sull'integrità del monostrato cellulare, si confronta il valore di TEER misurato prima e dopo l'aggiunta dei campioni digeriti.

4.11.3 Test di agglutinazione cellulare

Il test di agglutinazione cellulare prevede l'utilizzo di cellule eritroleucemiche umane, denominate K562. Questa linea cellulare, derivante da pazienti affetti da Leucemia Mieloide Cronica (CML), entrando in contatto con la gliadina tende ad agglutinare. Il più noto fra i peptidi tossici del α -gliadina è il frammento 31-43; in questo sistema *in vitro* esso determina l'attivazione dell'enzima transglutaminasi tissutale 2 (TG2) con conseguente riarrangiamento del citoscheletro e agglutinazione cellulare [Silano et al., 2012].

• Protocollo operativo

Le cellule K562 vengono coltivate in terreno di coltura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) arricchito con 10% di FCS (*Fetal Calf Serum*). Per eseguire il test di agglutinazione le cellule vengono separate mediante centrifugazione, e lavate due volte con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) privo di Ca²⁺ e Mg²⁺ (GIBCO, Carlsbad, CA, USA). Le cellule vengono quindi risospese nello stesso tampone PBS ad una concentrazione finale pari a 10⁸ cellule/mL. I campioni di cereali digeriti, come descritto nel Paragrafo 4.11.1, vengono aggiunti in una piastra da 96 pozzetti alla concentrazione finale di 7 mg/mL. Per ottenere questo, a ciascun pozzetto si aggiungono 25 μ L di sospensione cellulare per un volume finale totale corrispondente a 100 μ L. La sospensione cellulare viene incubata a temperatura ambiente per 30 minuti e si misura l'attività di agglutinazione dei diversi campioni utilizzando un lettore di piastra munito di agitatore (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Si legge la torbidità della sospensione cellulare a 600 nm (OD 600 nm) sotto continua agitazione al tempo 0 (T0) e dopo 30 minuti.



5. RISULTATI

5.1 Determinazione del contenuto di polifenoli totali

Il mais contiene una quantità variabile di polifenoli solubili e di polifenoli insolubili, i quali sono legati ad arabinosilani, pectine e altri polisaccaridi della parete cellulare mediante legami di tipo covalente. I composti fenolici sono presenti in alte concentrazioni all'interno del germe e dell'endosperma. I polifenoli insolubili sono principalmente localizzati a livello dell'aleurone, parte dell'endosperma maturo ricca di proteine, protetta a sua volta dal pericarpo. I polifenoli solubili, tra cui gli antociani, si trovano a livello del pericarpo o dell'aleurone [Maggiore, 2007].

I polifenoli solubili sono stati estratti con una soluzione idroalcolica, mentre i polifenoli insolubili con solvente organico dopo un processo di idrolisi in ambiente basico.

La determinazione del contenuto di polifenoli totali è stata eseguita analizzando i campioni mediante il saggio di Folin-Ciocalteu [Singleton and Rossi, 1965].

5.1.1 Retta di calibrazione

In **Tabella 5.1** sono riportate le concentrazioni delle soluzioni standard di acido gallico utilizzate per costruire la retta di calibrazione e un esempio delle relative assorbanze misurate a 765 nm. L'assorbanza del bianco (A_0) viene sottratta a quella delle soluzioni standard di acido gallico (A).

Tabella 5.1 - Dati utilizzati per la costruzione della retta di calibrazione per il dosaggio dei polifenoli totali

Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	$A-A_0$ (media \pm DS)
5	0.07 \pm 0.002
10	0.12 \pm 0.01
20	0.26 \pm 0.02
25	0.29 \pm 0.01
40	0.46 \pm 0.01
50	0.55 \pm 0.02

Un esempio di retta di calibrazione è illustrato in **Figura 5.1**; la retta è stata ottenuta tramite regressione lineare ponendo in ascissa la concentrazione degli standard e in ordinata l'assorbanza, ed ha equazione $y = 0,0109x + 0,0187$. Il coefficiente di correlazione ($R^2 = 0,9966$), vicino a 1, indica una risposta lineare ottimale nell'intervallo di concentrazioni considerate.

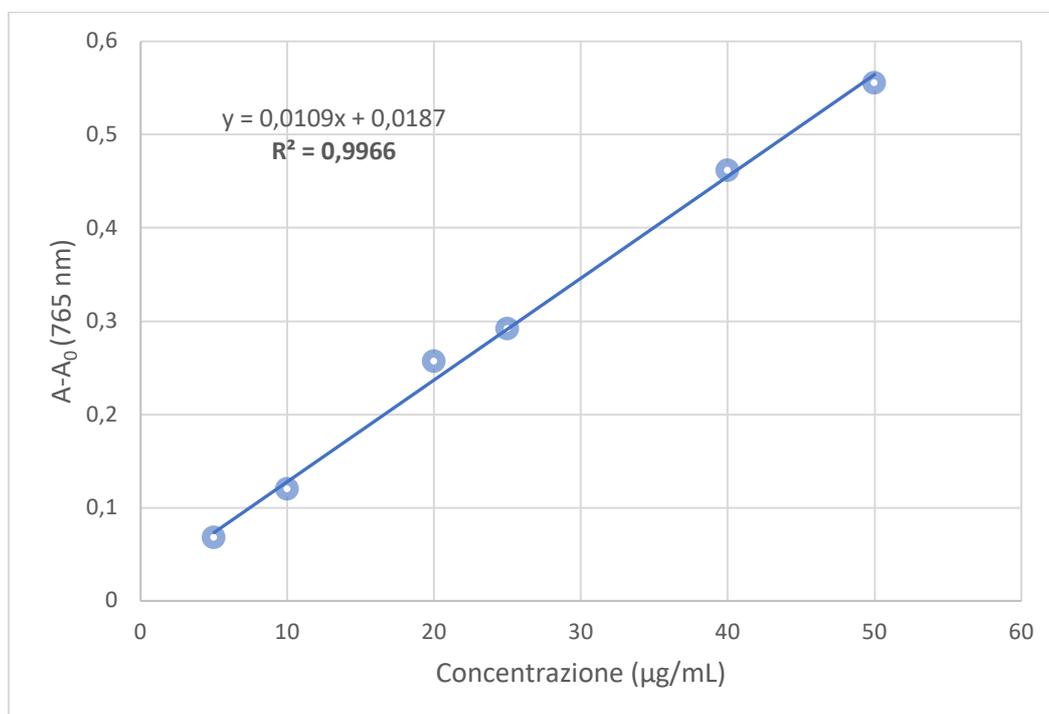


Figura 5.1 - Retta di calibrazione per il dosaggio dei polifenoli totali

5.1.2 Analisi dei campioni

I risultati delle analisi relativi al contenuto di polifenoli solubili nei campioni di mais analizzati, espressi come mg equivalenti di acido gallico per g di campione (mg EAG/g), sono riportati in **Tabella 5.2**.

Tabella 5.2 - Contenuto di polifenoli solubili nei campioni di mais analizzati (n=3)

Campione	Polifenoli solubili (mg EAG/g) Media \pm DS
Mais viola	
Reduno	4.1 \pm 0.3
Mais gialli	
Dolce	2.2 \pm 0.1
Scagliolo	0.8 \pm 0.1
Scoppio	1.7 \pm 0.1
Mais pigmentati	
Sugary	3.6 \pm 0.1
Polenta	2.5 \pm 0.3
Pop	3.1 \pm 0.4

I risultati riportati in **Tabella 5.2** sono stati oggetto di analisi statistiche, al fine di valutare la significatività delle differenze riscontrate tra le varietà pigmentate Sugary, Polenta e Pop rispetto alle corrispondenti varietà parentali (**Figura 5.2**).

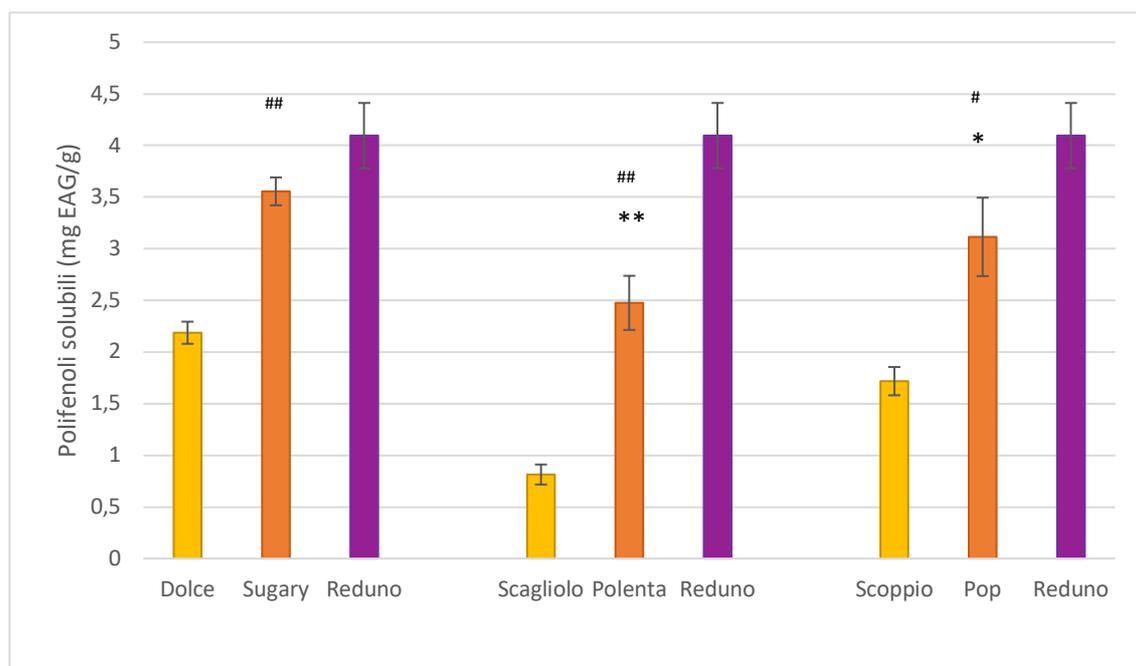


Figura 5.2 - Contenuto di polifenoli solubili nelle diverse varietà di mais. Ciascun mais pigmentato è stato confrontato con le rispettive varietà parentali: # mais pigmentato vs mais giallo, * mais pigmentato vs mais viola (*, # = $p < 0.05$, **, ## = $p < 0.005$)

Come si può osservare dalla **Tabella 5.2** e dalla **Figura 5.2**:

- Il mais pigmentato Sugary e il mais viola Reduno presentano il più alto contenuto di polifenoli solubili (3.6 ± 0.1 e 4.1 ± 0.3 mg EAG/g, rispettivamente). I valori ottenuti per questi campioni sono comparabili, come mostrato dall'assenza di significatività statistica. Il mais Sugary mostra un incremento significativo della componente solubile ($p < 0.005$) rispetto al mais giallo corrispondente (mais Dolce).
- Nei mais pigmentati Polenta e Pop, si osserva un incremento significativo della frazione solubile rispetto alle relative varietà parentali gialle Scagliolo ($p < 0.005$) e Scoppio ($p < 0.05$), rispettivamente. Queste due varietà mantengono però valori inferiori al mais Reduno, con differenze statisticamente significative ($p < 0.005$ e $p < 0.05$ per il mais Polenta e Pop, rispettivamente).

L'elevato contenuto di polifenoli solubili, evidenziato in tutte le varietà pigmentate, potrebbe essere ricondotto alla presenza di antociani.

In **Tabella 5.3** sono riportati i risultati delle analisi relative al contenuto di polifenoli insolubili, espressi come mg equivalenti di acido gallico per g di campione (mg EAG/g).

Tabella 5.3 - Contenuto di polifenoli insolubili nei campioni di mais analizzati (n=3)

Campione	Polifenoli insolubili (mg EAG/g) Media \pm DS
Mais viola	
Reduno	3.4 ± 0.2
Mais gialli	
Dolce	4.3 ± 0.5
Scagliolo	3.6 ± 0.5
Scoppio	11.1 ± 1.2
Mais pigmentati	
Sugary	5.7 ± 0.5
Polenta	4.3 ± 0.5
Pop	6.3 ± 0.4

I risultati riportati in **Tabella 5.3** sono stati oggetto di analisi statistiche, al fine di valutare la significatività delle differenze riscontrate tra le varietà pigmentate rispetto ai corrispondenti fenotipi parentali (**Figura 5.3**), in termine di polifenoli insolubili.

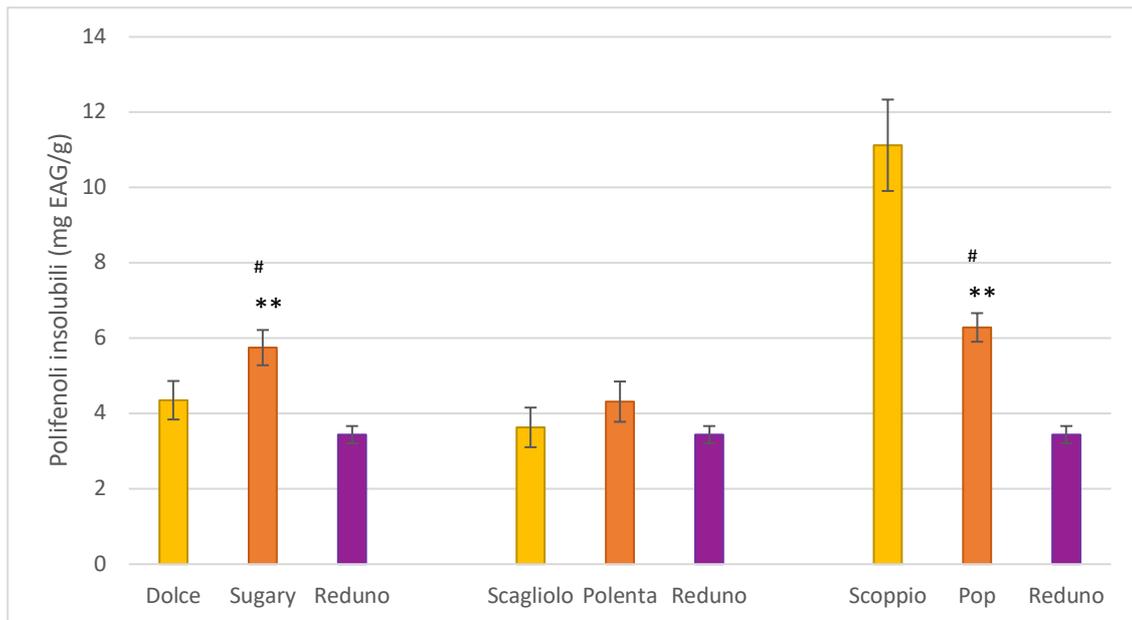


Figura 5.3 – Contenuto di polifenoli insolubili nelle diverse varietà di mais. Ciascun mais pigmentato è stato confrontato con le rispettive varietà parentali: # mais pigmentato vs mais giallo, * mais pigmentato vs mais viola (# = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$)

Dalla **Tabella 5.3** e dalla **Figura 5.3** si può osservare che:

- Il mais pigmentato Sugary mostra un incremento significativo della componente insolubile rispetto a entrambe le varietà parentali ($p < 0.05$ e $p < 0.005$ per il mais Dolce e Reduno, rispettivamente). Un comportamento analogo è stato osservato da Mahan e collaboratori [2013] i quali hanno analizzato differenti mais ibridi provenienti da 11 varietà parentali. La varietà pigmentata “Maiz Morando” ha mostrato un contenuto maggiore di composti fenolici rispetto ad entrambe le varietà parentali. Altri due varietà ibride, “Lfy Blue” e “Red Ear” hanno presentato un contenuto di polifenoli maggiore rispetto a quanto previsto dall’attitudine generale alla combinazione (GCA). Per GCA si intende la performance media di un parentale nella serie di incroci in cui esso costituisce uno dei genitori.

Questi risultati suggeriscono una possibile somma degli alleli responsabili della sintesi dei composti fenolici, con conseguente modifica nel contenuto di tali composti [Mahan et al., 2013].

- Il mais Polenta non presenta nessuna differenza significativa, in termini di polifenoli insolubili, rispetto a entrambe le varietà parentali (mais giallo Scagliolo e mais viola Reduno).
- Il mais giallo Scoppio è il campione con il maggior contenuto di polifenoli legati (11.1 ± 1.2 mg AGE/g). Il processo d'incrocio permette di ottenere una varietà pigmentata, mais Pop, caratterizzata da un buon contenuto di polifenoli insolubili (6.3 ± 0.4 mg AGE/g), significativamente superiore rispetto alla varietà viola Reduno ($p < 0.005$).

I composti fenolici solubili sono stati ampiamente studiati e rappresentano una buona fonte di antiossidanti introducibili attraverso la dieta. Tuttavia, anche i composti fenolici insolubili possono giocare un importante ruolo per la salute umana. Questa classe di composti resiste alle condizioni acide dello stomaco e all'attacco degli enzimi digestivi, raggiungendo intatta il colon e contribuendo localmente alla riduzione dello stress ossidativo e alla modulazione del microbiota [Cömert and Gökmen, 2017].

In **Tabella 5.4** sono riportati i polifenoli totali per ciascun campione di mais analizzato, ottenuti dalla somma della componente solubile e insolubile.

Tabella 5.4 - Contenuto di polifenoli totali (solubili e insolubili) nei campioni di mais analizzati. Valori espressi in mg EAG/g (n=3)

Campione	Polifenoli totali
	(mg EAG/g) Media \pm DS
Mais viola	
Reduno	7.5 \pm 0.1
Mais gialli	
Dolce	6.5 \pm 0.4
Scagliolo	4.4 \pm 0.6
Scoppio	12.8 \pm 1.1
Mais pigmentati	
Sugary	9.3 \pm 0.6
Polenta	6.8 \pm 0.5
Pop	9.4 \pm 0.5

Il confronto dal punto di vista statistico tra le varietà pigmentate e le rispettive varietà parentali, in termini di polifenoli totali, è illustrato in **Figura 5.4**.

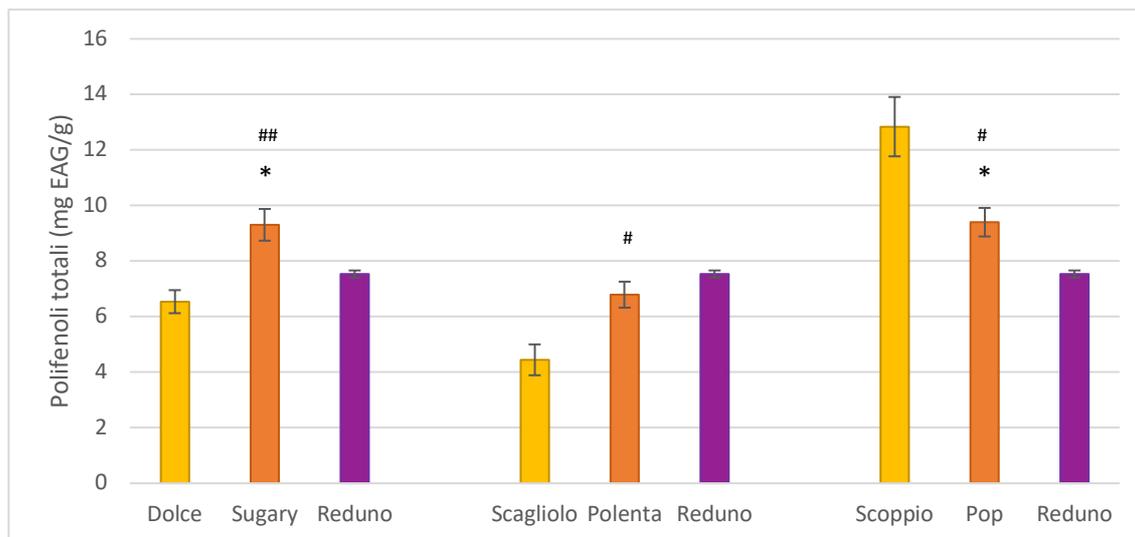


Figura 5.4 - Contenuto di polifenoli totali (solubili e insolubili) nelle diverse varietà di mais. Ciascun mais pigmentato è stato confrontato con le rispettive varietà parentali: # mais pigmentato vs mais giallo, * mais pigmentato vs mais viola (*, # = $p < 0.05$, ## = $p < 0.005$)

Dalla **Tabella 5.4** e dalla **Figura 5.4** si può osservare che:

- Il mais pigmentato Sugary presenta un incremento statisticamente significativo dei polifenoli totali rispetto a entrambe le varietà parentali ($p < 0.005$ e $p < 0.05$ per il mais Dolce e Reduno, rispettivamente).
- Il mais pigmentato Polenta ha un contenuto di polifenoli totali comparabile al mais viola Reduno e significativamente superiore al mais giallo corrispondente ($p < 0.05$).
- Il mais giallo Scoppio è il campione con il maggior contenuto di polifenoli totali, principalmente riconducibili alla frazione insolubile. Il mais ibrido Pop, si colloca in una situazione intermedia con un contenuto di polifenoli totali inferiore al mais Scoppio ($p < 0.05$) ma superiore al mais viola Reduno ($p < 0.05$).

I risultati relativi al contenuto di polifenoli (solubili e insolubili) sono in accordo con quelli riportati in letteratura e relativi ad altri fenotipi di mais di varia pigmentazione. Lopez-Martinez e collaboratori [2009] riportano un contenuto di polifenoli totali compreso nell'intervallo 1.70-34 mg EAG/g (1.36-27.20 mg EAG/g per gli insolubili e 0.33-6.80 mg GAE/g per i solubili), ottenuto dall'analisi di 18 varietà di mais con diverse pigmentazioni. I fenotipi viola erano caratterizzati da un contenuto di polifenoli totali compreso tra 4.65-34 mg EAG/g (3.81-27.20 mg EAG/g per gli insolubili e 0.83-6.80 mg GAE/g per i solubili).

Altri studi riportano un contenuto di polifenoli totali nei mais non pigmentati nell'intervallo 5.23-5.81 mg EAG/g, senza che siano rilevabili differenze significative tra le varietà gialle e quelle arancioni; le specie ricche di antociani presentano un contenuto di polifenoli totali compreso tra 4.49- 10.53 mg EAG/g [Žilic et al., 2012].

La **Figura 5.5** illustra le percentuali relative alle due frazioni, polifenoli solubili e insolubili, per ciascuna varietà di mais.

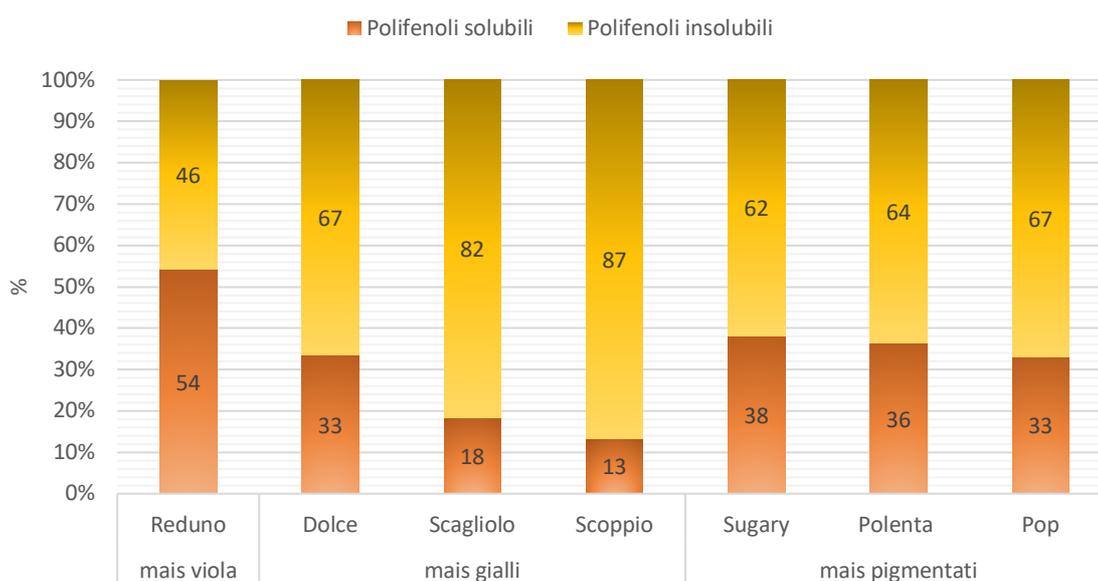


Figura 5.5 - Distribuzione dei polifenoli solubili e insolubili in ciascuna varietà di mais

Da quanto riportato in letteratura, nel mais i composti fenolici sono principalmente presenti nella forma insolubile, la quale rappresenta circa l'80% dei polifenoli totali. I polifenoli solubili, invece, costituirebbero il 18-23% [Lopez-Martinez et al., 2009; Adom and Liu, 2002]. Dai dati illustrati in **Figura 5.5**, il mais viola Reduno presenta una maggiore percentuale di composti solubili (54%), rispetto ai composti insolubili (46%), fatto riconducibile alla presenza di antociani, molecole idrosolubili estraibili in miscela idroalcolica. In letteratura scientifica sono riportati alcuni studi che confermerebbero i risultati ottenuti per il mais pigmentato Reduno: applicando diverse metodiche di idrolisi per l'estrazione di polifenoli insolubili (idrolisi enzimatica, termica e basica) Montilla e collaboratori (2011) hanno evidenziato che utilizzando l'idrolisi termica, per alcuni campioni, la concentrazione di polifenoli solubili superava quella dei legati; e nella cultivar "Kulli flour" (varietà viola) il dato veniva confermato anche dall'idrolisi basica.

Nei campioni di mais gialli analizzati in questo studio, il contenuto di polifenoli insolubili risulta compreso tra il 67 e l'87% dei polifenoli totali, in accordo con quanto riportato in letteratura.

Nelle varietà pigmentate, invece, come già evidenziato, si ha una percentuale di polifenoli legati (circa 60%) pari al doppio rispetto a quella dei liberi (circa 30%).

I mais pigmentati considerati in questo lavoro (Sugary, Polenta e Pop) sono ottenuti da incroci, per cui è chiaro che la composizione fenolica risente del parentale viola.

5.2 Determinazione del contenuto di antocianine totali

Il contenuto di antociani totali nei campioni di mais pigmentati è riportato in **Tabella 5.5**.

Tabella 5.5 - Contenuto medio di antociani totali nei campioni di mais pigmentati (n=3). Risultati espressi come equivalenti di cianidina-3-O-glucoside (mg/g)

Varietà	Campione	Equivalenti di cianidina-3-O-glucoside (mg/g) media \pm DS
Mais viola	Reduno	0.98 \pm 0.03
	Polenta	0.48 \pm 0.05
Mais pigmentati	Pop	0.69 \pm 0.05
	Sugary	0.57 \pm 0.03

Il contenuto di antociani totali e le relative analisi statistiche sono illustrati in **Figura 5.6**. Ciascun campione pigmentato (Polenta, Pop, Sugary) è stato confrontato con il mais parentale Reduno.

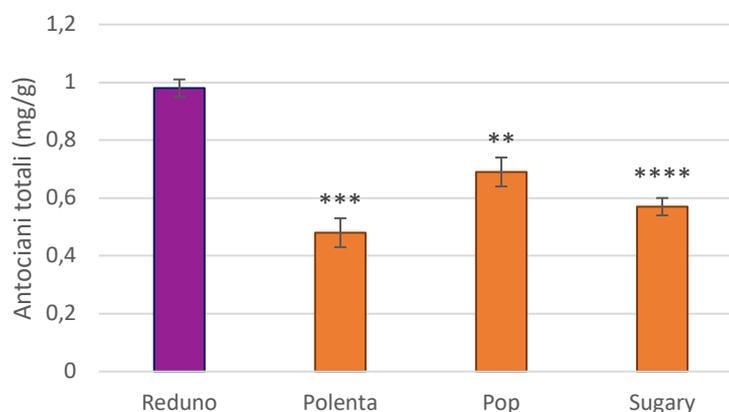


Figura 5.6 - Contenuto di antociani totali. Ciascun mais pigmentato è stato confrontato con il mais viola Reduno (** p<0.005; *** p<0.0005; **** p<0.0001)

I campioni di mais ibridi hanno evidenziato un contenuto di antociani totali significativamente inferiore rispetto al mais viola Reduno (**Figura 5.6**). Nessuna differenza statisticamente significativa si osserva tra i campioni di mais Sugary e Pop. Il mais Polenta, invece, presenta un contenuto di antociani totali inferiore al mais Sugary ($p < 0.05$) e al mais Pop ($p < 0.005$).

I valori di antociani misurati nelle varietà pigmentate incluse in questo lavoro di tesi rientrano nell'intervallo di concentrazioni riportate in letteratura, ovvero 0.015-8.60 mg cianidina-3-O-glucoside/g [Lopez-Martinez et al., 2009].

5.3 Valutazione dell'attività antiossidante

L'attività antiossidante totale dei campioni di mais è stata valutata mediante i test colorimetrici del DPPH e TEAC, applicati per l'analisi della frazione solubile e insolubile.

5.3.1 Retta di calibrazione test DPPH

In **Tabella 5.6** sono riportate le concentrazioni delle soluzioni standard di acido gallico utilizzate per costruire la retta di calibrazione e la relativa assorbanza rilevata a 520 nm. All'aumentare della concentrazione di acido gallico si osserva una riduzione dell'assorbanza. L'assorbanza di ciascuna soluzione standard (A) viene sottratta a quella del bianco (A_0) e il valore medio ottenuto ($A_0 - A$) viene utilizzato per la costruzione della retta.

Tabella 5.6 - Dati utilizzati per la costruzione della retta di calibrazione nel test del DPPH

Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	Assorbanza (media \pm DS)	$A_0 - A$
Bianco	0.93 \pm 0.0001	-
1	0.77 \pm 0.03	0.16
2.5	0.52 \pm 0.01	0.41
3.5	0.37 \pm 0.005	0.56
5.0	0.15 \pm 0.01	0.78

La retta di calibrazione, illustrata in **Figura 5.7**, è ottenuta tramite regressione lineare ponendo in ascissa la concentrazione degli standard e in ordinata la differenza tra l'assorbanza del bianco e quella di ciascuna soluzione standard (A_0-A), ed ha equazione $y = 0.1557x - 0.0091$. Il coefficiente di correlazione ($R^2 = 0.9991$), vicino a 1, indica una risposta lineare ottimale nell'intervallo di concentrazioni considerate.

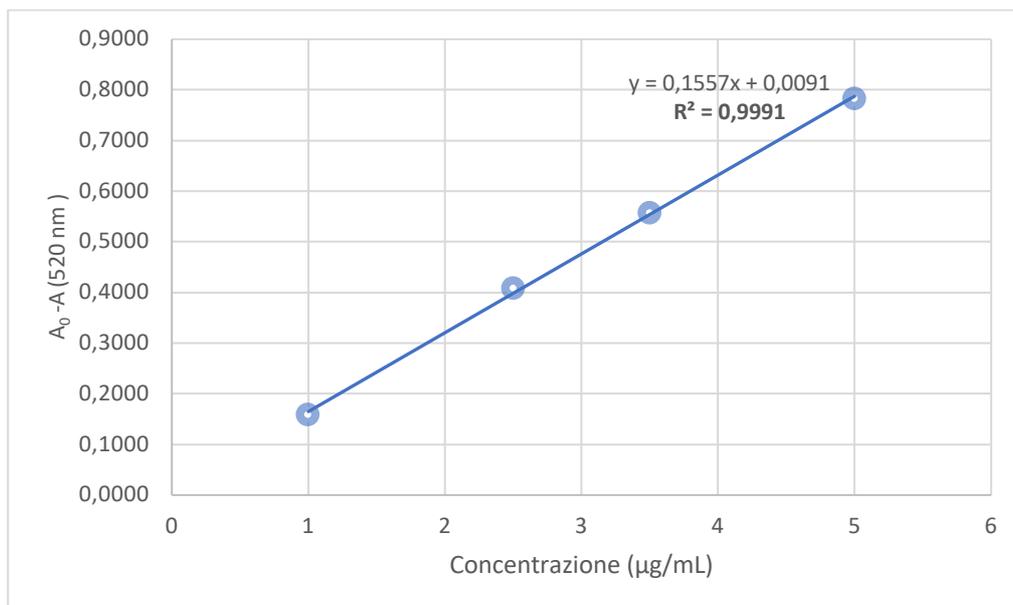


Figura 5.7 - Retta di calibrazione utilizzata per il test del DPPH

5.3.2 Retta di calibrazione test TEAC

In **Tabella 5.7** sono riportate le concentrazioni delle soluzioni standard di trolox utilizzate per costruire la retta di calibrazione e la corrispondente percentuale di inibizione dell'assorbanza calcolata come segue: $[1 - (A/A_0)] * 100$. Dove A rappresenta l'assorbanza di ciascuna soluzione standard e A_0 l'assorbanza del bianco. La capacità antiossidante è espressa come equivalenti di trolox su g di campione (mg TE/g).

Tabella 5.7 - Dati utilizzati per la costruzione della retta di calibrazione utilizzata per il test TEAC

Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	Assorbanza (media \pm DS)	% inibizione
Bianco	0.65 \pm 0.02	-
10	0.54 \pm 0.02	16.3 \pm 0.3
15	0.49 \pm 0.02	24.9 \pm 1.8
20	0.43 \pm 0.02	33.1 \pm 1.6
30	0.32 \pm 0.02	49.9 \pm 1.6

La **Figura 5.8** illustra la retta di calibrazione ottenuta tramite regressione lineare ponendo in ascissa la concentrazione degli standard di trolox e in ordinata la media delle percentuali di inibizione dell'assorbanza rispetto al bianco. Il coefficiente di correlazione ($R^2 = 0.9999$), vicino a 1, indica una risposta lineare ottimale nell'intervallo di concentrazioni considerate.

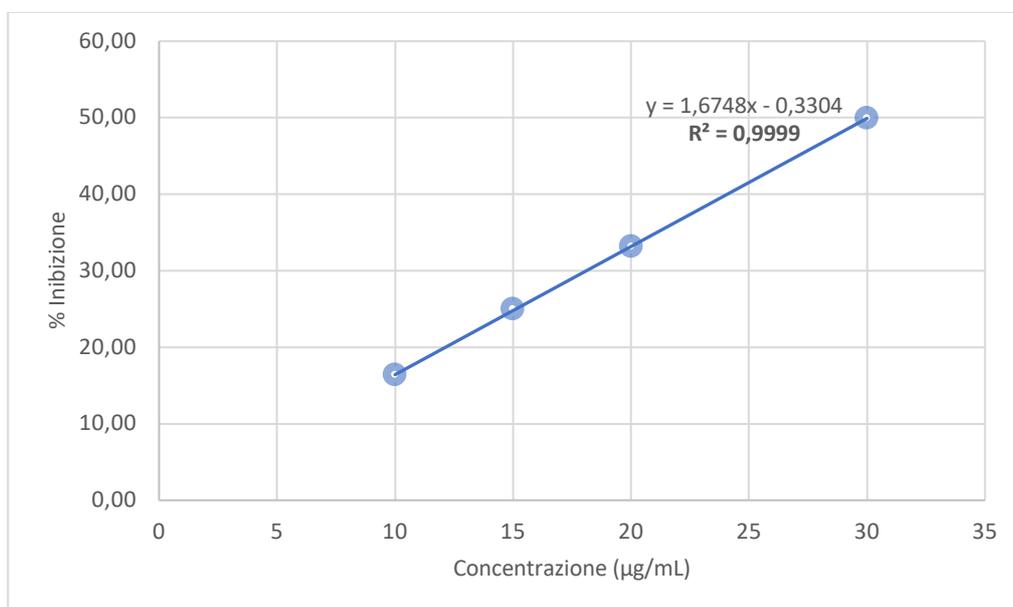


Figura 5.8 – Retta di calibrazione utilizzata per il test TEAC

5.3.3 Analisi dei campioni

La determinazione della capacità antiossidante di un campione è influenzata dalla natura del radicale utilizzato nel test colorimetrico [Zilic et al., 2012]. La sensibilità dei radicali nei confronti dei composti fenolici può variare, per questo motivo un singolo test generalmente non riflette l'attività antiossidante di tutti i composti presenti in miscele complesse. I test TEAC e del DPPH sono basati su diverse reazioni che coinvolgono radicali differenti; considerando che numerosi fattori possono condizionare il meccanismo di reazione tra antiossidanti e radicale, in alcuni casi i risultati ottenuti dalle analisi con i due metodi possono essere discordanti [Resat et al., 2016]. Al fine di ottenere una completa valutazione dell'attività antiossidante è dunque importante utilizzare più di una metodica analitica [Prior et al., 2005].

La **Tabella 5.8** riporta i risultati relativi alla capacità antiossidante misurata nella frazione solubile dei diversi campioni di mais mediante il test del DPPH e TEAC.

Tabella 5.8 - Capacità antiossidante della frazione solubile delle diverse varietà di mais misurata con il reattivo DPPH (mg EAG/g) e ABTS (mg TE/g) (n=3)

Campione	Capacità antiossidante frazione solubile	
	Media \pm DS	
	DPPH (mg EAG/g)	TEAC (mg TE/g)
Mais viola		
Reduno	0.34 \pm 0.02	3.10 \pm 0.17
Mais gialli		
Dolce	0.09 \pm 0.01	1.18 \pm 0.10
Scagliolo	0.06 \pm 0.01	0.57 \pm 0.11
Scoppio	0.09 \pm 0.01	0.80 \pm 0.07
Mais pigmentati		
Sugary	0.27 \pm 0.01	2.53 \pm 0.11
Polenta	0.22 \pm 0.02	1.78 \pm 0.23
Pop	0.26 \pm 0.03	2.52 \pm 0.34

Nelle **Figure 5.9** e **5.10** è illustrato il confronto dal punto di vista statistico tra le varietà pigmentate Sugary, Polenta e Pop e le rispettive varietà parentali, in termini di capacità antiossidante (AOA), per il test del DPPH e TEAC, rispettivamente.

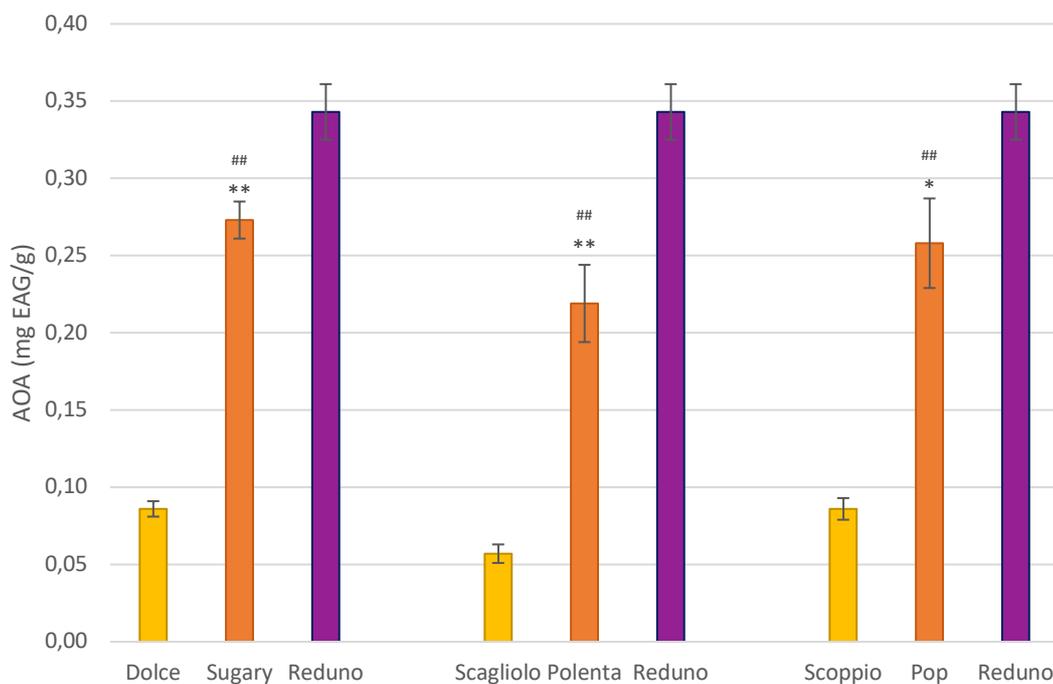


Figura 5.9 - AOA valutata mediante test del DPPH, espressa in mg EAG/g. Ciascun mais pigmentato è stato confrontato con le rispettive varietà parentali: # mais pigmentato vs mais giallo, * mais pigmentato vs mais viola (* = $p < 0.05$, **,### = $p < 0.005$)

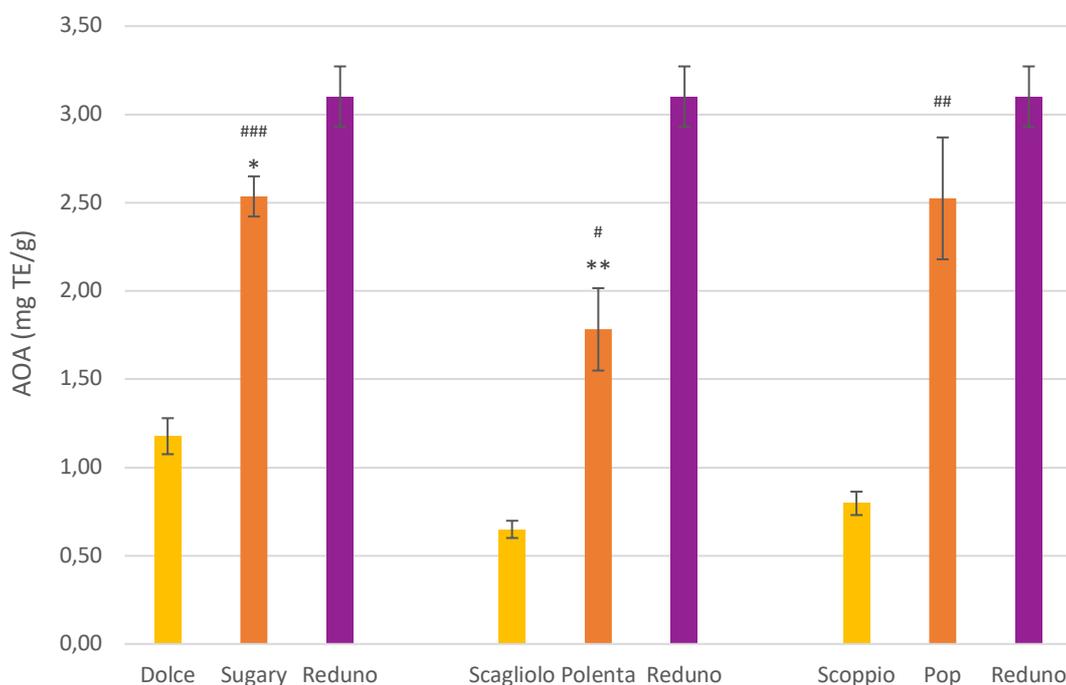


Figura 5.10 - AOA valutata mediante test TEAC ed espressa in mg TE/g. Ciascun mais pigmentato è stato confrontato con le rispettive varietà parentali: # mais pigmentato vs mais giallo, * mais pigmentato vs mais viola (*, # = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$, ### = $p < 0.0005$)

Dai dati ottenuti con entrambe le metodiche spettrofotometriche (**Figure 5.9 e 5.10**) si può osservare che:

- in entrambe le analisi colorimetriche i mais pigmentati Sugary, Polenta e Pop mostrano un incremento statisticamente significativo dell'attività antiossidante associata alla componente solubile, rispetto alle corrispondenti varietà parentali gialle;
- il mais viola Reduno, invece, presenta la maggior attività antiossidante. Solo la capacità antiossidante del mais ibrido Pop, misurata tramite test TEAC, non risulta statisticamente differente dal mais viola (**Figura 5.10**).

La **Tabella 5.9** riporti i risultati relativi alla capacità antiossidante misurata nella frazione insolubile dei diversi campioni di mais mediante il test del DPPH e TEAC.

Tabella 5.9 - Capacità antiossidante della frazione insolubile delle diverse varietà di mais misurata con il reattivo DPPH (mg EAG/g) e ABTS (mg TE/g) (n=3)

Capacità antiossidante frazione insolubile		
Media ± DS		
Campione	DPPH (mg EAG/g)	TEAC (mg TE/g)
Mais viola		
Reduno	0.22±0.03	3.62±0.33
Mais gialli		
Dolce	0.26±0.03	3.29±0.36
Scagliolo	0.26±0.02	3.11±0.27
Scoppio	0.92±0.08	12.48±0.92
Mais pigmentati		
Sugary	0.47±0.04	8.86±0.75
Polenta	0.36±0.04	5.62±0.68
Pop	0.45±0.04	7.10±0.42

Nelle **Figure 5.11 e 5.12** è illustrato il confronto dal punto di vista statistico tra le frazioni insolubili delle varietà pigmentate verso le rispettive varietà parentali, in termine di capacità antiossidante (AOA), per il test del DPPH e TEAC, rispettivamente.

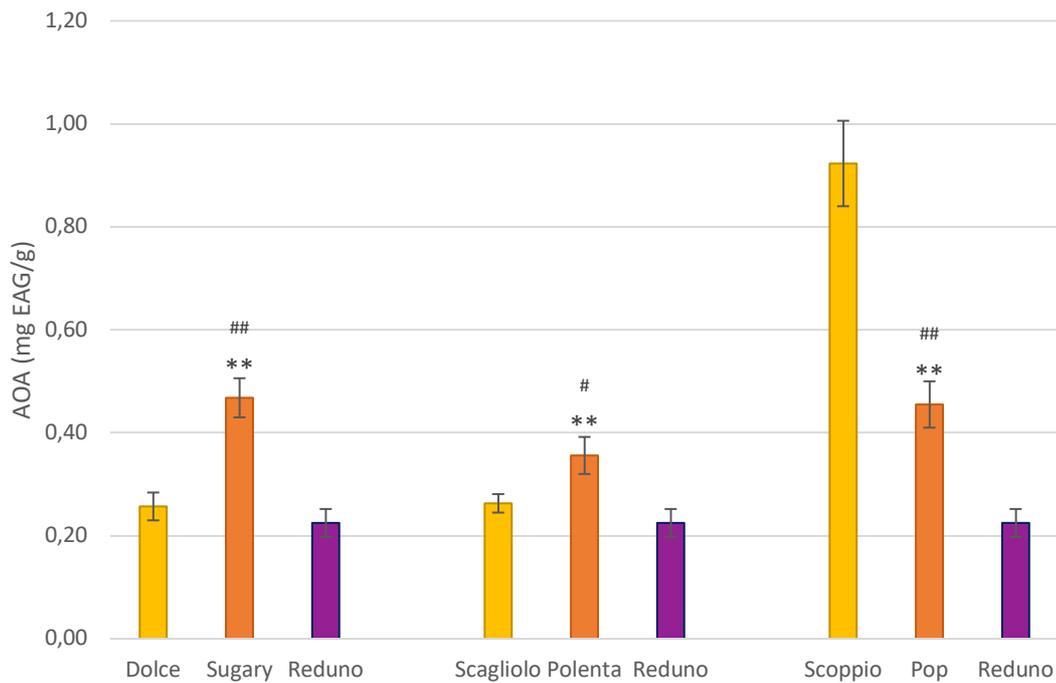


Figura 5.11 - AOA valutata mediante test del DPPH ed espressa in mg EAG/g. Ciascun mais pigmentato è stato confrontato con le rispettive varietà parentali: # mais pigmentato vs mais giallo, * mais pigmentato vs mais viola (# = $p < 0.05$, **,## = $p < 0.005$)

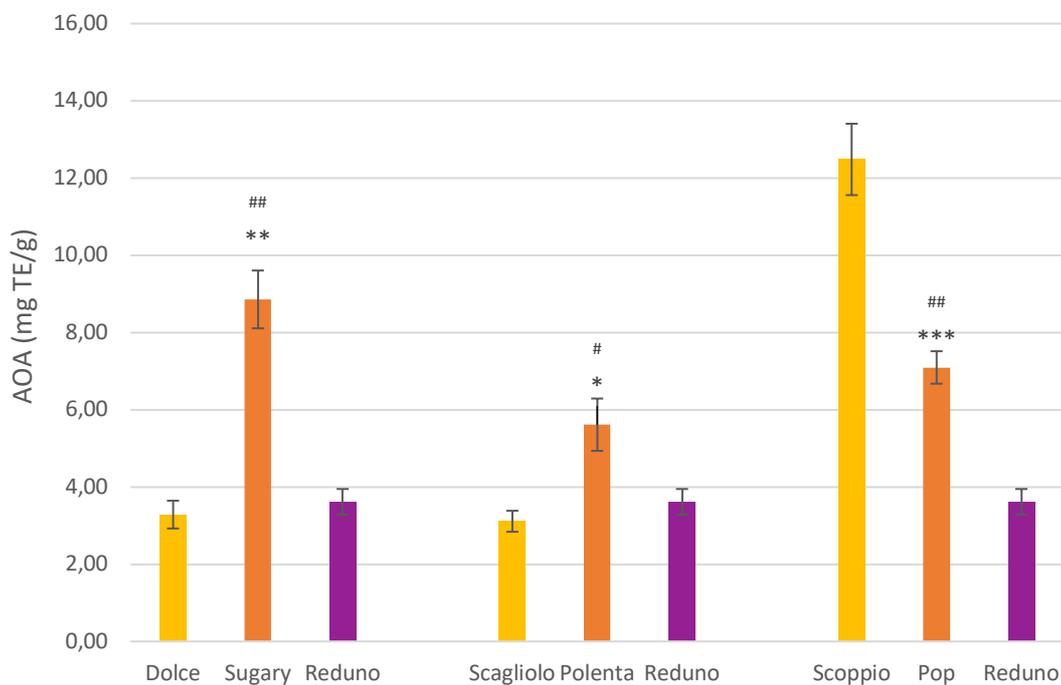


Figura 5.12 - AOA valutata mediante test TEAC ed espressa in mg TE/g. Ciascun mais pigmentato è stato confrontato con le rispettive varietà parentali: # mais pigmentato vs mais giallo, * mais pigmentato vs mais viola (*,# = $p < 0.05$, **,## = $p < 0.005$, *** = $p < 0.0005$)

Dai dati ottenuti mediante entrambe le metodiche spettrofotometriche si può osservare che (**Figure 5.11 e 5.12**):

- Il mais pigmentati Sugary e Polenta, mostrano un incremento significativo della AOA associata alla componente insolubile rispetto a entrambe le varietà parentali.
- In accordo con quanto osservato per i polifenoli insolubili, dosati con il saggio di Folin-Ciocalteu, il mais giallo Scoppio è il campione con la più alta attività antiossidante (0.92 ± 0.08 mg EAG/g e 12.48 ± 0.92 mg TE/g per il test del DPPH e TEAC, rispettivamente), e la varietà pigmentata Pop risulta possedere una capacità antiossidante significativamente superiore a quella del parentale mais viola Reduno ($p < 0.005$).

In **Tabella 5.10** è riportata la capacità antiossidante totale per ciascun campione di mais analizzato, ottenuta dal contributo sia della componente solubile sia insolubile.

Tabella 5.10 - Capacità antiossidante totale delle diverse varietà di mais misurata con il reattivo DPPH (mg EAG/g) e ABTS (mg TE/g). (n=3)

Campione	Capacità antiossidante totale Media \pm DS	
	DPPH (mg EAG/g)	TEAC (mg TE/g)
Mais viola		
Reduno	0.57 ± 0.01	6.72 ± 0.18
Mais gialli		
Dolce	0.34 ± 0.02	4.46 ± 0.43
Scagliolo	0.32 ± 0.02	3.76 ± 0.25
Scoppio	1.01 ± 0.08	13.28 ± 0.9
Mais pigmentati		
Sugary	0.74 ± 0.05	11.39 ± 0.83
Polenta	0.58 ± 0.04	7.40 ± 0.91
Pop	0.71 ± 0.07	9.62 ± 0.63

I dati relativi all'attività antiossidante associata ai polifenoli totali contenuti nei diversi campioni di mais sono stati oggetto di analisi statistiche. Le varietà pigmentate Sugary, Polenta e Pop sono state confrontate con i rispettivi mais parentali. Nelle **Figure 5.13 e 5.14** sono illustrati i risultati ottenuti per il test del DPPH e TEAC, rispettivamente.

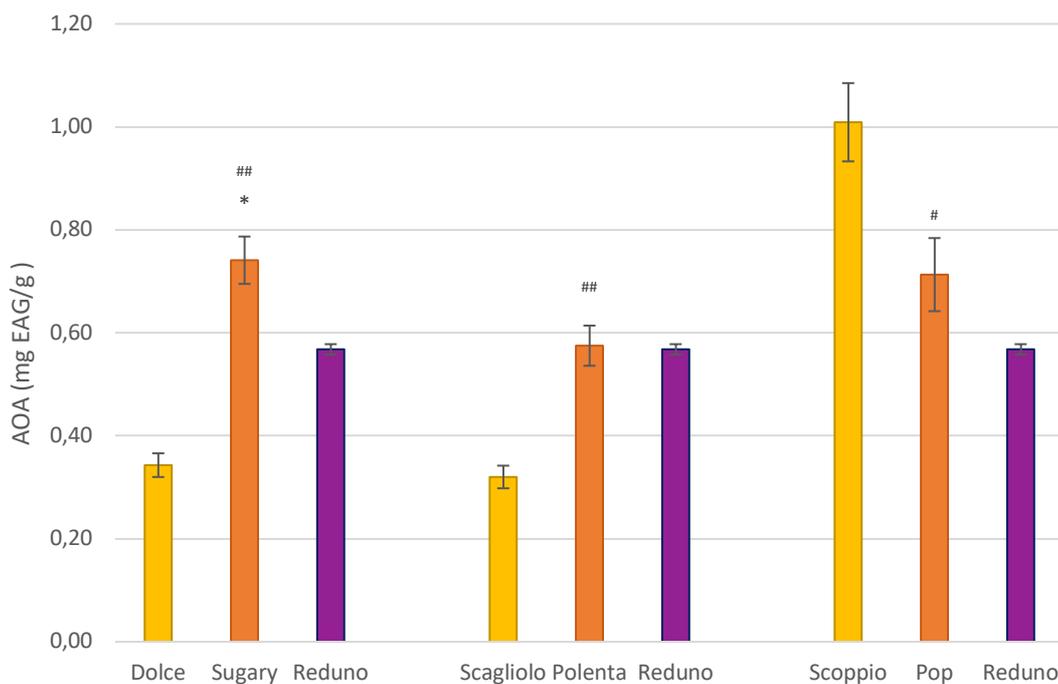


Figura 5.13 - AOA valutata mediante test del DPPH ed espressa in mg EAG/g. Ciascun mais pigmentato è stato confrontato con le rispettive varietà parentali: # mais pigmentato vs mais giallo, * mais pigmentato vs mais viola (*, # = $p < 0.05$, ## = $p < 0.005$)

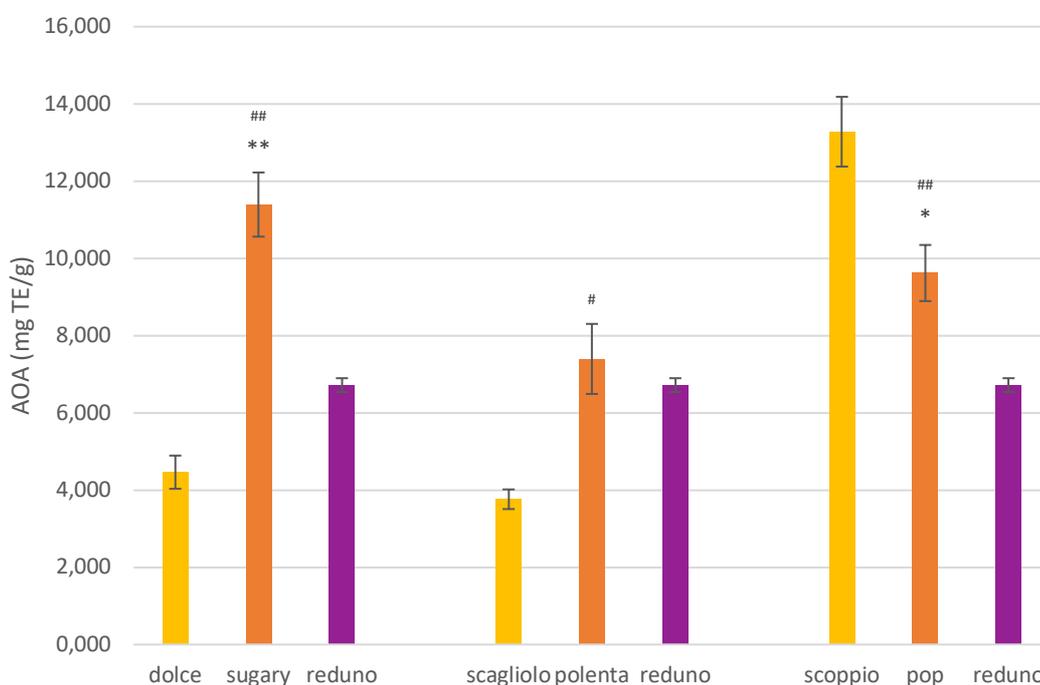


Figura 5.14 – AOA valutata mediante test TEAC ed espressa in mg TE/g. Ciascun mais pigmentato è stato confrontato con le rispettive varietà parentali: # mais pigmentato vs mais giallo, * mais pigmentato vs mais viola (*, # = $p < 0.05$, ## = $p < 0.005$)

Dai dati ottenuti mediante entrambe le metodiche spettrofotometriche si può osservare che (**Figure 5.13 e 5.14**):

- Il mais pigmentato Sugary mostra un incremento significativo dell'attività antiossidante totale rispetto ai mais parentali Dolce e Reduno ($p < 0.005$).
- Il mais pigmentato Polenta presenta un AOA paragonabile al mais viola Reduno ma significativamente superiore al mais giallo Scagliolo.
- Il mais giallo Scoppio è il campione con la più alta attività antiossidante, principalmente riconducibile al contributo della componente insolubile. Tuttavia, il mais ibrido Pop mostra un incremento statisticamente significativo, in termini di AOA, rispetto al mais viola Reduno ($p < 0.005$).

In **Figura 5.15** viene illustrata la correlazione tra le due metodiche spettrofotometriche utilizzate per la valutazione della capacità antiossidante totale dei campioni di mais inclusi nello studio.

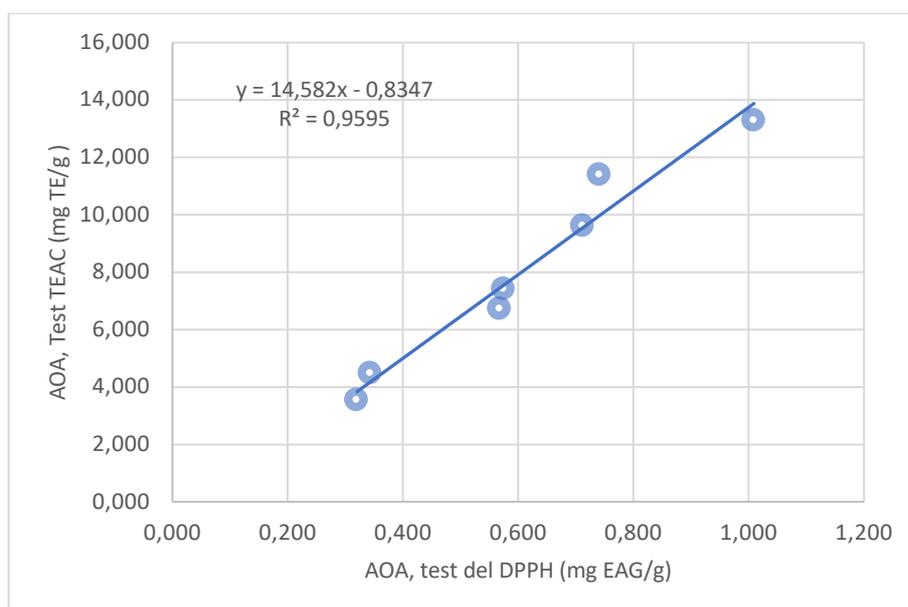


Figura 5.15 - Correlazione dei test spettrofotometrici utilizzati per la valutazione dell'attività antiossidante dei campioni di mais inclusi nello studio

Come illustrato in **Figura 5.15**, il coefficiente $R^2 = 0.9595$ indica una buona correlazione tra i test colorimetrici utilizzati nello studio.

Nelle **Figure 5.16** e **5.17** è illustrata la correlazione tra il contenuto di polifenoli totali e la capacità antiossidante, valutata mediante test del DPPH e TEAC, rispettivamente.

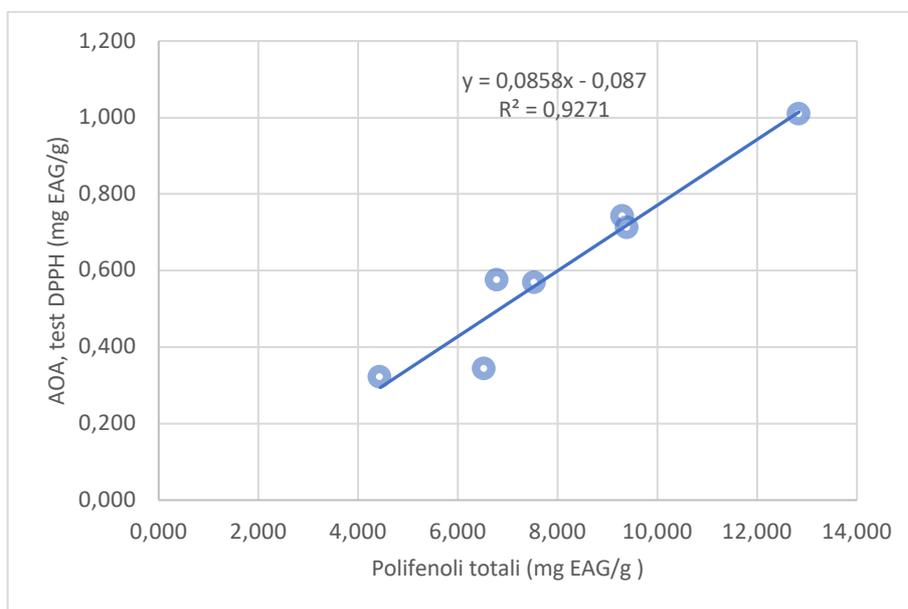


Figura 5.16 - Correlazione tra i polifenoli totali, misurati mediante metodo di Folin-Ciocalteu, e capacità antiossidante, valutata mediante test del DPPH

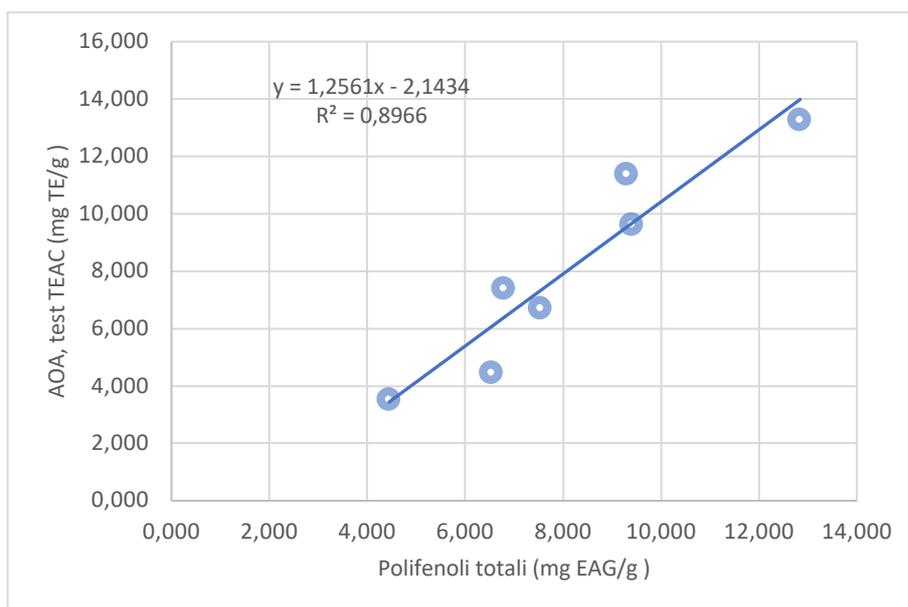


Figura 5.17 - Correlazione tra i polifenoli totali, misurati mediante metodo di Folin-Ciocalteu, e capacità antiossidante, valutata mediante test TEAC

Come illustrato nelle **Figure 5.16** e **5.17**, per entrambi i metodi si osserva una buona correlazione tra il contenuto di polifenoli totali e la relativa capacità antiossidante, come indicato dal coefficiente R^2 pari a 0.9271 per il test DPPH e 0.8966 per il test TEAC.

5.4 HPTLC

5.4.1 Caratterizzazione dei composti fenolici

Gli acidi fenolici sono tra i principali composti fenolici presenti nel mais, sia nella forma solubile sia in quella insolubile; per questo motivo sono stati selezionati come standard di riferimento per le analisi in HPTLC.

• Sensibilità del metodo

L'HPTLC è una tecnica analitica che permette di effettuare analisi semi-quantitative. L'intensità e la dimensione delle bande cromatografiche sono direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita contenuto del campione. La sensibilità del metodo viene valutata tramite il Limite di Rilevabilità (*Limit of Detection* – LOD) che rappresenta la minima quantità di analita rilevabile nelle condizioni cromatografiche scelte. I LOD relativi agli acidi fenolici inclusi nello studio sono stati determinati caricando sulla lastrina quantità note e decrescenti di ciascuna soluzione standard. In **Tabella 5.11** sono elencati i risultati relativi alla sensibilità del metodo per gli analiti ricercati.

Tabella 5.11 - LOD relativi agli acidi fenolici, valutati alla lunghezza d'onda più sensibile di rilevazione

Analita	λ di rilevazione (nm)	LOD (ng)*	LOD ($\mu\text{g/g}$)**
Acido gallico	254, 366	100	10
Acido caffeico	254, 366	100	10
Acido p-cumarico	254	100	10
Acido ferulico	254, 366	100	10
Acido clorogenico	366	100	10
Acido caftarico	366	40	4
Acido vanillico	254	100	10

* Riferito alla quantità caricata in lastrina (ng)

** Riferito alla quantità presente nel campione ($\mu\text{g/g}$)

• Analisi dei campioni

Tramite l'analisi del fingerprint è possibile valutare analogie e differenze qualitative e semi-quantitative nel contenuto di composti fenolici dei campioni. L'analisi di caratterizzazione viene condotta confrontando la corsa cromatografica degli standard con quella dei campioni e comparando il tipo e l'intensità della colorazione delle bande, prima e dopo derivatizzazione.

Nelle **Figure 5.18** e **5.19** sono riportati i risultati dell'analisi in HPTLC condotta sulla frazione solubile, rilevati alla lunghezza d'onda di 254 nm e 366 nm, rispettivamente. I diversi estratti di mais sono stati caricati sulla lastrina in parallelo alle soluzioni di acidi fenolici di riferimento.

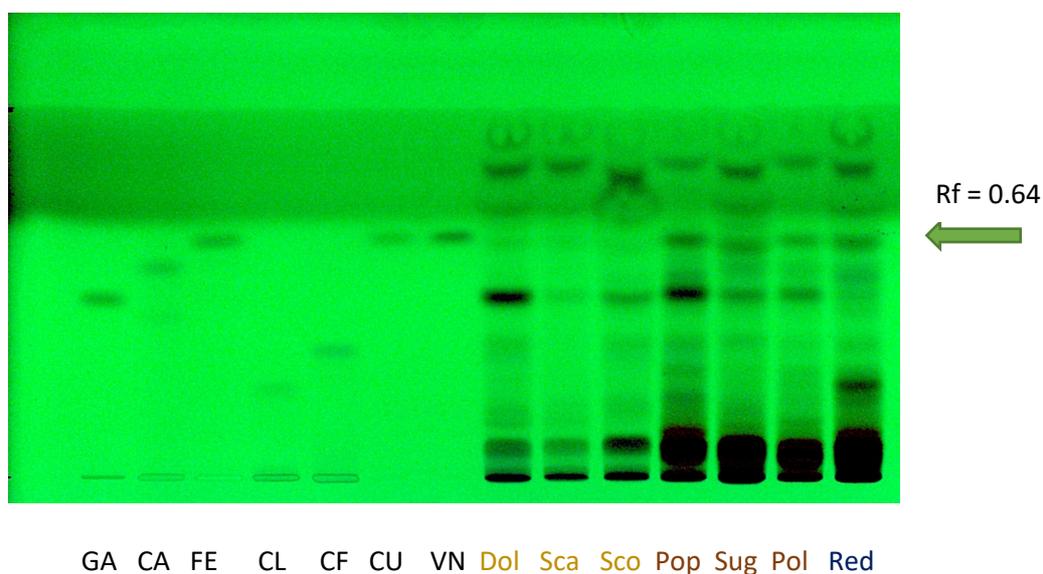


Figura 5.18 - Analisi della frazione solubile dei campioni di mais rilevata a 254 nm

Legenda:

GA: Acido gallico	CU: Acido cumarico	Pop: Mais pigmentato Pop
CA: Acido caffeico	VN: Acido vanillico	Sug: Mais pigmentato Sugary
FE: Acido ferulico	Dol: Mais giallo Dolce	Pol: Mais pigmentato Polenta
CL: Acido clorogenico	Sca: Mais giallo Scagliolo	Red: Mais viola Reduno
CF: Acido caftarico	Sco: Mais giallo Scoppio	

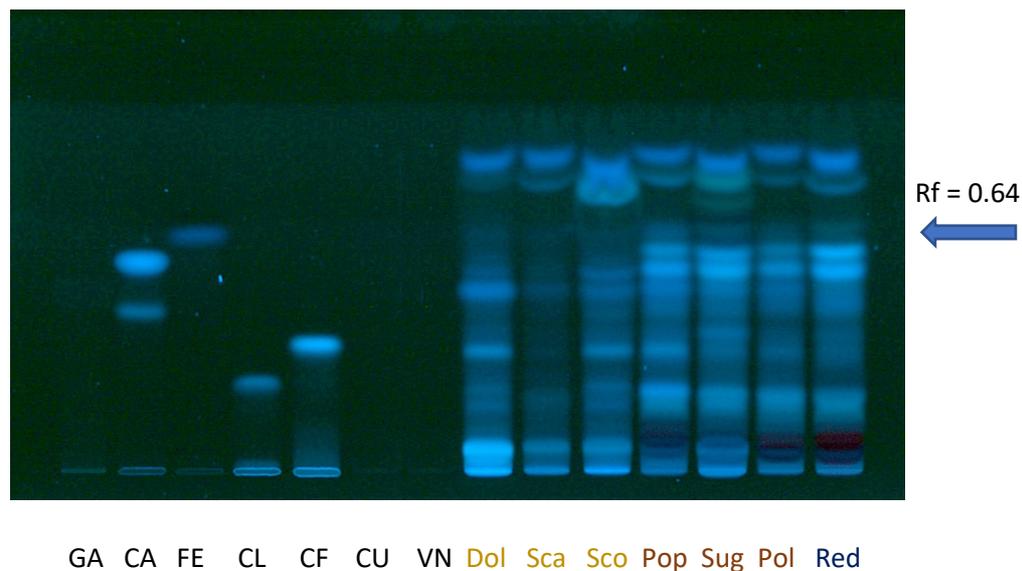


Figura 5.19 - Analisi della frazione solubile dei campioni di mais rilevata a 366 nm

Legenda:

GA: Acido gallico	CU: Acido cumarico	Pop: Mais pigmentato Pop
CA: Acido caffeico	VN: Acido vanillico	Sug: Mais pigmentato Sugary
FE: Acido ferulico	Dol: Mais giallo Dolce	Pol: Mais pigmentato Polenta
CL: Acido clorogenico	Sca: Mais giallo Scagliolo	Red: Mais viola Reduno
CF: Acido caftarico	Sco: Mais giallo Scoppio	

Gli acidi fenolici, in particolare l'acido ferulico e l'acido p-cumarico, sono i principali composti fenolici presenti nel mais, sia nella forma solubile sia in quella insolubile. Gli acidi fenolici possono essere presenti nella frazione solubile nella loro forma libera o "coniugata", ovvero glicosilati ed esterificati ad altre molecole [Salinas-Moreno et al., 2017]. La presenza delle forme coniugate degli acidi fenolici rende difficile la loro identificazione mediante HPTLC. Come si può osservare dalle **Figure 5.18** e **5.19**, i campioni di mais presentano profili (*fingerprints*) complessi, tuttavia i fenotipi pigmentati (mais Pop, Sugary, Polenta e Reduno) risultano più ricchi di acidi fenolici e derivati rispetto alle varietà gialle (Dolce, Scagliolo e Scoppio). In tutti i campioni è identificabile la banda relativa all'acido ferulico ($R_f = 0.64$), rilevabile sia a 254 nm sia a 366 nm.

Al fine di valutare l'attività antiossidante associata ai singoli composti contenuti nei campioni, il reattivo DPPH è stato utilizzato come agente derivatizzante. Il DPPH è un

radicale caratterizzato da colorazione viola, in presenza di antiossidanti si riduce diventando una molecola stabile caratterizzata da colorazione gialla. L'intensità della decolorazione dal viola al giallo è proporzionale all'attività antiossidante del composto.

In **Figura 5.20** sono riportati i risultati dell'analisi in HPTLC condotta sulla frazione solubile. L'attività antiossidante è stata valutata alla luce visibile dopo derivatizzazione con una soluzione di 0.05% DPPH in metanolo (p/v).

Questo metodo non consente di valutare il contributo degli antociani alla capacità antiossidante complessiva del campione, a causa dell'intensa colorazione associata a queste molecole.

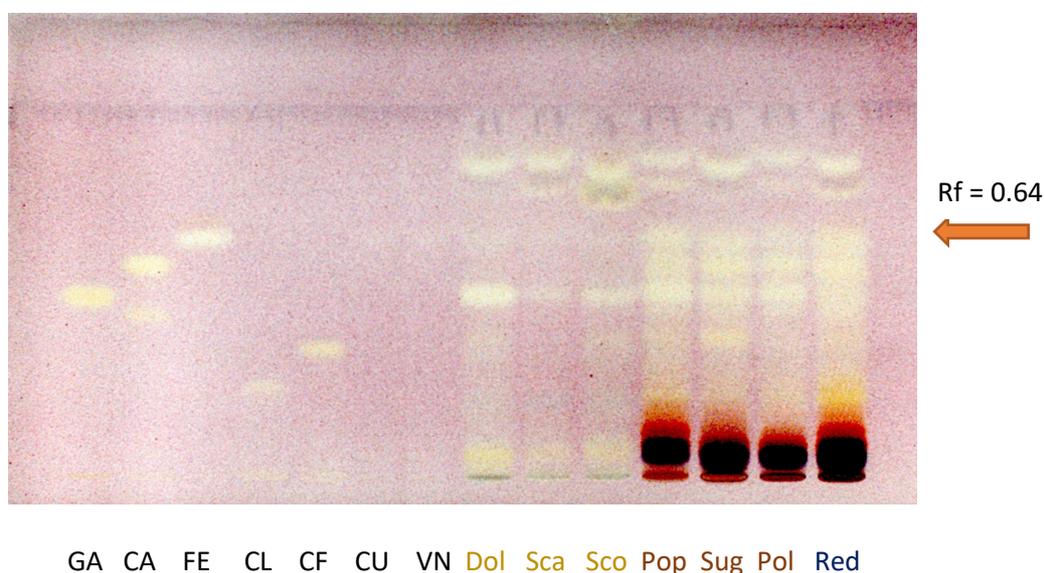


Figura 5.20 - Valutazione della capacità antiossidante relativa alla frazione solubile dei campioni di mais, rilevata alla luce visibile dopo derivatizzazione con reattivo DPPH

Legenda:

- | | | |
|-----------------------|----------------------------|------------------------------|
| GA: Acido gallico | CU: Acido cumarico | Pop: Mais pigmentato Pop |
| CA: Acido caffeico | VN: Acido vanillico | Sug: Mais pigmentato Sugary |
| FE: Acido ferulico | Dol: Mais giallo Dolce | Pol: Mais pigmentato Polenta |
| CL: Acido clorogenico | Sca: Mais giallo Scagliolo | Red: Mais viola Reduno |
| CF: Acido caftarico | Sco: Mais giallo Scoppio | |

Tutti gli standard inclusi nello studio, ad eccezione dell'acido p-cumarico e dell'acido vanillico, mostrano capacità antiossidante, come osservato dalla decolorazione delle bande corrispondenti (**Figura 5.20**). Sebbene l'attività antiossidante degli antociani non sia valutabile con tale metodo, tutti i mais pigmentati mostrano una maggior concentrazione di molecole antiossidanti, rispetto alle varietà gialle incluse nello studio. Il contributo dell'acido ferulico ($R_f = 0.64$), all'attività antiossidante dei campioni, è osservabile principalmente nelle varietà pigmentate.

Nelle **Figure 5.21** e **5.22** sono riportati i risultati dell'analisi in HPTLC condotta sulla frazione insolubile, rilevati alla lunghezza d'onda di 254 nm e 366 nm.

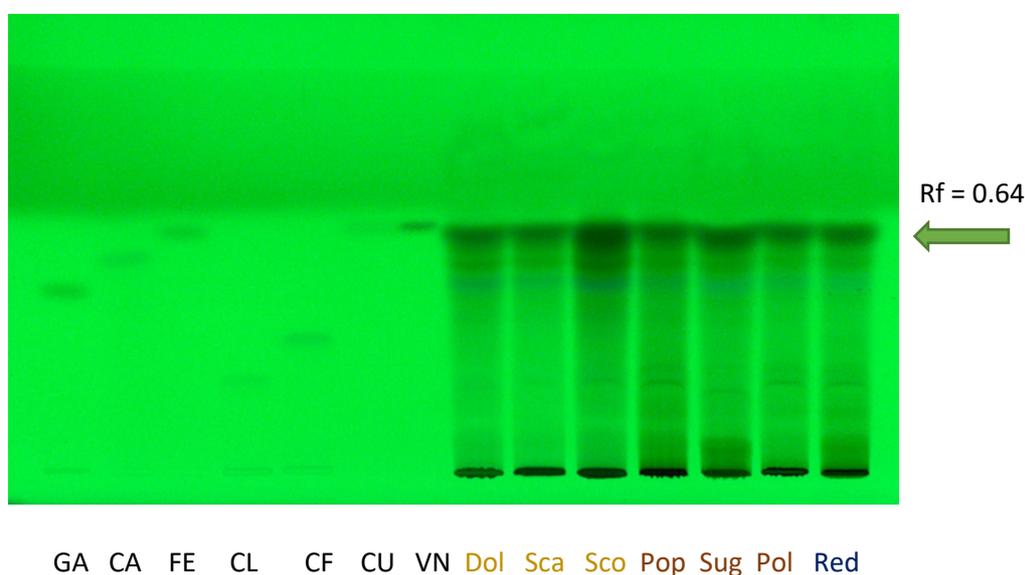


Figura 5.21 - Analisi della frazione insolubile dei campioni di mais rilevata a 254 nm

Legenda:

GA: Acido gallico	CU: Acido cumarico	Pop: Mais pigmentato Pop
CA: Acido caffeico	VN: Acido vanillico	Sug: Mais pigmentato Sugary
FE: Acido ferulico	Dol: Mais giallo Dolce	Pol: Mais pigmentato Polenta
CL: Acido clorogenico	Sca: Mais giallo Scagliolo	Red: Mais viola Reduno
CF: Acido caftarico	Sco: Mais giallo Scoppio	

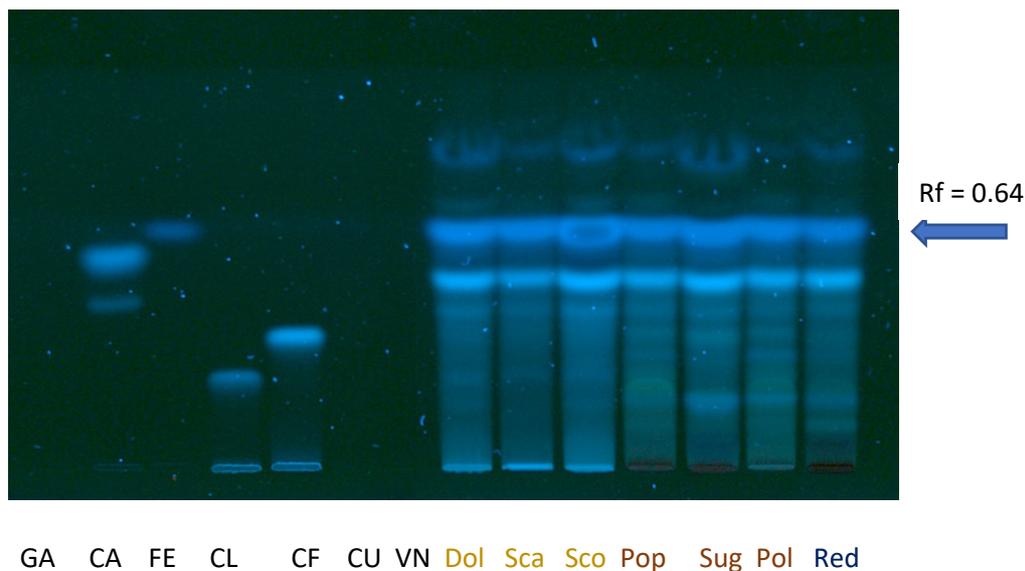


Figura 5.22 - Analisi della frazione insolubile dei campioni di mais rilevata a 366 nm

Legenda:

GA: Acido gallico	CU: Acido cumarico	Pop: Mais pigmentato Pop
CA: Acido caffeico	VN: Acido vanillico	Sug: Mais pigmentato Sugary
FE: Acido ferulico	Dol: Mais giallo Dolce	Pol: Mais pigmentato Polenta
CL: Acido clorogenico	Sca: Mais giallo Scagliolo	Red: Mais viola Reduno
CF: Acido caftarico	Sco: Mais giallo Scoppio	

L'acido ferulico ($R_f = 0.64$) è presente in tutti i campioni di mais in elevate concentrazioni, come indicato dall'intensità della colorazione delle bande a 254 nm e 366 nm. Il mais giallo Scoppio, apparentemente, presenta il più alto contenuto di acido ferulico. Dal confronto della frazione solubile con quella insolubile (**Figure 5.18-5.19** e **5.21-5.22**, rispettivamente), gli acidi fenolici sono maggiormente presenti nella forma insolubile rispetto alla forma solubile, in accordo con quanto riportato in letteratura [Adom and Liu, 2002].

In **Figura 5.23** sono riportati i risultati dell'analisi in HPTLC condotta sulla frazione insolubile, rilevati alla luce visibile. L'attività antiossidante è stata valutata dopo derivatizzazione con una soluzione di 0.05% DPPH in metanolo (p/v).

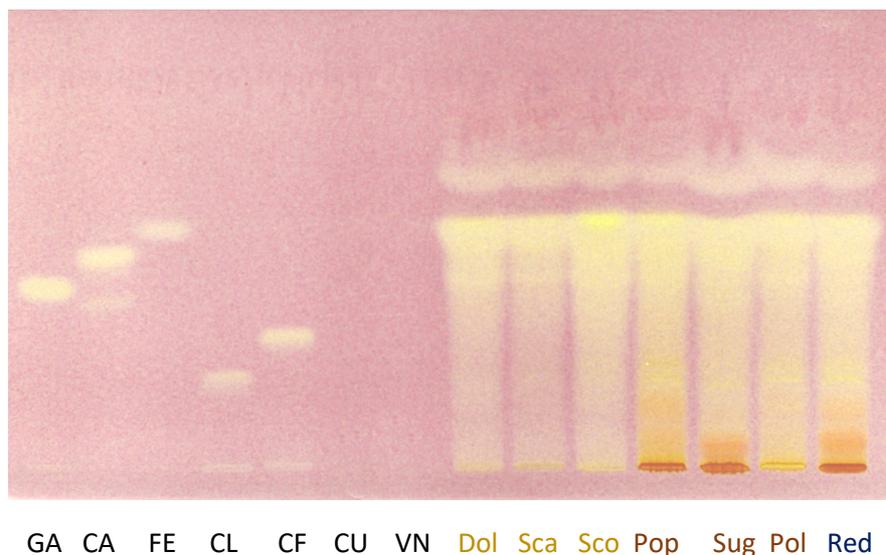


Figura 5.23 - Valutazione della capacità antiossidante relativa alla frazione insolubile dei campioni di mais, rilevata alla luce visibile dopo derivatizzazione con reattivo DPPH

Legenda:

GA: Acido gallico	CU: Acido cumarico	Pop: Mais pigmentato Pop
CA: Acido caffeico	VN: Acido vanillico	Sug: Mais pigmentato Sugary
FE: Acido ferulico	Dol: Mais giallo Dolce	Pol: Mais pigmentato Polenta
CL: Acido clorogenico	Sca: Mais giallo Scagliolo	Red: Mais viola Reduno
CF: Acido caftarico	Sco: Mais giallo Scoppio	

Come si può osservare dal confronto tra la frazione solubile (**Figura 5.20**) e la frazione insolubile (**Figura 5.23**) la decolorazione del reattivo DPPH risulta più marcata nell'analisi di polifenoli insolubili, a parità di quantità caricata in lastrina; confermando che l'estratto organico possiede una maggiore attività antiossidante rispetto a quello idroalcolico contenente i polifenoli solubili.

5.4.2 Caratterizzazione degli antociani

La pigmentazione caratteristica del mais viola Reduno e delle varietà Sugary, Polenta e Pop è riconducibile alla presenza degli antociani. Gli antociani sono una classe di flavonoidi idrosolubili responsabili del colore rosso, viola e blu di molta frutta, verdura e cereali [Giusti and Wrolstad, 2003].

• Sensibilità del metodo

La sensibilità del metodo per la rilevazione delle antocianine è stata valutata mediante la determinazione del Limite di Rilevabilità (*Limit of Detection* – LOD). In **Tabella 5.12** sono elencati i risultati relativi alla sensibilità del metodo.

Tabella 5.12 – LOD relativi alle antocianine, valutati alla lunghezza d'onda più sensibile di rilevazione

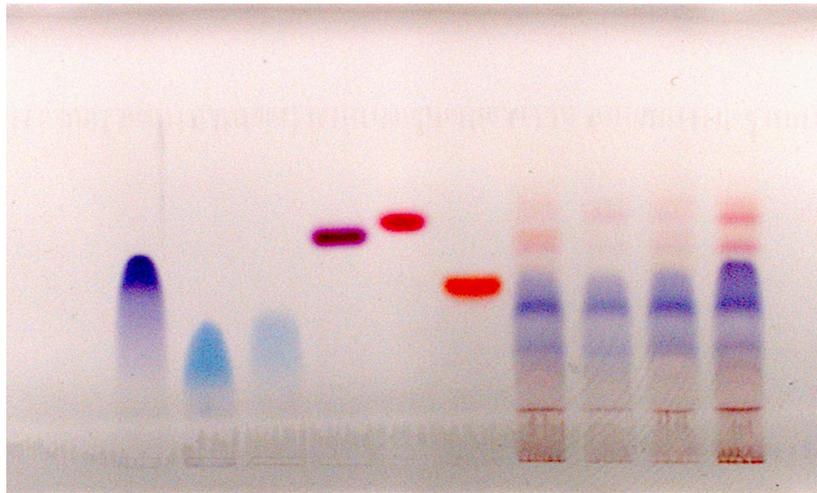
Analita	λ di rilevazione	LOD (ng)*	LOD (mg/g)**
Cianidina-3-O-glucoside	visibile	400	0.5
Delfinidina-3-O-glucoside	visibile	300	0.4
Petunidina-3-O-glucoside	visibile	400	0.5
Malvdina-3-O-glucoside	visibile	200	0.3
Peonidina-3-O-glucoside	visibile	200	0.3
Pelargonidina-3-O-glucoside	visibile	200	0.3

* Riferito alla quantità caricata in lastrina (ng)

** Riferito alla quantità presente nel campione ($\mu\text{g/g}$)

• Analisi dei campioni

Nell **Figura 5.24** sono riportati i risultati dell'analisi semi-quantitativa in HPTLC delle antocianine nei campioni di mais pigmentati e nel mais viola Reduno, rilevati alla luce visibile.



C D Pt M Pe Pg Pop Pol Sug Red

Figura 5.24 – Caratterizzazione delle antocianine in HPTLC

Legenda:

C: Cianidina-3-O-glucoside	Pe: Peonidina-3-O-glucoside	Sug: Mais pigmentato Sugary
D: Delfinidina-3-O-glucoside	Pg: Pelargondina-3-O-glucoside	Red: Mais viola Reduno
Pt: Petunidina-3-O-glucoside	Pop: Mais pigmentato Pop	
M: Malvidina-3-O-glucoside	Pol: Mais pigmentato Polenta	

L'identificazione delle antocianine nei campioni è stata condotta sulla base della corsa cromatografica e della colorazione delle bande. Come si può osservare dalla maggior intensità delle bande (**Figura 5.24**), la concentrazione di antocianine risulta più elevata nel mais viola Reduno. L'antocianina più abbondante, presente in tutti i campioni, è rappresentata dalla cianidina-3-O-glucoside ($R_f=0.49$) e dai suoi derivati, caratterizzati da una colorazione viola. In tutti i campioni è inoltre osservabile la Peonidina-3-O-glicoside ($R_f=0.61$).

5.5 Quantificazione acidi fenolici mediante HPLC-DAD

Il contenuto di acidi fenolici all'interno dei campioni in esame è stato valutato utilizzando la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) accoppiata a rivelatore a serie di fotodiodi (DAD). Sono stati considerati i tre acidi fenolici rilevati in tutte le varietà di mais incluse nello studio: acido vanillico, acido cumarico e acido ferulico. Il metodo analitico sviluppato è stato validato secondo le linee guida dell'FDA (*Food and Drug Administration*) [FDA, 2018].

In **Figura 5.25** è riportato un cromatogramma relativo all'iniezione di una miscela di acidi fenolici standard (acido vanillico $Tr= 15.97\pm 0.04$ min, acido cumarico $Tr= 20.33\pm 0.05$ min e acido ferulico $Tr= 21.69\pm 0.05$) alla concentrazione di $20\ \mu\text{g/mL}$.

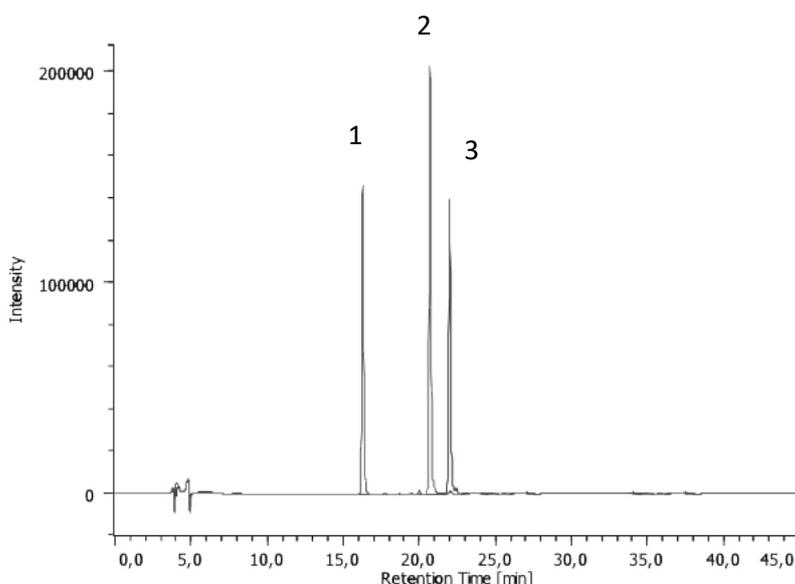


Figura 5.25 - Cromatogramma relativo all'iniezione di una miscela di acidi fenolici standard ($20\ \mu\text{g/mL}$)

Legenda: 1) acido vanillico, 2) acido cumarico, 3) acido ferulico

5.5.1 Validazione del metodo analitico

• Idoneità del sistema

Il sistema cromatografico utilizzato per il dosaggio degli acidi fenolici è stato validato applicando un test di idoneità i cui risultati sono riportati in **Tabella 5.13**. I parametri considerati sono: tempo di ritenzione (T_r), fattore di ritenzione (K), fattore di separazione (α), fattore di simmetria e numero di piatti teorici (N).

Tabella 5.13 - Risultati del test di idoneità di sistema ($n=3$)

Composto	T_r (Media \pm DS)	K^1 (Media \pm DS)	α^2 (Media \pm DS)	Fattore di simmetria (Media \pm DS)	N° di piatti teorici (Media \pm DS)
Acido vanillico	15.97 \pm 0.04	2.98 \pm 0.01	1.36 \pm 0.001	1.15 \pm 0.05	64400 \pm 414
Acido cumarico	20.33 \pm 0.05	4.07 \pm 0.02	1.08 \pm 0.001	1.11 \pm 0.03	102328 \pm 1303
Acido ferulico	21.69 \pm 0.05	4.41 \pm 0.02	1.02 \pm 0.002	1.12 \pm 0.04	113987 \pm 2661

⁽¹⁾ Fattore di ritenzione $K = (T_r - T_0)/T_0$ dove T_r e T_0 sono rispettivamente il tempo di ritenzione dei componenti del campione e del solvente .

⁽²⁾ Fattore di separazione (α) = $(T_{r2} - T_0)/(T_{r1} - T_0)$, dove T_{r1} e T_{r2} sono i tempi di ritenzione di due picchi vicini.

Dai dati riportati in **Tabella 5.13** si osserva che il sistema cromatografico utilizzato è risultato idoneo per la separazione e quantificazione degli analiti d'interesse:

1. I picchi cromatografici presentano un'elevata riproducibilità nei tempi di ritenzione (CV% compreso tra 0.21 e 0.25%);
2. Il fattore di ritenzione (K) risulta compreso tra 2.98 e 4.41 e le migliori prestazioni, in termini di efficienza e risoluzione, si ottengono quando K è compreso tra 1.5 e 5 [Cozzi et al., 2001].
3. Per ciascun acido fenolico, il fattore di simmetria (vicino ad 1) e l'elevato numero di piatti teorici confermano l'idoneità del sistema.

- **Linearità**

La linearità del metodo analitico è stata valutata per ciascun acido fenolico mediante la costruzione di una retta di calibrazione.

Nelle **Tabelle 5.14, 5.15 e 5.16** sono riportati i dati utilizzati per la costruzione delle rette di calibrazione per l'acido vanillico, cumarico e ferulico, rispettivamente; le quali sono illustrate nelle **Figure 5.26, 5.27 e 5.28**.

Tabella 5.14 - Soluzioni standard di acido vanillico e relative aree cromatografiche

Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	Area Media \pm DS (n=3)
0.2	8526 \pm 285
0.5	23412 \pm 1250
1	42412 \pm 2127
2.5	119044 \pm 5447
5	245169 \pm 1220
10	490262 \pm 10014
20	969367 \pm 7990

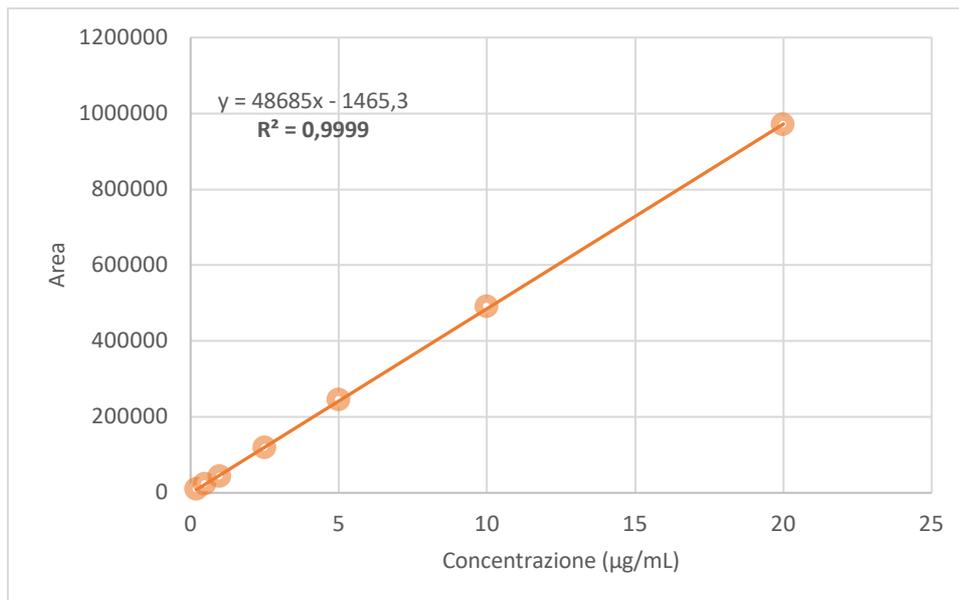


Figura 5.26 - Retta di calibrazione per il dosaggio dell'acido vanillico

Tabella 5.15 - Soluzioni standard di acido cumarico e relative aree cromatografiche

Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	Area Media \pm DS (n=3)
0.5	58568 \pm 3808
1	131262 \pm 4158
2.5	327576 \pm 3148
5	592173 \pm 383
10	1282346 \pm 36554
20	2628288 \pm 50030

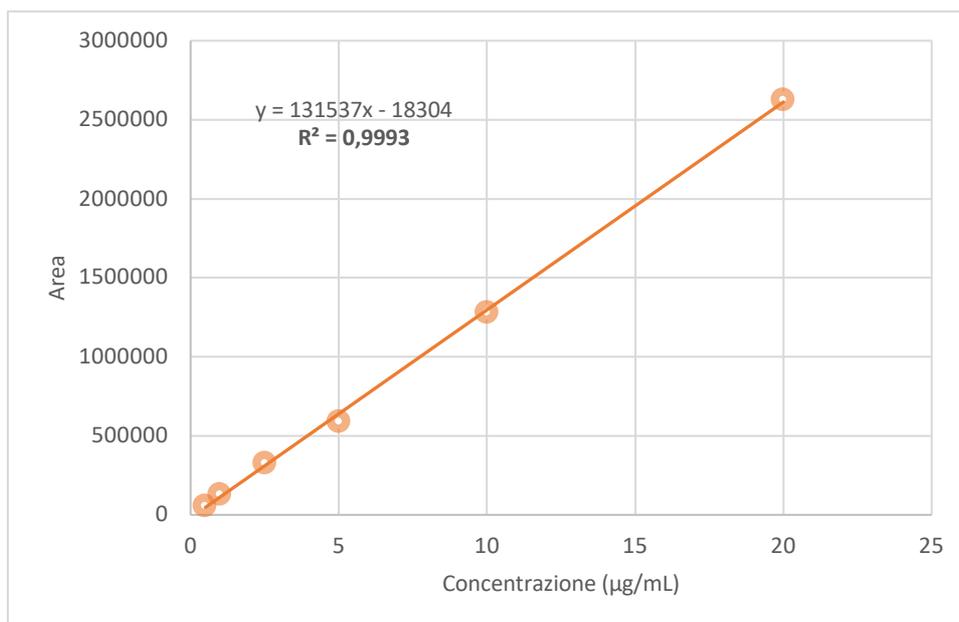


Figura 5.27 - Retta di calibrazione utilizzata per il dosaggio dell'acido cumarico

Tabella 5.16 - Soluzioni standard di acido ferulico e relative aree cromatografiche

Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	Area Media \pm DS (n=3)
5	332469 \pm 15443
10	673633 \pm 6051
20	1323476 \pm 61827
50	3244188 \pm 118720
80	5472381 \pm 112280

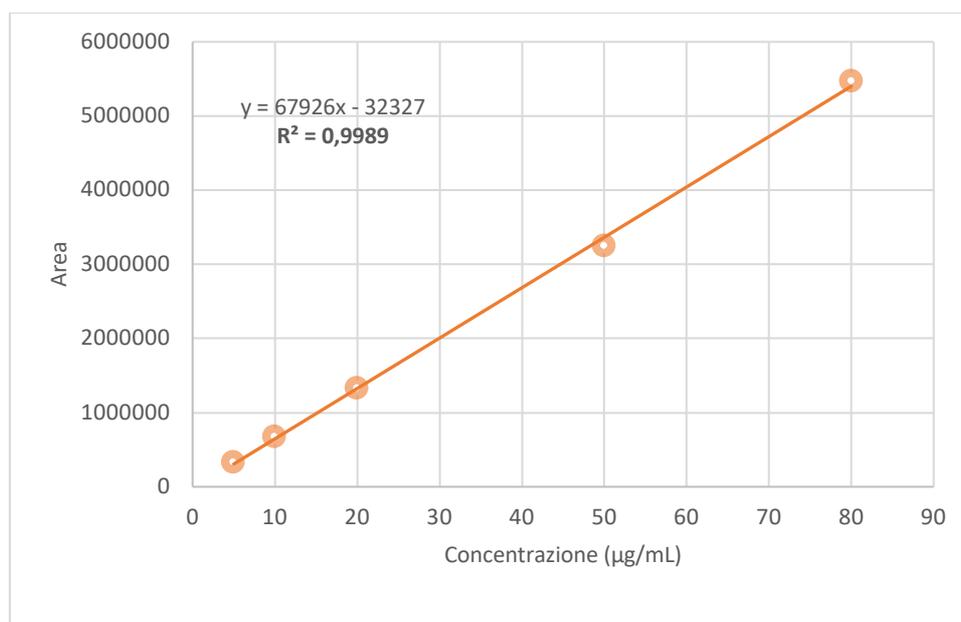


Figura 5.28 - Retta di calibrazione utilizzata per il dosaggio dell'acido ferulico

Come illustrato nelle **Figura 5.26-5.28**, il coefficiente di correlazione R^2 , vicino a 1 (0.9999, 0.9993 e 0.9989 per l'acido vanillico, cumarico e ferulico, rispettivamente), indica una risposta lineare ottimale nell'intervallo di concentrazioni considerate.

• Sensibilità

La sensibilità del metodo analitico è stata valutata mediante due parametri: il limite di determinazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ). Essi vengono determinati attraverso iniezioni di soluzioni standard a concentrazione nota, la quale viene progressivamente diluita fino ad ottenere un rapporto segnale:rumore di fondo (s/n) pari a 3:1 per il LOD e 10:1 per il LOQ.

In **Tabella 5.17** sono riportati i valori di LOD e LOQ per gli acidi fenolici inclusi nello studio, espressi in $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{g/g}$ di campione.

Tabella 5.17 - Valori di LOD e LOQ per gli acidi fenolici espressi in $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{g/g}$ di campione

Analita	LOD		LOQ	
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/g}$
Acido vanillico	0.03	0.14	0.20	0.80
Acido cumarico	0.02	0.07	0.10	0.40
Acido ferulico	0.07	0.28	0.25	1.00

• Precisione

In **Tabella 5.18** sono riportati i dati relativi alla precisione del metodo analitico, espressi come coefficiente di variazione percentuale (CV%). La precisione, valutata con un minimo di cinque iniezioni per concentrazione, viene distinta in precisione *within-day* (valutata durante una singola seduta analitica) e *between-day* (valutata in giorni differenti).

Tabella 5.18 - Dati relativi alla precisione *within-day* e *between-day*

Analita	Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	Precisione <i>within-day</i> (CV%)	Precisione <i>between-day</i> (CV%)
Acido vanillico	1	4.06	7.51
	2.5	4.61	6.09
	10	5.46	2.26
Acido cumarico	1	2.43	8.38
	2.5	5.22	4.11
	10	4.10	1.69
Acido ferulico	5	3.13	7.72
	20	3.03	2.12
	50	4.48	2.06

Come si può osservare in **Tabella 5.18**, i dati ottenuti confermano la precisione del metodo analitico. La precisione *within-day* e *between-day* non supera il 7.51 % per l'acido vanillico, l'8.38% per l'acido cumarico e il 7.72% per l'acido ferulico, rientrando nei criteri richiesti dalla FDA (CV%<15).

• Stabilità

La stabilità degli acidi fenolici è stata valutata a breve (24 h, T ambiente) e a lungo termine (20 giorni, -20°C), analizzando soluzioni standard a tre differenti concentrazioni (alta, media, bassa). I risultati, espressi come variazione percentuale, sono riportati in **Tabella 5.19**.

Tabella 5.19 - Risultati della stabilità degli acidi fenolici a breve e a lungo termine, espressi come variazione percentuale (n=3)

Analita	Concentrazione iniziale (µg/mL)	Stabilità a breve termine	Stabilità a lungo termine
		24 h, T _{amb} Variazione % (media±DS)	-20°C, 20gg Variazione % (media±DS)
Acido vanillico	1	85.4±1.9	93.1±2.4
	2.5	91.7±2.0	89.1±4.9
	10	95.8±5.7	96.7±3.2
Acido cumarico	1	87.2±0.8	90.9±1.1
	2.5	92.7±3.0	93.8±6.9
	10	97.3±4.6	100.4±0.8
Acido ferulico	5	90.0±2.3	104.9±2.2
	20	96.2±2.0	99.6±4.2
	50	97.7±4.4	101.8±1.7

Le prove effettuate a breve e a lungo termine hanno dimostrato una idonea stabilità degli analiti, infatti la variazione percentuale rientra nell'intervallo 85-115% [FDA, 2018].

• Recupero

Al fine di valutare il recupero percentuale degli acidi fenolici, ottenuto mediante la metodica di estrazione riportata da Bento-Silva e collaboratori [2018], si è operato per stabilire quale fosse il solvente di estrazione che fornisse il miglior risultato in termini di quantità e riproducibilità. A tale scopo l'acido ferulico è stato selezionato come composto

di riferimento per le successive prove, in quanto più rappresentativo dei campioni inclusi nello studio.

Facendo riferimento a quanto riportato in letteratura, l'etilacetato rappresenta il solvente di estrazione principalmente impiegato per l'estrazione dei composti fenolici [Lopez-Martinez et.al, 2009]. Tuttavia, sono state condotte ulteriori prove utilizzando una miscela dietilere:etilacetato 1:1 (v/v) e cloroformio [Bento Silva et al., 2018]. Al fine di valutare l'efficienza di estrazione, il recupero percentuale è stato considerato ad ogni passaggio del protocollo di estrazione:

- Dopo 1 ora di agitazione;
- Dopo 1 ora di agitazione e acidificazione con 37% HCl (pH 1);
- Dopo trattamento con esano;
- Dopo estrazione con solvente organico.

In **Tabella 5.20** sono riportati i risultati del recupero calcolato ad ogni fase del processo estrattivo.

Tabella 5.20 - Recupero % determinato ad ogni fase del processo di estrazione (n=3)

<i>Fase del processo di estrazione</i>	<i>Recupero % Media±DS</i>
<u>STEP 1</u>	
1 h di agitazione	100.5±2.9
<u>STEP 2</u>	
acidificazione	96.8±1.3
<u>STEP 3</u>	
delipidizzazione con esano	103.7±2.6
<u>STEP 4</u>	
estrazione con etilacetato	58.8±1.5
estrazione con dietilere:etilacetato	19.6±0.2
Estrazione con cloroformio	88.8±4.1

Come illustrato in **Tabella 5.20**, gli step iniziali (Step 1-3) non incidono sulla concentrazione dell'acido ferulico, in quanto il recupero percentuale è compreso tra $96.8\pm 1.3\%$ e $103.7\pm 2.6\%$. Il passaggio limitante è rappresentato dall'estrazione con solvente organico (step 4), dopo la quale il recupero scende a $58.8\pm 1.5\%$ per l'etilacetato e 19.6 ± 0.2 per la miscela dietilere:etilacetato. Il cloroformio risulta il solvente più idoneo per l'estrazione degli acidi fenolici, consentendo un recupero percentuale pari al $88.84\pm 4.08\%$. Considerando i risultati ottenuti dalle prove di recupero, il cloroformio è stato selezione come solvente estraente per le successive analisi.

5.5.2 Analisi dei campioni

Il metodo sviluppato in questo lavoro di tesi è stato applicato per il dosaggio quantitativo degli acidi fenolici contenuti nelle diverse varietà di mais incluse nello studio. Le analisi sono state condotte sia sulla frazione solubile sia sulla frazione insolubile.

• Polifenoli solubili

Al fine di valutare il contributo degli acidi fenolici al contenuto di polifenoli solubili, sono stati analizzati i campioni ottenuti dall'estrazione in miscela idroalcolica.

A titolo d'esempio, nella **Figura 5.28**, viene illustrato il cromatogramma relativo ad uno dei campioni analizzati (mais Scoppio, varietà gialla) a confronto con quelli dei tre principali standard di acidi fenolici considerati nello studio (acido vanillico, acido cumarico, acido ferulico).

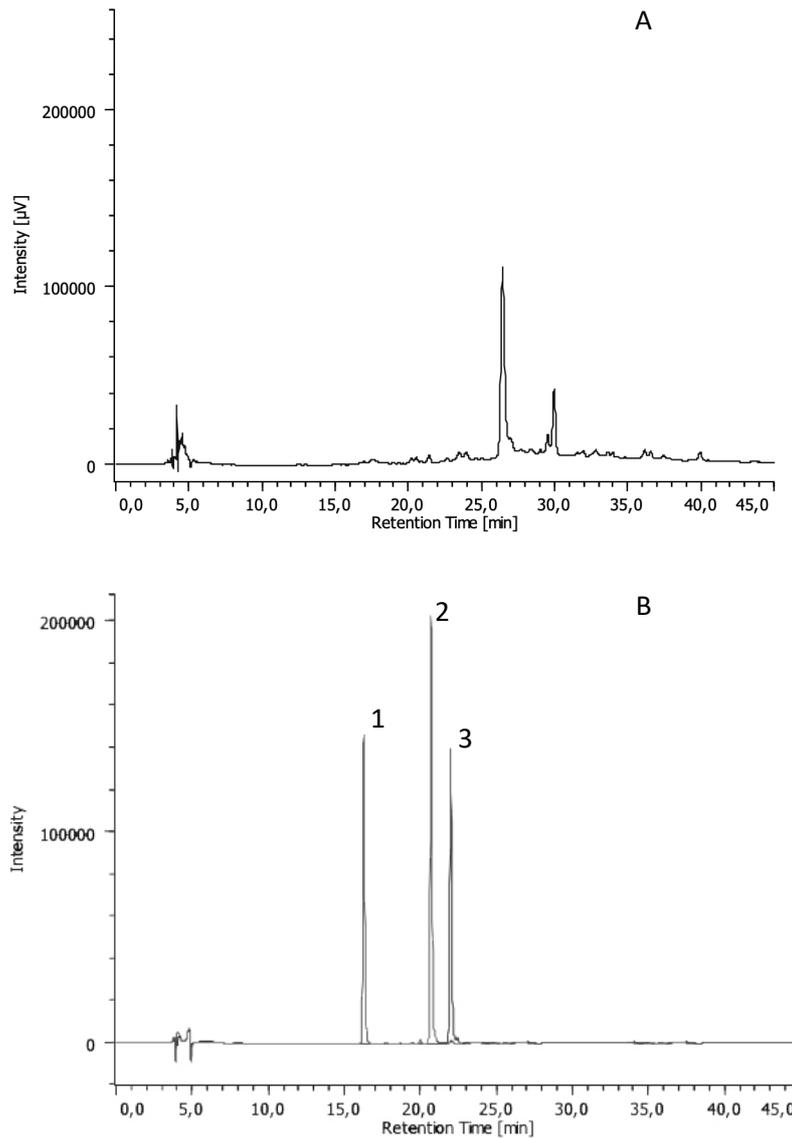


Figura 5.29 – Cromatogrammi relativi al campione di mais Scoppio (A) e agli standard di acidi fenolici alla concentrazione di 20 µg/mL (B)
 1. Acido vanillico 2. Acido cumarico 3. Acido ferulico

Come illustrato in **Figura 5.29** nel campione di mais Scoppio non si osservano picchi rilevanti in corrispondenza degli acidi fenolici (acido vanillico, acido cumarico e acido ferulico). Sono invece rilevabili picchi incogniti aventi un tempo di ritenzione compreso tra 27-31 minuti.

All'interno della frazione solubile gli acidi fenolici non sono presenti solo in forma libera, ma anche in forma coniugata: sono infatti particolarmente abbondanti le forme glicosilate e quelle esterificate [Salinas-Moreno et al., 2017]. Al fine di dosare il contenuto di acidi

fenolici solubili totali, presenti sia in forma coniugata che libera, si è reso necessario applicare una successiva metodica di idrolisi, in ambiente alcalino, prendendo come riferimento il protocollo descritto da Lopez-Martinez e collaboratori [2009].

I campioni, preparati come riportato nel Paragrafo 4.7.1 sono stati iniettati in HPLC-DAD. Nelle **Figure 5.30 -5.32** sono illustrati i cromatogrammi relativi alla frazione solubile dei mais pigmentati Sugary, Polenta, Pop confrontati con i rispettivi mais parentali.

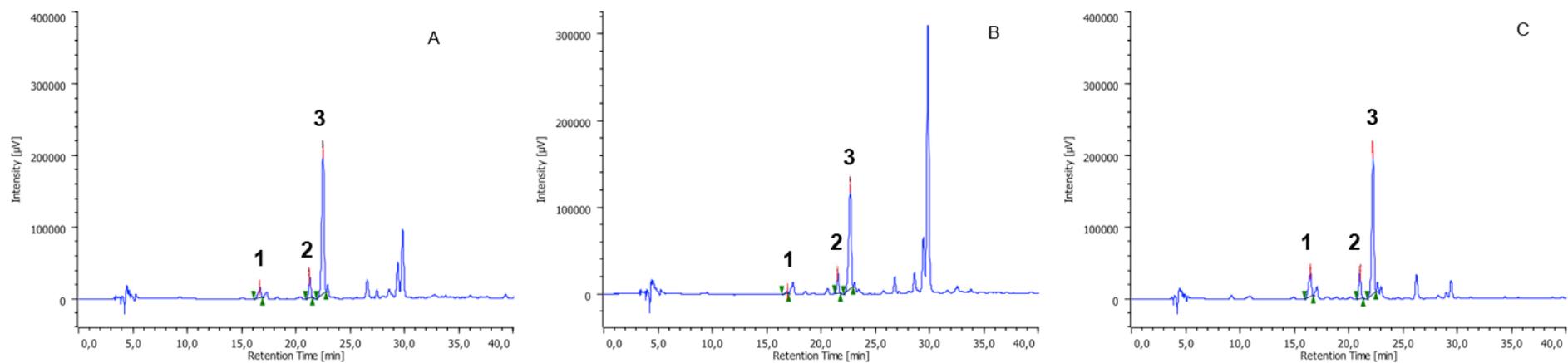


Figura 5.30 - Cromatogrammi relativi alla frazione solubile delle varietà: A) pigmentata Sugary, B) gialla Dolce, C) viola Reduno.
 1. Acido vanillico 2. Acido cumarico 3. Acido ferulico

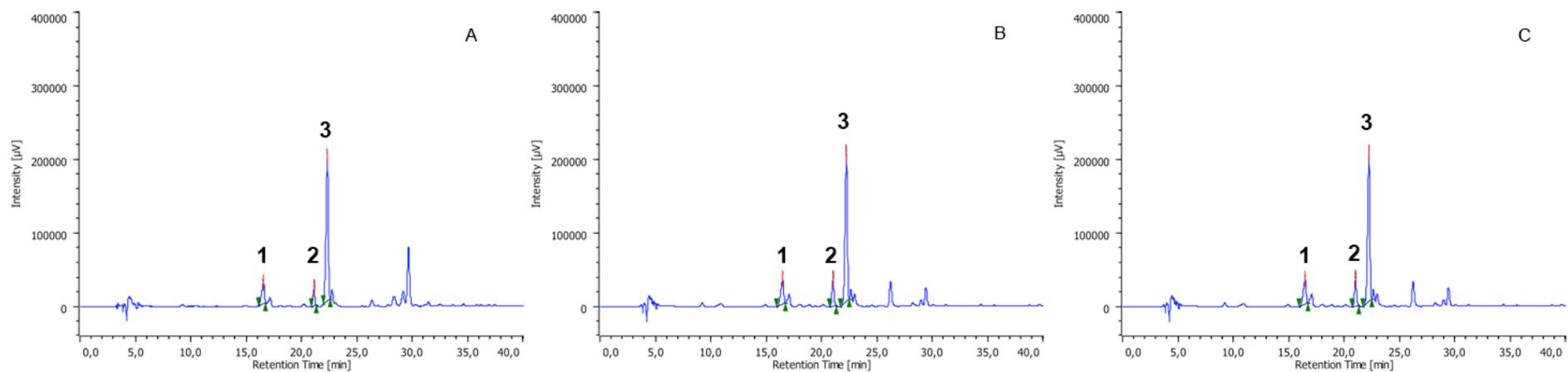


Figura 5.31 - Cromatogrammi relativi alla frazione solubile delle varietà: A) pigmentata Polenta, B) gialla Scagliolo, C) viola Reduno.
 1. Acido vanillico 2. Acido cumarico 3. Acido ferulico

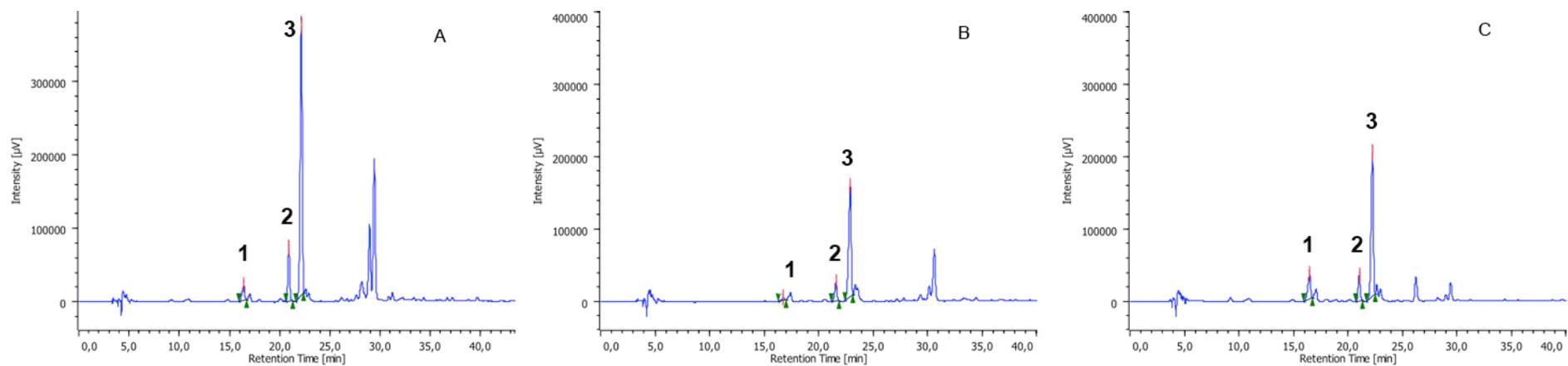


Figura 5.32 - Cromatogrammi relativi alla frazione solubile delle varietà: A) pigmentata Pop, B) gialla Scoppio, C) viola Reduno.
 1. Acido vanillico 2. Acido cumarico 3. Acido ferulico

Come si può osservare nelle **Figure 5.30-5.32**, in tutti i fenotipi di mais sono rilevabili i tre acidi fenolici presi in considerazione (acido vanillico, acido cumarico e acido ferulico). In particolare, l'acido ferulico rappresenta il composto più abbondante. In tutti i campioni di mais, ed in particolare nel mais Dolce, si evidenziano picchi al Tr = 30 minuti la cui natura è ancora oggetto di studio.

Nella **Tabella 5.21** sono riportati i risultati relativi alla quantificazione degli acidi fenolici in ciascuna varietà di mais.

Tabella 5.21 - Quantificazione acidi fenolici nelle diverse varietà di mais incluse nello studio (n=3)

Campione	Acido vanillico µg/g (media±DS)	Acido cumarico µg/g (media±DS)	Acido ferulico µg/g (media±DS)	Acidi fenolici totali µg/g (media±DS)
Mais viola				
Reduno	47.5±1.2	13.3±0.1	164.2±4.7	225.0±6.9
Mais gialli				
Dolce	2.3±0.4	10.1±0.7	116.4±6.0	128.8±7.0
Scagliolo	4.2±1.2	7.0± 0.4	65.8±8.3	76.9±7.5
Scoppio	7.9±0.3	12.6± 0.02	168.1±0.04	188.6±0.2
Mais pigmentati				
Sugary	20.5±1.4	16.2±0.8	182.5±8.3	219.2±8.9
Polenta	41.6±1.6	9.0±1.1	163.0±9.8	213.6±12.5
Pop	31.5±0.6	30.5±1.7	304.1±7.0	366.0±9.3

Nella **Figura 5.33** è rappresentato graficamente il contenuto totale di acidi fenolici nella frazione solubile delle diverse varietà di mais e i risultati delle rispettive analisi statistiche. Ciascun mais pigmentato è stato confrontato con le rispettive varietà parentali.

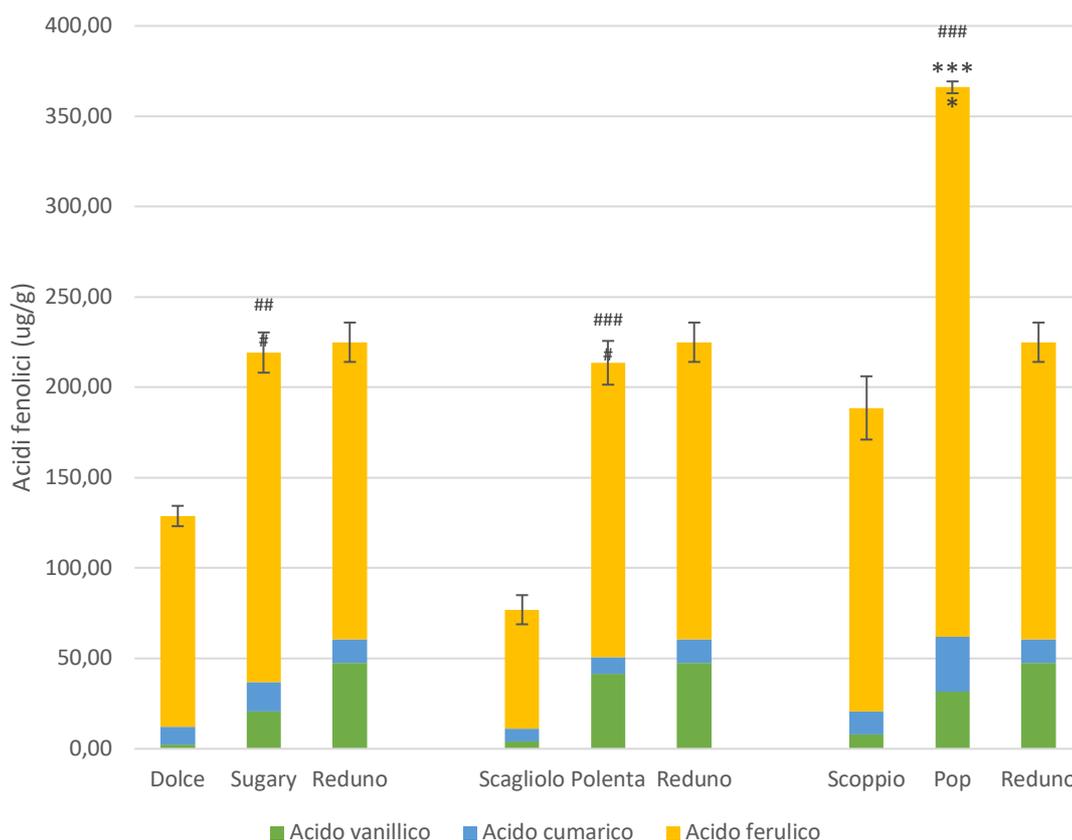


Figura 5.33 - Contenuto di acidi fenolici nella frazione solubile dei diversi campioni di mais inclusi nello studio. Ciascun mais pigmentato (Sugary, Polenta, Pop) è stato confrontato con le rispettive varietà parentali: # mais pigmentato vs mais giallo, * mais pigmentato vs mais viola (***,#### = $p < 0.0001$)

Come si può osservare dalla **Tabella 5.21** e dalla **Figura 5.33**, l'acido ferulico rappresenta l'acido fenolico più abbondante in tutti i campioni di mais. Il suo contenuto percentuale, rispetto agli acidi fenolici solubili totali, varia dal 73.0% per il mais Reduno al 90.4% per il mais Dolce.

Le varietà pigmentate Sugary, Polenta e Pop mostrano un incremento statisticamente significativo, in termini di acidi fenolici solubili, rispetto alle corrispondenti varietà gialle parentali, mais Dolce, Scagliolo e Scoppio, rispettivamente.

È interessante notare come l'incremento dei polifenoli solubili nelle varietà pigmentate rispetto alle gialle, registrato anche con le analisi spettrofotometriche (Paragrafo 5.1.2), non sia da ricondurre alla sola presenza degli antociani ma anche a un contributo degli acidi fenolici.

La varietà Pop mostra un incremento significativo degli acidi fenolici, rispetto ad entrambi i mais parentali (Scoppio e Reduno).

Gli acidi fenolici dosati nei diversi campioni di mais ricadono in un intervallo di concentrazioni compreso tra $76.9 \pm 7.5 \mu\text{g/g}$ (mais Scagliolo) e $366.0 \pm 9.3 \mu\text{g/g}$ (mais Pop), e l'acido ferulico risulta compreso tra $65.8 \pm 8.3 \mu\text{g/g}$ (mais Scagliolo) e $304.1 \pm 7.0 \mu\text{g/g}$ (mais Pop). Grazie a tali dati è evidente (ma anche attesa) come sia presente una discreta variabilità circa il contenuto di acidi fenolici all'interno dei diversi campioni analizzati.

I risultati ottenuti concordano con quanto riportato in letteratura; Slađana Žilic e collaboratori [2012] indicano un contenuto di acido ferulico solubile (nella forma coniugata) in diverse varietà pigmentate di *Zea mays* compreso tra $53.1 \pm 15.7 \mu\text{g/g}$ e $483.9 \pm 12.7 \mu\text{g/g}$; mentre l'acido p-cumarico risulta compreso tra $21.7 \pm 0.9 \mu\text{g/g}$ e $119.3 \pm 5.3 \mu\text{g/g}$.

• Polifenoli insolubili

Nel mais i composti fenolici sono principalmente presenti nella forma legata [Adom and Liu, 2002]. Il dosaggio degli acidi fenolici nella frazione insolubile è stato condotto analizzando i campioni, preparati come descritto nel Paragrafo 4.7.1.

Nelle **Figure 5.34–5.36** sono riportati i cromatogrammi relativi alla frazione insolubile dei mais pigmentati Sugary, Polenta, Pop confrontati con i rispettivi mais parentali.

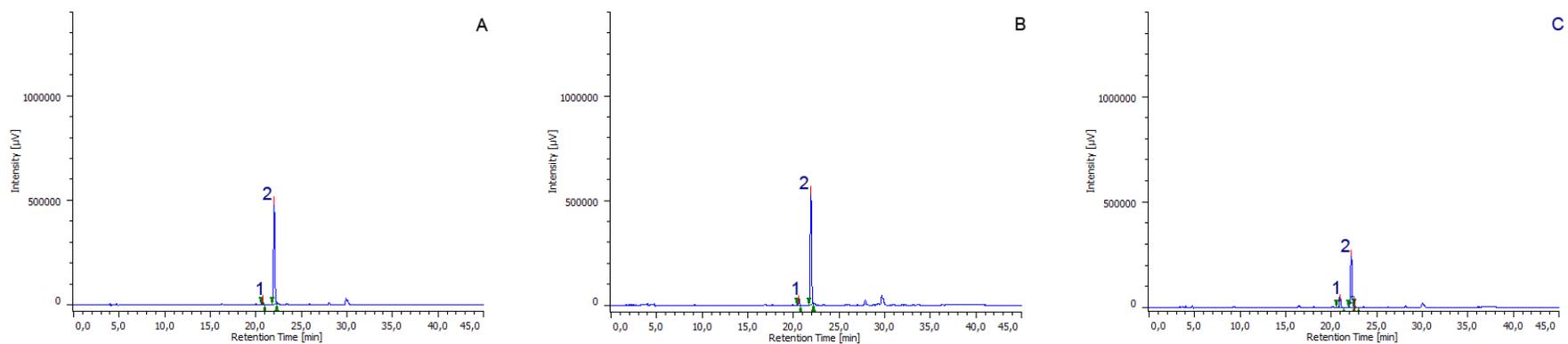


Figura 5.34 - Cromatogrammi relativi alla frazione insolubile dei mais: A) pigmentato Sugary, B) giallo Dolce, C) viola Reduno.
1. Acido cumarico 2. Acido ferulico

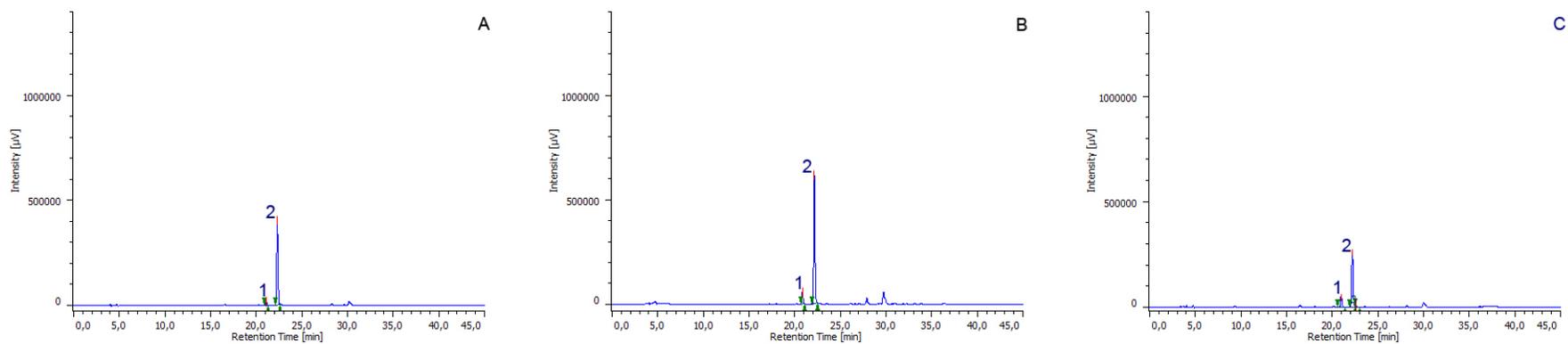


Figura 5.35 - Cromatogrammi relativi alla frazione insolubile dei mais: A) pigmentato Polenta, B) giallo Scagliolo, C) viola Reduno.
1. Acido cumarico 2. Acido ferulico

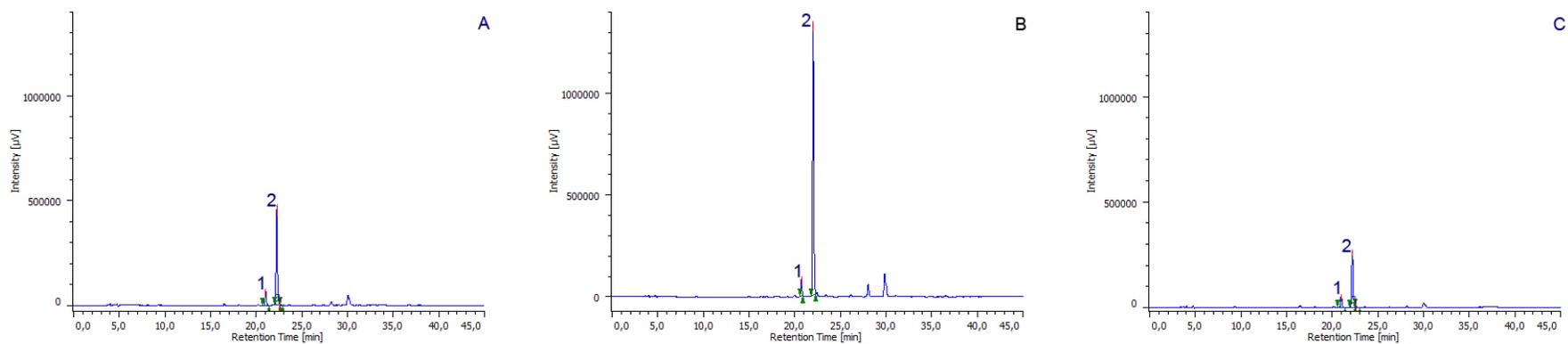


Figura 5.36 - Cromatogrammi relativi alla frazione insolubile dei mais: A) pigmentato Pop, B) giallo Scoppio, C) viola Reduno.
 1. Acido cumarico 2. Acido ferulico

Come è possibile osservare nelle **Figure 5.34-5.36**, nella frazione insolubile di tutti i fenotipi di mais sono rilevabili due acidi fenolici: l'acido cumarico e l'acido ferulico. Anche in questo caso, l'acido ferulico rappresenta il composto più abbondante.

Nella **Tabella 5.22** sono riportati i risultati relativi alla quantificazione degli acidi fenolici in ciascun fenotipo di mais.

Tabella 5.22 - Quantificazione acidi fenolici nella frazione insolubile dei diversi campioni di mais inclusi nello studio (n=3)

Campione	Acido cumarico µg/g (media±DS)	Acido ferulico µg/g (media±DS)	Acidi fenolici totali µg/g (media±DS)
Mais viola			
Reduno	101.8±9.0	918.5±90.2	1020.3±99.2
Mais gialli			
Dolce	72.6±3.9	1653.1±67.5	1725.7±70.6
Scagliolo	91.9±9.7	1764.5±64.9	1856.4±73.6
Scoppio	157.0±3.9	4666.7±526.3	4823.7±524.2
Mais pigmentati			
Sugary	56.1±3.9	1597.6±106.8	1653.7±110.5
Polenta	45.5±2.2	1134.6±118.2	1180.1±116.1
Pop	106.9±3.9	1381.2±34.7	1488.1±38.4

La **Figura 5.37** illustra il contenuto totale di acidi fenolici nella frazione insolubile dei diversi fenotipi di mais e i risultati delle rispettive analisi statistiche. Ciascun mais pigmentato è stato confrontato con le rispettive varietà parentali.

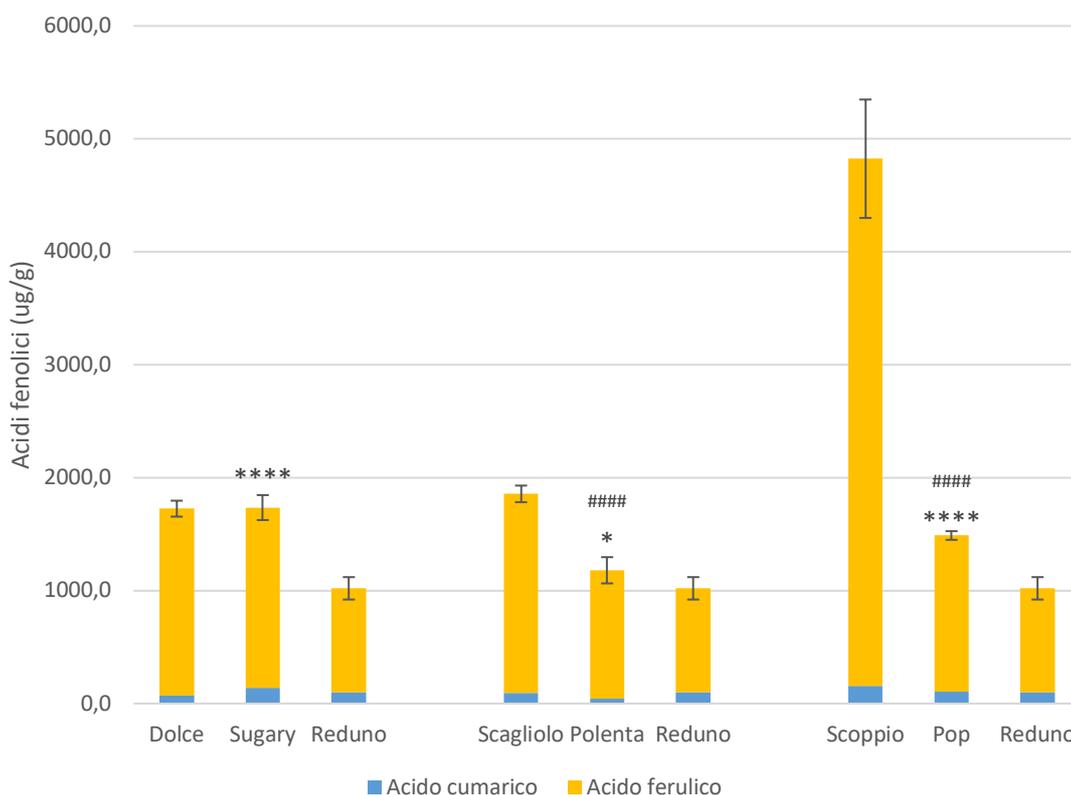


Figura 5.37 - Contenuto di acidi fenolici nella frazione insolubile dei diversi campioni di mais inclusi nello studio. Ciascun mais pigmentato (Sugary, Polenta, Pop) è stato confrontato con le rispettive varietà parentali: # mais pigmentato vs mais giallo, * mais pigmentato vs mais viola (*= $p < 0.05$, ****,#### = $p < 0.0001$)

Come si può osservare dalla **Tabella 5.22** e dalla **Figura 5.37**, l'acido ferulico rappresenta l'acido fenolico più abbondante nella frazione insolubile di tutti i campioni di mais. Tutte le varietà pigmentate mostrano un incremento statisticamente significativo, in termini di acidi fenolici insolubili, rispetto al mais viola Reduno. Ad eccezione del mais Sugary, il contenuto di acidi fenolici insolubili nelle varietà pigmentate risulta tuttavia inferiore rispetto alle rispettive varietà gialle.

Gli acidi fenolici dosati nei diversi campioni di mais ricadono in un intervallo di concentrazioni compreso tra $1020.3 \pm 99.20 \mu\text{g/g}$ (mais Reduno) e $4823.7 \pm 524.24 \mu\text{g/g}$ (mais Scoppio). Grazie a tali dati è evidente come sia presente una discreta variabilità circa il contenuto di acidi fenolici all'interno dei diversi campioni analizzati.

I risultati ottenuti concordano con quanto riportato in letteratura; Slađana Žilic e collaboratori [2012] indicano un contenuto di acido ferulico insolubile, in diverse varietà pigmentate di *Zea mays*, compreso tra $1188.93 \pm 19.61 \mu\text{g/g}$ e $4074.10 \pm 39.94 \mu\text{g/g}$.

5.6 Caratterizzazione antocianine mediante HPLC-MS

Al fine di identificare gli antociani contenuti nei campioni delle diverse varietà di mais, le soluzioni standard di antocianine e i campioni sono stati analizzati mediante la tecnica della spettrometria di massa combinata alla cromatografia liquida.

• 5.6.1 Analisi delle soluzioni standard

Come riportato da numerosi lavori in letteratura, la cianidina-3-*O*-glucoside, la pelargonidina-3-*O*-glucoside e la peonidina-3-*O*-glucoside sono le principali antocianine contenute nei chicchi di mais [Aoki et al., 2000; Abdel-Aal et al, 2006; Cuevas Montilla et al., 2011].

Nelle **Figure 5.38-5.40** sono riportati gli spettri di massa relativi agli standard di cianidina-3-*O*-glucoside, pelargonidina-3-*O*-glucoside e peonidina-3-*O*-glucoside, rispettivamente.

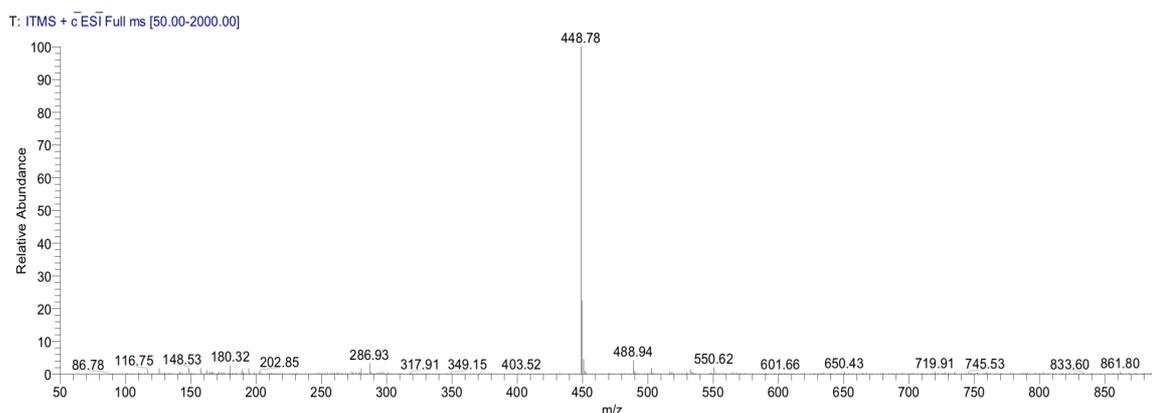


Figura 5.38 - Spettro di massa della cianidina-3-*O*-glucoside

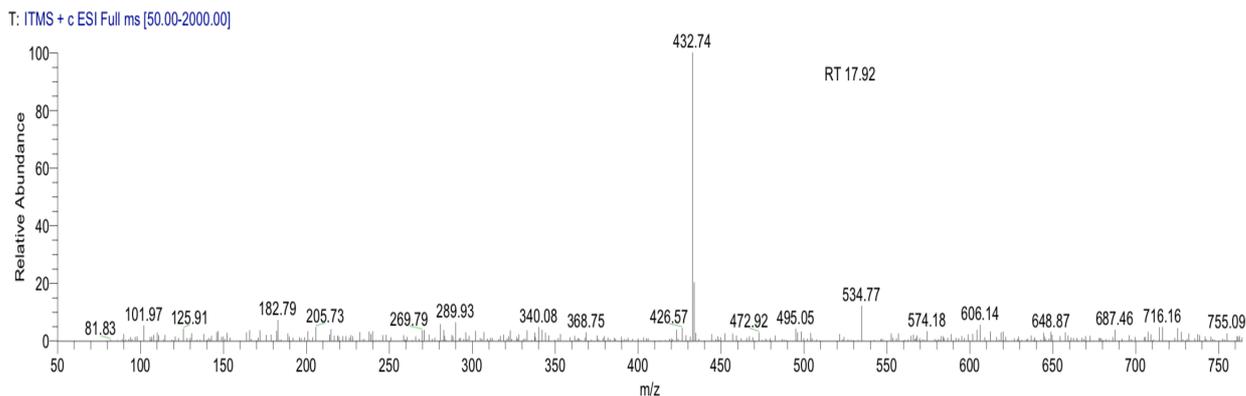


Figura 5.39 - Spettro di massa della pelargonidina-3-*O*-glucoside

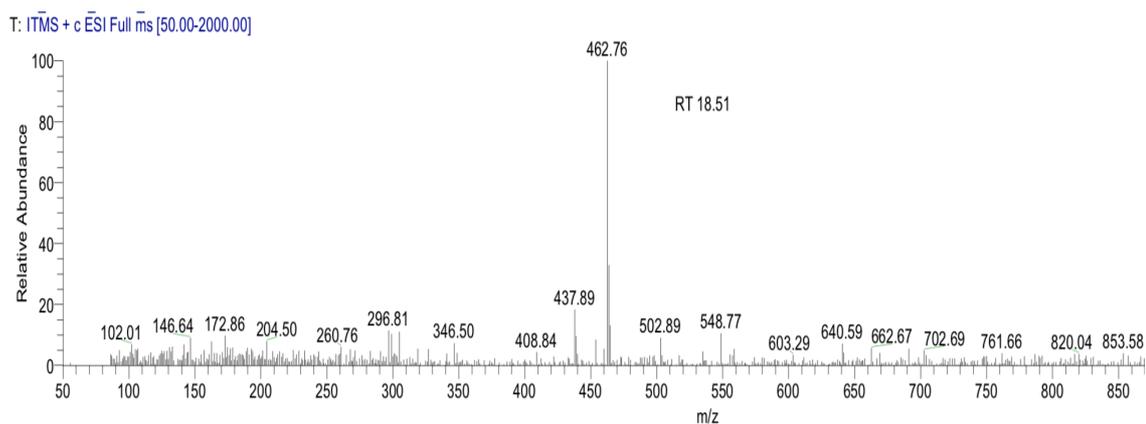


Figura 5.40 - Spettro di massa della peonidina-3-*O*-glucoside

I rapporti m/z delle antocianine standard e i relativi tempi di ritenzione (Tr) sono elencati in **Tabella 5.23**.

Tabella 5.23 - Rapporti m/z delle antocianine standard

Analita	Tr (min)	m/z
Cianidina-3- <i>O</i> -glucoside	16.52±0.10	449
Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucoside	17.76±0.01	433
Peonidina-3- <i>O</i> -glucoside	18.54±0.12	463

I dati ottenuti sono in accordo con quanto riportato in letteratura [Cuevas Montilla et al., 2011].

5.6.2 Analisi dei campioni

I campioni di mais pigmentati sono stati analizzati mediante la tecnica HPLC-MS al fine di identificare le antocianine in essi contenute.

Nelle **Figure 5.41, 5.42, 5.43 e 5.44** sono riportati i cromatogrammi in TIC (*Total Ion Chromatography*) e in SIM (*Single Ion Monitoring*) relativi ai campioni di mais Reduno, Polenta, Pop e Sugary, rispettivamente.

Nelle **Tabelle 5.24, 5.25, 5.26 e 5.27** sono elencati i tempi di ritenzione e i gli ioni molecolari (m/z) dei composti rilevati nel mais viola Reduno, e nei mais pigmentati Polenta, Pop e Sugary, rispettivamente. L'identificazione dei composti è stata condotta mediante confronto con gli standard di riferimento o, quando non disponibili, sulla base dei dati riportati in letteratura [Yang and Zhai, 2010; Cuevas Montilla et al., 2011; Žilić et al., 2012].

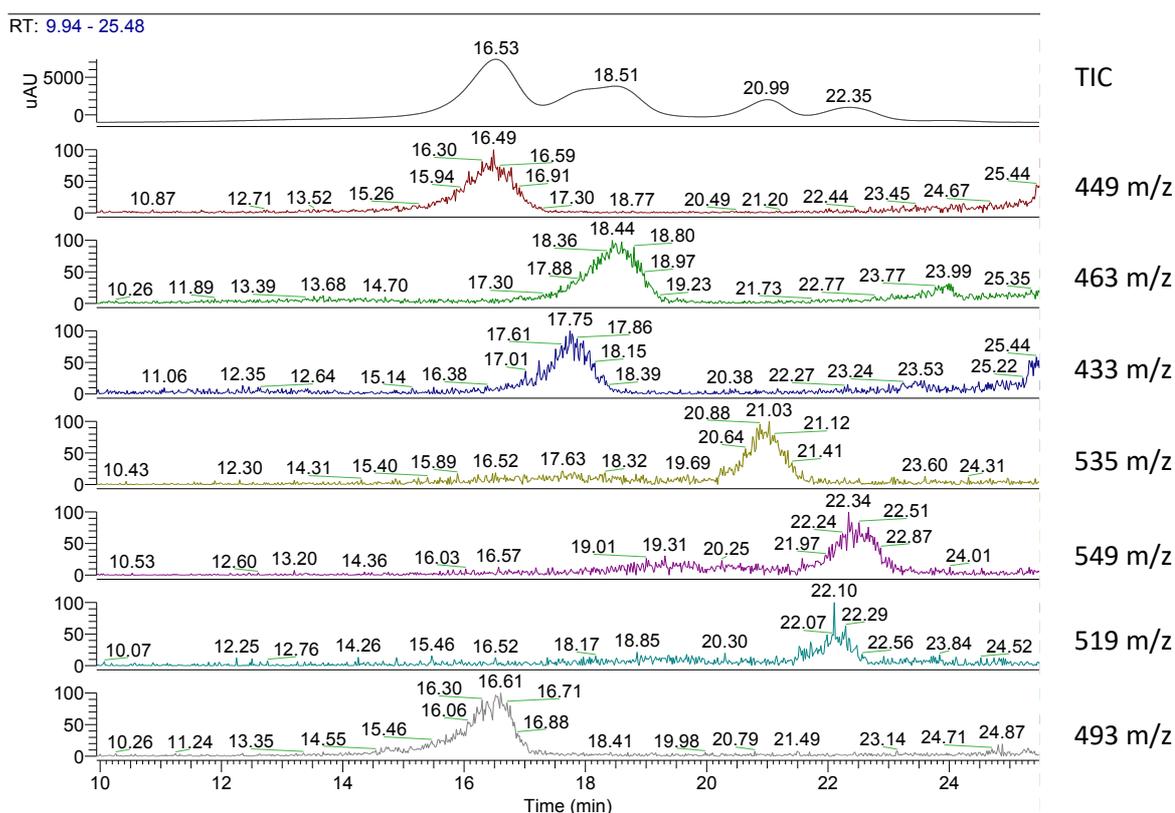


Figura 5.41 - Cromatogramma del campione Reduno in TIC e degli ioni molecolari in esso rilevati

Tabella 5.24 - Composti identificati nel campione di mais viola Reduno

Tr	m/z	Analita
16.49	449	Cianidina-3- <i>O</i> -glucoside
16.61	493	Malvidina-3- <i>O</i> -glucoside*
17.75	433	Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucoside
18.44	463	Peonidina-3- <i>O</i> -glucoside
21.03	535	Cianidina-3-(6-malonilglucoside)*
22.10	519	Pelargonidina-3-(6-malonilglucoside)*
22.34	549	Peonidina-3-(6-malonilglucoside)*

* analiti identificati sulla base dei dati riportati in letteratura

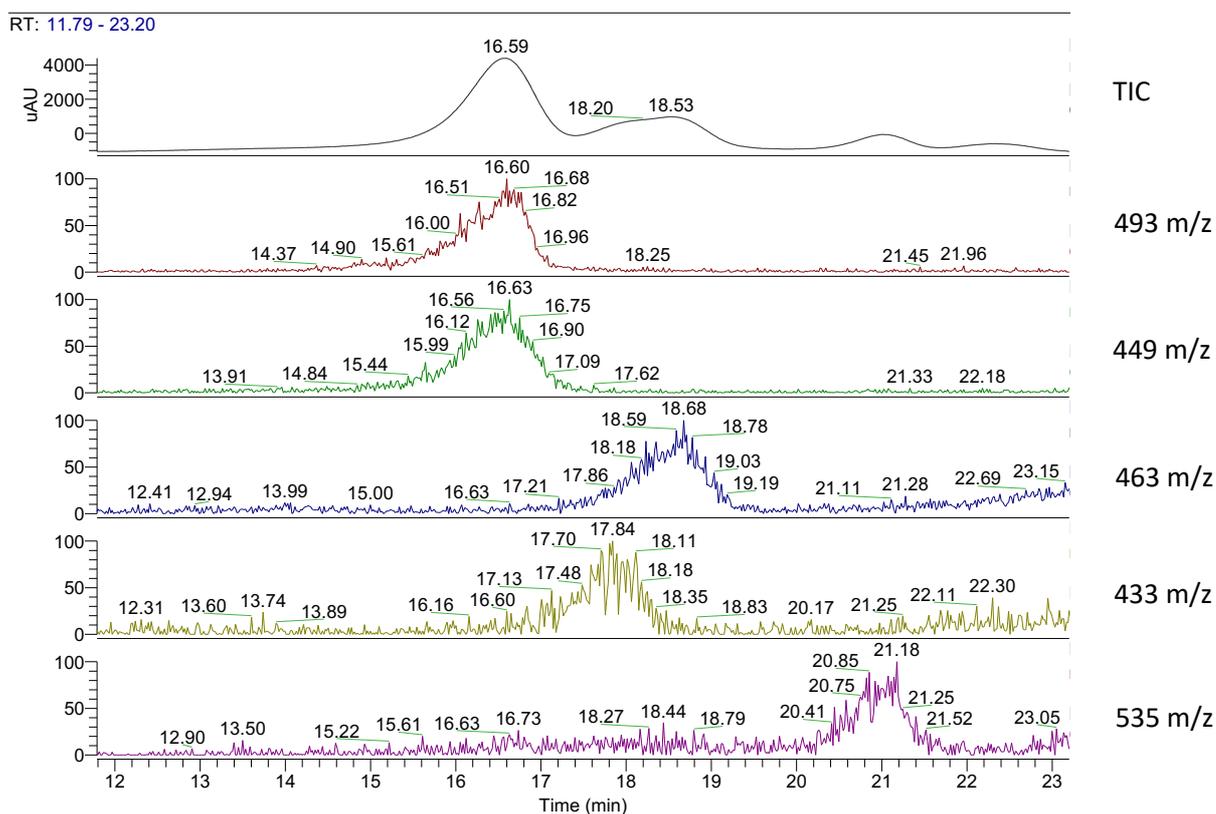


Figura 5.42 - Cromatogramma del campione Polenta in TIC e degli ioni molecolari in esso rilevati

Tabella 5.25 - Composti identificati nel campione di mais pigmentato Polenta

Tr	m/z	Analita
16.60	493	Malvidina-3- <i>O</i> -glucoside*
16.63	449	Cianidina-3- <i>O</i> -glucoside
17.84	433	Pelargonidina-3- <i>O</i> -gluco
18.68	463	Peonidina-3- <i>O</i> -glucoside
21.18	535	Cianidina-3-(6-malonilglucoside)*

* analiti identificati sulla base dei dati riportati in letteratura

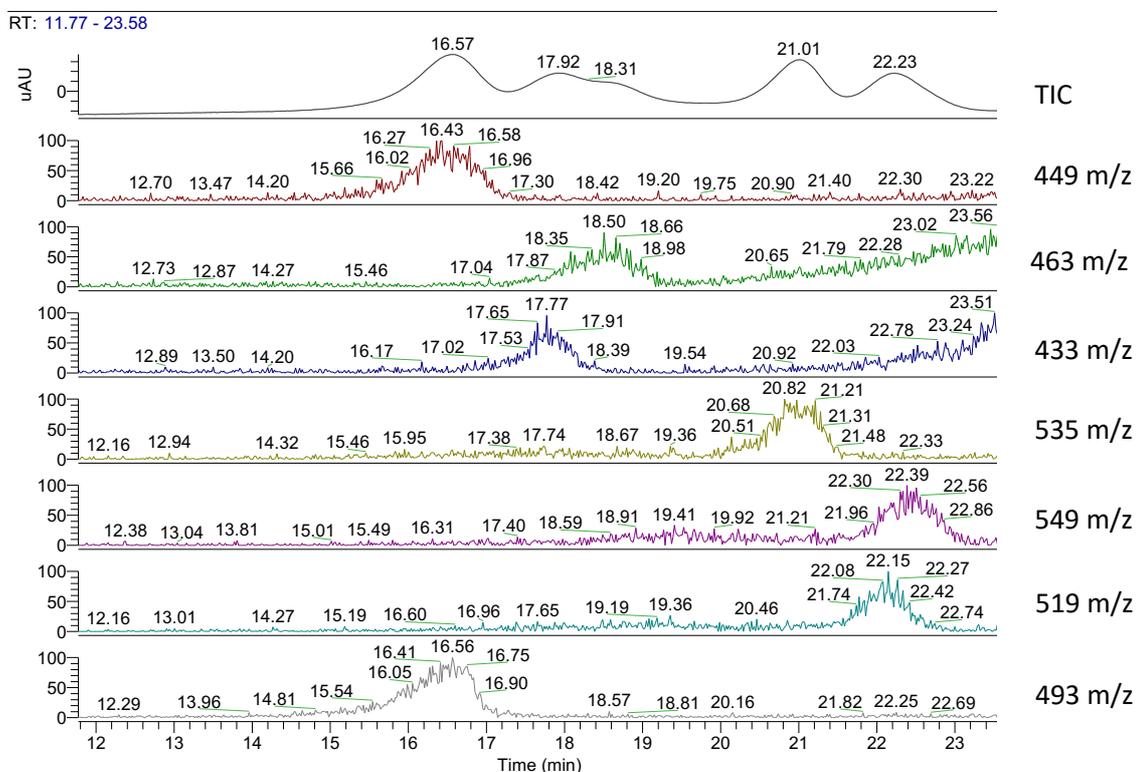


Figura 5.43 - Cromatogramma del campione Pop in TIC e degli ioni molecolari in esso rilevati

Tabella 5.26 - Composti identificati nel campione di mais pigmentato Pop

Tr	m/z	Analita
16.43	449	Cianidina-3- <i>O</i> -glucoside
16.56	493	Malvidina-3- <i>O</i> -glucoside*
17.77	433	Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucoside
18.50	463	Peonidina-3- <i>O</i> -glucoside
20.82	535	Cianidina-3-(6-malonilglucoside)*
22.15	549	Peonidina-3-(6-malonilglucoside)*
22.39	519	Pelargonidina-3-(6-malonilglucoside)*

* analiti identificati sulla base dei dati riportati in letteratura

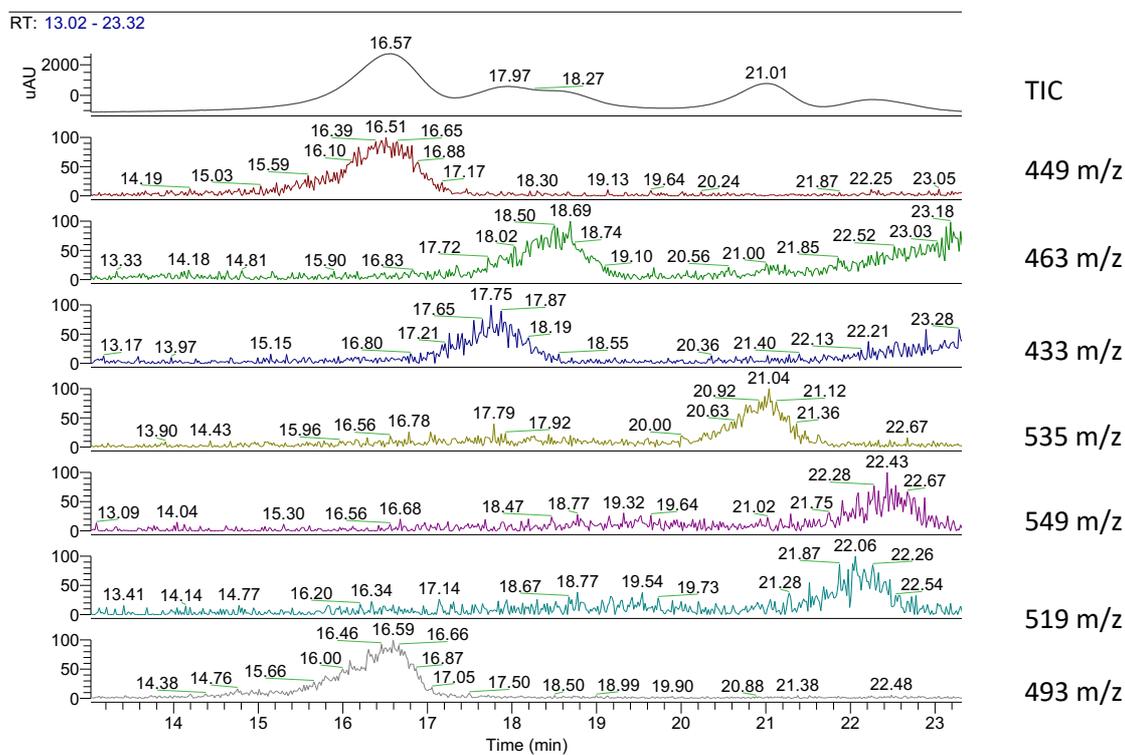


Figura 5.44 - Cromatogramma del campione Sugary in TIC e degli ioni molecolari in esso rilevati

Tabella 5.27 – Composti identificati nel campione di mais pigmentato Sugary

Tr	m/z	Analita
16.51	449	Cianidina-3- <i>O</i> -glucoside
16.59	493	Malvidina-3- <i>O</i> -glucoside*
17.75	433	Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucoside
18.50	463	Peonidina-3- <i>O</i> -glucoside
21.04	535	Cianidina-3-(6-malonilglucoside)*
22.06	549	Peonidina-3-(6-malonilglucoside)*
22.43	519	Pelargonidina-3-(6-malonilglucoside)*

* analiti identificati sulla base dei dati riportati in letteratura

In numerosi studi i principali antociani identificati nel mais pigmentato sono i glicosidi della cianidina, pelargonidina e peonidina [Aoky et al., 2000; Abdel-Aal et al., 2006; Cuevas Montilla et al., 2011; Žilić et al., 2012] e i rispettivi malonil derivati [Harborne and Self, 1997; Fossen et al., 2001; Pascual-Teresa et al., 2002; Yang et al., 2010]. Le analisi condotte in questo lavoro di tesi sono in accordo con quanto riportato in letteratura, dove i principali composti identificati nei mais pigmentati risultano i seguenti: Cianidina-3-*O*-glucoside, Pelargonidina-3-*O*-glucoside, Peonidina-3-*O*-glucoside, Cianidina-3-(6-malonilglucoside), Peonidina-3-(6-malonilglucoside), Pelargonidina-3-(6-malonilglucoside). L'unica eccezione è rappresentata dal mais pigmentato Polenta, in cui non sono stati rilevati la Peonidina-3-(6-malonilglucoside) e la Pelargonidina-3-(6-malonilglucoside). In tutti i campioni di mais è stato inoltre rilevato un composto avente m/z pari a 493 identificato, sulla base dei dati riportati in letteratura, come malvidina-3-*O*-glucoside [Fanali et al., 2011]. La presenza di questa antocianina nei mais pigmentati non viene frequentemente riportata in letteratura, tuttavia Cortes e collaboratori (2006) l'hanno identificata in un campione di mais blu mediante analisi HPLC-DAD.

5.7 Quantificazione antocianine mediante HPLC-DAD

Il metodo analitico sviluppato per il dosaggio delle antocianine nei campioni di mais pigmentati è stato validato secondo le linee guida dell'FDA [FDA, 2018].

In **Figura 5.45** è riportato un cromatogramma relativo all'iniezione di una miscela di antocianine standard (cianidina-3-*O*-glucoside $T_r = 16.88 \pm 0.15$ min, pelargonidina-3-*O*-glucoside $T_r = 18.58 \pm 0.16$ min e peonidina-3-*O*-glucoside $T_r = 19.67 \pm 0.16$) alla concentrazione di 5 $\mu\text{g/mL}$.

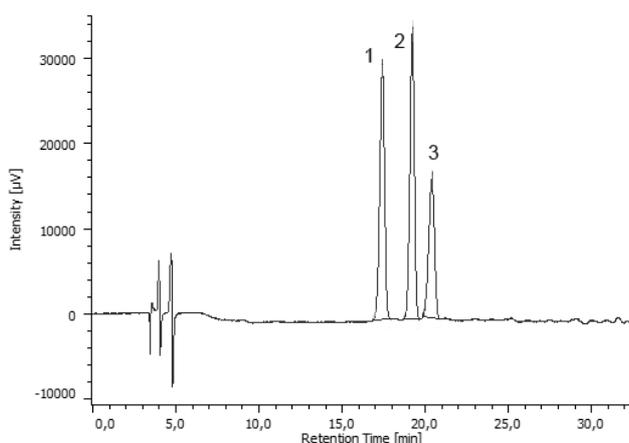


Figura 5.45 - Cromatogramma relativo all'iniezione di una miscela di antocianine standard (5 $\mu\text{g/mL}$).

1) cianidina-3-*O*-glucoside, 2) pelargonidina-3-*O*-glucoside, 3) peonidina-3-*O*-glucoside

5.7.1 Validazione del metodo analitico

• Idoneità del sistema

Il sistema cromatografico utilizzato per il dosaggio degli antociani è stato validato applicando un test di idoneità i cui risultati sono riportati in **Tabella 5.28**. I parametri considerati sono: tempo di ritenzione (T_r), fattore di ritenzione (K), fattore di separazione (α), fattore di simmetria e numero di piatti teorici (N).

Tabella 5.28 - Risultati del test di idoneità di sistema (n=3)

Composto	Tr (Media ± DS)	K^a (Media ± DS)	α^b (Media ± DS)	Fattore di simmetria (Media ± DS)	N° di piatti teorici (Media ± DS)
Cianidina-3-O-glucoside	16.88 ± 0.15	2.76	1.137	0.90	15048
Pelargonidina-3-O-glucoside	18.58 ± 0.16	3.14	1.078	0.92	23992
Peonidina-3-O-glucoside	19.67 ± 0.16	3.38	1.127	0.90	16164

^(a) Fattore di ritenzione $K = (Tr - T_0)/T_0$ dove Tr e T₀ sono rispettivamente il tempo di ritenzione dei componenti del campione e del solvente .

^(b) Fattore di separazione (α) = $(Tr_2 - T_0)/(Tr_1 - T_0)$, dove Tr₁ e Tr₂ sono i tempi di ritenzione di due picchi vicini.

Dai dati riportati in **Tabella 5.28** si osserva che il sistema cromatografico utilizzato è risultato idoneo per la separazione e quantificazione degli analiti d'interesse:

1. I picchi cromatografici presentano un'elevata riproducibilità nei tempi di ritenzione (CV% compreso tra 0.79 e 0.87%);
2. il fattore di ritenzione (K) risulta compreso tra 2.76 e 3.38 e le migliori prestazioni, in termini di efficienza e risoluzione si ottengono quando K è compreso tra 1.5 e 5 [Cozzi et al., 2001].
3. Il fattore di simmetria (vicino ad 1) per ciascuna cianidina e l'elevato numero di piatti teorici confermano l'idoneità del sistema.

• Linearità

La linearità del metodo analitico è stata valutata per ciascuna antocianina mediante la costruzione di una retta di calibrazione. Nelle **Tabelle 5.29, 5.30 e 5.31** sono riportati i dati utilizzati per la costruzione delle rette di calibrazione per la cianidina-3-O-glucoside, la pelargonidina-3-O-glucoside e la peonidina-3-O-glucoside, rispettivamente; le quali sono illustrate nelle **Figure 5.46, 5.47 e 5.48**.

Tabella 5.29 - Soluzioni standard di cianidina-3-*O*-glucoside e relative aree cromatografiche

Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	Area Media \pm DS (n=3)
0.5	54339 \pm 1064
1	115032 \pm 3201
2.5	322051 \pm 2915
5	581518 \pm 25592
10	1141324 \pm 42623

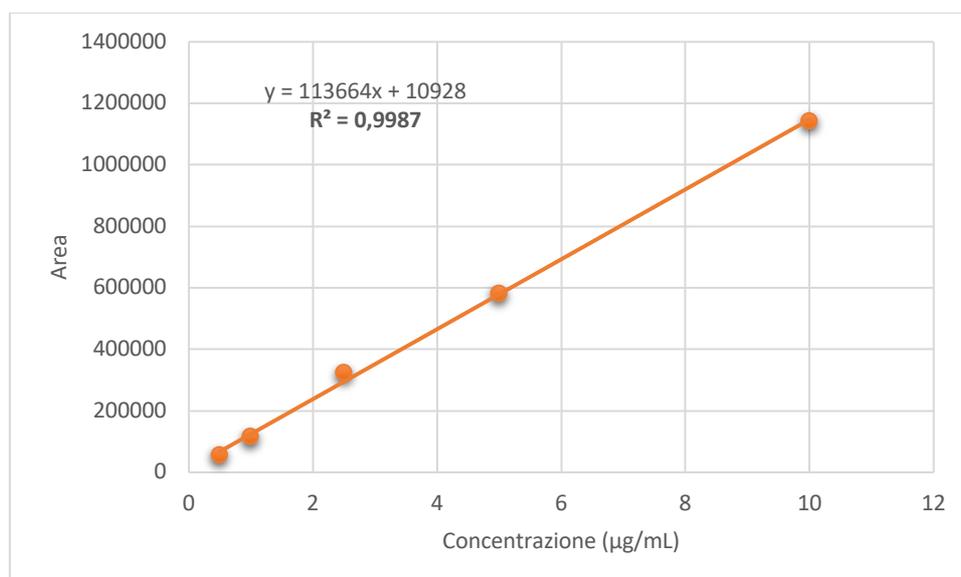


Figura 5.46 – Retta di calibrazione per il dosaggio della cianidina-3-*O*-glucoside

Tabella 5.30 - Soluzioni standard di pelargonidina-3-O-glucoside e relative aree cromatografiche

Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	Area Media\pmDS (n=3)
0.5	56774 \pm 1518
1	118571 \pm 2538
2.5	369290 \pm 2770
5	589206 \pm 73281
10	1207354 \pm 22454

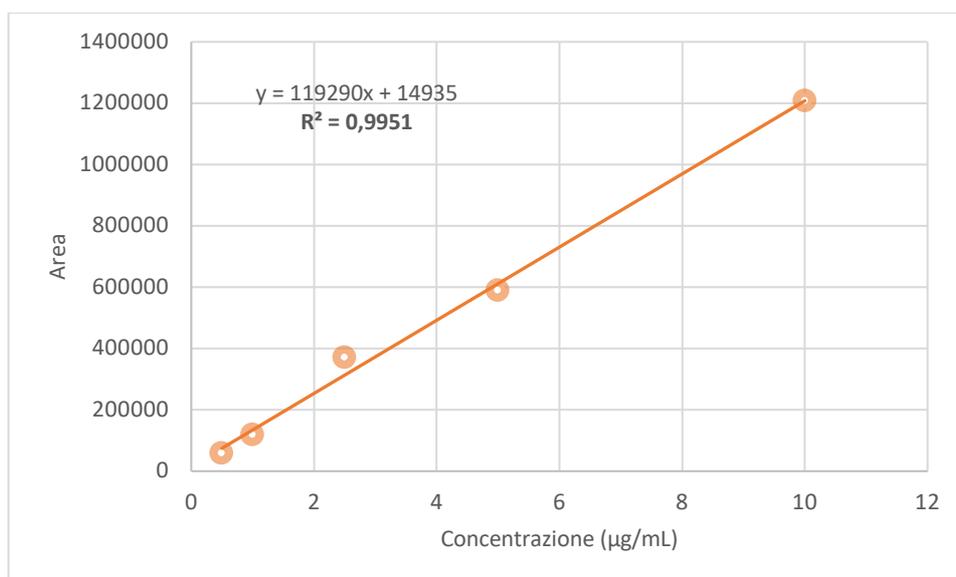


Figura 5.47 - Retta di calibrazione per il dosaggio della pelargonidina-3-O-glucoside

Tabella 5.31 - Soluzioni standard di peonidina-3-*O*-glucoside e relative aree cromatografiche

Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	Area Media \pm DS (n=3)
0.5	37958 \pm 1189
1	74004 \pm 4697
2.5	229162 \pm 4818
5	386972 \pm 8910
10	811863 \pm 12554

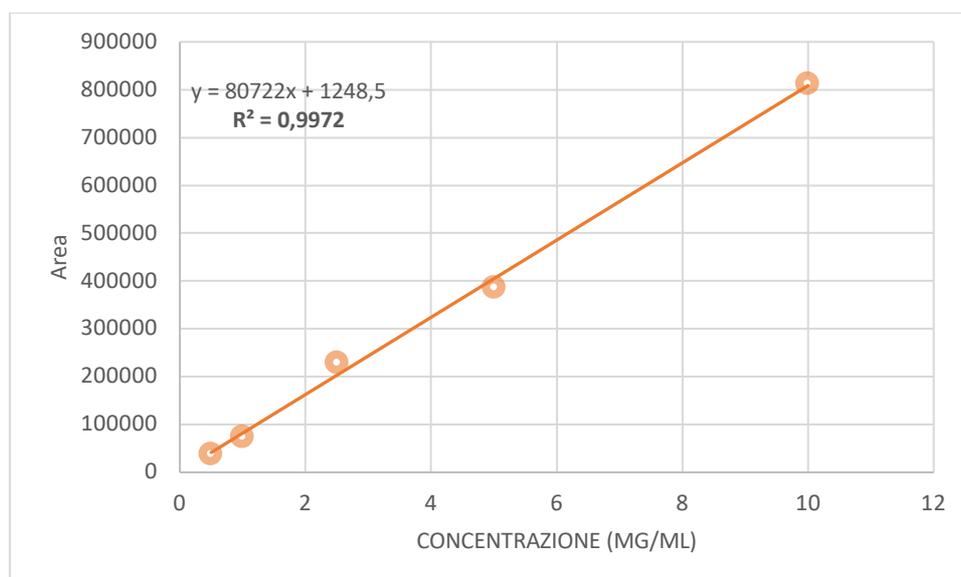


Figura 5.48 - Retta di calibrazione per il dosaggio della peonidina-3-*O*-glucoside

Come si può osservare dalle **Figure 5.46-5.48**, il coefficiente di correlazione R^2 superiore a 0.98 (0.9987, 0.9951 e 0.9972 per la cianidina-3-*O*-glucoside, la pelargonidina-3-*O*-glucoside e la peonidina-3-*O*-glucoside, rispettivamente) indica una risposta lineare ottimale nell'intervallo di concentrazioni considerate.

• Sensibilità

Anche nel caso delle antocianine, la sensibilità del metodo analitico è stata valutata mediante due parametri: il Limite di Rilevabilità (LOD) e il Limite di Quantificazione (LOQ).

In **Tabella 5.32** sono riportati i valori di LOD e LOQ per le antocianine incluse nello studio, espressi in $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{g/g}$ di campione.

Tabella 5.32 - Valori di LOD e LOQ per le antocianine espressi in $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{g/g}$ di campione

Analita	LOD		LOQ	
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/g}$
cianidina-3- <i>O</i> -glucoside	0.04	0.86	0.15	3.00
pelargonidina-3- <i>O</i> -glucoside	0.07	1.49	0.25	5.00
peonidina-3- <i>O</i> -glucoside	0.14	2.79	0.50	10.00

• Precisione

In **Tabella 5.33** sono riportati i dati relativi alla precisione del metodo analitico, espressi come coefficiente di variazione percentuale (CV%). La precisione, valutata con un minimo di cinque iniezioni per concentrazione, viene distinta in precisione *within-day* (valutata durante una singola seduta analitica) e *between-day* (valutata in giorni differenti).

Tabella 5.33 – Dati relativi alla precisione *within-day* e *between-day*

Analita	Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	Precisione	Precisione
		<i>within-day</i> (CV%)	<i>between-day</i> (CV%)
Cianidina-3- <i>O</i> -glucoside	1	3.02	8.73
	2.5	2.15	4.18
	5	2.16	4.45
Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucoside	1	2.65	7.69
	2.5	2.17	2.65
	5	1.37	3.96
Peonidina-3- <i>O</i> -glucoside	1	4.84	7.04
	2.5	3.44	4.56
	5	1.47	0.91

Come si può osservare in **Tabella 5.33**, la precisione *within-day* e *between-day* non supera l'8.73% per la cianidina-3-*O*-glucoside, il 7.69% per la pelargonidina-3-*O*-glucoside e il 7.04% per la peonidina-3-*O*-glucoside e rientra nei criteri richiesti dalla FDA (CV<15%).

• Stabilità

La stabilità delle antocianine è stata valutata a breve (24 h, T ambiente) e a lungo termine (20 giorni, -20°C), analizzando soluzioni standard a tre differenti concentrazioni (1, 2.5, 5 µg/mL). I risultati, espressi come variazione percentuale, sono riportati in **Tabella 5.34**.

Tabella 5.34 - Risultati della stabilità delle antocianine a breve e a lungo termine, espressi come variazione percentuale

Analita	Concentrazione iniziale (µg/mL)	Stabilità a breve termine	Stabilità a lungo termine
		24h, T _{amb} Variazione % (media±DS)	20gg, -20°C Variazione % (media±DS)
Cianidina-3- <i>O</i> -glucoside	1	59.7±11.5	97.2±2.5
	2.5	95.1±1.0	95.3±2.3
	5	91.5±0.3	104.4±1.4
Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucoside	1	90.4±8.0	94.9±2.3
	2.5	101.8±0.3	94.9±1.5
	5	99.3±0.3	107.5±1.1
Peonidina-3- <i>O</i> -glucoside	1	91.8±5.2	94.6±4.3
	2.5	99.9±1.3	92.5±2.9
	5	97.5±1.6	102.8±1.0

Le prove effettuate a lungo termine hanno confermato la stabilità degli analiti, infatti la variazione percentuale, valutata dopo 20 giorni mantenendo i campioni a -20°C, rientra nell'intervallo 85-115% [FDA, 2018].

I composti Pelargonidina-3-*O*-glucoside e Peonidina-3-*O*-glucoside risultano stabili anche se mantenuti a T ambiente per un tempo di 24 ore. Al contrario, per la cianidina-3-*O*-glucoside, nella stabilità a breve termine alla concentrazione di 1 µg/mL si è registrata una riduzione percentuale del -40.3%.

Al fine di monitorare ulteriormente la stabilità della cianidina-3-*O*-glucoside, sono state effettuate prove alla concentrazione di 1 µg/mL a T ambiente per un tempo di 4 ore. I risultati relativi alla stabilità a breve termine della cianidina-3-*O*-glucoside sono riportati in **Tabella 5.35**.

Tabella 5.35 - Risultati della stabilità a breve termine della cianidina-3-*O*-glucoside, espressi come variazione percentuale

Analita	Concentrazione iniziale (µg/mL)	Stabilità a breve termine	
		4h, T _{amb} Variazione % (media±DS)	24h, -20°C Variazione % (media±DS)
Cianidina-3- <i>O</i> -glucoside	1	89.0±2.1	59.7±11.5

Come si può osservare dalla **Tabella 5.35**, dopo 4 ore la riduzione percentuale della cianidina-3-*O*-glucoside è mediamente inferiore al 15%. I risultati ottenuti sulla stabilità delle antocianine suggeriscono come sia necessario analizzare i campioni entro 4 ore dalla loro preparazione. In alternativa le soluzioni devono essere conservate a -20° C per un tempo massimo di 20 giorni.

La stabilità degli analiti è stata valutata anche in matrice a breve (4 h, T ambiente) e a lungo termine (20 giorni, -20°C), analizzando un campione di mais viola Reduno. I risultati, espressi come µg/g e la variazione percentuale, sono riportati in **Tabella 5.36**.

Tabella 5.36 - Risultati della stabilità in matrice delle antocianine, i risultati sono espressi come µg/g e variazione percentuale

Analita	Concentrazione iniziale µg/g (media±DS)	Stabilità a breve termine 4h, T _{amb}		Stabilità a lungo termine 20g, -20°C	
		µg/g (media±DS)	Variazione % (media±DS)	µg/g (media±DS)	Variazione % (media±DS)
Cianidina-3- <i>O</i> -glucoside	171.1±5.6	190.0±3.3	111.0±0.02	186.93±0.7	109.2±0.01
Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucoside	24.5±0.9	25.4±0.7	104.0±0.03	23.4±0.6	95.6±0.02
Peonidina-3- <i>O</i> -glucoside	159.6±3.0	163.1±2.1	102.2±0.01	156.9±4.4	98.3±0.03

Come riportato in **Tabella 5.36**, la stabilità degli analiti a lungo termine e dopo 4 ore a temperatura ambiente risulta confermata anche in matrice, essendo la variazione percentuale compresa tra 85 e 115%.

Dall'analisi in HPLC-DAD del campione si erano osservati altri composti riconducibili alla cianidina-3-(6-malonilglucoside), pelargonidina-3-(6-malonilglucoside) e peonidina-3-(6-malonilglucoside), come indicato dalle analisi in HPLC-MS (Paragrafo 5.6). La stabilità di queste antocianine è stata valutata in matrice a breve termine (4 ore a T ambiente) ea lungo termine (48 h, 5 giorni e 20 giorni a -20°C). I risultati sono elencati in **Tabella 5.37**.

Tabella 5.37 - Stabilità in matrice delle antocianine, i risultati sono espressi come $\mu\text{g/g}$ e variazione percentuale

Analita	Concentrazione iniziale $\mu\text{g/g}$ (media \pm DS)	Stabilità a breve termine 4h, T _{amb}		Stabilità a lungo termine 48h, -20° C		Stabilità a lungo termine 5 gg, -20° C		Stabilità a lungo termine 20 gg, -20° C	
		$\mu\text{g/g}$ (media \pm DS)	Variazione % (media \pm DS)	$\mu\text{g/g}$ (media \pm DS)	Variazione % (media \pm DS)	$\mu\text{g/g}$ (media \pm DS)	Variazione % (media \pm DS)	$\mu\text{g/g}$ (media \pm DS)	Variazione % (media \pm DS)
CN	101.5	84.2	83.0	100.6	99.0	99.3	97.8	87.7	86.4
	± 2.1	± 3.3	± 0.03	± 4.2	± 0.04	± 2.5	± 0.02	± 2.7	± 0.03
PG	15.3	12.3	80.8	14.3	93.4	13.9	91.1	12.1	79.4
	± 0.8	± 0.9	± 0.06	± 1.2	± 0.1	± 1.0	± 0.1	± 1.2	± 0.1
PO	103.1	104.3	101.2	101.4	98.4	101.2	98.1	99.7	96.7
	± 1.1	± 0.9	± 0.01	± 6.1	± 0.1	± 4.7	± 0.05	± 1.5	± 0.01

CN: Cianidina 3,6-malonil glucoside; PG: Pelargonidina 3,6- malonil glucoside; PO: Peonidina 3,6-malonil glucoside

Come si può osservare dalla **Tabella 5.37** queste molecole risultano meno stabili delle antocianine glucosidi precedentemente valutate. La cianidina-3-(6-malonilglucoside) non risulta stabile dopo essere stata mantenuta per 4 ore a temperatura ambiente mentre la pelargonidina-3-(6-malonilglucoside) non è risultata stabile né a breve termine né dopo 20 giorni a -20°C.

I dati ottenuti suggeriscono che, al fine di ottenere una corretta quantificazione di tutti gli analiti, i campioni devono essere analizzati subito dopo l'estrazione o in alternativa mantenuti a -20°C per un tempo massimo di 5 giorni.

• Recupero

Il recupero è stato valutato utilizzando come matrice un mais giallo, addizionato di quantità note di antocianine standard. I mais gialli, come si può osservare in **Figura 5.49**, non presentano picchi interferenti in corrispondenza dei tempi di ritenzione degli antociani standard.

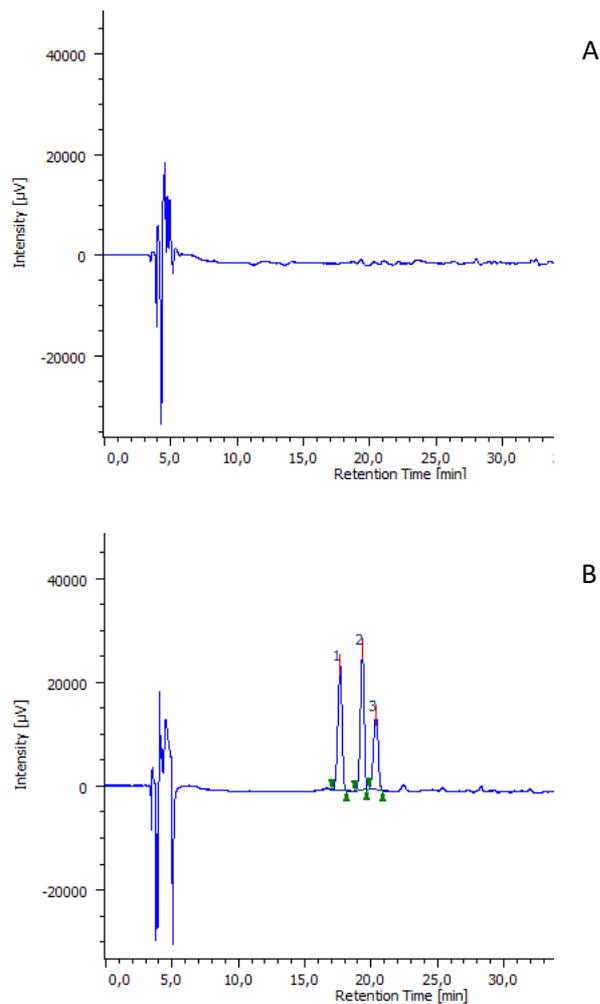


Figura 5.49 - Cromatogramma di un mais giallo rilevato a 520 nm (A), cromatogramma di un mais giallo a cui sono state aggiunte antocianine standard alla concentrazione di 5 µg/mL (B).

1) cianidina-3-*O*-glucoside, 2) pelargonidina-3-*O*-glucoside, 3) peonidina-3-*O*-glucoside

I risultati del recupero, valutati a tre concentrazioni differenti (1, 2, 5 µg/mL), sono elencati in **Tabella 5.38**.

Tabella 5.38 - Risultati del recupero delle antocianine a tre differenti concentrazioni

Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	Recupero % (media \pm DS)		
	Cianidina-3-O- glucoside	Pelargonidina-3-O- glucoside	Peonidina-3-O- glucoside
1	88.3 \pm 1.3	81.1 \pm 2.1	103.5 \pm 0.9
2	95.3 \pm 2.2	95.0 \pm 1.7	94.2 \pm 5.0
5	93.1 \pm 0.5	89.2 \pm 0.3	91.2 \pm 0.7

Come si può osservare dalla **Tabella 5.38**, il recupero percentuale di ciascun analita è risultato compreso tra l'80% e il 115%, in accordo con le più recenti linee guida della FDA [FDA, 2018].

5.7.2 Analisi dei campioni

Il metodo sviluppato in questo lavoro di tesi è stato applicato per l'analisi dei campioni di mais pigmentati inclusi nello studio.

In **Figura 5.50** è illustrato il cromatogramma relativo al campione di mais viola Reduno rilevato a 520 nm.

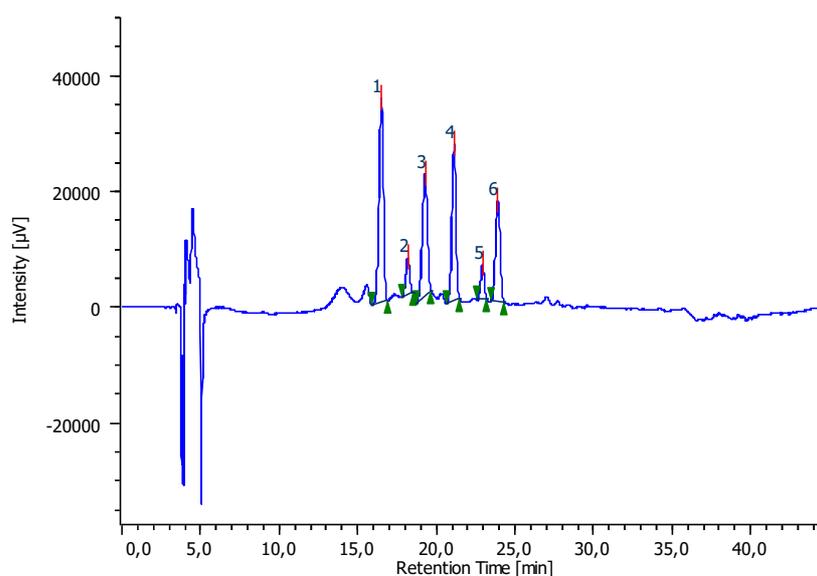


Figura 5.50 - Cromatogramma ottenuto dall'analisi mediante HPLC-DAD del mais viola Reduno.

1) cianidina-3-O-glucoside, 2) pelargonidina-3-O-glucoside, 3) peonidina-3-O-glucoside, 4) cianidina-3-(6-malonilglucoside), 5) pelargonidina-3-(6-malonilglucoside), 6) peonidina-3-(6-malonilglucoside)

Come si può osservare dalla **Figura 5.50** nel campione di mais Reduno si osservano sei picchi principali (Tr (min): 16.9 ± 0.2 ; 18.6 ± 0.2 ; 19.7 ± 0.2 ; 21.6 ± 0.2 ; 23.5 ± 0.2 ; 24.4 ± 0.2). L'identificazione delle antocianine è stata effettuata tenendo in considerazione i risultati ottenuti mediante l'analisi in HPLC-MS e confrontando il tempo di ritenzione dei picchi cromatografici nei campioni con i tempi di ritenzione degli standard di riferimento disponibili. Ulteriore conferma è stata ottenuta mediante la valutazione degli spettri di assorbimento. In **Figura 5.51-A** sono riportati gli spettri di assorbimento della 1) cianidina-3-*O*-glucoside (Tr= 16.5 min), 2) pelargonidina-3-*O*-glucoside (Tr= 18.2 min), 3) peonidina-3-*O*-glucoside (Tr= 19.3 min), ottenute mediante il rilevatore DAD. In **Figura 5.51-B** sono illustrati gli spettri di assorbimento dei picchi cromatografici relativi alla 4) cianidina-3-(6-malonilglucoside) (Tr= 21.2 min), 5) pelargonidina-3-(6-malonilglucoside) (Tr = 23.0 min), 6) peonidina-3-(6-malonilglucoside) (Tr = 24.0 min).

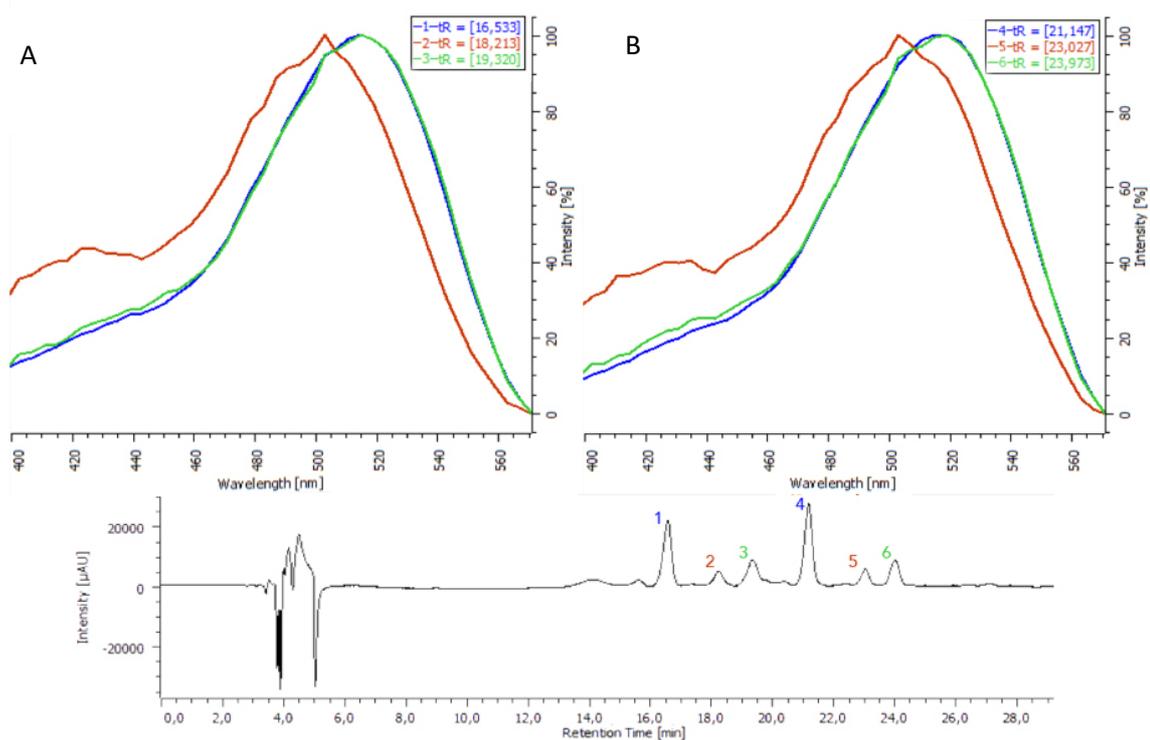


Figura 5.51 - Spettri di assorbimento della: 1) cianidina-3-*O*-glucoside, 2) pelargonidina-3-*O*-glucoside e 3) peonidina-3-*O*-glucoside (A); spettri di assorbimento della: 4) cianidina-3-(6-malonilglucoside), 5) pelargonidina-3-(6-malonilglucoside) e 6) peonidina-3-(6-malonilglucoside) (B)

Nelle **Figure 5.52, 5.53, 5.54** sono illustrati i cromatogrammi relativi ai campioni dei mais pigmentati Polenta, Pop e Sugary, rispettivamente.

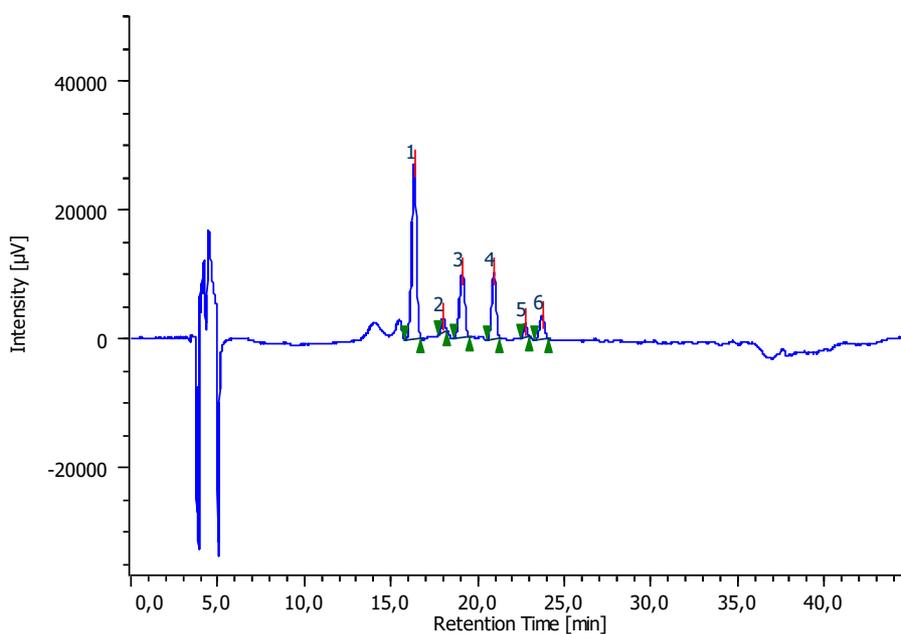


Figura 5.52 - Cromatogramma ottenuto dall'analisi mediante HPLC-DAD del mais pigmentato Polenta ($\lambda=520$ nm). 1) cianidina-3-*O*-glucoside, 2) pelargonidina-3-*O*-glucoside, 3) peonidina-3-*O*-glucoside, 4) cianidina-3-(6-malonilglucoside), 5) pelargonidina-3-(6-malonilglucoside), 6) peonidina-3-(6-malonilglucoside)

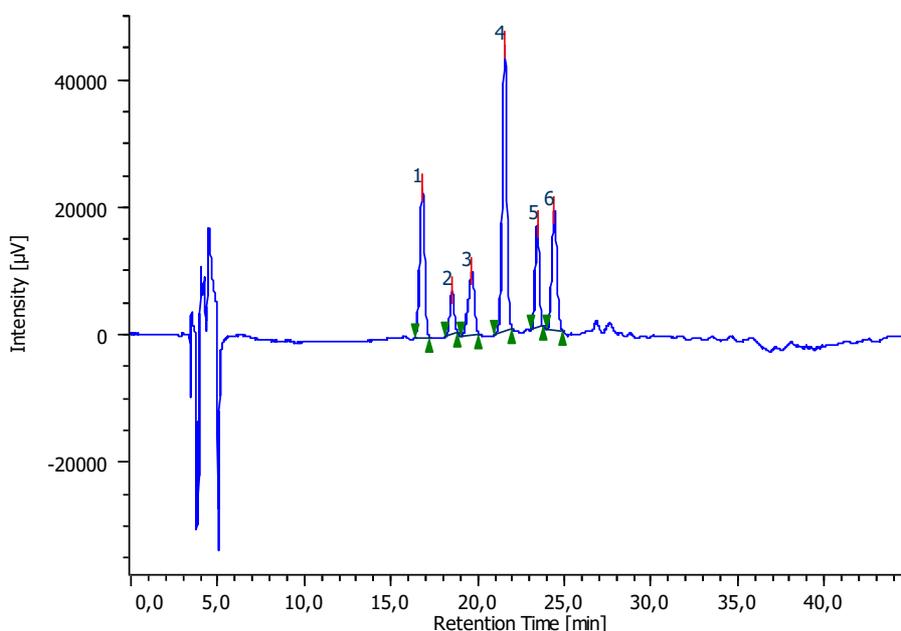


Figura 5.53 - Cromatogramma ottenuto dall'analisi mediante HPLC-DAD del mais pigmentato Pop ($\lambda=520$ nm). 1) cianidina-3-*O*-glucoside, 2) pelargonidina-3-*O*-glucoside, 3) peonidina-3-*O*-glucoside, 4) cianidina-3-(6-malonilglucoside), 5) pelargonidina-3-(6-malonilglucoside), 6) peonidina-3-(6-malonilglucoside)

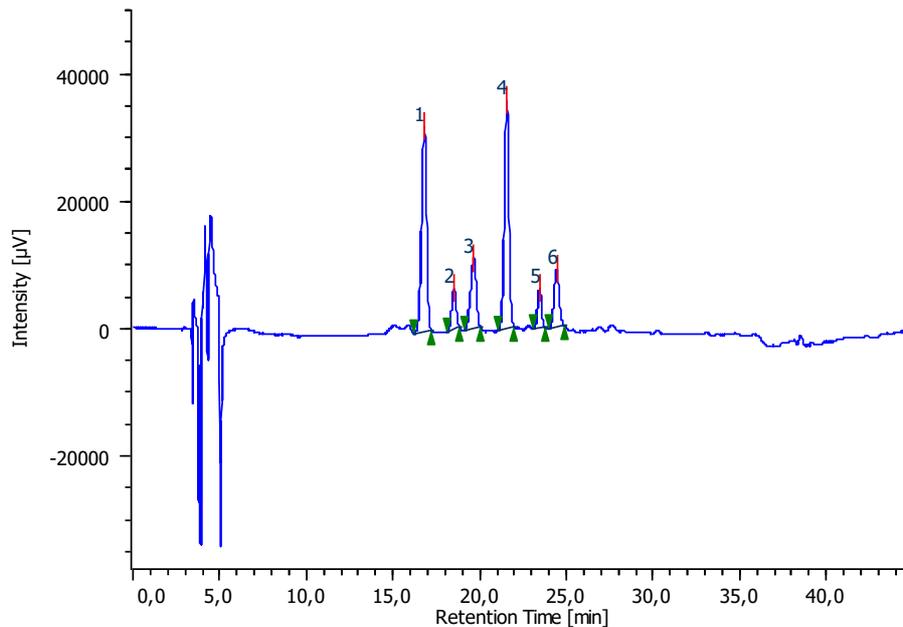


Figura 5.54 - Cromatogramma ottenuto dall'analisi mediante HPLC-DAD del mais pigmentato Sugary ($\lambda=520$ nm). 1) cianidina-3-*O*-glucoside, 2) pelargonidina-3-*O*-glucoside, 3) peonidina-3-*O*-glucoside, 4) cianidina-3-(6-malonilglucoside), 5) pelargonidina-3-(6-malonilglucoside), 6) peonidina-3-(6-malonilglucoside)

In tutti i campioni di mais pigmentati, ad eccezione del mais Polenta, sono ben visibili le antocianine: cianidina-3-*O*-glucoside, pelargonidina-3-*O*-glucoside, peonidina-3-*O*-glucoside, cianidina-3-(6-malonilglucoside), pelargonidina-3-(6-malonilglucoside) e peonidina-3-(6-malonilglucoside). Nel mais Polenta la pelargonidina-3-(6-malonilglucoside) è risultata inferiore al Limite di Quantificazione della pelargonidina-3-*O*-glucoside, analita di riferimento utilizzato per il dosaggio di tale composto (LOQ=5.0 µg/g).

Al fine di quantificare le antocianine contenute nei campioni, le aree ottenute sono state elaborate mediante regressione lineare. Poiché gli standard relativi alla cianidina-3-(6-malonilglucoside), pelargonidina-3-(6-malonilglucoside) e peonidina-3-(6-malonilglucoside) non erano commercialmente disponibili tali composti sono stati quantificati utilizzando le rette di calibrazione della corrispondente antocianina glucoside [Cuevas Montilla et al., 2011].

In **Tabella 5.39** sono riportati i dosaggi delle antocianine nei campioni di mais pigmentati.

Tabella 5.39 - Dosaggio delle antocianine nei campioni pigmentati (n=3)

	Concentrazione $\mu\text{g/g}$ (media \pm DS)			
	Reduno	Polenta	Pop	Sugary
Cianidina-3- <i>O</i> -glucoside	176.0 \pm 11.4	142.6 \pm 11.0	75.9 \pm 5.4	114.7 \pm 5.3
Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucoside	24.5 \pm 1.9	9.6 \pm 1.2	16.4 \pm 0.1	17.3 \pm 2.1
Peonidina-3- <i>O</i> -glucoside	155.8 \pm 14.8	74.2 \pm 4.9	56.7 \pm 3.4	64.5 \pm 2.8
Cianidina-3-(6-malonilglucoside)	100.4 \pm 8.2	37.8 \pm 3.5	132.4 \pm 11.7	112.7 \pm 3.9
Pelargonidina-3-(6-malonilglucoside)	14.7 \pm 1.4	NQ	39.5 \pm 3.7	13.7 \pm 0.8
Peonidina-3-(6-malonilglucoside)	97.4 \pm 10.3	21.8 \pm 2.4	90.3 \pm 6.3	46.6 \pm 1.9
Totale	568.8\pm46.1	286.0\pm22.3	411.1\pm29.8	369.5\pm15.7

*NQ: Non quantificabile <LOQ (5.0 $\mu\text{g/g}$)

Come si può osservare dalla **Tabella 5.39**, la cianidina-3-*O*-glucoside (176.0 \pm 11.4 $\mu\text{g/g}$) e la peonidina-3-*O*-glucoside (155.8 \pm 14.8 $\mu\text{g/g}$) rappresentano i principali composti contenuti nel campione Reduno, seguiti dalla cianidina-3-(6-malonilglucoside) (100.4 \pm 8.2 $\mu\text{g/g}$) e dalla peonidina-3-(6-malonilglucoside) (97.4 \pm 10.3 $\mu\text{g/g}$). I derivati della cianidina e della peonidina rappresentano il 48.6% e il 44.5% delle antocianine totali, rispettivamente. I derivati della pelargonidina, invece, costituiscono solo il 6.9% delle antocianine totali.

Anche nel campione pigmentato Polenta la cianidina-3-*O*-glucoside e la peonidina-3-*O*-glucoside rappresentano le principali antocianine (142.6 \pm 11.0 e 74.2 \pm 4.9 $\mu\text{g/g}$, rispettivamente), seguiti dalla cianidina-3-(6-malonilglucoside) (37.8 \pm 3.5 $\mu\text{g/g}$) e dalla peonidina-3-(6-malonilglucoside) (21.8 \pm 2.4 $\mu\text{g/g}$). I derivati della cianidina e della peonidina rappresentano il 65.4% e il 32.9% delle antocianine totali, rispettivamente. La pelargonidina-3-*O*-glucoside, invece, costituisce solo il 5.4% delle antocianine totali. Il contenuto di antociani totali, pari a 286.0 \pm 22.28 $\mu\text{g/g}$, risulta inferiore a quanto dosato per il mais viola parentale Reduno (568.8 \pm 46.1 $\mu\text{g/g}$). Questa riduzione nel contenuto di

antociani totali è spiegata dal fatto che il mais Polenta è stato ottenuto dall'incrocio del mais viola Reduno con il mais giallo Scagliolo.

Nel mais Pop, a differenza degli altri campioni pigmentati, il composto più abbondante è rappresentato dalla cianidina-3-(6-malonilglucoside) ($132.4 \pm 11.7 \mu\text{g/g}$), seguito dalla peonidina-3-(6-malonilglucoside) ($90.3 \pm 6.3 \mu\text{g/g}$). Analogamente a quanto osservato per gli altri campioni i derivati della cianidina sono i più abbondanti (50.7% delle antocianine totali), seguiti dai derivati della peonidina (35.8%) e della pelargonidina (13.6%).

Nel mais Sugary la cianidina-3-O-glucoside e la cianidina-3-(6-malonilglucoside) sono i composti più abbondanti (114.7 ± 5.3 e $112.7 \pm 3.9 \mu\text{g/g}$, rispettivamente). I derivati della cianidina rappresentano il 61.5% delle antocianine totali, seguiti dai derivati della peonidina (30.1%) e della pelargonidina (8.4%).

In **Figura 5.55** è illustrata la distribuzione delle diverse antocianine standard e l'analisi statistica dei risultati. Ciascun campione pigmentato è stato confrontato con il mais parentale Reduno.

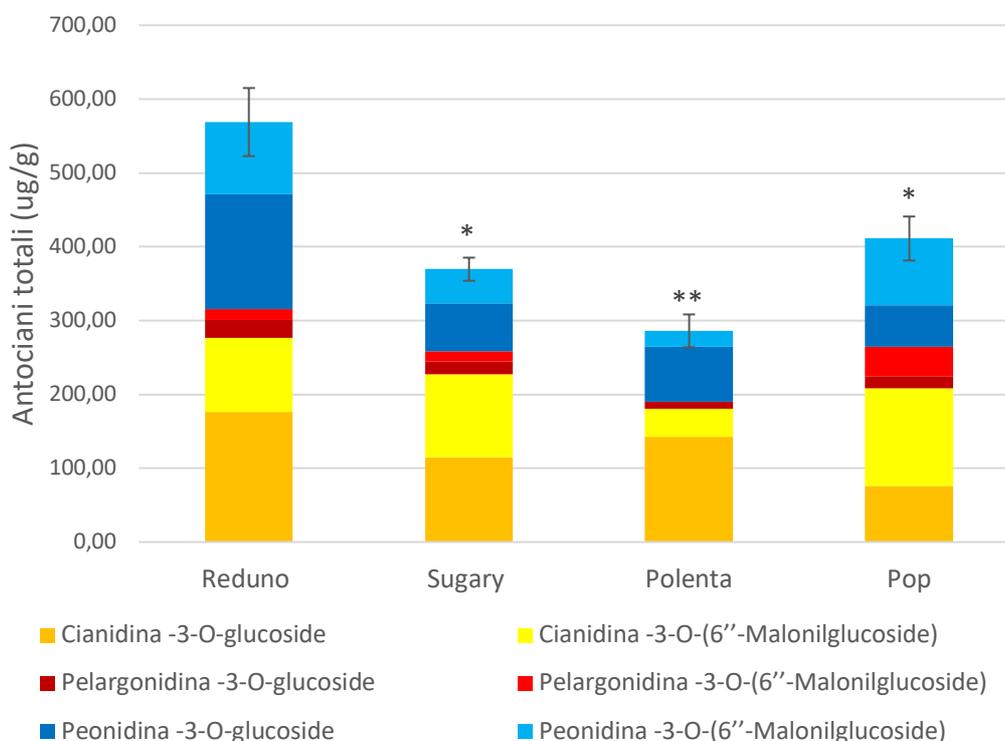


Figura 5.55 – Distribuzione delle antocianine. Ciascun campione pigmentato è stato confrontato con il mais viola (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$)

Come si può osservare dalla **Figura 5.55** i derivati della cianidina sono i composti maggiormente rappresentati in tutti i campioni di mais. Essi rappresentano dal 49% (mais Reduno) al 65% (mais Polenta) delle antocianine totali. Tali dati sono leggermente inferiori rispetto a quanto indicato in letteratura dove si riporta un valore di circa 70% [Aoki et al, 2000]. I derivati della pelargonidina sono abbondanti nel mais viola Reduno (36%) mentre nei mais pigmentati Sugary, Polenta e Pop rappresentano circa il 30%. I mais pigmentati presentano un contenuto di antociani statisticamente inferiore rispetto al mais viola parentale ($p < 0.05$ per il mais Pop e Sugary e $p < 0.005$ per il mais Polenta).

5.8 Stabilità antocianine dopo digestione gastrointestinale *in vitro*

Al fine di valutare la stabilità delle antocianine ai processi digestivi, gli estratti idroalcolici dei campioni di mais pigmentato sono stati analizzati prima e dopo il processo digestivo effettuato come descritto nel Paragrafo 4.10 della sezione Metodi. La simulazione della digestione gastro-intestinale è stata condotta sui campioni di mais pigmentato destinati al consumo umano: Pop, Sugary e Polenta.

In **Tabella 5.40** viene riportata la resa di estrazione per ciascun campione di mais, espressa come g di estratto/100 g di campione.

Tabella 5.40 - Resa di estrazione per ciascun campione di mais

Campione	Resa %
Polenta	5.67
Pop	4.31
Sugary	11.01

L'estrazione idroalcolica condotta sui campioni di mais ha permesso di ottenere estratti arricchiti della componente fenolica; la resa di estrazione % è risultata compresa tra il 5.67-11.01%.

In **Figura 5.56** è illustrato il cromatogramma relativo al bianco, ottenuto iniettando le soluzioni enzimatiche senza la presenza del campione.

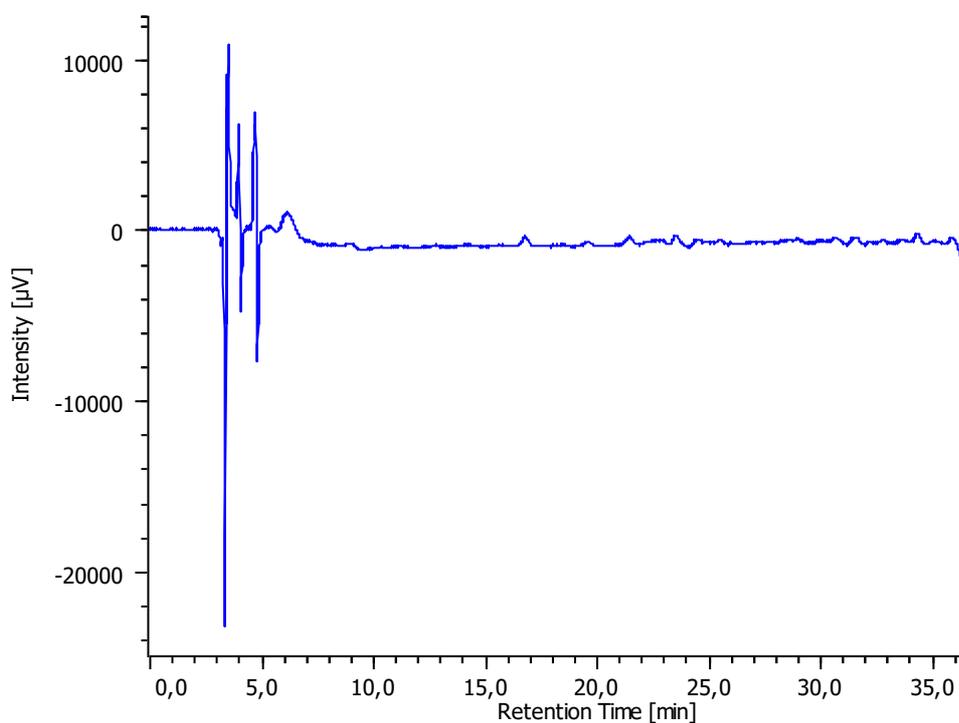


Figura 5.56 - Cromatogramma ottenuto dall'iniezione del bianco della digestione gastro-intestinale ($\lambda=520$ nm)

Come si può osservare dalla **Figura 5.56**, a 520 nm, non vi sono picchi interferenti in corrispondenza dei tempi di ritenzione delle antocianine (intervallo 16-24 minuti).

Nelle **Figure 5.57-5.59** sono illustrati i cromatogrammi relativi agli estratti idroalcolici dei mais pigmentati Sugary, Polenta, Pop (A) e le corrispondenti digestioni ai tempi 2+2h (B) e 2+24h (C).

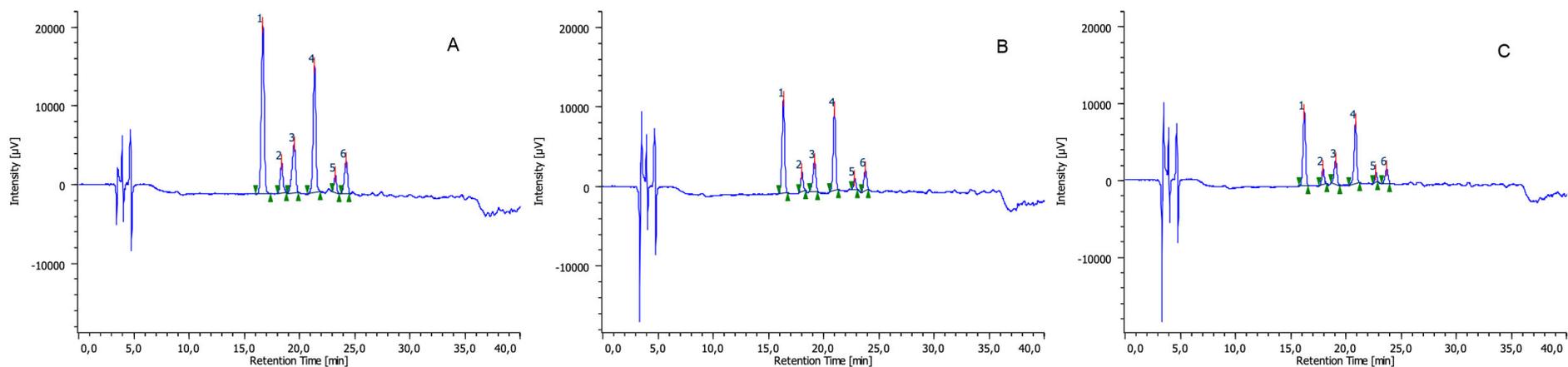


Figura 5.57 – Digestione del mais pigmentato Sugary. Cromatogramma relativo all'iniezione di: A) estratto idralcolico; B) digestione 2+2h; C) digestione 2+24h. 1) cianidina-3-*O*-glucoside, 2) pelargonidina-3-*O*-glucoside, 3) peonidina-3-*O*-glucoside, 4) cianidina-3-(6-malonilglucoside), 5) pelargonidina-3-(6-malonilglucoside), 6) peonidina-3-(6-malonilglucoside)

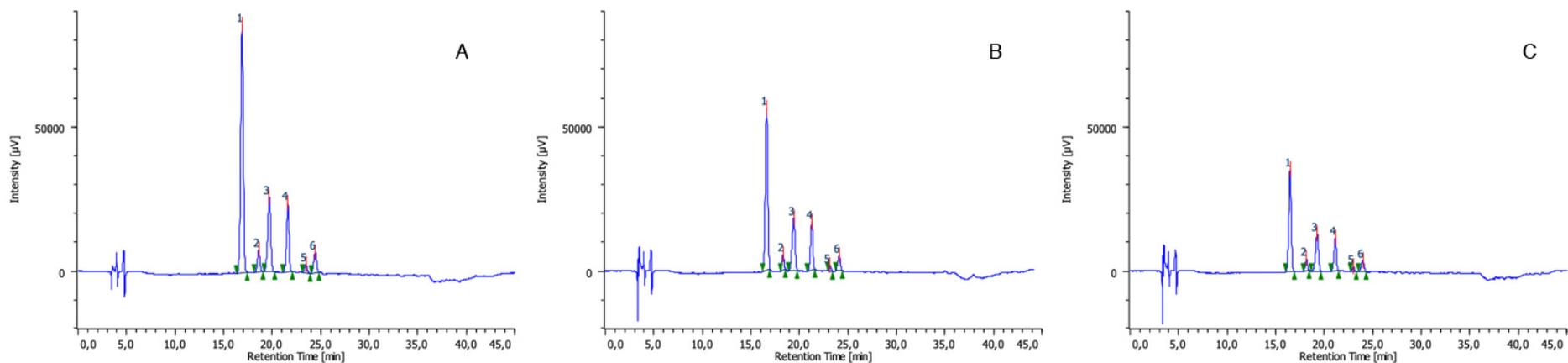


Figura 5.58 – Digestione del mais pigmentato Polenta. Cromatogramma relativo all'iniezione di: A) estratto idralcolico; B) digestione 2+2h; C) digestione 2+24h. 1) cianidina-3-*O*-glucoside, 2) pelargonidina-3-*O*-glucoside, 3) peonidina-3-*O*-glucoside, 4) cianidina-3-(6-malonilglucoside), 5) pelargonidina-3-(6-malonilglucoside), 6) peonidina-3-(6-malonilglucoside)

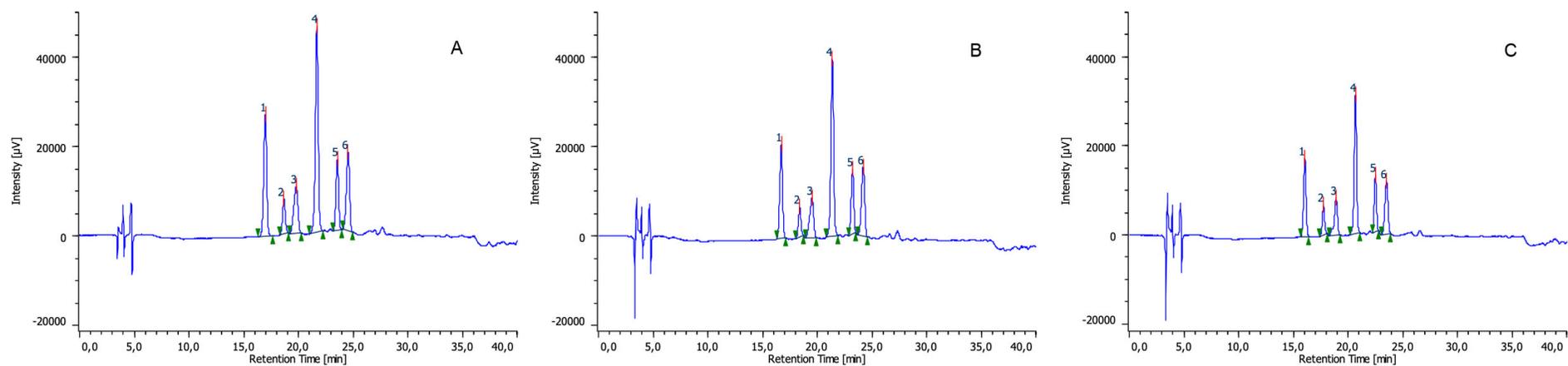


Figura 5.59 – Digestione del mais pigmentato Pop. Cromatogramma relativo all'iniezione di: A) estratto idralcolico; B) digestione 2+2h; C) digestione 2+24h.
 1) cianidina-3-*O*-glucoside, 2) pelargonidina-3-*O*-glucoside, 3) peonidina-3-*O*-glucoside, 4) cianidina-3-(6-malonilglucoside), 5) pelargonidina-3-(6-malonilglucoside), 6) peonidina-3-(6-malonilglucoside)

In **Tabella 5.41** sono riportate le variazioni percentuali di ciascuna antocianina ai diversi tempi di digestione.

Tabella 5.41 - Riduzione percentuale (%) delle antocianine dopo digestione gastro-intestinale *in vitro*

Analita	Digestione mais Pop		Digestione mais Polenta		Digestione mais Sugary	
	2h+2h Caduta % (Media ±DS)	2h+24h Caduta % (Media ±DS)	2h+2h Caduta % (Media ±DS)	2h+24h Caduta % (Media ±DS)	2h+2h Caduta % (Media ±DS)	2h+24h Caduta % (Media ±DS)
Cianidina-3-O-glucoside	-47.57±1.25	-55.93±3.99	-58.66±0.25	-70.21±0.17	-57.51±0.49	-66.50±1.75
Pelargonidina-3-O-glucoside	-47.45±4.21	-45.23±7.57	-59.78±0.75	-67.10±0.99	N.Q.*	N.Q.*
Peonidina-3-O-glucoside	-43.04±3.13	-51.35±5.31	-52.44±0.99	-60.30±0.56	-53.23±0.77	-64.96±1.41
Cianidina 3,6-malonil glucoside	-39.41±1.74	-51.86±4.01	-51.53±0.41	-62.86±0.94	-52.17±0.58	-63.13±1.90
Pelargonidina 3,6- malonil glucoside	-38.13±1.83	-46.98±7.33	N.Q.*	N.Q.*	N.Q.*	N.Q.*
Peonidina 3,6-malonil glucoside	-38.13±2.66	-48.26±5.74	-53.75±2.39	-58.81±1.38	-49.34±2.69	-83.00±1.20

* NQ: Non quantificabile, <LOQ (0.25 µg/mL)

Nelle **Figure 5.60-5.62** è illustrata la riduzione percentuale di antocianine durante il processo digestivo nei diversi campioni di mais pigmentati.

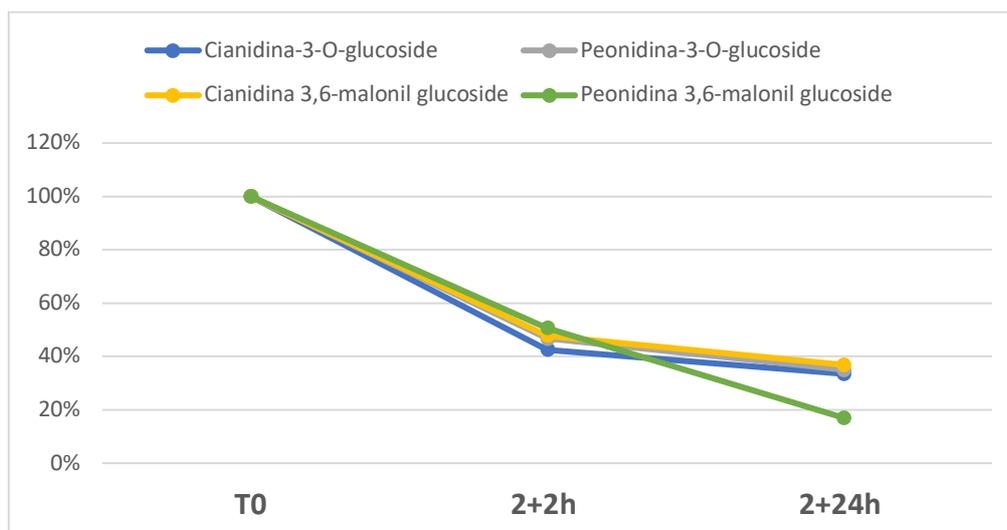


Figura 5.60 - Variazione percentuale delle antocianine durante i processi digestivi nel mais Sugary

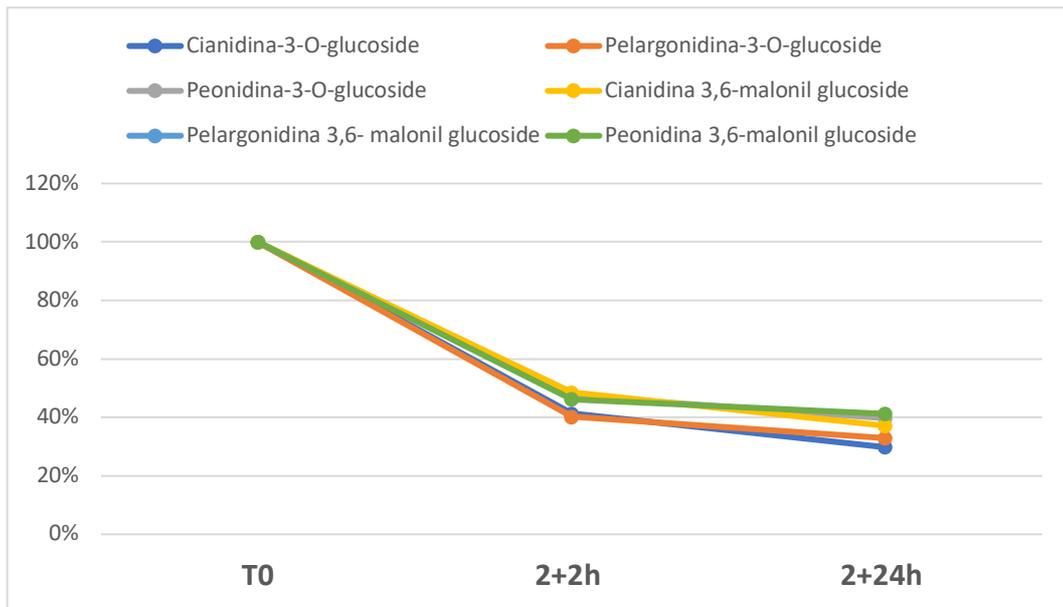


Figura 5.61 - Variazione percentuale di antocianine durante i processi digestivi nel mais Polenta

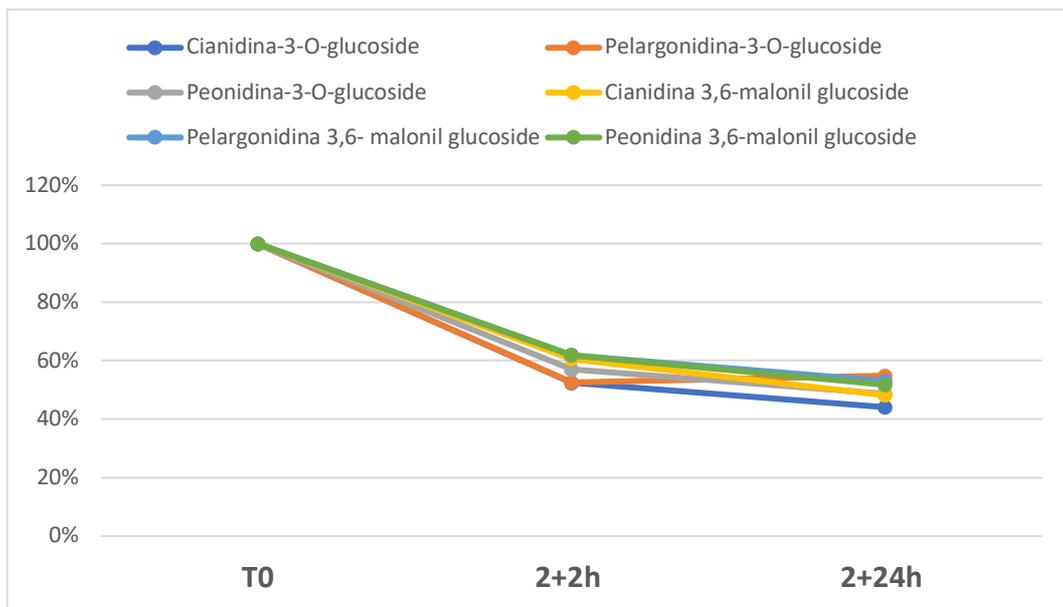


Figura 5.62 - Variazione percentuale di antocianine durante i processi digestivi nel mais Pop

Come si può osservare dalla **Tabella 5.41** e dalle **Figure 5.60-5.62** la digestione gastrointestinale determina una significativa riduzione delle antocianine. Dopo digestione per 2+2h, la variazione percentuale risulta compresa tra -38.13 ± 1.83 % per la Pelargonidina 3,6-malonil glucoside nel campione Pop a -59.78 ± 0.75 % per la Pelargonidina-3-O-glucoside nel campione Polenta. È interessante notare come la degradazione degli antociani avvenga principalmente durante le prime due ore di digestione intestinale (2+2h), mentre nelle successive ore (2+24h), la concentrazione di antocianine decresce meno rapidamente.

Dopo digestione per 2+24h la variazione percentuale risulta compresa tra $-45.23 \pm 7.57\%$ per la Pelargonidina-3-O-glucoside nel campione Pop a -83.00 ± 1.20 per la Peonidina 3,6-malonil glucoside nel campione Sugary.

La stabilità delle antocianine può essere influenzata da diversi fattori come il pH, la presenza di ossigeno, la loro struttura chimica e l'azione degli enzimi [Yousuf et al., 2016]. Al pH dello stomaco (1-2) le antocianine si trovano nella loro forma cationica stabile, come dimostrato da numerosi studi presenti in letteratura [Perez-Vicente et al., 2002; McDougall et al., 2005]. Contrariamente, il pH neutro dell'intestino e la presenza del microbiota determinano la conversione delle antocianine in diversi metaboliti come acidi fenolici e composti aldeidici [Aura et al., 2005; McGhie and Walton, 2007].

Al fine di valutare la biodisponibilità delle antocianine e un loro possibile effetto positivo per l'uomo è importante studiare la loro stabilità durante il processo gastro-intestinale. In particolare, durante questo lavoro di tesi, è stato considerato l'intero processo digestivo in quanto i soggetti celiaci sono affetti da una condizione di stress ossidativo a livello intestinale ed è quindi in quel distretto che devono svolgere attività antiinfiammatoria e antiossidante.

Sebbene i dati sull'effetto della digestione gastrointestinale del mais pigmentato siano scarsi in letteratura, numerosi studi hanno valutato l'effetto della digestione su questa classe di composti contenuti in altre matrici. San Giovanni e collaboratori [2015] hanno studiato l'attività biologica di un estratto di foglie di vite (*Vitis vinifera* L.), ricco in antociani. La digestione gastrointestinale di questo estratto ha determinato una riduzione del contenuto di antociani compreso tra -38% per la cianidina-3-O-glucoside e -71% per la delphinidina-3-O-glucoside. Analogamente, David e collaboratori [2019] ha registrato una riduzione del 70%, in termini di antociani totali, in seguito a digestione gastrointestinale *in vitro* di un estratto di *Cornus mas* L. (corniolo).

5.9 Trattamenti cellulari

Gli eventi precoci indotti dalla gliadina, che si verificano in corrispondenza delle cellule epiteliali intestinali, sono fondamentali nel determinare la cascata infiammatoria caratteristica della patologia celiaca, che si conclude con la distruzione del tessuto duodenale.

Tali eventi sono correlati all'attivazione dell'enzima cellulare transglutaminasi tissutale 2 (TG2), alla fosforilazione delle proteine intracellulari, al riarrangiamento del citoscheletro e all'apoptosi cellulare [Maiuri et al., 2005].

In questo contesto è importante testare la tossicità e/o la sicurezza di un cereale per i soggetti celiaci, valutando la capacità di scatenare questi eventi precoci, che sono a monte del processo infiammatorio.

5.9.1 Resistenza Elettrica Trans-Epiteliale

Test preliminari sono stati condotti al fine di confermare la sicurezza d'uso delle nuove varietà pigmentate. In particolare, sono state saggiate la varietà viola Reduno e la varietà pigmentata Polenta dopo digestione gastrointestinale *in vitro*, come descritto nel Paragrafo 4.11 della sezione Metodi.

Nelle cellule epiteliali T84, gliadina-sensibili, la presenza del peptide tossico p31-43 (da gliadina) causa un riarrangiamento del citoscheletro con conseguente incremento della permeabilità del monostrato cellulare.

In **Tabella 5.42** sono riportati i risultati relativi alla misura della TEER (*Trans-Epithelial Electrical Resistance*) ottenuti in presenza dei digeriti di mais Reduno e Polenta e dopo aver trattato le cellule con digeriti di frumento (controllo positivo) e riso (controllo negativo). I dati della TEER ottenuti per ciascun campione vengono confrontati con il controllo. Valori superiori ad 1 indicano un aumento della permeabilità del monostrato cellulare associato ad una tossicità da parte dei cereali. L'analisi è stata condotta in duplicato.

Tabella 5.42 - Risultati della TEER

Campione	TEER campione/TEER controllo	
	1^prova	2^prova
Riso (ctr-)	1	-
Frumento (ctr+)	3.3	4
Reduno	1	0.9
Polenta	1	1

Come si può osservare dalla **Tabella 5.42**, il prodotto di digestione del frumento determina una diminuzione dei valori di TEER con conseguente aumento del rapporto TEER controllo/TEER campione. I campioni di mais, invece, non influiscono sull'integrità del monostrato cellulare e non si osservano differenze, in termini di TEER, rispetto al controllo negativo (riso).

5.9.2 Test di agglutinazione cellulare

L'agglutinazione delle cellule K562 da parte della frazione proteica alcool-solubile di un cereale è un fenomeno TG2-dipendente, che può quindi essere utilizzato per un rapido screening *in vitro* della tossicità/sicurezza di questi campioni nella patologia celiaca [Silano et al., 2012].

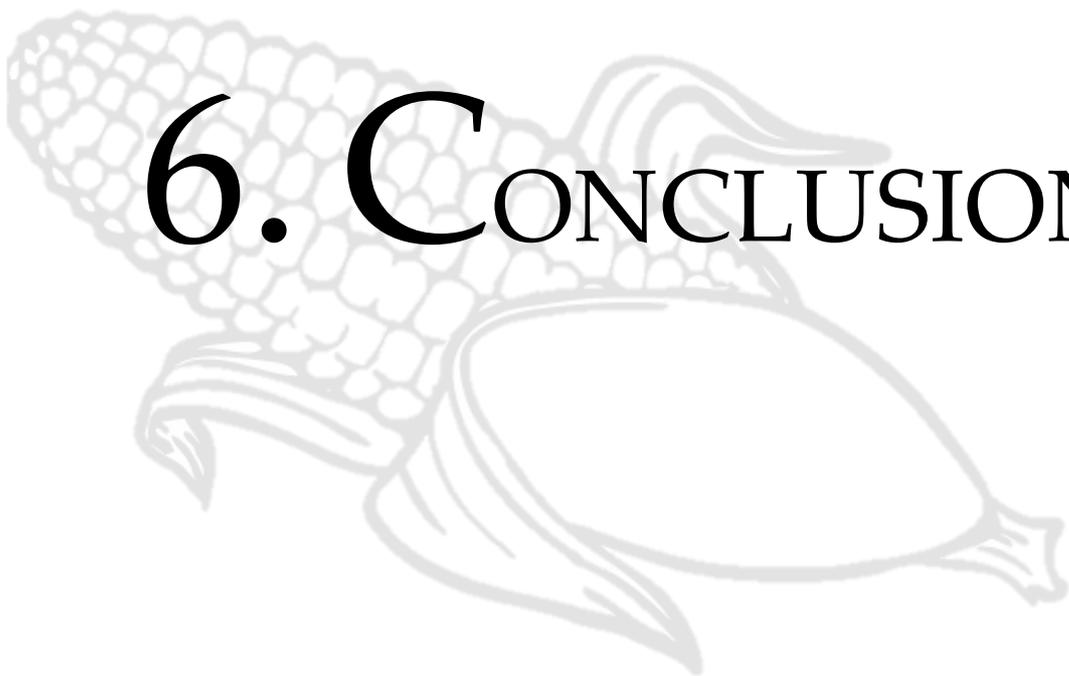
La **Tabella 5.43** riporta i risultati relativi alla percentuale di cellule K562 agglutinate dopo incubazione con i prodotti della digestione delle diverse varietà di mais (Reduno e Polenta), riso (controllo negativo) e frumento (controllo positivo). Una maggiore percentuale di agglutinazione è indice della tossicità del cereale saggiato. L'analisi è stata condotta in triplicato.

Tabella 5.43 - Risultati del test di agglutinazione cellulare

Campione	% cellule agglutinate		
	1^prova	2^prova	3^prova
Riso (ctr-)	0	0	0
Frumento (ctr+)	90	78	94
Reduno	0	0	0
Polenta	0	0	0

Come si può osservare dalla **Tabella 5.43**, i prodotti di digestione del riso e del mais Reduno e Polenta non determinano agglutinazione cellulare, confermando la sicurezza d'uso di questi cereali per i soggetti celiaci. Come atteso, invece, i prodotti di digestione del frumento determinano una marcata agglutinazione cellulare.

Tutte le analisi *in vitro* finora condotte evidenziano come la farina di frumento sia in grado di innescare gli eventi precoci che avvengono alla superficie delle cellule epiteliali intestinali al contrario dei cereali non tossici, riso e mais giallo, e delle nuove varietà di mais pigmentate. Questi dati preliminari suggeriscono la sicurezza d'uso delle varietà pigmentate per i soggetti celiaci; tuttavia, ulteriori analisi verranno condotte allo scopo di confermare quanto evidenziato con l'inclusione di tutte le varietà incluse nel lavoro di tesi



6. CONCLUSIONI

Lo stress ossidativo e l'infiammazione sono coinvolti nel meccanismo patogenetico della malattia celiaca. Considerando lo sbilanciamento ossidativo e l'infiammazione cronica dei soggetti celiaci, solo in parte compensati dalla dieta senza glutine, l'identificazione e la selezione di nuovi ingredienti caratterizzati da proprietà antiossidanti potrebbe apportare numerosi benefici nei soggetti affetti da celiachia. I mais pigmentati sono ottimi candidati a diventare ingredienti innovativi per i prodotti *gluten-free* in quanto sono ricchi in antociani, molecole ad elevata attività antiossidante, e sono naturalmente privi di glutine. L'impatto delle varietà pigmentate sullo stress ossidativo non è stato precedentemente studiato in questa patologia. Le metodiche sviluppate in questo lavoro di tesi sono importati strumenti al fine di caratterizzare le varietà di mais e studiare il possibile ruolo protettivo dei composti fenolici nei confronti degli effetti tossici della gliadina e delle prolamine tossiche nei pazienti celiaci. Le analisi condotte in questo studio hanno permesso di caratterizzare i differenti campioni di mais e valutarne la capacità antiossidante. Le metodiche sviluppate in HPLC sono state validate secondo i parametri del FDA [2018], risultando idonee e riproducibili per questa tipologia di matrice, e sono risultate in accordo con le altre metodiche cromatografiche (HPTLC e HPLC-MS) e spettrofotometriche applicate. Le varietà pigmentate Sugary, Polenta e Pop sono state confrontate con i rispettivi mais parentali (mais viola e mais gialli) e hanno mostrato un interessante profilo fenolico sia in termini di polifenoli solubili (antociani e acidi fenolici), sia in termini di polifenoli insolubili (acidi fenolici). Il contenuto di polifenoli è risultato proporzionale all'attività antiossidante valutata con le differenti metodiche spettrofotometriche (test del DPPH e TEAC) e cromatografiche (HPTLC).

Il processo digestivo *in vitro* ha evidenziato la parziale instabilità delle antocianine in ambiente intestinale, come riportato in letteratura; tuttavia circa il 50% delle antocianine risulta intatta dopo due ore di digestione gastrica e due ore di digestione intestinale (2+2h). Ulteriori analisi saranno necessarie al fine di verificare l'impatto del processo digestivo sull'attività antiossidante dei campioni.

I test cellulari *in vitro* (test di agglutinazione cellulare e valutazione della resistenza elettrica trans-epiteliale) hanno confermato la sicurezza d'uso di queste nuove varietà per i soggetti celiaci.

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi forniscono dati preliminari a sostegno dell'uso dei mais pigmentati nella dieta dei celiaci. La possibilità di integrare la dieta con queste nuove varietà contribuirebbe a un miglioramento dell'apporto di componenti a valenza nutrizionale e funzionale, con una possibile riduzione dello stress ossidativo spesso presente nei pazienti affetti da celiachia, nonostante l'aderenza alla dieta senza glutine.



7. BIBLIOGRAFIA

Abdel-Aal el-SM, Young JC, Rabalski I. **2006**. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *J Agric Food Chem* 54:4696-704.

Acquaah G. **2007**. Principles of plant genetics and breeding. Wiley-Blackwell publishing, Malden, Usa.

Adams F. **1856**. Extant works of Aretaeus Cappadocian. The Sydenham Society. London. Disponibile a: <https://archive.org/details/b21510271/page/n6>.

Adom KK, Liu RH. **2002**. Antioxidant activity of grains. *J Agric Food Chem* 50:6182-7.

Agardh D. **2007**. Antibodies against synthetic deamidated gliadin peptides and tissue transglutaminase for the identification of childhood celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:1276-81.

Aine L, Mäki M, Collin P, Keyrilainen O. **1990**. Dental enamel defects in celiac disease. *J Oral Pathol.* 19:241-5.

Ainsworth EA, Gillespie KM. **2007**. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* 2:875-7.

AOAC International. **2006**. Official method 2005.02. Total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants and wines. 18^{ed}, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburgst, MD.

Aoki H, Kuze N, Kato Y. **2002**. Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.). *Food Foods Ingredients J Jpn* 199:41-45.

Aura AM, Martin-Lopez P, O'Leary KA, Williamson G, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K, Santos-Buelga C. **2005**. *In vitro* metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur J Nutr* 44:133-42.

Ballabio C, Uberti F, Manferdelli S, Vacca E, Boggini G, Redaelli R, Catassi C, Lionetti E, Peñas E, Restani P. **2011**. Molecular characterisation of 36 oat varieties and *in vitro* assessment of their suitability for coeliacs' diet. *J Cereal Sci* 54: 110-115.

Bento-Silva A, Vaz Patto MC, do Rosário Bronze M. **2018**. Relevance, structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls. *Food Chem* 246:360-378.

Biagi F, Calabrò A. **2010**. Malassorbimento e malattia celiaca. In: Unigastro. Manuale di Gastroenterologia. Editrice Gastroenterologia Italiana; pp 391-397.

Bottaro G, Cataldo F, Rotolo N, Spina M, Corazza GR. **1999**. The clinical pattern of subclinical/silent celiac disease: an analysis on 1026 consecutive cases. *Am J Gastroenterol*. 94:691-6.

Boudet AM. **2007**. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68:2722-35.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. **1995**. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 28:25-30.

Carroccio A, Iannitto E, Cavataio F, Montalto G, Tumminello M, Campagna P, Lipari MG, Notarbartolo A, Iacono G. **1998**. Sideropenic anemia and celiac disease: one study, two points of view. *Dig Dis Sci* 43:673-8.

Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR. **1998**. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in celiac disease: an Italian multicentre study. *Gut* 42:362-65.

Catassi C, Fabiani E, Corrao G, Barbato M, De Renzo A, Carella AM, Gabrielli A, Leoni P, Carroccio A, Baldassarre M, Bertolani P, Caramaschi P, Sozzi M, Guariso G, Volta U, Corazza GR. Italian Working Group on Coeliac Disease and Non-Hodgkin's- Lymphoma. **2002**. Risk of non-Hodgkin lymphoma in celiac disease. *JAMA* 287:1413-19.

Catassi C. **2005**. The world map of celiac disease. *Acta Gastroenterol Latinoam* 35:37-55.

Catassi C. **2015**. Gluten sensitivity. *Ann Nutr Metab* 67:16-26.

Cevallos-Casals BA, Cisneros-Zevallos L. **2003**. Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and red-fleshed sweetpotato. *J Agric Food Chem* 51:3313–9.

Ciccocioppo R, di Sabatino A, Corazza GR. **2005**. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 140: 408–416.

Collin P, Mäki M, Kaukinen K. **2004**. It is the compliance, not milligrams of gluten, that is essential in the treatment of celiac disease. *Nutr Rev* 62:490; author reply 491.

Cömert ED, Gökmen V. **2017**. Antioxidants bound to an insoluble food matrix: their analysis, regeneration behavior, and physiological importance. *Compr Rev Food Sci F* 16: 382-399.

Corazza GR, Villanacci V. **2005**. Coeliac Disease: some considerations on the histological diagnosis. *J Clin Pathol* 58:573-74.

Cozzi R, Protti P, Ruaro T. **2001**. *Analisi Chimica Strumentale. II edizione. Volume C.* Ed. Zanichelli S.p.A. Cap 16.

Cuevas Montilla E, Hillebrand S, Antezana A, Winterhalter P. **2011**. Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (*Zea mays* L.) cultivars. *J Agric Food Chem* 59:7068-74.

Das AK, Singh V. **2015**. Antioxidative free and bound phenolic constituents in pericarp, germ and endosperm of Indian dent (*Zea mays* var. *indentata*) and flint (*Zea mays* var. *indurata*) maize. *J Funct Foods*. 13:363-74.

Das AK, Singh V. **2016**. Antioxidative free and bound phenolic constituents in botanical fractions of Indian specialty maize (*Zea mays* L.). *Food Chem* 201:298-306.

David L, Danciu V, Moldovan B, Filip A. **2019**. Effects of *In Vitro* Gastrointestinal Digestion on the Antioxidant Capacity and Anthocyanin Content of Cornelian Cherry Fruit Extract. *Antioxidants (Basel)* 8:pii:E114.

Dicke WK, Weijer HA, van de Kamer JH. **1953**. Celiac disease. II. The presence in wheat of the factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr* 42:34-42.

Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Clemente MG, Tripathi A, Sapone A, Thakar M, Iacono G, Carroccio A, D'Agate C, Not T, Zampini L, Catassi C, Fasano A. **2006**. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol* 41:408-19.

Duvick DN. **2005**. Genetic progress in yield of United States maize (*Zea mays* L.). *Maydica* 50:193-202.

EFSA, Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). **2014**. Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA J* 12:3894-4180.

Elli L, Dolfini E, Bardella MT. **2003**. Gliadin cytotoxicity and *in vitro* cell cultures. *Toxicol Lett* 46: 1-8.

Evangelisti E, Restani P. **2011**. I prodotti destinati a soggetti con patologia allergica. In: *Prodotti dietetici*. 2 Ed. Piccin Nuova Libreria; pp. 311-323.

Fabiani E, Catassi C, Villari A, Gismondi P, Pierdomenico R, Rättsch IM, Coppa GV, Giorgi PL. **1996**. Dietary compliance in screening-detected coeliac disease adolescents. *Acta Paediatr Suppl* 412:65-67.

Fanali C, Dugo L, D'Orazio G, Lirangi M, Dachà M, Dugo P, Mondello L. **2011**. Analysis of anthocyanins in commercial fruit juices by using nano-liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography with UV-vis detector. *J Sep Sci* 34:150-9.

Fasano A, Catassi C. **2001**. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 120:636-51.

Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Saturni L. **2012**. Celiac disease, inflammation and oxidative damage: a nutrigenetic approach. *Nutrients* 4:243-57.

Fossen T, Slimestad R, Andersen ØM. **2001**. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and red canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *J Agric Food Chem* 49:2318-21.

Freeman HJ. **2013**. The Neolithic Revolution and Subsequent Emergence of the Celiac Affection. *IJCD* 1:19-22.

Gasbarrini G, Malandrino N, Miele L, Merra G, Addolorato G, Lauritano EC, Montalto M, Grieco A, Landolfi R, Cammarota G, Gasbarrini A. **2009**. La clinica che cambia: il caso della malattia celiaca. *Intern Emerg Med* 4:S168-S181.

George EK, Hertzberger-ten Cate R, Van Suijlekom-Smit LW, Von Blomberg BM, Stapel SO, Van Elburg RM, Mearin ML. **1996**. Juvenile chronic arthritis and coeliac disease in the Netherlands. *Clin Exp Rheumatol* 14:571-75.

Gibert A, Kruizinga AG, Neuhold S, Houben GF, Canela MA, Fasano A, Catassi C. **2013**. Might gluten traces in wheat substitutes pose a risk in patients with celiac disease? A population-based probabilistic approach to risk estimation. *Am J Clin Nutr* 97:109-116.

Giusti MM, Wrolstad RE. **2003**. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem Eng J* 14:217-25.

Gobbi G, Bouquet F, Greco L, Lambertini A, Tassinari CA, Ventura A, Zaniboni MG. **1992**. Coeliac disease, epilepsy, and cerebral calcifications. The Italian Working Group on Coeliac Disease and Epilepsy. *Lancet* 340:439-43.

Godkin A, Jewell D. **1998**. The pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology* 115:206-10.

Hadjivassiliou M, Grunewald RA, Chattopadhyay AK, Davies-Jones GA, Gibson A, Jarratt JA, Kandler RH, Lobo A, Powell T, Smith CM. **1998**. Clinical, radiological, neurophysiological and neuropathological characteristics of gluten ataxia. *Lancet* 352:1582-85.

Harborne JB, Self R. **1997**. Malonated cyaniding-3-glucoside in *Zea mays* and other grasses. *Phytochem* 26:2417-18.

He J, Giusti MM. **2010**. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu Rev Food Sci Technol* - (new 2010) 1:163–87.

Hoffman JR, Falvo MJ. **2004**. Protein – Which is Best? *J Sports Sci Med* 3: 118–130.

Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelgeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP. ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. **2012**. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54:136-160.

Jabri B, Kasarda DD, Green PHR. **2005**. Innate and adaptive immunity: The Yin and Yang of celiac disease. *Immunol Rev* 206:219-31.

Jacson Allen PL. **2015**. Gluten-related disorders: celiac disease, gluten allergy, non-celiac gluten sensitivity. *Pediatr Nur* 41:146-50.

Kang JY, Kang AHY, Green A, Gwee KA, Ho KY. **2013**. Systematic review: worldwide variation in the frequency of coeliac disease and changes over time. *Aliment Pharmacol Ther* 38:226-45.

Karpati S. **2004**. Dermatitis herpetiformis: close to unravelling a disease. *J Dermatol Sci* 34:83-90.

Kim TH, Kim JK, Kang Y-H, Lee J-Y, Kang IJ, Lim SS. **2013**. Aldose reductase inhibitory activity of compounds from *Zea mays* L. *Biomed Res Intl* 2013:1–8.

Konczak I, Zhang W. **2004**. Anthocyanins - More than nature's colours. *J Biomed Biotechnol* 2004:239–40.

Koning F, Schuppan D, Cerf-Bensussan N, Sollid LM. **2005**. Pathomechanisms in celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19:373-87.

Koning F. **2005**. Celiac Disease: Caught Between a Rock and a Hard Place. *Gastroenterology* 129:1294-301.

Korponay-Szabó IR, Dahlbom I, Laurila K, Koskinen S, Woolley N, Partanen J, Kovács JB, Mäki M, Hansson T. **2003**. Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency. *Gut* 52:1567-7.

Lao F, Giusti MM. **2016**. Quantification of purple corn (*Zea mays* L.) anthocyanins using spectrophotometric and HPLC approaches: method comparison and correlation. *Food Anal Methods* 9:1367–80.

Lepore L, Martelossi S, Pennesi M, Falcini F, Ermini ML, Ferrari R, Perticarari S, Presani G, Lucchesi A, Lapini M, Ventura A. **1996**. Prevalence of celiac disease in patients with juvenile chronic arthritis. *J Pediatr.* 129:311-13.

Li J, Kang MK, Kim JK, Kim JL, Kang SW, Lim, SS, Kang YH. **2012**. Purple corn anthocyanins retard diabetes-associated glomerulosclerosis in mesangial cells and db/db mice. *Eur J Nutr* 51:961–73.

Lindh E, Ljungahall S, Larsson K, Lavo B. **1992**. Screening for antibodies against gliadin in patients with osteoporosis. *J Intern Med* 231:403-6.

Logan RFA, Rifkind EA, Turner ID, Ferguson A. **1989**. Mortality in coeliac disease. *Gastroenterology* 97:265-71.

Long N, Suzuki S, Sato S, Naiki-Ito A, Sakatani K, Shirai T, Takahashi, S. **2013**. Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. *Cancer Sci* 104:298–303.

Lopez-Martinez LX, Oliart-Ros RM, Valerio-Alfaro G, Lee C, Parkin KL, Garcia HS. **2009**. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *Food Sci Technol* 42:1187-92.

Losowsky MS. **2008**. A history of coeliac disease. *Dig Dis* 26:112-20.

Maggiore T. **2007**. Coltura e cultura: Il Mais. ART Servizi Editoriali S.p.A., Bologna

Mahana AL, Murray SC, Rooneyb LW, Crosbyc KM. **2013**. Combining Ability for Total Phenols and Secondary Traits in a Diverse Set of Colored (Red, Blue, and Purple) Maize. *Crop Science* 53:1248-1255.

Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Rispo A, Griffin M, Issekutz T, Quarantino S, Londei M. **2005**. Unexpected Role of Surface Transglutaminase Type II in Celiac Disease. *Gastroenterology* 129:1400-13.

Maiuri L, Troncone R, Mayer M, Coletta S, Picarelli A, de Vincenzi M, Pavone V, Auricchio S. **1996**. In vitro activities of A-gliadin related synthetic peptides: Damaging affect on the atrophic coeliac mucosa and activation of mucosal immune response in the treated coeliac mucosa. *Scand J Gastroenterol* 31:247-53.

Mäki M, Hallstrom Ö, Verronen P, Reunala T, Lähdeaho ML, Holm K, Visakorpi JK. **1988-b**. Reticulin antibody, arthritis, and coeliac disease in children. *Lancet* 1:479-80.

Mäki M, Kallonen K, Lahdeaho ML, Visakorpi JK. **1998-a**. Changing pattern of childhood coeliac disease in Finland. *Acta Paediatr Scand* 77:408-12.

McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. **2005**. Anthocyanins from red wine--their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phyto-chem* 66:2540-48.

McGhie TK, Walton MC. **2007**. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res* 51:702-13.

Mendoza-Díaz S, Ortiz-Valerio MDC, Castaño-Tostado E, Figueroa-Cárdenas JDD, Reynoso-Camacho R, Ramos-Gómez M, Campos-Vega R, Loarca-Piña G. **2012**. Antioxidant capacity and antimutagenic activity of anthocyanin and carotenoid extracts from nixtamalized pigmented creole maize races (*Zea mays* L.). *Plant Foods Hum Nutr* 67:442–9.

Molyneux P, Songklanakarin J. **2004**. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Sci Technol* 26:211-19.

Moreau M, Maria Siqueira EP. **2008**. Tossicologia analítica. Ed. Guanabara Koogan. Cap. 2-3.

Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, Murray L, Metzger MH, Gasparin M, Bravi E, Mäki M. Coeliac EU Cluster, Project Epidemiology. **2010**. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med* 42:587-95.

Mustalahti K, Collin P, Sievanen H, Salmi J, Mäki M. **1999**. Osteopenia in patients with clinically silent coeliac disease warrants screening. *Lancet* 354:744-45.

Nicholson RL, Hammerschmid R. **1992**. Phenolic compounds and their role in diseases resistance. *Annu Rev Phytopathol* 30:369-89.

O'Farrelly C, Marten D, Melcher D, McDougall B, Price R, Goldstein AJ, Sherwood R, Fernandes L. **1988**. Association between villous atrophy in rheumatoid arthritis and a rheumatoid factor and gliadin-specific IgG. *Lancet* 2:819-22.

Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. **1999**. The histopathology of celiac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11:1185-94.

Oomen AG, Rompelberg CJ, Bruil MA, Dobbe CJ, Pereboom DP, Sips AJ. **2003**. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Arch Environ Contam Toxicol* 44:281-7.

Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. **2002**. LC–MS analysis of anthocyanin from purple corn cob. *J Sci Food Agric* 82:1003-6.

Paulley JW. **1954**. Observations on the aetiology of idiopathic steatorrhoea. *Br J Med* 2:1318-21.

Pedreschi R, Cisneros-Zevallos L. **2007**. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). *Food Chem* 100:956–63.

Perez-Vicente A, Gil-Izquierdo A, Garcia-Viguera C. **2002**. *In Vitro* Gastrointestinal Digestion Study of Pomegranate Juice Phenolic Compounds, Anthocyanins, and Vitamin C. *J Agric Food Chem* 50:2308-12.

Piątek-Guziewicz A, Zagrodzki P, Paśko P, Krośniak M, Ptak-Belowska A, Przybylska-Feluś M, Mach T, Zwolińska-Wcisło M. **2017**. Alterations in serum levels of selected markers of oxidative imbalance in adult celiac patients with extraintestinal manifestations: a pilot study. *Pol Arch Intern Med* 127:532-39.

Prior RL, Wu X, Schaich K. **2005**. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290-303.

Ralph J, Quideau S, Grabber JH, Hatfield RD. **1994**. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *J Chem Soc Perkin* 1:3485-98.

Ramos FE, Muñoz AM, Alvarado OC, Alvarado A, Yañéz JA. **2012**. Purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. *J Med Foods* 15:206-15.

Ramos-Escudero F, Muñoz AM, Alvarado-Ortiz C, Alvarado A, Yáñez JA. 2012. Purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. *J Med Food* 15:206–15.

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 Radic Biol Med* 26:1231-37.

Real A, Comino I, de Lorenzo L, Merchán F, Gil-Humanes J, Giménez MJ, López-Casado MÁ, Torres MI, Cebolla Á, Sousa C, Barro F, Pistón F. 2012. Molecular and immunological characterization of gluten proteins isolated from oat cultivars that differ in toxicity for celiac disease. *PLoS One* 7:e48365.

Reddy MK, Alexander-Lindo RL, Nair MG. 2005. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *J Agric Food Chem* 53:9268–73.

Resat A, Mustafa O, Kubilay G, Esra C. 2016. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. *J Agric Food Chem* 64:1028-45.

Reunala T, Collin P. 1997. Diseases associated with dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 136:315-18.

Rodríguez SL, Wrolstad RE. 2001. Extraction, isolation and purification of anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley, New York, pp. 7–17.

Sakula J, Shiner M. 1957. Coeliac disease with atrophy of the small-intestine mucosa. *Lancet* 273:876-7.

Salinas-Moreno Y, Garcia-Salinas C, Ramirez-Diaz JL, Aleman-de la Torre I. 2017. Phenolic Compounds in Maize Grains and Its Nixtamalized Products, Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications. Ed. InTech, London, UK, pp.215-232.

Salinas-Moreno Y, Soto-Hernández M, Martínez-Bustos F, González-Hernández V, Ortega-Paczka R. **1999**. Analysis of anthocyanins in blue and red maize grains of four races. *Revista Fitotecnia Mexicana* 22:161-74.

Salmi TT, Hervoonen K, Kautiainen H, Collin P, Reunala T. **2011**. Prevalence and incidence of dermatitis herpetiformis: a 40-year prospective study from Finland. *Brit J Dermatol* 165:354-59.

Sangiovanni E, Di Lorenzo C, Colombo E, Colombo F, Fumagalli M, Frigerio G, Restani P, Dell'Agli M. **2015**. The effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the anti-inflammatory activity of *Vitis vinifera* L. leaves. *Food Funct* 6:2453-63.

Santos-Cervantes ME, Ibarra-Zazueta ME, Loarca-Piña G, Paredes-López O, Delgado-Vargas F. **2007**. Antioxidant and antimutagenic activities of *Randia echinocarpa* fruit. *Plant Foods Hum Nutr* 62:71–7.

Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PHR, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A. **2012**. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med* 10:13.

Shahidi F, Naczki M. **2004**. Biosynthesis, classification, and nomenclature of phenolics in food and nutraceuticals. In: Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press, Washington, DC pp:1-16

Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. **2002**. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 297:2275-79.

Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* 7:945-56.

Shipp J, Abdel-Aal E-SM. **2010**. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *Open Food Sci J* 4:7-22.

Silano M, Penas Pozo E, Uberti F, Manferdelli S, Del Pinto T, Felli C, Budelli A, Vincentini O, Restani P. 2014. Diversity of oat varieties in eliciting the early inflammatory events in celiac disease. *Eur J Nutr* 53:1177-86.

Silano M, Vincentini O, Luciani A, Felli C, Caserta S, Esposito S, Villella VR, Pettoello-Mantovani M, Guido S, Maiuri L. 2012. Early tissue transglutaminase-mediated response underlies K562(S)-cell gliadin-dependent agglutination. *Pediatr Res* 71:532-38.

Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Viticult* 16:144-58.

Sollid LM, Jabri B. 2005. Is celiac disease an autoimmune disorder? *Curr Opin Immunol* 17:595-600.

Sollid LM, Lie BA. 2005. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3:843-51.

Stepniak D, Koning F. 2006. Celiac disease-sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 67:460-8.

Van Heel DA, West J. 2006. Recent advances in coeliac disease. *Gut* 36: 864-74.

Versantvoort CH, Oomen AG, Van de Kamp E, Rompelberg CJ, Sips AJ. 2005. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem Toxicol* 43:31-40.

Vici G, Belli L, Biondi M, Polzonetti V. 2016. Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clin Nutr* 35:1236-41.

Volta U, Granito A, Fiorini E, Parisi C, Piscaglia M, Pappas G, Muratori P, Bianchi FB. 2008. Usefulness of antibodies to deamidated gliadin peptides in celiac disease diagnosis and follow-up. *Dig Dis Sci* 53:1582-8.

Volta U. 2003. Autoanticorpi nella celiachia: marcatori di malattia e di patologia autoimmune associata. *Ligand Assay* 8:89-97.

Wieser H, Koehler P. **2008**. The biochemical basis of celiac disease. *Cereal Chem* 85:1-13.

Yang Z, Zhai W. **2010**. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innov Food Sci Emerg* 11:470-6.

Yoshimoto M, Okuno S, Yamaguchi M, Yamakawa O. **2001**. Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:1652–5.

Yousuf B, Gul K, Wani AA, Singh P. **2016**. Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems. A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 56:2223-30.

Zhang Z, Zhou B, Wang H, Wang F, Song Y, Liu S, Xi S. **2014**. Maize purple plant pigment protects against fluoride-induced oxidative damage of liver and kidney in rats. *Intl J Environ Res Public Health* 11:1020–33.

Žilić S, Serpen A, Akillioğlu G, Gökmen V, Vančetović J. **2012**. Phenolic compounds, Carotenoids, Anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *J Agric Food Chem* 60:1224-31.

Sitografia

AIC: Associazione Italiana Celiachia. Disponibile al sito: <http://www.celiachia.it/home/HomePage.aspx>. Ultima consultazione: luglio 2019

FDA, *Food and Drug Administration*, 2018, Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Disponibile al sito: <https://www.fda.gov/media/70858/download>. Ultima consultazione: maggio 2019

Ministero della Salute – Relazione annuale al parlamento anno 2017. Disponibile al sito: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2808_allegato.pdf. Ultima consultazione: agosto 2019