

## Composizione e caratterizzazione della farina biologica del Mulino Bencivenga – Alvignano (CE)

Lo studio è stato condotto nei laboratori di 2 Istituti del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR): l'Istituto di Scienze dell'Alimentazione (ISA) di Avellino e l'Istituto di Biologia Agro-ambientale e Forestale (IBAF) di Napoli.

La farina fornita dal Mulino è stata analizzata nei laboratori dei due Istituti e di seguito vengono esposti i risultati con le metodologie utilizzate:

### Risultati

#### FARINA BIOLOGICA MULINO BENCIVENGA

ANALISI	RISULTATO
Umidità (%)	12,16
Ceneri (%)	1,06
Proteine (%)	8,63
Lipidi (%)	1,64
Polifenoli totali (mgGAE/L)	8
DPPH (%)	85,7

### Metodi analitici utilizzati:

#### Determinazione del contenuto di acqua

(Balestrieri F., Marini D., (1996). *Metodi di analisi chimica dei prodotti alimentari*. Monolite Editrice, Roma).

Il contenuto di acqua libera nei campioni è stato determinato mediante essiccamento in stufa a 100°C per 48 ore di una aliquota di campione omogenizzato, fino al raggiungimento del peso costante. La perdita di peso corrisponde alla perdita di umidità. Il risultato è stato espresso in percentuale.

#### Determinazione delle ceneri

2,67 g di campione vengono posti in un crogiuolo portato a peso costante. Il tutto si pone in muffola a 600°C per un'intera notte.

Peso residuo (ceneri): 28,2 mg

Contenuto ceneri: 1,06%

### **Contenuto di azoto totale**

*(Metodo Kjeldhal)*

Per la determinazione del contenuto di azoto totale si segue il metodo di Kjeldhal. Nel metodo si distinguono tre fasi, una fase di digestione (o mineralizzazione), una fase di distillazione dell'ammoniaca e una fase di determinazione quantitativa dell'ammoniaca prodotta.

Vengono utilizzati i seguenti reagenti:

- Acido solforico 96%
- Perossido di idrogeno 30%
- Catalizzatore costituito da Solfato di Potassio e Selenio
- Idrossido di Sodio 30% (m/v)
- Acido Borico 1% (m/v)
- Acido Cloridrico 0,1 N
- Indicatore rosso metile/verde di bromocresolo

Nella fase di digestione si mineralizza tutto l'azoto contenuto nel campione di analisi. Vengono pesati circa 1 grammo di parte edibile di campione precedentemente omogenizzato e vengono addizionati 10 mL di acido solforico 96% e una pastiglia di catalizzatore. Il campione viene riscaldato tramite piastra riscaldante ad alta temperatura (circa 400°C) in un digestore per 40 minuti. Una volta raffreddato al campione vengono aggiunti 5 mL di perossido di idrogeno 30% e si riscalda nuovamente. Questo processo trasforma tutto il materiale organico in anidride carbonica ed acqua, che evapora, e tutto l'azoto presente nel campione in solfato d'ammonio. Si lascia raffreddare e si esegue la fase di distillazione.

La distillazione viene effettuata in corrente di vapore tramite l'induzione di un getto di vapore acqueo nel pallone con il campione a cui sono stati aggiunti 50 mL di acqua distillata e 50 mL di idrossido di sodio 30%. Nella beuta di raccolta vengono posti 25 mL di acido borico 1% e 4 gocce di indicatore.

Una volta distillato il campione viene titolato con acido cloridrico 0,1N fino al viraggio dell'indicatore.

Per il calcolo delle proteine si applica la seguente formula:

$$\% \text{ proteine} = (V * 0,14 * 6,25)/g$$

dove: V= volume in mL di acido cloridrico 0,1N utilizzati per la titolazione

0,14 = grammi di azoto titolati da 1 mL di acido solforico

6,25 = fattore di conversione per le proteine

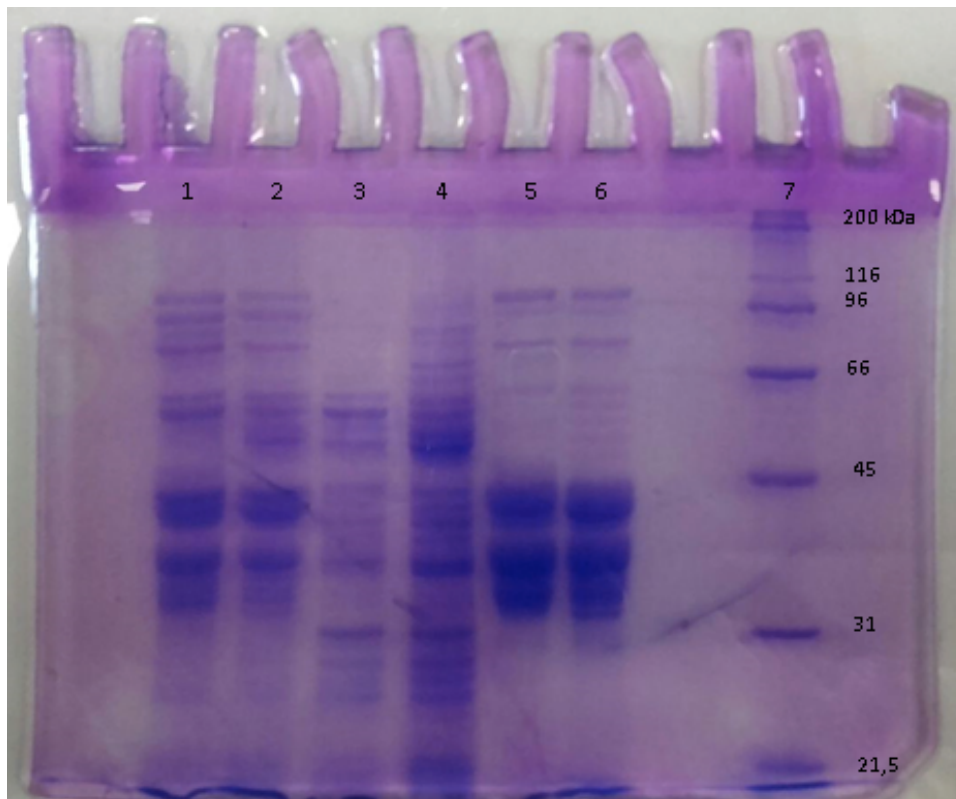
g = grammi del campione sottoposto ad analisi

## Analisi elettroforetica delle proteine della farina

Campioni esaminati: Farina biologica e farina commerciale

I campioni vengono esaminati mediante la tecnica SDS-PAGE al 10% di acrilammide:

- 1) Proteine totali farina commerciale
- 2) Proteine totali biologica
- 3) Proteine solubili farina commerciale
- 4) Proteine solubili biologica
- 5) Proteine insolubili farina commerciale
- 6) Proteine insolubili biologica
- 7) Standard di peso molecolare



Soluzioni impiegate

Sol A: NaCl 0,5 M

Sol B: 80 mM Tris-HCl pH 8,5, 50% isopropanolo, 20 mM DTT

Sol C: 330 mM Tris-HCl pH 7,2% SDS, 10% glicerolo

Sol D: 25 mM Tris-HCl pH 8,5, 6M urea, 2% SDS

Le prime tre soluzioni hanno lo scopo di separare le proteine solubili (albumine e globuline) dalle insolubili (gliadina e glutenina), mentre la quarta solubilizza tutte le proteine. Pertanto, sono stati preparati 3 campioni per ogni tipo di farina.

### **Preparazione campioni di proteine solubili.**

1go mg di farina si sospendono in 1,5 ml di soluzione A. Si centrifuga ed il supernatante viene utilizzato per l'elettroforesi e per il dosaggio delle proteine.

### **Preparazione campioni di proteine insolubili.**

Il residuo solido rimasto dalla centrifugazione si sospende in 1,5 ml di soluzione B. Si centrifuga ed al supernatante viene aggiunto acetone. In questo modo si ha la precipitazione delle proteine insolubili. Si centrifuga ed il residuo solido si solubilizza nella soluzione C.

Tale soluzione viene utilizzata per l'analisi elettroforetica.

### **Preparazione campioni di proteine totali.**

100 mg di farina si sospendono in 4 ml di soluzione D. La soluzione si bolle per 5 minuti. Si centrifuga ed il supernatante viene utilizzato per l'analisi elettroforetica.

### **Commento del risultato**

Le maggiori differenze si riscontrano a livello delle proteine solubili. Il campione proveniente da farina biologica ne possiede un maggior contenuto. Anche il pattern delle proteine insolubili appare lievemente diverso per i campioni di farina biologica.

**Determinazione delle proteine solubili (albumine e globuline):** metodo Bradford (reattivo BioRad)

Il saggio viene eseguito sui campioni utilizzati per l'elettroforesi. Ai campioni diluiti 1:10 si aggiunge il reattivo di Bradford. La reazione è immediata e l'assorbimento del colore blu sviluppato viene letto a 595 nm.

Mediante una retta di taratura costruita utilizzando BSA allo 0,1% si risale alla quantità di proteine nei campioni.

**Farina commerciale:** 9,73 mg proteine solubili/g di farina

**Farina biologica:** 19,7 mg proteine solubili/g di farina

### **Estrazione lipidi totali**

*(Metodo Soxhlet)*

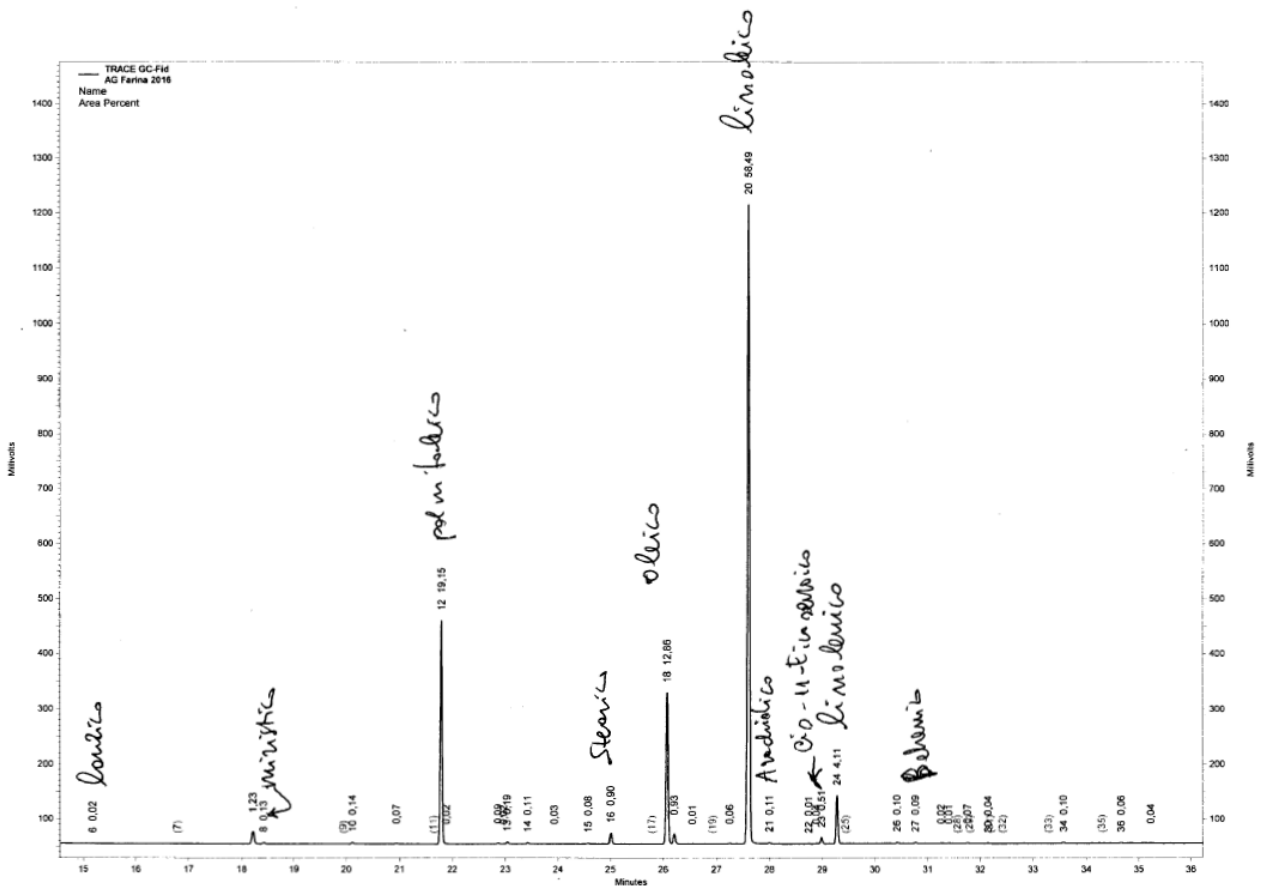
Il contenuto di lipidi totali è stato determinato mediante metodo Soxhlet. Circa 20 grammi di campione sono stati pesati direttamente in un ditale su un fondo di solfato di sodio anidro e coperto con uno strato dello stesso sale. L'estrazione è effettuata con etere dietilico in apparato Soxhlet per 6 ore. Il solvente è allontanato al Rotavapor, utilizzando un pallone della capacità idonea e previamente pesato. L'estratto viene poi posto in essiccatore prima di essere pesato.

### **Determinazione del profilo acido**

*(AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Fat (Total, Saturated, and Unsaturated) in Foods. HydrolyticExtraction Gas Cromatographic Method. Official Method 996.06)*

Gli estratti lipidici sono sottoposti a transesterificazione dei trigliceridi (AOAC 996.06), per ottenere gli esteri metilici degli acidi grassi. Circa 200 mg di estratto lipidico è posto in vials con tappo a vite con 2 mL di soluzione acido cloridrico –metanolo 1.25 M HCl per GC (Fluka) e quindi posto in bagno termostatico a 100°C per 60 minuti. Dopo rapido raffreddamento sono stati aggiunti 2 mL di acqua distillata e 2 mL di *n*-esano ad alto grado di purezza (Carlo Erba). Il campione è stato quindi agitato con vortex e centrifugato a 5000 rpm per 10 minuti, si preleva la fase esanica, si aggiunge solfato sodico, e il composto è così pronto per l'analisi al gas cromatografo (Gasromatografo TRACE GC (Thermo) equipaggiato con rivelatore FID e Autocampionatore AS 3000 (Thermo)).

La determinazione gas-cromatografica è stata effettuata mediante una colonna capillare Supelco SP-2560 (100 m x 0.25 mm, 0.20 µm) programmata: 140°C (5 min) fino a 240°C a 4°C/min, utilizzando come carrier l'elio, Fid: 260°C; secondo quanto previsto nel metodo AOAC 996.06.



**Tabella 1. Viene riportata la % degli acidi grassi, la sommatoria degli acidi grassi saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA), polinsaturi (PUFA) e il rapporto PUFA/SFA e oleico/linoleico.**

<b>N.</b>	<b>Component, Area %</b>	<b>1</b>
1	Butyric C4:0	0,1
2	Caproic C6:0	0,1
3	Caprylic C8:0	0,00
4	Capric C10:0	0,00
5	Undecanoic C11:0	0,00
6	Lauric C12:0	0,02
7	Tridecanoic C13:0	0,00
8	Myristic C14:0	1,23
9	Myristoleic C14:1	0,00
10	Pentadecanoic C15:0	0,00
11	cis-10-Pentadecenoic C15:1	0,00
12	Palmitic C16:0	0,00
13	Palmitoleic C16:1	19,15
14	Heptadecanoic C17:0	0,00
15	cis-10-Heptadecenoic C17:1	0,00
16	Stearic C18:0	0,90
17	Elaidic C18:1 n9t	0,00
18	Oleic C18:1 n9c	12,86
19	Linolelaidic C18:2 n6t	0,00
20	Linoleic C18:2 n6c	58,49
21	Arachidic C20:0	0,11
22	$\gamma$ -Linolenic C18:3 n6	0,00
23	cis-11-Eicosenoic C20:1	0,51
24	Linolenic C18:3 n3	4,11
25	Heneicosanoic C21:0	0,00
26	cis-11,14-Eicosadienoic C20:2	0,00
27	Behenic C22:0	0,09
28	cis-8,11,14-Eicosatrienoic C20:3 n6	0,00
29	Erucic C22:1 n9	0,00
30	cis-11,14,17- Eicosatrienoic C20:3 n3	0,00
31	Arachidonic C20:4 n6	0,00
32	Tricosanoic C23:0	0,00
33	cis-13,16-Docosadienoic C22:2	
34	Lignoceric C24:0	
35	cis-5,8,11,14,17-eicosapentanoic C20:5 n3	0,25
36	Nervonic C24:1	0,06
37	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic C22:6 n3	
<b><math>\Sigma</math>-SFA</b>		<b>2,55</b>
<b><math>\Sigma</math>-MUFA</b>		<b>32,58</b>
<b><math>\Sigma</math>-PUFA</b>		<b>62,85</b>
<b><math>\Sigma</math>-PUFA/<math>\Sigma</math>-SFA</b>		<b>24,65</b>
<b>Oleic C18:1 n9c/Linoleic C18:2 n6c</b>		<b>0,22</b>

## Commento al risultato

Il profilo degli acidi grassi è caratterizzato da un'elevata presenza di acidi grassi insaturi, sia mono ma soprattutto polinsaturi. Infatti i maggiori componenti sono rappresentati dall'acido oleico (12,86%), dal linoleico (58,49%) e dal linolenico (4,11%).

L'acido oleico è un acido grasso monoinsaturo costituito da 18 atomi di carbonio (18:1). Appartiene alla famiglia degli Omega-9 che abbassa i livelli di LDL lasciando HDLs liberi di pulire le arterie. Il linoleico in particolare è uno degli acidi grassi essenziali e appartiene al gruppo degli Omega 6 ed è il precursore fondamentale di alcuni bioregolatori endogeni: le prostaglandine, che svolgono una funzione molto importante nei processi infiammatori e trombotici, coinvolti nella coagulazione del sangue. Uno degli effetti benefici dell'acido linoleico è senz'altro quello legato all'abbassamento del colesterolo.

L'acido alfa linolenico è un acido grasso essenziale appartenente al gruppo degli Omega 3. Le funzioni principali che svolge l'acido alfa linolenico sono di tipo antiaggregante, vasoprotettiva e anti trombotica. Questo acido grasso viene infatti incorporato nelle membrane plasmatiche delle cellule e in caso di rottura delle stesse a causa di processi traumatici, infettivi od infiammatori, da origine a sostanze (citochine) che esplicano le suddette funzioni. In pratica, l'acido alfa linolenico riduce il livello di viscosità delle piastrine alterandone il potenziale aggregante.

## Gli Indici Nutrizionali

Vengono di seguito riportati gli indici di qualità nutrizionale, calcolati per caratterizzare e sintetizzare i principi salutistici e nutrizionali di ciascuna dieta.

### INDICE DI ATEROGENICITÀ (IA)

L'IA prende in considerazione i grassi monoinsaturi e distingue anche tra differenti tipi di acidi grassi nel calcolare il potenziale aterogenico della dieta. I valori di riferimento da considerare nella scelta dei piatti per tale indice sono compresi tra 0,01 e 0,31.

Come si vede dalla Tabella 2, il valore IA per la farina esaminata è di 0,06.

### INDICE DI TROMBOGENICITÀ (IT)

L' IT attribuisce differente peso ai diversi acidi grassi  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 in accordo con il loro potere antitrombogenico e include anche acidi grassi monoinsaturi. I valori di riferimento da considerare nella scelta dei piatti per tale indice sono compresi tra 0,20 e 0,57, nella farina esaminata tale indice è pari a 0,04.

**Tabella 2: Indici di aterogenicità (IA) e di trombogenicità (IT)**

IA	0,06
IT	0,04

## Commento

I valori riscontrati indicano che il campione esaminato è caratterizzato da indici salutistici e nutrizionali.

## **Determinazione dei polifenoli totali**

*(L.Alvarez, 2010)*

- **Estrazione**

Sono stati pesati 1,258 g di farina e sono stati aggiunti 25mL di metanolo. La soluzione è stata omogenizzata per due minuti all'ultra Turrax, successivamente vortexata per 5 minuti e centrifugata per 10 minuti a 2000 rp. Sono stati poi prelevati 10 mL di surnatante e filtrati.

Il contenuto totale di polifenoli è stato calcolato con il metodo di Folin-Ciocalteau. 100 µL di estratto, 100µL, 100 µL di Folin (TQ) e 700 µL di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sono stati miscelati in una falcon. La miscela è stata vortexata, incubata al buio per 20 minuti e centrifugata per 3 minuti a 2000 rp. L'Abs del surnatante è stata misurata a 735 nm contro un bianco costituito da metanolo.

Il contenuto di polifenoli totali è stato espresso in riferimento ad una retta di calibrazione ( $y= 0,02-0,038$ ) costruita usando quale standard l'acido gallico. I risultati finali sono stati espressi, per ciascun campione, come mg di acido gallico equivalente (GAE) su L di campione.

## **Determinazione dell'attività antiossidante (DPPH)**

*(L.Alvarez, 2010)*

- **Estrazione**

Sono stati pesati 1,258 g di farina e sono stati aggiunti 25mL di metanolo. La soluzione è stata omogenizzata per due minuti all'ultra Turrax, successivamente vortexata per 5 minuti e centrifugata per 10 minuti a 2000 rp. Sono stati poi prelevati 10 mL di surnatante e filtrati.

La miscela di reazione è costituita da 500 µL di campione diluito e 500 µL di DPPH (0,05 mg/mL). Il DPPH è stato preparato in un matraccio da 10 mL ( 0,05:1mL=x:10mL) e portato a volume con il metanolo. L'assorbanza del DPPH appena preparato, è stata letta prima delle analisi a 515nm e il valore deve essere compreso tra 1 e 1,2. Dopo aver vortexato, la miscela di reazione è stata incubata per 30 minuti al buio e successivamente è stata letta l'assorbanza a 515 nm contro un bianco costituito da metanolo.

I risultati sono stati espressi come rapporto percentuale dell'assorbanza del campione che diminuisce relativamente all'assorbanza del DPPH in assenza di estratto, a 515 nm. E' stata applicata la seguente formula:

$$\text{Abs DPPH} - \text{Abs campione} : \text{Abs DPPH} \times 100$$

## **Commento ai risultati**

I valori di polifenoli totali contenuti nella farina e l'attività antiossidante determinata con il metodo del DPPH indicano un discreto contenuto di molecole bioattive a cui fa riscontro anche una buona attività anti radicali liberi.