

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA IN

TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI

**Determinazione dei composti fenolici liberi e legati in farina di teff mediante
HPLC-ESI-TOF-MS**

Tesi in

31580 TECNOLOGIE DEI CEREALI E DERIVATI

Relatore:

Chiar.mo Prof. Giangaetano Pinnavaia

Correlatori:

Prof.ssa Maria Fiorenza Caboni

Dott.ssa Elixabet Díaz-de-Cerio

Dott. Vito Verardo

Candidato: Elisabetta Stopponi

Matricola N° 800913

Anno Accademico 2018/2019

Sessione unica

Sommario

Capitolo 1: Introduzione	1
Capitolo 2: Il teff.....	2
2.1 Botanica	2
2.1.1 Tassonomia, origini e varietà	2
2.1.2 Coltivazione e diffusione	4
2.1.3 Raccolta e stoccaggio.....	5
2.1.4 Morfologia	6
2.1.5 Anatomia.....	6
2.2 Composizione.....	7
2.2.1 Carboidrati	8
2.2.2 Proteine	9
2.2.3 Lipidi.....	10
2.2.4 Minerali.....	10
2.2.5 Composti bioattivi.....	11
2.3 Usi.....	16
2.3.1 Utilizzi tradizionali	17
2.3.2 Prodotti contenenti glutine.....	18
2.3.3 Prodotti senza glutine.....	19
Capitolo 3: Materiali e metodi	24
3.1 Campioni.....	24
3.2 Reagenti	24
3.3 Determinazione dei fenoli totali mediante saggio al reattivo di Folin-Ciocalteu	24
3.4 Estrazione dei fenoli liberi	25
3.5 Estrazione dei fenoli legati.....	25
3.6 Analisi mediante HPLC-ESI-TOF-MS	26
Capitolo 4: Risultati e discussione	28
4.1 Identificazione e quantificazione dei fenoli liberi.....	28
4.2 Identificazione e quantificazione dei fenoli legati	34
Capitolo 5: Conclusioni	37
Bibliografia	38

Capitolo 1: Introduzione

Il teff o tef è uno pseudocereale originario dell'Etiopia, dove è largamente utilizzato nell'alimentazione delle popolazioni locali, e che ne rappresenta il primo produttore mondiale (Lee, 2018).

Nel 2017, il teff copriva il 24% della superficie nazionale destinata alla coltivazione dei cereali ed era concentrato nelle regioni Amhara e Oromia, che contribuivano per l'87,8% alla produzione totale (Lee, 2018).

Secondo Berhane et al. (2011), tra il 2001 e il 2007 il teff soddisfaceva circa l'11% del fabbisogno calorico giornaliero della popolazione etiopica, mentre il consumo annuale pro capite ammontava a 61 kg nelle zone urbane contro appena 20 kg nelle aree rurali (Crymes, 2015).

Il crescente interesse per questo cereale è legato alla sua composizione nutrizionale che presenta un buon quantitativo di proteine e amminoacidi essenziali, carboidrati complessi a lento assorbimento, fibra, minerali, acidi grassi essenziali e sostanze fenoliche (Yilmaz e Arslan, 2018). Infine, l'assenza di glutine rende il teff una valida alternativa al frumento nella realizzazione di pane, pasta e altri prodotti da forno destinati ai malati di celiachia (Zhu, 2018).

Oltre a ciò, l'utilizzo di cereali e pseudocereali alternativi ad frumento nella realizzazione di prodotti da forno lievitati e non e di paste secche e fresche è ormai prassi consolidata e in continuo sviluppo, sia in Italia, sia a livello europeo e mondiale.

I dati quali e quantitativi attualmente disponibili riguardanti il profilo fenolico del teff (*Eragrostis tef*) sono estremamente carenti, pertanto la sua composizione fenolica rimane ancora parzialmente sconosciuta.

Questo cereale, tuttavia, presenta numerose caratteristiche positive che potrebbero renderlo un ingrediente adatto alla formulazione di prodotti funzionali (es. senza glutine o a basso indice glicemico), in quanto miglioratore delle caratteristiche organolettiche e/o tecnologiche del prodotto stesso.

Pertanto, lo scopo di questo lavoro è la determinazione dei composti fenolici liberi e legati in una farina di teff. L'identificazione e la quantificazione di tali composti è stata effettuata attraverso la combinazione della cromatografia liquida ad alte prestazioni e la spettrometria di massa con analizzatore a tempo di volo (HPLC-ESI-TOF-MS).

Capitolo 2: Il teff



Figura 1. Teff (Eragrostis tef). (Fonte: www.cnnspanol.cnn.com)

Il teff o tef (*Eragrostis tef*) è un pseudocereale appartenente alla famiglia delle *Poaceae* (Bultosa, 2016). Originario dell’Etiopia, che rappresenta il primo produttore mondiale di teff, è largamente utilizzato nell’alimentazione delle popolazioni locali (Lee, 2018).

Grazie alle sue notevoli capacità di resistenza alla siccità e all’attacco di parassiti, è stato possibile adattare la coltivazione del teff a differenti condizioni climatiche (Gebremariam et al., 2014), perciò negli ultimi anni si sta diffondendo anche in altri Paesi come Sud Africa, USA, India e Australia (Zhu, 2018).

Il crescente interesse per questo cereale è legato alla sua composizione nutrizionale, che prevede un buon quantitativo di proteine e amminoacidi essenziali, carboidrati complessi a lento assorbimento, fibra, minerali, acidi grassi essenziali e sostanze fenoliche (Yilmaz e Arslan, 2018). Infine, l’assenza di glutine rende il teff una valida alternativa al frumento nella realizzazione di pane, pasta e altri prodotti da forno destinati all’alimentazione della popolazione affetta da celiachia (Zhu, 2018).

2.1 Botanica

2.1.1 Tassonomia, origini e varietà

Il teff è una pianta annuale di origine tropicale, autogama e tetraploide, con un numero di cromosomi pari a 40 (Bultosa, 2004). Appartiene alla famiglia delle *Poaceae*, sottofamiglia *Chloridoideae* o *Eragrostoidae*, genere *Eragrostis*, specie *E. tef* (Akansha et al., 2018).

Il genere *Eragrostis* comprende circa 300 specie, delle quali il teff è l'unica attualmente coltivata (Bultosa, 2004).

Si ritiene che in origine il teff sia stato addomesticato dalle popolazioni pre-semitiche che abitavano l'Etiopia, tuttavia non è ben chiaro da quali specie parentali diploidi sia stato generato. (Bultosa, 2004). Attualmente, l'Ethiopian Institute of Biodiversity conserva oltre 5000 accessioni relative a questa specie, che testimoniano un'ampia variabilità nella morfologia (es. colore e forma del seme, altezza della pianta, conformazione della pannocchia, numero di spiglette), nelle caratteristiche agronomiche (es. durata delle fasi fenologiche, resa del raccolto) e nella composizione chimica del seme (es. contenuto proteico).

A scopo commerciale, le diverse cultivar sono distinte sulla base del colore esterno della cariosside, che varia dal bianco al marrone scuro (Figura 2). In Etiopia sono diffuse principalmente tre varietà: bianca (*nech*), rossa o marrone (*quey*) e mista (*sergegna*). La varietà più chiara può essere ulteriormente suddivisa in *nech* (bianca) e *magna* (molto bianca) (Akansha et al., 2018).



Figura 2. Diverse varietà di teff: (a) DZ-01-196 (bianca) (b) DZ-Cr-37 (crema) (c) DZ-01-99 (marrone chiaro) (d) sudafricana (marrone scuro). (Fonte: Bultosa, 2004)

Le cultivar chiare presentano un sapore più dolce e delicato, simile alla noce, mentre quelle scure hanno un aroma di nocciola più marcato (Lovis, 2003).

La varietà più chiara (*magna*) richiede le condizioni di crescita più rigorose, perciò può essere coltivata esclusivamente sugli altopiani etiopi, viene venduta al prezzo più alto ed è considerata la tipologia più prestigiosa di teff, tradizionalmente destinata alle famiglie più facoltose. Non a caso, negli ultimi anni numerosi agricoltori locali si sono orientati verso questa varietà, a discapito delle altre più scure, soprattutto nella zona di Addis Abeba, capitale dell'Etiopia nonché crocevia del commercio di teff (Lee, 2018).

Come tutte le piante C₄, il teff è in grado di assimilare efficacemente CO₂ durante la fotosintesi, perciò si ritiene che possa contribuire a combattere il surriscaldamento globale (Zhu, 2018).

2.1.2 Coltivazione e diffusione



Figura 3. Coltivazioni di teff in Africa. (Fonte: www.commonswikimedia.org)

Rispetto alla maggior parte dei cereali, il teff è una coltura in grado di adattarsi a condizioni ambientali avverse come siccità, suoli argillosi scarsamente drenati, climi difficili e terreni poveri di sostanze nutritive (Assefa et al. 2015). È in grado di crescere a diverse altitudini, dal livello del mare ai 3000 m s.l.m. (Bultosa, 2004). Grazie a queste caratteristiche, la sua coltivazione si è diffusa dall’Etiopia in numerosi Paesi del mondo quali Australia, Camerun, Canada, Cina, India, Olanda, Sud Africa, Regno Unito, Uganda e USA (Lee, 2018).

Ad esempio, è una delle varietà di miglio più coltivate in India, dove l’imprevedibilità del clima monsonico richiede specie dal ciclo produttivo breve, resistenti alla siccità e ad elevate temperature (Michaelraj e Shanmugam, 2013).

Tuttavia, le condizioni ideali per la coltivazione del teff prevedono un’altitudine di 1800-2100 m s.l.m., temperature comprese tra 10 e 27°C, 750-850 mm di precipitazioni annuali e 450-550 mm di piogge durante la crescita (Bultosa, 2004).

D’altra parte, in Etiopia la resa della coltura è piuttosto bassa, se paragonata ad altre specie ivi diffuse come mais e sorgo: la media nazionale si colloca sulle 1.664 tonnellate per ettaro (ton ha⁻¹), contro le 3.675 ton ha⁻¹ del mais o le 2.525 ton ha⁻¹ del sorgo.

Ciò è dovuto a un’agricoltura ancora rudimentale: scarso impiego di varietà migliorate geneticamente, frammentazione delle aree coltivate, basso livello di meccanizzazione, consistenti perdite del raccolto e mancanza di investimenti pubblici nella ricerca sono i principali ostacoli (Lee, 2018).

2.1.3 Raccolta e stoccaggio

La raccolta del teff avviene quando le parti vegetative e riproduttive della pianta virano al giallo: dopo 45-60 giorni per una maturazione molto precoce, 60-120 giorni per una maturazione precoce e 120-160 giorni per una maturazione più tardiva.

Tradizionalmente, in Etiopia la raccolta viene effettuata a mano, mediante una falce, e le pannocchie sono collocate in una serie di vasche e conservate all'aria aperta, in luoghi ombreggiati, in attesa di essere trebbiate. La separazione della cariosside dal resto della pianta può avvenire manualmente con dei bastoni, oppure mediante l'utilizzo di buoi che calpestano le pannocchie.

Il cereale viene tradizionalmente vagliato all'aria aperta, con l'ausilio di un rettangolo di pelle essiccata, chiamato *afarsa* o *hafarsaa* (Bultosa, 2004). In fase di vagliatura si verificano notevoli perdite dovute alle ridotte dimensioni e alla piccola massa del cereale, che si disperde facilmente insieme alla pula (Figura 4).

Le cariossidi sono infine stoccate in vasi o sacchi, all'interno di piccole capanne chiamate *gotera* o *gotaara*. Durante lo stoccaggio, il teff è particolarmente resistente all'attacco dei Curculionidi ed altri insetti infestanti le derrate, perciò si presta ad essere conservato più a lungo rispetto alla gran parte dei cereali (Bultosa, 2004; Gebremariam et al., 2014).



Figura 4. Raccolta e trebbiatura tradizionale del teff in Etiopia.
(Fonti: www.commonswikimedia.org; Getty Images)

2.1.4 Morfologia

Con una lunghezza compresa tra 0,9 e 1,7 mm e un diametro tra 0,7 e 1,0 mm, il teff è considerato uno dei cereali più piccoli al mondo. Dopo la trebbiatura la cariosside, di forma ovale, si presenta nuda, cioè priva delle glumette esterne (Bultosa, 2004), ma le sue piccole dimensioni impediscono la separazione del germe dall'endosperma durante la molitura (Akansha et al., 2018). Il colore esterno varia tra il bianco avorio, il marrone scuro e il rosso, a seconda della varietà; la massa della cariosside è generalmente inferiore a 2 mg (0,6 – 0,8 % della massa media di una cariosside di frumento) (Bultosa, 2004).



Figura 5. A sinistra: cariossidi di teff (Fonte: ALAMY per www.fashion.telegraph.co.uk). A destra: spighe di teff (Fonte: www.commons.wikimedia.org).

2.1.5 Anatomia

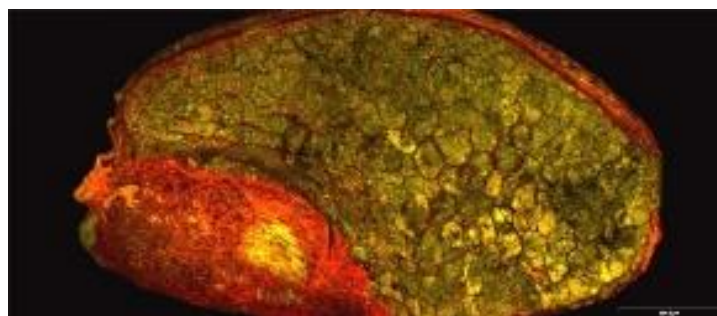


Figura 6. Sezione longitudinale di una cariosside di teff con germe ed endosperma, ottenuta con microscopio a scansione elettronica (SEM). (Fonte: Helbing, 2009)

La cariosside del teff presenta un pericarpo esterno membranoso, analogo alla crusca del frumento, contenente granuli di amido. Adiacente al pericarpo si trova la “testa”, caratterizzata da un contenuto di tannini rilevante solo in alcune varietà. Procedendo verso l’interno si incontrano lo strato aleuronico e il germe, entrambi ricchi in lipidi e proteine.

La parte più interna è l’endosperma, che rappresenta la quota preponderante della cariosside e può essere ulteriormente suddivisa in due strati: lo strato più esterno è vetroso e contiene la maggior

parte delle proteine e pochi granuli di amido, mentre lo strato più interno contiene in prevalenza amido e una piccola quota proteica (Bultosa, 2014).

2.2 Composizione

La composizione nutrizionale del teff può variare notevolmente a seconda delle condizioni ambientali di coltivazione, della tipologia di suolo, dei fertilizzanti impiegati e della cultivar. Una sintesi delle quantità relative ai principali componenti, determinati sul cereale crudo, è riportata in Tabella 1.

NUTRIENTE	Unità di misura	Valore per 100 g
Energia	kcal	367
Acqua	g	8,82
Proteine	g	13,30
Lipidi, totali	g	2,38
Acidi grassi saturi	g	0,449
Acidi grassi monoinsaturi	g	0,589
Acidi grassi polinsaturi	g	1,071
Carboidrati (per differenza)	g	73,13
Fibra alimentare, totale	g	8,0
Zuccheri, totali	g	1,84
MINERALI		
Calcio, Ca	mg	180
Ferro, Fe	mg	7,63
Magnesio, Mg	mg	184
Fosforo, P	mg	429
Potassio, K	mg	427
Sodio, Na	mg	12
Zinco, Zn	mg	3,63
VITAMINE		
Tiamina	mg	0,390
Riboflavina	mg	0,270
Niacina	mg	3,363

Vitamina B6	mg	0,482
Vitamina E (α -tocoferolo)	mg	0,08
Vitamina K (fillochinone)	μ g	1,9

Tabella 1. Composizione media della cariosside di teff cruda. (Fonte: USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 1 aprile 2018)

2.2.1 Carboidrati

Il quantitativo totale di carboidrati può variare tra il 57 e l'86%, ma in genere si colloca tra gli 83-86g per 100g di prodotto crudo e comprende monosaccaridi, disaccaridi, oligosaccaridi, polisaccaridi e fibra alimentare (Yilmaz e Arslan, 2018).

2.2.1.1 Amido

L'amido rappresenta la componente preponderante del cereale (>70% s.s.). È costituito da granuli poligonali e composti, di piccole dimensioni (2-6 μ m di diametro) (Emmambux e Taylor, 2013), lisci e privi di canali o pori superficiali. Alcuni sono piuttosto cubici e ad elevato ingrandimento mostrano una conformazione a guscio di tartaruga (Figura 7) (Bultosa, 2014).

Come in tutti i cereali, i granuli allo stato nativo sono in forma semi-cristallina e l'analisi ai raggi X rivela una diffrazione di tipo A.

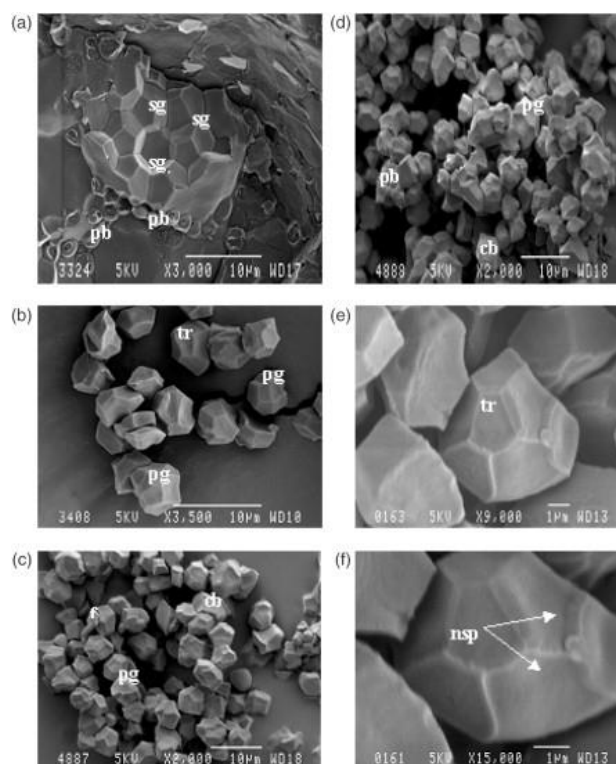


Figura 7. Granuli di amido composti (a) e singoli (b-f) di diverse varietà di teff: a, b) Sudafricana marrone (c) DZ-01-1681, (d-f) DZ-01-196 (sg = granuli di amido, pg = poligonali, cb = cubici, tr = guscio di tartaruga, pb = proteine, f = fibra, nsp = senza pori superficiali). (Fonte: Bultosa, 2004)

In tutti i vegetali, l'amido è composto da due tipologie di molecole: amilosio (lineare) e amilopectina (ramificata). Il rapporto quantitativo tra di esse dipende dall'origine botanica dell'amido e determina alcune proprietà fisico-chimiche del cereale.

Nel teff, i pesi molecolari dell'amilosio e dell'amilopectina variano rispettivamente da $1,0 \times 10^6$ a $1,3 \times 10^6$ e da $10,1 \times 10^7$ a $16,5 \times 10^7$ (Bultosa et al., 2008).

Il contenuto di amilosio è compreso tra il 20 e il 30% e la temperatura di gelatinizzazione dell'amido, determinata mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC), si colloca tra i 66 e gli 81°C, leggermente superiore a quella della maggior parte dei cereali (Bultosa, 2014).

Le catene lineari di amilosio sono in grado di formare con gli acidi grassi un complesso che ostacola l'attacco dell'amido da parte degli enzimi idrolitici e ne riduce la digeribilità.

Per tali ragioni, il teff è considerato un cereale a basso indice glicemico e quindi particolarmente indicato nella dieta della popolazione affetta da diabete (Yilmaz e Arslan, 2018).

Un'altra conseguenza del rilevante contenuto di amilosio è la bassa tendenza alla retrogradazione, proprietà che può trovare applicazione nella formulazione di numerosi alimenti cotti e refrigerati (Bultosa, 2014).

2.2.1.2 Fibra

Il quantitativo totale di fibra insolubile (intesa come la componente glucidica resistente alla digestione e all'assorbimento nell'intestino tenue, fermentescibile o non fermentescibile a livello dell'intestino crasso e avente effetti positivi sulla salute umana) è generalmente più alto rispetto a quello dei cereali più diffusi come frumento, riso e mais, poiché il teff è di piccole dimensioni e quindi il rapporto tra fibra e cariosside è elevato (Yirmaz e Arslan, 2018).

I diversi studi volti alla quantificazione della componente fibrosa non hanno condotto a un risultato univoco, dimostrando che il suo quantitativo varia a seconda del genotipo. (Zhu, 2018). Ad esempio, Baye et al. (2014) riportano un contenuto di fibra pari al 9,8% sulla cariosside secca, mentre Hager et al. (2012) sono giunti a un valore di 4,5% sul peso fresco della farina.

2.2.2 Proteine

Il quantitativo proteico medio della cariosside di teff è paragonabile a quello di altri cereali ed è compreso tra l'8 e l'11%. In base alla classificazione di Osborne, le proteine prevalenti sono albumine (37%) e globuline (18%), solubili in acqua o in soluzioni saline neutre, e gluteline (45%), parzialmente solubili in soluzioni acide o alcaline. Le prolamine rappresentano la frazione minore (12%) (Yirmaz e Arslan, 2018; Akansha et al., 2018).

In virtù del maggior contenuto in proteine solubili, quali albumine e globuline, si presume che il teff sia un cereale facilmente digeribile. Inoltre, non è stata riscontrata la presenza di glutine analogo a quello del frumento, pertanto il teff può essere adatto all'alimentazione delle persone affette da celiachia (Bultosa, 2014).

Il profilo amminoacidico del teff è piuttosto bilanciato e prevede un maggiore quantitativo di glutammina, alanina, leucina e prolina rispetto alla lisina. Il contenuto di isoleucina, leucina, valina, tirosina, treonina, metionina, fenilalanina, arginina, alanina e istidina sembra essere più elevato rispetto a quello riscontrato nella maggioranza dei cereali (Yirmaz e Arslan, 2018; Akansha et al., 2018).

2.2.3 Lipidi

Generalmente, i cereali non contengono elevati quantitativi di lipidi, ma possono essere considerati una fonte di acidi grassi essenziali in quanto alimenti consumati quotidianamente.

Secondo Forsido et al. (2013), il teff prevede un contenuto lipidico pari al 3,7%, perciò superiore a quello delle colture più diffuse in Etiopia come mais e frumento. Un altro studio comparativo riporta il valore di 4,4%, maggiore rispetto a frumento (3,6%), riso (0,9%), sorgo (3,5%), e mais (2,5%), ma inferiore rispetto ad avena (6,7%) e quinoa (8,6%) (Hager et al., 2012).

Ulteriori analisi hanno mostrato come la maggior parte dei lipidi sia presente in forma libera e solo un 10% sia legato all'amido (Zhu, 2018). È stata inoltre determinata la composizione in acidi grassi: prevalgono gli acidi grassi insaturi (84%), in particolare acido oleico (24%) e linoleico (44,2%), con un buon quantitativo di acido palmitico (15,9%) (Bultosa, 2014).

Lo studio condotto da Hager et al. (2012) riporta valori superiori sia per l'acido oleico (29,47%) sia per il linoleico (49,99%), ma un valore inferiore per l'acido palmitico (10,86%). Secondo gli stessi autori, il rapporto tra acidi grassi $\omega 6$ e $\omega 3$ è di 21:1.

2.2.4 Minerali

I minerali svolgono una miriade di funzioni fondamentali nell'organismo umano, perciò sono considerati micronutrienti essenziali.

Nel teff, le ceneri rappresentano circa il 2,15% sul peso fresco della farina (Hager et al., 2012). In Abebe e Ronda (2014) l'analisi dei campioni di farina ottenuti da 3 diverse varietà di teff ha fornito i seguenti valori, espressi come % p/p sul peso secco della farina: 2,63% per la varietà chiara DZ-Cr-387, 2,71% per la varietà scura DZ-01-99 e 3,52% per la varietà chiara DZ-Cr-37.

Il profilo in sali minerali del teff è piuttosto ricco e variegato: la cariosside integra presenta un elevato contenuto di calcio (180 mg/100g), ferro (7,63 mg/100g) e zinco (3,63 mg/100g), come riportato in Tabella 1 (Zhu, 2018).

Uno studio comparativo ha inoltre sottolineato un quantitativo di fosforo (350 mg/100g), magnesio (170 mg/100g), manganese (5,65 mg/100g) e rame (0,731 mg/100g) maggiore rispetto a quello di altre colture largamente diffuse in Etiopia (Forsido et al., 2013).

Se confrontata con la farina ricavata dai cereali più comuni, quali frumento, riso, avena, quinoa, grano saraceno, mais e sorgo, la farina di teff risulta maggiormente ricca in calcio (154,3 mg/100g), sodio (5,98 mg/100g), ferro (8,53 mg/100g), rame (0,93 mg/100g), manganese (3,45 mg/100g), zinco (4,15 mg/100g) e fosforo (361,7 mg/100g), come evidenziato dalla Tabella 2 (Hager et al., 2012).

MINERALE	[mg/100 kg]
Calcio, Ca	154,3
Sodio, Na	5,98
Ferro, Fe	8,53
Rame, Cu	0,93
Manganese, Mn	3,45
Zinco, Zn	4,15
Fosforo, P	361,7

Tabella 2. Composizione minerale della farina di teff. (Fonte: Hager et al., 2012)

Il quantitativo di ciascun minerale può variare a seconda della cultivar: il teff rosso presenta un maggior contenuto in ferro e calcio, mentre la varietà chiara è maggiormente ricca in rame. L'elevato contenuto di ferro è stato attribuito a una contaminazione del suolo, dovuta a pratiche agricole tradizionali (Abebe et al., 2007).

Tuttavia, la presenza di questo minerale in un alimento frequentemente consumato dalla popolazione locale, quale il teff, potrebbe aver contribuito ad abbassare l'incidenza dei casi di anemia da deficit di ferro (de Oliveira do Nascimento et al., 2018).

2.2.5 Composti bioattivi

Numerosi studi epidemiologici hanno condotto all'evidenza che il consumo di cereali integrali e legumi è associato a una serie di effetti positivi sulla salute, in primis la riduzione del rischio relativo a varie patologie croniche (come cancro, diabete e patologie cardiovascolari) e alla riduzione della biodisponibilità di alcuni nutrienti, ad esempio carboidrati e proteine (Amoako e

Awika, 2016; Taylor et al., 2007). Tali effetti positivi sono da ricondurre sostanzialmente alla fibra alimentare e ad alcuni composti fitochimici associati, contenuti in prevalenza nei tegumenti esterni della cariosside: da ciò deriva l'importanza del consumo del cereale integrale (Ravisankar et al., 2018; Shumoy e Raes, 2016).

I principali composti fitochimici presenti nel teff sono rappresentati dai polifenoli, ma sono stati individuati altri composti bioattivi come vitamine, minerali e fitati.

2.2.5.1 Polifenoli

I polifenoli sono un gruppo eterogeneo di sostanze derivanti dal metabolismo secondario delle piante, nelle quali svolgono un'importante attività antiossidante.

Le molecole fenoliche possono essere sostanzialmente ricondotte a tre classi: acidi fenolici (derivati dall'acido cinnamico o dall'acido benzoico), flavonoidi e tannini.

L'azione positiva dei polifenoli sull'organismo umano è legata all'attività antiossidante esercitata nei confronti dei radicali liberi, molecole estremamente reattive che si formano inevitabilmente nei sistemi biologici e innescano reazioni ossidative a catena che danneggiano le cellule. Gli antiossidanti sono in grado di interrompere tali catene neutralizzando i radicali attraverso la donazione di un atomo di idrogeno, oppure legando il radicale stesso. Di conseguenza, i polifenoli possono agire da anti-infiammatori, anti-aterosclerotici e anti-carcinogeni (Boka et al., 2013).

A sostegno di ciò, è stato riscontrato che il contenuto fenolico totale (TPC) delle farine ricavate da diverse varietà di teff è positivamente correlato alla loro capacità antiossidante (TAC), misurata mediante FRAP and DPPH (Forsido et al., 2013; Boka et al., 2013).

Gli effetti positivi sono svolti soprattutto dai composti fenolici legati alla fibra alimentare: ad esempio, alcuni acidi idrossi-cinnamici come acido ferulico e acido *p*-cumarico possono legarsi alle emicellulose presenti nella parete cellulare ed essere successivamente idrolizzati dalle esterasi a livello intestinale, dove esplicano la loro azione (Salawu et al., 2014).

I composti fenolici sono di particolare importanza poiché contribuiscono non solo all'aspetto nutrizionale, ma anche alle proprietà sensoriali dei prodotti a base di cereali (colore, sapore, flavour...), indirizzando la scelta del consumatore. (Ravisankar et al., 2018).

Tuttavia, non sono ancora stati svolti sufficienti studi in merito: le poche informazioni disponibili relative al contenuto totale e al profilo dei composti fenolici nel teff sono estremamente discordanti, a sostegno dell'ipotesi che esista una grande variabilità tra le diverse tipologie.

I polifenoli nel teff possono essere presenti in forma libera (frazione solubile) o in forma legata (frazione insolubile, esterificata o eterificata) (Salawu et al., 2014) e sono rappresentati sostanzialmente da acidi fenolici e flavonoidi, diversamente distribuiti nelle due frazioni.

Il contenuto totale di sostanze fenoliche (TPC) nel teff risulta superiore a quello di numerosi cereali come mais, grano, avena, quinoa e riso (Shumoy e Raes, 2016), ma inferiore a quello del grano saraceno (Hager et al. 2012).

Forsido et al. (2013) riportano un TPC di 123,6 mg GAE/100 g db, ma studi più recenti sembrano indicare un contenuto di sostanze fenoliche superiore, compreso tra 141 e 219 mg GAE/100g (Kotásková et al., 2016).

In base ai risultati ottenuti sia da Kotásková et al. (2016) sia da Ravisankar et al. (2018), la maggior parte dei composti fenolici si concentra nella frazione libera, alla quale è stata prevalentemente attribuita la capacità antiossidante del cereale. Al contrario, Shumoy e Raes (2016) hanno riscontrato una maggiore quantità di polifenoli nella frazione legata.

Tuttavia, le tre fonti concordano nell'affermare che la frazione solubile risulta composta in prevalenza da flavoni (Figura 8), mentre la frazione insolubile presenta la maggior concentrazione di acidi fenolici (Figura 9).

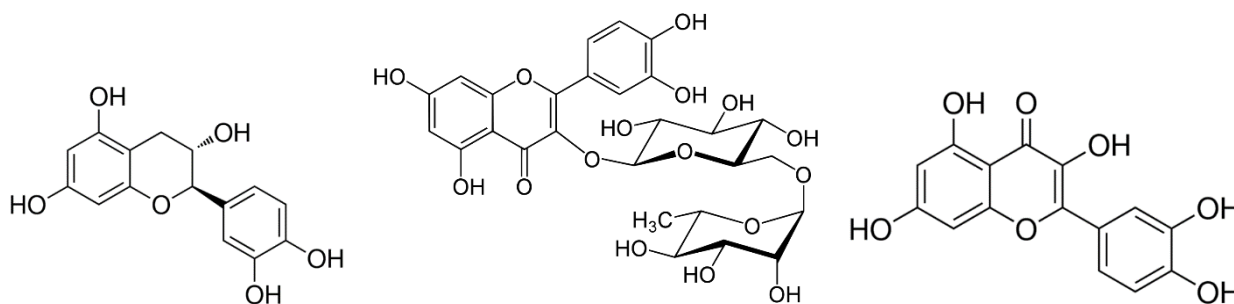


Figura 8. Principali flavonoidi presenti nel teff. Da sinistra: catechina, rutina, quercetina (Fonte: www.sigmaaldrich.com)

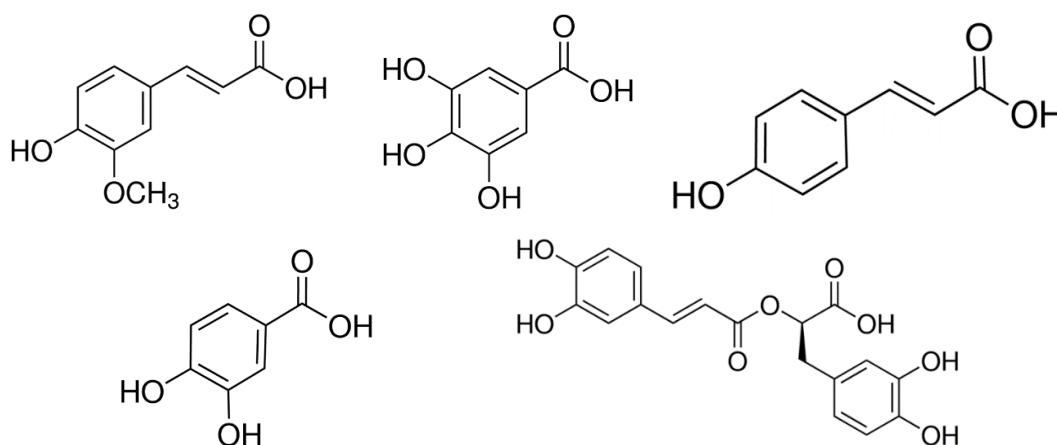


Figura 9. Principali acidi fenolici presenti nel teff. Da sinistra in alto: acido ferulico, acido gallico, acido p-cumarico, acido protocatecuico, acido rosmarinico (Fonte: www.sigmaaldrich.com)

Shumoy e Raes (2016) riportano un TPC della frazione libera e legata rispettivamente compreso tra 37 e 71 e tra 226 e 376 mg GAE/100 g db e un TFC (contenuto totale di flavonoidi) compreso tra 36 e 64 (frazione libera) e tra 113 e 258 (frazione legata) mg CE/100 g. I composti prevalenti

nell'estratto solubile sono gli acidi rosmarinico e ferulico e il flavonoide catechina, mentre quello insolubile è caratterizzato da un elevato contenuto di acido p-cumarico, acido rosmarinico e acido ferulico.

Anche Kotásková et al. (2016) hanno rilevato quantità significative di acido ferulico nella frazione legata, insieme ad acido gallico e ai flavonoidi quercetina, catechina e rutina. Nella frazione libera sono stati identificati gli acidi trans-p-cumarico, protocatecuico, ferulico, gallico e il flavonoide rutina.

Gli studi effettuati da Ravisankar et al. (2018) hanno portato ad identificare 34 diversi composti fenolici in alcune varietà di teff, la maggior parte dei quali sono stati isolati dalla frazione solubile, costituita soprattutto da flavoni. Se il contenuto totale di flavoni (compreso tra 1398 e 2049 µg/g) risulta simile tra le cultivar di diverso colore, non è così per la composizione: il teff bianco contiene esclusivamente derivati dell'apigenina, mentre il teff marrone contiene soprattutto derivati della luteolina¹ (Figura 11).

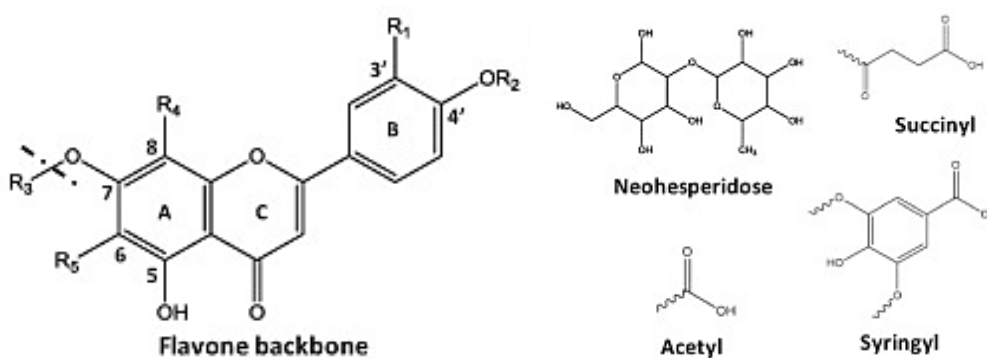


Figura 10. A sinistra: struttura di un generico flavone. A destra: principali sostituenti. (Fonte: Ravisankar et al., 2018)

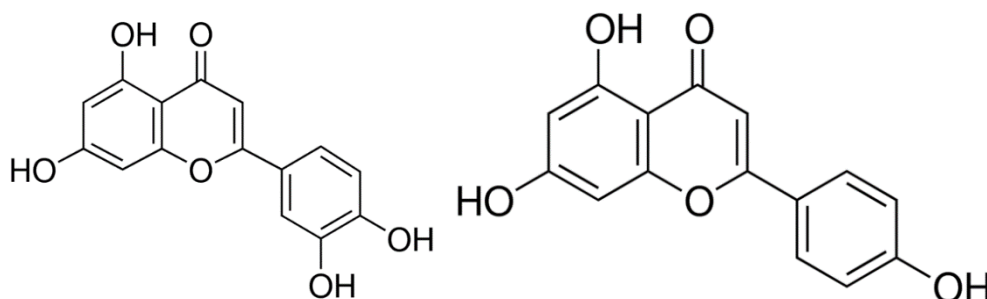


Figura 11. A sinistra: struttura della luteolina ($R_1=OH$, $R_2=R_3=H$). A destra: struttura dell'apigenina ($R_1=R_2=R_3=H$). (Fonte: www.sigmaaldrich.com)

In entrambe le varietà, la maggior parte dei flavoni sono diglicosidi (50%), mentre la frazione restante risulta equamente suddivisa tra monoglicosidi (20%) e composti acilati (20%).

¹ Questo aspetto sembra suggerire l'esistenza di differenti vie biosintetiche dei flavonoidi a seconda della tipologia di teff: se la sintesi di apigenina dalla naringenina segue lo stesso meccanismo, probabilmente solo la varietà marrone possiede l'enzima flavanone-3'-idrossilasi in grado di convertire la naringenina in eriodictolo, precursore primario della luteolina.

Poiché non sono state riscontrate differenze compositive rilevanti all'interno di una stessa tipologia di teff coltivata in luoghi differenti (USA ed Etiopia), è stato ipotizzato che l'influenza dell'ambiente sulla biosintesi dei flavonoidi sia trascurabile (Ravisankar et al., 2018).

Nella frazione legata sono stati identificati 6 acidi fenolici (concentrazione totale di 600 – 728 µg/g db) senza sostanziali differenze compositive tra la varietà bianca e la varietà marrone. La maggior parte degli acidi è rappresentata da forme monomeriche, quali acido ferulico (350-475 µg/g), acido isoferulico (80-100 µg/g) e acido p-cumarico (18-22 µg/g). Tra i deidrodimeri dell'acido ferulico domina l'8-O-4'-DiFA (64-80 µg/g) (Ravisankar et al., 2018).

Anche i risultati ottenuti da Salawu et al. (2014) risultano in accordo con quelli appena illustrati, poiché riportano quantità significative di acido ferulico, acido p-cumarico, luteolina e quercetina negli estratti ottenuti sia dal chicco intero, sia dall'idrolisi della parete cellulare del teff.

Uno studio ha riscontrato un maggiore contenuto di sostanze fenoliche nelle varietà di teff rosse (11,47 mg GAE/g) e marroni (9,87 mg GAE/g) rispetto alla varietà bianca (8,248 mg GAE/g), suggerendo una possibile correlazione tra composti fenolici e pigmentazione della cariosside (Boka et al., 2013). Tuttavia, la recente identificazione di quantità significative di procianidine sotto forma di tannini condensati solo nella varietà marrone (Ravisankar et al., 2018), ha portato ad attribuire a questi ultimi la diversa colorazione dell'epicarpo.

2.2.5.2 Fitosteroli e vitamine

Sebbene i cereali siano fonte di fitosteroli, solo uno studio ha riscontrato la presenza di β-sitosterolo e β-sitosterolo-3-Oβ-d-glucoside nel teff (El-Alfya et al., 2012).

La composizione in vitamine comprende niacina, vitamina B6, tiamina, riboflavina, vitamina K, vitamina A e α-tocoferolo, nessuna delle quali è presente in quantità rilevanti (Tabella 1) (Zhu, 2018).

2.2.5.3 Fitati

L'acido fitico è considerato un fattore anti-nutrizionale in quanto esercita un'azione chelante su alcuni minerali, riducendone la biodisponibilità, ed è in grado di ostacolare l'assorbimento di nutrienti come amminoacidi, amido e proteine (Hager et al., 2012).

Nel teff è presente un rilevante quantitativo di acido fitico, pari a circa 1,54 g/100 g db (Baye et al., 2014), superiore a quello di grano saraceno, frumento, riso, sorgo e avena (Hager et al., 2012). Alcuni processi tecnologici (ad esempio la fermentazione) possono essere sfruttati per ridurre il contenuto di acido fitico nei prodotti a base di teff (Zhu, 2018).

2.3 Usi



Figura 8. Esempi di prodotti a base di teff. (Fonti: www.planetahuerto.es; www.sorgentenatura.it; www.casaspadoni.it; www.shop.probios.it)

La moltitudine di studi effettuati negli ultimi anni sul teff ha messo in evidenza una serie di proprietà interessanti ai fini tecnologici e nutrizionali. Poiché presenta un buon quantitativo di fibra alimentare e di amilosio, è caratterizzato da un indice glicemico ridotto. Il teff ha un contenuto proteico simile a quello della maggioranza dei cereali, ma è più ricco in lisina e risulta privo delle proteine responsabili della formazione di glutine. Rappresenta una fonte importante di polifenoli, in particolare flavoni e acidi fenolici, che svolgono attività antiossidante positiva sull'organismo umano. Non mancano minerali (soprattutto ferro), vitamine e fitosteroli.

Le proprietà appena illustrate spiegano il crescente interesse del mondo accademico e dell'industria verso questo cereale, la cui coltivazione si sta diffondendo su scala mondiale.

Pertanto negli ultimi anni si sta assistendo allo sviluppo di possibili applicazioni del teff (soprattutto sotto forma di farina²) nella realizzazione di una grande varietà di prodotti, prevalentemente destinati a quelle fasce della popolazione con esigenze particolari (prodotti salutistici arricchiti, prodotti gluten-free, alimenti per diabetici, baby-foods...).

Tuttavia, gli studi effettuati concordano sulla necessità valutare accuratamente gli effetti dell'impiego del teff sulle caratteristiche del prodotto finito, allo scopo di ottenere alimenti qualitativamente accettabili non solo dal punto di vista nutrizionale, ma anche reologico (panificabilità) e sensoriale (aspetto esteriore, sapore, aroma, texture...).

² A differenza della farina di frumento, prodotta dalla macinazione dell'endosperma precedentemente privato del germe, la farina di teff viene ottenuta macinando il chicco intero, poiché le sue piccole dimensioni ostacolano la completa separazione della crusca e del germe. Per questo motivo, la farina di teff risulta più ricca di nutrienti, specialmente sali minerali, fibre, vitamine e lipidi (de Oliveira do Nascimento et al., 2018).

2.3.1 Utilizzi tradizionali

Attualmente il teff è una delle principali colture in Etiopia e rappresenta per tradizione la base dell'alimentazione della popolazione locale: nel 2017 ricopriva il 24% della superficie nazionale destinata alla coltivazione dei cereali e si stima che soddisfi l'11% del fabbisogno calorico e i 2/3 del fabbisogno proteico giornaliero della comunità (Lee, 2018).

Il principale impiego tradizionale è rappresentato dall'*injera*, un pane sottile e tondeggiante dal gusto lievemente acido, ottenuto dalla fermentazione spontanea di un impasto a base di farina di teff, che viene cotto su una piastra di terracotta dopo circa 24 ore di riposo (Figura 13) (Bultosa, 2016; Gebremariam et al., 2014).



Figura 9. Preparazione tradizionale, microstruttura e presentazione dell'*injera*. (Fonti: www.commons.wikimedia.org; www.washingtonpost.com; www.petitworldcitizen.com)

L'*injera* è molto diffuso in Etiopia ed Eritrea, viene utilizzato per portare le pietanze alla bocca ed è un ingrediente dello zighinì, un piatto tradizionale eritreo a base di carne e verdure (Dahlia e Marlène, 2014). Le fasi del processo produttivo dell'*injera* sono riportate in Figura 14 (Bultosa, 2004).

Studi recenti hanno analizzato l'effetto dell'applicazione di diverse modalità di fermentazione dell'impasto sul contenuto in acido fitico del prodotto finito³.

³ Come precedentemente illustrato, il teff presenta livelli significativi di acido fitico, il quale riduce il valore nutrizionale del cereale poiché è in grado di sequestrare minerali e nutrienti.

In Baye et al. (2013) la fermentazione spontanea ha ridotto del 28% il contenuto di acido fitico di un prototipo di *injera*, realizzato miscelando farina di teff e farina di sorgo. L'impiego di diversi ceppi di batteri lattici nel processo fermentativo ha permesso di ridurre ulteriormente la quantità di fitati (fino al 70% nel caso del *Lactobacillus buchneri*) (Fischer et al., 2014).

Il teff viene inoltre impiegato per produrre *tella*, una bevanda fermentata simile alla birra; *katikalla*, un liquore tipico; una sorta di porridge; *muk* (una zuppa) e piccoli dolci tradizionali di forma tondeggiante, chiamati *dabbo kolo* (Bultosa, 2004).

Al di là del ruolo gastronomico, questo cereale può essere sfruttato come foraggio per il bestiame oppure come materiale da costruzione (Lee, 2018).

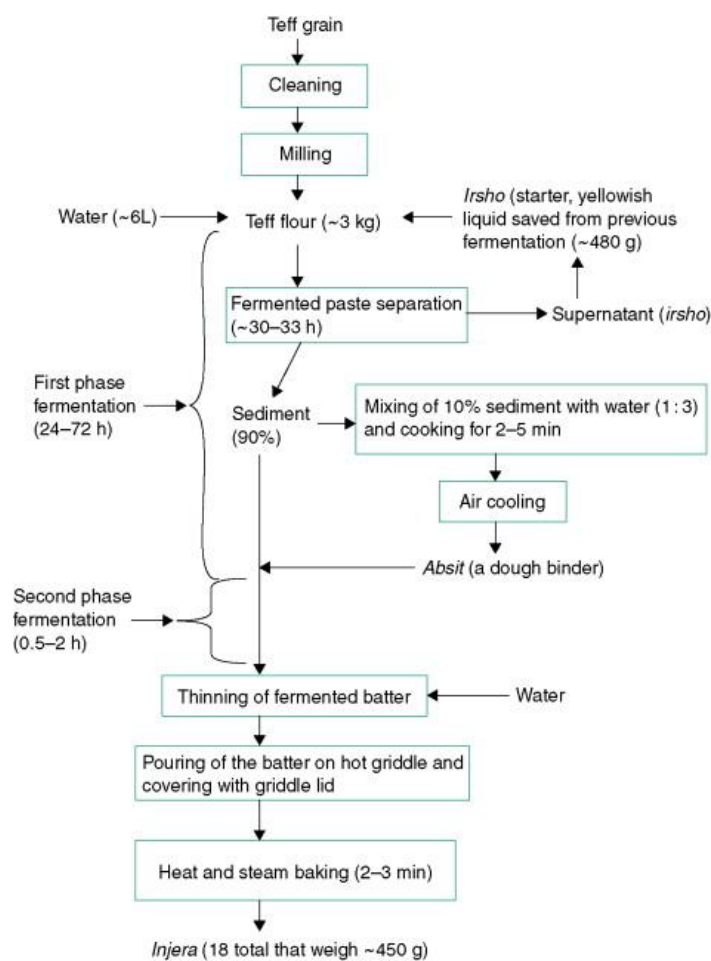


Figura 10. Fasi della realizzazione dell'*injera*. (Fonte: Bultosa, 2004)

2.3.2 Prodotti contenenti glutine

Numerosi studi hanno analizzato l'impiego della farina di teff in aggiunta alla farina di frumento nella realizzazione di pani e prodotti dolciari come torte e biscotti.

In generale, è stato riscontrato un aumento significativo del valore nutrizionale, soprattutto per quanto riguarda fibre, minerali e proteine. Nei pani ciò ha compromesso in parte la qualità sensoriale e le proprietà reologiche dei prodotti. Infatti, l'assenza di glutine nella farina di teff ha determinato la riduzione del volume specifico e del rapporto altezza/larghezza, il peggioramento della qualità sensoriale e una maggiore durezza della mollica (Figura 15) (Hager, Wolter, Czerny et al., 2012; Callejo et al., 2016).

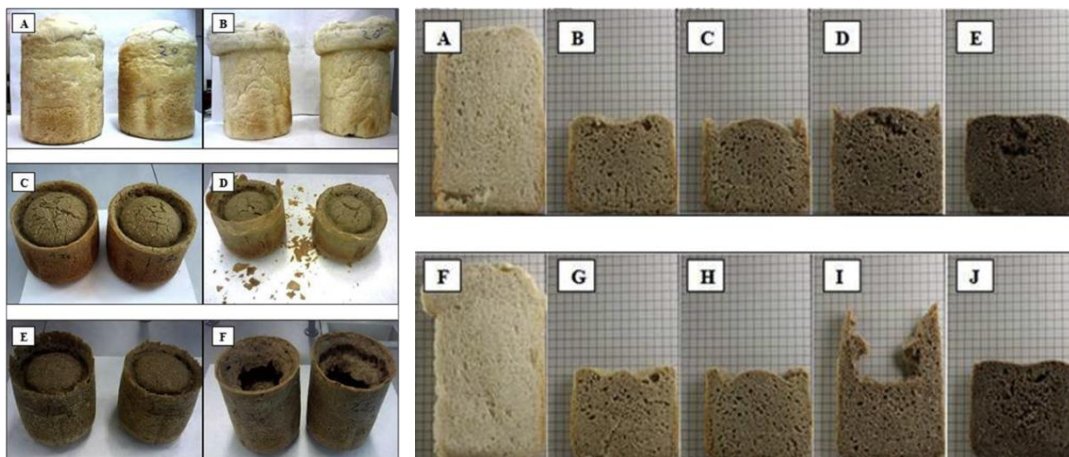


Figura 11. Aspetto e struttura di pani realizzati con quantità variabili di farina di grano e di teff delle varietà bianca e marrone. (Fonte: Callejo et al., 2016)

Al contrario, la farina di teff risulta particolarmente adatta a sostituire parte della farina di frumento nella realizzazione di torte e biscotti, nei quali la formazione del reticolo proteico deve essere minimizzata (Zhu, 2018).

È stato osservato che l'aggiunta di farina di teff alla formulazione di un pane porta all'aumento dell'attività antiossidante, molto probabilmente grazie alla presenza significativa di polifenoli in questo cereale, ma allo stesso tempo determina la riduzione della digeribilità in vitro del prodotto (Ronda et al., 2015).

2.3.3 Prodotti senza glutine

2.3.3.1 Pane

Il pane è sicuramente il principale prodotto su cui sia stato analizzato l'impiego di farina di teff in sostituzione alle farine prive di glutine più diffuse, come mais o riso, meno costose ma anche meno ricche dal punto di vista nutrizionale.

È stata utilizzata farina di teff in quantità variabile, in genere compresa tra il 5 e il 40%, con diverse conseguenze sulle caratteristiche nutrizionali e sensoriali del prodotto, ma anche sulle proprietà reologiche dell'impasto (attitudine panificatoria), principalmente a causa dell'assenza delle proteine responsabili della formazione di glutine.

I pani realizzati con farina di teff al 100% presentano una struttura compatta e uno sviluppo in volume ridotto, risultando qualitativamente inferiori a quelli a base di farine di altri cereali, quali quinoa, avena, sorgo, mais, riso, grano saraceno e frumento (Figura 16) (Hager et al., 2012).

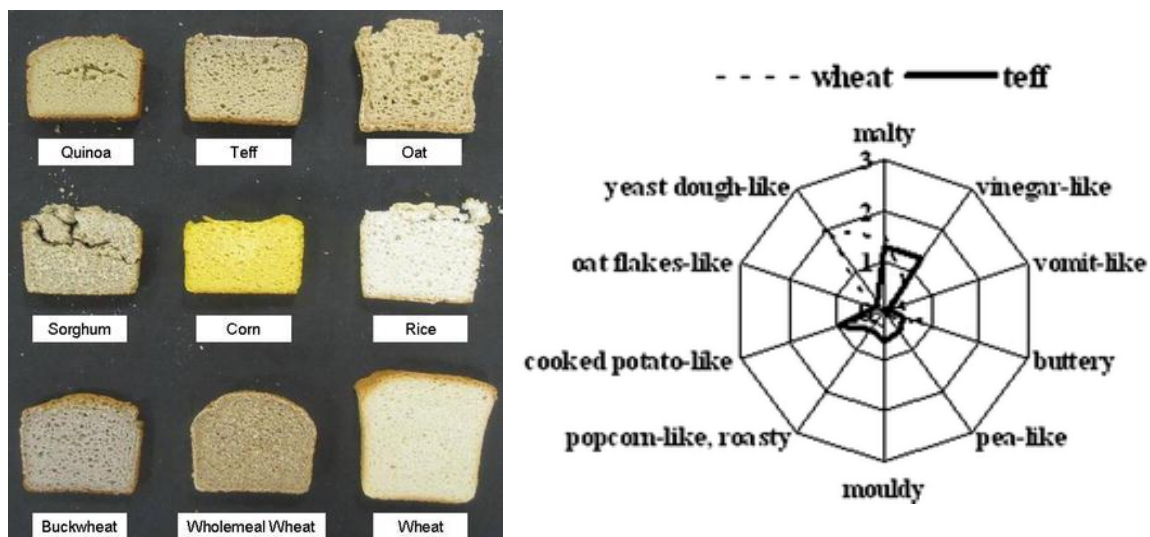


Figura 12. A sinistra: struttura di pani realizzati con farine di diversi cereali. A destra: profilo sensoriale del pane di teff, paragonato a quello di frumento. (Fonte: Hager et al., 2012).

I risultati ottenuti in merito all'alterazione delle proprietà reologiche degli impasti non concordano completamente, pertanto si può ipotizzare che siano legati alla varietà del cereale (Callejo et al., 2016).

Per migliorare l'attitudine panificatoria del teff sono stati impiegati diversi additivi in grado di mimare il complesso visco-elastico del glutine. Ad esempio, l'aggiunta di idrossipropilmetilcellulosa (HPMC) ha provocato un aumento del volume e una riduzione della durezza della mollica nel pane di teff (Hager e Arendt, 2013).

Una strategia per migliorare la qualità sensoriale dei prodotti gluten-free può essere l'aggiunta di un impasto acido (*sourdough*), ottenuto dalla fermentazione della farina ad opera dei microrganismi naturalmente presenti. Diversi studi hanno applicato questa tecnologia alla realizzazione di prototipi di pane a base di teff: in generale, l'aggiunta di uno starter acido ha ridotto la tenacità dell'impasto e migliorato il volume e l'alveolatura del prodotto. D'altra parte, la qualità sensoriale dei campioni è risultata nettamente inferiore a quella di un pane tradizionale a base di frumento; inoltre la breve shelf life (stimata a 1 giorno) potrebbe richiedere l'aggiunta di antimicrobici (Wolter et al., 2014).

2.3.3.2 Pasta

Hager et al. (2013) hanno realizzato un prototipo di spaghetti all'uovo senza glutine a base di farina di teff, e l'hanno confrontato con prodotti analoghi, ottenuti con farina di avena e di frumento. (Figura 17). In generale, la qualità sensoriale degli spaghetti a base di teff è risultata inferiore alle

altre due tipologie. D'altra parte, sono stati riscontrati un maggiore contenuto in fibra alimentare e minerali, un pIG (predicted Glycemic Index) di 45 (inferiore al fumento ma superiore all'avena), una minore elasticità e un tempo di cottura superiore. Pertanto, i risultati ottenuti suggeriscono che la farina di teff può essere utilizzata nella produzione di pasta gluten-free globalmente accettabile, ma sono senza dubbio necessari ulteriori studi per migliorarne la texture e le proprietà sensoriali.

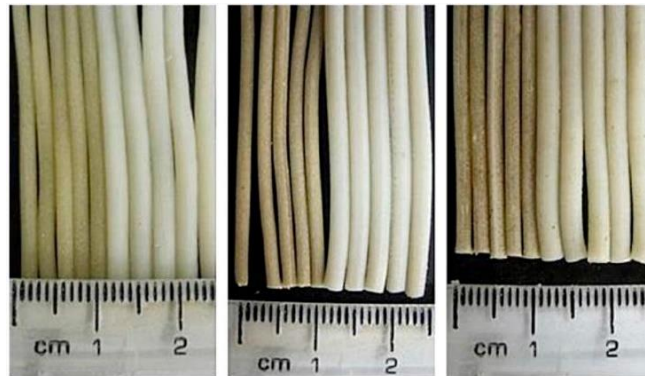


Figura 13. Aspetto prima e dopo la cottura di spaghetti all'uovo a base di farina di grano (a sinistra), di teff (al centro) e di avena (a destra). (Fonte: Hager et al., 2013)

2.3.3.3 Prodotti dolciari

Come precedentemente accennato, la farina di teff è particolarmente indicata nella realizzazione di prodotti dolciari, come torte, muffin e biscotti in virtù dell'assenza di glutine.

Lo studio effettuato da Mancebo et al. (2015) su una tipologia di biscotti "sugar-snap" realizzati con farine di diversi cereali ha evidenziato come il campione a base di farina di teff, nonostante presentasse un colore più scuro, espansione maggiore in cottura e superiore durezza, abbia ottenuto un grado di accettabilità sensoriale paragonabile a quello degli altri campioni (Figura 18).

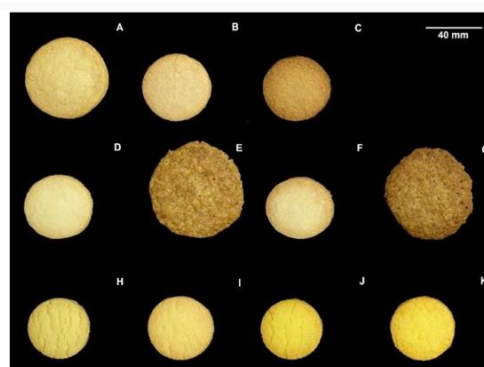


Figura 14. Aspetto di biscotti "sugar-snap" realizzati con farine di diversi cereali: A) grano; B) grano saraceno; C) teff; D), E), F), G) riso; H), I), J), K) mais. (Fonte: Mancebo et al., 2015)

Minarovičová et al. (2019) hanno impiegato la farina di teff (in quantità pari al 25,50% e 75%) nella realizzazione di muffin gluten-free a base di farina di riso e ne hanno valutato l'attività antiossidante e vari parametri qualitativi e sensoriali (Figura 19). I risultati più soddisfacenti sono

stati ottenuti con l'aggiunta di teff al 25%, che ha conferito ai prodotti un flavour apprezzabile e un sapore dolciastro e nocciolato. Quantità più elevate di teff (dal 50 al 75%) hanno influenzato negativamente la texture e il profilo sensoriale: i muffin sono risultati più duri e friabili e meno elastici.

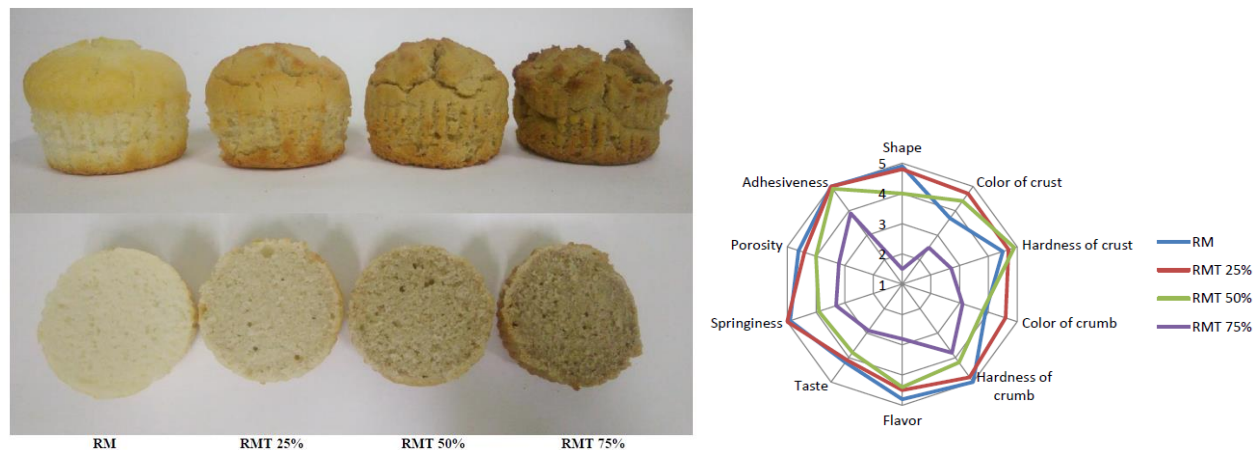


Figura 15. A sinistra: aspetto e struttura di muffin di farina di riso arricchiti con farina di teff (RM= 100% riso; RMT 25%= 25% teff; RMT 50%=50% teff; RMT 75%= 75% teff). A destra: profilo sensoriale. (Fonte: Minarovičová et al., 2019)

2.3.3.4 Estrusati, sostituti dei grassi, prodotti per l'infanzia

Al pari di altre farine prive di glutine, la farina di teff può essere sottoposta a estrusione: tale processo ne incrementa la solubilità in acqua, grazie alla gelatinizzazione dell'amido e alla denaturazione proteica. Gli estrusati di teff hanno presentato un indice di espansione simile a quello di altri cereali privi di glutine, come sorgo, miglio e quinoa, ma maggiore densità cellulare e resistenza alla rottura (Robin et al., 2015).

Uno studio ha analizzato il potenziale impiego del teff negli alimenti destinati all'infanzia: l'aggiunta di un 20% di farina di teff a un prototipo di prodotto a base di farina di legumi ha portato a un aumento del contenuto proteico (Griffith et al., 1998).

L'amido del teff è formato da granuli di piccole dimensioni, caratteristica che ne permette l'applicazione in diversi campi: nel settore alimentare come sostituto dei grassi, nella formulazione di film biodegradabili, come materiale per l'incapsulamento di ingredienti funzionali, nell'industria cartiera, tessile, cosmetica e fotografica (Lindeboom et al., 2004).

Ad esempio, l'amido estratto dal teff è stato miscelato ad acido stearico e inserito come sostituto dei grassi in un prodotto analogo alla maionese, destinato a diete ipocaloriche. Il prodotto di nuova formulazione ha mostrato una maggiore stabilità termica (sia durante lo scongelamento, sia ad alte temperature), un contenuto calorico ridotto del 76% e proprietà simili a quelle della maionese *full-fat* (Teklehaimanot et al., 2013; Wokadala et al. 2012).

2.3.3.5 Malto e bevande fermentate

Numerosi studi hanno simulato la produzione di malto dal teff, destinato alla realizzazione di bevande senza glutine (Gebremariam et al., 2013a; Gebremariam et al., 2013b; Gebremariam et al., 2013c). La varietà del cereale è risultata essere il principale fattore determinante la qualità del malto.

I principali zuccheri fermentescibili riscontrati sono glucosio (9,5–19,4 g/L) e maltosio (2,95–16,1 g/L). Se confrontato con il malto d'orzo convenzionale, il malto di teff ha mostrato inferiore attività α -amilasica, inferiore o simile attività β -amilasica, colore più intenso, viscosità paragonabile e minor contenuto in zuccheri fermentescibili. Rimangono tutt'ora da determinare le condizioni ideali del processo produttivo (Gebremariam et al., 2013c).

Il malto di teff potrebbe rappresentare una materia prima adatta alla produzione di bevande senza glutine a base di acido lattico. Infatti, alcune bevande largamente diffuse come le birre acide contengono livelli significativi di tale acido.

L'ammestramento isotermico del puro malto di teff, effettuato a una temperatura compresa tra 60 e 84°C, è stato sfruttato per produrre una bevanda fermentata a base di acido lattico, evidenziando la maggiore resa estrattiva per temperature superiori a 76°C (Gebremariam, Abegaz et al., 2015).

Inoltre, sono state impiegate colture di *L. amylolyticus* per condurre la fermentazione dell'acido lattico: le condizioni di processo ottimali sono risultate essere una temperatura di 42°C, pH iniziale pari a 5,4, concentrazione iniziale delle cellule microbiche pari a $1,86 \times 10^5$ cellule/mL e tempo di fermentazione di 52 h. La qualità sensoriale del prodotto è stata giudicata accettabile, pertanto si ritiene che bevande a base di teff ricche di acido lattico possano incontrare i gusti di una fascia significativa della popolazione (Gebremariam, Hassani et al., 2015).

Sebbene i risultati ottenuti indichino il malto da teff come una valida alternativa al malto d'orzo, non sono ancora stati applicati a livello industriale per la produzione di bevande alcoliche qualitativamente apprezzabili dal consumatore.

Capitolo 3: Materiali e metodi

3.1 Campioni

E' stato analizzato un campione di farina di teff, ottenuta dalla macinazione di una varietà commerciale, acquistata in un negozio di prodotti biologici.

La farina così ottenuta è stata conservata a -18 °C in attesa del suo utilizzo.

3.2 Reagenti

Per la determinazione dei fenoli totali mediante reattivo di Folin sono stati impiegati: Na_2CO_3 acquistato dalla BDH AnalaR® (Poole, Inghilterra), reattivo di Folin-Ciocalteu acquistato dalla MERCK KGaA (Darmstadt, Germania) e H_2O bi-deionizzata (con conduttività inferiore a 18,2 $\text{M}\Omega$) ottenuta tramite sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Per l'estrazione dei fenoli liberi e legati sono stati impiegati: etanolo, metanolo, NaOH, N_2 , acido idrocloridrico al 37%, acetato di etile e solfato sodico acquistati dalla Panreac (Barcellona, Spagna).

Per l'analisi UPLC-ESI-TOF-MS sono stati impiegati: H_2O bi-deionizzata; metanolo, acetonitrile, acido acetico e gli standard analitici (acido clorogenico, acido ferulico, catechina e quercetina) acquistati dalla Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania); acetone ed etanolo acquistati presso la Panreac (Barcellona, Spagna).

3.3 Determinazione dei fenoli totali mediante saggio al reattivo di Folin-Ciocalteu

Il metodo di Folin-Ciocalteu, finalizzato alla determinazione quantitativa dei fenoli totali, è basato sulla reazione di ossidoriduzione tra gli stessi composti, presenti nel campione, e il reattivo di Folin-Ciocalteu, che consiste in una soluzione gialla acida contenente un complesso ionico polimerico formato dagli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico.

L'estrazione dei fenoli totali è stata realizzata impiegando come solventi soluzioni a concentrazione crescente di etanolo (da 0 a 100% p/v). Circa 1 grammo di farina di teff è stato addizionato di 20 mL di solvente, sonicato per 30 minuti e centrifugato per 10 minuti a 5°C a una velocità di 4000 rpm. Il surnatante è stato prelevato e conservato a -18°C.

Sono stati posti 100 μL di ciascun estratto in un matraccio da 10 mL, addizionati di 500 μL di reattivo di Folin-Ciocalteu e 6 mL di acqua bidistillata. La miscela è stata agitata per 1 minuto, al termine del quale sono stati aggiunti 2 mL di Na_2CO_3 al 15% (p/v). Il tutto è stato agitato per altri

30 sec e portato al volume finale di 10 mL con acqua bidistillata. Le soluzioni così ottenute sono state riposte al buio per 2 h, per dare modo alla reazione di ossidoriduzione di avvenire.

Poiché tale reazione dà origine ad un cromoforo di colore blu, i campioni possono essere sottoposti a lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento di 750 nm e ad una temperatura di 25°C.

3.4 Estrazione dei fenoli liberi

L'estrazione dei fenoli liberi è stata realizzata secondo il metodo messo a punto da Verardo et al. (2011).

Sono stati pesati circa 3 g di farina di teff. Il campione è stato addizionato di 40 mL di etanolo all'80% e sonicato per 15 min nel bagno a ultrasuoni BÜCHI B-480 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). Per separare la frazione solida, i campioni sono stati centrifugati per 10 min a 5000 rpm mediante centrifuga Sigma 2-16PK (Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode am Harz, Germany). È stato prelevato il surnatante e il procedimento è stato ripetuto una seconda volta per massimizzare la resa estrattiva.

L'estratto complessivo è stato concentrato mediante evaporatore BÜCHI Rotavapor R-114 in combinazione con BÜCHI Waterbath B-480 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland).

Il residuo è stato ricostituito in 1 mL di soluzione metanolica (MeOH:H₂O 1:1 (v/v)) e conservato a -18°C in attesa di essere analizzato.

Sono state effettuate tre repliche del processo (n=3).

3.5 Estrazione dei fenoli legati

L'estrazione dei fenoli legati è stata condotta seguendo il metodo messo a punto da Verardo et al. (2011).

È stato preparato 1 L di soluzione di NaOH 1 M, ottenuta pesando 40 g di NaOH e portando a volume con acqua bidistillata.

Sono stati aggiunti 100 mL di NaOH 1 M a ciascuno dei due campioni rimasti dalla precedente estrazione in una bottiglia di topazio della capacità di 250 mL. È stato aggiunto N₂ nello spazio di testa per 15 secondi e la bottiglia è stata tappata per creare un'atmosfera inerte. I campioni sono stati posti in agitazione per tutta la notte a 65 rpm in ambiente oscuro, mantenendo la temperatura del bagno a 13°C.

Il giorno seguente sono stati ripresi i campioni e posti in ghiaccio, dopo aver raccolto eventuali residui dalle pareti della bottiglia con aliquote di acqua distillata. Mediante l'aggiunta di aliquote di

HCl (3-4 pipettate circa) ciascuna soluzione è stata portata a un pH compreso tra 2 e 2.5 con l'aiuto di un pHmetro precedentemente calibrato. Un'eventuale eccessiva acidità è stata corretta aggiungendo aliquote di NaOH 1 M.

I campioni sono stati posti in un imbuto separatore, addizionati di 100 mL di acetato di etile e agitati brevemente mantenendo l'imbuto in verticale, onde evitare la formazione di emulsioni che potessero ritardare la separazione delle fasi. Dopo una breve attesa, la fase acquosa inferiore è stata scartata nel vaso contenente il campione iniziale, mentre la fase organica soprastante è stata raccolta in una beuta. Il residuo acquoso è stato nuovamente sottoposto a estrazione con una seconda aliquota di acetato, ottenendo un'ulteriore quantità di estratto da aggiungere alla precedente. L'estratto complessivo è stato anidrificato mediante aggiunta di solfato di sodio e sottoposto a evaporazione nel BÜCHI Rotavapor R-114 per eliminare l'acetato.

Il residuo è stato ricostituito in 2 mL di soluzione metanolica (MeOH:H₂O 1:1 (v/v)) e conservato a -18°C in attesa dell'analisi.

3.6 Analisi mediante HPLC-ESI-TOF-MS

Le analisi sono state eseguite mediante un cromatografo liquido ACQUITY UPLC M-Class System di Waters (Waters Corp., Milford, MA, USA), composto da un degaser, una pompa binaria e un autocampionatore accoppiato a uno spettrometro di massa con analizzatore a tempo di volo SYNAP G2 di Waters.



Figura 16. HPLC-ESI-TOF-MS utilizzato nella presente tesi

La colonna HPLC utilizzata è una colonna Poroshell 120, SB-C18 (3.0×100 mm, 2.7 µm) di Agilent Technologies (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). L'analisi è stata effettuata utilizzando il gradiente proposto da Gomez-Caravaca, et al. (2014). Tutti gli estratti sono stati filtrati con filtri a trottola da 0,20 µm.

La ionizzazione è stata effettuata in modalità negativa in un range di massa m/z 50-1100.

La calibrazione dello strumento è stata effettuata per ogni analisi in modalità di calibrazione interna, utilizzando una soluzione nota fornita dall'azienda Waters.

Capitolo 4: Risultati e discussione

Come riportato nella sezione “Materiali e metodi”, gli estratti sono stati analizzati mediante saggio al reattivo di Folin-Ciocalteu, in modo da quantificare il contenuto totale di composti fenolici. Tuttavia, nonostante la centrifugazione e successiva filtrazione con filtri da 0,2 micron, è stato osservato un intorbidimento degli estratti, probabilmente dovuto all’insolubilizzazione di alcuni composti. Questo non ha permesso l’analisi spettrofotometrica, pertanto l’identificazione e la quantificazione dei composti fenolici è stata effettuata solo mediante HPLC-ESI-TOF-MS.

4.1 Identificazione e quantificazione dei fenoli liberi

L’analisi dell’estratto solubile di farina di teff mediante HPLC-ESI-TOF-MS ha permesso di riscontrare la presenza di 15 composti fenolici, come mostrato dal base peak chromatogram (BPC) (Fig. 20).

L’identificazione di ciascun picco è stata realizzata sulla base del tempo di ritenzione del composto, il suo spettro di massa e le informazioni già presenti in letteratura.

I dati ottenuti (tempo di ritenzione, formula molecolare, rapporto m/z sperimentale e calcolato, errore in ppm e corrispondenza con la distribuzione isotopica del composto) sono riportati in Tabella 3.

In accordo con Ravisankar et al. (2018), tutti i composti identificati appartengono alla famiglia dei flavoni: 11 di essi sono derivati dell’apigenina, due derivano dalla luteolina e i due restanti sono composti acetilati, derivati dal flavone vitexina.

I picchi 1, 3, e 5 sono stati rivelati in corrispondenza di valori di m/z rispettivamente pari a 593,1512, 593,1509 e 593,1502, che hanno permesso di identificarli come tre isomeri dell’apigenina diesoside (formula molecolare $C_{27}H_{30}O_{15}$).

Gli ioni al tempo di ritenzione di 8,825 e 9,384 minuti (picchi 4 e 6) hanno mostrato un rapporto m/z pari a 563,1394 e 563,1407, corrispondenti alla formula molecolare $C_{26}H_{28}O_{14}$: pertanto è stata proposta la loro identificazione come isomeri I e II del flavonoide apigenina esoside pentoside.

La presenza del composto apigenina esoside (formula molecolare $C_{21}H_{20}O_{10}$) è stata suggerita dai picchi 7 e 8, corrispondenti al valore sperimentale di m/z di 431,0984. La rivelazione di tali ioni in tempi di ritenzione differenti, nonostante il medesimo rapporto m/z , può essere spiegata dalla presenza di due isomeri del flavone identificato, caratterizzati da una struttura e quindi una polarità differente.

Lo ione al tempo di ritenzione 10,985 minuti (picco 9), ha mostrato un rapporto m/z di 445,1149, corrispondente alla formula molecolare $C_{22}H_{22}O_{10}$: pertanto è stato ricondotto al composto apigenina-7-metil-6/8-glucoside.

Un ulteriore derivato del flavone apigenina è stato identificato al tempo di ritenzione di 11,862 minuti (picco 12): si tratta dell'apigenina neoesperidoside, caratterizzata dal legame con il disaccaride neoesperidosio. La formula molecolare di tale composto ($C_{27}H_{30}O_{14}$) è stata ricavata sulla base di un m/z sperimentale pari a 577,1564.

Tra i derivati dell'apigenina, il composto che ha presentato il valore più elevato di m/z (pari a 743,1811) è stato rivelato in corrispondenza del picco 14 ($t_R = 12,582$ minuti). La formula molecolare ricavata ($C_{35}H_{36}O_{18}$) è stata attribuita al flavone apigenina-siringilarabinosil-glucoside, caratterizzato dal pentoso arabinosio e dal gruppo siringile come sostituenti.

Lo ione che ha presentato il tempo di ritenzione maggiore, pari a 13,53 minuti (picco 15), corrisponde al 7-metil apigenin-succinil glucoside, un ulteriore derivato dell'apigenina caratterizzato dalla presenza dei gruppi metile e succinile, che rendono la molecola scarsamente polare. Il valore di m/z rilevato è pari a 515,1202 e la formula molecolare ricavata è $C_{25}H_{24}O_{12}$.

Una varietà molto minore di composti è stata riscontrata tra i derivati della luteolina. Lo ione al picco 2 ($t_R = 7,783$ minuti) sembra corrispondere alla luteolina diesoside, avente formula molecolare $C_{27}H_{30}O_{16}$, ricavata da un m/z sperimentale pari a 609,1461.

Al tempo di ritenzione di 11,53 (picco 11) è stato rilevato uno ione avente m/z pari a 759,1786: questo è stato identificato come luteolina-siringilarabinosil-glucoside ($C_{35}H_{36}O_{19}$), che presenta i medesimi sostituenti del composto rilevato al picco 14 ma si differenzia per la presenza di un ulteriore atomo di ossigeno.

Il profilo fenolico libero è completato dall'identificazione di due isomeri dell'acetil-vitexina, derivanti dall'acetilazione del flavone vitexina e aventi formula molecolare $C_{23}H_{22}O_{11}$. Questo è stato permesso dalla rivelazione di due ioni ai tempi di 11,188 e 12,45 minuti (picchi 10 e 13), che hanno mostrato un rapporto m/z rispettivamente di 473,109 e 473,1086.

I composti illustrati sono stati precedentemente riportati da Ravisankar et al. (2018), ad eccezione degli isomeri I e II di acetil-vitexina, identificati per la prima volta nella farina di teff. Questo potrebbe essere dovuto all'origine e quindi alla composizione differente del campione, oppure all'utilizzo di un analizzatore di massa maggiormente sensibile.

La quantificazione dei composti fenolici liberi è stata eseguita utilizzando la quercetina come standard (sebbene siano stati presi in considerazione anche catechina, acido clorogenico e acido ferulico), poiché ha presentato la struttura più simile a quella dei composti isolati.

Persiste una certa differenza tra la risposta degli standard e il comportamento dei composti presenti nella farina di teff: pertanto, la quantificazione di questi ultimi rappresenta solo una stima della loro effettiva concentrazione. La concentrazione dei singoli composti è riportata in Tabella 4 ed è espressa in $\mu\text{g/g}$ di peso secco (d. w.) di campione.

Il contenuto totale di fenoli liberi, ottenuto come somma delle singole concentrazioni, è risultato essere pari a $113 \pm 2 \mu\text{g/g}$ d.w. di campione. Prevalgono i derivati dell'apigenina (circa l'86% dei fenoli liberi), mentre i derivati della luteolina costituiscono appena il 6% del totale. In particolare, è stata riscontrata un'elevata quantità di apigenina esoside (isomero I), pari a $42 \pm 3 \mu\text{g/g}$ d.w., seguita dall'isomero III di apigenina di-esoside ($15 \pm 2 \mu\text{g/g}$ d.w.) e dall'apigenina siringilarabinosil-glucoside ($7 \pm 1 \mu\text{g/g}$ d.w.). Tra i derivati dell'apigenina non sono da trascurare l'apigenina neoesperidoside ($5,30 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$ d.w.), l'isomero I di apigenina esoside pentoside ($4,8 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$ d.w.) e l'apigenina-7-metil-6/8-glucoside ($4,7 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ d.w.).

Per quanto riguarda i composti della luteolina, prevale la luteolina diesoside, stimata in concentrazione pari a $4,3 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ d.w., mentre la quantità di luteolina-siringilarabinosil-glucoside è poco più della metà ($2,9 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ d.w.).

Da notare una discreta quantità di acetil-vitexina nella forma isomerica I, pari a $5,2 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$ d.w. Sebbene dal punto di vista qualitativo i risultati ottenuti siano in accordo con quelli riportati da Ravisankar et al. (2018), l'aspetto quantitativo presenta differenze significative.

Secondo tale fonte, il composto presente in maggiore quantità è la luteolina diesoside, in concentrazione variabile tra $599,3 \pm 32,9$ (teff scuro, coltivato in Etiopia) e $375,1 \pm 5,7 \mu\text{g/g}$ (teff scuro, coltivato negli USA). Altri composti fenolici liberi presenti in quantità significative sono l'isomero III dell'apigenina diesoside (tra $590,4 \pm 13,9$ e $375,1 \pm 5,7 \mu\text{g/g}$) e l'isomero I dell'apigenina esoside (tra $388,3 \pm 7,4$ e $195,2 \pm 3,9 \mu\text{g/g}$), riscontrati nella stessa varietà di teff chiaro, coltivato in Etiopia oppure negli USA.

Pertanto, le analisi effettuate da Ravisankar et al. (2018) sembrano suggerire che la variabilità del dato quantitativo non dipenda solo dalla varietà di pianta (teff chiaro o scuro), ma anche dalle modalità e dal luogo di coltivazione.

Totalmente discordanti sono i risultati ottenuti da Kotásková et al. (2016). La fonte riporta un contenuto totale in fenoli liberi nettamente superiore (tra 284,5 e 626,6 $\mu\text{g/g}$); inoltre, i composti prevalenti sono acidi fenolici come il trans-p-cumarico, il protocatecuico, il ferulico e il gallico nella varietà scura e gli acidi protocatecuico e ferulico nella varietà bianca. Tale discrepanza potrebbe essere attribuita sia all'impiego di un'altra varietà di teff, sia al differente metodo di analisi (HPLC-DAD) che è meno specifico della metodologia che utilizza lo spettrometro di massa come detector.

Ancora maggiore è il contenuto in fenoli liberi riportato da Koubov et al. (2018): tra $530,8 \pm 1,8$ (teff bianco) e $751 \pm 2,1$ mg/kg (teff marrone). Anche in questo studio, i composti prevalenti nella frazione solubile sono acidi fenolici (soprattutto ferulico, protocatecuico, p-cumarico ed ellagico), mentre si riscontra una minore concentrazione di flavonoidi (rutina ed epigallocatechina).

Tabella 3. Composti fenolici liberi identificati nell'estratto insolubile di farina di teff mediante HPLC-ESI-TOF-MS.

Fonte	N°	Composto polare	Tempo di ritenzione (t _R)	Formula molecolare	m/z sperimentale	m/z calcolato	Errore (ppm)	Fit %
Ravisankar et al.	1	Apigenina dioside isomero I	7,766	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1512	593,1506	1	99,81
Ravisankar et al.	2	Luteolina dioside	7,783	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461	609,1456	0,8	99,89
Ravisankar et al.	3	Apigenina dioside isomero II	7,816	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1509	593,1506	0,5	99,73
Ravisankar et al.	4	Apigenina esode pentoside isomero I	8,825	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563,1394	563,1401	-1,2	97,41
Ravisankar et al.	5	Apigenina dioside isomero III	9,04	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1502	593,1506	-0,7	99,11
Ravisankar et al.	6	Apigenina esode pentoside isomero II	9,384	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563,1407	563,1401	1,1	99,99
Ravisankar et al.	7	Apigenina esode isomero I	9,649	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431,0984	431,0978	1,4	99,41
Ravisankar et al.	8	Apigenina esode isomero II	10,567	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431,0984	431,0978	1,4	99,9
Ravisankar et al.	9	Apigenina-7-Me-6/8-glucoside isomero I	10,985	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	445,1149	445,1135	3,1	99,03
	10	Acetil-vitexina isomero I	11,188	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	473,109	473,1084	1,3	98,77
Ravisankar et al.	11	Luteolin-siringilarabinosil-glucoside	11,53	C ₃₃ H ₃₆ O ₁₉	759,1786	759,1773	1,7	15,7
Ravisankar et al.	12	Apigenina neoesperidoside	11,862	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577,1564	577,1557	1,2	99,61
	13	Acetil-vitexina isomero II	12,45	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	473,1086	473,1084	0,4	100
Ravisankar et al.	14	Apigenin-siringilarabinosil-glucoside	12,582	C ₃₅ H ₃₆ O ₁₈	743,1811	743,1823	-1,6	86,95
Ravisankar et al.	15	7-metil apigenin-succinil glucoside	13,53	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1202	515,119	2,3	99,92

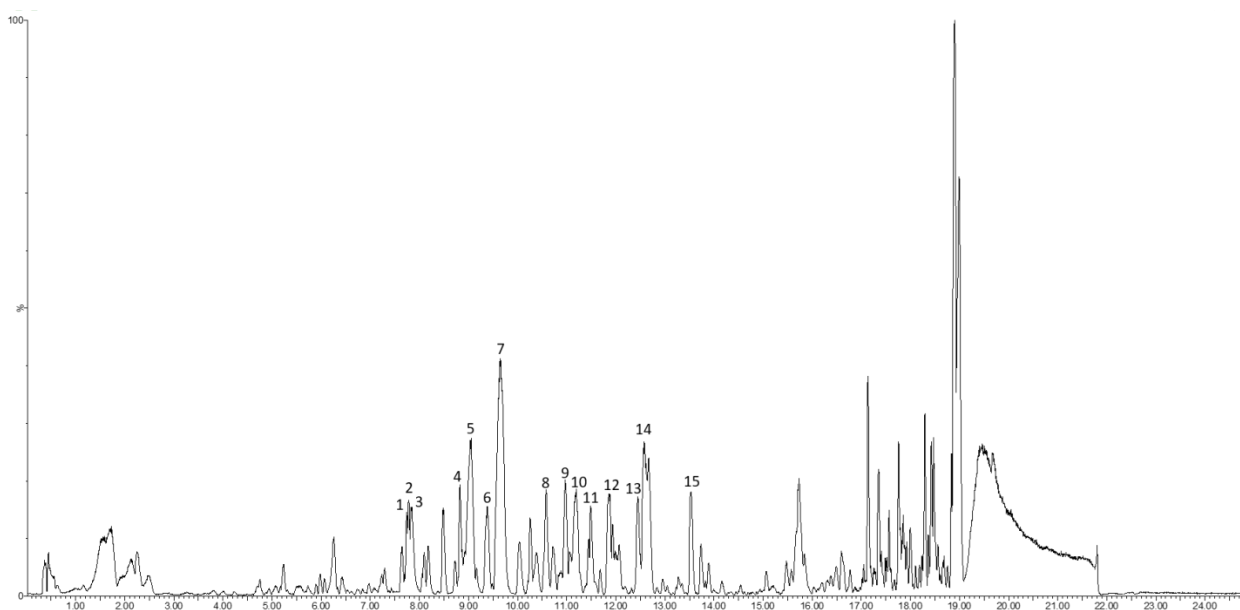


Figura 17. Base peak chromatogram dell'estratto solubile di farina di teff.

N°	Composto polare	Concentrazione (µg/g campione d.w.)
1	Apigenina diesoside isomero I	2,99 ± 0,03
2	Luteolina diesoside	4,3 ± 0,2
3	Apigenina diesoside isomero II	3,72 ± 0,05
4	Apigenina esoside pentoside isomero I	4,8 ± 0,3
5	Apigenina diesoside isomero III	15 ± 2
6	Apigenina esoside pentoside isomero II	4,07 ± 0,07
7	Apigenina esoside isomero I	42 ± 3
8	Apigenina esoside isomero II	3,52 ± 0,05
9	Apigenin-7-Me-6/8-glucoside isomero I	4,7 ± 0,2
10	Acetil-vitexina isomero I	5,2 ± 0,3
11	Luteolin-siringilarabinosil-glucoside	2,9 ± 0,1
12	Apigenina neoesperidoside	5,30 ± 0,06
13	Acetil-vitexina isomero II	3,64 ± 0,02
14	Apigenin-siringilarabinosil-glucoside	7 ± 1
15	7-metil apigenin-succinil glucoside	3,57 ± 0,03
	Totale (µg/g campione d.w.)	113 ± 2

Tabella 4. Concentrazione dei composti fenolici liberi identificati nell'estratto solubile di farina di teff.

4.2 Identificazione e quantificazione dei fenoli legati

L'analisi dell'estratto insolubile di teff ha condotto alla separazione e identificazione di 5 differenti composti, tutti appartenenti alla famiglia degli acidi fenolici e derivanti dall'acido ferulico.

Il BPC ottenuto è illustrato in Figura 21, mentre la Tabella 5 riporta, per ciascun composto, il tempo di ritenzione, la formula molecolare, i valori di m/z sperimentale e calcolato, l'errore e la fit %.

Lo ione del picco 1 ($t_R = 7,945$ minuti) mostra un m/z pari a 193,0511, pertanto è stato identificato come acido ferulico (formula molecolare $C_{10}H_{10}O_4$). Lo ione rivelato in corrispondenza del picco 2 ($t_R = 8,685$ minuti) presenta un valore di m/z molto simile (pari a 193,0513), perciò è stato attribuito a un isomero dell'acido ferulico, l'acido isoferulico, caratterizzato dalla medesima formula molecolare.

I picchi 3, 4 e 5 sono stati rilevati ai tempi di ritenzione di 1,2, 11,96 e 14,122 minuti e hanno mostrato valori di m/z analoghi, pari a 385,0911, 385,0921 e 385,0918. Pertanto sono stati identificati come tre isomeri dell'acido diferulico, caratterizzati dalla medesima formula molecolare $C_{20}H_{18}O_8$ ma da un tipo di legame differente tra i due monomeri di acido ferulico: si tratta dell'8-5'-DiFA, del 5-5'-DiFA e dell'8-4'-DiFA.

Tutti i composti appena illustrati sono già stati riscontrati nell'estratto insolubile di farina di teff da Ravisankar et al. (2018).

La Tabella 6 riporta la concentrazione di ciascun composto identificato, espressa in $\mu\text{g/g}$ d.w., ottenuta impiegando acido ferulico come standard.

Il contenuto totale in fenoli legati dell'estratto insolubile di teff è di $125 \pm 3 \mu\text{g/g}$ d.w., valore nettamente inferiore a quelli ottenuti da Ravisankar et al. ($600 - 728 \mu\text{g/g}$ d.w.), da Kotásková et al. ($188,4 - 423,3 \mu\text{g/g}$) e da Koubov et al. (tra $272,2 \pm 2,0$ e $321,5 \pm 3,1 \text{ mg/kg}$). Come riscontrato dal presente studio, le tre fonti concordano nell'affermare che la frazione insolubile è dominata dagli acidi fenolici.

In accordo con Ravisankar et al. (2018), prevalgono le forme monomeriche quali l'acido isoferulico ($54,7 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$) e l'acido ferulico ($17,5 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$). Tra i deidrodimeri dell'acido ferulico, il composto principale è l'8,4'-DiFA, presente in concentrazione di $42 \pm 1 \mu\text{g/g}$ d.w..

Altri studi hanno evidenziato una maggiore varietà di fenoli legati: accanto all'acido ferulico, Kotásková et al. (2016) ipotizzano la presenza di quercetina, catechina e acido gallico (nel teff marrone) e di quercetina, catechina e rutina (nel teff bianco).

Secondo Koubov et al. (2018) sarebbero presenti anche acido gallico, acido sinapico, acido ellagico, catechina ed epigallocatechina.

Tabella 5. *Composti fenolici legati identificati nell'estratto insolubile di farina di teff mediante HPLC-ESI-TOF-MS.*

Fonte	N°	Composto polare	Tempo di ritenzione (t _R)	Formula molecolare	m/z sperimentale	m/z calcolato	Errore (ppm)	Fit %
Ravisankar et al.	1	Acido ferulico	7,945	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193,0511	193,0501	5,2	21,3
Ravisankar et al.	2	Acido isoferulico	8,685	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193,0513	193,0501	6,2	99,95
Ravisankar et al.	3	5,5'- acido diferulico	11,2	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	385,0911	385,0923	-3,1	41,44
Ravisankar et al.	4	8,5'- acido diferulico	11,96	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	385,0921	385,0923	-0,5	97,97
Ravisankar et al.	5	8,4'- acido diferulico	14,122	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	385,0918	385,0923	-1,8	93,82

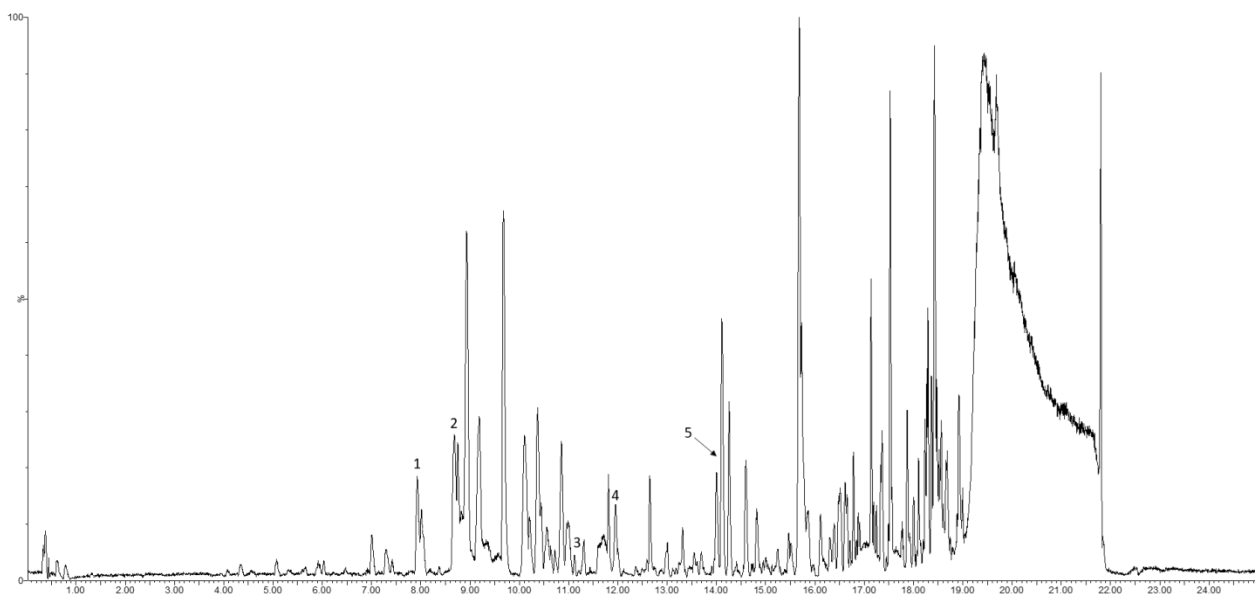


Figura 18. Base peak chromatogram dell'estratto insolubile di farina di teff.

N°	Composto polare	Concentrazione (µg/g campione d.w.)
1	Acido ferulico	17,5 ± 0,2
2	Acido isoferulico	54,7 ± 0,3
3	5,5'- acido diferulico	1,8 ± 0,2
4	8,5'- acido diferulico	9 ± 1
5	8,4'- acido diferulico	42 ± 1
	Totale (µg/g campione d.w.)	125 ± 3

Tabella 6. Concentrazione dei composti fenolici legati identificati nell'estratto insolubile di farina di teff.

Capitolo 5: Conclusioni

I dati ottenuti sottolineano come il teff sia una fonte di flavonoidi presenti in forma libera, mentre, al pari di altri cereali, i fenoli legati sono costituiti da acidi fenolici, rappresentati maggiormente dall'acido ferulico e i suoi derivati.

L'uso dell'HPLC-ESI-TOF-MS ha permesso l'identificazione e quantificazione di due isomeri che non erano stati precedentemente identificati.

Occorre inoltre sottolineare come non è stato possibile effettuare la determinazione dei composti fenolici totali mediante il reattivo di Folin-Ciocalteu, metodo ampiamente utilizzato per stimare il contenuto fenolico totale, a causa dell'intorbidimento dell'estratto in fase di diluizione. Questo risultato ha confermato il limite di tale metodologia nella determinazione dei composti fenolici.

Sono in atto ulteriori studi per l'identificazione di altri composti fenolici, sia liberi sia legati, negli estratti di farina di teff.

Bibliografia

- Abebe, Y.; Bogale, A.; Hambidge, K. M.; Stoeckerc, B. J.; Bailey, K. e Gibson, R. S. (2007), *Phytate, Zinc, Iron and Calcium Content of Selected Raw and Prepared Foods Consumed in Rural Sidama, Southern Ethiopia, and Implications for Bioavailability*, Journal of Food Composition and Analysis, 20, 161-168.
- Abebe, W. e Ronda, F. (2014), *Rheological and textural properties of tef [Eragrostis tef (Zucc.) Trotter] grain flour gels*, Journal of Cereal Science, 60, 122-130.
- Akansha; Sharma, K. e Chauhan, E. S. (2018), *Nutritional composition, physical characteristics and health benefits of teff grain for human consumption: A review*, The Pharma Innovation Journal, 7, 3-7.
- Amoako, D. B. e Awika, J. M. (2016), *Polymeric tannins significantly alter properties and in vitro digestibility of partially gelatinized intact starch granule*, Food Chemistry, 208, 10-17.
- Assefa, K.; Cannarozzi, G.; Girma, D.; Kamies, R.; Chanyalew, S.; Plaza-Wüthrich, S. et al. (2015), *Genetic diversity in tef [Eragrostis tef (Zucc.) Trotter]*, Frontiers Plant Science, 6, 177.
- Baye, K.; Mouquet-Rivier, C.; Icard-Vernière, C.; Rochette, I. e Guyot, J. P. (2013), *Influence of flour blend composition on fermentation kinetics and phytate hydrolysis of sourdough used to make injera*, Food Chemistry, 138, 430–436.
- Baye, K.; Mouquet-Rivier, C.; Icard-Vernière, C.; Picq, C. e Guyot, J. P. (2014), *Changes in mineral absorption inhibitors consequent to fermentation of Ethiopian injera: Implications for predicted iron bioavailability and bioaccessibility*, International Journal of Food Science and Technology, 49, 174–180.
- Berhane, G., Paulos, Z., Tafere, K. e Tamru, S. (2011), *Foodgrain consumption and calorie intake patterns in Ethiopia*, Ethiopia strategy support program II, documento di lavoro n°23.
- Boka, B.; Woldegiorgis, A. Z. e Haki, G. D. (2013), *Antioxidant properties of Ethiopian traditional bread (injera) as affected by processing techniques and tef grain [Eragrostis tef (Zucc.)] varieties*, Canadian Chemical Transactions, 1, 7-24.
- Bultosa, G. e Taylor J. R. N. (2004), *Teff*, Encyclopedia of Grain Science, Academic Press, 281-290.
- Bultosa, G.; Hamaker, B. R. e BeMiller, J. N. (2008), *An SEC-MALLS study of molecular features of water-soluble amylopectin and amylose of tef [Eragrostis tef (Zucc.) Trotter] starches*, Starch/Stärke, 60, 8–22.

Bultosa, G. (2016), *Teff: Overview*, In C. Wrigley; H. Corke; K. Seetharaman e J. Faubion, *Encyclopedia of food grains*, Academic Press, 209-220.

Callejo, M. J.; Benavente, E.; Ezpeleta, J. I.; Laguna, M. J.; Carrillo, J. M. e Rodríguez-Quijano, M. (2016), *Influence of teff variety and wheat flour strength on breadmaking properties of healthier teff-based breads*, *Journal of Cereal Science*, 68, 38-45.

Crymes, A. R. (2015), *The international footprint of teff: Resurgence of an ancient ethiopian grain*.

Dahlia e Marlène (2014), *African cuisine*, Edizioni R.E.I, 120.

De Oliveira do Nascimento, K.; do Nascimento Dias Paes, S.; de Oliveira, I. R.; Reis, I. P. e Ivanilda, M. A. (2018), *Teff: Suitability for Different Food Applications and as a Raw Material of Gluten-free, a Literature Review*, *Journal of Food and Nutrition Research*, 6, 74-81.

El-Alfya, T. S.; Ezzata, S. M. e Sleem, A. A. (2012), *Chemical and biological study of the seeds of Eragrostis tef (Zucc.) Trotter*, *Natural Product Research*, 26, 619–629.

Emmambux, M. N. e Taylor, J. R. N. (2013), *Morphology, physical, chemical, and functional properties of starches from cereals, legumes, and tubers cultivated in Africa: A review*, *Starch/Stärke*, 65, 715–729.

Fischer, M. M.; Egli, I. M.; Aeberli, I.; Hurrell, R. F. e Meile, L. (2014), *Phytic acid degrading lactic acid bacteria in tef-injera fermentation*, *International Journal of Food Microbiology*, 190, 54–60.

Forsido S. F.; Rupasinghe H. P. e Astatkie T. (2013), *Antioxidant capacity, total phenolics and nutritional content in selected Ethiopian staple food ingredients*, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64, 915-920.

Gebremariam, M. M.; Zarnkow, M. e Becker, T. (2013a), *Thermal stability of starch degrading enzymes of teff (Eragrostis tef) malt during isothermal mashing*, *Process Biochemistry*, 48, 1928–1932.

Gebremariam, M. M.; Zarnkow, M. e Becker, T. (2013b), *Effect of drying temperature and time on alpha-amylase, beta-amylase, limit dextrinase activities and dimethyl sulphide level of teff (Eragrostis tef) malt*, *Food and Bioprocess Technology*, 6, 3462–3472.

Gebremariam, M. M., Zarnkow, M. e Becker, T. (2013c), *Effect of teff (Eragrostis tef) variety and storage on malt quality attributes*, *Journal of the Institute of Brewing*, 119, 64–70.

Gebremariam, M. M.; Zarnkow, M. e Becker, T. (2014) *Teff (Eragrostis tef) as a raw material for malting, brewing and manufacturing of gluten-free foods and beverages: A review*. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 2881-2895.

Gebremariam, M. M.; Abegaz, K.; Zarnkow, M. e Becker, T. (2015), *Studies on the mashing conditions of teff (Eragrostis tef) malt as a raw material for lactic acid fermented gluten-free beverage*, International Journal of Food Science and Technology, 50, 2032–2037.

Gebremariam, M. M.; Hassani, A.; Zarnkow, M. e Becker, T. (2015), *Investigation of fermentation conditions for teff (Eragrostis tef) malt-wort by Lactobacillus amylolyticus*, LWT_Food, Science and Technology, 61, 164–171.

Gómez-Caravaca, A. M.; Verardo, V.; Berardinelli, A.; Marconi, E. e Caboni, M. F. (2014), *A chemometric approach to determine the phenolic compounds indifferent barley samples by two different stationary phases: A comparison between C18 and pentafluorophenyl core shell columns*, Journal of Chromatography A, 1355, 134-142.

Griffith, L. D.; Castell-Perez, M. E. e Griffith, M. E. (1998), *Effects of blend and processing method on the nutritional quality of weaning foods made from select cereals and legumes*, Cereal Chemistry, 75, 105–112.

Hager, A. S.; Wolter, A.; Jacob, F.; Zannini, E. e Arendt, E. K. (2012), *Nutritional properties and ultra-structure of commercial gluten free flours from different botanical sources compared to wheat flours*, Journal of Cereal Science, 56, 239–247.

Hager A. S.; Lauck, F.; Zannini, E. e Arendt, E. K. (2012), *Development of gluten-free fresh egg pasta based on oat and teff flour*, European Food Research and Technology, 235, 861-871.

Hager, A. S.; Wolter, A.; Czerny, M.; Bez, J.; Zannini, E.; Arendt, E. K., et al. (2012), *Investigation of product quality, sensory profile and ultrastructure of breads made from a range of commercial gluten-free flours compared to their wheat counterparts*, European Food Research and Technology, 235, 333–344.

Hager, A. S. e Arendt, E. K. (2013), *Influence of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), xanthan gum and their combination on loaf specific volume, crumb hardness and crumb grain characteristics of gluten-free breads based on rice, maize, teff and buckwheat*, Food Hydrocolloids, 32, 195–203.

Helbing, J. (2009), *Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie zur Beobachtung der Mälzung verschiedener Zerealien und Pseudozerealien*, Technische Universität München.

Kotásková, E.; Sumczynski, D.; Mlček, J. e Valášek, P. (2016), *Determination of free and bound phenolics using HPLC-DAD, antioxidant activity and in vitro digestibility of Eragrostis tef*, Journal of Food Composition and Analysis, 46, 15–21.

Lee, H. (2018), *Teff, A Rising Global Crop: Current Status of Teff Production and Value Chain*, The open agriculture journal, 12, 185-193.

Lindeboom, N.; Chang, P. R. e Tyler, R. T. (2004), *Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: A review*, *Starch/Stärke*, 56, 89–99.

Lovis, L. J. (2003), *Alternatives to wheat flour in baked goods*, *Cereal Foods World*, 48 (2), 61-63.

Michaelraj P. S. J. e Shanmugam A. (2013), *A study on millets based cultivation and consumption in India*, *International Journal of Marketing, Financial Services & Management Research*, 2(4), 9-58.

Mancebo, C. M.; Picón, J. e Gómez, M. (2015), *Effect of flour properties on the quality characteristics of gluten free sugar-snap cookies*, *LWT_Food. Science and Technology*, 64, 264–269.

Minarovičová, L.; Lauková, M.; Karovičová, J.; Kohajdová, Z. E Kepičová, V. (2019), *Gluten-free rice muffins enriched with teff flour*, *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 13 (1), 187-193.

Robin, F.; Théoduloz, C. e Srichuwong, S. (2015), *Properties of extruded whole grain cereals and pseudocereals flours*, *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 2152–2159.

Ronda, F.; Abebe, W.; Pérez-Quirce, S. e Collar, C. (2015), *Suitability of tef varieties in mixed wheat flour bread matrices: A physico-chemical and nutritional approach*, *Journal of Cereal Science*, 64, 139–146.

Salawu, S. O.; Bester, M. J.; and Duodu, K. G. (2014), *Phenolic composition and bioactive properties of cell wall preparations and whole grains of selected cereals and legumes*, *Journal of Food Biochemistry*, 38, 62-72.

Shumoy, H. e Raes, K. (2016), *Antioxidant Potentials and Phenolic Composition of Tef Varieties: An Indigenous Ethiopian Cereal*, *Cereal Chemistry*, 93(5), 465–470.

Singleton, V.L. e Rossi, J.A. (1965), *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.

Ravisankar, A.; Abegaz, K. e Awika, J. M. (2018), *Structural profile of soluble and bound phenolic compounds in teff (*Eragrostis tef*) reveals abundance of distinctly different flavones in white and brown varieties*, *Food Chemistry*, 263, 265-274.

Taylor, J.; Bean, S. R.; Ioerger, B. P. e Taylor, J. R. N. (2007), *Preferential binding of sorghum tannins with γ -kafirin and the influence of tannin binding on kafirin digestibility and biodegradation*, *Journal of Cereal Science*, 46(1), 22-31.

Teklehaimanot, W. H.; Duodu, K. G. e Emmambux, M. N. (2013), *Maize and teff starches modified with stearic acid as potential fat replacer in low calorie mayonnaise-type emulsions*, *Starch/Stärke*, 65, 773–781.

Verardo, V.; Gómez-Caravaca, A.M.; Marconi, E. e Caboni, M. F. (2011), *Air classification of barley flours to produce phenolic enriched ingredients: Comparative study among MEKC-UV, RP-HPLC-DAD-MS and spectrophotometric determinations*, *LWT – Food Science and Technology*, 44, 1555–1561.

Wokadala, O. C.; Ray, S. S. e Emmambux, M. N. (2012), *Occurrence of amylose–lipid complexes in teff and maize starch biphasic pastes*, *Carbohydrate Polymers*, 90, 616–622.

Wolter, A.; Hager, A. S.; Zannini, E.; Czerny, M. e Arendt, E. K. (2014), *Impact of sourdough fermented with *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 on baking and sensory properties of gluten-free breads*, *European Food Research and Technology*, 239, 1–12.

Yilmaz, H. O. e Arslan, M. (2018), *Teff: Nutritional Compounds and Effects on Human Health*, *Acta Scientific Medical Science*, 2.9, 15-18.

Zhu, F. (2018), *Chemical composition and food uses of teff (*Eragrostis tef*)*, *Food Chemistry*, 239, 402-415.