

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA**

Dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie Alimentari

Ciclo XXVI

**EVALUATION OF NUTRITIONAL QUALITY OF  
CEREALS: BIOACCESSIBILITY AND EFFECT  
OF THERMAL TREATMENT**

**Coordinatore:**

**Chiar.mo Prof. Furio Brighenti**

**Tutor:**

**Chiar.ma Prof.ssa Nicoletta Pellegrini**

**Dottoranda: Maria Zaupa**

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	
1. Generalità	5
1.1 Classificazione	5
1.2 Produzione	5
2. Effetti del consumo di cereali integrali sulla salute	6
2.1 Malattie cardiovascolari	7
2.1.1 Cardiopatia coronarica	8
2.1.2 Dislipidemia	10
2.1.3 Ipertensione	10
2.2 Diabete	11
2.3 Cancro	13
3. Struttura della cariossida	17
3.1 Tessuti esterni	17
3.2 Endosperma	17
3.3 Embrione	18
4. Composizione chimica	20
4.1 Macronutrienti	21
4.1.1 Carboidrati	21
4.1.2 Proteine	21
4.1.3 Lipidi	22
4.2 Micronutrienti	22
4.2.1 Vitamine	22
4.2.2 Minerali	24
4.3 Fibra	24
5. Composti antiossidanti	28
5.1 Composti fenolici	28
5.1.1 Acidi fenolici	29
5.1.2 Antocianine	32

5.1.3 Procianidine	34
5.2 Alchilresorcinoli	35
5.3 $\gamma$ -orizanoli	35
5.4 Carotenoidi	36
6. Effetto della cottura sulla componente antiossidante dei cereali	37
7. Effetto della cottura sulla struttura dei cereali	42
8. Interazioni tra i composti antiossidanti e le componenti della matrice dell'alimento	45
9. Bioaccessibilità e biodisponibilità	47
Letteratura citata	51
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>67</b>
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	
<b>Studio 1:</b> <i>In vitro</i> bioaccessibility of phenolics and vitamins from durum wheat aleurone fractions	70
<b>Studio 2:</b> Effect of cooking on total antioxidant capacity and anatomical change of differently pigmented rice varieties	93
<b>Studio 3:</b> Characterization of phenolic compounds of differently pigmented rice varieties and their changes during domestic cooking	111
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>142</b>

# *Riassunto*

L'evidenza epidemiologica suggerisce che il consumo di cereali integrali sia associato ad un ridotto rischio di malattie cronico-degenerative, probabilmente a causa del loro contenuto in fibra alimentare, micronutrienti e composti antiossidanti, localizzati principalmente negli strati esterni della cariosside. La qualità nutrizionale di un alimento tuttavia non dipende soltanto dal contenuto in composti bioattivi, ma anche dalla loro bioaccessibilità, che è influenzata dalla struttura della matrice e dai trattamenti (termici, meccanici) che l'alimento subisce. Da queste considerazioni, il progetto di dottorato si è sviluppato in due tematiche.

Un primo lavoro ha analizzato la bioaccessibilità di vitamine, acidi fenolici e capacità antiossidante (TAC) in diverse frazioni di frumento duro ricche di strato aleuronico. I risultati hanno messo in luce che queste frazioni sono nutrizionalmente interessanti, grazie al loro contenuto in fibra e all'eccellente bioaccessibilità dei composti analizzati. In particolare, le vitamine, i composti fenolici e la capacità antiossidante sono risultati maggiormente bioaccessibili nella parte più interna dello strato aleuronico rispetto alla parte più esterna e alla crusca, rendendo la parte interna dell'aleurone interessante come ingrediente da utilizzare nella formulazione di nuovi prodotti.

Un secondo tema del progetto ha riguardato lo studio dell'effetto della cottura (mediante bollitura e cottura a risotto) sulla capacità antiossidante e sul profilo fenolico di tre varietà di riso integrale diversamente pigmentate. La capacità antiossidante ha risentito maggiormente della bollitura in tutte le varietà, mentre solo nella varietà di riso nero la cottura a risotto ha determinato un incremento della TAC. I diversi composti fenolici hanno risentito in maniera diversa della cottura, con una diminuzione generale per antocianine, flavan-3-oli e flavonoli, mentre alcuni acidi fenolici non hanno risentito del trattamento termico. E' stato inoltre valutato l'effetto della cottura sulla struttura anatomica del riso, osservando modifiche soprattutto nell'endosperma. E' stato ipotizzato che durante la cottura parte dei composti, inclusi gli antiossidanti, vengano lisciviati nel liquido di cottura e che nel caso del risotto vengano successivamente riassorbiti, probabilmente attraverso le fratture della cariosside. Questo suggerisce che per una migliore comprensione dell'effetto della cottura sulla capacità antiossidante sia importante considerare non soltanto i composti antiossidanti ma anche la struttura della matrice.

The epidemiological evidences suggest that whole grain consumption is associated with a reduced risk of chronic diseases. This probably occurs because whole grains contain dietary fibre, micronutrients and antioxidant compounds, mostly located in the outermost layer of the caryopsis. However, the nutritional quality of a food does not depend only on the content of phytochemicals, but also on their bioaccessibility, which is influenced by the structure of the food matrix and the treatments (e.g. thermal, mechanical) done on food. From these considerations, the PhD project was developed in two topics.

The first work analyzed the bioaccessibility of vitamins, phenolic acids and antioxidant capacity (TAC) in different aleurone wheat fractions. The results showed that these fractions are nutritionally interesting, thanks to their high fibre content and an excellent bioaccessibility of analyzed compounds. In particular, vitamins, phenolic compounds and the antioxidant capacity were more bioaccessible in the inner part of aleurone layer with respect to the outer part of aleurone and the bran. It suggests that the inner part of aleurone can be used as an ingredient in the formulation of new wheat based products.

A second topic of the PhD project regarded the effect of cooking (with “risotto” method and boiling) on antioxidant capacity and phenolic profile of three differently pigmented rice varieties. The antioxidant capacity was affected by boiling in all the varieties, whereas risotto cooking caused an increase of the TAC only in black rice variety. Cooking differently influenced the different phenolic compounds, with a decrease of anthocyanins, flavan-3-ols and flavonols, whereas some phenolic acids were not affected. Moreover, the effect of cooking on the anatomical structure of rice was evaluated, observing modifications mainly in the endosperm. It was hypothesized that during cooking part of the compounds, included antioxidant compounds, are leached into the cooking medium and then, in the case of risotto cooking, they are subsequently re-absorbed, probably through the fractures in the caryopsis. This suggests that for a better comprehension of the cooking effect on antioxidant capacity it is important to consider not only antioxidant compounds, but also the structure of the matrix.

# *Introduzione*

# 1. GENERALITA'

## 1.1 Classificazione

I cereali sono piante monocotiledoni che botanicamente appartengono alla famiglia delle Poaceae (o Graminaceae). I cereali maggiormente diffusi sono: frumento (*Triticum aestivum*, *T. durum*, *T. spelta*), riso (*Oryza sativa*), mais (*Zea mays*), orzo (*Hordeum* spp.), sorgo (*Sorghum* spp.), miglio (*Elusine coracana*, *Eragrostis abyssinica*, *Panicum miliaceum*, *Pennisetum glaucum*), avena (*Avena* spp., soprattutto *A. sativa*), segale (*Secale cereale*), fonio (*Digitaria* spp., soprattutto *D. exilis*) e triticale (*x Triticosecale*, un ibrido artificiale tra la segale e il frumento). Generalmente, nel gruppo dei cereali vengono inclusi anche i cosiddetti pseudo-cereali, specificatamente il grano saraceno (*Fagopyrum esculentum*), appartenente alla famiglia delle Polygonaceae, la quinoa (*Chenopodium quinoa*), appartenente alle Chenopodiaceae, e l'amaranto (*Amaranthus* spp.), appartenente alle Amaranthaceae.

## 1.2 Produzione

I cereali e loro prodotti derivati rappresentano la maggiore fonte energetica nella dieta italiana con un contributo del 38.4 %, seguiti a distanza da oli e grassi (16.8 %) e latte e derivati (12.5 %) (Sette et al. 2013). A livello mondiale, la loro importanza è ancora maggiore, soprattutto nei Paesi in via di sviluppo e del terzo mondo, in cui il consumo di cereali fornisce in alcuni casi più del 50 % dell'energia assunta con la dieta (FAO, WFP and IFAD 2012).

I cereali, in termini di quantità prodotta, sono sicuramente il principale alimento prodotto. A livello mondiale, la produzione di mais, riso e frumento (considerati individualmente) è seconda soltanto alla canna da zucchero, con un quantitativo di 859, 469 e 655 milioni di tonnellate prodotte, rispettivamente per mais, riso e frumento (USDA Foreign Agricultural Service, dati riferiti all'anno 2012/13; FAOSTAT, Food and Agriculture Organization, 2013). Le previsioni per il 2013/14 affermano che la produzione mondiale di cereali aumenterà del 7.2 % rispetto all'anno precedente, raggiungendo la quota di 2479 milioni di tonnellate di cereali totali (FAO, Food and Agriculture Organization, dati aggiornati all'11/07/2013). Un sensibile aumento è previsto soprattutto per l'Europa. In particolare, la produzione di frumento raggiungerà 704 milioni di tonnellate, il riso 500 milioni di tonnellate, mentre la produzione di cereali diversi da frumento e riso sarà di circa 1275 milioni di tonnellate (FAO, Food and Agriculture Organization, dati aggiornati all'11/07/2013).

## 2. EFFETTI DEL CONSUMO DI CEREALI INTEGRALI SULLA SALUTE

Negli ultimi anni, l'evidenza scientifica riguardante l'effetto benefico del consumo di cereali integrali sulla salute si è fatta più consistente. Diversi studi hanno osservato effetti positivi legati al consumo di cereali integrali sul rischio di sviluppare diverse malattie, quali malattie cardiovascolari, diabete di tipo 2 e alcune forme di cancro. Nonostante le numerose evidenze scientifiche, soprattutto di tipo epidemiologico, alcuni lavori riportano risultati discordanti o poco chiari. Una delle difficoltà che può essere incontrata nell'analizzare in modo corretto l'effetto dei cereali integrali su alcune malattie e nel confrontare gli studi disponibili in letteratura è la definizione di cereale integrale o di alimento integrale.

Attualmente non esiste una definizione di cereale integrale accettata a livello internazionale. Una definizione precisa di cereale integrale è stata data per la prima volta dall'American Association of Cereal Chemists (AACC) International nel 1999: "Whole grain shall consist in the intact, ground, cracked or flaked caryopsis, whose principal anatomical components – the starchy endosperm, germ and bran – are present in the same relative proportions as they exist in the intact caryopsis". La stessa organizzazione nel 2013 ha dato la seguente definizione di prodotti integrali: "a whole grain food must contain 8 grams or more of whole grain per 30 grams of products" (AACC, sito internet). Un'ulteriore definizione è stata proposta nel 2004 dall'American Whole Grains Council (WGC), che ha definito i cereali integrali in maniera simile all'AACC International: "Whole grains or foods made from them contain all the essential parts and naturally-occurring nutrients of the entire grain seed in their original proportions. If the grain has been processed (e.g., cracked, crushed, rolled, extruded, and/or cooked), the food product should deliver the same rich balance of nutrients that are found in the original grain seed" (WGC, sito internet).

Negli Stati Uniti a livello legislativo esiste però un'altra definizione di prodotto integrale da utilizzare per l'etichettatura alimentare data dalla Food and Drug Administration. Il Food and Drug Administration Modernization Act nel 1999 ha infatti definito che un alimento integrale deve contenere  $\geq 51$  % in peso di ingredienti integrali per la quantità di riferimento abitualmente consumata (FDA, sito internet). In questa definizione sono esclusi gli alimenti con un contenuto  $\geq 25$  % di crusca legata a una sua addizione (Cho et al. 2013). Nel 2006, la Food and Drug Administration e l'U.S. Department of Health and Human Services hanno inoltre pubblicato una guida che descrive in modo più specifico gli alimenti che possono essere considerati cereali integrali e prodotti integrali (USD Health and Human Services & FDA 2006). In particolare, la guida riprende la definizione di cereale integrale già proposta dall'AACC nel 1999 e suggerisce quali trattamenti tecnologici possono essere applicati ai cereali integrali. Risultano esclusi da questa definizione alcuni prodotti ricchi in crusca (Cho et al. 2013).

A livello europeo, una definizione è stata data dall'European Food Safety Authority, che ha descritto i cereali integrali nel seguente modo: "Whole grain shall consist of the intact, ground, cracked or flaked kernel after the removal of inedible parts such as hull and husk. The principal anatomical components (the starchy endosperm, germ and bran) are present in the same relative proportions as they exist in the intact kernel. Small losses of components (i.e. less than 2% of the grain and 10% of the bran) that occur through processing methods consistent with safety and quality are allowed." Questa definizione tiene quindi conto anche di piccole perdite di componenti che possono avvenire allo scopo di allontanare alcune sostanze indesiderate per la salute.

Tuttavia, nonostante le varie definizioni, il concetto di cereale integrale e prodotto integrale è stato diversamente interpretato negli anni dalla comunità scientifica. In particolare, le maggiori controversie riguardano i prodotti ad alto contenuto di crusca. Negli anni '90, gli alimenti con un contenuto  $\geq 25$  % di crusca erano inclusi nella definizione di prodotto integrale. In questa classificazione erano quindi inclusi anche i prodotti ad alto contenuto di crusca e di fibra, nonostante, rispetto alla definizione dell'AACC, questi contenessero una percentuale di crusca ben superiore rispetto a quella contenuta nel cereale integrale (Cho et al. 2013). Attualmente, diversi studi presenti in letteratura hanno scelto di considerare come alimenti integrali solo quelli rispondenti alla definizione della FDA.

In generale, negli studi riportati di seguito vengono considerati cereali integrali o prodotti integrali gli alimenti inclusi nella definizione della Food and Drug Administration, ad eccezione di alcuni casi in cui viene specificata la presenza di crusca aggiunta all'alimento.

## **2.1 Malattie cardiovascolari**

Il termine malattie cardiovascolari si riferisce ad un gruppo di disturbi del cuore e dei vasi sanguigni, tra cui la cardiopatia coronarica e la patologia cerebrovascolare (WHO, World Health Organization). Le cause che portano all'insorgenza delle malattie cardiovascolari sono molteplici, tra le più comuni sono da riportare l'aterosclerosi e l'ipertensione.

Dai dati statistici riportati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità emerge che le malattie cardiovascolari sono attualmente il maggiore contributore alla mortalità globale, superando anche le morti per malattie infettive (WHO 2009). Nel 2005, infatti, le morti per malattie cardiovascolari a livello mondiale hanno raggiunto un valore pari a 17.5 milioni, di cui 7.5 milioni attribuite a coronaropatie e 5.7 milioni a ictus (Fuster & Kelly 2010). In particolare, più dell'80 % delle morti sono avvenute in Paesi a basso e medio reddito (WHO 2009). Le stime per l'anno 2015 prevedono

circa 20 milioni di morti per malattie cardiovascolari, pari al 30 % delle morti a livello mondiale (WHO 2005).

### **2.1.1 Cardiopatia coronarica (CHD, Coronary Heart Disease)**

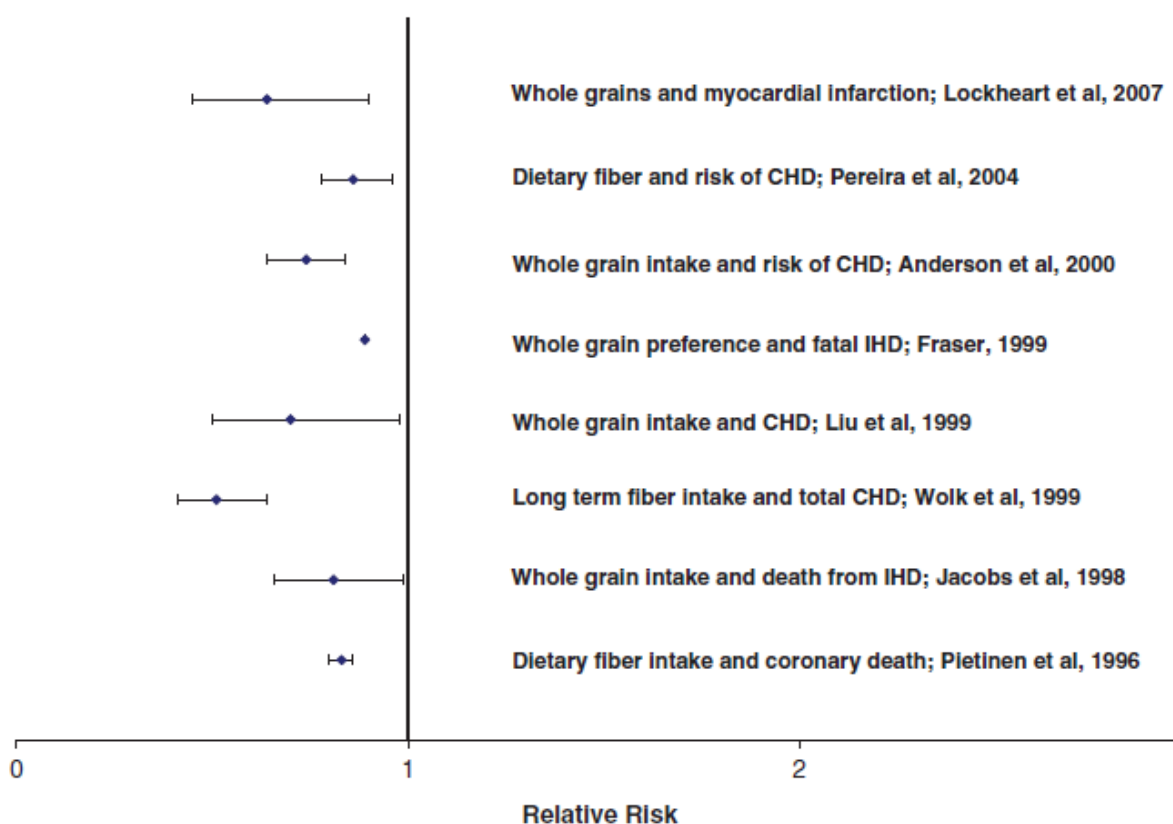
In generale, gli studi epidemiologici prospettici mostrano un'associazione inversa tra il consumo di cereali integrali e il rischio di malattie coronariche, come rappresentato in Figura 1. In particolare, una meta-analisi della letteratura pubblicata tra il 1966 e il 2012, che ha esaminato 45 studi prospettici di coorte e 21 trial controllati randomizzati, ha evidenziato come il consumo di 48-80 g di cereali integrali al giorno (3-5 porzioni/g), confrontato con il non o raro consumo di cereali integrali, diminuisca di circa il 21 % il rischio di malattie cardiovascolari (Ye et al. 2012). Similmente, Lillioja et al. (2013), analizzando i risultati ottenuti da 11 studi prospettici americani, in cui il quantitativo giornaliero di cereali integrali era riportato, ha calcolato che un incremento del consumo di cereali integrali di 20 g/giorno determina una riduzione del 26 % dell'incidenza di CHD, mentre un incremento di 30 g/giorno corrisponde ad un calo del 36 % dell'incidenza di CHD.

Considerando le diverse definizioni di prodotto integrale, Cho e colleghi (2013) hanno studiato la letteratura pubblicata tra il 1965 e il 2010 e analizzato separatamente i lavori che consideravano tre diverse categorie di prodotto integrale: fibra da cereali, cereali e prodotti integrali, miscele di cereali integrali e crusca. Da questa analisi è emersa un'associazione moderata tra il rischio di malattie cardiovascolari e il consumo elevato di fibra da cereali o miscele di cereali integrali e crusca (Cho et al. 2013). I dati riferiti ai soli cereali e prodotti integrali hanno fornito una evidenza limitata dell'associazione tra il consumo di questi prodotti e la riduzione del rischio di CVD, a causa della variabilità nella definizione della categoria (cosa comprendere, quantitativo di crusca presente nel prodotto) (Cho et al. 2013). Inoltre, l'associazione inversa tra consumo di cereali e prodotti integrali o miscele di cereali integrali e crusca e rischio di malattie cardiovascolari è risultata attenuata o scompariva dopo correzione del modello per fattori quali fibra, magnesio, crusca (Cho et al. 2013). Questi dati sembrano indicare che la riduzione del rischio di malattie croniche associata al consumo di cereali integrali sia parzialmente o in gran parte dovuto alla fibra e/o crusca presente nei cereali integrali (Cho et al. 2013). Uno studio che ha valutato differenti fonti di fibra (cereali, verdura, frutta) ha riscontrato che soltanto la fibra da cereali era fortemente associata ad un rischio ridotto di CHD (Liu et al. 1999). Similmente, in uno studio prospettico, che ha seguito per 14 anni 42850 uomini di età compresa tra 40 e 75 anni al momento del reclutamento, è stata riscontrata un'associazione inversa tra il consumo di cereali integrali e l'incidenza di CHD; questa associazione si è rivelata più forte mettendo in relazione il consumo di crusca e l'incidenza di CHD (Jensen et al. 2004).

Di discordante parere è uno studio prospettico su circa 35000 donne americane in post-menopausa, lo “Iowa Women’s Health Study“, che ha notato che il minore rischio di CHD nei quintili con maggiore consumo di cereali integrali non era spiegato dalla correzione per consumo di fibra, suggerendo che il rischio di CHD sia ridotto grazie ad alcune componenti dei cereali diverse dalla fibra (Jacobs et al. 1998b). E’ da considerare che ai polisaccaridi che costituiscono la fibra dei cereali sono legati numerosi composti fenolici, al punto che recentemente è stato introdotto il concetto di complesso “fibra-antiossidanti” (Vitaglione et al. 2008). A supporto di questa ipotesi una meta-analisi che ha valutato l’associazione tra consumo di fibra e CHD ha notato che vitamine, minerali, composti fitochimici, antiossidanti e altri micronutrienti, presenti in concentrazioni elevate nei prodotti ricchi in fibra, possono contribuire in modo indipendente all’effetto protettivo di questi prodotti nei confronti delle patologie cardiovascolari (Anderson et al. 2000).

I meccanismi attraverso i quali i cereali integrali svolgono un ruolo protettivo nei confronti delle cardiopatie coronariche sono la diminuzione di colesterolo LDL sierico e trigliceridi, il miglioramento della dislipidemia, dell’ipertensione, del diabete e dell’obesità, tutti fattori di rischio di questa patologia (Anderson et al. 2000).

**Figura 1.** Consumo di cereali integrali o fibra e rischio relativo di malattie cardiovascolari. Rischio relativo  $\pm$  intervallo di confidenza 95 % (fonte: Okarter & Liu 2010).



### 2.1.2 Dislipidemia

Diversi studi trasversali hanno evidenziato un'associazione inversa tra consumo di cereali integrali e dislipidemia (Newby et al. 2007; McKeown et al. 2002). Diversamente, risultati discordanti sono stati riportati da alcuni studi d'intervento, a seconda del tipo di cereale analizzato. Si è visto che l'avena e l'orzo hanno un maggiore effetto positivo sui lipidi rispetto al frumento o al riso (Shimizu et al. 2008), probabilmente a causa di un diverso contenuto in fibre viscoso (Harris & Kris-Etherton 2010). Infatti, i  $\beta$ -glucani, un tipo di fibra viscosa presente nell'avena e nell'orzo, incrementano l'escrezione fecale degli acidi biliari, che sono sintetizzati a partire da colesterolo (Harris & Kris-Etherton 2010). In questo modo, i  $\beta$ -glucani riducono il riassorbimento degli acidi biliari, diminuendo il loro livello nel fegato e promuovendo la conversione di altro colesterolo in acidi biliari. Conseguentemente, per ottenere colesterolo supplementare, il fegato aumenta l'internalizzazione di particelle LDL, riducendone i livelli ematici (Harris & Kris-Etherton 2010).

### 2.1.3 Ipertensione

Il consumo di 3 porzioni (16 g per porzione) al giorno di cereali integrali è stato associato ad una diminuzione del 19 % negli uomini (Flint et al. 2009) e del 33 % nelle donne (Wang et al. 2007) del rischio di sviluppare ipertensione. In particolare, uno studio di coorte prospettico, effettuato su più di 33000 uomini durante 18 anni di follow-up, ha messo in luce una associazione inversa tra il consumo di cereali integrali e l'incidenza di ipertensione, indipendentemente da altri fattori, quali marker di un sano stile di vita, tra cui l'attività fisica, il consumo di sodio, alcol, frutta e verdura (Flint et al. 2009). Un risultato simile è stato ottenuto dallo studio "Women's Health Study", in cui sono state osservate quasi 30000 donne per 10 anni (Wang et al. 2007). In questo studio, tuttavia, non è stata osservata alcuna associazione significativa tra il consumo di cereali raffinati e l'ipertensione.

Diversamente dalle evidenze degli studi prospettici, i risultati degli studi di intervento randomizzati, che hanno analizzato l'effetto del consumo di cereali integrali sulla pressione sanguigna, non si sono dimostrati univoci. Alcuni studi, infatti, hanno riportato una diminuzione della pressione sanguigna (Keenan et al. 2002; Pins et al. 2002), mentre altri non hanno mostrato differenze significative (Kestin et al. 1990; Swain et al. 1990). In particolare, Keenan et al. (2002) hanno notato che l'aggiunta di cereali di avena ad una dieta normale di soggetti con ipertensione ha ridotto in modo significativo la pressione sanguigna sia sistolica sia diastolica. Inoltre, sono diminuiti anche il colesterolo totale e LDL (Keenan et al. 2002). Similmente, in uno studio che ha confrontato l'effetto di cereali di avena con cereali di frumento raffinato in persone con pressione sanguigna elevata, è stato osservato che il 73 % dei partecipanti che hanno consumato avena ha ridotto o cessato l'utilizzo di farmaci contro l'ipertensione e ha mostrato una minore pressione

sanguigna (Pins et al. 2002). Diversamente, il confronto tra il consumo di alimenti ad alto contenuto in fibra contenenti crusca di avena e alimenti a basso contenuto in fibra contenenti frumento raffinato ha messo in luce che entrambi i prodotti hanno ridotto il livello del colesterolo in maniera simile e che probabilmente l'effetto era dovuto al fatto che entrambi i prodotti avevano sostituito parte dei grassi della dieta (Swain et al. 1990).

Considerando i meccanismi alla base dello sviluppo dell'ipertensione, ci sono sempre maggiori evidenze, sia da studi epidemiologici osservazionali sia da trial clinici randomizzati, che la pressione sanguigna sia influenzata dalla dieta, ed in particolare dall'assunzione di potassio e fibra, entrambi presenti nei cereali integrali (Flint et al. 2009). Inoltre, si ipotizza che il meccanismo che lega il consumo di cereali integrali con l'ipertensione, oltre all'effetto sulla pressione sanguigna già ricordato, possa essere il minore guadagno di peso nel corso degli anni (Flint et al. 2009). Sembra infatti che l'effetto ipotensivo dei cereali integrali sia mediato dal miglioramento di altri fattori di rischio, quali peso corporeo, dislipidemia e insulino resistenza (Harris & Kris-Etherton 2010).

## **2.2 Diabete**

Il diabete è una malattia cronica caratterizzata da iperglicemia causata da una insufficiente secrezione di insulina da parte del pancreas e/o da alterazioni nell'azione dell'insulina. Il diabete di tipo 1 è caratterizzato da una mancata produzione di insulina, mentre il diabete di tipo 2 è caratterizzato dall'insulino-resistenza, cioè dalla scarsa sensibilità delle cellule all'azione dell'insulina. Questa forma di diabete spesso deriva da un eccessivo peso corporeo ed inattività fisica (WHO, World Health Organization, sito internet). Una meta-analisi della letteratura pubblicata tra il 1966 e il 2012 ha evidenziato come il consumo di 48-80 g di cereali integrali al giorno (3-5 porzioni/giorno), confrontato con il non o raro consumo di cereali integrali, si associ non soltanto ad una riduzione dell'incidenza di CHD, ma determini anche una diminuzione di circa il 26 % del rischio di diabete di tipo 2 (Ye et al. 2012). Questa associazione è confermata da una recente revisione (Lillioja et al. 2013) condotta su diversi studi prospettici effettuati negli Stati Uniti che ha messo in luce come un incremento del consumo di cereali integrali pari a 30 g/giorno o 40 g/giorno equivalga ad un calo del 30 % o 40 %, rispettivamente, dell'incidenza di diabete di tipo 2. In accordo con le precedenti revisioni della letteratura c'è anche uno studio che ha analizzato la letteratura pubblicata dal 1965 al 2010 (Cho et al. 2013). Gli autori hanno riportato un numero di studi di coorte prospettici che mostrano una associazione inversa consistente tra il consumo di fibra da cereali o miscele di cereali integrali e crusca e il rischio di diabete di tipo 2. Tra gli studi analizzati, 5 su 6 hanno evidenziato che il consumo elevato di cereali integrali e crusca

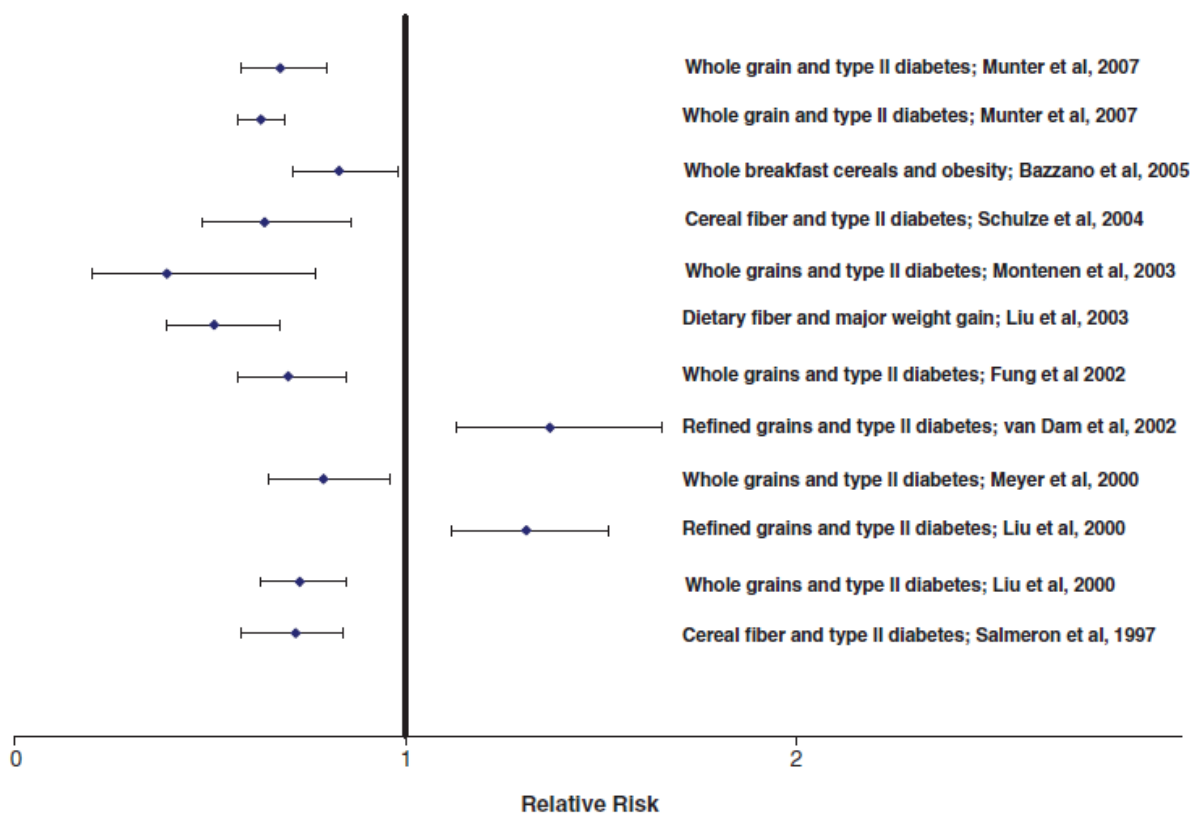
determinava una riduzione del rischio di diabete tra il 21 e il 40 % (Cho et al. 2013). Considerando come prodotti integrali soltanto quelli rispondenti alla definizione della Food and Drug Administration, ed escludendo quindi i prodotti con un contenuto di crusca  $\geq 25$  %, in letteratura è stato trovato soltanto uno studio prospettico condotto su una coorte femminile (Nurses' Health Study, NHS). Questo studio ha coinvolto circa 160000 donne per 12-18 anni di follow-up e ha riportato una riduzione del rischio di incidenza di diabete del 32-37 % con il consumo di cereali integrali (de Munter et al. 2007).

Come riportato nelle revisioni della letteratura, la maggior parte degli studi epidemiologici hanno messo in luce un'associazione inversa tra il consumo di cereali integrali e fibra e il rischio di diabete di tipo 2, come riportato in Figura 2. In aggiunta, in un non recentissimo studio è stata investigata anche l'associazione tra diabete di tipo 2 e consumo di cereali sia integrali sia raffinati (Liu et al. 2000). Confrontando il quintile di maggiore consumo di cereali rispetto al quintile di minore consumo, è emersa una associazione positiva tra il consumo di cereali raffinati e rischio di diabete di tipo 2, mentre il maggiore consumo di cereali integrali era associato con un minore rischio di insorgenza della patologia.

I risultati ottenuti dagli studi di intervento, in cui sono stati somministrati prodotti contenenti miscele di cereali integrali e crusca, sembrano confermare le evidenze riportate dagli studi prospettici (Lutsey et al. 2007; Newby et al. 2007; Cho et al. 2013).

Si ipotizza che la riduzione del rischio di diabete di tipo 2 sia legata all'effetto sinergico di numerosi componenti dei cereali integrali, quali composti fitochimici, vitamina E, magnesio e altri (Slavin 2004). In effetti, l'assunzione di magnesio, fibra e vitamina E (presenti in buone concentrazioni nei cereali integrali) in quantità relativamente elevate può prevenire l'iperinsulinemia (Slavin 2004). Inoltre, rispetto ai prodotti raffinati, i prodotti integrali sono generalmente digeriti e assorbiti lentamente a causa della loro conformazione fisica e dell'elevato contenuto in fibra viscosa. In questo modo essi producono una minore risposta glicemica postprandiale, con una conseguente minore domanda di insulina alle  $\beta$ -cellule pancreatiche (Liu et al. 2000).

**Figura 2.** Consumo di cereali integrali o fibra e rischio relativo di diabete di tipo 2. L'associazione è espressa come rischio relativo  $\pm$  intervallo di confidenza 95 % (fonte: Okarter & Liu 2010).

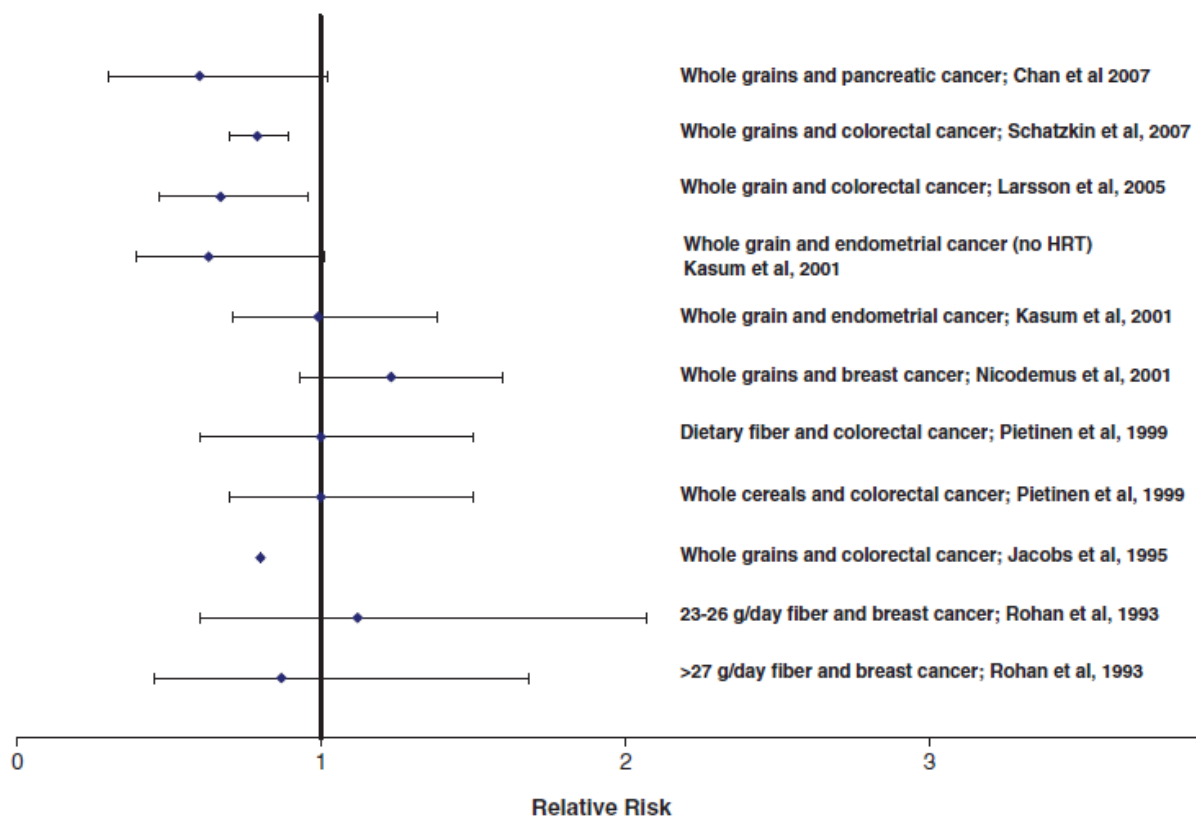


## 2.3 Cancro

Diversi studi epidemiologici hanno investigato l'associazione tra consumo di cereali integrali e rischio di cancro, suggerendo che i cereali integrali possono avere un effetto protettivo nei confronti del cancro, e in particolare di tumori gastrointestinali, quali quello gastrico e del colon, e tumori ormone-dipendenti, quali quelli della prostata e del seno (Slavin 2000). In una meta-analisi che ha correlato il consumo di cereali integrali e il cancro, l'effetto protettivo dei cereali integrali è stato osservato in 46 studi su 51 analizzati, e in 43 su 45 studi dopo l'esclusione di 6 riferimenti che riportavano difetti nel disegno o un basso consumo (Jacobs et al 1998a). In particolare, i rischi relativi sono risultati  $< 1$  in quasi tutti gli studi che hanno valutato il rischio di cancro del colon-retto e polipi, del tratto digestivo, del pancreas, tumori ormone-dipendenti e altri tipi di tumore, con valori riferiti agli specifici tumori compresi nell'intervallo 0.5-0.8, mostrando un effetto protettivo del consumo di cereali integrali, ad eccezione del cancro al seno (rischio relativo pari a 0.86) e alla prostata (rischio relativo pari a 0.90) (Jacobs et al. 1998a).

Alcuni studi epidemiologici riportanti un'associazione tra consumo di cereali integrali e rischio di cancro sono riassunti in Figura 3. Come si evince dalla Figura, gli studi mostrano però risultati diversi riguardo questa associazione. In particolare, in uno studio caso-controllo condotto su circa 400 pazienti l'associazione tra consumo di fibra e rischio di morte dovuta a cancro del seno si è rivelata inconsistente (Rohan et al. 1993). Inoltre, Pietinen e colleghi (1999), analizzando i dati dell'Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study ottenuti su un campione di 27111 uomini seguiti per 8 anni, non hanno rilevato alcuna associazione tra rischio di cancro del colon-retto e consumo di fibra (fibra totale, solubile, insolubile da prodotti a base segale) e tra cancro e consumo di verdura, frutta o cereali, non confermando precedenti evidenze che l'elevato consumo di frutta, verdura e cereali integrali diminuisca il rischio di sviluppo di questa patologia. Tra gli studi a favore dell'effetto protettivo dei cereali su questa patologia, ce ne sono di epidemiologici prospettici che mostrano una associazione inversa tra consumo di cereali integrali e cancro del colon-retto. In particolare, Larsson et al. (2005) hanno notato che l'associazione rimaneva anche dopo correzione per diversi fattori confondenti, quali consumo di carne, frutta e verdura. Anche uno studio condotto su circa 292 mila uomini e 198 mila donne tra i 50 e 71 anni con 5 anni di follow-up ha osservato che il consumo di cereali integrali e fibra da cereali era associato ad una modesta riduzione del rischio di cancro del colon-retto, con un'associazione più forte nel cancro al retto rispetto al cancro al colon (Schatzkin et al. 2007).

**Figura 3.** Consumo di cereali integrali o fibra e rischio di cancro. L'associazione è espressa come rischio relativo  $\pm$  intervallo di confidenza 95 % (fonte: Okarter & Liu 2010).



Sono stati proposti 4 potenziali meccanismi protettivi nei confronti del cancro legati al consumo di cereali integrali (Slavin 2000):

1. i cereali integrali sono fonti di carboidrati non digeribili, quali fibra, amido resistente e oligosaccaridi, che possono venire fermentati dai batteri presenti nel microbiota del colon producendo acidi grassi a corta catena, che servono da fonte energetica per i colonociti, e che abbassano il pH del colon, riducendo la solubilità dei sali biliari e quindi la loro disponibilità per l'attività carcinogenica (Slavin 2000). Inoltre, la fibra causa un aumento di massa fecale, ed una conseguente riduzione del tempo di transito, diminuendo la possibilità che i mutageni fecali interagiscano con l'epitelio intestinale.
2. i cereali integrali presentano una notevole concentrazione di composti antiossidanti. Le molecole antiossidanti potrebbero essere importanti nella prevenzione del cancro, ritardando l'inizio o rallentando l'ossidazione dei substrati ossidabili. Inoltre, i composti fenolici sono coinvolti nell'induzione di sistemi di detossificazione (Slavin 2000).

3. i cereali integrali contengono fitoestrogeni, che con il loro effetto ormonale sembra proteggano dal cancro, in particolare da quelli ormone-dipendenti (Slavin 2000).
4. i cereali integrali modulano la glicemia e questo ha un effetto protettivo nei confronti del cancro del colon e del seno (Slavin 2000). Infatti, uno studio riporta che il cancro del colon è legato a livelli più alti di glucosio nel sangue e insulina e ad una maggiore massa corporea (Schoen et al.1999).

### 3. STRUTTURA DELLA CARIOSSIDE

Forma, taglia e peso delle cariossidi sono le caratteristiche che più facilmente permettono di identificare le singole specie di cereale (Evers & Millar 2002). Il peso di mille cariossidi varia da 0.14 g per il teff a 600 g per il mais (Evers & Millar 2002). Le cariossidi appartenenti alle specie delle tribù Triticeae (frumento, segale, orzo e triticale) e Aveneae (avena) si distinguono per la presenza di un solco nella parte ventrale, assente nelle altre specie (Evers & Millar 2002). La morfologia delle cariossidi può comunque variare all'interno delle specie, e può essere associata ad alcuni parametri qualitativi. Ad esempio, nel riso il rapporto lunghezza su larghezza può dare un'indicazione della composizione dell'endosperma, in particolare del tipo di amido presente (Evers & Millar 2002).

Le componenti della cariosside dei cereali possono variare nelle diverse specie, ma una struttura generica comune può comunque essere descritta. La struttura della cariosside presenta i seguenti tessuti, dall'esterno verso l'interno: tegumenti (i tessuti esterni), endosperma, germe.

#### 3.1 Tessuti esterni

Gli strati più esterni che circondano l'endosperma e il germe rappresentano i tessuti materni della cariosside e si distinguono in, rispettivamente dall'esterno verso l'interno: glume, pericarpo, testa (o seed coat, o spermoderma), nucella (o perisperma, o strato ialino) (Bechtel & Pomeranz 1977).

Gli strati che compongono il pericarpo variano tra i diversi cereali; essi sono comunque generalmente composti da cellule vuote, alcune delle quali mantengono la loro forma, mentre altre appaiono schiacciate e deformate (Evers & Millar 2002).

In generale, i tegumenti presentano numerose cellule vuote e le loro pareti cellulari sono composte prevalentemente da xilani (circa 60 %), cellulosa (circa 30 %) e lignina (circa 10 %) (Jääskeläinen et al. 2013). In questi tessuti sono inoltre presenti elevate concentrazioni di acidi fenolici; in particolare, nel pericarpo l'acido ferulico si presenta altamente dimerizzato (50-56 % nel frumento) (Antoine et al. 2003).

#### 3.2 Endosperma

L'endosperma consiste di due tessuti: l'endosperma amilaceo e l'aleurone. Botanicamente, lo strato aleuronico è lo strato più esterno dell'endosperma, nonostante venga comunemente considerato parte della crusca, poiché durante i trattamenti di macinazione rimane adeso allo strato ialino e in questo modo viene rimosso insieme agli strati più esterni della cariosside (Brouns et al. 2012).

Lo strato aleuronico è composto da uno o più strati continui di cellule vive, che circondano l'endosperma amilaceo e il germe. Nel frumento è presente un unico strato di cellule, mentre nell'orzo e nel riso possono essere presenti più strati. La variabilità nell'orzo è varietale, mentre nel riso è osservabile anche all'interno di una singola cariosside, con zone che presentano un numero diverso di strati di cellule (Evers & Millar 2002). La dimensione delle cellule non dipende dalla dimensione della cariosside; ad esempio, nel frumento le cellule dell'aleurone hanno un diametro di 20-75  $\mu\text{m}$  (Brouns et al. 2012), mentre nel mais sono di dimensioni minori, nonostante la cariosside sia più grande. Le pareti cellulari dello strato aleuronico sono spesse e non lignificate, e nel frumento rappresentano circa il 35 % del volume e più del 40 % del peso della cellula (Brouns et al. 2012). Le pareti cellulari sono composte principalmente da arabinoxilani e  $\beta$ -glucani (Jääskeläinen et al. 2013). In numerosi cereali, inoltre, le pareti cellulari possiedono un'elevata concentrazione di acidi fenolici, principalmente acido ferulico e secondariamente acido *p*-cumarico (Antoine et al. 2003). Nel citoplasma sono presenti delle inclusioni sferiche di due tipi, le prime formate da fitati e minerali, le seconde composte da niacina e proteine (Brouns et al. 2012). In questo tessuto sono presenti notevoli concentrazioni di proteine, lipidi, vitamine e minerali (Evers & Millar 2002).

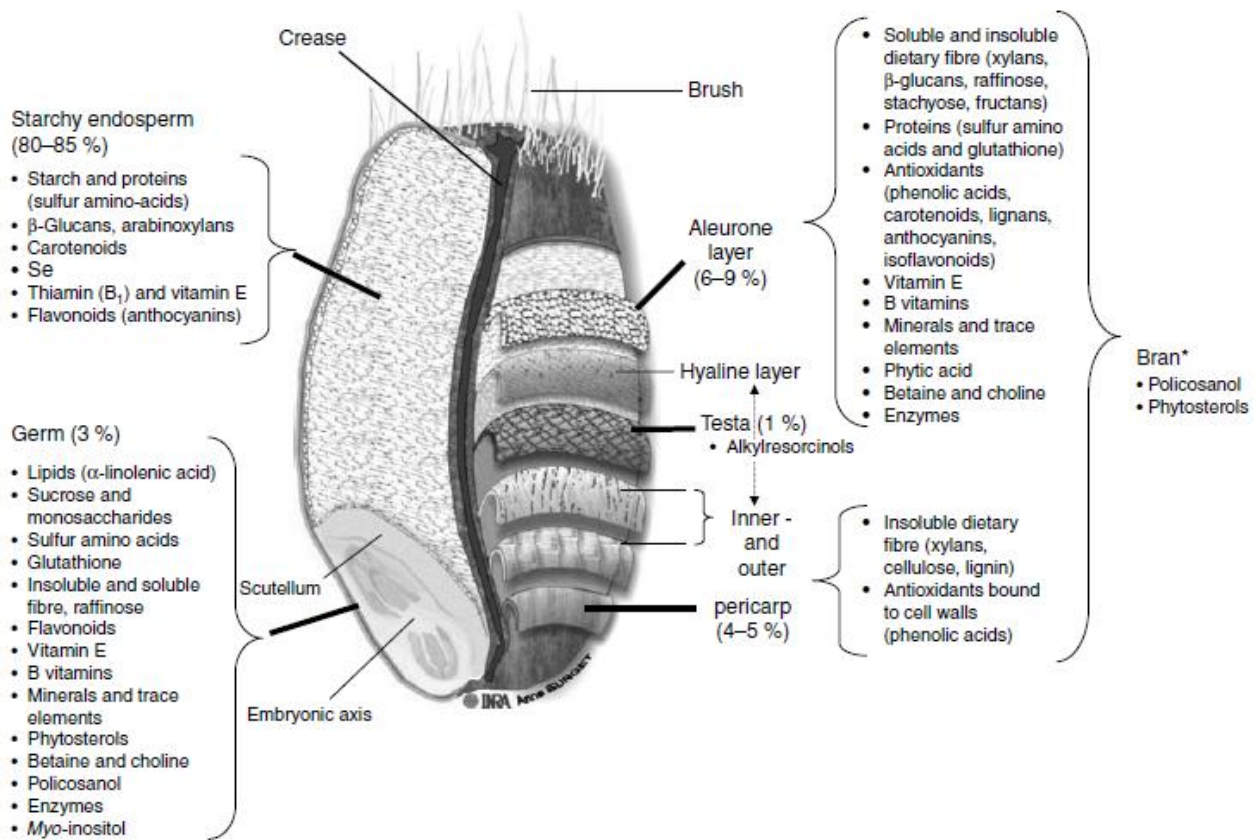
L'endosperma amilaceo occupa la parte centrale della cariosside e rappresenta il tessuto preponderante nei cereali. Esso è composto da cellule contenenti granuli di amido circondati da una matrice di proteine di riserva (Evers & Millar 2002). Le cellule hanno pareti cellulari sottili, la cui composizione varia nelle diverse specie. Il riso presenta un elevato contenuto di cellulosa, l'orzo e l'avena sono ricchi di  $\beta$ -glucani, mentre nel frumento i maggiori componenti sono gli arabinoxilani (Evers & Millar 2002). In questa parte anatomica, il contenuto di altre sostanze nelle pareti, quali acidi fenolici e proteine, è molto limitato (Jääskeläinen et al. 2013). In alcuni cereali, quali riso e orzo, le cellule nella zona subaleuronica si distinguono da quelle della zona centrale dell'endosperma, per la dimensione minore, la maggiore concentrazione di proteine e vitamine e per la conformazione dell'amido, presente in minore quantità e in granuli di dimensioni minori (Bechtel & Pomeranz 1978b; Nair et al. 2011).

### 3.3 Embrione

Il germe è localizzato nella zona ventrale alla base della cariosside. Alla maturità della cariosside è composto dall'asse embrionico e dallo scutello (Bechtel & Pomeranz 1978a). L'embrione è il tessuto con la maggiore concentrazione di lipidi e vitamine liposolubili e la maggiore percentuale di umidità nella cariosside matura (Evers & Millar 2002).

Nella Figura 4 è riportata la rappresentazione delle frazioni della cariosside di frumento (crusca, germe ed endosperma) con i composti bioattivi maggiormente presenti (Fardet et al. 2008).

**Figura 4.** Rappresentazione delle frazioni della cariosside di frumento (crusca, germe ed endosperma) con i composti bioattivi maggiormente presenti (fonte: Fardet et al. 2008).



## 4. COMPOSIZIONE CHIMICA

In generale, la cariosside dei cereali è costituita principalmente da carboidrati (circa 75 %) e proteine mentre minore è la quantità di grassi (McKevith 2004). In Tabella 1 è riportata la composizione chimica dei principali cereali. I diversi macro- e micro-nutrienti sono ripartiti in modo diverso nei diversi tessuti e regioni anatomiche della cariosside, a seconda della funzione biologica di questi ultimi, come riassunto in Tabella 2.

**Tabella 1.** Composizione chimica dei principali cereali (valori medi, g/100 g di sostanza secca) (fonte: Haard 1999).

Cereali	Carboidrati	Proteine	Lipidi	Fibra	Ceneri
Frumento	69.7	10.6	1.9	1.0	1.4
Mais	63.6	9.8	4.9	2.0	1.4
Riso	64.3	7.3	2.2	0.8	1.4
Orzo	55.8	11.0	3.4	3.7	1.9
Avena	62.9	9.3	5.9	2.3	1.4
Segale	71.8	8.7	1.5	2.2	1.8
Miglio	63.4	11.5	4.7	1.5	1.5
Sorgo	62.9	8.3	3.9	4.1	2.6

**Tabella 2.** Distribuzione dei maggiori componenti nelle diverse regioni anatomiche della cariosside di frumento (valori medi, g/100 g di sostanza secca) (fonte: D'Egidio 2004).

Regione anatomica	% cariosside	Amido e altri carboidrati	Proteine	Lipidi	Cellulosa Emicellulosa Pentosani	Minerali
Tegumenti	9	14.0	12.8	2.4	65.2	5.6
Aleurone	8	12.0	32.0	8.0	38.0	10.0
Endosperma	80	83.0	11.0	3.0	2.0	1.0
Germe	3	20.0	38.0	15.0	22.0	5.0

## 4.1 Macronutrienti

### 4.1.1 Carboidrati

Il maggior componente dei cereali è l'amido, presente nell'endosperma sotto forma di granuli o cluster di granuli. Nelle diverse specie di cereali, i granuli di amido possono presentare diverse dimensioni: ad esempio nel riso hanno un diametro di circa 5  $\mu\text{m}$ , mentre nel frumento possono raggiungere 25-40  $\mu\text{m}$  di dimensione. (McKevith 2004). In particolare, possono essere classificati in granuli di tipo A, di grandi dimensioni (20-25  $\mu\text{m}$ ) e forma lenticolare, e granuli di tipo B, di dimensioni minori (2-10  $\mu\text{m}$ ) e forma sferica. Nell'endosperma possono essere presenti entrambe le tipologie di granuli, in proporzioni diverse nei diversi cereali. In particolare, nel frumento e nell'orzo è stata osservata una distribuzione trimodale dei granuli di amido in base alla loro dimensione (Svihus et al. 2005). La distribuzione delle dimensioni dei granuli di amido varia tra le cultivar, suggerendo un controllo genetico, nonostante i fattori ambientali possano influenzare le dimensioni del granulo e le proprietà dell'amido (Svihus et al. 2005).

L'amido è composto da amilosio e amilopectina. L'amilopectina consiste in catene di  $\alpha$  1-4 glucosio, ramificate tramite legami  $\alpha$  1-6 e presenta un peso molecolare nell'ordine di  $10^4$ - $10^6$  kDa. L'amilosio è invece caratterizzato da poche ramificazioni e peso molecolare di circa 100 kDa (Svihus et al. 2005). Il rapporto amilosio:amilopectina dipende dal cereale e dalla varietà (McKevith 2004). Generalmente, l'amido è composto per il 25-27 % da amilosio, ma in alcune varietà di mais e riso (le varietà *waxy*) la maggior parte dell'amido è formata da amilopectina.

Al granulo di amido si trovano associate altre componenti, quali lipidi e proteine. I lipidi presenti consistono di acidi grassi e fosfolipidi, associati all'amilosio, e distribuiti prevalentemente nelle zone periferiche della cariosside (Svihus et al. 2005). Le proteine sono disposte maggiormente sulla superficie del granulo di amido (Svihus et al. 2005).

Nei cereali sono presenti anche zuccheri liberi, in bassa quantità ( $\approx$  1-2 %), tra cui saccarosio, maltosio, fruttosio e glucosio (McKevith 2004).

### 4.1.2 Proteine

I cereali contengono circa il 6-15 % di proteine (McKevith 2004). In particolare, il contenuto di proteine è riportato essere 5.8-7.7 % (riferito al peso secco) nel riso, 8-15 % nell'orzo, 9-11 % nel mais, circa 10-13 % nel frumento (Shewry 2007). Si sono notate, inoltre, differenze intra e interspecifiche relativamente modeste, amplificate dai fattori ambientali (Shewry 2007).

Le proteine di riserva, localizzate prevalentemente nell'endosperma della cariosside, presenti maggiormente sono: gliadine e glutenine in frumento, gluteline in riso, prolamine (zeina) in mais, ordeine e gluteline in orzo, albumine e globuline in avena (McKevith 2004).

Particolare importanza è rivestita dalle proteine del glutine presenti nel frumento, che grazie alle loro proprietà visco-elastiche consentono il processo di panificazione. Queste proteine si distinguono in gliadine, proteine monomeriche che possiedono comportamento viscoso, e glutenine, proteine polimeriche responsabili dell'elasticità dell'impasto. Le glutenine sono un insieme eterogeneo di polimeri formati da un numero differente di subunità gluteniniche ad alto e basso peso molecolare legati tramite ponti disolfuro (Veraverbeke & Delcour 2002). Le proteine del glutine rappresentano circa l' 80-85 % delle proteine totali nel frumento, mentre il restante 15-20 % è formato da un gruppo eterogeneo di proteine (Veraverbeke & Delcour 2002). Queste ultime proteine vengono classificate in albumine e globuline e hanno principalmente funzioni metaboliche (enzimi) o strutturali; alcune di queste possono però concorrere nel definire il potenziale di panificazione di una farina (Veraverbeke & Delcour 2002).

Le proteine dei cereali forniscono molti amminoacidi, nonostante alcuni siano presenti in modeste concentrazioni. La lisina rappresenta l'amminoacido limitante, nonostante il suo contenuto vari nelle diverse specie, con concentrazioni maggiori nel riso e nell'avena, e minori nel frumento e nel mais; nella segale l'amminoacido limitante è il triptofano (McKevith 2004). Le proteine contenute nei tessuti embrionali e nello strato aleuronico hanno un contenuto maggiore in amminoacidi essenziali (Shewry 2007). Queste proteine, però, spesso vengono rimosse con gli strati esterni della cariosside durante i trattamenti di decorticazione e perlatura.

#### **4.1.3 Lipidi**

I lipidi sono presenti nei cereali in quantità ridotta, con un contenuto pari a 1-3 % nell'orzo, riso, segale e frumento, 5-9 % nel mais e 5-10 % nell'avena (percentuali riferite al peso secco) (McKevith 2004). Essi sono localizzati principalmente nel germe e la loro composizione acidica rivela un elevato contenuto di acido linoleico (McKevith 2004).

### **4.2 Micronutrienti**

#### **4.2.1 Vitamine**

I cereali sono una fonte importante di vitamine del gruppo B, soprattutto tiamina, riboflavina e niacina. Essi contengono inoltre una buona quantità di vitamina E (McKevith 2004).

## Vitamine del gruppo B

La concentrazione delle vitamine maggiormente presenti nei cereali è risultata avere un'alta variabilità nelle diverse varietà analizzate, con un contenuto nel frumento compreso tra 2.60 e 6.13 µg/g (riferito al peso secco) per la tiamina, tra 0.48 e 1.06 µg/g per la riboflavina e tra 1.45 e 3.16 µg/g per la piridossina (Batifoulie et al. 2006). Un ulteriore studio sul frumento, che ha analizzato 24 varietà invernali di frumento coltivato nel 2007 in quattro siti (Regno Unito, Polonia, Francia e Ungheria) e 2 varietà primaverili, coltivate negli stessi siti ad esclusione della Polonia, ha riportato le seguenti concentrazioni: 5.53-13.55 µg/g (riferito al peso secco) di tiamina, 0.77-1.40 µg/g di riboflavina, 1.27-2.97 µg/g di piridossina e 0.16-1.74 µg/g di niacina (Shewry et al. 2011). Gli autori commentano che il contenuto di vitamine B1, B2 e B6 è risultato compreso nei range riportati da precedenti lavori, mentre il contenuto di vitamina B3 è risultato pari al 10-15 % dei contenuti riportati precedentemente (Shewry et al. 2011).

Il contenuto di folati in diversi tipi di frumento è stato misurato essere compreso tra circa 320 ng/g e 940 ng/g (Piironen et al. 2008; Kariluoto et al. 2010), con concentrazioni comprese tra 323-774 ng/g nel frumento tenero, 637-891 ng/g nel frumento duro, 505-647 ng/g nella spelta, 429-678 ng/g nel farro diploide e 516-937 nel farro tetraploide (Piironen et al. 2008). E' stato inoltre notato che nel frumento il contenuto di folati è influenzato maggiormente dai fattori ambientali rispetto a fattori genetici (Kariluoto et al. 2010).

Per quanto riguarda il riso, nel riso integrale sono state misurate le seguenti concentrazioni di vitamine di tipo B: 2.9-4.8 µg/g di tiamina, 0.4-0.5 µg/g di riboflavina e 40-47 µg/g di niacina (Haard 1999; D'Egidio 2004).

## Vitamina E

Il termine vitamina E comprende una famiglia formata da otto composti, che presentano due tipologie di struttura, i tocoferoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - tocoferolo) e i tocotrienoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienolo). La vitamina E è presente in numerosi alimenti, inclusi i cereali integrali, in cui è concentrata nel germe (Liu 2007). Nel farro (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*), in particolare, è stata osservata una diversa localizzazione dei diversi vitameri: nel germe sono concentrati i tocoli totali,  $\alpha$ - e  $\beta$ - tocoferoli, mentre  $\alpha$ - e  $\beta$ - tocotrienolo hanno mostrato elevati livelli nella crusca, nonostante siano presenti in quantità significative anche nel germe e nell'endosperma (Hidalgo & Brandolini 2008). La concentrazione di tocoli totali misurata nei cereali integrali è la seguente: circa 75 mg/kg (peso secco) nel frumento tenero e nell'orzo, 72 mg/kg nell'avena, 67 mg/kg nel mais, 60.6 mg/kg nel frumento duro (Panfili et al. 2003). I composti più importanti sono stati identificati essere il  $\beta$ -tocotrienolo nel frumento (33-43 mg/kg), il  $\gamma$ -tocoferolo

nel mais (45 mg/kg) e l' $\alpha$ -tocotrienolo in avena e orzo (56 e 40 mg/kg, rispettivamente) (Panfili et al. 2003).

#### 4.2.2 Minerali

I cereali sono una buona fonte di potassio e inoltre contengono ferro, magnesio e zinco. Diversamente, sono poveri in sodio (McKevith 2004). Il contenuto in minerali nei cereali integrali è riassunto in Tabella 3.

Nel frumento, fosforo, potassio, calcio, manganese, ferro e zinco sono concentrati nell'aleurone e nell'embrione (in particolare nello scutello), e sono presenti in basse concentrazioni nell'endosperma amilaceo. Diversamente, il rame è distribuito più uniformemente nei diversi tessuti (Mazzolini et al. 1985). Con la rimozione degli strati più esterni della cariosside, le perdite di ferro e zinco risultano essere pari o maggiori al 50 %; le perdite di ferro sono maggiori rispetto allo zinco, indicando che il ferro presenta una localizzazione più periferica nella cariosside (Brinch-Pederson et al. 2007). Nell'orzo, il ferro è presente in gran parte (circa 70 %) nell'endosperma (comprendente anche l'aleurone), mentre nel pericarpo e nel germe è presente per il 15-20 % e 7-8 %, rispettivamente (Brinch-Pederson et al. 2007). Il ferro e lo zinco vengono stoccati insieme ai fitati nei globoidi, all'interno dei vacuoli di stoccaggio delle proteine dell'embrione e dell'aleurone (Brinch-Pederson et al. 2007).

**Tabella 3.** Contenuto in minerali nei cereali integrali (fonte: Fardet et al. 2008).

Cereale (varietà)	Zinco (mg/100g)	Ferro (mg/100g)	Rame ( $\mu$ g/100g)	Selenio ( $\mu$ g/100g)	Manganese (mg/100g)
Frumento	2.6	3.2	369	0.5-74.6	3.1
Mais (giallo, bianco, blu)	1.7	1.5	240	12.0	0.4
Riso (marrone, nero)	1.6	3.2	288	10.0	2.1
Avena	3.2	5.8	422	7.1	3.1
Orzo	2.8-7.4	2.8-12.8	419-570	7.0	1.5
Segale	2.9-3.1	2.8-4.4	290-392	1.4	2.9
Sorgo (bianco, giallo, rosso, marrone)	0.3-1.8	1.1-5.7	20-735	13.0	4.3
Miglio	2.9-6.6	6.9-20	340-610	2.0	1.1

#### 4.3 Fibra

Uno dei componenti più importanti dei cereali dal punto di vista nutrizionale è la fibra. La fibra è concentrata nella crusca, della quale rappresenta il 18-87 % del peso, percentuale che varia nei

diversi cereali (Vitaglione et al. 2008). Il suo contenuto nell'intera cariosside dei cereali integrali dipende dalla morfologia del seme e varia dall'11.5 % nell'avena al 27.1 % nell'orzo (Vitaglione et al. 2008). La fibra presente nei cereali mostra una struttura chimica eterogenea e può essere grossolanamente classificata in base alla sua solubilità in acqua in fibra solubile e fibra insolubile (Vitaglione et al. 2008). Il contenuto di fibra insolubile è predominante soprattutto in frumento e mais, mentre la fibra solubile è presente in concentrazioni importanti in avena, dove raggiunge il 16.2 % della materia secca (Vitaglione et al. 2008). La fibra solubile è rappresentata maggiormente da arabinoxilani in frumento, segale e orzo, mentre nell'avena è presente un'elevata percentuale di  $\beta$ -glucani (McKevith 2004). Il contenuto di fibra totale nelle diverse frazioni dei cereali integrali e nella crusca dei diversi cereali è riassunto in Tabella 4.

**Tabella 4.** Contenuto (g/100g) di fibra totale, fibra insolubile, fibra solubile, acidi fenolici (mg/kg) e contenuto fenolico totale (mg acido gallico equivalenti/kg) della cariosside intera e della crusca dei cinque cereali principali nella dieta occidentale (fonte: Vitaglione et al. 2008).

	TDF	IDF	SDF	FA	PCA	VA	SA	TPC
Frumento								
intero	11.6-17.0	10.2-14.7	1.4-2.3	4.5-1270	0.2-37.2	0.6-35	1.3-63	350-1505
crusca	36.5-52.4	35.0-48.4	1.5-4.0	1942-5400	100-457	100-164	300	2800-5643
Segale								
intero	15.2-20.9	11.1-16.0	3.7-4.5	6-860	41	3-22	2-120	-
crusca	35.8	30.5	5.3	25-2780	100-190	10	53-100	5840
Avena								
intero	11.5-37.7	8.6-33.9	2.9-3.8	359	-	17	55	1223
crusca	18.1-25.2	14.5-20.2	3.6-5.0	-	-	-	-	1950
Orzo								
intero	14.6-27.1	12.0-22.1	2.6-5.0	168-723	4-374	29.2-33.4	-	-
crusca	-	-	-	2202-2017	2565-3367	82-117	-	-
Mais								
intero	13.1-19.6	11.6-16.0	1.5-3.6	380-1759	31	4.6	57	2194-3010
crusca	86.7	86.5	0.2	26100-33000	3000-4000	-	-	-

TDF fibra dietetica totale, IDF fibra dietetica insolubile, SDF fibra dietetica solubile, FA acido ferulico, PCA acido *p*-cumarico, VA acido vanillico, SA acido sinapico, TPC contenuto fenolico totale

## Arabinosilani

Gli arabinosilani sono polimeri formati da uno scheletro lineare di unità di  $\beta$ -D-xilopiranosio unite tramite legame (1 $\rightarrow$ 4). Le catene laterali più frequenti sono costituite da  $\alpha$ -L-arabinofuranosio e acido  $\alpha$ -D-glucuronico (Saulnier et al. 2007). Nei cereali sono inoltre presenti esteri di acido acetico e acidi idrossicinnamici, quali acido ferulico e acido *p*-cumarico, legati in posizione O-5 delle unità di arabinofuranosio (Saulnier et al. 2007).

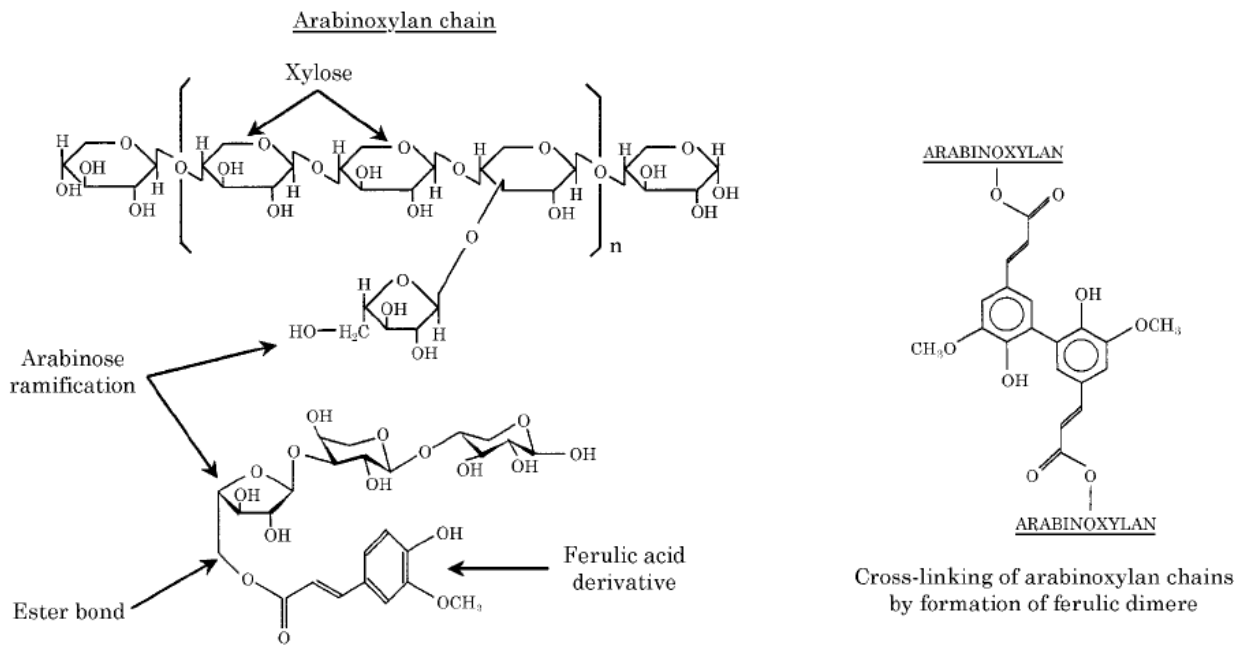
La quantità e la struttura dei polimeri degli arabinosilani mostrano grandi differenze nei diversi tessuti e tra le diverse cultivar (Saulnier et al. 2007). Nell'endosperma di frumento, gli arabinosilani sono composti solamente da arabinosio e xilosio, mentre nell'aleurone essi sono altamente esterificati, con acido ferulico, diidroferulati e acido *p*-cumarico. Nell'aleurone, l'acido ferulico e acidi diidroferulici rappresentano circa il 3.2 % e 0.45 % rispettivamente degli arabinosilani insolubili (Saulnier et al. 2007). Negli strati esterni della cariosside, ed in particolare nel pericarpo, gli arabinosilani mostrano una struttura complessa e altamente ramificata. Lo scheletro del polimero mostra un altro grado di sostituzione e gli acidi idrossicinnamici sono presenti in elevate quantità (Saulnier et al. 2007).

## $\beta$ -glucani

I  $\beta$ -glucani sono dei polisaccaridi non ramificati composti da unità di  $\beta$ -D-glucopiranosio legati con legami (1 $\rightarrow$ 4) e (1 $\rightarrow$ 3) in proporzione variabile (Charalampopoulos et al. 2002). Tra le diverse specie di cereali, le quantità maggiori di  $\beta$ -glucani sono contenute nell'orzo (3-11 %, riferito al peso secco) e nell'avena (3-7 %) (Charalampopoulos et al. 2002). Questo polimero è concentrato nelle pareti cellulari più interne dello strato aleuronico e nella parte subaleuronica dell'endosperma in orzo, avena e frumento (Charalampopoulos et al. 2002). Nel frumento, comunque, il suo contenuto è decisamente modesto (solitamente < 1 %).

Alla frazione polisaccaridica dei cereali è associato una notevole quantità di composti fenolici, in particolare acidi idrossicinnamici. Più del 90 % di questi composti sono legati ai polisaccaridi delle pareti cellulari (Vitaglione et al. 2008). Per questo motivo, recentemente è stato introdotto il concetto di complesso "fibra-antiossidanti". In effetti, i composti antiossidanti legati alla fibra concorrono nella determinazione della struttura della fibra e, conseguentemente, delle sue proprietà fisiche (Vitaglione et al. 2008). L'acido ferulico, in particolare, nella forma di diferulati forma strutture a ponte tra le catene polisaccaridiche e cross-linking tra i polisaccaridi e la lignina (Vitaglione et al. 2008), come rappresentato in Figura 5.

**Figura 5.** Struttura chimica delle componenti delle pareti cellulari (fonte: Piot et al. 2001).



## 5. COMPOSTI ANTIOSSIDANTI

I cereali, come già ricordato, contengono un'ampia varietà di composti antiossidanti, alcuni dei quali complementari alle molecole presenti in frutta e verdura. I composti fenolici rivestono un ruolo importante, in quanto rappresentano la maggior parte dei composti antiossidanti presenti nei cereali, e le classi presenti includono derivati degli acidi benzoico e cinnamico, antocianidine, flavonoli, flavoni, flavanoni (Adom & Liu 2002). Sono inoltre presenti tocoferoli, tocotrienoli e orizanoli (Adom & Liu 2002). Nei cereali i composti antiossidanti possono essere presenti in forma libera, coniugata solubile e legata insolubile. La maggior parte dei composti si trovano nella forma insolubile, legati ai polisaccaridi delle pareti cellulari (Adom & Liu 2002). In particolare, la percentuale dei composti fenolici totali presenti in forma legata è compresa tra il 62 % nel riso e l'85 % nel mais (come riportato in Tabella 5) (Adom & Liu 2002).

Per questo motivo, nell'analisi dei composti antiossidanti nei cereali è importante adottare un'adeguata metodologia di estrazione, che preveda anche una fase d'idrolisi, al fine di misurare anche la frazione legata e non sottostimare il contenuto totale dei composti (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto 2005).

**Tabella 5.** Contributi percentuali delle frazioni libera e legata dei cereali di fenoli totali e capacità antiossidante totale (fonte: Adom & Liu 2002).

	contenuto fenolico (%)		capacità antiossidante totale (%)	
	libero	legato	libera	legata
mais	15	85	13	87
frumento	25	75	10	90
avena	25	75	42	58
riso	38	62	29	71

### 5.1 Composti fenolici

I fenoli sono molecole che possiedono uno o più anelli aromatici con uno o più gruppi idrossilici. Essi sono generalmente classificati in acidi fenolici, flavonoidi (che a loro volta includono flavoni e flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocianidine, calconi, isoflavoni) e tannini.

La concentrazione dei composti fenolici nei cereali è influenzata dal tipo di cereale, dalla varietà, dalla regione anatomica della cariosside analizzata, dai fattori ambientali e agronomici (Liu 2007).

Questi composti sono presenti generalmente come glicosidi legati a svariate molecole di zucchero o come complessi legati ad acidi organici, amine, lipidi, carboidrati e altri fenoli (Liu 2007).

### 5.1.1 Acidi fenolici

Gli acidi fenolici vengono classificati in due gruppi:

- derivati dell'acido idrossibenzoico, quali gli acidi *p*-idrossibenzoico, protocatecuico, vanillico, siringico e gallico;
- derivati dell'acido idrossicinnamico, quali gli acidi *p*-cumarico, caffeico, ferulico e sinapico (Liu 2007).

Gli acidi fenolici rappresentano la forma più comune di composto fenolico presente nei cereali (Li et al. 2008). Gli acidi fenolici comunemente identificati nei cereali integrali includono gli acidi ferulico, vanillico, caffeico, siringico e *p*-cumarico (Liu 2007).

Il composto maggiormente presente nei cereali integrali è rappresentato dall'acido ferulico (acido 3-metossi-4-idrossicinnamico); esso si trova prevalentemente in forma legata, concentrato nelle pareti cellulari dello strato aleuronico e del pericarpo, mentre nell'endosperma è presente soltanto in tracce (Liu 2007). La concentrazione, ripartita per frazioni, dell'acido ferulico nei principali cereali è riportata in Tabella 6. Il contenuto di acido ferulico totale è maggiore nel mais, seguito da frumento, orzo e riso, con un rapporto tra le frazioni libera, coniugata solubile e legata pari a 0.1:1:100 (Adom & Liu 2002). Essendo presente maggiormente negli strati esterni della cariosside, è stato osservato che il contenuto di acido ferulico nel frumento è dipendente dalla dimensione della cariosside, con un contenuto maggiore nelle cariossidi di taglia minore, che possiedono una maggiore concentrazione in arabinoxilani (Klepacka & Fornal 2006).

L'acido ferulico nelle pareti cellulari dei vegetali monocotiledoni è presente in forma di diferulato, associato agli arabinoxilani attraverso legami esterei. Bunzel e colleghi (2001) hanno identificato i diversi diidroferulati presenti nella fibra solubile e insolubile in diversi cereali: mais, frumento, spelta, riso, orzo, segale, avena e miglio. Gli acidi diidroferulici osservati nella fibra insolubile sono state le forme: 8-5', 8-8', 5-5', 8-O-4', e 4-O-5'. Queste molecole sono state osservate anche nella fibra solubile, ad eccezione dell'acido 4-O-5' diidroferulico (Bunzel et al. 2001). Il contenuto nelle due matrici è risultato diverso e nettamente superiore nella fibra insolubile (tra 2.4 e 12.6 mg/g) rispetto alla fibra solubile (40-230 µg/g) (Bunzel et al. 2001). In particolare, nella fibra insolubile sono maggiormente presenti i dimeri 8-5', mentre nella fibra solubile sono presenti concentrazioni significative di dimeri 8-8' (Bunzel et al. 2001). Considerando i diversi cereali, il contenuto maggiore di diidroferulati nella fibra insolubile si trova nel mais (12596 µg/g), seguito da miglio (5693 µg/g), riso (4042 µg/g), segale (3647 µg/g), avena (3599 µg/g) e frumento (2372 µg/g). Il

frumento presenta la concentrazione più alta nella fibra solubile (233  $\mu\text{g/g}$ ) (Bunzel et al. 2001). Nel mais è stata inoltre recentemente osservata la presenza di alcune forme di diidrotrimeri di acido ferulico, per un contenuto complessivo pari a 916  $\mu\text{g/g}$  (Dobberstein & Bunzel 2010).

**Tabella 6.** Contenuto di acido ferulico nei cereali ( $\mu\text{mol}$  acido ferulico/100g) e contributo percentuale di ogni frazione sul totale (fonte: Adom & Liu 2002).

	libera	solubile coniugata	legata	totale
Mais	0.92 $\pm$ 0.02 (0.1%)	8.95 $\pm$ 0.11 (1%)	896.27 $\pm$ 9.09 (98.9%)	906.13 $\pm$ 9.09
Frumento	0.57 $\pm$ 0.02 (0.2%)	3.27 $\pm$ 0.27 (1%)	329.60 $\pm$ 16.20 (98.8%)	333.44 $\pm$ 16.20
Avena	0.65 $\pm$ 0.04 (0.4%)	3.4 $\pm$ 0.56 (1.84%)	180.61 $\pm$ 4.57 (97.8%)	184.66 $\pm$ 4.61
Riso	0.7 $\pm$ 0.05 (0.5%)	9.9 $\pm$ 0.34 (6.5%)	142.80 $\pm$ 8.68 (93%)	153.39 $\pm$ 8.68

Nei cereali, la frazione libera mostra un'eterogeneità maggiore nel profilo acidico rispetto alla frazione legata. Comunque, l'acido ferulico in forma libera risulta presente in tutti i cereali più comuni, e in molti di questi risulta l'acido fenolico più rappresentato, ad eccezione dell'avena che contiene elevate quantità di acido cumarico (Zieliński et al. 2001; Žilić et al. 2011). In particolare, il contenuto di acido ferulico libero nella segale è risultato maggiore di quello presente nel frumento tenero, frumento duro, orzo e avena (Žilić et al. 2011). Sono inoltre stati identificati nella frazione libera gli acidi clorogenico, caffeico e, soltanto in segale e avena, l'acido *p*-cumarico (Žilić et al. 2011).

Nel frumento è stata misurata una concentrazione media di acidi fenolici totali pari a 658  $\mu\text{g/g}$  (Li et al. 2008). Questo valore rappresenta una media calcolata su una collezione di 130 cultivars di frumento invernale, 20 cultivar di frumento estivo, 5 linee di spelta, 10 linee di frumento duro e 10 linee di farro (5 di *Triticum monococcum* var. *monococcum* e 5 di *T. turgidum* var. *dicoccum*). Considerando le diverse frazioni, gli acidi fenolici liberi contribuiscono in maniera minima, con un contenuto di 3-30  $\mu\text{g/g}$ , pari all'1 % del totale. Una proporzione maggiore è stata identificata come composti coniugati solubili (22 %), presenti in un intervallo tra 76 e 416  $\mu\text{g/g}$ . Il contributo maggiore è stato identificato come frazione legata, pari al 77 % del contenuto totale di acidi fenolici (Li et al. 2008). Considerando i singoli composti presenti, la frazione libera ha mostrato la maggiore eterogeneità di composizione tra i diversi genotipi di frumento. Una variabilità minore è stata notata tra i composti coniugati solubili, in cui i composti maggiormente presenti erano gli acidi 2,4-diidrossibenzoico (che rappresenta il 25-39 % della frazione), ferulico e sinapico. Diversamente, il profilo della frazione legata non ha mostrato grandi differenze tra i diversi genotipi, con la

preponderanza dell'acido ferulico (72-85 %). In particolare, in questa frazione sono presenti anche i diferulati, che rappresentano il 3-9 % dei ferulati totali (Li et al. 2008).

Anche il contenuto di acidi fenolici totali varia nei diversi genotipi di mais differentemente pigmentato (Žilić et al. 2012). In particolare studiando 10 varietà di mais, è stato misurato un contenuto di acidi fenoli totali nell'intervallo tra 5227 e 5811 µg acido gallico equivalenti/g (peso secco) nei genotipi che non presentavano antocianine, tra 10529 e 7353 µg acido gallico equivalenti/g nei genotipi blu ricchi in antocianine, tra 6011 e 6115 µg acido gallico equivalenti/g nei genotipi rossi, di 4494 µg acido gallico equivalenti/g nel genotipo multicolore (Žilić et al. 2012). Nei genotipi di mais analizzati, gli autori hanno rilevato tre acidi fenolici, precisamente gli acidi ferulico, *p*-cumarico e, in concentrazioni minori, *o*-cumarico. Le forme legate sono risultate presenti in proporzione maggiore. In particolare, il 76-91 % dell'acido ferulico e dell'acido *p*-cumarico erano presenti nel mais in forma legata (Žilić et al. 2012). Diversamente, l'acido *o*-cumarico non è stato riscontrato nella frazione legata, mentre la forma libera e quella coniugata solubile contribuiscono per il 52-100 % e 0-48 % al contenuto totale degli acidi fenolici, rispettivamente (Žilić et al. 2012).

Il profilo degli acidi fenolici nel riso, sia integrale sia perlato, è dominato dall'acido ferulico (255-362 µg/g e 61-84 µg/g, rispettivamente nel riso integrale e perlato), seguito dal *p*-cumarico (70-152 µg/g nel riso integrale), con contenuti minori di acidi gallico, vanillico, caffeico e siringico (Zhou et al. 2004b). Come atteso, il contenuto individuale degli acidi fenolici in diverse varietà di riso è risultato maggiore nel riso integrale rispetto al perlato, con un valore medio di acidi fenolici totali pari a 469 µg/g e 94 µg/g, rispettivamente (Zhou et al. 2004b). Nel riso integrale, gli acidi fenolici sono presenti per l'85-89 % in forma legata, con un contenuto medio di 421 µg/g (Zhou et al. 2004b). In effetti, l'acido *p*-cumarico è associato alla lignina, mentre l'acido ferulico è legato agli arabinoxilani che costituiscono la parete cellulare (Zhou et al. 2004b). Nella crusca di una varietà di riso a pigmentazione nera è stato notato un contenuto maggiore di acidi gallico, idrossibenzoico e protocatecuico rispetto alle varietà non pigmentate e con colorazione rossa (Laokuldilok et al. 2011).

L'acido ferulico è stato osservato essere l'acido fenolico più abbondante anche nell'orzo, con un contenuto compreso tra 359 e 624 µg/g (Hernanz et al. 2001). Tra gli acidi idrossicinnamici, sono inoltre stati quantificati gli acidi *p*-cumarico (79-260 µg/g) e caffeico (< 19 µg/g). Gli autori hanno inoltre identificato le diverse forme di diidrodimeri di acido ferulico presenti nelle varietà di orzo analizzate. Tra i composti analizzati, 8-*O*-4'-diFA (73-118 µg/g) era presente in maggiore quantità, seguito da 5,5'-diFA (26-47 µg/g), 8,5'-diFA benzofurano (22-45 µg/g) e 8,5'-diFA (10-23 µg/g) (Hernanz et al. 2001).

In un recente studio è stato riportato che anche alcuni cereali africani, in particolare sorgo (*Sorghum bicolor* subsp. *bicolor*), miglio (*Pennisetum glaucum* L.) e fonio (*Digitaria exilis*), contengono gli acidi fenolici soprattutto in forma legata e che l'acido ferulico risulta essere il composto maggiormente presente (N'Dri et al. 2013). Il profilo fenolico dei tre cereali africani risulta diverso nella frazione libera, con la predominanza dell'acido protocatecuico nel fonio, degli acidi vanillico e caffeico nel sorgo e degli acidi *p*-cumarico e gallico nel miglio, mentre la frazione legata è meno eterogenea tra le specie, presentando in prevalenza acido ferulico e *p*-cumarico (N'Dri et al. 2013). In un'altra varietà di miglio (*Eleusine coracana*) è stato riportato che la frazione libera contribuisce per il 71 % al contenuto totale degli acidi fenolici (Subba Rao & Muralikrishna 2002). In particolare, gli acidi protocatecuico, gallico e caffeico sono gli acidi maggiormente presenti nella frazione libera, mentre, anche in questo caso, la frazione legata è caratterizzata dagli acidi ferulico e, secondariamente, caffeico e cumarico (Subba Rao & Muralikrishna 2002).

### 5.1.2 Antocianine

Le antocianine sono dei pigmenti idrosolubili che contribuiscono ai colori blu, viola e rosso nei vegetali. Nei cereali sono i flavonoidi maggiormente studiati. La presenza di antocianine è stata osservata in diverse varietà pigmentate di mais, frumento, riso, orzo e sorgo.

In uno studio condotto su diverse varietà di frumento pigmentate, la varietà blu analizzata ha mostrato un maggior contenuto di antocianine totali (152.2 µg/g di frumento integrale, media di tre annate produttive), rispetto alle varietà viola (93.1 µg/g) e rossa (5.1 µg/g) (Abdel Aal & Hucl 2003). E' stato inoltre osservato che nel frumento, la composizione in antocianine è differente nelle varietà pigmentate in blu e in viola (Abdel Aal & Hucl 2003; Abdel Aal et al. 2006). Nel frumento viola, la cianidina 3-glucoside è risultata essere la preponderante, seguita dalla peonidina malonilglucoside. Diversamente, nel frumento blu è stata identificata come antocianina prevalente la delphinidina 3-glucoside, rappresentando circa il 40 % delle antocianine totali, seguita dalla delphinidina 3-rutinoside (circa 20-30 %) (Abdel Aal et al. 2006; Abdel Aal et al. 2008). In particolare, nel frumento pigmentato i pigmenti che conferiscono la colorazione blu sono localizzati nello strato aleuronico, mentre i pigmenti viola sono concentrati nel pericarpo (Abdel Aal et al. 2006).

Il mais pigmentato presenta una complessa composizione in antocianine. In mais di diverse pigmentazioni (blu, rosa, viola, rosso e multicolore) sono stati isolati dai 18 ai 25 composti (Abdel Aal et al. 2006). La cianidina 3-glucoside è stata identificata come l'antocianina più presente nel mais pigmentato, eccetto per il mais rosa, in cui l'antocianina prevalente è la pelargonidina 3-glucoside, con un contenuto del 43 % delle antocianine totali (Abdel Aal et al. 2006). Inoltre, è stato notato che gran parte delle antocianine identificate nel mais pigmentato sono presenti in

forma acilata, con la presenza dei gruppi malonil e succinil, e presentano numerosi isomeri (Abdel Aal et al. 2006). Un ulteriore studio su varietà di mais con diversa pigmentazione (bianca, gialla, arancione, rossa, azzurra, blu e multicolore) ha invece evidenziato che l'antocianina maggiormente presente era la cianidina 3-glucoside in tutte le varietà analizzate (Žilić et al. 2012).

Nell'orzo viola sono state identificate la cianidina 3-glucoside e la delphinidina 3-glucoside come antocianine principali, ed è stato misurato un contenuto di antocianine totali pari a 573 µg/g (Bellido & Beta 2009). Similmente, un ulteriore studio su orzo con differenti pigmentazioni ha misurato un contenuto di antocianine tra 13 e 1038 µg/g, osservando una maggiore presenza di antocianine nelle varietà blu e viola rispetto alle varietà a pigmentazione nera (Kim et al. 2007). Anche in questo caso, le antocianine più comuni sono state la cianidina 3-glucoside per le varietà viola e la delphinidina 3-glucoside nelle varietà blu e nere (Kim et al. 2007).

Il contenuto in antocianine nel riso è stato analizzato in numerosi studi, che si sono focalizzati soprattutto sulle varietà a pigmentazione nera. Il contenuto totale medio di antocianine è stato misurato pari a 3276 µg/g nelle varietà nere e 94 µg/g nelle varietà rosse, mostrando un contenuto molto maggiore nel riso nero (Abdel Aal et al. 2006). In alcune varietà a pigmentazione rossa non è stata riscontrata la presenza di antocianine. Nonostante i numerosi studi presenti abbiano analizzato numerose varietà differenti di riso, la letteratura è in accordo nella composizione delle varietà nere. Infatti, tutti gli studi osservano come antocianina preponderante la cianidina 3-glucoside, che in alcune varietà rappresenta più del 90 % delle antocianine totali, seguita dalla peonidina 3-glucoside (Abdel Aal et al. 2006; Finocchiaro et al. 2010; Zhang et al. 2010; Sompong et al. 2011; Laokuldilok et al. 2011; Chen et al. 2012; Frank et al. 2012; Min et al. 2012). Il contenuto medio di queste due antocianine nel riso nero varia da circa 200 a 2000 µg/g per la cianidina 3-glucoside e da circa 100 a 200 µg/g per la peonidina 3-glucoside (Abdel Aal et al. 2006; Sompong et al. 2011; Frank et al. 2012). Nel riso rosso il loro contenuto è stato misurato pari a 14 µg/g per la cianidina 3-glucoside e 2.5 µg/g per la peonidina 3-glucoside (Abdel Aal et al. 2006). Oltre a queste due antocianine, sono stati identificati altri composti presenti in minore quantità e che differiscono nelle diverse varietà di riso analizzato. In alcune varietà a pigmentazione nera e rossa è stata notata la presenza di isomeri di cianidina diglucoside, identificati come cianidina 3,5-diglucoside (Abdel Aal et al. 2006; Hou et al. 2013). In quantità minime, in alcune varietà nere e rosse sono state identificate anche: cianidina 3-rutinoside (Abdel Aal et al. 2006; Zhang et al. 2010), malvidina (Chen et al. 2012), petunidina 3-glucoside (Chen et al. 2012), cianidina 3-galattoside (Min et al. 2012). Uno studio recente ha analizzato tramite Imaging con spettrometria di massa l'esatta localizzazione di diverse antocianine nel pericarpo di una varietà di riso a pigmentazione nera (Yoshimura et al. 2012). Il lavoro ha notato che le antocianine composte da uno zucchero pentoso erano localizzate nell'intero pericarpo, mentre le

antocianine composte da uno zucchero esoso erano concentrate nella parte posteriore dorsale del pericarpo. Questo suggerisce che la differente localizzazione delle diverse antocianine sia dovuta alla diversa composizione della molecola dello zucchero piuttosto che all'aglicone (Yoshimura et al. 2012).

Nel sorgo pigmentato, il sorgo nero ha mostrato il maggiore contenuto in antocianine (circa 10 mg/g nella crusca), rispetto al sorgo marrone e rosso (2.8-4.3 mg/g di antocianine totali nella crusca) (Awika et al. 2004b). In questo cereale sono state identificate solamente 3-deossiantocianidine, in particolare luteolinidina e apigeninidina che rappresentano circa il 50 % delle antocianine totali (Awika et al. 2004a). Questa classe di antocianine si caratterizza per la mancanza del gruppo idrossile in posizione C-3, che conferisce una maggiore stabilità al pH rispetto alle comuni antocianine e le loro forme glicosilate (Awika et al. 2004b).

### 5.1.3 Procianidine

I tannini presenti nei cereali sono soltanto tannini di tipo condensato, o proantocianidine. Infatti, nei cereali non è stata evidenziata la presenza di acido tannico o tannini idrolizzabili. I tannini condensati sono dei polimeri composti da unità di flavan-3-oli e/o flavan-3,4-dioli, legati tramite legami C4→C8 (proantocianidine di tipo B) (Dykes & Rooney 2006).

Nel sorgo, il monomero più abbondante è la catechina, mentre il dimero maggiormente presente è la procianidina B1 (Awika & Rooney 2004). Tra i composti a basso peso molecolare, si distingue l'epicatechina gallato. Diversamente, nei composti a maggiore peso molecolare, è stata riportata la presenza di un'elevata eterogeneità di procianidine polimeriche (Awika & Rooney 2004). In diverse varietà di sorgo è stata misurata una concentrazione di tannini compresa tra 10 e 82 mg/g (riferita al peso secco) (Awika & Rooney 2004; Dykes et al. 2005; Kobue-Lekalake et al. 2007), presente soprattutto come polimeri con grado di polimerizzazione > 10 (Awika et al. 2003).

Nel sorgo, la presenza di tannini è una caratteristica genetica che dipende dalla varietà, mentre il colore del pericarpo non è un indicatore della loro presenza (Dykes & Rooney 2006). In particolare, la presenza di tannini è legata alla testa pigmentata, caratteristica presente nelle varietà di sorgo in cui entrambi i geni  $B_1$   $B_2$  sono dominanti. Inoltre, il gene S controlla la presenza di pigmenti nell'epicarpo ed endocarpo in presenza di testa pigmentata (Dykes & Rooney 2006). Le varietà di sorgo vengono suddivise in classi: tipo I, che non presenta testa pigmentata; tipo II, che presenta testa pigmentata e i tannini sono localizzati in vescicole all'interno dello strato della testa; tipo III, che presenta testa pigmentata e i tannini sono depositati lungo le pareti cellulari della testa e alcuni sono presenti nel pericarpo (Dykes & Rooney 2006). In generale, le varietà di tipo II e tipo III

contengono livelli di tannini pari a 6.4-15.5 mg catechina equivalenti/g e 11-56.3 mg catechina equivalenti/g, rispettivamente (Dykes & Rooney 2006).

Nel miglio la presenza di tannini è riportata soltanto per alcune specie, quali *Eleusine coracana* con concentrazioni pari a 1.4-5.2 mg catechina equivalenti/g (Hedge & Chandra 2005), teff (*Eragrostis tef* Zucc.) e alcune varietà di *Pennisetum glaucum*. Diversamente, nel *Panicum miliaceum* e nel fonio (*Digitaria exilis* Kippist) non è presente la testa pigmentata (Dykes & Rooney 2006).

La presenza di procianidine è stata misurata anche nell'orzo, in quantità di 0.74 mg/g, con una composizione prevalente di molecole a basso grado di polimerizzazione (monomeri, dimeri, trimeri, 4-6meri) (Gu et al. 2004).

Nel riso, alcune procianidine sono state identificate in alcune varietà a pigmentazione rossa e nera (Oki et al. 2002; Finocchiaro et al. 2007; Finocchiaro et al. 2010; Min et al. 2012). In queste varietà sono stati osservati principalmente oligomeri, del tipo catechina e/o epicatechina derivati (Oki et al. 2002; Finocchiaro et al. 2007; Min et al. 2012).

## 5.2 Alchilresorcinoli

Gli alchilresorcinoli sono lipidi fenolici, derivati del 1,3-diidrossibenzene con una catena alchilica in posizione 5 dell'anello benzenico, che rende queste molecole anfifiliche (Fardet 2010). Questi composti sono concentrati prevalentemente negli strati più esterni della cariosside, in particolare sono localizzati negli strati intermedi tra il pericarpo e la testa (Landberg et al. 2008). Essi sono presenti in elevate quantità nella segale (360-3200 µg/g), nel frumento (317-1010 µg/g) e nel triticale (580-1630 µg/g) e in quantità minori nell'orzo (42-500 µg/g), miglio (100 µg/g) e mais (Ross et al. 2003; Andersson et al. 2010).

## 5.3 γ-orizanoli

I γ-orizanoli sono miscele di steril ferulati (ad esempio, metilsteroli esterificati con acido ferulico). Il contenuto nel riso integrale è compreso tra 18 e 65 mg/100g (peso secco) e nella crusca di riso tra 185 e 520 mg/100g (Fardet 2010; Cho et al. 2012; Jeng et al. 2012; Gunaratne et al. 2013). I maggiori γ-orizanoli presenti nel riso sono cicloartenil ferulato, 2,4-metilenecicloartenil ferulato, campesteril ferulato e sitosteril ferulato (Cho et al. 2012; Jeng et al. 2012; Gunaratne et al. 2013).

Diversi tipi di  $\gamma$ -orizanoli sono stati isolati anche in altri cereali diversi dal riso, in particolare nel frumento, nel mais e nella segale (Norton 1994; D'Ambrosio 2013).

## 5.4 Carotenoidi

Nei cereali è inoltre presente un discreto contenuto di carotenoidi. Tra i cereali, il mais è la fonte più importante, con un contenuto medio di carotenoidi totali pari a circa 11  $\mu\text{g/g}$  (peso secco) (Kurilich & Juvik 1999; Panfili et al. 2004). In particolare, il mais possiede un elevato contenuto di zeaxantina (6.43  $\mu\text{g/g}$ ),  $\beta$ -criptoxantina (2.40  $\mu\text{g/g}$ ) e  $\alpha+\beta$ -carotene (1.44  $\mu\text{g/g}$ ) (Panfili et al. 2004). Negli altri cereali, il maggiore composto è la luteina, con un contenuto compreso tra 0.23 e 2.65  $\mu\text{g/g}$  nell'avena e nel frumento duro, rispettivamente (Panfili et al. 2004). Alfa-carotene,  $\beta$ -carotene e zeaxantina sono principalmente localizzati nel germe, mentre la luteina è distribuita in modo omogeneo nella cariosside (Panfili et al. 2004). Nel farro (*Triticum monococcum* L. subsp *monococcum*), la luteina è stata misurata in concentrazioni pari a 5.8-7.5  $\mu\text{g/g}$  (peso secco) nell'intera cariosside, con una concentrazione preponderante nel germe (26.3-38.0  $\mu\text{g/g}$ ), seguita da endosperma (5.1-7.4  $\mu\text{g/g}$ ) e crusca (4.0-4.5  $\mu\text{g/g}$ ) (Hidalgo & Brandolini 2008). Uno studio condotto sul riso, ha messo in luce che il livello di carotenoidi varia tra ed entro i diversi sottogruppi di riso (Belefant-Miller & Grace 2010). In particolare, il riso di tipo japonica delle zone temperate generalmente possiede il maggiore contenuto in carotenoidi, mentre il tipo japonica tropicale il minore (Belefant-Miller & Grace 2010). Inoltre, il contenuto in carotenoidi totali è risultato significativamente differente in varietà di riso con differente pigmentazione, mostrando un contenuto pari a 4.82  $\mu\text{g/g}$  nelle cultivar nere, 0.52  $\mu\text{g/g}$  nelle cultivar a pigmentazione rossa e 0.021  $\mu\text{g/g}$  nelle cultivar non pigmentate (Kim et al. 2010). Nelle varietà analizzate sono stati identificati, in ordine di concentrazione, luteina,  $\beta$ -carotene e zeaxantina (Kim et al. 2010).

## 6. EFFETTO DELLA COTTURA SULLA COMPONENTE ANTIOSSIDANTE DEI CEREALI

La maggior parte della letteratura riguardante i composti antiossidanti nei cereali è riferita a campioni crudi, e si è interessata dell'analisi della capacità antiossidante mediante diversi metodi e dell'identificazione e quantificazione dei singoli composti di diverse classi di molecole che concorrono alla capacità antiossidante, quali polifenoli, carotenoidi, tocoferoli e tocotrienoli,  $\gamma$ -orizanoli, alchilresorcinoli (Fardet et al. 2008). Al contrario, l'effetto della cottura sulla capacità antiossidante e sui composti fenolici nei cereali è stato poco studiato. Tuttavia, i cereali vengono consumati dopo cottura, per cui risulta importante analizzare come i trattamenti termici possano influenzare le componenti antiossidanti di questi alimenti.

Gli studi condotti al riguardo riportano che generalmente nel riso, sorgo e miglio si riscontra una riduzione del contenuto fenolico totale, misurato tramite metodo spettrofotometrico di solito il reattivo di Folin-Ciocalteu oppure con il blu di Prussia (Towo et al. 2003; Perez-Jimenez & Saura-Calixto 2005; Dlamini et al. 2007; Finocchiaro et al. 2007; Li et al. 2007; N'Dri et al. 2013). In particolare, Towo e colleghi (2003) riportano che il processo di bollitura causa una diminuzione del contenuto fenolico solubile totale, dosato tramite un metodo colorimetrico, pari al 40 % e 80 % nel miglio e sorgo rosso, rispettivamente. Per spiegare l'effetto negativo del trattamento termico a carico dei composti fenolici, gli autori hanno formulato alcune ipotesi, quali la lisciviazione dei composti nel liquido di cottura, la formazione di complessi con le macromolecole dell'endosperma, la degradazione per trattamento termico (Towo et al. 2003). Similmente, Shobana & Malleshi (2007) hanno notato un decremento del 14 % del contenuto fenolico dopo trattamento termico del miglio, mentre N'Dri et al. (2013) riportano una diminuzione del contenuto fenolico totale, misurato tramite metodo con il reattivo di Folin Ciocalteu, di circa 8 % in fonio, 46 % in miglio e 45 % in sorgo, con una diminuzione a carico sia dei composti solubili che legati. Gli autori suggeriscono che questa diminuzione, soprattutto quella dei composti solubili, possa essere parzialmente spiegata da una perdita dei flavonoidi, presenti maggiormente nella frazione solubile e suscettibili al calore (N'Dri et al. 2013). Un ulteriore studio condotto su sette varietà di miglio ha riscontrato una diminuzione del contenuto fenolico totale dopo cottura, mediante bollitura per 30 minuti, soltanto in due varietà, mentre gli altri campioni non hanno subito diminuzioni significative (Chandrasekara et al. 2012). La diminuzione del contenuto fenolico totale dopo cottura nelle due varietà è stato spiegato come degradazione dei composti fenolici o migrazione di questi nell'endosperma con formazione di complessi con le macromolecole, che hanno reso i composti fenolici meno accessibili all'estrazione. Diversamente, nelle varietà in cui il contenuto fenolico totale non ha subito un decremento significativo dopo cottura si è ipotizzato che l'effetto sia stato

causato dal rilascio di composti fenolici legati che hanno compensato le perdite subite durante il trattamento termico (Chandrasekara et al. 2012). Analizzando un altro cereale, Finocchiaro et al. (2007) hanno valutato l'effetto di due tipi di cottura (bollitura e "risotto") in due varietà di riso, una bianca e una rossa. E' stata notata una diminuzione di composti antiossidanti in seguito alla bollitura, pari a circa il 20 % nella varietà bianca e 60 % in quella rossa, con una perdita quasi totale per i composti solubili del riso rosso (Finocchiaro et al. 2007). La cottura a risotto ha invece causato una minore perdita a carico dei composti antiossidanti, pari al 44 % nel riso rosso, mentre nella varietà bianca la cottura non ha causato perdite significative (Finocchiaro et al. 2007). Questo effetto differente delle due tecniche di cottura è stato spiegato dal fatto che la cottura a risotto prevede il completo assorbimento dell'acqua di cottura, limitando in questo modo le perdite di composti per lisciviazione. Un risultato simile è stato osservato da Massaretto et al. (2011), che ha cotto il riso per 30 minuti fino a completo assorbimento dell'acqua. In questo studio si è notata una riduzione del contenuto fenolico pari al 50 % nel riso pigmentato rosso e nessun effetto significativo nelle varietà non pigmentate. Anche in questo caso, la componente fenolica che ha risentito maggiormente del trattamento termico è stata la frazione solubile, che nel riso pigmentato è composta principalmente da procianidine. Diversamente, la frazione insolubile delle varietà non pigmentate non ha risentito in modo significativo del trattamento di cottura, mentre il contenuto dei composti fenolici insolubili nel riso pigmentato è aumentato significativamente. Gli autori suggeriscono che l'effetto complessivo del trattamento termico, con diminuzione dei composti solubili e incremento di quelli insolubili, sia dovuto alle reazioni di degradazione e polimerizzazione, nonostante non escludano la possibilità di formazione di complessi tra i composti solubili e le macromolecole della matrice alimentare (Massaretto et al. 2011). Diversamente, Nagah & Seal (2005), analizzando l'attività antiossidante nel riso integrale a seguito di un trattamento di bollitura, hanno proposto che la degradazione e/o lisciviazione avvenga soltanto a carico dei composti liberi, mentre gli antiossidanti trattenuti all'interno della matrice dell'alimento non risentano dalla cottura. Nel riso, il contenuto dei composti fenolici è stato osservato diminuire anche a seguito di trattamento di parboilizzazione, probabilmente a causa di una parziale lisciviazione nell'acqua, di degradazione termica e di formazione di interazioni con altri componenti del cereale, facilitate dalle modificazioni che avvengono nella struttura interna del cereale durante il processo di parboilizzazione (Walter et al. 2013). Diversamente dagli studi finora elencati, uno studio condotto sul mais ha evidenziato un aumento del 44 % dell'attività antiossidante e un incremento del contenuto fenolico totale pari al 54 %, a seguito di trattamento termico (115°C per 25 min) (Dewanto et al. 2002). Questo incremento è stato attribuito ad un aumento del contenuto fenolico solubile ed una corrispondente diminuzione dei composti fenolici legati, che con la cottura sono stati rilasciati dalla forma legata (Dewanto et al. 2002).

Prendendo in esame le singole classi di composti antiossidanti, diversi studi su cereali sottoposti a trattamenti termici hanno riportato un aumento del contenuto di acidi fenolici solubili causato dal rilascio di questi composti dalle strutture cellulari probabilmente degradate in seguito al trattamento termico (Zieliński et al. 2001; Bryngelsson et al. 2002; Dewanto et al. 2002; Zieliński et al. 2006). In particolare, nell'avena i trattamenti termici applicati hanno causato un aumento degli acidi ferulico e *p*-cumarico, probabilmente rilasciati dalla forma legata tramite idrolisi, mentre l'acido caffeico, essendo più sensibile al calore, ha subito una diminuzione con la cottura a vapore (Bryngelsson et al. 2002). Similmente, in frumento, orzo, segale, avena e grano saraceno è stato osservato un incremento di tutti gli acidi fenolici liberi e legati dopo estrusione, ad eccezione degli acidi sinapico e caffeico nei primi quattro cereali e dell'acido vanillico nel grano saraceno (Zielinski et al. 2001; Zielinski et al. 2006). Risultati diversi sono stati ottenuti in due varietà di riso a genotipo rosso e non pigmentato, in cui il contenuto degli acidi analizzati (sinapico, ferulico e *p*-cumarico) è diminuito in seguito a cottura sia con metodo a risotto sia mediante bollitura (Finocchiaro et al. 2007). Per concludere, un lavoro che ha analizzato tre cereali africani ha riportato risultati diversi tra i cereali. Dopo cottura, i composti fenolici solubili sono aumentati nel sorgo e nel miglio, mentre quelli legati sono diminuiti nel sorgo, ma non si sono modificati nel miglio. Gli autori hanno suggerito che il fenomeno predominante che avviene durante la cottura sia una parziale solubilizzazione dei componenti delle pareti cellulari con conseguente rilascio di composti. Diversamente, nel fonio è stata osservata una diminuzione degli acidi fenolici solubili, insieme ad un aumento dei composti legati, suggerendo che nel corso della cottura abbiano luogo delle reazioni di polimerizzazione e/o ossidazione dei composti solubili che determinano un incremento della frazione analizzata come legata (N'Dri et al. 2013).

Considerando le procianidine, in una varietà di riso rosso sono state osservate perdite di questi composti pari a circa 70 % e 96 % dopo cottura con completo assorbimento dell'acqua e bollitura, rispettivamente (Finocchiaro et al. 2007). Inoltre, nel caso delle procianidine del sorgo, presenti nel cereale principalmente come polimeri ad alto peso molecolare ( $DP > 10$ ), è stato riportato che queste vengono depolimerizzate dal processo di estrusione. Questo trattamento, infatti, causa un incremento del livello degli oligomeri con  $DP \leq 4$  e una diminuzione dei polimeri con  $DP \geq 6$  (Awika et al. 2003).

Nelle varietà pigmentate dei cereali, quali riso e frumento, sono presenti elevate concentrazioni di antocianine. Questi composti sono notoriamente sensibili ai trattamenti termici. Uno studio che ha valutato l'effetto di tre diversi metodi di cottura sulle antocianine nel riso, ha notato che la cianidina-3-glucoside, la principale antocianina presente, diminuisce con i trattamenti termici, in misura maggiore con la cottura a pressione (79.8 %), seguita dalla cottura effettuata in un cuociriso (74.2 %) e da quella ottenuta sul fornello a gas (65.4 %) (Hiemori et al. 2009). Contemporaneamente, è

stato notato un corrispondente aumento del contenuto di acido protocatecuico, formatosi dalla degradazione termica della cianidina 3-glucoside (Hiemori et al. 2009). Analizzando la stabilità delle antocianine a diversi fattori, tra cui la temperatura, è stato visto che la loro degradazione aumenta all'aumentare della temperatura (Abdel Aal et al. 2003). E' stato osservato, inoltre, che la cianidina 3-glucoside risulta meno stabile ai trattamenti termici della peonidina 3-glucoside e della cianidina 3,5-diglucoside, a causa della loro conformazione chimica (Hou et al. 2013). Infatti, la stabilità delle antocianine aumenta con il numero di gruppi metossilici nell'anello B e diminuisce con l'aumento dei gruppi idrossili liberi. Inoltre, la glicosilazione e l'acilazione aumentano la stabilità di questi composti, di conseguenza i disaccaridi risultano più stabili dei corrispondenti monosaccaridi (Hiemori et al. 2009).

La velocità di degradazione delle antocianine totali in un prodotto integrale tuttavia è diversa rispetto alle antocianine pure (Abdel-Aal & Hucl 2003). Questo suggerisce che le antocianine presenti in un alimento si comportino in modo differente rispetto alle antocianine pure contenute in una soluzione modello.

Risultati diversi sono stati riportati per quanto riguarda il  $\gamma$ -orizanolo. Uno studio condotto sul riso ha infatti messo in luce che la parboilizzazione causa un decremento di questo composto (Pascual et al. 2013). Diversamente, il trattamento di bollitura del riso integrale ha causato un incremento della concentrazione di  $\gamma$ -orizanoli in una varietà a pigmentazione rossa, mentre in una varietà non pigmentata non è stato osservato alcun effetto significativo, probabilmente a causa dei fenomeni concomitanti di rilascio di parte delle molecole di  $\gamma$ -orizanolo legate e di perdita di molecole per ossidazione (Finocchiaro et al. 2007).

Per quanto riguarda la classe dei tocoferoli e tocotrienoli, generalmente questi composti non risentono molto dei trattamenti termici e le perdite che si notano sono dovute principalmente a degradazione lipidica (Tiwari & Cummins 2009). In cereali quali avena, orzo, frumento, segale e grano saraceno, sono state riportate perdite di tocoferoli e tocotrienoli pari a circa il 30 % in seguito a trattamento di estrusione (Zieliński et al. 2001). Diversamente, nel riso integrale il contenuto di tocoli (riferito al peso secco) è aumentato dopo bollitura, probabilmente a causa di un rilascio di tocoli legati e ad una perdita di solidi solubili durante la cottura (Finocchiaro et al. 2007). Distinguendo le due classi di composti, è stata notata una maggiore perdita di tocotrienoli rispetto ai tocoferoli dopo cottura a vapore di avena, probabilmente dovuta alla diversa localizzazione di questi composti nella cariosside con un maggiore effetto protettivo dato dal germe (Bryngelsson et al. 2002). Infatti, i tocoferoli sono presenti in maggiore concentrazione nel germe rispetto all'endosperma, dove sono predominanti i tocotrienoli (Bryngelsson et al. 2002).

Riassumendo, i composti antiossidanti risentono in maniera diversa dei trattamenti subiti dai cereali, probabilmente a causa della loro diversa struttura chimica che li rende diversamente suscettibili alla degradazione, ma anche alla loro diversa distribuzione e compartimentazione nella cariosside e alla presenza o meno in forma libera o legata alle macromolecole della matrice (Bryngelsson et al. 2002).

## 7. EFFETTO DELLA COTTURA SULLA STRUTTURA DEI CEREALI

I trattamenti termici, oltre a modificare il contenuto di determinate molecole, quali i composti ad attività antiossidante, causano modifiche alla struttura e microstruttura dei cereali. Alterando la struttura dei tessuti e le macromolecole, ne sono a loro volta influenzati anche i composti minori. Questi, infatti, possono venire rilasciati dal tessuto/organo in cui sono stoccati che viene degradato o subisce rottura con la cottura, rimanendo maggiormente accessibili poiché non sono più compartimentati, oppure possono essere maggiormente soggetti a degradazione termica, essendo più accessibili, oppure possono formare delle interazioni con le componenti della matrice.

Data la difficoltà di seguire il comportamento delle molecole antiossidanti durante il processo di cottura, la loro localizzazione e le modifiche (anche chimiche) che subiscono, diventa importante studiare l'ambiente in cui queste molecole si trovano. Per poter analizzare il comportamento dei composti antiossidanti durante la cottura può essere utile valutare le modifiche che avvengono nella struttura e a carico dei componenti della matrice dei cereali.

Durante il processo di cottura in presenza di acqua (bollitura o con completo assorbimento dell'acqua) l'effetto più evidente sul cereale è l'assorbimento di acqua all'interno del grano e la conseguente gelatinizzazione dell'amido. L'assorbimento dell'acqua avviene dall'esterno verso l'interno, con una diffusione lenta a causa della conformazione cristallina dell'amido (Kasai et al. 2005) e con una velocità maggiore all'inizio della cottura (Yadav & Jindal 2007). In particolare, il contenuto di acqua che viene assorbita è funzione delle proprietà fisico-chimiche del riso, quali il contenuto di amilosio e proteine (Yadav & Jindal 2007). Durante la cottura, i legami a idrogeno tra le molecole di amido vengono sostituiti da legami tra l'amido e le molecole d'acqua (Kasai et al. 2005). Inoltre la distribuzione dell'acqua all'interno della cariosside avviene in modo diverso nella bollitura e nella cottura a vapore. I grani nel corso della bollitura mostrano un fronte di umidità che avanza gradualmente verso il centro della cariosside, mentre con la cottura a vapore si osserva una distribuzione dell'acqua omogenea all'interno della cariosside, con un contenuto di umidità che aumenta gradualmente con il tempo di cottura (Stapley et al. 1997). Questo effetto è confermato anche dalle osservazioni effettuate da Briffaz e colleghi (2012), che hanno osservato delle sezioni trasversali di riso perlato a determinati intervalli di tempo nel corso della bollitura. Questi autori riportano che, dopo cottura parziale (75 °C per 30 min), il centro del grano non mostra modifiche sostanziali, mentre nella regione intermedia sono avvenute alcune modifiche evidenziate da disorganizzazione cellulare e aggregazione di materiale fuso, e gli strati esterni sono completamente distrutti (Briffaz et al. 2012). In particolare, il confine della parte distrutta corrisponde al fronte di gelatinizzazione, confermando che durante la bollitura la distribuzione dell'acqua avviene gradualmente dall'esterno verso l'interno.

Considerando l'aspetto morfologico, la cottura causa espansione ed eventuale rottura della cariosside. L'effetto della cottura è stato osservato più marcato nelle zone vicino ai punti di rottura e alle fratture, dove l'acqua è penetrata, mentre nelle zone più interne l'effetto è minore, anche se pur sempre significativo (Ogawa et al. 2003). All'interno della cariosside, con l'assorbimento di acqua si ha rigonfiamento e gelatinizzazione dei granuli di amido, che assumono l'apparenza di una massa amorfa (Srikaeo e al. 2006). Le cellule appaiono lisate, a causa del rigonfiamento dell'amido (Tamura & Ogawa 2012). Nello specifico, l'effetto combinato di calore e umidità genera il rigonfiamento dell'amido e l'aumento di pressione all'interno delle cellule. Inoltre, la cottura del cereale in eccesso di acqua facilita la parziale solubilizzazione dei componenti delle pareti cellulari, indebolendo le pareti. Come risultato, la cellula si lisa e libera il suo contenuto (Briffaz et al. 2012). All'interno della cariosside si formano inoltre delle fratture, che si creano non per separazione delle cellule, ma con la distruzione delle pareti cellulari, come risultato di un aumento della pressione, a causa del riscaldamento dell'acqua che viene trasformata in vapore e che rimane intrappolato (Ogawa et al. 2003; Tamura et al. 2013 in press). Queste fratture si formano all'inizio della cottura, e successivamente aumentano di volume diventando spazi vuoti con l'aumento della temperatura all'interno della cariosside (Tamura et al. 2013 in press). E' stato suggerito inoltre che le fratture operino come canali per il flusso dell'acqua all'interno della cariosside durante la cottura (Ogawa et al. 2003). Sulla superficie dei grani di riso cotti sono state notate numerose zone vuote, o cluster di amido poco compatti, dovuti alla lisciviazione di amido (Rewthong et al. 2011). Durante la cottura, infatti, le componenti cellulari, quali amilosio e amilopectina, pareti cellulari danneggiate, lipidi, proteine e altre molecole, possono venire liscivate nel liquido di cottura (Ogawa et al. 2003). In particolare, i solidi che eluiscono sono composti per più del 98 % da amilosio e amilopectina (Tamura & Ogawa 2012) e la loro quantità dipende dalla durata della cottura (Yadav & Jindal 2007). Recentemente, è stato proposto che il materiale lisciviato nell'acqua di cottura dipenda anche dalla presenza di fratture nella cariosside, che renderebbero i composti contenuti nella matrice cellulare maggiormente accessibili (Tamura et al. 2013 in press). In una seconda fase della cottura del riso, quando l'acqua viene assorbita, i materiali eluiti condensano sulla superficie del grano formando uno strato di rivestimento, il cosiddetto "coated layer", di spessore pari a circa 1-7  $\mu\text{m}$  (Tamura & Ogawa 2012). Poiché il materiale eluito nell'acqua di cottura deriva da cellule distrutte e/o aree vuote nella cariosside, è stato suggerito che lo spessore dello strato di rivestimento sia correlato alla quantità del tessuto danneggiato durante la cottura (Tamura & Ogawa 2012).

Le osservazioni finora descritte si riferiscono al riso cotto mediante bollitura o con completo assorbimento dell'acqua, che rappresentano i metodi più comuni per la cottura del riso. Diversamente, l'esposizione del riso a un getto di aria secca a temperatura elevata (280-300 °C) per un breve intervallo di tempo (14 sec) causa un effetto che presenta alcune differenze rispetto

alla bollitura. In particolare, la porzione interna della cariosside assume una struttura spugnosa con pareti spesse (Witek et al. 2010). I granuli di amido e le proteine della cariosside vengono trasformati in una massa amorfa, mentre la struttura delle pareti cellulari rimane intatta, con pareti più o meno intatte (Witek et al. 2010). Si nota, inoltre, la formazione di pori distribuiti in modo disomogeneo e parzialmente interconnessi; sono presenti aree con numerosi pori di dimensione ridotta ( $< 20 \mu\text{m}$ ) e aree con un numero ridotto di pori di grandi dimensioni (fino a 2 mm) (Witek et al. 2010).

## 8. INTERAZIONI TRA I COMPOSTI ANTIOSSIDANTI E LE COMPONENTI DELLA MATRICE DELL'ALIMENTO

Nella valutazione dell'effetto della cottura non si può prescindere dal valutare la microstruttura e le interazioni (effettive e potenziali) che possono intercorrere tra i diversi composti presenti all'interno della cariosside, in quanto questi fattori influenzano, e in alcuni casi determinano, il contenuto di composti estraibili e la loro bioaccessibilità.

L'esempio più rilevante è sicuramente la fibra. Infatti, gli acidi cinnamici (soprattutto l'acido ferulico e secondariamente l'acido *p*-cumarico) nell'aleurone e nel pericarpo sono presenti in forma legata, esterificati con gli arabinoxilani e arabinogalattani delle pareti cellulari (Vitaglione et al. 2008). In particolare, l'acido ferulico, con la formazione di diferulati, forma strutture a ponte tra le catene dei polisaccaridi e cross-linking tra polisaccaridi e lignina (Vitaglione et al. 2008). In questo modo, i composti fenolici determinano la struttura della fibra e le sue proprietà fisiche, quali la reticolazione, il peso molecolare e la solubilità in acqua; d'altro canto la fibra influenza la bioaccessibilità di questi composti (Vitaglione et al. 2008).

Numerosi studi riportano inoltre la possibilità di interazioni tra i composti fenolici e gli altri componenti della matrice alimentare, oltre alla fibra. Uno studio effettuato sulla cariosside di frumento ha permesso di ipotizzare anche un'interazione tra gli esteri di acido ferulico (legati alla parete) e i fosfolipidi (Piot et al. 2001). Riguardo le proteine, Skrabanja e colleghi (2000) hanno osservato, durante il trattamento termico di grano saraceno, la formazione di interazioni tra polifenoli e proteine con effetto negativo sulla digestione delle proteine. Nel frumento, Noort et al. (2010) hanno rilevato delle interazioni tra i monomeri di acido ferulico (legato alla parete cellulare) e le proteine del glutine, con un effetto negativo sulla funzionalità del reticolo glutinico. E' nota, inoltre, la possibilità d'interazione tra proantocianidine e alcune prolamine (ad esempio, ordeina in orzo e kafirina in sorgo), mentre l'acido tannico può interagire con la gliadina (Emmambux & Taylor 2003). Mazzaracchio et al. (2001) hanno valutato le interazioni tra antocianine e gliadine, in una soluzione modello, notando che il legame tra antocianina e proteina è risultato maggiormente probabile nel caso dell'antocianina in forma agliconica rispetto alla forma glicosilata. Inoltre, l'intera molecola dell'antocianina è verosimilmente coinvolta nell'interazione, in quanto la cavità della proteina che consente il legame sembra essere di dimensioni sufficienti per permettere l'inclusione dell'intera molecola dell'antociano (Mazzaracchio et al. 2001).

E' stato inoltre notato che le antocianine possono interagire con i polisaccaridi con conseguente perdita di colore (Lewis et al. 1995). Recentemente, è stato suggerito che composti fenolici a basso peso molecolare, come acido gallico e acido ferulico, e le catechine possono formare interazioni con le molecole di amido, modificando le proprietà funzionali dell'amido (Zhu et al.

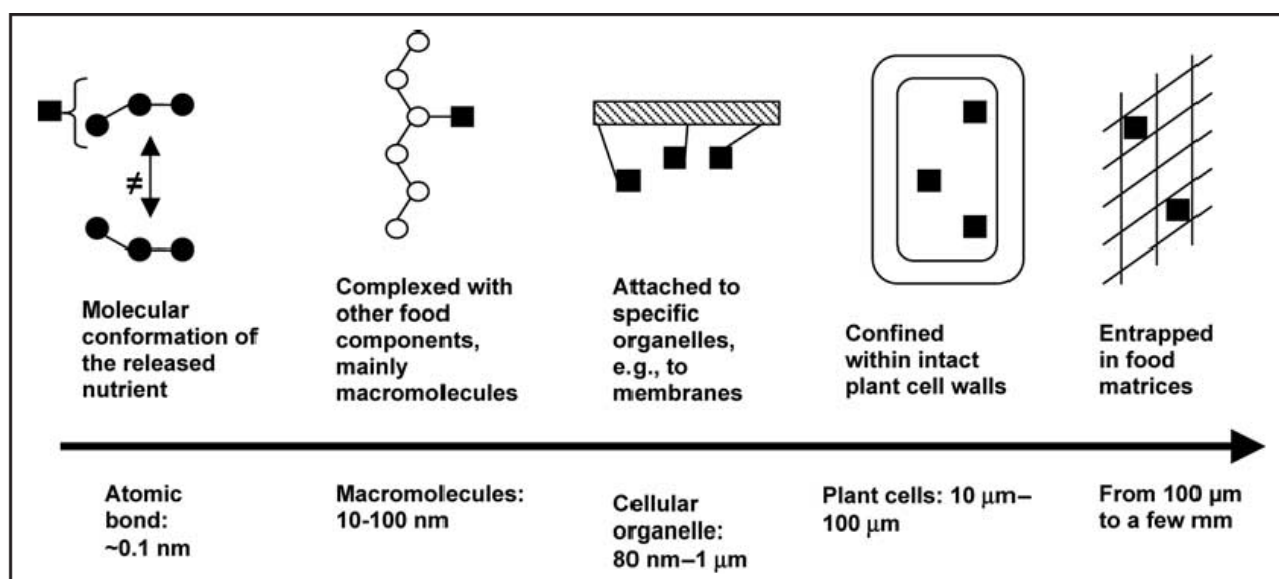
2008; Wu et al. 2009; Barros et al. 2012). E' stato infatti osservato che i composti fenolici sono in grado di influenzare la gelatinizzazione dell'amido, modificando anche le caratteristiche di texture del gel che si forma, e di causare un ritardo della sua retrogradazione (Zhu et al. 2008; Wu et al. 2009). Tra i composti fenolici, sono le proantocianidine che interagiscono maggiormente con le molecole di amido rispetto ai fenoli monomerici. Questi risultati confermano precedenti osservazioni ottenute analizzando pane e biscotti preparati con l'aggiunta di crusca di sorgo, che suggeriscono che il grado di interazioni delle procianidine con le macromolecole aumenta con il grado di polimerizzazione delle procianidine (Awika et al. 2003). Anche recentemente è stata confermata la formazione di interazioni tra composti fenolici e amido in soluzione sia a temperatura ambiente sia durante cottura (Barros et al. 2012) con la costituzione di complessi insolubili tra i fenoli e l'amido gelatinizzato. Inoltre, le interazioni sono apparse essere specifiche per l'amilosio e i frammenti lineari di amilopectina, suggerendo che le interazioni coinvolte siano di tipo idrofobico (Barros et al. 2012).

## 8. BIOACCESSIBILITA' E BIODISPONIBILITA'

La biodisponibilità è definita come la frazione di un nutriente ingerito che è disponibile per l'utilizzo nelle funzioni fisiologiche normali e come riserva (Parada & Aguilera 2007). Diversamente, la bioaccessibilità è rappresentata dalla frazione di nutriente che è rilasciato dalla matrice dell'alimento ed è disponibile per l'assorbimento intestinale (Parada & Aguilera 2007).

Il contenuto di un nutriente disponibile per l'assorbimento dipende quindi dalla struttura della matrice dell'alimento e dalla presenza di interazioni del nutriente con altre componenti dell'alimento (Parada & Aguilera 2007). In Figura 6 sono rappresentati alcuni meccanismi che possono influenzare la bioaccessibilità di un nutriente.

**Figura 6.** Meccanismi che influiscono sulla bioaccessibilità di un nutriente (■ in una matrice alimentare (fonte Parada & Aguilera 2007).



Un esempio che descrive come la matrice alimentare possa essere determinante nell'influencare la biodisponibilità di un composto è sicuramente l'acido ferulico presente nelle frazioni crusali.

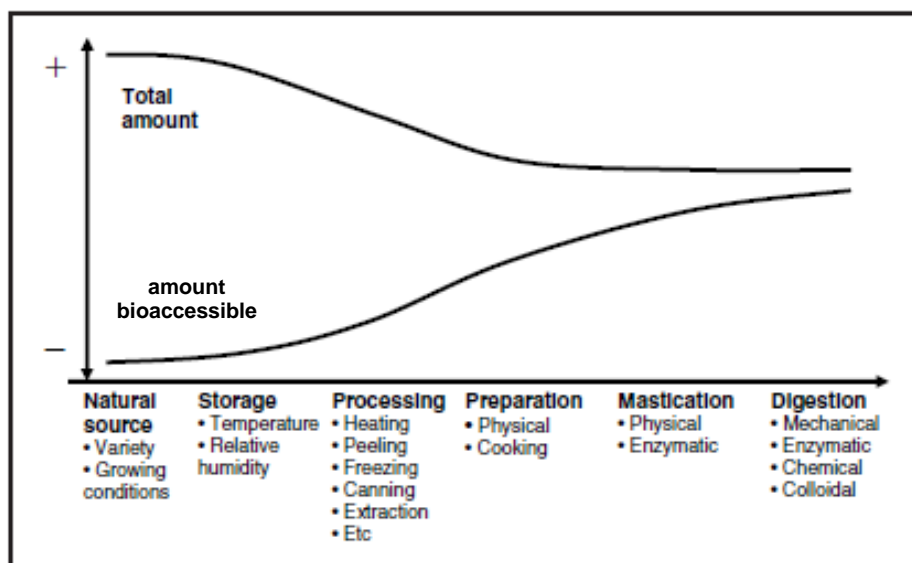
L'acido ferulico, come precedentemente affermato, è il composto fenolico più abbondante nei cereali, con un contenuto compreso tra 290 e 740 μg/g (peso secco) nel frumento duro e tra 180 e 870 μg/g nel frumento tenero. Esso è presente per circa il 98 % in forma legata, esterificato agli arabinoxilani delle pareti cellulari. Queste caratteristiche strutturali influenzano in modo significativo la bioaccessibilità e quindi biodisponibilità di questo composto (Adam e al. 2002). E' stato infatti osservato, sia in ratti sia in uomini, che la forma in cui è presente l'acido ferulico legato determina il

suo grado di assorbimento (Zhao & Moghadasian 2008). In particolare, l'acido esterificato con zuccheri è più facilmente idrolizzabile dalle esterasi e/o dai microrganismi intestinali rispetto ad un polisaccaride ferulato con una struttura complessa, che può ridurre le interazioni tra gli enzimi idrolitici e il polimero di acido ferulico, con la conseguente riduzione del rilascio di acido ferulico (Zhao & Moghadasian 2008). E' stato inoltre studiato come i composti associati alla fibra non vengano assorbiti (o soltanto in una minima parte) nel primo tratto gastrointestinale, raggiungendo il colon, dove possono venire rilasciati grazie all'azione delle esterasi batteriche. Anche nel colon, il cross-linking dei polisaccaridi è un fattore che limita la biodegradabilità da parte dei microrganismi (Amrein et al. 2003). E' stato infatti notato che le porzioni di fibra che contengono acido ferulico in quantità minore vengono attaccate preferenzialmente dai microrganismi, mentre l'acido ferulico e i suoi diidrodimeri vengono degradati lentamente e in misura minore (Amrein et al. 2003).

La biodisponibilità nei ratti e nell'uomo dell'acido ferulico di prodotti a base di cereali, in particolare crusca, si è rivelata modesta: 3 % nell'uomo (Kern et al. 2003), 2.5-3 % nei ratti (Adam et al. 2002) e 0.4-0.5 % dalla crusca di mais in ratti (Zhao et al. 2005). La biodisponibilità è sicuramente determinata dal rilascio del composto dalla matrice alimentare e quindi dalla sua bioaccessibilità. Nella crusca, la frazione di acido ferulico libero è stata misurata essere inferiore all'1 %. Tramite analisi mediante l'utilizzo di un modello del tratto gastrointestinale (TIM system), la frazione libera è risultata essere altamente bioaccessibile, mentre soltanto una minima porzione della frazione legata è stata apparentemente rilasciata. Complessivamente, la bioaccessibilità totale della crusca è stata trovata essere inferiore all'1 % (Mateo Anson et al. 2009b). Inoltre, la bioaccessibilità dell'acido ferulico in forma libera aggiunto ad una farina si è rivelata elevata (circa 60 %) (Mateo Anson e al. 2009b).

Diversi trattamenti tecnologici, quali macinazione, fermentazione, processi termici, possono influenzare positivamente la bioaccessibilità. Solitamente i meccanismi coinvolti sono la degradazione/rottura delle pareti cellulari o la dissociazione di complessi nutriente-matrice (Parada & Aguilera 2007). E' da notare che alcuni processi tecnologici possono causare un decremento del contenuto di nutrienti, ma allo stesso tempo rendere questi ultimi maggiormente accessibili, determinando in questo modo un maggiore contenuto di nutriente effettivamente disponibile per l'assorbimento (un esempio è rappresentato in Figura 7) (Parada & Aguilera 2007).

**Figura 7.** Esempio di un alimento in cui il contenuto totale di un nutriente diminuisce con il tempo, mentre il contenuto bioaccessibile aumenta a causa della soppressione degli effetti della matrice alimentare (fonte: Parada & Aguilera 2007, con modifiche).



Negli ultimi anni, si stanno studiando e mettendo a punto diversi processi innovativi, al fine di ottenere prodotti o ingredienti con una aumentata bioaccessibilità dei nutrienti in essi contenuti.

Considerando i cereali, la frazione che riscuote maggiore interesse è la frazione cruscale, grazie al suo contenuto in micronutrienti e sostanze fenoliche e antiossidanti. Una delle peculiarità di questa frazione è il suo elevato contenuto in fibra, che, da un lato apporta sostanze nutrizionalmente interessanti, dall'altro lato ostacola la bioaccessibilità e, di conseguenza, la biodisponibilità, dei composti in essa contenuti.

La letteratura riporta diverse tecnologie che possono essere applicate al fine di modificare la struttura della matrice del cereale e facilitare l'accessibilità dei composti, in particolare dei composti fenolici. Le tecniche si possono dividere in due categorie:

- processi di frazionamento umido (wet-fractionation processes), quali trattamenti enzimatici e fermentazione;
- processi di frazionamento secco (dry-fractionation processes), quali macinazione ultrafine, classificazione ad aria, separazione elettrostatica (Hemery et al. 2010).

Per ottenere delle frazioni con particolari caratteristiche nutrizionali, quali ad esempio un elevato contenuto di composti fenolici, è possibile utilizzare dei processi di frazionamento. Un esempio di questa tecnica è la separazione elettrostatica, che permette di separare i differenti strati che compongono la crusca, in modo da ottenere delle frazioni cruscali con caratteristiche diverse e

peculiari (Hemery et al. 2009). Particolare attenzione ha ricevuto negli ultimi anni la separazione dello strato aleuronico, in quanto è lo strato della cariosside dei cereali in cui sono concentrati numerosi micronutrienti e sostanze antiossidanti. Per questo motivo, attraverso le tecnologie di molitura si stanno compiendo sforzi nella direzione di separare questa frazione dalle altre frazioni cruscali e dall'endosperma.

Con la macinazione ultra-fine si ottengono acidi fenolici più accessibili agli enzimi, digestivi o che agiscono durante la fermentazione nel caso della panificazione, tramite un aumento della superficie delle particelle delle pareti cellulari e/o tramite la rottura delle cellule dell'aleurone con conseguente rilascio del contenuto intracellulare (Hemery et al. 2010). Uno studio condotto su dei pani arricchiti in fibra ha infatti evidenziato una aumentata bioaccessibilità di acidi fenolici e minerali sia in seguito a riduzione delle dimensioni delle particelle di crusca, sia aumentando la concentrazione della frazione aleuronica micronizzata (Hemery et al. 2010). Alcuni studi hanno inoltre valutato l'effetto della micronizzazione sul contenuto fenolico della frazione stessa, evidenziando risultati discordanti. Zhou et al. (2004a), infatti, hanno notato un aumento del contenuto in acidi fenolici della frazione di aleurone micronizzato rispetto all'aleurone non micronizzato, mentre Rosa et al. (2013) non hanno riscontrato differenze significative nel contenuto fenolico. In entrambi gli studi le frazioni micronizzate hanno però mostrato una maggiore capacità antiossidante, dovuta probabilmente al metodo di analisi utilizzato. Infatti, Zhou et al. (2004a) hanno misurato soltanto i composti antiossidanti liberi, mentre Rosa et al. (2013) hanno misurato la capacità antiossidante tramite un metodo diretto (Serpen et al. 2008), in cui la riduzione delle dimensioni delle particelle permette una maggiore esposizione dei composti fenolici nelle pareti cellulari.

Un'ulteriore tecnica che ha mostrato risultati positivi nell'incrementare la bioaccessibilità dei composti legati alle pareti cellulari è stata il trattamento con enzimi idrolitici. Mateo Anson et al. (2009a) hanno applicato un trattamento enzimatico durante la fermentazione di alcuni tipi di pani. Gli autori hanno utilizzato una combinazione di enzimi, contenente xilanasi,  $\beta$ -glucanasi,  $\alpha$ -amilasi, cellulasi, per idrolizzare la matrice polisaccaridica ed in particolare la parete cellulare, e ferulico esterasi, specifico per idrolizzare il legame tra acido ferulico e i polisaccaridi di parete. La combinazione di fermentazione e trattamento enzimatico ha prodotto un aumento della bioaccessibilità, analizzata tramite l'utilizzo di un modello dinamico computerizzato del tratto intestinale (TIM system), negli acidi fenolici analizzati, con un incremento pari a 5 volte per l'acido ferulico e 2 volte per gli acidi *p*-cumarico e sinapico, rispetto ai pani contenenti crusca non trattata enzimaticamente (Mateo Anson et al. 2009a).

**LETTERATURA CITATA**

- Abdel Aal E.-S.M., Abou-Arab A.A., Gamel T.H., Hucl P., Young J.C., Rabalski I. (2008). Fractionation of blue wheat anthocyanin compounds and their contribution to antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11171-11177.
- Abdel Aal E.-S.M., Hucl P. (2003). Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2174-2180.
- Abdel Aal E.-S.M., Young J.C., Rabalski I. (2006). Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4696-4704.
- Adam A., Crespy V., Levrat-Verny M.-A., Leenhardt F., Leuillet M., Demigné C., Rémésy C. (2002). The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *Journal of Nutrition* 132: 1962-1968.
- Adom K.K., Liu R.H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6182-6187.
- Amrein T.M., Gränicher P., Arrigoni E., Amadò R. (2003). In vitro digestibility and colonic fermentability of aleurone isolated from wheat bran. *LWT* 36: 451-460.
- Anderson J.W., Hanna T.J., Peng X., Kryscio R.J. (2000). Whole grain foods and heart disease risk. *Journal of the American College of Nutrition* 19: 291S-299S.
- Andersson A.A.M., Åman P., Wandel M., Frølich W. (2010). Alkylresorcinols in wheat and rye flour and bread. *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 794-801.
- Antoine C., Peyron S., Mabilhe F., Lapierre C., Buochet B., Abecassis J., Rouau X. (2003). Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2016-2033.
- Awika J.M., Dykes L., Gu L., Rooney L.W., Prior R.L. (2003). Processing of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products alters procyanidin oligomer and polymer distribution and content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5516-5521.
- Awika J.M., Rooney L.W. (2004). Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry* 65: 1199-1221.
- Awika J.M., Rooney L.W., Waniska R.D. (2004a). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 90: 293-301.
- Awika J.M., Rooney L.W., Waniska R.D. (2004b). Properties of 3-deoxyanthocyanins from sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4388-4394.

- Barros F., Awika J.M., Rooney L.W. (2012). Interaction of tannins and other sorghum phenolic compounds with starch and effects on in vitro starch digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 11609-11617.
- Batifoulie F., Verny M.-A., Chanliaud E., Rémésy C., Demigné C. (2006). Variability of B vitamin concentrations in wheat grain, milling fractions and bread products. *European Journal of Agronomy* 25: 163-169.
- Bechtel D.B., Pomeranz Y. (1977). Ultrastructure of the mature ungerminated rice (*Oryza sativa*) caryopsis. The caryopsis coat and the aleurone cells. *American Journal of Botany* 64: 966-973.
- Bechtel D.B., Pomeranz Y. (1978a). Ultrastructure of the mature ungerminated rice (*Oryza sativa*) caryopsis. The germ. *American Journal of Botany* 65: 75-85.
- Bechtel D.B., Pomeranz Y. (1978b). Ultrastructure of the mature ungerminated rice (*Oryza sativa*) caryopsis. The starchy endosperm. *American Journal of Botany* 65: 684-691.
- Belefant-Miller H., Grace S.C. (2010). Variations in bran carotenoid level within and between rice subgroups. *Plant Foods for Human Nutrition* 65: 358-363.
- Bellido G., Beta T. (2009). Anthocyanin composition and Oxygen Radical Scavenging Capacity (ORAC) of milled and pearled purple, black, and common barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:1022-1028.
- Briffaz A., Mestres C., Escoute J., Lartaud M., Dornier M. (2012). Starch gelatinization distribution and peripheral cell disruption in cooking rice grains monitored by microscopy. *Journal of Cereal Science* 56: 699-705.
- Brinch-Pederson H., Borg S., Tauris B., Holm P.B. (2007). Molecular genetic approaches to increasing mineral availability and vitamin content of cereals. *Journal of Cereal Science* 46: 308-326.
- Brouns F., Hemery Y., Price R., Mateo Anson N. (2012). Wheat aleurone: separation, composition, health aspects, and potential food use. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52: 553-568.
- Bryngelsson S., Dimberg L.H., Kamal-Eldin A. (2002). Effects of commercial processing on levels of antioxidants in oats (*Avena sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1890-1896.
- Bunzel M., Ralph J., Marita J.M., Hatfield R.D., Steinhart H. (2001). Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 653-660.

- Chan J.M., Wang F., Holly E.A. (2007). Whole grains and risk of pancreatic cancer in a large population-based case-control study in the San Francisco Bay Area, California. *American Journal of Epidemiology* 166: 1174–1185.
- Chandrasekara A., Naczek M., Shahidi F. (2012). Effect of processing on the antioxidant activity of millet grains. *Food Chemistry* 133: 1-9.
- Charalampopoulos D., Wang R., Pandiella S.S., Webb C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 79: 131-141.
- Chen X.Q., Nagao N., Itani T., Irifune K. (2012). Anti-oxidative analysis, and identification and quantification of anthocyanin pigments in different coloured rice. *Food Chemistry* 135: 2783-2788.
- Cho J.-Y., Lee H.J., Kin G.A., Kim G.D., Lee Y.S., Shin S.C., Park K.-H., Moon J.-H. (2012). Quantitative analyses of individual  $\gamma$ -oryzanol (steryl ferulates) in conventional and organic brown rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science* 55: 337-343.
- Cho S.S., Qi L., Fahey G.C.Jr., Klurfeld D.M. (2013). Consumption of cereal fiber, mixtures of whole grains and bran, and whole grains and risk reduction in type 2 diabetes, obesity, and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 98: 594-619.
- D'Ambrosio M. (2013). Performances of CN-columns for the analysis of  $\gamma$ -oryzanol and its *p*-coumarate and caffeate derivatives by normal phase HPLC and a validated method of quantification. *Food Chemistry* 138: 2079-2088.
- D'Egidio M.G. (2004). Cereali. In *Chimica degli alimenti*. Cabras P., Martelli A. Piccin Nuova Libreria s.p.a. Padova (Italia).
- de Munter J.S., Hu F.B., Spiegelman D., Franz M., van Dam R.M. (2007). Whole grain, bran, and germ intake and risk of diabetes: a prospective cohort study and systematic review. *PLoS Med* 4: e261.
- Dewanto V., Wu X., Liu R.H. (2002). Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4959-4964.
- Dlamini N.R., Taylor J.R.N., Rooney L.W. (2007). The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of African sorghum-based foods. *Food Chemistry* 105: 1412-1419.
- Dobberstein D., Bunzel M. (2010). Separation and detection of cell wall-bound ferulic acid dehydrodimers and dehydrotrimers in cereals and other plant materials by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 8927-8935.

- Dykes L., Rooney L.W. (2006). Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of Cereal Science* 44: 235-251.
- Dykes L., Rooney L.W., Waniska R.D., Rooney W.L. (2005). Phenolic compounds and antioxidant activity of sorghum grains of varying genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6813-6818.
- Emmambux N.M., Taylor J.R.N. (2003). Sorghum kafirin interaction with various phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 402-407.
- Evers T., Millar S. (2002). Cereal grain structure and development: some implications for quality. *Journal of Cereal Science* 36: 261-284.
- FAO, WFP and IFAD (2012). The state of food insecurity in the world 2012. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition. Roma, FAO ([www.fao.org/docrep/016/i3027e/i3027e.pdf](http://www.fao.org/docrep/016/i3027e/i3027e.pdf)).
- Fardet A., Rock E., Rémésy C. (2008). Is the *in vitro* antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected *in vivo*? *Journal of Cereal Science* 48: 258-276.
- Fardet A. (2010). New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fiber? *Nutrition Research Reviews* 23: 65-134.
- Finocchiaro F., Ferrari B., Gianinetti A. (2010). A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. *Journal of Cereal Science* 51: 28-34.
- Finocchiaro F., Ferrari B., Gianinetti A., Dall'Asta C., Galaverna G., Scazzina F., Pellegrini N. (2007). Characterization of antioxidant compounds of red and white rice and changes in total antioxidant capacity during processing. *Molecular Nutrition & Food Research* 51: 1006-1019.
- Flint A., Hu F.B., Glynn R.J., Jensen M.K., Franz M., Sampson L., Rimm E.B. (2009). Whole grains and incident hypertension in men. *American Journal of Clinical Nutrition* 90: 493-498.
- Frank T., Reichardt B., Shu Q., Engel K.-H. (2012). Metabolite profiling of colored rice (*Oryza sativa* L.) grains. *Journal of Cereal Science* 55: 112-119.
- Fuster V., Kelly B.B. editors, Institute of Medicine (US) Committee on Preventing the Global Epidemic of Cardiovascular Disease: Meeting the challenges in developing countries (2010). Promoting cardiovascular health in the developing world. A critical challenge to achieve global health. National Academic Press (US), Washington (DC) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45688/>).

- Gu L., Kelm M.A., Hammerstone JF., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Gebhardt S., Prior R.L. (2004). Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *Journal of Nutrition* 134: 613-617.
- Gunaratne A., Wu K., Li D., Bentota A., Corke H., Cai Y.-Z. (2013). Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. *Food Chemistry* 138: 1153-1161.
- Haard N.F. (1999). Cereals: rationale for fermentation. In *Fermented cereals. A global perspective*. Haard N.F., Odunfa S.A., Lee C.-H., Quinetero-Ramírez R., Lorence-Quiñones A., Wachter-Radarte C. FAO Agricultural Services Bulletin 138 (<http://www.fao.org/docrep/x2184e/x2184e00.htm#con>).
- Harris K.A., Kris-Etherton M. (2010). Effects of whole grains on coronary heart disease risk. *Current Atherosclerosis Reports* 12: 368-376.
- Hedge P.S., Chandra T.S. (2005). ESR spectroscopic study reveals higher free radical quenching potential in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) compared to other millets. *Food Chemistry* 92: 177-182.
- Hemery Y., Rouau X., Dragan C., Bilici M., Belega R., Dascalescu L. (2009). Electrostatic properties of wheat bran and its constitutive layers: Influence of particle size, composition, and moisture content. *Journal of Food Engineering* 93: 114-124.
- Hemery Y.M., Mateo Anson N., Havenaar R., Haenen G.R.M.M., Noort M.W.J., Rouau X. (2010). Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions. *Food Research International* 43: 1429-1438.
- Hernanz D., Nuñez V., Sancho A.I., Faulds C.B., Williamson G., Bartolomé B., Gómez-Cordovés C. (2001). Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4884-4888.
- Hidalgo A., Brandolini A. (2008). Protein, ash, lutein and tocopherols distribution in einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) seed fractions. *Food Chemistry* 107: 444-448.
- Hiemori M., Koh E., Mitchell A.E. (2009). Influence of cooking on anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L. *japonica* var. SBR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1908-1914.
- Hou Z., Qin P., Zhang Y., Ciu S., Ren G. (2013). Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. *Food Research International* 50: 691-697.

- Jääskeläinen A.-S., Holopainen-Mantila U., Tamminen T., Vuorinen T. (2013). Endosperm and aleurone cell structure in barley and wheat as studied by optical and Raman microscopy. *Journal of Cereal Science* 57: 543-550.
- Jacobs D.R., Marquart L., Slavin J.L., Kushi L.H. (1998a) Wholegrain intake and cancer: an expanded review and meta-analysis. *Nutrition and Cancer* 30: 85–96.
- Jacobs D.R., Meyer K.A., Kushi L.H., Folsom A.R. (1998b). Wholegrain intake may reduce the risk of ischemic heart disease death in postmenopausal women: The Iowa Women's Health Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 68: 248–257.
- Jeng T.L., Shih Y.J., Lai C.C., Lin Y.W., Wang C.S., Sung J.M. (2012).  $\gamma$ -oryzanol, tocol and mineral compositions in different grain fractions of giant embryo rice mutants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 1468-1474.
- Jensen M.K., Koh-Banerjee P., Hu F.B., Franz M., Sampson L., Grønbæk M., Rimm E.B. (2004). Intakes of whole grains, bran, and germ and the risk of coronary heart disease in men. *American Journal of Clinical Nutrition* 80: 1492-1499.
- Jensen M.K., Koh-Banerjee P., Franz M., Sampson L., Grønbæk M., Rimm E.B. (2006). Whole grains, bran, and germ in relation to homocysteine and markers of glycemic control, lipids, and inflammation. *American Journal of Clinical Nutrition* 83: 275-283.
- Kariluoto S., Edelmann M., Piironen V. (2010). Effects of environment and genotype on folate contents in wheat in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 9324-9331.
- Kasai M., Lewis A., Marica F., Ayabe S., Hatae K., Fyfe C.A. (2005). NMR imaging investigation of rice cooking. *Food Research International* 38: 403-410.
- Keenan J.M., Pins J.J., Frazel C., Moran A., Turnquist L. (2002). Oat ingestion reduces systolic and diastolic blood pressure in patients with mild or borderline hypertension: A pilot trial. *Journal of Family Practice* 51: 369.
- Kern S.M., Bennett R.N., Mellon F.A., Kroon P.A., Garcia-Conesa M.-T. (2003). Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6050-6055.
- Kestin M., Moss R., Clifton P.M., Nestel P.J. (1990). Comparative effects of three cereal brans on plasma lipids, blood pressure, and glucose metabolism in mildly hypercholesterolemic men. *American Journal of Clinical Nutrition* 52: 661-666.

- Kim J.K., Lee S.Y., Chu S.M., Lim S.H., Suh S.-C., Lee Y.-T., Cho H.S., Ha S.-H. (2010). Variation and correlation analysis of flavonoids and carotenoids in Korean pigmented rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 12804-12809.
- Kim M.-J., Hyun J.-N., Kim J.A., Park J.-C., Kim M.-Y., Kim J.-G., Lee S.-J., Chun S.-C., Chung I.-M. (2007). Relationship between phenolic compounds, anthocyanins content and antioxidant activity in colored barley germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4802-4809.
- Klepacka J., Fornal Ł. (2006). Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46: 639-647.
- Kobue-Lekalele R., Taylor J.R.N., de Kock H.L. (2007). Effects of phenolics in sorghum grain on its bitterness, astringency and other sensory properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 1940-1948.
- Kurilich A.C., Juvik J.A. (1999). Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1948-1955.
- Landberg R., Kamal-Eldin A., Salmenkallio-Marttila M., Rouau X., Åman P. (2008). Localization of alkylresorcinols in wheat, rye and barley kernels. *Journal of Cereal Science* 48: 401-406.
- Laokuldilok T., Shoemaker C.F., Jongkaewwattana S., Tulyathan V. (2011). Antioxidants and antioxidant activity of several pigmented rice brans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 193-199.
- Larsson S.C., Giovannucci E., Bergkvist L., Wolk A. (2005). Whole grain consumption and risk of colorectal cancer: A population-based cohort of 60 000 women. *British Journal of Cancer* 92: 1803–1807.
- Lewis C.E., Walker J.R.L., Lancaster J.E. (1995). Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins. *Food Chemistry* 54: 315-319.
- Li L., Shewry P.R., Ward J.L. (2008). Phenolic acids in wheat varieties in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9732-9739.
- Li W., Pickard M.D., Beta T. (2007). Effect of thermal processing on antioxidant properties of purple wheat bran. *Food Chemistry* 104: 1080-1086.
- Lillioja S., Neal A.L., Tapsell L., Jacobs D.R.Jr. (2013). Whole grains, type 2 diabetes, coronary heart disease, and hypertension: Links to the aleurone preferred over indigestible fiber. *BioFactors* 39: 242-258.
- Liu R.H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science* 46: 207-219.

- Liu S., Manson J.E., Stampfer M.J., Hu F.B., Giovannucci E., Colditz G.A., Hennekens C.H., Willett W.C. (2000). A prospective study of whole-grain intake and risk of type 2 diabetes mellitus in US women. *American Journal of Public Health* 90: 1409–1415.
- Liu S.M., Stampfer M.J., Hu F.B., Giovannucci E., Rimm E., Manson J.E., Hennekens C.H., Willett W.C. (1999). Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurse's Health Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 70: 412–429.
- Lutsey P.L., Jacobs D.R. Jr, Kori S., Mayer-Davis E., Shea S., Steffen L.M., Szklo M., Tracy R. (2007). Whole grain intake and its cross-sectional association with obesity, insulin resistance, inflammation, diabetes and subclinical CVD: The MESA study. *British Journal of Nutrition* 98: 397-405.
- Massaretto I.L., Madureira Alves M.F., Mussi de Mira N.V., Karaoglanovic Carmona A., Lanfer Marquez U.M. (2011). Phenolic compounds in raw and cooked rice (*Oryza sativa* L.) and their inhibitory effect on the activity of angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Cereal Science* 54: 236-240.
- Mateo Anson N, Selinheimo E., Havenaar R., Aura A.-M., Mattila I., Lehtinen P., Bast A., Poutanen K., Haenen G.R.M.M. (2009a). Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 6148-6155.
- Mateo Anson N., van den Berg R., Havenaar R., Bast A., Haenen G.R.M.M. (2009b). Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *Journal of Cereal Science* 49: 296-300.
- Mazzaracchio P., Tozzi S., Boga C., Forlani L., Pifferi P.G, Barbiroli G. (2001). Interaction between gliadins and anthocyan derivatives. *Food Chemistry* 129: 1100-1107.
- Mazzolini A.P., Pallaghy C.K., Legge G.J.F. (1985). Quantitative microanalysis of Mn, Zn and other elements in mature wheat seed. *New Phytologist* 100: 483-509.
- McKeown N.M., Meigs J.B., Liu S., Wilson P.W.F., Jaques P.F. (2002). Whole-grain intake is favorably associated with metabolic risk factors for type 2 diabetes and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 76: 390-398.
- McKevith B. (2004). Nutritional aspects of cereals. *Nutritional Bulletin* 29: 111-142.
- Min B., Gu L., McClung A.M., Begman C.J., Chen M.-H. (2012). Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bra colours. *Food Chemistry* 133: 715-722.

- N'Dri D., Mazzeo T., Zauza M., Ferracane R., Fogliano V., Pellegrini N. (2013). Effect of cooking on the total antioxidant capacity and phenolic profile of some whole-meal African cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 29-36.
- Nagah A.M., Seal C.J. (2005). *In vitro* procedure to predict apparent antioxidant release from wholegrain foods measured using three analytical methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 1177-1185.
- Nair S., Knoblauch M., Ullrich S., Baik B.-K. (2011). Microstructure of hard and soft kernels of barley. *Journal of Cereal Science* 54: 354-362.
- Newby P.K., Maras J., Bakun P., Muller D., Ferrucci L., Tucker K.L. (2007). Intake of whole grains, refined grains, and cereal fiber measured with 7-d diet records and associations with risk factors for chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 86: 1745-1753.
- Noort M.W.J., van Haaster D., Hemery Y., Schols H.A., Hamer R.J. (2010). The effect of particle size of wheat bran fractions on bread quality – Evidence for fibre-protein interactions. *Journal of Cereal Science* 52: 59-64.
- Norton R.A. (1994). Isolation and identification of steryl cinnamic derivatives from corn bran. *Cereal Chemistry* 71: 111-117.
- Ogawa Y., Glenn G.M., Orts W.J., Wood D.F. (2003). Histological structures of cooked rice grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7019-7023.
- Okarter N., Liu R.H. (2010). Health benefits of whole grain phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50: 193-208.
- Oki T., Masuda M., Kobayashi M., Nishiba Y., Furuta S., Suda I., Sato T. (2002). Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7524-7529.
- Panfili G., Fratianni A., Irano M. (2003). Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3940-3944.
- Panfili G., Fratianni A., Irano M. (2004). Improved Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 6373-6377.
- Parada J., Aguilera J.M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science* 72: R21-R32.

- Pascual C.S.C.I., Massaretto I.L., Kawassaki F., Cerdeira Barros R.M., Noldin J.A., Lanfer Marquez U.M. (2013). Effects of parboiling, storage and cooking on the levels of tocopherols, tocotrienols and  $\gamma$ -oryzanol in brown rice (*Oryza sativa* L.). *Food Research International* 50: 676-681.
- Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F. (2005). Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5036-5040.
- Pietinen P., Malila N., Virtanen M., Hartman T.J., Tangrea J.A., Albanes D., Virtamo J. (1999). Diet and risk of colorectal cancer in a cohort of Finnish men. *Cancer Causes Control* 10: 387–396.
- Piironen V., Eldemann M., Kariluoto S., Bedo Z. (2008). Folate in wheat genotypes in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9726-9731.
- Pins J.J., Geleva D., Leemam K., Frazer C, O'Connor P.J., Cherney L.M. (2002). Do whole-grain oat cereals reduce the need for antihypertensive medications and improve blood pressure control? *Journal of Family Practice* 51: 353-359.
- Piot O., Autran J.-C., Manfait M. (2001). Investigation by Confocal Raman Microspectroscopy of the molecular factors responsible for grain cohesion in the *Triticum aestivum* bread wheat. Role of the cell walls in the starchy endosperm. *Journal of Cereal Science* 34: 191-205.
- Rewthong O., Sopontonnarit S., Taechapairoj C., Tungtrakul P., Prachayawarakorn S. (2011). Effects of cooking, drying and pretreatment methods on texture and starch digestibility of instant rice. *Journal of Food Engineering* 103: 258-264.
- Rohan T.E., Hiller J.E., McMichael A.J. (1993). Dietary factors and survival from breast cancer. *Nutrition and Cancer* 20: 167–177.
- Rosa N.N., Barron C., Gaiani C., Dufour C., Micard V. (2013). Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. *Journal of Cereal Science* 57: 84-90.
- Ross A.B., Shepherd M.J., Schüpphaus M., Sinclair V., Alfaro B., Kamal-Eldin A., Åman P. (2003). Alkylrescinols in cereals and cereal products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4111-4118.
- Salmeron J., Ascherio A., Rimm E.B., Colditz G.A., Spiegelman D., Jenkins D.J., Stampfer M.J., Wing A.L., Willett W.C. (1997). Dietary fiber, glycemic load and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care* 20:545–550.
- Saulnier L., Sado P.-E., Branlard G., Charmet G., Guillon F. (2007). Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *Journal of Cereal Science* 46: 261-281.

- Schatzkin A., Mouw T., Park Y., Subar A.F., Kipnis V., Hollenbeck A., Leitzmann M.F., Thompson F.E. (2007). Dietary fiber and whole-grain consumption in relation to colorectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 85: 1353-1360.
- Schoen R.E., Tangen C.M., Kuller L.H., Burke G.L., Cushman M., Tracy R.P., Dobs A., Savage P.J.(1999). Increased blood glucose and insulin, body size and incident colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 91: 1147-1154.
- Serpen A., Gökmen V., Pellegrini N., Fogliano V. (2008). Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereals products. *Journal of Cereal Science* 48: 816-820.
- Sette S., Le Donne C., Piccinelli R., Mistura L., Ferrari M., Leclercq C. (2013). The third National Food Consumption Survey, INRAN-SCAI 2005–06: major dietary sources of nutrients in Italy. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 64: 1014-1021.
- Shewry P.R. (2007). Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science* 46: 239-250.
- Shewry P.R., Van Schaik F., Ravel C., Charmet G., Rakszegi M., Bedo Z., Ward J.L. (2011). Genotype and environment effects on the contents of vitamins B1, B2, B3, and B6 in wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 10564-10571.
- Shimizu C., Kihara M., Aoe S., Araki S., Ito K., Hayashi K., Watari J., Sakata Y., Ikegami S. (2008). Effect of high  $\beta$ -glucan barley on serum cholesterol concentrations and visceral fat area in Japanese men. A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Plant Foods for Human Nutrition* 63: 21-25.
- Shobana S., Malleshi N.G. (2007). Preparation and functional properties of decorticated finger millet (*Eleusine coracana*). *Journal of Food Engineering* 79: 529-538.
- Shoen R.E., Tangen C.M., Kuller L.H., Burke G.L., Cushman M., Tracy R.P., Dobs A., Savage P.J. (1999). Increased blood glucose and insulin, body size and incident colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 91: 1147-1154.
- Skrabanja V., Lærke H.N., Kreft I. (2000). Protein-polyphenol interactions and *in vivo* digestibility of buckwheat groat proteins. *European Journal of Physiology* 440: R129-R131.
- Slavin J. (2000). Mechanisms for the impact of whole grain foods on cancer risk. *Journal of the American College of Nutrition* 19: 330S-307S.
- Slavin J. (2004). Whole grains and human health. *Nutrition Research Reviews* 17: 99-110.

- Sompong R., Siebenhandl-Ehn S., Linsberger-Martin G., Berghofer E. (2011). Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chemistry* 124: 132-140.
- Srikaeo K., Furst J.E., Ashton J.F., Hosken R.W. (2006). Microstructural changes of starch in cooked wheat grains as affected by cooking temperatures and times. *LWT* 39: 528-533.
- Stapley A.G.F., Hyde T.M., Gladden L.F., Fryer P.J. (1997). NMR imaging of the wheat grain cooking process. *International Journal of Food Science and Technology* 32: 355-375.
- Subba Rao M.V.S.S.T., Muralikrishna G. (2002). Evaluation of the antioxidant properties of free and bound phenolic acids from native and malted finger millet (Ragi, *Eleusine coracana* Indaf-15). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 889-892.
- Svihus B., Uhlen A.K., Harstad O.M. (2005). Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Animal Feed science and Technology* 122: 303-320.
- Swain J.F., Rouse I.L., Curley C.B., Sacks F.M. (1990). Comparison of the effect of oat bran and low-fiber wheat on serum lipoprotein levels and blood pressure. *New England Journal of Medicine* 322: 147-152.
- Tamura M., Ogawa Y. (2012). Visualization of the coated layer at the surface of rice grain cooked with varying amounts of cooking water. *Journal of Cereal Science* 56: 404-409.
- Tamura M., Nagai T., Hidaka Y., Noda T., Yokoe M., Ogawa Y. (2013 in press). Changes in histological tissue structure and textural characteristics of rice grain during cooking process. *Food Structure*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foostr.2013.10.003>.
- Tiwari U., Cummins E. (2009). Nutritional importance and effect of processing on tocopherols in cereals. *Trends in Food Science & Technology* 20: 511-520.
- Towo E.E., Svanberg U., Ndossi G.D. (2003). Effect of grain pre-treatment on different extractable phenolic groups in cereals and legumes commonly consumed in Tanzania. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 980-986.
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (2006). Whole grain label statements. Guidance for industry and FDA staff. (<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/06d-0066-gdl0001.pdf>).
- Veraverbeke W.S., Delcour J.A. (2002). Wheat protein composition and properties of wheat gluten in relation to breadmaking functionality. *Critical reviews in Food Science and Nutrition* 42: 179-208.

- Vitaglione P., Napolitano A., Fogliano V. (2008). Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science & Technology* 19: 451-463.
- Walter M., Marchesan E., Sachet Massoni P.F., Picolli da Silva L., Meneghetti Sarzi Sartori G., Bruck Ferreira R. (2013). Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing. *Food Research International* 50: 698-703.
- Wang L., Gaziano J.M., Liu S., Manson J.A.E., Buring J.E., Sesso H.D. (2007). Whole- and refined-grain intakes and the risk of hypertension in women. *American Journal of Clinical Nutrition* 86: 472-479.
- Witek M., Węglarz W.P., de Jong L., van Dalen G., Blonk J.C.G., Heussen P., Van Velzen E., Van As H., van Duynhoven J. (2010). The structural and hydration properties of heat-treated rice studied at multiple length scales. *Food Chemistry* 120: 1031-1040.
- Wu Y., Chen Z., Li X., Li M. (2009). Effect of tea polyphenols on the retrogradation of rice starch. *Food Research International* 42: 221-225.
- Yadav B.K., Jindal V.K. (2007). Water uptake and solid loss during cooking of milled rice (*Oryza sativa* L.) in relation to its physicochemical properties. *Journal of Food Engineering* 80: 46-54.
- Ye E.Q., Chacko S.A., Chou E.L., Kugizaki M., Liu S. (2012). Greater whole-grain intake is associated with lower risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and weight gain. *Journal of Nutrition* 142: 1304-1313.
- Yoshimura Y., Zaima N., Moriyama T., Kawamura Y. (2012). Different localization patterns of anthocyanin species in the pericarp of black rice revealed by Imaging Mass Spectrometry. *PLoS ONE* 7 (2): e31285. doi:10.1371/journal.pone.0031285.
- Zhang M.W., Zhang R.F., Zhang F.X., Liu R.H. (2010). Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 7580-7587.
- Zhao Z., Egashira Y., Sanada H. (2005). Phenolic antioxidants richly contained in corn bran are slightly bioavailable in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5030-5035.
- Zhao Z., Moghadasian M.H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry* 109: 691-702.
- Zhou K., Laux J.J., Yu L. (2004a). Comparison of Swiss red wheat grain and fractions for their antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1118-1123.
- Zhou Z., Robards K., Helliwell S., Blanchard C. (2004b). The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chemistry* 87: 401-406.

Zhu F., Cai Y.Z., Sun M., Corke H. (2008). Effect of phenolic compounds on the pasting and textural properties of wheat starch. *Starch/Staerke* 60: 609-616.

Zieliński H., Kozłowska H., Lewczuk B. (2001). Bioactive compounds in the cereal grains before and after hydrothermal processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2: 159-169.

Žilić S., Hadži-Tašković Šukalović V., Dodig D., Maksimović V., Maksimović M. Basić Z. (2011). Antioxidant activity of small grain cereals caused by phenolics and lipid soluble antioxidants. *Journal of Cereal Science* 54: 417-424.

Žilić S., Serpen A., Akıllıoğlu G., Gökmen V., Vančetović J. (2012). Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 1224-1231.

## SITI INTERNET VISITATI

AACC, American Association of Cereal Chemists,  
<http://www.aaccnet.org/initiatives/definitions/Pages/WholeGrain.aspx>, accesso in data 29/08/2013.

FAO, Food and Agriculture Organization, dati aggiornati all' 11/07/2013,  
[www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/](http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/), accesso in data 29/08/2013.

FAOSTAT Food and Agriculture Organization, [faostat.fao.org/site/339/default.aspx](http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx), accesso in data 29/08/2013.

FDA, Food and Drug Administration,  
<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/LabelingNutrition/ucm073639.htm>,  
accesso in data 29/08/2013.

USDA Foreign Agricultural Service, dati riferiti all'anno 2012/13, [www.fas.usda.gov/grain/Current](http://www.fas.usda.gov/grain/Current),  
accesso in data 29/08/2013.

WGC, Whole Grains Council (2004). <http://wholegrainscouncil.org/whole-grains-101/definition-of-whole-grains>,  
accesso in data 11/01/2014.

WHO, World Health Organization, [www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cardiovascular-diseases/cardiovascular-diseases2/definition-of-cardiovascular-diseases](http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cardiovascular-diseases/cardiovascular-diseases2/definition-of-cardiovascular-diseases),  
accesso in data 17/11/2013.

WHO, World Health Organization, [http://www.who.int/diabetes/action\\_online/basics/en/](http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/),  
accesso in data 11/01/2014.

WHO, World Health Organization, [http://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/en/](http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/), accesso in data 11/01/2014.

WHO. World health statistics 2009. Geneva: World Health Organization.

[http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/EN\\_WHS09\\_Full.pdf](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS09_Full.pdf)

WHO, World Health Organization (2005). Preventing chronic diseases: A vital investment.

[http://www.who.int/chp/chronic\\_disease\\_report/full\\_report.pdf](http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/full_report.pdf).

## *Scopo della tesi*

L'evidenza epidemiologica suggerisce che il consumo di cereali integrali sia associato ad un ridotto rischio di malattie cronico-degenerative. Questo effetto protettivo è probabilmente da attribuire al loro contenuto in fibra alimentare, micronutrienti e composti bioattivi con potenziale effetto antiossidante, tra cui vitamina E, minerali, polifenoli, carotenoidi, alchilresorcinoli e orizanoli. Questi composti sono localizzati principalmente negli strati esterni della cariosside che compongono la crusca, in particolare nello strato aleuronico, e nel germe. Inoltre, è stato notato che le varietà di cereali pigmentate presentano un maggior contenuto di composti a potenziale antiossidante rispetto alle varietà non pigmentate. Per questo motivo, negli ultimi anni si sta puntando alla messa a punto di tecniche molitorie che consentano una migliore separazione delle diverse frazioni dei cereali e che, in particolare, consentano una separazione e purificazione di determinati strati della crusca, con particolare attenzione allo strato aleuronico.

Nel valutare l'effettiva qualità nutrizionale di un alimento risulta importante considerare non soltanto il contenuto in composti bioattivi, ma anche la bioaccessibilità dei composti stessi, che influenza la conseguente biodisponibilità, rappresentando l'effettivo potenziale benefico dell'alimento. La bioaccessibilità di un composto dipende in primo luogo dalla struttura della matrice dell'alimento e dalle eventuali interazioni del composto con altri componenti della matrice. Inoltre, i diversi trattamenti (meccanici, termici, enzimatici) che l'alimento subisce, oltre ad avere un effetto diretto sui composti bioattivi, possono modificare la struttura della matrice, influenzando in questo modo la bioaccessibilità dei composti.

Da queste considerazioni sono stati sviluppati due filoni di ricerca con al centro la qualità nutrizionale dei cereali che hanno caratterizzato questo progetto di dottorato.

Il primo tema ha riguardato la valutazione della bioaccessibilità, tramite un modello di digestione *in vitro*, di vitamine, composti fenolici e capacità antiossidante presenti in alcune frazioni innovative ottenute a partire dalla crusca del frumento duro. Queste frazioni sono ricche di strato aleuronico, uno strato che solitamente viene scartato con la crusca nell'industria molitoria, ma che è caratterizzato da un elevato contenuto in nutrienti (proteine, lipidi, vitamine, minerali) e composti fitochimici (composti fenolici). Queste frazioni sono state inoltre sottoposte ad un trattamento di ultra-micronizzazione, al fine di valutare se il trattamento meccanico di ultra-macinazione consentisse un incremento della bioaccessibilità dei composti.

Nel secondo filone di ricerca è stato studiato l'effetto di cotture domestiche sulla capacità antiossidante, la struttura anatomica, valutata mediante microscopia ottica, e il profilo fenolico di varietà di riso integrale diversamente pigmentate. L'ipotesi alla base di questo tema era che

cotture diverse potessero influenzare diversamente la struttura del cereale e che queste modifiche a loro volta potessero spiegare l'effetto della cottura stessa sulla capacità antiossidante e sul profilo fenolico.

# *Parte sperimentale*

## **Studio 1**

# **IN VITRO BIOACCESSIBILITY OF PHENOLICS AND VITAMINS FROM DURUM WHEAT ALEURONE FRACTIONS**

**Maria Zaupa**<sup>1\*</sup>, Francesca Scazzina<sup>1\*</sup>, Margherita Dall'Asta<sup>1</sup>, Luca Calani<sup>1</sup>, Daniele Del Rio<sup>1</sup>, Marta A. Bianchi<sup>2</sup>, Camilla Melegari<sup>2</sup>, Pietro De Albertis<sup>2</sup>, Giovanni Tribuzio<sup>2</sup>, Nicoletta Pellegrini<sup>1#</sup>, Furio Brighenti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Science, Human Nutrition Unit, University of Parma, Parco Area delle Scienze 59/A, IT-43124 Parma, Italy

<sup>2</sup> Barilla G. e R. F.lli, Via Mantova, 166, IT-43122 Parma, Italy

\* Equal contributors.

Accepted in Journal of Agricultural and Food Chemistry

**ABSTRACT**

Durum wheat aleurone, thanks to its nutrient-rich composition, might be of potential use as a functional ingredient in cereal-based foods provided nutrients can be made available for absorption. We evaluated the *in vitro* bioaccessibility of thiamine, niacin and phenolic acids in different aleurone fractions obtained with an industrial processing aimed to obtain material of different composition and particle size.

Results indicate that the main phenolic compounds and vitamins investigated have a higher bioaccessibility when present in the inner part of the aleurone layer compared to the outer part of aleurone or the unfractionated bran. Moreover, an ultra-micronization treatment employed to reduce particle size does not further improve the bioaccessibility of these compounds.

We conclude that aleurone fractions from durum wheat bran could represent a nutritionally relevant ingredient, bringing together a high fiber content and an excellent bioaccessibility of vitamins and phytochemicals generally associated to nutritional benefits.

**Keywords: wheat aleurone; bran; bioaccessibility; phenolic compounds; vitamins**

## INTRODUCTION

A growing body of evidence indicates that wholemeal cereals may contribute to the prevention of chronic diseases. In epidemiological studies, the consumption of wholemeal cereals has been associated with a reduced risk of cardiovascular disease,<sup>1</sup> type 2 diabetes,<sup>2</sup> and some types of cancer.<sup>3,4</sup> Although the mechanisms behind the protective effect linked to wholemeal cereals consumption remain to be fully demonstrated, a higher intake of dietary fiber, micronutrients and phytochemicals might be implicated.<sup>5</sup> Actually, wholemeal cereals are a source of several micronutrients and phytochemicals with potential biological activity. In wheat grain, most of these compounds are located within the germ and in the outermost part of the caryopsis, particularly in the aleurone layer.<sup>6</sup> Anatomically, the aleurone is a monolayer of cells of 20-75  $\mu\text{m}$  of diameter and represents the outer part of the starchy endosperm of wheat kernels. However, aleurone is considered a part of the bran because during milling it is removed from the endosperm together with the pericarp and other outer layers, and represents  $\approx 50\%$  of the bran fraction.<sup>7</sup> The aleurone cells are surrounded by thick non-lignified walls, which comprise more than 40% of the cell weight,<sup>7</sup> and are composed mainly of non-starch polysaccharides, i.e. dietary fiber, with the predominance of arabinoxylans and secondly  $\beta$ -glucans.<sup>8</sup>

Beside its dietary fiber content, nutrients and phytochemicals compounds in aleurone might have an important role in the protection from chronic diseases associated to the consumption of wholemeal cereal based products.<sup>9</sup> Indeed, wheat aleurone has been reported to contain, in addition to good-quality proteins, high amounts of minerals, vitamins, sterols, and phenolic compounds.<sup>8</sup> Among the latter, the most represented are phenolic acids, and in particular ferulic acid.<sup>10</sup> Ferulic acid has an important role in the structural properties of aleurone fiber, as it is in a great extent esterified to arabinoxylans of the cell walls, and in the form of diferulates provides cross-links between cell wall polysaccharides.<sup>11</sup> Aleurone layer is also a relevant source of B vitamins, in particular niacin and thiamine, and minerals such as phosphorus, magnesium, manganese and iron,<sup>7</sup> amounting to 40-60 % of total minerals of the whole wheat kernel.<sup>8</sup>

The industrial process milling of durum wheat produces different by-products among them the aleurone layer. Therefore, due to the potential health effects of aleurone layer<sup>7</sup> the recovery of the selected wheat fractions rich in aleurone and their re-use as food ingredients might be nutritionally advantageous. However, beside the quantity, the bioavailability of these compounds should be taken into account, as it strongly depends on their bioaccessibility, which in turn is affected by the food matrix and the processing conditions.

Different processing methods can be applied to modify the bran structure and composition. Among these wet-fractionation processes (such as enzymatic treatments and fermentation) and dry-fractionation processes (such as ultra-fine grinding, air-classification and electrostatic separation) are the most promising tools to increase nutrient bioaccessibility in milling fractions. Some of these techniques, such as ultra-fine grinding, have been demonstrated to deeply change the physical structure of the cereal matrix, causing a partial rupture of aleurone cells, with the consequent release of intra-cellular contents.<sup>12</sup> However, the effect on nutrient bioaccessibility remains to be demonstrated.

Therefore we studied, using an *in vitro* model simulating human gastrointestinal digestion, the bioaccessibility of phenolic compounds, vitamins and total antioxidant capacity in durum wheat bran fractions rich in aleurone layer obtained by micronization. Moreover, the ultra-micronization was applied to the fractions in order to investigate the effect of the particle size reduction as a possible way to further improve the bioaccessibility of these compounds.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals**

Ferulic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, sinapic acid, nicotinic acid, thiamine, pepsin from porcine gastric mucosa, pancreatin from porcine pancreas (3xUSP), and taka diastase from *Aspergillus oryzae* were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Spectra/Por® dialysis membrane tubes were from Spectrum® Laboratories Inc. (Rancho

Dominguez, CA, USA). All chemicals used in the study were of analytical grade. Ultrapure water from a MilliQ system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout the experiments.

### **Wheat bran fractions**

The durum wheat bran fractions were provided by Barilla G. e R. F.lli, Parma - Italy. Durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) grains underwent three subsequent steps of debranning (DECO 420R from TAE, Italy) in an industrial durum mill (capacity 13 ton/h, traditional milling by roller-millers, plansichters and purifiers). The material produced from the third debranning step was processed through a micronization technique (Micronizer Mod. KMX-875 - Separ Microsystem, Italy), followed by an air separation step (Air Separator Mod. SX-1.000 - Separ Microsystem, Italy) to obtain two different bran fractions: the IN sample (the inner part of aleurone -Barilla Aleurone A-) and the OUT sample (the outer part of aleurone, containing also a residue of tissue cells coming from the outer layer close to the aleurone -Barilla Aleurone B- ). The extraction yield of IN and OUT samples was 0.75% and 1.25% of wheat, respectively. The IN (particle sizes < 100 µm) and OUT (particle sizes ranging 300-425 µm) fractions were subsequently ultra-micronized by jet milling (Fluid Jet Mill Plant Model J-125 - Tecnologia Meccanica Srl, Italy) to obtain the IN ultra-micronized (IN-M) (particle sizes < 20µm) and the OUT ultra-micronized (OUT-M) (particle sizes < 100µm) fractions, respectively.

Moreover, a standard wheat bran fraction (BRAN) (particle sizes 100-600 µm) was used as a control in this work. The BRAN was produced with a standard milling process (capacity 10 ton/h, traditional milling by roller-miller, plansichter and purifiers).

### **Proximate composition of wheat bran fractions**

All fractions were analyzed for starch (% , AOAC method 996.11), protein (% N × 5.70, AOAC method 992.23), lipid (% , AOAC method 922.06), fiber (% , AOAC method 985.29) and ash content (% , AOAC method 923.03).

For the analysis of minerals, samples were digested using a closed-vessel microwave digestion system (Milestone ETHOS PLUS with HPR-1000/10S high pressure rotor). Raw and retained

samples were weighted to proper Teflon digestion vessels. A mixture of concentrated nitric acid and hydrogen peroxide was carefully added, vessels were properly closed and introduced into the microwave oven. Vessels were thereafter cooled to room temperature and digested samples were diluted with deionized water, for subsequent determination of minerals. An inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ULTIMA 2 ICP-AES HORIBA Jobin Yvon, France) with a radial configuration was used for Fe, Cu, Zn and Mg determinations. Measurements were performed at the following emission lines (nm): Zn 213.856, Cu 324.754, Fe 259.940, Zn 213.856, Mg 280.270.

### ***In vitro* digestion**

All *in vitro* digestions were performed in triplicate for each wheat bran fraction, following the method described by Amrein et al.<sup>8</sup> with some modifications. Prior to digestion, the wheat fractions were mixed with water to obtain a mixture with  $\approx 40$  % moisture, obtaining a homogeneous dough. The *in vitro* gastrointestinal model was set up as follows: 8 g of humidified samples were suspended in phosphate buffer (20 mmol L<sup>-1</sup>) and incubated at 37 °C stepwise with human saliva for 2 min at pH 6.9, and porcine pepsin (2500 U) for 2 h at pH 2.0-2.5. Each sample was then transferred into 20 cm dialysis tubing strips (12000 Da molecular weight cut-off) with 100 mg of pancreatin from porcine pancreas (3xUSP), sealed with plastic clamps, and incubated for 24 h at pH 6.9 into 1000 mL sealed containers containing 500 mL of phosphate buffer.

The dialyzed and retained solutions were collected after dialysis and the volumes carefully measured. The dialyzed solution contains free low molecular weight compounds that are potentially absorbed during digestion, whereas the solution retained within the dialysis tube contains the portion of sample that is ideally not fully digested and absorbed in the upper gastrointestinal tract. The bioaccessibility of a specific compound was calculated considering the quantity of compound dialyzed with respect to the initial quantity in the sample before digestion (100 %).

The analyses of total antioxidant capacity, phenolic acids and vitamins were carried out in triplicate on the undigested, retained and dialyzed solutions of all wheat bran fractions.

### **Extraction of antioxidant compounds and phenolic acids**

For the preparation of soluble extracts, 50 mg of raw sample were extracted with 6 mL of water under agitation for 20 min at room temperature, followed by centrifugation at 9200 x g for 10 min, and the supernatant was collected. For the extraction of the bound phenolic compounds, the residue was further hydrolyzed with 1.5 mL of 2 mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide at room temperature for 1 h. After alkaline hydrolysis, the pH of the mixture was adjusted to 3 by adding 1.35 mL of 3 mol L<sup>-1</sup> citric acid. The bound phenolic samples were then extracted with 6 mL of ethyl acetate. The ethyl acetate extracts were evaporated to dryness under a stream of nitrogen at room temperature and the residue was dissolved in methanol. Retained samples were centrifuged at 9200 x g for 10 min, the supernatant was collected and treated as soluble extract. The residue was undergone to the extraction of bound phenolic compounds as reported for raw samples. Dialyzed samples were not undergone to extraction. Soluble and bound extracts and dialyzed samples were kept at -20 °C in the dark and filtered (0.45 µm nylon filters) prior to analysis.

### **Extraction of vitamins**

For the extraction of vitamins in undigested (i.e., raw samples) and retained fractions, about 1 g of undigested samples and 5-9.4 g of retained fractions (according to moisture of the sample) corresponding to 1 g of dried sample were extracted with 20 mL of water in the presence of 300 mg of taka diastase at pH 4.5 for 1 h at 37 °C, followed by centrifugation at 9200 x g for 10 min, and the supernatant was collected. The extraction was performed following the method described in a specific kit for vitamin analysis in cereal products (VitaFast® Vitamin B3, VitaFast® Vitamin B1, R-Biopharm, Italy).

### **Total Antioxidant Capacity (TAC)**

The total antioxidant capacity was measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay.<sup>13</sup>

### **LC-MS<sup>n</sup> analyses**

Phenolic acids, thiamine and nicotinic acid in wheat bran fractions, dialyzed and retained solutions were analyzed using an Accela UHPLC 1250 equipped with linear ion-trap-mass spectrometer

(LTQ XL, Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA, USA) fitted with a heated-electrospray ionization probe (H-ESI-II; Thermo Fisher Scientific Inc.). The separation was performed using a Hypersil Gold column (50 x 2.1 mm), 1.9  $\mu\text{m}$  particle size (Thermo Fisher Scientific Inc.).

#### *Phenolic acids*

The phenolic acids analysis was carried out in negative ionization mode, using the following conditions. The MS worked with a capillary temperature equal to 275  $^{\circ}\text{C}$ , while the source heater temperature was set to 45  $^{\circ}\text{C}$ . The sheath gas flow was 40 units, while auxiliary and sweep gases were set to 5 and 2 units, respectively. The source voltage was 4 kV. The capillary voltage and tube lens were -21.00 and -57.71 V, respectively. For separation of the analytes, phase A was aqueous formic acid (0.1 % v:v) and phase B was methanol/water (98:2 v:v). The mobile phase, pumped at a flow rate of 0.3 mL/min, was kept for 10 min in linear gradient of 7 % to 40 % of B. Analyses were carried out using Selected Reaction Monitoring; *p*-hydroxybenzoic acid ( $m/z$  137) was fragmented using a pure helium (99.999 %) collision induced dissociation (CID) of 36, generating a fragment ion with  $m/z$  93; *p*-coumaric acid ( $m/z$  163) was fragmented with CID 30, generating the corresponding fragment ion at  $m/z$  119; caffeic acid ( $m/z$  179) yielded the corresponding fragment ion at  $m/z$  135, using a CID of 29; ferulic acid ( $m/z$  193) generated three daughter ions at  $m/z$  134, 149 and 178, using a CID of 28; sinapic acid ( $m/z$  223) generated three fragment ions at  $m/z$  164, 179 and 208, with a CID of 25. The quantification of each phenolic acid was performed through a calibration curve with the respective commercial standard. The  $R^2$  of the curves of standard compounds ranged from 0.992 to 0.998.

#### *Thiamine and nicotinic acid*

The analysis of thiamine and nicotinic acid was carried out in positive ionization mode, using the following conditions. The MS worked with capillary temperature equal to 275 $^{\circ}\text{C}$ , while the source heater temperature was set to 200  $^{\circ}\text{C}$ . The sheath gas flow was 40 units, while auxiliary gas was set to 5 units. The source voltage was 3.5 kV. The capillary voltage and tube lens were 24 and 85 V, respectively. For the separation of the analytes, phase A was aqueous formic acid (0.1 % v:v) and phase B was acetonitrile in 0.1 % formic acid (v:v). The mobile phase, pumped at a flow rate of

0.2 mL/min, was kept at 100 % phase A up to 2 min, and then from 2 to 6 min linear gradient to 40 % phase B. The analysis of nicotinic acid (m/z 124) was carried out using Selected Reaction Monitoring (SRM), with CID 55, generating the corresponding fragment ions at m/z 78, 80, 94, 96, 106. Thiamine (m/z 265) was analyzed by Consecutive Reaction Monitoring, with CID equal to 18, generating the corresponding fragment ion at m/z 122. This fragment was further fragmented with a CID of 42, generating fragment ions at m/z 81, 95, 105. The quantification of each vitamin was performed through a calibration curve with the respective commercial standards.

### **Statistical analysis**

All experiments were performed in triplicate. Means and standard deviations (SD) were calculated with SPSS Version 19.0 statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). One way analysis of variance followed by LSD post-hoc test ( $p < 0.05$ ) was used to identify differences among different fractions.

## **RESULTS**

### **Proximate composition and analyses of wheat bran fractions**

#### ***Macro- and micro-nutrients***

The composition in macro- and micro-nutrients of the different wheat fractions is reported in Table 1. The OUT fraction was characterised by a higher fiber content, equal to 55 %, with respect to 15 and 36 % in the IN and BRAN samples, respectively. The IN fractions showed a higher content in starch, proteins, lipids, and ash. Regarding minerals, we limited the analysis to iron, copper, zinc and magnesium because of their reported relevant concentration in wheat. The distribution among the fractions was similar for all the analysed minerals, with slightly higher levels observed in the IN and IN-M fractions. Thiamine was higher in the IN and IN-M fractions, whereas the distribution of niacin was uniform.

### **Total Antioxidant Capacity**

The TAC of the wheat bran fractions is reported in Figure 1. The OUT fractions showed the highest total antioxidant capacity values (11.69 and 11.04 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g for OUT and OUT-M, respectively), followed by BRAN (8.73 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g). The IN fractions showed the lowest TAC values (5.27 and 5.07 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g in IN and IN-M, respectively). The ultra-micronized and regular-sized samples showed comparable TAC values. The main TAC contributors to the OUT and OUT-M fractions TAC were bound compounds (88 % and 84 % of the global TAC, respectively), whereas the IN and IN-M fractions presented a high proportion of antioxidant capacity related to free compounds ( $\approx$  50 %).

### **Phenolic acids**

Figure 1 reports the phenolic acid profile of the wheat fractions. In each fraction, five phenolic acids were detected and quantified: ferulic, *p*-coumaric, sinapic, caffeic and *p*-hydroxybenzoic acids. Ferulic acid was the main phenolic acid, with a concentration ranging between 50.2 and 210.4 mg/100 g, whereas *p*-coumaric, sinapic, caffeic and *p*-hydroxybenzoic acids were present in the different fractions in the range of 3.4-8.7, 1.7-7.6, 0.1-1.8 and 1.2-1.9 mg/100 g dry weight, respectively. Ferulic, sinapic and caffeic acids were present almost completely bound to the fiber fraction. Peculiarly, *p*-coumaric acid was present mainly in the bound form in BRAN, OUT and OUT-M fractions, but its free form was close to the 50% in the IN and IN-M samples. Finally, *p*-hydroxybenzoic acid showed to be prevalently free in all samples.

### **Bioaccessibility of the wheat bran fractions**

#### **Total Antioxidant Capacity**

Figure 2 reports the percentage of absorbed TAC calculated as the amount of TAC found in the dialyzed solution divided by the initial TAC value of each wheat bran fractions. Antioxidant compounds contributing to the TAC were more bioaccessible in the IN and IN-M fractions, with bioaccessibility values of 60 and 65 %, respectively, whereas the relative bioaccessibility in the other fractions was lower ( $\approx$  20 % in the OUT and OUT-M and 33 % in BRAN), and not significantly

different among these fractions. TAC values in retained and dialyzed samples are reported in Table 2. The retained samples of BRAN, OUT and OUT-M, representing the non bioaccessible components, showed a higher TAC level, mainly attributable to bound antioxidant compounds, than that of the dialyzed solutions. Conversely, the IN and IN-M fractions showed the lowest TAC in retained, unabsorbable portion, with a complementary high TAC of the dialyzed solution.

### ***Phenolic acids***

The bioaccessibility of phenolic acids after digestion is reported in Figure 2. The percentage of absorbed compounds was different for the five phenolic acids and among fractions. Ferulic acid absorption did not show any significant difference among fractions, with values ranging from 32 to 51 %. In addition, ferulic acid content in retained and dialyzed samples is presented in Table 2. Compared with the other fractions, IN and IN-M showed a lower content in dialyzed and retained ferulic acid, in accordance with their lower original content. Among the minor acids, *p*-hydroxybenzoic presented the highest percentage of absorption (84-99 %), whereas for *p*-coumaric, sinapic and caffeic acids the bioaccessibility was widely variable among the fractions.

### ***Vitamins***

Vitamin content in the retained fractions and bioaccessibility values are described in Table 3. Thiamine was extremely bioaccessible, with IN and IN-M fractions reaching the highest values ( $\approx$  99 %), followed by OUT-M, OUT and BRAN. On the contrary, niacin was highly retained within the dialysis membrane, with slightly higher bioaccessibility values for the IN and IN-M fractions.

## **DISCUSSION**

The present work aimed to study the nutritional characteristics of two innovative wheat aleurone fractions, in order to evaluate their potential use as functional ingredients in cereal-based foods. In particular, the bioaccessibility of vitamins, antioxidants and phenolic compounds was evaluated in different wheat bran fractions by means of an *in vitro* digestive process, and in function of a ultra-micronization treatment influencing their particle size. The aleurone fractions were obtained

through an industrial process and do not correspond to a specific histological separation, making this work novel, and the results hardly comparable with those obtained with aleurone fractions obtained with different milling techniques analyzed in other studies.<sup>14, 15</sup>

The compositional analysis of the investigated samples showed that the outer aleurone fraction is for a great extent fibrous, whereas the inner aleurone is mainly composed of intracellular material, containing more starch, proteins and lipids. The higher mineral and vitamin content in the latter fraction might be explained by their compartmentalization within the cells.<sup>7</sup>

In accordance with the literature,<sup>16, 17</sup> the most relevant contribution to the TAC was attributable to bound compounds, with the OUT fraction showing the highest bound and overall TAC, and the IN fraction the lowest, in good agreement with their content of fiber. This was expected, as fibre-bound phenolics represent the major TAC contributors in cereals.<sup>14</sup>

Ferulic acid was the predominant phenolic compound measured in the bran and aleurone fractions, as already reported.<sup>10</sup> This phenolic compound has been previously identified as the main contributor to aleurone TAC<sup>14</sup> and it constitutes a structural component of the cell wall. It is mostly esterified to arabinoxylans, as previously described by Beaugrand *et al.*,<sup>18</sup> who reported a strong correlation between arabinoxylans and ferulic acid content in wheat bran. In agreement with these observations, ferulic acid, together with *p*-coumaric acid, was present in a greater extent in the OUT fraction, which is richer in cell wall fiber. Conversely, *p*-hydroxybenzoic and sinapic acids contents were comparable in inner and outer aleurone layers, as they are mainly located in the aleurone intracellular compartment.<sup>12</sup>

The ultra-micronized samples showed a TAC value comparable with their respective regular size fractions. Moreover, such process did not cause significant modifications to phenolic acid composition, with the only exception of a slight but significant increase in free ferulic acid. Conversely, previous works<sup>19, 20</sup> observed that the ultra-fine grinding increased the antioxidant capacity of wheat bran. These different results might be linked to the different analytical methods used for analysing samples, as Zhou *et al.*<sup>19</sup> measured only free antioxidant compounds, whereas

Rosa *et al.*<sup>20</sup> measured TAC with a direct method,<sup>21</sup> in which the reduction of particle size leads to a higher exposure of cell wall phenolic acids.

After the *in vitro* digestion, the inner aleurone layers showed the highest bioaccessibility and the highest *in vitro* absorbed TAC values. A higher antioxidant capacity of the bioaccessible aleurone fraction with respect to bran has been already reported by Mateo Anson *et al.*<sup>15</sup> Interestingly, in the present study, despite the inner aleurone fraction contained less antioxidant compounds, its TAC was released more efficiently during digestion, possibly because phenolics were present in large proportion in the free and more bioaccessible form. Actually, Adam *et al.*<sup>22</sup> observed that the rate of release of the esterified ferulic acid from a complex matrix within the digestive tract appears dependent on the nature of the fibers to which it is linked, with non-starch polysaccharides in endosperm cell walls being more extensively broken down than their pericarp counterparts. Therefore, phenolic compounds bound to endosperm arabinoxylans might be more easily released with respect to phenolics linked to the pericarp or the outer aleurone layer.

In the present study, phenolic acids were differently released during digestion among the fractions. In particular, *p*-hydroxybenzoic acid presented the highest bioaccessibility in all the fractions, likely because of its predominant free form in the undigested fractions. The previous studies regarding the bioaccessibility of phenolic acids in cereals and cereal products have shown a very low bioavailability of ferulic acid from cereals in humans, with figures as low as 3 %.<sup>23</sup> Mateo Anson *et al.*<sup>24</sup> reported that in a dynamic *in vitro* system the bioaccessibility of this compound from bran and aleurone was lower than 1 %, assuming that the sole free fraction is a significant contributor. In the present study, the bioaccessibility of ferulic acid measured by an *in vitro* digestive model was observed to be higher, with all the free form absorbed, but also with a relevant percentage of the bound fraction able to become available for absorption after digestion. The micronization process could have partially improved the bioaccessibility of phenolic compounds.

The bioaccessibility of thiamine resulted high in all the fractions, as previously suggested by Roth-Maier and colleagues,<sup>25</sup> reporting a high pre-caecal bioavailability of thiamine from wheat bran (92 %) in pigs. Yu and Kies<sup>26</sup> observed that particle size is able to influence thiamine absorption. In the

present study, the proportion of absorbed thiamine was BRAN < OUT < IN, with ultra-micronized samples showing slightly higher values.

Niacin was less bioaccessible than thiamine, with values ranging between 10 and 55 % in OUT-M and IN-M, respectively. In good agreement to this observation, in a study conducted on pigs treated with ileo-rectal anastomosis and fed wheat, the pre-caecal digestibility of niacin was nearly 50-60 %.<sup>27</sup> In aleurone, niacin forms inclusions with proteins, that can influence its bioaccessibility.

There is growing evidence that indicate that the consumption of wholemeal cereals and wholemeal cereal based products with respect to refined ones contributes to the prevention of chronic diseases. For this reason, the 2010 Dietary Guidelines for Americans recommended a consumption of at least 3 ounce-equivalents of wholemeal cereals per day.<sup>28</sup> In many western countries, the consumption of wholegrain products is estimated to be low, under the recommended intake; indeed, on average, Americans eat less than 1 once-equivalent per day of wholegrain products.<sup>28</sup> One barrier to a major consumption probably is the expected low sensory quality. The isolation and use of selected fractions in the formulation of new cereal based products could be a strategy for improving the offer of wholegrain products. In particular, aleurone fractions can be promising in replacing a part of the flour in the formulation of new products with wholegrain nutritional characteristics and that look and taste like a refined grain product. Moreover, the utilization of these fractions allows to valorize the milling by-products, and to reduce wastes.

Based on the present results, wheat aleurone fractions analyzed in this study could represent a nutritionally relevant ingredient in the preparation of wheat based products, bringing together a high fiber content and an excellent bioaccessibility of vitamins and minor phytochemicals generally associated to nutritional benefits. Moreover, these nutritional characteristics are present in inner and outer aleurone layer fractions also without any further ultra-micronization treatment, permitting to obtain nutritionally interesting ingredients without additional processing costs. In particular, IN fraction presented the most interesting characteristics among the analyzed fractions, suggesting that it can be used in the formulation of new wheat based products. These promising results

obtained with an *in vitro* model suggest to proceed with a human study in order to evaluate the bioaccessibility and bioavailability of aleurone enriched foods.

### **ABBREVIATIONS USED**

BRAN, wheat bran fraction; CID, collision induced dissociation; FRAP, ferric reducing antioxidant power; IN, inner part of wheat bran fraction; IN-M, IN micronized; OUT, the other part of wheat bran fraction; OUT-M, OUT micronized; TAC, total antioxidant capacity.

## LITERATURE CITED

1. Ye, E.Q.; Chacko, S.A.; Chou, E.L.; Kugizaki, M.; Liu, S. Greater whole-grain intake is associated with lower risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and weight gain. *J. Nutr.* **2012**, *142*, 1304-1313.
2. de Munter, J.S.L.; Hu, F.B.; Spiegelman, D.; Franz, M.; van Dam, R.M. Whole grain, bran, and germ intake and risk of type 2 diabetes; A prospective cohort study and systematic review. *PLoS Medicine* **2007**, *4*, 1385-1395.
3. Larsson, S.C.; Giovannucci, E.; Bergkvist, L.; Wolk, A. Whole grain consumption and risk of colorectal cancer: A population-based cohort of 60 000 women. *Br. J. Cancer* **2005**, *92*, 1803–1807.
4. Chan, J.M.; Wang, F.; Holly, E.A. Whole grains and risk of pancreatic cancer in a large population-based case-control study in the San Francisco Bay Area, California. *Am. J. Epidemiol.* **2007**, *166*, 1174–1185.
5. Okarter, N.; Liu, R. H. Health benefits of whole grain phytochemicals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 193-208.
6. Fardet, A. New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre? *Nutr. Res. Rev.* **2010**, *23*, 65-134.
7. Brouns, F.; Hemery, Y.; Price, R.; Mateo Anson, N. Wheat aleurone: separation, composition, health aspects, and potential food use. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2012**, *52*, 553-568.
8. Amrein, T.M.; Gränicher, P.; Arrigoni, E.; Amadò, R. In vitro digestibility and colonic fermentability of aleurone isolated from wheat bran. *LWT - Food Sci. Technol.* **2003**, *36*, 451-460.
9. Lilloja, S.; Neal, A.L.; Tapsell, L.; Jacobs, D.R. Jr. Whole grains, type 2 diabetes, coronary heart disease, and hypertension: Link to the aleurone preferred over indigestible fiber. *Biofactors* **2013**, *39*, 242-258.
10. Li, L.; Shewry, P.R.; Ward, J.L. Phenolic acids in wheat varieties in the Healthgrain diversity screen. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9732-9739.
11. Vitaglione, P.; Napolitano, A.; Fogliano, V. Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, *19*, 451-463.
12. Hemery, Y.M.; Mateo Anson, N.; Havenaar, R.; Haenen, G.R.M.M.; Noort, M.W.J.; Rouau, X. Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1429-1438.

13. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 15-27.
14. Mateo Anson, N.; van den Berg, R.; Havenaar, R.; Bast, A.; Haenen, G.R.M.M. Ferulic acid from aleurone determines the antioxidant potency of wheat grain (*Triticum aestivum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5589-5594.
15. Mateo Anson, N.; Havenaar, R.; Bast, A.; Haenen, G.R.M.M. Antioxidant and anti-inflammatory capacity of bioaccessible compounds from wheat fractions after gastrointestinal digestion. *J. Cereal Sci.* **2010**, *51*, 110-14.
16. Adom; K.K.; Liu; R.H. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6182-6187.
17. Fardet, A.; Rock, E.; Rémésy, C. Is the *in vitro* antioxidant potential of whole grain cereals and cereals products well reflected *in vivo*? *J. Cereal Sci.* **2008**, *48*, 258-276.
18. Beaugrand, J.; Crônier, D.; Debeire, P.; Chabbert, B. Arabinoxylans and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility. *J. Cereal Sci.* **2004**, *40*, 223-230.
19. Zhou, K.; Laux, J.J.; Yu, L. Comparison of Swiss red wheat grain and fractions for their antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1118-1123.
20. Rosa, N.N.; Barron, C.; Gaiani, C.; Dufour, C.; Micard, V. Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. *J. Cereal Sci.* **2013**, *57*, 84-90.
21. Serpen, A.; Gökmen, V.; Pellegrini, N.; Fogliano, V. Direct measurementt of the total antioxidant capacity of cereals products. *J. Cereal Sci.* **2008**, *48*, 816-820.
22. Adam, A.; Crespy, V.; Levrat\_Verny, M.A.; Leenhardt, F.; Leuillet, M.; Demigné, C.; Rémésy, C. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1962-1968.
23. Kern, S.M.; Bennett, R.N.; Mellon, F.A.; Kroon, P.A.; Garcia-Conesa, M.T. Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6050-6055.
24. Mateo Anson, N.; van den Berg, R.; Havenaar, R.; Bast, A.; Haenen, G.R.M.M. Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *J. Cereal Sci.* **2009**, *49*, 296-300.
25. Roth-Maier, D.A.; Wild, S.I.; Erhardt, W.; Henke, J.; Kirchgessner, M. Investigations on the intestinal availability of native thiamin in selcted foods and feedstuffs. *Eur. J. Nutr.* **1999**, *38*, 241-246.

26. Yu, B.H.; Kies, C. Niacin, thiamine, and pantothenic-acid bioavailability to humans from maize bran as affected by milling and particle size. *Plant Foods Hum. Nutr.* **1993**, *43*, 87-95.
27. Wauer, A.; Stangl, G.I.; Kirchgessner, M.; Erhardt, W.; Henke J.; Henning, U.; Roth-Maier, D.A. A comparative evaluation of ileo-rectal anastomosis techniques for the measurement of apparent precaecal digestibilities of folate, niacin and pantothenic acid. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **1999**, *82*, 80-87.
28. U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services. *Dietary Guidelines for Americans, 2010*. 7<sup>th</sup> Edition, Washington, DC: U.S. Government Printing Office, December 2010.

**Table 1.** Macro and micronutrient composition of wheat bran fractions.<sup>a</sup>

	starch	protein	lipid	fiber	ash	iron	copper	zinc	magnesium	thiamine	niacin
BRAN	24.42 ± 1.56	15.38 ± 0.48	6.00 ± 0.30	36.00 ± 0.23	3.40 ± 0.11	11.24 ± 0.10	2.37 ± 0.04	7.36 ± 0.04	391.66 ± 1.61	7.42 ± 1.63	19.53 ± 5.39
OUT	14.23 ± 0.30	12.64 ± 0.35	8.68 ± 0.20	55.57 ± 0.33	4.84 ± 0.10	11.51 ± 0.08	2.19 ± 0.01	8.51 ± 0.27	297.96 ± 5.61	6.79 ± 0.46	15.38 ± 4.76
OUT-M	12.63 ± 0.83	12.64 ± 0.35	8.68 ± 0.20	55.57 ± 0.33	4.84 ± 0.10	12.19 ± 0.25	2.22 ± 0.03	8.42 ± 0.56	295.63 ± 1.81	4.44 ± 0.98	14.15 ± 6.44
IN	40.28 ± 1.08	18.07 ± 0.47	11.04 ± 0.32	15.00 ± 1.00	6.90 ± 0.08	17.63 ± 0.20	2.80 ± 0.03	11.88 ± 0.41	602.78 ± 4.83	24.59 ± 1.08	21.86 ± 1.87
IN-M	34.52 ± 1.40	18.07 ± 0.47	11.04 ± 0.32	15.00 ± 1.00	6.90 ± 0.08	19.59 ± 0.17	3.00 ± 0.04	12.39 ± 0.54	676.24 ± 8.05	27.84 ± 4.34	17.08 ± 3.45

<sup>a</sup> values are presented as means ± SD and are expressed on dry weight basis. Data of starch, protein, lipid, fiber and ash are expressed as g/100 g, those of minerals and vitamins are expressed as mg/100 g.

**Table 2.** TAC and ferulic acid content in retained and dialyzed samples after digestion.<sup>a</sup>

	TAC retained			TAC dialyzed	Ferulic retained			Ferulic dialyzed
	<i>Free</i>	<i>bound</i>	<i>total</i>		<i>free</i>	<i>bound</i>	<i>total</i>	
BRAN	0.50 ± 0.03 b	5.96 ± 0.71 c	6.47 ± 0.74 c	2.88 ± 0.57 a	0.32 ± 0.04 c	92.43 ± 14.61 a	92.75 ± 14.58 a	44.38 ± 14.58 bc
OUT	0.37 ± 0.01 c	9.43 ± 0.55 a	9.86 ± 0.56 a	2.36 ± 0.49 a	0.45 ± 0.07 bc	102.03 ± 9.21 a	102.47 ± 9.13 a	107.89 ± 9.13 a
OUT-M	0.46 ± 0.02 b	7.96 ± 1.30 b	8.42 ± 1.32 b	2.07 ± 0.74 a	0.83 ± 0.26 b	109.30 ± 35.20 a	110.13 ± 24.71 a	68.59 ± 24.71 b
IN	0.67 ± 0.12 a	2.82 ± 0.29 d	3.49 ± 0.21 d	3.17 ± 0.61 a	0.49 ± 0.14 bc	32.68 ± 2.71 b	33.17 ± 2.81 b	17.01 ± 2.81 c
IN-M	0.67 ± 0.08 a	3.13 ± 0.14 d	3.80 ± 0.06 d	3.27 ± 0.89 a	1.36 ± 0.35 a	25.38 ± 4.15 b	26.74 ± 4.11 b	26.54 ± 4.11 c

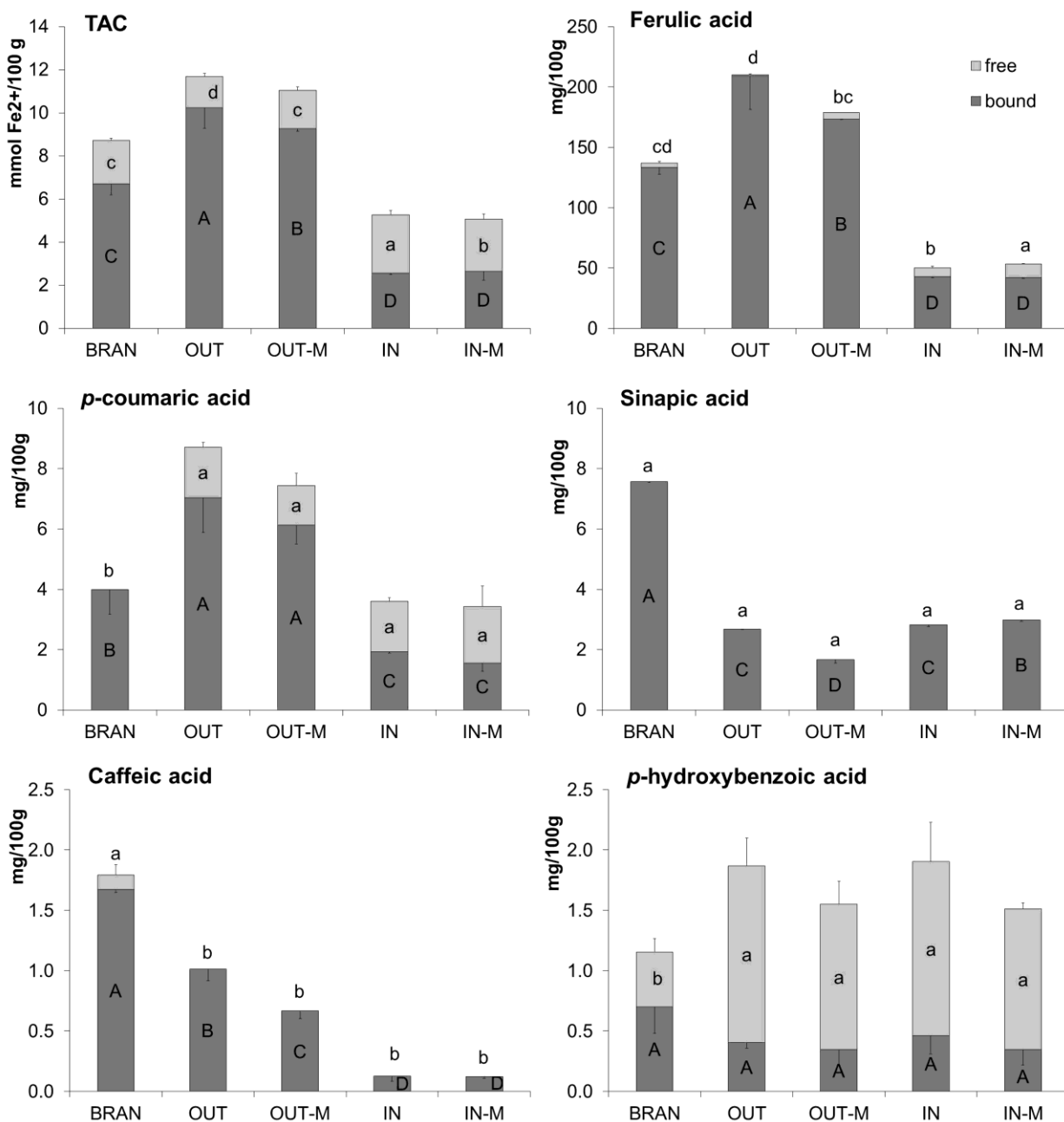
<sup>a</sup> values are presented as means ± SD. Data of TAC are expressed as mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g of undigested fraction on dry weight basis. Data of ferulic acid are expressed as mg/100 g of undigested fraction on dry weight basis. Different letters in column correspond to significantly ( $p < 0.05$ ) different samples.

**Table 3.** Thiamine and niacin content in retained samples and bioaccessibility after digestion.<sup>a</sup>

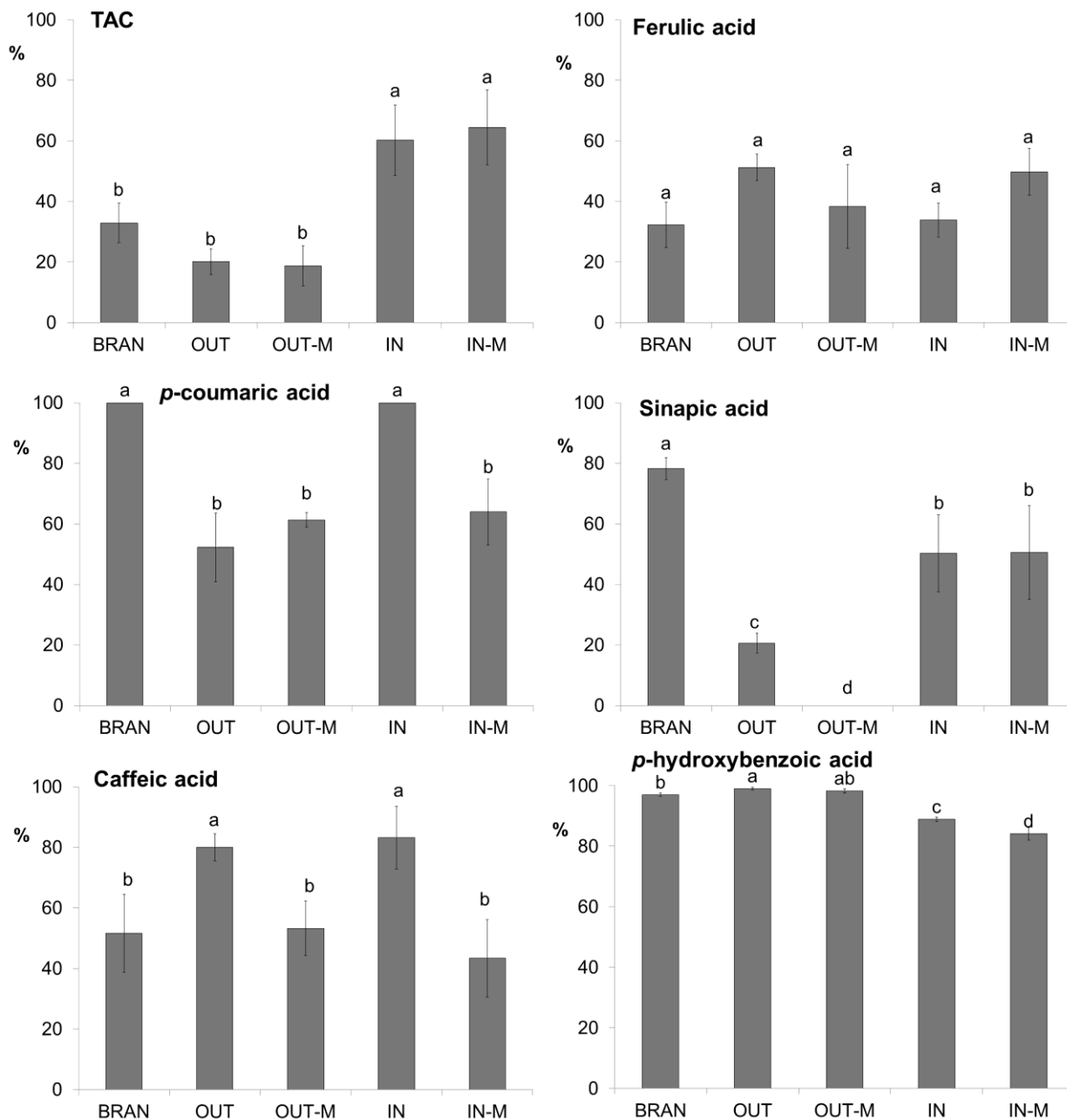
	Thiamine		Niacin	
	content	bioaccessibility	content	bioaccessibility
BRAN	2.77 ± 0.95 a	62.64 ± 12.83 d	13.98 ± 2.41 a	28.41 ± 12.38 b
OUT	1.36 ± 0.37 b	79.95 ± 5.55 c	12.71 ± 0.35 a	17.34 ± 2.27 b
OUT-M	0.58 ± 0.19 bc	86.96 ± 4.33 bc	12.65 ± 1.84 a	10.61 ± 5.21 b
IN	0.33 ± 0.20 c	98.65 ± 0.84 ab	10.96 ± 0.82 a	49.84 ± 3.78 a
IN-M	0.16 ± 0.08 c	99.42 ± 0.29 a	7.53 ± 2.40 b	55.94 ± 14.05 a

<sup>a</sup> values are presented as means ± SD and are expressed on dry weight basis. The content in retained is expressed as mg/100 g of undigested fraction on dry weight basis, the bioaccessibility is expressed as %. Different letters in column correspond to significantly ( $p < 0.05$ ) different samples.

**Figure 1.** Total antioxidant capacity (mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g dry weight) and phenolic acids content (mg/100 g dry weight) of the wheat bran fractions. Different lowercase letters in the same panel correspond to significant (*p*<0.05) differences in soluble portion among the fractions. Different capital letters in the same panel correspond to significant (*p*<0.05) differences in bound portion among the fractions.



**Figure 2.** Bioaccessibility (%) of antioxidant compounds and phenolic acids of the wheat bran fractions. Different letters in the same panel correspond to significant ( $p < 0.05$ ) differences among the fractions.



## **Studio 2**

# **EFFECT OF COOKING ON TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY AND ANATOMICAL CHANGE OF DIFFERENTLY PIGMENTED RICE VARIETIES**

**Maria Zaupa<sup>a</sup>, Tommaso Ganino<sup>a</sup>, Lucia Dramis<sup>b</sup>, Nicoletta Pellegrini<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Department of Food Science, University of Parma, Parco Area delle Scienze 59/A, 43124 Parma, Italy

<sup>b</sup> Department of Bioscience, University of Parma, Parco Area delle Scienze 11/A, 43124 Parma, Italy

**Running title:** Effect of cooking on antioxidant capacity and anatomical change of rice

Submitted for publication

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** In the recent years, the pigmented rice varieties have received increased attention because of their content in antioxidant compounds. Previous studies have reported that the cooking treatment generally causes a decrease of their antioxidant capacity. This effect could be partially due to a change of the matrix structure that, in turn, could influence the accessibility of antioxidant compounds. Therefore, in this study the effect of two different cooking methods (i.e. “risotto” and boiling) on the total antioxidant capacity (TAC) and the anatomical structure of three differently pigmented rice varieties was evaluated.

**RESULTS:** In all analyzed varieties the risotto cooking damaged the grain structure to a greater extent than boiling, but preserved more the antioxidant capacity of rice, in particular in Venere variety. Differently, the boiling treatment negatively affected the TAC in all the varieties. Based on the anatomical changes and the TAC results, in the risotto cooking a re-absorption of the leached compounds, including antioxidants, was hypothesized.

**CONCLUSION:** The observations suggested that for a better comprehension of the cooking effect on the antioxidant capacity it is important to consider not only the antioxidant compounds but also the structure of the matrix, which could influence the release of the compounds.

**Keywords:** pigmented rice, domestic cooking, antioxidant capacity, anatomical structure.

## INTRODUCTION

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important cereal crop for human consumption in the world. Despite their low diffusion, in the recent years pigmented rice varieties have received increased attention because of their antioxidant properties, related to the presence of phenolic compounds located mainly in the outer layer of the caryopsis and germ.<sup>1,2</sup> These compounds comprise phenolic acids, more representative in white varieties, and flavonoids, which characterize pigmented rice, such as proanthocyanidins in red rice and anthocyanins in black varieties.<sup>3-5</sup>

Previous studies have reported that the cooking treatment generally causes a decrement of antioxidant capacity, including phenolic content, in cereals.<sup>4,6-8</sup> As regards rice, it was observed that cooking caused a decrease of antioxidants in white and red varieties, with a higher reduction in red rice.<sup>4</sup> A similar result was observed by Massaretto *et al.*,<sup>7</sup> who reported a reduction of 50 % of phenolic content in pigmented rice, whereas no significant effect was observed in white varieties. Accordingly, Tananuwong & Tangsrianugul<sup>9</sup> reported a reduction of nearly 80-90 % in total phenolic content and reducing antioxidant power after cooking of hulled red rice varieties, despite a significant increase of anthocyanin content. Moreover, the type of cooking process influences the antioxidant content and capacity. It has been observed that boiling affected the antioxidant compounds to a greater extent than “risotto” cooking in both non pigmented and pigmented varieties.<sup>4</sup> Several hypotheses were stated to explain the observed decreases of phenolic content: i) the leaching of phenolic compounds into the cooking media, ii) the degradation of phenolic compounds by heat treatment and iii) the formation of complexes between phenolic compounds and macromolecules of endosperm.<sup>6</sup> Besides them, the thermal treatment can modify the structure of the matrix, influencing the accessibility and the extractability of antioxidant compounds.<sup>10</sup>

In the previous studies, different techniques, such as microscopy, NMR and spectroscopic methods, have been applied to observe the morphology of cooked rice grains and the effect of thermal treatments on cereal matrix.<sup>11-15</sup> These studies were mainly focused on the starch gelatinization of milled rice and analyzed the structure of rice in order to evaluate a relationship

with the texture and other quality parameters, such as sensorial properties.<sup>16-18</sup> However, to our knowledge, no study has evaluated whether the anatomical structure modifications can influence the release of antioxidant compounds and their consequent loss during cooking treatment. Therefore, the aim of this study was the evaluation of the cooking effect on the caryopsis rice structure and on the release of antioxidant compounds. For this purpose, three rice varieties, selected because of their different phenolic composition, were cooked by use of two different cooking treatments (i.e. boiling and “risotto”) and the histological structure of grains was compared with their antioxidant capacity values, as an index of the overall antioxidant composition.

## **EXPERIMENTAL**

### **Materials**

Three varieties of whole-meal rice were analyzed: a white variety (Ribe), a red variety (Ermes), and a black variety (Venere). The grains were purchased at a local market in Parma (Italy).

### **Chemicals**

All chemicals and solvents were of analytical grade. Toluidine Blue O (TBO) solution was purchased from Carlo Erba (Milan, Italy), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Paraffin for processing and embedding was purchased from Sherwood Medical Co. (St. Luis, Mo. USA). Ultrapure water from MilliQ system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout the experiments.

### **Cooking procedure**

Two different domestic cooking techniques were applied: boiling and “risotto”. Both cooking procedures applied were designed to achieve the complete starch gelatinization. Briefly, 110-120 mg of cereal was weighed into a 10 mL glass tube. The tube was placed in a water bath at 100 °C, added with a previously determined amount of boiling water and covered. The rate water/cereal was 3.6:1 (w/w) for “risotto” and 20:1 (w/w) for boiling. The cooking time was 40 min for all studied

varieties and for each cooking procedure. The cooked cereals were then cooled in an ice bath for 5 min. For each variety, cooking trials were performed in triplicate.

### **Extraction procedure**

The following extraction procedure was carried out to determine the antioxidant capacity of samples, i.e. raw and cooked rice varieties using the method previously described by N'Dri *et al.*<sup>8</sup> with some modifications. Raw grains were ground to fine flour using a coffee grinder (model AR100, Moulinex, Ecully Cedex, France), whereas cooked grains were ground by Ultraturrax (model T25, Ika, Werke, Staufen im Breisgau, Germany). For the preparation of the soluble extract, each sample was first extracted with 3 mL of water/formic acid (99/1, v/v) under agitation for 15 min at room temperature. The extraction was successively repeated with 2 mL of water/formic acid (99/1, v/v). Each extraction step was followed by centrifugation at 9200 g for 10 min and the clear supernatants were combined. The extraction was repeated twice with ethanol/water/formic acid (98/2/1, v/v/v), and the supernatants were combined. The extraction residue was further used to extract the bound phenolic compounds. For this purpose, the residue was digested with 1.5 mL of 2 mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide at room temperature for 1 h. After alkaline hydrolysis, the pH of the mixture was adjusted to 3 by adding 1.35 mL of 3 mol L<sup>-1</sup> citric acid. The samples were extracted twice with 5 mL of ethyl acetate and the supernatants were combined. The ethyl acetate extracts were evaporated to dryness under a gentle steam of nitrogen at room temperature and the residue was dissolved in methanol. Soluble and bound extracts were kept at -20°C in the dark prior to their analysis.

### **Determination of Total Antioxidant Capacity (TAC)**

The total antioxidant capacity of all the extracts was measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay.<sup>19</sup> Data of TAC are reported in millimoles of Fe<sup>2+</sup> equivalents per kg of raw sample.

### **Histological analysis**

Rice samples were fixed in a formalin: acetic acid: 60 % ethanol solution (2:1:17, v/v; FAA solution) and after at least 2 weeks they were dehydrated with gradual alcohol concentrations. Embedding

was made in paraffin blocks and the resulting blocks were sectioned at 5  $\mu\text{m}$  thickness (transversal sections) with a microtome Leitz 1512 (Wetzlar, Germany). The sections were stained with the TBO solution for the detection of the structure, and with the tannin solution for the detection of total tannins.<sup>20</sup> For each staining technique, at least three replicate sections for each variety and treatment were stained. The sections were examined using an image analysis system (QWIN 3 Leica Imaging Systems Ltd.) attached to binocular and optical microscopes (Leica DM 4000B, Wetzlar, Germany) equipped with a Leica DC 100 digital camera, which was also used for the image capture.

### **Statistical analysis**

Means and standard deviations of data were calculated with SPSS Version 19.0 statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). One way analysis of variance and the LSD post-hoc test at a 95 % confidence level ( $P \leq 0.05$ ) were used to identify differences among the different treatments.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **TAC analysis**

In Table 1, the antioxidant capacity of rice undergone to different thermal treatments is reported. Considering raw samples, Venere rice exhibited the highest TAC, followed by Ermes and Ribe varieties. Accordingly with the literature data,<sup>2,21</sup> in the pigmented rice varieties a high proportion of the TAC was found in the soluble fraction (82 and 75 % in Venere and Ermes, respectively), whereas in the white variety this fraction was less predominant. The antioxidant capacity data confirmed that phenolic compounds associated with the pigmentation are essentially not bound to complex insoluble structures, as anthocyanins and proanthocyanidins are typically stored in the vacuole.<sup>2</sup> Differently, in Ribe variety the soluble fraction contribution to total TAC was low, because the white rice lacks flavonoids in the caryopsis. The TAC of the bound fraction was quite similar among the varieties, with the lowest content in Ribe one. This fraction is mainly characterized by hydroxycinnamic acids, which are bonded to the cell wall.<sup>4</sup>

The two thermal treatments (i.e. risotto cooking and boiling) caused a significant decrease of the total TAC (the sum of soluble and bound fractions) of the three varieties, except for Venere variety for which the risotto cooking caused a significant increase of total TAC (Table 1).

Considering the risotto cooking, the TAC of the soluble fraction (the sum of aqueous and ethanolic fractions) presented the same trend of total TAC, with an increase of the TAC in Venere variety and a decrease in Ribe and Ermes varieties. On the contrary, the TAC of bound fraction significantly decreased in the Venere variety, whereas it was not significantly affected in Ermes and Ribe varieties. Interestingly, the single fractions that compose the soluble fraction showed a different behavior. In fact, in all the samples, the TAC of the aqueous fraction increased significantly after cooking, with the highest increase observed in Venere rice, whereas the TAC of the ethanolic fraction decreased. This seems to suggest that this cooking treatment partly made antioxidant compounds more soluble in the aqueous fraction than in the ethanolic one. Different reasons could explain it in the three rice varieties.

In Venere variety, the TAC increase of the aqueous fraction was much greater than the decrease of ethanolic one in cooked rice with respect to raw one, suggesting that the higher soluble TAC, along with a lower TAC of bound fraction, is probably due to the denaturing effect of thermal treatment on the matrix of cereal.<sup>8,9</sup> Such partial denaturing effect, releasing the compounds from the matrix, increased their aqueous extraction. This effect has been already observed in different cereals,<sup>22,23</sup> and the breakdown of cellular constituents by thermal treatment, with a consequent increase of the soluble phenolic content, was hypothesized. Moreover, Venere variety is known to be characterized by the presence of anthocyanins, which during cooking are partly degraded by heat.<sup>24,25</sup> In particular, during cooking cyanidin 3-glucoside, the most abundant anthocyanin in black rice, can be decomposed and converted into protocatechuic acid.<sup>24</sup> Being the latter more soluble in water than cyanidin 3-glucoside, it can contribute to the higher TAC of the aqueous fraction.

In red rice, the decrease of the total soluble TAC observed can be explained by a partial thermal degradation of proanthocyanidins. Moreover, these compounds can be depolymerized into

monomers or oligomers with lower degree of polymerization,<sup>26</sup> contributing to the TAC of the aqueous fraction. In Ribe rice, the behavior observed could be due to the combined effect of the thermal degradation of soluble antioxidant compounds<sup>27</sup> and their increased extractability. Conversely to the Venere variety, the bound fraction TAC of these two varieties was not decreased by this thermal treatment. Such behavior could be the result of two opposite and simultaneous effect: the release of compounds from the bound form promoted by the thermal process and their successive formation of interactions with the macromolecules of the matrix.<sup>6</sup> It has been effectively reported that phenolic compounds can interact with some proteins and starch, both in native and thermal treated forms.<sup>28,29</sup> In particular, the different phenolic compounds, which characterize the varieties of analyzed rice, can differently interact with the molecules of the matrix: generally proanthocyanidins interact with starch molecules and proteins to a greater extent than monomeric phenolic compounds.<sup>29</sup> Moreover, anthocyanins can form interactions with proteins, but the linkage is more probable in the aglyconic form than in glycosylated compounds,<sup>30</sup> which is the common form present in rice.

Finally, because in the present study the total antioxidant capacity and not the single phenolic compounds was measured, it is important to underline that TAC measurement does not represent a mere sum of the antioxidant potentials of single compounds, but it considers also their synergistic interactions.<sup>31</sup> During cooking, in all the varieties, the degradation of some cellular compartments (see below) probably permits the contact among molecules dislocated in different organelles in raw sample, contributing to the TAC values of risotto cooked rice.

Differently from the effect of risotto cooking, boiling caused a significant decrease of total TAC in all the three varieties. This loss was more severe than that observed with the risotto cooking, and more evident in pigmented rice. In fact, Venere and Ermes varieties lost 53 % of the TAC of the raw sample, whereas Ribe rice lost 31 % of the TAC. Similarly, losses of 60 % and 20 % of the total TAC were previously reported in red and white boiled rice, respectively.<sup>4</sup> Moreover, Towo *et al.*<sup>6</sup> measured a reduction of total extractable phenolics of 40 % and 80 % in finger millet and red sorghum, respectively, after boiling for 15 min. In particular, in the present study the TAC of the

soluble fraction, both aqueous and ethanolic ones, decreased significantly in all the grains. This decrease is likely due to the leaching of antioxidant compounds in cooking medium.<sup>6</sup>

### **Histological analysis**

Rice samples showed the typical structure of cereal caryopsis; from the outside inwards pericarp, perisperm, aleurone and endosperm were visible.<sup>32</sup> The external layers, which compose pericarp, were formed by compressed cells and appeared fused together, with a pericarp thickness of  $20.61 \pm 3.90$ ,  $21.78 \pm 3.54$ ,  $19.10 \pm 5.33$   $\mu\text{m}$  in Venere, Ermes and Ribe varieties, respectively. The aleurone was composed by one or more cell layers. In rice this characteristic occurs within a single grain,<sup>33</sup> with single- or multicellular layer being observed near the embryo. In Ribe rice, aleurone cells were mostly distributed in a single layer, whereas in Venere aleurone was in a great extent two cells thick; red variety showed prevalent mono or bi-cellular layer, within a single grain. Aleurone cells, in transversal section, appeared roughly square, with a more elongated form along the tangential diameter in Venere variety. Aleurone layer thickness was higher in Ribe ( $51.03 \pm 11.63$   $\mu\text{m}$ ) and Venere ( $48.83 \pm 10.16$   $\mu\text{m}$ ) varieties with respect to Ermes ( $35.86 \pm 5.70$   $\mu\text{m}$ ). In aleurone cells some inclusions were present: small starch granules and others, likely proteins and other molecules, such as phytates (Fig. 1A).<sup>34</sup> In endosperm, the cells gradually increase in size from small cells of the subaleurone layer to the large cells of the inner zone of endosperm tissue. These cells contain mainly starch inclusion, which was present in form of granules and cluster of granules.

Considering the macroscopic dimension, cooking caused the expansion and swelling of the caryopsis, with a consequent fracture, visible in particular at outer layers level. This fracture was probably caused by the resistance opposed by pericarp to the expansion and in boiled rice it took place especially along the dorsal/ventral area, whereas in risotto rice it appeared at the extremities. In the areas near the fractures, where the cooking water penetrated, in all the varieties a great effect of cooking was observed and the cells along the perimeter of the fractures were disrupted, as already seen by Ogawa *et al.*<sup>12</sup> In both cooking methods, the external layers were only slightly damaged by the thermal treatment, and the cell walls were almost intact. Conversely, the

endosperm was the most damaged tissue, especially in correspondence of the fractures, whereas subaleurone layers suffered to a minor extent. Considering the cellular dimension, cells expanded for water absorption and starch gelatinization with a consequent cell lysis. In particular, in endosperm cell walls were broken and the cell content released.

The starch gelatinization after both cooking methods was different in the varieties. In Ribe and red varieties, it occurred in all the caryopsis section. In Venere variety, the starch gelatinization was more evident in correspondence of the fractures; in subaleurone areas, where water interacted less with the cells, the starch was partially still present in form of granules.

Inside the caryopsis, in both cooking methods, some cracks and voids were observed, probably formed by a combined effect of pressure buildup and subsequent expansion and partial solubilisation of cell wall components, with the consequent cell lysis and the release of its content.<sup>14</sup> Ogawa *et al.*<sup>12</sup> suggested that cracks operate as channels for the flow of water into the grain during cooking. In risotto rice the cracks were observed in the center of the kernel, whereas in boiled one they were also formed in the subaleurone area. Moreover, in boiled rice the cellular content of endosperm was eluted in the cooking water to a remarkable extent, forming bigger void areas, whereas with risotto cooking the loss of interior content was lesser. However, in general, the structure of boiled rice (Fig. 1B) resulted less damaged than rice cooked with risotto method (Fig. 1C). This probably occurs because boiled rice, after the initial absorption, reaches an equilibrium between the inside of the grain and the outside. Differently, during the final part of the risotto cooking, the grains are undergone to a complete absorption of water that can influence the organization of the matrix cellular compounds.

In the rice caryopsis, the presence and the localization of tannins were observed by the use of the tannin solution.<sup>20</sup> In all the raw varieties, tannins were mainly concentrated, as expected, in the outer layers, in particular in pericarp (Fig. 2A-B). In Ribe variety, tannins present in the pericarp appeared in crystalline dust form, whereas in Venere and Ermes varieties were in dark granular form. Some tannin was also noted in the cytoplasm of aleurone cells and in endosperm. It was already observed that tannins can be present in different forms. In grape skin, they were present in

two bound forms, i.e. a continuous deposit and distinct granular unities, and as free tannins in solution in the vacuolar sap, in the form of granules.<sup>35</sup> After both cooking treatments, tannins were also observed in a remarkable concentration in endosperm (Fig. 2C-D). In particular, in Ribe rice, the tannin solution reacted in correspondence of starch granules (Fig. 2E), whereas in Venere and red rice varieties tannins were more widespread in the caryopsis.

During cooking, the water penetrates in the grain, and the cell components, such as amylose and amylopectin, damaged cell walls and other molecules, in particular antioxidant compounds, can be leached into the cooking medium through the fractures. This effect can justify the TAC decrease observed in all the rice varieties cooked by boiling. During cooking, the leached compounds can be reabsorbed in the grain, maintaining an equilibrium state between inside and outside the grain. Considering in particular the antioxidant compounds, in boiling only a part of them is probably reabsorbed, whereas the major part remains in the cooking medium. In the case of risotto cooking, in a second step of cooking the water is probably absorbed completely in the grain, with the consequent reabsorption of the leached compounds. This hypothesis seems to be confirmed by the anatomical observations and the TAC data. Indeed, in raw kernels, tannins were concentrated in the outer layers, whereas after cooking they were also revealed in the remarkable concentration in endosperm. Moreover, the TAC values of the aqueous extract (that represents the most extractable compounds) increased with risotto cooking in all the three varieties. The absorption of molecules probably occurred in the correspondence of the fractures, because the outer layers were not severely damaged by cooking and did not permit the migration of compounds from water to endosperm through themselves. Indeed, the absorption, in correspondence of a fracture, of compounds that react with tannin solution is visible in Figure 2F. It has already been observed in polished rice that during boiling starch, cell wall fragments and other materials are eluted into the cooking water,<sup>15</sup> and, when water is absorbed, the eluted materials condense on the surface of grain and form a coated layer.

## CONCLUSION

Evaluating the effect of cooking on rice, we observed that in all the analyzed varieties the risotto cooking damaged the grain structure to a greater extent, but preserved more the antioxidant capacity of rice, especially in the case of Venere variety. In fact, an increase of TAC was observed in Venere after risotto cooking, whereas in red and Ribe varieties a decrease of TAC was observed mainly due to the ethanolic soluble fraction. This different behavior measured by the TAC assay among the varieties could be due to the different anatomical structure and/or the antioxidant composition. However, despite the structure of rice was differently influenced by the two thermal treatments, the effect of cooking on the structure did not present remarkable differences among the varieties, except for the gelatinization of starch. This observation led to hypothesize that during the risotto cooking the different behavior of the antioxidant capacity among the varieties was not determined only by the structure, but the composition of antioxidant compounds plays a major role. These suggestions would be confirmed by the evaluation of single phenolic compounds. Therefore, as suggested by the present study, for a better understanding of the effect of cooking on the antioxidant capacity of cereals, the study of the anatomical structure should be investigated in order to evaluate the factors that could influence the release, and in turn the extractability, of these compounds.

## LITERATURE CITED

1. Fardet A, Rock E and Rémésy C, Is the *in vitro* antioxidant potential of whole-grain cereals and cereals products well reflected *in vivo*? *J Cereal Sci* **48**: 258-276 (2008).
2. Finocchiaro F, Ferrari B and Gianinetti A, A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. *J Cereal Sci* **51**: 28-34 (2010).
3. Abdel-Aal ESM, Young JC and Rabalski I, Anthocyanins composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *J Agric Food Chem* **54**: 4696-4704 (2006).
4. Finocchiaro F, Ferrari B, Gianinetti A, Dall'Asta C, Galaverna G, Scazzina F and Pellegrini N, Characterization of antioxidant compounds of red and white rice and changes in total antioxidant capacity during processing. *Mol Nutr Food Res* **51**: 1006-1019 (2007).
5. Min B, Gu L, McClung AM, Bergman CJ and Chen MH, Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours. *Food Chem* **133**: 715-722 (2012).
6. Towo EE, Svanberg U and Ndossi GD, Effect of grain pre-treatment on different extractable phenolic groups in cereals and legumes commonly consumed in Tanzania. *J Sci Food Agric* **83**: 980-986 (2003).
7. Massaretto IL, Madureira Alves MF, Mussi de Mira NV, Karaoglanovic Carmona A and Lanfer Marquez UM, Phenolic compounds in raw and cooked rice (*Oryza sativa* L.) and their inhibitory effect on the activity of angiotensin I-converting enzyme. *J Cereal Sci* **54**: 236-240 (2011).
8. N'Dri D, Mazzeo T, Zaupa M, Ferracane R, Fogliano V and Pellegrini N, Effect of cooking on the total antioxidant and phenolic profile of some whole-meal African cereals. *J Sci Food Agric* **93**: 29-36 (2013).
9. Tananuwong K and Tangsrianugul N, Effects of storage conditions and cooking on colour and antioxidant activities of organic pigmented rice. *Int J Food Sci Technol* **48**: 67-73 (2013).
10. Parada J and Aguilera JM, Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J Food Sci* **72**: R21-R32 (2007).
11. Horigane AK, Toyoshima H, Hemmi H, Engelaar WMHG, Okubo A and Nagata T, Internal hollows in cooked rice grains (*Oryza sativa* cv. Koshihikari) observed by NMR micro imaging. *J Food Sci* **64**: 1-5 (1999).

12. Ogawa Y, Glenn GM, Orts WJ and Wood FW, Histological structures of cooked rice grain. *J Agric Food Chem* **51**: 7019-7023 (2003).
13. Witek M, Węglarz WP, de Jong L, van Dalen G, Blonk JCG, Heussen P, Van Velzen E, Van As H and van Duynhoven J, The structural and hydration properties of heat-treated rice studied at multiple length scales. *Food Chem* **120**: 1031-1040 (2010).
14. Briffaz A, Mestres C, Escoute J, Lartaud M and Dornier, M, Starch gelatinization distribution and peripheral cell disruption in cooking rice grains monitored by microscopy. *J Cereal Sci* **56**: 699-705 (2012).
15. Tamura M and Ogawa Y, Visualization of the coated layer at the surface of rice grain cooked with varying amounts of cooking water. *J Cereal Sci* **56**: 404-409 (2012).
16. Leelayuthsoontorn P and Thipayarat A, Textural and morphological changes of Jasmine rice under various elevated cooking conditions. *Food Chem* **96**: 606-613 (2006).
17. Mestres C, Ribeyre F, Pons B, Fallet V and Matencio F, Sensory texture of cooked rice is rather linked to chemical than to physical characteristics of raw grain. *J Cereal Sci* **53**: 81-89 (2011).
18. Rewthong O, Soponronnart S, Taechapairoj C, Tungtrakul P and Prachayawarakorn S, Effects of cooking, drying and pretreatment methods on texture and starch digestibility of instant rice. *J Food Engin* **103**: 258-264 (2011).
19. Benzie IFF and Strain JJ, Ferric reducing antioxidant power assay, direct measure the total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* **299**: 15-27 (1999).
20. Ruzin S, *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, Oxford (1999).
21. Walter M, Marchesan E, Massoni PFS, da Silva LP, Sartori GMS and Ferreira RB, Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing. *Food Res Int* **50**: 698-703 (2013).
22. Zieliński H, Kozłowska H and Lewczuk B, Bioactive compounds in the cereal grains before and after hydrothermal processing. *Innov Food Sci Emerg Technol* **2**: 159-169 (2001)
23. Dewanto V, Wu X and Liu RH, Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* **50**: 4959-4964 (2002).
24. Hiemori M, Koh E and Mitchell AE, Influence of cooking on anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L. *japonica* var. SBR). *J Agric Food Chem* **57**: 1908-1914 (2009).

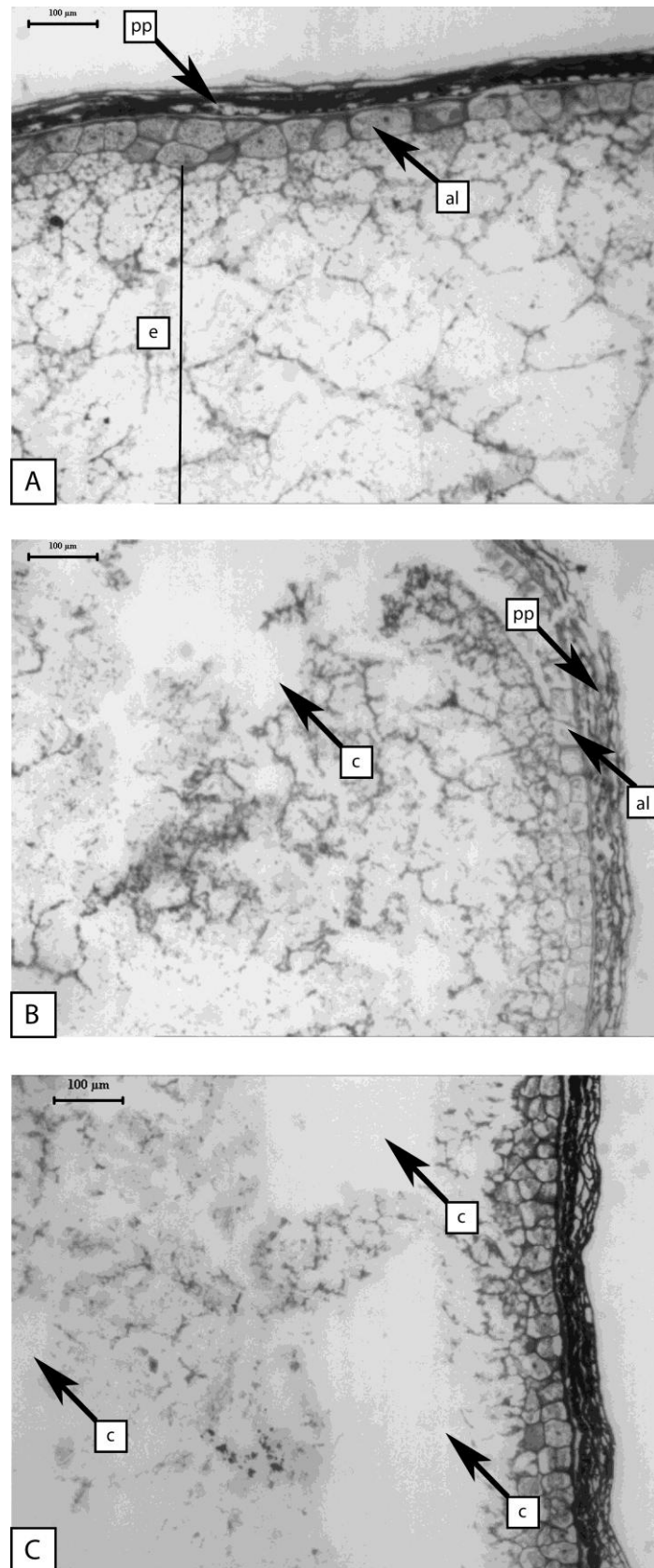
25. Hou Z, Qin P, Zhang Y, Cui S and Ren G, Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. *Food Res Int* **50**: 691-697 (2013).
26. Awika JM, Dykes L, Gu L, Rooney LW and Prior RL, Processing of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products alters procyanidin oligomer and polymer distribution and content. *J Agric Food Chem* **51**: 5516-5521 (2003).
27. Nagah AM and Seal CJ, *In vitro* procedure to predict apparent antioxidant release from wholegrain foods measured using three analytical methods. *J Sci Food Agric* **85**: 1177-1185 (2005).
28. Skrabanja V, Lærke HN ND Kreft I, Protein-polyphenol interactions and *in vivo* digestibility of buckwheat groat proteins. *Eur J Physiol* **440**: R129-R131 (2000).
29. Barros F, Awika JM and Rooney LW, Interaction of tannins and other sorghum phenolic compounds with starch and effects on *in vitro* starch digestibility. *J Agric Food Chem* **60**: 11609-11617 (2012).
30. Mazzaracchio P, Tozzi S, Boga C, Forlani L, Pifferi PG and Barbiroli G, Interaction between gliadins and anthocyan derivatives. *Food Chem* **129**: 1100-1107 (2001).
31. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M and Brighenti F, Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *J Nutr* **133**: 2812-2819 (2002).
32. Bechtel, DB and Pomeranz Y, Ultrastructure of the mature ungerminated rice (*Oryza sativa*) caryopsis. The caryopsis coat and the aleurone cells. *Am J Bot* **64**: 966-973 (1977).
33. Evers T and Millar S, Cereal grain structure and development: some implications for quality. *J Cereal Sci* **36**: 261-284 (2002).
34. Krishnan S, Ebenezer GAI and Dayanandan P, Histochemical localization of storage components in caryopsis of rice (*Oryza sativa* L.). *Current Sci* **80**: 567-571 (2001).
35. Amrani Joutei K, Glories Y and Mercier M, Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis* **33**: 133-138 (1994).

**Table 1.** TAC of raw and cooked rice samples <sup>a</sup>.

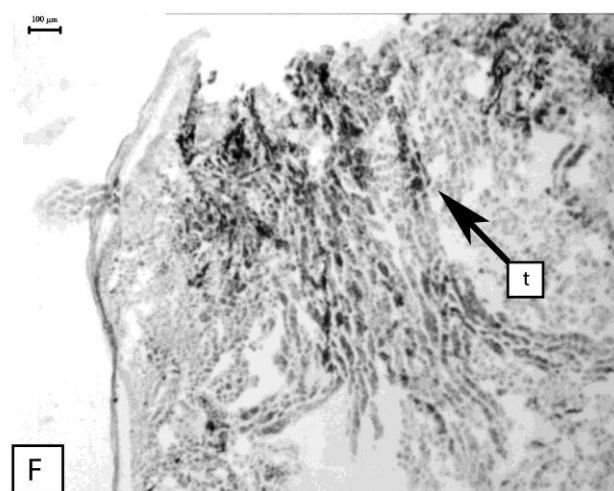
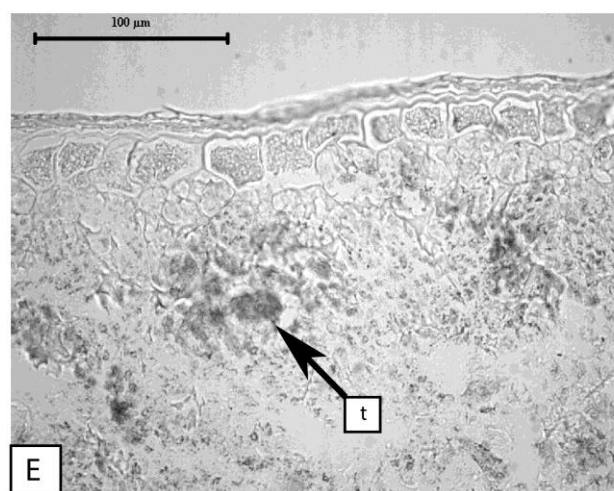
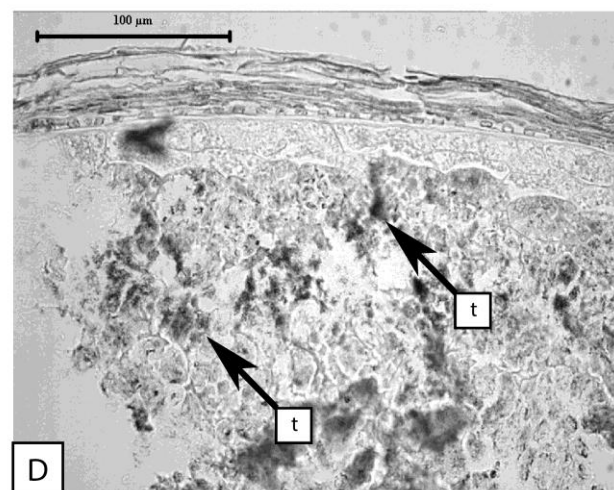
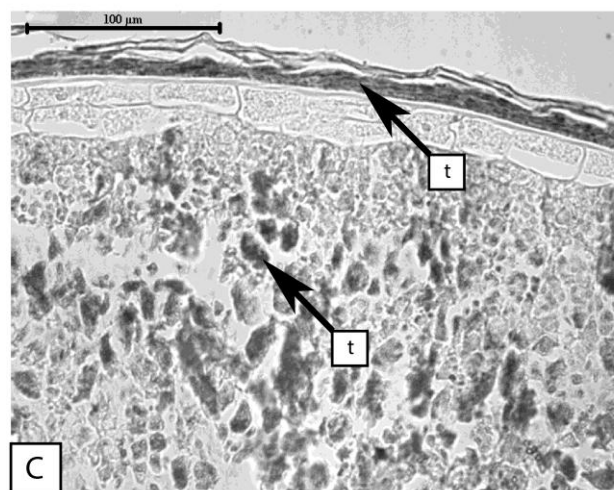
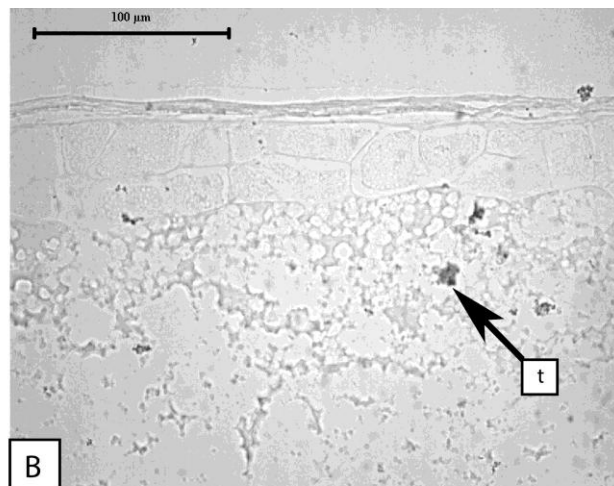
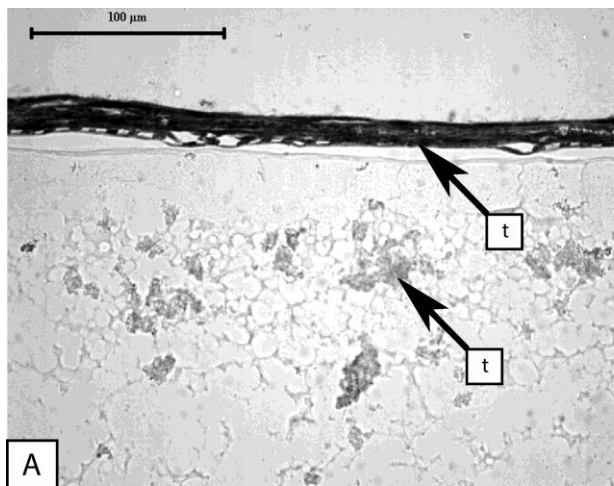
Variety	Water	Ethanol	Soluble#	Bound	Total*
<i>Venere</i>					
raw	29.58 ± 1.63 b	22.94 ± 2.71 a	52.31 ± 1.16 b	11.58 ± 1.11 a	63.89 ± 1.00 b
risotto	45.44 ± 2.68 a	19.63 ± 1.51 b	65.35 ± 4.05 a	8.86 ± 0.91 b	74.23 ± 4.91 a
boiled	14.70 ± 1.26 c	6.21 ± 0.55 c	20.47 ± 2.19 c	9.43 ± 0.76 b	29.99 ± 2.83 c
<i>Ermes</i>					
raw	9.43 ± 0.99 b	23.16 ± 1.15 a	32.55 ± 0.22 a	11.08 ± 0.87 ab	43.63 ± 0.80 a
risotto	13.17 ± 0.68 a	6.38 ± 0.77 b	19.55 ± 1.60 b	10.69 ± 0.49 b	30.26 ± 1.45 b
boiled	5.48 ± 0.50 c	2.82 ± 0.32 c	8.30 ± 0.52 c	11.91 ± 1.00 a	20.17 ± 1.46 c
<i>Ribe</i>					
raw	9.92 ± 0.75 b	5.26 ± 0.27 a	15.15 ± 0.44 a	6.67 ± 0.21 b	21.84 ± 0.63 a
risotto	11.07 ± 1.22 a	2.34 ± 0.24 b	13.42 ± 1.00 b	6.59 ± 0.36 b	20.06 ± 1.26 b
boiled	6.30 ± 0.79 c	1.55 ± 0.17 c	7.85 ± 0.40 c	7.15 ± 0.67 a	15.00 ± 0.62 c

<sup>a</sup> Values are presented as mean ± SD. Data are expressed as mmol Fe<sup>2+</sup> kg<sup>-1</sup> raw sample. # Soluble fraction represents the sum of aqueous and ethanolic fractions. \*Total TAC is the sum of the TAC of soluble and bound fractions. Different letters for each rice variety undergone to different treatments correspond to significant differences ( $P < 0.05$ ) among raw and cooked samples.

**Figure 1.** Transverse section of Venere rice caryopsis stained with Toluidine Blue method. **(A)** uncooked, **(B)** boiled, **(C)** cooked with risotto method. Legend: pp = pericarp and perisperm, al = aleurone layer, e = endosperm, c = crack.



**Figure 2.** Transverse section of rice caryopsis stained with tannin reagent. (A) uncooked Venere rice, (B) uncooked Ribe rice, (C) boiled Venere rice, (D) risotto Venere rice, (E) risotto Ribe rice, (F) boiled Venere rice. The dark inclusions are tannins, as indicated by the arrows.



## **Studio 3**

# **CHARACTERIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF DIFFERENTLY PIGMENTED RICE VARIETIES AND THEIR CHANGES DURING DOMESTIC COOKING**

**Maria Zaupa<sup>1</sup>, Luca Calani<sup>1</sup>, Daniele Del Rio<sup>1</sup>, Furio Brighenti<sup>1</sup>, Nicoletta  
Pellegrini<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Food Science, Human Nutrition Unit, University of Parma

Submitted for publication

## ABSTRACT

Rice is one of the most common meals of the world and some particular varieties, so called pigmented varieties, are becoming more used due to the high amount of secondary metabolites, like phenolic acids and flavonoids. However, the effect of the different cooking processes on the stability and the amount of the phenolic compounds in rice varieties is far to be clarified. In this study, we compared the effect of two different cooking methods (*i.e.* “risotto” and boiling) on the profile and the amount of several phenolic compounds in white, red and black rice varieties. Before the cooking, all the varieties contained several phenolic acids, whereas anthocyanins and flavonols are peculiar of black rice as well as flavan-3-ols of the red rice variety. Both the cooking processes showed a general decrease in the amount of the phenolics, with greater losses in the boiling method. In black rice, total anthocyanins dropped of 30 and 64 % after the risotto and boiling methods, respectively, while flavan-3-ols decreased significantly with both cooking methods, with higher losses observed for dimers with respect to catechin. Concerning to flavonols, in the black rice variety, the boiling method caused the losses of nearly 75 % of the three flavonols; on the contrary, the risotto cooking affected the same compounds to a lesser extent and isorhamnetin 3-O-glucoside was not influenced. Among phenolic acids, only *m*-coumaric acid in all the varieties, and phenolic acid glycosides only in black rice, had a relevant decrease with risotto method, whereas boiling affected also protocatechuic acid and the phenolic acid glycosides in all the varieties.

These data demonstrate that cooking processes characterized by a complete absorption of water, like risotto, is a better choice than boiling in order to save phenolic compounds in terms of stability and amount.

**Keywords:** pigmented rice, domestic cooking, phenolic compounds

## INTRODUCTION

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important staple foods for the population in the world. The most common varieties belong to the white genotype, even if there is an increasing interest for the pigmented varieties, due to their phenolic content in the outer layer of the caryopsis (Fardet et al. 2008; Finocchiaro et al. 2010). The major classes of phenolic compounds present in rice are phenolic acids, flavonols, anthocyanins and procyanidins. Non-pigmented varieties generally contain only phenolic acids and flavonoids, whereas pigmented ones are qualitatively and quantitatively more rich in phenolic compounds. In particular, red rice is characterized by the presence of procyanidins, whereas in black rice anthocyanins or both anthocyanins and procyanidins can be present, depending on the variety (Finocchiaro et al. 2010). In most of the studies these bioactive molecules have been spectrophotometrically quantified as total phenolics and total flavonoids (Shen et al. 2009; Kong and Lee 2010; Zhang et al. 2010; Massaretto et al. 2011; Chen et al. 2012; Min et al. 2012; Walter et al. 2013), whereas the profile of single phenolic acids and flavonoids was less evaluated (Zhou et al. 2004; Tian et al. 2004; Guo and Beta 2013; Pereira-Caro et al. 2013a; Pereira-Caro et al. 2013b).

In literature, there are few studies about the fate of phytochemicals after the thermal treatments in rice. Such studies were focused in particular on the effect of temperature on anthocyanins (Hiemori et al. 2009), and on total phenolic content and antioxidant capacity (Massaretto et al. 2011; Walter et al. 2013). The heat degradation of anthocyanins was observed in black rice cooked with three different methods (Hiemori et al. 2009) and in whole-meals containing blue-wheat bran (Abdel-Aal and Hucl 2003). A detrimental effect of thermal treatment was also noted on flavonoids of buckwheat groats (Dietrych-Szostak and Oleszek 1999). Similarly, in buckwheat spaghetti nearly 40 % of total phenolic content (composed mainly by flavonoids) decreased, and 12 % was leached in cooking water (Verardo et al. 2011). Conversely, contrasting results were observed for phenolic acids. In fact, different effects of cooking on phenolic acids were hypothesized: i) a partial release from the bound form with the consequent increase of the soluble one, ii) a decrease of the soluble compounds by the heat degradation and iii) an increase of the bound form caused by interactions

of phenolic acids with macromolecules of the food matrix (Zielinski et al. 2001; Zielinski et al. 2006; Fares et al. 2010; N'Dri et al. 2013).

The aim of this work was to characterize the phenolic profile in white, red and black rice varieties, selected because of their different phenolic composition, and evaluate the effect of cooking on these compounds. For this purpose, the phenolic compounds were evaluated by LC-MS<sup>n</sup> analysis in raw rice and after cooking by using boiling and “risotto” cooking treatments.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Materials**

Three varieties of whole-meal rice were analyzed: a white variety (Ribe), a red variety (Erme) and a black variety (Venere). The grains were purchased at a local market in Parma (Italy).

### **Chemicals**

Ferulic, vanillic, sinapic, *p*-coumaric, *m*-coumaric and protocatechuic acids, catechin, procyanidin A2 and quercetin 3-*O*-glucoside were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Cyanidin 3-*O*-glucoside and cyanidin 3-*O*-rutinoside were purchased from Extrasynthase (Genay Cedex, France). All chemical used in the study were of analytical grade. Ultrapure water from a MilliQ system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout the experiments.

### **Cooking procedure**

Two different domestic cooking techniques were applied: boiling and “risotto”. Both cooking procedures applied were designed to achieve the complete starch gelatinization. Briefly, 110-120 mg of cereal was weighed into a 10 mL glass tube. The tube was placed in a water bath at 100 °C, added with a previously determined amount of boiling water and covered. The rate water/cereal was 3.6:1 (w/w) for “risotto” and 20:1 (w/w) for boiling. In the case of risotto, the initial volume of water was determined to guarantee that at the end of cooking all the water was absorbed by the

rice. The cooking time was 40 min for all studied varieties and for each cooking procedures. The cooked cereals were then cooled in an ice bath for 5 min. For each variety, cooking trials were performed in triplicate.

### **Extraction procedure**

The extraction procedure to extract the antioxidant compounds of samples, i.e. raw and cooked rice varieties, was the following (N'Dri et al. 2013, with modifications). Raw grains were ground to fine flour using a coffee grinder (model AR100, Moulinex, Ecully Cedex, France), whereas cooked grains were ground by Ultraturax (model T25, Ika, Werke, Staufen im Breisgau, Germany). For the preparation of the soluble extract, each sample was first extracted with 3 mL of water/formic acid (99/1, v/v) under agitation for 15 min at room temperature. The extraction was successively repeated with 2 mL of water/formic acid (99/1, v/v). Each extraction step was followed by centrifugation at 9200 g for 10 min and the clear supernatants were combined. The extraction was repeated twice with ethanol/water/formic acid (98/2/1, v/v/v), and the supernatants were combined. The sum of aqueous and ethanolic fractions represents the free soluble fraction. The extraction residue was further used to extract the bound phenolic compounds. For this purpose, the residue was digested with 1.5 mL of 2 mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide at room temperature for 1 h. After alkaline hydrolysis, the pH of the mixture was adjusted to 3 by adding 1.35 mL of 3 mol L<sup>-1</sup> citric acid. The samples were extracted twice with 5 mL of ethyl acetate and the supernatants were combined. The ethanol and ethyl acetate extracts were evaporated to dryness under a gentle steam of nitrogen at room temperature and the residue was dissolved in aqueous methanol (50/50 v:v) acidified with formic acid (0.1 % v:v). Soluble and bound extracts were kept at -20°C in the dark prior to their analysis.

### **LC-MS<sup>n</sup> analyses**

Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and flavan-3-ols in the three rice varieties were analyzed using an Accela UHPLC 1250 equipped with a linear ion-trap mass spectrometer (LTQ XL, Thermo

Fisher Scientific Inc., San Jose, CA, USA) fitted with a heated-electrospray ionization probe (H-ESI-II; Thermo Fisher Scientific Inc.). The separation was performed using a Blue Orchid-175-1.8  $\mu\text{m}$  C18A (50x2 mm) column (Knauer, Berlin, Germany).

#### *Anthocyanins*

The anthocyanin analysis was carried out in positive ionization mode, using the following conditions. The MS worked with a capillary temperature equal to 275 °C, while the source heater temperature was set to 300 °C. The sheath gas flow was 40 unit, while auxiliary and sweep gases were set to 5 and 0 units, respectively. The source voltage was 4.5 kV. The capillary voltage and tube lens were 20 and 95 V, respectively. For the separation of the analytes, phase A was acetonitrile acidified with formic acid (0.1 %, v/v) and phase B was aqueous formic acid (0.1 %, v/v). The mobile phase, pumped at a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup>, was kept for 12 min in linear gradient from 5 to 40 % A, from 40 to 80 % in 1 min, 80 % A for 3 min, from 80 to 5 % A in 1 min and then 5 min at start conditions to reequilibrate the column.

The analyses were carried out in Full MS<sup>2</sup> mode, monitoring the specific ions that were fragmented using a collision induced dissociation (CID) of 15 (arbitrary units).

The quantification of cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-rutinoside were performed through a calibration curve with the respective commercial standard. Peonidin 3-glucoside was quantified as cyanidin 3-glucoside equivalents, while cyanidin diglucoside and peonidin 3-rutinoside were expressed as cyanidin 3-rutinoside equivalents.

#### *Phenolic acids, flavonols and flavan-3-ols*

The phenolic acids, flavonols and flavan-3-ol analysis was carried out in negative ionization mode, using the following conditions. The MS worked with a capillary temperature equal to 275 °C, while the source heater temperature was set to 200 °C. The sheath gas flow was 40 unit, while auxiliary and sweep gases were set to 5 and 5 units, respectively. The source voltage was 4 kV. The capillary voltage and tube lens were -42 and -117.71 V, respectively. For separation of the

analytes, phase A was acetonitrile acidified with formic acid (0.1 %, v/v) and phase B was aqueous formic acid (0.1 %, v/v). The mobile phase, pumped at a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup>, was kept for 13 min in linear gradient from 5 to 45 % A, from 45 to 80 % in 1 min, 80 % A for 3 min, from 80 to 5 % A in 1 min and then 5 min at starting conditions to reequilibrate the column.

The analyses were carried out in Full MS<sup>2</sup> mode, monitoring the specific ions that were fragmented using a CID of 30. Further MS<sup>3</sup> experiment was carried out for a better identification of phenolic acids and flavonoids using a CID of 30. Pure helium (99.999 %) was used for CID.

The quantification of each phenolic acid was performed through a calibration curve with the respective commercial standard. The concentration of ferulic acid *O*-dihexoside, diferulic acids and triferulic acids was expressed as ferulic acid equivalents. The concentration of vanillic acid *O*-hexoside and sinapic acid *O*-dihexoside was expressed as vanillic acid and sinapic acid equivalents, respectively.

The quantification of quercetin 3-*O*-glucoside was performed through a calibration curve with the respective commercial standard. The concentration of taxifolin *O*-hexoside and isorhamnetin *O*-glucoside was expressed as quercetin 3-*O*-glucoside equivalents.

The quantification of (+)-catechin was performed through a calibration curve by reference to the appropriate standard compound, while B-type procyanidin dimers were expressed as procyanidin A2 equivalents.

### **Statistical analysis**

Means and standard deviations of data were calculated with SPSS Version 19.0 statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). One way analysis of variance and the LSD post-hoc test at a 95 % confidence level ( $p < 0.05$ ) were used to identify differences among the different treatments.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Identification of phenolic compounds in rice samples

Phenolic compounds of the rice varieties analysed are summarized in Tables 1 and 2. The identification was based on the mass-to-charge ratio ( $m/z$ ) of the molecular ion and on the characteristic fragment ions. The comparison with authentic standards was performed whenever possible.

#### *Anthocyanins*

Seven anthocyanins were identified only in the aqueous and ethanolic extracts of black rice. The basis of the proposed identifications are shown in Table 1.

Three isomers (r.t. 4.22, 4.61 and 4.86 min) presented a positive charged molecular ion  $[M]^+$  at  $m/z$  611 and a daughter ion at  $m/z$  287 as the most abundant  $MS^2$  ion (cyanidin), resulting from the loss of two hexose units. Additional  $MS^2$  ions at  $m/z$  355 occurred in all isomers, while a fragment at  $m/z$  449 was produced only in one isomer after the loss of hexose group. The peaks were identified as cyanidin *O*-diglucoside.

One peak (r.t. 4.46 min) had a  $[M]^+$  at  $m/z$  449 and fragmented with the production of a daughter ion at  $m/z$  287 (cyanidin), with the loss of 162 amu corresponding to a hexose group. Through the cochromatography with an authentic standard, the peak was unambiguously identified as cyanidin 3-*O*-glucoside.

One peak (r.t. 4.72 min) had a  $[M]^+$  at  $m/z$  595, which on  $MS^2$  yielded two ions at  $m/z$  449 and 287, corresponding to cyanidin glucoside and free cyanidin, with the loss of 146 amu (rhamnose group) and 308 amu (rutinose group), respectively. Upon the bases of these results and the comparison with an authentic standard, the peak was positively identified as cyanidin 3-*O*-rutinoside.

Two peaks had a  $[M]^+$  at  $m/z$  463 (r.t. 5.07 min) and  $m/z$  609 (rt 5.24 min), 14 amu higher than cyanidin 3-*O*-glucoside and cyanidin 3-*O*-rutinoside, respectively. The first peak had a  $MS^2$  fragment ion at  $m/z$  301, while the second peak was fragmented producing daughter ions at  $m/z$

463 and 301. Based on mass fragmentation behavior of these compounds, two peaks were identified, in elution order, as peonidin 3-*O*-glucoside and peonidin 3-*O*-rutinoside.

#### *Flavan-3-ols*

One peak (r.t. 3.20 min) had a  $[M-H]^-$  at  $m/z$  289, which produced daughter ions at  $m/z$  245, 205, 179, 271. Based on the spectrum and in comparison with authentic standard, the peak was positively identified as (+)-catechin.

Three peaks (r.t. 2.87, 4.00 and 4.49 min, respectively) presented a  $[M-H]^-$  at  $m/z$  577, and  $MS^2$  ions at  $m/z$  425, 451, 407. Based on these fragment ions spectrum, the peaks were identified as B-type dimers of procyanidins.

#### *Flavonols*

One peak (r.t. 4.75 min) had a negative charged molecular ion  $[M-H]^-$  at  $m/z$  465 which gave  $MS^2$  ions at  $m/z$  285, 303, 241. The subsequent fragmentation of the daughter ion at  $m/z$  303 produced  $MS^3$  ions at  $m/z$  167, 285, 193, 165, 259, 177, characteristic of taxifolin. Based on the mass spectrum and according with literature (Sriseadka et al. 2012; Pereira-Caro et al. 2013a), the peak was identified as taxifolin *O*-hexoside.

One peak (r.t. 6.60 min) had a  $[M-H]^-$  at  $m/z$  463. On  $MS^2$  it produced an ion at  $m/z$  301 (loss of hexose group), which was fragmented in  $MS^3$  ions at  $m/z$  179 and 151. This peak was unambiguously identified based on cochromatography with the authentic standard of quercetin 3-*O*-glucoside.

One peak (r.t. 7.25 min) produced a  $[M-H]^-$  at  $m/z$  477 which gave principal  $MS^2$  ions at  $m/z$  314, 315 (loss of hexose group) and 357. The  $MS^2$  ion at  $m/z$  315 was subsequently fragmented to  $m/z$  300, 285, 287 and 313. Based on the mass spectrum and on literature (Sriseadka et al. 2012), the peak was identified as isorhamnetin 3-*O*-glucoside.

### *Phenolic acids*

Protocatechuic, *m*-coumaric, *p*-coumaric, ferulic and sinapic acids were identified by comparison with the authentic standards.

Some hexoside forms of phenolic acids were detected. They were identified by the characteristic loss of one or two hexose groups and by MS<sup>3</sup> spectra.

In particular, one peak (r.t. 4.78 min) presented a [M-H]<sup>-</sup> at m/z 329, which yielded MS<sup>2</sup> ions at m/z 167 (loss of one hexose group), 149 and 125. The MS<sup>2</sup> daughter ion at m/z 167 was subsequently fragmented in MS<sup>3</sup> experiment producing daughter ions at m/z 123 and 81. The peak was tentatively identified as vanillic acid O-hexoside.

One peak (r.t. 5.19 min) produced a [M-H]<sup>-</sup> at m/z 517, which gave on MS<sup>2</sup> three principal peak ions at m/z 355 (loss of one hexose group), 193 (loss of two hexose groups) and 175. The fragment ion at m/z 193 was subsequently fragmented through MS<sup>3</sup> experiment, producing a spectrum which matched with that of ferulic acid (m/z 178, 149 and 134). Therefore, this peak was identified as ferulic acid O-dihexoside.

One peak (r.t. 5.35 min) presented a [M-H]<sup>-</sup> at m/z 547, which fragmented in MS<sup>2</sup> ions at m/z 385 (loss of one hexose group), 223 (loss of two hexose groups), and 205. The fragment at m/z 223 produced on MS<sup>3</sup> experiments the characteristic ions of sinapic acid at m/z 208, 179 and 164. Based on the spectrum and on literature (Sánchez-Rabaneda et al. 2004), the peak was identified as sinapic acid O-dihexoside.

Six peaks had [M-H]<sup>-</sup> at m/z 385. The daughter ions formed are presented in Table 2. The most characteristic MS<sup>2</sup> ions were m/z 341 (loss of carboxyl group), 326 (loss of methyl group from m/z 341), 313, 297 (loss of carboxyl group from m/z 341), 282 (loss of methyl group from m/z 297). Other fragment ions at m/z 370 and m/z 193 were formed, depending on the monitored peak. MS<sup>3</sup> experiments were performed after fragmentation of m/z 341, producing MS<sup>3</sup> ions at m/z 326, 297 and 282. Further MS<sup>3</sup> analyses on m/z 193, produced the same characteristic daughter ions of ferulic acid at m/z 178, 149 and 134. These data were compared with literature (Callipo et al. 2010) and the peaks were thus identified as diferulic acids.

Five peaks (rt 7.31, 8.12, 8.52, 9.49 and 10.21 min) were found corresponding to  $[M-H]^-$  at  $m/z$  577, which produced principal  $MS^2$  ions at  $m/z$  533 (loss of carboxyl group), 489 (loss of carboxyl group from  $m/z$  533), 461, 445, 341, 355, 311. The daughter ion at  $m/z$  533 was subsequently fragmented producing  $MS^3$  ions at  $m/z$  489, 461, 341, 311, 193. One peak (rt 8.12) fragmented the daughter ion at  $m/z$  193, which produced  $MS^3$  ions at  $m/z$  178, 149 and 134 that matched with those of ferulic acid. Based on these mass spectra, the peaks were identified as triferulic acids.

## Quantification of phenolic compounds in raw and cooked rice samples

### *Anthocyanins*

In black rice, five anthocyanins were identified in the free extracts, whereas they were not found in the bound fraction. This observation is in agreement with literature, considering that anthocyanins are typically stored in the vacuole and not bound to insoluble structures of the cell (Finocchiaro et al. 2010). In Table 3 the concentration of the five identified anthocyanins is reported and the content of cyanidin *O*-diglucoside represents the sum of the three isomers.

In raw samples, the most abundant anthocyanin was cyanidin 3-*O*-glucoside, with a concentration of 256  $\mu\text{g/g}$  dry weight (corresponding to 77 % of the total anthocyanin content), followed by peonidin 3-*O*-glucoside (nearly 15 %) and cyanidin *O*-diglucoside (5.5 %). The other identified anthocyanins were present in minor concentration. The total anthocyanin content of the black rice was 334  $\mu\text{g/g}$  dry weight. In the literature data, the total amount of anthocyanins varies significantly among different varieties of black rice. Abdel-Aal et al. (2006) measured a concentration of 3276  $\mu\text{g/g}$  of total anthocyanins, while Hiemori et al. (2009) reported a value of 630  $\mu\text{g/g}$  and Sompong et al. (2011) between 1095 and 2566  $\mu\text{g/g}$ . However, all the authors agreed with the prevalence of cyanidin-3-*O*-glucoside, which represents more than 90 % of total anthocyanin content in some varieties, and the presence of peonidin-3-*O*-glucoside as second anthocyanin (Abdel-Aal et al. 2006; Sompong et al. 2011; Laokuldilok et al. 2011; Chen et al. 2012; Frank et al. 2012; Min et al.

2012). The third anthocyanin in order of content was cyanidin *O*-diglucoside. In the present study, three isomers of this anthocyanin were observed. Similarly, other studies reported the presence of two or three isomers of this anthocyanin (Hiemori et al. 2009; Abdel-Aal et al. 2006). Concerning the characterization of the cyanidin derivative, literature is ambiguous: three studies suggest that this molecule is cyanidin 3,5-*O*-diglucoside (Hou et al. 2013; Pereira-Caro et al. 2013a,b), but a third study excluded this identification due to a mismatch in the comparison with the authentic standard (Hiemori et al. 2009).

The two thermal treatments affected significantly the total anthocyanin content, with a reduction of 30 % and 64 % of the total content in risotto and boiled rice, respectively. A significant decrease of anthocyanins in black rice during thermal processing was already reported by Hiemori et al. (2009), who observed losses of total anthocyanins higher than those measured in the present study (between 65 and 79 %, depending on the cooking method adopted). It was observed that the temperature at which the food is cooked is the predominant factor influencing the stability of anthocyanins in cooked foods (Abdel-Aal and Hucl 2003; Hiemori et al. 2009). In the present work, the temperature was not different in the two cooking methods, therefore the major reduction observed in boiled rice with respect to risotto one is likely to ascribe to the leaching of anthocyanins into the cooking medium during cooking, as already suggested (Towo et al. 2003).

Considering the single anthocyanins, risotto cooking affected peonidin 3-*O*-glucoside and peonidin 3-*O*-rutinoside to a greater extent than their corresponding form with cyanidin as aglycone. This behavior is in disagreement with previous observations on the thermal stability of solutions of pure anthocyanins. In fact, it is reported that cyanidin 3-*O*-glucoside is less stable than peonidin 3-*O*-glucoside and cyanidin 3,5-*O*-diglucoside, because of its chemical conformation (Hou et al. 2013). It is worth to consider that different molecules are able to influence the anthocyanins stability: some phenolic compounds, acting as co-pigments, tend to increase their stability. On the other way, compounds as sugars and their degradation products, are able to accelerate the anthocyanins degradation (Hou et al. 2013). Moreover, the rate of anthocyanin degradation of a whole meal containing blue wheat bran was observed to be different compared to isolated anthocyanins,

suggesting that anthocyanins contained in foods behave differently than pure anthocyanins in solution (Abdel-Aal and Hucl 2003).

#### *Flavan-3-ols*

Flavan-3-ols were identified in the red rice analyzed, not in black and white varieties. It has been previously reported that white genotypes do not contain flavan-3-ols, whereas this class of compounds can be present in some black varieties (Finocchiaro et al. 2010). Flavan-3-ols have been typically observed in the red varieties (Oki et al. 2002; Finocchiaro et al. 2007; Finocchiaro et al. 2010; Min et al. 2012; Pereira-Caro et al. 2013a). As reported in Table 4, (+) catechin and B-type procyanidin dimers were identified in the red variety analyzed, mainly in the free extracts, in total concentrations of 4.6 and 13.5 µg/g dry weight, respectively. Previous studies reported higher values of procyanidins in red rice (Finocchiaro et al. 2007; Min et al. 2012), but they observed also oligomers and polymers of catechin and epicatechin. In the analyzed red variety, flavan-3-ols were present only as monomers and dimers. Similarly, monomers and dimers were mainly identified in a French red variety (Pereira-Caro et al. 2013a).

After both cooking treatments, the flavan-3-ol content significantly decreased, with higher losses observed for dimers. A loss of procyanidins with cooking was already observed in red rice (Finocchiaro et al. 2007), but in disagreement with the present study boiling affected the procyanidin content to a greater extent than risotto cooking. Few studies evaluated the effect of thermal treatment on condensed tannins in sorghum. Dlamini et al. (2007) observed a reduction of these compounds in traditional wet cooked and instant extruded porridges. Moreover, processing of sorghum brans into cookies and bread significantly reduced the procyanidin content, with a more pronounced effect in the higher molecular weight polymers (Awika et al. 2003).

#### *Flavonols*

Belonging to the class of flavonols, quercetin 3-O-glucoside, isorhamnetin 3-O-glucoside and taxifolin O-hexoside were identified and quantified in black rice. Isorhamnetin 3-O-glucoside was observed in traces only in red rice, whereas quercetin 3-O-glucoside was observed in traces, but

not quantified, in the other rice varieties. All the flavonols were present in higher amount in the free fraction, especially taxifolin *O*-hexoside, than in the bound one. The concentrations of the single molecules is reported in Table 5.

In black rice analyzed, among flavonols taxifolin *O*-hexoside had the highest concentration, followed by quercetin 3-*O*-glucoside and isorhamnetin 3-*O*-glucoside. Similar concentrations were previously reported in a Japanese black-purple rice (Pereira-Caro et al. 2013b). Moreover, another study, analyzing four varieties of differently pigmented French rice, identified these molecules in black rice, but not in red, brown and white rice varieties (Pereira-Caro et al. 2013a), in agreement with our results. Quercetin and isorhamnetin derivatives were also detected in seven black rice brans, in concentrations ranging between 26 and 200 µg quercetin equivalents/g and between 40 and 270 µg quercetin equivalents/g for quercetin 3-*O*-glucoside and isorhamnetin 3-*O*-glucoside, respectively (Sriseadka et al. 2012). In the bran of the same varieties, these authors found taxifolin 7-*O*-glucoside in concentrations ranging from 7.7 to 30 µg quercetin equivalents/g (Sriseadka et al. 2012).

Except for the total content of isorhamnetin 3-*O*-glucoside in risotto rice, the thermal processing caused a significant decrease of flavonols amount. In fact, the boiling strongly affected about the 75 % of the total content of all the compounds, whereas the risotto method influenced in a lesser extent. In fact, the total content of quercetin 3-*O*-glucoside and taxifolin *O*-hexoside decreased of 23 % and 39 %, respectively in risotto rice. The detrimental effect of thermal processing on flavonoids, analyzed by chromatographic methods, was already observed in buckwheat groats, with a reduction of flavonoid concentration increased by prolonged temperature treatments (Dietrych-Szostak and Oleszek 1999). Similarly, in the buckwheat spaghetti only 46 % of total phenolic compounds (mainly flavonoids) tolerated the cooking process, whereas 42.4 % of the total phenolic fraction was degraded and 11.6 % was dissolved in cooking water (Verardo et al. 2011). As hypothesized for anthocyanins, the severe losses of flavonols here measured in boiled rice was probably due to the leaching of these compounds into the cooking medium (Towo et al. 2003). The leaching of quercetin mono- and diglucosides has been observed in the water during the cooking

of brown- and red-skinned onions, without any production of free quercetin (Price et al. 1997). The authors concluded that the losses of quercetin glucosides arose mainly from the action of leaching than from the chemical or thermal degradation.

### *Phenolic acids*

The phenolic acid content of rice samples is shown in Tables 4-6. In rice, the phenolic acids are present in free, soluble conjugate and/or insoluble bound forms (Tian et al. 2004). Accordingly, in the analyzed samples, some phenolic acids were detected as single acids, in free or bound form, or conjugated with one or two sugar moieties. In general, the content of insoluble compounds was higher than that of soluble phenolic acids, maybe because phenolic compounds are mostly located in the outer layers of rice grains. In particular, the main portion of ferulic and *p*-coumaric acids is linked to the cell wall polysaccharides (i.e., arabinoxylans) and lignin (Zhou et al. 2004).

Among the single acids, *m*-coumaric and protocatechuic acids were detected mostly in the free fraction, whereas the bound one was dominated by ferulic, *p*-coumaric and sinapic acids. To our knowledge, the presence of *m*-coumaric acid in rice grains has not been reported yet. Conversely, the total protocatechuic acid content, equal to 77 and 16 µg/g in black and red varieties analyzed, respectively, is similar to that reported in previous studies in pigmented varieties (Sompong et al. 2011; Guo and Beta 2013). The concentration of *p*-coumaric, sinapic and ferulic acids found in the three rice varieties analyzed is in accordance to those reported in some varieties of non-pigmented (Zhou et al. 2004; Tian et al. 2004; Mattila et al. 2005) and red (Guo and Beta 2013) rice varieties. Differently, Vichapong et al. (2010) analyzed six varieties of non-pigmented and pigmented Thai rice and observed a lower amount of these acids, measuring concentrations equal to 6.2-12.5 and 11.3-55.4 µg/g dry weight of *p*-coumaric and ferulic acids, respectively.

The main portion of insoluble phenolic acids was represented by diferulic and triferulic acids. Some studies have evaluated the presence and the type of diferulic and triferulic acids in cereals, focusing their attention on the identification of the molecules (Bunzel 2006; Callipo et al. 2010). Few studies have analyzed the content of these compounds in the grains, founding lower amounts.

Mattila et al. (2005) measured 17 mg/kg fresh weight of ferulic acid dehydrodimers in a commercial brown long grain parboiled rice, being ferulic acids dimers determined semiquantitatively by an internal standard method. Moreover, in the alkaline extracts of rice endosperm cell walls the dehydrodimers of ferulic acid were measured in amounts equal to 0.56 mg/g (Shahidi and Naczki 2003).

Regarding the hexosidic forms of phenolic acids, vanillic acid hexoside, sinapic acid dihexoside and ferulic acid dihexoside were detected and quantified. They were present in remarkable concentrations in all the rice varieties, except for vanillic acid hexoside that was found only in the free fraction of the black variety. In the literature some soluble conjugated forms of phenolic acids were reported. In particular, some esters of hydroxycinnamic acids with glucose or other carbohydrates and organic acids, such as feruloyl glucoside and sinapoyl glucoside, have been identified in red rice (Finocchiaro et al. 2007). In a Japanese rice (var. *koshihikari*), the presence of feruloylsucrose and sinapoylsucrose was reported, as the major soluble phenolic compounds in brown rice, along with ferulic acid (Tian et al. 2004). Moreover, the hexosyl glycosidic forms of ferulic, caffeic and syringic acids were detected in durum wheat (Callipo et al. 2010).

The effect of cooking on phenolic acid content of the three rice varieties is reported in Tables 4-6. Considering the overall phenolic acids, in the present study the cooking generally decreased these compounds, especially in boiled samples. In fact, the soluble fraction was more preserved with risotto cooking than with boiling in red and white varieties. Differently in black rice this fraction was affected by both cooking methods. The effect of the two thermal treatments on the bound fraction was similar in all the varieties, with a decrease of the bound phenolic acids.

Considering the phenolic acids present in the analyzed rice varieties mainly in the free fraction, *m*-coumaric acid was significantly affected by both thermal treatments, with higher losses observed in boiled rice, whereas protocatechuic acid was less sensitive to heat treatment, without significant losses for risotto cooking in red variety. Interestingly, in black rice it was observed an important increase of protocatechuic acid concentration after risotto cooking, mainly in aqueous fraction. This effect was likely due to the degradation of cyanidin 3-glucoside, which was converted into

protocatechuic acid, as already proposed by Hiemori et al. (2009). In boiling this effect was not observed, probably due to the leaching of this acid into the cooking medium. The bound phenolic acids were affected by cooking to a lesser extent than the free ones. Only *p*-coumaric acid decreased with both cooking methods, in the three varieties. The other compounds behave differently among the varieties and with the two heat treatments. In the case of the phenolic acid hexosides present in the free fraction, the cooking affected the three compounds differently in the rice varieties. In black rice, the three compounds decreased with both cooking methods. In red and white rices, the two dihexoside compounds behave similarly, displaying significant losses caused by boiling (55-68 %), whereas the risotto cooking did not affect their content. In sweet corn, it was observed that thermal treatment was not able to break the ester linkage of feruloyl oligosaccharides present in the cereal (Dewanto et al. 2002). Therefore, in boiling the losses are probably to ascribe to the leaching of compounds into the cooking medium, whereas in risotto retain of ferulic acid dihexoside was probably due to their thermal stability.

To our knowledge, only few studies have investigated the effect of cooking on the profile of phenolic acids in cereals. Finocchiaro et al. (2007) reported that the total content of sinapic, ferulic and *p*-coumaric acids dropped after both water and risotto cooking treatments in red and white genotypes of rice. Differently, in four grains (wheat, barley, rye and oat) it was observed an increase in all analyzed free and ester-bound phenolic acids, except for sinapic and caffeic acids after extrusion (Zielinski et al. 2001). The changes of the free phenolic acid content were more intensive compared to those related to the ester-bound ones, indicating that a strong hydrothermal processing may liberate phenolic acids from the cell walls (Zielinski et al. 2001). Similar results were found in buckwheat groats treated by an extrusion process (Zielinski et al. 2006). Moreover, an increase of the bound fraction of phenolic acids after cooking was seen in pasta enriched with debranning fractions of wheat, whereas the soluble phenolic acids were not affected (Fares et al. 2010). In a study in which three whole-meal African cereals were analysed, after the cooking process, soluble phenolics increased in sorghum and millet, whereas bound ones decreased in sorghum and were not affected in millet. Differently, in fonio a decrease of soluble phenolic acids

was observed along with an increase in bound ones (N'Dri et al. 2013). In our study, both soluble and bound fractions were affected by cooking in boiled samples, whereas in rices cooked by risotto method free fraction decreased only in black rice. Our results suggest that the decrease of phenolic compounds in the bound fraction is probably due to their partial release. However, this release does not determine an increase of phenolic compounds in the free fraction. This could be due to a partial heating degradation of these compounds. Therefore, the opposite effects, i.e. a release from the bound fraction and the thermal degradation, have as result that, in red and white varieties, the free fraction was not affected by the risotto cooking. A similar behaviour of the phenolic content was already seen in millet by Chandrasekara et al. (2012).

## CONCLUSIONS

In the present study, the phenolic profile of three different pigmented rice varieties has been analyzed, and the quantity of most of them was monitored before and after the risotto and boiling cooking methods. We demonstrated that the risotto cooking, which allows a complete absorption of water, is a better cooking method than the boiling to save phenolic compounds, in terms of stability and amounts. These observations indicate that the consumption whole-meal rice, and in particular the pigmented varieties, should be recommended as a good source of phenolic compounds in the diet, especially when it is cooked with complete absorption of water. and that a part of these remained after cooking.

## LITERATURE CITED

- Abdel Aal E.-S.M., Hucl P. (2003). Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2174-2180.
- Abdel Aal E.-S.M., Young J.C., Rabalski I. (2006). Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4696-4704.
- Bunzel M., Ralph J., Brüning P., Steinhart H. (2006). Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6409-6418.
- Callipo L., Cavaliere C., Fuscoletti V., Gubbiotti R., Samperi R., Laganà A. (2010). Phenylpropanoate identification in young wheat plants by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: monomeric and dimeric compounds. *Journal of Mass Spectrometry* 45: 1026-1040.
- Chen X.Q., Nagao N., Itani T., Irifune K. (2012). Anti-oxidative analysis, and identification and quantification of anthocyanin pigments in different coloured rice. *Food Chemistry* 135: 2783-2788.
- Dewanto V., Wu X., Liu R.H. (2002). Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4959-4964.
- Dietrych-Szostak D., Oleszek W. (1999). Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4384-4387.
- Dlamini N.R., Taylor J.R.N., Rooney L.W. (2007). The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of African sorghum-based foods. *Food Chemistry* 105: 1412-1419.
- Fardet A., Rock E., Rémésy C. (2008). Is the *in vitro* antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected *in vivo*? *Journal of Cereal Science* 48: 258-276.
- Fares C., Platani C., Baiano A., Menga V. (2010). Effect of processing and cooking on phenolic acid profile and antioxidant capacity of durum wheat pasta enriched with debranning fractions of wheat. *Food Chemistry* 119: 1023-1029.
- Finocchiaro F., Ferrari B., Gianinetti A. (2010). A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. *Journal of Cereal Science* 51: 28-34.
- Finocchiaro F., Ferrari B., Gianinetti A., Dall'Asta C., Galaverna G., Scazzina F., Pellegrini N. (2007). Characterization of antioxidant compounds of red and white rice and changes in total antioxidant capacity during processing. *Molecular Nutrition & Food Research* 51: 1006-1019.

- Frank T., Reichardt B., Shu Q., Engel K.-H. (2012). Metabolite profiling of colored rice (*Oryza sativa* L.) grains. *Journal of Cereal Science* 55: 112-119.
- Guo W., Beta T. (2013). Phenolic acid composition and antioxidant potential of insoluble and soluble dietary fibre extracts derived from selected whole-grain cereals. *Food Research International* 51: 518-525.
- Hiemori M., Koh E., Mitchell A.E. (2009). Influence of cooking on anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L. *japonica* var. SBR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1908-1914.
- Hou Z., Qin P., Zhang Y., Ciu S., Ren G. (2013). Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. *Food Research International* 50: 691-697.
- Huang S.H., Ng L.T. (2012). Quantification of polyphenolic content and bioactive constituent of some commercial rice varieties in Taiwan. *Journal of Food Composition and Analysis* 26: 122-127.
- Kong S., Lee J. (2010). Antioxidants in milling fractions of black rice cultivars. *Food Chemistry* 120: 278-281.
- Laokuldilok T., Shoemaker C.F., Jongkaewwattana S., Tulyathan V. (2011). Antioxidants and antioxidant activity of several pigmented rice brans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 193-199.
- Lee J.W. (2010). Identification and quantification of anthocyanins from the grains of black rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Food Science and Biotechnology* 19: 391-397.
- Massaretto I.L., Madureira Alves M.F., Mussi de Mira N.V., Karaoglanovic Carmona A., Lanfer Marquez U.M. (2011). Phenolic compounds in raw and cooked rice (*Oryza sativa* L.) and their inhibitory effect on the activity of angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Cereal Science* 54: 236-240.
- Mattila P., Pihlava J.-M., Hellström J. (2005). Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8290-8295.
- Min B., Gu L., McClung A.M., Begman C.J., Chen M.-H. (2012). Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different grain colours. *Food Chemistry* 133: 715-722.
- N'Dri D., Mazzeo T., Zaupa M., Ferracane R., Fogliano V., Pellegrini N. (2013). Effect of cooking on the total antioxidant capacity and phenolic profile of some whole-meal African cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 29-36.

- Oki T., Masuda M., Kobayashi M., Nishiba Y., Furuta S., Suda I., Sato T. (2002). Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7524-7529.
- Pereira-Caro G., Cros G., Yokota T., Crozier A. (2013a). Phytochemical profiles of black, red, brown, and white rice from the Camargue region of France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 7976-7986.
- Pereira-Caro G., Watanabe S., Crozier A., Fujimura T., Yokota T., Ashihara H. (2013b). Phytochemical profile of a Japanese black-purple rice. *Food Chemistry* 141: 2821-2827.
- Price K.R., Bacon J.R., Rhodes M.J.C. (1997). Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 938-942.
- Sánchez-Rabameda F., Jáuregui O., Lamuela-Raventós R.M., Viladomat F., Bastida J., Codina C. (2004). Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18: 553-563.
- Shahidi F., Naczk M. (2003). *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC Press.
- Shen Y., Jin L., Xiao P., Lu Y., Bao J. (2009). Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science* 49: 106-111.
- Sompong R., Siebenhandl-Ehn S., Linsberger-Martin G., Berghofer E. (2011). Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chemistry* 124: 132-140.
- Srisedka T., Wongpornchai S., Rayanakorn M. (2012). Quantification of flavonoids in black rice by Liquid Chromatography-Negative Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 11723-11732.
- Tian S., Nakamura K., Kayahara H. (2004). Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4808-4813.
- Towo E.E., Svanberg U., Ndossi G.D. (2003). Effect of grain pre-treatment on different extractable phenolic groups in cereals and legumes commonly consumed in Tanzania. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 980-986.
- Verardo V., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Marconi E., Fernández-Gutiérrez A., Caboni M.F. (2011). Determination of free and bound phenolic compounds in buckwheat spaghetti by RP-

HPLC-ESI-TOF-MS: Effect of thermal processing from farm to fork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 7700-7707.

Vichapong J., Sookserm M., Srijesdaruk V., Swatsitang P., Srijaranai S. (2010). High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *LWT-Food Science and Technology* 43: 1325-1330.

Walter M., Marchesan E., Sachet Massoni P.F., Picolli da Silva L., Meneghetti Sarzi Sartori G., Bruck Ferreira R. (2013). Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing. *Food Research International* 50: 698-703.

Zhang M.W., Zhang R.F., Zhang F.X., Liu R.H. (2010). Phenolic profiles and antioxidant activity of black bran of different commercially available varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 7580-7587.

Zhou Z., Robards K., Helliwell S., Blanchard C. (2004). The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chemistry* 87: 401-406.

Zieliński H., Kozłowska H., Lewczuk B. (2001). Bioactive compounds in the cereal grains before and after hydrothermal processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2: 159-169.

Zieliński H., Michalska A., Piskula M.K., Kozłowska H. (2006). Antioxidants on thermally treated buckwheat groats. *Molecular Nutrition & Food Research* 50: 824-832.

**Table 1:** Mass spectral characteristics of anthocyanins in black rice

Rt (min)	Compound	[M] <sup>+</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)
4.22	Cyanidin O-diglucoside	611	355, 287
4.46	Cyanidin 3-O-glucoside	449	287
4.61	Cyanidin O-diglucoside	611	355, 287
4.72	Cyanidin 3-O-rutinoside	595	449, 287
4.86	Cyanidin O-diglucoside	611	355, 449, 287
5.07	Peonidin 3-O-glucoside	463	301
5.24	Peonidin 3-O-rutinoside	609	463, 301

**Table 2:** Mass spectral characteristics of flavan-3-ols, flavonols and phenolic acids in black, red and white rice varieties.

Rt (min)	Compound	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	MS <sup>3</sup> (m/z)
<b>Flavan-3-ols</b>				
2.87	Dimer, type B	577	451, 425, 407	
3.20	(+)-Catechin	289	271, 245, 205, 179	
4.00	Dimer, type B	577	451, 425, 407	
4.49	Dimer, type B	577	451, 425, 407	
<b>Flavonols</b>				
4.75	Taxifolin O-hexoside	465	<u>303</u> , 285, 241,	167, 285, 193, 165, 259, 177
6.60	Quercetin 3-O-glucoside	463	301	179, 151
7.25	Isorhamnetin 3-O-glucoside	477	387, 357, <u>315</u> , 314, 285	300, 285, 287, 313
<b>Phenolic acids</b>				
1.71	Protocatechuic acid	153	109	
4.78	Vanillic acid O-hexoside	329	<u>167</u> , 149, 125	123, 81
5.19	Ferulic acid O-dihexoside	517	355, <u>193</u> , 175,	178, 149, 134
5.35	Sinapic acid O-dihexoside	547	385, <u>223</u> , 205,	208, 179, 164
5.40	<i>p</i> -coumaric acid	163	119	
5.68	Sinapic acid	223	208, 164, 179	
5.99	Ferulic acid	193	178, 149, 134	
6.05	<i>m</i> -coumaric acid	163	119	
6.58	Diferulic acid	385	<u>341</u>	326, 297, 282
6.98	Diferulic acid	385	<u>341</u> , 297	326, 297, 282
7.31	Triferulic acid	577	<u>533</u> , 489, 445	489
8.12	Triferulic acid	577	533, 489, <u>193</u>	178, 149, 134
8.27	Diferulic acid	385	370, <u>341</u> , 326, 297, 282	326, 297, 282
8.52	Triferulic acid	577	<u>533</u> , 489, 461, 341	489, 461, 341
8.92	Diferulic acid	385	341, 313, <u>193</u>	178, 149, 134
9.32	Diferulic acid	385	370, <u>341</u> , 326, 282	326, 297, 282
9.49	Triferulic acid	577	<u>533</u> , 355, 311, 489	489, 461, 311, 296, 193
10.13	Diferulic acid	385	341, 313, <u>193</u>	178, 149, 134
10.21	Triferulic acid	577	<u>533</u> , 505, 461, 433, 383, 355, 313, 193	489, 461, 341, 311, 193, 179

The underlined MS<sup>2</sup> fragment ions were fragmented in MS<sup>3</sup> experiment.

**Table 3:** Anthocyanin content of raw and cooked black rice and percentage of losses by cooking.<sup>a</sup>

	raw	risotto	boiled
Cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside	255.7 ± 4.2 a	184.6 ± 13.7 b (-27.8%)	96.2 ± 0.6 c (-62.4%)
Peonidin 3- <i>O</i> -glucoside	50.8 ± 0.7 a	28.2 ± 0.6 b (-44.4%)	15.5 ± 0.9 c (-69.5%)
Cyanidin 3- <i>O</i> -rutinoside	7.5 ± 0.1 a	6.5 ± 1.0 a (-13%)	1.9 ± 0.4 b (-74.7%)
Peonidin 3- <i>O</i> -rutinoside	1.3 ± 0.1 a	0.8 ± 0.2 b (-38.5%)	0.5 ± 0.0 c (-61.5%)
Cyanidin <i>O</i> -diglucoside <sup>b</sup>	18.6 ± 0.3 a	14.4 ± 0.7 b (-22.6%)	5.4 ± 0.3 c (-71.0%)
<i>Total</i>	333.9 ± 4.4 a	234.5 ± 14.1 b (-29.8%)	119.5 ± 1.2 c (-64.2%)

<sup>a</sup> Values are presented as mean ± SD. Data are expressed as µg/g dry weight. Different letters in the same row correspond to significantly ( $p < 0.05$ ) different samples. Values in parentheses represent the percentage of loss with cooking with respect to raw rice. <sup>b</sup> cyanidin *O*-diglucoside content is the sum of the three peaks.

Peonidin 3-*O*-glucoside was quantified as cyanidin 3-*O*-glucoside equivalents. Peonidin 3-*O*-rutinoside and cyanidin *O*-diglucoside were quantified as cyanidin 3-*O*-rutinoside equivalents.

**Table 4:** The phenolic acid and flavan-3-ol content of raw and cooked red rice.<sup>a</sup>

	raw			risotto			boiled		
	free	bound	<i>total</i>	free	bound	<i>total</i>	free	bound	<i>total</i>
<b>Flavan-3-ols</b>									
(+)-Catechin	4.0 ± 0.9 a	0.6 ± 0.0 f	4.6 ± 0.9 x	1.8 ± 0.2 b	0.3 ± 0.1 g	2.1 ± 0.2 z (-55.9%)	2.8 ± 0.3 b	0.4 ± 0.1 fg	3.3 ± 0.4 y (-30.0%)
Dimer, type B <sup>b</sup>	10.2 ± 1.7 a	3.3 ± 0.4 f	13.5 ± 2.1 x	1.9 ± 0.4 b	0.2 ± 0.0 g	2.2 ± 0.4 y (-81.2%)	3.1 ± 0.2 b	n.q.	3.1 ± 0.2 y (-69.8%)
<b>Phenolic acids</b>									
Protocatechuic acid	14.6 ± 1.8 a	1.1 ± 0.1 f	15.7 ± 1.7 x	13.6 ± 1.2 a	n.q.	13.6 ± 1.2 x (-13.1%)	5.2 ± 0.2 b	n.q.	5.2 ± 0.2 y (-66.9%)
p-coumaric acid	n.q.	65.5 ± 1.6 f	65.5 ± 1.6 x	n.q.	47.8 ± 5.2 g	47.8 ± 5.2 y (-27.0%)	n.q.	43.4 ± 4.1 g	43.4 ± 4.1 y (-33.7%)
Sinapic acid	n.d.	16.1 ± 3.7 fg	16.1 ± 3.7 xy	n.d.	13.3 ± 0.4 g	13.3 ± 0.4 y (-17.4%)	n.d.	18.1 ± 0.1 f	18.1 ± 0.1 x (+12.7%)
Ferulic acid	n.q.	322.1 ± 35.8 f	322.1 ± 35.8 x	n.q.	223.5 ± 32.2 g	223.5 ± 32.2 y (-30.6%)	n.q.	241.3 ± 32.5 g	241.3 ± 32.5 y (-25.1%)
Diferulic acid <sup>b</sup>	n.d.	24455 ± 2056 f	24455 ± 2056 x	n.d.	17252 ± 3020 g	17252 ± 3020 y (-29.5%)	n.d.	17455 ± 2071 g	17455 ± 2071 y (-28.6%)
Triferulic acid <sup>b</sup>	n.d.	8792 ± 192 f	8792 ± 192 x	n.d.	6155 ± 901 g	6155 ± 901 y (-30.0%)	n.d.	7496 ± 1357 fg	7496 ± 1357 xy (-14.7%)
Sinapic acid O-dihexoside	222.2 ± 4.9 a	n.d.	222.2 ± 4.9 x	259.3 ± 76.6 a	n.d.	259.3 ± 76.6 x (+16.7%)	100.6 ± 1.5 b	n.d.	100.6 ± 1.5 y (-54.7%)
Ferulic acid O-dihexoside	2205.8 ± 103.8 a	n.d.	2205.8 ± 103.8 x	2400.9 ± 298.5 a	n.d.	2400.9 ± 298.5 x (+8.8%)	718.6 ± 143.0 b	n.d.	718.6 ± 143.0 y (-67.4%)

<sup>a</sup> Values are presented as mean ± SD. Data are expressed as µg/g dry weight. Different letters in the same row correspond to significantly (p<0.05) different samples. The letters a,b,c are referred to the free fraction; the letters f,g,h are referred to the bound fraction; the letters x,y,z are referred to the total content. The values in parentheses represent the percentage of loss with cooking with respect to raw rice. n.q.= not quantifiable; n.d.= not detected. <sup>b</sup> the content of diferulic and triferulic acids and dimers of procyanidin are the sum of the corresponding peaks.

B-type procyanidin dimers were quantified as procyanidin A2 equivalents. Ferulic acid *O*-dihexoside, diferulic acids and triferulic acids were quantified as ferulic acid equivalents. Sinapic acid *O*-dihexoside was quantified as sinapic acid equivalents.

**Table 5:** The phenolic acid and flavonol content of raw and cooked black rice.<sup>a</sup>

	raw			risotto			boiled		
	free	bound	<i>total</i>	free	bound	<i>total</i>	free	bound	<i>total</i>
<b>Flavonols</b>									
Taxifolin O-hexoside	118.1 ± 3.6 a	0.5 ± 0.1 f	118.7 ± 3.5 x	72.0 ± 4.3 b	n.q.	72.0 ± 4.3 y (-39.3%)	30.2 ± 1.3 c	n.q.	30.2 ± 1.3 z (-74.5%)
Quercetin 3-O-glucoside	22.5 ± 3.5 a	8.8 ± 1.5 f	31.3 ± 2.4 x	22.4 ± 2.9 a	1.5 ± 0.1 g	23.9 ± 2.9 y (-23.7%)	8.3 ± 2.0 b	0.2 ± 0.0 g	8.5 ± 2.0 z (-73.0%)
Isorhamnetin 3-O-glucoside	4.5 ± 1.1 a	1.5 ± 0.2 f	6.0 ± 1.1 x	5.6 ± 0.4 a	0.2 ± 0.0 g	5.7 ± 0.4 x (-5.4%)	1.4 ± 0.2 b	0.1 ± 0.0 g	1.5 ± 0.2 y (-74.6%)
<b>Phenolic acids</b>									
Protocatechuic acid	65.6 ± 4.4 b	11.8 ± 1.8 f	77.4 ± 4.7 y	273.9 ± 8.5 a	6.5 ± 1.2 g	280.4 ± 9.1 x (+262.4%)	40.9 ± 1.5 c	4.2 ± 1.1 h	45.1 ± 0.4 z (-41.7%)
<i>m</i> -coumaric acid	164.9 ± 2.0 a	10.2 ± 3.2 f	175.1 ± 2.3 x	107.5 ± 5.5 b	5.6 ± 0.5 g	113.1 ± 5.1 y (-35.4%)	46.6 ± 1.5 c	5.6 ± 0.2 g	52.1 ± 1.4 z (-70.2%)
<i>p</i> -coumaric acid	n.q.	35.9 ± 1.8 f	35.9 ± 1.8 x	n.q.	32.1 ± 1.1 g	32.1 ± 1.1 y (-10.5%)	n.q.	25.9 ± 0.9 h	25.9 ± 0.9 z (-27.8%)
Ferulic acid	n.q.	188.2 ± 12.8 f	188.2 ± 12.8 x	n.q.	166.7 ± 29.5 f	166.7 ± 29.5 x (-11.4%)	n.q.	206.3 ± 41.2 f	206.3 ± 41.2 x (+9.6%)
Diferulic acid <sup>b</sup>	n.d.	23329 ± 2461 f	23329 ± 2461 x	n.d.	17052 ± 1627 g	17052 ± 1627 y (-26.9%)	n.d.	17775 ± 1371 g	17775 ± 1371 y (-23.8%)
Triferulic acid <sup>b</sup>	n.d.	8946 ± 291 f	8946 ± 291 x	n.d.	4899 ± 363 h	4899 ± 363 z (-45.2%)	n.d.	6712 ± 794 g	6712 ± 794 y (-25.0%)
Vanillic acid O-hexoside	4077.7 ± 231.9 a	n.d.	4077.7 ± 231.9 x	2441.1 ± 146.7 b	n.d.	2441.1 ± 146.7 y (-40.1%)	932.5 ± 6.7 c	n.d.	932.5 ± 6.7 z (-77.1%)
Sinapic acid O-dihexoside	579.0 ± 67.4 a	n.d.	579.0 ± 67.4 x	148.5 ± 4.5 b	n.d.	148.5 ± 4.5 y (-74.3%)	140.0 ± 9.3 b	n.d.	140.0 ± 9.3 y (-75.8%)
Ferulic acid O-dihexoside	7137.9 ± 1438.9 a	n.d.	7137.9 ± 1438.9 x	4491.1 ± 332.0 b	n.d.	4491.1 ± 332.0 y (-47.3%)	1767.8 ± 65.8 c	n.d.	1767.8 ± 65.8 z (-79.3%)

<sup>a</sup> Values are presented as mean ± SD. Data are expressed as µg/g dry weight. Different letters in the same row correspond to significantly (p<0.05) different samples. The letters a,b,c are referred to the free fraction; the letters f,g,h are referred to the bound fraction; the letters x,y,z are

referred to the total content. The values in parentheses represent the percentage of loss with cooking with respect to raw rice. n.q.= not quantifiable; n.d.= not detected. <sup>b</sup> the content of diferulic and triferulic acids are the sum of the corresponding peaks.

Taxifolin *O*-hexoside and isorhamnetin *O*-glucoside were quantified as quercetin 3-*O*-glucoside equivalents. Ferulic acid *O*-dihexoside, diferulic acids and triferulic acids were quantified as ferulic acid equivalents. Vanillic acid *O*-hexoside and sinapic acid *O*-dihexoside were quantified as vanillic acid and sinapic acids equivalents, respectively.

**Table 6:** The phenolic acid content of raw and cooked white rice.<sup>a</sup>

	raw			risotto			boiled		
	free	bound	total	free	bound	total	free	bound	total
<b>Phenolic acids</b>									
<i>m</i> -coumaric acid	102.2 ± 7.6 a	8.6 ± 1.9 f	110.8 ± 9.4 x	75.5 ± 4.5 b	6.9 ± 1.5 f	82.5 ± 3.0 y (-25.6%)	37.3 ± 2.5 c	n.q.	37.3 ± 257 z (-66.3%)
<i>p</i> -coumaric acid	n.q.	75.9 ± 1.6 f	75.9 ± 1.6 x	n.q.	67.4 ± 2.0 g	67.4 ± 2.0 y (-11.2%)	n.q.	68.5 ± 3.4 g	68.5 ± 3.4 y (-9.8%)
Sinapic acid	n.d.	28.0 ± 0.8 f	28.0 ± 0.8 x	n.d.	18.7 ± 0.5 g	18.7 ± 0.5 y (-33.1%)	n.d.	9.3 ± 0.3 h	9.3 ± 0.3 z (-66.8%)
Ferulic acid	n.q.	494.3 ± 48.4 f	494.3 ± 48.4 x	n.q.	533.4 ± 11.5 f	533.4 ± 11.5 x (+7.9%)	n.q.	357.6 ± 33.2 g	357.6 ± 33.2 y (-27.7%)
Diferulic acid <sup>b</sup>	n.d.	19188 ± 876 f	19188 ± 876 x	n.d.	14844 ± 2119 g	14844 ± 2119 y (-22.6%)	n.d.	18510 ± 1506 f	18510 ± 1506 x (-3.5%)
Triferulic acid <sup>b</sup>	n.d.	11023 ± 502 fg	11023 ± 502 xy	n.d.	12841 ± 1553 f	12841 ± 1553 x (+14.6%)	n.d.	7779 ± 939 g	7779 ± 939 y (-30.6%)
Sinapic acid O-dihexoside	271.0 ± 28.7 a	n.d.	271.0 ± 28.7 x	276.6 ± 59.2 a	n.d.	276.6 ± 59.2 x (+2.0%)	88.1 ± 9.3 b	n.d.	88.1 ± 9.3 y (-67.5%)
Ferulic acid O-dihexoside	9883.4 ± 2057.0 a	n.d.	9883.4 ± 2057.0 x	9360.7 ± 554.0 a	n.d.	9360.7 ± 554.0 x (-5.3%)	3143.4 ± 470.4 b	n.d.	3143.4 ± 470.4 y (-68.2%)

<sup>a</sup> Values are presented as mean ± SD. Data are expressed as µg/g dry weight. Different letters in the same row correspond to significantly ( $p < 0.05$ ) different samples. The letters a,b,c are referred to the free fraction; the letters f,g,h are referred to the bound fraction; the letters x,y,z are referred to the total content. The values in parentheses represent the percentage of loss with cooking with respect to raw rice. n.q.= not quantifiable; n.d.= not detected. <sup>b</sup> the content of diferulic and triferulic acids are the sum of the corresponding peaks.

Ferulic acid O-dihexoside, diferulic acids and triferulic acids were quantified as ferulic acid equivalents. Sinapic acid O-dihexoside was quantified as sinapic acid equivalents.

# *Conclusioni*

Sempre maggiori evidenze scientifiche hanno messo in luce come il consumo di cereali e di prodotti integrali, rispetto ai prodotti raffinati, contribuisca alla prevenzione delle malattie cronicodegenerative. In molti Paesi occidentali, tuttavia, si stima che il consumo di prodotti integrali sia minore delle quantità raccomandate. Un aspetto che influenza la scelta del consumatore è sicuramente l'aspetto visivo. Per questo motivo, negli ultimi anni si è assistito ad un crescente interesse nello sviluppo di tecnologie e tecniche molitorie che permettano l'isolamento di frazioni cruscali selezionate, da utilizzare come ingrediente nella formulazione di prodotti a base di cereali. In particolare, lo strato aleuronico è la frazione che desta maggiore interesse, in quanto ricco di micronutrienti e composti bioattivi.

Nello studio "*In vitro* bioaccessibility of phenolics and vitamins from durum wheat aleurone fractions" sono state analizzate diverse frazioni ricche di strato aleuronico. Queste frazioni e un campione di controllo costituito da crusca sono state sottoposte ad un modello di digestione *in vitro*, per valutare la bioaccessibilità di vitamine, composti fenolici e capacità antiossidante. I risultati ottenuti hanno messo in luce come le frazioni aleuroniche analizzate siano nutrizionalmente interessanti, grazie al loro elevato contenuto in fibra e un'eccellente bioaccessibilità delle vitamine e dei composti fenolici. In particolare, è stata vista una maggiore bioaccessibilità dei composti fenolici, delle vitamine e della capacità antiossidante presenti nella parte più interna dello strato aleuronico rispetto a quelli della parte più esterna dell'aleurone e della crusca. Questo risultato sembra essere dovuto ad una diversa composizione e struttura della matrice delle frazioni analizzate. Infatti, la parte più esterna dell'aleurone contiene più fibra a cui i composti si legano, mentre nell'aleurone più interno è presente una maggior porzione di composti in forma libera. A conferma di questa osservazione, tra gli acidi fenolici e le vitamine analizzati, sono risultati essere maggiormente bioaccessibili i composti localizzati nei compartimenti intracellulari in forma libera. Diversamente, la bioaccessibilità dei composti presenti nei cereali in forma legata, sia ai polisaccaridi delle pareti cellulari sia ad altre componenti della matrice, è risultata ridotta. Questo comportamento suggerisce l'importanza svolta dalla struttura della matrice nel definire l'accessibilità dei composti.

La frazione contenente la parte più interna dello strato aleuronico è risultata quindi, tra le frazioni, essere quella che presenta le caratteristiche nutrizionali più interessanti. Questi risultati suggeriscono che queste frazioni, e in particolare la parte più interna dell'aleurone, possano essere utilizzate come ingredienti nella formulazione di nuovi prodotti, consentendo di ottenere un alimento con le caratteristiche nutrizionali di un prodotto integrale, ma che si presenta visivamente e sensorialmente come un prodotto raffinato. Questo studio rappresenta una prima valutazione sulla qualità nutrizionale delle frazioni aleuroniche. Partendo da questo studio, potrebbe essere interessante utilizzare le frazioni come ingredienti in un nuovo prodotto, quale pane o pasta, e

valutare la bioaccessibilità dei composti nel prodotto finito. Inoltre, un interessante sviluppo futuro sarà la valutazione dell'effetto *in vivo* dei prodotti formulati con queste frazioni, in modo da valutare l'effettiva biodisponibilità dei composti.

Una seconda parte del progetto di dottorato ha voluto studiare l'effetto della cottura su tre varietà di riso integrale differenziate pigmentate: una varietà a pigmentazione nera, una a pigmentazione rossa e una terza varietà non pigmentata.

L'analisi del profilo fenolico del riso ha messo in luce che queste varietà sono caratterizzate da composti fenolici appartenenti a diverse classi. In particolare, la varietà a pigmentazione nera è caratterizzata dalla presenza di antocianine, flavonoli e acidi fenolici, mentre la varietà rossa contiene flavan-3-oli e acidi fenolici. Nella varietà non pigmentata sono stati identificati principalmente acidi fenolici. La presenza di diverse molecole negli strati esterni della cariosside è stata evidenziata anche con l'osservazione microscopica tramite il reattivo per i tannini. Sono state notate delle inclusioni di "tannini" in tutte e tre le varietà di riso; in particolare, queste inclusioni erano presenti in forme diverse tra le varietà. Questo potrebbe suggerire che le inclusioni siano composte da molecole diverse, ma la tecnica dell'osservazione microscopica non consente di affermarlo, poiché non è in grado di dare indicazioni sulle classi di composti presenti.

Considerando l'effetto del trattamento termico sulla struttura del riso, entrambi i metodi di cottura hanno causato la formazione di fratture nella cariosside, e a livello dei tessuti l'effetto maggiore si è notato nell'endosperma, con lisi cellulare e conseguente rilascio del contenuto, mentre gli strati più esterni non hanno subito rilevanti modifiche. In particolare, l'osservazione anatomica del riso ha rivelato che in tutte le varietà la cottura a risotto ha danneggiato la struttura maggiormente rispetto alla bollitura. Diversamente, la capacità antiossidante è risultata maggiormente preservata con la cottura a risotto rispetto alla bollitura. Anche l'analisi dei composti fenolici ha mostrato una minore diminuzione di questi dopo cottura a risotto rispetto alla bollitura. Questo effetto è stato spiegato con la lisciviazione dei composti nel liquido di cottura durante il trattamento termico. Al contrario, nel caso della cottura a risotto, in cui l'acqua di cottura viene completamente assorbita, le osservazioni dei cambiamenti della struttura al microscopio hanno consentito di ipotizzare il riassorbimento dei composti lisciviati, che probabilmente avviene in corrispondenza delle fratture.

Considerando le diverse varietà, la capacità antiossidante è risultata aumentata nel riso a pigmentazione nera dopo cottura a risotto, mentre nelle altre due varietà è diminuita. Questo diverso comportamento tra le varietà può essere spiegato dalla diversa composizione in composti antiossidanti che risentono del trattamento di cottura in modo differente. Tuttavia, l'analisi dei

composti fenolici non ha permesso di chiarire l'aumento di capacità antiossidante che si osserva nel riso a pigmentazione nera dopo cottura a risotto. I singoli composti, infatti, diminuiscono o restano costanti con la cottura, ad eccezione dell'acido protocatecuico che aumenta significativamente, ma il cui aumento non è sufficiente per spiegare i più alti valori di capacità antiossidante rispetto al prodotto crudo. E' da considerare che nel riso sono presenti altre classi di composti non fenolici che possono contribuire alla capacità antiossidante, quali ad esempio carotenoidi e  $\gamma$ -orizanoli. Inoltre, la capacità antiossidante non rappresenta una semplice somma dei potenziali antiossidanti dei singoli composti, ma dipende anche dalle loro interazioni sinergiche.

La capacità antiossidante può essere influenzata anche dalla struttura e dalle interazioni che intercorrono tra i composti antiossidanti e le componenti della matrice. Nonostante la struttura del riso abbia risentito in modo diverso dei due tipi di trattamento termico, l'effetto della cottura non ha mostrato differenze importanti tra le varietà analizzate. Tuttavia, considerando la struttura in relazione ai composti antiossidanti presenti nel riso possono essere fatte alcune considerazioni. Le perdite minori di capacità antiossidante sono state osservate nel riso non pigmentato, in cui sono presenti principalmente acidi fenolici in forma legata, il cui legame li rende meno suscettibili alla cottura. Inoltre, durante la cottura la struttura del cereale viene parzialmente degradata, e la lisi cellulare permette il rilascio dei composti antiossidanti dai loro compartimenti, rendendoli maggiormente accessibili all'estrazione. I composti rilasciati, tuttavia, possono entrare in contatto con le altre componenti della matrice e creare interazioni, con conseguente diminuzione dell'estraibilità. La formazione di interazioni dipende dalla natura delle molecole, e si è visto che tra i composti fenolici le procianidine interagiscono maggiormente con le altre componenti, quali amido e proteine. Queste interazioni, insieme al diverso effetto termico sui diversi composti e agli effetti sinergici tra le molecole che concorrono alla capacità antiossidante, potrebbero contribuire nel diverso effetto della cottura sulla capacità antiossidante nelle tre varietà.

L'analisi della struttura degli alimenti è un argomento attuale, e recentemente numerosi studi sono stati pubblicati al riguardo. Questi studi hanno però messo in relazione la struttura con le proprietà fisico-chimiche o sensoriali dei prodotti, mentre manca un confronto con le caratteristiche nutrizionali. Come si è visto da questo lavoro, per comprendere in modo più completo l'effetto dei trattamenti sulle proprietà nutrizionali di un alimento è importante indagare anche la struttura anatomica con l'obiettivo di valutare i fattori che possono influenzare il rilascio e l'estraibilità dei composti bioattivi. Lo studio della struttura, tramite l'osservazione della conformazione delle componenti dell'alimento, quali i diversi tessuti e le diverse macromolecole, potrebbe inoltre aiutare a dare un'indicazione della potenziale bioaccessibilità di alcuni composti nutrizionalmente interessanti, con l'obiettivo di selezionare le componenti dell'alimento con una maggiore bioaccessibilità, da utilizzare come ingredienti nella formulazione di prodotti innovativi.