

TECNICA MOLITORIA

MANGIMIFICI - PASTIFICI - MOLINI - SILI

Realizzare impianti ...

*Gli impianti MS "chiavi in mano",
soddisfano pienamente le esigenze
dei Clienti.*



Molino a grano tenero da 120 T/24H
BRESCIA / ITALIA



Molino a grano tenero da 120 T/24H
BRESCIA / ITALIA

... è la nostra arte.



Padova/Italia

**molini da grano - molini da mais
silos cereali - silos farine**

Via Pelosa, 78
35030 Selvazzano Dentro (PD)
Ph. 049 8978743/8978744
Fax 049 8978780
Info@ms-italia.com
www.ms-italia.com



CHIRIOTTI EDITORI

Ricerca del grano tenero in miscela con il duro negli sfarinati e nelle paste variamente essiccate

Analisi della componente lipidica e degli esteri degli steroli

Soft wheat detection in durum wheat meal and dried pasta
by analysing the lipidic fraction and the steryl esters

D. Naviglio - R. Romano - C. Raia - G. Lambiase - R. Ferriero - G. Nota - S. Spagna Musso
Dipartimento di Scienza degli Alimenti - Università degli Studi di Napoli "Federico II" -
Via Università 100 - 80055 Portici - NA - Italia

SUMMARY

In this paper an alternative procedure of analysis of hard grain/soft grain wheat mixtures is proposed. The current method of analysis is based on the electrophoretic analysis of proteic component; this investigative procedure is applicable to the milled wheat but is not suitable for pasta because of the proteic compounds degradation during the pasta drying phase. The proposed method is based on the isolation of lipidic fraction from wheat meal and pasta and on the following gaschromatographic analysis of steryl esters, which are not degraded during pasta making. On the basis of evaluation of some specific ratios between the steryl esters, it is possible to determine the percentage of soft grain mixed to the hard grain both in the milled wheat and pasta.

SOMMARIO

In questo lavoro viene proposta una procedura alternativa di analisi delle miscele di grano tenero in grano duro sia come sfarinati che dopo la pastificazione. L'attuale metodo di indagine basa l'analisi sulla componente proteica che viene risolta attraverso l'elettroforesi. Tale metodo è applicabile alle miscele degli sfarinati, mentre sulle paste il metodo fallisce in quanto la componente proteica viene degradata in seguito al riscaldamento del prodotto durante la fase di essiccazione. Il metodo proposto nel presente lavoro si basa sull'isolamento della frazione lipidica degli sfarinati e delle paste e sull'analisi gascromatografica degli esteri degli steroli, che non vengono alterati durante la fase di pastificazione. In base alla valutazione di alcuni specifici rapporti tra esteri degli steroli è possibile risalire alla percentuale di grano tenero presente in miscela con il grano duro, sia negli sfarinati che nelle paste.

INTRODUZIONE

Il frumento è una graminacea del genere *Triticum*, di cui sono note numerose specie. Le più comuni e le più importanti dal punto di vista merceologico sono il *Triticum aestivum* o *vulgare*, comunemente detto grano tenero, e il *Triticum durum* o grano duro. Il grano tenero si presta a essere coltivato a latitudini e climi molto diversi, caldi temperati e freddi e dalla sua macinazione si ottiene la "farina di grano tenero" o "farina" destinata alla produzione del pane e dei dolci.

Il grano duro invece può essere coltivato soltanto in zone a clima caldo; a causa di questa limitazione il suo costo è più elevato rispetto a quello del grano tenero. Dalla macinazione del grano duro si ottiene la "farina di grano duro" comunemente nota come "semola" che è particolarmente adatta alla produzione delle paste alimentari (1).

Ogni qualvolta si parla "di pasta di semola di grano duro" si associa istintivamente l'immagine di questo prodotto all'Italia, dove viene ancora preparata secondo la tradizionale ricetta che prevede l'impiego esclusivo di semola.

Secondo la legge italiana (2) sono denominate "pasta di semola di grano duro" e "pasta di semolato di grano duro", i prodotti ottenuti dalla trafilazione, laminazione e conseguente essiccamento di impasti preparati rispettivamente ed esclusivamente:

- con semola di grano duro e acqua;
- con semolato di grano duro e acqua.

La normativa vigente consente, inoltre, la produzione di paste all'uovo e di paste speciali contenenti vari ingredienti alimentari che devono essere preparate utilizzando esclusivamente la semola di grano duro. Fanno eccezione le paste fresche, caratterizzate da

un contenuto di acqua che non può superare il 30%, per le quali è permesso l'uso della farina di grano tenero.

Nel 1998 il Parlamento italiano ha convertito in legge una circolare ministeriale emanata nel 1992 in seguito al recepimento di normative comunitarie (3), secondo la quale l'Italia permette l'importazione e la commercializzazione di paste alimentari ottenute da miscele di grano tenero e grano duro legalmente prodotte negli altri Paesi membri della Comunità Europea purché sia riportata in etichetta l'esatta composizione del prodotto commercializzato; in particolare le confezioni devono recare le seguenti indicazioni:

- a) "Pasta di semola di grano duro", qualora essa sia prodotta solo con grano duro;
- b) "Pasta di semola di grano duro e sfarinati di grano tenero", qualora il primo componente prevalga sul secondo;
- c) "Pasta di sfarinati di grano tenero e semola di grano duro", qualora il primo componente prevalga sul secondo;
- d) "Pasta di sfarinati di grano tenero", qualora essa sia prodotta solo con grano tenero (4).

Attualmente i moderni processi di produzione della pasta alimentare prevedono due diverse tecnologie di essiccazione, differenti per la coppia di parametri tempo-temperatura. La tecnologia HT, prevede una temperatura dell'aria di massimo 70°C, con una durata del ciclo termico di circa 19 ore, mentre la tecnologia THT prevede una temperatura dell'aria di massimo 90°C per un tempo totale di circa quattro ore (5).

L'uso della semola e del semolato come materie prime di base per la produzione industriale della pasta è legato alle caratteristiche funzionali e tecnologiche del glutine, che caratterizza l'indice di cottura e la resistenza alla cottura,

attributi fondamentali per la qualità della pasta. Il glutine è un complesso lipoproteico plastico ed elastico che si forma per interazione di unità prolaminiche (gliadine) e gluteniniche in seguito all'idratazione e all'azione meccanica dell'impastamento (6, 7).

La formazione del glutine genera una rete proteica tridimensionale che va a costituire l'impalcatura dell'impasto, fra le cui maglie sono disposti granuli d'amido e aria (8). La frazione più importante del glutine nel processo di pastificazione (diversamente da quello di panificazione) è la gliadina, che ha il ruolo sia di conferire fluidità agli impasti densi, consentendo di formare la pasta per estrusione attraverso le trafile, sia di unire i granuli di amido.

I vantaggi dell'utilizzazione del grano duro come materia prima per le paste alimentari consistono quindi nella superiorità della frazione gliadinica rispetto a quella gluteninica (nel grano tenero si osserva invece un rapporto inverso) e nell'elevata presenza di carotenoidi che conferiscono alla pasta un caratteristico colore ambrato (9).

Per i motivi sopra esposti, è auspicabile che le paste siano prodotte con sfarinati di grano duro, invece in diversi Paesi si assiste ad una grave carenza di tale sfarinato per cui si ricorre alla farina di grano tenero la cui coltivazione richiede inoltre meno cure ed offre un maggiore rendimento per ettaro.

Nuove ricerche, volte a comprendere sempre meglio i meccanismi che regolano le trasformazioni dell'amido e delle proteine durante il processo produttivo, si vanno sempre più sviluppando al fine di ottenere delle ottime paste impiegando anche gli sfarinati di grano tenero (8).

Il prezzo notevolmente più basso del grano tenero rispetto a quello del grano duro può

indurre i produttori di pasta all'impiego di miscele nella sua fabbricazione e a riportare fraudolentemente in etichetta la dizione: "pasta di semola di grano duro". Di qui nasce la necessità di andare a rilevare aggiunte fraudolente di farina alla semola a monte del processo di pastificazione sugli sfarinati di semola tal quali e di verificare che ciò che viene dichiarato sull'etichetta del prodotto finito sia corrispondente al vero, conducendo delle analisi mirate sulle paste (10).

Attualmente sia in diversi Stati membri dell'UE che negli USA la denominazione di pasta è legalmente attribuita anche a prodotti provenienti da miscele dei due grani. La commercializzazione in Italia di queste paste a prezzi più bassi senza una precisa indicazione della composizione in etichetta potrebbe comportare che il prodotto italiano di alta qualità risultasse fortemente svantaggiato dal punto di vista economico rispetto a quello estero meno costoso.

In tale ottica, sono stati sviluppati, a partire dalla metà del secolo scorso, numerosi metodi che mirano a stabilire, da una parte, la purezza degli sfarinati di semola di grano duro e, dall'altra, la miscelazione di grano tenero con il grano duro (11). Negli ultimi anni, inoltre, è diventata sempre più crescente l'esigenza di attuare i controlli sul prodotto finito (non essendo sempre possibile il controllo a monte) che essendo sottoposto a cicli termici di essiccazione industriali, ha introdotto delle ulteriori difficoltà analitiche (12,13,14,17).

Attualmente non esiste una normativa uniforme per la regolamentazione del prodotto pastario in ambito europeo; infatti, mentre la legislazione italiana stabilisce per le semole un limite di accettabilità di "impurezze" fino al 3%, rilevabile con il metodo elettroforetico di Resmini-De Bernardi (15, 16), l'UE fissa tale

limite al 7%, rilevabile con il metodo immuno-chimico di Cantagalli Piazzini (17). Nella seconda metà degli anni '90 è stato completato uno studio quadriennale finanziato dalla Comunità Europea e finalizzato alla determinazione quanto più possibile accurata del rilevamento del grano tenero in relazione alla caratterizzazione necessaria per il mercato interno della pasta. Da questa indagine è emerso che possono essere classificati come "utilizzabili" i seguenti metodi: l'elettroforesi della ω -gliadina, l'analisi mediante HPLC su fase inversa della γ -gliadina e l'immuno-test della friabilina; inoltre è stato evidenziato con enfasi che, qualora si volessero esaminare campioni di pasta essiccata in condizioni non note, non vi sono attualmente da proporre metodi di riferimento per l'Unione Europea (18).

SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo del presente lavoro è quello di mettere a punto un metodo analitico rapido e attendibile in base al quale si possa rilevare la presenza di grano tenero in miscela con il grano duro, sia negli sfarinati tal quali che nelle paste da essi ottenute. Tale metodo dovrà avere il pregio di poter essere vantaggiosamente applicato anche nel caso in cui si volesse risalire alla quantità di grano tenero presente in campioni di pasta variamente essiccata. I metodi di analisi attualmente esistenti in letteratura e fondati sull'analisi di componenti di natura proteica falliscono nel riconoscimento del grano tenero a causa della denaturazione di tali composti in seguito ai trattamenti termici cui vengono oggi sottoposte le paste. La nostra attenzione, per l'impostazione del metodo, è stata perciò

rivolta all'analisi della componente di natura lipidica (trigliceridi, steroli ed esteri degli steroli) degli sfarinati che è notoriamente stabile alle alte temperature perché costituita da sostanze altobollenti e per niente termolabili.

MATERIALI E METODI

1.1. Principio del metodo

Il grasso presente nello sfarinato o nella pasta da sottoporre ad analisi viene recuperato mediante un sistema rapido di estrazione; esso consiste nel fare percolare su una colonna impaccata con il materiale da estrarre finemente macinato un'opportuna quantità di etere dietilico. L'eluato raccolto viene portato a secco mediante evaporatore rotante e le ultime tracce di solvente sono allontanate mediante insufflazione di azoto. Si prepara una soluzione al 5% in esano del grasso recuperato che, dopo transesterificazione con idrossido di sodio 2N in metanolo, viene analizzata per via HRGC su colonna polare 65%-fenil metilsilicone. La presenza della farina di grano tenero viene evidenziata dall'esame di una particolare configurazione di quattro doppietti di picchi cromatografici. Infine, dal confronto dei rapporti tra i doppietti più significativi e dalla costruzione di una opportuna retta di taratura è possibile risalire alla quantità di grano tenero presente in miscela con il grano duro.

1.2. Estrazione del grasso

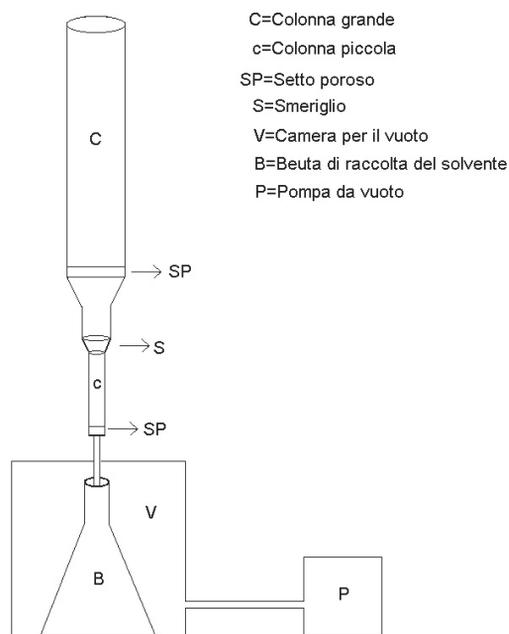
1.2.1. Materiale occorrente

Etere etilico puro per analisi (Lab-Scan, Dublino, Irlanda); sodio solfato anidro (Carlo Erba, Milano, Italia); colonna in vetro con

setto poroso per lo sfarinato; colonnina in vetro con setto poroso per il solfato di sodio anidro; camera da vuoto; pompa da vuoto; evaporatore rotante; azoto in bombola.

1.2.2. Procedura

In **fig. 1** viene riportato schematicamente il sistema approntato per l'estrazione rapida del grasso "libero" dagli sfarinati. Nella colonna C sono posti 100 g del materiale da estrarre finemente macinato; la colonnina c viene riempita per circa un terzo della sua capacità con solfato di sodio anidro. L'estremità smerigliata della colonna C è inserita nella colonnina c che a sua volta è innestata sulla camera da vuoto V. Quest'ultima è collegata con la pompa da vuoto P e in essa è posta la beuta di raccolta B. Viene azionata la pompa e si dà tempo allo sfarinato di assestarsi formando un impaccamento quanto più possibile com-



Sistema per l'estrazione rapida del grasso degli sfarinati.

fig. 1

patto. A questo punto si versano lentamente 100 mL di etere dietilico nella colonna C e si attende l'eluizione completa. L'eluato è recuperato nella beuta di raccolta e il grasso è portato a secco mediante evaporatore rotante alla temperatura di 50°C; le tracce residue di etere dietilico sono allontanate insufflando azoto nella beuta di raccolta.

1.3. Preparazione del campione di grasso da analizzare tal quale per via GC

1.3.1. Materiale e solventi occorrenti
n-Esano puro per analisi (Lab-Scan, Dublino, Irlanda); pipetta da 1 mL; agitatore meccanico (Vortex); bilancia analitica al decimilligrammo; provette da centrifuga.

1.3.2. Procedura

Pesare in una provetta una quantità di grasso quanto più vicina a 50 mg; aggiungere 1 mL esatto di n-esano e agitare vigorosamente su un agitatore meccanico fino alla dissoluzione completa del grasso.

1.4. Preparazione del campione di grasso da analizzare previa transesterificazione per via GC

1.4.1. Materiale e solventi occorrenti
Idrossido di sodio puro per analisi (Carlo Erba, Milano, Italia); metanolo anidro puro per analisi (Lab-Scan, Dublino, Irlanda); acido cloridrico 2 N (Carlo Erba, Milano, Italia); agitatore meccanico (Vortex); micropipetta regolabile da 1 mL; centrifuga.

1.4.2. Preparazione del reattivo transesterificante

In un contenitore di polietilene pesare circa

8 g di idrossido di sodio ed aggiungere 100 mL di metanolo anidro. Agitare fino a dissoluzione completa dell'idrossido di sodio (Soda metanolica 2N).

1.4.3. Procedura

La soluzione del grasso al 5% (p/v) preparata come al punto 1.3.2. e contenuta in una provetta da centrifuga è addizionata di 400 µL di reattivo transesterificante; essa è agitata per 30 sec sul vortex e neutralizzata con l'aggiunta di 400 µL di Acido Cloridrico 2N. Si centrifuga per 30 sec e si sottopone all'analisi GC la fase organica supernatante.

1.5. Isolamento della frazione apolare del grasso degli sfarinati

1.5.1. Materiale e solventi

Diclorometano puro per analisi (Lab-Scan, Dublino, Irlanda); provette; agitatore meccanico (vortex); colonnine SPE con fase SiOH da 1.000 mg (Phenomenex, Torrance, CA, USA); cilindro in vetro da 50 mL; pallone da 50 mL per rotavapor; micropipetta regolabile da 1 mL; azoto in bombola.

1.5.2. Procedura

Pesare circa 50 mg di grasso in una provetta e aggiungere 500 µL circa di diclorometano; agitare su vortex fino a dissoluzione del grasso e trasferire sulla colonnina SPE con fase SiOH preventivamente ambientata con due volumi di diclorometano. Lavare la provetta con 500 µL di diclorometano e trasferire il solvente sulla colonnina. Eluire la frazione apolare del grasso con 30 mL di diclorometano e raccogliere l'eluato in un pallone da 50 mL preventivamente tarato; portare a secco mediante evaporatore rotante, eliminare le

tracce residue di solvente con un flusso di azoto e pesare il pallone tarato contenente la frazione apolare estratta. Pesare il pallone alla bilancia analitica e risalire per differenza con la sua tara alla quantità di frazione apolare recuperata. Preparare di questa una soluzione al 5% (p/v).

1.6. Analisi gascromatografica del grasso tal quale degli sfarinati per la determinazione della sua composizione

Iniettare 1 µL di soluzione preparata come al punto 1.3. nel gascromatografo nelle seguenti condizioni di analisi.

1.6.1. Strumentazione

Gascromatografo equipaggiato con iniettore programmabile (PSS) e rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) (Autosystem XL Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) e collegato ad un integratore elettronico HP mod. 3394A (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA).

Colonna capillare in silice fusa $l=30$ m, i.d. 0,25 mm, f.t. 0,25 µm con fase stazionaria 65% fenil metilsilicone (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA).

1.6.2. Condizioni gascromatografiche

- Gas di trasporto: idrogeno, flusso in colonna di 2 mL/min;
- Gas ausiliari: idrogeno e aria cromatografica;
- Temperatura del detector: 370°C;
- Programmata dell'iniettore: 70°C per 0,1 min, incremento di 999°C/min fino a 370°C e tenere per 5 min;
- Programmata della camera: 250°C per 2 min; incremento di 5°C/min fino a 360°C, tenere per 5 min.

1.7. Analisi gascromatografica del grasso estratto dagli sfarinati previa transesterificazione con soda metanolica 2N per l'analisi della composizione acidica

Iniettare 1 µL della soluzione ottenuta come al punto 1.4. nel gascromatografo nelle seguenti condizioni di analisi.

1.7.1. Strumentazione

Gascromatografo equipaggiato con iniettore programmabile (PTV) e rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) (DANI mod. 86.10 HT, Milano, Italia) e collegato a un integratore elettronico HP mod. 3394A (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA).

Colonna capillare in silice fusa l=60 m, i.d. 0,25 mm, f.t. 0,25 µm con fase stazionaria 90% bis-cianopropil-10%-fenilsilicone (Restek Corp., Bellefonte, PA, USA).

1.7.2. Condizioni gascromatografiche

- Gas di trasporto: elio, flusso in colonna di 1,5 mL/min;

- Gas ausiliari: idrogeno ed aria cromatografica;

- Temperatura del detector: 250°C;

- Programmata dell'iniettore: 60°C per 0,1 min, incremento di 999°C/min fino a 240°C e tenere per 3 min;

- Programmata della camera: 150°C per 2 min; incremento di 8°C/min fino a 240°C, tenere per 10 min.

1.8. Analisi gascromatografica della frazione apolare recuperata dal grasso estratto dagli sfarinati

Iniettare 1 µL della soluzione della frazione

apolare preparata come al punto 1.5. utilizzando la strumentazione riportata al punto 1.6.1. e le condizioni riportate al punto 1.6.2.

1.9. Analisi gascromatografica della frazione apolare previamente transesterificata con soda metanolica 2N

Iniettare 1 µL della soluzione della frazione apolare ottenuta come al punto 1.5. e transesterificata come al punto 1.4. utilizzando la strumentazione riportata al punto 1.6.1. e le condizioni riportate al punto 1.6.2.

1.10. Analisi gascromatografica del grasso degli sfarinati previa transesterificazione per analizzare la zona degli esteri degli steroli

Analizzare la soluzione del grasso ottenuta come al punto 1.3. e transesterificata come al punto 1.4. utilizzando la strumentazione riportata al punto 1.6.1 e le condizioni riportate al punto 1.6.2. iniettando 1 µL nel gascromatografo.

1.11. Identificazione gascromatografica dei picchi diagnostici di nostro interesse della frazione apolare tal quale

La frazione apolare preparata come al punto 1.5. è sottoposta ad analisi mediante GC-MS nelle seguenti condizioni di analisi.

1.11.1. Strumentazione

Gascromatografo GC-17A equipaggiato con iniettore split-splittless e spettrometro di massa QP-5000 Shimadzu come rivelatore,

collegato con interfaccia di acquisizione Class 5000 (Shimadzu Corp., Kyoto, Giappone). Colonna capillare in silice fusa $l=30$ m, i.d. 0,25 mm, f.t. 0,10 μm con fase stazionaria 65% fenil metilsilicone (Restek Corp., Bellefonte, PA, USA).

1.11.2. Condizioni gascromatografiche

- Gas di trasporto: elio, flusso in colonna di 2 mL/min;
- Energia di ionizzazione: 70 eV;
- Acquisizione: 50-500 u.m.a.;
- Temperatura iniettore: 350°C;
- Programmata della camera: 250°C per 2 min; incremento di 5°C/min fino a 360°C, tenere per 5 min.

1.12. Identificazione

gascromatografica dei picchi diagnostici di interesse della frazione apolare transesterificata

La frazione apolare del grasso recuperata come al punto 1.5. e transesterificata come al punto 1.4. è sottoposta ad analisi mediante GC-MS utilizzando la strumentazione del punto 1.11.1. e con le condizioni di analisi riportate al punto 1.11.2.

RISULTATI E DISCUSSIONI

Valutazione del metodo di estrazione rapido utilizzato in alternativa al metodo di estrazione ufficiale Soxhlet

L'estrazione del grasso dagli sfarinati della farina e della semola è stata realizzata con una procedura rapida, che consiste nel fare percolare il solvente estraente dietiletere

su un volume cilindrico dello sfarinato stesso assestato in una colonna di vetro di diametro e lunghezza opportuni secondo la procedura riportata in Materiali e Metodi. La strategia di tale metodo estrattivo è stata acquisita dal metodo rapido di analisi dei grassi degli sfarinati, mediante il quale è possibile determinare la quantità di grasso contenuta in tali matrici facendo percolare su di esse il solvente estraente sotto pressione (19). I metodi ufficiali di estrazione per gli sfarinati di grano tenero e di grano duro prevedono l'estrazione in "batch" oppure l'estrazione mediante Soxhlet (20). Il primo metodo si basa sul contatto della matrice solida con il liquido per un tempo minimo di almeno 24 ore, il secondo invece che richiede almeno sei ore prevede l'estrazione del grasso con solvente a ricadere utilizzando l'apparecchio Soxhlet.

Entrambi i metodi sono validi analiticamente ma richiedono dei tempi di estrazione inaccettabili quando il numero di analisi da effettuare è alto. È stata valutata la possibilità di accelerare i tempi di estrazione introducendo il sistema a percolazione del solvente estraente. Poiché in questo caso si utilizza etere dietilico, si estraggono dalla matrice solida i cosiddetti lipidi liberi, cioè i lipidi apolari. Il processo di estrazione si basa sul fatto che via via che il liquido percola sulla colonna impaccata, il grasso viene rimosso dallo sfarinato e trasportato con il fronte del solvente; ciò accade perché la "fase stazionaria" non esercita nessuna interazione verso tali composti e il liquido che passa sugli strati già estratti contribuisce a rendere esauriente l'estrazione dei lipidi liberi.

Sono state condotte delle prove di estra-

zione al fine di valutarne la completezza in funzione del volume di dietiletere utilizzato per peso di sfarinato. I risultati relativi al recupero del grasso sono riportati in **tab. 1**. Come è possibile vedere, il minimo volume di dietiletere richiesto per esaurire 100 g di sfarinato di grano tenero è di 100 mL; infatti la differenza del recupero rispetto a quello ottenuto utilizzando 120 mL è trascurabile. Lo stesso andamento del recupero è stato riscontrato anche per la semola e per la pasta finemente macinata. Nella **tab. 2** viene riportato il confronto del grasso estratto ottenuto con i tre metodi utilizzati; i risultati riportati evidenziano che le tre procedure portano allo stesso

Tabella 1 - Recupero percentuale del grasso libero da 100 g di sfarinato di grano tenero, duro e dalla pasta finemente macinata utilizzando il metodo rapido di estrazione proposto.

Vol. etere mL	Farina recupero (%)	Semola recupero (%)	Pasta recupero (%)
30	18,7	13,6	11,5
50	35,8	31,4	30,7
70	68,9	64,8	62,6
100	99,4	99,0	99,2
120	99,9	99,8	99,7

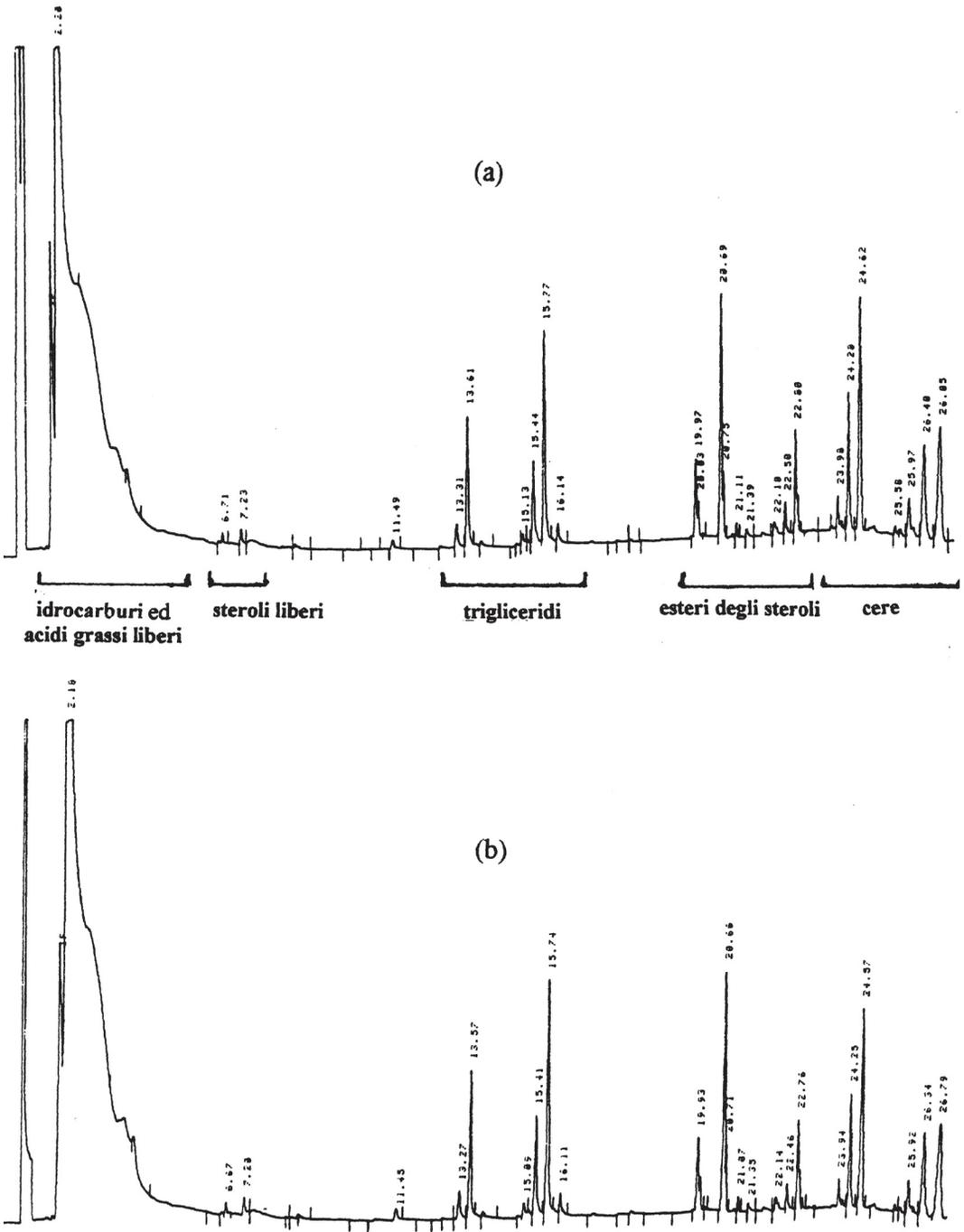
Tabella 2 - Quantità di grasso in percento recuperato. I valori, espressi in percento p/p, riportati nella tabella sono il risultato della media di tre determinazioni.

	Farina	Semola	Pasta
Metodo rapido	1,04%	0,69%	0,15%
Soxhlet	1,08%	0,70%	0,16%
Batch	1,06%	0,73%	0,17%

quantitativo di grasso estratto per le tre matrici, nei limiti degli errori sperimentali. Da ciò si evince che è possibile utilizzare il metodo rapido come alternativa ai metodi tradizionali di estrazione qualora si intenda ridurre al minimo il tempo di estrazione. Infine, sono stati analizzati qualitativamente per via GC i grassi ottenuti dalle estrazioni parziali e quelli ottenuti dall' estrazione totale per ciascuna matrice. In **fig. 2** sono riportati i gascromatogrammi del grasso di farina recuperati con un' estrazione parziale (recupero 18,7%) contro un' estrazione esauriente. Come è possibile osservare, i profili cromatografici sono equivalenti per quanto riguarda la distribuzione relativa dei picchi. Ciò dimostra che, anche se il grasso libero degli sfarinati non è quantitativamente estratto, la distribuzione relativa delle componenti lipidiche (idrocarburi e acidi grassi liberi, steroli liberi, trigliceridi, esteri degli steroli e cere) rimane costante. Agli stessi risultati si perviene se si confrontano i grassi provenienti da estrazioni parziali e totali di semole e paste.

Effetto della temperatura sulla stabilità della componente lipidica

Per verificare quale fosse l' effetto della temperatura sulla componente lipidica degli sfarinati, sono stati analizzati i grassi estratti da 10 farine e 10 semole mantenute a temperatura ambiente. Gli stessi sfarinati sono stati tenuti a 130°C per 60 min ed il grasso estratto è stato analizzato mediante gascromatografia. Il confronto della distribuzione percentuale delle famiglie gliceridiche e degli esteri degli steroli nei due casi non mostra apprezzabili variazioni.



Gascromatogramma del grasso tal quale di farina Grandi Molini Italiani estratto parzialmente (a) e gascromatogramma dello stesso grasso dopo recupero totale (b). Nella figura (a) sono indicate le zone relative all'eluizione delle componenti lipidiche più rappresentative nel grasso degli sfarinati.

fig. 2

Ricerca di markers diagnostici contenuti nella farina

Al fine di ricercare possibili differenze tra le matrici lipidiche della farina e della semola è stato effettuato inizialmente il confronto tra i grassi analizzati tal quali delle due matrici. In **fig. 3** sono raffigurati i gascromatogrammi ottenuti analizzando un grasso di farina e uno di semola tal quali. Se si osserva la distribuzione relativa delle componenti lipidiche, si evidenzia una differenza nella zona degli esteri degli steroli, compresa tra i tempi di ritenzione di 19 e 21 min, per la presenza di due doppietti più alti nella farina e praticamente trascurabili nella semola. Successivamente, dai grassi sono state isolate le frazioni apolari secondo la procedura riportata al punto 1.5. per ricercare ulteriori differenze. Il confronto tra i gascromatogrammi, relativi alle frazioni apolari della farina e della semola, mostrati nella **fig. 4**, non evidenzia alcuna differenza ulteriore: la zona dei trigliceridi scompare a causa della ritenzione esercitata dal gel di silice, mentre le zone degli esteri degli steroli e delle cere rimangono praticamente invariate se confrontate con i relativi gascromatogrammi dei grassi analizzati tal quali (**fig. 3**).

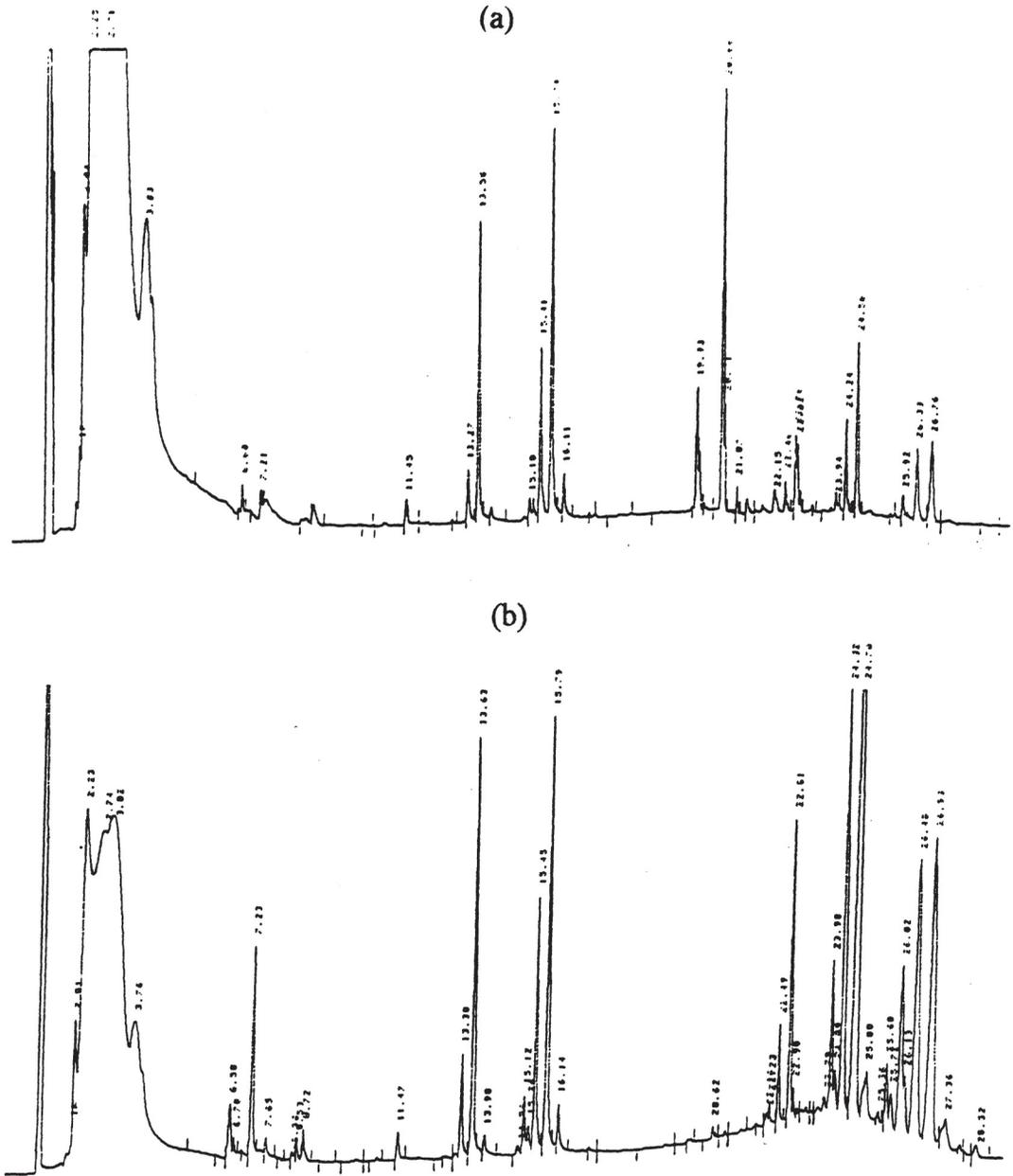
Identificazione GC-MS degli esteri degli steroli dopo transesterificazione della frazione lipidica apolare degli sfarinati

I grassi estratti dalle farine e dalle semole, analizzati tal quali mediante GC-MS, hanno consentito di accertare solamente la presenza del campesterolo palmitato e del β -sitosterolo palmitato. Poiché, come è riportato

in letteratura (21), la presenza dell'acido oleico è rilevante, è sembrato strano il non ritrovamento del campesterolo oleato e del β -sitosterolo oleato nella zona degli esteri degli steroli. Abbiamo perciò ipotizzato che la causa fosse legata alla sovrapposizione di molecole di altra natura presenti in quantità maggiori rispetto a questi esteri, che non consentiva la registrazione di uno spettro di massa facilmente interpretabile. Gli spettri di massa di questi composti interferenti indicavano la probabile presenza di esteri a lunga catena, simili alle cere. In un nostro precedente lavoro (22) abbiamo dimostrato che in n-esano le cere e i trigliceridi vengono quantitativamente e rapidamente transesterificati mediante soda metanolica 2N, mentre in queste stesse condizioni sperimentali gli esteri degli steroli a lunga catena assolutamente non reagiscono. Per tale motivo il grasso degli sfarinati di grano tenero e di grano duro è stato sottoposto alla reazione di transesterificazione e dal confronto dei gascromatogrammi relativi al grasso tal quale con quelli transesterificati di semola e di farina (rispettivamente **fig. 3** e **5**) è emerso che i profili appaiono profondamente modificati. I picchi relativi ai trigliceridi e alle cere scompaiono, mentre nella zona delle cere compaiono nettamente dei doppietti di picchi che, analizzati mediante spettrometria di massa sono risultati essere: campestanolo oleato (picco 5) e campesterolo oleato (picco 6); β -sitostanololo oleato (picco 7) e β -sitosterolo oleato (picco 8), la cui numerazione è indicata nella **fig. 6a**; inoltre anche i primi due doppietti, riportati in letteratura come singoli picchi di palmitati di campestanolo (picco 1) e di β -sitostanololo (picco 3), sono stati sdoppiati in due picchi differenti per una insaturazione nell'anello del ciclopentano-

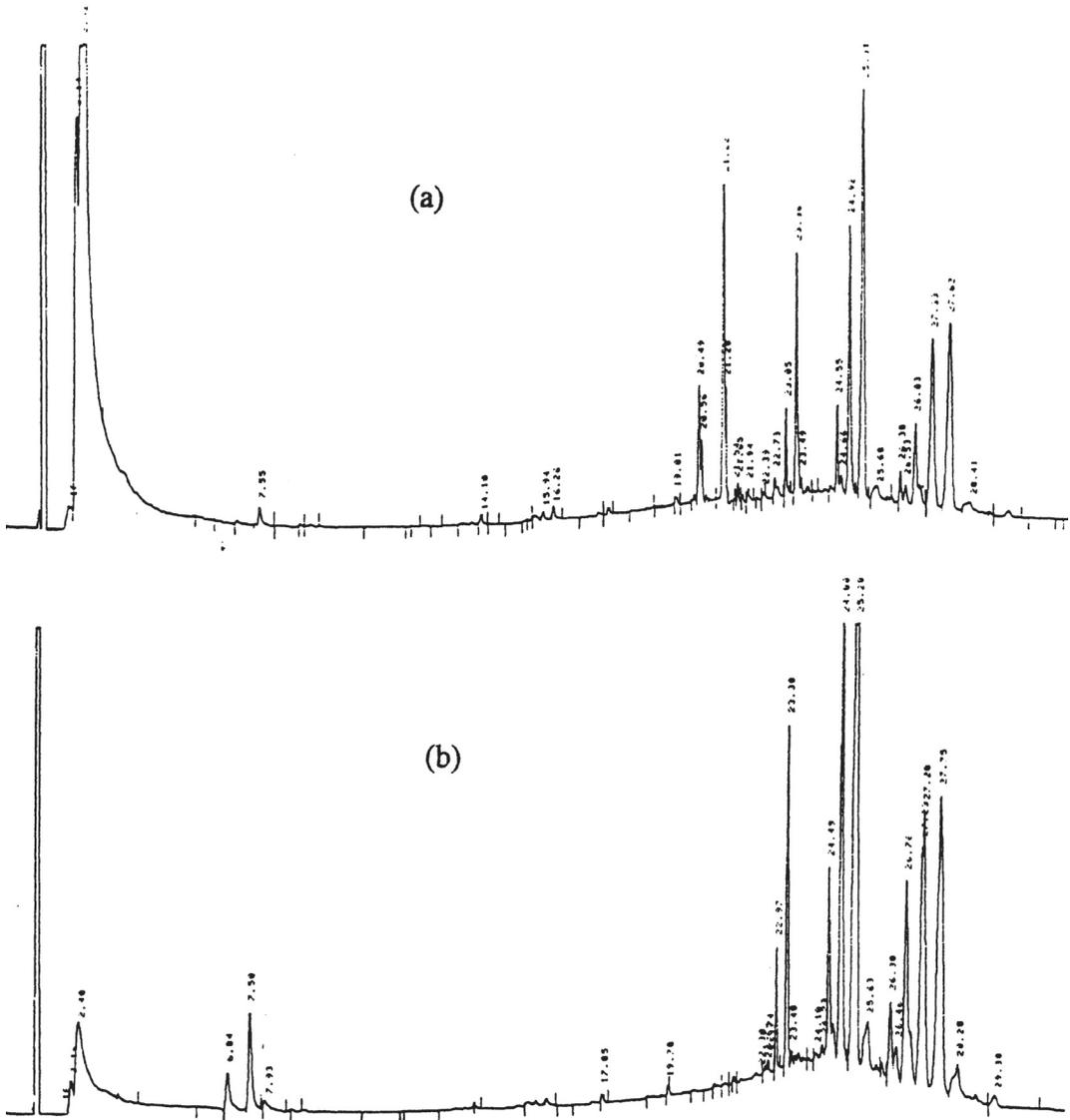
periidrofenantrene della parte sterolica degli esteri e identificati come palmitati di campesterolo (picco 2) e di β -sitosterolo (picco 4) (fig. 6a). I rapporti dei picchi relativi agli esteri degli steroli sono tipicamente differenti nei

due tipi di grasso. È su questa configurazione che è stato impostato il metodo di analisi quali-quantitativo per la differenziazione del grano tenero dal grano duro e il relativo dosaggio delle miscele.



Gas cromatogrammi del grasso estratto dalla farina Russo (a) e gas cromatogramma del grasso estratto dalla semola Buitoni (b) analizzati tal quali.

fig. 3



Gasromatogrammi della frazione apolare recuperata dal grasso estratto dalla farina Barilla (a) e dalla semola Divella (b).

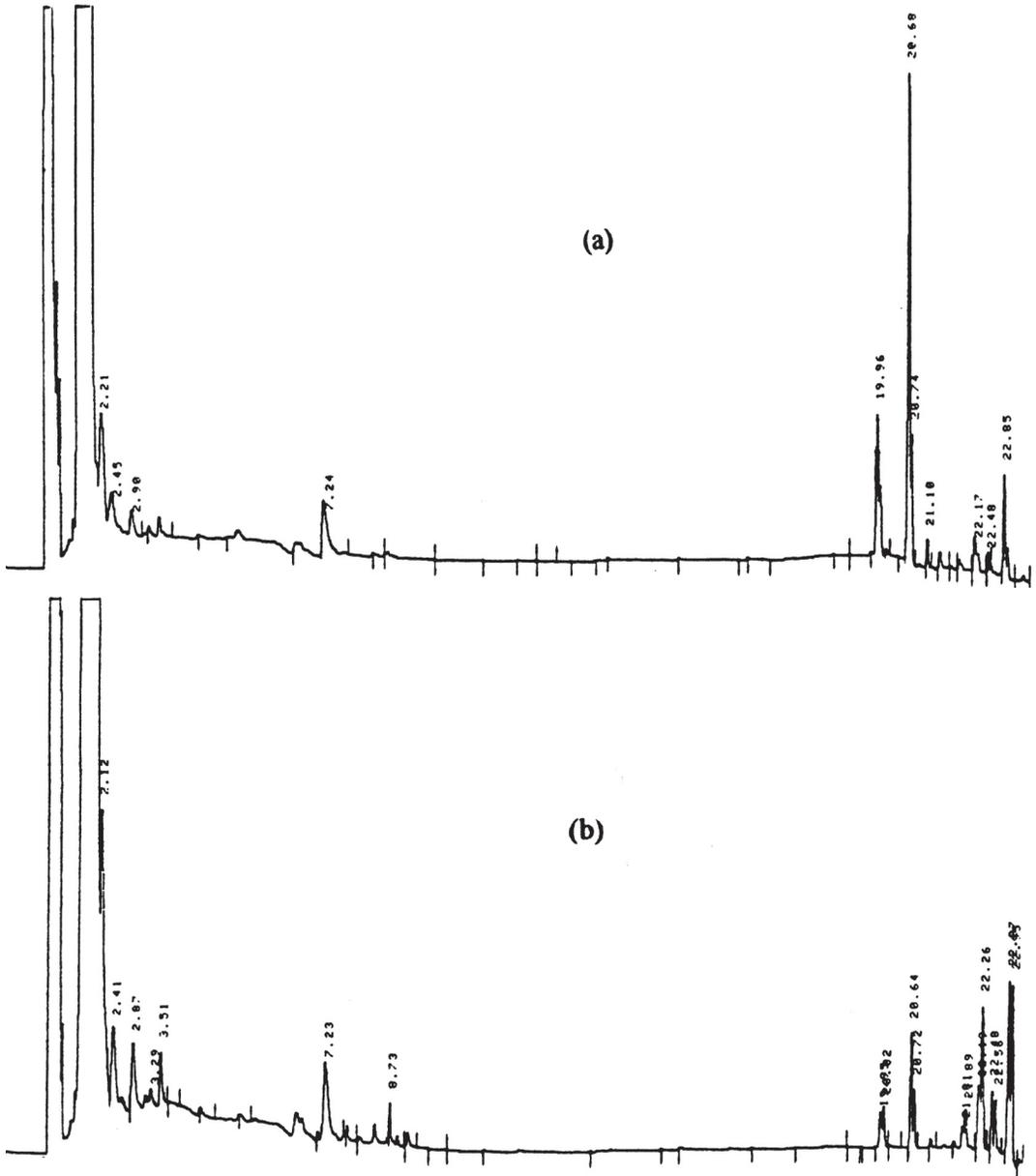
fig. 4

Nel 1993 Sarwar *et al.* (23) hanno proposto un metodo in base al quale questi esteri potevano essere assunti come indici per individuare la presenza di farina in miscela con la semola. La metodica che peraltro prevedeva l'uso della cromatografia ad alta pressione (HPLC) non era scevra da inconvenienti:

l'accuratezza dei risultati dipendeva tra l'altro dalla completa estrazione della sostanza grassa; questa operazione si ottiene effettuando una preliminare idrolisi acida della matrice iniziale che, oltre ad essere lunga e tediosa, non sempre porta a risultati accurati. Altro obiettivo della transesterificazione è

quello di mettere a punto una metodica più veloce e accurata che è indipendente dal recupero totale del grasso e che svincoli di conseguenza l'analisi dall'aggiunta di uno standard interno.

Sono state ricercate delle differenze nella composizione acidica dei due grassi iniettando il transesterificato nelle condizioni riportate al punto 1.7. ma, come si evidenzia in **fig. 7**, non si sono evidenziate differenze



Gas cromatogrammi del grasso proveniente dalla farina Crai (a) e dal semolato Altgrani (b) dopo transesterificazione con soda metanolica 2N.

fig. 5

sfruttabili a fini analitici relativamente alla loro identificazione.

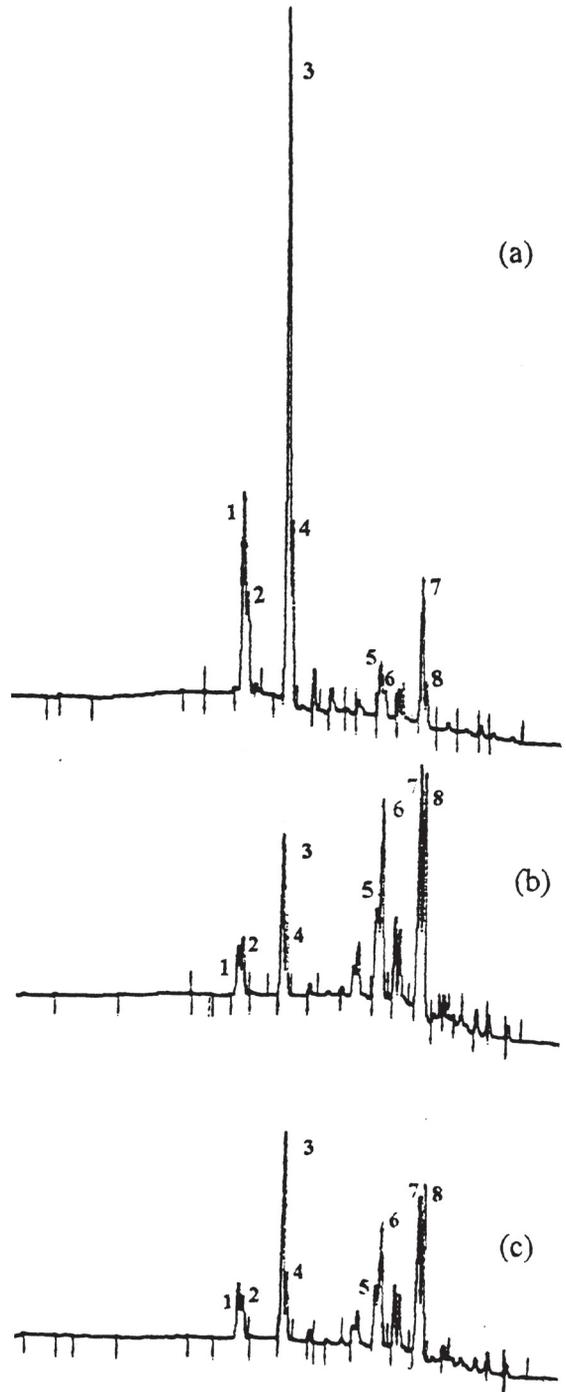
Rapporti caratteristici degli esteri degli steroli nelle farine e nelle semole dopo transesterificazione

Allo scopo di individuare particolari indici che consentano di evidenziare e quantificare la presenza delle farine nelle semole, sono stati transesterificati e gascromatografati secondo le condizioni riportate al punto 1.10. i grassi estratti da 10 farine e da 10 semole del commercio. In **tab. 3** vengono riportati i rapporti tra le altezze dei picchi 3 e 6 ed i rapporti tra i picchi 3 e 7. Come si può osservare i valori dei rapporti indicati sono compresi in intervalli soddisfacentemente ristretti e diversi tra le due matrici. La determinazione sperimentale di questi rapporti permette di risalire al grado di purezza di ciascuna delle due matrici.

Mediante l'aggiunta di un opportuno standard interno (colesteril palmitato) al grasso prima di effettuare la reazione di transesterificazione, è stato possibile determinare la quantità in peso degli esteri degli steroli contenuti negli sfarinati di partenza. I risultati hanno indicato una presenza di tale frazione cinque volte maggiore nella farina rispetto alla semola (**tab. 3**). Questi risultati fanno prevedere una grande sensibilità del metodo di rilevazione del grano tenero in miscela con il grano duro.

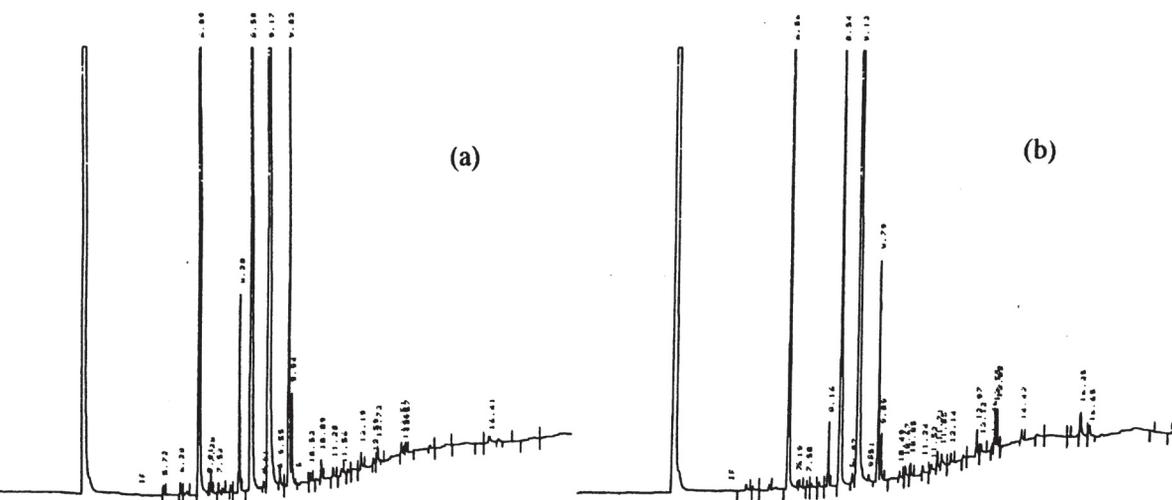
Rilevazione della presenza di grano tenero nelle paste

Allo scopo di verificare se questi stessi indici potessero servire per individuare e quantificare la presenza di farina nelle paste, sono stati preparati degli impasti con sola farina



Gascromatogramma relativo alla sola zona degli esteri degli steroli della farina Crai (a), del semolato Altgrani (b) e della loro miscela al 10% di farina Crai.

fig. 6



Gascromatogramma relativo alla composizione acidica del semolato Altgrani (a) e della farina Crai (b) ottenuti dall'analisi dei grassi estratti e poi transesterificati con soda metanolica 2N.

fig. 7

e sola semola. Una parte degli impasti è stata essiccata a temperatura ambiente; altre due aliquote sono state essiccate a 70°C e a 130°C per un'ora, rispettivamente. I grassi estratti con la procedura descritta, sono stati transesterificati e analizzati mediante GC. In **tab. 4** vengono riportati i rapporti caratteri-

stici nonché la quantità di grasso estratto per 100 g di sfarinato. Come si può osservare la quantità di grasso estratto è circa il 15% della quantità che si estrae dagli sfarinati non sottoposti ad impasto, indipendentemente dalla temperatura di essiccazione; ciò nonostante i rapporti caratteristici tra i picchi presi come

Tabella 3 - Rapporti caratteristici dei picchi rappresentativi relativi a 10 campioni di farina e a 10 campioni di semola del commercio e abbondanze delle relative frazioni steroliche.

Campione farina e semola	Rapporto picchi 3/6 farina	Rapporto picchi 3/6 semola	Rapporto picchi 3/7 farina	Rapporto picchi 3/7 semola	Esteri degli steroli farina (mg/100 g)	Esteri degli steroli semola (mg/100 g)
1F e 1S	4,3	0,89	1,5	0,67	0,015	0,0035
2F e 2S	8,0	0,86	2,3	0,62	0,017	0,0030
3F e 3S	5,0	0,70	1,3	0,74	0,013	0,0028
4F e 4S	7,6	0,75	2,3	0,74	0,018	0,0029
5F e 5S	12,7	0,60	2,9	0,71	0,019	0,0026
6F e 6S	13,7	0,69	3,2	0,67	0,020	0,0027
7F e 7S	13	0,72	4,3	0,70	0,021	0,0028
8F e 8S	5,0	0,61	1,3	0,66	0,020	0,0026
9F e 9S	9,6	0,76	2,5	0,70	0,013	0,0028
10F e 10S	10,7	0,81	2,5	0,67	0,018	0,0029

Tabella 4 - Andamento dei rapporti caratteristici di farina, semola e impasti essiccati a diverse temperature e percentuale di grasso estratto.

Campione	Rapporto caratteristico 3/6	Rapporto caratteristico 3/7	Quantità di grasso estratto %
Farina Crai	13	3,1	1,04
Impasto di farina (25°C)	12,8	3,0	0,18
Impasto di farina (70°C)	13,3	3,2	0,15
Impasto di farina (130°C)	12,7	3,3	0,16
Semolato Altgrani	0,81	0,67	0,80
Impasto di semola (25°C)	0,79	0,66	0,15
Impasto di semola (70°C)	0,80	0,65	0,17
Impasto di semola (130°C)	0,83	0,68	0,16

riferimento sia per le farine che per le semole non subiscono particolari variazioni. La riduzione del recupero dei lipidi liberi è stata già evidenziata in studi precedenti (24) in cui si riporta che durante la preparazione dell'impasto il 90% di essi si legano alla struttura proteica tridimensionale che si genera a causa del contatto con l'acqua.

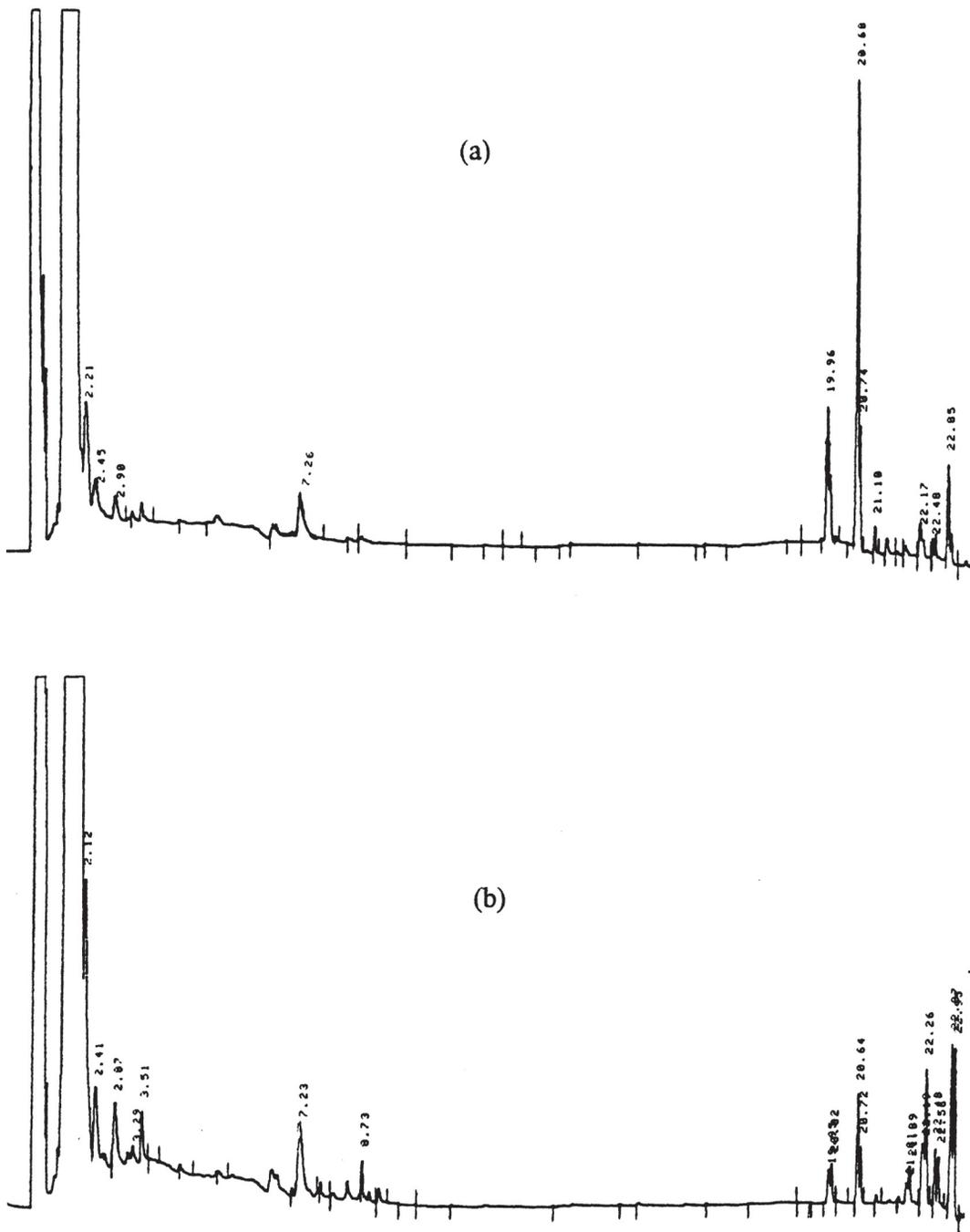
Controllo della purezza delle semole impiegate per la pastificazione Proposta di un metodo rapido alternativo ai metodi ufficiali

Le industrie interessate alla fabbricazione della pasta effettuano di routine il controllo della semola acquistata per certificarne la genuinità, utilizzando i metodi ufficiali di analisi già citati.

A partire da una semola e da una farina analizzate tal quali si sono preparate miscele contenenti il 2, 5 e 10% di farina, rispettivamente. Nelle **fig. 8a** e **8b** vengono riportati i gascromatogrammi relativi al grasso transesterificato della farina e della semola puri di partenza e quelli relativi ai grassi

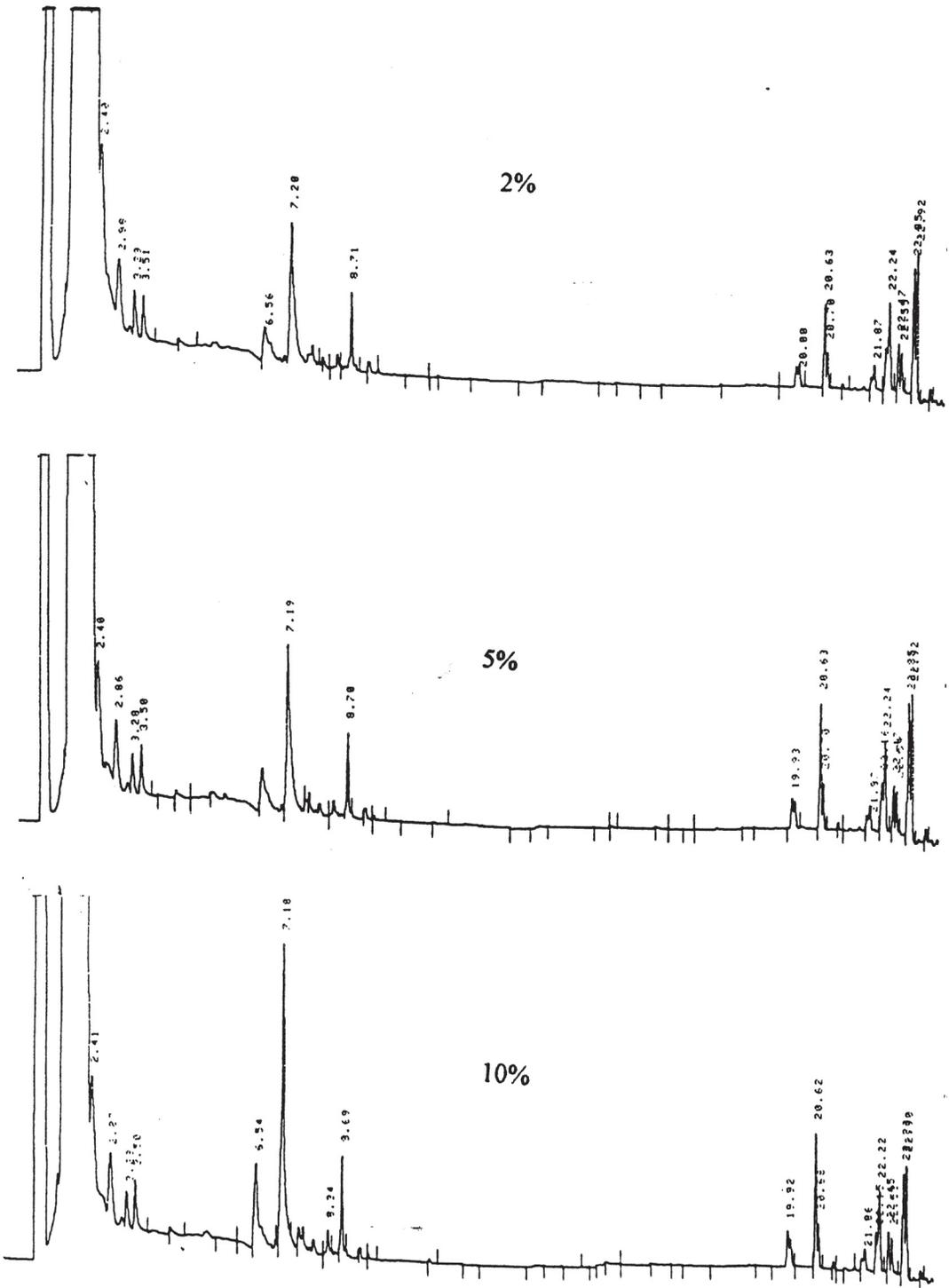
estratti dalle miscele preparate come sopra e transesterificati. Come si può osservare, il cromatogramma relativo alla miscela al 2% in farina presenta un profilo cromatografico che comincia a differenziarsi da quello di una semola. Il gascromatogramma relativo alla miscela al 5% non lascia alcun dubbio circa la presenza di farina nella semola. Inoltre, via via che cresce il contenuto di farina, si osserva una crescita dei picchi che sono inizialmente bassi nella semola: il picco 1 scavalca il picco 2, il picco 3 supera i picchi 6, 7 e 8. Ciò si riscontra già nella miscela al 5%, allontanando la somiglianza del profilo globale da quello tipico della semola pura. Tale effetto è ancora più marcato nella miscela al 10% (**fig. 8b**).

Nella **tab. 5** sono riportati i rapporti rappresentativi della farina e della semola utilizzate per la preparazione delle miscele. Il calcolo teorico previsto per i mescolamenti, a partire dai valori degli estremi, ottenuti per la farina e per la semola risulta in ottimo accordo con i rapporti ottenuti sperimentalmente. La convergenza dei valori è possibile se si tiene conto di un fattore cinque nella quantità



Gas cromatogramma del grasso proveniente dalla farina Crai (a) e dal semolato Altgrani (b) dopo transesterificazione con soda metanolica 2N.

fig. 8a



Gas cromatogrammi relativi ai grassi estratti da miscele di farina Crai al 2, 5 e 10% in semolato Altgrani dopo transesterificazione.

fig. 8b

Tabella 5 - Andamento dei rapporti teorici e sperimentali caratteristici di farina, semola e loro miscele come matrici tal quali.

Campione	Rapporto picchi 3/6 teorico	Rapporto picchi 3/6 sperimentale	Rapporto picchi 3/7 teorico	Rapporto picchi 3/7 sperimentale
Farina Crai	-	13	-	3,1
Semolato Altgrani	-	0,81	-	0,67
Miscela 2%	1,07	1,04	0,91	0,95
Miscela 5%	1,43	1,51	1,20	1,24
Miscela 10%	2,13	2,00	1,61	1,55

Tabella 6 - Andamenti teorici e sperimentali dei rapporti caratteristici di paste essiccate a temperatura ambiente (25°C) e ad alta temperatura (130°C).

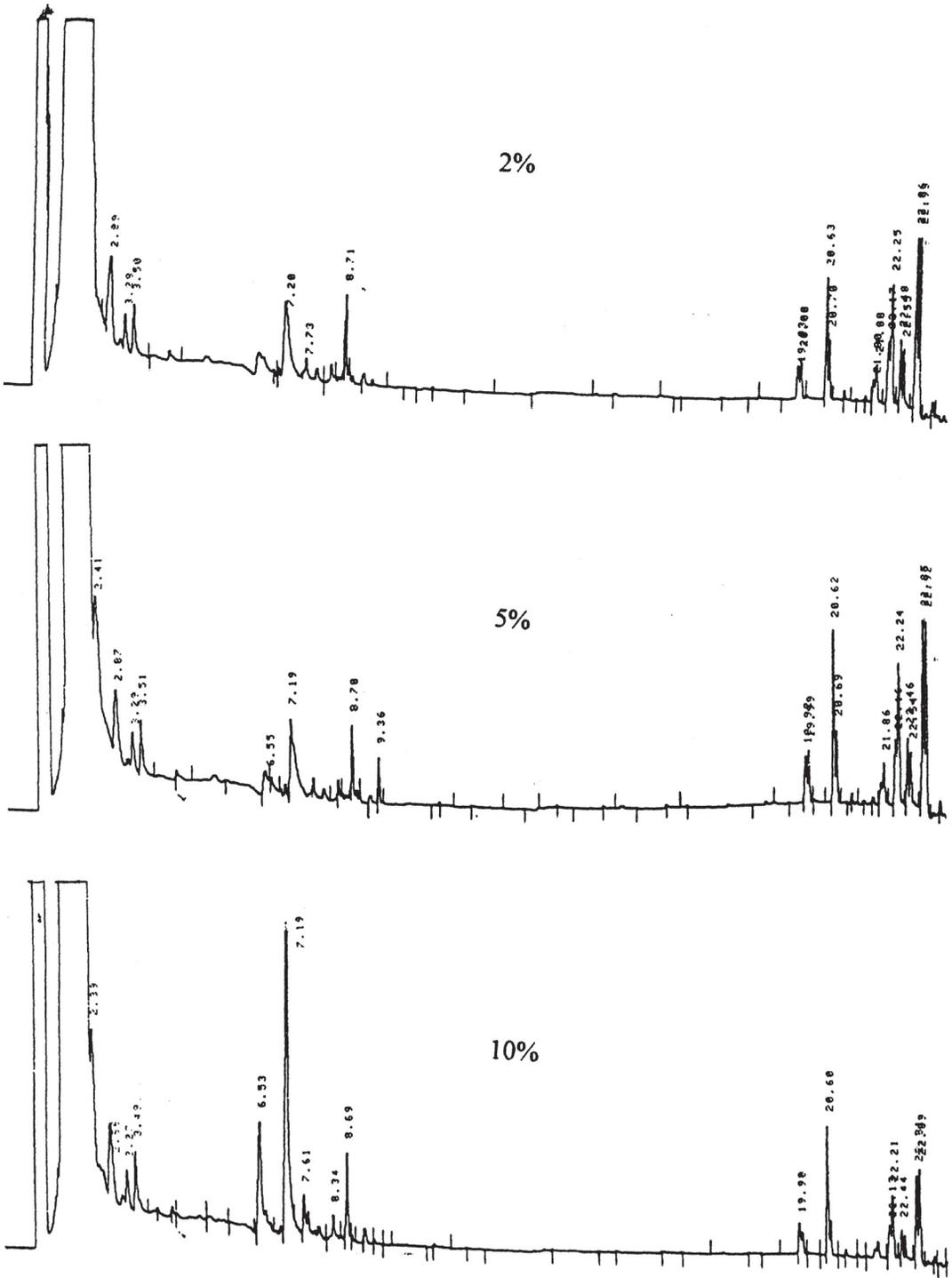
Campione	Rapporto picchi 3/6 teorico	Rapporto picchi 3/6 sper. (25°C)	Rapporto picchi 3/6 sper. (130°C)	Rapporto picchi 3/7 teorico	Rapporto picchi 3/7 sper. (25°C)	Rapporto picchi 3/7 sper. (130°C)
Impasto di Farina Crai	-	12,8	12,9	-	3,0	3,3
Impasto di Semolato Altgrani	-	0,79	0,83	-	0,66	0,68
Pasta al 2%	1,07	1,04	1,06	0,91	0,95	0,93
Pasta al 5%	1,43	1,39	1,37	1,2	1,24	1,23
Pasta al 10%	2,13	2,08	2,16	1,6	1,55	1,58

della frazione sterolica contenuta nella farina rispetto a quella della semola.

Rilevazione della presenza di grano tenero nelle paste variamente essiccate

Allo scopo di verificare se questi stessi indici potessero servire per individuare e quantificare la presenza di farina nelle paste variamente essiccate, a partire da una semola e da una farina analizzate tal quali, si sono preparate miscele con il 2, 5 e 10% di farina, rispettivamente e da queste sono state prodotte tre serie di paste sottoposte a diverse tempera-

ture di essiccazione. Una parte degli impasti è stata essiccata a temperatura ambiente; altre due aliquote sono state essiccate per un'ora a 70°C e a 130°C rispettivamente. I grassi estratti con la procedura descritta, sono stati transesterificati e analizzati mediante GC. In **tab. 6** vengono riportati i rapporti caratteristici ottenuti per le paste confrontati con i rapporti calcolati teoricamente. Anche per le paste valgono le considerazioni fatte per le miscele di sfarinati. Infatti come si può osservare nella **fig. 9**, dove si riportano i gascromatogrammi relativi ai grassi recuperati dalle paste trattate a 130°C, l'andamento del profilo della frazione degli esteri degli steroli è



Gas cromatogrammi relativi ai grassi estratti da paste ottenute da miscele di farina Crai al 2, 5 e 10% in semolato Altgrani e trattate a 130°C, dopo transesterificazione.

fig. 9

praticamente identico a quello delle miscele riportate nella figura precedente (fig. 8b).

CONCLUSIONI

Lo studio della componente lipidica delle farine e delle semole ha consentito l'individuazione di una classe di composti, gli esteri degli steroli, che è contenuta in quantità costante e maggiore nelle farine rispetto alle semole in cui è praticamente trascurabile. I picchi identificati in letteratura come palmitati di β -sitosterolo e di campesterolo sono stati meglio risolti mediante l'analisi gascromatografica su colonna capillare 65%-fenil metilsilicone e sdoppiati in due ulteriori picchi che differiscono per una insaturazione nella struttura della parte sterolica degli esteri. L'individuazione di tali doppietti in aggiunta ad altri due doppietti di esteri di steroli – identificati come oleati di campesterolo e campestanolo, i primi, e oleati di β -sitosterolo e β -sitostanolo i secondi – ci ha consentito di svincolare l'analisi dall'estrazione esauriente del grasso degli sfarinati, potendo monitorare dei rapporti caratteristici delle farine e delle semole. La stabilità termica degli esteri degli steroli, ha reso possibile la messa a punto di un metodo rapido di analisi che è in grado di fornire risultati attendibili circa il mescolamento del grano tenero con il grano duro non solo a partire dalle matrici iniziali, ma anche quando sia stata ottenuta la pasta, indipendentemente dalla temperatura di essiccazione. Infine, l'estrazione rapida del grasso mediante percolazione del solvente estraente sulla colonna impaccata con lo sfarinato consente di accelerare i tempi di analisi se paragonato ai metodi classici di estrazione e risulta perciò vantaggioso nei casi in cui debbano essere analizzati molti campioni in tempi brevi.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Biffoli R. (1984). *Chimica degli Alimenti*. USES Ediz. Scientifiche Firenze.
- 2) DPR n. 187 del 9 febbraio 2001. Regolamento per la revisione della normativa sulla produzione e commercializzazione di sfarinati e paste alimentari, a norma dell'articolo 50 della legge 22 febbraio 1994, n. 146.
- 3) Disposizioni per l'adempimento di obblighi derivanti dall'appartenenza dell'Italia alle Comunità Europee. Legge del 24 aprile 1998 n. 128, art. 48, pubblicata in suppl. ordinario n. 88/L alla G.U. n. 104 del 7-5-98.
- 4) Importazione di pasta alimentare di grano tenero o mista con semola di grano duro, difforme dalla Legge 4 luglio 1967 n. 580, purché etichettata. Circolare Ministeriale del 2 novembre 1992, n. 131149/R.
- 5) Milatovich L., Mondelli G. (1990). *La tecnologia della pasta alimentare*. Chiriotti Editori.
- 6) Madureri E. (1996). Le analisi delle farine. *Tecnica Molitoria*, 3, 237-248.
- 7) Inghilterra G. (2003). Influenza dei lipidi sulle proprietà reologiche di impasti di sfarinato di grano tenero. *Tecnica Molitoria*, 11, 1148-1152.
- 8) Quaglia G.B. (1997). Paste da cereali alternativi, paste aglutiniche, ed apteiche, paste arricchite. *Tecnica Molitoria*, 6, 666-672.
- 9) Medvedev G. (1997). Aspetti non convenzionali della pastificazione. *Tecnica Molitoria*, 11, 1210-1214.
- 10) Cortecs Diagnostics. (1998). Anticorpi per kit ricerca tenero nella pasta. *Tecnica Molitoria*, 5, 527-532.
- 11) Brandolini V., Maietti A., Mazzotta D., Manziani E. (1998). Riconoscimento varietale del frumento mediante elettroforesi capillare. *Tecnica Molitoria*, 12, 1341-1343.
- 12) Milatovic L. (1963). Analisi per determinare la purezza del grano e della farina. *Tecnica Molitoria*, 22, 89.
- 13) D'Egidio M.G. (1983). Analisi delle caratteristiche legate alla qualità delle paste alimentari. *Tecnica Molitoria*, 83, 564-574.
- 14) Franciosi A.M., Giovannini G. (1965). Cromatografia in fase vapore applicata all'analisi di paste alimentari. Differenziazione tra tenero e duro. *Tecnica Molitoria*, 2, 107.
- 15) Resmini P., De Bernardi G. (1969). Possibilità di semplificare il metodo elettroforetico Resmini per la ricerca ed il dosaggio dei prodotti di grano tenero in quelli di grano duro. *Tecnica Molitoria*, 4, 70.
- 16) Resmini P., De Bernardi G. (1976). Il metodo elettroforetico rapido per il riconoscimento ed il dosaggio del grano tenero nel grano duro, negli sfarinati e nelle paste alimentari. *Tecnica Molitoria*, 10, 97.
- 17) Cantagalli P., Piazzi S.E., Sordi-Galli S. (1969). Il controllo della genuinità delle semole di frumento duro e delle paste alimentari mediante analisi immunologica. *Tecnica Molitoria*, 4, 79.

- 18) Autran J.C. (1995). Determinazione del grano tenero nella pasta: risultati quadriennali di uno studio a livello europeo. *Getreide Mehl und Brot*, 5, 272-277.
- 19) Nota G., Spagna Musso S., Naviglio D., Romano R., Di Matteo M. (1995). Determinazione rapida del grasso nelle farine e nelle semole mediante tecniche strumentali. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 72, 73-77.
- 20) AOAC (1995). *Metodi ufficiali di analisi*. 16ª edizione.
- 21) Pomeranz Y. (1988). *Wheat Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemists. Terza edizione.
- 22) Nota G., Spagna Musso S., Romano R., Naviglio D., Improta C. (1995). Idrolisi rapida degli esteri degli steroli nei grassi. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 72, 315-316.
- 23) Sarwar M., Mc Donald C.E. (1993). Detection of bread wheat farina adulterant in durum wheat semolina and pasta dried at low, high and ultra high temperatures. *Cereal Chemistry*. 70 (4), 405-411.
- 24) Morrison W.R. (1978). *Cereal Lipids*. Advances in Cereal Science and Technology. American Association of Cereal Chemistry.