

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI  
BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI  
CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA / LAUREA MAGISTRALE IN  
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI

**ESTRAZIONE DI ADDITIVI VEGETALI DAL FRUTTO  
DI RIBES ROSSO AL FINE DI UTILIZZARLI COME  
INGREDIENTI TECNOLOGICI IN PRODOTTI  
A BASE DI CARNE**

Tesi in

QUALITÀ E FORMULAZIONE DEGLI ALIMENTI

(C.I.) - FORMULAZIONE E INNOVAZIONE DI PRODOTTO

Relatore:

**Prof. Pietro Rocculi**

Correlatore:

**Dott.ssa Urszula Tylewicz**

**Prof. Petras Rimantas Venskutonis**

**Dott.ssa Laura Jūrienė**

Candidato: **Corrado Dipietro**

Matricola N° 0000976021

Anno Accademico 2021/2022

Sessione unica

# INDICE

## INTRODUZIONE

## PARTE GENERALE

1. Pianta del Ribes	5
1.1. Ribes rosso	6
1.1.1. Composizione e Valori nutrizionali	7
2. Tecniche di estrazione	9
2.1. Tecniche tradizionali	9
2.2. Tecniche innovative (Ultrasuoni, Estrattore Naviglio, SFE-CO <sub>2</sub> )	11
3. Prodotti funzionali	17

## PARTE SPERIMENTALE

4. <b>Materiali e metodi</b>	19
4.1. Materia prima	19
4.2. Prima Fase: Estrazione degli ingredienti	19
4.2.1. SFE-CO <sub>2</sub>	20
4.2.2. Macerazione	21
4.2.3. Naviglio	22
4.3. Seconda Fase: Caratterizzazione degli ingredienti	24
4.3.1. Analisi compositive sulla polvere di ribes rosso	24
4.3.2. Analisi del potere antiossidante	27
4.3.3. Quantificazione flavonoidi	35
4.4. Terza Fase: Studio applicativo in prodotto a base di carne	35
4.4.1. Test preliminari	36
4.4.2. Piano d'azione esecutivo dello studio	38

4.5. Quarta Fase: Simulazione della digestione dell'alimento in vitro	46
4.5.1. Analisi capacità antiossidante sui residui della digestione	49
<b>5. Risultati e discussione</b>	<b>50</b>
5.1. Risultati ottenuti dalla caratterizzazione degli additivi vegetali	50
5.2. Risultati dello studio applicativo	52
<b>6. Conclusioni</b>	<b>66</b>
<b>7. Bibliografia</b>	<b>67</b>
7.1. Sitografia	70

## INTRODUZIONE

Uno degli inconvenienti maggiori dei prodotti a base di carne dal punto di vista nutrizionale sono l'alta suscettibilità del prodotto all'ossidazione lipidica con conseguente riduzione della *shelf life* e deterioramento, rendendolo un prodotto difficile da consumare nel lungo termine senza ricorrere al congelamento o alla conservazione sottovuoto del prodotto.

Il secondo problema è legato alla forte carenza in termini di fibra alimentare, un problema sempre più riscontrato la quale mancanza è spesso correlata a vari disturbi di salute come malattie cardiovascolari, obesità, problemi al colon o cancro (Larsson & Wolk, 2006).

La carne ed i prodotti a base di carne rappresentano una delle primarie fonti di sostentamento umano consumata in tutto il mondo, in quanto presenta molteplici aspetti qualitativi.

In primis è un'ottima fonte di proteine di alta qualità con un buon equilibrio di aminoacidi essenziali ad alto valore biologico (Lawrie & Ledward, 2006; Lorenzo & Pateiro, 2013), è un importante fonte di numerosi micronutrienti come selenio, ferro, magnesio, potassio, sodio e vitamine quali A, B12 e acido folico.

Inoltre, la carne rispetto a prodotti di origine vegetale risulta avere un livello molto superiore in termini di biodisponibilità (Biesalski, 2005) dei micronutrienti oltre a riuscire a soddisfare il gusto di chi la consuma grazie alle sue molteplici qualità sensoriali ed organolettiche che ne conferiscono la sua consistenza, colore, aroma e caratteristico sapore.

Varie reazioni bio-chimiche e processi microbiologici si verificano nella carne durante la lavorazione e lo stoccaggio; alcuni di essi possono influire negativamente sulla qualità dei prodotti crudi e trasformati.

L'ossidazione di lipidi e proteine nella carne è uno dei fattori di deterioramento che genera grandi cambiamenti indesiderati; vi sono però vari metodi fisici e additivi di varia natura che ci permettono di controllarli.

A causa delle crescenti preferenze dei consumatori verso la "naturalità" degli alimenti, c'è la tendenza a sostituire i conservanti chimici con alternative di origine vegetale naturale.

Numerosi materiali vegetali sono una buona fonte di antiossidanti naturali e agenti antimicrobici, che contribuiscono a prolungare la durata di conservazione dei prodotti stabilizzandone le caratteristiche qualitative.

Inoltre, gli ingredienti naturali possono aumentare il valore nutritivo e i benefici per la salute dei prodotti a base di carne, arricchendoli con sostanze fitochimiche bioattive e altri nutrienti preziosi, come composti polifenolici, vitamine, fibre alimentari e minerali (Kerner et al; 2021).

Proprio su questi presupposti questo studio ha avuto l'obiettivo di valutare la funzionalità e l'efficacia di additivi vegetali estratti dal frutto di ribes rosso mediante tecniche innovative che puntano a concentrare ed estrarre il maggior numero di composti antiossidanti, componenti benefiche e nutrienti.

Una volta ottenuti questi additivi, sono stati utilizzati come ingredienti funzionali in prodotti a base di carne prolungandone la *shelflife* attraverso un maggiore controllo dell'ossidazione lipidica e proteica, migliorandone il profilo nutritivo cercando di non impattare negativamente o anzi migliorare il prodotto finito dal punto di vista organolettico e sensoriale.

# PARTE GENERALE

## 1. PIANTA DEL RIBES

Il ribes, appartenente alla famiglia delle *Grossulariaceae*, diffuso nell'intero emisfero boreale ed in Sudamerica, comprende piante coltivate a scopo alimentare, come il ribes rosso, l'uva spina ed il ribes nero.

I luoghi d'origine del ribes rosso sono le Regioni montane dell'Europa Occidentale mentre quelle del ribes nero sono l'Asia e l'Europa settentrionale sino alle Alpi.

La pianta era certamente già conosciuta nel XVI secolo in quanto in trattati di medicina relativi alle proprietà benefiche degli alimenti, vengono indicate le loro proprietà benefiche, tali frutti all'epoca venivano coltivati solo sporadicamente in Italia, e più su larga scala in altre nazioni come la Germania, l'Olanda e la Polonia (Amirante; 2014).

Il nome ribes della pianta è nato nell'anno 1500 e non deriva dal greco o dal latino come sovente avviene in botanica, né dal nome del suo scopritore, ma dal termine scandinavo "*rips*" da dove poi fu importata in Italia nelle tre varietà di ribes comune rosso o bianco, di ribes nero e l'uva spina varietà bianca dotata di spine.

La pianta di ribes è un arbusto perenne, di solito a portamento cespuglioso, che a seconda della varietà e della tecnica di coltivazione, può raggiungere altezze comprese tra 1 e 3 metri.

La pianta è dotata di radici poco profonde ed il tronco è molto sottile, soprattutto nelle piante che crescono a cespuglio e portano dei rami lunghi di circa 20 cm, con delle gemme situate verso l'esterno dei rami.

Le foglie sono allungate, di colore verde, prive di pelurie, ed hanno un peduncolo abbastanza sviluppato sprovvisto di stipole alla base.

I fiori sono autofertili, tranne che nel *Ribes nigrum* e sono costituiti da cinque petali di colore bianco con sfumature gialle ed i sepali sono verdi e lunghi.

Il frutto è una bacca traslucida di forma tondeggianti riunita in grappoli ed ha un colore variabile a seconda della specie coltivata rosso, bianco o nero; Il diametro della bacca di ribes è solitamente inferiore al centimetro.

La polpa ha un sapore dolce-acidulo nel ribes rosso e bianco, più amarognolo nel ribes nero e all'interno della bacca sono custoditi numerosi semi di dimensioni piccolissime.

In termini produttivi la pianta di ribes entra in produzione già dal secondo anno dell'impianto, ma la piena produzione parte dal 4-5 anno e da questo momento il ribes si mantiene in produzione per 10-12 anni, assicurando ottime rese (Amirante; 2014).

Il ribes non è una pianta molto esigente per quanto riguarda la tipologia del terreno e si adatta bene anche nei suoli più poveri, dove produce frutti più aromatici e profumati, a discapito, però, delle rese; tuttavia, predilige terreni soffici e ben drenati, con una reazione leggermente acida ed un pH compreso tra 6,2 e 6,7 ed il valore ottimale è pari a 6,5.

Le forme di allevamento più utilizzate per il ribes a scopi produttivi, possono essere a cespuglio e a controspalliera, di cui la prima è una forma libera, senza bisogno di sostegni, mentre l'allevamento a controspalliera prevede una distanza d'impianto di 2,5 metri tra le file e 1,5 metri, tra una pianta e l'altra lungo la fila.

La raccolta del ribes si esegue manualmente, in quanto i frutti maturi si staccano facilmente dalla pianta e se si incontra resistenza nel distacco del frutto, conviene passare al grappolo successivo; si precisa, che se il frutto è particolarmente maturo, deve essere prelevato delicatamente dalla pianta e poi inserito in un contenitore con cautela al fine di non rovinare il frutto al quanto delicato.

La pianta del ribes viene frequentemente utilizzata a scopo farmacologico, trova impiego terapeutico soprattutto nella cura degli stati infiammatori di varia origine, come ad esempio il mal di gola, le bronchiti o il raffreddore, ma anche delle allergie delle più comuni sindromi influenzali, delle congiuntiviti e di molte forme di dermatite. Gli estratti della pianta vengono considerati un elisir contro infiammazioni, malanni stagionali e stress, sono considerati l'alternativa naturale al cortisone (Amirante; 2014). Le proprietà antinfiammatorie di questi estratti aiutano il sistema immunitario a difendere l'organismo da allergie e da influenze, del ribes nero si utilizzano diverse parti con differenti proprietà e cioè le foglie vengono usate in fitoterapia sotto forma di infusi e tintura madre.

Inoltre, i frutti sono ricchissimi di acido citrico, vitamina C, in una forma più stabile di quella degli agrumi, inoltre contengono polifenoli, oligoelementi, antociani, gli antiossidanti tipici della frutta di colore viola e flavonoidi, sono preziosi per le loro capacità astringenti, vaso protettrici e rinfrescanti e sono commercializzati in erboristeria in fase liquida.

### 1.1. Ribes rosso

*Ribes rubrum* (L., 1753), comunemente noto come ribes rosso, è una pianta appartenente alla famiglia delle *Grossulariaceae*, originaria dell'Europa occidentale (Belgium, France, Germany, Great Britain, Netherlands, Spain) poi successivamente importato negli altri continenti. (Figura 1)

Il ribes rosso è un piccolo arbusto perenne, caducifoglie e latifoglie, alto massimo 1-2 metri, molto ramificato. Le foglie sono verdi con tre lobi. I fiori sono di colore che variano dal giallo al verde. Fiorisce in marzo-aprile e fruttifica in luglio-agosto.



Figura 1: Frutto Ribes rosso

I frutti sono piccole bacche di colore rosso, edibili e cresce principalmente in un bioma temperato.

Il frutto di tale specie di ribes può essere coltivato fino a 1200 – 1400 m s.l.m., l'ambiente ideale è caratterizzato da lunghi periodi invernali di freddo, dove però non si debbano temere gelate primaverili tardive. L'apparato radicale è profondo e permette alle piante di sopportare lunghi periodi di siccità ma la produttività aumenta considerevolmente in terreni irrigui.

### **1.1.1. Composizione e valori nutrizionali**

Questo frutto è ricco di qualità benefiche sicuramente grazie al fatto che è caratterizzato da buone concentrazioni di acidi organici e acidi grassi come linoleico  $\omega$ -3, linolenico  $\omega$ -6, oleico  $\omega$ -9; ricco di acido ascorbico, flavonoidi, polifenoli, terpeni e antocianine; ed è pure ricco di minerali (calcio, ferro, fosforo, fluoro, e magnesio, selenio, zinco, manganese, rame e potassio) e di vitamine (A, B1, B2, B3, B5, B6, C, E, K, colina, folati, acido folico (FDE), beta carotene, luteina + zeaxantina).

Fin dai tempi degli indiani d'America questa bacca veniva utilizzata per diverse preparazioni di pietanze e salse, da cui hanno tratto notevoli informazioni sulle loro proprietà terapeutiche.

Tra i principali benefici del ribes rosso troviamo: Antiossidante, Antireumatico, Antinfettivo, Cardioprotettivo, Diuretico, Emostatico e Lassativo.

Molte le proprietà del ribes rosso tra cui il contrastare l'azione di batteri patogeni (*Escherichia coli*) responsabili di infezioni intestinali; di contrastare l'infiammazione e proteggere capillari e vasi sanguigni dai danni del colesterolo. Hanno inoltre un'azione astringente, rinfrescante e protettiva della vista proteggendo la retina dai radicali liberi. Il ribes rosso, come tutti i frutti rossi, grazie ai suoi specifici nutrienti sono utili per il genere femminile nel periodo di gravidanza (Orsavová et al; 2019).

Il ribes rosso può aiutare a migliorare la salute dell'apparato digerente e combattere la stitichezza grazie alle sue fibre, tra cui le pectine, in grado di rimuovere il colesterolo dalle arterie e dai vasi sanguigni.

Il ribes rosso sembra essere in grado di aiutare la formazione dei globuli rossi grazie al contenuto di rame e ferro, essenziali per la formazione di nuove cellule del sangue; inoltre, l'equivalente di una tazza di ribes rosso contiene il 76% del fabbisogno giornaliero di vitamina C, un potente antiossidante che aiuta il corpo a sviluppare la resistenza contro gli agenti infettivi e a combattere i radicali liberi.

La spiccata azione antiossidante è stata osservata in vitro dagli estratti di bacche di diverse cultivar di Ribes, *Rubus* e *Vaccinium*, generi ricchi di sostanze fenoliche, antociani e polifenoli. Tutti gli estratti grezzi che presentano una notevole attività antiossidante, in particolare contro il radicale superossido generati chimicamente. A favorire tale potere si aggiunge l'abbondante concentrazione di manganese, cofattore essenziale in alcuni enzimi per importanti difese antiossidanti.

L'attività di contrasto verso i radicali liberi risulta essere molto forte anche in considerazione del fatto che gli estratti sembrano contenere più sostanze attive, come antociani e polifenoli, rispetto ad altri frutti della stessa famiglia. Inoltre, gli estratti hanno mostrato una certa attività inibitoria dell'enzima *xanthine oxidase* (Hidalgo & Almajano; 2017).

Diverse cultivar di ribes rosso sono caratterizzate da variazioni significative nelle quantità di fenoli totali e solidi solubili, mentre il contenuto di zuccheri e acidi organici è stato influenzato dalla loro origine geografica. Le bacche possono avere molto successo nel mercato fresco perché le loro caratteristiche organolettiche sono solitamente favorite dai consumatori, ma la loro durata è tipicamente breve.

Per questo motivo, gli effetti di lavorazione e conservazione sulla qualità delle bacche sono stati ampiamente studiati. Il congelamento è la tecnologia di lavorazione e conservazione più comune applicata alle bacche a causa del suo potere di ridurre le reazioni chimiche e biologiche negli alimenti, la conservazione dei nutrienti e importanti attributi di qualità e costi operativi relativamente bassi. (Djordjević et al; 2010)

Il ribes rosso è per lo più destinato al consumo fresco, spesso in assortimento con altri piccoli frutti, possono essere conservati a lungo (oltre 1 mese) in cella frigorifera in atmosfera normale. Il ribes viene anche utilizzato industrialmente sotto forma di surgelati, disidratati, succhi e puree (basi per nettari, yogurt, gelati, pasticceria), confetture e gelatine, frutti interi allo sciroppo e sotto alcool, liquori, coloranti, cosmetici e prodotti farmaceutici. Le gemme e le foglie (ricche di terpeni) sono impiegate nella preparazione di tè ed infusi.

## 2. TECNICHE DI ESTRAZIONE

Esistono una vastissima quantità di tecniche che permettono di separare una componente da una matrice indipendentemente dal suo stato fisico, tutte hanno il medesimo fine di concentrare il prodotto il più possibile togliendo tutte le componenti diversa da quella target ed a volte la miglior applicazione è proprio quella di un utilizzo combinato di più tecniche.

Le tecniche attuali di estrazione solido-liquido sfruttano essenzialmente la diffusione e l'osmosi come principi sui quali è possibile incidere per ridurre il tempo di estrazione e per aumentare la resa. Infatti, la tendenza attuale è quella di aumentare la temperatura del sistema estrattivo per ottenere migliori risultati oppure realizzare più volte il contatto del solvente estraente con il solido da estrarre.

Vi sono metodiche più classiche come la macerazione, spremitura o il Soxhlet, oppure tecniche più innovative che sfruttano microonde, ultrasuoni, fluidi supercritici o la variazione di pressione.

La spremitura o estrazione a freddo è uno dei metodi più antichi, al giorno d'oggi ampiamente utilizzato per la produzione di succhi di frutta e l'estrazione dell'olio grazie all'utilizzo di una pressa a vite.

La tecnica estrattiva da laboratorio Soxhlet, viene riportata come metodo ufficiale di estrazione per numerosi metodi analitici, utilizza il riscaldamento del sistema, poiché si basa sui principi della diffusione e dell'osmosi, per cui non è utilizzabile per le sostanze che si degradano per effetto del calore.

L'utilizzo degli ultrasuoni per l'estrazione di principi attivi dalle piante officinali porta ad ottenere gli stessi risultati dell'estrazione per spremitura, se non risultati peggiori in quanto il sistema si riscalda a causa del prolungato trattamento frantumando la matrice ottenendo un miscuglio impossibile da separare e quindi difficilmente applicabile a livello industriale.

Mentre di gran lunga più efficaci sono quelle che sfruttano le variazioni di pressione nel sistema per favorire l'azione estraente del solvente come ad esempio l'estrattore Naviglio.

### 2.1. Tecniche tradizionali

Alla base dell'estrazione solido-liquido vi è, senza dubbio, una osservazione sperimentale se, una matrice solida contenente del materiale estraibile, viene immerso in un liquido, quest'ultimo inizia ad arricchirsi di determinate sostanze chimicamente affini. La più classica e la più semplice tra le tecniche di estrazione, è la macerazione, oltre ad essere la più economica perciò largamente diffusa. Purtroppo, essa non è sempre applicabile in quanto richiede tempi lunghi di contatto tra il solido ed il liquido; ad esempio, i vegetali non possono essere posti a macerare in acqua per l'insorgere di fenomeni di putrefazione.

Una tecnica estrattiva largamente usata che consiste nel ricoprire il solido da estrarre con il liquido e lasciare stare il sistema in questo stato per un tempo prolungato.

L'estrazione avviene a temperatura ambiente e di conseguenza non c'è alterazione dei composti termolabili; d'altra parte i tempi di estrazione sono mediamente lunghi per il fatto che l'estrazione avviene principalmente per effetti diffusivi, tanto che si richiede di agitare il sistema di tanto in tanto per favorire la diffusione dei composti estratti ed evitare un sovrassaturazione localizzata nelle immediate vicinanze della superficie del solido da estrarre, cosa che porta ad un rallentamento del processo estrattivo globale. Per aumentare l'efficienza di tali sistemi estrattivi si ricorre ad un aumento di temperatura, che incide sull'aumento della diffusione, al fine di ridurre i tempi di estrazione ed aumentare le rese. In alternativa vengono anche utilizzati ultrasuoni o microonde per aumentare l'energia cinetica delle molecole che si trovano all'interno della matrice solida.

Tale espediente non è applicabile in molti casi a causa della termolabilità di alcuni composti come per molte matrici vegetali in quanto esse contengono sostanze che si degradano per effetto del calore.

L'efficienza del processo globale in genere non è alta e non è universalmente applicabile, ma date le grandi quantità di solido impiegate l'estratto risulta abbastanza ricco di composti estraibili.

La macerazione richiede solamente delle fasi di agitazione saltuaria per permettere la diffusione e l'osmosi delle sostanze estratte in tutta la massa del liquido estraente in modo tale da evitare delle zone di sovrassaturazione in prossimità del solido da estrarre.

La macerazione non richiede né apparecchiature complesse né del personale specializzato ma è in genere abbastanza lunga e richiede dei giorni o settimane per andare a completezza.

Le esigenze produttive dell'industria, che impongono l'ottenimento di grandi quantità di estratti in poco tempo, hanno trovato una applicazione nell'estrazione per percolazione; in tale caso è possibile trattare grandi quantità di materiale solido con grandi volumi di liquido e giungere in tempi abbastanza brevi all'estratto sacrificando però l'efficienza dell'estrazione che si mantiene bassa per il limitato contatto tra il solido ed il liquido estraente.

La scelta del liquido estraente risulta molto importante, l'utilizzo dell'acqua è impensabile, in quanto la maggior parte delle sostanze vegetali, contenendo inevitabilmente delle flore microbiche, andrebbero in putrefazione più rapidamente rispetto al processo estrattivo.

Spesso vengono utilizzate delle miscele acqua-alcool più efficienti dei corrispondenti sistemi di solventi monocomponenti nell'estrazione di composti fenolici. Numerosi studi effettuati hanno dimostrato che l'etanolo sembra essere migliore per il recupero di composti antiossidanti in confronto a solventi come metanolo acetone o esano. Inoltre, l'uso di etanolo è uno dei solventi più utilizzati a causa della convenienza economica in quanto può essere ottenuto da una fonte rinnovabile (canna da zucchero) inoltre è anche un solvente che produce un minore impatto ambientale rispetto agli altri, migliorando l'approccio della chimica sostenibile. (Bensaid et al; 2018)

In molti processi industriali la fase iniziale della preparazione di un prodotto richiede l'applicazione di una tecnica di estrazione solido-liquido per isolare il materiale estraibile contenuto nelle più svariate matrici di tipo vegetale. Le applicazioni di tale tecnica a livello industriale sono molteplici, l'esempio più importante è il settore delle piante officinali, da cui si ricavano i principi attivi con proprietà farmacologiche per la cura di determinate patologie e malattie dell'uomo; campi affini sono quello dell'erboristeria, della cosmetica e della profumeria che ricavano gli ingredienti principali dei loro preparati sottoponendo ad estrazione solido-liquido parti di piante come fiori, foglie, radici etc. (Sito: Estrazione solido liquido )

Anche in altri settori industriali come quello dell'industria delle bevande, viene impiegata una estrazione solido-liquido per ottenere estratti alcolici di bucce di agrumi, fiori, foglie etc., che poi sono mescolati ad acqua e zucchero per l'ottenimento del prodotto finito.

## **2.2. Tecniche innovative**

### **Estrazione ad Ultrasuoni**

Gli ultrasuoni vengono generati per mezzo di materiali con particolari caratteristiche meccanico-elettriche, i materiali piezoelettrici. Questi materiali, come ad esempio il quarzo, hanno la caratteristica di generare una differenza di potenziale se compressi o stirati in senso trasversale, quando cioè sono sottoposti ad una deformazione meccanica. Questa loro particolare caratteristica (piezoelettricità) viene sfruttata per generare queste onde meccaniche sopra il campo dell'udibile umano (ultrasuoni). La piezoelettricità (la parola deriva dal greco, comprimere, premere) è quindi la proprietà di alcuni cristalli di generare una differenza di potenziale quando sono soggetti ad una deformazione meccanica, con effetto reversibile, e rappresenta la chiave di accesso per l'emissione degli ultrasuoni.

Gli ultrasuoni sono onde meccanici sonori. A differenza dei fenomeni acustici propriamente detti, le frequenze che caratterizzano gli ultrasuoni sono superiori a quelle mediamente percepite da un orecchio umano. La frequenza utilizzata convenzionalmente per differenziare le onde soniche da quelle ultrasoniche è fissata in 20 kHz. Il termine ultrasuono indica quindi chiaramente ciò che è al di là (ultra) del suono, identificando così le onde sonore non udibili dall'uomo. (Sito: Estrazione ad ultrasuoni, Mengoli)

Come ogni altro tipo di fenomeno ondulatorio gli ultrasuoni sono soggetti a fenomeni di riflessione, rifrazione e diffrazione e possono essere definiti mediante parametri quali la frequenza, la lunghezza d'onda, la velocità di propagazione, l'intensità (misurata in decibel).

La tecnica estrattiva ad ultrasuoni, grazie al fenomeno della cavitazione, rompe la parete della cellula vegetale, incrementando il trasferimento di massa e la penetrazione del solvente, permettendo di accelerare i tempi di estrazione solo grazie ad un'azione fisica.

L'estrazione ad ultrasuoni viene applicata da decenni in campo alimentare e si basa sulla trasmissione di vibrazioni con frequenza elevatissima, compresa tra 20.000 e 40.000 al secondo. Poiché la caratteristica chimico-fisica che identifica le onde luminose, sonore, ed anche gli ultrasuoni è la lunghezza d'onda, a seconda di quella che si utilizza si ottengono determinati risultati. Il tempo di estrazione va da un minimo di 20 minuti ad un massimo di un'ora a seconda del tipo di pianta da trattare: foglie, fiori, frutti, ecc. o cortecce e radici più o meno legnose.

In ogni caso occorre prima di effettuare una macinazione per è necessario ottenere particelle vegetali della dimensione di circa 3/5 mm; la ricerca ha dimostrato che questa è la dimensione ottimale per realizzare una estrazione totale nei tempi prestabiliti. Questa alta tecnologia consente di ottenere estratti liposolubili ed idrati con la stessa facilità e con gli stessi tempi utilizzati per i tipi idroalcolici, idroglicerici, glicolici.

La lavorazione viene sempre fatta a freddo, a temperatura ambiente, con un liquido di supporto selezionato preventivamente in base all'estratto da ottenere: idrosolubile, lipolico, idroalcolico, ecc. L'aumento di temperatura al termine dell'estrazione non supera i 2-3 gradi; ciò consente di evitare anche la possibile caramellizzazione dei componenti zuccherini naturalmente presenti nelle materie prime vegetali.

I vantaggi ottenuti grazie all'impiego di ultrasuoni sono la possibilità di preservare completamente le proprietà organolettiche e i principi attivi della materia prima grazie ad un processo completamente naturale, si evita l'utilizzo di alta temperatura e quindi la formazione di possibili composti indesiderati ed un'alta velocità di estrazione.

### **Estrattore Naviglio**

Il Naviglio è una tecnica ideata e scoperta da Daniele Naviglio uno studente italiano laureato in chimica negli anni 1993-94, che ne depositò la domanda di brevetto nel 1998, rilasciato poi nel 2000. (Sito: Estrazione solido liquido )

L'estrattore rapido solido-liquido dinamico rappresenta una tecnologia innovativa di estrazione solido-liquido che permette di esaurire in tempi brevi, paragonato alle altre tecniche estrattive attualmente esistenti, le matrici solide contenenti sostanze estraibili in un solvente organico o inorganico ed in loro miscela.

Mentre in altre metodiche, l'azione estrattiva è di tipo passivo, cioè bisogna attendere che si raggiunga un equilibrio di composizione tra i composti estratti nel liquido e quelli rimanenti nel solido, nel caso del Naviglio Estrattore si esercita una azione attiva verso le sostanze da estrarre; non bisogna attendere lo stabilirsi di un equilibrio, ma i composti non chimicamente legati alla matrice solida vengono estratti in piccole quantità ad ogni ciclo estrattivo fino al completo esaurimento della matrice che avviene in tempi dell'ordine di grandezza delle ore.

La novità dell'estrattore sta nel fatto che cambia la filosofia estrattiva poiché viene invertita la tendenza dei metodi attuali che mirano a riscaldare il sistema estrattivo per aumentare la resa ed accelerare i tempi di estrazione; il Naviglio Estrattore effettua

l'estrazione a temperatura ambiente o sub-ambiente e sfrutta un aumento di pressione del liquido estraente sulla matrice solida da estrarre.

L'importanza di estrarre a basse temperature risiede nel fatto che in questo modo viene evitato lo stress termico a carico di sostanze termolabili.

Perciò è possibile, ad esempio, riprodurre fedelmente la composizione delle sostanze contenute nelle piante officinali senza indurre trasformazioni a carico dei principi attivi, che in genere sono i composti più "delicati" da estrarre in quanto risentono degli effetti della temperatura.

Il Naviglio Estrattore rappresenta una valida alternativa rispetto alle tecniche estrattive attualmente esistenti e trova applicazione nell'estrazione dei principi attivi dalle piante officinali, nella estrazione degli oli essenziali agrumari, nell'estrazione di essenze e profumi, nell'estrazione di grassi etc.

Nel settore alimentare, sia nell'ambito della produzione che della ricerca, per esempio il Naviglio trova applicazione anche nell'idratazione rapida dei legumi e nella destrutturazione a temperatura ambiente degli ortaggi (cottura, cottura senza calore) per una maggiore conservazione degli elementi nutrizionali.

Queste applicazioni possono essere realizzate sia su scala industriale che su scala di laboratorio.

L'obiettivo del progetto è quello di arrivare a mettere a punto diversi trattamenti industriali di estrazione/purificazione sfruttando una innovativa tecnologia di estrazione solido-liquido.

I vantaggi nell'impiego di questa tecnica sono la velocità con cui si può eseguire questo processo, la possibilità di usare temperature più basse della temperatura ambiente ottimo se si prevede l'estrazione di eventuali composti termolabili.

Un altro aspetto positivo è quello di poter estrarre da matrici vegetali anche con solventi come l'acqua risolvendo così in alcuni casi uno dei maggiori svantaggi ovvero la problematica legata all'utilizzo di solventi chimici. (Sito: Estrazione solido liquido )

Prove sperimentali condotte fino ad oggi su più di duecento vegetali hanno dimostrato che, lavorando alla pressione di 6 atm, la maggior parte delle matrici solide, indipendentemente dal grado di sminuzzamento, possono essere estratte utilizzando circa venti cicli estrattivi che si completano in circa due ore.

Inoltre, è stata provata la riproducibilità dell'estrazione su una stessa matrice in termini ponderali e sono stati condotti esperimenti di confronto con le altre tecniche estrattive, che hanno evidenziato un recupero più alto a favore del Naviglio Estrattore, nonché una qualità dell'estratto superiore e in nessun caso è stata indotta alterazione delle sostanze termolabili.

## Estrazione del fluido supercritico con anidride carbonica (SFE-CO<sub>2</sub>)

L'estrazione del fluido supercritico (SFE, *Supercritical Fluid Extraction*) è una tecnica molto giovane che si basa sullo stato specifico che si ottiene quando la temperatura e la pressione della sostanza sono al di sopra del punto critico.

In quello stato supercritico si ottiene un fluido che ha caratteristiche specifiche di gas e liquidi (solvatazione e potenza simile ai liquidi, ma bassa viscosità, alta diffusività simile ai gas). In fase di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), è possibile distinguere tre stati (solido, liquido e gas).

Questi stati sono separati dalla curva di fusione (equilibrio solido-liquido), la curva di sublimazione (equilibrio solido-vapore) e la curva di vaporizzazione (equilibrio liquido-vapore).

Il triplo punto e il punto critico anche sono estremamente importanti. Il punto triplo mostra le condizioni quando tutti e tre gli stati coesistono, mentre il punto critico è alla fine della curva di vaporizzazione dove liquidi e gas formano una fase fluida omogenea e, al di sopra di questo punto, si ottiene il fluido supercritico (Figura 2) (Raventós et al; 2002).

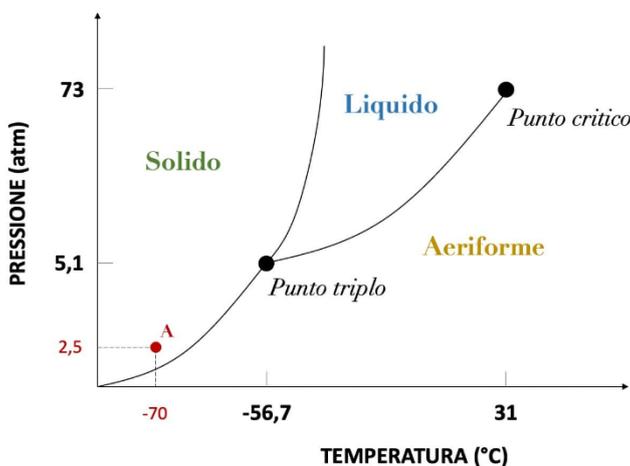


Figura 2: Diagramma di fase dell'anidride carbonica in funzione della temperatura e della pressione.

Rispetto al solvente liquido, i solventi fluidi supercritici hanno due vantaggi principali, il potere di dissoluzione del fluido supercritico dipende dalla sua densità che potrebbe essere in base a piccole variazioni di pressione e/o temperatura.

Il secondo vantaggio è che il fluido supercritico ha una minore viscosità e tensione superficiale, ma un coefficiente di diffusione più elevato, che migliora il trasferimento di massa.

L'anidride carbonica in fase supercritica assume le caratteristiche di solvente non polare ed è paragonabile al n-esano; con questo metodo è perciò possibile estrarre composti non polari da matrici solide.

Per un'estrazione di questo tipo sono anche necessari: un serbatoio della fase mobile (CO<sub>2</sub>), una pompa per CO<sub>2</sub> per pressurizzare i gas, un recipiente di estrazione con un riscaldamento a giacca, un controllore per mantenere la pressione nel sistema, e un bacino di raccolta.

Prima di tutto, CO<sub>2</sub> liquida viene pompata nella zona di riscaldamento, dove viene riscaldata e diventa fluido supercritico; quindi, passa nella cella di estrazione che contiene una camicia di riscaldamento con il controllo della temperatura e le valvole di pressione in ingresso/ uscita per mantenere le condizioni di estrazione desiderate.

Il fluido supercritico si diffonde nella cella di estrazione rapidamente attraverso la matrice del campione e dissolvendo le componenti che devono essere estratte.

Il fluido e i composti disciolti sono trasportati dalla cella di estrazione al separatore dove la potenza del fluido sta diminuendo grazie ad una pressione ridotta o un aumento della temperatura del fluido.

Infine, l'estratto può essere raccolto dalla valvola situata nella parte inferiore del separatore, mentre i gas di CO<sub>2</sub> vengono raffreddati, ricompresi e riciclati o scaricati nell'atmosfera (Figura 3).

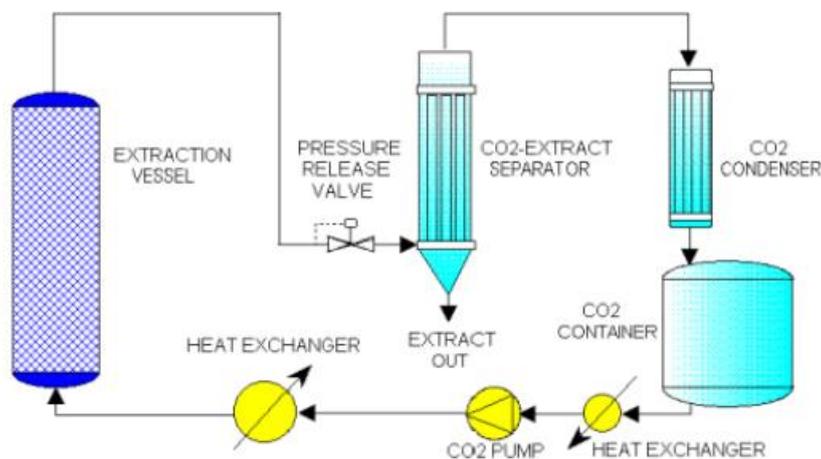


Figura 3: Diagramma dell'apparato SFE

Durante l'estrazione di SFE, è molto importante prestare attenzione ad alcuni fattori compreso il solvente, alla preparazione del materiale vegetale che deve avere una granulometria appropriata, eventuali co-solventi, alle condizioni di estrazione (temperatura, pressione e tempo di estrazione), la portata di CO<sub>2</sub> e il rapporto solvente-alimentazione (Reverchon & De Marco; 2006).

Uno dei vantaggi di questa tecnica è che alla fine dell'estrazione l'anidride carbonica viene allontanata sotto forma di gas dando la possibilità di recuperare i composti estratti concentrati

Ma presenta anche diversi svantaggi gli alti costi di applicazione e la sua non universalmente applicabilità in quanto prevede il contatto tra solido e il gas allo stato fluido, CO<sub>2</sub> nello stato supercritico acquista le caratteristiche chimico-fisiche dell'esano, immiscibile in acqua incolore e pericoloso.

Questa tecnica è brillantemente impiegata in processi industriali come nell'estrazione della caffeina dal caffè, l'estrazione dell'olio dai semi o la nicotina dal tabacco. (Madani et al; 2022)

### 3. PRODOTTI FUNZIONALI

Sin dall'antichità l'uomo ha rivolto particolare attenzione all'alimentazione attribuendone proprietà salutistiche e medicamentose. Un documento dell'antico Egitto, Il Papiro di Ebres (Regno di Amenhotep I 1534 a.C.), fa riferimento alla pianta dell'aglio, la quale veniva impiegata per curare disturbi cardiocircolatori parassitosi ed infezioni, proprietà confermate dalla scienza moderna che ne riconduce gli effetti benefici al solfuro di allile, un potente antiossidante e battericida.

A metà degli anni '80 fu proposto in Giappone il termine di "cibo funzionale" sull'osservazione di un progressivo allungamento dell'età media attribuito a particolari effetti benefici svolti dall'alimentazione giapponese basata sul largo consumo di pesce, un alimento questo, che apporta alla dieta un'elevata quota di grassi polinsaturi della serie omega-3 e di riso in cui sono presenti carboidrati complessi.

Tali supposizioni hanno trovato riscontri in numerosi studi scientifici volti ad evidenziare il ruolo degli omega-3 sull'incidenza delle patologie cardiovascolari (Aspetti normativi del functional food, Unife, 2013).

Questo continuo cambiamento nel modo di intendere gli alimenti e l'alimentazione ha dato il via a nuove ricerche e alla realizzazione di nuove tecniche di manipolazione dei cibi che hanno portato alla realizzazione degli alimenti funzionali.

Come riportato nel documento europeo di consenso sui "FUNCTIONAL FOOD" della Comunità Europea (COM 424 16/07/2003) un alimento è definito funzionale se oltre alle sue proprietà nutrizionali è scientificamente dimostrata la sua capacità di influire positivamente su uno o più funzioni fisiologiche, contribuendo a migliorare lo stato di salute e a ridurre il rischio di insorgenza delle malattie correlate al regime alimentare.

Gli alimenti funzionali non sono pillole o capsule ma sono parte integrante di un normale alimento. Un alimento funzionale può essere un "cibo naturale", oppure un alimento al quale, mediante trattamento tecnologico, è stato fortificato, arricchito o tolto un componente; può inoltre essere un alimento in cui uno o più componenti sono stati modificati.

Un alimento funzionale deve essere tale per tutta la popolazione o per gruppi particolari di popolazione e va consumato in un contesto di abituale alimentazione giornaliera.

L'informazione contenuta nei messaggi relativi agli alimenti funzionali deve essere chiara sulle proprietà dello specifico alimento. Per stabilire la sicurezza di un alimento funzionale, sono necessarie certificazioni ufficiali di controllo.

Gli obiettivi salutistici di tali prodotti possono essere molteplici:

- Funzioni gastrointestinale: includono equilibrio microflora, attività immunitaria, biodisponibilità nutrienti, motilità e transito intestinale.
- Stress ossidativo: richiede un soddisfacente introito di antiossidanti (polifenoli, carotenoidi, flavonoidi, vitamine) per bilanciare attività ossidante e sistemi di difesa.
- Sistema cardiovascolare: il controllo di colesterolemia e trigliceridemia riduce incidenza patologie cardiovascolari.
- Metabolismo dei macronutrienti: ruolo degli omega-3 nella modulazione genica delle vie metaboliche degli acidi grassi saturi. Interazione tra fruttani e lipogenesi epatica.
- Sviluppo neonatale e accrescimento: ruolo degli acidi grassi omega-3, acido folico e colina nello sviluppo fetale e neonatale.
- Xenobiotici e fitonutrienti: ruolo dei fitonutrienti nella protezione dell'organismo dalla tossicità e cancerogenicità causata da xenobiotici.

Attualmente dozzine di componenti fisiologicamente attivi dei cibi funzionali sono in fase di studio. Si tratta di componenti di derivazione sia vegetale (es. fitonutrienti come flavonoidi, isoflavonoidi, composti antiossidanti, fitosteroli ecc.) che animale (es. zoonutrienti come gli acidi grassi omega-3). Questi composti sono allo studio per valutare il loro potenziale ruolo nella prevenzione delle malattie e nel mantenimento della salute.

# PARTE SPERIMENTALE

## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1. Materia prima

I frutti di ribes rosso provenienti da coltivazioni locali della Lituania sono stati conservati in frigorifero prima del loro utilizzo a temperature di circa 4°C, mentre la carne di suino è stata comprata fresca il giorno della sperimentazione in un supermercato locale (Lidl, Kaunas, Lituania), lo stesso per il sale ed il pepe utilizzati per la preparazione degli hamburger.

### 4.2. Prima Fase: estrazione degli ingredienti

Una volta scelto il ribes rosso come matrice vegetale, è iniziato un processo di valutazione delle diverse tecniche utilizzabili al fine di estrarre dalle vinacce rimaste di tale frutto, precedentemente utilizzato in altri processi come la spremitura per ricavarne il succo, degli ingredienti con ottime caratteristiche benefiche.

Uno di queste è sicuramente la polvere di ribes rosso ottenuta da un processo di essiccazione convenzionale ed un successivo processo di omogeneizzazione al fine di ottenere una polvere di granulometria più uguale possibile.

Ma lo stesso risultato può essere raggiunto anche con tecniche più innovative come l'estrazione del fluido supercritico con anidride carbonica (SFE-CO<sub>2</sub>) eliminando allo stesso tempo gran parte della componente lipidica dovuto al grande quantitativo di semi che sono presenti nel frutto.

Un secondo additivo vegetale che si può ricavare dai ribes rossi è un estratto, ovvero un composto fluido ottenuto mediante un processo di estrazione solido-liquido.

Per tale processo sono molte le tipologie di tecniche esistenti ognuna delle quali con diversi vantaggi e svantaggi o maggiore/minore applicabilità in funzione delle caratteristiche di estrazione e della componente che si vuole estrarre.

Per questo studio la produzione dell'estratto di ribes rosso è avvenuta parallelamente con due metodiche: con la macerazione e con il Naviglio, al fine anche di poter confrontare i prodotti finali di queste due metodiche dal punto di vista di quantitativo di componenti con potere antiossidanti estratti.

#### 4.2.1. ESTRAZIONE CON CO<sub>2</sub> - Estrazione del fluido supercritico con anidride carbonica (SFE-CO<sub>2</sub>)

A differenza delle normali modalità di estrazione questa metodica non necessita di una preventiva essiccazione della samsa ma può essere utilizzata tal quale dopo un processo di macinazione. Ogni estrazione di SFE sotto pressione di 40 MPa è stata effettuata in un estrattore Helix (Figura 4) (Sito Helix: 1 CO<sub>2</sub> Separator)

L'estrazione consiste nell'accendere il dispositivo di raffreddamento così facendo all'interno dello strumento si raggiunge una temperatura di -5°C, attivare poi l'essiccatore ad aria compressa, l'aria e il sistema operativo impostando la temperatura desiderata per il riscaldamento a CO<sub>2</sub> e per il riscaldamento del serbatoio.

Inseriamo poi il contenitore di estrazione ovvero un recipiente da 500 ml, con all'interno 100g della samsa di ribes rosso macinata (dimensione delle particelle 0,5 mm), nella copertura di riscaldamento che porta la matrice a temperatura di 53 °C, assicurandosi poi che lo scarico e il regolatore di flusso della CO<sub>2</sub> siano chiusi.

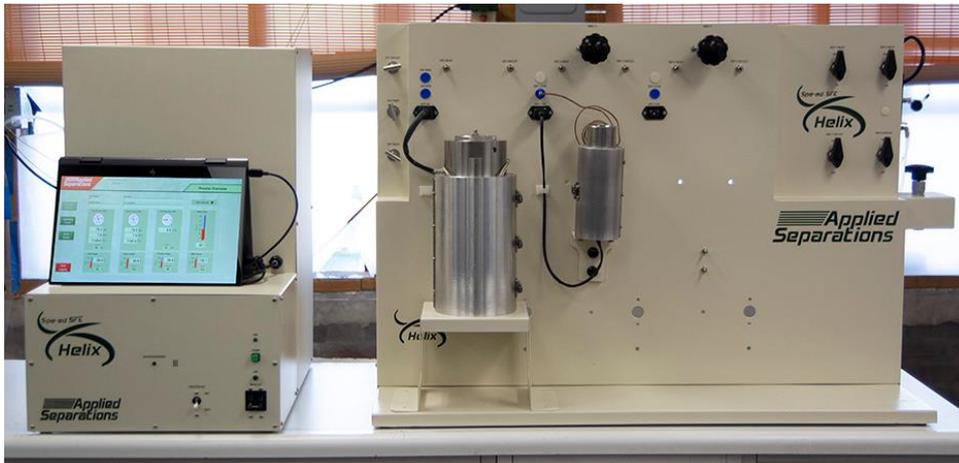


Figura 4: Estrattore Helix

Il volume della CO<sub>2</sub> consumata è stato misurato in standard litri per minuti (L/min) allo stato standard: P = 100 kPa, T = 20°C, ρ = 0,0018 g/mL.

Si procede aprendo il serbatoio del gas e accendo il sistema di pompaggio dopo aver selezionato la pressione desiderata, incomincio ad aprire lentamente la valvola di ingresso assicurandoci che non ci siano perdite, una volta completamente aperta inizia il tempo di estrazione statico di 30 minuti.

Finito il tempo di estrazione statica si passa a quello dinamico aprendo la valvola di uscita del gas e facendolo fluire in modo controllato grazie ad un regolatore di flusso con una portata di 2 L/min di CO<sub>2</sub>.

Una volta finito il tempo di estrazione si arresta la pompa, si chiudono le valvole del gas, si depressurizza e se il flusso di CO<sub>2</sub> è 0 L/min (pressione della cella ~ 0 bar) e il regolatore è completamente aperto si può estrarre la cella di estrazione.

Durante l'esperimento le rese sono state misurate ogni 15 min. Alla fine l'estrazione è stata ripetuta 3 volte. Gli estratti da tutte le ripetizioni sono stati raccolti in bottiglie di vetro e mantenute a -20 °C in attesa delle analisi successive.

La degrassatura della polvere di sansa di ribes rosso è visibile anche ad occhio nudo come è possibile vedere dal confronto della polvere prima e dopo il trattamento dalle immagini sottostanti (Figura 5 e 6).



Figura 5: Polvere prima dell'estrazione



Figura 6: Polvere dopo l'estrazione

#### **4.2.2. Macerazione**

Per questa tecnica di estrazione sono stati pesati all'interno di una beuta da un litro di volume, 40g di campione, ovvero la polvere di Ribes rosso precedentemente degrassata con la SFE-CO<sub>2</sub>, all'interno è stato aggiunto 200ml di etanolo puro al 95%, il liquido scelto per l'estrazione.

La beuta è stata posta all'interno di un agitatore per 4h, questo strumento permette un continuo contatto all'interfaccia tra il solvente e la polvere permettendo una migliore estrazione.

Concluso il tempo il contenuto delle beute viene filtrato attraverso un filtro in carta in una nuova beuta recuperando così la maggiore quantità di liquido possibile (Figura 7), dopo il filtraggio si reinserisce nella beuta iniziale la parte solida rimasta sul filtro e si aggiungono ulteriori 100ml di etanolo per poi riparla in agitatore per altre due ore.



Figura 7: Fase di Filtraggio dell'estratto

Passate le due ore si effettua nuovamente una fase di filtraggio come fatto precedentemente e si procede con una ripetizione dell'ultimo ciclo effettuato; quindi, si aggiungono 100ml di etanolo e poi lo si mette ad agitare per altre 2h.

Per l'ultima volta l'etanolo insieme alla polvere viene filtrato nella beuta che raccoglie l'estratto, per far evaporare l'etanolo si utilizza il *rotavapor* strumento che grazie all'utilizzo del sottovuoto permette di separare diversi solventi in base al loro punto di ebollizione, separando quindi l'etanolo all'interno dell'ampolla rimarrà solo l'estratto di macerazione dalla sansa di *red currant*.

Infine, per assicurarsi che all'interno dell'ampolla sia evaporata l'intera componente etanolica lo si pone sotto flusso di azoto per 15 minuti.

Avendo precedentemente annotato il peso dell'ampolla vuota e il suo peso con all'interno l'estratto e la quantità di campione utilizzato è poi possibile calcolarsi lo *Yield* ovvero l'effettiva resa del processo di estrazione.

### 4.2.3. Naviglio

Il principio di funzionamento su cui si basa il Naviglio è la generazione, grazie ad un opportuno solvente, di un gradiente di pressione negativo tra l'esterno e l'interno di una matrice solida contenente delle componenti estraibili, seguita da un repentino ripristino delle condizioni di equilibrio iniziali, induce l'estrazione forzata dei composti non chimicamente legati alla struttura principale di cui è costituito il solido. (Sito: Estrazione solido liquido )

Il processo estrattivo prevede il riempimento della camera di estrazione con la polvere di ribes rosso, preventivamente degrassata mediante SFE-CO<sub>2</sub>, da estrarre per farlo dopo averne pesati circa 200 g, si annota il peso e la si inserisce all'interno di un sacchetto di materiale poroso con maglie sufficientemente piccole da impedire alla polvere di fuoriuscire e allo stesso tempo che permetta il passaggio del liquido estraente. (Figura 8)

Si procede poi riempiendo il circuito di solvente estraente, in questo studio è stato utilizzato l'etanolo puro al 95%. Durante la fase di riempimento il macchinario viene mantenuto a pressione atmosferica e sul fondo delle due camere cilindriche di estrazione vengono posti due setti porosi che consentono il passaggio del liquido e bloccano invece la matrice solida ed eventuali parti grossolane di materiale.

Inizia una fase statica che consiste nell'innalzamento della pressione del liquido fino a valori compresi tra 8 e 9 bar, questo è reso possibile dall'azione dei pistoni generata sul liquido ed esercitata su entrambe le camere in quanto collegate da un condotto.



Figura 8: Estrattore naviglio

Il sistema viene lasciato sotto pressione per un tempo necessario affinché il liquido possa penetrare efficacemente all'interno della matrice solida.

Una volta trascorso tale tempo la pressione nel liquido viene rimossa rapidamente grazie ad un rapido movimento dei pistoni; in questo modo il liquido decade immediatamente alla pressione atmosferica, ma per un istante infinitesimo il liquido all'interno della matrice solida si trova ancora al valore di 8-9 bar.

In tal modo si viene a creare una differenza di pressione tra l'interno e l'esterno della matrice del solido, che costringe il liquido a fuoriuscire rapidamente dall'interno del campione, la generazione di questo gradiente di pressione negativo è chiamato effetto di "risucchio".

Lo spostamento rapido del liquido dall'interno verso l'esterno contribuisce alla fuoriuscita delle sostanze non chimicamente legate alla matrice solida.

Inizia a questo punto la fase di dinamica che consiste in un rimescolamento del liquido in tutto il sistema estrattivo; l'unione della fase statica e una dinamica costituisce un ciclo estrattivo.

Per raggiungere l'esaurimento della matrice solida, e quindi una completa estrazione delle componenti non legate, sono necessari più cicli estrattivi.

In tale tecnica estrattiva la componente dovuta al fenomeno della diffusione e dell'osmosi è veramente trascurabile. L'effetto principale dell'estrazione è dovuto alla generazione di un gradiente di pressione che induce lo spostamento rapido del liquido dall'interno verso l'esterno della matrice solida dando luogo ad un risucchio delle sostanze contenute nella matrice solida.

Alla fine del processo dall'estrattore Naviglio si ottiene il solvente con tutti i componenti estratti, nel caso della matrice analizzata era un liquido di colore giallo intenso (Figura 9).

Per ottenere l'estratto si sottopone ad essiccazione la soluzione mediante l'uso del *rotavapor* che permette di separare l'etanolo sfruttando il suo basso punto di ebollizione; se necessario alla fine si può posizionare sotto flusso di azoto per 15 minuti per eliminare ogni traccia di etanolo.



Figura 9: Estratto pre-evaporazione

Avendo annotato il peso del campione inserito nell'estrattore, anche in questa metodica, è possibile calcolare la resa effettiva del processo dopo aver ottenuto il peso dell'estratto dopo i vari processi di essiccazione.

### **4.3. Seconda Fase: Caratterizzazione degli ingredienti**

Conclusa la fase di estrazione e produzione degli ingredienti vegetali ottenuti dalla sansa di Ribes rosso, prima di procedere con la fase applicativa dello studio ovvero il loro impiego all'interno di un prodotto a base di carne è necessario analizzare le caratteristiche compositive.

Sulla polvere di ribes rosso sono state eseguite le analisi necessarie per una valutazione dei valori nutrizionali, poi entrambi gli ingredienti sono stati sottoposti all'analisi per quantificare il potere antiossidante ed infine negli estratti è stata effettuata l'analisi per la quantificazione del contenuto totale di flavonoidi.

#### **4.3.1. Analisi compositive sulla polvere di ribes rosso**

Sulla polvere di ribes rosso, prima sottoposta a estrazione SFE-CO<sub>2</sub>, sono state effettuate diverse analisi per valutarne la composizione nello specifico l'analisi dell'umidità, delle ceneri, delle proteine, della frazione lipidica e del contenuto totale di fibre.

- **Analisi sull'umidità:**

È stata pesata una quantità di campione di circa 3 g all'interno di una piastra anch'essa precedentemente pesata; successivamente la piastra con all'interno il campione è stata inserita all'interno di una stufa per circa due h a 105°C.

Concluso il tempo vengono poste in un essiccatore per 30/40 min per evitare una umidificazione del campione e per raggiungere più velocemente la stabilizzazione del peso. Una volta stabilizzato il peso viene annotato e grazie ai

valori delle precedenti pesate e alla formula è possibile ricavare il contenuto percentuale di umidità nel campione.

$$Umidità\% = \left( \frac{(\text{Peso dopo la stufa} - \text{Peso della piastra})}{\text{Peso del campione}} \right) * 100$$

- **Analisi delle ceneri:**

Come per l'umidità la polvere del campione viene pesata ricercando la medesima grammatura di 3 g circa annotando anche in questo caso il peso del campione e del contenitore vuoto.

Il crogiolo con all'interno il campione viene scaldato per circa 20 ore su una piastra riscaldante e poi posizionato in muffola dove viene incenerito per circa 24h raggiungendo temperature di 520 – 550°C.

Successivamente viene posto all'interno di un essiccatore e una volta che il peso si stabilizza viene annotato, questo valore insieme agli altri valori precedentemente registrati permette di calcolare la quantità percentuali di cenere all'interno del campione.

$$Ceneri\% = \left( \frac{(\text{Peso post muffola} - \text{Peso della piastra})}{\text{Peso del campione}} \right) * 100$$

- **Analisi Proteine:**

Per la valutazione dell'azoto totale è stata utilizzata la metodica ufficiale, il Kjeldahl, si pesano in appositi cilindri una quantità variabile di campione tra tre e cinque grammi a poi l'analisi composta da tre fasi può iniziare:

La prima è la digestione dove all'interno del cilindro graduato si aggiungono 200ml di Acido solforico ( $H_2SO_4$ ) e una pastiglia di catalizzatore ( $Cu_2SO_4$ ), che combinati con un trattamento di 90 minuti ad alte temperature, permette di convertire l'azoto totale proteico in solfato di ammonio.

Si prosegue poi con la fase di Distillazione, viene aggiunta acqua distillata e Idrossido di sodio (NaOH), per neutralizzare l'eccesso di acido solforico, così facendo da ioni ammonio si produce ammoniaca libera ( $NH_3$ ) che mediante distillazione in corrente di vapore viene separata e raccolta in una quantità nota di acido bórico( $H_3BO_3$ ) in eccesso di 30 ml.

Infine, con una Titolazione utilizzando acido cloridrico 0,1N (HCl) e tre gocce di colorante (rosso di metile).

Conoscendo il volume di HCl utilizzato per la titolazione e la quantità di campione utilizzata è possibile calcolare la concentrazione percentuale di azoto totale e conseguentemente alla percentuale di proteine presente nel campione.

$$Azoto\ totale\% = \frac{(1,4 * \text{Molarità HCl} * 1 * \text{Volume HCl})}{\text{Peso campione}}$$

$$\text{Proteine \%} = \text{Azoto totale\%} * 6,25$$

- **Analisi dei grassi:**

Viene pesato un grammo di campione all'interno di un'ampolla di vetro, si procede con l'aggiunta di 200 ml di Isoesano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), come descritto dal metodo ufficiale, il Soxhlet (Figura 10), grazie a specifici ditali di cellulose e attraverso un ciclo di circa tre ore si ottiene il grasso totale presente della matrice disciolto nel solvente che per essere misurato necessita di essere portato a secco.

Per far evaporare il solvente si utilizza il *rotavapor*, ed alla fine per velocizzare il processo e per assicurarsi che rimanga solo la componente lipidica si esegue un passaggio sotto flusso di azoto.

Si ottiene quindi l'ampolla con solo i lipidi disciolti; pesando quest'ultimo e conoscendo il peso del campione iniziale e del contenitore vuoto si ottiene la percentuale di lipidi grezzi.



Figura 10: Estrattore Soxhlet

$$\text{Lipidi}\% = \left( \frac{\text{Peso sostanze grasse}}{\text{Peso campione}} \right) * 100$$

- **Analisi Fibre:**

In questa metodica analitica viene inserita una quantità di campione pari a un grammo (W1) all'interno di un cilindro con filtro poroso all'interno del quale è già stata inserita della celite (un grammo circa) e passato in muffola per eliminare l'umidità presente.

Successivamente inizia una sequenza di lavaggi del campione con diverse soluzioni precedentemente portate a bollore, il primo lavaggio si effettua con 150 ml di soluzione acida, acido solforico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,13N), seguono tre lavaggi con circa 50 ml di acqua distillata bollente.

Si prosegue poi con 150 ml di soluzione basica, idrossido di potassio KOH (0,13N), ed infine con ulteriori 3 lavaggi di acqua distillata come nel passaggio precedente assicurandosi che nella colonna di lavaggio non rimangano residui di campione, in quanto il peso finale sarà fondamentale per determinare il contenuto accurato di fibre nella matrice.

Il lavaggio con le diverse soluzioni è reso possibile modificando grazie ad una valvola lo stato del sistema rendendolo chiuso, in pressione o sottovuoto (Figura 11).

Conclusi i lavaggi il cilindro viene inserito per circa 20h in stufa, una volta che il peso si stabilizza viene annotato il peso (W2) infine si ripete lo stesso passaggio ponendolo in muffola alla fine del quale si ottiene l'ultima pesata (W3).

Alla fine, grazie alle pesate effettuate risolvendo la formula ottengo il contenuto percentuale di fibre del campione.



Figura 11: Macchinario per il lavaggio

$$Fibre\% = \frac{(W2 - W3)}{W1}$$

Le stesse analisi descritte precedentemente sono state eseguite sulla polvere di ribes rosso ottenuta dalla sansa prima di essere sottoposta ad estrazione con fluido supercritico con la CO<sub>2</sub>, per analizzare e comparare anche le differenze tra le due polveri e vedere come influisce l'estrazione sui valori nutrizionali dell'ingrediente.

#### 4.3.2. Analisi della capacità antiossidante

Dopo l'analisi della composizione della polvere di ribes rosso lo studio prosegue analizzando la capacità antiossidante degli ingredienti estratti in particolare sulla polvere prima e dopo il processo di degrassatura e sugli estratti sia quelli ottenuti dall'estrazione mediante macerazione sia dalla tecnica che prevede l'utilizzo dell'estrattore Naviglio.

Sono disponibili diversi test per la misurazione diretta dell'atomo di idrogeno o del trasferimento dell'elettrone da potenziali antiossidanti a radicali liberi. Le attività

antiossidanti riportate con questi metodi sono generalmente associate alla loro capacità di *scavenging* contro specifiche tipologie di specie radicaliche, alcune delle quali possono essere artificiali e biologicamente irrilevanti.

I dati sulla capacità di donazione di atomi di idrogeno o elettroni ottenuti con questi metodi forniscono importanti informazioni sul loro antiossidante intrinseco potenziale con minima interferenza ambientale. Questi test non richiedono lipidi substrato e di solito impiegano un sistema chimico contenente un ossidante (radicali liberi o altri ROS), una sonda ossidabile (non necessaria per alcuni test) e antiossidanti sotto investigazione.

A seconda delle reazioni chimiche coinvolte, questi test si dividono in due categorie di saggi: quelli basati su reazioni di trasferimento di atomi di idrogeno (HAT) e saggi basati su reazioni di trasferimento di singoli elettroni (ET). Gli antiossidanti possono eliminare i radicali o altri ROS, come ad esempio, perossido di idrogeno e perossidi lipidici, mediante HAT ed ET raggiungendo lo stesso risultato finale, indipendentemente dal meccanismo coinvolto, sebbene la cinetica e il potenziale di reazione varia (Prior et al; 2005).

Le reazioni di trasferimento di singoli elettroni (ET) e quelle del trasferimento di singoli atomi di idrogeno (HAT) possono anche verificarsi in parallelo e, in questo caso, il meccanismo dominante in un dato sistema dipende dalla struttura e dalle proprietà antiossidanti, dalla solubilità e coefficiente di partizione, così come il sistema solvente (Fereidoon et al; 2015). Le attività antiossidanti sono espresse come inibizione contro l'ossidazione mediata da sonde ossidabili o equivalenti di un antiossidante di riferimento selezionato come nel caso del Trolox, dell'acido ascorbico e di altri composti.

L'ossidazione della sonda è misurabile mediante varie tecnologie di rilevamento la cui precisione avanza con la disponibilità di una strumentazione aggiornata. Questi includono spettrofotometro, fluorometro, chemiluminescenza, EPR (risonanza paramagnetica elettronica), FTIR (infrarosso trasformato di Fourier), NMR (risonanza magnetica nucleare) e metodi amperometrici. Questi saggi chimici per la misurazione dell'attività antiossidante sono semplici, veloci e a volte automatizzati e sono ampiamente utilizzati nello screening iniziale e nella valutazione di nuovi composti antiossidanti o estratti di prodotti/sottoprodotti naturali.

Dopo un'accurata ricerca bibliografica sono state scelte come metodiche per la valutazione dell'attività antiossidante l'analisi del contenuto fenolico totale (TPC), l'ABTS e il CUPRAC.

Per ognuna di queste analisi il primo passaggio è stato quello di costruire le curve di calibrazione su cui tutti i dati raccolti successivamente ottenuti dall'analisi del campione possano essere confrontati potendo così stimare il potere antiossidante

## TPC- Contenuto fenolico totale

Il contenuto fenolico totale (TPC) è un altro parametro importante della capacità antiossidante totale (TAC) ed è ampiamente utilizzato per la valutazione di estratti antiossidanti, compresi quelli di erbe aromatiche, spezie, frutta, cereali e legumi, tra gli altri. Il test Folin-Ciocalteu è il noto metodo per la determinazione del TPC mediante spettrofotometria colorimetrica. Questo test è stato inizialmente progettato per l'analisi delle proteine, sfruttando la tirosina, un aminoacido fenolico, nelle proteine (Folin & Ciocalteu, 1927). Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999) lo adottarono in seguito per analizzare i componenti fenolici nel vino, che divenne un'analisi di routine per la valutazione degli antiossidanti degli alimenti e degli estratti vegetali.

Il test Folin-Ciocalteu si basa sulla riduzione del reagente Folin-Ciocalteu da composti fenolici in condizioni alcaline. Il reagente Folin-Ciocalteu contiene complessi acido fosfomolibdico/fosfotungstico che sono ridotti, producendo un cromoforo di colore blu con assorbimento massimo a 765 nm (Magalhaes et al; 2008). La reazione chimica si basa sul trasferimento di elettroni da composti fenolici e sulla misura dell'assorbanza dei complessi di colore blu.

Questo è reso possibile grazie al centro di molibdeno che nei complessi è generalmente accettato come sito di riduzione, dove lo ione  $\text{Mo}^{6+}$  viene ridotto a  $\text{Mo}^{5+}$  accettando un elettrone dall'antiossidante fenolico. Pertanto, il test Folin-Ciocalteu è un test basato sul trasferimento di un singolo elettrone (ET) e associato al potere riducente degli antiossidanti fenolici.

Per questa analisi come reattivo per la creazione della curva di calibrazione viene utilizzato l'acido gallico, vengono pesati 25 mg di acido gallico e li si scioglie in 25 ml di metanolo (Me-OH) all'interno di un matraccio tarato ottenendo una concentrazione di 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Da questa concentrazione iniziale vengono prodotte diverse diluizioni a differenti concentrazioni di acido gallico (10, 30, 50, 60, 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Dopo aver creato le diverse diluizioni si procede prelevando 150  $\mu\text{l}$  di acido gallico a diversa concentrazione, ed inserendole ognuna in una diversa Eppendorf, al cui interno sono già stati inseriti 10 mg di cellulosa precedentemente pesata; viene poi inserito il reattivo di Folin-Ciocalteu 750  $\mu\text{l}$  di, passati 3 minuti dall'inserimento del reattivo vengono aggiunti 600  $\mu\text{l}$  di Carbonato di Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (75g/l).

I medesimi passaggi precedentemente descritti vengono eseguiti anche per il bianco ovvero una Eppendorf all'interno della quale al posto dell'acido gallico viene inserita acqua distillata.

Per ogni diversa concentrazione di acido gallico e per il bianco vengono fatte cinque repliche per poter ottenere risultati precisi ed accurati grazie all'uso di operazioni statiche come la media la deviazione standard e RSD%.

Dopo l'inserimento dei solventi all'interno delle Eppendorf ognuna viene omogenizzata al vortex al fine di favorire una più rapida dissoluzione e poi vengono poste su una pedana basculante per 2 ore, successivamente vi è una fase di centrifuga per 5 minuti

a 4500 rpm alla fine della quale si procede spostando la parte liquida del campione all'interno di una cuvetta di plastica facendo attenzione a non smuovere il residuo solido perché potrebbe causare rumori di fondo sulla percezione dell'assorbanza da parte dello spettrofotometro.

Ogni cuvetta viene quindi analizzata ad una lunghezza d'onda di 760nm; procedo poi una volta calcolata la media delle varie repliche alla creazione della curva di calibrazione grazie alla distribuzione sul piano dei diversi valori corrispondenti alle diverse concentrazioni di acido gallico analizzate. Grazie a questa curva è possibile interpretare i dati che raccoglieremo eseguendo l'analisi TPC sul campione.

Si procede quindi pesando all'interno di apposite boccette la polvere di ribes rosso diluita secondo una scala decrescente con la cellulosa, producendo miscele con concentrazione variabile, da 0.5 mg/ml a 0.001 mg/ml; si procedere nella medesima modalità usata per la curva di calibrazione, inserendo in 4 Eppendorff contenenti 10 mg per ogni diluizione di campione precedentemente pesata, vengono aggiunti: 150  $\mu$ l di acqua distillata, il reattivo di Folin-Ciocalteu (750  $\mu$ l) e tre minuti dopo il carbonato di sodio (600  $\mu$ l).

Le Eppendorff vengono poi omogenizzate al vortex, basculate per due ore, centrifugate ed infine analizzate allo spettrofotometro (Genesys 20, Germania) a 760 nm (Figura 12).



L'acido gallico è lo standard di riferimento comunemente utilizzato ed è per questo che i risultati dell'analisi del contenuto fenolico totale (TPC) sono generalmente espressi come equivalenti di acido gallico (GAE) per grammo di massa del campione o dell'estratto.

Il test Folin-Ciocalteu per la determinazione del TPC presenta molti vantaggi, inclusa la sua semplicità, riproducibilità e robustezza. Tuttavia, soffre di diversi inconvenienti come la sensibilità al pH, la temperatura e il tempo di reazione (Karadag et al., 2009); quindi, per la coerenza è necessaria un'adeguata selezione delle condizioni di reazione e risultati affidabili. Inoltre, la sovrastima del TPC è una delle principali preoccupazioni per il Dosaggio Folin-Ciocalteu, per il contributo di agenti riducenti non fenolici, come zuccheri riducenti e alcuni aminoacidi, presenti nel sistema per la riduzione del reagente (Sadowska-Bartosz et al; 2022). Pertanto, in alcuni casi può essere utile l'analisi parallela dei risultati con metodi HPLC.

### **ABTS- Acido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico)**

Nella seconda categoria, “*Single Electron Transfer*” (ET), rileva la capacità di un potenziale antiossidante di trasferire un elettrone per ridurre qualsiasi composto, inclusi metalli, carbonili e radicali. Coinvolge una reazione redox con l'ossidante (anche come sonda per il monitoraggio della reazione) come indicatore dell'endpoint della reazione. Oltre al TPC un altro importante test di questa categoria è l'ABTS (acido 2,2'-azinobis-(3-etilenebenzotiazolin)-6-solfonico).

Il metodo prende anche il nome di TEAC (acronimo di Trolox<sup>®</sup> *Equivalent Antioxidant Capacity*), perchè riporta i valori di AOC dei vari campioni, come Trolox<sup>®</sup> equivalenti, ovvero la concentrazione millimolare di una soluzione di Trolox<sup>®</sup> che ha la stessa capacità antiossidante di una soluzione 1mM della soluzione del composto o miscela da analizzare (Matteucci; 2012).

L'ABTS, uno dei più noti metodi di *scavenging*, è stato sviluppato per la prima volta come metodo semplice e conveniente per la determinazione della capacità antiossidante totale (TAC) (Miller et al., 1993). Il test misura la capacità degli antiossidanti necessari ad eliminare il catione radicale stabile ABTS • + (2,2'-azinobis (acido 3-etilbenzotiazoline-6-solfonico)), un cromoforo verde blu con assorbimento massimo a 734 nm che diminuisce la sua intensità in presenza di antiossidanti da cui il metodo prende il nome.

Gli antiossidanti possono neutralizzare il catione radicale ABTS<sup>•+</sup>, per riduzione diretta tramite donazione di elettroni o per radicali spegnimento tramite donazione di atomi di idrogeno e l'equilibrio di questi due meccanismi è generalmente determinato dalla struttura antiossidante e dal pH del mezzo (Prior et al.; 2005). Quindi, sebbene questa analisi sia generalmente classificata come metodo basato su ET, si applica anche al meccanismo HAT.

L'entità dello scolorimento del colore blu-verde, quantificato come una diminuzione dell'assorbanza a 734 nm, dipende dalla durata della reazione, l'attività antiossidante intrinseca e la concentrazione nel campione (Sadowska-Bartosz et al; 2022).

Nel test TEAC originale, sono stati utilizzati metmioglobina e perossido di idrogeno generano un radicale ferrilmioglobina intermedio, che poi ha reagito con ABTS a produrre ABTS<sup>•+</sup>. L'agente ossidante è stato successivamente sostituito da perossido o persolfato. Il persolfato di potassio è l'ossidante più comunemente usato per la generazione di ABTS<sup>•+</sup>. Il test ABTS o TEAC viene utilizzato per misurare l'attività antiossidante totale di sostanze pure, fluidi corporei e materiali vegetali.

Anche per questa analisi è necessario prima di procedere analizzando il campione produrre una curva di calibrazione che mette in relazione la perdita del segnale di assorbanza con la concentrazione di antiossidante aggiunto, per questo test si utilizza il trolox come reattivo. Viene preparata una soluzione di trolox pesando 0.0125 mg e unendo 25 ml di metanolo (MeOH) in modo da ottenere una concentrazione di 2000 µmol/L.

Da questa soluzione si producono delle diluizioni aggiungendo in modo crescente sempre una maggiore quantità di metanolo partendo dalla soluzione iniziale (100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500  $\mu\text{mol/L}$ ).

In cinque Eppendorf per ogni diluizione, contenente 10 mg di cellulosa preliminarmente pesata, vengono inseriti 25  $\mu\text{L}$  della diluizione della soluzione di Trolox e 1,5 ml della soluzione per l'analisi ABTS.

Questa soluzione si ottiene miscelando la soluzione PBS, ottenuta dissolvendo 8.18 g NaCl, 0.27 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 0.15 g KCl in un litro di acqua ultra-pura, con 50 mL con 200  $\mu\text{L}$  di  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (70 mmol/L), viene poi lasciata riposare al buio a temperatura ambiente per circa 16 h, alla fine delle quali si misura l'assorbanza con lo spettrofotometro a 734nm che deve raggiungere il valore di  $0.700 \pm 0.010$  prima di poter essere utilizzata.

Una volta aggiunti tutti i reagenti in ciascuna Eppendorf vengono vortexati, agitati sulla pedana basculante per due ore, poi centrifugati (4500 rpm, 5 min) ed infine il surnatante viene trasferito all'interno delle cuvette per poi essere analizzato allo spettrofotometro al fine di ottenerne l'assorbanza media per ogni diluizione grazie alle repliche effettuate.

Una volta creata la curva di calibrazione si procede analizzando la matrice di ribes rosso; quindi, in cinque Eppendorf per ogni diluizione del campione vengono inseriti 10 mg e lo stesso numero di repliche per il bianco inserendo però solo cellulosa. All'interno di ognuna si addiziona 25  $\mu\text{L}$  di metanolo (MeOH) e 1500 ml di soluzione ABTS la medesima preparata ed utilizzata per la curva di calibrazione.

I campioni vengono poi agitati con il vortex per 15 secondi circa, scecherate su una pedana basculante per due ore a 250 rpm ed infine centrifugate per cinque minuti a 4500 rpm.

Per concludere il surnatante può essere analizzato allo spettrofotometro per determinarne l'assorbanza utilizzando la stessa lunghezza d'onda usata precedentemente 734 nm.

L'ABTS è solitamente espresso come  $\mu\text{mol}$  (o mmol) degli equivalenti di Trolox (TE) per litro. Il Trolox viene utilizzato di frequente in quanto selezionato come *scavenger* standard inoltre è considerato un analogo solubile in acqua della vitamina E.

I vantaggi di questa tecnica sono sicuramente la velocità di analisi, l'ampio intervallo di pH e la possibilità di usare molecole idrofile e lipofile consentite mentre i limiti sono dati dal tempo di reazione dopo l'aggiunta del reattivo che se superiori a sei minuti possono dare risultati errati (Sadowska-Bartosz et al; 2022).

## CUPRAC

L'ultima analisi caratterizzante l'attività antiossidante che è stata effettuata è il CUPRAC, il test della capacità antiossidante di riduzione del rame (CUPRAC) ovvero una riduzione del rame test sviluppato come variante del test FRAP.

Il dosaggio del potere antiossidante ferrico riducente (FRAP) è un tipico metodo basato su ET che misura l'Attività antiossidante è determinato come aumento dell'assorbanza a 593 nm e i risultati sono espressi come equivalenti micro-molari di  $Fe^{2+}$ .

Il metodo misura la riduzione potere degli antiossidanti di convertire ioni rameici ( $Cu^{2+}$ ) in ioni rameosi ( $Cu^{+}$ ). Un ligando più comunemente impiegato in questo test la Neocuproina (Nc, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) ha la funzione di formare un complesso rame-ligando per facilitare la misurazione dell'assorbanza.

La  $Cu^{2+}$ -neocuproina complesso può essere ridotto dagli antiossidanti a  $Cu^{+}$ -neocuproina, complesso che risulta cromoforo con assorbimento massimo a 450 nm (Reşat et al; 2004).

Questo metodo modificato è stato suggerito essere applicabile a matrici alimentari relativamente insolubili così come ai cosmetici insolubili prodotti, come creme, balsami e polveri.

Quando si vogliono analizzare degli estratti vegetali dovrebbero sottoposti a flusso di azoto ( $N_2$ ) per scacciare  $O_2$  e devono poi essere conservati in frigorifero se non analizzati il giorno dell'estrazione, poiché reazioni catalizzate complesse con cinetiche imprevedibili possono aver luogo (Reşat et al; 2004).

In primis è stato necessario creare la curva di calibrazione, anche per questa analisi viene usato il Trolox come reattivo e si parte dalla medesima soluzione utilizzata per l'analisi ABTS ovvero quella di 2000  $\mu\text{mol/L}$ .

Viene effettuata una prima diluizione per ottenere una concentrazione di 1000  $\mu\text{mol/L}$  e poi viene creata una scala di diluizione per ottenere delle soluzioni di Trolox a diversa concentrazione rispettivamente 25, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{mol/L}$ .

Si procede inserendo 400  $\mu\text{L}$  di ogni diluizione creata in Eppendorf con all'interno 10 mg di cellulosa precedentemente pesati e per il bianco aggiungo 400  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata; per tutte le diluizioni e per il bianco vengono prodotte cinque repliche.

Successivamente si aggiungono i solventi: 400  $\mu\text{L}$  di cloruro rameico ( $\text{CuCl}_2$ ) (1 mM), 400  $\mu\text{L}$  di Neocuprina (7.5 mM) e infine la soluzione buffer 400  $\mu\text{L}$  di acetato d'ammonio ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) a pH 7 (Figura 13).

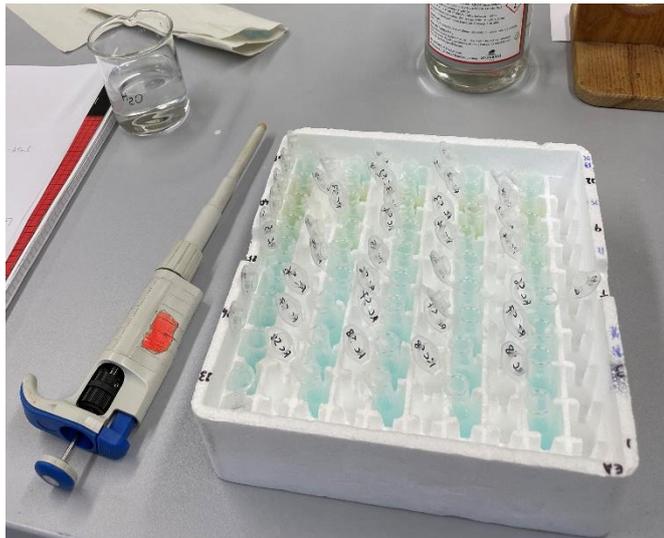


Figura 13: Analisi CUPRAC

Le Eppendorf devono essere agitate al vortex, poste su un oscillatore per due ore, centrifugate per cinque minuti per 4500 rpm, alla fine con l'utilizzo dello spettrofotometro si misura l'assorbanza del surnatante a 450 nm e si riportano le assorbanze per ogni ripetizione di ogni diluizione.

La media di questi valori ottenuti insieme alla scala di diverse concentrazioni utilizzata ci permetteranno di creare una curva che sarà fondamentale per rendere comprensibili ed utilizzabili i dati che verranno raccolti per il campione.

Per l'analisi degli additivi vegetali estratti dal ribes rosso si pesano all'interno di Eppendorf 10 mg di campione, producendo quattro repliche per ogni campione, successivamente si aggiungono in ognuna 400  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata e poi nella stessa concentrazione i medesimi solventi utilizzati per creare la curva di calibrazione: cloruro rameico ( $\text{CuCl}_2$ ) (1 mM), Neocuprina (7.5 mM) e acetato d'ammonio ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) come buffer.

Le eppendorf vengono poi vortexate per 15 secondi circa ognuna, con una pedana basculante vengono agitate per due ore a 250 rpm ed infine centrifugate per cinque minuti a 4500 rpm. Il surnatante si preleva, facendo attenzione a non far cadere la componente solida che si è sedimentata sul fondo, e si analizza l'assorbanza a 450nm. I risultati delle assorbanze correlati con la curva di calibrazione creata permettono di esprimere anche in questo caso come l'analisi ABTS in  $\mu\text{mol}$  (o mmol) degli equivalenti di Trolox (TE) per litro.

### 4.3.3. Quantificazione della concentrazione di flavonoidi

Uno dei metodi ampiamente utilizzati per la determinazione del TFC negli estratti vegetali è il saggio colorimetrico del cloruro di alluminio, dove Al (III) viene utilizzato come agente complessante, in questo studio viene utilizzato per la quantificazione del contenuto totale di flavonoidi.

Il test proposto per la prima volta nel 1960 per la determinazione dei derivati del flavonolo nei farmaci (Christ & Müller, 1960); è un metodo che si basa sulla formazione di chelati di Al(III)-flavonoidi.

A causa dei loro numerosi gruppi ossidrilici e ossidrilici, i flavonoidi hanno una grande affinità per legare ioni metallici come Al(III), per lo più con un rapporto 1:1, a seconda delle condizioni sperimentali tra cui il valore del pH (Kasprzak et al; 2015),(Amjad M. S. et al; 2021).

Inizialmente vengono prodotte tre diluizioni dell'estratto, rispettivamente di 20, 10 e 5 mg/ml, per ognuna ne vengono prelevati 500 µL e vengono inseriti all'interno di due Eppendorf; una verrà usata per l'effettiva analisi del campione l'altra sarà utilizzata come bianco.

Per ogni diluizione vengono preparate quattro repliche, lo stesso per i bianchi in quanto per questa analisi devono essere fatti per ogni diluizione creata.

Infatti, in metà delle Eppendorf per ogni diluizione verranno aggiunti 500 µL di etanolo per creare il bianco mentre nell'altra parte si aggiungono 500 µL di una soluzione al 2% di cloruro d'alluminio (AlCl<sub>3</sub>).

Le soluzioni vengono mantenute per dieci minuti a temperatura ambiente dopo essere state agitate per pochi secondi, successivamente si misura l'assorbanza allo spettrofotometro con raggio avente lunghezza d'onda di 415 nm.

Infine, vengono eseguite le medie delle assorbanze ottenute da ogni diluizione, tale valore viene espresso come grammi di quercetina equivalenti (QE) su cento grammi di estratto.

La quercitina appartiene al gruppo dei flavonoli, più precisamente a quello dei tetraossiflavonoli, ed è uno dei flavonoidi più comuni e facilmente estraibili dagli alimenti vegetali (Amjad et al; 2021).

### 4.4. Terza fase: studio applicativo in un prodotto a base di carne

Una volta concluse le analisi sulla polvere e l'estratto di ribes rosso nella loro completezza è possibile iniziare a valutare come l'aggiunta di quest'ultimi all'interno di un prodotto a base di carne potessero modificarne positivamente o negativamente il prodotto finito.

Avendo analizzato la matrice sia dal punto di vista compositivo che da quello della capacità antiossidante è stato possibile valutare a livello preliminare, per esempio, il

quantitativo di fibre risultate nel prodotto nel momento in cui si aggiungono differenti concentrazioni di polvere o come solo a livello ipotetico la matrice potesse andare a modificare la texture ma soprattutto il colore del prodotto finito.

Prima però di procedere all'elaborazione di un piano preciso e strutturato sulla base del quale eseguire lo studio è necessario condurre dei test preliminari producendo dei campioni di prova, per eseguire delle prove delle analisi che si volevano eseguire sul prodotto.

Per esempio, valutare possibili problemi legati alla preparazione o alla cottura, valutare il quantitativo adeguato di ogni ingrediente da inserire per la creazione del prodotto finale e infine prendere confidenza con le analisi e le tempistiche che ognuna di esse richiede in quanto per una migliore accuratezza dei risultati è necessario che tutte le analisi vengano eseguite nello stesso giorno.

È stato deciso di realizzare degli hamburger utilizzando la carne macinata di maiale in quanto è quella più facile da reperire ovunque, ma anche la meno costosa e infine quella che vista l'elevata quantità di grassi presenti al suo interno permetta una migliore visualizzazione dell'effetto dell'ossidazione lipidica.

#### 4.4.1. Test preliminare

Sono stati come primo passo decisi gli ingredienti per il prodotto ovvero: la carne macinata di maiale, acqua, sale, pepe e rispettivamente estratto o polvere di sansa di Ribes rosso.

Per poter valutare quali potevano essere le concentrazioni adatte di ognuno di questi ingredienti da unire sono stati prodotti sei hamburger con diverse concentrazioni, rispettivamente quattro con diversa quantità di polvere, due con differente quantitativo di estratto e uno senza niente che verrà usato come campione di controllo per avere un confronto tra l'assenza e la presenza dell'ingrediente.

Tabella 1: Concentrazioni usate per i vari ingredienti nel test preliminare

Sample (g)	Control	1% Pomace	2% Pomace	3% Pomace	5% Pomace	1% Extract	2% Extract
Meat	150,3	149,3	148,3	147,3	145,3	149,3	148,3
Water	27	27	27	27	27	27	27
Salt	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
Pepper	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Pomace/ Extract	-	1,8	3,6	5,4	9	1,8	3,6
Total	180	180	180	180	180	180	180

Per ognuna delle concentrazioni riportare nella Tabella 1, sono stati prodotti 3 hamburger per un totale di 180g di prodotto, ognuno dei quali approssimativamente da 60g.

Una volta pesati e formati grazie all'apposito stampo per hamburger, due dei tre prodotti vengono cotti per 15 minuti in forno assicurandosi di raggiungere la temperatura al cuore di 75°C misurata grazie ad una sonda, mentre uno viene lasciato crudo (Figura 14 e 15).



Figura 14: Hamburger crudi



Figura 15: Hamburger cotti

Successivamente vengono eseguite diverse analisi: il calcolo della perdita di acqua in cottura, il pH, il contenuto totale di mioglobina, l'analisi dei pigmenti totali e l'analisi sensoriale; tutte rispettivamente eseguite secondo metodo ufficiale sia sul prodotto cotto che su quello crudo.

Grazie all'analisi preliminare è stato possibile effettuare diverse correzioni alle caratteristiche del piano di studio in modo da prevenire errori di produzione e evitare perdite di tempo e risorse come nella produzione di hamburger con concentrazioni superiori al 3% di polvere di ribes rosso, i quali grazie all'analisi sensoriale eseguita sono risultati essere inaccettabili a causa del colore troppo intenso ed una consistenza eccessivamente granulosa al palato.

Inoltre, produrre con concentrazioni superiori di polvere non sarebbe comunque sufficiente per raggiungere il quantitativo di fibre necessario per l'ottenimento di un "Claim" nutrizionale "fonte di fibre" sul prodotto finito.

altri aspetto rilevato dall'analisi sensoriale è l'eccessivo quantitativo di sale aggiunto che era quindi da diminuire e l'odore troppo forte generato dall'estratto negli hamburger concentrati al 2%.

Anche il volume dei campioni è stato ridimensionato ed aumentato a 70g ciascuno in relazione all'alto quantitativo di acqua persa durante il trattamento termico.

Infine, per rendere più gradevole il prodotto e cercare di alleviare il più possibile la percezione al palato della polvere aggiunta è stata macinata finemente con un filtro prima di 0,5 mm e poi di 0,2 mm.

Questo studio preliminare ha permesso di effettuare diverse importanti modifiche ma anche accurate valutazioni tra i prodotti con diverse concentrazioni e di scegliere quali tra questi fossero i migliori sui quali condurre lo studio.

È stata valutata la quantità di campione che serviva per tutte le analisi e stabilito il quantitativo totale di repliche da produrre per ogni concentrazione considerando che questo studio aveva come obiettivo quello di valutare tutte le caratteristiche del prodotto e come queste si modificano nel tempo con il trascorrere dei giorni di conservazione.

Per questo gli hamburger sono stati conservati e analizzati seguendo quelli che sono i loro giorni massimi di conservazione, rispettivamente 11 giorni per quelli crudi e 21 per quelli cotti.

La sensoriale è stata fondamentale in questa fase preliminare in quanto ha permesso di comprendere l'accettabilità secondo il parere di un ipotetico consumatore del prodotto e capire quindi quali erano gli aspetti più importanti sulle quali concentrarsi al fine di scegliere quelli migliori da utilizzare per lo studio ufficiale.

Per la conservazione si è scelto il confezionamento sottovuoto in appositi sacchetti in plastica e conservati ad una temperatura di circa 4°C in frigorifero.

#### **4.4.2. Piano d'azione esecutivo dello studio**

Prima di partire con la effettiva produzione di hamburger degli hamburger è stato stilato un piano per poter procedere con criterio scientifico e accuratezza evitando errori e ottenendo una sperimentazione parametrizzabile misurabile, che potesse produrre risultati accurati.

Sono stati selezionati, per la produzione, 3 hamburger con 3 diverse concentrazioni degli additivi vegetali prodotti, uno con 0,8% di estratto di ribes rosso e due con la polvere rispettivamente uno concentrato all'1,5% e l'altro al 3%.

Come è possibile vedere dalla tabella sottostante (Tabella 2), è stata modificata la quantità degli ingredienti (sale, pepe e acqua) precedenti sempre basandosi sui risultati ottenuti durante il test preliminare dell'analisi sensoriale.

Tabella 2: Concentrazioni dei vari ingredienti definitive utilizzate nello studio.

Sample (g)	Control	1,5 % Pomace	3 % Pomace	0,8 % Extract
Meat	184,36	181,06	177,76	182,6
Water	33	33	33	33
Salt	2,2	2,2	2,2	2,2
Pepper	0,44	0,44	0,44	0,44
Pomace/Extract	-	3,3	6,6	1,76
Total	220	220	220	220

Per ogni concentrazione di hamburger sono stati utilizzati 1,76 kg di carne macinata (Figura 16) di suino (lidl), l'alto quantitativo utilizzato è dovuto al fatto che è stato preparato lo stesso quantitativo di hamburger sia cotti che crudi in quanto sia gli uni che gli altri sono stati analizzati in quattro diversi giorni di *shelf life*.

In totale sono stati prodotti 96 hamburger 48 dei quali sono stati sottoposti a cottura mentre la restante metà sono stati direttamente confezionati sottovuoto e conservati in frigorifero.

Per l'esecuzione delle analisi sono stati scelti diversi giorni per campioni cotti e per quelli crudi in quanto presentano diversa *shelf life*.

I campioni crudi sono stati analizzati il giorno zero e poi successivamente il quarto, il settimo e l'undicesimo giorno; mentre i cotti nel medesimo giorno dei crudi per il giorno zero e per il settimo e poi nuovamente il tredicesimo e il ventunesimo giorno questo perché sono stati stimati circa 21 giorni di *shelf life* per i burger cotti conservati sottovuoto in frigo ad una temperatura costante e controllata di 4°C.

Il giorno zero di questa analisi sono stati quindi prodotti contemporaneamente tutti gli impasti con le varie concentrazioni di ingredienti poi divise metà per i cotti e metà per i crudi, entrambe ulteriormente porzionate in quattro porzioni da 220g ognuna, infine da ogni porzione sono stati prodotti tre hamburger due dei quali di 70 g precisi per le analisi analitiche e l'ultimo, che risultava di un peso leggermente superiore, è stato segnato e utilizzato per l'analisi sensoriale.

Nello stesso giorno della produzione tutti gli hamburger prodotti e destinati all'analisi da cotti sono stati posti in forno per 15 minuti a 180°C assicurandosi che tutti gli hamburger raggiungessero una temperatura al cuore di 75°C, monitorando la cottura per evitare il



Figura 16: Preparazione dei diversi impasti per hamburger

raggiungimento di uno stato di imbrunimento eccessivo della superficie esterna dovuto alla reazione di Maillard.

Il packaging sottovuoto, scelto al fine di preservare il più possibile le caratteristiche organolettiche del prodotto durante la conservazione è stato eseguito mediante apposita macchina confezionatrice in una azienda produttrice di carne estera che collabora con l'università.

Ogni giorno di analisi sono state svolte sia sui campioni cotti che su quelli crudi e in alcuni casi su entrambi se il girone combaciava come si può osservare dalla Tabella 3.

Tabella 3: Giorni di analisi in funzione della *shelf life* dei campioni cotti e crudi

	Giorno 0:	Giorno 4:	Giorno 7:	Giorno 11:	Giorno 13:	Giorno 21:
Burger crudi	X	X	X	X		
Burger cotti	X		X		X	X

Le analisi scelte ed eseguite sui campioni sono state selezionate al fine di poter studiare al meglio il prodotto finito e nello specifico come gli ingredienti funzionali ottenuti dal ribes rosso agiscono contro l'ossidazione della componente lipidica.

*Analisi eseguite sui campioni:*

- **Perdita in cottura (Cooking Loss):**

Al fine di poter valutare la quantità di campione persa, composta principalmente da acqua, durante il processo di cottura dell'hamburger.

Si esegue pesando su bilancia analitica il medesimo hamburger prima di cuocerlo e poi nella fase successiva alla cottura assicurandosi che il campione si sia raffreddato e che il peso si sia stabilizzato.

Una volta ottenuti questi due valori si calcola la perdita percentuale facendo il rapporto tra la differenza tra peso crudo e peso cotto e il peso del campione crudo, infine il risultato si moltiplica per 100.

$$Cooking\ loss\ \% = \frac{(P.\ raw - P.\ cook)}{P.\ raw} * 100$$

- **Misurazione del pH**

Questa analisi viene eseguita grazie all'utilizzo del pH-metro, strumento che permette di misurare il pH di una matrice e che necessita di una preventiva calibrazione con soluzioni buffer di pH noti mantenuti a temperatura ambiente; la rilevazione è possibile grazie ad un elettrodo che viene inserito all'interno del campione.

Nei campioni crudi è stato necessario solamente inserire la sonda nell'hamburger e ripetere l'azione per quattro volte annotando i risultati. Il pH però, non può essere misurato nelle medesime condizioni in tutte le matrici, alcune necessitano di una preparazione preliminare del campione come nel caso degli hamburger cotti.

Per misurarlo si porziona e si pesano circa due grammi di campione su bilancia analitica all'interno di un *baker*, si aggiungono 20 ml di una soluzione 0.1M di cloruro di potassio (KCl), e si omogenizza la soluzione con un Ultra-turex per alcuni secondi fino all'ottenimento di una soluzione omogenea dove non vi sia più del particolato solido.

Nel caso dei campioni cotti questa procedura è stata effettuata su due repliche di campione per ognuna dei quali è stato poi misurato tre volte il pH.

- **Misurazione del colore**

Analisi effettuata per ottenere una precisa valutazione dei cambiamenti di tonalità e di colore dei vari hamburger in base alla tipologia e alla quantità di matrice aggiunta all'interno, ed evidenziare come questi valori possano variare nel tempo con l'avanzare della conservazione del prodotto.

Il colore viene misurato utilizzando un colorimetro (Chroma meter CR 400/410 (CIE)) con una D50 come fonte di illuminazione e con un angolo standard di osservazione di 10° (Figura 17).

Per l'espressione dei valori è stata utilizzata la scala di colore CIE  $L^*a^*b^*$ , è uno spazio colore definito dalla Commissione internazionale per dell'illuminazione (CIE) nel 1976; esprime il colore come tre valori:  $L^*$  per la leggerezza percettiva e  $a^*$  e  $b^*$  per i quattro colori unici della visione umana: rosso, verde, blu e giallo.



Figura 17: Colorimetro - Chroma meter CR 400/410 (CIE)

Infine, si calcola anche la differenza di colore totale tra i campioni e il campione usato come controllo grazie all'uso della formula di seguito riportata.

$$\Delta E = \sqrt{(L'_C - L_R)^2 + (a'_C - a_R)^2 + (b'_C - b_R)^2}$$

- **Analisi della Texture**

L'obiettivo principale alla base è quello di realizzare un test oggettivo che permetta affiancare alla valutazione sensoriale umana uno strumento scientifico che dia risultati ripetibili per valutare la struttura degli alimenti.

Le Texture Analysis sono state per molti anni al centro di importanti studi in ambito accademico ed universitario e, solo recentemente, il mercato alimentare sta comprendendo l'importanza di dotarsi di specifici strumenti per indagare le proprietà dei prodotti alimentari. (Figura 18)

L'analisi della struttura degli alimenti è estremamente importante per studiare i fattori che influenzano le proprietà fisiche dei cibi. Grazie a questa analisi è stato possibile studiare caratteristiche quali: la rigidità o forza del prodotto, la consistenza, la coesività e l'elasticità ed interpretare la complessità strutturale studiandone le proprietà a determinate condizioni, in modo da monitorare i processi di trasformazione e conservazione.

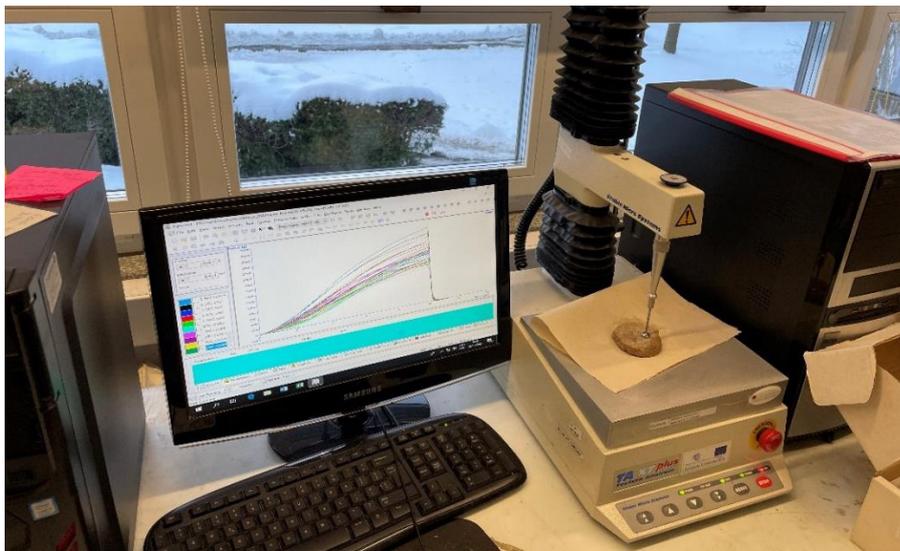


Figura 18: Texture analyzer

Si utilizzano degli strumenti di misura che permettono di eseguire una misurazione della forza in funzione del tempo, oppure della forza in funzione della distanza, poiché una sonda, montata su un analizzatore di struttura, andrà a generare una deformazione sul campione che viene sottoposto ad un test in compressione o in trazione. (Sito: Analisi della texture dei generi alimentari) La sonda che nel caso di prodotti carnei è una sfera, viene spostata a una velocità definita in una direzione verso l'alto o, più comunemente, verso il basso e la forza di resistenza viene misurata durante il test generando un grafico (Sito: Analisi della texture dei generi alimentari).

- **Analisi dei pigmenti totali**

Con questa analisi l'obiettivo è quello di determinare la quantità risultante di pigmenti presenti nel campione valutando il quantitativo apportato dall'aggiunta della matrice e da come durante la sua conservazione possa variare.

Per questa analisi, effettuata sia sui campioni cotti che su quelli crudi, sono stati campionati cinque grammi ed inseriti all'interno di una falcon preventivamente rivestita da un foglio di alluminio al fine di prevenire la deteriorazione dei pigmenti causata dall'esposizione alla luce.

All'interno del contenitore sono poi stati aggiunti 20 ml di acetone ( $C_3H_6O$ ), 1ml di acqua distillata e 0.5 ml di acido cloridrico concentrato (HCl), la miscela viene poi omogenizzata con un Turex (The Kingdom of Belgium) per un minuto a 11000 rpm per ottenere una completa estrazione dei pigmenti.

Per concludere è poi necessario separare i pigmenti ormai disciolti nella componente liquida dal resto della matrice per questo si procede con una filtrazione della componente liquida con carta filtro; il filtrato (Figura 19) verrà poi misurato allo spettrofotometro con una lunghezza d'onda di 640 nm.

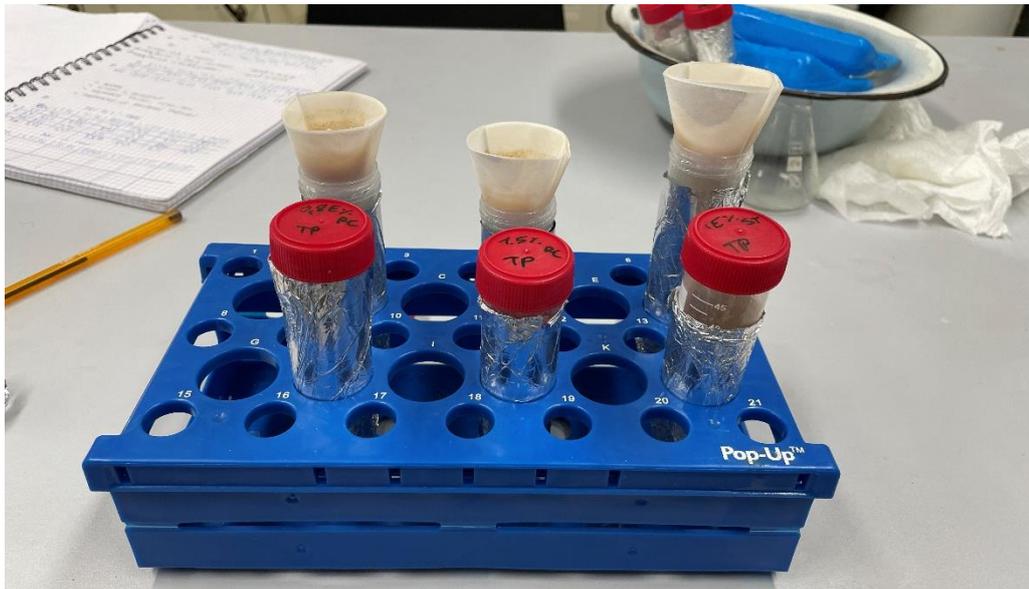


Figura 19: Processo di filtrazione

Il contenuto di pigmenti totale è esprimibile moltiplicando poi le assorbanze rilevate per 680.

Per ogni replica del campione sono state fatte dalle 4 alle 5 misurazione al fine di poter avere una buona base di dati da cui poter raggiungere risultati certi grazie all'utilizzo di programmi statistici di elaborazione dei dati.

- **Determinazione della forma delle mioglobine contenute**

La concentrazione del contenuto mioglobinico è stata determinata utilizzando il metodo analitico di A. Carlez (1995) (link).

Consiste nel pesare utilizzando una bilancia analitica due grammi di hamburger all'interno di una falcon da 45ml preventivamente avvolta da un foglio di carta alluminio al fine di preservare il deterioramento del campione causato dalla luce.

Mediante un cilindro graduato vengono aggiunti in ciascuna falcon 20 ml di una soluzione buffer di sodio potassio a concentrazione di 0,04 mol/l con un pH di 6.8 successivamente viene tutto omogenizzato mediante l'uso di un Ultra-Turex (The Kingdom of Belgium) per 20 secondi a 11000 rpm.

Una volta ottenuto un composto omogeneo i campioni sono messi in un bagno ghiacciato per un'ora e successivamente posti in centrifuga a 1000 rpm per 30 minuti al fine di ottenere un'ottimale separazione tra la componente solida della matrice e il liquido surnatante creatosi dalla soluzione buffer all'interno della quale sono stati estratte le forme mioglobiniche.

Ottenuta una piena separazione la componente liquida viene filtrata in una nuova falcon, anch'essa avvolta da un foglio di alluminio, mediante un filtro di carta al fine di ottenere una soluzione pura che verrà poi analizzata allo spettrofotometro (Genesys 20, Germania).

La misurazione dell'assorbanza viene poi eseguita su quattro diverse lunghezze d'onda, rispettivamente 503, 525, 557 e 583 nm.

Grazie a queste misurazioni è possibile determinare non soltanto il contenuto mioglobinico ma anche le proporzioni espresse in percentuale di Deossimioglobina, Ossimioglobina e Met-mioglobina rispettivamente la forma non legata, la forma legata e quella ossidata.

I valori delle assorbanze, infatti, vengono inizialmente utilizzate per ricavare i valori R1, R2 e R3 attraverso le seguenti formule:

$$R1 = \frac{A_{583}}{A_{525}} \quad R2 = \frac{A_{557}}{A_{525}} \quad R3 = \frac{A_{503}}{A_{525}}$$

Infine, si determinano le concentrazioni percentuali delle forme mioglobiniche:

$$Mb(\%) = (-0.543R1 + 1.594R2 + 0.552R3 - 1.329) * 100;$$

$$MbO_2(\%) = (-0.722R1 - 1.432R2 - 1.659R3 + 2.599) * 100;$$

$$MetMb(\%) = (-0.159R1 - 0.085R2 + 1.262R3 - 0.520) * 100;$$

Per ognuno dei campioni sono state effettuate due repliche sia per i campioni cotti che quelli crudi ogni girone di analisi.

- **TBARS – sostanze reattive dell'acido barbiturico**

L'analisi del TBARS viene eseguita al fine di quantificare i composti originati dall'ossidazione lipidica e viene effettuato secondo il metodo scientifico di Nissen, Byrne, Bertelsen, and Skibsted (2004).

Per l'esecuzione di questa analisi abbiamo pesato all'interno di falcon da 45ml due grammi di campione all'interno della quale vengono poi aggiunti sei ml di una soluzione concentrata al 7,5% di TCA, ovvero una soluzione di 7.5 g di Acido tricloroacetico disciolto in 100 ml di acqua distillata.

Una volta aggiunto il TCA il contenuto viene omogenizzato con un Ultra turax IKA18 (IKA, Staufen, Germany) e la soluzione risultate viene poi centrifugata a 3000 rpm per cinque minuti ad una temperatura di 10°C.

Dopo il processo di centrifugazione nella falcon vengono aggiunti due ml di una soluzione di TBA con concentrazione 0.02 molare (M), una soluzione prodotta disciogliendo in 100 ml di acqua distillata 0.2883g di Acido tiobarbiturico.

La soluzione è stata poi filtrata attraverso un filtro di carta porosa ed il risultate viene messo per 40 minuti in un bagno d'acqua caldo, mantenuto da una piastra ad induzione in continuo stato di bollore.

La soluzione risultate viene infine analizzata allo spettrofotometro utilizzando una lunghezza d'onda di 530nm al fine di ottenere il valore di assorbanza che verrà poi espresso come milligrammi di Malondialdeide (MDA) per kg di prodotto.

- **Analisi sensoriale**

Per la parte di analisi relativa all'analisi sensoriale sono stati selezionati 8 panelisti tra il personale dell'università di Kaunas dal dipartimento dell'*University of technology*, precedentemente istruiti all'analisi sensoriale secondo le norme ISO 8586 del 2012.

I panelisti erano già familiari con la valutazione sensoriale di prodotti a base di carne.

Dopo una serie di prove effettuate preliminarmente al giorno di inizio dello studio sono stati identificati degli attributi specifici adeguati alla valutazione del prodotto.

I descrittori utilizzati erano: Umidità superficiale, Omogeneità, Intensità del colore, Discolorazione, Intensità dell'odore, presenza di possibili odori sgradevoli, Accettabilità, Priorità, Intensità del sapore, Presenza di possibili sapori sgradevoli e Succosità della carne. Le ultime tre caratteristiche sono state valutate solo per i Burger cotti.

Le intensità di ogni parametro sono state espresse attraverso una scala di misura compresa tra uno e cinque dove uno sta per non percepito e cinque massima percezione della caratteristica, mentre per gli ultimi due parametri la valutazione era espressa dal medesimo range numerico ma da *"Dislike"* a *"Like very much"*.

Per il giorno zero del caso studio, come per gli altri giorni in cui sono state ripetute le analisi sui campioni, sono stati posizionati sul piatto da assaggio dopo essere stati tagliati in cubetti da tre cm l'uno.

Di fianco ad ogni diverso hamburger tagliato è stato riportato un numero per l'identificazione in modo tale che gli assaggiatori non venissero influenzati dalle varie concentrazioni di matrice o estratto presenti all'interno, e allo stesso tempo per permettere il loro riconoscimento attraverso una corrispondenza numerica e di poter quindi poi raccogliere tutti i risultati dai panelisti e ottenere poi il profilo sensoriale per ciascun hamburger.

Terminato l'assaggio e la valutazione degli hamburger sono state raccolte le schede di valutazione ed inserite in un apposito foglio Excel, successivamente viene calcolata la media per ogni parametro per ogni diverso hamburger al fine di ottenere un profilo sensoriale di ognuno dei diversi campioni e poter dedurre o fare ipotesi su come una maggiore/minore concentrazione di polvere, piuttosto che di estratto può influire sulla texture o sul colore del prodotto finito e più in generale sulla gradibilità per un potenziale consumatore finale. Le analisi sono state eseguite in accordo con gli standard europei ISO 13299:2016.

#### **4.5. Quarta Fase: Simulazione della digestione dell'alimento in vitro**

La *Vitro Digestion* è una tecnica che si effettua al fine di riprodurre la fase di digestione di un alimento, per farlo si ricrea l'effetto dell'ambiente intestinale facendo reagire il campione con i diversi enzimi che un alimento incontrerebbe dal momento che viene introdotto nella cavità orale fino all'ultima fase digestiva nell'intestino.

Questa analisi, eseguita secondo il metodo scientifico di Miller, Schrickler, Rasmussen, & Van Campen (1981) modificato dall'aggiunta di una fase iniziale che simula la fase orale, viene eseguita per analizzare la quantità di antiossidanti che vengono assorbiti durante la digestione e questo è possibile ottenendo le soluzioni risultati dalle fasi digestive ed effettuando su di esse l'analisi del potere antiossidante (TPS e ABTS).

Per l'esecuzione di questa analisi è necessaria una fase preliminare che consiste nella liofilizzazione del campione, una volta effettuata si preleva un campione di un grammo e lo si inserisce all'interno di una Falcon da 45ml, completato questo passaggio iniziano le tre fasi che compongono questa analisi.

Per ogni campione sono stati prodotti sei replicati ognuno in una falcon differente ad ogni fase digestiva una coppia di falcon non procede con la digestione e viene centrifugata e filtrata per essere poi analizzata.

Questa analisi è stata condotta solo sugli hamburger del giorno zero:

- *Prima Fase:*

La prima è quella che simula l'inizio della digestione di un alimento e quindi il contatto con la saliva all'interno della cavità orale, per riprodurlo si inserisce all'interno della falcon con il campione 3.5 ml di una soluzione di  $\alpha$ -amilosio prodotto disciogliendo 32.5 mg dell'enzima in polvere ( $\alpha$ -amilosio) in 25 ml di una soluzione di Cloruro di Calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) alla concentrazione di 1mM con pH neutro (pH=7), precedentemente prodotta disciogliendo 65g di Sali di Cloruro di Calcio in 100ml di acqua distillata.

Una volta aggiunta il contenitore viene incubato per 30 minuti alla temperatura di 37°C.

Trascorso il tempo per la digestione la reazione necessita di essere interrotta e per farlo si utilizzano le alte temperature come quella di ebollizione dell'acqua; quindi, si inseriscono a bagnomaria i campioni in un contenitore con acqua in fase di ebollizione che viene mantenuta costante grazie ad una piastra induzione sottostante che fornisce in modo continuo calore al bagno.

I campioni rimangono in acqua bollente per quattro minuti alla fine dei quali il processo digestivo enzimatico è stato interrotto e vengono immersi in un bagno ghiacciato per raggiungere una temperatura ambiente ed essere raffreddati velocemente (Figura 20).

La Falcon viene poi posta all'interno di una centrifuga (Velocity 14, Italy) a 10000 rpm per 30 minuti per ottenere una netta separazione tra la parte liquida e quella solida data dalle componenti del campione non digerite in questa fase ed infine filtrati in un nuovo contenitore attraverso un foglio di carta filtro per isolare la componente liquida che andrà poi analizzata.

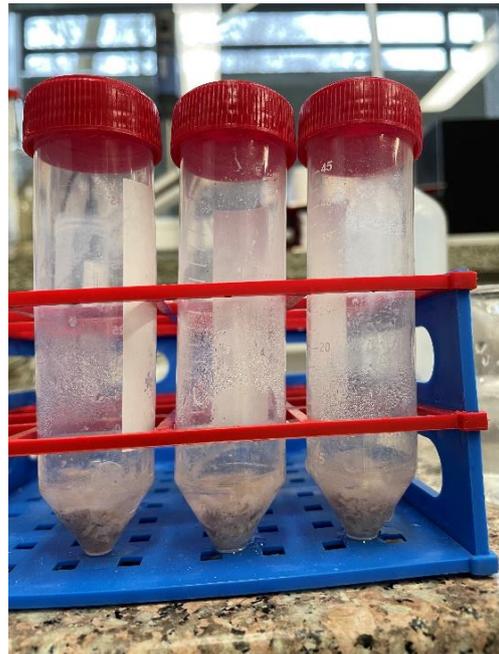


Figura 20: Risultato della prima fase digestiva

- *Seconda Fase:*

In questa fase l'obiettivo è quello di simulare la fase di digestione gastrica per farlo si parte dalla falcon all'interno della quale è precedentemente avvenuta la fase uno, ovvero quella della digestione orale. Il composto risultante dalla prima fase deve essere acidificato fino al raggiungimento di un  $\text{pH} = 2 \pm 0,05$ , per farlo si procede aggiungendo delle gocce di una soluzione di Acido cloridrico (HCl) 1M, precedentemente preparata diluendo in un matraccio 3,1ml di Acido cloridrico puro in 100ml di acqua distillata.

Una volta che la sonda del pH-metro (Figura 21) inserita nel composto mostra il pH ricercato si procede aggiungendo 1,2 ml di una soluzione di pepsina di porcino preparata disciogliendo 16 g dell'enzima pepsina in polvere in 100 ml di una soluzione di Acido cloridrico 0,1M.

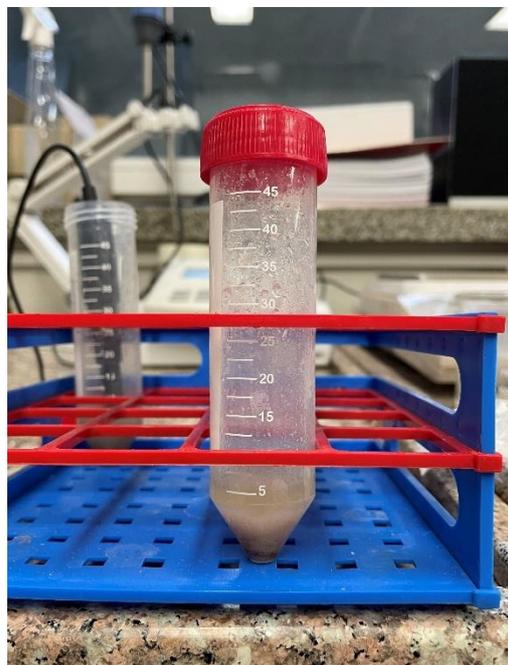


Figura 21: Modificazione del pH

Dopo l'aggiunta della pepsina i campioni vengono incubati a  $37^{\circ}\text{C}$  in un agitatore rotante a 95 rpm per due ore ovvero il tempo necessario per completare questa fase di digestione.

Per l'inattivazione degli enzimi le falcon vengono messe in un bagno d'acqua caldo mantenuto allo stato di ebollizione per quattro minuti e subito dopo inserito in un bagno ghiacciato per favorire un rapido raffreddamento.

Alla fine, due falcon per ogni campione vengono centrifugate a 10000 rpm per 30 minuti in centrifuga e successivamente filtrati con foglio di carta filtro per ottenere la soluzione limpida priva di particolato solido.

- *Terza fase:*

L'ultima fase digestiva è quella intestinale che viene eseguita sul composto risultante dopo la prima e la seconda fase, quindi sulla coppia di falcon rimaste.

La digestione intestinale viene eseguita a pH tendenzialmente neutri per questo motivo inizialmente si deve ottenere una soluzione con  $\text{pH} = 6 \pm 0,05$ , per farlo, si procede aggiungendo poche gocce alla volta, misurandone il pH cadenzatamente, di una soluzione 1M di Bicarbonato di Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), ottenuta sciogliendo 0.84 g di Sali di bicarbonato di sodio in 100 ml di acqua distillata.

Si procede poi con l'aggiunta della componente enzimatica in questo caso si utilizzano 3 ml di una soluzione di pancreatina di porcino ed estratto di bile, per produrla si disciolgono 0,4 g di pancreatina e 2,5g di estratto di bile in 100ml di una soluzione di bicarbonato di sodio 0,1M.

Aggiunto l'enzima il pH della soluzione necessita, per ottimizzazione dello stato della reazione, di una correzione fino ad un valore di  $\text{pH} = 7,5 \pm 0,05$ ; per farlo si aggiungono poche gocce alla volta di Bicarbonato di Sodio 1M controllando ogni volta il valore del pH.

I campioni vengono poi incubati per due ore ad una temperatura costante di 37°C, alla fine dei quali vengono posti per quattro minuti in un bagno d'acqua bollente per interrompere l'azione enzimatica ed infine in un bagno ghiacciato per velocizzare il raffreddamento del campione.

Per poi separare la componente liquida, quella dove sono state estratte le componenti digerite, da quella solida si centrifugano i campioni a 10000 rpm per 30 minuti e successivamente vengono filtrati su filtri in carta circolari.

Le soluzioni ottenute da ognuna delle tre fasi per ogni campione devono poi essere conservate in frigorifero a temperature di circa 0-4°C fino al giorno dell'analisi.

#### **4.5.1. Analisi dell'attività antiossidante sugli estratti ottenuti dalla digestione in vitro**

Conclusa la simulazione della digestione in vitro le sei provette per ogni campione contenenti le soluzioni risultanti dalle tre fasi digestive possono essere analizzate per verificare la quantità di antiossidanti rimasti nel prodotto.

Essendo tre le fasi digestive per ogni campione cotto e crudo e due le repliche prodotte per ognuno in totale sono state prodotte 48 provette sulle quali vengono eseguite le analisi per il potere antiossidante già svolte e descritte nella prima fase dello studio nello specifico l'analisi TPC e ABTS.

In base ai risultati ottenuti delle analisi eseguite sugli additivi vegetali prodotti è stato possibile individuare quali diluizioni produrre dalle soluzioni ottenute dalle diverse fasi digestive per l'analisi degli antiossidanti.

Per la prima fase 0,25 ml/ml e 0,125 ml/ml, 0,03125 ml/ml e 0,0156 ml/ml per la seconda fase e 0,0625 ml/ml e 0,03125 ml/ml per la terza fase.

Una volta diluite tutte le soluzioni sono state eseguite le analisi sulla capacità antiossidante su tutti i campioni nelle medesime condizioni eseguite per l'analisi degli ingredienti funzionali vegetali estratti dal ribes rosso.

## 5. RISULTATI E DISCUSSIONE

Per ogni serie di risultati ottenuti dalle repliche di uno stesso campione, durante le varie analisi, sono state sempre calcolate: la media, la deviazione standard e il coefficiente di variazione (RSD%).

Conclusa la parte sperimentale di tale studio tutti i dati ottenuti sono stati ordinati e sistemati in file Excel appositamente creati per agevolare l'analisi e la visualizzazione dei risultati finali, passaggio fondamentale per l'elaborazione dei risultati.

Inoltre, per l'elaborazione dei risultati è stato impiegato un software statistico "Statgraphics 19", permettendo di evidenziare se tra i risultati ottenuti nel medesimo giorno di analisi vi sono o meno differenze significative tra i valori grazie al test di Tukey; in alcuni casi è stato utilizzato anche per verificare la significatività dei dati dello stesso campione in funzione del tempo.

### 5.1. Risultati ottenuti dalla caratterizzazione degli additivi vegetali

Composizione della polvere di ribes rosso:

Tabella 4: Risultati composizione polvere di ribes rosso prima e dopo l'estrazione SFE CO<sub>2</sub>

%	Polvere di ribes (g)	Polvere di ribes sottoposta a SFE-CO <sub>2</sub> (g)
Umidità	7,44	7,70
Ceneri	2,76	3,17
Proteine	16,31	16,15
Lipidi	19,76	4,94
Fibre	0,25	0,30

Come riportato dai risultati ottenuti dalle analisi eseguite sui valori nutrizionali prima e dopo il processo di estrazione sulla polvere di ribes rosso (Tabella 4), non risultano grandi cambiamenti dei valori delle macromolecole o dell'acqua, fatta eccezione per la frazione lipidica che subisce una riduzione fino ad un quarto del contenuto iniziale.

Risultato che coincide con quelli attesi in quanto l'estrazione con SFE-CO<sub>2</sub> viene eseguita proprio con lo scopo di degrassare la matrice in quanto naturalmente ricca di semi oleosi.

## Capacità antiossidante della polvere e degli estratti:

Al momento dell'esecuzione di queste analisi sugli estratti ottenuti dal processo di macerazione e dal Naviglio, i campioni sono stati prima diluiti preparando prima una concentrazione di 20mg/ml, poi da questa diverse altre diluizioni (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156) in modo da avere per ogni analisi delle concentrazioni adeguate a poter valutare la capacità antiossidante in base alla reattività della matrice.

Queste analisi sono state ripetute al fine di poter verificare come varia la concentrazione degli antiossidanti nelle diverse polveri/estratti a cui vengono applicati diversi processi estrattivi e capire quindi quale può essere il più efficace ma anche quali concentrazioni di sostanze antiossidanti vengono estratte e rimangono in ogni additivo.

Tabella 5: Risultati delle capacità ossidanti dei tre test eseguiti (TPC, ABTS, CUPRAC) su tutte le fasi produttive delle matrici estratte

	TPC, mg GAE/g sample	TPC, mg GAE/g DW	ABTS <sup>•+</sup> , mg TE/g sample	ABTS <sup>•+</sup> , mg TE/g DW	CUPRAC, mg TE/g sample	CUPRAC, mg TE/g DW
<b>Residues</b>						
Red currants	1.95±0.13	1.80±0.12	8.90±0.98	8.24±0.91	10.51±0.95	9.73±0.88
After SFE-CO <sub>2</sub>	2.64±0.17	2.14±0.14	10.94±0.68	8.86±0.55	13.74±1.06	11.13±0.86
After Naviglio	1.68±0.03	1.54±0.03	4.40±0.44	3.52±0.35	9.55±0.67	7.64±0.54
After maceration	2.63±0.21	1.97±0.16	6.42±0.46	4.81±0.34	8.58±0.96	6.42±0.72
<b>Extracts</b>						
SFE-CO <sub>2</sub>	6,42±0,11	0,80±0,01				
Ethanol extract after Naviglio	12.26±0.42	0,12±0,00	64,93±2,62	0,66±0,03	54,41±3,70	0,55±0,04
Ethanol extract after maceration	12,03±0,63	0,80±0,04	21,16±0,91	1,40±0,06	43,53±3,44	2,88±0,23

DW (*Dry Weight*): valore su peso secco

Comparando tutti i risultati delle analisi sulla capacità antiossidante è possibile avere un piano generale sul potere ossidativo degli additivi vegetali prima di ogni processo (Tabella 5).

Per quanto riguarda la polvere di ribes si riscontra un aumento generale del valore di quantità di componenti antiossidanti tra prima e dopo l'estrazione con fluido supercritico con SFE-CO<sub>2</sub>, risultato atteso in quanto tale tecnica è stata applicata con l'obiettivo di concentrare l'ingrediente eliminandone l'eccesso lipidico dovuto all'alto contenuto di semi naturalmente presenti nel frutto.

Gli estratti invece avendo subito tecniche dal maggiore effetto concentrante riportano valori nettamente più alti rispetto alla polvere. Tra i due estratti quello con valori più alti è stato quello ottenuto con l'estrattore Naviglio che sia nel test CUPRAC che nel ABTS dove il valore risulta essere tre volte superiore a quello raggiunto dell'estratto ottenuto tramite macerazione.

## 5.2. Risultati dello studio applicativo

### **Cooking Loss:**

Dall'analisi della perdita di liquidi in cottura, come si evince dalla Figura 22, la presenza della *pomace* all'interno dell'impasto degli hamburger porta ad una maggiore "water holding capacity" (WHC) dovuta al contenuto di fibre dietetiche nella "pomace", infatti nel campione 3% RC si verifica la minore perdita di liquidi leggermente superiore del 30%, subito dopo vi sono il campione con l'estratto (RCE) e l'1.5% RC che secondo ANOVA non vi è differenza significativa tra i due valori ( $P > 0.05$ ).

Mentre il controllo, come da previsto, presenta una perdita di liquidi anche superiore al 40% dimostrato dal fatto che l'acqua risulta essere tenuta intrappolata da un minor numero di legami all'interno della matrice dell'hamburger.

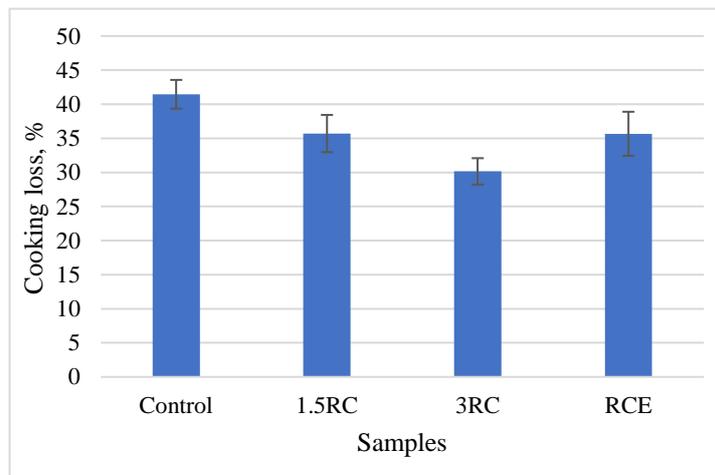


Figura 22: Effetto degli additivi sulla perdita in cottura degli hamburger cotti

### **pH:**

Il pH è un valore fondamentale soprattutto quando si parla di prodotti a base di carne, in quanto è correlato a moltissime caratteristiche organolettiche e fisiche della carne stessa come la freschezza, il colore, la tenerezza, la succosità, la capacità di ritenzione idrica e il contenuto di proteine estraibili. (Tamkutè et al; 2021)

Moltissimi sono i fattori che possono influenzare un aumento del pH come l'accumulo di metaboliti legati alla crescita batterica che in seguito all'esaurimento delle riserve di glucosio, utilizzano gli amminoacidi liberi per produrre ammoniaca. (Gill; 1983)

Altre cause di fluttuazioni possono essere dovute, specialmente durante periodi prolungati di conservazione, dall'idrolisi dei lipidi e dalla formazione di acidi grassi liberi nella matrice.

Come si può osservare dalle tabelle 6 e 7 durante il giorno zero, ovvero quello della produzione degli hamburger, vi è una differenza significativa ( $P < 0.05$ ), confermata dall'analisi statistica, tra i diversi campioni; quelli contenenti la polvere è l'estratto presentano valori più bassi rispetto al controllo quasi certamente dovuto alla matrice di Ribes rosso che risulta essere acida dovuto alle alte concentrazioni di acido ascorbico e acido citrico contenuti all'interno (Limnaios et al; 2021), in particolare se aggiunta sotto forma di polvere come suggeriscono i risultati.

Il *buger* contenente il 3% di polvere, infatti, è quello che ha registrato i valori più bassi di pH.

Analizzando i risultati dei campioni crudi si evidenzia come nei primi giorni successivi alla preparazione, intorno al 4 giorno, i valori di pH crescono tutti mentre nei giorni successivi i valori iniziano a decrescere probabilmente dovuti all'accumulo di metaboliti originati dalla degradazione batterica e dall'idrolisi della componente grassa della carne di maiale. (Tamkutė et al; 2021)

La medesima tendenza di decrescita significativa ( $P < 0.05$ ), verificata dal test di ANOVA, è possibile vederla nell'hamburger del controllo e in quello contenente 1,5% di polvere dei campioni cotti.

Tabella 6: Effetti degli additivi nel periodo di tempo (giorni) sul valore del pH degli hamburger crudi.

Samples	Storage period (days)			
	0	4	7	11
Control	$_{B}5.92 \pm 0.00^d$	$_{C}5.98 \pm 0.01^c$	$_{A}5.65 \pm 0.02^b$	$_{A}5.66 \pm 0.03^b$
1.5RC	$_{A}5.61 \pm 0.00^b$	$_{B}5.65 \pm 0.02^a$	$_{B}5.65 \pm 0.01^b$	$_{B}5.63 \pm 0.01^b$
3RC	$_{A}5.53 \pm 0.00^a$	$_{D}5.64 \pm 0.01^a$	$_{C}5.61 \pm 0.01^a$	$_{B}5.59 \pm 0.01^a$
RCE	$_{B}5.63 \pm 0.00^c$	$_{D}5.72 \pm 0.01^b$	$_{C}5.66 \pm 0.01^b$	$_{A}5.55 \pm 0.02^a$

<sup>a,b,c</sup>Different letters within the same column indicate statistical differences between samples (one-way ANOVA,  $P < 0.05$ ). <sup>A,B,C</sup> Different letters within the same row indicate statistical differences between samples (one-way ANOVA,  $P < 0.05$ ).

Tabella 7: Effetti degli additivi nel periodo di tempo (giorni) sul valore del pH degli hamburger cotti.

Samples	Storage period (days)			
	0	7	13	21
Control	$6.29 \pm 0.00^d$	$6.10 \pm 0.04^d$	$6.18 \pm 0.05^c$	$5.41 \pm 0.16^a$
1.5RC	$5.68 \pm 0.00^a$	$5.67 \pm 0.04^a$	$5.81 \pm 1.10^a$	$5.62 \pm 0.05^b$
3RC	$5.75 \pm 0.00^b$	$5.84 \pm 0.00^b$	$5.84 \pm 0.01^{a,b}$	$5.94 \pm 0.07^c$
RCE	$6.03 \pm 0.00^c$	$5.95 \pm 0.00^c$	$5.93 \pm 0.07^b$	$6.15 \pm 0.01^d$

<sup>a,b,c</sup>Different letters within the same column indicate statistical differences between samples (one-way ANOVA,  $P < 0.05$ ). <sup>A,B,C</sup> Different letters within the same row indicate statistical differences between samples (one-way ANOVA,  $P < 0.05$ ).

### Pigmenti totali:

L'analisi dei pigmenti totali nei hamburger cotti ha evidenziato come nel giorno di produzioni, ovvero il "Day 0", una differenza significativa seconda ANOVA rispetto al controllo si riscontra quando viene aggiunta un'elevata quantità di polvere (3% RC) oppure con l'aggiunta dell'estratto raggiungendo i valori più alti, rispettivamente 114,58 e 118,66 mentre se non vi sono differenze significative ( $P > 0.05$ ) a livello di pigmenti totali tra il campione di controllo e quello contenente 1,5% di polvere infatti i valori ottenuti sono stati 74,63 e 76,84.

In generale i risultati su questa analisi sia per i campioni crudi che per quelli cotti non sono molto significativi in quanto sono al quanto confusi soprattutto quelli ottenuti durante i giorni di *shelf life*, la causa di tale problema è probabilmente dovuta anche all'avanzare dell'ossidazione dei componenti della matrice che influenza il risultato dell'analisi.

### Colore:

Il colore è un parametro di qualità importante dei prodotti a base di carne per i consumatori in termini di preferenze di acquisto.

Inoltre, le caratteristiche del colore sono legate a diversi importanti processi che si verificano nella carne durante la lavorazione e lo stoccaggio (Kerner et al; 2021).

Aggiungendo ingredienti vegetali si possono avere forti effetti sul colore sul prodotto finito. L'effetto dell'aggiunta della polvere o dell'estratto di ribes rosso sui parametri del colore ( $L^*$ ,  $a^*$ , e  $b^*$ ) è stato valutato al fine di evidenziare come gli ingredienti che migliorano la qualità nutrizionale della carne possono influenzare l'accettabilità generale e il l'aspetto agli occhi dei consumatori.

Come è stato possibile vedere fin dal primo giorno di produzione degli hamburger, l'aggiunta dei vari additivi ha portato evidenti differenze di colorazione in base al

quantitativo di polvere o estratto aggiunto come già avevamo riscontrato durante i test preliminari.

Tutti gli additivi aggiunti avevano delle colorazioni differenti e questo si riscontra poi nei risultati di questa analisi, la polvere di ribes rosso aveva un colore rosato non troppo acceso probabilmente dovuto alla alta concentrazione di semi di colorazione bianca presenti matrice prima di subire una fase di granulazione; mentre l'estratto era caratterizzato da un colorito giallo intenso.

È evidente come, nei campioni crudi, l'aggiunta della polvere ha portato ad una diminuzione significativa ( $P < 0.05$ ) del valore  $L^*$  (Tabella 8), e che con l'aumento della quantità porta ad una diminuzione maggiore di tale valore come si può notare confrontando i valori dei campioni 1,5% e 3% RC con quello del controllo.

Per quanto riguarda la "Redness", essendo l'estratto giallastro e la polvere abbastanza chiara più della carne di maiale utilizzata diminuisce notevolmente, secondo ANOVA vi è differenza significativa ( $P < 0.05$ ) tra i campioni e il controllo ma la diversità più marcata la si ritrova confrontando il controllo e il 3% RC.

Per l'ultimo valore, la  $b^*$  riporta valori più alti in particolare nei burger contenente l'estratto visto l'intenso colore giallo dell'estratto stesso, questa significativa differenza ( $P < 0.05$ ), sulla "Yellowness" tra l'RCE e gli altri campioni, rimane marcata e costante durante tutto il periodo di conservazione dove il suo valore rimane nettamente più alto degli altri.

Tabella 8: I cambiamenti nei parametri del colore degli hamburger crudi durante il periodo di conservazione (giorni).

Samples	Storage period (days)			
	0	4	7	11
<b>Lightness (<math>L^*</math>)</b>				
Control	$_{A}55.51 \pm 0.63^c$	$_{A,B}58.64 \pm 0.82^c$	$_{B}59.56 \pm 0.72^d$	$_{B}61.48 \pm 3.87^b$
1.5RC	$_{A}46.73 \pm 0.45^b$	$_{C}51.74 \pm 0.26^b$	$_{B}49.79 \pm 0.84^b$	$_{C}51.09 \pm 0.84^a$
3RC	$_{A}44.38 \pm 0.37^a$	$_{B}48.52 \pm 0.56^a$	$_{B}47.76 \pm 0.45^a$	$_{B}47.81 \pm 0.55^a$
RCE	$_{A}54.81 \pm 0.89^c$	$_{B}58.43 \pm 0.82^c$	$_{B}57.72 \pm 0.70^c$	$_{B}58.53 \pm 0.80^b$
<b>Redness (<math>a^*</math>)</b>				
Control	$17.43 \pm 0.56^d$	$14.51 \pm 0.62^d$	$16.54 \pm 1.84^c$	$14.04 \pm 0.23^d$
1.5RC	$12.58 \pm 0.10^b$	$10.40 \pm 0.27^b$	$12.43 \pm 0.49^b$	$10.14 \pm 0.46^b$
3RC	$10.87 \pm 0.20^a$	$9.45 \pm 0.46^a$	$9.55 \pm 0.33^a$	$9.18 \pm 0.20^a$
RCE	$14.81 \pm 0.26^c$	$11.81 \pm 0.34^c$	$13.32 \pm 0.58^b$	$11.25 \pm 0.18^c$
<b>Yellowness (<math>b^*</math>)</b>				
Control	$11.82 \pm 0.26^b$	$11.41 \pm 0.27^b$	$11.70 \pm 0.28^b$	$11.67 \pm 0.38^b$
1.5RC	$10.22 \pm 0.15^a$	$10.25 \pm 0.34^a$	$10.01 \pm 0.21^a$	$9.48 \pm 0.43^a$
3RC	$9.94 \pm 0.26^a$	$10.22 \pm 0.17^a$	$10.15 \pm 0.29^a$	$9.39 \pm 0.11^a$
RCE	$12.85 \pm 0.30^c$	$12.23 \pm 0.30^c$	$12.93 \pm 0.44^c$	$12.14 \pm 0.34^b$

<sup>a,b,c,d</sup>Different letters within the same column indicate statistical differences between samples (one-way ANOVA,  $P < 0.05$ ). <sup>A,B,C</sup> Different letters within the same row indicate statistical differences between samples (one-way ANOVA,  $P < 0.05$ ).

Analizzando i campioni cotti (Tabella 9) è stato invece possibile evidenziare valori più alti in generale di L\* (“Lightness”) rispetto a quelli crudi, mentre vi è stato un calo dei valori di “Redness” probabilmente dovuti alla fase di cottura e alle alte temperature che hanno portato la carne ad assumere una colorazione più scura tendente al marrone classica della carne cotta e alla formazione in alcuni punti di macchie più scure dovute al naturale processo di imbrunimento non enzimatico e alla reazione di Maillard.

I valori di b\* rimangono invece abbastanza costanti, non discostandosi troppo da quelli dei campioni crudi mostrando sempre valori più alti negli hamburger con l’aggiunta di estratto.

Tabella 9: I cambiamenti nei parametri del colore degli hamburger cotti durante il periodo di conservazione (giorni).

Samples	Storage period (days)			
	0	7	13	21
<b>Lightness (L*)</b>				
Control	<sub>A,B</sub> 60.94±1.19 <sup>b</sup>	<sub>B</sub> 63.26±0.85 <sup>b,c</sup>	<sub>B</sub> 62,68±0,99 <sup>b</sup>	<sub>A</sub> 60,05±1,43 <sup>a,b</sup>
1.5RC	<sub>A</sub> 61.45±0.29 <sup>b</sup>	<sub>A</sub> 61.45±1.07 <sup>b</sup>	<sub>A</sub> 61,26±0,86 <sup>b</sup>	<sub>A</sub> 61,90±1,31 <sup>b</sup>
3RC	<sub>A</sub> 59.14±0.41 <sup>a</sup>	<sub>A</sub> 58.83±1.76 <sup>a</sup>	<sub>A</sub> 58,79±0,90 <sup>a</sup>	<sub>A</sub> 58,89±1,45 <sup>a</sup>
RCE	<sub>A</sub> 66.25±0.61 <sup>c</sup>	<sub>A</sub> 65.48±0.34 <sup>c</sup>	<sub>A</sub> 66,29±1,41 <sup>c</sup>	<sub>A</sub> 67,29±1,13 <sup>c</sup>
<b>Redness (a*)</b>				
Control	4.54±0.06 <sup>a</sup>	5.70±0.20 <sup>b</sup>	5,28±0,16 <sup>c</sup>	5,02±0,36 <sup>b</sup>
1.5RC	3.93±0.24 <sup>a</sup>	3.86±0.19 <sup>a</sup>	3,82±0,25 <sup>a</sup>	3,78±0,45 <sup>a</sup>
3RC	4.04±0.10 <sup>a</sup>	4.24±0.23 <sup>a</sup>	4,21±0,28 <sup>a,b</sup>	3,77±0,09 <sup>a</sup>
RCE	4.55±0.59 <sup>a</sup>	4.39±0.54 <sup>a</sup>	4,59±0,25 <sup>b</sup>	4,73±0,52 <sup>b</sup>
<b>Yellowness (b*)</b>				
Control	12.25±0.05 <sup>b</sup>	12.26±0.49 <sup>b</sup>	12,51±0,31 <sup>b</sup>	13,18±0,70 <sup>b</sup>
1.5RC	10.26±0.20 <sup>a</sup>	10.56±0.56 <sup>a</sup>	11,03±0,24 <sup>a</sup>	11,07±0,61 <sup>a</sup>
3RC	10.24±0.36 <sup>a</sup>	10.54±0.19 <sup>a</sup>	10,90±0,25 <sup>a</sup>	10,76±0,29 <sup>a</sup>
RCE	<sub>A</sub> 12.59±0.18 <sup>b</sup>	<sub>A</sub> 12.91±0.91 <sup>a</sup>	<sub>A</sub> 12,30±0,30 <sup>b</sup>	<sub>A</sub> 12,99±0,10 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>Different letters within the same column indicate statistical differences between samples (one-way ANOVA, P < 0.05). <sup>A,B,C</sup> Different letters within the same row indicate statistical differences between samples (one-way ANOVA, P < 0.05).

### Texture:

La texture è un’altra di quelle caratteristiche fisiche fondamentali per un prodotto a base di carne che può avere una forte rilevanza in termini di accettabilità di un prodotto per il consumatore, per tale motivo questa analisi viene sempre affiancata ad analisi sensoriali sul prodotto finito.

Dai risultati ottenuti dall’analisi effettuata sui campioni crudi è visibile una tendenza crescente del valore di durezza su tutti i campioni tra il giorno di produzione e il tredicesimo giorno un’ipotesi possibile è che nel tempo il danno ossidativo alle proteine abbia portato ad un aumento della durezza nella carne attraverso la formazione di carbonili proteici e legami incrociati tra proteine, la perdita di gruppi Tiolici proteici e la funzionalità proteica (Yan et al; 2014).

I campioni 3% RC seguito dal 1.5% RC sono quelli che hanno raggiunti valori più alti grazie alla alta concentrazione di fibre all'interno della polvere di ribes rosso (López-Vargas J. H. et al 2014). (Tabella 10)

Tabella 10: I cambiamenti dei parametri della texture (forza) dei campioni cotti durante il periodo di conservazione (giorni).

Samples	Storage period (days)	
	Firmness, N	
	0	13
Control	0.97±0.05 <sup>a</sup>	1.66±0.02 <sup>b</sup>
1.5RC	1.18±0.04 <sup>b</sup>	1.82±0.13 <sup>b,c</sup>
3RC	1.27±0.12 <sup>b</sup>	2.12±0.02 <sup>c</sup>
RCE	0.95±0.03 <sup>a</sup>	1.30±0.03 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup>Different letters within the same column indicate statistical differences between samples (one-way ANOVA,  $P < 0.05$ ).

Trascorsi 13 giorni si è verificato un aumento dei valori del 70% in più probabilmente dovuto ad un assorbimento dell'acqua da parte della polvere, intrappolandola in una matrice più consistente, diverso è stato l'incremento per il campione contenente l'estratto (RCE) il cui valore, a livello statistico risulta significativamente diverso ( $P < 0.05$ ), in quanto è salito solo del 40% dovuto alla composizione più fluida dell'additivo vegetale aggiunto nella preparazione.

Un simile comportamento si è osservato negli hamburger cotti la cui durezza ha subito un incremento fino al quattordicesimo giorno a causa dalla perdita di liquidi e del relativo essiccamento della carne, fenomeno direttamente proporzionale alla quantità di polvere aggiunta nell'impasto, infatti, come si evince dalla Figura 23, confrontando i valori del campione di controllo con il 3% RC, ovvero quello che raggiunge i valori di durezza più alti.

Trascorsi 13 giorni i valori del controllo e dei campioni contenenti la polvere di ribes rosso iniziano una fase decrescente probabilmente a causa dell'inizio di attività enzimatiche e degradazione proteica che hanno come conseguenza il rammollimento della texture (Sánchez-Zapata et al; 2011).

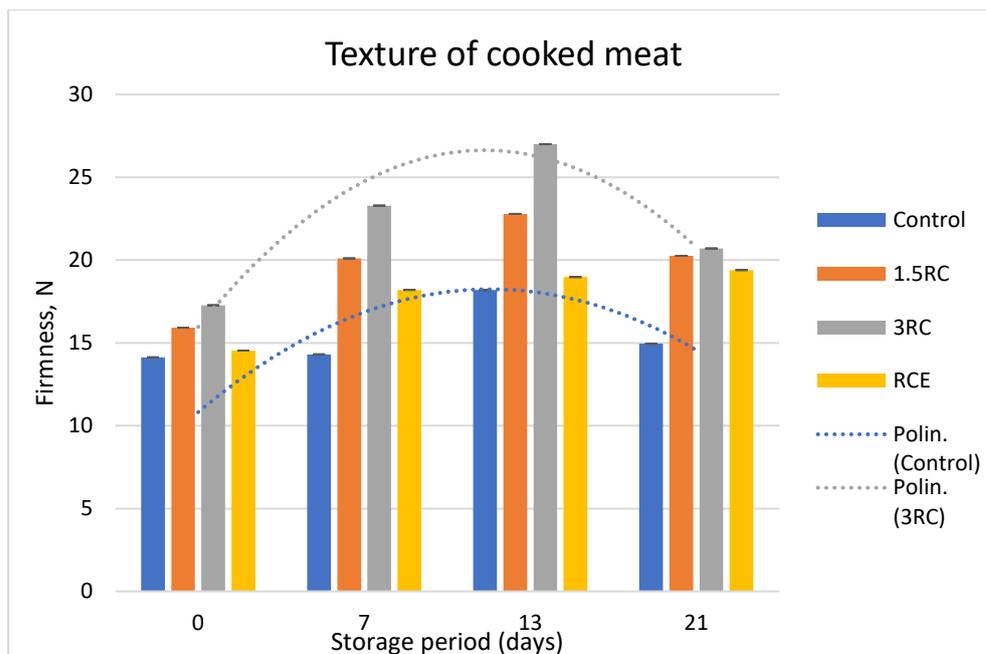


Figura 23: I cambiamenti dei parametri della texture (forza) degli hamburger cotti durante il periodo di conservazione (giorni).

#### TBARS:

I prodotti di degradazione degli acidi grassi insaturi sono correlati allo sviluppo di un odore sgradevole rancido. L'ossidazione dei lipidi causa vari problemi di qualità come irrancidimento, scolorimento, durata di conservazione più breve e maggiori rischi per la salute, per tale motivo è un processo che deve essere contrastato. L'MDA (Malondialdeide) è un prodotto di ossidazione secondaria molto tossico, che si forma durante l'ossidazione, e il suo livello deve essere controllato utilizzandolo come marker durante il periodo di conservazione sia dal punto di vista sensoriale che dal punto di vista della salute dei consumatori.

Tabella 11: Risultati dei test antiossidanti sugli additivi estratti da ribes rosso

	TPC, mg GAE/g sample	TPC, mg GAE/g DW	CUPRAC, mg TE/g sample	CUPRAC, mg TE/g DW	ABTS <sup>+</sup> , mg TE/g sample	ABTS, mg TE/g DW
<b>Pomace</b>						
Red currants	1.95±0.13	1.80±0.12	10.51±0.95	9.73±0.88	8.90±0.98	8.24±0.91
After SFE-CO <sub>2</sub>	2.64±0.17	2.14±0.14	13.74±1.06	11.13±0.86	10.94±0.68	8.86±0.55
After maceration	2.63±0.21	1.97±0.16	8.58±0.96	6.42±0.72	6.42±0.46	4.81±0.34
<b>Extracts</b>						
Ethanol extract after maceration	12,03±0,63	0,80±0,04	43,53±3,44	2,88±0,23	21,16±0,91	1,40±0,06

Dai risultati ottenuti dall'analisi si evince una buona effettività sia della polvere che dell'estratto in quanto secondo ANOVA presentano valori significativamente più bassi ( $P < 0.05$ ) rispetto al controllo dove invece nel tempo la formazione di prodotti secondari dell'ossidazione cresce in modo esponenziale.

La spiegazione di tale efficienza viene dimostrata dai risultati dell'analisi degli antiossidanti (Tabella 11) fatta precedentemente sulla polvere e sull'estratto che avevano riportato alti valori per entrambi.

L'efficacia dei campioni "3 RC" e "RCE" risulta nel complesso simile ma analizzando i valori si può ipotizzare che nei primissimi giorni che seguono la produzione dell'hamburger l'estratto sia più efficace contro l'ossidazione e che però con il passare dei giorni la sua efficacia diminuisca mentre il campione al 3% dimostra un valore iniziale più alto ma che poi mantenga un andamento, e quindi un effetto, più costante e duraturo nel tempo (Figura 24).

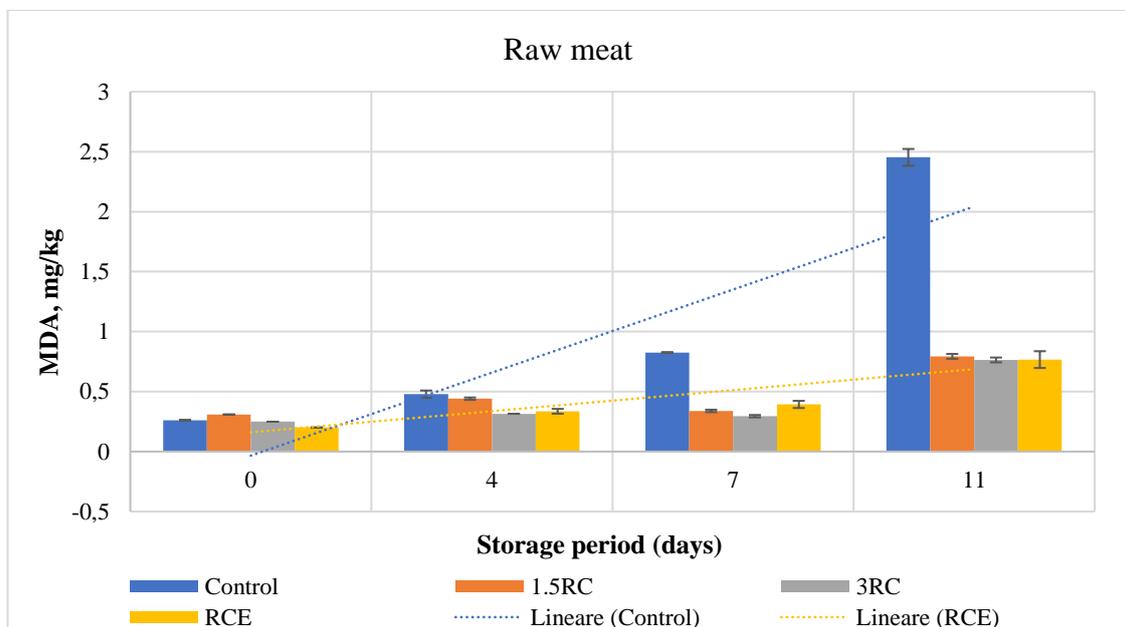


Figura 24: Cambiamenti dei valori del TBARS degli hamburger di maiale crudi confezionati sottovuoto durante il periodo di conservazione (MDA mg/kg).

Nei campioni cotti l'analisi ha riportato esiti al quanto simili, nel controllo si evidenziano fin dal primo giorno dello studio alti valori che nel tempo crescono esponenzialmente superando già dopo dieci giorni i 2,00 mg di MDA/kg di prodotto ovvero la soglia al di sotto della quale non vengono percepiti dal consumatore secondo uno studio di Wood et al 2004. Dopo 21 giorni di conservazione sottovuoto dei campioni, il controllo ha raggiunto 3.88 mg di MDA/kg di prodotto probabilmente anche accentuato dal processo di cottura a cui è stato sottoposto (Figura 25).

Anche per gli hamburger sottoposti a cottura il campione concentrato al 3% in polvere risulta essere più efficace contro l'ossidazione soprattutto nel lungo periodo, in quanto dopo 21 giorni di *shelf life* si può notare una significativa differenza ( $P < 0.05$ ) sul il

valore di MDA del campione RCE che risulta essere il doppio rispetto a quelli dei campioni contenenti la polvere di ribes rosso.

È importante però ricordare che la misurazione del TBARS fornisce informazioni preliminari sui processi ossidativi nella carne; per un supporto più valido degli effetti antiossidanti, lo studio dovrebbe essere esteso utilizzando altri metodi come la misurazione dei perossidi, l'ossidazione dei pigmenti della carne e i gruppi carbonilici e solfidrilici (Tamkutė et al; 2019).

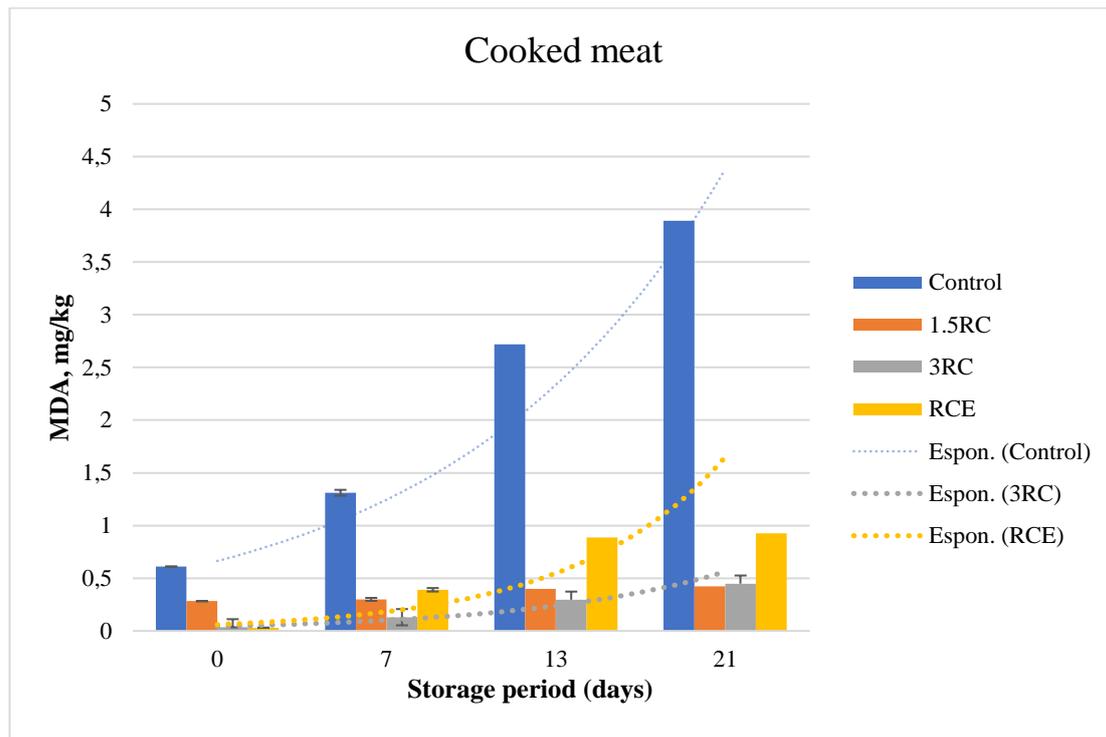


Figura 25: Cambiamenti dei valori del TBARS degli hamburger di maiale cotti confezionati sottovuoto durante il periodo di conservazione (MDA mg/kg).

### Mioglobina:

Il colore della carne dipende dalla quantità di Nitrosomioglobina presente all'interno dell'impasto con l'analisi, infatti, si ha l'obiettivo di trovare il quantitativo percentuale delle tre forme di pigmenti della mioglobina.

Ossimioglobina (MbO<sub>2</sub>), Metmioglobina (MetMb) e Deossimioglobina (Mb) sono i tre pigmenti che definiscono il colore di prodotti a base di carne, mentre dalla MetMb dipendono i cambiamenti di colori della carne fresca in quanto una volta ossidata avviene la conversione, da MbO<sub>2</sub>, aumentandone la quantità presente nella matrice e conferendo alla carne un indesiderato colore marrone.

Molteplici sono i fattori che possono velocizzare tale conversione promuovendo un'ossidazione del ferro nel pigmento come: bassi pH, ossigeno a bassa pressione, l'uso di additivi speziati, alcune tipologie di imballaggi, la composizione di alcuni gas, la concentrazione di sale o persino l'origine di alcune tipologie di carne. (Tamkutė et al 2021)

Il quantitativo di MetMb è quindi un ottimo indicatore per conoscere lo stato di ossidazione di un prodotto a base di carne va considerato che è determinato con un metodo spettrofotometrico (Krzywicki, 1982), e che quindi a causa della presenza di estratto colorato possono verificarsi molte interferenze con le caratteristiche di assorbimento dei pigmenti della carne.

I risultati ottenuti dopo un'accurata analisi si sono rivelati poco soddisfacenti e un po' confusionari a livello di tendenza nel tempo una delle cause risiede sicuramente nello stretto legame che la componente mioglobinica ha con il pH la cui analisi come precedentemente visto ha riportato valori un po' altalenanti.

Nonostante la scarsa affidabilità dei risultati raggiunti analizzando con occhio critico quello che si può ipotizzare e che i dati ottenuti dall'analisi svolta sui campioni cotti, secondo ANOVA, solo nell'hamburger di controllo si verificano fluttuazioni significative ( $P < 0.05$ ) del valore di MetMb durante il periodo di studio di 21 giorni mentre negli altri 1,5 RC, 3 RC e RCE non vi sono differenze significative di tale indicatore nel tempo magari dovuta ad una azione antiossidante eseguita dalla polvere o dall'estratto di ribes rosso all'interno del campione.

### **Analisi sensoriale:**

Gli effetti negativi sulla qualità sensoriale sono tra i principali problemi nell'utilizzo di ingredienti di origine vegetale morfologicamente diversi nei prodotti a base di carne. Pertanto, una fase molto importante è la determinazione delle dosi accettabili di tali ingredienti e dei loro effetti su varie caratteristiche organolettiche.

Sebbene oggi le preferenze del consumatore siano anche più fortemente legata alla salubrità dei costituenti di origine vegetale, le caratteristiche sensoriali degli alimenti non hanno perso significato nel determinarne la scelta finale.

Pertanto, la valutazione degli effetti degli ingredienti ottenuti dal ribes rosso sulla qualità sensoriale degli hamburger di maiale è stata un'analisi molto importante per comprendere come il prodotto finito viene visto dal consumatore e quali sono i principali difetti percepiti.

Analizzando i risultati dell'analisi dei campioni crudi nel primo giorno dello studio, in generale si può notare come l'hamburger di controllo e quello contenente l'estratto sono quelli che hanno raggiunto i valori più alti in termini di accettabilità per gli assaggiatori a dispetto di quelli con la polvere all'interno.

In particolare, il "3 RC" è quello che ha totalizzato un apprezzamento minore probabilmente legato alla presenza di eccessiva quantità di ingrediente che ha influenzato il colore in primis che è diventato eccessivamente scuro, generando anche odori estranei nel prodotto, odori percepiti sebbene in minor quantità anche nel campione "1.5 RC".

Con il passare del tempo però questi valori hanno subito diverse variazioni arrivando l'undicesimo giorno a mostrare come si può vedere dalla Figura 26 e 27, una quasi impercettibile differenza tra i diversi campioni e anzi in alcuni casi il controllo risulta

persino inferiore agli altri come ad esempio sul colore, sulla presenza di umidità superficiale e sulla generazione di “Off-odors”.

Una spiegazione plausibile è che l’aggiunta dei vari ingredienti del ribes rosso porti ad un rallentamento generale del deterioramento dell’hamburger, infatti, il campione che risulta essere più approvato dai panelisti è quello contenente l’estratto (RCE).

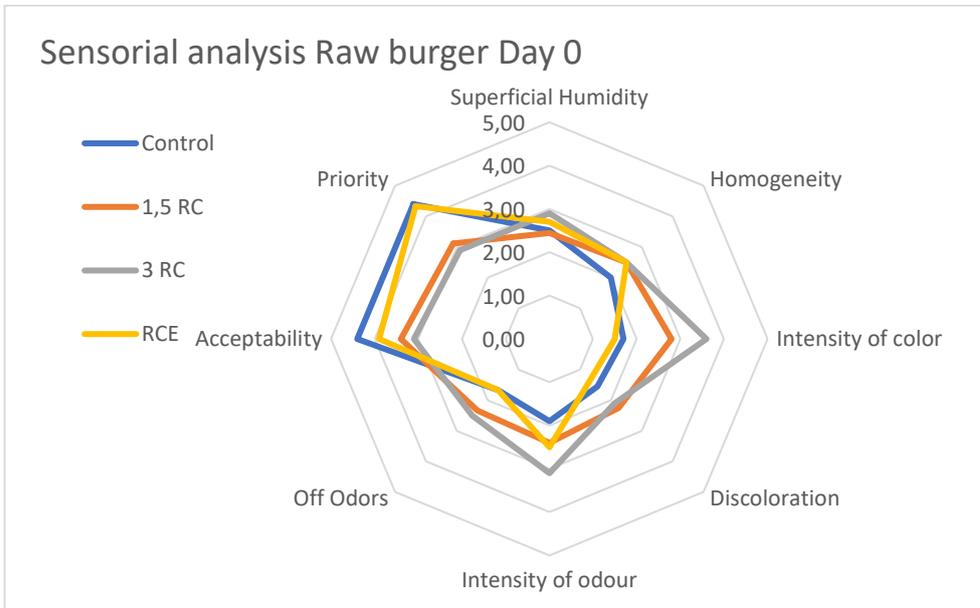


Figura 26: Risultati analisi sensoriale dei campioni crudi nel giorno zero.

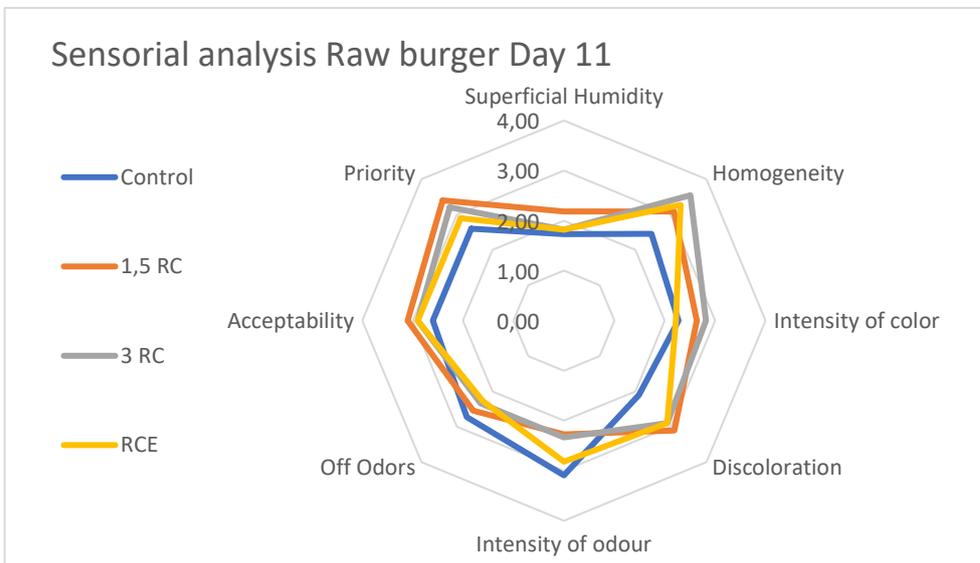


Figura 27: Risultati analisi sensoriale dei campioni crudi nell’undicesimo giorno.

Simili ma non identici risultati sono stati evidenziati analizzando i campioni cotti, dopo la cottura si è delineata una forte somiglianza di valori tra coppie di campioni: il controllo e l’RCE e tra l’“1.5 RC” e il “3 RC”, la prima è quella che raggiunge valori più alti di appetibilità e che risulta essere gradita in ugual modo dagli assaggiatori.

I campioni con all'interno la polvere, in particolare il "3 RC" riporta ancora problemi sul colore della carne, sulla succosità, sulla eccessiva discolorazione e passati più di 21 giorni anche problemi legati alla presenza di cattivi odori.

Durante però la *shelf life* dei campioni si delinea una netta diminuzione significativa dei valori del controllo dovuta principalmente alla formazione di "Off-odors" e "Off-flavour" e anche della sua accettabilità generale, mentre i valori dei campioni contenenti la polvere, dal punto di vista dell'accettabilità rimangono abbastanza invariati con qualche leggero segno di miglioramento (Figura 28 e 29).

L'hamburger con l'estratto però è quello che ottiene migliori valori sulle diverse caratteristiche valutate ed in particolare sull'accettabilità senza genere un effetto impattante sulle caratteristiche del prodotto finto.

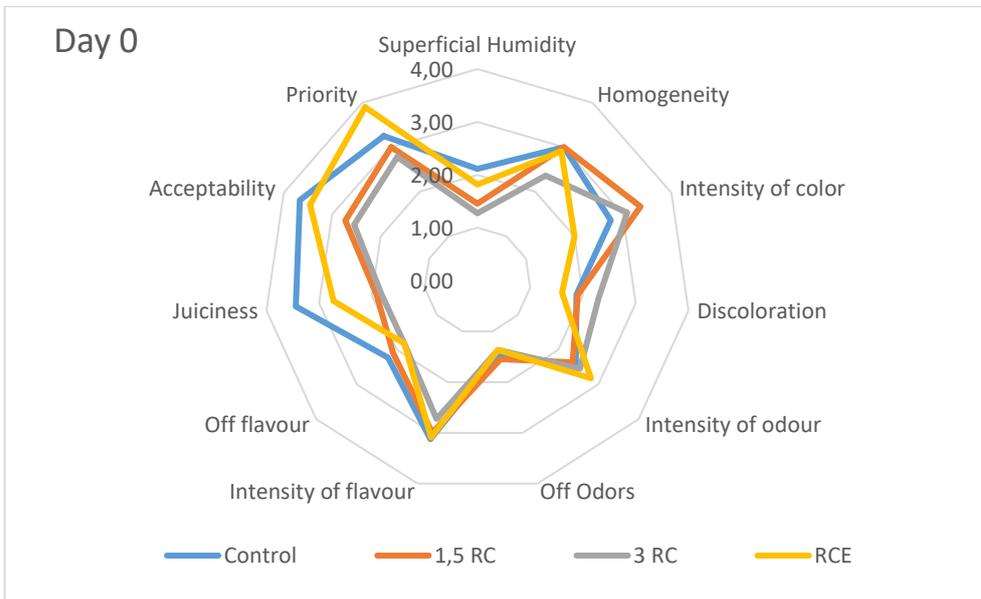


Figura 28: Risultati analisi sensoriale dei campioni cotti nel giorno zero.

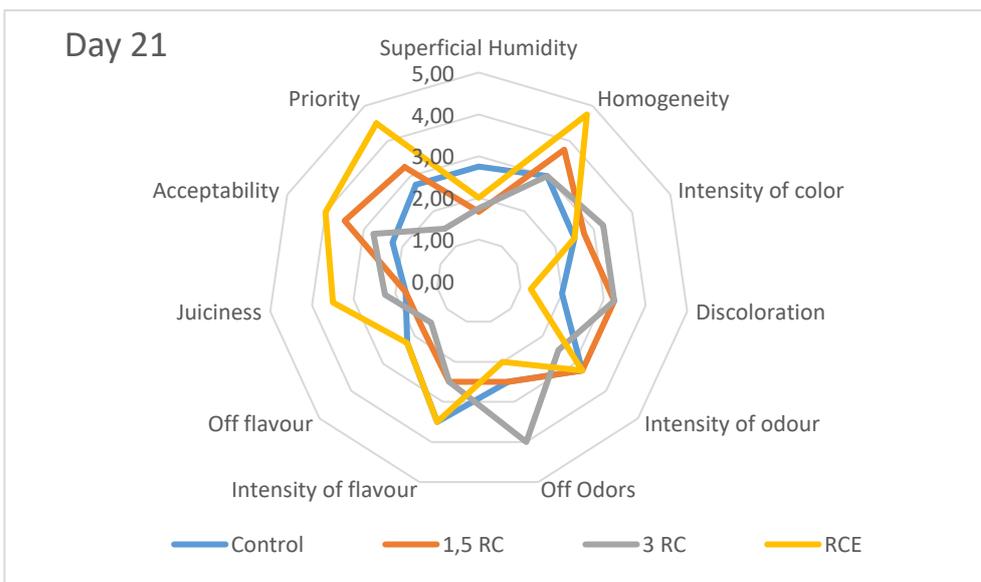


Figura 29: Risultati analisi sensoriale dei campioni cotti del ventunesimo giorno.

### Analisi sul potere antiossidante durante la digestione in vitro:

In accordo con i risultati ottenuti dal test sul livello di ossidazione lipidico negli hamburger (TBARS) i risultati hanno evidenziato una significativa differenza ( $P < 0.05$ ) comprovata dall'analisi statistica tra il controllo e i campioni contenenti gli additivi vegetali aggiunti.

Analizzando i valori ottenuti dai campioni crudi (Tabella 12) con l'analisi ABTS della prima fase, secondo ANOVA vi è una significativa differenza tra i valori di milligrammi di equivalente di Trolox per millilitro del campione di controllo e quelli di "3 RC" e "RCE".

Nella seconda fase digestiva dai risultati dell'analisi TPC si ritrova una differenza significativa ( $P < 0.05$ ) tra il controllo e tutti gli altri campioni, mentre nella terza secondo la medesima analisi solo il campione con l'estratto dimostra di avere più potere antiossidante rispetto agli altri.

Per i campioni cotti invece il valore aggiunto portato dagli ingredienti ottenuti dal ribes rosso si evidenziano in modo significativo sull'analisi TPC nella prima fase dove il controllo ha risultati più bassi degli altri (Tabella 13) e nella seconda fase grazie al test dell'ABTS allo stesso modo ma con distacco di valori ancora più netto, dove l'"RCE" raggiunge i 5,17 mg di trolox equivalenti per millilitro rispetto ai 2.92 mg/ml di campione di controllo.

In accordo con i risultati ottenuti dall'analisi TBARS si può affermare che alcuni antiossidanti sono stati utilizzati per contrastare l'ossidazione della componente lipidica ma da questi dati si evince che ne è rimasto ancora una buona quantità in quanto i risultati a fine della digestione simulata sono ancora alti.

Tabella 12: Risultati della capacità antiossidante degli hamburger crudi misurati con diverse tecniche (ABTS<sup>•+</sup>, TPC) durante la digestione in vitro.

Sample	Q <sub>1</sub> , µC	Q <sub>2</sub> , µC	Q <sub>T</sub> , µC	TPC, mg GAE/mL	ABTS, mg TE/mL
<b>Oral phase (I)</b>					
Control				0.06±0.00 <sup>a</sup>	0.33±0.02 <sup>b</sup>
1.5RC				0.08±0.01 <sup>b</sup>	0.28±0.02 <sup>a</sup>
3RC				0.11±0.01 <sup>d</sup>	0.42±0.02 <sup>c</sup>
RCE				0.09±0.00 <sup>c</sup>	0.40±0.02 <sup>c</sup>
<b>Gastric phase (II)</b>					
Control				0.59±0.02 <sup>a</sup>	3.12±0.13 <sup>a</sup>
1.5RC				0.65±0.04 <sup>b</sup>	3.72±0.23 <sup>b</sup>
3RC				0.63±0.02 <sup>b</sup>	3.85±0.37 <sup>b</sup>
RCE				0.64±0.01 <sup>b</sup>	3.65±0.10 <sup>b</sup>
<b>Intestine phase (III)</b>					
Control				0.54±0.02 <sup>a</sup>	2.91±0.07 <sup>a</sup>
1.5RC				0.55±0.02 <sup>a</sup>	3.28±0.11 <sup>b</sup>
3RC				0.55±0.01 <sup>a</sup>	3.46±0.33 <sup>b</sup>
RCE				0.62±0.02 <sup>b</sup>	3.18±0.13 <sup>a,b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup>Different letters within the same column indicate statistical differences between samples (one-way ANOVA,  $P < 0.05$ ).

Tabella 13: Risultati della capacità antiossidante degli hamburger cotti misurati con diverse tecniche (ABTS<sup>•+</sup>, TPC) durante la digestione in vitro.

Sample	TPC, mg GAE/mL	ABTS, mg TE/mL
<b>Oral phase (I)</b>		
Control	0.06±0.00 <sup>a</sup>	0.45±0.00 <sup>c</sup>
1.5RC	0.10±0.01 <sup>b</sup>	0.35±0.01 <sup>a</sup>
3RC	0.11±0.01 <sup>b</sup>	0.40±0.02 <sup>b</sup>
RCE	0.10±0.00 <sup>b</sup>	0.44±0.04 <sup>b,c</sup>
<b>Gastric phase (II)</b>		
Control	0.63±0.03 <sup>a</sup>	2.92±0.11 <sup>a</sup>
1.5RC	0.82±0.02 <sup>b</sup>	4.14±0.16 <sup>b</sup>
3RC	0.83±0.05 <sup>b</sup>	4.35±0.16 <sup>b</sup>
RCE	0.94±0.05 <sup>c</sup>	5.17±0.16 <sup>c</sup>
<b>Intestine phase (III)</b>		
Control	0.58±0.01 <sup>a</sup>	2.89±0.17 <sup>a</sup>
1.5RC	0.63±0.03 <sup>b</sup>	3.37±0.21 <sup>b</sup>
3RC	0.60±0.01 <sup>a,b</sup>	3.07±0.07 <sup>a,b</sup>
RCE	0.72±0.02 <sup>c</sup>	4.17±0.32 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup>Different letters within the same column indicate statistical differences between samples (one-way ANOVA, P < 0.05).

## 6. CONCLUSIONI

L'ambito dell'utilizzo di ingredienti di origine vegetale come additivi in prodotti a base di carne, con il fine di ottenerne un miglioramento funzionale del prodotto finito, è sicuramente in continua evoluzione e vi sono ancora molte matrici che meritano di essere approfondite e moltissime altre che devono essere scoperte.

In generale però con i dati ottenuti si può affermare che l'utilizzo di questa polvere/estratto proveniente dal frutto del Ribes rosso all'interno di prodotti a base di carne porta diversi aspetti positivi come un abbassamento di pH, condizione ottima per contrastare la proliferazione batterica e per migliorarne lo stato di conservazione. Questi additivi di origine vegetale inoltre portano ad una diminuzione della perdita in cottura soprattutto nel caso dell'aggiunta di polvere di ribes rosso, un aspetto che può risultare interessante dal punto di vista economico.

Un miglioramento lo si ottiene anche a livello nutrizionale da più punti di vista, per esempio grazie all'aggiunta di polvere si aggiunge anche una piccola percentuale di fibre che non sarà mai sufficiente a raggiungere un livello tale per ottenere il *Claim* nutrizionale "fonte di fibre" senza andare a incidere troppo sull'accettabilità del prodotto, ma ne aumenta sicuramente il contenuto in maniera significativa. E per ultima ma non per importanza vi è un miglioramento delle capacità antiossidante che dona al prodotto finito, influenzandone così non solo il colore nel tempo ma anche le caratteristiche di accettabilità del prodotto e la soprattutto la sua *shelf life* prolungandola.

Uno dei maggiori ostacoli in questa produzione, oltre sicuramente al tempo e alle risorse necessarie per la produzione degli estratti e della polvere da una matrice come il ribes rosso, è la percezione del prodotto per il consumatore. Sebbene vi sia una crescente attenzione per la ricerca di alimenti con etichetta pulita e l'uso di ingredienti più naturali possibili il gusto del consumatore rimane comunque un obiettivo difficile da raggiungere, in questo caso soprattutto per la polvere di ribes rosso che da come è emerso dall'analisi sensoriale causa diversi difetti nel prodotto finito.

Per concludere possiamo un prodotto a base di carne con l'aggiunta di un additivo ottenuto dal ribes rosso comporta, se applicato in modo adeguato effetti benefici da diversi punti di vista sul consumatore ma per confermarlo sarebbero necessarie risultati accurati da ulteriori analisi e successivamente una volta ottenuti una fase di studio ben pianificata su analisi cliniche su esseri viventi.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Amirante Paolo, (2014), "Macchine ed impianti per la raccolta conservazione e il trattamento delle colture ortive ed industriali", Edizione su sito internet dell'autore, [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net) paolo amirante.
- Amjad M. Shraim, Talaat A. Ahmed, Md Mizanur Rahman, Yousef M. Hijji, (2021), Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation, *LWT*, Volume 150, 111932, ISSN 0023-6438.
- Bensaid, S., Cravotto, G., Cavaglià, G., & Talarico, S. (2018). Corso di Laurea Magistrale di Ingegneria Chimica dei processi Sostenibili.
- Biesalski, H.K. (2005) La carne come componente di una dieta sana: ci sono rischi o benefici se la carne viene evitata nella dieta? *Scienza della carne*, 70, 509-524.
- Djordjević, B., Šavikin, K., Zdunić, G. et al. (2010) Biochemical Properties of Red Currant Varieties in Relation to Storage. *Plant Foods Hum Nutr* **65**, 326–332.
- Fereidoon Shahidi, Ying Zhong, (2015), Measurement of antioxidant activity, *Journal of Functional Foods*, Volume 18, Part B, Pages 757-781.
- Gill CO., (1983) May; Meat Spoilage and Evaluation of the Potential Storage Life of Fresh Meat, *J Food Prot.* 46(5):444-452.
- Hidalgo GI, Almajano MP., (19 gennaio 2017), Frutti rossi: estrazione di antiossidanti, contenuto fenolico e determinazione dello scavenging radicale: una recensione. *Antiossidanti (Basilea)*.; 6(1):7.
- Kasprzak, Maria & Erxleben, Andrea & Ochocki, Justyn. (2015). *ChemInform Abstract: Properties and Applications of Flavonoid Metal Complexes*. RSC Advances. 2015.
- Kerner Kristi, Jõudu Ivi, Tanavots Alo e Venskutonis Petras Rimantas, (2021), Applicazione PR di Raw e Defatted di Supercritical CO2 Presscake ai semi di canapa ed estratto antiossidante di erba dolce in polpette di hamburger di maiale. *Alimenti*, 10, 1904.
- Larsson Susanna C., Wolk Alicja, (20 October 2006), Meat consumption and risk of colorectal cancer: A meta-analysis of prospective studies, *Volume 119, Issue 11*.
- Lawrie, R. A., & Ledward, D. (2006). Chemical and biochemical constitution of muscle. *Lawrie's Meat Science* (7th ed.). Woodhead Publishing 75–127.
- Lawrie, R.A. and Ledward, D.A. (2006) *Lawrie's Meat Science*. 6th Edition, Woodhead, Cambridge, 11-30.
- Lewis Tyra and Martic Sanela, (2022), Electrochemical Monitoring of the Superoxide Anion Radical with Quercetin and Metallo-Quercetin Complexes, *The Electrochemical Society*.
- Limnaios Athanasios, Pathak Namrata, Grossi Bovi Grazielle, Fröhling Antje, Valdramidis Vasilis P., Taoukis Petros S., Schlüter Oliver, (2021), Effect of cold atmospheric pressure plasma processing on quality and shelf life of red currants, *LWT*, Volume 151, 112213, ISSN 0023-6438.

- López-Vargas Jairo H., Fernández-López Juana, Pérez-Álvarez José Ángel, Viuda-Martos Manuel, (2014), Quality characteristics of pork burger added with albedo-fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products, *Meat Science*, Volume 97, Issue 2, Pages 270-276, ISSN 0309-1740.
- Lorenzo José M., Pateiro Mirian, (marzo 2013), Influencia del tipo di muscoli sul valore nutrizionale della carne di puledro *Scienza della carne* Volume 93, pagine 630-638.
- Lorenzo, J. M., & Pateiro, M. (2013). Influence of type of muscles on nutritional value of foal meat. *Meat Science*, 93, 630–638.
- Madani Leila, Derriche Ratiba, Ali-H Al-Marzouqi, (2022), Experimental and mathematical modelling data of green process of essential oil extraction: Supercritical CO<sub>2</sub> extraction, *Materials Today: Proceedings*, Volume 49, Part 4, Pages 1023-1029.
- Magalhaes, Luis & Segundo, Marcela & Reis, Salette & Lima, José. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*. 613. 1-19.
- Matteucci P., (2012), Sviluppo di un metodo elettrochimico per la determinazione della Capacità Antiossidante, UNIBO tesi.
- Orsavová Jana, Hlaváčová Irena, Mlček Jiří, Snopek Lukáš, Mišurcová Ladislava, (2019), Contribution of phenolic compounds, ascorbic acid and vitamin E to antioxidant activity of currant (*Ribes L.*) and gooseberry (*Ribes uva-crispa L.*) fruits, *Food Chemistry*, Volume 284, Pages 323-333,
- Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K. (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Pyrzynska K, Pełkal A., (2011 Oct-Dec), Flavonoids as Analytical Reagents. *Crit Rev Anal Chem.*;41(4):335-345.
- Raventós M, Duarte S, Alarcón R., (2002); Application and Possibilities of Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction in Food Processing Industry: An Overview. *Food Science and Technology International*. 8(5):269-284.
- Reşat Apak, Kubilay Güçlü, Birsen Demirata, Mustafa Özyürek, Saliha Esin Çelik , Burcu Bektaşoğlu, K. Işıl Berker and Dilek Özyurt, (2007), Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay, *Molecules*, 12, 1496-1547
- Reverchon, E. & de marco, Iolanda. (2006). Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Natural Matter. *The Journal of Supercritical Fluids*. 38. 146-166.
- Sadowska-Bartosz, I.; Bartosz, G., (2022), Evaluation of The Antioxidant Capacity of Food Products: Methods, Applications and Limitations. *Processes*, 10, 2031.
- Sánchez-Zapata Elena, Fernández-López Juana, Peñaranda Mariola, Fuentes-Zaragoza Evangélica, Sendra Esther, Sayas Estrella, Pérez-Alvarez José A., (2011), Technological properties of date paste obtained from date by-products

and its effect on the quality of a cooked meat product, *Food Research International*, Volume 44, Issue 7, Pages 2401-2407, ISSN 0963-9969.

- Tamkutė Laura, Melero Gil Beatriz, Rovira Carballido Jordi, Pukalskienė Milda, Venskutonis Petras Rimantas, (2019), Effect of cranberry pomace extracts isolated by pressurized ethanol and water on the inhibition of food pathogenic/spoilage bacteria and the quality of pork products, *Food Research International*, Volume 120, Pages 38-51, ISSN 0963-9969.
- Tamkutė Laura, Vaicekauskaitė Rūta, Melero Beatriz, Jaime Isabel, Rovira Jordi, Venskutonis Petras Rimantas, (2021), Effects of chokeberry extract isolated with pressurized ethanol from defatted pomace on oxidative stability, quality and sensory characteristics of pork meat products, *LWT*, Volume 150, 111943, ISSN 0023-6438.
- Wood J.D, Richardson R.I, Nute G.R, Fisher A.V, Campo M.M, Kasapidou E, Sheard P.R, M Enser, (2004), Effects of fatty acids on meat quality: a review, *Meat Science*, Volume 66, Issue 1, Pages 21-32, ISSN 0309-1740.
- Yan Dai, Yi Lu, Wei Wu, Xiao-ming Lu, Zhao-peng Han, Yi Liu, Xing-min Li, Rui-tong Dai, (2014), Changes in oxidation, color and texture deteriorations during refrigerated storage of ohmically and water bath-cooked pork meat, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 26, Pages 341-346, ISSN 1466-8564.

## 7.1. Sitografia

- Analisi della texture dei generi alimentari | ZwickRoell
- Estrazione solido liquido | Naviglio Estrattore per l'estrazione solido-liquido | Nuova Estrazione Napoli Campania Italia
- Helix: 1 CO2 Separator - Supercritical Fluids from Applied Separations
- Microsoft PowerPoint - Alimenti Funzionali FAR.ppt (unife.it) Aspetti normativi del functional food, Unife, (2013).
- Texture Analysis per studiare le proprietà fisiche dei prodotti alimentari (elis.it)
- Estrazione ad ultrasuoni, Franco Mengoli:  
[https://www.google.it/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwi0iezcny39AhXES\\_EDHWdnBaUQFnoECCIQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.chimicifisiciinterprover.it%2Fwp-content%2Fplugins%2Fdownload-attachments%2Fincludes%2Fdownload.php%3Fid%3D1812&usg=AOvVaw1tOj2BCiPf9eTkxWJPW5UW](https://www.google.it/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwi0iezcny39AhXES_EDHWdnBaUQFnoECCIQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.chimicifisiciinterprover.it%2Fwp-content%2Fplugins%2Fdownload-attachments%2Fincludes%2Fdownload.php%3Fid%3D1812&usg=AOvVaw1tOj2BCiPf9eTkxWJPW5UW)