



Relazione finale borsa di studio dal titolo “*Valorizzazione della sansa attraverso il suo uso a fini Mangimistici*”.

Borsa di Studio finanziata con fondi PSR Calabria 2014/2020. Misura 16 - Intervento 16.02.01 “Sviluppo di nuovi prodotti, pratiche, processi e tecnologie nel settore agroalimentare e forestale” – annualità 2017 (CUP progetto: J52C22000580005).

Periodo di svolgimento dall’01/02/2023 al 31/12/2023

Durata prevista da bando: 12 mesi – Durata effettiva: 11 mesi *

Titolare Borsa di Studio: Dott.ssa Caterina Cilione

Responsabile Scientifico: Prof. Pasquale Caparra

Dipartimento di AGRARIA, Università *Mediterranea* di Reggio Calabria

Settore Scientifico Disciplinare: AGR/18 (Nutrizione e Alimentazione Animale)

La presente relazione è composta di n. 29 pagine numerate da 1 a 29

* La titolare della borsa di studio ha rinunciato all’ultimo mese in quanto vincitrice di un concorso per l’attribuzione di un assegno di ricerca (vedasi, in allegato alla presente relazione, dichiarazione di rinuncia ultimo mese borsa di studio).



INDICE

- 1. INTRODUZIONE**
- 2. OBIETTIVO BORSA DI STUDIO**
- 3. ATTIVITÀ SVOLTE**
- 4. VERIFICHE IN ITINERE E VALUTAZIONE FINALE**

INTRODUZIONE

La coltivazione dell'olivo ha sempre avuto una notevole importanza economica e sociale nei Paesi del Bacino del Mediterraneo: la maggior parte della produzione mondiale di olive, stimata intorno ai 10 milioni di tonnellate – di cui 9 milioni utilizzati per l'estrazione dell'olio di oliva – è localizzata in Spagna, Italia e Grecia. L'Italia è il secondo produttore europeo di olio di oliva con una produzione nazionale media di oltre 6 milioni di quintali. Circa il 90% della produzione di olio si registra nel Sud Italia, tra Puglia, Calabria e Sicilia (Istat 2009). Tuttavia, in questo scenario idilliaco, il trattamento dei sottoprodotti dell'industria olearia occupa un ruolo di primissimo piano fra le difficoltà da dovere fronteggiare. Tra i diversi “scarti” prodotti il costo dello smaltimento della sansa si aggira intorno ai 70 euro/ton. La sansa vergine d'oliva rappresenta il residuo del processo meccanico di estrazione dell'olio dalle olive; è composta dalla polpa d'oliva, dalle buccette, da una piccola quantità di olio d'oliva, dai frammenti di nocciolino e da un certo livello di umidità, che può variare dal 35 al 70%, in base al sistema estrattivo utilizzato. Il valore della sansa vergine d'oliva dipende, oltre che dal tenore d'umidità, dal contenuto in polifenoli e acido oleico (Chiofalo et al., 2002)¹ importanti nell'alimentazione animale per i loro benefici effetti correlati alla salute.

Nella sansa di oliva residua una quantità significativa di sostanze ad azione antiossidante come caroteni, antociani, tocoferoli e polifenoli aventi capacità antiossidante. Durante il processo di estrazione dell'olio, si attivano le β -glicosilasi endogene che determinano l'idrolisi dell'oleuropeina nella forma agliconica 3,4-DHPEA-EDA (decarbossimetiloleuropeina aglicone), che è poi ulteriormente idrolizzato a idrossitirosolo (3,4-DHPEA) per azione di una esterasi. In maniera analoga, il decarbossimetil ligstroside aglicone (p-HPEA-EDA) ed il tirosolo (p-HPEA) derivano dall'idrolisi del ligstroside, un altro secoiroide della famiglia delle Oleaceae. Questi polifenoli mostrano una potente azione antiossidante che si esplica anche in sinergia con l' α -tocoferolo magnificandone l'effetto.

I polifenoli si comportano da antiossidanti poiché presentano nella molecola insaturazioni e gruppi idrossilici in grado di donare elettroni e protoni alle molecole radicaliche, che vengono così neutralizzate, producendo effetti antiossidanti (Dugo et al., 2003)², antimutageni e anticarcinogeni. Nella sansa di oliva residua anche una discreta quantità di olio (circa il 10%) con un'ottima composizione in acidi grassi; inserendola nella razione degli animali si riesce a migliorare la qualità nutrizionale del grasso intramuscolare della carne.

L'utilizzo della sansa vergine di olive nell'alimentazione degli animali in produzione zootecnica potrebbe quindi rappresentare più di un aspetto positivo. Gli acidi grassi nella carne, così come in

altri alimenti, si dividono in acidi grassi saturi ed acidi grassi insaturi. Tra questi hanno un elevato valore nutraceutico gli acidi grassi polinsaturi: linoleico (precursore degli omega 6), linolenico (precursore degli omega 3) e gli acidi linoleici coniugati (CLA), una categoria di acidi grassi rappresentata soprattutto dall'acido rumenico, così chiamato perché sintetizzato principalmente nel ruminante dell'animale.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato che, affinché nell'organismo non si creino condizioni di sbilanciamento tra i diversi eicosanoidi, negli alimenti la quantità di omega 6 non debba superare 4 volte la quantità degli omega 3, cioè è raccomandato un basso rapporto omega6/omega3. Gli acidi omega 3 sono inoltre relazionati ad un abbassamento del rischio di contrarre malattie cardiovascolari, così come anche l'acido rumenico. È possibile intervenire sulla composizione degli acidi grassi presenti nei lipidi della carne agendo sulla composizione della dieta degli animali. Di conseguenza negli ultimi anni si è sviluppato un grande interesse scientifico nei riguardi di studi rivolti al miglioramento di questo rapporto nella carne.

Il progetto “Valorizzazione della sansa attraverso il suo uso ai fini “Mangimistici” si inserisce in un contesto ben più ampio di economia circolare, un nuovo approccio alla produzione di beni che mira a recuperare un sottoprodotto delle lavorazioni industriali per generare nuove materie prime con potenziale nutraceutico da utilizzare nell'alimentazione del bovino Podolico, una razza autoctona particolarmente rustica, capace di utilizzare risorse alimentari povere e di fornire una produzione di carne di qualità. Un approccio sostenibile che avrà un peso sempre maggiore nelle politiche Ue, anche in vista dell'applicazione della strategia From farm to fork.

OBIETTIVO BORSA DI STUDIO

Il progetto “Valorizzazione della sansa attraverso il suo uso a fini Mangimistici” si è posto come obiettivo quello di verificare l'effetto dell'impiego della sansa vergine di olive disidratata e denocciolata in combinazione o meno con i semi di lino estrusi sulle performance in vivo e alla macellazione e sulle caratteristiche qualitative della carne di vitelli podolici, con particolare riferimento al processo di ossidazione, alla composizione acidica e alle caratteristiche sensoriali.

Dopo una prima attività preliminare di ricerca bibliografica, formulazione dei mangimi sperimentali integrati con sansa di olive e messa a punto dei metodi per l'analisi degli alimenti zootecnici e della carne, si è passati alla fase operativa che ha riguardato le attività di seguito riportate.

ATTIVITÀ SVOLTE

Le attività previste dalla borsa di studio sono state svolte presso lo stabilimento di macellazione e lavorazione industriale di carni MONTAGNA S.P.A., contrada Toscano Ioele, Corigliano Rossano (CS) dove sono state effettuate le operazioni di macellazione e sezionamento e presso il Laboratorio di Zootecnica e Produzioni Animali di Qualità - Dipartimento di Agraria, Lotto D, livello -1, via dell'Università n. 25, 89124 Reggio Calabria, dove sono state effettuate le analisi per valutare gli effetti delle diverse diete sulle caratteristiche quanti-qualitative della carne.

Le attività presso lo stabilimento di macellazione e lavorazione industriale di carni MONTAGNA S.P.A. hanno interessato le seguenti misurazioni e valutazioni:

1. Peso delle carcasse sia a caldo che dopo 24 ore di refrigerazione a 3 °C, al fine di valutare il calo frigo;
2. pH della carcassa ad 1 e 24 ore post-mortem utilizzando un pHmetro portatile (Hanna, HI 99163) dotato di un elettrodo penetrante e inserito nel muscolo longissimus thoracis tra la 7a e l'8a vertebra toracica della mezzena destra;
3. Colore del grasso sottocutaneo come coordinate CIELAB L*, a* e b* (CIE, 1986) con fotometro a riflettanza tristimolo Minolta CR200 (illuminante D65);
4. Conformazione e stato di ingrassamento delle carcasse secondo le modalità previste dal Regolamento del Consiglio 1183/2006/CE;



Valutazione SEUROP delle Carcasse e misurazione colore del grasso di copertura

Dopo aver effettuato le suddette misurazioni e valutazioni, da ogni mezzena destra, a 48 ore dalla macellazione, è stato prelevato il muscolo *Longissimus Dorsi* (LD), frazione compresa tra la 6a vertebra toracica e la 6a vertebra lombare, che è stato utilizzato per la determinazione delle caratteristiche strumentali.



Campioni di muscolo *longissimus dorsi* utilizzati per le analisi strumentali

Portati in laboratorio i campioni di muscolo *Longissimus Dorsi* (LD) sono stati suddivisi in sub campioni per la determinazione dei macro e micro costituenti, a partire dalla parte craniale del muscolo. Quattro fette di campione fresco sono state porzionate per la determinazione del colore e TBARs sia dei campioni conservati in pellicola permeabile all'ossigeno (PVC), prelevati dopo 48 ore di refrigerazione, che dei campioni conservati in atmosfera protettiva (MAP) prelevati dopo 7 giorni di frollatura.



Muscolo *longissimus dorsi* durante la fase di suddivisione in sotto campioni

Allo scopo di evidenziare la progressione dei fenomeni ossidativi, quindi la shelf-life della carne ed i conseguenti cambiamenti a livello chimico e nutrizionale, sono state effettuate le analisi colorimetriche e la stabilità ossidativa (TBARS) (Siu & Draeper, 1978) a diversi tempi di conservazione: 0 giorni (T0), 3 giorni (T3), 6 giorni (T6) e 10 giorni (T10). Ciascun sotto campione è stato preparato secondo il medesimo protocollo, in particolare, la porzione di carne è stata tagliata in quattro fette dallo spessore di 2 cm, avvolte con pellicola trasparente permeabile all'ossigeno, disposte in frigo alla temperatura di 4°C nelle vaschette in alluminio per alimenti, preventivamente numerate con l'identificativo del campione e la sigla del periodo di trattamento. I campioni del T0 sono stati immediatamente analizzati dopo due ore di blooming, mentre le altre vaschette (T3, T6, T10) sono state collocate su 4 diversi ripiani del frigorifero.



Fettine di muscolo L. Dorsi poste in frigo per la determinazione della shelf life

La restante parte del muscolo è stato porzionato e congelato alla temperatura di -22 °C in attesa delle successive analisi per la determinazione degli esteri metilici degli acidi grassi, calo cottura e centesimali.

Analisi chimiche dei micro costituenti del muscolo *Longissimus Dorsi* (LD):

- Determinazione degli acidi grassi del muscolo *Longissimus Dorsi* (LD) (Folch et al., 1956)
- Determinazione degli acidi grassi della sansa e dei mangimi (Gray et al 1967)
- Determinazione colore CIE, 1986
- Determinazione polifenoli
- Determinazione saggio FRAP (Benzie, I.F.F. e Strain, J.J. (1996)
- Determinazione saggio TEAC (R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans 1999).

Analisi chimiche (AOAC, 1995) dei macro costituenti del muscolo *Longissimus Dorsi* (LD):

- Lipidi grezzi;
- Protidi grezzi;
- Ceneri;
- Umidità;
- Calo cottura.

Determinazione Esteri Metilici Acidi Grassi (FAME)

I componenti principali della frazione lipidica di origine animale sono gli acidi grassi che differiscono tra loro per lunghezza di catena (che varia da 4 a 26 atomi di carbonio), grado di insaturazione (monoinsaturi, polinsaturi, coniugati etc.) nonché per isomeria geometrica (cis, trans). La molecola degli acidi grassi è costituita da una catena idrocarburica alifatica con un gruppo carbossilico (-COOH) terminale. In presenza di soli legami singoli le molecole prendono il nome di acidi grassi saturi (Saturated Fatty Acid, SFA), mentre se nella catena è presente almeno un doppio legame si parla di acidi grassi insaturi (Unsaturated Fatty Acid, UFA) e, in particolare, di acidi grassi monoinsaturi (Monounsaturated Fatty Acids, MUFA) e acidi grassi polinsaturi (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA) quando i doppi legami sono uno o in numero superiore. A ciascuna molecola è attribuito un nome secondo le norme della IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry); inoltre, nella letteratura scientifica sono estremamente frequenti le notazioni abbreviate del tipo C_n:_m, in cui *n* è il numero di atomi di C della catena alifatica e *m* è il numero di doppi legami.

Per poter identificare il maggior numero di Esteri Metilici Acidi Grassi (FAME), sia degli alimenti somministrati che dei campioni di muscolo ho utilizzato una tecnica analitica complessa quale la gascromatografia (GC). Per la caratterizzazione della frazione lipidica, ho adottato la metodica a freddo Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. (1957)³ la quale ha comportato diversi passaggi: l'estrazione del grasso dalla matrice, la trans-esterificazione degli acidi grassi nei corrispondenti metilesteri (FAME), la separazione degli acidi grassi, la loro identificazione e quantificazione.

Estrazione Acidi grassi

Il campione di carne di circa 200 grammi è stato tritato per renderlo più omogeneo possibile,



Campione di muscolo longissimus dorsi tritato

successivamente sono stati pesati 10 g di carne ed inseriti all'interno di beute da 500 ml a cui sono stati aggiunti 150 ml di soluzione cloroformio:metanolo 2:1 (v/v). Si è quindi proceduto ad omogenizzare, in un bagno di ghiaccio, i campioni per 2 minuti mediante Ultraturrax (Fig. 7).



Omogeneizzazione in bagno di ghiaccio del campione con Ultraturrax

Subito dopo, sono stati aggiunti 100 ml di cloroformio, quindi è stata ripetuta la fase di omogeneizzazione per altri 4 minuti. In seguito i campioni sono stati filtrati e trasferiti in imbuti separatori, nei quali è stata aggiunta una soluzione di cloruro di potassio (0,88% w/v) pari ad 1/5 del volume filtrato e si è attesa la separazione delle due fasi (16 ore).



Imbuti separatori – Prima separazione AG

Ottenuta la prima separazione delle due fasi, è stata raccolta la fase inferiore in un cilindro graduato, è stata aggiunta una quantità di acqua e metanolo rapporto (1:1) pari ad $\frac{1}{4}$ del volume filtrato, trasferita nell'imbutto separatore (Fig. 9) ed atteso due ore per la seconda separazione delle due fasi. La fase organica sottostante, contenente gli acidi grassi, è stata portata a secco alla temperatura di 38°C mediante evaporatore rotante, trasferita nel palloncino da 25 mL per essere trans-esterificata.



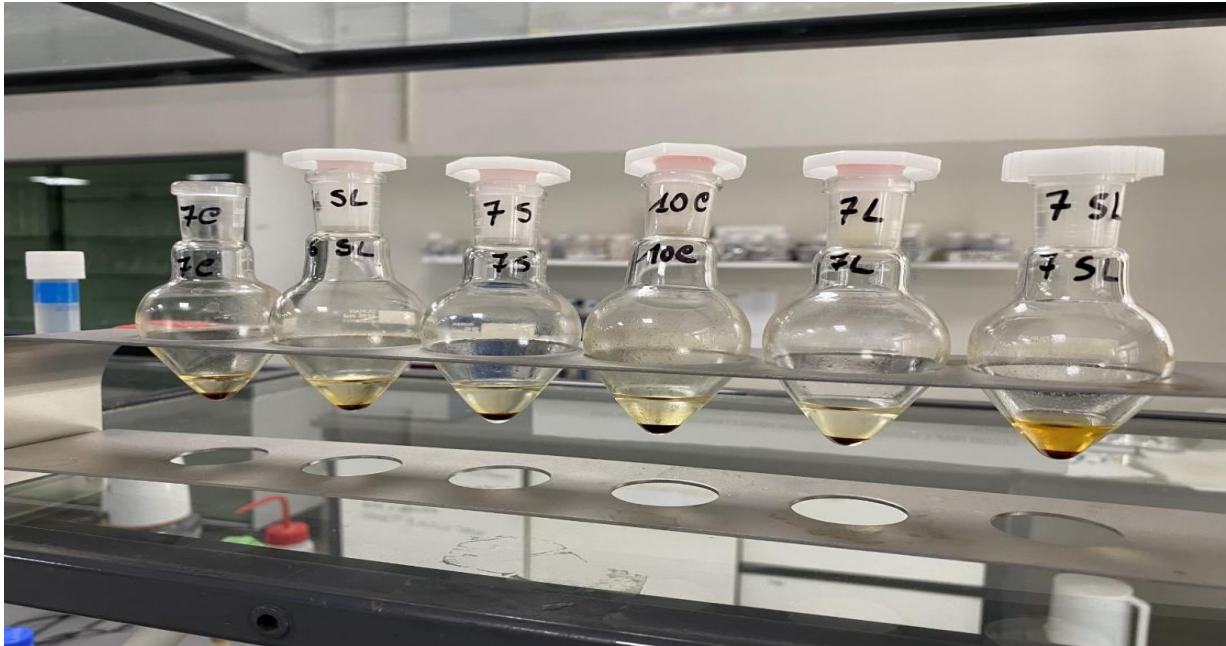
Seconda separazione AG



Campione portato a secco con evaporatore rotante

Trans-esterificazione degli acidi grassi nei corrispondenti metilesteri (FAME)

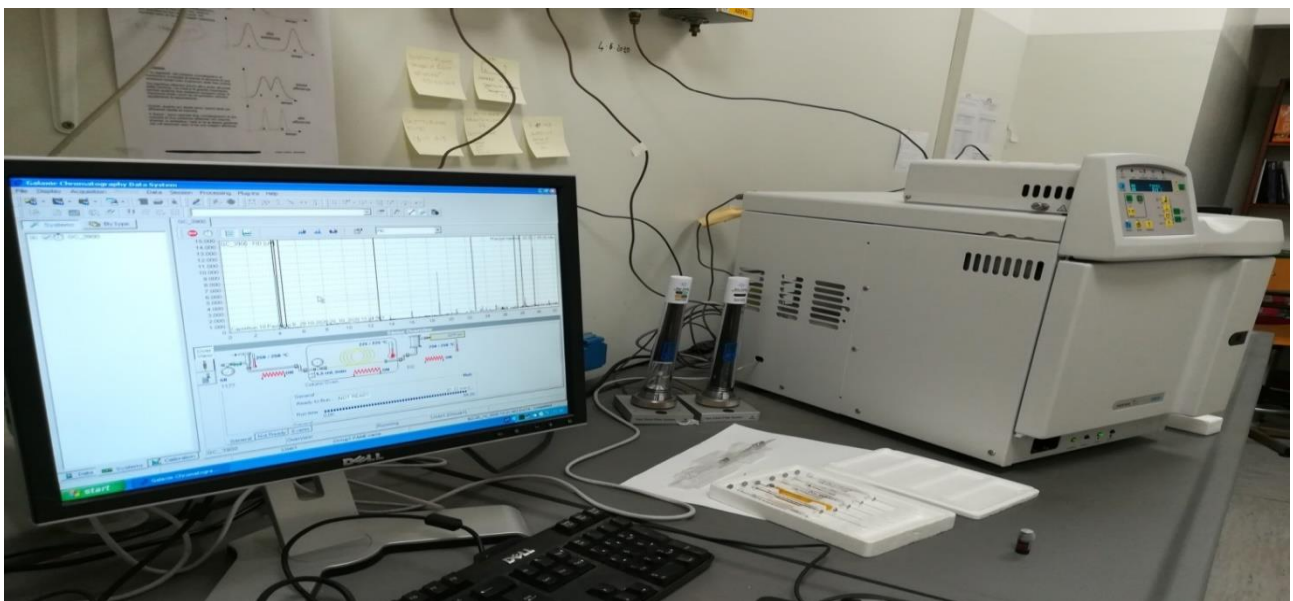
L'estratto lipidico è stato poi trans-esterificato aggiungendo 1 ml di esano e 0,05 ml di KOH metanologico 2 N (IUPAC, 1987), contenente come Standard Interno (SI) l'estere metilico dell'acido nonanoico (C9) alla concentrazione di 0.25 mg/ml.



Metilazione campioni di muscolo Longissimus Dorsi

Identificazione e quantificazione degli esteri metilici degli acidi grassi (FAME): Analisi gascromatografica

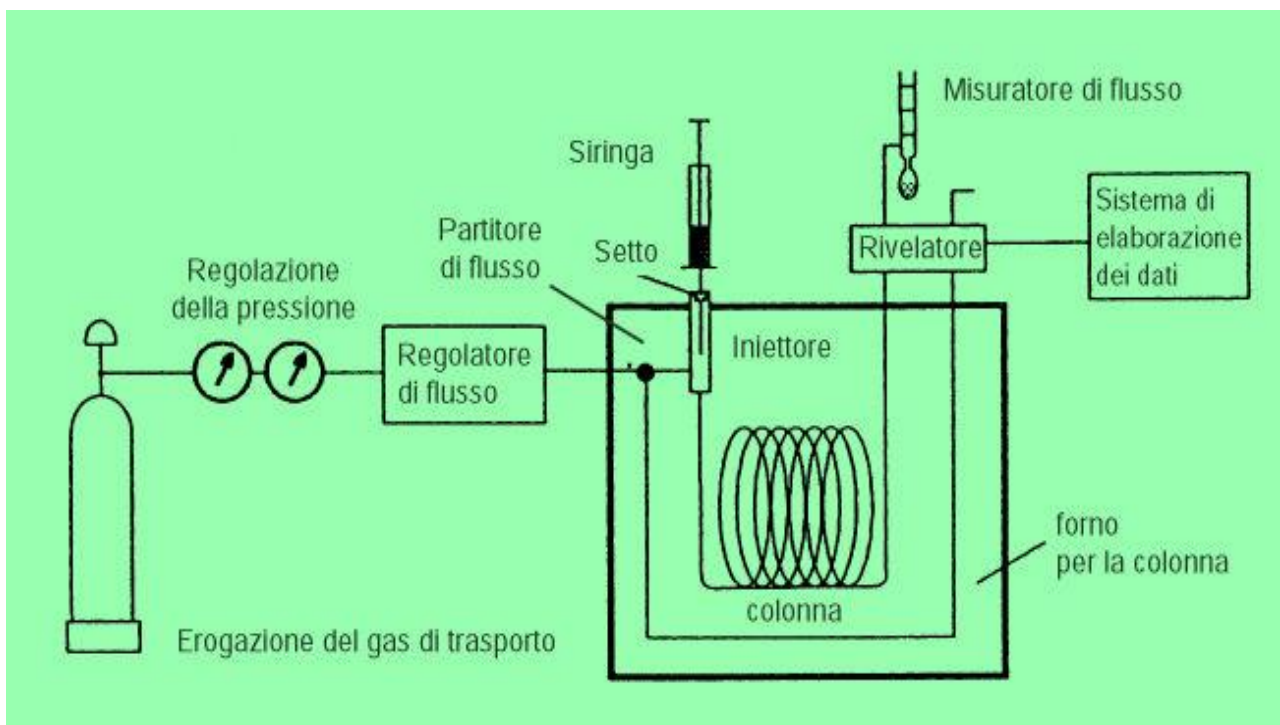
Gli esteri metilici degli acidi grassi, ottenuti come sopra riportato, sono stati quindi iniettati nel gascromatografo Varian 3900 dotato di rilevatore ad ionizzazione di fiamma (FID) e di una colonna capillare, altamente polare, dalle seguenti caratteristiche: Varian CP- SIL 88 dalla lunghezza di 100m, diametro interno pari a 0,25 mm e spessore di 0,20 mm (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA).



Gas cromatografo Varian 3900, Galaxie Chromatography Data System, AOAC Official Method 996.06

Il Gas cromatografo fornisce un cromatogramma per ogni campione, in cui la quantità di sostanza eluita è diagrammata in funzione del tempo che la sostanza ha impiegato per attraversare la colonna. La separazione dei metilesteri avviene in base al numero di atomi di carbonio della catena e, a parità di lunghezza della catena, in base al grado di insaturazione. Inoltre il tempo di ritenzione (RT) aumenta in funzione del numero dei doppi legami, con una discriminazione determinata dalla posizione dei doppi legami (gli acidi grassi insaturi sono tanto più trattenuti quanto più il doppio legame si allontana dal metile terminale della catena alifatica) e dalla loro configurazione (si osservano tempi di ritenzione maggiori per gli isomeri in configurazione *cis* rispetto a quelli con configurazione *trans*). I singoli acidi grassi sono stati identificati confrontandoli con i tempi di ritenzione della miscela nota di acidi grassi standard (FAME mix 37 componenti da Supelco Inc., Bellefont, PA). L'analisi quantitativa è stata eseguita con il metodo dello standard interno per confronto con la curva di calibrazione precedentemente costruita utilizzando un software specifico, gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) sono stati espressi come mg/100 g di muscolo.

Il gascromatografo è costituito essenzialmente da quattro parti: la sorgente del gas di trasporto (elio), la zona d'iniezione e vaporizzazione della miscela in esame, la colonna cromatografica (contenuta in una camera termostata) ed il rivelatore (detector), FID (Flame Ionization Detector), collegato ad un sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati (computer).



Schema del gascromatografo

Determinazioni analitiche delle caratteristiche fisiche della carne miranti alla definizione delle caratteristiche qualitative della carne.

Sui 36 campioni di muscolo longissimus dorsi sono state effettuate le seguenti determinazioni analitiche: **Colore**, mediante colorimetro Minolta CR 300 su fetta di carne tagliata e lasciata ossigenare per 1 ora a 4°C (Illuminante D65), rilevando le coordinate colorimetriche L* (luminosità), a* (indice del rosso), b* (indice del giallo), C* (croma), H* (tinta); **tenerezza**, misurata su carne cruda e su carne cotta, utilizzando cesoia Warner Bratzler; **calo cottura**, espresso come perdita di peso percentuale di un campione di carne di peso noto sottoposto a cottura in bagno termostato alla temperatura di 75°C per 50 minuti fino al raggiungimento della temperatura interna di 75°C.

Misurazione del colore del musolo L. Dorsi

Il colore della carne bovina fresca risulta una delle caratteristiche qualitative particolarmente importante nella decisione d'acquisto dei consumatori in quanto lo utilizzano come indicatore di freschezza e salubrità (Mancini & Hunt, 2005). L'aspetto della carne è un argomento complesso che coinvolge la genetica animale, le condizioni ante e post mortem, la chimica muscolare e molti fattori legati alla lavorazione, confezionamento, distribuzione, conservazione, esposizione e preparazione finale della carne per il consumo.

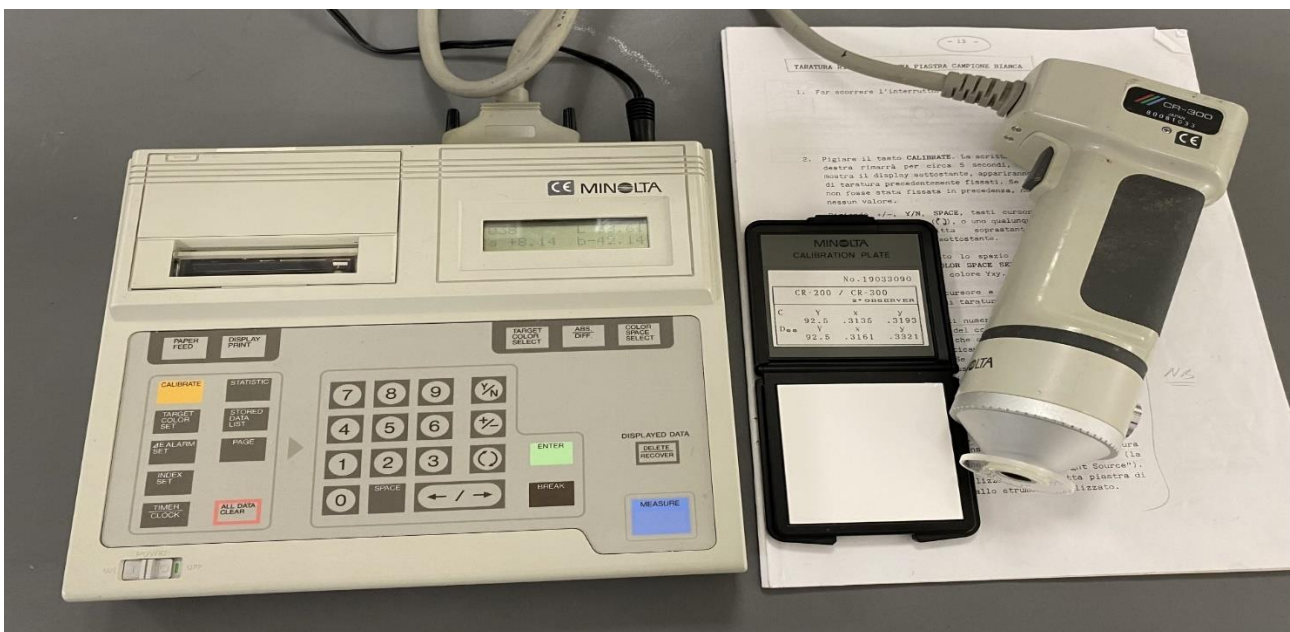
Il colore della carne cruda deriva da una proteina di colore rosso porpora presente nel muscolo chiamata mioglobina, questa è formata da un nucleo di ematina, comprendente 4 anelli pirrolici legati ad un atomo di ferro bivalente centrale, e da una globina. Probabilmente la sua funzione è quella di immagazzinare ossigeno e cederlo nella fase di contrazione muscolare. Quindi il ferro contenuto nel gruppo eme è in grado di reagire con l'ossigeno generando in questo modo le diverse colorazioni che possono essere apprezzate nella carne. In presenza di ossigeno il ferro passa in tempi brevi alla forma ferrosa trasformandosi in ossimioglobina (MbO₂), di colore rosso-vivo, e più lentamente nella forma trivalente ossidata, denominata metamioglobina (MMb⁺) di colore bruno.

Quindi la sua misurazione del colore è di fondamentale importanza. Le metodologie prevedono che il colore venga valutato 24-48 ore dopo la macellazione o nei giorni successivi per evidenziare eventuali alterazioni del colore durante la conservazione. Il colore viene valutato dopo aver esposto la superficie di taglio della carne all'aria per almeno 1 ora affinché si verifichi il blooming, ossia la formazione di ossimioglobina sulla superficie.

Per determinare la durata di conservazione della carne conservata in frigo alla temperatura di 4°C, su ogni campione oggetto d'analisi è stata eseguita la determinazione oggettiva del colore, mediante un colorimetro a riflettanza MINOLTA Chroma Meter, modello CR-300, provvisto di una testa di misura con un'apertura di 8 mm di diametro, illuminante D65. I risultati, su 3 repliche di ogni campione, sono stati espressi in coordinate colorimetriche:

- Luminosità (L^*): espressa su una scala che va dal nero (0) al bianco (100),
- Indice del rosso (a^*): con campo di variabilità fra il rosso (0 / +50) e il verde (0 / -50),
- Indice del giallo (b^*): con campo di variabilità fra il giallo (0 / +50) e il blu (0 / -50).

I due indici di a^* e b^* permettono inoltre di definire altri due parametri di più facile e immediata comprensione, il Cromo o intensità di colore o indice di saturazione, che indica la percentuale di colore puro presente, ossia la forza con cui un colore si stacca dal colore neutro (per Cromo pari a 0 si ha il colore grigio) e la Tinta o rapporto tra la componente rossa e quella gialla, che indica, con una misura angolare, la tonalità del colore (per Tinta pari a 0 si ha il colore porpora).



Colorimetro Minolta CR300

Il colorimetro emette un flash di luce standard per intensità e composizione e stima quindi il fascio di luce riflessa dalla superficie da valutare per le caratteristiche colorimetriche. Questa luce costituisce la parte dello stimolo luminoso, emesso dal colorimetro, che non viene assorbita dalla superficie, ed è quella poi percepita dal nostro occhio. L'indagine colorimetrica utilizza il sistema CIELAB cioè un sistema colorimetrico pubblicato nel 1976 dalla CIE (Commission International

d'Éclairage) basato sul modello psicometrico, utilizzato per la descrizione numerica della percezione cromatica dell'occhio umano.

La misurazione del colore è stata effettuata al tempo zero dopo due ore di blooming sui campioni di carne conservati in frigorifero a 4°C. La suddetta analisi è stata ripetuta dopo 3, 6 e 10 giorni per verificare la shelf-life.

Suscettibilità all'ossidazione lipidica (TBARS) dei campioni di Longissimus Dorsi

I lipidi, date le loro implicazioni sulla salute umana, sono la componente a cui recentemente è stata rivolta la maggiore attenzione, in termini tanto quantitativi quanto qualitativi.

L'ossidazione a carico della componente lipidica è una delle maggiori cause di deterioramento della carne e dei prodotti da essa derivati; tale processo determina una perdita in acidi grassi essenziali, cambiamenti indesiderati di sapore, colore e consistenza, perdita di vitamine liposolubili. Tale analisi è stata effettuata sul prodotto fresco, a diversi tempi di conservazione: al tempo zero (T0), dopo tre giorni (T3), dopo 6 giorni (T6) e dopo 10 giorni (T10), sia sui campioni di muscolo Longissimus Dorsi avvolti in pellicola permeabile all'ossigeno e conservato in frigorifero alla temperatura di 3°C, che sui campioni di muscolo conservato in atmosfera protettiva (MAP: 20% Ossigeno, 50% anidride carbonica e 30% Azoto).

Test dell'acido tiobarbiturico (TBA)

Il dosaggio delle sostanze reattive con l'acido tiobarbiturico (TBARS) è un metodo stabilito per studiare la perossidazione lipidica. Questo saggio sfrutta la spontanea reattività chimica della Malondialdeide (MDA) ($\text{CH}_2(\text{CHO})_2$), che è il principale prodotto della perossidazione lipidica e, viene utilizzato come indicatore di stress ossidativo con l'acido tiobarbiturico (TBA), la cui condensazione origina un addotto facilmente rilevabile spettrofotometricamente, ad una lunghezza d'onda di 532 nm. Dall'assorbanza misurata, è stata così determinata la concentrazione in μM di MDA dei campioni, grazie all'utilizzo di una curva standard con concentrazione nota di MDA.

L'analisi delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS), utilizzate come indice dell'ossidazione lipidica, è stata condotta sui campioni di muscolo Longissimus Dorsi, secondo il metodo descritto da Siu & Draeper, 1978⁵. Cinque grammi di campione sono stati omogeneizzati con l'ultraturax (2 minuti a 13.000 rpm) in 15 ml di acido tricloroacetico (TCA) al 5% (w/v). Dopo aver filtrato l'omogenato mediante carta da filtro (Whatman 42), è stata prelevata un'aliquota di 4 ml a cui sono stati aggiunti 1 ml di acido tiobarbiturico (0,02 M). In seguito, dopo aver lasciato in incubazione la soluzione a 80 °C per 90 minuti, attendendo lo sviluppo della reazione colorimetrica, è stata misurata l'assorbanza a 532 nm. La quantificazione della malonaldeide (MDA) è stata

effettuata inserendo il dato relativo alla lettura in un'equazione di regressione ottenuta con cinque soluzioni standard di MDA ad altrettante diluizioni. Il dato è stato espresso in mg di MDA/kg di carne (tal quale).



Campioni in cuvette dopo la lettura allo spettrofotometro

Determinazione dei polifenoli totali

I polifenoli sono dei composti organici di origine vegetale, noti per le loro capacità antiossidanti, che li vedono ampiamente proposti per la prevenzione di malattie cardiovascolari e malattie croniche, come il cancro e patologie neurodegenerative. Nella letteratura scientifica sono riportati numerosissimi studi che attribuiscono a tali composti organici, una volta ingeriti dall'uomo, diverse attività nel miglioramento dello stato di salute, come riduzione dello stress ossidativo e dell'infiammazione.

Separazione, Identificazione ed Analisi dei Polifenoli totali

Anche se i polifenoli condividono la stessa struttura fenolica di base, possedendo uno scheletro carbonioso e sostituenti differenti, mostrano diverse proprietà fisico-chimiche. Prima di effettuare il processo di estrazione è necessario preparare i campioni in maniera adeguata, conservandoli e trasportandoli con attenzione per minimizzare l'ossidazione dei composti d'interesse. Per impedire

l'ossidazione e la degradazione dei polifenoli i campioni non devono essere esposti alla luce, alle temperature elevate e alla presenza di ossigeno. Devono inoltre essere essiccati a bassa temperatura o congelati prima dell'estrazione per evitare l'azione delle polifenol-ossidasi. Sulla sansa vergine denocciolata e sui quattro campioni di mangimi ho effettuato le analisi dei polifenoli totali mediante l'estrazione e la lettura allo spettrofotometro. La metodica prevede una prima fase di estrazione: si pesa 0,5 g di campione in una falcon da 15 ml, si aggiunge 10 ml di diethyl ether (contenente 1% di acido acetico), si agita energicamente tramite vortex per 30 secondi e si trasferisce quindi nel bagno ad ultrasuoni per 15 secondi a 4°C, infine si centrifuga a 2500 giri per 15 minuti in centrifuga refrigerata a 4°C.



Bagno ultrasuoni



Centrifuga refrigerata

L'analisi è stata effettuata introducendo 100 microlitri di estratto in falcon da 15 ml ed aggiungendo 900 microlitri di acqua bidistillata, 500 microlitri di reattivo di Folin-Ciocalteu e 2,5 ml di soluzione di Na_2CO_3 al 20%. Dopo 30 minuti di incubazione ho effettuato la lettura spettrofotometrica a 765 nm (SPECTROFOTOMETRO SHIMADZU UV-1800).



Spettrofotometro

L'assorbanza è proporzionale alla concentrazione dei composti fenolici presenti nel campione. Per il calcolo del contenuto in fenoli totali, è stata necessaria la determinazione di una curva di taratura ottenuta da concentrazioni note di acido gallico (0-600 µg). L'equazione della curva è la seguente:

$$y = 0,01146 x - 0,01515$$

dove: y = assorbanza a 760 nm e x = µg di acido gallico

Calibrazione: Per quantificare la quantità di composti fenolici nel campione, è stata utilizzata una curva di calibrazione. Sono state preparate soluzioni standard di un composto fenolico di riferimento (acido gallico) in diverse concentrazioni conosciute. Queste soluzioni standard sono state sottoposte allo stesso trattamento del campione ed è stata misurata la loro assorbanza. Successivamente, è stata costruita la curva di calibrazione tracciando l'assorbanza rispetto alla concentrazione delle soluzioni standard.

Calcolo dei risultati: La concentrazione di composti fenolici nel campione è stata calcolata interpolando i dati di assorbanza sulla curva di calibrazione.

Il principio di questa metodica si basa sul fatto che il reagente di Folin Ciocalteu è formato da due complessi acidi fosfomolibdeno/fosfotungsteno. I composti fenolici in ambiente basico vengono ossidati dai metalli molibdeno e tungsteno presenti nei complessi, ed assumono la colorazione blu dovuta alla riduzione dei metalli. I valori finali della determinazione sono stati espressi in mg di acido Tannico/gr sostanza secca.

Determinazione saggio FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power Assay) Benzie, I.F.F. e Strain, J.J. (1996).

Il metodo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)⁶, è un metodo colorimetrico basato sulla capacità di vari antiossidanti di ridurre il complesso ferrico tripiridil-triazina (Fe+3-TPTZ) alla forma ferrosa colorata (Fe+2-TPTZ), a bassi valori di pH (Benzie and Strain, 1996), sviluppando una intensa colorazione blu. La reazione viene monitorata misurando spettrofotometricamente il cambiamento di assorbanza a 593nm, direttamente correlata alla forza di riduzione degli antiossidanti presenti nella reazione. Il reagente FRAP è preparato al momento mischiando tampone acetato (300mM acetato di sodio, pH 3.6), 2,4,6- tris(2-piridil) -S-triazina (10mM in 40mM di acido cloridrico) e FeCl₃*6H₂O (20mM) in rapporto 10:1:1 (v/v/v), rispettivamente. Il reagente FRAP è stato scaldato a 37°C a bagnomaria per 10 minuti. Al volume di 10µl di campione (diluito 10 volte) sono stati aggiunti 190 µl di reagente FRAP. Al bianco, è stata aggiunta la stessa quantità di FRAP con 10 µl di etanolo 100%. L'assorbanza è stata misurata dopo 6 minuti di incubazione a temperatura ambiente alla lunghezza d'onda di 593nm in microcuvette. Composti antiossidanti come α-tocoferolo, trolox,

vitamina C, acido urico, bilirubina, ecc. sono in grado di ridurre FeIII a FeII. Pertanto, la reazione tra il complesso TPTZ-FeIII e l'estratto muscolare comporterà la riduzione del complesso TPTZ-FeIII a complesso TPTZ-FeII operata da eventuali antiossidanti presenti nel campione. La produzione di ferroso-TPTZ produrrà un aumento dell'assorbanza a 593nm direttamente proporzionale alla concentrazione di antiossidanti nel campione. Ogni campione è stato ripetuto in triplicato. Il metodo FRAP permette di ottenere una stima globale dell'attività antiossidante dei polifenoli nei campioni di carne.

Determinazione saggio TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay)

La capacità antiossidante è stata valutata come attività di scavenging in vitro nei confronti del radicale monocationico 2,2'-azinobis-(acido 3- etilbenzotiazoline-6-sulfonico) (ABTS*) secondo il metodo spettrofotometrico riportato in Re et al. (1999)⁷. Il metodo si basa sul rilevamento spettrofotometrico della riduzione del radicale monocationico ABTS*, generato per ossidazione dell'ABTS per azione del persolfato di potassio ($K_2S_2O_8$) e avente un'assorbanza (Abs) stabile alla lunghezza d'onda di 734 nm. La soluzione ABTS* radicalica è stata preparata il giorno precedente usando ABTS 7mM e persolfato di potassio 2.45mM in tampone fosfato (5mM di Na_2HPO_4 , pH 7.4) e lasciata al buio a temperatura ambiente per 12-16h. Durante questa incubazione, il persolfato di potassio ossida l'ABTS a radicale ABTS*, un cromoforo responsabile della colorazione blu-verde della soluzione. La soluzione radicalica è diluita in tampone sodio-fosfato 5mM a pH 7.4 in rapporto ABTS: Tampone (1:50, v/v) in modo da ottenere un valore di Abs iniziale di 0.70 ± 0.05 a 734nm. 10 μ l di tutti i campioni (diluiti 30 volte), in triplicato. Tutti i valori di Abs sono stati registrati dopo 20 minuti alla lunghezza d'onda di 734nm. La retta di taratura è stata costruita utilizzando il Trolox (50-700 μ M). I risultati sono espressi come mmol eq. Trolox / kg di campione. Tutte le analisi sono state condotte in triplicato.



Saggio FRAP e TEAC

Determinazione del contenuto in lipidi grezzi (EE)

Il campione, costituito da 5g di carne tritata di bovina, è stato trasferito nel ditale per Soxhlet chiuso con del cotone ed essiccato in stufa a 102 °C per 24 ore. Successivamente è stato posto nell'estrattore collegato al pallone opportunamente tarato, è stato aggiunto etere di petrolio, montato il refrigerante sopra l'estrattore e posto sulla piastra riscaldante. L'estrazione è stata condotta per 6 ore, successivamente è stato rimosso il pallone e portato a secco nel rotovapor. In seguito il pallone è stato posto in stufa termostata a 105 °C per 30 minuti fino a peso costante, quindi pesato (PF) per il calcolo della percentuale di estratto etero (EE).



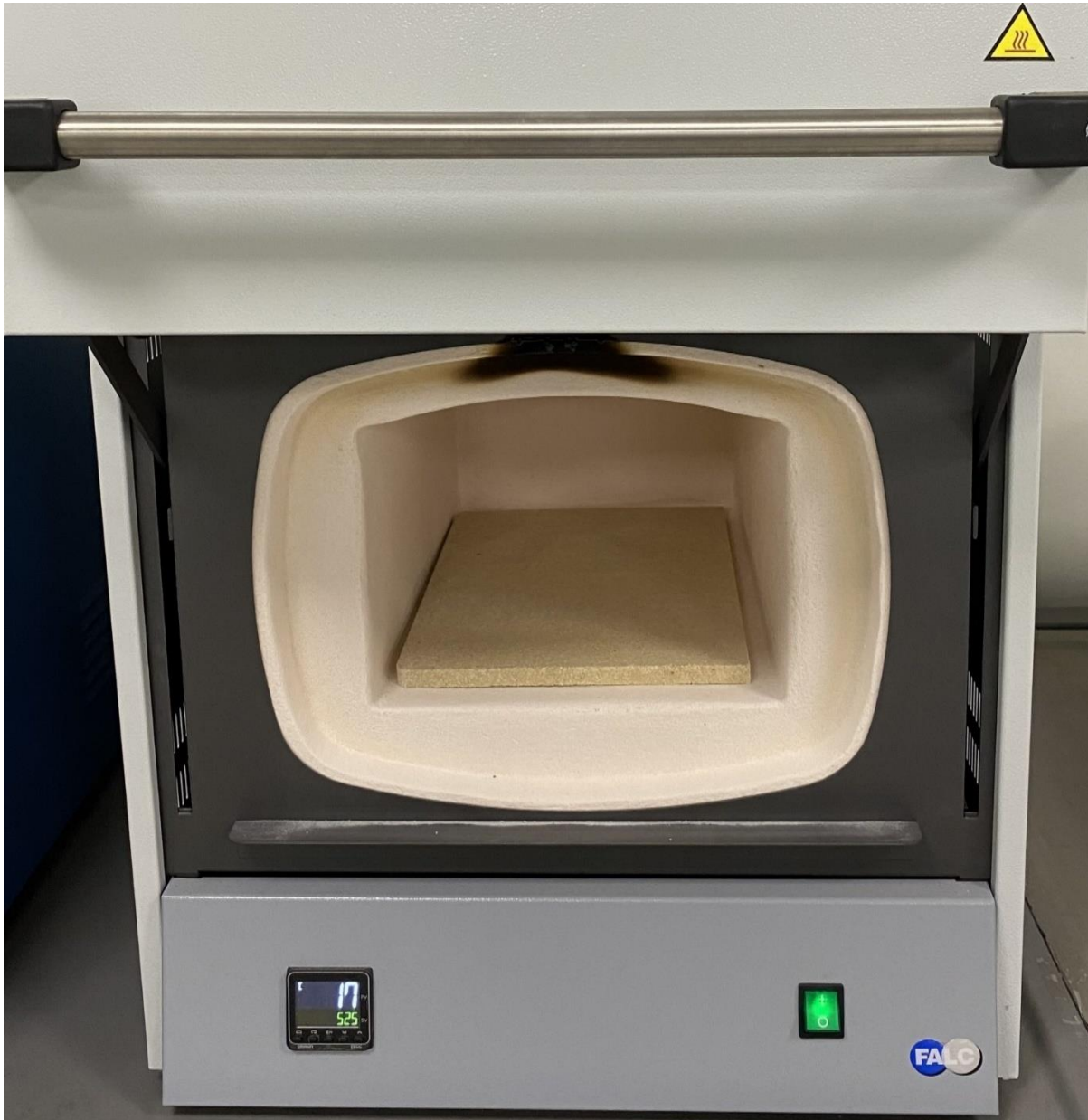
Fig.

Estrattore Soxhlet

$$\% \text{ LIPIDI (EE)} = \frac{\text{PESO FINALE (PF)} - \text{TARA (pallone)}}{\text{Peso campione}} \times 100$$

Determinazione del contenuto in ceneri

La determinazione delle ceneri è stata effettuata su 5 g di campione di carne tritata bovina, posta in un crogiolo precedentemente tarato in muffola a 550°C per circa 10 minuti, raffreddato in essiccatore e pesato. Il campione è stato poi calcinato in muffola (fig.23) a 550 °C sino all'ottenimento di ceneri bianche.



Muffola

Il crogiolo è stato pesato dopo raffreddamento per il calcolo della percentuale delle ceneri:

$$\% \text{ Ceneri} = \frac{\text{PESO FINALE (PF)} - \text{TARA (pallone)}}{\text{Peso campione}} \times 100$$

Determinazione del contenuto in proteine grezze (PG)

Le proteine costituiscono il 23% del tessuto muscolare scheletrico e sono composte da 20 amminoacidi uniti tramite un legame peptidico. Hanno un contenuto totale di azoto di circa il 16% (inclusi i composti azotati non proteici) e tale valore è impiegato per calcolare la percentuale di proteina grezza a partire da quella di azoto ($100/16 = 6,25$) determinabile analiticamente. La valutazione del contenuto proteico è stata eseguita secondo le indicazioni descritte nel metodo Kjeldhal (AOAC, 1995). Tale metodo è il principale per determinare il contenuto di azoto negli alimenti e quindi anche l'azoto proteico della carne. La materia organica è stata completamente mineralizzata (fig. 24) in presenza di un catalizzatore e convertita in ammonio solfato.



Mineralizzatore

In seguito a processo di distillazione (fig. 25), l'azoto presente nel campione è stato quantificato mediante titolazione acido-base (fig. 26) con idrossido di sodio 0,1 N e la quantità di azoto calcolata a partire dalla quantità di ammoniaca liberata.



Distillatore azoto



Titolazione PG

Per convertire infine la quantità di ammoniaca ottenuta in fase di distillazione in percentuale di proteine, il contenuto di azoto è stato moltiplicato per un coefficiente che tiene conto della composizione amminoacidica del campione secondo la formula:

$$G = V \times N \times pe/1000$$

V: ml di NaOH utilizzati nella titolazione

N: normalità dell'NaOH

pe: N contenuto in $\text{NH}_3 = 14$

Determinazione contenuto Umidità

Il tenore in umidità dei campioni è stato determinato ponendo 5 g di carne in stufa per 16 ore, alla temperatura di 105°C. La percentuale di umidità è stata calcolata come differenza di peso tra il campione fresco e dopo essiccamento, ed espresso in percentuale (AOAC, 1995).

Partecipazione ad eventi

In data 12.10.2023, presso l’Aula Magna del Dipartimento di Agraria, ho partecipato al Seminario dal titolo “*La zootecnica e il rilancio delle aree marginali*”.

VERIFICHE IN ITINERE E VALUTAZIONE FINALE

Il responsabile scientifico Prof. Pasquale Caparra ha verificato ed approvato il lavoro svolto durante gli undici mesi di attività di ricerca valutandolo pienamente soddisfacente.

BIBLIOGRAFIA

1. AOAC (1995). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis (16th ed.). Washington, DC: AOAC.
2. Chiofalo, B., Liotta, L., Zumbo, A., and Chiofalo, V. (2004). Administration of olive cake for ewe feeding: effect on milk yield and composition. *Small Rumin. Res.* 55, 169–176. doi: 10.1016/j.smallrumres.2003.12.011
3. Folch, J., Lees, M., & Stanley, G.H.S., (1957). A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

4. Gray et al 19674IUPAC (1987). International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. Pergamon Press, Oxford.
5. I.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay, *Anal. Biochem.* 239 (1996) 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
6. I. Serraino, L. Dugo, P. Dugo, L. Mondello, E. Mazzon, G. Dugo, A.P. Caputi, S. Cuzzocrea, Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure, *Life Sci.* 73 (2003) 1097–1114, [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00356-4](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00356-4).
7. IUPAC (1987). International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. Pergamon Press, Oxford
8. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine.* [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
9. Siu, G.M., & Draper, H.H. (1978). A survey of the malonaldehyde content of retail meats and fish. *Journal of Food Science*, 43, 1147-1149.
10. R.A. Mancini, M.C. Hunt, Current research in meat color, *Meat Sci.* 71 (2005) 100–121, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.03.003>.



Reggio Calabria, lì 15.04.2024

Titolare della Borsa di Studio
Dott.ssa Caterina Cilione