

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE  
CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE**

**METODI ALTERNATIVI ALL'UTILIZZO DI NITRATI E NITRITI COME  
CONSERVANTI**

**Relatore: Prof. Fernando Formaggio**

**Laureanda: Iris Troncon**

**1234911**

**Anno accademico 2022/2023**

# INDICE

<b>Introduzione</b> .....	1
<b>CAPITOLO 1 – Ruolo dei nitrati e nitriti come additivi nella carne</b> .....	3
<b>1.1 Effetto antimicrobico</b> .....	3
<b>1.2 Azione antiossidante</b> .....	5
<b>1.3 Caratteristiche sensoriali</b> .....	6
<b>CAPITOLO 2 – Rischi associati all’utilizzo di nitrati e nitriti</b> .....	8
<b>CAPITOLO 3 – Metodi alternativi all’utilizzo di nitrati e nitriti sintetici</b> .....	10
<b>3.1 Estratti o polveri vegetali</b> .....	10
<b>3.2 Acidi e sali organici</b> .....	12
<b>3.3 Plasma</b> .....	13
<b>3.4 Alta pressione idrostatica (HHP)</b> .....	15
<b>3.5 Campo elettrico pulsato (PEF)</b> .....	16
<b>3.6 Uso ridotto di nitrati e nitriti</b> .....	17
<b>Conclusioni</b> .....	19
<b>Bibliografia</b> .....	20

## Introduzione

Questo elaborato si pone come scopo quello di analizzare i motivi che portano l'industria alimentare ad utilizzare nitrati e nitriti come additivi in prodotti a base di carne, i benefici e i rischi associati e le possibili alternative per limitarne o abolirne l'uso.

Nitrato e nitrito sono due anioni, rispettivamente dalla formula chimica  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$ , spesso utilizzati come conservanti alimentari sotto forma di sali di potassio o di sodio: gli additivi più comuni a base di questi anioni sono nitrito di sodio (E249), nitrito di potassio (E250), nitrato di sodio (E251) e nitrato di potassio (E252).

Nitrati e nitriti possono essere assunti attraverso tre fonti principali: acqua, vegetali, carni lavorate.

Nell'acqua si trovano principalmente a causa dell'inquinamento delle risorse idriche per l'uso sempre più diffuso di fertilizzanti; per le acque potabili le quantità di nitrato e nitrito sono regolamentate a livello legislativo (il limite massimo per il nitrato è 50 mg/L, quello per il nitrito invece è 0.1 mg/L).<sup>[1]</sup>

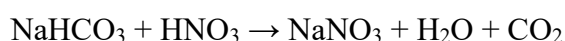
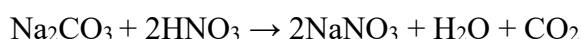
I vegetali sono le fonti naturali principali di nitrati e nitriti: ortaggi a foglia verde come sedano, lattuga, spinaci o rucola contengono un elevato quantitativo di nitrati che possono essere ridotti a nitriti da vari tipi di microrganismi.<sup>[2]</sup>

Infine, i nitrati e nitriti sintetici vengono aggiunti principalmente a carni lavorate, come salumi di vario tipo (salame, pancetta, prosciutto, bresaola), wurstel, carne in scatola e carne affumicata come il bacon.

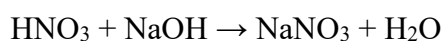
La loro aggiunta avviene principalmente durante la lavorazione della carne, attraverso l'inclusione diretta di miscele dei sali alla carne stessa oppure utilizzandoli per creare marinature o salamoie.

La produzione del nitrato di sodio può avvenire con diversi metodi di sintesi:

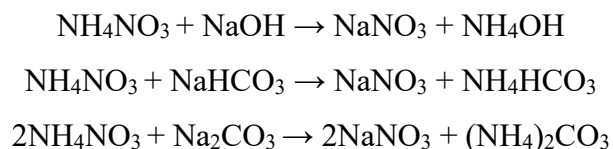
- Reazione tra carbonato o bicarbonato di sodio con acido nitrico



- Reazione di neutralizzazione tra acido nitrico e idrossido di sodio (reazione altamente esotermica)

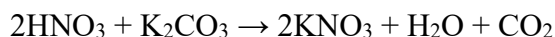


- Reazione tra quantità stechiometriche di nitrato di ammonio con idrossido di sodio, bicarbonato di sodio o carbonato di sodio

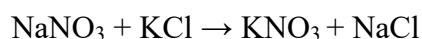


Il nitrato di potassio invece viene principalmente prodotto attraverso:

- Reazione tra acido nitrico e carbonato di potassio



- Reazione di scambio ionico tra nitrato di sodio e cloruro di potassio



Il nitrito di sodio viene sintetizzato a partire da una miscela di diossido di azoto e monossido di azoto con idrossido di sodio:  $2\text{NaOH} + \text{NO}_2 + \text{NO} \rightarrow 2\text{NaNO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ .

Infine, il nitrito di potassio viene ottenuto industrialmente attraverso la riduzione del nitrato di potassio con ossido di calcio sospeso in una soluzione di nitrato di potassio in presenza di biossido di zolfo privo di aria:  $\text{KNO}_3 + \text{CaO} + \text{SO}_2 \rightarrow \text{CaSO}_4 + \text{KNO}_2$ .

Tali additivi apportano dei benefici ai prodotti nei quali vengono aggiunti, come l'inibizione della formazione di agenti patogeni, azione antiossidante nei confronti di lipidi e proteine e conferimento di caratteristiche sensoriali ottime per tali prodotti, come colore, sapore e consistenza.

Ci sono però anche aspetti negativi da considerare nei confronti dell'assunzione di tali sostanze, a causa del fatto che, attraverso meccanismi che verranno illustrati nel corso dell'elaborato, possono portare alla formazione di nitrosammine che sono cancerogene per l'umano. Per questo motivo la quantità di nitrati e nitriti consentite sono elencate nel regolamento n. 1129/2011 dell'UE: 100 mg/kg di nitriti per carni non sterilizzate, 150 mg/kg per carni sterilizzate, mentre per i nitrati 150 mg/kg. <sup>[1,3,4]</sup>

La dose giornaliera accettabile di nitrati è 3.7 mg/kg di peso corporeo, mentre per i nitriti 0.07 mg/kg di peso corporeo. In Europa è stato stimato un'assunzione media pro-capite di nitrato di circa 155 mg/kg di peso corporeo giornaliera (tenendo conto di tutte le fonti da cui è possibile introdurlo), quindi al di sotto del limite consentito per una persona adulta di 60 kg (222 mg). <sup>[1,2,6]</sup>

Nonostante questo, la richiesta da parte dei consumatori di carne con etichetta "pulita" è sempre maggiore e l'industria alimentare deve far fronte a questa sollecitazione cercando di scoprire e introdurre metodi alternativi a tali additivi, tenendo in considerazione i costi e il fatto che i possibili sostituiti debbano conferire alla carne le stesse o migliori caratteristiche di quella conservata con nitrati e nitriti.

# CAPITOLO 1

## Ruolo di nitrati e nitriti come additivi nella carne

Nitrati e nitriti vengono utilizzati nell'ambito dell'industria alimentare sin dal 1950-1960 grazie al fatto che essi permettono di dare molteplici benefici ai prodotti a base di carne alla quale vengono aggiunti, con il vantaggio aggiuntivo che sono poco costosi. Questi aspetti positivi hanno favorito l'utilizzo di tali additivi per molti anni, fino ad arrivare ai giorni nostri. [4]

Prima di descrivere tutti gli effetti benefici di tali sostanze nella carne è necessario specificare che il nitrato non ha nessuna funzione diretta se non quella di fungere da “serbatoio” di nitriti: infatti, nei prodotti alimentari i nitrati vengono gradualmente convertiti a nitriti da enzimi microbici, presenti naturalmente nella carne, oppure presenti nelle colture *starter* aggiunte durante la lavorazione delle carni. Quindi, solamente i nitriti sono i veri responsabili di tutti gli effetti indicati di seguito. [5]

### 1.1 Effetto antimicrobico

Il primo effetto è quello di inibire la crescita e la formazione di agenti patogeni come *Listeria Monocytogenes*, *Bacillus Cereus*, *Clostridium Perfringens*, *Staphylococcus Aureus* ma soprattutto del batterio *Clostridium Botulinum*.

Il batterio *Clostridium Botulinum* produce spore, anche nelle condizioni ambientali più ostili, che si trasformano in cellule vegetative una volta che le condizioni diventano favorevoli. Tali cellule rilasciano la tossina botulinica, una proteina neurotossica, quando si trovano a determinati valori di pH, temperatura e pressione e in assenza di ossigeno. [2]

La tossina botulinica è tra le più velenose per l'uomo, tantoché la dose letale è inferiore a 1 ng/kg di peso corporeo.

La sua assunzione inibisce il rilascio dell'acetilcolina, un neurotrasmettitore, e quindi interferisce con il normale funzionamento del sistema nervoso. Questo provoca l'impossibilità ai muscoli di contrarsi in modo corretto con conseguente perdita della forza muscolare e del loro controllo.

L'avvelenamento da botulino viene chiamato “botulismo”. I sintomi sono debolezza muscolare, annebbiamento e sdoppiamento della vista, fatica ad ingerire, difficoltà di espressione e in casi più gravi paralisi dei muscoli respiratori.

Siccome tale pericolosa tossina potrebbe formarsi nei prodotti a base di carne, è necessario prevenirla l'insorgenza. Questo compito è svolto efficacemente da nitrati e nitriti che impediscono alle spore di svilupparsi in cellule vegetative, che sono la forma attiva e moltiplicante del batterio. Inoltre, essi permettono di mantenere divise le cellule vegetative che si formano.

I meccanismi d'azione dei nitriti sono molteplici:

- inibiscono l'attività degli enzimi metabolici dei batteri, reagendo con ferro e zolfo contenuti in essi e disattivandoli (figura 1). [2,7]

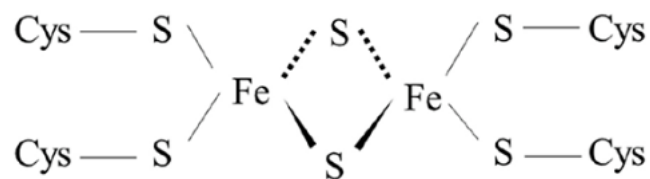
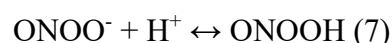
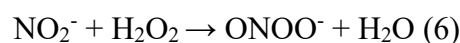
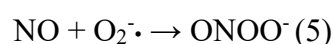
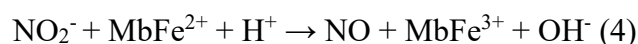
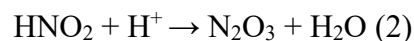
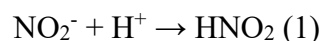


Fig. 1 - Struttura della ferredossina, enzima necessario per la produzione di ATP nelle cellule vegetative clostridiali.<sup>[7]</sup>

- Promuovono la produzione di perossinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e acido perossinitroso ( $\text{ONOOH}$ ), specie nitrosanti altamente ossidanti e reattive, che penetrano facilmente nelle cellule batteriche e all'interno di esse ossidano proteine e lipidi e danneggiano il DNA. Tali reazioni portano la cellula a non poter più funzionare correttamente non potendo più riprodursi. La formazione di tali sostanze parte dall'autossidazione dell'ossimioglobina dalla quale vengono formati radicali superossido ( $\text{O}_2^-$ ) e perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) che reagiscono rispettivamente con ossido nitrico ( $\text{NO}$ ) (5) e con i nitriti (6) formando perossinitrito che in ambiente fisiologico si trova in equilibrio con acido perossinitroso (7). L'ossido nitrico a sua volta viene formato dalla riduzione di nitriti a causa del pH basso (5.5 – 6.5) in acido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) e ossido nitrico (1,2,3) oppure a causa della reazione con desossimioglobina che a sua volta si ossida (4).



Chiaramente questi meccanismi di inibizione sono favoriti a certe condizioni di pH, concentrazione di nitriti e temperatura. [7]

## 1.2 Azione antiossidante

Nitrati e nitriti contribuiscono ad inibire l'ossidazione di lipidi e proteine che porta alla formazione di sostanze interferenti con le caratteristiche organolettiche del prodotto alimentare.

L'ossidazione dei lipidi è una reazione radicalica (figura 2). Nella fase di "iniziazione" le molecole lipidiche e specie reattive dell'ossigeno e/o radicali liberi reagiscono formando radicali lipidici (L•) che a loro volta reagendo con l'ossigeno portano alla formazione di lipoperossidi (LOO•). Tali radicali nella fase di "propagazione" vengono ulteriormente ossidati attraverso reazioni radicaliche a catena fino ad arrivare alla "terminazione", fase nella quale si formano specie come aldeidi, dialdeidi o 4-idrossi-nonenale (HNE) che conferiscono alla carne un sapore "warmed-over" (riscaldato), ossia un sapore stantio e poco invitante, talvolta rancido. [9,10]

Il nitrito ha la capacità di evitare la formazione di tali composti in diversi modi:

- fungendo da agente chelante di ioni metallici (anche del ferro dell'eme) che se fossero liberi favorirebbero la reazione di ossidazione;
- producendo ossido nitrico che può reagire con le specie reattive dell'ossigeno e quindi bloccare nella fase iniziale l'ossidazione;
- formando con l'ossigeno il diossido di azoto (NO<sub>2</sub>) bloccando così la formazione di lipoperossidi;
- reagendo con i lipoperossidi portando la reazione radicalica alla fase di "terminazione", con formazione di molecole non radicaliche che non alterano le caratteristiche sensoriali della carne. [2]

Il grado di ossidazione lipidica si misura attraverso il metodo TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances). Grazie alla reazione dei sottoprodotti dell'ossidazione lipidica con l'acido barbiturico viene determinato il grado di ossidazione. [9]

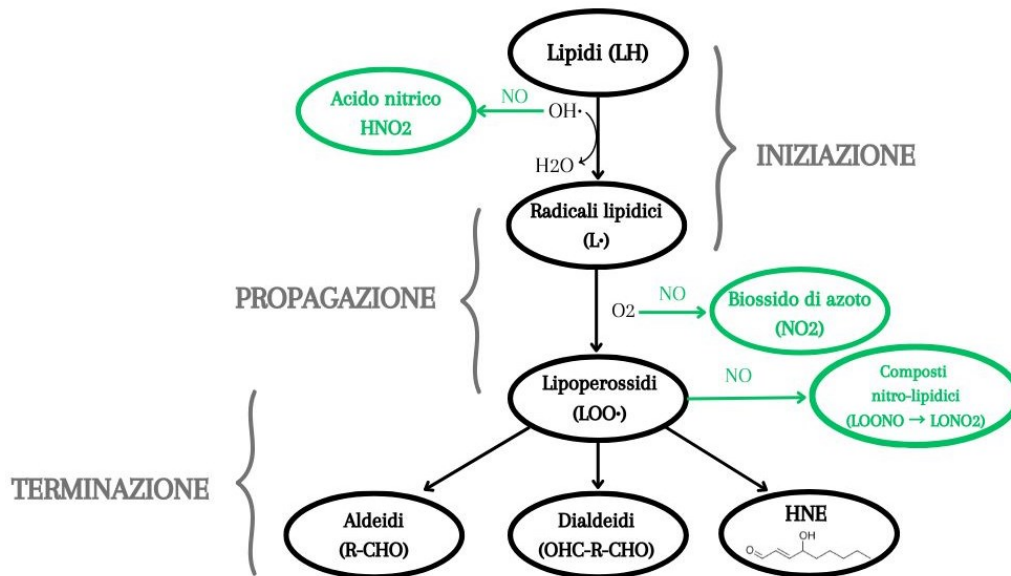


Fig. 2 - Meccanismo radicalico della reazione di ossidazione lipidica (reazioni nere) e inibizioni di essa con l'aggiunta di nitrito (reazioni verdi).

L'ossidazione delle proteine ha un meccanismo simile a quello dell'ossidazione dei lipidi: le specie reattive dell'ossigeno e/o i prodotti principali o secondari della perossidazione lipidica reagiscono con le proteine modificandone la loro struttura covalente, disattivandole e provocando modificazioni al prodotto in cui sono contenute. Infatti, si verifica una minore ritenzione idrica delle proteine, una minore solubilità e digeribilità e una ridotta disponibilità di aminoacidi essenziali come cisteina e tirosina.

Il meccanismo del nitrito nei confronti dell'ossidazione proteica non si conosce con esattezza. Diversi studi hanno riportato che la presenza di nitrito fa diminuire la quantità di gruppi carbonilici. Tuttavia, il nitrito ha anche un effetto pro-ossidante perché l'ossido nitrico può reagire con lo ione superossido formando perossinitrito che ossida le proteine formando composti con gruppi carbonilici, che a loro volta possono reagire con ammine per formare basi di Schiff. Il grado di ossidazione proteica viene determinato attraverso un'analisi quantitativa sui composti carbonilici. [8,9]

### 1.3 Caratteristiche sensoriali

Nitrati e nitriti hanno anche la funzione di conferire ai prodotti a base di carne ottime caratteristiche sensoriali. In particolare, sono in grado di impartire alla carne un determinato colore e sapore che rende il prodotto gradevole al consumatore.

Il colore che si genera a seguito dell'aggiunta di nitriti e nitrati alla carne è un colore rosso-rosato, dato dal pigmento nitrosil-mioglobina (NO-Mb).



Le reazioni che portano alla formazione di questo prodotto si basano principalmente sull'interazione tra mioglobina (Mb (Fe<sup>2+</sup>)) e/o metamioglobina (Mb (Fe<sup>3+</sup>)) (la forma ossidata della mioglobina) con ossido nitrico, a sua volta ottenuto dall'ossidazione dei nitriti (figura 3).

Da tali reazioni si ottengono rispettivamente nitrosil-mioglobina (NO-Mb (Fe<sup>2+</sup>)) e nitrosil-metamioglobina (Mb (Fe<sup>3+</sup>)); quest'ultima può facilmente essere ridotta a NO-Mb e tale processo è favorito in presenza di antiossidanti.

La nitrosil-mioglobina conferisce alla carne il suo colore caratteristico, ma tale pigmento è instabile se viene sottoposto ad acidificazione o ad alte temperature e in tali condizioni forma un nuovo pigmento color rosato, il nitrosil-emocromo. [2,4,10]

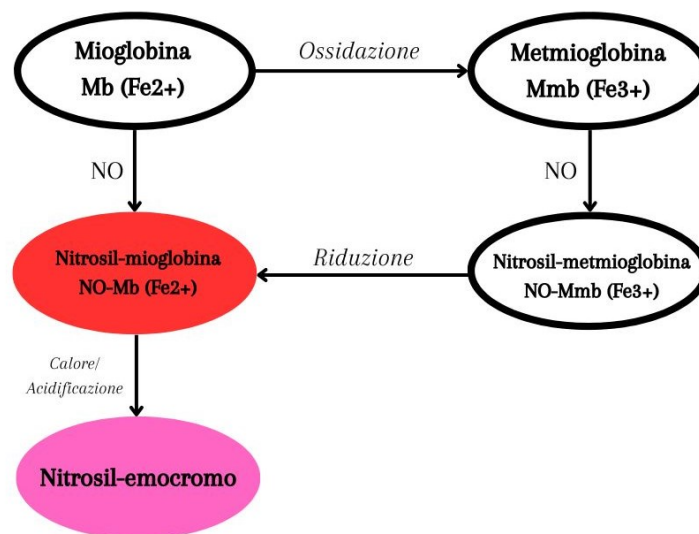


Fig. 3 - Schema di reazioni che portano alla formazione dei pigmenti responsabili del colore della carne in presenza di nitriti

I nitriti influiscono anche sull'odore, gusto e consistenza, ma le reazioni responsabili di ciò non sono note, anche se è possibile presupporre che uno degli effetti più importanti sia quello di inibire l'ossidazione dei lipidi e quindi far sì che non si formi il sapore rancido. Nonostante questo possa essere uno dei fattori, non è sicuramente l'unico: ci sono altre reazioni non ancora esattamente note che portano alla formazione di sostanze specifiche che conferiscono sapori caratteristici alla carne.

[2]

## CAPITOLO 2

### Rischi associati all'utilizzo di nitrati e nitriti

Nonostante tutti gli effetti benefici apportati alla carne, i nitriti sono allo stesso tempo estremamente pericolosi per il nostro organismo.

Essi prendono parte a processi che portano alla formazione di composti N-nitrosi: N-nitrosammine volatili, N-nitrosammine non volatili, prodotti carbossilici eterociclici N-nitrosi, N-nitrosammidi, composti di Amadori e glicosammine N-nitrosate.

Tra queste classi di composti le N-nitrosammine volatili sono considerate pericolose per l'uomo. Ne esistono più di 300. Quelle che si formano principalmente attraverso l'assunzione di salumi sono N-nitroso-dimetil-ammina (NDMA), N-nitroso-dietil-ammina (NDEA), N-nitroso-piperidina (NPIP), N-nitroso-morfolina (NMOR) e N-nitroso-dibutil-ammina (NDBA) (figura 4); <sup>[4,11]</sup> questi composti sono stati tutti considerati cancerogeni, ma le prime due sostanze sono state classificate sostanze cancerogene del gruppo 2A (carcinogeni probabili per gli esseri umani), mentre le altre sono state classificate sostanze cancerogene del gruppo 2B (possibili carcinogeni umani). <sup>[4]</sup>

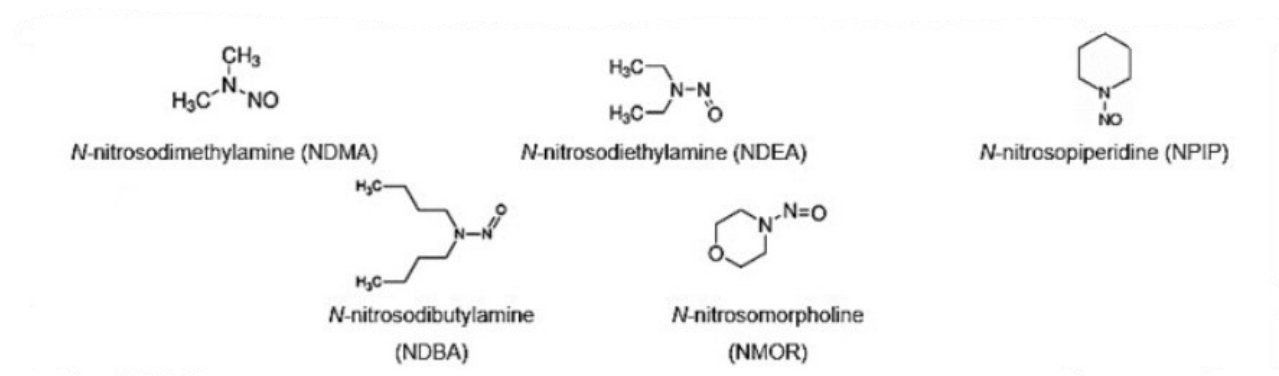


Fig. 4 - Strutture delle N-nitrosammine volatili principali che si formano nei prodotti a base di carne in presenza di nitriti. <sup>[11]</sup>

Tali composti sono organo-specifici e possono provocare cancro alla mammella, renale, esofageo, gastrico o al colon-retto e possono essere teratogeni, possono quindi provocare malformazioni e anomalie agli organi del feto nelle donne in stato di gravidanza. <sup>[2,3]</sup>

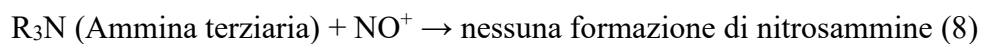
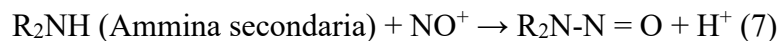
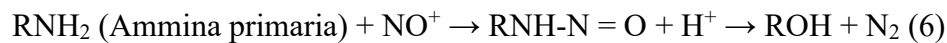
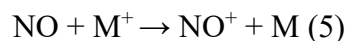
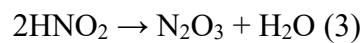
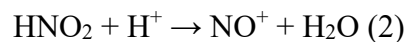
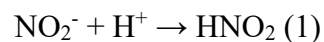
La formazione delle N-nitrosammine volatili può avvenire direttamente nella carne cruda oppure nel tratto gastrointestinale ed è favorita da elevate temperature e pH acidi.

Il meccanismo di formazione si basa sull'acidificazione del nitrito in acido nitroso (1) che in ambiente acido forma il catione nitrosile ( $:N\equiv O:^+$ ) (2) oppure reagisce con se stesso per formare il

triossido di azoto (3) che si decompone in ossido nitrico e biossido di azoto (4). L'ossido nitrico poi reagisce con la metmioglobina contenente  $\text{Fe}^{3+}$  che viene ridotta a mioglobina contenente  $\text{Fe}^{2+}$  con la contemporanea formazione del catione nitrosile (5). A questo punto tale catione reagisce con le ammine formando le N-nitrosammine. [2]

Le ammine che generano le N-nitrosammine più persistenti sono le ammine secondarie (7), le primarie formano N-nitrosammine instabili (6) mentre le terziarie non le formano (8). [2]

Di seguito vengono illustrate tutte le reazioni che portano alla formazione di queste sostanze:



A causa di ciò i nitriti sono stati anch'essi classificati dalla IARC (International Agency for Research on Cancer) come sostanze cancerogene appartenenti al gruppo 2A.

Un altro motivo che porta i nitriti ad essere pericolosi è l'insorgenza nei neonati della "sindrome del bambino blu", ossia la metaemoglobinemia: è una malattia che si genera soprattutto nei bambini quando sono affetti da un elevato quantitativo di nitriti nel sangue che provoca l'ossidazione dell'emoglobina ( $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{O}_2$ ) in metaemoglobina, la quale non è in grado di trasportare l'ossigeno:  $4\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{O}_2 + 4\text{NO}_2^- + 4\text{H} \rightarrow 4\text{Hb}(\text{Fe}^{3+}) + 4\text{NO}_3^- + \text{O}_2 + 2\text{H}_2$ .

Tale malattia genera nei bambini la pelle color blu, da questo il nome "sindrome del bambino blu". [2]

È importante infine sapere che i nitriti sono dieci volte più cancerogeni dei nitrati: il dosaggio fatale dei nitrati è di 80-800 mg/kg di peso corporeo mentre per i nitriti è 33-250 mg/kg di peso corporeo. [2]

Tali rischi correlati all'assunzione di questi conservanti non possono essere sottovalutati. È quindi necessario capire quali siano possibili alternative all'utilizzo di nitrati e nitriti in grado di diminuire o eliminare la quantità di nitriti residui che possono portare problemi di salute al consumatore.

## CAPITOLO 3

### Metodi alternativi all'utilizzo di nitrati e nitriti sintetici

Ad oggi il mondo della scienza si sta impegnando a ricercare metodi per conservare tutti i prodotti a base di carne che tradizionalmente richiederebbero l'aggiunta di nitrati e nitriti. Questo perché c'è una richiesta sempre maggiore di prodotti con etichetta “pulita”, quindi privi di conservanti, che permettano di ridurre i nitriti residui e che allo stesso tempo conferiscano alla carne tutte le caratteristiche richieste.

#### 3.1 Estratti o polveri vegetali

Diversi tipi di vegetali, soprattutto verdure a foglia verde, contengono una certa quantità di nitrato che potrebbe sostituirsi al nitrito aggiunto. Il nitrato presente nelle verdure viene convertito a nitrito da diversi microrganismi e può conferire alla carne tutte le caratteristiche e i benefici richiesti: azione antiossidante, antimicrobica e caratteristiche organolettiche idonee. [2]

Tali vegetali possono essere aggiunti alla carne sottoforma di polveri o di estratti.

Gli estratti sono molto concentrati a differenza delle polveri e per questo per raggiungere lo stesso effetto è necessario utilizzare un quantitativo di polveri molto maggiore rispetto agli estratti. Ciò può provocare effetti negativi alla carne: aggiungendone elevate quantità si potrebbero avere conseguenze indesiderate, come alterazione del colore e del sapore.

Gli estratti vegetali oltre ad avere un elevato contenuto di nitrati sono anche ricchi di polifenoli, terpenoidi e alcaloidi, sostanze che contribuiscono ulteriormente agli effetti antiossidanti e antimicrobici. Questo è un aspetto molto importante per la carne che, nonostante sia ricca di sostanze nutritive, è povera di antiossidanti e battericidi e quindi facilmente soggetta a deterioramento. [8]

L'effetto antiossidante è dato principalmente dal fatto che i polifenoli contenuti negli estratti vegetali sono in grado di inibire gli enzimi che portano alla formazione di radicali liberi, di reagire con i radicali liberi che si formano creando composti non radicalici e di chelare ioni metallici che favorirebbero l'ossidazione. [8]

Un altro fattore estremamente importante dato dalla presenza di composti fenolici è il fatto che essi possono legare a sé il nitrito residuo, prevenendo la formazione di ossido nitrico, al pH basso dello stomaco, e quindi indirettamente bloccando anche la formazione di N-nitrosammine. [4]

Gli estratti possono essere ottenuti in diversi modi, da metodi di estrazione più tradizionali, come l'estrazione con solvente, a metodi più innovativi e puliti, come l'estrazione con fluidi supercritici o assistita da ultrasuoni. [8]

I nitrati presenti naturalmente negli estratti vengono convertiti in nitriti in tre modi differenti: i) attraverso l'utilizzo di colture *starter*, ossia un insieme di microrganismi che favoriscono la riduzione, ii) attraverso il sistema di pre-salamoia, ossia l'incubazione dell'estratto in presenza di batteri prima di entrare in contatto con la carne, oppure iii) attraverso il sistema pre-convertito che è molto simile al sistema di pre-salamoia; l'unica differenza risiede nel fatto che viene controllata e regolata la quantità di nitrito presente. [6]

In tabella 1 vengono riportati alcuni estratti o polveri vegetali e i loro effetti sulla base di alcuni studi condotti in questi anni in carni di maiale, manzo, agnello e pecora. [2,3,4,8,10,12]

Tabella 1 – Esempi di alcuni estratti e polveri vegetali utilizzati nei prodotti a base di carne e i loro effetti

<b>Sostanza</b>	<b>Effetti</b>
<i>Estratto di rosmarino + menta</i>	25 ppm di rosmarino ha raddoppiato il tempo di conservazione e 62 ppm di menta hanno aumentato l'effetto antimicrobico.
<i>Estratto di buccia di melograno</i>	Valori di TBARS e formazione di carbonili molto più basse
<i>Estratto foglia di olivo</i>	Migliorata la qualità di conservazione da 1 a 3-4 settimane nelle celle frigorifere
<i>Estratto di cavolo rosso</i>	Diminuzione di TBARS e pH senza nessun impatto significativo sull'ossidazione delle proteine e sull'aspetto antimicrobico
<i>Estratto di ciliegia</i>	Forte capacità antiossidante, miglioramento del colore.
<i>Estratto di buccia di anguria</i>	Riduzione di TBARS e conta microbica
<i>Estratto di foglie di moringa oleifera</i>	Miglioramento significativo degli attributi sensoriali e migliore qualità microbica
<i>Estratto di chiodi di garofano</i>	Migliore stabilità ossidativa e migliore conservazione senza influenzare in modo significativo gli attributi sensoriali
<i>Estratto di cannella</i>	Ossidazione lipidica e crescita microbica limitata
<i>Estratti di sottoprodotti di agrumi</i>	Marcata azione antimicrobica, ridotta degradazione proteica e presenza di TBARS
<i>Polvere di prezzemolo</i>	Riduzione dell'insorgenza di <i>L.monocytogenes</i> e della quantità di nitriti residui
<i>Polvere di pomodoro</i>	Miglioramento del colore della carne grazie alla presenza di licopene e riduzione dell'ossidazione lipidica

Come è possibile notare, le polveri e gli estratti vegetali apportano diversi benefici alla carne. Il loro meccanismo d'azione è simile a quello dei nitriti aggiunti, con il lato positivo di aver nella maggior parte dei casi minor quantità di nitrito residuo e quindi minor pericolo di formazione di N-nitrosammine.

Tuttavia, è necessario specificare che i prodotti vegetali hanno quantità di nitrati e polifenoli variabili a seconda del tipo di coltivazione. Quindi, anche utilizzando sempre lo stesso tipo di estratto potrebbero esserci delle variazioni composizionali. [3]

### **3.2 Acidi e sali organici**

Acidi e sali organici come lattato, sorbato, acetato e benzoato possono essere dei buoni sostituti a nitrati e nitriti grazie alla loro capacità di ridurre lo sviluppo microbico e in generale di aumentare le prestazioni della stagionatura.

È stato dimostrato che in particolare il lattato, sale dell'acido lattico, è il più efficace a questo scopo perché apporta numerosi benefici alle carni lavorate senza effetti collaterali: migliora la stabilità del colore, aumenta la qualità della carne conferendo un sapore salato, implementa la capacità di trattenere l'acqua e fornisce anche un'azione antiossidante, evitando la formazione di sapori sgradevoli e rancidi, e antibatterica.

Inibisce l'ossidazione grazie alla sua capacità di eliminare i radicali liberi reagendo con essi e portando alla formazione di specie non radicaliche che non interferiscono con il sapore della carne.

Questo sale, inoltre, permette di preservare il colore grazie all'enzima lattato deidrogenasi (LDH) che converte il lattato in piruvato e il NAD<sup>+</sup> (forma ossidata) a NADH (forma ridotta). Il NADH a sua volta si comporta come agente riducente nei confronti della metmioglobina riportando alla formazione la mioglobina che era stata ossidata e ripristinando il colore originale della carne. Degli studi hanno osservato come, alla presenza di lattato, venga preservata la mioglobina dall'essere ossidata anche nelle condizioni più favorevoli e permetta quindi di mantenere stabile il pigmento rosso; inoltre, è stato osservato che è necessaria solo una concentrazione pari all'1% per preservare il colore rosso e per conferire il gusto più adatto al prodotto: ad ogni aggiunta pari all'1% viene migliorata sia la pigmentazione che la palatabilità della carne.

Anche l'effetto antimicrobico è stato ampiamente studiato ed è stato dimostrato che aggiunte di lattato portano alla minor insorgenza di sostanze patogene.<sup>[13]</sup> Infatti, quando il pH al di fuori della cellula è inferiore al pH all'interno della cellula, come nel caso degli alimenti leggermente acidi, gli anioni lattato si accumulano all'interno della cellula. Sembra che in tale situazione sia alterata la permeabilità delle membrane che porta alla morte dei batteri.<sup>[13]</sup> Chiaramente l'effetto antibatterico

è influenzato da diversi fattori come quantità di lattato aggiunta, tipo di prodotto da trattare, pH, temperatura.

Se il lattato viene utilizzato assieme al cloruro di sodio (NaCl), si ottiene un effetto sinergico: aumenta la capacità di conservazione e l'inibizione della crescita di sostanze patogene, a tal punto da ottenere prodotti con caratteristiche migliori di quelle conservate con nitrati e nitriti.

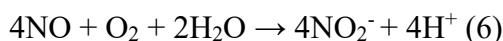
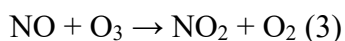
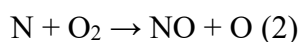
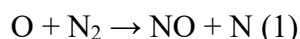
Altri sali organici, come sorbato, propionato e benzoato sono in grado di sopprimere batteri Gram – positivi come il *Clostridium Botulinum*, ma questi son più difficili da sostituire ai nitriti rispetto al lattato perché oltre all'azione antibatterica non sono in grado di conferire tutte le altre caratteristiche (colore, sapore) che con i nitriti vengono soddisfatte. [2]

### 3.3 Plasma

Il plasma è un gas ionizzato ottenuto attraverso una scarica elettrica in un gas neutro come l'azoto (N<sub>2</sub>). Tale trattamento può avvenire a pressione atmosferica o a bassa pressione. [3,6]

Il gas ionizzato formatosi contiene specie reattive dell'azoto che attraverso una serie di reazioni possono essere convertite a nitriti: inizialmente viene formato ossido nitrico dalle reazioni tra un atomo di ossigeno e una molecola di azoto (1) e tra un atomo di azoto e una molecola di ossigeno (2). L'ossido nitrico a sua volta reagisce con l'ozono (O<sub>3</sub>), che viene precedentemente generato dal plasma, per formare vari ossidi di azoto tra cui, principalmente, il diossido di azoto (3).

Gli ossidi di azoto che sono stati generati si diffondono e dissolvono in acqua e reagendo con essa portano alla formazione di acido nitroso e acido nitrico (4,5) che si dissociano formando ioni nitrato e nitrito (4,5,6). [3]



La soluzione contenente nitrati e nitriti viene inserita all'interno di un miscelatore attraverso un tubo con l'ausilio di un sistema di pompe e viene addizionata all'impasto di carne da trattare (figura 5).

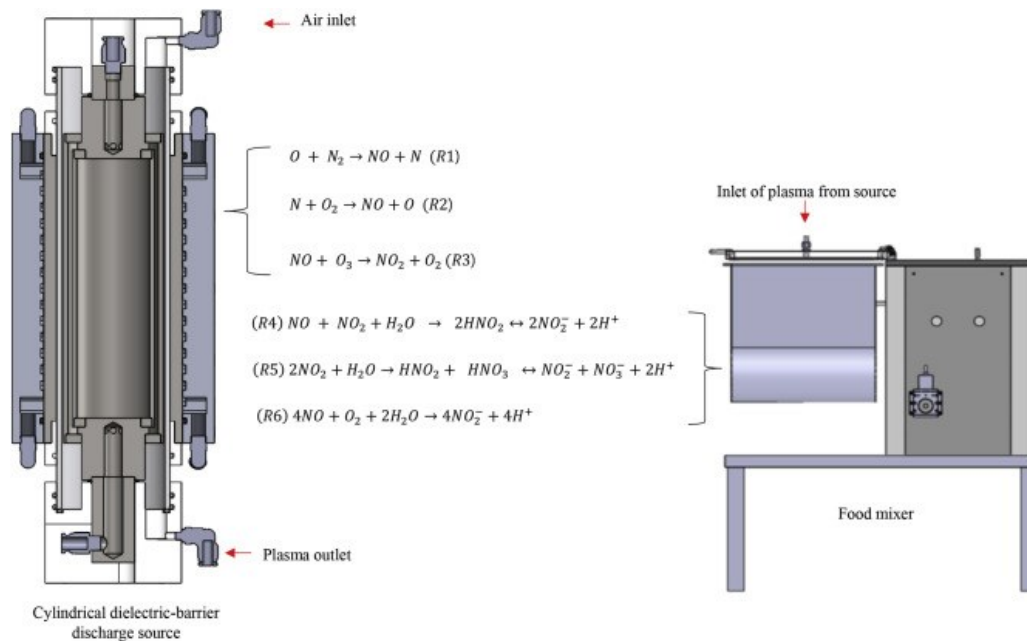


Fig. 5 - Schema di formazione di nitrati e nitriti mediante trattamento al plasma con acqua [6]

È stata studiata anche la possibilità di trattare direttamente la carne con il plasma per rendere la procedura più semplice, ma tale opzione è di difficile realizzazione perché con la formazione del plasma le temperature si innalzano a tal punto da portare la carne in condizioni favorevoli per la crescita dei batteri (sopra i 13°C) mentre con il trattamento indiretto al plasma, durante il trasporto tramite il tubo, si ha un abbassamento della temperatura tale da evitare il deterioramento del prodotto.

È possibile applicare il trattamento al plasma anche a vegetali che contengono un basso contenuto di nitrati i quali poi vengono aggiunti alla carne.

Uno studio ha dimostrato che la quantità di nitriti prodotta dal plasma è direttamente proporzionale al tempo di applicazione del plasma stesso, quindi è possibile regolare facilmente la quantità di nitriti introdotta nei prodotti tramite questo trattamento.

Inoltre, è stato verificato che utilizzando questo metodo di conservazione piuttosto che quello tradizionale con aggiunta di nitrati e nitriti sono soddisfatte tutte le caratteristiche richieste, ossia mantenimento del colore rosso, azione antibatterica e azione antiossidante, ma è presente un contenuto di nitriti residui significativamente più basso, quindi la pericolosità dovuta alla formazione di N-nitrosammine volatili è decisamente inferiore. [3,6]

Se al prodotto trattato con plasma viene addizionato anche acido ascorbico il livello di nitriti residui si abbassa ulteriormente grazie all'azione antiossidante della vitamina C che riduce facilmente  $\text{NO}_2^-$  che è eventualmente rimasto.



Un altro aspetto positivo è dovuto al fatto che dal plasma vengono generate anche altre specie che contribuiscono a fornire un effetto antibatterico. Infatti, è stato dimostrato che tramite questa tecnica tale effetto è ancora più efficace. [6]

Tuttavia, è necessario studiare in modo più approfondito se le specie reattive generate dal plasma possano apportare modifiche chimiche al cibo che potrebbero intaccare la sicurezza del prodotto, anche se dai primi studi condotti non sembra che questo avvenga.

Nonostante ciò, rimane ancora una tecnica sperimentale sia perché non si sa ancora molto sulla sicurezza, sia per l'elevato costo della strumentazione. [3]

### **3.4 Alta pressione idrostatica (HHP)**

È un metodo che permette di conservare la carne senza nessun conservante, ma applicando solamente una pressione elevata. Abitualmente la pressione va da 100 a 800 Mpa ed è applicata uniformemente e istantaneamente a tutto il prodotto, in un tempo che può variare da 20 secondi a 20 minuti.

Il prodotto viene inserito in una vasca a pressione, viene immerso in un fluido che può essere acqua o glicole e successivamente la vasca viene sigillata. Il fluido serve a distribuire uniformemente la pressione in tutto il sistema, la quale viene generata da una pompa dotata di fluido aggiuntivo.

La pressione viene applicata per un certo tempo, successivamente viene rilasciata e il prodotto torna alla sua forma originale.

L'obiettivo di questa tecnica è quello di deteriorare attraverso l'elevata pressione le cellule batteriche, non permettendo più di far passare fluidi ed elettroliti tra le membrane e quindi rendendo difficile la loro riproduzione. Uno studio ha riportato che i batteri Gram-negativi (*Salmonella*) sono più resistenti rispetto ai batteri Gram-positivi (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*) a tale trattamento.

È stato dimostrato che, oltre ad ottenere un'azione antibatterica, è migliorata la durata di conservazione e quindi l'ossidazione lipidica è stata inibita. Non sono stati riscontrati effetti benefici per quanto riguarda il colore.

Si tratta di un processo adiabatico, quindi ad ogni aumento di pressione aumenta anche la temperatura. In particolare, ad ogni aumento di 100MPa la temperatura sale di 3°C quindi deve essere determinato un giusto compromesso tra pressione e temperatura, per far sì che vengano danneggiate le cellule batteriche ma che allo stesso tempo venga preservata una temperatura abbastanza bassa in modo da non poter favorire l'insorgenza di tali batteri.

È possibile aggiungere alla carne un additivo come il lattato di potassio o enterocin LM-2, ossia un dipeptide prodotto dal batterio *Enterococcus faecium* LM-2 che ha la caratteristica di essere un agente antimicrobico contro altri batteri. Aggiungendo tali sostanze assieme al trattamento ad alta pressione idrostatica si ottiene un effetto sinergico sulle caratteristiche del prodotto trattato. [2]

In tabella 2 vengono riportati alcuni trattamenti HHP a diversi prodotti di carne e il loro effetto. [2]

Tabella 2 - Effetti derivanti dal trattamento HHP con diverse condizioni operative

<b>Trattamento</b>	<b>Prodotto</b>	<b>Effetti</b>
<i>HHP a 600 MPa</i>	Prosciutto crudo affettato	Inibizione di <i>L. monocytogenes</i> dopo conservazione di 120 giorni a 4°C
<i>HHP a 400 MPa</i>	Prosciutto crudo affettato sottovuoto	Shelf life del prodotto aumentata
<i>HHP a 400 MPa</i>	Salame affumicato	Riduzione dei batteri <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Enterococchi</i>
<i>HHP a 400 MPa + lattato di potassio</i>	Prosciutto cotto affettato	Inibizione di <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> in 12 settimane di conservazione
<i>HHP a 450 MPa</i>	Prosciutto iberico	Riduzione di <i>Listeria monocytogenes</i> dopo 60 giorni
<i>HHP a 800 MPa</i>	Carne di maiale	Ritardo dell'ossidazione lipidica
<i>HHP a 600 MPa</i>	Prosciutto stagionato	<i>Salmonella enterica</i> , <i>L.monocytogenes</i> e <i>S.aureus</i> hanno valori sotto il limite massimo durante 4 mesi di conservazione
<i>HHP a 400 MPa + enterocin</i>	Prosciutto affettato	Eliminazione di <i>Salmonella enteritidis</i> e <i>L. monocytogenes</i>

Dalla tabella 2 è possibile notare come l'effetto principale sia quello antibatterico. L'effetto antiossidante è meno efficace rispetto a nitrati e nitriti, ma l'aspetto positivo è che con tale trattamento non è possibile che si formino N-nitrosammine volatili cancerogene non essendoci la presenza di nessun tipo di nitrati o nitriti.

### 3.5 Campo elettrico pulsato (PEF)

La carne viene posta tra due elettrodi e viene colpita da impulsi elettrici brevi ad alta tensione.

Questo provoca l'elettro-permeabilizzazione delle membrane plasmatiche delle cellule microbiche,

ossia la formazione di pori temporanei o definitivi che generano danni alle cellule patogene che non sono più in grado di proliferare e riprodursi e vengono quindi inattivate.

Affinché l'elettropermeabilizzazione abbia successo si deve tener conto di diversi fattori:

- biologici, quindi tipo, forma o orientazione delle cellule;
- fisico – chimici della carne come il pH o la conduttività;
- di processo, come distanza tra i due elettrodi e la loro geometria, numero di impulsi elettrici e frequenza.

Oltre all'effetto antimicrobico, tale trattamento accelera il tempo di stagionatura. Inoltre, se al prodotto viene aggiunto cloruro di sodio o nitrati e nitriti, il campo elettrico pulsato permette di diffonderli meglio e più uniformemente, con conseguente miglior conservazione e minor uso di nitrati/nitriti. Non apporta modifiche a livello nutrizionale o sensoriale della carne.

Tale tecnica è di recente introduzione, per cui sono necessari ulteriori approfondimenti per verificare la sua efficacia nei confronti del colore, dell'ossidazione, della tenerezza e della capacità di ritenzione idrica della carne.

I costi anche in questo caso sono più elevati rispetto all'utilizzo tradizionale di nitrati e nitriti, ma potrebbe valerne la pena nel caso in cui effettivamente sia in grado di ottenere prodotti a base di carne con le corrette caratteristiche organolettiche, sicure e senza rischio di formazione di sostanze cancerogene per l'uomo. [3]

### **3.6 Uso ridotto di nitrati e fosfati**

È possibile ridurre la formazione di N-nitrosammine endogene semplicemente riducendo la quantità di nitrati e nitriti, cercando comunque di preservare la sicurezza e i corretti parametri organolettici della carne.

È stato condotto uno studio su quattro salami stagionati a cui sono stati aggiunte diverse quantità di conservante: 110 mg/kg Na-nitrito + 0.2% di fosfato (a), 55 mg/kg Na-nitrito + 0.2% di fosfato (b), 55 mg/kg Na-nitrito + 0.2% di fosfato + 225 mg/kg Na-ascorbato (c), 110 mg/kg Na-nitrito (d).

In tutti i casi sono state determinate e analizzate diverse caratteristiche:

- pH: in tutti i casi c'è stato un aumento nelle prime due settimane e una diminuzione nell'ultima, tutti presentavano valori simili tranne il campione (d) a causa dell'assenza di fosfati che sono conosciuti per avere un pH alcalino.

- Muffa: è maggiore nei casi (b) e (c), in cui il contenuto di nitriti è ridotto; la sua formazione fa diminuire l'evaporazione dell'acqua prevenendo l'eccessiva stagionatura e conferendo le caratteristiche sensoriali più adatte.
- Batteri: in tutti i casi non sono state rilevate presenze di batteri nocivi per l'uomo, nemmeno nei salumi trattati con un contenuto di nitrato più basso. L'importante affinché questo non avvenga è mantenere l'attività dell'acqua sotto lo 0.85 in modo di impedire agli agenti patogeni di proliferare.
- Colore: la minor quantità di nitriti non ha interferito sul colore; Infatti, è necessaria solo una piccola quantità per preservare il colore della carne (25 ppm). L'ascorbato ha contribuito a mantenere la carne più rossa.
- Caratteristiche chimico – fisiche: il contenuto di lipidi, proteine e indice di proteolisi è risultato molto simile in tutti e quattro i casi; la quantità di TBARS è stata sempre sotto il limite di rivelabilità ma era maggiore nel caso in cui il nitrito è stato dimezzato. La presenza di fosfati ha inibito la formazione di tali sostanze grazie al fatto che innalza il pH mentre l'ossidazione è favorita a pH bassi.

Tutti questi risultati portano alla conclusione che, utilizzando un contenuto inferiore di nitriti, fino a raggiungere i 55 mg/kg, è possibile ottenere delle buone caratteristiche della carne con l'aiuto di altri additivi che non danno effetti collaterali, come la presenza di fosfati, che innalzano il pH e sfavoriscono l'ossidazione, o la presenza di ascorbato che funge anch'esso da antiossidante e oltre a prevenire l'ossidazione lipidica e proteica permette di preservare meglio il colore, evitando l'ossidazione della mioglobina. <sup>[5,6]</sup>

## Conclusioni

È emerso che i metodi alternativi all'utilizzo di nitrati e nitriti sono molteplici e ognuno di essi apporta dei vantaggi particolarmente significativi ma anche alcuni limiti.

L'uso di acidi o sali organici, dell'alta pressione idrostatica o del campo elettrico pulsato permette di evitare definitivamente l'assunzione di nitrati e nitriti (aggiunti come sali, presenti negli estratti vegetali o prodotti dal plasma). Tuttavia, è necessario tener conto dei costi elevati delle strumentazioni necessarie per mettere in atto queste nuove tecniche (in particolare HHP e PEF) e dell'efficacia di HHP e PEF nei confronti di colore, ossidazione e azione antimicrobica.

L'uso di polveri/estratti vegetali, del plasma o semplicemente l'uso ridotto di nitriti non elimina l'assunzione di nitrati e nitriti, ma permette di ottenere prodotti a base di carne con livelli di nitriti residui molto più bassi. Quindi, la possibilità che si formino N-nitrosammine volatili è molto più remota. Il vantaggio che ci siano queste sostanze all'interno della carne è quello di avere tutte le caratteristiche ideali per il prodotto senza andare incontro alla pericolosità che si formino sostanze cancerogene. È tuttavia necessario utilizzare combinazioni e quantità di polveri ed estratti adatte per non alterare le caratteristiche sensoriali della carne. Inoltre, è opportuno studiare in modo più approfondito se le altre sostanze generate dal plasma possano dare effetti collaterali indesiderati.

## Bibliografia

- [1] Karwowska, M.; Kononiuk, A.; *Nitrates/Nitrites in Food – Risk for Nitrosative Stress and Benefits*, *Antioxidants*, **2020**, 9, 241 – 266
- [2] Shakil, M.H.; Trisha, A.T.; Rahman, M.; Talukdar, S.; Kobun, R.; Huda, N.; Zzaman, W.; *Nitrites in Cured Meats, Health Risk Issues, Alternatives to Nitrites: A Review*, *Foods*, **2022**, 11, 3355 – 3381
- [3] Stoica, M.; Antohi, V. M.; Alexe, P.; Ivan, A. S.; Stanciu, S.; Stoica, D.; Zlati, M. L.; Stuparu-Cretu, M.; *New Strategies for the Total/Partial Replacement of Conventional Sodium Nitrite in Meat Products: a Review*, *Food and Bioproc. Techn.*, **2022**, 15, 514 – 538
- [4] Bernardo, P.; Patarata, L.; Lorenzo, J. M.; Fraqueza, M. J.; *Nitrate Is Nitrate: The Status Quo of Using Nitrate through Vegetable Extracts in Meat Products*, *Foods*, **2021**, 10, 3019 – 3037
- [5] Škrlep, M.; Ozmec, M.; Čandek-Potokar, M.; *Reduced Use of Nitrites and Phosphates in Dry-Fermented Sausages*, *Processes*, **2022**, 10, 821 – 834
- [6] Siekmann, L.; Plötz, M.; Krischek, C.; *Alternative Curing Methods*, *Curr. Clin. Micro. Rpt.*, **2021**, 8, 40 – 48
- [7] Yong, H. I.; Kim, T.; Choi, H.; Jang, H. W.; Jung, S.; Choi, Y.; *Clean Label Meat Technology: Pre – Converted Nitrite as a Natural Curing*, *Food Sci. Anim. Resour.*, **2021**, 41, 173 – 184
- [8] Awad, A. M. Kumar, P.; Fitry, M. R. I.; Jusoh, S.; Ab Aziz, M. F.; Sazili, A. Q.; *Overview of plant extracts and natural preservatives in meat*, *Food Proc. and Preserv.*, **2022** 16796 - 16823
- [9] Bonifacie, A.; Gatellier, P.; Promeyrat, A.; Nassy, G.; Picgirard, L.; Scislawski, V.; Santé – Lhoutellier, V.; Théron, L.; *New Insights into the Chemical Reactivity of Dry – Cured Fermented Sausages: Focus on Nitrosation, Nitrosylation and Oxidation*, *Foods*, **2021**, 10, 852 – 867
- [10] Jo, K.; Lee, S.; Yong, H. I.; Choi, Y.; Jung, S.; *Nitrite sources for cured meat products*, *Food Sc. and Techn.*, **2020**, 129, 109583 - 109592
- [11] Molognoni, L.; Daguer, H.; Motta, G. E.; Merlo, T. M.; De Dea Lindner, J.; *Interactions of preservatives in meat processing: Formation of carcinogenic compounds, analytical methods, and inhibitory agents*, *Food Res. Intern.*, **2019**, 125, 108608 – 108625
- [12] Ferysiuk, K.; Wójciak, K. M.; *Reduction of Nitrite in Meat Products Through the Application of Various Plant – Based Ingredients*, *Antioxidants* **2020**, 9, 711 – 739

[13] Carpenter, C.E.; Broadbent, J.R.; *External Concentration of Organic Acid Anions and pH: Key Independent Variables for Studying How Organic Acids Inhibit Growth of Bacteria in Mildly Acidic Foods*, J. Food Sci., **2009**, 74, R12-R15