

**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione**

**Corso di Laurea in  
Sicurezza Igienico-sanitaria degli Alimenti**

*Tesi di laurea*

**Addizione di composti fenolici estratti dall'acqua di  
vegetazione del frantoio, ad un insaccato da stagionare.  
Effetto sulla componente lipidica**

**Relatore: Prof. Enrico Novelli**

**Correlatore: Dott.ssa Stefania Balzan**

**Laureando: Tessarolo Davide  
1005004**

**Anno Accademico 2013/2014**



*Alla mia famiglia, e  
a Francesca*



# Indice

<b>SOMMARIO</b> .....	7
<b>1.INTRODUZIONE</b> .....	9
1.1 Salame: un insaccato da fermentare .....	9
1.2 Ossidazione degli acidi grassi .....	10
1.2.1 Autossidazione .....	10
1.2.2 Fotossidazione .....	12
1.3 Olio e acque di vegetazione .....	14
1.3.1 Produzione dell'olio d'oliva .....	14
1.3.2 Composti fenolici nell'olio e nell'acqua di vegetazione .....	16
1.3.2.1 Composti fenolici nelle olive .....	17
1.3.2.2 Composti fenolici nell'olio d'oliva .....	20
1.3.2.3 Composti fenolici nell'acqua di vegetazione .....	24
1.4 Estrazione dei composti fenolici dall'acqua di vegetazione .....	27
1.4.1 Metodiche per lo smaltimento dei sottoprodotti della produzione dell'olio d'oliva .....	27
1.4.2 Ottenere CPC dall'acqua di vegetazione .....	28
1.4.3.Purificazione CPC: ottenimento del VWPE .....	30
1.5 Azioni dei fenoli estratti dall'acqua di vegetazione .....	31
1.5.1 Azione antiossidante negli alimenti .....	32
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	35
<b>3.MATERIALI E METODI</b> .....	37
3.1 Preparazione dei salami .....	37
3.1.1 Salami interi .....	37
3.1.2 Salami esposti .....	41
3.2 Analisi chimica sulla frazione lipidica .....	41
3.2.1 Estrazione e determinazione quantitativa del grasso .....	41
3.2.2 Determinazione dei prodotti secondari del processo di irrancidimento: TBARS .....	43
3.2.3 Determinazione dei prodotti primari del processo di irrancidimento: perossidi .....	44
3.2.4 Determinazione dell'acidità titolabile .....	44
3.3 Parametri di stagionatura .....	45
3.3.1 Determinazione del pH .....	45
3.3.2 Determinazione dell'attività dell'acqua (aw- activity water) .....	45
3.3.3 Determinazione del contenuto di umidità .....	46
3.4 Analisi statistica dei dati .....	46

<b>4.RISULTATI</b> .....	47
4.1 Salami stagionati interi .....	47
4.1.1. Quantità di grasso .....	47
4.1.2 TBARS .....	49
4.1.3 Acidità titolabile .....	52
4.1.4 Perossidi .....	55
4.1.5 pH, aw, umidità .....	58
4.2 Salami stagionati, confezionati in MAP, esposti .....	62
4.2.1 Quantità di grasso .....	62
4.2.2 TBARS .....	64
4.2.3 Acidità titolabile .....	66
4.2.4 Perossidi .....	69
4.2.5 pH, aw, umidità .....	72
<b>5.DISCUSSIONE</b> .....	75
5.1 Salami interi .....	75
5.2 Salami esposti .....	80
<b>6.CONCLUSIONI</b> .....	85
<b>7.BIBLIOGRAFIA</b> .....	87

## SOMMARIO

Il processo di produzione dell'olio di oliva produce grandi quantità di acque di vegetazione difficili da smaltire. Il problema riguarda principalmente i composti fenolici, metaboliti secondari delle piante caratterizzati da un forte potere antimicrobico e antiossidante.

Il presente elaborato di tesi ha lo scopo di verificare l'effetto di un estratto fenolico, ottenuto dalle acque di vegetazione del frantoio, sulla componente lipidica di un insaccato da stagionare e sulla componente lipidica di un insaccato stagionato pre-affettato, confezionato, posto in atmosfera modificata, stoccato a 4°C ed esposto alla luce.

Per valutare l'effetto sul salame sono stati preparati 4 gruppi di salami (detti tesi): B detta bianco che è un salame con ricetta base; C detta controllo con l'aggiunta del 2% di glicerolo alla ricetta base; L1 salami con l'aggiunta all'impasto della tesi C di 75mg/100g dell'estratto fenolico ottenuto dalle acque di vegetazione del frantoio; L2 salami con l'aggiunta all'impasto della tesi C di 150mg/100g dell'estratto fenolico ottenuto dalle acque di vegetazione del frantoio. Tutti questi salami sono stati fatti stagionare e sono stati valutati la %grasso, l'ossidazione lipidica attraverso i parametri numero di perossidi (meq. O<sub>2</sub>/1000g grasso) e TBARS (mg malondialdeide/kg campione), in aggiunta all'acidità titolabile (g acido oleico/100g campione); i parametri appena citati sono stati valutati a tempi di stagionatura precisi: 0, 3, 10, 20 giorni. Una parte dei salami sono stati stagionati fino a 30 giorni, quindi affettati, confezionati in atmosfera modificata (70% N<sub>2</sub> e 30% CO<sub>2</sub>), stoccati a 4°C con alternanza di 12 ore di luce e altrettante di buio per un periodo di 30 giorni. Per questi salami, detti esposti o "pre-affettati e confezionati", sono stati valutati gli stessi parametri dei salami interi (TBARS, acidità titolabile, numero di perossidi, %grasso) a tempi di esposizione ben precisi: 0, 10, 20, 30 giorni. Sia per i salami interi che per quelli "pre-affettati e confezionati" sono stati valutati anche, il pH e l'aw; per i salami interi è stata valutata anche l'umidità.

Sia nei salami interi che in quelli esposti (pre-affettati e confezionati) i composti fenolici determinano una riduzione dei valori di TBARS, rispetto ai salami non arricchiti; nell'acidità titolabile non si osservano differenze significative tra salami arricchiti e non, sia nei salami interi che in quelli esposti. I salami interi arricchiti (L1 ed L2) non presentano un numero di perossidi significativamente diverso dai salami non arricchiti (B e C); nei salami esposti il numero di perossidi è inferiore in quelli arricchiti rispetto ai salami B e C, ma questa differenza non è statisticamente significativa perché  $0,05 < (p=0,054) < 0,10$ . L'aggiunta dell'estratto fenolico non ha modificato sostanzialmente l'evoluzione del contenuto di grasso, del pH e dell'aw nei salami interi durante la stagionatura, rispetto ai salami non arricchiti. Il pH dei salami esposti non presenta notevoli differenze tra le tesi C, L1 ed L2, mentre nella tesi B il pH sale in maniera più decisa; in linea generale, nei salami esposti, si osserva un lieve aumento dell'aw durante il periodo di esposizione alla luce, senza particolari differenze tra le tesi.





# 1.INTRODUZIONE

## 1.1 SALAME:UN INSACCATO DA FERMENTARE

Secondo il punto 1 dell'articolo 16 del DECRETO MINISTERIALE del 21 settembre 2005 "Disciplina della produzione e della vendita di taluni prodotti di salumeria" si intende per «salame» "il prodotto di salumeria, costituito da carni ottenute da muscolatura striata appartenente alla carcassa di suino con aggiunta di sale ed eventualmente di carni di altre specie animali, macinate e miscelate con grasso suino in proporzioni variabili, ed insaccato in budello naturale o artificiale"; nel punto 3 dello stesso articolo si riporta anche che "il salame è asciugato e stagionato in condizioni climatiche suscettibili di determinare, nel corso di una graduale riduzione di umidità, l'evolversi di fenomeni fermentativi ed enzimatici naturali tali da comportare modificazioni che conferiscono al prodotto le caratteristiche organolettiche tipiche e tali da garantire la conservazione e la salubrità in condizioni normali di temperatura ambiente".

Il salame fa parte della categoria dei salumi e per la precisione si tratta di un insaccato crudo, fermentato, non affumicato. Dal punto di vista normativo, per l'Unione Europea il salame rientra nei prodotti a base di carne: i prodotti a base di carne sono prodotti che hanno subito un trattamento tecnologico che ha provocato una modificazione sostanziale della materia prima (trattamento termico, affumicatura, salagione, stagionatura, essiccazione, marinatura, estrazione, estrusione o una combinazione di tali procedimenti) tale che la superficie di taglio permette di constatare la scomparsa delle caratteristiche delle carni fresche (Reg. CE n° 853 del 2004).

Dal punto di vista pratico il salame è un insaccato di carne suina, a volte mista con carne bovina, più o meno stagionato, preparato miscelando tagli di carne magri come il dorso, lombi, spalle con tagli di carne grassi come il lardo o la pancetta. L'articolo 17 del DECRETO MINISTERIALE del 21 settembre 2005 riporta che "Nella preparazione del salame è consentito impiegare vino, pepe, aglio, piante aromatiche, zucchero, destrosio, fruttosio, lattosio, latte magro in polvere, proteine del latte, colture microbiche di avviamento alla fermentazione, spezie, aromi, additivi consentiti ad eccezione dei coloranti."

Il salame è un alimento fermentato e nella produzione industriale si usano degli "starter microbici" per controllare la fermentazione: l'impiego di colture di avviamento è normato dal D.M. 28/12/1994 del Ministero della Sanità, che specifica quali generi e specie di batteri e funghi impiegare.

Il salame di per sé è un alimento con un una percentuale considerevole di grasso, secondo una tabella dell' INRAN (<http://www.inran.it>), un "salame alla cacciatore" presenta una composizione centesimale con il 30,6% di acqua, il 28,5% di proteine, il 34% di lipidi, 1,2% zuccheri solubili. Da questi valori si nota che la frazione lipidica è quella maggiormente rappresentata, ma è anche quella più delicata tra quelle che ho appena citato: i lipidi possono andare incontro all'irrancidimento ossidativo, un alterazione che comporta la produzione di composti indesiderati, responsabili di odori e sapori sgradevoli negli alimenti.

## 1.2.OSSIDAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI

L'ossidazione dei lipidi interessa soprattutto gli acidi grassi insaturi, quindi più doppi legami sono presenti nell'acido grasso e più quell'acido grasso sarà bersaglio dell'ossidazione lipidica; la degradazione dei lipidi porta alla formazione di una serie di composti indesiderati quali aldeidi, chetoni, alcoli, esteri, idrocarburi, furani, lattoni e altri composti ossigenati che sono responsabili degli odori e dei sapori sgradevoli negli alimenti. La formazione di questi composti dell'ossidazione lipidica rappresenta un danno economico ed organolettico nei confronti di un prodotto alimentare (Conte L. 2004); da alcuni studi è emerso che i prodotti di ossidazione dei lipidi sono coinvolti in patologie cardiache e tumorali nell'uomo (Botsoglou et al., 1994).

L'ossidazione lipidica è un processo che vede due protagonisti principali: l'ossigeno e gli acidi grassi insaturi. A seconda dello stato energetico dell'ossigeno, quest'ultimo reagisce in modi diversi con il substrato lipidico e l'ossidazione lipidica procede con meccanismi diversi:

- a. l'ossigeno allo stato di tripletto reagisce con i lipidi con un meccanismo chiamato AUTOSSIDAZIONE
- b. l'ossigeno allo stato singoletto reagisce con i lipidi con un meccanismo chiamato FOTOSSIDAZIONE.

### 1.2.1 AUTOSSIDAZIONE

L'autossidazione è la reazione che avviene tra l'ossigeno tripletto e una molecola organica: i grassi sono particolarmente sensibili a questa reazione, soprattutto i grassi che presentano un elevato grado di insaturazione degli acidi grassi.

I parametri che influiscono l'autossidazione sono:

- a) il grado di insaturazione dell'alimento: l'assorbimento di ossigeno nel tempo, aumenta con l'aumentare del numero di doppi legami presenti negli acidi grassi
- b) temperatura: più elevata è la temperatura, più è veloce l'ossidazione lipidica
- c) agenti catalizzanti: intesi come radiazioni (luce, UV....) e metalli di transizione quali Fe (ferro), Cu (rame), Mn (manganese), Co (cobalto) accelerano il processo ossidativo
- d) la pressione dell'ossigeno: se nel sistema c'è un'elevata pressione parziale di ossigeno, questo comporta una maggior solubilizzazione del gas nell'alimento e quindi un aumento della velocità di assorbimento dell'ossigeno stesso
- e) capacità del sistema di trattenere i gas: alcuni alimenti sono più propensi a trattenere i gas (tra cui l'ossigeno) rispetto ad altri, i liquidi ad esempio, trattengono meglio i gas dei solidi

f) la presenza di enzimi: alcuni enzimi come la lipossigenasi catalizzano l'ossidazione degli acid grassi insaturi, oppure le lipasi che promuovono la liberazione di acidi grassi (principale substrato dell'ossidazione lipidica)

g) la presenza di sostanze antiossidanti rallenta il processo ossidativo

(Conte L. 2004).

Per l'ossigeno tripletto  $^3\text{O}_2$  si intende l'ossigeno allo stato fondamentale che possiede due elettroni con spin paralleli e se viene immerso in un campo magnetico può assumere tre livelli di energia leggermente diversi fra loro: da qui l'origine della dicitura ossigeno tripletto. (Cozzi et al., 1998).

L'ossigeno tripletto non è in grado di reagire con un acido grasso insaturo RH, perché questa reazione è termodinamicamente sfavorita; gli acidi grassi sono in uno stato di singoletto, ovvero lo spin totale della molecola è uguale a zero ed in presenza di campi magnetici esterni la molecola assume un solo livello energetico. La reazione tra una molecola allo stato di singoletto, come l'acido grasso RH, e una molecola allo stato di tripletto, come  $^3\text{O}_2$ , è sfavorita a causa dello stato di conservazione dello spin della molecola di acido grasso.

La reazione di autossidazione è possibile tra ossigeno tripletto e il radicale libero  $\text{R}^\bullet$  e si svolge secondo il tipico andamento delle reazioni radicaliche, formando idroperossidi e composti volatili.

Nella reazione di autossidazione si distinguono tre fasi principali:



Figura 1: schema delle tre principali fasi dell'autossidazione lipidica (Conte et al., 2004)

Nella fase di **iniziazione o induzione** si forma un radicale libero  $\text{R}^\bullet$  per distacco di un atomo di idrogeno da gruppo metile in alfa al doppio legame di un acido grasso insaturo; il calore, la

presenza di metalli catalizzatori, le radiazioni nella luce visibile e nell'ultravioletto sono i fattori che danno il via a questa prima fase del processo di ossidazione lipidica e vengono per ciò chiamati iniziatori.

### Seconda fase: *propagazione*

Iniziatori e lipidi insaturi reagiscono formando dei radicali alchilici  $R^\bullet$  i quali reagiscono velocemente con l'ossigeno tripletto  $^3O_2$  formando radicali perossili  $ROO^\bullet$ . Il radicale perossile può strappare un idrogeno ad un altro acido grasso insaturo RH, originando così un idroperossido ROOH e un radicale libero  $R^\bullet$ . La formazione di un idroperossido a partire da un acido grasso insaturo, comporta uno spostamento del doppio legame che viene così stabilizzato per risonanza.

Nella fase di propagazione avvengono tutta una serie di reazioni che portano alla formazione di nuovi radicali e di idroperossidi (prodotti primari dell'ossidazione): gli idroperossidi vengono decomposti in radicali perossili  $ROO^\bullet$  e radicali alcossili  $RO^\bullet$ .

I radicali alcossili  $RO^\bullet$  sono il substrato per la formazione dei composti secondari dell'ossidazione lipidica: idrocarburi, esteri, aldeidi, chetoni, alcoli, acidi organici, ecc. Quindi alcuni dei radicali alcossili vengono decomposti, mentre altri continuano a partecipare alla formazione di specie radicaliche reagendo con idroperossidi e acidi grassi.

### Terza fase: *terminazione*

In questa fase tutti i radicali presenti fase di propagazione hanno reagito fra loro e si trasformano in specie chimiche stabili, come ROOR, ROH, ROR, R-R. (Conte L. 2004.).

## 1.2.2 FOTOSSIDAZIONE

Il principale meccanismo dell'ossidazione dei lipidi è quello in cui partecipa l'ossigeno tripletto, ma non è il solo perché anche l'ossigeno singoletto può svolgere un ruolo importante; l'ossigeno nello stato eccitato di singoletto è in grado di reagire direttamente con i composti organici (tra cui gli acidi grassi insaturi) per 2 motivi:

- l'ossigeno singoletto  $^1O_2$  ha un'energia superiore all'ossigeno tripletto
- l'ossigeno singoletto  $^1O_2$  non ha una barriera di spin come l'ossigeno tripletto, perché anche gli acidi grassi insaturi sono allo stato di singoletto

Per ossigeno singoletto  $^1O_2$  si intende l'ossigeno molecolare con spin totale è uguale a zero, la molecola di ossigeno si trova in stato di singoletto perché in presenza di campi magnetici manifesta un solo livello energetico. Se una molecola allo stato di singoletto assorbe un quanto di energia radiante ( $h\nu$ ), in seguito allo spostamento di un elettrone in un livello vibrazionale di uno stato elettronico più alto, la molecola allo stato "eccitato" (Cozzi et al., 1998). Nel caso dell'ossigeno

singoleto, perché esso possa passare dallo stato fondamentale (ossigeno tripletto  $^3\text{O}_2$ ) a quello di singoletto eccitato, è necessario che sia presente una sostanza che assorba e trasferisca l'energia delle radiazioni luminose (visibile, UV): questa sostanza è nota come fotosensibilizzante (Sen). Perché si formi l'ossigeno singoletto è quindi necessaria un'interazione luce, sostanza fotosensibilizzante e ossigeno fondamentale (tripletto).

Il processo di fotossidazione degli acidi grassi inizia con l'assorbimento di luce da parte del fotosensibilizzante ( $^1\text{Sen}$ ), in cui un elettrone passa ad un livello energetico superiore, portando il fotosensibilizzante ad uno stato energetico di singoletto eccitato ( $^1\text{Sen}^*$ ). La sostanza fotosensibilizzante allo stato di singoletto eccitato può essere convertita, attraverso un'interconversione di sistema (ISC), allo stato di tripletto eccitato ( $^3\text{Sen}^*$ ), che corrisponde all'intermedio reattivo nella fotossidazione; a questo punto  $^3\text{Sen}^*$  può seguire due vie per l'ossidazione dei lipidi, la via di I tipo o la via di II tipo.

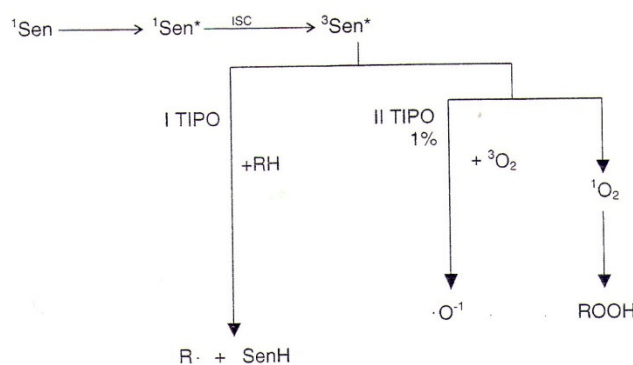


Figura 2:schema della reazione di fotossidazione degli acidi grassi (Conte et al.,2004)

Nella **via di I tipo** viene trasferito un elettrone dal fotosensibilizzante allo stato di tripletto eccitato ( $^3\text{Sen}^*$ ), ad un substrato RH, come un acido grasso insaturo. Si producono dei radicali liberi  $\text{R}^\bullet$  o ioni radicali. Il fotosensibilizzante allo stato di tripletto eccitato ( $^3\text{Sen}^*$ ) può agire come iniziatore di radicali liberi nella fase di induzione dell'autossidazione degli acidi grassi insaturi.

Nella **via di II tipo** il fotosensibilizzante allo stato di tripletto eccitato ( $^3\text{Sen}^*$ ) reagisce con l'ossigeno tripletto  $^3\text{O}_2$  portando entrambi i reagenti allo stato di singoletto ( $^1\text{Sen}$  e  $^1\text{O}_2$ ); l'ossigeno singoletto costituisce la forma eccitata dell'ossigeno che è in grado di reagire direttamente con gli acidi grassi insaturi, allo stato di singoletto, formando gli idroperossidi ROOH (prodotti primari dell'ossidazione lipidica).

L'ossigeno singoletto reagisce con un acido grasso insaturo secondo una reazione di tipo "ene" (Figura 3): l'ossigeno si lega ad una estremità del doppio legame e contemporaneamente estrae un protone allilico (carbonio più distante del carbonio in  $\alpha$  al doppio legame); si forma poi un

nuovo doppio legame tra il carbonio in posizione allylica e l'altra estremità del doppio legame originale. In questo passaggio il doppio legame passa da *cis* a *trans*.

Nella via di tipo II può formarsi anione superossido  $O^{-1}$  attraverso il trasferimento di un elettrone dal fotosensibilizzante (allo stato di tripletto eccitato  $^3Sen^*$ ) all'ossigeno tripletto. Nella realtà solo l'1% dell'ossigeno tripletto viene convertito in anione superossido, mentre quasi tutta l'energia trasferita dal fotosensibilizzante (allo stato di tripletto eccitato  $^3Sen^*$ ) all'ossigeno tripletto  $^3O_2$ : si forma così l'ossigeno singoletto  $^1O_2$  (Conte L. 2004).

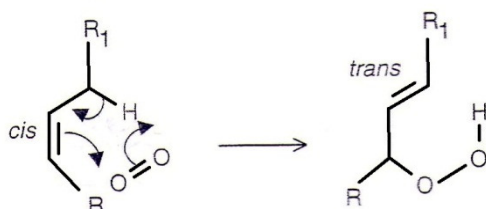


Figura 3 :reazione di tipo “ene” tra ossigeno singoletto e un acido grasso insaturo *cis*(Conte et al.,2004)

### 1.3. OLIO E ACQUE DI VEGETAZIONE

#### 1.3.1 PRODUZIONE DELL'OLIO D'OLIVA

I sistemi utilizzati per produrre l'olio d'oliva sono 3, riportati in figura 4:

- Sistema a pressione tradizionale
- Sistema a centrifugazione a tre fasi attraverso Decanter (detto anche a tre uscite)
- Sistema a centrifugazione a due fasi attraverso Decanter (detto anche a due uscite)

in base al sistema impiegato per produrre l'olio d'oliva si producono diversi volumi di olio e di acque di vegetazione, partendo dalla stessa quantità di olive utilizzate.

Il processo di produzione dell'olio d'oliva ha subito dei cambiamenti evolutivi. Il tradizionale processo di pressatura è stato sostituito con la centrifugazione prima attraverso ad un sistema tri-fase, seguito poi da uno bi-fase. Il sistema a pressione è stato sostituito principalmente per 2 motivi era discontinuo e provocava un riscaldamento della pasta, generando così tutta una serie di problematiche relative alla qualità dell'olio. Oggi il più utilizzato in tutto il mondo è sicuramente il moderno sistema di centrifugazione.

Il **sistema trifase** (chiamato anche a tre uscite) venne introdotto nel 1970 per migliorare la resa d'estrazione e produce tre flussi distinti in uscita dal decanter di estrazione:

- 2,7% Olio vergine d'oliva
- 47,8% composti solidi che prendono il nome di “sansa”
- 49,5% acque reflue (acqua di vegetazione derivante dai tessuti molli delle olive + acqua di processo)

Questo tipo di sistema è il più utilizzato in Italia e prevede l'aggiunta di grandi quantitativi di acqua, fino a 0,2 – 0,5 m<sup>3</sup> per ogni tonnellata d'olive. Questo comporta una produzione mondiale di circa **30 milioni di m<sup>3</sup>/ annui di acque reflue** e di circa **0,5 - 0,6 t di sansa vergine** per t di olive lavorate.

Il **sistema a due fasi** (detto anche a due uscite) è stato invece introdotto in Spagna nel 1990: si tratta di un approccio produttivo più moderno ed ecologico poiché riduce drasticamente l'utilizzo d'acqua durante il processo. Questo sistema genera 2 flussi, ovvero olio puro ed un sottoprodotto semi-solido che è una combinazione tra sansa ed acque reflue: questo prodotto prende il nome di sansa semi-solida o rifiuto di frantoio bifase.

L'utilizzo del decanter a due fasi permette di ottenere un olio con un quantitativo di composti fenolici leggermente superiore rispetto a quello ottenuto tramite tri-fase. Tuttavia la maggior parte dei composti fenolici, circa il 98%, rimane nella sansa semi-solida. Inoltre la principale problematica della sansa semisolido è il tenore di umidità che rende la sansa stessa difficilmente trasportabile e lavorabile. (Lorenzini, L. 2011)

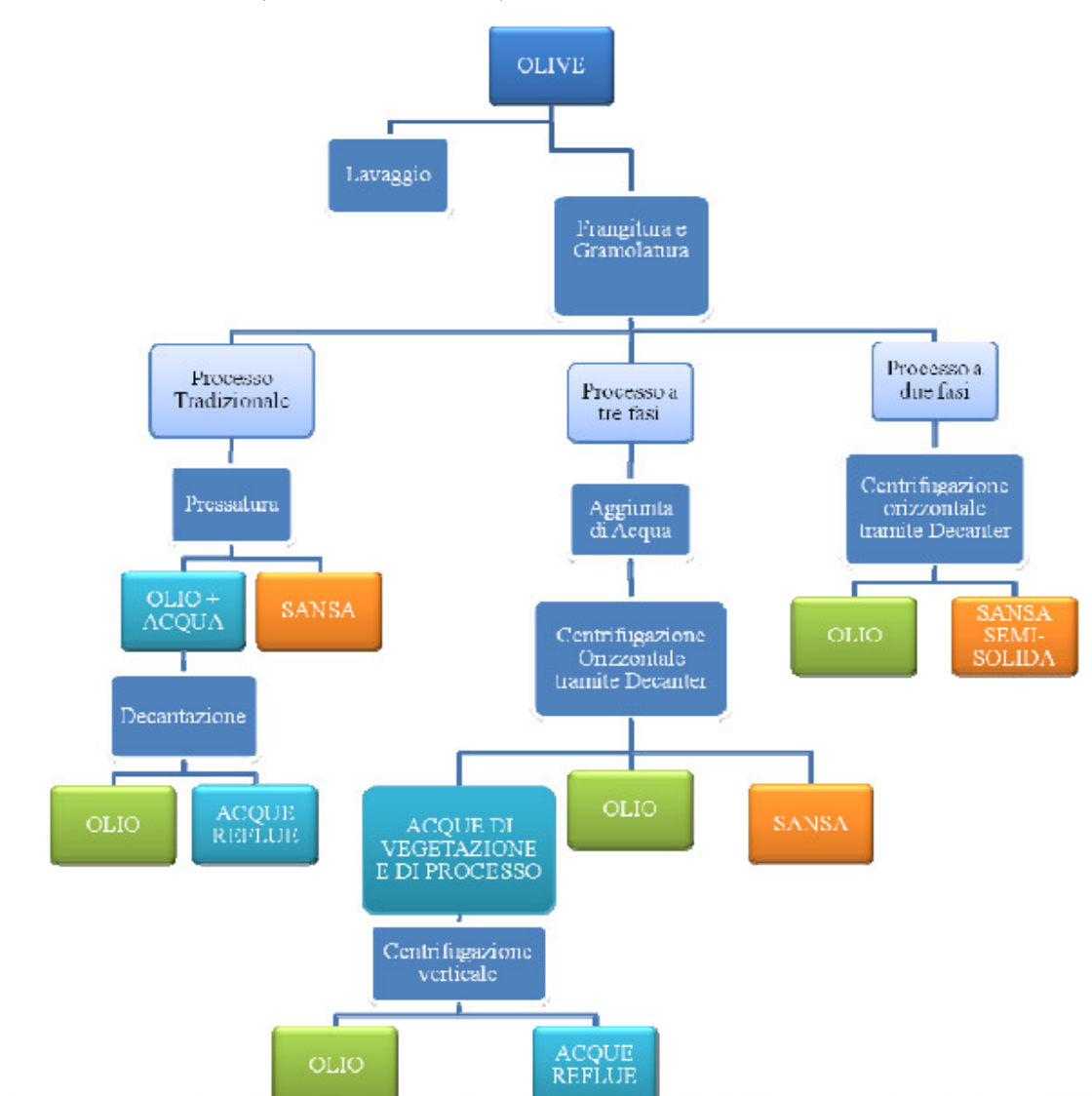


Figura 4: Flow sheet processo estrattivo dell'olio d'oliva (Lorenzini, 2011)

### 1.3.2 COMPOSTI FENOLICI NELL'OLIO E NELLE ACQUE DI VEGETAZIONE

L'olio d'oliva vergine (VOO) è un costituente fondamentale della dieta mediterranea e proprio all'olio d'oliva è stato riconosciuto un ruolo importante nella salute umana. Le attività biologiche dell'olio d'oliva vergine (antiossidante, antinfiammatoria, anti-cancro, chemoprotettiva) sono state associate da numerosi scienziati alla presenza di potenti antiossidanti, come per esempio i fenoli idrofilici. Questi composti fenolici idrofilici rappresentano un gruppo di metaboliti secondari che non sono generalmente presenti in altri oli o grassi. L'olio d'oliva vergine contiene differenti classi di fenoli, come acidi fenolici e alcoli, flavonoidi, lignani e secoiridoidi (Servili et al., 2011).

I composti fenolici sono dei metaboliti secondari di tutto il regno vegetale e si inseriscono nella dieta umana attraverso il consumo di alimenti di origine vegetale. Per quanto riguarda l'oliva, i composti fenolici sono sintetizzati originariamente dalla pianta come difesa nei confronti di molti agenti patogeni (Bianco et al. 1999), ma molti dei fenoli presenti nell'olio vergine di oliva si formano durante il processo di estrazione a partire da quelli già presenti nella drupa. Durante la frangitura, gramolatura ed estrazione i composti fenolici della drupa vengono biotrasformati (Pannelli et al. 1991; Servili et al 1996).

Dal punto di vista chimico i composti fenolici sono delle sostanze che presentano come unità di base un gruppo fenolico, cioè un anello benzenico a cui è legato un gruppo ossidrilico. La classe dei composti fenolici include sia composti semplici, monomeri, sia composti polimerizzati (come i tannini). Durante la conservazione degli alimenti, i composti fenolici più semplici tendono a polimerizzare formando polimeri condensati ad elevato peso molecolare (Lorenzini, 2011.).

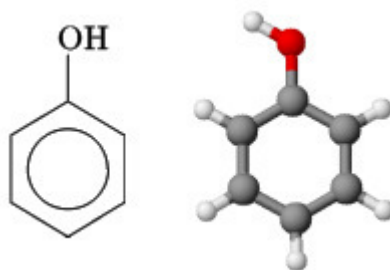


Figura 5:Struttura del fenolo (Lorenzini, 2011)

Chimicamente parlando i fenoli sono molecole anfipatiche, presentano cioè sia un gruppo idrofilico (gruppo ossidrilico) che un gruppo idrofobico (l'anello aromatico).La maggior parte dei composti fenolici in natura si trova coniugata principalmente ad una molecola di zucchero. Nell'olio d'oliva i composti fenolici conferiscono il gusto tipico e l'aroma amaro e fruttato. Come vedremo più avanti, questi composti si oppongono all'autossidazione, contribuendo alla stabilità dell'olio (Conte, 2004).



### 1.3.2.1 Composti fenolici nelle olive

L'oliva è una drupa di di 2-3 cm, dal peso compreso tra 0,5 e 20g (Pannelli 2011) che in base alla *cultivar* può presentare una forma ovoidale o rotonda. La drupa dell'oliva si suddivide in tre parti: epicarpo o buccia, mesocarpo o polpa, endocarpo o pietra.

L'epicarpo è un rivestimento esterno costituito prevalentemente da cere. Durante la maturazione della drupa l'epicarpo è soggetto ad un cambiamento di colore: la drupa passa dal verde chiaro al viola marrone, a volte anche al nero. Il mesocarpo, in mezzo tra epicarpo ed endocarpo, è una polpa carnosa che costituisce quasi dal 70 all'80% del peso del frutto.

L'endocarpo è la parte più interna della drupa, si tratta di un nocciolo legnoso che contiene al suo interno il vero seme con l'embrione; il peso dell'endocarpo varia fra il 13 e il 30 % del peso totale del frutto. (Piccoli, 2012)

L'oliva è formata in media dal 50% di acqua, l'1,6% da proteine, il 19,1% da carboidrati (quali pectine), il 5,8% da cellulosa, l'1,5% da sostanze inorganiche, e il 22% da acidi organici (prodotti intermedi derivanti dai processi degradativi o derivati da altri composti), pigmenti e olio. L'olio che si estrae dalle olive è contenuto quasi totalmente nella polpa.

I fenoli sono presenti a concentrazioni molto basse (1-3%) nella drupa e hanno diversi ruoli:

- agenti antimicrobici
- sono responsabili del grado di doratura della drupa
- conferiscono proprietà organolettiche ed aromatiche tipiche al frutto

La produzione di fenoli da parte della pianta è influenzata da diversi fattori esterni come lesioni della pianta o del frutto, esposizioni alla radiazioni UV; la composizione dei fenoli nella drupa varia a seconda della *cultivar*, della posizione in cui si ritrova il frutto, della stagione, dello stoccaggio, delle condizioni climatiche, della provenienza geografica, delle tecnologie produttive utilizzate nella produzione dell'olio e dello stadio di maturazione del frutto. (Piccoli, 2012)

Durante la maturazione delle olive i livelli dei vari nutrienti cambiano, tra questi i composti fenolici aumentano da 120 a 160 giorni dalla fioritura e calano poi da 160 a 200 giorni dalla fioritura (appunti di lezione).

Le classi di fenoli presenti nella drupa dell'oliva sono riportati nella figura 6, mentre le formule chimiche dei diversi fenoli sono riportati in figura 7 e 8

## COMPOSTI FENOLICI NELLE OLIVE

### FLAVONOLI

Quercitina-3-rutinoside, Luteolina-7-glucoside, Luteolina-5-glicoside, Apigenina-7-glucoside

### ACIDI FENOLICI

Acido clorogenico, acido caffeico, acido *p*-idrossibenzoico, acido protocatecuico, acido vanilico, acido siringico, acido *p*-cumarico, acido *o*-cumarico, acido ferulico, acido sinapico, acido benzoico, acido cinnamico, acido gallico

### ALCOLIFENOLICI

(3-4-diidrossifenil)etanolo (3,4-DHPEA), (*p*-idrossifenil)etanolo (*p*-HPEA)

### SECOIRIDOIDI

Oleuropeina, demetiloleuropeina, Ligstroside, Nuzhenide

### DERIVATI DELL'ACIDO IDROSSICINNAMICO

Verbascoside

Figura 6: Classi dei principali fenoli presenti nelle olive (Ghanbari *et al.*, 2012).

I composti fenolici dell'oliva si trovano in forma coniugata (spesso con degli zuccheri, come il glucosio) per aumentare la tossicità delle molecole nei confronti dei microrganismi e per favorire la solubilizzazione, lo stoccaggio in alcuni compartimenti cellulari e il trasporto delle stesse alle cellule.

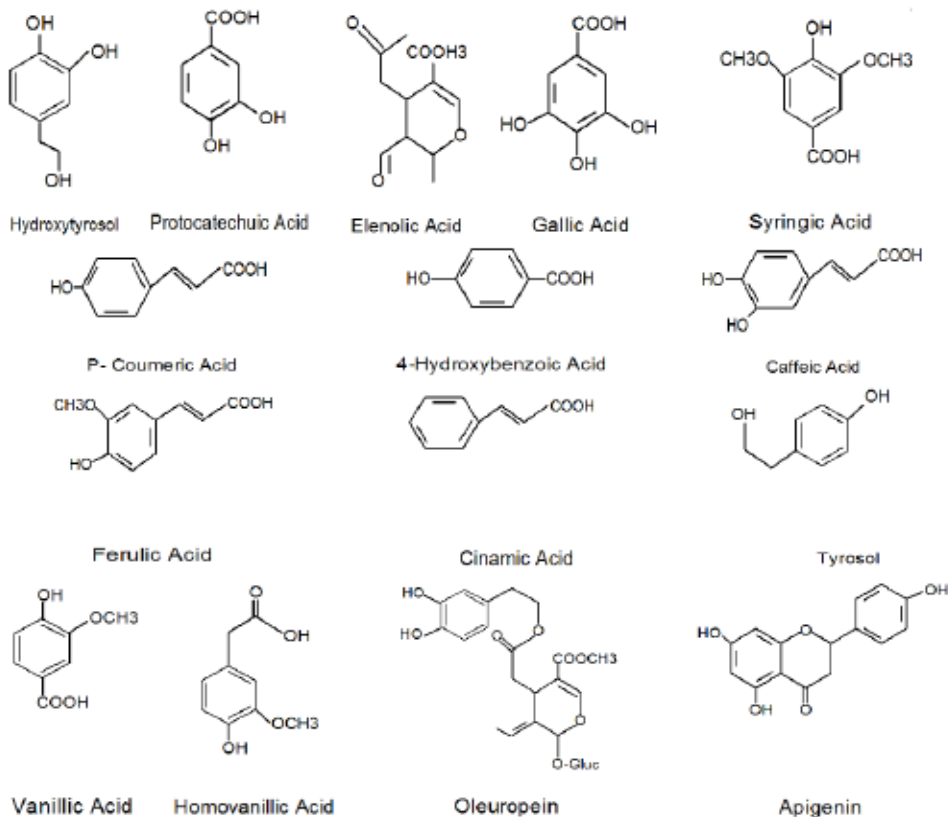


Figura 7: Struttura chimica di alcuni composti fenolici presenti nelle olive/olio (Ghanbari *et al.*, 2012).

I fenoli delle olive si dividono in i fenoli lipofili, come i cresoli, e i fenoli idrofili tra cui troviamo gli acidi fenolici, i flavonoidi, i secoiridoidi e gli alcoli fenolici. I principali polifenoli studiati nelle olive sono gli acidi idrossibenzoici come l'acido vanillico, siringico e gallico che presentano uno scheletro carbonioso di tipo C6- C1 (C6=benzene legato ad un gruppo COOH). Ci sono anche acidi idrossicinnamici (C6-C3 come l'acido caffeico, ferulico e sinapico) e i flavonoidi con struttura chimica C6-C3-C6 come la cianidina. Tra i derivati dell'acido idrossicinnamico c'è il verbascoside. Agli alcoli fenolici appartengono idrossitirosolo (3,4-DHPEA) e il tirosolo (p-idrossifeniletanolo o p-HPEA) (Piccoli, 2012).

Nella drupa i fenoli presenti in maggior quantità sono il tirosolo (p-HPEA) e l'idrossitirosolo (3,4-DHPEA) che sono stati ritrovati rispettivamente in concentrazioni di 19,48 mg/100g di olive e 76,73 mg/100g di olive nello studio condotto da Kountouri et al (2007).

L'oleuropeina è un secoiridoide presente nella drupa dell'oliva che conferisce quel sapore amaro del frutto; in fase di maturazione della drupa, l'oleuropeina scende di concentrazione perché subisce una catalisi chimica o enzimatica che porta alla demetilazione della molecola, formando nuovi composti fenolici. Di contro tirosolo, verbascoside ed idrossitirosolo aumentano di concentrazione durante la maturazione. (Piccoli, 2012).

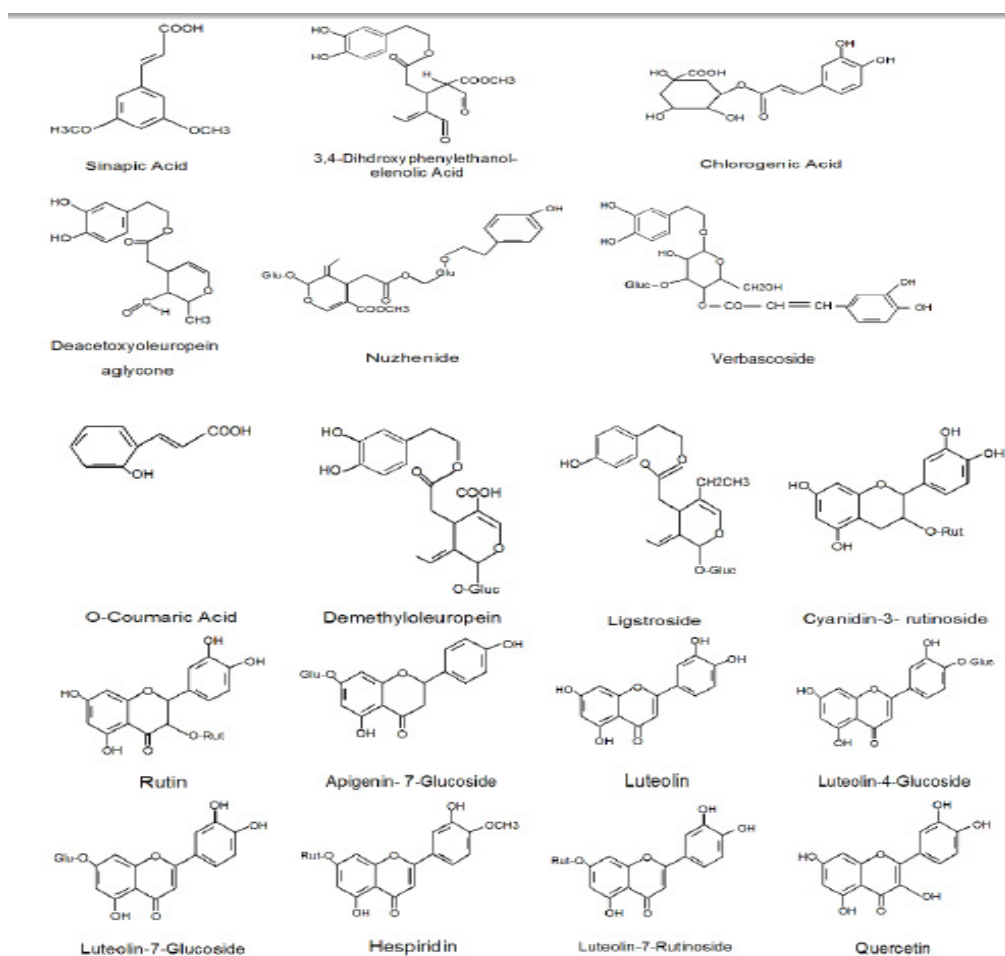


Figura 8 (Continua della precedente figura): Struttura chimica di alcuni composti fenolici presenti nelle olive/olio (Ghanbari *et al.*, 2012).

I principali fenoli dell'oliva si distribuiscono nella drupa come nella Tabella 1 qui di seguito

EPICARPO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Flavonoidi glucosidi</u>: Flavonoli, Flavoni (luteolina-7-glucoside, Apigenina-7-glucoside, rutina, quercetina), Antociani(in forma glucosidica che conferiscono il colore viola alle olive mature, ricordiamo cianidina-3-glucoside, delphinidina...)</li> <li>• <u>Triterpeni</u>: Eritrodiolo, acido oleanolico e maslinico</li> </ul>
MESOCARPO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Acidi fenolici</u>: derivati dall'acido Cinnamico e Benzoico (acido cumarico, ferulico, caffeico , 3,4-diidrossifenilacetico4-idrossibenzoico).</li> <li>• <u>Acidi fenolici derivati</u>: Verbascoside, derivante dall'acido idrossicinnamico.</li> <li>• <u>Alcoli Fenolici</u>: Tirosole(p-HPEA) ed Idrossitirosole(3,4 DHPEA).</li> <li>• <u>Secoiridoidi</u>: Oleuropeina glucoside, Demetiloleuropeina e Ligustroside.</li> <li>• <u>Eteri</u>: Catecolo, Metilcatecolo.</li> </ul>
ENDOCARPO	<p><u>Secoiridoidi</u>: Oleuropeina glucoside, Demetiloleuropeina, Nüzhenide.</p>

Tabella 1: principali fenoli dell'oliva si distribuiscono nella drupa

### 1.3.2.2 Composti fenolici nell'olio d'oliva

Durante la lavorazione delle olive per la produzione dell'olio d'oliva vergine, i composti fenolici di partenza presenti nelle olive mature:

- in parte rimangono tali,
- in parte si trasformano,
- in parte vengono persi.

I composti fenolici nell'olio d'oliva sono presenti in concentrazioni che variano tra 40-90 mg/Kg di estratto metanolico (Baldioli et al., 1996), comunque la cultivar, il clima, il sistema di estrazione, le condizioni di lavorazione e di stoccaggio sono i fattori che più influiscono sul contenuto fenolico dell'olio (Pannelli et al. 2011). I composti fenolici rappresentano dei composti minori all'interno dell'olio d'oliva: in un olio estratto dalle olive di varietà *Frantoio* gli acidi grassi come l'oleico (78,2%), palmitico (9,5 %), stearico (2,9%), linoleico (7,4%), linolenico (0,6%) costituiscono la maggior parte dei componenti totali (Aparicio et al., 2002).

I principali composti fenolici presenti nell'olio d'oliva vergine sono quelli riportati nella tabella 2 qui di seguito.

ACIDI FENOLICI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Derivati dall'acido Cinnamico (acido caffeico, acido cumarico, acido ferulico)</li> <li>• Derivati dell'acido Benzoico (acido gallico, acido vanillico, acido siringico).</li> </ul>
FENILETIL ALCOLI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tirosolo (p-HPEA)</li> <li>• Idrossitirosolo (3,4-DHPEA)</li> </ul>
SECOIRIDOIDI AGLICONI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isomero dell'Oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EA, dove EA sta per "acido elenolico")</li> <li>• Ligustroside aglicone (p-HPEA-EA)</li> <li>• Forma aldeidica dell'oleuropeina aglicone</li> <li>• Forma aldeidica del ligustroside aglicone</li> </ul>
FORME DIALDEIDICHE DEI SECOIRIDOIDI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Decarbossimetil oleuropeina aglicone (3,4 DHPEA-EDA o Forma dialdeidica dell'acido elenolico (EDA) legata al 3,4-DHPEA)</li> <li>• Decarbossimetil ligustroside aglicone (p-HPEA-EDA o forma dialdeidica dell'acido elenolico legata al p-HPEA)</li> </ul>
TERPENI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Squalene.</li> </ul>
LIGNANI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pinoresinolo</li> <li>• Acetossipinoresinolo</li> <li>• Idrossipinoresinolo</li> </ul>
FLAVONOIDI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flavoni: Apigenina, Luteolina</li> <li>• Flavonoli: Tassifolina</li> </ul>
IDROSSI-ISOCROMANI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1-fenil-6,7-diidrossi-isocromano</li> <li>• 1-(3'-metossi-4'-idrossi)fenil-6,7-diidrossi-isocromano</li> </ul>

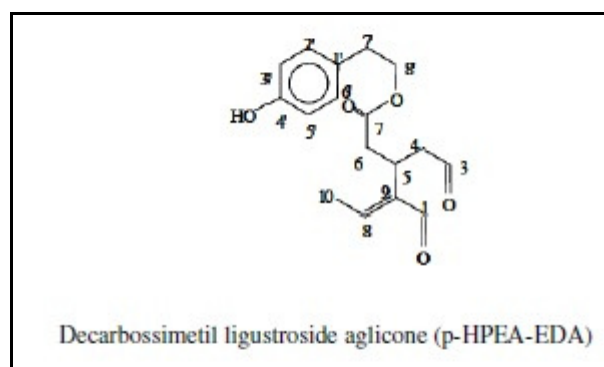
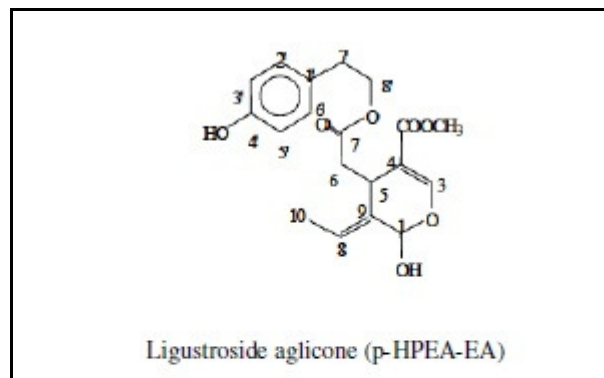
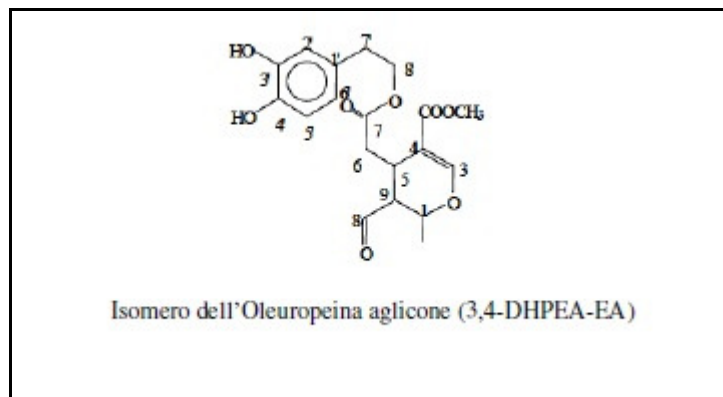
Tabella 2: Composti fenolici presenti nell'olio d'oliva (Lercker 2011, Boskou 2006)

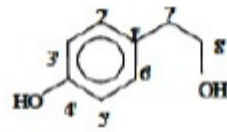
Il composto fenolico maggiormente presente nell'olio è la forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenoico che deriva principalmente dall'oleuropeina aglicone e dal ligostride

aglicone. Nell'olio d'oliva, rispetto al frutto, aumentano la concentrazione alcoli fenolici quali tirosolo (*p*-HPEA) e idrossitirosolo (3,4-DHPEA) per effetto di processi di idrolisi dei secoroididi quali 3,4-DHPEA-EDA (3,4-diidrossifenil-etanolo legato alla forma dialdeidica dell'acido elenolico), il *p*-HPEA-EDA (*p*-idrossifeniletanolo legato alla forma dialdeidica dell'acido elenolico) e il 3,4-DHPEA-EA (3,4-diidrossifenil-etanolo legato all'acido elenolico). I secoroididi sono composti agliconi, cioè slegati dal glucosio (Piccoli 2012), perché nella produzione dell'olio d'oliva entrano in azione delle  $\beta$ -glucosidasi che rompono il legame tra il glucosio e l'acido elenoico (EA) dei secoroididi, dando vita alla serie di composti agliconi sopra citati(Lorenzini, 2011).

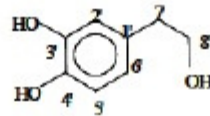
Nell'olio d'oliva si ritrovano anche altri fenoli quali i lignani, che sono principalmente rappresentati dal (+)-1-acetossipinoresinolo e dal (+)-1-pinoresinolo.

Di seguito sono riportate le formule dei principali composti fenolici dell'olio.

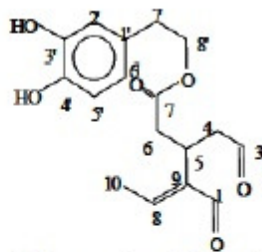




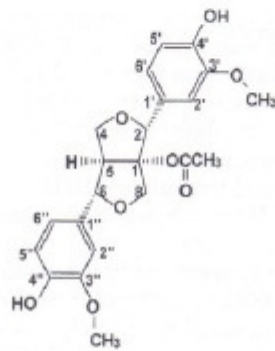
Tirosolo (p-HPEA)



Idrossitirosolo (3,4-DHPEA)



Decarbossimetil oleuropeina aglicone (3,4 DHPEA-EDA)



Acetossipinoresinolo

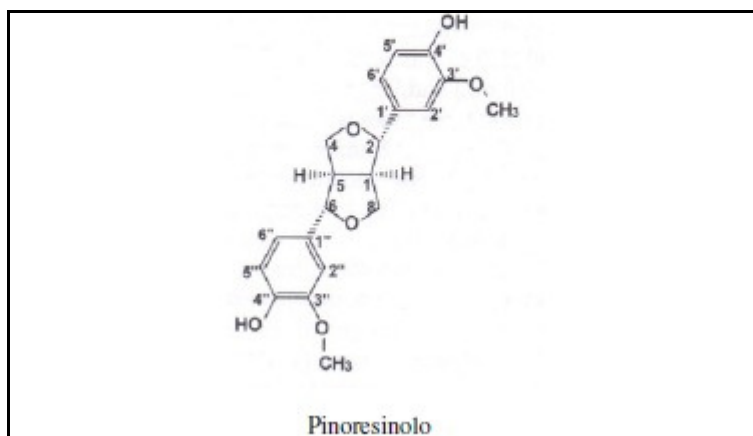


Figura 9: Principali composti fenolici dell'olio d'oliva

### 1.3.2.3 Composti fenolici nell'acqua di vegetazione

Nella descrizione del punto 1.3.1 abbiamo visto quali sono i diversi sistemi di estrazione dell'olio dall'oliva: sistema tradizionale, sistema di centrifugazione a tre fasi, sistema di centrifugazione a due fasi. Negli ultimi due sistemi di estrazione si formano dei sottoprodotti di lavorazione quali sansa ed acqua di vegetazione che comunemente si chiamano output di lavorazione. La quantità di acqua e sansa che si formano in fase di estrazione varia a seconda del sistema di centrifugazione, come riportato in figura 10.

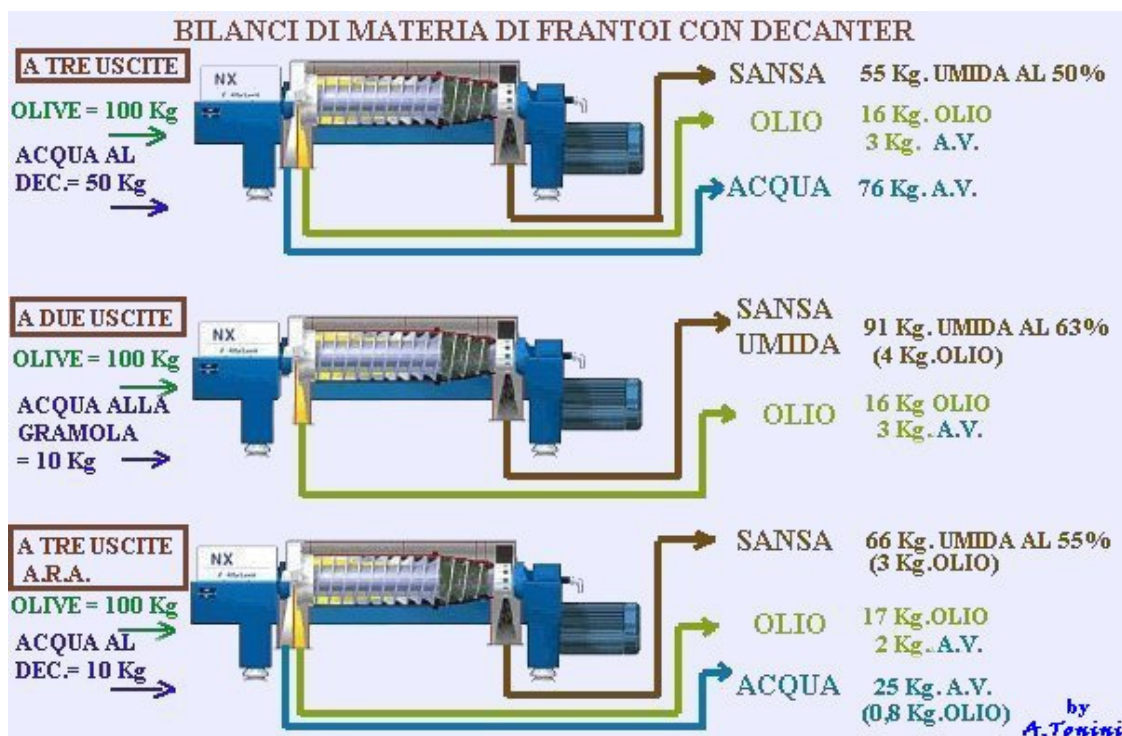


Figura 10: appunti di lezione

La sansa è una miscela solida di polpa d'oliva e noccioli molto umida (umidità relativa del 50% per un sistema di centrifugazione a tre fasi, mentre umidità relativa al 63% in un sistema di



centrifugazione a due fasi) la cui composizione varia a seconda che si tratti di una sansa ottenuta tramite un sistema di centrifugazione a due o tre fasi.

L'acqua di vegetazione è l'acqua che esce dal decanter in fase di estrazione. L'acqua di vegetazione presenta un elevato carico organico e minerale (principalmente potassio, fosforo, sodio, calcio, ferro, magnesio, composti dell'azoto) oltre che una notevole quantità di solidi sospesi (190 g/L), un alto rapporto C/N ed un elevato quantitativo di composti fenolici; il pH si aggira attorno ad un intervallo di 4-6.

L'elevato carico organico (dai 3 ai 16 g/100g) e la sua composizione rendono l'acqua di vegetazione un buon substrato per i microrganismi del suolo e dei corsi d'acqua, ma l'elevata presenza di composti fenolici la rendono resistente alla degradazione microbica: per questo motivo l'acqua di vegetazione non può essere riversata direttamente nei fiumi e sul suolo. La componente organica contiene proteine, lipidi, zuccheri solubili (glucosio, saccarosio, fruttosio), polisaccaridi (emicellulose e pectine), oligosaccaridi, polioli. (Lorenzini, 2011).

Parametro	Intervallo
Sostanza secca (%)	6,33 – 7,19
pH	4,5 – 6
Materiale organico (%)	3 – 16
C/N	52,3 – 54,3
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (g/l)	0,31 – 0,7
K <sub>2</sub> O (g/l)	2,37 – 10,8
Ca (g/l)	0,2 – 0,64
Na (g/l)	0,11 – 0,42
Mg (mg/l)	44 – 220
Fe (mg/l)	18,3 – 120
Cu (mg/l)	1,5 – 6
Mn (mg/l)	1,1 – 12
Zn (mg/l)	2,4 – 12
Densità (g/cm <sup>3</sup> )	1,02 – 1,048
Lipidi (%)	0,03 – 2
Carboidrati (%)	1 – 8
Sostanze azotate (%)	1,2 – 2,4
Fenoli (%)	0,34 – 1,13
COD (g/l) <sup>3</sup>	40 – 220
BOD <sub>5</sub> (g/l) <sup>4</sup>	15 – 120

Tabella 3: Caratteristiche chimico-fisiche delle acque reflue di frantoio (Morillo et al. 2009; Amirante 2011)

Nell'acqua di vegetazione il contenuto in fenoli può raggiungere i 10 g/L: questa quantità rappresenta il 98% dei fenoli presenti inizialmente nella drupa, infatti solamente il 2% dei fenoli è trasferito all'olio (Tafesh, 2012).

I principali composti fenolici presenti nell'acqua di vegetazione delle olive sono il tirosolo (p-HPEA) 0,02 g/L, l'idrossitirosolo (3,4- DHPEA) 0,01 g/L, oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EDA) 4,1 g/L e il verbascoside 0,7 g/L (Servili et al., 2011); naturalmente sono stati individuati anche tutta una serie di altri composti fenolici (tabella 4)

L'idrossitirosolo presente nell'acqua di vegetazione sembra che si formi a causa dell'idrolisi dell'oleuropeina durante il processo di produzione dell'olio d'oliva, oppure a causa di un'idrolisi acida dei derivati secoiridoidi (Lorenzini, 2012).

<u>Secoiridoidi derivati</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oleuropeina aglicone</li> <li>• Decarbossimetil oleuropeina aglicone,</li> <li>• Isomero dell'oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EA, dove EA sta per "aldeide acido elenolico")</li> <li>• Ligustroside aglicone (p-HPEA-EA)</li> <li>• Verbascoside</li> <li>• Forma dialdeidica dell'acido elenolico (EDA) legata al 3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA)</li> <li>• Forma dialdeidica dell'acido elenolico legata al p-HPEA (p-HPEA-EDA)</li> </ul>
<u>Acidi Fenolici</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acido vanillico e caffeico</li> </ul>
<u>Fenil alcoli</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tirosolo (p-HPEA o p-idrossifeniletanolo)</li> <li>• Idrossitirosolo (3,4-DHPEA o 3,4-diidrossifeniletanolo).</li> </ul>
<u>Flavonoidi</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luteolina</li> <li>• Luteolina 7-glucoside</li> </ul>
<u>Esteri</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metili oleoside estere</li> <li>• Oleoside dimetil estere</li> </ul>
<u>Tri-terpeni</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eritrodiole</li> <li>• Acido oleanolico</li> <li>• Acido maslinico</li> </ul>

Tabella 4: Composti fenolici individuati nelle acque reflue di frantoio(Lorenzini, 2011)

## 1.4 ESTRAZIONE DEI COMPOSTI FENOLICI DALL'ACQUA DI VEGETAZIONE

### 1.4.1 METODI PER LO SMALTIMENTO DEI SOTTOPRODOTTI DELLA PRODUZIONE DELL'OLIO D'OLIVA

L'acqua di vegetazione ottenuta dalla produzione dell'olio d'oliva (OVW olive vegetation water) presenta un notevole problema dal punto di vista ambientale. Nel corso degli anni si sono ipotizzati vari metodi di smaltimento ed applicazione dei sottoprodotti della lavorazione delle olive (sansa e acqua di vegetazione):

- biorisanamento dei reflui attraverso trattamenti chimico-fisici o biologici
- ammendamento naturale: le sansa vergini vengono sparse in modo controllato sul terreno come fertilizzante
- produzione di compost a partire dalle sansa
- utilizzo come combustibile: trattamento combinato di sansa e acqua di vegetazione
- conversione in biocarburanti: si parte dai rifiuti ligno-cellulosici come la sansa che viene biodegradata in appositi serbatoi
- substrato per la crescita batterica: partendo da acque reflue combinate con altri substrati solidi, si permette la crescita di microrganismi con un aumento della loro biomassa
- produzione di biopolimeri ed enzimi partendo dai reflui del frantoio: l'attenzione principale è quella di ottenere plastiche biodegradabili
- fertirrigazione: spandere l'acqua di vegetazione sul terreno come fertilizzante per specie arboree
- bio-integratori agricoli: polimeri organici, estratti da acque di vegetazione, e trasformati in derivati metallici sono risultati fitotossici, da qui la possibilità di utilizzare le frazioni polimeriche come bio-integratori metallici
- arricchimento dell'olio: a partire da un concentrato fenolico, ottenuto da acque reflue di frantoio, è stato eseguito un arricchimento, in termini di profilo fenolico, di un olio. Questo

aumento della componente fenolica ha generato miglioramenti nei confronti delle proprietà salutistiche, sensoriali e della shelf-life di questo prodotto.

- isolamento di composti fenolici: i composti fenolici possono essere impiegati come integratori nella formulazione di mangimi per la dieta di animali da produzione, quali per esempio il suino pesante (Lorenzini, 2011)

Un'altra possibilità è quella di isolare i composti fenolici dall'acqua di vegetazione del frantoio ed utilizzarli come arricchimento nella produzione di alcuni alimenti: produrre alimenti funzionali a base di latte fermentato oppure aggiungere i composti fenolici nell'impasto di insaccati da stagionare.

Da questa ultima considerazione nasce la necessità di estrarre ed isolare i composti fenolici dall'acqua di vegetazione della produzione dell'olio d'oliva (OVW).

#### 1.4.2 OTTENERE CPC DALL'ACQUA DI VEGETAZIONE

I composti fenolici sono ottenuti in un aggregato che si chiama concentrato fenolico crudo (CPC) mediante il passaggio dell'acqua di vegetazione (OVW) in una serie di membrane; tutto questo entro 24 ore dall'estrazione dell'acqua stessa.

L'acqua di vegetazione è stata preventivamente trattata con enzimi ad attività emicellulosica-pectinasi (Preparazione enzimatica O S-Max, OE Italia Srl, Marsala, Italia). Tale preparato enzimatico è stato aggiunto all'acqua di vegetazione (500 gr/t) e fatto agire a temperatura ambiente (20°C) per 12 ore. Successivamente l'acqua è stata sottoposta ad microfiltrazione a membrana, ultrafiltrazione ed osmosi inversa come riassunto nel flow-chart (Figura 11). Tutto il processo è avvenuto a temperatura controllata (20°C) attraverso uno scambiatore di calore, ed in atmosfera satura di N<sub>2</sub> per ridurre la quantità di O<sub>2</sub> nello spazio di testa dei contenitori durante e dopo il processo di filtrazione. Per la microfiltrazione è stata impiegata una membrana tubolare in polipropilene (pori di 0,1-0,3 µm) con una superficie totale di 8 m<sup>2</sup>. L'ultrafiltrazione è invece eseguita con due membrane a spirale in poliammide e tracce di polisulfone, (pori di 7 kDa) con una superficie totale di 16 m<sup>2</sup>. Nella fase di osmosi inversa è stata invece impiegata una membrana a spirale ed a film-sottile (TFM), composta da Durasan™ e polisulfone con una superficie totale di 9 m<sup>2</sup>. Questa membrana è in grado di trattenere molecole con un peso di 100 Dalton. Tutte le membrane sono state acquistate da Permeare S.r.l. (Milano, Italia).

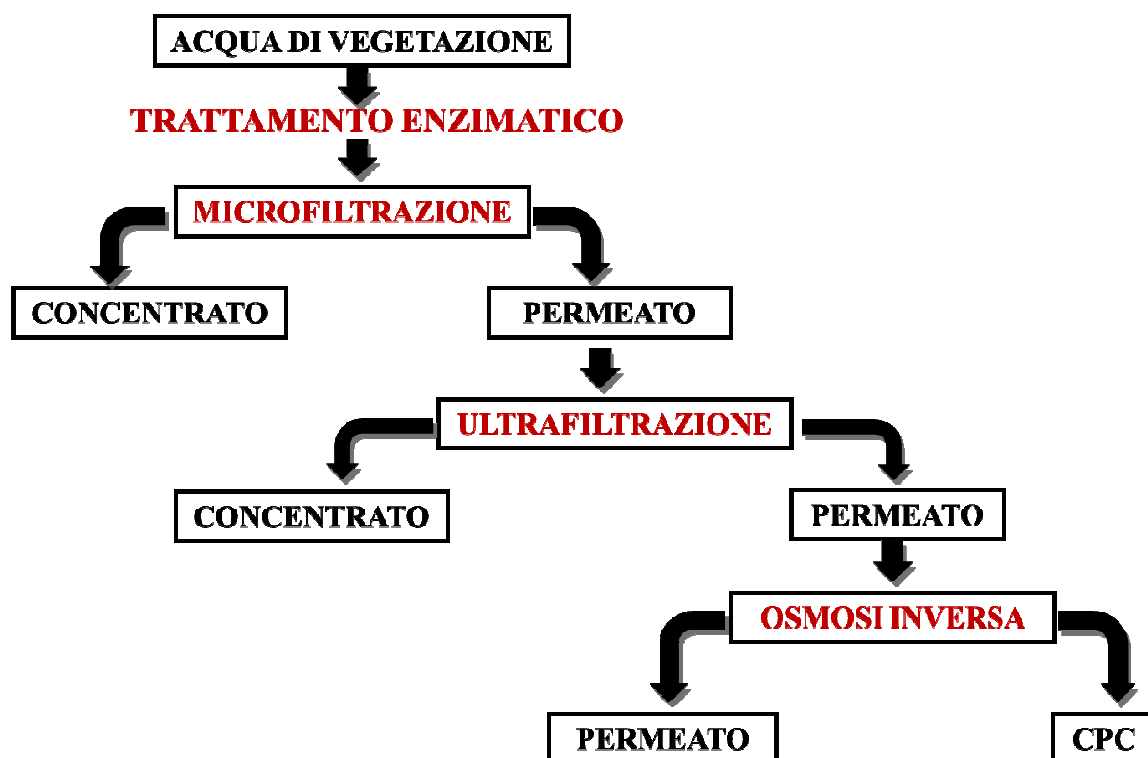


Figura 11: Flow-chart di produzione del concentrato crudo fenolico (CPC) (Servili et al.,2011)

Il CPC ottenuto presenta un contenuto in fenoli totali di 19,3 g/L e la sua composizione si può riassumere nella figura 12:

Compound	OVW		CPC	
<i>Phenols (g/l)</i>				
3,4-DHPEA <sup>2</sup>	0.01	(0.01)a	0.03	(0.003)b
p-HPEA	0.02	(0.04)a	0.01	(0.001)b
3,4-DHPEA-EDA	4.1	(0.1)a	16.9	(1.7)b
Verbascoside	0.7	(0.1)a	2.4	(0.2)b
Total phenols	4.9	(0.2)a	19.3	(1.7)b
<i>Volatile compounds (µg/l)</i>				
<i>Aldehydes</i>				
Hexanal <sup>2</sup>	1410	(106)a	1010	(75.5)b
(E)-2-Pentenal	44.0	(2.9)a	395	(25.6)b
(E)-2-Hexenal	187	(14)a	3280	(246)b
<i>Alcohols</i>				
1-Penten-3-ol	677	(37.2)a	6930	(381)b
1-Pentanol	442	(36.8)a	970	(63.1)b
(E)-2-Penten-1-ol	828	(53.8)a	5120	(333)b
1-Hexanol	2590	(142)a	9550	(406)b
(E)-3-Hexen-1-ol	350	(19.2)a	910.0	(65.1)b
(Z)-3-Hexen-1-ol	2840	(156)a	5735.0	(315)b
(Z)-2-Hexen-1-ol	870	(47.8)a	1432.0	(78.8)b
<i>Esters</i>				
Hexyl acetate	n.d.		n.d.	
(Z)-3-Hexenyl acetate	n.d.		n.d.	

OVW = olive-vegetation water, CPC = crude phenolic concentrate; n.d. = not detected.

<sup>2</sup> The phenolic and the volatile contents are the mean values of four independent experiments; numbers in parentheses represent  $\pm$  standard deviation. Values in each row relative to the two methods bearing the same letter next to the value were not significantly different ( $p < 0.01$ ).

Figura 12 :composizione dei composti fenolici e volatili nell'acque di vegetazione e nel concentrato crudo fenolico (Servili et al., 2011)

La determinazione dei composti fenolici nel CPC è avvenuta attraverso un'analisi HPLC, secondo quanto riportato da Servili et al., (2011) e da questa analisi emerge come l'oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EDA) sia il composto fenolico maggiormente presente con una concentrazione di 16,9 g/L, seguito dal verbascoside 2,4 g/L; nel CPC sono presenti anche tirosolo (p-HPEA) ed idrossitirosolo (3,4-DHPEA) rispettivamente con 0,01 g/L e 0,03 g/L.

La bassa concentrazione dell'idrossitirosolo (3,4-DHPEA) nel CPC è dovuta all'immediato trattamento dell'acqua di vegetazione dopo il processo di estrazione dell'olio d'oliva: l'idrolisi dell'oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EDA) causa un incremento di idrossitirosolo nell'acqua di vegetazione durante lo stoccaggio, ma nella produzione del CPC non avviene questo stoccaggio e quindi l'idrolisi dell'oleuropeina aglicone risulta molto rallentata. (Servili et al., 2011)

Il CPC non è la forma ideale in cui aggiungere i composti fenolici ad un insaccato da fermentare, di fatti il CPC è stato ulteriormente purificato come di seguito.

#### 1.4.3.PURIFICAZIONE CPC: OTTENIMENTO DEL VWPE

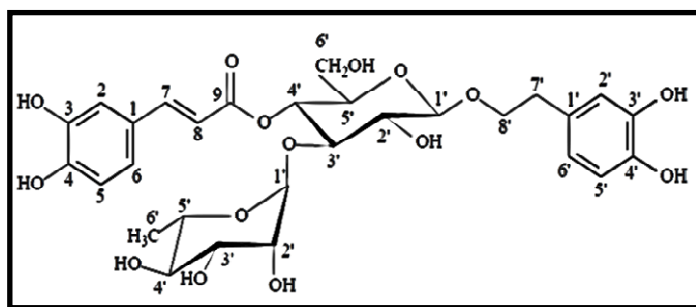
Attraverso un'estrazione liquido-liquido 100 ml CPC sono stati miscelati con 50ml di etile acetato per un minuto, successivamente la fase organica è stata recuperata mentre il residuo acquoso è stato sottoposto ad un'ulteriore estrazione.

L'acqua in eccesso è stata eliminata con sodio solfato anidro aggiunto fino alla saturazione. Quindi la fase organica è stata filtrata su filtro di carta ed esposta alla vaporazione per rimuovere il solvente. Sono seguiti tre lavaggi con etanolo e l'estratto è stato fatto evaporare per rimuovere l'etile acetato residuo. Infine l'estratto è stato sospeso in etanolo per permettere lo stoccaggio a -80°C al riparo da fonti luminose.

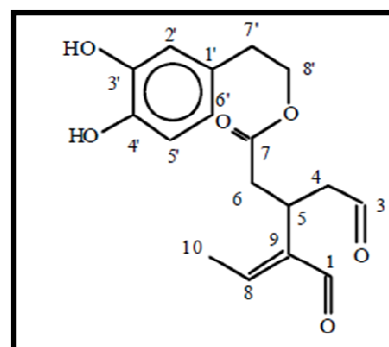
La purezza del VWPE (vegetation water phenolic extract) è del 65%, la composizione fenolica dell'estratto (g/Kg) è riportata in tabella 5 (Piccoli, 2012) e in figura13 .

3,4 DHPEA (idrossitirosolo)	72,7 ± 0,6
p-HPEA (Tirosolo)	17,8 ± 0,1
3,4 DHPEA-EDA	471,7 ± 1,9
VERBASCOSIDE	83,6 ± 1,0
Somma frazioni fenoliche	645,7 ± 2,3
Contenuto fenolico	65

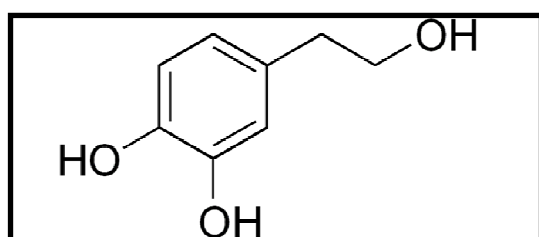
Tabella 5: Composizione dell'estratto fenolico (VWPE) utilizzato per la prova in vitro e come additivo nelle salsicce (Piccoli, 2012).



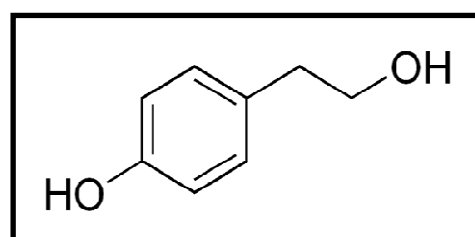
**Verbascoside**



**Decarbossimetil oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EDA)**



**Idrossitirosolo (3,4-DHPEA)**



**Tirosolo (p-HPEA)**

Figura 13: formule dei fenoli che costituiscono l'estratto fenolico (VWPE)

### 1.5.AZIONI DEI FENOLI ESTRATTI DALL'ACQUA DI VEGETAZIONE

Al termine dell'estrazione dei composti fenolici si ottengono 2 fenil alcoli (tirosolo ed idrossitirosolo) e 2 derivati dei secoiridoidi (oleuropeina aglicone e verbascoside), quest'ultimi più concentrati dei primi. Tutti e quattro questi composti sono composti fenolici idrofili, perché sono riusciti a passare nelle acque di vegetazione da cui sono stati estratti, questo è determinato da un basso coefficiente di ripartizione  $K_p$  (olio/acqua) dei biofenoli in particolare come riportato nella

Tabella 6: Coefficiente di ripartizione di alcuni composti presenti nell'olio e nell'acqua di vegetazione (Rodis et al., 2002).

COMPOSTI	$K_p$ (coefficiente di partizione)
Oleuropeina	0,0006
Idrossitirosolo (3,4-DHPEA)	0,0100
Acido protocatechico	0,0390
Tirosolo (p-HPEA)	0,0770
Acido caffeico	0,0890
3,4-DHPEA-EDA	0,1890
3,4-DHPEA-EA	1,4900

Come detto in precedenza, i composti fenolici presentano numerose proprietà utili nei confronti della salute umana, prima fra tutte la funzione antiossidante. Per tale motivo è consigliato il consumo di composti fenolici nella prevenzione di malattie come i tumori, l'arteriosclerosi,

l'invecchiamento cellulare, oltre che nella prevenzione di malattie degenerative: questi composti vanno a contrastare la formazione di radicali liberi che causano il danno cellulare. Alcuni composti fenolici hanno mostrato su alcune linee cellulari (piastrine, leucociti, macrofagi...), rilevanti per le patologie umane, un'azione di modulazione degli enzimi come la lipossigenasi, la ciclossigenasi, la NADPH ossidasi e la ossidonitrico sintasi. L'idrossitirosolo (3,4-DHPEA), per esempio, ha mostrato una serie di funzioni tra cui quella di inibire l'aggregazione piastrinica e quella di inibire la produzione ad opera di leucociti umani di molecole pro-infiammatorie. Inoltre sembra che i composti fenolici agiscano sull'endotelio vascolare e regolino la pressione sanguigna. Un'altra funzione dei composti fenolici è quella di regolare l'attività immunitaria agendo sullo sviluppo di alcuni tumori come quello della pelle. Infatti l'idrossitirosolo sembra inibire le mutazioni a carico del DNA e la nitratura delle tirosine, ad opera dei perossinitriti, mostrando un effetto protettivo da malattie degenerative e croniche (Piccoli, 2012).

### 1.5.1 AZIONE ANTIOSSIDANTE NEGLI ALIMENTI

I composti fenolici estratti dalle acque di vegetazione presentano un'azione antiossidante anche nei confronti dei grassi degli alimenti in cui sono presenti, difatti già nell'olio d'oliva i fenoli proteggono da eventuali ossidazioni indesiderate dei lipidi.

Genericamente per antiossidante si intende una sostanza che, addizionata in basse concentrazioni comparate con quella del substrato ossidabile (come gli acidi grassi insaturi), è in grado di ritardare o prevenire significativamente l'ossidazione del substrato stesso. Da qui si capisce che il ruolo degli antiossidanti è quello di estendere la shelf-life di un alimento.

In base al meccanismo d'azione gli antiossidanti possono essere suddivisi in

- ***antiossidanti primari***

sostanze riducenti che si ossidano al posto dell'alimento, si tratta di composti accettori di radicali liberi, che quindi ritardano o interrompono la propagazione dell'auto o fotossidazione. Gli antiossidanti primari sono molto efficaci nelle fasi di induzione o iniziazione, mentre in presenza di elevate quantità di perossidi non hanno un'elevata attività antiossidante.

- ***antiossidanti secondari***

si tratta di sostanze in grado di ridurre gli antiossidanti primari, quando questi hanno reagito con l'alimento, rendendo l'antiossidante primario nuovamente disponibile per reagire con nuove specie radicaliche. I principali meccanismi d'azione di questi antiossidanti sono: la chelazione di metalli proossidativi, oxygen scavengers (liberano il substrato dall'ossigeno sequestrandolo), singlet oxygen quenchers (disattivare l'ossigeno singoletto), agenti riducenti (riducono gli antiossidanti primari ossidati). Il ruolo di questi antiossidanti è quindi sinergico all'attività degli antiossidanti primari. (Conte, 2004)



I composti fenolici dell'olio d'oliva e delle acque di vegetazione vengono considerati degli antiossidanti primari visto presentano attività di scavenging contro l'anione superossido ( $O^{\cdot -}$ ) ed idrogeno perossido ( $H_2O_2$ ) e soprattutto impediscono la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Lorenzini, 2011). Gli antiossidanti fenolici inibiscono l'ossidazione lipidica catturando un radicale perossido ( $ROO^{\cdot}$ ) secondo due meccanismi:

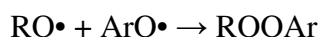
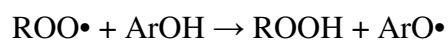


Figura 14: reazioni tra un antiossidante fenolico e un radicale perossido

dove ArOH è il composto fenolico antiossidante, mentre  $ArO^{\cdot}$  è un radicale aromatico con una reattività molto bassa per i lipidi, infatti la formazione di  $ArO^{\cdot}$  riduce la velocità di propagazione dell'ossidazione lipidica. Il radicale dell'antiossidante stabilizza l'elettrone spaiato per risonanza, grazie all'anello aromatico, e partecipa alla fase di terminazione.

Nella prima reazione il radicale idroperossido  $ROO^{\cdot}$  sottrae un idrogeno radicalico dall'antiossidante, si formano così un radicale aromatico  $ArO^{\cdot}$  e un idroperossido ROOH. Nella seconda reazione i due radicali ( $ArO^{\cdot}$  e  $RO^{\cdot}$ ) si combinano formando un dimero non radicalico (ROOAr). Bisogna ricordare che gli ortodifenoli come l'idrossitirosolo (3,4-DHPEA) e l'oleuropeina presentano una maggiore attività antiossidante rispetto a quella di fenoli con minor ingombro sterico, ovvero meno gruppi ossidrilici attaccati all'anello benzenico, come il tirosolo (p-HPEA) (Gambacorta et al., 2009).

In uno studio del 1988 si paragonavano il potere antiossidante di cinque composti aggiunti singolarmente a dell'olio d'oliva raffinato e conservato al buio a 50 °C; alla fine dello studio si è stabilito l'effetto di inibizione relativa dell'autossidazione: idrossitirosolo>acido caffeico>BHT (butilidrossitoluene)>oleuropeina>tirosolo. L'idrossitirosolo che risulta avere l'attività antiossidante più elevata, è anche il composto che si degrada più velocemente (Conte, 2004).

Essendo l'acqua di vegetazione ricca di composti fenolici quali oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EA), idrossitirosolo (3,4-DHPEA), tirosolo (p-HPEA), verbascoside, vista l'azione antiossidante di questi composti, esiste la possibilità di utilizzare un estratto fenolico (ottenuto da un sottoprodotto della lavorazione dell'olio), come una miscela di antiossidanti naturali da poter aggiungere nella preparazione di alcuni alimenti con lo scopo di prolungarne la shelf-life degli alimenti stessi.



## **2.SCOPO DELLA TESI**

Gli obiettivi del presente lavoro sono :

1. verificare l'effetto di un estratto fenolico ottenuto dalle acque di vegetazione del frantoio sulla componente lipidica di un **IMPASTO PER INSACCATO** da stagionare.
2. verificare l'effetto di un estratto fenolico ottenuto dalle acque di vegetazione del frantoio sulla componente lipidica di un insaccato stagionato, affettato, posto in atmosfera modificata, stoccato a 4°C ed esposto alla luce



## 3.MATERIALI E METODI

### 3.1.PREPARZIONE DEI SALAMI

#### 3.1.1 SALAMI INTERI

La logica nella preparazione dei salami è stata quella di ottenere 24-26 salami da circa 0,300 kg per ognuna delle tre tesi principali:

1. CONTROLLO: salami che hanno come ingredienti il tritato di carne, il sale (2,6% sul peso del salame), gli starter microbici (0,0125% sul peso) e il glicerolo (2% sul peso del salame)
2. L1: salami che presentano come ingredienti il tritato di carne, il sale (2,6% sul peso del salame), il glicerolo (2% sul peso del salame) gli starter microbici (0,0125% sul peso del salame ovvero 12,5g su 100kg salame) e 75mg/100g impasto di estratto fenolico purificato al 65%.
3. L2: salami che presentano come ingredienti il tritato di carne, il sale (2,6% sul peso del salame), il glicerolo (2% sul peso del salame) gli starter microbici (0,0125% sul peso del salame ovvero 12,5g su 100kg salame) e 150mg/100g impasto di estratto fenolico purificato al 65%.
4. In aggiunta si vogliono ottenere almeno 8 salami normali, detti BIANCO perché contengono solo: il tritato di carne, il sale (2,6% sul peso dei salami) e gli starter microbici (0,0125% sul peso del salame ovvero 12,5g su 100kg salame).

Quindi in totale si volevano ottenere all'incirca 86-90 salami da 0,300 kg.

Nel caso reale i salami prelevati per effettuare le analisi chimiche sulla componente lipidica sono stati prelevati da un pool di 86 salami (42 coppie e 2 singoli) destinati anche ad altre analisi come l'analisi microbiologica e altre valutazioni chimiche (determinazione del contenuto di cloruri, proteina grezza, azoto non proteico, umidità, pH, aw).

Per la preparazione dei salami sono state utilizzate 4 spalle disossate di suino e 3 pancette sempre di suino, reperite presso un macello. Le spalle sono considerate dei tagli magri, mentre le pancette sono considerate dei tagli grassi. Nella preparazione dei salami, oltre ai tagli di carne, sono stati aggiunti altri ingredienti quali:

- colture di avviamento "starter microbici" delle specie *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosum*.
- sale marino grosso
- glicerolo concentrato al 90%
- estratto fenolico purificato concentrato al 65% la cui composizione si può vedere nella tabella 7

Composizione fenolica mg/gr degli estratto ottenuto dal concentrato dell'acqua di vegetazione .	
	Estratto 6B
3,4 DHPEA	71,5 ± 1,0
p-HPEA	18,6 ± 0,9
3-4 DHPEA-EDA	469,3 ± 3,3
Verbascoside	86,8 ± 5,2
Somma frazioni fenoliche	646,3 ± 6,2
Contenuto fenolico %	65

Tabella 7: Composizione dell'estratto fenolico (VWPE) usato nella preparazione di dei salami (Taticchi e Servili,2012)

La preparazione può essere suddivisa in varie fasi:

a. pulitura dei tagli di carne

le 4 spalle sono state pulite togliendo il grasso di copertura con un coltello, mentre le 3 pancette sono state pulite togliendo un po' di membrana connettivale sempre con il coltello.

I tagli di carne sono stati ridotti in pezzi (in modo da poter poi essere inseriti nel tritacarne) e posizionati in bacinelle di acciaio pulite

b. macinazione della carne

dopo che i tagli di carne sono stati puliti dalle parte superflue e ridotti in pezzi vengono inseriti alternativamente pezzi di spalla e di pancetta nel tritacarne "Cavalli Meat Processing Machinery S.r.l." modello TCS 22: il macchinario in questione presenta dei coltelli che macinano insieme i vari tagli di carne. Dal tritacarne, attraverso una griglia con fori di diametro intorno 0,5 cm, escono 35 kg di tritato di carne composto per circa il 70% da parte magra e per circa il 30% da parte grassa.

c. miscelazione dell'impasto

Siccome al termine della preparazione i salami presenteranno una concentrazione di ingredienti diversa in funzione alla tesi, il tritato viene diviso in 4 parti:

- 4-5 kg sono destinati per preparare i salami della tesi BIANCO,
- 10 kg sono destinati per preparare i salami della tesi CONTROLLO,
- 10 kg sono destinati per preparare i salami della tesi L1,
- 10 kg sono destinati per preparare i salami della tesi L2.

Nella tesi BIANCO per ottenere 4kg di miscelato (tritato, sale e starter microbici) una parte del tritato viene posto in un miscelatore "Cavalli Meat Processing Machinery S.r.l." modello IMP 50 bipala: il miscelatore è una macchina che presenta delle pale le quali mescolano il tritato con gli altri ingredienti e riduce il diametro delle particelle del tritato stesso. Nel miscelatore vengono

aggiunti, tramite un imbuto, il 2,6% sale (quindi in questo caso 104g) e lo 0,0125% di starter microbici (quindi in questo caso si tratta di 0,5 g). Alla fine si aggiunge il resto del tritato per raggiungere i 4 kg di miscelato:  $\text{tritato} = (4\text{kg miscelato} - (2,6\% \text{ sale} + 0,0125\% \text{ starter}))$ . Per miscelare al meglio tutti gli ingredienti le pale del miscelatore vengono fatte ruotare per una decina di volte in un senso e poi nell'altro.

Nella tesi CONTROLLO per ottenere 10 kg di miscelato (tritato, sale, starter microbici, glicerolo) una parte del tritato viene posto in un miscelatore "Cavalli Meat Processing Machinery S.r.l." modello IMP 50 bipala: il miscelatore è una macchina che presenta delle pale le quali mescolano il tritato con gli altri ingredienti e riduce il diametro delle particelle del tritato stesso. Nel miscelatore vengono aggiunti, tramite un imbuto, il 2,6% sale (quindi in questo caso 260g), lo 0,0125% di starter microbici (quindi in questo caso si tratta di 1,25 g). Successivamente viene aggiunto un 2% di glicerolo al 90%, quindi nel nostro caso sono stati aggiunti 200g. Alla fine si aggiunge il resto del tritato per raggiungere i 10 kg di miscelato:  $\text{tritato} = (10\text{kg miscelato} - (2,6\% \text{ sale} + 0,0125\% \text{ starter} + 2\% \text{ glicerolo}))$ . Per miscelare al meglio tutti gli ingredienti le pale del miscelatore vengono fatte ruotare per una decina di volte in un senso e poi nell'altro.

Nella tesi L1 per ottenere 10 kg di miscelato una parte del tritato viene posto in un miscelatore di "Cavalli Meat Processing Machinery S.r.l." modello IMP 50 bipala: il miscelatore è una macchina che presenta delle pale le quali mescolano il tritato con gli altri ingredienti e riduce il diametro delle particelle del tritato stesso. Nel miscelatore vengono aggiunti, tramite un imbuto, il 2,6% sale (quindi in questo caso 260g), lo 0,0125% di starter microbici (quindi in questo caso si tratta di 1,25g). Successivamente vengono aggiunti :

- un 2% sul peso del tritato, di glicerolo al 90%, quindi nel nostro caso sono stati aggiunti 200g.
- 11,36 g di estratto fenolico purificato al 65% in modo da ottenere una concentrazione di composti fenolici pari a 75mg/100g salame

Il glicerolo serve a veicolare i composti fenolici nel tritato in modo che si distribuisca omogeneamente nel miscelato. Alla fine si aggiunge il resto del tritato per raggiungere i 10 kg di miscelato:  $\text{tritato} = (10\text{kg miscelato} - (2,6\% \text{ sale} + 0,0125\% \text{ starter} + 2\% \text{ glicerolo} + 11,36\text{g estratto fenolico}))$ .

Nella tesi L2 per ottenere 10 kg di miscelato una parte del tritato viene posto in un miscelatore di "Cavalli Meat Processing Machinery S.r.l." modello IMP 50 bipala: il miscelatore è una macchina che presenta delle pale le quali mescolano il tritato con gli altri ingredienti e riduce il diametro delle particelle del tritato stesso. Nel miscelatore vengono aggiunti, tramite un imbuto, il 2,6% sale (quindi in questo caso 260g), lo 0,0125% di starter microbici (quindi in questo caso si tratta di 1,25 g).

Successivamente vengono aggiunti :

- un 2% sul peso del tritato, di glicerolo al 90%, quindi nel nostro caso sono stati aggiunti 200g.
- 22,72 g di estratto fenolico purificato al 65% in modo da ottenere una concentrazione di composti fenolici pari a 150mg/100g salame

Alla fine si aggiunge il resto del tritato per raggiungere i 10 kg di miscelato: tritato= (10kgmiscelato - (2,6% sale+0,0125% starter+ 2% glicerolo+ 22,72g estratto fenolico)).

Per miscelare al meglio tutti gli ingredienti le pale del miscelatore vengono fatte ruotare per una decina di volte in un senso e poi nell'altro.

Il miscelato di ogni tesi è stato posto in una bacinella di acciaio inox dedicata.

Va precisato che in un primo momento si è preparato ed insaccato il miscelato della tesi B, in un secondo momento si è preparato ed insaccato il miscelato della tesi C. Successivamente si è preparato ed insaccato il miscelato della tesi L1 ed infine si è preparato ed insaccato il miscelato della tesi L2.

#### d. insacco e pezzatura salami

Tutti e 4 i miscelati sono stati processati nello stesso modo.

Si mette il miscelato in una macchina insaccatrice "Cavalli Meat Processing Machinery S.r.l." modello ID 25V che compatta il miscelato e lo fa uscire da un tubo del diametro di 5 cm, al quale si attacca il budello naturale. Il risultato: un lungo insacco che viene posto in bacinelle di acqua calda in modo da facilitare lo scorrimento del miscelato nel budello. Successivamente un esperto salumiere procede alla pezzatura dei salami legando due spaghi all'estremità di ogni porzione e poi tagliando il budello. Successivamente si procede a bucherellare il budello di ogni salame per tutta la sua superficie. I salami vengono poi accoppiati a 2 a 2 e posti a sgocciolare.

Si annota quanti sono i salami per quella tesi e si lega uno spago colorato per identificare i salami di una tesi da quelli di un'altra. Ad ogni salame viene dato un numero identificativo.

Alla fine risultavano 9 salami per la tesi BIANCO, 23 salami per la tesi CONTROLLO, 30 salami per la tesi L1, 24 salami per la tesi L2.

#### e. asciugatura e stagionatura

i salami sono stati posti in un armadio di stagionatura a 21°C con abbassamento della temperatura di 1°C/giorno fino ad arrivare a 16°C il quinto giorno. Dopo il quinto giorno la temperatura è stata impostata a 12±1°C. L'umidità era compresa fra valori di 70-90%.

Per l'analisi sono stati prelevati 2 salami per ogni tesi (per la tesi BIANCO questo non è stato sempre possibile visto il numero ridotto di salami) a tempi ben precisi di stagionatura quali

- T0: giorno dell'insacco dei salami,



- T3: 3 giorni dall'insacco,
- T10: 10 giorni dall'insacco,
- T20: 20 giorni dall'insacco,

Siccome le analisi sulla componente lipidica, non potevano essere svolte nell'immediato, i salami sono stati messi sottovuoto e posti in congelatore a -80.

### 3.1.2 SALAMI ESPOSTI

34 salami di tutte le tesi in esame, sono stati stagionati fino a 30 giorni dall'insacco. Questi salami sono stati ridotti in fette da 1 cm, messi in delle vaschette di plastica, e grazie alla macchina ORVED VGP le vaschette sono state sigillate con una pellicola di plastica ed è stata sostituita l'aria con una miscela di 70% N<sub>2</sub> e 30% CO<sub>2</sub>. Le vaschette sono poi stoccate in un banco frigo a 4°C con alternanza di 12 ore di luce e altrettante di buio, per un periodo totale di 30 giorni. Su ogni vaschetta è stata mantenuta la codifica del campione in modo da poter risalire alla tesi. I salami sono stati prelevati dal banco frigorifero ad tempi ben precisi di esposizione quali

- T0: 0 giorni di esposizione,
- T10: 10 giorni di esposizione,
- T20: 20 giorni di esposizione,
- T30: 30 giorni di esposizione

Siccome le analisi sulla componente lipidica, non potevano essere svolte nell'immediato, i salami sono stati messi sottovuoto e posti in congelatore a -80°C. La logica del prelievo era quella di avere almeno 2 salami/vaschette per ogni tesi, in modo da poter dei risultati in doppio al termine dell'analisi: per la tesi BIANCO non è sempre stato possibile prelevare 2 salami, visto il numero ridotto di pezzi.

## 3.2.ANALISI CHIMICA SULLA FRAZIONE LIPIDICA

### 3.2.1 ESTRAZIONE E DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL GRASSO

L'estrazione del grasso è stata effettuata secondo il metodo di Folch et al. (1957), modificato come segue.

Si macina campione con Retsch a 0,40 giri/s per 5 secondi e si preleva un'aliquota di 7,5g mettendola in colonne con filtro e rubinetto. Si lava ogni aliquota con circa 130ml di miscela diclorometano/metanolo 2:1 (17 ml per g campione pesato) e si omogenizza il campione con UltraTurrax (T25 BASIC IKA WERKE) ad una velocità di 11.000 giri/min per 2 minuti, il filtrato viene raccolto in beute codate. Al filtrato viene aggiunta una soluzione NaCl 0,58% p/V in proporzione al 20% del peso del filtrato; il tutto viene agitato, messo in imbuto separatori e lasciato decantare una notte al buio sotto cappa in modo che si separino le fasi della miscela.

Dopo una notte si osserva una separazione di fase: nella fase inferiore si concentrano i lipidi. La fase inferiore viene filtrata in presenza di sodio solfato anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro) in palloni da 100ml che vengono pesati (prima vuoti e poi lordi)

#### Determinazione quantitativa del contenuto di grasso

Per avere una determinazione quantitativa del contenuto di grasso si preleva un aliquota di filtrato dal pallone di raccolta e la si mette in una provetta. La provetta viene lasciata sotto-cappa (accesa) per almeno 48h, in modo che tutto il diclorometano evapori e rimanga poi solo il grasso sul fondo. Attraverso un serie proporzioni si riesce ad ottenere i grammi di grasso/100g salame preso in esame, bisogna conoscere:

- a. il peso netto (3 cifre decimali) dell'aliquota di campione prelevata dal campione
- b. il peso netto (3 cifre decimali) del filtrato nel pallone: rappresenta il diclorometano usato per quell'aliquota di campione (circa 7,5g) e il grasso presente in quell'aliquota di campione
- c. il peso netto (4 cifre decimali) dell'aliquota di filtrato trasferita nella provetta
- d. il peso netto (4 cifre decimali) del grasso rimasto nella provetta dove abbiamo trasferito l'aliquota di filtrato

poi si fa una semplice proporzione mettendo in rapporto il grasso con il filtrato (dove c'è solo grasso e diclorometano) come qui di seguito.

PESO GRASSO NELLA PROVETTA(d): PESO ALIQUOTA FILTRATO NELLA PROVETTA (c) = PESO GRASSO NEL PALLONE (INCOGNITA) : PESO FILTRATO NEL PALLONE (b)

PESO GRASSO NEL PALLONE/ PESO ALIQUOTA CAMPIONE(a)\*100= %GRASSO

#### Continuazione estrazione grasso

Il filtrato del pallone viene portato a secco tramite un evaporatore Rotavapor R-210/215 della B.U.CHI Italia Sr.l, impostando i seguenti parametri: 40°C dell'acqua del bagnetto e 337mbar di depressione in modo da far allontanare il diclorometano. Nel pallone rimane quindi solo grasso (con qualche traccia di diclorometano) che viene trasferito in una provetta: in presenza di sovratanante si aggiunge del  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, si centrifuga a 4000rpm per 5minuti a 8°C con la centrifuga EPPENDORF 5810 R e si toglie tutto il sovratanante con una pasteur.

Successivamente per eliminare eventuali tracce di diclorometano si mette la provetta con il grasso in un bagno a 40°C e sotto corrente di  $\text{N}_2$ . Nel caso si fosse aggiunto  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  si procede a ricentrifugare a 4000rpm per 5minuti a 8°C per far andare sul fondo il sodio solfato anidro.

I campioni vengono posti in frigorifero a 4°C al buio se la determinazione dell'acidità titolabile e del numero di perossidi è effettuata il giorno seguente, mentre sono posti a -18°C se la determinazione dell'acidità titolabile e del numero di perossidi è effettuata dopo 2-3 giorni.

### 3.2.2 DETERMINAZIONE DEI PRODOTTI SECONDARI DEL PROCESSO DI IRRANCIDIMENTO: TBARS

La malondialdeide è un marcatore dell'accumulo dei prodotti secondari del processo di ossidazione lipidica, è idrosolubile e in ambiente acido reagisce con l'acido Tiobarbiturico (TBA) per formare un addotto di colore **rosa** la cui intensità viene misurata in spettrofotometria a lunghezza d'onda di 532nm. La determinazione della malondialdeide è stata effettuata secondo il metodo di Botsoglou et al., (1994) secondo il seguente schema.

A 2,0 grammi di campione (salame intero) posti in tubo da centrifuga, sono stati aggiunti 8 ml di una soluzione di acido tricloroacetico (TCA) al 5% e 5 ml di esano con lo 0,8% di BHT (un antiossidante). Il campione viene omogeneizzato con UltraTurrax (T25 BASIC IKA WERKE) per 30 secondi ad alta velocità (13 000 giri/min) e successivamente centrifugato a 3000 rpm per 3 minuti a 4 °C. Dopo centrifugazione si osservano 3 fasi:

- fase superiore dove si trova principalmente l'esano
- fase intermedia con un disco composto da connettivo e proteine
- fase inferiore in cui sono presenti il TCA e la malondialdeide

Si allontana la fase superficiale con una pompa per il vuoto, una pasteur e una beuta codata di raccolta. Il campione viene poi filtrato per allontanare il tappo solido di connettivo e proteine; successivamente 2,5 ml di filtrato sono stati fatti reagire con 2,5 ml di una soluzione di acido tiobarbiturico (TBA) 0,02M e posti in stufa a 100°C per 35 minuti. Dopo raffreddamento, si procede alla misura condotta con spettrofotometro VARIAN modello CARY-1E UV/VIS a 532 e 600 nm. L'assorbanza a 600 nm viene presa come riferimento per verificare l'andamento dell'assorbanza dei vari campioni.

Per la seguente analisi è stato preparato un bianco reagenti che ha subito la stessa procedura dei campioni e che viene letto allo spettrofotometro. Il bianco reagenti viene fatto per osservare se i reagenti danno un contributo nella reazione (tra TBA e malondialdeide) e nell'assorbanza dei campioni: quindi l'assorbanza dei reagenti viene poi sottratta a quella letta dei campioni.

La determinazione della concentrazione della malondialdeide si ottiene sfruttando la legge di Lambert-Beer che mette in relazione la concentrazione di un composto in base alla sua assorbanza ad una determinata lunghezza d'onda .

L'assorbanza della malondialdeide si ottiene togliendo l'assorbanza dei reagenti:

Assorbanza malondialdeide= Assorbanza letta campione - Assorbanza bianco

Successivamente l'assorbanza viene normalizzata (ovvero rapportata ad un 1 g di campione) e poi viene inserita in una equazione della curva di taratura da cui si ricava la concentrazione del campione: equazione retta taratura  $y = 77861x + 0,0024$  ,dove x è la concentrazione della malondialdeide in M in 1 g di campione, mentre y è l'assorbanza. Dalla concentrazione della malondialdeide in M in 1 g di campione attraverso la MM(massa molecolare)della malondialdeide si ottiene una concentrazione g malondialdeide /g campione che può essere trasformata in mg/kg campione.

### 3.2.3 DETERMINAZIONE DEI PRODOTTI PRIMARI DEL PROCESSO DI IRRANCIDIMENTO: PEROSSIDI

Il numero di perossidi è l'indice correlato al prodotto primario del processo di autossidazione (irrancidimento) del grasso. Gli idroperossidi reagiscono con lo ione ioduro dando origine a iodio elementare (I<sub>2</sub>) che viene titolato con sodio tiosolfato (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

Il metodo esprime i milliequivalenti di ossigeno attivo per 1000g di grasso. La determinazione del numero di perossidi è stata effettuata secondo la metodica AOAC (1990) (1),. modificata come segue

Si procede a mettere il grasso estratto in stufa a 60 °C per 15 minuti in modo da rendere liquido il grasso e facilitarne il prelievo. Si pesano circa 500 mg di grasso in un becher e si aggiungono 20 ml di miscela acido acetico/diclorometano (3/2) per solubilizzare il grasso. Successivamente si aggiungono 0,5 mL di soluzione di KI satura (si osserva un cambiamento di colore da bianco a giallo intenso) e si lascia al buio per 2 minuti, in modo che i perossidi reagiscono con il KI. Passati i 2 minuti si aggiungono 75 ml di acqua distillata (il colore passa da giallo a bianco) e alcune gocce di salda d'amido (con un numero elevato di perossidi la soluzione si colora di blu). La miscela ottenuta viene titolata con sodio tiosolfato (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) N/10 o N/100 fino al cambiamento di colore da blu a bianco.

In base al volume di sodio tiosolfato (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ,alla concentrazione dello stesso e al peso del grasso usato per l'analisi, otteniamo il numero di perossidi grazie alla formula riportata qui di seguito

$$\text{Numero di perossidi (meq. O 2/1000g grasso)} = V_{sx} N_x 1000/p$$

V<sub>s</sub> = ml di Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> N/10 del campione

N = normalità della soluzione

p = massa del campione di grasso

### 3.2.4 DETERMINAZIONE DELL'ACIDITA' TITOLABILE

L'acidità è un parametro che esprime la quantità ponderale di acidi grassi non esterificati. E' rappresentata dalla quantità di KOH o NaOH (mg) necessaria a neutralizzare 1g di materia grassa. Può essere svolta anche su quantitativi di grasso inferiori al grammo. L'acidità è conseguenza diretta del rilascio degli acidi grassi dovuto al fenomeno "dell'idrolisi dei trigliceridi", prima parte del processo complessivo di degradazione lipidica, noto anche come irrancidimento idrolitico .Gli acidi grassi liberi sono il bersaglio dell'ossidazione lipidica, quindi più sono presenti, più è probabile che si formino composti primari (perossidi) e secondari (composti a basso peso molecolare come aldeidi, chetoni, idrocarburi, alcoli...) dell'ossidazione lipidica.

La determinazione dell'acidità titolabile è stata effettuata secondo la metodica AOAC (1990) (2),. modificata come segue

Si procede a mettere il grasso estratto in stufa a 60 °C per 15 minuti in modo da rendere liquido il grasso e facilitarne il prelievo. Si pesano circa 500 mg di grasso in un becher, si aggiungono 20 ml miscela etere di petrolio/etanolo (2/1) per solubilizzare il grasso. Successivamente si titola il grasso con NaOH o KOH circa  $5 \cdot 10^{-2}$  N in presenza di fenoftaleina.

Se NaOH è troppo concentrato lo si diluisce in rapporto 1:10. L'importante è determinare il titolo esatto della soluzione di NaOH titolando 2ml HCl 0,1 N in presenza di fenoftaleina.

In base al volume di NaOH, alla concentrazione dello stesso e al peso del grasso usato per l'analisi, otteniamo % acido oleico, sfruttando la MM( massa molecolare) dell'acido oleico, grazie alla formula riportata qui di seguito

$$\% \text{ acido oleico} = V \times N \times 28,2/p$$

V=volume di NaOH in ml usato per titolare

N= normalità dell'NaOH usato per titolare

p= peso in grammi del grasso da titolare

### 3.3.PARAMETRI DI STAGIONATURA

#### 3.3.1 DETERMINAZIONE DEL pH

Il pH è stato misurato in 2 salami per tesi ad ogni tempo di stagionatura (0,3,10,20) per i salami interi e in 2 salami per tesi ad ogni tempo di esposizione (0,10,20,30 giorni) per i salami esposti. Inoltre la misura per ogni salame è stata effettuata in doppio. Prima di misurare il pH lo strumento è stato tarato con soluzioni tampone a pH 4,0 e 7,0.

La misura del pH per un salame è stato determinato utilizzando un pHmetro (Knick 910 con elettrodo Metler Toledo) e posizionando l'elettrodo in tre punti di un taglio fresco per i salami interi e in tre punti della fetta per i salami esposti: così si ottengono tre valori per ogni salame.

#### 3.3.2 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' DELL'ACQUA (aw- activity water)

Per la misura di acqua libera è stato utilizzato l'igrometro (Aqualab Decagon serie 4 TEV).

La determinazione è stata condotta su 2 salami per tesi ad ogni tempo di stagionatura (0,3,10,20) per i salami interi e in 2 salami per tesi ad ogni tempo di esposizione (0,10,20,30 giorni) per i salami esposti. Inoltre le letture per ogni salame sono state effettuate in doppio. La misura è stata effettuata previa calibrazione dello strumento a mezzo di soluzioni saline standard a titolo noto di aw. Le capsule di materiale plastico prima dell'utilizzo sono state accuratamente pulite e poste in stufa a 65 °C per tutta la notte per allontanare l'eventuale umidità presente. . Ogni salame viene così processato: si procede a tagliare una fetta ed eliminare il budello, la fetta viene poi ridotta in cubetti.

Dopo raffreddamento le capsule sono state riempite con i cubetti del campione da processare in modo uniforme e messe nello strumento per la lettura.

### 3.3.3 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI UMIDITA'

La determinazione del contenuto di umidità è stata effettuata in stufa a 105 °C secondo su 2 salami per tesi ad ogni tempo di stagionatura (0,3,10,20) per i salami interi. Non è stata calcolata l'umidità per i salami esposti. Dopo aver posto in stufa per circa 1 ora a 105 °C le capsule e averle raffreddate in essiccatore, si è proceduto a pesarle e ad aggiungere circa 5,0 grammi di campione. La capsule sono state riposte in stufa a 105° C per 24 ore, quindi tolte dalla stufa, lasciate raffreddate in essiccatore e pesate. L'analisi è stata svolta sul campione macinato.

I risultati sono stati espressi come percentuale d'acqua sul tal quale.

### 3.4.ANALISI STATISTICA DEI DATI

Per i salami interi

I dati sono stati inseriti all'interno del software statistico SPSS versione 20.0 per Windows. L'obbiettivo è stato quello di osservare se c'è una differenza tra le medie dei risultati per ogni variabile (quantità di grasso, acidità, n° di perossidi, TBARS) prima in base al fattore tesi (BIANCO,CONTROLLO,L1,L2) e poi in base al fattore tempo di stagionatura (T0,T3,T10,T20), attraverso l'ANOVA (analisi della varianza) ad una via. Per determinare quali gruppi del fattore in esame fossero diversi tra loro è stato utilizzato come test post hoc il test HSD di Tukey, con livello di significatività pari a  $p < 0,05$ .

Per i salami esposti

I dati sono stati inseriti all'interno del software statistico SPSS versione 20.0 per Windows. L'obbiettivo è stato quello di osservare se c'è una differenza tra le medie dei risultati per 3 variabili (acidità, n° di perossidi, TBARS) prima in base al fattore tesi (BIANCO,CONTROLLO,L1,L2) e poi in base al fattore tempo di esposizione (T0,T10,T20,T30), attraverso l'ANOVA (analisi della varianza) ad una via. Per determinare quali gruppi del fattore in esame fossero diversi tra loro è stato utilizzato come test post hoc il test HSD di Tukey, con livello di significatività pari a  $p < 0,05$ .

## 4.RISULTATI

### 4.1SALAMI STAGIONATI INTERI

Si tratta di salami stagionati 30 giorni nell'armadio di stagionatura dove si è partiti da 21°C e si è scesi di 1°C/giorno fino a raggiungere i 16°C, poi la temperatura è stata mantenuta a  $12 \pm 1^\circ\text{C}$  fino al termine dei 30 giorni. L'umidità dell'armadio è stata compresa tra il 70 e il 90%.

#### 4.1.1 QUANTITA' DI GRASSO

Le considerazioni che seguiranno vengono fatte sulle medie e deviazioni standard dei dati raccolti durante l'attività di laboratorio, come per le altre variabili, non è sempre stato possibile calcolare la deviazione standard per ogni tesi ad ogni tempo di stagionatura.

Al tempo di stagionatura T10 non è stata calcolata la media per i salami delle tesi BIANCO (B) e CONTROLLO (C) perché i valori ottenuti dall'analisi dei campioni sono anomali, quindi non sono stati inseriti

- nel calcolo della media per ogni tesi ad ogni tempo di stagionatura
- nella produzione del grafico
- per calcolare la differenza dei campioni attraverso l'approccio statistico dell'ANOVA ad una via

Tabella 8 con medie e deviazioni standard della quantità di grasso

%grasso (g grasso/100g salame)				
Tempo/tesi	B	C	L1	L2
0	17,19	18,0 $\pm$ 10,54	16,45 $\pm$ 1,57	19,60 $\pm$ 1,78
3	19,45	16,88 $\pm$ 0,50	18,77 $\pm$ 0,50	17,73 $\pm$ 0,48
10			22,73	22,43
20	23,35	22,62 $\pm$ 0,44	24,39 $\pm$ 0,69	23,15 $\pm$ 1,23

Tabella 9 con le variazioni delle medie della %grasso delle varie tesi

variazioni grasso	B	C	L1	L2
$\Delta t$ 0-3	2,26	-1,12	2,32	-1,87
$\Delta t$ 3-10			3,95	4,70
$\Delta t$ 3-20	3,90	5,73		
$\Delta t$ 10-20			1,66	0,71
$\Delta t$ 0-20	6,16	4,61	7,94	3,54

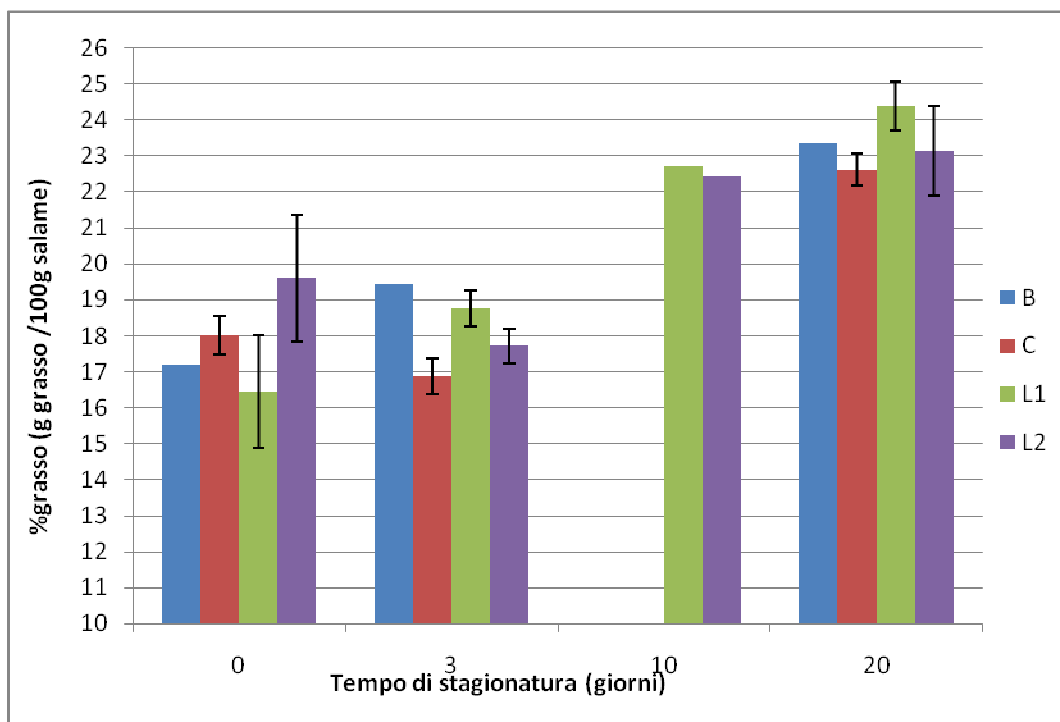


Figura 15: andamento delle medie delle quantità di grasso in funzione dei giorni di stagionatura

In linea generale si può osservare che i valori di partenza di grasso si discostano tra le tesi, ma nel tempo presentano un andamento simile tra loro. Dal grafico si può osservare una differenza a 2 a 2 nell'andamento iniziale del primo intervallo di tempo di stagionatura (0-3 giorni):

- le tesi CONTROLLO ed L2 presentano un calo nel quantitativo di grasso rispettivamente di 1,12 punti% e di 1,87 punti%
- le tesi BIANCO ed L1 presentano un aumento nel quantitativo di grasso rispettivamente di 2,26 punti% e di 2,32 punti %

Gli intervalli successivi (3-10 giorni e 10-20 giorni di stagionatura) sono stati calcolati solo sulle tesi L1 ed L2, perché nelle tesi B e C i valori per calcolare il valore medio nei tempi di stagionatura T10 rientrano nei valori anomali; quindi per le tesi B e C è stato preso in considerazione un intervallo da 3 a 20 giorni di stagionatura.

Per le tesi L1 ed L2 nell'intervallo da 3 a 10 giorni di stagionatura si osserva un aumento della percentuale di grasso rispettivamente di 3,95 e 4,70 punti %; la stessa cosa succede per le tesi B e C nell'intervallo 3-20 giorni con aumenti di 3,90 punti% per B e di 5,73 punti % per C. Per le tesi L1 ed L2 nell'ultimo intervallo di esposizione il tenore di grasso di tutte le tesi, subisce un ulteriore aumento, anche inferiore rispetto agli intervalli precedenti. Per tutte le tesi a T20 si osservano valori più elevati della % di grasso.

Nello specifico le diverse tesi osservano il seguente andamento:

- a. la tesi BIANCO: parte da un valore 17,19% che aumenta fino ad 19,45% nei primi 3 giorni stagionatura; negli intervalli 3- 10 giorni e 10-20 giorni non è stato possibile calcolare



l'andamento perché il valore riscontrato a 10 giorni è **15,45%** uno dei valori anomali. A 20 giorni si osserva una %grasso di 23,35.

b. la tesi CONTROLLO parte da un valore di 18,10 % che cala fino al 16,88% a 3 giorni di stagionatura; negli intervalli 3- 10 giorni e 10-20 giorni non è stato possibile calcolare l'andamento perché il valori riscontrato a 10 giorni sono **14,34% e 14,37%** due dei valori anomali. A 20 giorni si osserva un valore più alto rispetto agli altri della stessa tesi: 22,62%.

c. la tesi L1 parte da un valore grasso del 16,45% che aumenta ad 18,77% nel primo intervallo di stagionatura; nel periodo che intercorre tra i 3 e i 10 giorni il contenuto di grasso sale fino a raggiungere il 22,73% . Negli ultimi 10 giorni di stagionatura si osserva un aumento del tenore di grasso che si attesta a 24,39% a 20 giorni di stagionatura: il valore medio più elevato tra le diverse medie.

d. la tesi L2 parte da un valore 19,60% che cala fino ad 17,73% nei primi 3 giorni di stagionatura; nell'intervallo 3-10 giorni il contenuto di grasso sale fino a 22,43% mentre negli ultimi 10 giorni di stagionatura si osserva un aumento fino al 23,15%.

Da notare è sicuramente il fatto che per la tesi L1 si osserva il valore medio massimo del contenuto% di grasso e che sempre la tesi L1 parte dal valore medio iniziale più basso. Per tutte le tesi si osserva il picco del contenuto di grasso a 20 giorni di stagionatura, mentre i valore medi minimi, escludendo i valori anomali, si registrano al momento dell'insacco dei salami, ovvero a T0. Dall'analisi statistica dei dati, l'ANOVA ad una via mostra che non ci sono differenze significative ( $p > 0,05$ ) tra le diverse tesi (B,C,L1,L2) per il contenuto di grasso. L'ANOVA ad una via mostra però che c'è una differenza significativa tra i diversi tempi di stagionatura: il test HSD di Tukey, con livello di significatività pari a  $p < 0,05$  dimostra che i tempi T0,T3 sono significativamente diversi dai tempi T10,T20.

Tabella 10: si vedono le medie del contenuto di grasso e le d.s. in base al tempo di stagionatura (T)

	T0	d..s	T3	d.s	T10	d.s	T20	d.s	Significatività.
%grasso(g/100g campione)	17,90 <sup>b</sup>	1,66	18,00 <sup>b</sup>	1,11	22,58 <sup>a</sup>	0,21	24,08 <sup>a</sup>	2,11	***( $0,000 < 0,05$ )

#### 4.1.2.TBARS

Per ogni campione i risultati sono espressi come mg di malondialdeide/kg di salame e si tratta di valori ottenuti dalla media di 2 valori, in quanto ogni campione è stato processato in doppio.

Le considerazioni che seguono vengono fatte sulle medie e deviazioni standard dei dati raccolti durante l'attività di laboratorio. In alcuni casi non è stato possibile calcolare la deviazione standard perché era presente un solo valore valido per quella tesi e per quei giorni di esposizione.

Tabella 11: medie e deviazioni standard

Tempo/tesi	mg malondialdeide/kg di salame			
	B	C	L1	L2
0	8,98 ±1,74	24,59 ±3,18	8,43 ±5,97	8,38 ±3,77
3	153,49 ±6,75	134,17 ±50,23	9,57 ±6,45	21,05 ±3,60
10	110,53 ±18,45	119,58 ±29,58	16,58 ±4,95	4,80 ±0,84
20	73,59 ±7,68	99,45 ±8,14	12,30 ±3,09	19,45 ±4,64

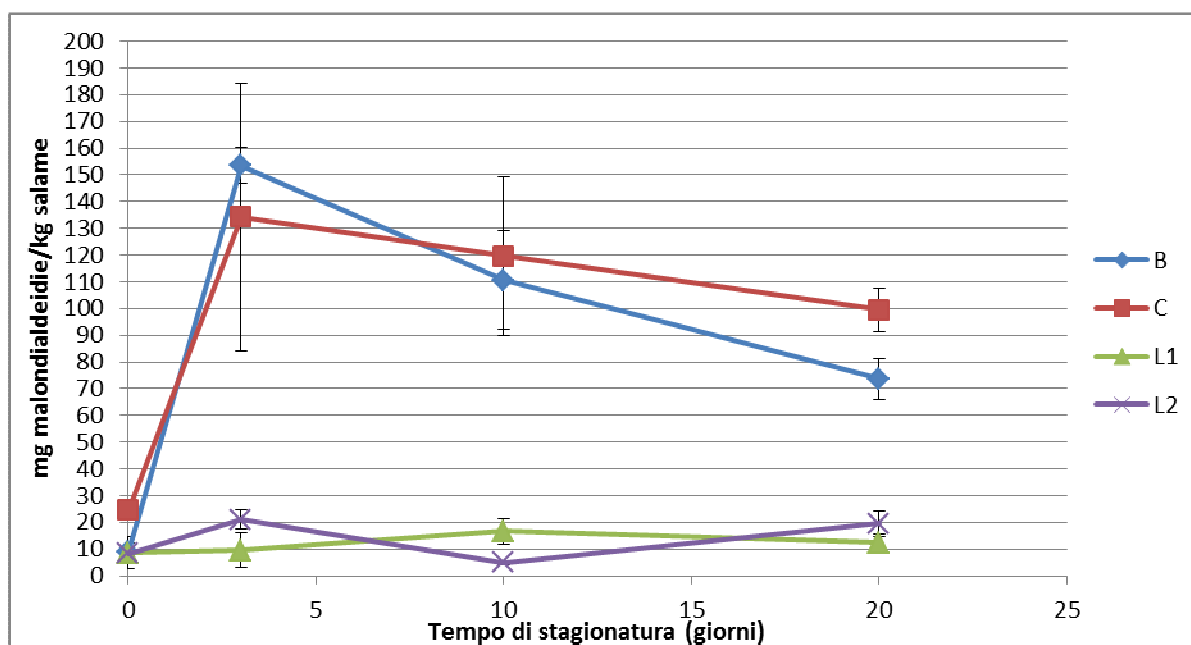


Figura 16: grafico che descrive l'andamento delle medie dei TBARS per ogni tesi in funzione dei giorni di stagionatura

Dal grafico e dalla tabella si può osservare che in partenza le tesi BIANCO, L1, L2 presentano valori medi di mg di malondialdeide/kg simili tra di loro, mentre nella tesi controllo il valore iniziale è decisamente più elevato:

- le tesi BIANCO, L1, L2 partono rispettivamente da valori di 8,98 mg malondialdeide/kg salame, 8,43 mg malondialdeide/kg salame e 8,38 mg malondialdeide/kg salame
- la tesi CONTROLLO parte da un valore di 24,59 mg malondialdeide/kg salame, un valore 3 volte superiore a quelli delle altre tre tesi

Osservando l'andamento del TBARS, in linea generale si può dire che per le tesi L1 ed L2 i valori medi si aggirano intorno a valori compresi tra i 5 e 20 mg malondialdeide/kg salme, mentre nelle tesi BIANCO E CONTROLLO arriviamo a toccare valori di 130-150 mg malondialdeide/kg salame: nelle tesi BIANCO E CONTROLLO si osserva un deciso aumento dei valori di malondialdeide nei primi 3 giorni di stagionatura, dopo 3 questo periodo si vede un calo dei valori che rimangono però decisamente più elevati (73,59 mg per BIANCO e 99,45 mg CONTROLLO) di quelli delle tesi L1 ed L2 (12,30 mg per L1 e 19,45 mg per L2).

La tesi L2 presenta un andamento altalenante nella concentrazione di malondialdeide: si osserva un aumento nei primi 3 giorni di stagionatura, poi un calo nell'intervallo da 3 a 10 giorni e successivamente un altro aumento.

Nello specifico ho potuto osservare che

- a. la tesi BIANCO parte da un valore di 8,98 mg malondialdeide/kg salame e aumenta nei primi 3 giorni di stagionatura fino a 153,49 mg malondialdeide/kg salame: si tratta dell'aumento più alto in tutti gli intervalli di tempo, di tutte le tesi. Dopo i tre giorni di stagionatura la concentrazione di malondialdeide cala toccando i 110,53 mg malondialdeide/kg salame a 10 giorni di stagionatura e 73,59 mg malondialdeide/kg salame a 20 giorni di stagionatura.
- b. la tesi CONTROLLO parte da un valore di 24,59 mg malondialdeide/kg salame e aumenta nei primi 3 giorni di stagionatura fino a 134,17 mg malondialdeide/kg salame. . Dopo i tre giorni di stagionatura la concentrazione di malondialdeide cala toccando i 119,53 mg malondialdeide/kg salame a 10 giorni di stagionatura e 99,45 mg malondialdeide/kg salame a 20 giorni di stagionatura
- c. la tesi L1 parte da un valore di 8,43 mg malondialdeide/kg salame e aumenta fino a 10 giorni di stagionatura arrivando a 9,57 mg malondialdeide/kg salame a tre giorni e a 16,58 mg malondialdeide/kg salame a 10 giorni. Nell'intervallo che va dai 10 ai 20 giorni di stagionatura la concentrazione di malondialdeide subisce un calo toccando i 12,30 mg a 20 giorni di stagionatura.

la tesi L2 parte da un valore di 8,38 mg malondialdeide/kg salame che aumenta fino a 21,05 mg nei primi 3 giorni di stagionatura, per poi un calare a 4,80 mg (raggiunge il valore medio più basso tra tutti i valori medi) nell'intervallo da 3 a 10 giorni. Nell'ultimo intervallo, quello da 10 a 20 giorni di stagionatura, la concentrazione di malondialdeide subisce un altro aumento arrivando a 19,45mg.

Tabella con le variazioni delle medie del TBARS delle varie tesi nei diversi intervalli di stagionatura

variazioni TBARS	B	C	L1	L2
$\Delta t$ 0-3	144,51	109,58	1,14	12,68
$\Delta t$ 3-10	-42,96	-14,59	7,01	-16,25
$\Delta t$ 10-20	-36,94	-20,13	-4,28	14,65
$\Delta t$ 0-20	64,61	74,86	3,88	11,08

Osservando la tabella delle variazioni delle medie dei TBARS per ogni tesi nei diversi intervalli di stagionatura si osserva come

- la tesi L1 presenti gli aumenti e i cali della concentrazione di malonaldeide più bassi e presenta la minor differenza tra valore finale e valore iniziale
- la tesi BIANCO presenti i cali e gli aumenti più elevati.
- la tesi CONTROLLO presenta un andamento molto simile alla tesi BIANCO, anche se con cali e aumenti leggermente inferiori.
- la tesi L2 presenta aumenti e cali nella concentrazione di malonaldeide simili fra loro: si tratta di differenze comprese tra i 12 e i 16 mg

Dall'analisi statistica dei dati, l'ANOVA ad una via mostra che ci sono differenze significative ( $p > 0,05$ ) tra le diverse tesi (B,C,L1,L2) per il TBARS: il test HSD di Tukey, con un livello di significatività pari a  $p < 0,05$ , dimostra che le tesi L1,L2 sono significativamente diverse dalle tesi B,C. L'ANOVA ad una via mostra però che non c'è una differenza significativa tra i diversi tempi di stagionatura (T0,T3,T10,T20)

Tabella 11: si vedono le medie del TBARS (mg MDA/kg salame) e le d.s. in base alla tesi (B,C,L1,L2)

	B	d..s	C	d.s	L1	d.s	L2	d.s	Significatività
TBA (mg MDA/kg salame)	84,04 <sup>a</sup>	53,38	94,45 <sup>a</sup>	48,02	11,72 <sup>b</sup>	4,60	13,42 <sup>b</sup>	7,74	*** (0,00 < 0,05)

#### 4.1.3 ACIDITA' TITOLABILE

Le considerazioni seguenti vengono fatte sulle medie e deviazioni standard dei dati raccolti durante l'attività di laboratorio. In alcuni casi non è stato possibile calcolare la deviazione standard perché era presente un solo valore valido per quella tesi e per quei giorni di esposizione.

L'acidità titolabile è espressa come % di acido oleico.

Tabella 12: medie e deviazioni standard

acidità come %acido oleico				
Tempo/tesi	B	C	L1	L2
0	0,50	0,57 ±0,01	0,59 ±0,33	0,81 ±0,13
3	1,17	0,85 ±0,30	0,97 ±0,25	0,73 ±0,07
10	1,29	1,02 ±0,09	1,30 ±0,22	1,84 ±0,17
20	2,90 ±0,09	2,01 0,11	2,12 ±0,25	1,99 ±0,07

Tabella 13: le variazioni dell'acidità nei vari intervalli di tempo durante la stagionatura

Acidità di variazioni	B	C	L1	L2
Δt 0-3	0,68	0,28	0,38	-0,08
Δt 3-10	0,12	0,17	0,32	1,11
Δt 10-20	1,61	0,98	0,82	0,15
Δt 0-20	2,41	1,44	1,53	1,17

Dal grafico (pagina seguente) e dalla tabella si può osservare che in tutte le tesi l'acidità tende ad aumentare con il passare dei giorni di stagionatura. Possiamo osservare che le tesi CONTROLLO, BIANCO ed L1 presentano un andamento simile, anche se impostati su valori diversi: si tratta di aumento dell'acidità nei primi tre giorni di stagionatura e nell'intervallo tra 10 e 20 di stagionatura, mentre c'è un aumento più lieve nell'intervallo tra 3 e 10 giorni di stagionatura. Per la tesi L2 invece presenta un aumento spiccato nell'intervallo tra 3 e 10 giorni di stagionatura, mentre nell'intervallo tra 10 e 20 giorni l'aumento è più contenuto; nei primi 3 giorni di stagionatura invece c'è un lieve calo.

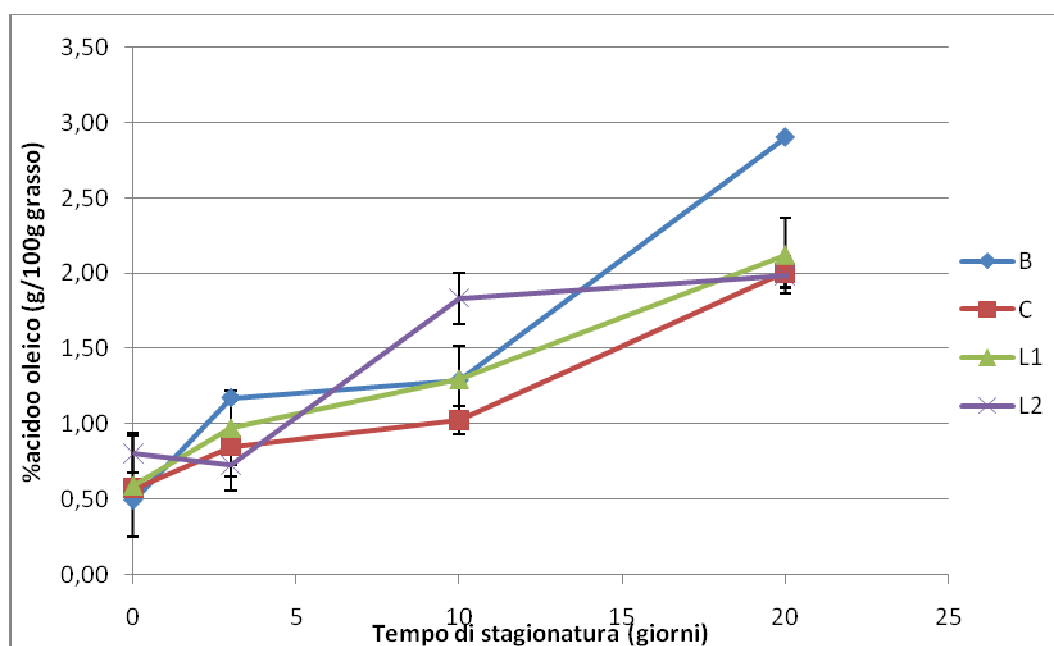


Figura 17: Grafico che descrive l'andamento delle medie dell'acidità per ogni tesi in funzione dei giorni di stagionatura

Osservando in dettaglio i dati ed il grafico ho osservato che

- a. la tesi BIANCO parte da un valore di 0,50 % acido oleico e aumenta fino a 1,17% nei primi 3 giorni di stagionatura. Nell'intervallo successivo (quello da 3 a 10 giorni di stagionatura) l'acidità aumenta ancora, ma con una velocità inferiore arrivando a 1,29%. A 20 giorni di stagionatura la %media di acido oleico raggiunge il suo picco a 2,90%, il valore medio più elevato tra le quattro tesi; l'aumento di acidità nell'ultimo intervallo della tesi BIANCO(1,61 punti ) è quello più elevato tra tutti gli intervalli di tutte le tesi .
- b. la tesi CONTROLLO parte da un valore di 0,57 % acido oleico e che aumenta fino a 0,85% primi 3 giorni e fino a 1,02% a 10 giorni di stagionatura. L'aumento più significativo lo si osserva nell'ultimo intervallo, dove a 20 giorni di stagionatura si osserva un valore medio di 2,01%.
- c. la tesi L1 parte da un valore di 0,59 % acido oleico e nei primi 3 giorni di esposizione aumenta fino a 0,97% acido oleico .A 10 giorni di syagionatura la concentrazione di acido oleico subisce un aumento simile al precedente raggiungendo il valore di 1,30 %. Nell'ultimo periodo di stagionatura (da 10 a 20 giorni) la % acido oleico subisce un aumento di quasi 0,90% arrivando a 2,12%.
- d. la tesi L2 parte da un valore di 0,81 % acido oleico e nei primi 3 giorni di stagionatura, a differenza di tutte le altre tesi, cala fino a 0,73% acido oleico. A nell'intervallo successivo (quello da 3 a 10 giorni di esposizione)la concentrazione di acido oleico subisce un aumento superiore al 1% raggiungendo il valore di 1,84 % che risulta essere il valore medio più elevato in quell'intervallo di tempo. Nell'ultimo periodo di esposizione (da 10 a 20 giorni) la % acido oleico subisce un aumento inferiore al precedente arrivando ad un valore medio del 1,99%.

L2 è l'unica tesi che presenta un calo dei valori medi di acidità tra un tempo di stagionatura e l'altro ed è anche la tesi che presenta l'aumento inferiore tra valore iniziale e valore finale.

Dall'analisi statistica dei dati, l'ANOVA ad una via mostra che non ci sono differenze significative ( $p > 0,05$ ) tra le diverse tesi (B,C,L1,L2) per la variabile %acidità. L'ANOVA ad una via mostra però che c'è una differenza significativa tra i diversi tempi di stagionatura: il test HSD di Tukey, con livello di significatività pari a  $p < 0,05$  dimostra che nei tempi T0,T3 presentano valori medi significativamente diversi dai tempi T10,T20 e che i tempi nei T10 e T20 le %acidità medie significativamente diversi fra di loro.

Naturalmente all'aumentare del tempo si stagionatura l'acidità aumenta.

Tabella 14 :si vedono le medie dell'acidità (g a.oleico/100g grasso) e le d.s. in base al tempo di stagionatura (T0,T3,T10,T20)

	T0	d..s	T3	d.s	T10	d.s	T20	d.s	Significatività.
acidità (%acido oleico)	0,65 <sup>c</sup>	0,16	0,88 <sup>c</sup>	0,22	1,37 <sup>b</sup>	0,36	2,26 <sup>a</sup>	0,41	*** $(0,000 < 0,05)$

#### 4.1.4 PEROSSIDI

Le considerazioni vengono fatte sulle medie e deviazioni standard dei dati raccolti durante l'attività di laboratorio. In alcuni casi non è stato possibile calcolare la deviazione standard perché era presente un solo valore valido per quella tesi e per quei giorni di esposizione. I perossidi vengono espressi come meq di O<sub>2</sub>/1000g grasso.

Tabella 15: medie e deviazioni standard

n°perossidi come meq O <sub>2</sub> /kg grasso				
Tempo/tesi	B	C	L1	L2
0	5,14	2,33±0,40	2,26±0,33	1,28±0,02
3	4,01	7,13±2,18	6,06±2,73	14,65±0,94
10	3,80	6,15±0,42	5,92±3,34	11,33±1,34
20	7,38±0,08	10,05±0,64	9,02±5,32	11,19±2,49

Tabella 16: le variazioni del numero di perossidi

variazioni perossidi	B	C	L1	L2
Δt 0-3	-1,13	4,80	3,81	13,37
Δt 3-10	-0,21	-0,99	-0,14	-3,32
Δt 10-20	3,58	3,90	3,10	-0,14
Δt 0-20	2,24	7,71	6,76	9,92

Già dalle tabelle e dal grafico (figura 18) ho potuto osservare come l'andamento del numero di perossidi non è lineare, ma anzi è un susseguirsi di diminuzioni e aumenti: questo perché i perossidi, o meglio gli idroperossidi, sono i prodotti primari nell'ossidazione lipidica e vengono continuamente prodotti e trasformati, determinando questo effetto altalena.

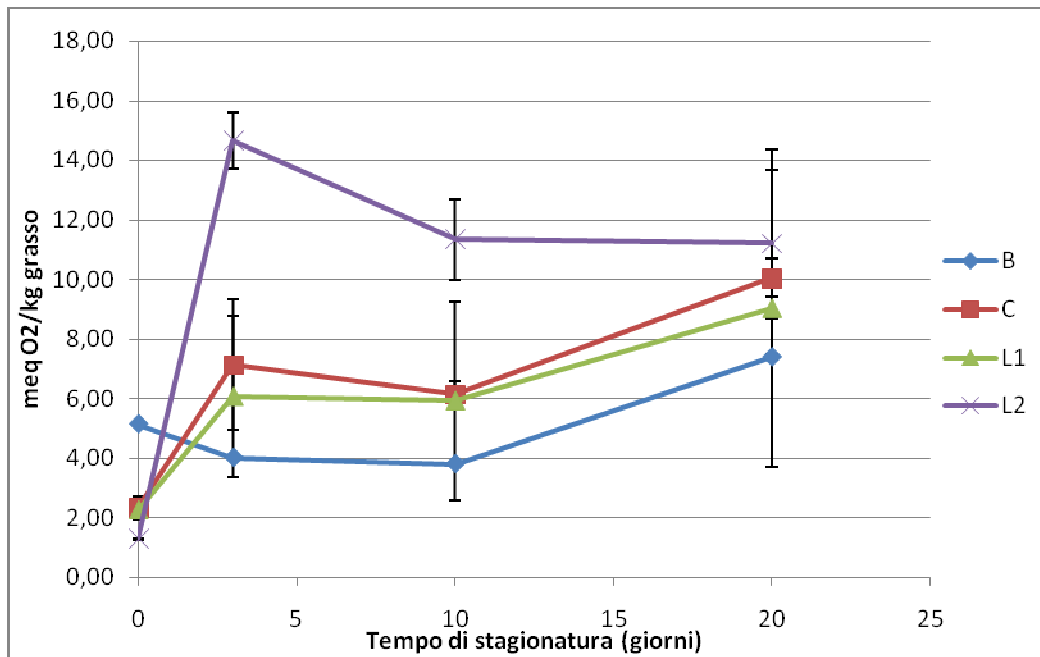


Figura 18: Grafico che descrive l'andamento delle medie del numero di perossidi per ogni tesi in funzione ai giorni di esposizione

Osservando il grafico, i perossidi tendono a seguire andamento tendenzialmente altalenante per le tesi CONTROLLO, L1 e L2, mentre per la tesi BIANCO segue un andamento a parabola ascendente: cala nei primi due intervalli per poi aumentare nell'ultimo intervallo di stagionatura. Le tesi L1 ed CONTROLLO presentano un andamento molto simile: aumento del numero di perossidi nel primo intervallo di stagionatura, calo leggero nel secondo intervallo e aumento spiccato nell'ultimo intervallo. La tesi L2 ha un andamento simile a quello delle tesi CONTROLLO ed L1 per i primi due intervalli, ma con aumenti e diminuzioni più marcate, mentre nell'ultimo intervallo il numero di perossidi subisce un leggero calo a differenza di tutte le altre tesi.

Nello specifico posso per ogni tesi posso dire che:

- la tesi BIANCO parte da un numero di perossidi di 5,14meq O<sub>2</sub>/kg grasso (il valore di partenza medio più alto tra tutte le tesi) che cala ad 4,01meq O<sub>2</sub>/kg grasso nei primi 3 giorni di stagionatura; nei 7giorni successivi (intervallo 3-10 giorni di esposizione) il numero di perossidi cala ancora arrivando a 3,80meq O<sub>2</sub>/kg grasso; nell'ultimo periodo di stagionatura (10-20 giorni di esposizione) il numero di perossidi aumenta fino ad arrivare a 7,38meq O<sub>2</sub>/kg grasso.
- La tesi CONTROLLO parte da un numero di perossidi di 2,33meq O<sub>2</sub>/kg grasso, e nei primi 3 giorni di stagionaturail numero di perossidi subisce un aumento fino ad arrivare ad 7,13meq O<sub>2</sub>/kg grasso; nell'intervallo successivo (intervallo 3-10 giorni) il numerosubisce un calo fermandosi a quota 5,92meq O<sub>2</sub>/kg grasso, mentre negli ultimi 10 giorni il numero di perossidi aumenta fino ad arrivare ad 9,02meq O<sub>2</sub>/kg grasso.



- c. la tesi L1 parte da un numero di perossidi di 2,26meq O<sub>2</sub>/kg grasso e nei primi 3 giorni di stagionatura cala ad 6,06meq O<sub>2</sub>/kg grasso; nel secondo intervallo di tempo (3-10 giorni ) il numero di perossidi cala leggermente fino a 5,92meq O<sub>2</sub>/kg grasso, per poi subire un aumento ad 9,02meq O<sub>2</sub>/kg grasso negli ultimi 10 giorni.
- d. la tesi L2 parte dal numero di perossidi più basso di 1,28meq O<sub>2</sub>/kg grasso e nei primi 3 giorni di stagionatura presenta l'aumento più elevato di tutti gli intervalli, di ben 13,37 meqO<sub>2</sub>/kg grasso arrivando a 14,65meq O<sub>2</sub>/kg grasso, il più alto valore medio di perossidi calcolato per tutte 4 le tesi di salami interi; nel secondo intervallo di stagionatura (0-3 giorni) il numero di perossidi cala fino ad 11,33meq O<sub>2</sub>/kg grasso; il numero di perossidi cala leggermente negli ultimi 10 giorni di esposizione toccando un valore medio di 11,19meq O<sub>2</sub>/kg grasso.

Dal grafico si può notare come i valori medi di perossidi della tesi BIANCO siano i più bassi nel secondo e nel terzo intervallo, mentre presenta il più alto valore medio di partenza. L'aumento del numero di perossidi più elevato è quello subito da L2 nel primo intervallo, mentre il calo più elevato si registra sempre in L2 (nel secondo intervallo); L2 presenta anche il valore finale più elevato e la maggior differenza tra valore iniziale e valore finale.

Dall'analisi statistica dei dati, l'ANOVA ad una via mostra che non ci sono differenze significative ( $p > 0,05$ ) tra le diverse tesi (B,C,L1,L2) per il numero di perossidi. L'ANOVA ad una via mostra però che c'è una differenza significativa tra i diversi tempi di stagionatura: il test HSD di Tukey, con livello di significatività pari a  $p < 0,05$  dimostra che il tempo T0 è significativamente diverso dai tempi T3,T10,T20. Lo stesso test di Tukey mostra, come già detto in precedenza, che il numero di perossidi è più basso al momento dell'insacco dei salami (T0), mentre è più elevato durante la stagionatura.

Tabella 17: si vedono le medie del numero di perossidi (meq O<sub>2</sub>/1000g grasso) e le d.s. in base al tempo di stagionatura (T0,T3,T10,T20)

	T0	d..s	T3	d.s	T10	d.s	T20	d.s	Significatività.
Perossidi (meq O <sub>2</sub> /kg grasso)	2,41 <sup>b</sup>	1,31	8,53 <sup>a</sup>	4,56	7,23 <sup>a</sup>	3,27	9,41 <sup>a</sup>	2,69	** (0,001 < 0,05)

## CORRELAZIONI TRA LE VARIABILI

Attraverso il software statistico SPSS versione 20.0 si è osservato che c'è una correlazione significativa ( $p < 0,05$ ) tra la variabile ACIDITA' titolabile e la variabile PEROSSIDI; inoltre c'è una correlazione molto significativa ( $p < 0,01$ ) tra la variabile ACIDITA' e la variabile %GRASSO.

Tabella 18: correlazione delle variabili in esame nello studio dei salami interi

		acidità	perossidi	tba	EE
acidità	Correlazione di Pearson	1	,429*	,089	,899**
	Sig. (2-code)		,020	,646	,000
	N	29	29	29	23
perossidi	Correlazione di Pearson	,429*	1	-,013	,349
	Sig. (2-code)	,020		,947	,103
	N	29	29	29	23
tba	Correlazione di Pearson	,089	-,013	1	-,074
	Sig. (2-code)	,646	,947		,737
	N	29	29	29	23
EE	Correlazione di Pearson	,899**	,349	-,074	1
	Sig. (2-code)	,000	,103	,737	
	N	23	23	23	23

\*. La correlazione è significativa al livello 0,05 (2-code).

\*\*. La correlazione è significativa al livello 0,01 (2-code).

### 4.1.5. pH, aw, UMIDITA'

#### pH

Nella tabella e nel grafico sottostanti sono riportati i valori di pH medi riscontrati nei salami interi nei diversi giorni di stagionatura.

Tabella 19: medie e d.s. dei valori di pH dei salami in funzione del tempo di stagionatura

medie	0	d.s	3	d.s	10	d.s.	20	d.s.	30	d.s.
B	5,57		5,40		5,25		5,38	0,05	5,36	0,03
C	5,53	0,04	5,34	0,04	5,17	0,01	5,35	0,03	5,27	0,02
L1	5,53	0,03	5,28	0,00	5,16	0,03	5,32	0,03	5,23	0,02
L2	5,47	0,01	5,35	0,00	5,11	0,00	5,27	0,02	5,21	0,03

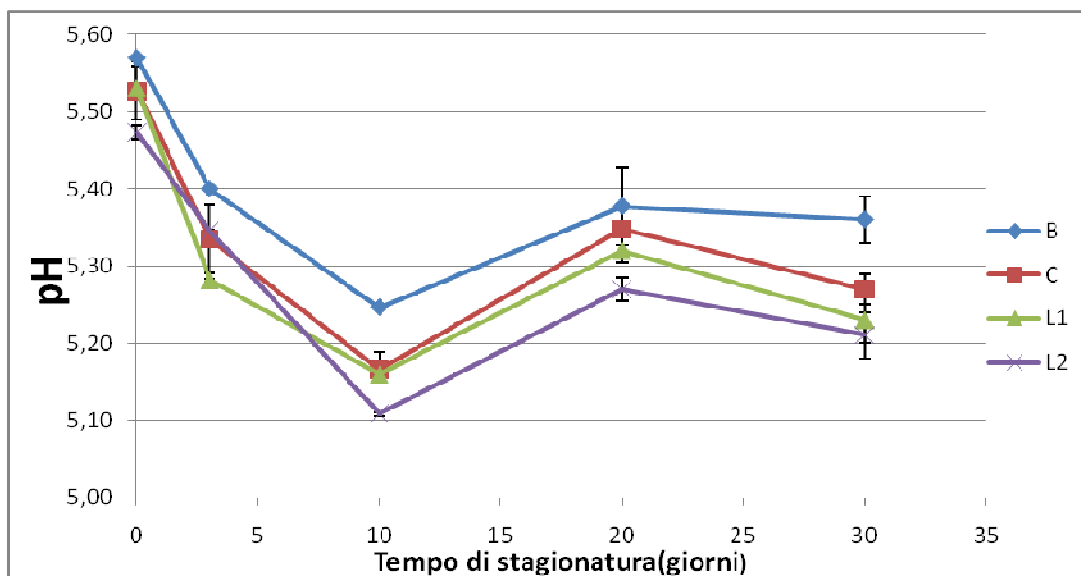


Figura 19: Grafico sull'andamento dei valori di pH medi in funzione del tempo di stagionatura dei salami

In linea generale l'andamento del pH è simile per tutte 4 le tesi in esame: al momento dell'insacco si parte da valori medi di pH compresi fra 5,47 e 5,57, comunque inferiori al 5,60. Dal momento dell'insacco il pH scende nei primi tre giorni di stagionatura fino a valori di 5,30-5,40; la discesa del pH continua fino a 10 giorni di stagionatura toccando i valori medi minimi per ogni tesi che si aggirano attorno a 5,10-5,25. Da 10 a 20 giorni il pH ha un rialzo a valori simili a quelli registrati al tempo 3, cioè appena al di sotto del 5,40-5,30. Negli ultimi 10 giorni di stagionatura il pH scende leggermente e si attesta su valori di 5,20-5,30.

La tesi BIANCO è quella che presenta un'acidificazione meno spinta rispetto alle altre tesi. La tesi L2 presenta nei primi 3 giorni, un acidificazione un po' più lenta rispetto alle tesi L1 e CONTROLLO, dai 3 ai 10 giorni di stagionatura presenta un abbassamento di pH rapido toccando 5,11 a 10 giorni; nei giorni successivi L2 segue l'andamento delle tesi L1 ed CONTROLLO.

Le tesi L1 e CONTROLLO presentano un andamento simile, solo che L1 registra valori medi inferiori a quelli della tesi CONTROLLO, in tutti i giorni di stagionatura in cui si è proceduta alla misurazione.

aw

Nella tabella e nel grafico sottostanti sono riportati i valori di aw medi riscontrati nei salami interi nei diversi giorni di stagionatura.

Tabella 20: medie e d.s. dei valori dell'aw dei salami in funzione del tempo di stagionatura

medie	0	d.s	3	d.s	10	d.s.	20	d.s.	30	d.s.
B	0,968		0,962		0,949		0,934	0,002	0,912	0,007
C	0,956	0,006	0,957	0,002	0,945	0,001	0,930	0,001	0,913	0,004
L1	0,961	0,001	0,958	0,001	0,944	0,000	0,928	0,002	0,911	0,007
L2	0,962	0,001	0,958	0,002	0,947	0,001	0,927	0,001	0,909	0,006

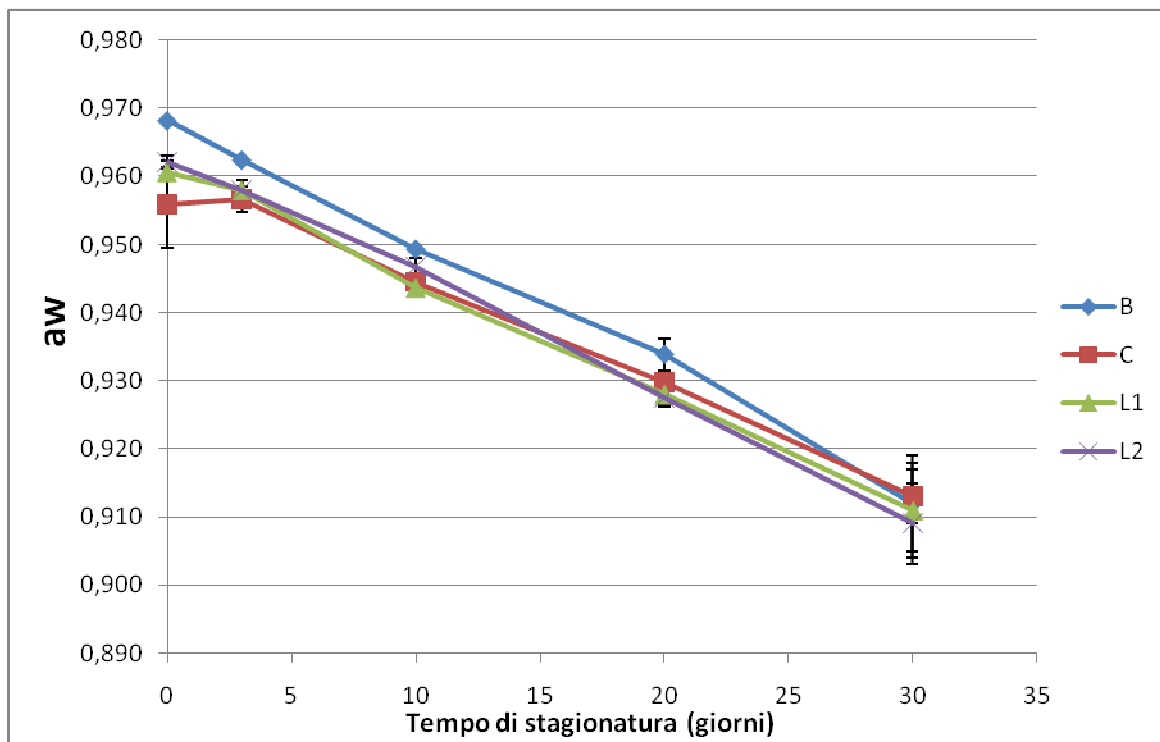


Figura 20: Grafico sull' andamento dei valori di aw medi in funzione del tempo di stagionatura dei salami

L'andamento dei valori medi di aw è simile in tutte e 4 le tesi dei salami studiati: col passare dei giorni di stagionatura si osserva una riduzione costante dell'aw. Si parte con valori intorno a 0,960 e a 30 giorni di stagionatura si toccano valori intorno a 0,910.

#### UMIDITA'

L'umidità espressa come % di acqua sul campione tal quale, cala progressivamente mano a mano che passano i giorni durante la stagionatura. Mediamente dal momento dell'insacco a 30 giorni di stagionatura, i salami delle 4 tesi (BIANCO, CONTROLLO, L1 ed L2) presentano un calo dell'umidità di circa il 30%.

Tabella 21: medie e d.s. dei valori dell'umidità dei salami in funzione del tempo di stagionatura

medie	0	d.s.	3	d.s.	10	d.s.	20	d.s.
B	56,57		51,74		47,61		40,03	1,19
C	55,97	0,43	53,69	0,41	49,44	1,26	43,67	0,92
L1	55,83	0,61	52,88	0,57	45,85	1,80	40,45	0,68
L2	56,20	0,31	53,66	0,49	48,66	1,09	41,72	3,08

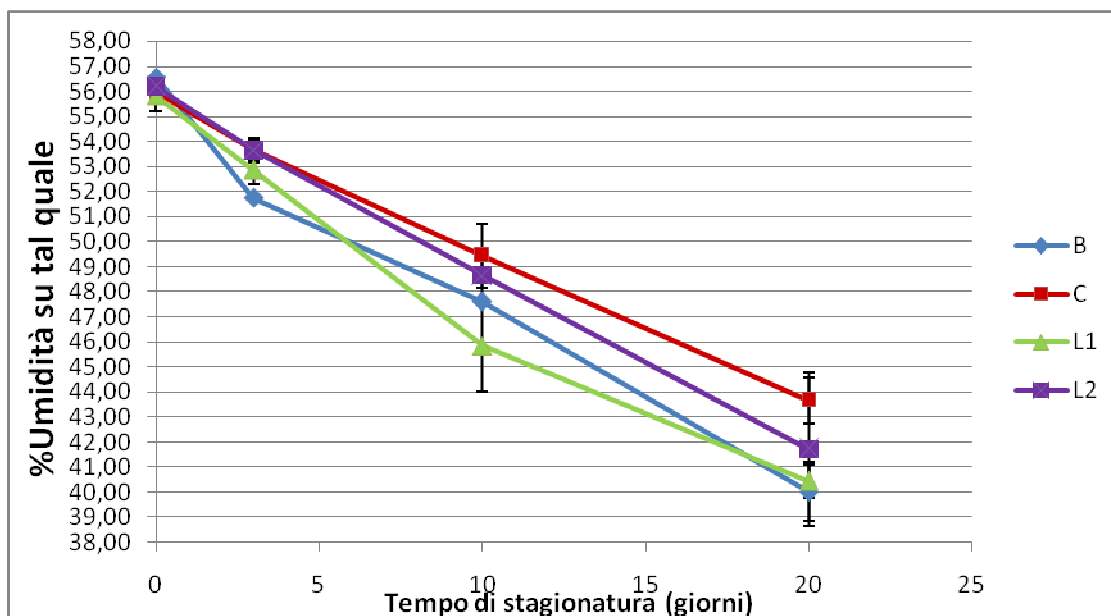


Figura 21: Grafico sull'andamento dei valori di umidità medi in funzione del tempo di stagionatura dei salami

Durante la stagionatura le tesi BIANCO ed L1 si alternano per la velocità di calo del quantitativo d'acqua: nel primo intervallo di tempo (0-3 giorni) la tesi BIANCO presenta un calo di 4,83 punti% mentre L1 solo di 2,95 punti%; nell'intervallo successivo la situazione si inverte: la tesi BIANCO presenta un calo di 4,13 punti%, mentre la tesi L1 cala di ben 7,03 punti% arrivando a 45,85% umidità a 10 giorni di fermentazione. Negli ultimi 10 giorni di fermentazione la tesi BIANCO cala di 7,59 punti % e la tesi L1 di 5,40 punti.

Le tesi CONTROLLO ed L2 presentano un calo dei valori di umidità più costante e si attestano su valori superiori alle tesi L1 e BIANCO ad ogni tempo di stagionatura in cui si è svolta la misurazione.

Tabella 22: variazioni dell'umidità tal quale in funzione del tempo di stagionatura

	$\Delta t_{0-3}$	$\Delta t_{3-10}$	$\Delta t_{10-20}$
B	-4,83	-4,13	-7,59
C	-2,28	-4,25	-5,76
L1	-2,95	-7,03	-5,40
L2	-2,54	-5,00	-6,94

## 4.2 SALAMI STAGIONATI, CONFEZIONATI IN MAP, ESPOSTI

Si tratta di salami stagionati 30 giorni, poi affettati, messi in MAP a 4-6°C ed esposti alla luce neon: si tratta di un ambiente simile a quello del banco frigo del supermercato.

### 4.2.1 QUANTITA' DI GRASSO

Le considerazioni vengono fatte sulle medie e deviazioni standard dei dati raccolti durante l'attività di laboratorio, come per le altre variabili, non è sempre stato possibile calcolare la deviazione standard per ogni tesi ad ogni tempo di esposizione

Tabella 23: medie e deviazioni standard della quantità di grasso(g/100g salame) in base ai vari tempi di esposizione

GRASSO	T0	T10	T20	T30
B	20,78	17,85	23,46	20,62
C	17,89	18,50	22,52 ±0,53	16,55 ±3,02
L1	18,28	16,13 ±1,06	21,89 ±2,02	18,07 ±4,04
L2	21,72	20,62 ±1,74	23,61 ±3,90	16,36 ±1,07

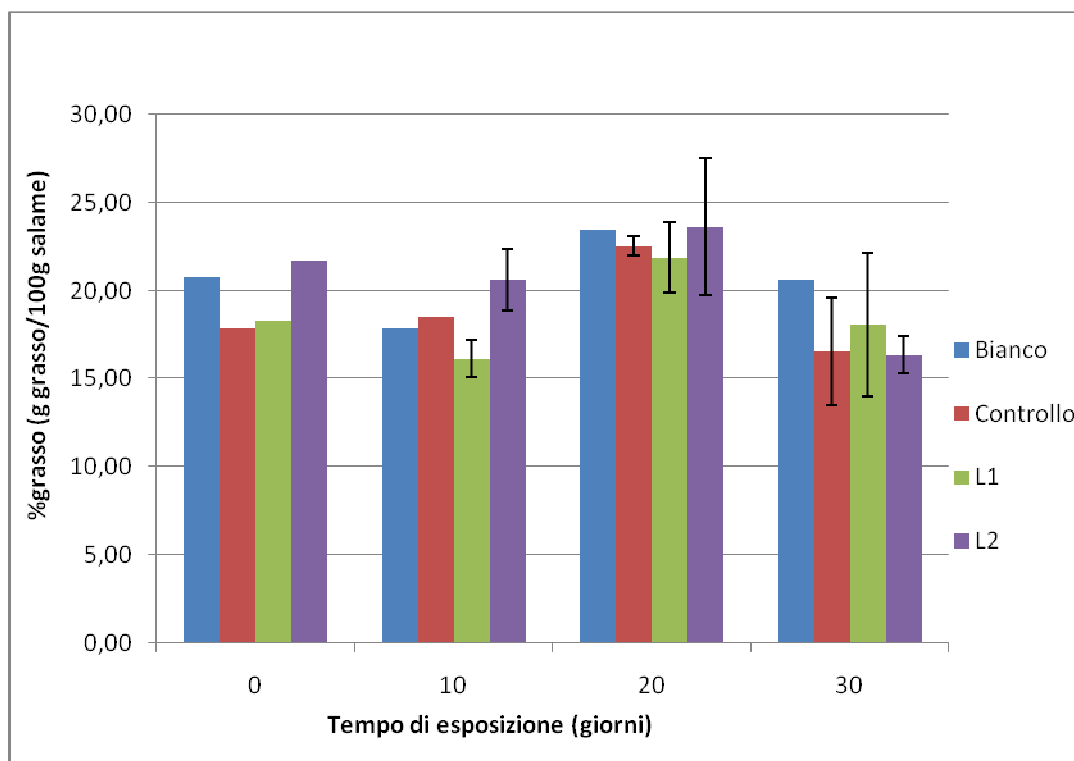


Figura 22: Grafico dei valori delle medie delle quantità di grasso in base ai giorni di esposizione

In linea generale si può osservare che i valori di partenza di grasso si discostano tra le tesi, ma nel tempo presentano un andamento simile tra loro. Dal grafico si può osservare che il quantitativo di grasso nei primi 10 giorni di esposizione è leggermente inferiore a quelli all'inizio dell'esposizione,

tranne nella tesi controllo dove si osserva un valore leggermente più alto; in tutte le tesi a 20 giorni di esposizione si osservano valori del tenore di grasso più alto rispetto al tempo 10. Tutte le tesi raggiungono il picco del quantitativo di grasso a 20 giorni. A 30 giorni di esposizione il tenore di grasso presenta dei valori inferiori a T20, quasi simili ai valori iniziali; nelle tesi L2 e controllo a 30 giorni si osservano un valori inferiori a quelli di partenza.

Nello specifico le diverse tesi osservano i seguenti valori:

- a. la tesi BIANCO: parte da un valore 20,78% che cala fino ad 17,85% nei primi 10 giorni di esposizione; nell'intervallo 10- 20 giorni il contenuto di grasso si alza fino a raggiungere il 23,36%, mentre negli ultimi 10 giorni di esposizione si osserva un calo fino al valore di 20,62, molto simile al valore di partenza.
- b. la tesi CONTROLLO parte da un valore di 17,89 % che, al contrario delle altre tesi, aumenta fino al 18,50% a 10 giorni di esposizione; come per le altre tesi, nel secondo intervallo di esposizione (10-20 giorni) il contenuto di grasso sale e arriva ad un picco di 22,52%, mentre nell'ultimo intervallo di esposizione c'è un calo considerevole fino ad 16,55%, un valore inferiore a quello di partenza.
- c. la tesi L1 parte da un valore grasso del 18,28% che scende ad 16,13% nel primi intervallo di esposizione; nel periodo che intercorre tra i 10 e i 20 giorni di esposizione il contenuto di grasso aumenta fino a raggiungere il 21,89 %,ma negli ultimi giorni di esposizione si osserva un calo del tenore di grasso che si attesta a 18,07% a 30 giorni di esposizione.
- d. la tesi L2 parte da un valore 21,72% che cala fino ad 20,62% nei primi 10 giorni di esposizione; nell'intervallo 10-20 giorni il contenuto di grasso aumenta fino a 23,61% ( il valore più alto tra le diverse medie), mentre negli ultimi 10 giorni di esposizione si osserva un calo fino al 16,36%, il valore più basso tra le diverse medie ed è anche un valore inferiore a quello di partenza.

Da notare è sicuramente il fatto che per la tesi L2 si osservano i valori medi massimi e minimi del contenuto% di grasso e che sempre la tesi L2 parte dal valore medio iniziale più alto. Le tesi BIANCO ed L1 presentano percentuali del contenuto di grasso finali molto vicini a rispettivi valori iniziali. Per tutte le tesi si osserva il picco del contenuto di grasso a 20 giorni di esposizione, con valori medi che si concentrano in 2 punti %ali: dal 21,89 % di L1 fino al 23,61% di L2.

#### 4.2.2 TBARS:

Le considerazioni che seguono vengono fatte sulle medie e deviazioni standard dei dati raccolti durante l'attività di laboratorio. In alcuni casi non è stato possibile calcolare la deviazione standard perché era presente un solo valore valido per quella tesi e per quei giorni di esposizione.

Tabella 24: medie e deviazioni standard del TBARS in funzione dei giorni di esposizione

Tempo/tesi	malonaldeide mg/kg salame			
	B	C	L1	L2
0	97,70±8,40	80,64± 2,89	13,66± 5,33	10,58± 5,94
10	110,76	121,760	10,75± 0,37	11,60± 2,73
20	90,64	122,42± 11,04	16,42± 6,93	10,14± 1,12
30	118,319	142,81± 11,44	22,28± 2,55	18,60± 8,64

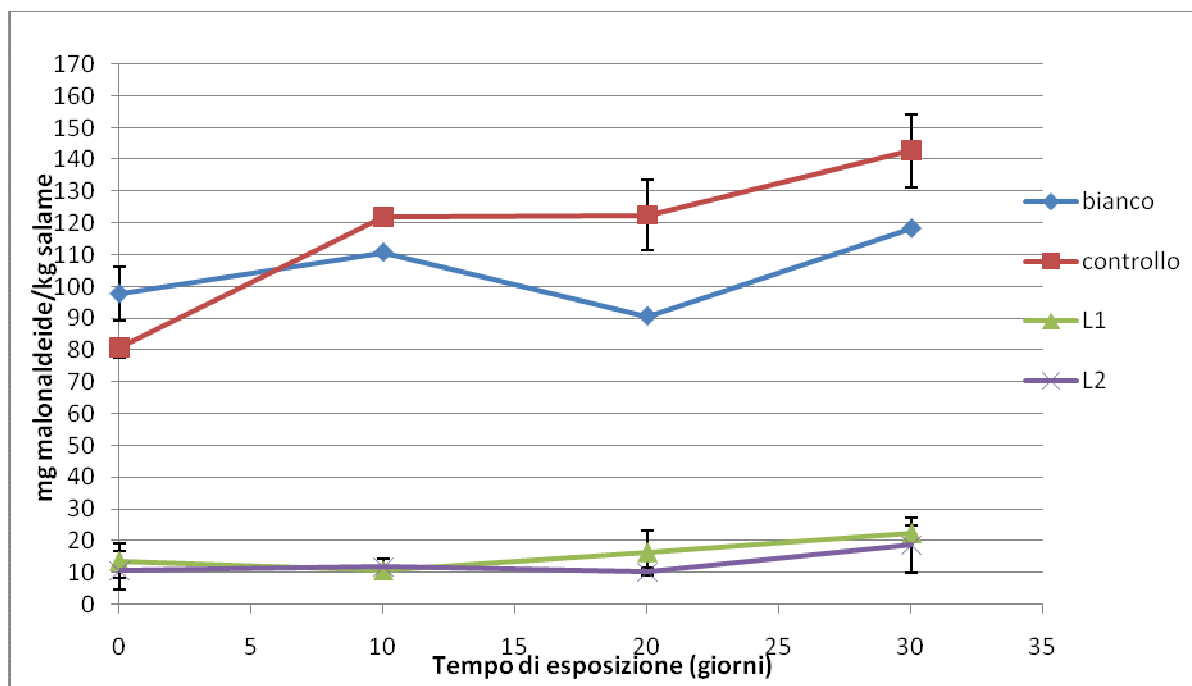


Figura 23: Grafico che descrive l'andamento delle medie dei TBARS per ogni tesi in funzione dei giorni di esposizione

Dal grafico e dalla tabella si può osservare che già in partenza le 4 tesi presentano valori di mg di malondialdeide/kg di campione diversi a due a due:

- le tesi BIANCO e CONTROLLO partono rispettivamente da valori di 97,701 mg malondialdeide/kg salame e 80,641 mg malondialdeide/kg salame, si tratta di valori di partenza di per sé abbastanza alti
- le tesi L1 ed L2 partono rispettivamente da valori di 13,660mg malondialdeide/kg salame e di 10,576 mg malondialdeide/kg salame, si tratta di valori almeno 7 volte più bassi delle tesi BIANCO e CONTROLLO.



Una divisione a due a due delle 4 tesi in partenza può essere spiegata dal fatto che nel BIANCO e nel CONTROLLO non sono presenti polifenoli, mentre nelle tesi L1 ed L2 sì, e questo ha influito durante la stagionatura precedente alla riduzione in fette, messa in atmosfera modificata ed esposizione su un ipotetico banco frigo, dei salami. Durante la stagionatura di 30 giorni i polifenoli hanno quindi rallentato l'ossidazione lipidica nel grasso dei salami delle tesi L1 ed L2, questo rallentamento ha portato ad una minor produzione di composti secondari dell'ossidazione lipidica, tra i quali la malondialdeide. Durante la stagionatura nelle tesi BIANCO e CONTROLLO, non essendoci i polifenoli, l'ossidazione lipidica è progredita normalmente portando ad una maggior formazione di malondialdeide che ho quantificato.

Durante i 30 giorni di esposizione a 4-6°C e alla luce del banco frigo c'è stata un'evoluzione dell'ossidazione lipidica dei salami: per effetto della luce, con il passare del tempo, l'ossidazione lipidica aumenta e porta all'aumento di concentrazione di composti secondari, tra i quali la malondialdeide.

Nello specifico ho potuto osservare che

- a. la tesi BIANCO parte da un valore di 97,701 mg malondialdeide/kg salame e aumenta nei primi 10 giorni di esposizione fino a 110,761 mg malondialdeide/kg salame. La concentrazione di malondialdeide presenta una flessione ad 90,641 mg malondialdeide/kg salami nei 10 giorni successivi, seguita da un aumento fino a 118,319 mg malondialdeide/kg salame a 30 giorni di esposizione.
- b. la tesi CONTROLLO parte da un valore di 80,641 mg malondialdeide/kg salame e aumenta nei primi 10 giorni di esposizione fino a 121,758 mg malondialdeide/kg salame. La concentrazione di malondialdeide rimane pressoché costante nell'intervallo di tempo 10-20 giorni di esposizione, mentre aumenta fino a 142,813 mg malondialdeide/kg salame nell'ultimo intervallo di esposizione (20-30 giorni).
- c. la tesi L1 parte da un valore di 13,660 mg malondialdeide/kg salame e subisce una flessione nei primi 10 giorni di esposizione fino a 10,748 mg malondialdeide/kg salame. La concentrazione di malondialdeide aumenta costantemente nei 2 intervalli di tempo successivi: a 20 giorni la malondialdeide si attesta a 16,417 mg/kg salame e a 30 giorni raggiunge i 22,279 mg/kg salame.
- d. la tesi L2 parte da un valore di 10,576 mg malondialdeide/kg salame rimane intorno ai 10-11,6 mg malondialdeide/kg salame fino a 20 giorni di esposizione. Nell'ultimo intervallo di tempo la concentrazione di malondialdeide aumenta fino a 18,595 mg/kg salame.

Dall'analisi statistica dei dati, l'ANOVA ad una via mostra che ci sono differenze significative ( $p > 0,05$ ) tra le diverse tesi (B,C,L1,L2) per il TBARS: il test HSD di Tukey, con un livello di

significatività pari a  $p < 0,05$ , dimostra che le tesi L1,L2 presentano valori medi di TBARS significativamente inferiori a quelli delle tesi B,C. L'ANOVA ad una via mostra però che non c'è una differenza significativa tra i diversi tempi di esposizione (T0,T10,T20,T30).

Tabella 25 : medie del TBARS (mg MDA/kg salame) ed.s. in base al fattore tesi (B,C,L1,L2)

	B	d..s	C	d.s	L1	d.s	L2	d.s	Significatività
TBA (mg MDA/kg salame)	104,36 <sup>a</sup>	12,50	122,14 <sup>a</sup>	23,79	16,81 <sup>b</sup>	5,95	13,16 <sup>b</sup>	5,74	*** (0,000 < 0,05)

#### 4.2.3 ACIDITA' TITOLABILE

Le considerazioni che seguono vengono fatte sulle medie e deviazioni standard dei dati raccolti durante l'attività di laboratorio. In alcuni casi non è stato possibile calcolare la deviazione standard perché era presente un solo valore valido per quella tesi e per quei giorni di esposizione.

L'acidità titolabile è espressa come % di acido oleico .

Tabella 26: medie e deviazioni standard

<b>AT (%acido oleico)</b>	<b>Tempo 0</b>	<b>Tempo 10</b>	<b>Tempo 20</b>	<b>Tempo 30</b>
<b>C</b>	2,95	2,95	3,20±0,007	3,88±0,11
<b>L1</b>	2,96	3,06±0,60	3,64±0,17	4,59±0,14
<b>L2</b>	3,18	3,35±0,12	3,95±1,15	4,51±0,05
<b>B</b>	3,05	3,52	4,00	4,47

Tabella 27: gli aumenti di AT da un tempo di esposizione al successivo

<b>AT aumenti</b>	<b>Intervallo 0-10</b>	<b>Intervallo 10-20</b>	<b>Intervallo 20-30</b>
<b>C</b>	0,00	0,25	0,67
<b>L1</b>	0,10	0,58	0,95
<b>L2</b>	0,17	0,60	0,56
<b>B</b>	0,47	0,48	0,47

Dal grafico (pagina seguente) e dalla tabella si può osservare come in tutte le tesi, l'acidità totale tende a salire col passare dei giorni di esposizione, conseguenza del fatto che nel processo di irrancimento idrolitico vengono liberati acidi grassi, tra cui l'acido oleico, che faranno da substrato per la formazione di idroperossidi e composti secondari (aldeidi, chetoni, tra cui la malondialdeide quantificata con la metodica dell'acido tiobarbiturico).

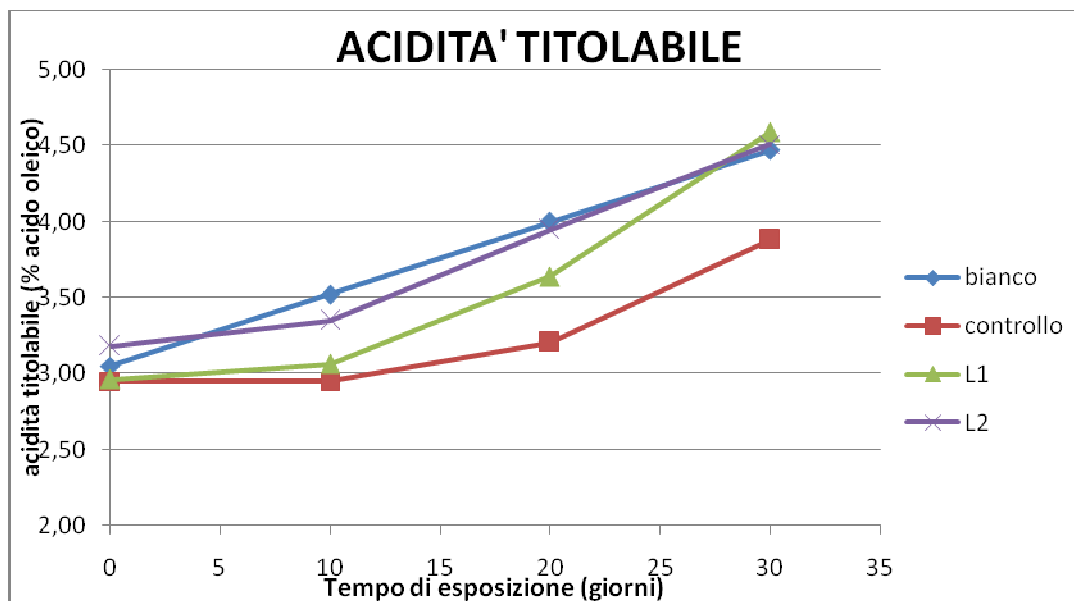


Figura 24: Grafico che descrive l'andamento delle medie dell'acidità per ogni tesi in funzione dei giorni di esposizione

Osservando in dettaglio i dati ed il grafico ho osservato che

- a. la tesi BIANCO parte da un valore di 3,05 % acido oleico e aumenta costantemente di circa mezzo punto percentuale ogni 10 giorni. Al termine dell'esposizione la tesi BIANCO si attesta su un valore di 4,47 in % acido oleico, un valore molto vicino a quello riscontrato per i salami delle tesi L1 ed L2.
- b. la tesi CONTROLLO parte da un valore di 2,95 % acido oleico e non aumenta per i primi 10 giorni di esposizione. A 20 giorni di esposizione la concentrazione di acido oleico sale a 3,20 %, un aumento ( $3,20 - 2,95 = 0,25$ ) inferiore rispetto alle tesi BIANCO ( $4,00 - 3,52 = 0,48$ ), L1 ( $3,64 - 3,06 = 0,58$ ), L2 ( $3,95 - 3,35 = 0,60$ ) nello stesso intervallo da 10 a 20 giorni di esposizione. Nell'ultimo periodo di esposizione, quello che va da 20 a 30 giorni, la % acido oleico subisce un aumento superiore al precedente ( $0,68 > 0,25$ ) e si attesta intorno al 3,88 %. La tesi controllo a fine esposizione giunge ad un valore di acidità inferiore (al di sotto del 4% acido oleico) rispetto alle altre 3 tesi che si aggirano intorno ad un valore di circa 4,5 % acido oleico.
- c. la tesi L1 parte da un valore di 2,96 % acido oleico e nei primi 10 giorni di esposizione aumenta fino a 3,06% acido oleico: si tratta di un aumento (0,10) inferiore alle tesi BIANCO (0,47) ed L2 (0,17), ma non alla tesi controllo (0,00). A 20 giorni di esposizione la concentrazione di acido oleico subisce un aumento superiore al precedente raggiungendo il valore di 3,64 % che risulta inferiore alle tesi BIANCO ed L2, ma superiore alla tesi CONTROLLO nello stesso periodo di esposizione. Nell'ultimo periodo di esposizione (da 20

a 30 giorni) la % acido oleico subisce un aumento di quasi 1% arrivando a 4,59, il valore più alto tra le 4 tesi, ma vicino alle tesi BIANCO ed L2.

- d. la tesi L2 parte da un valore di 3,18 % acido oleico e nei primi 10 giorni di esposizione aumenta fino a 3,35% acido oleico: si tratta di un aumento (0,17) inferiore solo a quello del BIANCO nello stesso periodo. A 20 giorni di esposizione la concentrazione di acido oleico subisce un aumento superiore al precedente raggiungendo il valore di 3,95 % che risulta inferiore alla sola tesi BIANCO. Nell'ultimo periodo di esposizione (da 20 a 30 giorni) la % acido oleico subisce un aumento simile al precedente arrivando a 4,51, valore vicino alle tesi BIANCO ed L1.

Da questi dati emerge che la tesi controllo ha un aumento di acidità titolabile più rallentato e raggiunge un livello finale inferiore rispetto alle altre tre tesi: segue un andamento a se, quasi scollegato dalle altre tre tesi.

Per quanto riguarda le tesi L1 ed L2, possiamo dire che entrambe presentano:

- un rallentamento dell'aumento di acidità
- valori in % acido oleico inferiori

nei primi 10 giorni di esposizione rispetto alla tesi BIANCO.

Le stesse tesi L1 ed L2 nei giorni di esposizione successivi (20 e 30 giorni) presentano un aumento di acidità in linea o superiore alla tesi BIANCO e arrivano a % finali di acido oleico simili o leggermente superiori rispetto alla stessa tesi BIANCO. Dall'analisi statistica dei dati, l'ANOVA ad una via mostra che non ci sono differenze significative ( $p > 0,05$ ) tra le diverse tesi (B,C,L1,L2) per l'acidità titolabile. L'ANOVA ad una via mostra però che c'è una differenza significativa tra i diversi tempi di esposizione per l'acidità titolabile: il test HSD di Tukey, con livello di significatività pari a  $p < 0,05$  dimostra che i tempi T0,T10,T20 sono significativamente diversi dal tempo T30. I valori medi di acidità aumentano all'aumentare dei giorni di esposizione, ma solo al tempo di esposizione T30 i valori di acidità sono significativamente più elevati rispetto a agli altri tempi esposizione.

Tabella 28: medie e d.s. dell'acidità in funzione del tempo di esposizione. Vengono riportati se le differenze tra i diversi tempi di esposizione sono o meno significative secondo il test HSD di Tukey

	0	d.s	10	d.s	20	d.s	30	d.s	Significatività
acidità (%acido oleico)	3,04 <sup>b</sup>	0,11	3,22 <sup>b</sup>	0,35	3,47 <sup>b</sup>	0,65	4,39 <sup>a</sup>	0,31	***( $0,000 < 0,05$ )

#### 4.2.4 PEROSSIDI

Le considerazioni vengono fatte sulle medie e deviazioni standard dei dati raccolti durante l'attività di laboratorio. In alcuni casi non è stato possibile calcolare la deviazione standard.

Tabella 29: medie e deviazioni standard

Perossidi	Tempo 0	Tempo 10	Tempo 20	Tempo 30
<b>C</b>	48,60	33,71	12,54±1,14	19,64±5,64
<b>L1</b>	12,70	8,52±1,01	15,34±5,17	12,15±0,53
<b>L2</b>	19,90	6,53±1,85	18,32±4,38	15,05±8,40
<b>B</b>	24,10	34,18	9,96	20,65

Tabella 30: le variazioni del numero di perossidi

Perossidi variazioni	$\Delta t$ 0-10	$\Delta t$ 10-20	$\Delta t$ 20-30	$\Delta t$ 0-30
C	-14,89	-21,17	7,10	-28,96
L1	-4,18	6,82	-3,18	-0,55
L2	-13,37	11,79	-3,27	-4,85
B	10,08	-24,22	10,69	-3,45

Già dalle tabelle e dal grafico ho potuto osservare come l'andamento del numero di perossidi non è lineare, ma anzi è un susseguirsi di diminuzioni e aumenti: questo perché i perossidi, o meglio gli idroperossidi, sono i prodotti primari nell'ossidazione lipidica e vengono continuamente prodotti e trasformati, determinando questo effetto altalena.

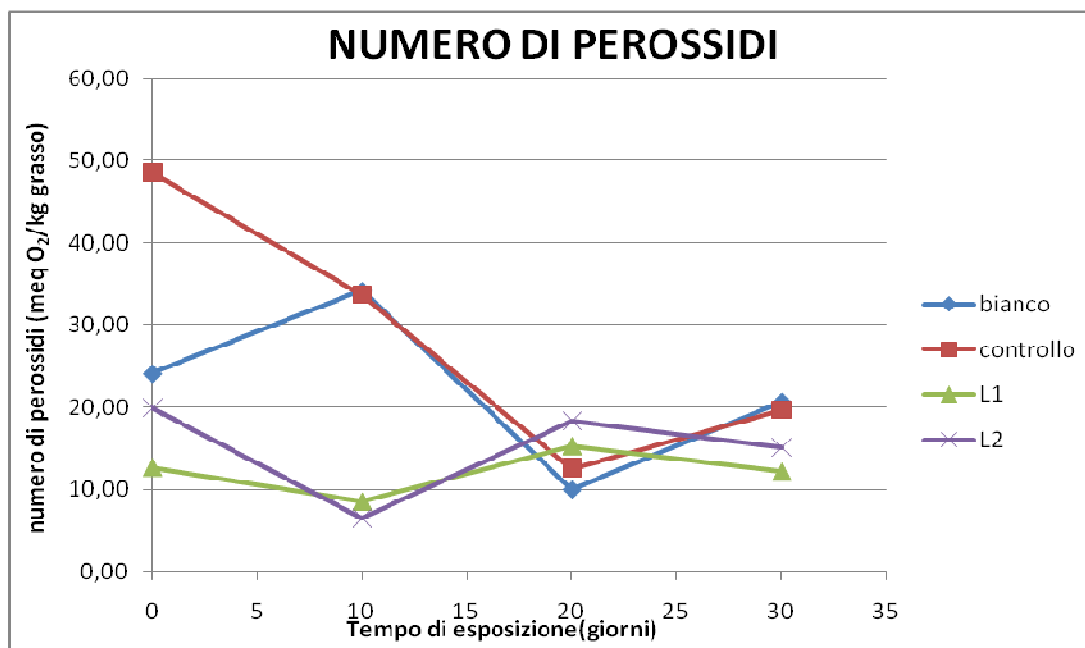


Figura 25: Grafico che descrive l'andamento delle medie del numero di perossidi per ogni tesi in funzione ai giorni di esposizione

Osservando bene il grafico ho osservato che l'andamento del numero di perossidi per le tesi L1 ed L2 è simile: diminuzione nei primi 10 giorni di esposizione, aumento nell'intervallo da 10 a 20 giorni di esposizione ed infine un calo negli ultimi 10 giorni di esposizione.

La tesi BIANCO nei primi 10 giorni di esposizione presenta un aumento del numero di perossidi, che cala bruscamente nei 10 giorni successivi (intervallo 10-20 giorni di esposizione) per poi risalire nell'ultimo periodo di esposizione (20-30 giorni di esposizione).

La tesi CONTROLLO nei primi 10 giorni evidenzia un forte calo del numero di perossidi, che continua anche nei 10 giorni successivi (intervallo 10-20 giorni) avvicinandosi molto all'andamento della tesi BIANCO fino alla fine del periodo di esposizione: calo del numero di perossidi nell'intervallo 10-20 giorni e aumento nell'intervallo 20-30 giorni.

Le tesi CONTROLLO e BIANCO presentano un andamento e dei valori medi vicini nel numero di perossidi durante il secondo e terzo intervallo di tempo di esposizione.

Nello specifico posso per ogni tesi posso dire che:

- e. la tesi BIANCO parte da un numero di perossidi di 24,10 meq O<sub>2</sub>/kg grasso che aumenta ad 34,18 meq O<sub>2</sub>/kg grasso nei primi 10 giorni di esposizione; nei 10 giorni successivi (intervallo 10-20 giorni di esposizione) il numero di perossidi cala di 24,22 meq O<sub>2</sub>/kg grasso arrivando a 9,96 meq O<sub>2</sub>/kg grasso; nell'ultimo periodo di esposizione (20-30 giorni di esposizione) il numero di perossidi aumenta fino ad arrivare a 20,65 meq O<sub>2</sub>/kg grasso.
- f. La tesi CONTROLLO parte da un numero di perossidi di 48,60 meq O<sub>2</sub>/kg grasso, il valore di partenza più alto rispetto a tutte le altre tesi, e nei primi 10 giorni di esposizione il numero di perossidi cala ad 33,71 meq O<sub>2</sub>/kg grasso; il calo continua anche nei 10 giorni successivi (intervallo 10-20 giorni) arrivando a quota 12,54 meq O<sub>2</sub>/kg grasso, mentre negli ultimi 10 giorni il numero di perossidi aumenta fino ad arrivare ad 19,64 meq O<sub>2</sub>/kg grasso. La tesi controllo presenta il più forte calo del numero di perossidi dal valore di partenza fino al valore finale(-28,96 meq O<sub>2</sub>/kg grasso).
- g. la tesi L1 parte da un numero di perossidi di 12,70 meq O<sub>2</sub>/kg grasso e nei primi 10 giorni di esposizione cala ad 8,52 meq O<sub>2</sub>/kg grasso; nel secondo intervallo di tempo (10-20 giorni di esposizione) il numero di perossidi aumenta fino a 15,34 meq O<sub>2</sub>/kg grasso, per poi calare ad 12,15 meq O<sub>2</sub>/kg grasso negli ultimi 10 giorni. La tesi L1 presenta il più basso valore finale (al tempo di esposizione di 30 giorni) per quanto riguarda il numero di perossidi, lo stesso valore però è molto vicino al valore iniziale di perossidi della tesi stessa: la variazione del numero di perossidi dal valore iniziale a quello finale, di -0,55 meq O<sub>2</sub>/kg grasso, è la più bassa di tutte le tesi in esame.

- h. la tesi L2 parte da un numero di perossidi di 19,90 meq O<sub>2</sub>/kg grasso e nei primi 10 giorni di esposizione cala ad 6,53 meq O<sub>2</sub>/kg grasso, il più basso valore medio di perossidi calcolato per tutte 4 le tesi di salami esposti nell'ipotetico banco frigorifero; nel secondo intervallo di esposizione (10-20 giorni) il numero di perossidi aumenta fino ad 18,32 meq O<sub>2</sub>/kg grasso, per poi calare ad 15,05 meq O<sub>2</sub>/kg grasso negli ultimi 10 giorni di esposizione.

Dal grafico e dalle tabelle ho potuto notare che negli ultimi 2 tempi di esposizione, ovvero a 20 e 30 giorni, i valori del numero di perossidi sono compresi circa tra 10,00 e 20,00 meq O<sub>2</sub>/kg grasso per tutte e 4 le tesi prese in esame, considerando che partivano da valori anche distanti fra di loro.

L'ANOVA ad una via mostra che ci sono delle differenze appena significative tra le diverse tesi (B,C,L1,L2), infatti  $0,05 < (p=0,054) < 0,100$ . Dall'ANOVA ad una via in base al fattore tempo di esposizione, emerge che i valori medi del numero di perossidi sono più alti all'inizio dell'esposizione e poi calano con l'aumentare dei giorni di esposizione, ma non si tratta di differenze significative ( $p > 0,05$ ).

#### CORRELAZIONI TRA VARIABILI

Attraverso il software statistico SPSS versione 20.0 si è osservato che c'è una correlazione significativa ( $p < 0,05$ ) tra la variabile PEROSSIDI e la variabile TBARS: ovvero l'andamento della variabile PEROSSIDI è significativamente simile all'andamento della variabile TBARS.

**Correlazioni**

		acidità	perossidi	tba
acidità	Correlazione di Pearson	1	-,287	-,081
	Sig. (2-code)		,170	,758
	N	28	28	28
perossidi	Correlazione di Pearson	-,287	1	,429*
	Sig. (2-code)	,170		,023
	N	28	28	28
tba	Correlazione di Pearson	-,081	,429*	1
	Sig. (2-code)	,758	,023	
	N	28	28	29

\*. La correlazione è significativa al livello 0,05 (2-code).

Tabella 31: correlazione delle variabili in esame nello studio dei salami esposti sul banco frigorifero alla luce neon

#### 4.2.5.pH e aw

##### pH

Nella tabella e nel grafico sottostanti sono riportati i valori di pH medi riscontrati nei salami interi nei diversi giorni di stagionatura.

Tabella 32 : medie e d.s. dei valori di pH dei salami in funzione del tempo di esposizione

medie	0	d.s.	10	d.s.	20	d.s.	30	d.s.
B	5,36	0,02	5,50	0,06	5,58	0,06	5,44	
C	5,27	0,02	5,36	0,02	5,37	0,02	5,33	
L1	5,23	0,03	5,30	0,03	5,29	0,02	5,30	0,04
L2	5,21	0,03	5,33	0,01	5,30	0,06	5,29	0,02

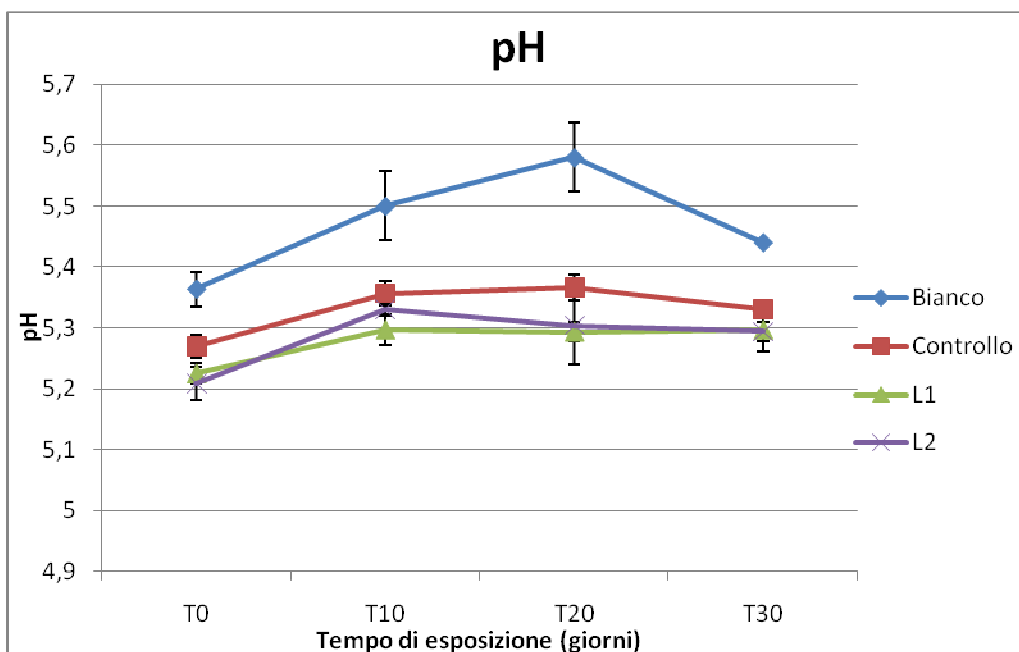


Figura 26: Grafico sull'andamento dei valori di pH medi in funzione del tempo di esposizione dei salami

In linea generale c'è un aumento del pH nei primi 10 giorni per tutte le tesi. La tesi BIANCO continua l'aumento di pH fino a 20 giorni di esposizione, mentre nelle tesi CONTROLLO ed L1 il valore rimane costante nel secondo intervallo di esposizione. Per la tesi L2 si osserva un calo di pH proprio nell'intervallo che va da 10 a 20 giorni di esposizione. Nell'ultimo intervallo di esposizione (20-30 giorni) si osserva un calo deciso nella tesi BIANCO, mentre una calo più lieve nella tesi CONTROLLO. Nelle tesi L1 ed L2 il valore di pH resta costante nell'ultimo intervallo. Le tesi L1 ed L2 presentano valori di pH inferiori a quelli delle tesi BIANCO e CONTROLLO in tutti i tempi di esposizione.



## aw

Nella tabella e nel grafico sottostanti sono riportati i valori di aw medi riscontrati nei salami affettati e posti in vaschette con atmosfera modificata nei diversi giorni di esposizione.

Tabella 33: medie e d.s. dei valori dell'aw dei salami in funzione del tempo di esposizione

medie	0	d.s.	10	d.s.	20	d.s.	30	d.s
B	0,912	0,004	0,917	0,002	0,920	0,007	0,919	0,004
C	0,913	0,007	0,913	0,002	0,913	0,009	0,915	0,001
L1	0,911	0,006	0,916	0,002	0,916	0,003	0,917	0,004
L2	0,909	0,007	0,918	0,003	0,921	0,002	0,914	0,004

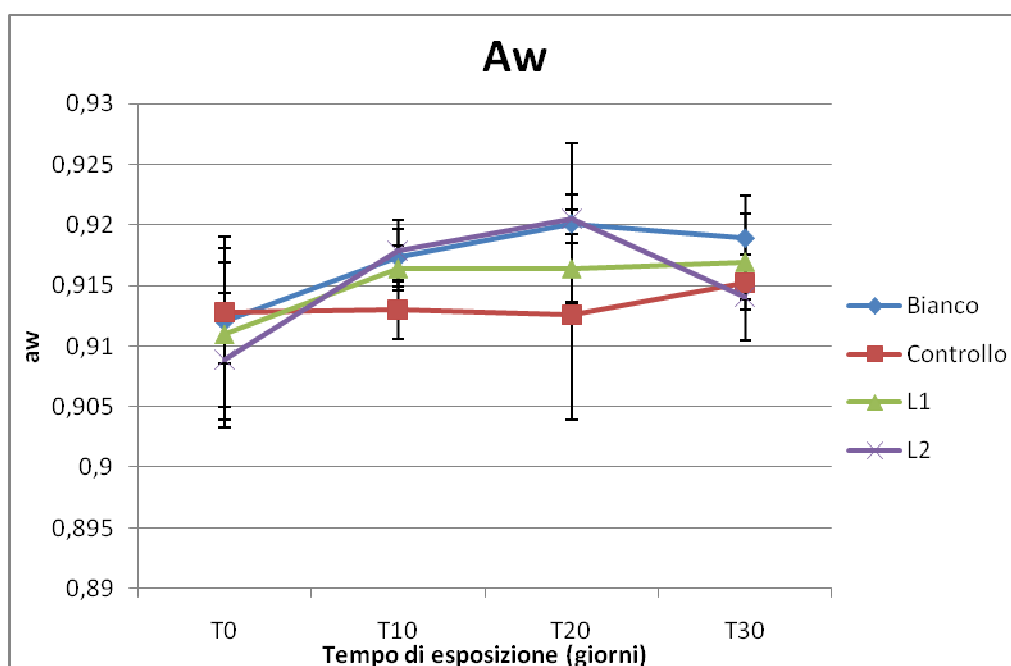


Figura 27 :Grafico sull'andamento dei valori di aw medi in funzione del tempo di stagionatura dei salami

L'andamento dei valori medi di aw è diverso da tesi a tesi:

**BIANCO:** parte da un valore di 0,912 che aumenta ad 0,9173 nel primo intervallo (0-10 giorni) e fino a 0,9201 nel secondo intervallo di esposizione (10-20 giorni); nell'ultimo intervallo si osserva un leggero calo ad 0,9189.

**La tesi CONTROLLO:** il valore iniziale di 0,9128 resta quasi costante per i primi due intervalli di esposizione, mentre aumenta fino a 0,9152 negli ultimi 10 giorni di esposizione.

**La tesi L1:** da 0,9110 si osserva un aumento fino a 0,9165 nei primi 10 giorni di esposizione, dopo di che il valore non cambia fino a fine periodo di esposizione.

**La tesi L2** presenta un andamento simile alla tesi BIANCO con aumento più marcato nel primo intervallo di esposizione e un calo più deciso nell'ultimo intervallo (20-30 giorni): si passa da un valore di 0,9205 a 20 giorni, ad un valore di 0,9170 a 30 giorni.



## 5.DISCUSSIONE

### 5.1.SALAMI INTERI

Tabella 34: medie e d.s. delle variabili acidità, n° perossidi, TBARS, % grasso in funzione delle tesi dei salami. Vengono riportate se le differenze tra le diverse tesi sono o meno significative secondo il test HSD di Tukey.

	B	d.s	C	d.s	L1	d.s	L2	d.s	Significatività
acidità (% acido oleico)	1,75	1,09	1,11	0,60	1,26	0,61	1,34	0,62	N.S. (0,464>0,05)
Perossidi (meq O2/kg grasso)	5,54	1,75	6,41	3,08	5,81	3,64	9,61	5,47	N.S.(0,186>0,05)
TBA (mg MDA/kg salame)	84,04 <sup>a</sup>	53,38	94,45 <sup>a</sup>	48,02	11,72 <sup>b</sup>	4,60	13,42 <sup>b</sup>	7,74	*** (0,000<0,05)
%grasso(g/100g campione)	20,00	3,12	19,11	2,77	20,32	3,64	20,48	2,57	N.S. (0,857> 0,05)

Tabella 35: medie e d.s. delle variabili acidità, n° perossidi, TBARS, % grasso in funzione del tempo di stagionatura. Vengono riportate se le differenze tra i diversi tempi di stagionatura sono significative o meno secondo il test HSD di Tukey.

	T0	d..s	T3	d.s	T10	d.s	T20	d.s	Significatività.
acidità (%acido oleico)	0,65 <sup>c</sup>	0,16	0,88 <sup>c</sup>	0,22	1,37 <sup>b</sup>	0,36	2,26 <sup>a</sup>	0,41	*(0,000<0,05)
Perossidi (meq O2/kg grasso)	2,41 <sup>b</sup>	1,31	8,53 <sup>a</sup>	4,56	7,23 <sup>a</sup>	3,27	9,41 <sup>a</sup>	2,69	*(0,001<0,05)
TBA (mg MDA/kg salame)	13,11	7,92	69,01	69,02	56,06	57,81	51,2	39,28	N.S. (0,194>0,005)
%grasso(g/100g campione)	17,90 <sup>b</sup>	1,66	18,00 <sup>b</sup>	1,11	22,58 <sup>a</sup>	0,21	24,08 <sup>a</sup>	2,11	*(0,000<0,05)

#### Quantità di grasso

Osservando il grafico della variabile %grasso (Figura 15) si nota subito che mancano i valori delle tesi BIANCO e CONTROLLO al tempo di stagionatura 10 giorni: l'analisi sui salami di tali due tesi a questo tempo di stagionatura per la determinazione del quantitativo di grasso è stata svolta in quadruplicato, ma ogni volta il risultato del quantitativo di grasso si attestava intorno al 15%, un valore di per sé inferiore ai valori di partenza delle due tesi. In un insaccato da stagionare il contenuto di acqua si riduce mano a mano che passano i giorni e di conseguenza aumentano le

concentrazioni degli altri nutrienti quali proteina grezza, sale e grasso; è quindi impossibile che la % di grasso dopo 10 giorni sia inferiore di quasi 3 punti% rispetto al valore registrato al momento dell'insacco, quando il salame è ricco di acqua. Inoltre al tempo 10 si notano 2 salami, rispettivamente delle tesi L1 ed L2, che presentano valori intorno il 22-23%, mentre altri 2 salami delle tesi L1 ed L2 (uno per tesi) sempre al tempo 10, presentano una % grasso intorno al 16%: è impossibile che salami allo stesso tempo di stagionatura presentano una variabilità di 6-7 punti %.

Durante la stagionatura di 42 giorni un insaccato crudo presenta una graduale riduzione della %umidità e i modo inversamente proporzionale un aumento del contenuto di grasso.

(Fanco et al., 2002)

Table 2  
Evolution of the main chemical components during the processing of Androlla (mean of three batches±standard deviation)<sup>a</sup>

	Processing time (days)							
	0	1	3	7	14	21	28	42
Moisture (%)	61.64±0.61a	60.30±1.99ab	57.08±1.84bc	50.71±3.90cd	43.25±5.28d	39.98±8.75de	32.18±5.39e	29.68±9.02e
Protein (N×6.25) (%DM)	33.4±0.06a	32.3±1.25a	35.6±1.79a	33.0±0.54a	35.5±2.90a	34.7±4.54a	32.9±1.34a	35.8±1.97a
Fat (%DM)	40.26±2.64a	41.47±2.76a	43.40±1.83a	42.64±3.94a	41.24±1.51a	42.56±1.45a	43.73±2.49a	41.17±2.11a
Ash (%DM)	7.80±1.08a	7.05±0.50a	7.27±0.61a	7.37±0.16a	6.74±0.75a	7.10±1.32a	7.08±1.20a	7.01±0.56a
NaCl (%DM)	4.23±1.81a	4.17±1.77a	4.48±1.88a	4.14±1.49a	3.63±1.48a	3.62±1.43a	4.12±1.78a	3.64±1.49a
Total carbohydrates (%DM)	0.99±0.42a	0.78±0.38ab	0.70±0.48ab	0.54±0.53ab	0.46±0.37ab	0.37±0.29ab	0.35±0.35ab	0.21±0.19b
Nitrate (ppm)	43.8±17.93a	42.0±18.87a	40.9±18.44a	43.7±25.35a	41.7±29.18a	41.5±30.63a	46.1±27.84a	42.7±24.86a

<sup>a</sup> Means in the same row and parameter group during processing without a common following letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Figura 28: evoluzione dei principali componenti chimici durante la stagionatura di un insaccato crudo(Fanco et al.,2002)

Per quanto riguarda i salami presi in esame in questo lavoro di tesi, analizzando i dati, l'ANOVA ad una via non risultano differenze significative ( $p > 0,05$ ) tra le diverse tesi (B,C,L1,L2) per il contenuto di grasso. L'ANOVA ad una via mostra però che c'è una differenza significativa tra i diversi tempi di stagionatura: il test HSD di Tukey, con livello di significatività pari a  $p < 0,05$  dimostra che i tempi T0,T3 sono significativamente diversi dai tempi T10,T20.

Prendendo in considerazione la % di umidità (Figura 21) dei salami oggetto di studio in questa tesi, si può osservare che per tutte le tesi, c'è una graduale riduzione del contenuto d'acqua mano a mano che passano i giorni di stagionatura. Tutto questo è in linea con l'andamento del contenuto di grasso descritto da Franco et al., (2002).

### TBARS

Per quanto riguarda i salami interi abbiamo visto che il fattore tesi determina una differenza significativa solo nella variabile TBARS, infatti i salami della tesi L1 (75mg composti fenolici/100g salame) e della tesi L2(150mg composti fenolici/100g salame) presentano valori di TBARS significativamente inferiori a quelli dei salami delle tesi BIANCO e CONTROLLO durante i giorni di stagionatura; le tesi BIANCO e CONTROLLO non presentano negli ingredienti i composti

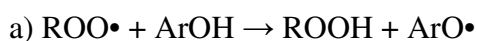
fenolici. Inoltre i salami delle tesi L1 ed L2 presentano aumenti di TBARS molto inferiori se confrontati con gli aumenti di TBARS delle tesi BIANCO e CONTROLLO.

I composti fenolici riducono quindi la produzione dei composti secondari di ossidazione lipidica e questo risultato è in tendenza con i lavori di altri autori su salami in cui sono stati aggiunti altri ingredienti di origine vegetale con proprietà antiossidante, come per Aguirrezàbal et al. (2000): in questo studio i salami preparati con carne, grasso, sale e paprica presentano valori significativamente inferiori ( $p < 0,05$ ) rispetto ai salami in cui non era stata aggiunta paprica, durante il periodo di stagionatura. Inoltre nello stesso studio, i salami in cui non è stata aggiunta paprica si osserva un aumento dei valori di malondialdeide durante il periodo di stagionatura, mentre nei salami in cui la paprica è stata aggiunta il TBARS non aumenta.

Probabilmente i fenoli aggiunti bloccano la formazione di prodotti secondari di ossidazione, come la malondialdeide, agendo sui prodotti di ossidazione primari, come i perossidi e gli idroperossidi: i perossidi non si degradano nei tipici composti a basso peso molecolare (aldeidi, chetoni, alcoli, acidi...), perché vengono catturati in parte dai fenoli e con questi ultimi formano composti stabili, non reattivi.

### Perossidi

Nei salami arricchiti con composti fenolici ci si dovrebbe aspettare un netto calo nella produzione dei perossidi, oppure uno spostamento della loro produzione in avanti nel tempo, ma questo non succede nei salami oggetto di questo lavoro. Dal punto di vista statistico l'ANOVA ad una via mostra che non ci sono differenze significative ( $p > 0,05$ ) tra le diverse tesi (B,C,L1,L2) per il numero di perossidi. Inoltre se si osserva l'andamento ( Figura 18) dei dati riferiti ai salami della tesi L2 (quelli addizionati con i composti fenolici ad una concentrazione di 150 mg/100g di salame) si nota che durante la stagionatura il numero di perossidi è più elevato, il che è molto insolito visto che i composti fenolici tendono a reagire proprio con i perossidi ROO• secondo le reazioni



che sono riportate nell'introduzione di questa tesi alla sezione 3.AZIONI DEI FENOLI ESTRATTI DALL'ACQUA DI VEGETAZIONE.

Secondo le reazioni appena viste nei salami con fenoli la produzione di perossidi dovrebbe calare o spostarsi in avanti nel tempo di stagionatura: questo infatti accade in salami arricchiti con il 5% di kimchi e stagionati per 14 giorni a 20°C rispetto ai salami senza l'aggiunta di kimchi nello studio di Lee et al.,(2005). Un risultato simile ottiene Aguirrezàbal et al.,(2000) con i suoi collaboratori in salami senza sale, ma con il 3% di paprika che presentano un numero di perossidi(meq di O<sub>2</sub>/1000g grasso) significativamente inferiore ( $p < 0,05$ ) al numero di perossidi dei salami arricchiti con l'1% di aglio o con nessun arricchimento a 32 giorni e a 96 giorni di stagionatura.

L'elevato numero di perossidi per la tesi L2 ai tempi di stagionatura di 3 e 10 giorni, rispettivamente con valori di 14,65meq di O<sub>2</sub>/1000g grasso e 11,33meq di O<sub>2</sub>/1000g grasso, è probabilmente il risultato di un artefatto analitico. Durante l'analisi per l'estrazione del grasso si

macina il campione, poi lo si pesa e successivamente lo si lava con la miscela per l'estrazione; probabilmente per i campioni della tesi L2 ai tempi di stagionatura 3 e 10 giorni, è passato troppo tempo tra la loro macinazione e il lavaggio con la miscela di estrazione. Durante questo lasso di tempo i campioni si sono ossigenati, facendo aumentare il numero di perossidi già presenti nei campioni stessi. Un'altra ipotesi è che il tempo intercorso tra la pesatura del grasso estratto e il momento in cui avviene la titolazione con sodio tiosolfato, sia stato troppo lungo: in alcune analisi infatti ho svolto contemporaneamente la titolazione per determinare l'acidità e i perossidi, e l'analisi dei perossidi è stata l'ultima che ho svolto tra le due.

### Acidità titolabile

Per quanto riguarda i valori di acidità nei salami oggetto di questo studio di tesi di laurea non sono state osservate differenze significative tra i salami con i fenoli aggiunti e quelli senza fenoli. Si tratta di un valore non del tutto inaspettato perché già nello studio di Lee et al., (2005) tutti i campioni di salami, compresi quelli trattati con kimchi o con kimchi-powder che quelli non trattati, presentavano un aumento continuo dell'acidità, espressa come % acido oleico. Nello stesso studio emerge quindi che l'aggiunta di questo preparato di origine vegetale, non ha effetti significativi ( $p > 0,05$ ) durante il periodo di stagionatura (circa 32 giorni): i salami trattati con le concentrazioni più alte di questo preparato arrivano ad avere valori di acidità a volte più elevati di quelle dei salami non trattati, come accade nei salami L2 (concentrazione di fenoli pari a 150 mg/100g di salame) oggetto di questo tesi, dove al tempo di stagionatura di 10 giorni L2 presenta un valore più alto rispetto ai valori delle tesi BIANCO e CONTROLLO allo stesso tempo di stagionatura.

Nello studio di Lee et al., (2005) appena citato la temperatura di stagionatura era impostata a 20°C, quindi la temperatura così alta può avere aumentato l'attività enzimatica degli enzimi lipolitici, a discapito dell'azione antiossidante del kimchi aggiunto nei salami. Nel nostro caso studio dei salami arricchiti con i fenoli estratti dalle acque di vegetazione della lavorazione delle olive, la temperatura di stagionatura era di 12°C  $\pm$  1°C e a 20 giorni di stagionatura si osservano in L1 ed L2 valori simili a quelli dei salami di Lee arricchiti con il 15% di kimchi, sempre a 20 giorni di stagionatura.

In un altro studio, di Aguirrezàbalet al. (2000), è stato dimostrato che aglio e paprica riducono la velocità di formazione di acidi grassi liberi in salami spagnoli, durante la stagionatura. Aguirrezàbal e collaboratori asseriscono che le spezie sopra citate, presentano un'attività antimicrobica, e di conseguenza anche un'attività inibente nei confronti della lipolisi; tale risultato in questo studio potrebbe però essere attribuito anche alla bassa temperatura (8°C) a cui sono stati fatti stagionare i salami. Quindi forse, in questo lavoro di tesi, una temperatura di stagionatura  $> 8^\circ\text{C}$  può aver influito sulla flora microbica, selezionando maggiormente microrganismi più lipolitici, come Micrococcaceae e lieviti.

Un'altra possibilità è che i fenoli aggiunti nell'impasto dei salami non blocchino l'azione delle lipasi tissutali presenti nelle carni suine, e soprattutto l'azione delle lipasi microbiche delle

Micrococcaceae e dei lieviti, principali responsabili della lipolisi in prodotti fermentati come il salame.

### CORRELAZIONI TRA VARIABILI

Nei salami interi c'è una correlazione significativa ( $p < 0,05$ ) tra la variabile ACIDITA' titolabile e la variabile PEROSSIDI; inoltre c'è una correlazione molto significativa ( $p < 0,01$ ) tra la variabile ACIDITA' e la variabile %GRASSO. La correlazione positiva tra acidità e contenuto può essere spiegata dal fatto che durante la stagionatura il salame si asciuga e di conseguenza la concentrazione del grasso aumenta, quindi mano a mano che la stagionatura procede percentualmente c'è a disposizione più grasso che può essere attaccato dalle lipasi microbiche le quali liberano acidi grassi aumentando l'acidità titolabile.

### pH e aw

Per quanto riguarda il pH dei salami interi si nota dalla Figura 19 che l'andamento del pH è simile per tutte e 4 le tesi in esame (B, C, L1, L2): al momento dell'insacco si parte da valori medi di pH compresi fra 5,47 e 5,57, comunque inferiori al 5,60. Dal momento dell'insacco il pH scende nei primi tre giorni di stagionatura fino a valori di 5,30-5,40; la discesa del pH continua fino a 10 giorni di stagionatura toccando i valori medi minimi per ogni tesi i quali si aggirano attorno a 5,10-5,25. Da 10 a 20 giorni il pH ha un rialzo a valori simili a quelli registrati al tempo 3, cioè appena al di sotto del 5,40-5,30. Negli ultimi 10 giorni di stagionatura il pH scende leggermente e si attesta su valori di 5,20-5,30.

Questo andamento del pH è in linea con l'andamento di insaccati arricchiti con altri ingredienti di origine vegetale fonti di sostanze antiossidanti, come il tè verde e i semi dell'uva, ricche in composti fenolici: anche in insaccati arricchiti con fenoli del tè verde o dei semi dell'uva non si osservano differenze significative con l'andamento del pH di salami controllo (cioè senza nessun arricchimento) (LiLing et al., 2013).

L'andamento dei valori medi di aw (Figura 20) è simile in tutte e 4 le tesi dei salami oggetto di questo lavoro di tesi (B,C,L1,L2): col passare dei giorni di stagionatura si osserva una riduzione costante dell'aw. Si parte con valori intorno a 0,960 e a 30 giorni di stagionatura si toccano valori intorno a 0,910. Non c'è molta differenza tra i salami arricchiti con composti fenolici e non, in quanto la riduzione dell'aw è influenzata solo dal tempo di stagionatura, come riportato nello studio di Li Ling et al., (2013): in questo studio la riduzione dell'aw dei salami arricchiti con fenoli del tè verde o dei semi dell'uva, non presentano valori diversi dai salami di controllo.

## 5.2.SALAMI ESPOSTI

Tabella 35: medie e d.s. delle variabili acidità, n° perossidi, TBARS, in funzione delle tesi dei salami. Vengono riportate se le differenze tra le diverse tesi sono o meno significative secondo il test HSD di Tukey.

	B	d..s	C	d.s	L1	d.s	L2	d.s	Significatività
acidità (%acido oleico)	3,76	0,61	3,35	0,43	3,75	0,72	3,69	0,84	N.S. (0,696>0,05)
Perossidi (meq O2/kg grasso)	22,23	9,99	24,45	14,37	12,47	3,73	14,79	6,92	†appena significativo (0,05<p=0,054<0,10)
TBA (mg MDA/kg salame)	104,36 <sup>a</sup>	12,50	122,14 <sup>a</sup>	23,79	16,81 <sup>b</sup>	5,95	13,16 <sup>b</sup>	5,74	*** (0,00<0,05)

Tabella 36: medie e d.s. delle variabili acidità, n° perossidi, TBARS, in funzione del tempo di esposizione. Vengono riportate se le differenze tra i diversi tempi di esposizione sono o meno significative secondo il test HSD di Tukey

	0	d..s	10	d.s	20	d.s	30	d.s	Significatività
acidità (%acido oleico)	3,04 <sup>b</sup>	0,11	3,22 <sup>b</sup>	0,35	3,47 <sup>b</sup>	0,65	4,39 <sup>a</sup>	0,31	*** (0,000<0,05)
Perossidi (meq O2/kg grasso)	26,35	15,57	16,33	13,71	15,11	4,53	15,73	5,79	N.S. (0,235>0,05)
TBA (mg MDA/kg salame)	50,64	45,05	41,26	51,36	46,13	50,47	58,51	57,88	N.S.(0,923>0,05)

### Quantità di grasso

Il contenuto di grasso nei salami esposti varia all'interno di ogni tesi (Figura 22), durante i diversi giorni di esposizione, tale variabilità è dettata solo dalla differenza tra ogni singolo salame: i salami preparati per questa tesi sono stati preparati artigianalmente con l'ausilio di alcune macchine, ma non si può parlare di prodotti industriali che presentano una stretta omogeneità nella composizione centesimale del prodotto.

Nei salami esposti i valori medi del contenuto di grasso spaziano dal 16,13% al 23,61%, nonostante sono tutti salami stagionati 30 giorni; probabilmente questa variabilità è dettata dalla preparazione dei salami stessi. Siccome si tratta di salami con lo stesso livello di stagionatura, dal punto di vista statistico non aveva senso inserirli in un'analisi della varianza in funzione del fattore tempo; inoltre



essendo finita la stagionatura non si può più osservare un effetto del tempo sul contenuto grasso dei composti fenolici. Per questi motivi i risultati sul contenuto di grasso non sono stati inseriti un'analisi della varianza in funzione del fattore tesi.

### TBARS

In uno studio Parra et al., (2012) dei prosciutti crudi vengono affettati e confezionati in atmosfera modificata (70% di N<sub>2</sub> e dal 30 %CO<sub>2</sub>), metà di questi salumi vengono esposti alla luce per 60 giorni a 4°C, mentre l'altra metà è tenuta al buio a 4°C. Dal lavoro di Parra e collaboratori emerge che il prosciutto esposto alla luce presenta valori di TBARS significativamente più elevati rispetto al prosciutto stoccato al buio, sia a 1,30 e 60 giorni di stoccaggio; in questo studio non c'era l'ossigeno, quindi solo l'esposizione o meno alla luce influiva sull'ossidazione lipidica, aumentando la produzione di composti secondari in grado di reagire con il TBA (l'acidoTiobarbiturico). Il lavoro di Parra presenta delle condizioni simili a quelle dei salami affettati riportati in questa tesi.

In questo lavoro di tesi, i salami sono stati confezionati in atmosfera modificata con una miscela di 70% N<sub>2</sub> e 30% CO<sub>2</sub>, e stoccati (a 4°C) come i prosciutti di Para et al.,(2012), ma sono stati messi tutti nelle stesse condizione di esposizione alla luce. Questa scelta permette di osservare un effetto sui valori di TBARS dettato solo dalla presenza o meno dei composti fenolici nell'impasto dei salami. Naturalmente il salame e il prosciutto crudo non sono la stessa matrice: il prosciutto crudo è un salume non insaccato, crudo che si ottiene da una parte anatomica intera del maiale, che è la coscia; mentre il salame è un salume insaccato, crudo, fermentato, in cui diversi tagli carne vengono macinati. Nonostante il salame e il prosciutto crudo non siano la stessa matrice, si tratta sempre di salumi la cui materia prima di partenza sono tagli di maiale e nel prodotto finito la % di grasso è intorno al 20% a fine stagionatura, quindi il confronto tra queste due matrici non è così forzato.

Dal grafico dell'andamento del TBARS nei salami esposti si può osservare che il fattore tesi (presenza o meno di composti fenolici) determina una differenza significativa ( $p < 0,005$ ) solo variabile TBARS: i salami della tesi L1 (75mg composti fenolici/100g salame) e della tesi L2 (150mg composti fenolici/100g salame) presentano valori di TBARS significativamente inferiori a quelli dei salami delle tesi BIANCO e CONTROLLO (che non presentano negli ingredienti i composti fenolici) durante il periodo di esposizione alla luce.

Probabilmente i composti fenolici riducono la produzione dei composti secondari dell'ossidazione lipidica nei salami arricchiti, bloccando quella che è la via di I tipo nella fotossidazione lipidica.

### Perossidi

Nei salami arricchiti con composti fenolici ci si dovrebbe aspettare un netto calo nella produzione dei perossidi, oppure uno spostamento della loro produzione in avanti nel tempo, ma questo non succede in maniera così netta nei salami esposti oggetto di questo lavoro. L'ANOVA ad una via mostra che ci sono delle differenze appena significative tra le diverse tesi (B,C,L1,L2), infatti  $0,05 < (p = 0,054) < 0,100$ ; le tesi L1( tritato di carne, il sale, il glicerolo, gli starter microbici e

75mg/100g composti fenolici) con 12,47meq O<sub>2</sub>/kg grasso, ed L2 (tritato di carne, il sale, il glicerolo, gli starter microbici e 150mg/100g) con 14,79meq O<sub>2</sub>/kg grasso, presentano valori inferiori a quelli delle tesi BIANCO (tritato di carne, il sale e gli starter microbici) con 22,23 meq O<sub>2</sub>/kg grasso e CONTROLLO (tritato di carne, il sale, gli starter microbici e il glicerolo) con 24,45meq O<sub>2</sub>/kg grasso. Quindi c'è una differenza tra i salami esposti arricchiti con i composti fenolici (L1 ed L2) e i salami senza composti fenolici (B e C), solo che non è una differenza significativa al 5% ( $p < 0,05$ ).

In uno studio di Valencia et al., (2005) hanno presentato la diversa risposta all'ossidazione lipidica in 2 gruppi di salami stagionati 14 giorni, affettati, confezionati in atmosfera modificata (80% N<sub>2</sub> e 20% CO<sub>2</sub>) e stoccati a 4°C per 5 mesi:

- un gruppo di salami era stato preparato sostituendo parzialmente del lardo con dell'olio di semi di lino. A questi salami è stata aggiunta anche una miscela di antiossidanti quali Butylhydroxytoluene (BHT) (100 mg/kg) and butylhydroxyanisole (BHA) (100 mg/kg)
- il secondo gruppo di salami (CONTROLLO) invece è stato preparato semplicemente con tagli magri di maiale e lardo

A 5 mesi di stoccaggio i salami in cui si è sostituito il lardo con l'olio di semi di lino e aggiunta della miscela di antiossidanti, presentavano un numero significativamente inferiore ( $p < 0,05$ ) di perossidi rispetto ai salami del gruppo di controllo. Stranamente a 2 mesi di stoccaggio accade l'esatto contrario; quindi da questo studio gli antiossidanti artificiali sembrano avere un effetto maggiore nel lungo periodo nei salami confezionati in atmosfera modificata. Nei salami esposti oggetto del lavoro di questa tesi, invece se si osserva la Figura 24, i salami arricchiti con i composti fenolici presentano un numero di perossidi medio inferiore nei primi 10 giorni di esposizione alla luce. Nei salami oggetto di questa tesi parliamo di composti fenolici naturali di origine vegetali, mentre nello studio di Valencia et al., (2005) parliamo di antiossidanti artificiali, di sintesi. Inoltre il tempo per cui si è osservato l'effetto antiossidante nei salami esposti (affettati, in atmosfera modificata, esposti alla luce a 4°C) arricchiti con i composti fenolici è stato solamente di 1 mese, mentre nei salami dello studio di Valencia il tempo di stoccaggio è stato di 5 mesi.

### Acidità Titolabile

Per quanto riguarda i valori di acidità nei salami oggetto di questo studio di tesi di laurea non sono state osservate differenze significative ( $p > 0,05$ ) tra i salami con i fenoli aggiunti e quelli senza fenoli. L'ANOVA ad una via mostra che c'è una differenza significativa tra i diversi tempi di esposizione per l'acidità titolabile: il test HSD di Tukey, con livello di significatività pari a  $p < 0,05$  dimostra che i tempi T<sub>0</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>20</sub> sono significativamente diversi dal tempo T<sub>30</sub>. I valori medi di acidità aumentano all'aumentare dei giorni di esposizione, ma solo al tempo di esposizione T<sub>30</sub> i valori di acidità sono significativamente più elevati rispetto a agli altri tempi esposizione.

Da altri lavori come quello di Wójciak et al., (2012) è emerso che insaccati con lo 0,05 % di ascorbato di sodio, stagionati per 21 giorni, confezionati sottovuoto e stoccati in frigorifero per 6 mesi presentano valori di acidità titolabile significativamente inferiori ( $p < 0,05$ ) rispetto a salami

controllo, nei quali non è stato aggiunto l'ascorbato di sodio. La differenza di acidità titolabile tra i 2 gruppi di salami è stata osservata a 0,4, 6 mesi di stagionatura. L'ascorbato di sodio è di per sé un antiossidante di sintesi utilizzato come additivo negli alimenti. Nei salami esposti oggetto del lavoro di questa tesi sono stati utilizzati composti fenolici naturali di origine vegetale che non sembrano avere un effetto inibente nei confronti dell'attività lipolitica con il passare dei giorni di esposizione. I salami delle tesi L1 ed L2 presentano valori di acidità inferiori alla tesi BIANCO a 0,10,20 giorni di esposizione, ma a 30 giorni i valori delle tre tesi si concentrano in un intervallo ristretto; i valori della tesi CONTROLLO risultano addirittura più bassi di quelli delle tesi L1 ed L2. Inoltre nel nostro studio i salami sono stati esposti alla luce, mentre nello studio di Wójciak et al.,(2012) non viene specificato se i salami stati esposti alla luce, mentre in entrambi i lavori salami sono stati confezionati in atmosfera priva di ossigeno: nel lavoro esposto da questa tesi si tratta di un'atmosfera modificata, mentre nello studio di Wójciak et al., si tratta di un sottovuoto.

Riassumendo nei salami esposti non ci differenze significative tra le diverse tesi: probabilmente i composti fenolici non riescono ad impedire il processo lipolitico operato dalle lipasi microbiche, presenti nel salame esposto anche se non ci sono più i microrganismi e questo porta un graduale aumento dell'acidità nel tempo di esposizione. Va ricordato che i salami esposti sono salami stagionati 30 giorni che sono poi stati affettati, messi in atmosfera modificata ed esposti alla luce a 4°C.

### Correlazione tra variabili

Per quanto riguarda la correlazione tra le variabili acidità titolabile, numero di perossidi, TBARS c'è una correlazione positiva, secondo me casuale, tra perossidi e TBARS: i perossidi sono prodotti molto reattivi ed instabili, mentre il per il TBARS si parla di prodotti di degradazione che risultano stabili che sono strettamente legati allo stato del campione da cui sono estratti. Quindi non ha molto senso parlare di una correlazione positiva tra le concentrazioni di specie stabili e le concentrazioni di specie instabili come i perossidi i quali sono molto influenzabili dalle condizioni in cui si effettua l'analisi.

### pH e aw

Nei salami oggetto di questo studio è emerso che in linea generale c'è un aumento del pH nei primi 10 giorni per tutte le tesi. La tesi BIANCO l'aumento di pH continua fino a 20 giorni di esposizione, mentre nelle tesi CONTROLLO ed L1 il valore rimane costante nel secondo intervallo di esposizione. Per la tesi L2 si osserva un calo di pH proprio nell'intervallo che va da 10 a 20 giorni di esposizione. Nell'ultimo intervallo di esposizione (20-30 giorni) si osserva un calo deciso nella tesi BIANCO, mentre una calo più lieve nella tesi CONTROLLO. Nelle tesi L1 ed L2 il valore di pH resta costante nell'ultimo intervallo. Le tesi L1 ed L2 presentano valori di pH inferiori a quelli delle tesi BIANCO e CONTROLLO in tutti i tempi di esposizione, mentre nello studio di Wójciak et al.,(2012) non c'è una differenza sostanziale tra gli insaccati con lo 0,05 % di ascorbato

di sodio stagionati per 21 giorni, messi sottovuoto e stoccati in frigorifero per 6 mesi e i salami controllo, nei quali non è stato aggiunto l'ascorbato di sodio.

Per quanto riguarda l'attività dell'acqua aw nello studio di Wójciak et al.,(2012) per i salami stagionati per 21 giorni, messi sottovuoto e stoccati in frigorifero per 6 mesi si osserva un abbassamento significativo dell'aw a 2 mesi (passando da 0,875 a 0,858) mentre per i salami in cui è stato aggiunto ascorbato di sodio allo 0,05% l'abbassamento significativo di aw si osserva a 4 mesi; a 4 mesi l'aw dei salami controllo è significativamente più bassa di quella dei salami arricchiti con ascorbato di sodio. Nei salami oggetto di questo studio è emerso che in linea generale un aumento dell'aw durante il periodo di esposizione alla luce, un andamento opposto in confronto a quello dello studio di Wójciak: bisogna precisare che nei salami esposti oggetto di questo studio sono salami ridotti in fette e messi in delle vaschette, quindi con una superficie di scambio per l'acqua libera più elevata rispetto ai salami interi messi in sottovuoto di Wójciak. Inoltre osservando il grafico n... L'andamento dei valori medi di aw è diverso da tesi a tesi:

BIANCO: parte da un valore di 0,912 che aumenta ad 0,9173 nel primo intervallo (0-10 giorni) e fino a 0,9201 nel secondo intervallo di esposizione (10-20 giorni); nell'ultimo intervallo si osserva un leggero calo ad 0,9189.

la tesi CONTROLLO: il valore iniziale di 0,9128 resta quasi costante per i primi due intervalli di esposizione, mentre aumenta fino a 0,9152 negli ultimi 10 giorni di esposizione.

la tesi L1: da 0,9110 si osserva un aumento fino a 0,9165 nei primi 10 giorni di esposizione, dopo di che il valore non cambia fino a fine periodo di esposizione.

la tesi L2 presenta un andamento simile alla tesi BIANCO con aumento più marcato nel primo intervallo di esposizione e un calo più deciso nell'ultimo intervallo (20-30 giorni): si passa da un valore di 0,9205 a 20 giorni, ad un valore di 0,9170 a 30 giorni

## 6.CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dall'analisi della componente lipidica dei salami arricchiti con un estratto fenolico ottenuto dall'acqua di vegetazione del frantoio, hanno mostrato una riduzione nella produzione di composti secondari (terminali) dell'ossidazione lipidica (tra cui la malondialdeide), misurati con la tecnica TBARS, rispetto ai salami non arricchiti.

Ci si aspettava un effetto simile a quello ottenuto per il TBARS, anche per la variabile del "numero di perossidi" nei salami arricchiti con l'estratto fenolico, invece i risultati ottenuti mostrano che i composti fenolici non sembrano ridurre la produzione di perossidi, ma anzi nei salami arricchiti con 150mg/100g di fenoli si registrano i risultati più elevati: la valutazione del numero di perossidi sarebbe da riproporre in un altro studio simile per confrontare i risultati, perché c'è il sospetto che il numero di perossidi di alcuni salami si sia alzato durante l'analisi di laboratorio.

Sempre nei salami arricchiti con i composti fenolici per quanto riguarda l'acidità titolabile, non si sono notate differenze significative rispetto ai salami non arricchiti (tesi BIANCO e CONTROLLO): le tesi L1 ed L2 presentano a volte valori superiori rispetto ai salami non arricchiti. Per quanto riguarda la % di grasso, l'umidità, il pH e l'aw l'aggiunta dell'estratto fenolico non ha compromesso o modificato sostanzialmente l'evoluzione dei parametri appena citati nei salami interi durante la stagionatura.

Nei salami stagionati 30 giorni, poi affettati, posti in MAP (70% N<sub>2</sub> e 30% CO<sub>2</sub>) a 4-6°C ed esposti alla luce neon con alternanza di luce e buio i risultati non si discostano molto da quelli già visti nei salami interi.

Nei salami esposti (affettati e confezionati in MAP) i composti fenolici riducono la produzione di composti secondari (terminali) dell'ossidazione lipidica (tra cui la malondialdeide), misurati con la tecnica TBARS, rispetto ai salami non arricchiti. Nei salami esposti si osserva valori del numero di perossidi inferiori nei salami arricchiti rispetto i salami B e C, ma questa differenza non è ancora statisticamente significativa perché  $0,05 < (p=0,054) < 0,10$ . Per quanto riguarda l'acidità titolabile non c'è differenza tra i salami esposti arricchiti con i composti fenolici o meno.

Il pH dei salami esposti non presenta notevoli differenze tra le tesi C,L1 ed L2, mentre nella tesi B il pH sale in maniera più decisa; in linea generale, per i salami esposti, si osserva un aumento dell'aw durante il periodo di esposizione alla luce senza particolari differenze tra le tesi.

I composti fenolici hanno dimostrato un effetto di riduzione dei composti secondari dell'ossidazione lipidica, ma per dimostrare o meno che i composti fenolici ottenuti dall'acqua di vegetazione di un frantoio, possano essere degli ingredienti realmente utili in insaccati da stagionare, occorre svolgere una seconda prova, prestando particolare attenzione sull'analisi del numero di perossidi durante i giorni stagionatura.



## 7.BIBLIOGRAFIA

Aguirrezàbal, M. M., Mateo, J., Domìnguez, M. C., & Zumalaca´rregui, J. M. (2000). The effect of paprika, garlic and salt on acidity in dry sausages. *Meat Science*, 54, 77-81.

Amirante P. (2011). Caratteristiche meccaniche e funzionali degli impianti di estrazione dell'olio di olive e dei reflui oleari. *Oleum, manuale dell'olio d'olive*. Ricci A., Edagricole, Bologna, 193-229.

AOAC (1990) (1) riferimento 965.33 .Peroxide value of oils and fat. in the "Official Methods of Analytical Chemists"- volume 2, Food composition; Additives; Natural Contaminants. published by The Association of Official Analytical Chemists, Inc. Herlich K., Ed., Arlington, Virginia, USA.

AOAC (1990) (2) riferimento 939.05 .Fat acidity-Grain. in the "Official Methods of Analytical Chemists"- volume 2, Food composition; Additives; Natural Contaminants. published by The Association of Official Analytical Chemists, Inc. Herlich K., Ed., Arlington, Virginia, USA.

Aparicio R., Luna G. 2002. Characterisation of monovarietal virgini olive oil. *Eur.J.Lipid Science Techonology*, 104, 614-627

Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G. and Montedoro, G.F. (1996) "Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1583-1593

Bianco A., Muzzalupo I., Piperno A., Romeo G., Uccella N. (1999). Bioactive derivatives of oleuropein from olive fruits. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 47, 3531-3534.

Boskou D. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 505-512.

Botsoglou N.A., Fletouris D.J., Papageorgiou G.E., Vassilopoulos V.N., Mantis A.J and Trakatellis A.G. (1994) "Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples." *J. Agric. Food Chem*, 42, 1931-1937

Conte L. 2004.*Lipidi*. In *Chimica degli alimenti*. Cabras P., Martelli A., pp. 50-55. Padova: Piccin-Nuova Libreria

Cozzi.R, Protti P., Ruaro T. 1998. *Elementi di analisi chimica strumentale*. Bologna: Zanichelli Editore S.p.a

Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H., (1957) "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues" *The Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509

Fanco I., Prieto B., Cruza J.M., Lòpez M., Carballo J.(2002) "Study of the biochemical changes during the processing of Androlla, a Spanish dry-cured pork sausage". *Food Chemistry*, 78, 339-345

Gambacorta G., Baiano A, Previtali M.A., Terracone C., La Notte E. 2009 . "Ruolo delle sostanze antiossidanti negli alimenti". *Ital. J. Agron. / Riv. Agron.*, 1 Suppl.:171-184.

Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A.-H. and Saari, N. (2012) "Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)-A Review". *Int J Mol Sci*, 13 (3), 3291-3340.

Kountouri, A.M., Mylona, A., Kaliora, A.C. and Andrikopoulos, N.K. (2007) "Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans". *Phytomedicine*, 14, 659–667.

Lee Y.J., Kunz B. (2005). The antioxidant properties of baechu-kimchi and freeze-dried kimchi-powder in fermented sausages. *Meat Science*. 69,741-7479

Lercker G. (2011). La chimica dell'olio da olive. *Oleum, manuale dell'olio d'olive*. Ricci A., Edagricole, Bologna, 1-37.

Li Ling, Shao Junhua, Zhu Xudong, Zhou Guanghong e Xu Xinglian. (2013). "Effect of plant polyphenols and ascorbic acid on lipid oxidation, residual nitrite and N-nitrosamines formation in dry-cured sausage". *International Journal of Food Science and Technology* , 48, 1157–1164

Lorenzini, L. 2011. *Valutazione dell'utilizzo di un concentrato fenolico da reflui oleari nell'alimentazione del suino pesante*. Tesi di laurea, Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Facoltà di Agraria, Università degli Studi, Perugia

Montanaro S. Anni Accademici 2004-2005, 2005-2006, 2006-2007. *Studi sulla degradazione nell'ambiente di xenobiotici (farmaci) indotta da fattori abiotici*. Dottorato di ricerca in Scienze Chimiche XX ciclo. Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali. Università degli Studi Federico II, Napoli

Morillo J.A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A., Russell N.J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82, 25–39.



Pannelli G., Servili M., Baldioli M., Montedoro G.F. (1991). *Changes in the phenolic and pectic substances in olive fruit and oil as a function of ripening, cultivar and extraction technology*. OLEA, 21-64.

Pannelli G. (2011). Caratteristiche chimico-fisiche dell'oliva e dell'olio con riferimenti alle cultivar più diffuse. *Oleum, manuale dell'olio d'olive*. Ricci A., Edagricole, Bologna, 75-105.

Parra V., Viguera J., Sánchez J., Peinado J., Espàrrago F., Gutierrez J.I., Andres A.I. 2012. "Effect of exposure to light on physico-chemical quality attributes of sliced dry-cured Iberian ham under different packaging systems". *Meat Science*, 90, 236-243.

Piccoli S. 2012. *Polifenoli estratti dalle acque di vegetazione dei frantoi: effetti sulla shelf-life di salsicce e studi in vitro*. Tesi di Laurea, Corso di Laurea magistrale interfacoltà in Biotecnologie per l'Alimentazione, Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi, Padova

Rodis P.S., Karathanos V.T., Mantzavinou A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 50, 596-601.

Servili M., Baldioli M., Mariotti F., Montedoro G.F.: *Secoiridoides of virgin olive oil: modification during the oil mechanical extraction process*. Proceedings of the world Conference and Exhibition on Oil seed and edible oils processing. Istanbul October 6-10 1996, 289-295.

Servili M., Esposto S., veneziani G., Urbani S., Taticchi A., Di Maio I., Selvaggini R., Sordini B., Montedoro G. 2011. "Improvement of bioactive phenol content in virgin olive oil with an olive-vegetation water concentrate produced by membrane treatment". *Food Chemistry*, 124, 1308-1315

Tafesh, A., Naim, N., Jeries, J., Fares, H., Herbert, R. and Hassan, A. (2011) "Synergistic Antibacterial Effects of Polyphenolic Compounds from Olive Mill Waste water" Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Vol. 2011

Valencia I., Ansorena D., Astiasaràn I. (2006). "Stability of linseed oil and antioxidants containing dry fermented sausages: A study of the lipid fraction during different storage conditions". *Meat Science*, 73, 269-277.

Wójciak karolina m., Trzaskowska monika, Kołożyn-krajewska danuta, Dolatowski zbigniew j.(2012). “Evaluation of technological properties and oxidative stability of organic dry fermented probiotic sausages during long-term storage”. *Bull Vet Inst Pulawy*, 56, 305-314

## SITOGRAFIA

[http://www.inran.it/646/tabelle\\_di\\_composizione\\_degli\\_alimenti.html?idalimento=110610&quant=100](http://www.inran.it/646/tabelle_di_composizione_degli_alimenti.html?idalimento=110610&quant=100)

## NORMATIVA

1994. Decreto del Ministero della Sanità del 28.12.1994 “Autorizzazione all'impiego di colture di avviamento «starters microbici» nella preparazione degli insaccati carnei la cui tecnologia produttiva non comporti trattamenti con il calore”. Gazzetta ufficiale n.89, 15 aprile

2004. REGOLAMENTO (CE) N. 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. Gazzetta Ufficiale Legge n 139 del 30.4.2004, pag. 55.

2005. Decreto del MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE del 21.09.2005 “Disciplina della produzione e della vendita di taluni prodotti di salumeria”. Gazzetta Ufficiale n.231, serie generale, 4 ottobre

## Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Professor Novelli per avermi accettato come tesista e per avermi insegnato veramente cosa vuol dire stare in laboratorio. Lo ringrazio anche per la pazienza e la disponibilità nel rispondere alle mie innumerevoli domande.

Un grande grazie va anche alla Dottoressa Balzan per avermi aiutato nei momenti critici dell'attività di laboratorio e per aver "subito" le mie incomprensioni con formule, grafici e tabelle.

Un sentito ringraziamento va a tutto il gruppo di Veneto Agricoltura per avermi le porte della loro struttura, per avermi fornito la strumentazione e a volte anche il reagentario (grazie Cristina).

Un grazie va anche a Roberto e Cristina di Veneto Agricoltura di Thiene per avermi mostrato quanto la chimica sia un mondo fantastico, vario, pieno di sfaccettature dove potersi tuffare.

Un ringraziamento va alla mia famiglia che hanno sopportato infinite ore di discorsi in giro per casa, in vista degli esami. Vorrei ringraziare la mia nonna Mafalda che ha dato tanto per farmi arrivare dove sono oggi.

Nonno posso non ringraziare i miei amici più cari di Altavilla: Andrea S., Andrea P., Giulia e Alberto, Lucia, Valentina con Cristian, Marta, Giuseppe e tutti quelli che qui non ho citato per aver sopportato le mie tante ultime assenze.

Un caro grazie va alle mie tre compagne delle superiori Giulia, Giorgia, Alessia per aver sopportato infiniti discorsi sui salami, sulle olive e sul cibo in generale.

Un dolce grazie va agli amici di Rampazzo e Carmignano perché mi hanno fatto sentire l'affetto quando ne sentivo il bisogno.

Ringrazio Omar, Jacopo, Carlo, Andrea R., Mattia, Maristella, Elisa, Elena, Anna e tutti i compagni dell'università perché sono stati per me una vera seconda famiglia.

Un grazie molto speciale va a Francesca, la mia ragazza, non basterebbe un libro lungo il doppio di questa tesi per farci stare tutti i motivi, ma uno voglio dirlo: perché mi ama per come sono.