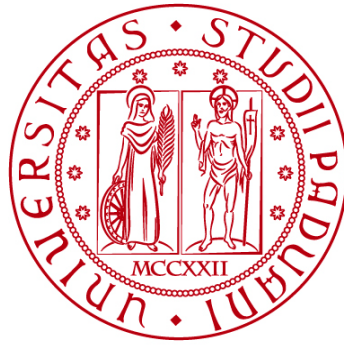


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

***Daucus carota* L. come vegetale funzionale nella
produzione di nuovi prodotti alimentari**

**Tutor: Prof.ssa Francesca Dalla Vecchia
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Beatrice Sterchele

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE: <i>Daucus carota</i> L. COME SPECIE MODELLO	1
2. CARATTERISTICHE CHIMICHE, FITOCHIMICHE E PROPRIETÀ FUNZIONALI CORRELATE	3
2.1 Carotenoidi	5
2.2 Composti fenolici	6
2.3 Fibra alimentare	7
3. I TRATTAMENTI NON TERMICI E GLI STRESS ABIOTICI POST-RACCOLTA	8
3.1 Lo stress da ferita	9
3.2 Le proprietà dell'acido clorogenico	12
4. LA TRASFORMAZIONE DELLE CAROTE STRESSATE	15
4.1 Succo di carota	15
4.2 Purea di carota	18
4.3 Polvere di carota	21
5. CONCLUSIONE	23
6. BIBLIOGRAFIA	24

1. INTRODUZIONE: *Daucus carota* L. COME SPECIE MODELLO

La carota, come *Daucus carota* L., appartiene alla famiglia delle Ombrellifere ed è uno dei vegetali a radice più consumati e conosciuti al mondo. Diffusa nel XIII secolo a partire dalla Cina, sia meridionale che settentrionale, rappresenta un ortaggio facile da coltivare, si adatta facilmente a diverse condizioni ambientali e, per questo, è capace di crescere sia in ambienti dal clima subtropicale che temperato (figura 1) (Tian *et al.*, 2024).

La carota viene riconosciuta come un alimento funzionale perchè contiene quantità elevate di sostanze fitochimiche promotrici della salute dell'uomo, come carotenoidi, fenoli e fibre alimentari (Jacobo-Velazquez, 2023); grazie a queste sostanze e al fatto che queste rappresentano un'importante fonte di antiossidanti con attività antitumorali e antidiabetiche, in tutto il mondo il consumo delle carote è in costante crescita (Sharma *et al.*, 2012).

Per questi motivi, negli ultimi anni numerosi studi hanno riguardato la possibilità di potenziare il potere benefico delle carote, ovvero valorizzare il loro contenuto nutraceutico per poi trasformarle in alimenti sani o in nuovi ingredienti salutari, come succhi, puree o polveri. I trattamenti post-raccolta, come lo stress da ferita, sembrano essere le tecniche più efficaci per migliorare la qualità delle carote. Infatti, stimolando l'attivazione del metabolismo secondario, sono in grado di indurre l'accumulo dei composti bioattivi nei tessuti (Jacobo-Velazquez, 2023).

I risultati ottenuti da questi studi hanno confermato il fatto che la carota è un ortaggio versatile e ricco di proprietà che l'industria alimentare potrebbe sfruttare per migliorare la salute umana (Jacobo-Velazquez, 2023).



Figura 1. a Fiore di carota. b Radice di carota. c, d, Coltivazioni di carote.
(Tian *et al.*, 2024).

2. CARATTERISTICHE CHIMICHE, FITOCHIMICHE E PROPRIETÀ FUNZIONALI CORRELATE

La carota è nota per essere fonte di preziose sostanze nutritive; infatti, negli Stati Uniti d'America e nei Paesi occidentali rappresenta la più importante fonte di carotenoidi (Sharma *et al.*, 2012).

La sua struttura generale è data da una parte apicale chiamata ombrella, una parte centrale, ovvero il fusto e infine la radice, la quale permette di classificare le carote sulla base delle diverse colorazioni: alcune vengono definite orientali e hanno per lo più radici viola o, con meno frequenza, gialle, mentre quelle occidentali presentano radici che vanno dal bianco al rosso, passando per l'arancione (Mandrich *et al.*, 2023).

Inoltre, le carote possono essere catalogate in selvatiche e coltivate, che si diversificano per la pigmentazione della radice e per il sapore: le prime hanno radici spesse, un sapore dolce e vanno dal bianco al viola, mentre le seconde hanno radici più sottili, un sapore più amaro e sono principalmente bianche (Mandrich *et al.*, 2023).

Le carote contengono Calcio (Ca), Fosforo (P), Magnesio (Mg), Potassio (K), Sodio (Na), Ferro (Fe) e Manganese (Mn) (tabella 1); in particolare le quantità di Magnesio, Sodio e Ferro sono diverse in base al tipo di carota. Inoltre, rappresentano una fonte importante di vitamine, le quali, assieme ai minerali, definiscono la qualità di questo vegetale. Importanti sono la vitamina E, A e i derivati della vitamina B: la vitamina E, che origina dall' α -tocoferolo è indispensabile per la segnalazione cellulare, l'espressione dei geni e la corretta funzione delle membrane cellulari; la Vitamina A, derivante dal β -carotene, invece, è importante per aumentare l'efficienza del sistema immunitario; ed infine i derivati della Vitamina B sono importanti per le funzioni cerebrali, per un corretto funzionamento del sistema digestivo e per una equilibrata crescita cellulare (Mandrich *et al.*, 2023).

Nelle carote è rilevante anche la presenza degli acidi organici, uno fra tutti è l'acido ascorbico, conosciuto anche come Vitamina C, il quale possiede un'importante attività antiossidante. Altri acidi organici che svolgono un ruolo importante per la salute dell'uomo sono l'acido gallico, un fattore antimutageno, l'acido

idrossicinnamico con attività antiinfiammatoria e l'acido benzoico con un ruolo antibatterico (Mandrigh *et al.*, 2023).

Inoltre, è stato calcolato il contenuto di acqua delle carote, il quale si aggira attorno l'86% e l'89% (Mandrigh *et al.*, 2023).

Daucus carota L. contiene anche molti carboidrati, sottoforma di zuccheri semplici come fruttosio, saccarosio e glucosio, la cui quantità può variare in base alle condizioni ambientali di crescita e di conservazione (Mandrigh *et al.*, 2023).

Oltre alle vitamine, numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che alcuni fitonutrienti contenuti nella carota proteggono l'organismo umano dallo stress ossidativo (Sharma *et al.*, 2012) e quindi incrementare il consumo di carota potrebbe ridurre il rischio di contrarre malattie croniche, cardiovascolari e cancro (Mandrigh *et al.*, 2023).

Più precisamente, la qualità delle carote deriva dalla presenza nei tessuti dei composti bioattivi, ovvero sostanze fitochimiche, per lo più metaboliti secondari che apportano benefici alla salute: carotenoidi, fenoli e fibre alimentari (Sharma *et al.*, 2012).

Chemical Constituents	Observed Amount
Moisture	86–89 mg/100 g FW
Ca	34–80 mg/100 g FW
P	25–53 mg/100 g FW
K	240 mg/100 g FW
Mg	9 mg/100 g FW
Mn	0.2–0.8 mg/kg FW
Fe	0.4–2.2 mg/100 g
Na	40 mg/100 g
Total sugars	2.73–11.24 g/100 g FW
Total organic acids	1.07–2.79 g/100 g FW
Vitamin C (ascorbic acid)	1.0–5.3 mg/100 g * FW
Total phenolics	7.3–224 mg/100 g FW
Tetraterpenoids (carotenoids, chlorophylls)	0.2–4.1 mg/100 g FW

Tabella 1. Costituenti chimici della carota.

FW = peso fresco; dipende dal tempo e dalle condizioni di conservazione (dopo 30 giorni i valori potrebbero ridursi del 50% del valore iniziale). Modificato. (Mandrigh *et al.*, 2023).

2.1 Carotenoidi

I Carotenoidi, composti appartenenti alla famiglia dei tetraterpeni (isoprenoidi C₄), possiedono una catena centrale di atomi di carbonio con legami sia doppi che singoli e diversi gruppi terminali ciclici o aciclici.

Questi fitonutrienti si concentrano per lo più nelle radici e danno un colore che va dal giallo al rosso. In particolare, nelle carote il loro contenuto medio va dai 16 ai 38 mg/100g (Mandrigh *et al.*, 2023).

Si suddividono principalmente in Caroteni e Xantofille. I Caroteni più diffusi sono il β -carotene, l' α -carotene e la luteina, mentre le Xantofille presenti sono la

zeaxantina, β -criptoxantina e il licopene. Più precisamente, il β -carotene rappresenta in media l'80% dei carotenoidi totali presenti nella radice delle carote (Mandrigh *et al.*, 2023).

Questi composti sono importanti per l'organismo perché rappresentano i primi precursori della Vitamina A, attirando l'attenzione di molti ricercatori in seguito alla scoperta di un loro possibile ruolo protettivo contro alcune tipologie di cancro. Infatti, sono stati segnalati come composti dotati di un enorme potenziale nella prevenzione di malattie cardiovascolari e degenerative come Alzheimer, nella riduzione del rischio di degenerazione muscolare correlata all'età e nella prevenzione della cataratta; inoltre agiscono efficacemente contro i radicali liberi e rafforzano il sistema immunitario (Sharma *et al.*, 2012).

2.2 Composti fenolici

Le carote contengono anche composti fenolici, maggiormente concentrati nella buccia, in minor quantità nel floema e ancora meno nello xilema. Essi si suddividono in acidi fenolici, flavonoidi e tannini, accumulati tutti dalla presenza di un anello benzoico; possono essere liberi, coniugati a zuccheri oppure insolubili. Vengono definiti come promotori della salute dell'uomo perché possiedono un elevato potere antiossidante, antimutageno e antitumorale. La molecola più diffusa e studiata appartiene al gruppo degli acidi fenolici ed è l'acido clorogenico. (Sharma *et al.*, 2012; Mandrigh *et al.*, 2023).

È stato dimostrato che applicare specifici stress abiotici post-raccolta nelle carote modifica la quantità e la qualità dei composti fenolici, migliorando le proprietà nutraceutiche. È noto che lo stress da ferita è una pratica che induce l'attivazione del metabolismo dei fenilpropanoidi, portando all'accumulo dei composti fenolici (Jacobó-Velázquez, 2023).

2.3 Fibra alimentare

Le carote sono ricche di fibre alimentari, in particolare nella sansa; queste sostanze non danno all'organismo nessun apporto calorico in quanto non sono digeribili dall'essere umano; nonostante ciò, un'alimentazione ricca di fibre viene correlata alla prevenzione di patologie coronariche e della diverticolite. Le fibre, inoltre, assicurano una regolarità intestinale, diminuiscono i livelli di colesterolo, regolano la concentrazione ematica di glucosio e aiutano a prevenire le patologie cardiache (Sharma *et al.*, 2012).

Le fibre si dividono sulla base della solubilità, dunque possono essere solubili e insolubili: quelle solubili sono principalmente cellulosa e, in minor quantità, emicellulosa e lignina, mentre quelle insolubili sono le pectine (Sharma *et al.*, 2012; Mandrich *et al.*, 2023).

3. I TRATTAMENTI NON TERMICI E GLI STRESS ABIOTICI POST-RACCOLTA

Le strategie finora più impiegate per prolungare la durata della conservazione delle carote e dei suoi prodotti si riferiscono ai trattamenti termici, ma questi comportano nell'alimento diminuzioni delle sostanze benefiche e cambiamenti delle proprietà organolettiche (Jacobó-Velázquez *et al.*, 2021).

Per questo motivo, recentemente, gli studiosi hanno iniziato ad approfondire e studiare nuove tecnologie, come i trattamenti non termici e gli stress abiotici post-raccolta: i primi prevedono l'utilizzo di ultrasuoni, campi elettrici pulsanti e alti livelli di pressione, senza l'impiego di alte temperature ed estendono la durata della conservazione degli alimenti, assicurando la stessa qualità nutraceutica e organolettica; gli stress abiotici post-raccolta, invece, prevedono l'implicazione di stimoli non biologici con l'obiettivo di sollecitare il metabolismo secondario come meccanismo difensivo e sono, ad esempio, lo stress da ferita, le radiazioni ultraviolette, le atmosfere modificate e i fito-ormoni esogeni (Jacobó-Velázquez, 2023; Jacobó-Velázquez *et al.*, 2021).

Attraverso molte ricerche è emerso che alcuni trattamenti non termici possono agire anche come stress abiotici in quanto sono in grado di causare un accumulo di nutraceutici nei tessuti degli alimenti (Jacobó-Velázquez, 2023).

Per molti studiosi, *Daucus carota* L. rappresenta, quindi, una risorsa chiave grazie ai suoi costituenti funzionali e viene utilizzata come specie modello per la ricerca e l'applicazione delle nuove tecnologie.

In carota gli stress abiotici post-raccolta promuovono l'accumulo di antiossidanti; in particolare è stato osservato che lo stress da ferita ad una temperatura di 15°C comporta un aumento dei composti fenolici dal 200% all'800% entro 48 ore, senza comprometterne la qualità complessiva (Jacobó-Velázquez *et al.*, 2021).

Queste procedure post-raccolta, tuttavia, non sono idonee a inattivare enzimi e a bloccare la crescita di microorganismi che possono danneggiare l'integrità e le proprietà dell'alimento. Al contrario, i trattamenti termici sono in grado di inibire enzimi e microorganismi che possono ostacolare l'aumento delle sostanze benefiche, si possono inattivare enzimi importanti per l'arricchimento nutraceutico dell'alimento stesso. Inoltre, se utilizzati nella maniera corretta, combinare i

trattamenti non termici con quelli post-raccolta consentirebbero di creare nuovi prodotti alimentari e, quindi, di promuovere nel mercato alimenti arricchiti di composti bioattivi (Jacobo-Velazquez *et al.*, 2021).

3.1 Lo stress da ferita

Come affermato precedentemente, gli stress abiotici post-raccolta incrementano la concentrazione di sostanze antiossidanti negli alimenti. Il trattamento post-raccolta più efficace e semplice da applicare è lo stress da ferita, il quale, in carota, induce l'accumulo dei composti fenolici stimolando l'attività metabolica del fenilpropanoidi (Jacobo-Velazquez, 2023).

Vi sono numerosi studi a supporto di questo: per esempio si sostiene che in carota la biosintesi dei composti fenolici può venire incrementata se si aumenta l'intensità della ferita. Più precisamente, quando una cellula vegetale viene sottoposta a uno stress o subisce dei danni, il metabolismo fenolico reagisce in due modi: in primo luogo, i composti fenolici vengono ossidati a causa della rottura della membrana cellulare; in secondo luogo, la cellula inizia a sintetizzare nuovi antiossidanti fenolici come meccanismo di difesa nei confronti della ferita. Questo secondo processo è guidato da cambiamenti nell'attività dell'enzima chiave della via metabolica del fenilpropanoide, ovvero la fenilalanina ammoniaca liasi (PAL) (Surjadinata & Cisneros-Zevallos, 2012).

La tecnica dello stress da ferita può venire eseguita attraverso una procedura attuabile sia su scala industriale e sia a livello domestico e permette di produrre carote tagliate fresche, salutari e pronte al consumo: il primo step del procedimento è rappresentato dal lavaggio e dall'igienizzazione delle carote intere non sbucciate, per esempio con una soluzione di cloro 150 ppm; solo in seguito, è possibile applicare la lesione riducendo la carota in strisce corte e sottili mediante una grattugia, in quanto solo se viene tagliata in questo modo, la biosintesi dei composti fenolici si attiva molto velocemente. Infine, per poter osservare un evidente aumento della concentrazione degli antiossidanti fenolici, il prodotto ottenuto dalla lesione deve venire conservato alla temperatura di 10-15°C per circa 48 ore. È importante che le fasi di lavaggio e igienizzazione avvengano prima del taglio in

quanto questa procedura potrebbe rimuovere il segnale della ferita, ovvero l'adenosina trifosfato extracellulare eATP, e quindi impedire l'accumulo dei fenoli nei tessuti. Se questo dovesse avvenire, sarebbe possibile aggiungere eATP dopo il lavaggio del tessuto ferito per immersione o spruzzatura, in modo da aggiungere il segnale della ferita in seguito alla sua parziale eliminazione (Jacobó-Velázquez, 2023).

Un'altra tecnica in grado di generare la medesima risposta dello stress da ferita prevede il trattamento delle carote intere con un'elevata pressione idrostatica fino a raggiungere la pressione ideale, chiamata anche CUT, capace di indurre la biosintesi dei composti fenolici. Nelle carote, quindi, la ferita scatena una risposta fisiologica di difesa con lo scopo di riparare il danno (Jacobó-Velázquez, 2023).

È stato condotto uno studio riguardo il meccanismo di risposta che si innesca in seguito alla lesione, in particolare è stata analizzata l'intensità della ferita in quanto questa ha un impatto sull'attività dell'enzima PAL, correlata con l'aumento del contenuto fenolico e con il ruolo protettivo nei confronti dell'ossidazione (Surjadinata & Cisneros-Zevallos, 2012). Le carote sono state tagliate in tre modi diversi: a rondelle o fette, dalle quali è stato ricavato il secondo formato, ovvero a spicchio di torta ed infine la forma più piccola, la carota grattugiata (figura 2). È stata inoltre definita l'intensità di ferita A/W come il rapporto tra l'area in cm² della porzione di carota ottenuta dalla lesione e il peso del tessuto in g ed è stata misurata per tutti e tre i formati delle carote: 4,2 cm²/g per le rondelle, 6,0 cm²/g per gli spicchi e 23,4 cm²/g per le carote grattugiate. Le carote intere rappresentavano il controllo, dunque con un A/W di 0,0 cm²/g in quanto, non essendo state tagliate, l'area della superficie ferita risultava essere nulla.

Per confrontare i dati, sono state utilizzate tre cultivar di carote differenti. Dopo 8 giorni di conservazione delle carote tagliate, il contenuto fenolico era aumentato di 5,7 volte rispetto al giorno 0, senza sostanziali differenze tra le tre cultivar di carote. Per quanto concerne AOX, che esprime la quantità di composti organici alogenati, dopo otto giorni vi è stato un aumento diverso nelle tre cultivar di carote, ovvero di 15,5, 18,5 e 17,0 volte. L'AOX indica quanto i composti fenolici sono efficaci nel neutralizzare i radicali liberi; dunque, un elevato valore di questa grandezza indica maggior protezione dai radicali liberi.

Per quanto riguarda, invece, l'enzima PAL, dopo 2 giorni di conservazione si è osservato un picco massimo dell'attività e poi con il passare del tempo il valore è diminuito.

Secondo la teoria alla base di questo procedimento, le grandezze appena descritte ovvero la concentrazione di antiossidanti fenolici, il livello di AOX e l'attività dell'enzima PAL sarebbero dovuti crescere all'aumentare dell'intensità della ferita. Infatti, la quantità di composti fenolici, in seguito alla lesione, nelle carote a rondelle è aumentata del 97%, per gli spicchi di torta è cresciuta del 75%, mentre per le carote grattugiate c'è stato un aumento del 252%. In particolare, l'acido clorogenico era la componente fenolica più presente in tutte e tre le cultivar di carote.

L'intensità della ferita ha aumentato anche il livello di AOX; infatti, dopo quattro giorni di conservazione, la quantità è raddoppiata o triplicata nelle carote a rondelle e a spicchio, mentre in quelle grattugiate è cresciuto fino a 12,4 volte. Invece, l'attività dell'enzima PAL è incrementata, rispettivamente nelle carote a rondelle, a spicchio e grattugiate di 19,2, 27,9 e 266,2 volte.

Con questi dati, dunque, viene dimostrato che la biosintesi di composti fenolici con attività antiossidante dipende dall'intensità di ferita e che l'aumento dell'intensità di ferita incrementa la concentrazione degli antiossidanti fenolici. Queste evidenze suggeriscono che, inserire nella dieta carote bio-arricchite con queste metodiche, potrebbe essere una buona strategia contro l'ossidazione. Inoltre, l'industria alimentare potrebbe sfruttare queste tecniche per creare integratori alimentari, cosmetici, cibi e bevande funzionali (Surjadinata & Cisneros-Zevallos, 2012).

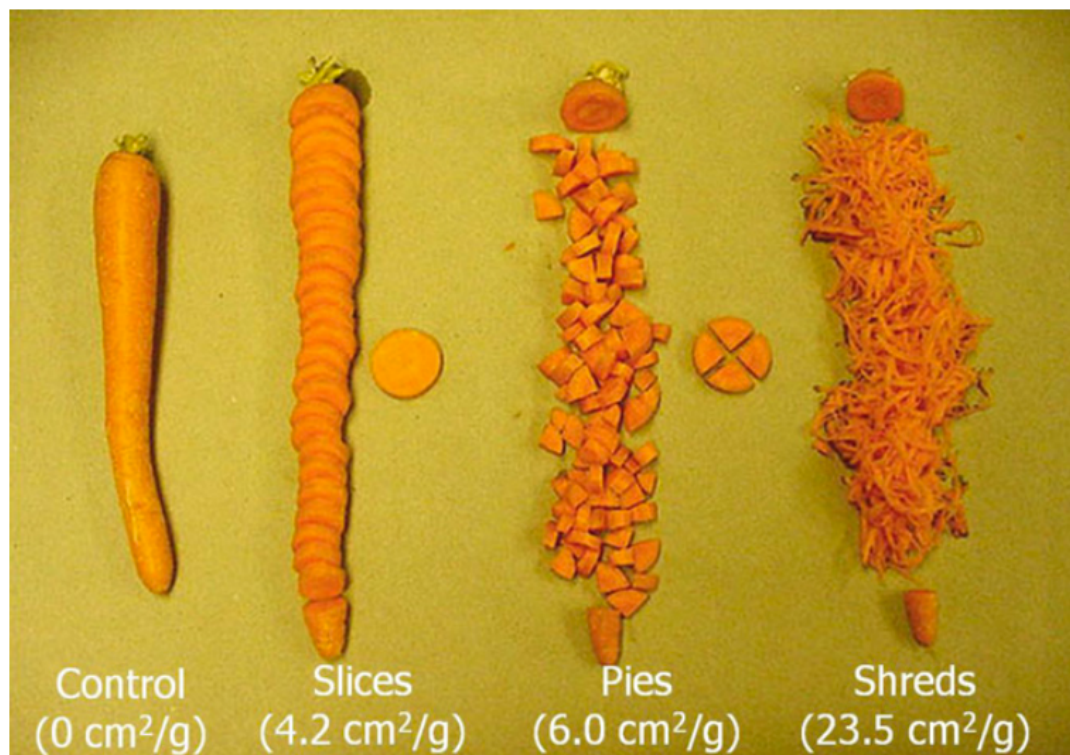


Figura 2. I valori si riferiscono all'intensità di ferita A/W.
(Surjadinata & Cisneros-Zevallos, 2012).

3.2 Le proprietà dell'acido clorogenico

L'acido clorogenico è uno dei più importanti antiossidanti fenolici della dieta dell'uomo perché comporta numerosi effetti positivi sulla salute. Appartiene alla famiglia dei composti fenolici chiamata acidi idrossicinnamici. Chimicamente è costituito da acido chinico e da acido caffeico, perciò è chiamato anche 5-O-acido caffeilchinico (5-CQA) (figura 3). È diffuso in molte piante e alimenti, quali carote, mele, caffè, melanzane e patate (Santana-Gálvez *et al.*, 2017).

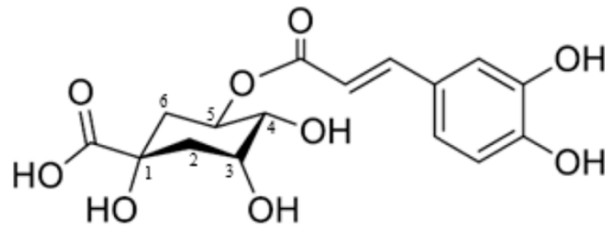


Figura 3. Struttura chimica dell'acido clorogenico (5-O-acido caffeilchinico). (Santana-Gálvez J. *et al.*, 2017).

È emerso che l'acido clorogenico possiede proprietà principalmente antiossidanti, ma anche antitumorali, antinfiammatorie, antidiabetiche, antipertensive e antineurodegenerative. Studi clinici e *in vivo* effettuati attraverso la somministrazione di diete o alimenti arricchiti di acido clorogenico hanno dimostrato che l'acido in questione possiede proprietà benefiche contro l'obesità, il diabete, l'ipertensione e, quindi, in generale ha effetti positivi sulla sindrome metabolica (Santana-Gálvez *et al.*, 2017).

Per esempio, risultati ottenuti da studi *in vivo* svolti su 32 topi hanno confermato che l'acido clorogenico ha effetti contro l'obesità (Santana-Gálvez *et al.*, 2017). In particolare, questi animali sono stati suddivisi in quattro gruppi, i quali sono stati alimentati in diverso modo per otto settimane. Per il primo gruppo è stata utilizzata una dieta normale, per il secondo una dieta con il 37% delle calorie provenienti dai grassi, per il terzo gruppo una dieta sempre ricca di grassi ma con lo 0,02% di acido clorogenico e, infine, all'ultima classe di topi è stata somministrata una dieta anch'essa ricca di grassi ma con lo 0,02% di acido caffeico, un altro composto fenolico.

Dai risultati ottenuti è emerso che l'acido clorogenico è più efficace dell'acido caffeico; infatti, solo l'acido clorogenico ha ridotto in maniera significativa la quantità di trigliceridi nel tessuto adiposo.

Le differenze tra il gruppo in cui è stata introdotta la dieta ad alto contenuto di grassi e i due gruppi trattati con i due composti fenolici è che questi, a differenza dei primi, hanno ridotto la massa grassa viscerale, il peso corporeo, i livelli di trigliceridi nel cuore e nel fegato, la quantità di colesterolo nel cuore, il tessuto adiposo e hanno anche diminuito i livelli di insulina e leptina.

Altri studi *in vivo* effettuati su diversi gruppi di topi hanno dimostrato che l'acido clorogenico ha anche effetti sul metabolismo dei lipidi, sui livelli di glucosio nel sangue, sul processo di guarigione delle ferite e sulla formazione della cataratta (Santana-Gálvez *et al.*, 2017).

Da altri test clinici è emerso che consumare giornalmente l'acido clorogenico puro e alimenti che lo contengono in maniera significativa, riduce la disfunzione endoteliale e migliora la pressione sanguigna.

Inoltre, in altri esperimenti *in vivo* l'acido clorogenico ha diminuito la concentrazione di lipidi nel fegato, ha rafforzato la sensibilità all'insulina; è risultato anche efficace nel bloccare la resistenza all'insulina in soggetti sottoposti a una dieta ricca di grassi, ha impedito lo sviluppo della steatosi epatica e si è dimostrato valido nel prevenire l'incremento di peso (Santana-Gálvez *et al.*, 2017). Secondo quanto emerso da alcuni studi fatti su soggetti sottoposti al consumo di caffè arricchito da acido clorogenico, questo composto potrebbe avere un impatto sul glucosio e per questo motivo possiede proprietà benefiche contro l'obesità e il diabete. Infatti, diete caratterizzate da un basso livello di glucosio porterebbero al consumo del grasso per produrre energia e, invece, una bassa attività dell'insulina porterebbe a sua volta alla riduzione dei depositi di grasso nel tessuto adiposo (Santana-Gálvez *et al.*, 2017).

Per di più, l'acido clorogenico ha anche un ruolo come additivo alimentare: molti studi supportano l'idea che questo fenolo potrebbe venire sfruttato dall'industria alimentare per la conservazione dei prodotti alimentari perché è un potente agente antimicrobico in grado di agire contro batteri, muffe, lieviti e virus.

Un'altra proprietà dell'acido clorogenico è quella di possedere un'elevata attività antiossidante, in particolare previene l'ossidazione dei lipidi a cui sono soggetti i prodotti alimentari, impedendo così lo sviluppo di composti tossici.

Dunque, questa versatilità derivante dal duplice ruolo come additivo alimentare e nutraceutico, dimostra che il 5-O-acido caffeilchinico e, quindi, le carote arricchite da questo composto potrebbero venire utilizzate per la produzione di alimenti o ingredienti funzionali, come bevande, puree o polveri e integratori o formulazioni alimentari (Santana-Gálvez *et al.*, 2017).

4. LA TRASFORMAZIONE DELLE CAROTE STRESSATE

L'induzione di stress in carota rappresenta un enorme potenziale in quanto può venire impiegato nella produzione di nuovi prodotti alimentari con maggiori proprietà nutraceutiche. Sono stati prodotti, infatti, alimenti funzionali come succhi, puree e polveri a partire da carote trattate con agenti stressogeni con l'obiettivo di inserirli nella dieta quotidiana o in nuove formulazioni alimentari (Jacobovelazquez, 2023).

4.1 Succo di carota

Gli stress abiotici sono in grado di aumentare il contenuto nutraceutico di un alimento senza modificarlo con sostanze dannose e senza manipolarlo geneticamente. A dimostrazione di ciò, è stato applicato lo stress da ferita per produrre un succo di carote con molte proprietà benefiche perché arricchito di composti fenolici (Santana-Gálvez *et al.*, 2019).

In generale il succo di carota, una delle bevande più diffuse ottenute da un vegetale a radice, è facile da ottenere ed è ricco di numerosi minerali e vitamine.

L'ottenimento di un succo di carota arricchito e funzionale comporta una concentrazione maggiore di carotenoidi e fenoli.

Il metodo per ottenerlo consiste, prima di applicare lo stress da ferita, nel lavaggio con acqua delle carote intere, ovvero non lesionate e con la buccia, nella disinfezione per cinque minuti con una soluzione di cloro, nella asciugatura e in seguito nella eliminazione delle due estremità. Sono state quindi analizzate l'azione degli stress indotti quali appunto la sbucciatura, l'intensità della ferita, la sbollentatura e la modalità di conservazione.

Solo la metà delle carote è stata sbucciata, invece tutte sono state tagliate in 3 modi diversi: a fette, a spicchio di torta, ottenuto tagliando in quattro parti le fette, a strisce corte e sottili, che corrispondono a carote grattugiate, mentre altre sono state lasciate intere. Successivamente alcune sono state sbollentate, messe a raffreddare in acqua e conservate per 48 ore a 15 °C, altre hanno subito il processo inverso, ovvero sono state prima conservate e poi sbollentate. Inoltre una parte delle carote

sbucciate non sono state sbollentate e conservate perché utilizzate come il gruppo di controllo.

Alla fine, si sono ottenuti tre diversi campioni: il controllo, le carote sbollentate e poi conservate per 48 ore e le carote prima conservate e poi sbollentate.

I dati ottenuti suggeriscono che le migliori condizioni per produrre il succo di carota arricchito, ovvero con il più alto livello di carotenoidi e fenoli, corrispondono alle carote tagliate a fette, prima conservate per 48 ore a 15 °C e poi sbollentate.

Il succo è stato ottenuto attraverso un estrattore, poi è stato pastorizzato per 10 minuti a 85 °C in una pentola di metallo a bagnomaria per ridurre al minimo la degradazione dei composti fenolici e successivamente è stato congelato a -20 °C per poi venire analizzato.

In particolare, a partire dalle quattro diverse condizioni di stress indotto sono stati ottenuti quattro tipologie di succhi: il controllo, ovvero il succo di carote non sbucciate (CUCJ), il succo convenzionale, cioè carote semplicemente sbucciate (CPCJ), il succo di carote stressate non sbucciate (SUCJ) e infine il succo di carote stressate e sbucciate (SPCJ).

È emerso che rimuovere la buccia comporta una riduzione del contenuto fenolico in quanto questa contiene una quantità di fenoli maggiore fino a quasi cinque volte rispetto ai tessuti interni. Inoltre, sbollentare prima le carote e poi conservarle non migliora il contenuto fenolico perché la sbollentatura potrebbe inattivare gli enzimi della via del fenilpropanoide necessari alla pianta per reagire allo stress da ferita.

L'aumento del contenuto fenolico è proporzionale all'intensità della ferita, però nelle carote prima sbollentate e poi conservate non c'è stato un significativo aumento dei composti fenolici e il contenuto fenolico diminuiva all'aumentare dell'intensità da ferita, al tempo stesso nelle carote conservate e poi tagliate i fenoli sono aumentati significativamente. Una possibile spiegazione è che gli enzimi necessari per indurre l'accumulo dei composti fenolici si attivano durante la conservazione, mentre con la sbollentatura i composti fenolici vengono persi a causa del contatto con l'acqua; più l'intensità di ferita è maggiore, più composti vengono persi perché aumenta il rapporto superficie/volume della carota e quindi cresce il contatto con l'acqua. Dunque, conservare e poi sbollentare risulta essere la strategia vincente.

Inoltre, l'acido clorogenico ha una concentrazione maggiore nelle carote a fette non sbucciate rispetto a quelle sbucciate e può aumentare fino a sei volte, se le carote vengono prima conservate e poi sbollentate. Per quanto concerne il β -carotene, invece, questo non viene influenzato dai passaggi di pelatura, sbollentatura e conservazione.

In generale per ottenere un succo di carote ricco di fenoli è necessario che le carote con la buccia vengano tagliate a fette per poi essere conservate per 48 ore a 15°C e poi sbollentate. Queste caratteristiche corrispondono al succo SUCJ, il quale possiede anche meno zuccheri e calorie rispetto al succo di carota convenzionale CPCJ. Una quantità inferiore di carboidrati può essere correlata al fatto che in seguito allo stress da ferita, per sintetizzare i composti fenolici, la carota utilizza gli zuccheri per ottenere il carbonio, il quale è fondamentale e necessario per la sintesi dei fenoli.

Invece succhi ottenuti dalle carote non sbucciate, CUCJ e SUCJ, possiedono elevate concentrazioni di calcio e potassio, mentre nessuno dei succhi contiene quantità importanti di ferro e fibra alimentare.

Dunque SUCJ, oltre a massimizzare il contenuto nutraceutico, possiede il 195% in più di fenoli e il 3600% in più di acido clorogenico rispetto al succo di carota convenzionale CUCJ.

Si può fare una stima dell'apporto nutraceutico giornaliero che comporterebbe consumare una quantità di succo SUCJ; per esempio, 240 ml di SUCJ corrispondono a 11 mg di acido clorogenico e si stima che consumare 50 mg al giorno di questo composto fenolico porterebbe degli effetti positivi sulla salute dell'uomo. Una porzione di SUCJ fornisce, quindi, il 22% del fabbisogno giornaliero di acido clorogenico e consumarne un litro significherebbe ricevere il 95%. Dunque, una porzione al giorno di SUCJ fornirebbe il 100% del fabbisogno giornaliero di vitamina A e rappresenterebbe una buona fonte di carotenoidi, i quali porterebbero effetti positivi contro lo stress ossidativo e alcuni tipi di tumori (Santana-Gálvez *et al.*, 2019).

4.2 Purea di carota

La purea di carote ottenuta dopo aver sottoposto la radice a stress da ferita può essere definita come un alimento funzionale in quanto contiene quantità elevate di acido clorogenico.

È stato condotto uno studio sui ratti alimentati con purea di carote stressate con l'obiettivo di studiare le conseguenze sul microbiota e sulle capacità cognitive e cerebrali (López-Martínez *et al.*, 2020).

Lo stress da ferita risulta essere la tecnica più efficace per questo tipo di esperimenti in quanto è un procedimento rapido, semplice ed economico.

Come affermato precedentemente, i composti fenolici che si accumulano in seguito allo stress abiotico, tra cui il più abbondante acido clorogenico, hanno effetti benefici nei confronti della sindrome metabolica. Studi suggeriscono una correlazione tra il ruolo del microbiota e lo sviluppo neurale e cognitivo; infatti, gli antiossidanti fenolici hanno conseguenze positive sull'attività dei neuroni, riducono la loro degenerazione e in particolare l'acido clorogenico, metabolizzato a livello del microbiota intestinale, agisce nei confronti dei batteri intestinali più benefici e importanti come *Lactobacillus* spp.

Le carote sono state lavate, disinfettate per 5 minuti in una soluzione di cloro e poi le due estremità sono state tagliate e la parte rimanente è stata affettata. Il campione di controllo, ovvero le fette di carote non stressate è stato sbollentato, poi macinato e pastorizzato, mentre il secondo campione, ovvero le fette di carote stressate, sono state conservate per 48 ore a 15 °C, poi sbollentate, macinate e pastorizzate. La purea arricchita è stata quindi raffreddata, portata successivamente a 20°C, poi divisa in porzioni uguali da 30 g e infine conservata a -80°C fino al momento dell'impiego.

Ratti Wistar a 30 giorni di vita sono stati divisi in due gruppi ciascuno con quattro maschi e quattro femmine. È stato inserito anche un gruppo di controllo, il quale è stato alimentato ogni giorno con 30 g di una miscela bilanciata costituita da 20% di caseina, 50% saccarosio, 15% amido di mais, 5% olio vegetale, 5% cellulosa, 3,5% minerali e 1% vitamine. La dieta giornaliera per i due gruppi di animali era rappresentata per il 90% dalla dieta del gruppo di controllo, mentre il rimanente

10% comprendeva, per il gruppo 1 la purea di carote stressate WSCP e per il gruppo 2 la purea di controllo CP.

Tutti i topi sono stati alimentati con le modalità appena descritte per 30 giorni, al termine dei quali i ratti sono stati sottoposti a test cognitivi.

Successivamente due femmine sono state accoppiate con un maschio dello stesso gruppo, con l'obiettivo di ottenere una seconda generazione di topi Wistar proveniente, quindi, da una prima generazione alimentata con purea di carota biofortificata con acido clorogenico. Terminato lo svezzamento, i ratti di seconda generazione sono stati sottoposti a dei test cognitivi e sono stati sacrificati per ottenere dei campioni di cervello e intestino tenue da poter analizzare (López-Martínez *et al.*, 2020).

Il test cognitivo a cui sono state sottoposte tutte le generazioni per quattro volte in tre giorni è il test del labirinto acquatico di Morris: il topolino viene immerso in una vasca suddivisa in quattro sezioni, una delle quali conteneva una piattaforma di uscita di colore blu nascosta appena sotto qualche millimetro dal pelo dell'acqua; l'obiettivo del test è calcolare la latenza, ovvero il tempo che impiega l'animale a trovare la piattaforma blu, il tempo passato in ogni quadrante e la lunghezza totale del percorso compiuto (Morris, 1984).

Nei primi due giorni di test sull'apprendimento non ci sono state differenze sostanziali tra i tre gruppi. Mentre, dei cambiamenti si sono notati al terzo giorno di test, in quanto il gruppo 1 di entrambe le generazioni, alimentato da WSCP, ha commesso meno errori rispetto alla prima generazione del gruppo di controllo e alla seconda generazione alimentata da CP. In ogni caso, un miglioramento si è notato per la seconda generazione di entrambi i gruppi CP e WSCP, con un tempo inferiore ai 10 secondi per trovare la piattaforma di uscita e con una media di 1 errore.

Secondo quanto emerso da alcune ricerche l'acido clorogenico agisce a livello della barriera ematoencefalica del sistema nervoso centrale e attiva la serotonina nell'ippocampo che a sua volta diminuisce il livello di ansia dell'individuo. Quindi la presenza di questo metabolita potrebbe portare ad una diminuzione dello stress nei topi durante la prova che li porterebbe ad ottenere una prestazione migliore.

Per quanto concerne, invece, il legame tra il microbiota intestinale e il sistema nervoso centrale, nei ratti CP e WSCP di seconda generazione vi è una concentrazione maggiore di *Lactobacillus* spp. rispetto al controllo. Questo

suggerisce che la dieta potrebbe influenzare positivamente la presenza dei batteri benefici nell'intestino. In particolare, i composti fenolici sono in grado di modificare la composizione del microbiota intestinale, comportandosi come probiotici e sensibilizzando gli agenti patogeni. Per esempio, i flavonoidi favoriscono la crescita di alcuni batteri, tra cui *Lactobacillus* spp. e questo potrebbe spiegare perché i gruppi che hanno consumato la purea biofortificata hanno mostrato delle abilità cognitive migliori nel test del labirinto di Morris. Infatti, alti livelli di *Lactobacillus* spp. nelle due puree, WSCP e CP, corrispondono a latenze più brevi nel test cognitivo del terzo giorno.

In sintesi, quindi, questi risultati indicano che l'acido clorogenico favorisce la salute intestinale regolando e mantenendo l'equilibrio dei batteri nell'intestino, promuovendo la crescita di quelli benefici come il *Lactobacillus* spp. e, indirettamente, regolando i fattori neurotrofici nel cervello.

La correlazione, invece, tra la consumazione della purea arricchita e lo sviluppo del cervello presenta delle differenze nella seconda generazione in quanto i ratti trattati con CP e WSCP presentano cervello e cervelletto di un peso maggiore. Non solo, anche il contenuto di mielina risulta essere più elevato nel WSCP rispetto a PC e questo valore aumenta ancora di più se viene considerata la seconda generazione. La mielina è responsabile della trasmissione veloce dei segnali, quindi il sistema nervoso centrale dei ratti Wistar che hanno consumato WSCP elabora le informazioni più velocemente e quindi i risultati dei test cognitivi potrebbero risultare migliori.

È noto che l'aumento dei radicali liberi può causare effetti negativi, uno fra tutti la perossidazione dei lipidi, ovvero la degradazione ossidativa che colpisce gli acidi grassi insaturi del cervello. L'acido clorogenico ha un effetto positivo in questo perché blocca i radicali liberi, inibendo la perossidazione dei lipidi e, quindi, proteggendo il cervello dallo stress ossidativo.

Tuttavia, anche se il cervello mostra segni di miglior sviluppo, ciò non significa necessariamente che ci saranno migliori prestazioni cognitive. Questo perché le capacità cognitive sono influenzate anche da altri fattori come l'apprendimento spaziale, la memoria e le capacità motorie. Il fabbisogno proteico giornaliero è cruciale per lo sviluppo del cervello e può influenzare le funzioni cognitive. Pertanto, se la purea di carote venisse utilizzata per soddisfare il fabbisogno

proteico, si potrebbero migliorare lo sviluppo cerebrale e le prestazioni cognitive nei ratti WSCP (López-Martínez *et al.*, 2020).

4.3 Polvere di carota

La trasformazione di carota in polvere risulta essere una procedura conveniente e funzionale per integrare questo ingrediente in nuovi alimenti con l'obiettivo di potenziarne il contenuto nutraceutico. Un alimento adatto a questo tipo di analisi è la tortilla di mais nixtamalizzata, molto diffusa nella dieta dei messicani, molti dei quali affetti da obesità. Aumentando il contenuto nutraceutico di queste tortillas si potrebbe migliorare la salute degli individui e promuovere uno stile di vita sano.

È stato applicato lo stress da ferita alle carote con l'obiettivo di ottenere una polvere con quantità maggiori di fenoli (Santana-Gálvez *et al.*, 2016).

Il procedimento nel dettaglio è il seguente: le carote sono state disinfettate per 5 minuti in una soluzione di cloro e asciugate. Successivamente le due estremità sono state tagliate e poi, con un robot da cucina, è stato applicato lo stress lesionale. Le carote triturate sono state conservate per 48 ore a 15°C in un contenitore con dei fori. Al termine della conservazione, sono state essiccate a 60°C per 30 ore per raggiungere un livello di umidità adeguato e poi sono state riposte a raffreddare per altre 12 ore. Infine, le carote sono state macinate grazie ad un mulino a coltelli e poi setacciate in modo tale da ottenere la polvere.

Attraverso questo procedimento si sono ottenute due tipi di CP, ovvero due tipi di polvere di carota: CPP, ottenuta da carote triturate e subito dopo essiccate e SCP, proveniente da carote triturate e, prima di venire essiccate, conservate per consentire l'accumulo dei fenoli.

È stata determinata la concentrazione ottimale di CP, ovvero il 10% del peso a secco. Quindi la farina di mais è stata sostituita con lo 0% o il 10% di CP. La miscela di farina di mais e CP, chiamata masa, è stata preparata aggiungendo 1-1,3 g acqua/g farina e mescolando tutto con un robot da cucina, dopo di che è stata messa a riposare per 10 minuti. Come penultimo step, il masa è stato sottoposto, grazie ad una macchina apposita, a tre diverse temperature: 291°C, 347°C e poi 287°C.

Alla fine, le tortillas sono state confezionate in sacchetti richiudibili di polietilene e riposti in una stanza esposta alla luce naturale ed artificiale per 3 giorni a 21 °C.

L'analisi fitochimica della polvere di carota CP ha riportato che la fibra alimentare in SCP è cresciuta del 23% rispetto a quella presente in CCP a causa dell'aumento delle fibre insolubili, come la lignina (Santana-Gálvez *et al.*, 2016). Questo è avvenuto perchè le carote rispondono allo stress lesionale sintetizzando i fenoli, i quali a loro volta stimolano la produzione di lignina: essa è in grado di ridurre le perdite d'acqua in quanto, essendo un composto idrofobico, rende le pareti cellulari della carota meno permeabili e, dunque, più resistenti a situazioni di stress idrico (Becerra-Moreno *et al.*, 2015).

L'acido clorogenico è il composto fenolico che ha subito l'accumulo maggiore. Inoltre, è rilevante anche l'aumento di α -carotene e β -carotene 48 ore dopo lo stress da ferita in quanto la lesione stimola la produzione delle specie reattive ROS e la pianta risponde accumulando sostanze antiossidanti come i carotenoidi.

La sostituzione del 10% di CCP e del 10% di SCP nelle tortillas di mais ha portato ad un aumento evidente di TDF, ovvero di fibra alimentare totale, fino al, rispettivamente, 10,62% e 12,22% del peso secco. Inoltre, la sostituzione del 10% di SCP ha causato una crescita dei fenoli del 155%, di gran lunga maggiore rispetto a PCC e un aumento di fibra alimentare del 35%. Invece la sostituzione del 10% di CP ha aggiunto nelle tortillas carotenoidi, come α -carotene, β -carotene e luteina.

Le tortillas così ottenute non hanno subito cambiamenti né nella consistenza, né nella durata di conservazione, inoltre hanno mostrato una buona accettabilità da parte dei consumatori.

Pertanto, la polvere di carota ottenuta attraverso lo stress lesionale si è rivelata un ottimo ingrediente per aumentare il valore nutrizionale delle tortillas e se venisse incorporata in altri alimenti, potrebbe offrire numerosi vantaggi per la salute umana (Santana-Gálvez *et al.*, 2016).

5. CONCLUSIONE

Daucus carota L. è oggetto di numerosi studi che hanno valorizzato le sue proprietà nutraceutiche provenienti dai tre principali composti bioattivi presenti nei tessuti, quali i fenoli, i carotenoidi e le fibre alimentari (Jacobo-Velázquez, 2023). Questi elementi possiedono proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, antidiabetiche e antitumorali e perciò, se introdotti nella dieta quotidiana, possono rappresentare un aiuto nella cura e nella prevenzione di molte malattie (Sharma *et al.*, 2012).

Negli ultimi anni, infatti, le ricerche si sono concentrate nella trasformazione delle carote in nuovi prodotti alimentari attraverso l'applicazione di stress abiotici, tra i quali lo stress da ferita. Grazie a queste metodiche è emerso che il contenuto nutraceutico delle carote può essere migliorato e, di conseguenza, il consumo di questo ortaggio e dei prodotti ottenuti dalla sua trasformazione potrebbero venire sfruttati dall'industria alimentare per formulare nuovi alimenti sani e innovativi. Infatti, le ricerche condotte hanno evidenziato che dalla carota stressata è possibile ottenere diversi prodotti alimentari, ovvero il succo, la purea e la polvere, i quali potrebbero avere, se consumati regolarmente, un impatto positivo sulla salute dell'uomo.

In conclusione, ulteriori studi *in vivo* e *in vitro* potrebbero suggerire nuove applicazioni di *Daucus carota* L. come ingrediente e alimento funzionale (Jacobo-Velázquez, 2023).

6. BIBLIOGRAFIA

- Becerra-Moreno, A., Redondo-Gil, M., Benavides, J., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2015). Combined effect of water loss and wounding stress on gene activation of metabolic pathways associated with phenolic biosynthesis in carrot. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–15.
- Jacobo-Velázquez, D.A., Santana-Gálvez, J. & Cisneros-Zevallos, L. (2021). Designing Next-Generation Functional Food and Beverages: Combining Nonthermal Processing Technologies and Postharvest Abiotic Stresses. *Food Eng Rev*, 13, 592–600.
- Jacobo-Velazquez, D.A. (2023). Transformation of carrots into novel food ingredients and innovative healthy foods. *Applied Food Research*, 3(1), 100303.
- López-Martínez, J. M., Santana-Gálvez, J., Aguilera-González, C., Santacruz, A., Amaya- Guerra, C. A., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2020). Effects of carrot puree with enhanced levels of chlorogenic acid on rat cognitive abilities and neural development. *CyTA-Journal Food*, 18(1), 68–75.
- Mandrich, L., Esposito, A. V., Costa, S., & Caputo, E. (2023). Chemical Composition, Functional and Anticancer Properties of Carrot. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(20), 7161.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11, 47–60.
- Santana-Gálvez, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2017). Chlorogenic Acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. *Molecules*, 22(3), 358.

- Santana-Gálvez, J., Pérez-Carrillo, E., Velázquez-Reyes, H. H., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2016). Application of wounding stress to produce a nutraceutical-rich carrot powder ingredient and its incorporation to nixtamalized corn flour tortillas. *Journal of Functional Foods*, 27, 655–666.

- Santana-Gálvez, J., Santacruz, A., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2019). Postharvest wounding stress in horticultural crops as a tool for designing novel functional foods and beverages with enhanced nutraceutical content: Carrot juice as a case study. *Journal of food science*, 84(5), 1151–1161.

- Sharma, K. D., Karki, S., Thakur, N. S., & Attri, S. (2012). Chemical composition, functional properties and processing of carrot—A review. *Journal of Food Science and Technology*, 49(1), 22–32.

- Surjadinata, B. B., & Cisneros-Zevallos, L. (2012). Biosynthesis of phenolic antioxidants in carrot tissue increases with wounding intensity. *Food chemistry*, 134(2), 615–624.

- Tian, Z., Dong, T., Wang, S., Sun, J., Chen, H., Zhang, N., & Wang, S. (2024). A comprehensive review on botany, chemical composition and the impacts of heat processing and dehydration on the aroma formation of fresh carrot. *Food chemistry: X*, 22, 101201.