

## INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	3
<b>CAPITOLO 1 –INTRODUZIONE</b>	4
1.1 FARMACI - ALIMENTI – SALUTE	5
1.2 ALIMENTI FUNZIONALI E NOVEL FOOD	6
1.3 PIANTE PER NUOVI ALIMENTI NUTRACEUTICI	8
1.4 FIORI COME ALIMENTO	10
1.5 ASPETTI SALUTISTICI DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE	12
1.5.1 Antiossidanti	
1.5.2 Vitamina C	
1.5.3 Carboidrati solubili	
1.5.4 Acidi organici	
1.6 ASPETTI DI SICUREZZA	20
1.6.1 Fitofarmaci	
1.6.2 Micotossine	
1.6.3 Metalli pesanti	
1.7 TECNOLOGIE POST-RACCOLTA	26
1.8 STABILIZZAZIONE DELLE CONSERVE VEGETALI	29
1.8.1 Classificazione merceologica delle conserve vegetali	
1.8.2 Conserve e semiconserve	
1.8.3 Stabilizzazione microbiologica mediante trattamenti termici	
1.8.4 Conservazione mediante uso dello zucchero	
1.9 RUOLO DEL SACCAROSIO NELLA DIETA	33
<b>CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA TESI</b>	35
<b>CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI</b>	38
3.1 PIANO SPERIMENTALE PER LA VALUTAZIONE DELLA MATERIA PRIMA	39
3.2 STRUMENTAZIONE	40
3.2.1 HPLC	
3.2.2 SPETTROFOTOMETRO	
3.2.3 EPR	
3.3 ANALISI CHIMICO-FISICHE SULLA MATERIA PRIMA	42
3.3.1 Contenuto in solidi solubili (SSC)	

3.3.2	pH, acidità titolabile (TA)	
3.3.3	Acidi organici	
3.3.4	Carboidrati solubili	
3.4	ANALISI BIOCHIMICHE E ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE SULLA MATERIA PRIMA	46
3.4.1	Vitamina C totale	
3.4.2	Polifenoli totali	
3.4.3	Antociani totali	
3.4.4	Test antiossidanti: sale di Fremy e DPPH	
3.4.5	Identificazione di molecole bio-attive	
3.5	ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI	55
3.6	PREPARAZIONE DELLA MISCELA-BASE	57
3.7	PROTOCOLLI DI STABILIZZAZIONE TERMICA	58
3.8	PIANO SPERIMENTALE PER LE VALUTAZIONI DEL SEMILAVORATO	59
3.9	ANALISI FISICO-CHIMICHE DEL SEMILAVORATO	61
3.9.1	pH, acidità titolabile (TA), contenuto in solidi solubili (SSC), attività dell'acqua (Aw) sostanza secca (s.s. %)	
3.9.2	Viscosità	
3.9.3	Colore	
3.10	ANALISI MICROBIOLOGICHE DEL SEMILAVORATO	63
3.10.1	Fasi preparatorie dei campioni	
3.10.2	Conte microbiche	
3.11	ANALISI NUTRACEUTICHE DEL SEMILAVORATO	65
3.11.1	Polifenoli totali	
3.11.2	Antociani totali	
3.12	FORMULAZIONE PER YOGURT COMMERCIALE	66
3.12.1	Analisi fisico-chimiche dei campioni di yogurt	
3.12.2	Analisi microbiologiche dei campioni di yogurt	
3.12.3	Analisi sensoriale dello yogurt formulato	
	<b>CAPITOLO 4 – RISULTATI E DISCUSSIONE (MATERIA PRIMA)</b>	<b>69</b>
4.1	SCELTA DELLE CULTIVAR DI ROSE DA INCLUDERE NELLO STUDIO	70
4.2	ANALISI ESEGUITE SULLE CULTIVAR DI ROSA	72
4.2.1	Contenuto in solidi solubili (SSC), pH, acidità titolabile (TA)	
1.	Rose Inglesi	
2.	Rose Coprisuolo	
3.	Rose Antiche	
4.	Confronto fra i 3 gruppi di rose	
4.2.2	Acidi organici	75
1.	Rose Inglesi	

	2.	Rose Coprisuolo	
	3.	Rose Antiche	
	4.	Confronto fra i 3 gruppi di rose	
4.2.3		Carboidrati solubili	78
	1.	Rose Inglesi	
	2.	Rose Coprisuolo	
	3.	Rose Antiche	
	4.	Confronto fra i 3 gruppi di rose	
4.2.4		Vitamina C totale	82
	1.	Rose Inglesi	
	2.	Rose Coprisuolo	
	3.	Rose Antiche	
	4.	Confronto fra i 3 gruppi di rose	
4.2.5		Polifenoli totali e test antiossidanti del DPPH e del sale di Fremy	85
	1.	Rose Inglesi	
	2.	Rose Coprisuolo	
	3.	Rose Antiche	
	4.	Confronto fra i 3 gruppi di rose	
4.3		ELABORAZIONE STATISTICA DELLE ANALISI CHIMICO-FISICHE E BIOCHIMICHE	94
	4.3.1	Analisi delle componenti principali (PCA)	
	4.3.2	Analisi discriminante	
	4.3.3	Considerazioni sui risultati della PCA e dell'analisi discriminante	
4.4		DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI CHIMICO-FISICHE	104
4.5		DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI BIOCHIMICHE	106
4.6		RISULTATI DELLE PROVE DI IDENTIFICAZIONE DI MOLECOLE BIO-ATTIVE	108
<b>5</b>		<b>CAPITOLO 5 – RISULTATI E DISCUSSIONE (SEMILAVORATO)</b>	<b>112</b>
5.1		SCELTA DELLE CULTIVAR DI ROSA DA UTILIZZARE PER LA PREPARAZIONE DEL SEMILAVORATO	113
5.2		PROFILO ANIOSSIDANTE DELLE CULTIVAR DI ROSA UTILIZZATE PER LA PREPARAZIONE DEL SEMILAVORATO	114
5.3		SCELTA DELLA QUANTITA' DI MATERIA PRIMA PER LA FORMULAZIONE DELLA MISCELA-BASE	116
5.4		SCELTA DEI METODI DI STABILIZZAZIONE	117
5.5		PARAMETRI QUALITATIVI TECNOLOGICI	118
5.6		ANALISI MICROBIOLOGICHE DURANTE LA <i>SHELF-LIFE</i>	122
5.7		ANALISI DEI CONTENUTI NUTRACEUTICI	124
5.8		FORMULAZIONE PER YOGURT BASE COMMERCIALE	127

5.8.1	Valutazioni chimico-fisiche	128
5.8.2	Analisi microbiologiche durante la <i>shelf-life</i>	129
5.9	ANALISI SENSORIALE DELLO YOGURT FORMULATO	132
5.10	DISCUSSIONE FINALE DEI RISULTATI	134
<b>CAPITOLO 6– CONCLUSIONI</b>		138
<b>CAPITOLO 7 – RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b>		142

## RIASSUNTO

Lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di indagare sull'idoneità all'impiego dei fiori in termini nutraceutici, tecnologici e di salubrità per la realizzazione di un nuovo ingrediente alimentare. Come modello dello studio, è stata scelta la specie floricola *Rosa sp.* i cui petali, noti per la loro ricchezza in principi attivi, sono da tempo utilizzati in ambiti sia fitoterapico sia gastronomico. Tuttavia, le informazioni scientifiche disponibili sulle proprietà chimico-nutrizionali e tecnologiche dei petali di rosa, sono attualmente frammentarie proprio per l'aspetto innovativo dell'impiego 'convenzionale' come ingrediente alimentare. Un significativo aspetto della ricerca ha riguardato le modalità produttive della materia prima la cui coltivazione è avvenuta in un ambiente naturale e protetto senza l'utilizzo di fitofarmaci e di concimi chimici. L'indagine scientifica ha preso origine dagli studi di caratterizzazione chimica di cultivar di rose coltivate biologicamente, valutate nel corso delle operazioni tecnologiche a cui si è fatto ricorso per la produzione di un 'intermedio' (semilavorato) da destinare a successivi utilizzi. Attualmente non esistono in letteratura studi riguardanti le proprietà chimiche e biochimiche di preparati, ottenuti dalla lavorazione di matrici floricole (e non dai loro estratti), utilizzabili in produzioni di largo consumo come i prodotti lattiero-caseari. L'obiettivo della presente ricerca è stato quello di formulare un ingrediente ai petali di rosa per un alimento-base come lo yogurt. La produzione dello yogurt, alimento di per sé funzionale, verrebbe in tal caso diversificata proprio grazie alla nuova formulazione, caratterizzata dalle sostanze bio-attive della matrice floricola. Pertanto si sono studiate e definite le relazioni esistenti tra il processo di trasformazione tecnologica dei petali di rosa in semilavorato, la composizione di fase di quest'ultimo e le caratteristiche chimiche, microbiologiche e funzionali del nuovo ingrediente così ottenuto. Sono stati messi a punto una serie di protocolli analitici per la valutazione dei parametri chimico-nutrizionali sulla materia prima (contenuto in carboidrati solubili e in acidi organici) e dei contenuti nutraceutici. Tali contenuti sono stati analizzati sia in termini di singole molecole o di gruppi di composti antiossidanti (vitamina C, contenuto in polifenoli e antociani totali), sia in termini di attività antiradicalica espressa come potere *scavenger* di una molecola rappresentativa del *pool* antiossidante appartenente al substrato vegetale, mediante opportuni saggi (test contro i radicali DPPH e Sale di Fremy). È stata successivamente studiata una 'ricetta' per la trasformazione dei petali di rosa di alcune delle cultivar testate, in miscela-base, modulando le formulazioni base-frutta sia come quantità della materia prima utilizzata sia relativamente all'adozione del protocollo termico di stabilizzazione. Sono state messe a punto le metodiche di estrazione dei composti bio-attivi (polifenoli e antociani totali) dalla miscela-base anche dopo trattamento termico. Sono stati pertanto misurati gli indici analitici per la valutazione dello stato di conservazione (parametri di processo e contenuti microbiologici durante la *shelf-life*) sia per l'ingrediente sia per lo yogurt formulato. Su tale prodotto sono stati poi eseguiti dei test d'assaggio di tipo descrittivo da parte di un *panel* addestrato in grado di valutare l'intensità di alcuni caratteristici parametri sensoriali del nuovo prodotto.

Alcune delle criticità relative allo svolgimento di questo lavoro sono sorte in relazione al reperimento di materia prima idonea in quanto, attualmente, non sono presenti in Italia roseti biologici. L'approvvigionamento delle cultivar di rose studiate è stato possibile grazie all'individuazione di siti di raccolta non convenzionali in cui la coltivazione delle rose avveniva secondo le modalità della conduzione biologica (roseto privato, parcelle sperimentali, ambiente naturale).

## SUMMARY

The aim of this PHD project was to study the suitability of flowers as nutraceutical, technological and healthy sources, in order to produce a new food ingredient.

A case study for the research, the *Rosa* botanical species was chosen, because the petals are rich in nutritional compounds and are normally used in gastronomical and phytotherapeutic field. However the scientific information about their chemical-nutritional and technological properties are, at the moment, fragmentary, in particular because the use of roses as food ingredients are very unconventional. For this reason we prefer to pinpoint the innovative characteristics of this study. A particular aspect of the study was related to the ways to produce and obtain raw material. The roses were cultivated in a protected, natural and chemical, phytochemical free environment. The organic cultivation of flowers for nutritional use, could encourage a new kind of vegetable production in a sector where, normally, the use of pesticides is absolutely necessary.

The first scientific step of the study was the chemical characterization of the organically grown roses varieties both as raw material and during processing, in order to obtain an ingredient suitable for several destinations. In this case, there is also a lack of scientific literature regarding chemical and biochemical properties of ingredients, or final products, obtained directly from floricultural matrix (not from flower extracts or by-products).

One of the targets of this research was to realize a formulation of an ingredient, rose petal based, for basic food like yogurt, that is in itself considered a functional food.

The floricultural matrix could offer interesting opportunities not only for garden nurseries or organic flower producers, but also in order to diversify the yogurt production. In this case, in fact, the dairy makers could combine the benefits of the bio-active compound of the flowers with the well known beneficial contribution of the yogurt. The relationship between technological processing of the petals, their phase composition and chemical, microbiological, functional characteristics of the new ingredient, were studied. In particular, for raw material quality evaluation, specific analytical protocols were established, in order to determine chemical-nutritional and nutraceutical parameters,

Nutraceutical composition of the flowers was focused both in terms of specific molecules or antioxidant compound groups such as: ascorbic acid, polyphenols, total anthocyanins and also in terms of antiradical activity, expressed as *scavenger* effect. DPPH and Fremy' salt, methods, were the most representative analytical ways used for these determinations.

The correct composition of vegetable ingredient (rose petals), in the model mixture under study, was accurately calculate and tested in various attempts. Then this innovative formulation was stabilized microbiologically by applying a specific and targeted thermal treatment. The same analysis carried out on raw material (extraction and characterization of the bio-active compounds), were carried out before and after thermal treatment to evaluating base-flowers-mixture. The analytical indices (including microbial analysis) above described and targeted sensory evaluation test, were also organized for the prepared flower yogurt. In particular, sensorial analysis was carried out following descriptive methods. The trained panel was asked to evaluate intensity of the "new product" typical parameters, such as, color, perfume, flavor, texture, etc.

A critical aspect of the research was the difficulty to obtain and receive suitable raw material. In fact, at the moment the organic cultivation of flowers (specially organic roses destined for nutrition) doesn't exist in Italy. Only through a special network of information (web site, etc) was it possible to find a flower producer, working organically. Other samples of organic roses were available from private collectors and agricultural research institutes involved in flower cultivation.

## RINGRAZIAMENTI

La ricerca, per questa tesi di dottorato, è stata finanziata dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali ed è stata svolta presso l'Unità di Ricerca per i processi dell'industria agro-alimentare di Milano afferente al Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura (CRA-IAA), in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Farmacologiche di Milano (Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Milano). L'interdisciplinarietà dello studio ha reso necessaria la collaborazione con la sezione di Microbiologia del Centro di Ricerca per le produzioni foraggere e lattiero casearie di Lodi (CRA-FLC).

Ringrazio sentitamente il **Dre Maestrelli**, primo ricercatore del CRA-IAA, per il suo rigore, la curiosità scientifica e la fattiva collaborazione nel coordinare questa ricerca ma soprattutto per il corredo di incoraggiamenti forniti nell'arco del triennio.

Ringrazio la **Prof.ssa Restani** (Dipartimento di Scienze Farmacologiche di Milano) per la sua disponibilità durante gli incontri di revisione e per avere contribuito in termini organizzativi al compimento della ricerca. Ringrazio la Dott.ssa Chiara Di Lorenzo, dottoranda a Scienze Farmacologiche, per la collaborazione durante l'esecuzione delle analisi biochimiche

Ringrazio il **Dre Carminati**, ricercatore del CRA-FLC, per la preziosa collaborazione concessa per le analisi di microbiologia e per gli utilissimi dettagli forniti durante i resoconti.

Ringrazio il **Dre Lo Scalzo**, ricercatore del CRA-IAA, per la sua disponibilità riguardo l'impostazione metodologica delle analisi chimiche e biochimiche.

Ringrazio la **Dott.ssa Rizzolo**, ricercatrice del CRA-IAA, per avere condiviso con grande interesse alcune parti della ricerca e per la collaborazione durante l'elaborazione statistica dei dati.

Ringrazio il **Dre Giangiacomo** e la **Dott.ssa Torreggiani**, per la disponibilità in fase di stesura e di organizzazione del progetto di dottorato

Ringrazio la **Dott.ssa Cattaneo**, direttore del CRA-IAA, per aver mostrato interesse verso questa nuova tematica e per avere revisionato alcune parti della tesi

Ringrazio **Gianni Bertolo**, collaboratore tecnico del CRA-IAA per la disponibilità mostrata durante le delicate fasi di trasformazione della materia prima e per avere contribuito all'esecuzione di alcune analisi di laboratorio

Ringrazio le mie care colleghe del CRA-IAA: la Dott.ssa **Alexa Avitabile Leva** per i chiarimenti forniti durante i primi approcci alla tematica della presente ricerca; la Dott.ssa **Giovanna Cortellino**, ricercatrice del CRA-IAA, per la condivisione riguardo alcuni argomenti di pertinenza tecnologica; la Dott.ssa **Marta Fibiani** per la disponibilità e la curiosità mostrate durante tutte le discussioni tecniche e scientifiche inerenti questa tesi; la Dott.ssa **Maristella Vanoli**, compagna di viaggio, per la sua preziosa disponibilità e per i consigli forniti nel corso dei tre anni; la **Dott.ssa Serena Gobbi**, per avere contribuito, in termini organizzativi, al compimento delle analisi presso il CRA-FLC di Lodi

Ringrazio i miei cari colleghi del CRA-IAA: **Fabio Lovati**, prezioso collaboratore tecnico, per la sua puntuale disponibilità, per l'aiuto fornito durante l'esecuzione dei test sensoriali e per il grande supporto durante gli assemblamenti informatici; **Maurizio Grassi** per la collaborazione fornita durante l'elaborazione statistica dei dati delle analisi sensoriali e per l'esecuzione delle analisi colorimetriche.

Ringrazio le tirocinanti **Erika Guido** e **Debora Cilia** per aver condiviso la tematica di questa ricerca

Ringrazio la **Sig.ra Moro**, proprietaria del roseto di Cascina Brogginia, per aver contribuito con molta disponibilità alla fornitura e allo stoccaggio delle Rose Inglesi nel corso dei tre anni della ricerca.

Ringrazio il Sig.re **Roberto Viti**, proprietario del Giardino Museo delle Rose antiche in Serramazzone (Modena) per la disponibilità e l'ospitalità durante i campionamenti.

Un sincero grazie alla mia famiglia: ai miei genitori (senza il loro grande aiuto non sarei mai riuscita a raggiungere i miei obiettivi), a mio marito (comprensivo e paziente), ai miei due cari bimbi Riccardo ed Elena

---

***CAPITOLO 1***  
***INTRODUZIONE***

---



## **1.1 FARMACI-ALIMENTI-SALUTE**

Il cibo ha condizionato la vita e la salute dell'uomo sin dalle sue origini. Infatti, il rapporto tra alimentazione e salute ha una lunga storia nel corso della quale, spesso, alcuni alimenti venivano assimilati a dei veri e propri farmaci. Nell'antichità, la medicina moralistica ippocratico-galenica, utilizzava sapientemente la dietetica come strumento di cura: l'assunzione di cibi ristoratori e di vini medicinali era uno dei pochi strumenti che il medico aveva a disposizione per curare le malattie. In epoca medioevale, l'alimentazione era considerata uno dei sei elementi fondamentali in grado di agire sullo stato di salute. In tempi più vicini, il rapporto tra alimentazione e salute ha assunto un valore crescente: nell'Ottocento la scoperta del valore nutrizionale degli alimenti e nel Novecento la constatazione dell'importanza delle vitamine poneva nuovi rapporti tra cibo e farmaco. Oggi infine, i moderni precetti dietetici sono alla base della prevenzione di molte patologie. Il cibo diventa sempre più un elemento importante per la salute, così come importante per superare le malattie è il farmaco. Come i farmaci, gli alimenti, una volta ingeriti, non devono arrecare 'danni collaterali' all'organismo che li ha assunti per svolgere un'adeguata funzione alimentare, o meglio, per essere utili ai fini salutari, dovrebbero svolgere un'azione protettiva nei confronti dell'organismo stesso (Sironi V.A., 2009).

E' ormai ampiamente noto che il danno ossidativo che quotidianamente colpisce le cellule sia a livello di DNA sia di altre macromolecole, può portare ad altre malattie degenerative, come il cancro e le disfunzioni cardiovascolari (Block *et al.*, 1994). La valutazione epidemiologica degli antiossidanti contenuti negli alimenti è, attualmente, fonte di continuo dibattito nella comunità scientifica a causa dei risultati, a volte contraddittori, che sono scaturiti nel corso degli anni da studi diversi. Gli studi di tal genere condotti negli ultimi decenni, sulle abitudini alimentari, hanno evidenziato come gli alimenti ricchi di sostanze antiossidanti, sono il più importante fattore di protezione contro le patologie cronico-degenerative (Tavani e La Vecchia, 1999; WCRF, 2007) mentre l'effetto dei singoli antiossidanti (o della capacità antiossidante totale della dieta) non è stato ancora confermato definitivamente (Agudo *et al.*, 2007; La Vecchia e Bosetti, 2007). La via preferibile di introduzione degli antiossidanti è quella che sfrutta la fonte naturale, cioè con gli alimenti. Anche nelle raccomandazioni scaturite dall'analisi dei maggiori studi su dieta e tumori è stato messo l'accento, sull'importanza in termini di prevenzione, non di un singolo componente alimentare ma di un equilibrio dietetico complessivo, che si traduce, nello specifico, nell'indicazione a consumare gli alimenti ricchi in antiossidanti. Tutto ciò è ampiamente correlato anche, allo sviluppo di nuovi prodotti e/o ingredienti funzionali.

## **1.2 ALIMENTI FUNZIONALI E NOVEL FOOD**

Il concetto di alimento funzionale ebbe origine in Giappone intorno agli anni Ottanta; successivamente, nel 1991, tali alimenti vennero definiti con l'acronimo FOSHU, *Foods for Specified Health Use*, delineando così, cibi aventi proprietà benefiche sulla salute umana per la presenza di particolari elementi benefici o perché privati di costituenti allergenici. In seguito, nel 2002, l'*International Life Sciences Institute* (ILSI), definì "funzionali" gli alimenti aventi la capacità di influire positivamente su una o più funzioni fisiologiche, contribuendo a preservare o migliorare lo stato di salute e di benessere e a ridurre il rischio di insorgenza di malattia (Wildman R.E.C. *et al.*, 2007). La tabella 1 riporta alcune definizioni di "alimento funzionale" nei diversi Paesi.

**Tabella 1: Definizione di alimento funzionale nei diversi Paesi (Jones et al., 2008).**

<b>Paesi</b>	<b>Definizione</b>
Canada (Health Canada)	Componenti degli alimenti che conferiscono dimostrati benefici per la salute o riducono il rischio di patologie croniche, al di là del loro ruolo nutrizionale di base. L'alimento funzionale è simile all'alimento convenzionale ed i componenti bioattivi sono naturalmente presenti nell'alimento.
USA (Institute of Food Technology)	Alimenti e componenti degli alimenti che forniscono un beneficio per la salute al di sopra ed oltre quello fornito dalla comune nutrizione. Forniscono nutrienti essenziali in quantità superiori a quelle necessarie per il normale mantenimento, crescita e sviluppo, ed altri componenti bioattivi che concorrono ad un risultato positivo per la salute dell'uomo.
Giappone (Japanese Department of Health)	Alimenti che, basandosi sulle conoscenze scientifiche della relazione tra nutrizione e salute, evidenziano effetti benefici. A questi alimenti è concesso di essere commercializzati con specifiche indicazioni salutistiche (claims) rivolte a gruppi di popolazione.
Australia (National Center of Excellence in Functional Food)	Alimenti che incontrano le esigenze del consumatore nel segmento salute, e sono in grado di prevenire o coadiuvare condizioni di salute compromesse.
Unione Europea (European Commission, Health Consumer Protection)	Alimenti di cui è stata dimostrata la capacità di interagire positivamente con una o più funzioni bersaglio nell'organismo, con effetto superiore a quello della normale nutrizione, in modo da ottenere un significativo miglioramento dello stato di salute e benessere e/o una diminuzione di rischio di contrarre patologie croniche.

Un alimento per essere definito "funzionale" deve possedere alcuni requisiti essenziali quali:

- 1) la sicurezza e la base scientifica dell'effetto salutistico esplicito,
- 2) l'aspetto, l'odore e il sapore devono essere simili a quelli degli alimenti tradizionali,
- 3) non devono presentarsi sottoforma farmaceutica.

Si tratta quindi di alimenti veri e propri, in grado di mostrare la loro efficacia nel contesto dell'abituale alimentazione giornaliera.

Un alimento funzionale può essere:

- 1) un alimento naturale,
- 2) un alimento in cui è stato aggiunto modificato o eliminato uno o più componenti con mezzi tecnologici o biotecnologici,
- 3) un alimento in cui è stata modificata la natura o la biodisponibilità di uno o più elementi,
- 4) un *novel food*.

Il "Regolamento CE n°258/97 del Parlamento europeo e del Consiglio del 27 gennaio 1997" (G.U., 1997), definisce i *novel food* come "alimenti o ingredienti che non sono stati utilizzati in misura significativa nell'alimentazione umana all'interno della Comunità Europea prima del 15 maggio 1997". Inoltre, tale Regolamento ha lo scopo di assicurare la tutela della salute umana.

I *novel food* proposti dalle aziende devono essere sottoposti a una verifica di sicurezza prima di essere commercializzati e solo quelli che superano la valutazione tossicologica vengono autorizzati alla vendita. Per semplificare l'iter descritto, le aziende possono richiedere semplicemente una notifica (Hasler C.M., 2005), ma solo se i prodotti a livello nazionale sono considerati sostanzialmente equivalenti ad alimenti ed ingredienti già esistenti per quanto concerne la composizione chimica, il valore nutrizionale, il metabolismo, l'impiego e il livello di sostanze indesiderabili contenute.

Gli alimenti funzionali attualmente disponibili sul mercato alimentare sono numerosi; tra questi vi sono: i probiotici, i prebiotici e i simbiotici.

1) I probiotici, come yogurt e latti fermentati, sono prodotti in cui sono presenti microrganismi vivi, solitamente lattobacilli o bifidobatteri, in grado, una volta ingeriti in adeguate quantità, di raggiungere l'intestino, moltiplicarsi ed esercitare un'azione di equilibrio sulla microflora intestinale (FAO/WHO Expert Consultation, 2001).

2) Gli alimenti prebiotici, invece, si trovano sia sottoforma di yogurt e latti fermentati sia come prodotti da forno e la loro azione è dovuta alla fibra alimentare, ingrediente alimentare non digeribile, che stimola selettivamente la crescita o l'attività di uno o più batteri presenti nel tratto intestinale permettendo di riequilibrare la flora batterica.

3) Gli alimenti simbiotici sono definiti tali quando contengono nella loro formulazione sia la componente probiotica, sia quella prebiotica.

Altre classi di alimenti funzionali sono:

- 4) i latti delattosati destinati a soggetti affetti da intolleranza al lattosio
- 5) i peptidi bioattivi, costituiti da derivati delle proteine del latte vaccino, in grado di esplicare diverse funzioni tra cui anti-microbica, anti-ipertensiva, antiossidante e "carrier" di minerali, agendo sul sistema cardiovascolare, nervoso, immunitario e gastrointestinale (Andreoli A. *et al.*, 2008).

### **1.3 PIANTE PER NUOVI ALIMENTI NUTRACEUTICI**

In tempi recenti nasce il concetto della presenza, negli alimenti di normale consumo, di componenti che non rientrano nella categoria dei cosiddetti ‘nutrienti’ classici. La parola ‘nutraceutico’ deriva da una fusione dei termini ‘nutrizionale’ e ‘farmaceutico’ e viene oggi utilizzata per indicare alimenti, o componenti di alimenti, che forniscono importanti benefici per la salute dell’uomo, non solo in termini conservativi, ma soprattutto preventivi. I prodotti nutraceutici rappresentano quindi una delle nuove frontiere della nutrizione, in quanto ad essi si può ascrivere un valore aggiunto dell’alimento per la prevenzione della salute, che, in virtù di tale plus valore, può essere considerato un vero e proprio farma-alimento.

Alla categoria di alimenti funzionali, come già anticipato nel precedente paragrafo (1.2), appartiene anche un sottogruppo di alimenti detti ‘probiotici’, che apportano effetti benefici in quanto contengono batteri probiotici. Il termine ‘probiotici’ fu coniato agli inizi del ‘900 dal premio Nobel Ilya Ilyich Machnikov che per primo sottolineò l’effetto benefico dei batteri lattici, citandone, a supporto, la longevità delle popolazioni caucasiche e bulgariche che, notoriamente, consumano elevate quantità di prodotti fermentati quali lo yogurt. E’ importante ricordare che la maggior parte dei ceppi batterici, con una dimostrata efficacia probiotica, appartiene ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Hrelia *et al.*, 2009).

In generale, lo yogurt, anche quello non addizionato di specifici ceppi probiotici, è di per sé ritenuto un alimento adatto alla dieta giornaliera per il suo contenuto in sali minerali (calcio), vitamine del gruppo B e proteine facilmente assimilabili grazie alla presenza di fermenti lattici attivi. L’immagine dello yogurt, in Italia, è quella di alimento con elevate proprietà salutistiche e dietetiche complemento ideale di una alimentazione sana e leggera. Nel recente passato il settore dello yogurt si è sviluppato a ritmi sostenuti, favorito dalla destrutturazione dei pasti, dalla riduzione del tempo dedicato alla prima colazione, dall’emergere di una cultura alimentare che apprezza il ridotto contenuto calorico e le proprietà salutistiche del prodotto. Il consumatore tipico di yogurt si caratterizza per una scarsa fidelizzazione verso le singole marche ed una elevata propensione alle innovazioni di prodotto. L’ampliamento della gamma e la proposta di gusti sempre nuovi, svolgono un ruolo fondamentale in una merceologia distributiva del prodotto yogurt caratterizzata da una continua ricerca di novità. Storicamente sono state premiate le politiche di prodotto attuate dai *competitor* che si sono rivolti a mercati di nicchia (prodotti biologici), o che hanno sviluppato caratteristiche qualitative o di immagine altamente differenziate. Nella produzione degli yogurt, inoltre, è sempre più privilegiata la valenza dietetico-nutrizionale in termini di funzione d’uso che indirizza i consumatori all’acquisto di yogurt naturali, magri o arricchiti di preparazioni base-frutta, tal quale o zuccherina. In tal caso, infatti, è associabile anche una valenza di tipo sensoriale, in quanto, il gusto acido caratteristico dello yogurt, può venire leggermente moderato con l’aggiunta di preparati, essenze di frutta o altre sostanze, che non possono però superare il 30%. A tale proposito, a livello di ricerca scientifica, il recente impiego di matrici frutticole o floricole non convenzionali, nella preparazione degli yogurt, ha come obiettivo principale il miglioramento della valenza edonistica come nel caso degli studi riguardanti l’aggiunta di estratti di fiori di ibisco (Iwalokun e Shittu, 2007) o dei frutti di rosa canina (Dayisoğlu, 2005) in cui sono stati evidenziati gli effetti dell’aggiunta sulle proprietà sensoriali dello yogurt. In un altro lavoro sono stati studiati gli effetti dell’aggiunta di mirtilli allo yogurt in termini di conservabilità del prodotto e di

sicurezza microbiologica (Penney, 2004). Per ciò che riguarda l'aumento di valore aggiunto, in termini salutistici, di alimenti come i lattici fermentati, in un recente lavoro, sono stati evidenziati i mutamenti delle caratteristiche fisico-chimiche e dell'attività antiossidante in yogurt addizionati di *Hylocereus polyrhizus* e *Hylocereus undatus* (frutto bianco e rosso della pianta Pitaya della famiglia delle *Cactaceae*). I frutti di questa pianta tropicale sono noti per le loro elevate proprietà nutrizionali (Zainoldin e Baba, 2009). In questo studio, infatti, sono stati evidenziati gli effetti dell'aggiunta per il 10%-20%-30% (v/v) dei frutti di Pitaya durante la preparazione dello yogurt, sul contenuto in polifenoli totali e sulla risposta antiradicalica (test DPPH) del prodotto ottenuto. Negli yogurt formulati con frutti di Pitaya, rispetto allo yogurt di controllo non arricchito, è stato riscontrato un aumento dei fenoli e polifenoli e quindi un incremento di attività antiossidante deputato ai composti bio-attivi caratteristici della matrice vegetale considerata.

In un recente lavoro, sono stati considerati gli effetti dell'aggiunta di estratti di piante coltivate in Sardegna (*Cynara scolymus* L., *Arbutus unedo* L. e *Prunus avium* L.), in yogurt prodotti artigianalmente. In particolare, sono state valutate le proprietà fisico-chimiche, microbiologiche e l'attività antiossidante degli yogurt arricchiti di tali estratti vegetali. Lo studio ha dimostrato che l'aggiunta può significativamente migliorare le proprietà salutistiche del prodotto sia in termini di attività antiossidante sia in termini di sopravvivenza della flora microbica (Cossu *et al.*, 2009).

Attualmente non esistono in letteratura studi riguardanti le proprietà chimiche e biochimiche di preparati, ottenuti dalla lavorazione di matrici floricole (e non dai loro estratti), utilizzabili in prodotti lattiero-caseari di largo consumo. Attualmente, si osserva invece, la commercializzazione di altri prodotti (bevande, succhi, acqua aromatizzata), arricchiti di estratti ai fiori d'arancio, di ibisco, di loto, di gelsomino e di viola, e la motivazione dell'integrazione di tali estratti nelle varie formulazioni, riguarda principalmente le caratteristiche sensoriali anziché quelle funzionali. La propensione al loro consumo, però, indica un apprezzamento da parte del consumatore verso questi prodotti, e ciò potrebbe portare all'inclusione di cibi a base di fiori nella razione alimentare travalicando il significato di "curiosità" destinato a ricoprire solo un ruolo "di moda" o "di nicchia". Le conoscenze attuali sulle proprietà salutistiche dei fiori, già convenzionalmente utilizzati come alimento (Que F. *et al.*, 2007), potrebbero anche delineare un nuovo modello di consumo dei fiori che tenga conto non solo delle loro proprietà edonistiche come aspetto, colore, aroma e profumo ma anche dei contenuti nutraceutici (Calabretto A. *et al.*, 2004).

## 1.4 FIORI COME ALIMENTO

Nel corso dei secoli, i fiori hanno sempre rappresentato una parte importante nelle gastronomie delle varie culture come la cucina cinese che ha incluso crisantemi, gigli e fiori di loto a partire da oltre sei secoli, o gli antichi romani che utilizzavano rose e violette per profumare e insaporire le pietanze servite nei banchetti importanti. Attualmente in Italia si utilizzano i girasoli per ricavarne l'olio, i fiori di zucca nelle minestre e nei risotti, i fiori di zuccina e di acacia in pastella, in Corea si cucinano dolci fritti coperti con petali di azalea e in Giappone i fiori di ravizzone vengono solitamente usati nelle insalate e nelle minestre (Corea, impiego dei fiori in cucina). Lo zafferano, ottenuto dagli stammi dell'omonimo fiore, è comunemente utilizzato per risotti e piatti esotici come il cous cous; la vaniglia, ricavata dai baccelli di un'orchidea originaria del Messico, è solitamente impiegata per aromatizzare dolci, specialmente torte, così come l'estratto dei fiori d'arancio; infine un utilizzo ancora più diffuso è quello delle tisane come camomilla e malva.



*Praline alla rosa*



*Insalata con violette e lavanda*

Negli ultimi anni si è considerata con nuove prospettive la "riscoperta" della flora spontanea e dei fiori come ingredienti per la ristorazione classificata come "creativa". Grazie alle loro qualità estetiche ed aromatiche, i fiori possono essere utilizzati sia per insaporire insalate fredde, bevande o zuppe, sia per decorare dolci; in questo contesto vengono impiegati soprattutto i petali di rosa e di calendula, i fiori di violetta, di pesco, d'arancio e di susino. Inoltre piccoli fiori e petali possono essere caramellati e serviti come dolci: rinomate sono le violette candite prodotte tradizionalmente a Borgo San Dalmazzo, in Piemonte, attraverso tecniche consolidate nel tempo e in

base agli usi locali. Molto frequente è poi l'impiego di fiori diversi per guarnire crostini salati o per decorare dolci a base di frutta.



*Dolci a base di frutta e fiori*



*Crostini salati*

La rosa, invece, viene impiegata soprattutto nella produzione del rosolio, un liquore derivato dai petali di questo fiore, di cui il Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali ha concesso alla regione Piemonte il riconoscimento tra i prodotti agroalimentari tradizionali italiani (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, 2009). Inoltre a livello artigianale la rosa viene utilizzata per la preparazione di confetture, sciroppi, gelati, crostate, frittate e aperitivi; mentre ricette più elaborate sono illustrate in testi di gastronomia come l'italiano "Cucinare con i fiori" (Marenghi L., 2003) e il francese "Jardins de fleurs" (Lambert A. *et al.*, 2001), o sono disponibili direttamente dai ristoranti più ricercati, come il risotto alle rose e le quaglie ai petali di rosa.



*Rosolio*

L'uso dei fiori di garofano (disidratati) (*Dianthus L.*), sembra per il momento circoscritto alla preparazione di tisane o infusi, ma, considerato, il loro contenuto in pigmenti (Onozaki *et al.*, 1999), possono essere serviti anche freschi abbinati a cereali nella guarnizione di gelati o yogurt. Per le caratteristiche aromatiche peculiari, i fiori di garofano, possono essere anche impiegati nella preparazione di primi piatti particolarmente appetitosi. I fiori di calendula, infine, già citati, possono essere associati anche a prodotti da forno a base di yogurt (plumcake).



*Coppa di yogurt con fiori di garofano*



*Tagliatelle con pancetta e fiori di garofano*



*Plumcake con fiori di calendula*

Tali impieghi dimostrano che il consumatore manifesta una buona propensione al consumo di fiori. A questo proposito, in uno specifico studio (Kelley K.M. *et al.*, 2001), sono stati condotti alcuni test per stimare le percezioni sia dei consumatori sia degli chef riguardo tre specie di fiori: la *Viola tricolor*, il *Borago officinalis*, e il *Tropaeolum majus* quantificando in particolare gli attributi gusto, fragranza e impatto visivo. I risultati dello studio dimostrano come i consumatori e gli chef abbiano espresso giudizi positivi per le tre specie di fiori saggiate.

## **1.5 ASPETTI SALUTISTICI DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE**

Studi epidemiologici hanno accertato che diete ricche di alimenti di origine vegetale contribuiscono a ridurre i fattori di rischio dell'insorgenza di molte patologie, quali malattie cardiovascolari, malattie metaboliche, malattie neurovegetative e patologie infiammatorie (Carratù B., *et al.*, 2005). Le piante, infatti, sono ricche di composti fitochimici aventi attività benefica sulla salute umana. Le molecole antiossidanti sono indispensabili per l'organismo in quanto contrastano gli effetti delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Quest'ultime si formano in quanto l'ossigeno, potendo accettare singoli elettroni, forma derivati instabili caratterizzati da un'alta reattività, come il radicale superossido ( $O_2^-$ ), il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), il radicale ossidrilico ( $\bullet OH$ ) e l'ossigeno singoletto ( $^1O_2$ ). Le conseguenze principali del danno da loro apportato sono l'inattivazione di enzimi, la depolimerizzazione di polisaccaridi, la rottura del DNA, la distruzione delle membrane e la perossidazione lipidica; inoltre sono state correlate a numerose malattie quali lo sviluppo di tumori, l'infarto del miocardio e a malattie neurologiche come il morbo di Parkinson e il morbo di Alzheimer (McKee *et al.*, 2006).

Gli organi floreali delle piante, oltre agli antiossidanti, contengono gli zuccheri. Tali molecole sono i principali costituenti della sostanza secca degli alimenti di origine vegetale e sono indispensabili in quanto rappresentano da sempre la fonte più abbondante ed importante di energia per l'uomo. Per il ruolo primario nel metabolismo energetico, nella sintesi degli acidi nucleici, dei glicolipidi, delle glicoproteine, ecc., essi devono rappresentare nel lattante almeno il 40% delle calorie totali della dieta, nel divezzo circa il 50% e nell'adulto il 55-60%. Tale apporto è indispensabile anche per soddisfare i bisogni energetici del cervello e dei globuli rossi, che richiedono nell'adulto circa 180g di glucosio al giorno. Un equilibrato apporto di carboidrati è pertanto estremamente importante nell'età evolutiva; se l'apporto calorico non eccede i fabbisogni stabiliti per l'età del soggetto, si incorre più raramente in patologie quali l'obesità, il diabete e, in età successive, a malattie degenerative. Non si deve inoltre dimenticare, che i carboidrati determinano un incremento dei valori glicemici in modo differente (Caramia G. *et al.*, 2001) (tabella 2), infatti, i glucidi di interesse alimentare possono essere distinti, in base alla struttura chimica, in semplici e complessi, quest'ultimi sono da preferire rispetto ai primi in quanto determinano un incremento glicemico graduale e distribuito nel tempo. I carboidrati semplici comprendono i monosaccaridi, quali glucosio e fruttosio e i disaccaridi, quali saccarosio, maltosio e lattosio, contenuti in numerosi alimenti primari tra cui il latte, la frutta e i vegetali.

I carboidrati complessi, o polisaccaridi, comprendono, l'amido e la fibra alimentare; il primo è costituito da polimeri di glucosio lineare (amilosio) e ramificati (amilopectina) in proporzioni variabili e nella dieta di un soggetto adulto rappresenta la principale fonte di carboidrati utilizzabili successivamente dal metabolismo cellulare. La fibra alimentare, è una componente degli alimenti di origine vegetale, in particolare degli ortaggi, in quanto costituente della parete cellulare; è priva di interesse nutrizionale diretto ma è in grado di esibire differenti proprietà chimico-fisiche in relazione alla sua origine e tali proprietà possono essere correlate ad un ampio *range* di risposte fisiologiche.



**Tabella 2 Indice glicemico e potere edulcorante degli zuccheri semplici**

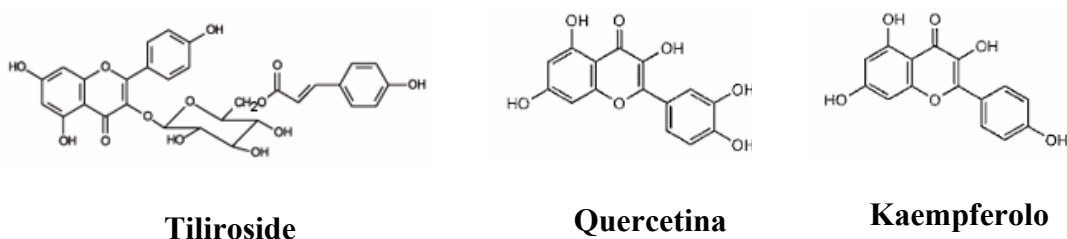
<b>Zucchero</b>	<b>Indice glicemico<sup>a</sup></b>	<b>Potere edulcorante</b>
Maltosio	152	0,50
Glucosio	138	0,74
Saccarosio	83	1
Lattosio	57	0,30
Fruttosio	26	1,50

<sup>a</sup> rispetto al pane bianco posto uguale a 100

La fibra alimentare è un importante componente della dieta umana, in quanto esercita effetti di tipo funzionale e metabolico: oltre all'aumento del senso di sazietà e al miglioramento della funzionalità intestinale e dei disturbi ad essa associati, l'introduzione di fibra con gli alimenti è stata messa in relazione alla riduzione del rischio di importanti malattie cronic-degenerative. In particolare, esistono molteplici evidenze scientifiche (Cabras P. *et al.*, 2004) che correlano il minor tempo di transito dei residui fecali con una diminuzione dell'incidenza dei tumori al colon e delle malattie cardiovascolari. Inoltre, è in grado di rallentare l'assorbimento dei carboidrati diluendoli nel tempo e riducendo conseguentemente il picco iperglicemico che si verifica nel periodo post-prandiale, e incrementare l'assorbimento di ioni metallici quali calcio e magnesio. Il fabbisogno giornaliero stabilito dai LARN (Livelli giornalieri di Assunzione Raccomandata di Nutrienti) è di 30 g al giorno (Società Italiana di Nutrizione Umana, 2010).

### **1.5.1 Antiossidanti**

Gli antiossidanti presenti negli alimenti di origine vegetale, comprendono: i polifenoli, composti ubiquitari che contribuiscono alla pigmentazione e alle caratteristiche sensoriali; i glucosinolati, composti presenti soprattutto nelle *Brassicaceae* (cavolfiori, cavoletti di Bruxelles e broccoli), la cui assunzione è stata correlata alla riduzione del rischio di contrarre tumori (Carratù B. *et al.*, 2005); e i carotenoidi, una classe di molecole presente soprattutto in alimenti di colore giallo-arancio come carote, pomodori, peperoni, zucche, ma anche prezzemolo, spinaci e bietole. Tra gli antiossidanti, i polifenoli comprendono sostanze aventi struttura chimica comune, sono dei derivati del benzene con uno o più gruppi idrossilici associati all'anello. Studi scientifici hanno dimostrato che tra i fiori, quelli della rosa sono particolarmente ricchi di polifenoli (Tateyama C. *et al.*, 1997). Da alcuni studi è emerso che vi è una correlazione tra lo stadio di sviluppo delle rose e la concentrazione di polifenoli presenti (Youwei Z. *et al.*, 2007); inoltre, l'attività antiossidante di questo fiore è correlata alle significative quantità di antocianidine, molecole appartenenti al sottogruppo dei flavonoidi. Questi ultimi sono prodotti naturali, formati da due anelli aromatici uniti da un ponte a tre atomi di carbonio (Maffei M., 1998). Oltre alle loro importanti funzioni fisiologiche legate alle strategie riproduttive dei fiori, i flavonoidi impartiscono il colore a fiori e frutti, e possiedono proprietà biochimiche di interesse funzionale in ambito nutrizionale e terapeutico, in quanto svolgono un ruolo importante nella cardioprotezione e nella neuroprotezione. Esistono sei classi principali di flavonoidi: i calconi, i flavanoni, i flavoni, i flavonoli, le antocianidine, e gli isoflavoni. In particolare, alle antocianidine appartengono pigmenti idrosolubili rosso-violacei presenti nei vegetali del medesimo gruppo cromatico, come la tiliroside, il kaempferolo e la quercetina, riscontrabili anche nelle rose (Gawron-Gzella A. *et al.*, 2007). Queste molecole sono molto importanti in quanto nel nostro organismo possono svolgere un ruolo protettivo nei confronti dell'ossidazione delle LDL (lipoproteine a bassa densità), inoltre possono costituire una salvaguardia contro eventuali alterazioni a carico del DNA ed eliminare i radicali ossidrilici (Capasso F. *et al.*, 2000).



**Figura 4** Struttura chimica delle antocianidine tiliroside, quercetina e kaempferolo

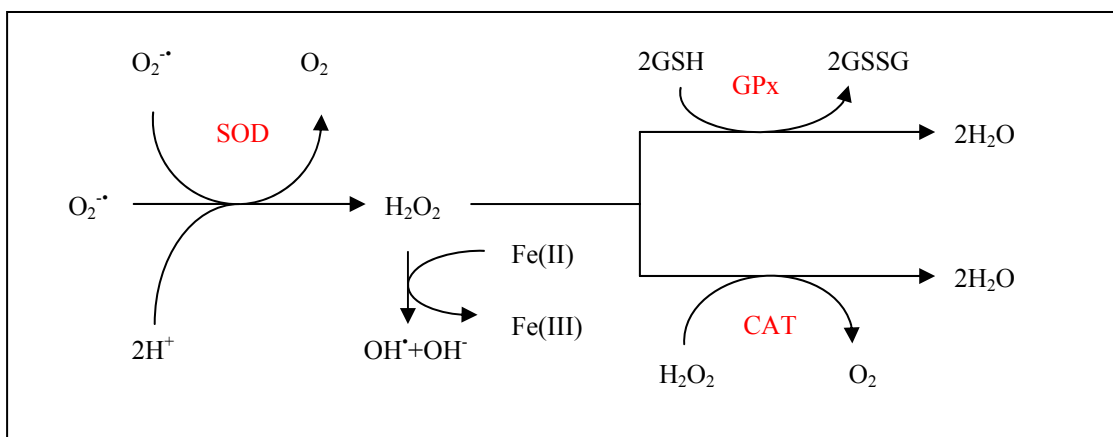
A seguito di un recente studio condotto nel 2004 (Ng T.B. *et al.*, 2004), si è potuta collegare l'attività antiossidante dell'estratto acquoso di petali di rosa con la presenza di composti fenolici identificati come derivati dell'acido gallico.

In un ulteriore studio (Vinokur Y. *et al.*, 2006), sono state valutate le proprietà salutistiche di dodici cultivar di rose che potrebbero essere potenzialmente destinate nella preparazione di infusi, data la loro gradevolezza sia nel gusto sia nella *texture*. Gli infusi sono stati preparati utilizzando 100 mg di petali di rosa in 10 mL di acqua a 85°C, miscelando ogni 5 minuti e variando i tempi di infusione da 1 a 30 minuti. Quindi il filtrato è stato utilizzato per la determinazione dell'attività antiossidante, per i contenuti dei polifenoli totali, di acido gallico e di antocianine. Da questo studio è emerso che i petali di rosa mostrano un'attività antiossidante comparabile a quella del tè verde e del tè nero noti per le loro proprietà salutistiche antiossidanti. Il contenuto di polifenoli totali è positivamente correlato con l'attività antiossidante, risultata uguale o superiore a quella del tè verde. Per quanto riguarda il contenuto di acido gallico nei diversi infusi di rosa, alcune cultivar hanno mostrato valori pari al 35-55% dei polifenoli totali. Le antocianine, essendo correlate al colore dei petali, sono state rilevate in quantità crescenti nelle cultivar tendenti al rosso, e nonostante la variabilità delle concentrazioni riscontrate per ciascuna varietà, il loro contenuto è risultato comunque superiore rispetto a quello del tè verde.

Un interessante studio (Ng T.B. *et al.*, 2005), ha mostrato la correlazione tra l'assunzione di estratto ai petali di rosa con i livelli di espressione genica di diversi enzimi. Alcuni di questi sono deputati alla protezione dai radicali liberi dell'ossigeno, ritenuti responsabili dell'invecchiamento e dei danni ossidativi a carico di cellule e tessuti come conseguenza del metabolismo aerobico. Inoltre possono essere implicati nello sviluppo di tumori, infiammazioni e malattie cardiache.

Per la rimozione dei radicali liberi esistono due sistemi di difesa, uno di tipo non enzimatico, attraverso gli antiossidanti assunti con la dieta, e uno di tipo enzimatico. Quest'ultimo rappresenta la prima linea di difesa ed include gli enzimi superossido-dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e glutatione-perossidasi (GPx) che agiscono come mostrato nella figura 5.

Per queste ragioni vi è un interesse sempre crescente per gli antiossidanti naturali contenuti nelle piante medicinali, come la *Rosa rugosa* da tempo utilizzata nella medicina popolare cinese per le sue proprietà farmacologiche e per gli effetti degli estratti dei suoi fiori sull'attività e sui livelli di espressione genica della CAT e GPx. Il medesimo studio ha posto in evidenza l'effetto di tali estratti sulla perossidazione lipidica nel sangue, nel fegato e nel cervello di particolari topi, definiti SAM mice, (*senescence-accelerated mice*). I SAM mice nei primi 3 mesi non presentano differenze rispetto agli altri, ma dai successivi 4-6 mesi esibiscono segni di invecchiamento quali movimenti rallentati, ridotta attività, perdita dei peli e della loro lucentezza e ulcerazioni alla pelle. Ad un gruppo di tali topi sono stati somministrati 80mg/kg di peso corporeo di estratto di rosa mentre al gruppo di controllo è stata somministrata una soluzione di NaCl 0,9% per 30 e 60 giorni. Lo studio, avvalendosi della RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) ha dimostrato come il trattamento con estratto ai fiori di rosa incrementi l'attività della CAT nei topi attraverso up-regulation dell'espressione del relativo gene proteggendo le cellule dal danno ossidativo causato dal perossido d'idrogeno. Inoltre nei topi trattati si è evidenziato un decremento della perossidazione lipidica.



**Figura 5** L'enzima superossido dismutasi (SOD) converte l'anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ) in perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ). Quest'ultimo è successivamente convertito in 2 molecole d'acqua, sia dalla catalasi (CAT), sia dalla glutazione perossidasi (GPx) previa ossidazione del glutatione (da ridotto GSH, ad ossidato GSSG) (Galli *et al.*, 2004).

### 1.5.2 Vitamina C

La vitamina C è una molecola idrosolubile non sintetizzabile dall'uomo che deve assumerla attraverso la dieta; in tal modo viene assorbita nel tratto gastrointestinale mediante diffusione passiva se la concentrazione è rilevante, o mediante un meccanismo di trasporto attivo  $Na^+$  dipendente nel caso di piccole dosi. Frutta e ortaggi sono ricchi di vitamina C come mostrato in tabella 3.

La vitamina C è presente nell'organismo soprattutto nella forma attiva ridotta di acido ascorbico, e in piccole concentrazioni nella forma ossidata di acido deidroascorbico.

**Tabella 3** Contenuti di vitamina C nei vari alimenti vegetali espressi in mg/100 g di parte edule (da aa.vv.)

Alimenti vegetali	Vitamina C
Bacche di rosa canina	400
Peperoni	151
Kiwi	85
Cavolfiore	59
Spinaci	54
Arance	50
Mandarini	48
Pomodori	25,3

Quest'ultimo viene ritrasformato ad opera dell'enzima deidroascorbato reductasi glutatione dipendente in acido ascorbico (Figura 6).

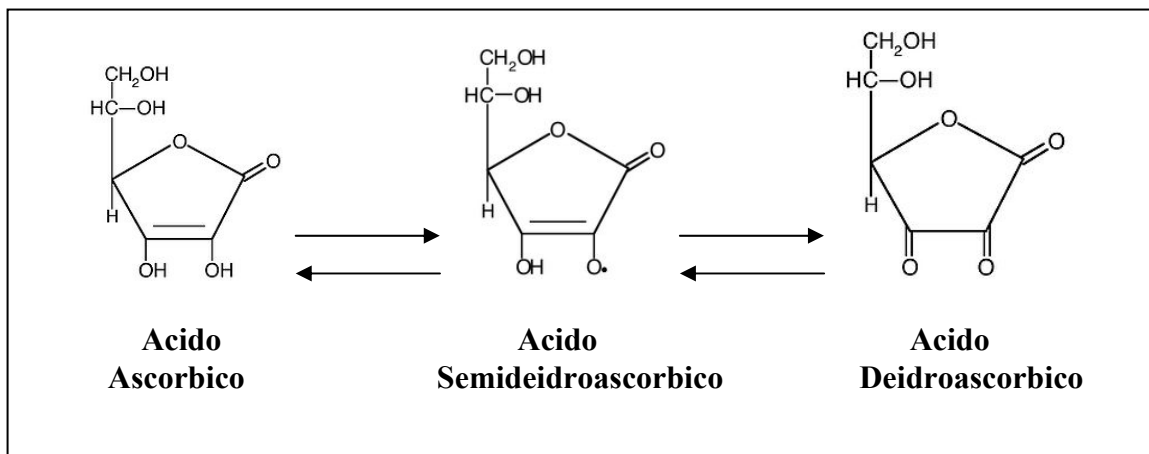
La vitamina C funge da antiossidante per un'ampia varietà di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei compartimenti acquosi delle cellule e nei liquidi extracellulari ossidandosi ad acido deidroascorbico.

La vitamina C protegge le membrane attraverso due meccanismi: in primo luogo, reagisce con i radicali perossilici che si formano nel citoplasma prima che essi riescano a raggiungere la membrana, impedendo così la perossidazione lipidica; in secondo luogo, l'acido ascorbico promuove l'attività antiossidante della vitamina E ( $\alpha$ -

tocoferolo) rigenerandola nella sua forma ridotta (McKee T. *et al.*, 2006).

Oltre a queste funzioni, la vitamina C, interviene nello sviluppo dei fibroblasti, osteoblasti e odontoblasti; a livello intestinale, favorisce l'assorbimento del ferro, e il suo trasferimento alla ferritina; ed è impiegata nell'idrossilazione della dopamina a noradrenalina.

Il fabbisogno giornaliero di vitamina C stabilito dai LARN è di 60 mg al giorno, l'assunzione di dosi massicce, ad esempio per uso scorretto degli integratori alimentari, non sembra apportare nessun beneficio, in quanto l'eccesso viene eliminato attraverso le urine.



**Figura 6** Conversione dell'acido ascorbico ad acido deidroascorbico e viceversa (da aa.vv.)

### **1.5.3. Carboidrati solubili**

I carboidrati sono composti costituiti da carbonio, idrogeno e ossigeno e contribuiscono a conferire sapore e consistenza agli alimenti. Rappresentano la principale fonte di energia, costituendo il 55-60% della quota calorica giornaliera comunemente assunta. Il glucosio e il fruttosio sono presenti in abbondanti quantità nelle parti eduli di numerosi vegetali (tabella 4).

Il glucosio svolge un ruolo fondamentale nell'organismo, in quanto è la fonte energetica fondamentale delle cellule del cervello e delle cellule che hanno pochi mitocondri o che ne sono privi, come gli eritrociti, ma anche delle cellule

**Tabella 4** Contenuti di glucosio e fruttosio in frutta e verdura espressi in g/Kg di parte edule (da aa.vv.)

<b>Alimenti vegetali</b>	<b>Glucosio</b>	<b>Fruttosio</b>
Banane	62	41
Arance	39	33
Mele	32	80
Fragole	25	27
Pere	16	60
Mandarini	11	38
Peperoni	25	10
Carote	24	23
Pomodori	14	19
Aglio	14	8
Piselli	12	10
Zucchine	11	12
Lattughe	5,10	3,10

che hanno una limitata ossigenazione, come quelle del bulbo oculare. Essendo, quindi, una molecola fondamentale, l'organismo provvede ad immagazzinarla nel fegato sottoforma di glicogeno, attraverso la glicogenesi, dal quale potrà prelevarlo nei momenti di necessità.

Il fruttosio, invece, è assorbito più lentamente e per semplice diffusione, ciò significa che il fruttosio può entrare nelle cellule della mucosa solo se la sua concentrazione in queste è inferiore rispetto all'esterno; dopodiché è trasportato sino al fegato dove viene facilmente metabolizzato in glucosio. È il più dolce tra tutti gli zuccheri, ed ha limitate implicazioni negative a livello nutrizionale, in quanto è uno dei carboidrati che presenta uno dei più bassi valori di indice glicemico (come mostrato in tabella 2 del capitolo "1.5 Aspetti salutistici degli alimenti di origine vegetale").

### 1.5.4 Acidi organici

Gli acidi organici, conosciuti anche come acidi carbossilici, sono composti contenenti il gruppo funzionale “carbossile” caratterizzato da un gruppo idrossile (-OH) legato ad un gruppo carbonile (C=O). Gli acidi organici sono fondamentali per la crescita di tutti gli organismi, in quanto indispensabili per le funzioni essenziali delle cellule quali la produzione delle membrane cellulari.

L'acido malico (figura 7) si trova in natura in molti frutti acerbi, come mele, ciliegie, mirtilli, uva ed è uno dei principali responsabili dell'acidità, conferendo ai cibi il caratteristico sapore di mela verde riscontrabile ad esempio in alcuni vini giovani.

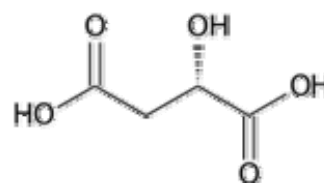


Figura 7 Acido malico

Nelle piante ha funzione di riserva e contribuisce a mantenere un idoneo equilibrio omeostatico tra l'interno e l'esterno delle cellule. Nell'industria farmaceutica è utilizzato sotto forma di sali per le sue proprietà fungistatiche, mentre nell'industria alimentare, nella produzione del vino per eliminare i tartrati (Villavecchia V. *et al.*, 1982).

L'acido shikimico (figura 8) è un importante intermedio biochimico sia per i microrganismi, sia per le piante e gli animali, e prende il nome da un fiore giapponese, lo shikimi (*Illicium anisatum*), da cui viene estratto. È un acido organico fondamentale in quanto precursore biosintetico indispensabile per diversi composti, tra cui l'acido gallico e gli amminoacidi aromatici fenilalanina, tirosina e triptofano. Nell'industria farmaceutica l'acido scichimico è prodotto dall'*Escherichia coli* mutato geneticamente ed è utilizzato per la sintesi dell'antivirale Tamiflu® (Wendisch V.F. *et al.*, 1982).

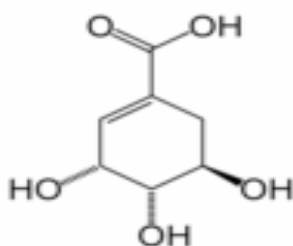


Figura 8 Acido shikimico

L'acido fumarico (figura 9) è presente in natura sia nella frutta sia negli ortaggi, ed è stato isolato per la prima volta dalle radici della pianta erbacea selvatica *Fumaria officinalis*, da cui prende il nome. È un isomero dell'acido maleico, molecola molto tossica, anche se la transizione dall'uno all'altro è molto improbabile in quanto essendo due isomeri molto stabili necessiterebbero di importanti somministrazioni di energia; può essere ottenuto anche come sottoprodotto della sintesi dell'acido malico. L'acido fumarico è utilizzato sia in medicina, per il trattamento della psoriasi, sia nei prodotti alimentari come stabilizzante.

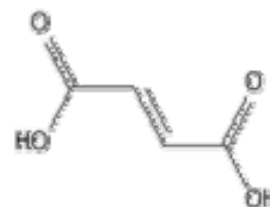


Figura 9 Acido fumarico

## **1.6 ASPETTI DI SICUREZZA**

Un elemento fondamentale da considerare riguardo il consumo dei vegetali, in particolare per i fiori eduli, è la sicurezza della materia prima quindi il monitoraggio della concentrazione dei residui di sintesi, ovvero dei fitofarmaci e l'analisi di eventuali contaminanti di origine naturale presenti, quali micotossine, e di derivazione ambientale come i metalli pesanti.

### **1.6.1 Fitofarmaci**

I fitofarmaci sono sostanze chimiche che vengono rilasciate nell'ambiente deliberatamente al fine di eliminare specie animali o vegetali considerate dannose per le coltivazioni. I vantaggi derivanti dall'utilizzo di questi prodotti sono essenzialmente:

- 1) di tipo economico, in quanto attraverso il loro utilizzo è possibile salvaguardare le produzioni agricole in coltivazione;
- 2) di protezione della salute pubblica, relativamente alla prevenzione della trasmissione di malattie contagiose attraverso l'azione degli insetti.

Premessa indispensabile affinché un fitofarmaco sia efficace è che associ all'alta attività biocida una sufficiente garanzia di sicurezza per l'uomo, gli animali domestici, l'entomofauna utile e, in generale, per l'ambiente (Gentile Abbattista I., *et al.*, 1987). Per tutelare il consumatore, ciascuna nazione stabilisce, per ogni pesticida, un limite massimo di residuo consentito (MRL) per i prodotti agricoli freschi pronti alla commercializzazione, tenendo in considerazione l'eventuale possibilità di degrado o di accumulo durante le successive lavorazioni (Galli C.L. *et al.*, 2004). Questo valore, che non è un limite tossicologico, è ottenuto sperimentalmente seguendo le Good Agricultural Practices (GAP), ovvero linee guida sviluppate per garantire il massimo raccolto possibile e il minimo rischio sia per gli operatori sia per il consumatore; se alla raccolta l'MRL nell'alimento è superiore al limite legale, il prodotto non può essere commercializzato.

La quantità di residuo di fitofarmaco presente sulla matrice vegetale dipende sia dalle proprietà agronomiche del pesticida come:

- dose di applicazione,
- tipo di applicazione,
- modalità di applicazione,
- numero di trattamenti,
- velocità di degradazione,
- proprietà fisico-chimiche-biologiche,

sia dalle caratteristiche del vegetale trattato (Cabras P. *et al.*, 2004) quindi:

- tipo di coltura,
- densità delle piante,
- rapporto superficie/peso,
- morfologia di superficie del prodotto,

ma anche dalle condizioni meteorologiche della zona sottoposta al trattamento fitosanitario.

I nuovi pesticidi commercializzati recentemente dalle aziende produttrici, possiedono una serie di caratteristiche comuni tra cui la copertura da brevetto, il che comporta automaticamente



un prezzo più alto, ma anche la maggior selettività, e la sempre minore persistenza ambientale (Dolara P., 1997).

Per i fiori non si hanno dati relativi sul limite massimo di residuo consentito, in quanto non è una matrice comunemente utilizzata a scopo alimentare. I dati a disposizione riguardano frutta, ortaggi e prodotti trasformati, così come mostrato in tabella 5.

Il fiore è una matrice particolare perché a differenza degli alimenti vegetali comunemente consumati, non si può sbucciare né lavare in quanto potrebbe risultare compromessa la fragranza caratteristica. Anche l'uva utilizzata per la produzione del vino, non viene lavata, ma in questo caso i residui tendono ad adsorbirsi sulla frazione solida del mosto, riscontrando così contenuti minori o addirittura nulli nel prodotto finito.

**Tabella 5 Alcuni limiti massimi di residui delle sostanze attive dei prodotti fitosanitari tollerati nei prodotti destinati all'alimentazione in attuazione delle disposizioni comunitarie (G.U., 2004).**

Alimento	Insetticida (mg/kg)		Erbicida (mg/kg)		Fungicida (mg/kg)	
	Carbaril	Paration	Paraquat	Glifosate	Captano	Esaclo-ro-benzene (HCB)
Frutta	-	0,05	0,02	-	-	0,01
Ortaggi	-	0,05	0,02	-	-	0,01
Pomacee	-	-	-	-	21	-
Albicocco	-	-	-	-	10	-
Tè	0,1	0,1	0,05	10	-	0,02
Erbe aromatiche e infusionali (essiccati commerciali)	-	-	-	-	-	0,1

In Italia, l'utilizzo dei fiori è orientato quasi esclusivamente verso la produzione di piante a scopo ornamentale. Il fiore, in questo settore, deve essere "perfetto" ed "impeccabile" per poter godere del favore del pubblico (Agra Press, 2008). Ciò implica un forte impiego di fitofarmaci il cui utilizzo è sovente concentrato in zone ben circoscritte, essendo la floricoltura un'attività con caratteristiche produttive a dimensione "distrettuale" come la Riviera Ligure di Ponente, la Versilia, e la Lucchesia. Il risultato di questa attività, e di conseguenza, l'impiego massiccio di fitofarmaci in tali zone, oltre a mettere a repentaglio la sicurezza d'uso delle falde acquifere, dell'atmosfera, del terreno di queste aree, limita fortemente l'impiego dei fiori in ambito gastronomico. Per questo, dal momento in cui si intende orientare l'utilizzo verso tale settore, il prodotto ottenuto da coltivazione biologica diventa un requisito fondamentale, in quanto non esistono, per ora, norme di buona pratica agricola che permettano di definire un MRL. Questo tipo di coltivazione può essere perseguita con tecniche di conversione e pratiche agronomiche specifiche di lotta biologica, ovvero tecniche mirate alla sostituzione dei trattamenti chimici con metodi di lotta naturale, al fine di mantenere i parassiti al di sotto della soglia di tolleranza economica (Pilati L., 2004).

### **1.6.2 Micotossine**

Le micotossine sono metaboliti secondari sintetizzati dai funghi solo se sussistono le condizioni favorevoli di temperatura e umidità che possono ritrovarsi sia nelle piante infette e nelle derrate alimentari, sia nelle colture foraggere destinate all'alimentazione degli animali da allevamento. Sono caratterizzate da una grande diversità strutturale che spiega la varietà degli effetti avversi indotti. Tra i metaboliti fungini di maggior interesse micotossicologico vi sono le aflatossine, i tricoteceni, le ocratossine, e le fumonisine. Le prime sono prodotte dal genere *Aspergillus*, si riscontrano soprattutto in cereali, oli di semi e frutta secca, e la loro presenza causa danni a livello epatico come cirrosi e steatosi, e nei casi più gravi tumore al fegato. I tricoteceni prodotti da *Fusarium* e *Myrothecium*, possono contaminare cereali, soprattutto mais, e sono responsabili di irritazione e necrosi cutanea e delle mucose, emorragie, danni a livello del timo e del midollo osseo, inoltre possono causare effetti teratogeni ed aborto. Le ocratossine prodotte dai generi *Aspergillus* e *Penicillium*, si ritrovano come contaminanti di cereali, semi di caffè e cacao, e frutta secca, hanno azione nefrotossica manifestata da necrosi, fibrosi, e sclerosi interstiziale, con ridotta filtrazione glomerulare; sono stati inoltre dimostrati altri effetti come l'attività cancerogena del tratto urinario e l'attività teratogena. Infine, le fumonisine, prodotte da *Fusarium* contaminano prevalentemente i cereali e sembrano essere correlate alla comparsa di tumori esofagei. Le contaminazioni da micotossine possono riguardare anche il latte, l'uva sultanina, le spezie, la birra, i succhi di frutta, e le piante infusionali. Per questo il Ministero della Sanità Italiano ha definito per tali prodotti dei limiti di tolleranza, ovvero dei contenuti massimi ammissibili di micotossine; alcuni esempi sono riportati in tabella 6.

Le micotossine essendo molto stabili, persistono nei prodotti contaminati per lungo tempo anche dopo la morte del fungo produttore, e contrariamente alle tossine batteriche, non vengono completamente distrutte o allontanate dai normali processi fisici quali calore e radiazioni, chimici come estrazione e raffinazione, e biologici ovvero la fermentazione, normalmente impiegati dalle industrie alimentari (Galli C.L. *et al.*, 2004). Proprio per l'impossibilità di eliminare tecnologicamente queste sostanze e la gravità dei danni ad essi associati, occorre garantire l'assenza di tali metaboliti. In Italia, i maggiori problemi inerenti le micotossine derivano dall'importazione di derrate (siano esse materie prime, ingredienti o prodotti finiti) da paesi con clima caldo-umido dell'area sub-sahariana, dall'area asiatica e dall'area sudamericana. Nel caso specifico dei fiori eduli come le rose, non esistono studi in merito per poter definire se tali specie possono costituire terreno fertile per un'eventuale contaminazione da micotossine. Lo studio più affine è stato condotto dall'ARPA dell'Emilia Romagna presso la sezione di Bologna tra il 2000 e il 2003, in cui è stata analizzata la presenza di aflatossine in vari prodotti tra cui erbe infusionali e officinali come guaranà, tè, tè verde, succo di aloe, rosa canina, karkadè, iperico e melissa. La maggior parte di questi prodotti proviene da paesi di origine tropicale, ovvero luoghi caratterizzati da alte variazioni di temperatura e umidità, per cui il problema delle micotossine risulta essere molto rilevante in quanto sussistono le condizioni ottimali per il loro sviluppo, nonostante ciò, non è stata riscontrata la loro presenza nei campioni considerati (Bergamini C. *et al.*, 2005). Il rischio micotossine, deve essere costantemente monitorato e valutato in particolare durante le fasi di stoccaggio e di trasporto in quanto più suscettibili di un'eventuale contaminazione.

**Tabella 6: Contenuti massimi ammissibili (limiti di tolleranza) consigliati dal Ministero della Sanità Italiano per aflatossine (B1,B2,G1,G2,M1), l'ocratossina A, la patulina e lo zearalenone in alcuni alimenti (Cabras P. *et al.*, 2004).**

Contenuti massimi ammissibili µg/kg (ppb)						
Prodotto alimentare	Aflatossine B1+B2+G1+G2	Aflatossina B1	Aflatossina M1	Ocratossina A	Patulina	Zearalenone
Alimenti per l'infanzia	0,1	-	0,01	0,5	-	20
Spezie	20	10	-	-	-	-
Caffè crudo	-	-	-	8	-	-
Caffè tostato e caffè solubile	-	-	-	4	-	-
Cacao e prodotti derivati	-	-	-	0,5	-	-
Birra	-	-	-	0,2	-	-
Succhi di frutta	-	-	-	-	50	-
Carne suina e prodotti derivati	-	-	-	1	-	-
Cereali e prodotti derivati	-	-	-	3	-	-
Piante infusionali e loro parti	5	10	-	-	-	-

### **1.6.3 Metalli pesanti**

I metalli pesanti sono costituenti naturali della crosta terrestre e sono presenti in tutti gli ecosistemi in concentrazioni generalmente molto basse (Galli C.L. *et al.*, 2004). Tuttavia, esistono alcune circostanze, determinate soprattutto dall'attività antropica, in cui le quantità possono aumentare notevolmente generando situazioni di pericolo anche gravi per gli esseri viventi. I metalli, data la loro stabilità, non sono degradati e tendono a distribuirsi nel suolo, nelle acque, e nell'atmosfera, attraverso un ciclo geologico, per poi concentrarsi mediante un ciclo biologico in piante e animali, con successivo trasferimento all'uomo tramite la catena alimentare ed esplicando effetti tossici diversi a seconda della loro natura. I metalli vengono assorbiti dalle piante attraverso l'apparato radicale, per cui la presenza in frutti, semi, ortaggi, ecc. in vari organi dei vegetali destinati all'alimentazione dipenderà dalla loro concentrazione nei terreni coltivati.

Il piombo è il contaminante più abbondante, essendo rilasciato tra l'altro dagli scarichi industriali, ed ha una diffusione ubiquitaria; la principale via di esposizione è il cibo, infatti, è stato rinvenuto in pesci e molluschi, carni e uova, cereali e vegetali, ma soprattutto negli alimenti per bambini. Il piombo, inoltre, tra i vari metalli che possono inquinare la matrice vegetale è quello che si riscontra in maggiore quantità. Nell'organismo, può concentrarsi sia nel sistema scheletrico, sia nei tessuti molli e nel sistema nervoso; è in grado di attraversare la barriera placentare, causando seri danni al sistema nervoso dei nascituri e nei casi più gravi

morte neonatale. Inoltre, può indurre anemia sia per blocco della sintesi dell'eme sia riducendo la vita media degli eritrociti e determinando quindi danni alle cellule del tubulo prossimale.

Anche il mercurio è un metallo a diffusione pressoché ubiquitaria, in quanto è utilizzato su vasta scala sia nelle industrie sia in agricoltura per la formulazione di composti organici ad azione insetticida, fungicida e battericida. Il suo notevole impiego ha alterato il preesistente equilibrio, determinando condizioni di inquinamento, talora assai gravi, degli animali e dei vegetali. Inoltre il mercurio inorganico presente, può essere metilato per azione dei batteri anaerobici trasformandolo nella sua forma organica di dimetilmercurio; quest'ultimo viene assorbito molto più facilmente dal tratto gastrointestinale concentrandosi soprattutto a livello del sistema nervoso centrale. Inoltre potendo attraversare la barriera placentare può causare teratogenicità comportamentale.

Un altro metallo che può ritrovarsi negli alimenti è l'arsenico, rilasciato nell'ambiente da diverse fonti antropogeniche; può depositarsi sul suolo sotto forma di polveri ed essere successivamente assorbito attraverso l'apparato radicale delle piante; oppure, può trovarsi sull'apparato fogliare in quanto addizionato a insetticidi, erbicidi e fungicidi. L'ingestione di alte dosi di arsenico, pari a 1-3 mg/kg di peso corporeo, causa intossicazione acuta, caratterizzata da nausea, vomito, diarrea, convulsioni, aritmia cardiaca e nei casi più gravi, morte del soggetto entro un'ora. Inoltre, dal 1987, l'EPA (Environmental Protection Agency) e lo IARC (International Agency for Research on Cancer), lo hanno collegato allo sviluppo di cancro alla pelle.

Il cadmio è utilizzato come pigmento per pitture e plastiche, come materiale catodico per batterie ed in alcuni fertilizzanti. Può essere presente in differenti alimenti, tra cui carne, pesce, frutta e semi, in diverse concentrazioni a seconda della quantità presente nell'aria, nell'acqua di irrigazione e nei fertilizzanti. L'intossicazione attraverso l'ingestione di concentrazioni relativamente alte provoca nausea, vomito e dolori addominali, a cui segue un veloce recupero, anche se per concentrazioni di 140-260 µg di Cd/giorno per più di 10 anni, la WHO (World Health Organization) lo riconduce allo sviluppo di disfunzioni renali, e casi ben più gravi si riscontrano in soggetti esposti a valori occupazionali.

Per tutelare il consumatore, l'Unione Europea ha fissato per ogni metallo i limiti massimi consentiti nei diversi alimenti (G.U., 2001) (tabella 7), quindi occorre porre particolare attenzione non solo al tasso di metalli pesanti presenti nel terreno, ma anche al loro contenuto nell'acqua di irrigazione, nei fertilizzanti, e negli antiparassitari utilizzati. Anche in questo caso, però, non esistono dati relativi ai fiori.

**Tabella 7 Limiti di tolleranza di piombo, cadmio, mercurio per alcuni alimenti (G.U., 2001) e di arsenico per l'acqua potabile (G.U., 1993).**

Alimenti	Tenore massimo (mg/kg di peso fresco)			Limiti di legge (µg/L)
	Piombo	Cadmio	Mercurio	Arsenico
Latte di mucca (latte crudo, latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte)	0,02	-	-	-
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento	0,02	-	-	-
Carni bovini, ovini, suini e pollame	0,1	0,05	-	-
Muscolo di pesce	0,2	0,05	-	-
Crostacei	0,5	0,5	-	-
Molluschi bivalve	1,0	1,0	-	-
Cereali, legumi e leguminose	0,2	0,1 (crusca, germi di grano e riso 0,2)	-	-
Cavoli, ortaggi a foglia e funghi coltivati	0,3	0,2	-	-
frutta	0,1	0,05	-	-
Bacche e frutta di piccole dimensioni	0,2	-	-	-
Prodotti della pesca (fatte alcune eccezioni)			0,5	-
Acque minerali naturali	-	-	-	200

## 1.7 TECNOLOGIE POST-RACCOLTA

L'importanza dei trattamenti tecnologici degli alimenti risiede nel garantire la sicurezza e la prevenzione dalle malattie. Questi obiettivi possono essere perseguiti attraverso processi basati sul controllo della temperatura, sia calore che congelamento, l'irradiazione o la disinfezione chimica. Oltre a questi scopi, attualmente, la tecnologia alimentare include il miglioramento delle qualità nutrizionali, sensoriali e funzionali dei vari prodotti.



*Viola tricolor*

Per quanto concerne la conservabilità dei fiori, come per frutta e verdura, il fattore temperatura è molto importante per definirne la *shelf-life*. A questo riguardo è stato condotto uno studio in cui prendendo in considerazione diverse specie di fiori si è dimostrato come la conservabilità sia caratteristica per ciascuno di essi. Più specificatamente si sono studiati: *Viola tricolor* (viola), *Viola x wittrockiana* (viola del pensiero), *Tropaeolum majus* (nasturzio), *Borago officinalis* (borragine) e *Phaseolus coccineus*



*Tropaeolum majus*

(fagiolo americano). I fiori sono stati raccolti con i boccioli completamente aperti, e successivamente trasportati in laboratorio in un sacchetto non sigillato a circa 22°C. Quindi, si sono conservati in buste di plastica sigillate, e con quattro piccoli forellini agli angoli per consentire gli scambi gassosi di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. La durata complessiva dal momento della raccolta a quello della conservazione è inferiore ai 90 minuti. Ciascuna specie è stata, quindi, posta in sei camere a temperatura controllata, a 20, 10, 5, 2.5, 0 e -2.5°C al riparo dalla luce, e successivamente analizzata a distanza di una e due settimane. Da questo studio è emerso che la



*Phaseolus coccineus*

viola, la viola del pensiero e il nasturzio conservati a 0 e 2.5°C non mostrano segni di perdita di qualità a distanza di due settimane ed hanno requisiti tali da poter essere commercializzati. La borragine si conserva per una settimana a temperature superiori di -2.5°C, mentre raggiunge le due settimane se conservata a -2.5°C. Per quanto riguarda il fiore del fagiolo americano, può essere conservato per una settimana a temperature comprese fra 0-10°C, ma non raggiunge mai valori accettabili alla seconda settimana qualsiasi sia la temperatura di conservazione. Questo studio dimostra, quindi, come per ciascuna specie di fiore vi sia una temperatura ottimale in cui si ha una conservabilità tale da garantire qualità e preservazione del prodotto per un periodo che sia il più lungo possibile (Kelley K.M. *et al.*, 2003), così come avviene per una vastissima serie di produzioni vegetali.

Un ulteriore studio (Friedman H. *et al.*, 2005) ha esaminato la vulnerabilità alla senescenza del *Tropaeolum majus*, determinando l'eventuale sensibilità all'etilene, un ormone rilasciato



*Viola x wittrockiana*



*Borago officinalis*

dalle piante in grado di influire sulla germinazione e sull'invecchiamento della pianta; la *shelf-life*; e l'attività antiossidante dei fiori in diversi tipi di confezionamento. Entro un'ora dalla raccolta, i fiori sono stati condizionati in vari modi:

- 1) privi di confezione;
- 2) atmosfera attiva modificata (MA) ottenuta da una miscela di gas: CO<sub>2</sub> (5-10%), O<sub>2</sub> (10%), e N<sub>2</sub> (85-80%) e confezionati in film di polipropilene;
- 3) atmosfera passiva modificata: polipropilene sigillato non perforato senza iniezione di miscela di gas;
- 4) polipropilene sigillato e perforato;
- 5) avvolti in polivinilcloruro (PVC) alle temperature di 2°C e 4-5°C per una settimana.

Lo studio ha dimostrato che il *T. majus* sia sensibile all'azione dell'etilene, in quanto aumenta la sua degradazione all'aumentare della concentrazione di etilene, mentre aumenta la conservabilità se esposto all'azione dell'1-MCP (1-metilciclopropene), inibitore dell'etilene. La notevole riduzione della liberazione di questo gas sta alla base della conservazione in atmosfera controllata. Questa condizione è permessa attraverso la regolazione dei livelli di ossigeno e anidride carbonica nell'ambiente di conservazione.

La qualità dei fiori conservati sia in PVC sia in polipropilene è migliore dei fiori non confezionati, e il migliore mantenimento ottenuto si verifica in atmosfera attiva modificata per sette giorni a 2-5°C. La qualità dei fiori conservati alle diverse temperature, è comparabile ed evidenzia la commerciabilità del prodotto. Tale studio mostra risultati differenti rispetto a quello citato in precedenza, nonostante siano stati testati sempre i fiori di nasturzio; questo potrebbe dipendere dalla diversa varietà dei fiori esaminati, dal diverso stadio di maturazione del fiore, dalla temperatura e dalla durata del trasporto dal momento della raccolta a quello del confezionamento, nelle diverse condizioni di crescita del fiore. Ciò dimostra come sia fondamentale uno studio accurato e mirato di una precisa varietà campionata in un'area ben definita, per limitare quelle che sono le normali variazioni climatiche come temperatura e piovosità caratteristiche della zona nei diversi anni, e ridurre le variabili che accidentalmente possono manifestarsi durante le operazioni di laboratorio e che infine potrebbero incidere sulla variabilità di conservazione del prodotto.

Per quanto concerne la rosa, uno dei trattamenti tecnologici plausibili è la produzione di un semilavorato, ovvero un preparato destinato ad essere integrato in altri alimenti come yogurt e gelati. Nel caso specifico, alcuni dei parametri importanti ai fini dell'apprezzamento del prodotto finito, risulterebbero essere l'aroma e il colore. Quest'ultimo, in particolare, è molto suscettibile all'imbrunimento causato dall'azione enzimatica generata dalla rottura e dalla frantumazione durante l'omogeneizzazione dei petali. In tal caso,



*Possibile impiego dei fiori conservati*



*Gelato artigianale alla rosa*

si renderanno necessari opportuni accorgimenti per preservare le caratteristiche chimiche della matrice vegetale.

I petali di rosa possono essere utilizzati anche per la produzione di tisane; in questo caso si dovrebbe mettere a punto un metodo di essiccamento adeguato, come avviene nel caso del tè. Alcuni esempi possono essere le foglie di tè nero in cui si utilizzano essiccatori a rulli o camere di essiccazione che riducono l'umidità di circa il 55-65%, facendo perdere l'acqua dalle foglie rendendole morbide al fine di poterle successivamente macerare; le foglie di tè verde, invece, possono essere essiccate attraverso il passaggio in forni ventilati innalzando gradualmente la temperatura fino a peso costante, evitando il rischio di ossidazione e conservando quindi colore e caratteristiche (Rinallo C., 2005).

Inoltre la rosa può essere aggiunta ad altri preparati al fine di ottimizzarne le loro proprietà; ciò è stato dimostrato in uno studio (Mollov P. *et al.*, 2007) riguardante bevande alla fragola, in cui il miglioramento della stabilità del colore di queste bibite è reso possibile grazie alla presenza di pigmenti polifenolici naturalmente presenti nel fiore di rosa. Nella fragola, sono presenti le antocianine, importanti non solo nel definire un'acceptabilità del prodotto dal punto



*Yogurt ai fiori già presente sul mercato*

di vista estetico, ma anche per il ruolo che svolgono sotto il profilo salutistico, come spiegato nel paragrafo “1.5.1 Antiossidanti”. Queste molecole, però, sono suscettibili alla luce e al calore e vengono danneggiate durante i convenzionali processi di confezionamento della bevanda. La *Rosa damascena* Mill. data la sua abbondanza in flavonoli e per gli alti livelli di pigmenti polifenolici, è stata presa in considerazione come

ingrediente, più precisamente è stata valutata la pigmentazione e la stabilità al calore delle antocianine della fragola in presenza dei polifenoli dei petali di rosa. Quindi, è stato confrontato il contenuto di antocianine in bevande alla fragola con e senza l'aggiunta dell'estratto ai petali di rosa riscaldando il preparato a 85°C e valutando i contenuti in entrambe le soluzioni a intervalli di 30 minuti. Dall'analisi del colore si è osservato un significativo cambiamento verso il giallo durante il riscaldamento della sola bevanda alla fragola; mentre, la stabilità del colore incrementa con l'aggiunta dell'estratto di petali di rosa.



## **1.8 STABILIZZAZIONE DELLE CONSERVE VEGETALI**

Lo scopo principale della produzione di conserva vegetali è quello di prolungare il tempo di conservazione di un alimento che allo stato naturale (ortaggi, frutta, fiori freschi) sarebbe relativamente breve. Nel corso del tempo si è passati da metodi di conservazione empirici a metodi sempre più avvalorati da tecniche scientifiche, man mano che la microbiologia e la tecnologia alimentare prendevano sviluppo. In sostanza l'uomo ha sempre avuto la necessità di ottenere alimenti *stabili* nel tempo, tanto che oggi si parla di “stabilizzazione degli alimenti”.

Tra i mezzi di stabilizzazione degli alimenti vi sono trattamenti più o meno energici ed efficaci. Quelli più blandi, come conservazione allo stato fresco e l'uso dell'atmosfera modificata, sono stati illustrati nel paragrafo precedente. I trattamenti più energici, contemporaneamente all'effetto stabilizzante, possono determinare una trasformazione del prodotto di partenza (materia prima), tanto che il prodotto finale può avere caratteristiche del tutto diverse (per esempio, confettura) e la sua stabilità nel tempo accrescersi notevolmente rispetto all'alimento originario. Un alimento stabile subisce comunque, nell'arco della sua vita, una serie di modificazioni delle caratteristiche qualitative provocate da processi chimico/enzimatici che avvengono in maniera più o meno lenta al suo interno nonché dallo sviluppo dei microrganismi presenti, poiché non tutti i trattamenti stabilizzanti sono anche sterilizzanti. Le tecniche di conservazione hanno quindi lo scopo di prevenire e/o rallentare le modificazioni della struttura, delle caratteristiche sensoriali e del valore nutritivo dei cibi.

### **1.8.1 Classificazione merceologica delle conserve vegetali**

La classificazione delle conserve più importante dal punto di vista puramente produttivo è quella effettuata sulla base delle loro caratteristiche chimico-fisiche, ossia il pH e l'acqua libera (*activity water* - aw). La distinzione in classi (tabella 8) non è però da considerarsi rigida in quanto sono possibili delle sovrapposizioni. Ogni classe è contraddistinta da:

- una diversa possibilità di sviluppo di microrganismi nella conserva;
- un conseguente possibile grado di alterazione del prodotto e di rischio di patogenicità;
- i relativi trattamenti termici da effettuare per ottenere la stabilizzazione del prodotto.

In particolare:

- classi a), d) ed e): possibile sviluppo di lieviti, funghi e bacilli lattici = alterazioni del prodotto ma assenza di patogenicità per il consumatore. Sono le conserve naturalmente acide od ottenute mediante acidificazione (aggiunta di sostanze acide o fermentazioni);
- classe b): possibile sviluppo di lieviti, funghi, bacilli e clostridi non patogeni = alterazioni del prodotto ma con assenza di patogenicità per il consumatore. Sono le conserve naturalmente acide;
- classe c) e f): possibile sviluppo di qualsiasi tipo di microrganismo = alterazioni del prodotto e possibili aspetti di patogenicità. Sono le conserve poco acide.

**Tabella 8 Classificazione sulla base delle caratteristiche chimico-fisiche (pH e aw)**

aw	Conserve acide		Conserve a bassa acidità
	pH < 4.3	4.3 < pH < 4.6	pH > 4.6
>0.98	a) succhi e polpe di agrumi, conserve di ortaggi all'aceto	b) succhi e polpe di frutta, succhi e passate di pomodoro, conserve di pomodoro, conserve di frutta all'acqua	c) conserve di ortaggi al naturale, conserve sott'olio non fermentate e/o acidificate
<0.98	d) concentrati di pomodoro, concentrati di frutta, marmellate, confetture e gelatine, ortaggi in salamoia fermentati	e) concentrati di pomodoro, concentrati di frutta, marmellate, confetture e gelatine, ortaggi in salamoia fermentati	f) ortaggi in salamoia non fermentati

Fonte: Manuale di corretta prassi igienica per la produzione di conserve vegetali stabilizzate mediante trattamenti termici (Conservare vegetali appertizzate) predisposta dalla Stazione Sperimentale per l'industria delle conserve alimentari per conto di ANICAV - luglio 1996).

### 1.8.2 Conserve e semiconserve

Si definisce 'conserva' un prodotto trattato a temperature di sterilizzazione dopo essere stato inserito in un recipiente a chiusura ermetica. Il trattamento termico utilizzato determina la morte di tutte le forme vegetative o di spore microbiche (patogeni e non) e degli enzimi. Questi prodotti hanno una durata di conservazione molto lunga.

Si definisce 'semiconserva' un prodotto trattato a temperature che distruggono forme microbiche vegetative (fra cui le patogeni) ed enzimi. Questi prodotti, non sterili, contengono un numero variabile di microrganismi (forme microbiche termoresistenti, spore) che sono però tenuti sotto controllo mediante l'applicazione di ulteriori tecnologie (Leistner, 1992). Queste sono basate su:

- fattori fisici come le basse temperature che devono essere mantenute costantemente durante la conservazione
- tecniche che hanno come scopo la creazione di ambienti inadatti allo sviluppo microbico (abbassamento dell'acqua libera con concentrazione del prodotto per evaporazione dell'acqua, acidificazione e/ o aggiunta di zucchero).

### 1.8.3 Stabilizzazione microbiologica mediante i trattamenti termici

La contaminazione microbiologica al momento del trattamento termico determina la durata della vita commerciale del prodotto finito e, di conseguenza, la sua durata limite di consumo.

Per quanto riguarda la termoresistenza dei microrganismi, esiste una temperatura massima oltre la quale si osserva l'arresto della loro attività metabolica, poi della loro moltiplicazione; seguito da danni irreversibili e morte. I fattori che influenzano la resistenza al calore, oltre al tipo di microrganismo, sono:

- temperatura ottimale di moltiplicazione
- tempo e temperatura di trattamento

- presenza di forme vegetative, e/o spore
- fase di moltiplicazione logaritmica dei microrganismi
- numero iniziale di microrganismi, perché si osserva una maggiore resistenza al calore con una popolazione microbica numerosa a causa della formazione di agglomerati
- le caratteristiche del substrato (pH, valori aw, sostanze protettive)

La maggior parte dei microrganismi tossici sono mesofili (Salmonella, Botulino, *C. perfringens*, *S. aureus*). Batteri mesofili sono anche le enterobacteriaceae e la maggior parte dei Gram +, come *Bacillus*, *Micrococcus* e lattici. La gran parte delle forme vegetative è neutralizzata tra 55 e 65°C. Lieviti e muffe sono in genere termosensibili e, come i batteri vegetativi, sono distrutti a partire dai 55°C; alcune muffe o le loro spore, però, possono risultare termo tolleranti.

La distruzione effettiva dei microrganismi si esplica con riduzioni successive del 90% della popolazione microbica presente. Ad una data temperatura T, l'intervallo di tempo necessario per ottenere una riduzione del 90% pari ad un decimo, si chiama 'tempo di riduzione decimale', si indica con  $D_T$  e si esprime generalmente in minuti. Qualsiasi sia il microrganismo considerato, un aumento di temperatura, nel trattamento effettuato, causa una riduzione dei tempi necessari per la distruzione; l'aumento di temperatura necessario per ridurre la costante  $D_T$  di 10 volte è detto valore z ed è espresso in °C; tale valore varia con il ceppo batterico ed è compreso in genere tra +5°C e +15°C. La resistenza al calore ( $D, z$ ) è proprietà specifica del ceppo. Dipende dallo stato delle cellule (in fase logaritmica la resistenza è minore) e dal substrato (a valori di pH da 6 a 8 c'è la massima resistenza; più è bassa l'aw, maggiore è la termo resistenza).

Essendo impossibile la distruzione totale di una popolazione batterica, si deve definire un tasso di distruzione con un margine di sicurezza accettabile, sia per i prodotti sterilizzati sia per quelli pastorizzati. Un dato trattamento termico, applicato ad un dato prodotto, in condizioni note, è caratterizzato dal valore F (effetto letale di quel trattamento). Per F s'intende il numero di minuti in cui, ad una data temperatura di riferimento, viene raggiunto un effetto letale sul germe guida, equivalente alla somma degli effetti letali dell'intero processo termico. Il rilevamento dell'evoluzione della temperatura a cuore del prodotto per tutto il tempo permette di calcolare il valore F effettivamente applicato. L'effettivo trattamento termico subito da un prodotto deriva da tutti gli effetti letali causati sia nel periodo di salita della temperatura, sia nel tratto di raffreddamento, dopo il raggiungimento della temperatura stabilita. A livello industriale si calcola automaticamente il valore F di un dato trattamento termico, mediante rilevazione delle temperature del prodotto fatta con apposite sonde inserite in campioni test. Il segnale raccolto dalle sonde, ad ogni minuto o intervallo di tempo, è inviato ad un calcolatore con un software che produce una curva di processo (Kramer e Cantoni, 1994; Rahman e Dekker, 1999).

Per le conserve molto acide (con pH < 4.2), le temperature richieste sono in genere inferiori a 100°C in quanto a pH acido le spore non germinano e sopravvivono solo forme vegetative oppure lieviti e muffe. In tal caso i germi bersaglio sono poco definiti e in genere si considerano forme vegetative con  $D_{71^\circ\text{C}}=2/3$  minuti e  $z=10^\circ\text{C}$ , oppure muffe con  $D_{92^\circ\text{C}}=2/3$  minuti e  $z=7^\circ\text{C}$  (Migliorini, 2004).

#### 1.8.4 Conservazione mediante uso dello zucchero

L'aggiunta di zucchero ad un alimento, altera la crescita microbica. In concentrazioni modeste (fino al 20%), lo zucchero aggiunto funge da substrato favorevole per la crescita dei microrganismi; in concentrazioni elevate (anche superiore al 50%) ha un effetto batteriostatico e conservante.

L'effetto conservante dello zucchero è dovuto a:

- pressione osmotica esercitata che determina un effetto tossico qualora la concentrazione del composto superi il 50%
- riduzione della solubilità dell'ossigeno (sfavorisce gli aerobi ma favorisce gli anaerobi)
- riduzione dell'attività dell'acqua

I diversi microrganismi presentano una diversa tolleranza alle alte concentrazioni in zuccheri. I batteri sono i più sensibili. Gli zuccheri comunemente utilizzati sono:

- fruttosio: monosaccaride disponibile solo come sciroppo in quanto è difficilmente cristallizzabile per l'elevata igroscopicità. Il suo sapore dolce e fresco richiama quello della frutta.
- destrosio: monosaccaride derivato dal mais, disponibile in forma cristallina; molecola piccola che penetra velocemente nei tessuti ed esercita un'elevata pressione osmotica (superiore a quella del saccarosio)
- sciroppo di mais: deriva dall'idrolisi dell'amido di mais. Le sue caratteristiche sono diverse a seconda della percentuale in zuccheri riducenti presenti espressi come destrosio equivalente (DE). Maggiore è il valore DE e più è dolce e fermentescibile. In generale, si usa per frutta sciroppata, marmellate, gelatine dove deve dare viscosità, a basso valore di DE; ad alto DE si impiega nei succhi per i quali è più importante l'effetto dolcificante.
- saccarosio: deriva dalla barbabietola o dalla canna da zucchero. È un disaccaride non riducente quindi meno reattivo in termini di reazione di *Maillard* (non causa imbrunimento).

In particolare per la frutta, i trattamenti osmotici orientati alla disidratazione/concentrazione, sono da lungo tempo studiati soprattutto in termini di miglioramento delle caratteristiche fisico-chimiche durante i processi di trasformazione subiti dalla materia prima (Ponting *et al.*, 1966; Maltini *et al.*, 1983). Tali trattamenti sono stati per esempio applicati a cubetti di pesche e albicocche al fine di ottenere semilavorati tecnologicamente idonei per la frutta atta all'impiego in prodotti lattiero-caseari come lo yogurt (Giangiacomo *et al.*, 1994). Durante i processi di disidratazione osmotica (OD), avvengono trasporti di massa dovuti ai trasferimenti del flusso d'acqua dall'alimento alla soluzione osmotica e del flusso di soluti dalla soluzione all'alimento. Alcuni autori hanno riscontrato una maggiore ritenzione di vitamina C e clorofilla durante la conservazione a -10°C in kiwi surgelati dopo opportuno trattamento osmotico. Gli stessi autori hanno anche osservato una maggiore stabilità della frazione delle antocianine in fragole osmo-disidratate e surgelate durante il periodo di conservazione (Torreggiani e Bertolo, 2001).

Un altro interessante pre-trattamento indicato per la frutta in pezzi utilizzabile come semilavorato prima del congelamento è la tecnica di *vacuum infusion*; prove di applicazione di tale tecnica sono state condotte in uno studio riguardante il miglioramento qualitativo di fragole e pere in pezzi per i lattici fermentati come lo yogurt. Il congelamento e la successiva pastorizzazione cui viene sottoposta la frutta al momento della raccolta e della produzione

possono arrecare danni alla struttura del frutto per distruzione dei tessuti cellulari e perdita di turgore con scadimento delle caratteristiche fisico-chimiche ed organolettiche. La tecnica di 'vacuum infusion' (rimozione dell'aria dai tessuti vegetali e infusione di sostanze polifunzionali- alginati e saccarosio - per trasferimento idrodinamico) applicata alla frutta prima del congelamento serve a ridurre i danni funzionali arrecati dai trattamenti di stabilizzazione e permette di migliorare la consistenza della frutta in pezzi anche dopo l'aggiunta allo yogurt (Cattaneo et al., 2002).

### **1.9 RUOLO DEL SACCAROSIO NELLA DIETA**

Il saccarosio è chimicamente classificato come un carboidrato; in particolare è un disaccaride composto da glucosio e fruttosio. Il suo nome scientifico è beta-D-fructofuranosyl-alfa-D-glucopiranoside. Come tutti i carboidrati, è bruciato (ossidato) nel corpo per produrre energia, espressa come 16 kJ/g. Questa energia è solo la metà di quella prodotta da un grammo di grasso (37 kJ/g) ed molto inferiore a quella fornita dall'alcool (29 kJ/g). I carboidrati nella dieta, tra cui il saccarosio, hanno quattro destini metabolici principali:

- (1) ossidazione nei tessuti, principalmente come molecole di glucosio
- (2) formazione di glicogeno nel fegato e nei muscoli
- (3) conservazione come triacilglicerolo (TAG), principalmente nel fegato
- (4) conversione di glucosio nel fegato come precursori C3 utilizzati come substrato per la gluconeogenesi.

Nell'arco di 4 ore dopo un pasto tipico, la quantità di carboidrati assunti supera di gran lunga la quantità di glucosio che può essere ossidato nelle cellule. Come risultato, la maggior parte del glucosio è immagazzinato come glicogeno nel fegato e nei muscoli scheletrici ed è successivamente rilasciato e ossidato nelle 12 h successive all'assunzione.

Il saccarosio svolge un ruolo unico nella dieta. Soddisfa il desiderio istintuale per il gusto della dolcezza e contribuisce a fornire, nelle diete occidentali, una media del 10% di energia. Negli alimenti ha molti ruoli funzionali: modifica la conservazione, la composizione, il sapore e quindi la qualità dei cibi. Ha, purtroppo, una cattiva reputazione: in passato, il saccarosio raffinato è stato indicato come causa di diabete, sovrappeso, malattie cardiache, carenze di micronutrienti e anche di iperattività nei bambini. Nell'ultimo decennio, invece, un gran numero di nuove ricerche, indicano il contrario (Glinnsmann *et al.*, 1986). Oggi il consumo di saccarosio raffinato è realmente molto più basso di quello stimato (45-65 g al giorno invece di 125 g al giorno nei paesi industrializzati), e l'assunzione di zuccheri è inversamente correlata al contenuto di grassi della dieta (maggiore è l'assunzione di zucchero, minore è quella di grasso). Inoltre, l'assunzione moderata di zuccheri è associata a un più alto apporto di micronutrienti e gli alimenti contenenti saccarosio non aumentano il livello di glucosio nel plasma più di quanto non facciano i cibi amidacei.

Il saccarosio raffinato è aggiunto agli alimenti per diversi motivi, oltre che per la sua dolcezza. Le difficoltà insite nella produzione di prodotti a bassa carica energetica con edulcoranti intensi attestano le migliori prerogative del saccarosio. Ad esempio, contribuisce alla tessitura di torte e biscotti e fornisce viscosità in bocca se presente in bevande analcoliche e succhi di frutta. E' anche un potente conservante e contribuisce alla lunga conservazione di confetture e dolci. Nei prodotti surgelati come gelati, ha molteplici funzioni: agisce come un

emulsionante, impedendo la separazione dell'acqua e delle fasi di grasso, abbassa il punto di congelamento, in modo da rendere il prodotto più liquido e 'cremoso'. La presenza di saccarosio ritarda la cristallizzazione del lattosio negli alimenti lattiero-caseari e nel cioccolato al latte (minuscoli cristalli di lattosio forniscono una sensazione di 'sabbiosità'). Nelle conserve di frutta, gli sciroppi di saccarosio sono utilizzati per prevenire il rammollimento causato dal movimento osmotico dello zucchero della frutta. Sciroppi di zucchero, sono utilizzati come vettori per farmaci e medicinali, soprattutto per i bambini che non possono assumere formulazioni compresse. Nei prodotti come lo yogurt e il caffè, maschera l'acidità o l'amaro mentre nei succhi di frutta e negli sciroppi equilibra il rapporto zucchero-acido. Infine, il saccarosio è un substrato per le fermentazioni (nei processi di panificazione e produzione della birra), ma in tal caso è convertito in alcool e altri prodotti. Per tutte queste ragioni, quando si progetta un prodotto a basso contenuto di zucchero, dovrebbero essere aggiunte altresì numerose sostanze per ricoprire tutti i ruoli che il saccarosio eseguirebbe da solo (Brand-Miller, 2005).

---

***CAPITOLO 2***  
***SCOPO DELLA TESI***

---

I recenti dati pubblicati su antiossidanti alimentari e su particolari sostanze protettive presenti nei prodotti vegetali, inducono sempre più i consumatori ad attribuire importanza al tipo di alimenti da prediligere e, quindi, a seguire una dieta corretta. Gli alimenti funzionali sono evidenze tangibili dell'aumentato interesse presso i consumatori odierni per ciò che riguarda il rapporto tra alimentazione e salute. Tra gli alimenti funzionali vi sono i prodotti naturali vegetali che contengono componenti biologicamente attivi. I petali di rosa sono un esempio. Data la loro ricchezza in principi attivi come polifenoli e antociani (Kumar et al., 2008), sono stati scelti per la realizzazione di un nuovo ingrediente alimentare suscettibile di sviluppi interessanti.

Lo studio compiuto ai fini della presente tesi di dottorato è stato svolto presso l'Unità di Ricerca per i processi dell'industria agroalimentare di Milano afferente al Consiglio per la Ricerca in Agricoltura (CRA-IAA) in collaborazione con l'Università degli Studi di Milano (Dipartimento di Scienze Farmacologiche). Per l'interdisciplinarietà delle tematiche condotte, lo studio ha previsto anche il contributo della sezione di Microbiologia del Centro di Ricerca per le produzioni foraggere e lattiero-casearie (CRA-FLC) di Lodi.

Le indagini intraprese hanno inizialmente riguardato la caratterizzazione chimico-nutrizionale dei petali di diverse cultivar di rosa appartenenti ai gruppi 'Rose inglesi', 'Rose coprisuolo' e 'Rose antiche' tutte coltivate biologicamente. La scelta di tali cultivar di rosa si è basata sulla valutazione della loro capacità di resistenza alle principali avversità biotiche ed abiotiche tipiche di questo fiore, permettendo una crescita spontanea senza interventi da parte dell'uomo quali irrigazione, potatura, e trattamenti fitosanitari. Queste caratteristiche garantirebbero la produzione di un alimento biologico e, valutando una realtà più estesa rispetto a quella da noi considerata, permetterebbe di costituire una filiera produttiva, intesa come concatenazione di soggetti interessati, in grado di moltiplicare le disponibilità attuali di materia prima di alcuni ordini. Altre caratteristiche che hanno decretato la scelta delle cultivar d'interesse sono state la profumazione caratteristica e la ricchezza in pigmenti antocianici.

Gli studi di caratterizzazione della materia prima (carboidrati solubili, acidi organici, vitamina C, pigmenti, polifenoli totali, attività antiossidante), hanno permesso di individuare le cultivar più idonee, in termini nutrizionali e tecnologici, per la trasformazione dei loro petali in semilavorato idoneo alla formulazione di yogurt commerciali. Da un punto di vista nutrizionale lo yogurt di per sé è ritenuto un alimento adatto alla dieta giornaliera per il suo contenuto in sali minerali (calcio), vitamine del gruppo B e proteine facilmente assimilabili grazie alla presenza di fermenti lattici attivi. Nel recente passato, il segmento commerciale dello yogurt si è sviluppato a ritmi sostenuti, favorito dalla destrutturazione dei pasti, dalla riduzione del tempo dedicato alla prima colazione, dall'emergere di una cultura alimentare che apprezza il ridotto contenuto calorico e le proprietà salutistiche del prodotto. Il consumatore tipico di yogurt si caratterizza per una scarsa fidelizzazione verso le singole marche ed una elevata propensione alle innovazioni di prodotto. Attualmente non esistono in letteratura studi riguardanti le proprietà chimiche e biochimiche di preparati, ottenuti dalla lavorazione di matrici floricole e non dai loro estratti, utilizzabili in prodotti lattiero-caseari di largo consumo.

L'obiettivo finale della presente ricerca, pertanto, è stato quello di formulare un nuovo ingrediente o semilavorato per yogurt a base di petali di rosa dotato di proprietà sensoriali originali (sapore/profumo naturale) e naturalmente caratterizzato dalla presenza di sostanze bioattive proprie della matrice floricola.



I petali di rosa delle cultivar prescelte sono stati trasformati in miscela-base seguendo una 'ricetta' appositamente studiata per la matrice fiore. Nello studio di formulazione di questo nuovo ingrediente, il processo tecnologico ha svolto un ruolo fondamentale specialmente nella fase di scelta della qualità e quantità del materiale di partenza e dei coadiuvanti tecnologici (zucchero, correttori di acidità) utilizzati nella miscela-base. Tale ruolo chiave si è ripresentato con forza anche nella fase di stabilizzazione della miscela, con l'adozione di idonei protocolli termici. La miscela stabilizzata è inserita in condizioni di sterilità in uno yogurt commerciale, è stata sottoposta a controlli microbiologici durante la *shelf-life* per poterne garantire la sicurezza alimentare. Sulla miscela originaria e su quella stabilizzata con il calore, sono state condotte le determinazioni delle sostanze bio-attive (polifenoli e antociani totali) per indagare sulla funzionalità del preparato che, data l'originalità e l'impiego considerato non ancora convenzionale, deve rispondere a criteri tecnologici predefiniti, dettati dalle esigenze di una possibile produzione industriale sostenibile.

---

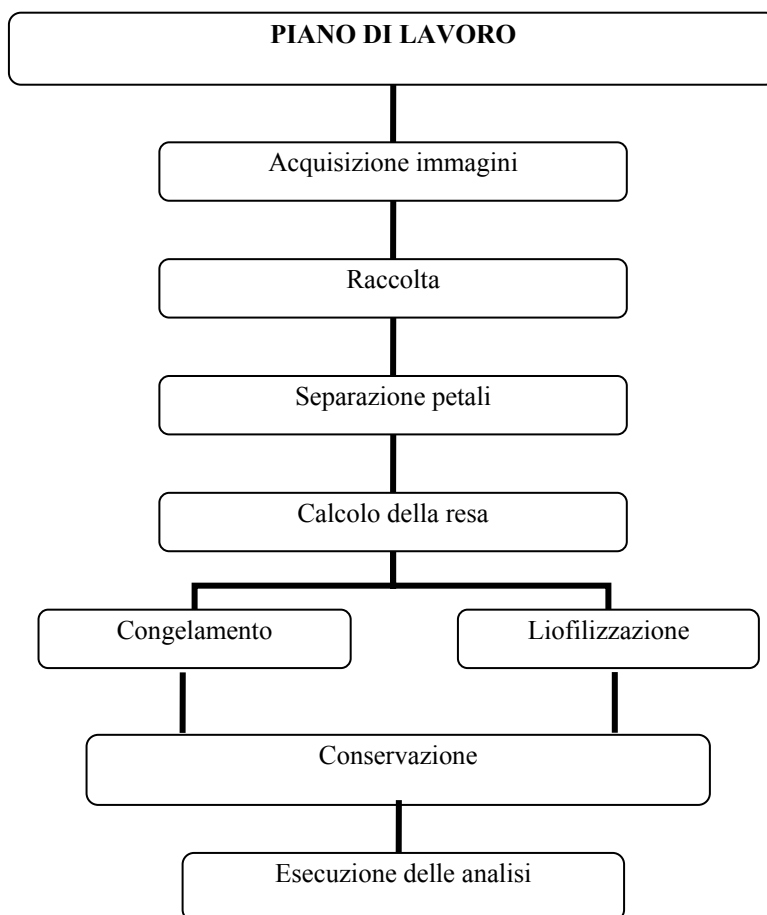
***CAPITOLO 3***  
***MATERIALI E METODI***

---

### **3.1 PIANO SPERIMENTALE PER LA VALUTAZIONE DELLA MATERIA PRIMA**

Le cultivar di rose analizzate sono state raccolte in tre località differenti e appartengono a specie diverse. Si rimanda al capitolo “4.1 Campionamento delle cultivar analizzate” per la spiegazione dettagliata.

Il diagramma di flusso presentato in figura 18 indica i passaggi effettuati dalla raccolta del fiore fino alla sua conservazione, per l’esecuzione delle analisi successive.



**Figura 10 Diagramma di flusso rappresentante gli step eseguiti per la pianificazione del lavoro**

I fiori prelevati sono stati trasportati in contenitori isotermici dal sito di raccolta al laboratorio, facendo attenzione di mantenere separati fisicamente i fiori dalle piastre produttrici di freddo, in quanto una forte escursione termica potrebbe danneggiare il fiore portandolo ad una veloce senescenza per disidratazione superficiale (*freeze burn*).

In laboratorio, i petali sono stati divisi dal resto del fiore e sono stati successivamente conservati con due metodi differenti:

- 1) congelamento sottovuoto;
- 2) liofilizzazione.

Per il primo metodo, i petali sono stati pesati e conservati in sacchetti di PET sottovuoto e congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$ , permettendo la conservazione del campione tal quale. Questi sono stati successivamente utilizzati per le analisi chimiche di base e compositive mirate quali pH, acidità titolabile, contenuto in solidi solubili (SSC), composizione in carboidrati solubili (glucosio, fruttosio) e acidi organici (chinico, malico, fumarico, seichimico).

Per il secondo metodo, i petali di rosa sono stati messi in sacchetti di plastica atti al congelamento, pesati ed etichettati, quindi, sono stati posti in liofilizzatore (CHRIST ALPHA 1-4LSC) per 12 ore. Questo trattamento permette di disidratare il campione attraverso due fasi:

- dapprima il prodotto viene congelato a temperature molto basse, circa  $-60^{\circ}\text{C}$ , trasformando l'acqua presente nelle rose, in ghiaccio;
- successivamente, l'applicazione dell'alto vuoto (0,011mBar) congiuntamente ad un brusco riscaldamento a temperature moderate, permette la trasformazione del ghiaccio direttamente in vapore (sublimazione); il vapore poi viene allontanato con l'ausilio di una pompa aspirante.

Il prodotto disidratato è stato successivamente ripesato, ridotto in polvere, condizionato e conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Il campione liofilizzato è stato utilizzato per le analisi di tipo biochimico quali la valutazione dei polifenoli totali, della vitamina C e dell'attività antiradicalica mediante test di abbattimento dei radicali stabilizzati DPPH e sale di Fremy. Per queste analisi viene utilizzato il campione liofilizzato in quanto questo metodo di conservazione ha il vantaggio, rispetto a quello precedente, di assicurare il mantenimento delle caratteristiche del prodotto originario.

## **3.2. STRUMENTAZIONE**

### **3.2.1 HPLC**

Per le analisi degli acidi organici e della vitamina C è stata utilizzata l'apparecchiatura HPLC Jasco, composta dalle seguenti parti:

- a) **Pompa**: JASCO PU-980 Intelligent HPLC Pump, a una via per analisi isocratica.
- b) **Autocampionatore termostato**: JASCO AS-1555-10 Intelligent Sampler, costituito da un rack portacampioni, contenente fino a 50 *vials* da 2 ml, e da un sistema di aspirazione ad ago formato da un braccio meccanico che preleva il volume di campione desiderato per poi iniettarlo nel *loop*. Il termostato del supporto contenente le *vials* assicura il mantenimento della temperatura impostata.
- c) **Modulo termostato per la colonna**: JASCO CO-1560 Intelligent Column Thermostat.
- d) **Rivelatore**: JASCO UV-Vis Detector.
- e) **Fase mobile**: acido orto fosforico 0,02M.

Per le analisi dei carboidrati solubili, è stata utilizzata l'apparecchiatura HPLC Jasco, avente la stessa componentistica dell'HPLC precedente, ma con alcune variabili:

- a) **Pompa**: JASCO 880-PU Intelligent HPLC Pump, a una via per analisi isocratica.
- b) **Autocampionatore**: JASCO AS-1555 Intelligent Sampler, non termostato.
- c) **Modulo termostato per la colonna**: JONES CHROMATOGRAPHY.
- d) **Rivelatore**: JASCO RI-930 Intelligent RI Detector.

- e) **Fase mobile** acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,002M.

### **3.2.2 Spettrofotometro**

Per testare l'attività antiradicalica attraverso il test del DPPH e per valutare il contenuto dei polifenoli totali nel campione, è stato utilizzato lo spettrofotometro mod. JASCO, UVIDEK-320, composto dalle seguenti parti:

- a) **Sorgente:** lampada a filamento di tungsteno, che copre l'intervallo di lunghezze d'onda da 930 a 330 nm.
- b) **Monocromatore:** in cui filtri ottici assorbono una parte delle componenti spettrali della radiazione incidente e ne trasmettono una gamma più o meno ampia.
- c) **Comparto celle:** essendo uno spettrofotometro doppio raggio, ha due celle: una per il campione, l'altra per il bianco. Il raggio uscente dal monocromatore viene infatti sdoppiato e inviato alle due cuvette. Quest'ultime sono in quarzo, hanno una forma a parallelepipedo a sezione quadrata, con cammino ottico di un cm.
- d) **Rivelatore:** trasforma l'energia radiante in segnale elettrico, successivamente trasferito ad un sistema di elaborazione del segnale.

### **3.2.3 EPR**

La Risonanza Paramagnetica Elettronica, nota come EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*), è una tecnica spettroscopica impiegata per individuare e analizzare specie chimiche contenenti uno o più elettroni spaiati, quali sono ad esempio i radicali. Un elettrone spaiato ha uno spin di +1/2 o -1/2 e si comporta come un piccolo magnete. Se viene esposto ad un campo magnetico esterno, può disporsi, rispetto ad esso, sia in direzione parallela che inversa, ed avere quindi due possibili livelli energetici. La spettroscopia EPR si basa sull'assorbimento di microonde da parte di un campione sottoposto ad un campo magnetico, comportando la promozione dell'elettrone spaiato ad un più alto livello energetico, fino a raggiungere un valore di risonanza con le microonde. Si generano così delle bande di assorbimento caratteristiche in grado di fornire informazioni utili circa la natura e la struttura dei radicali presenti nel sistema.

L'EPR mod. MiniScope MS 200 Magnetech (Berlin, German) è stato utilizzato per testare l'attività antiradicalica attraverso il test del sale di Fremy. I parametri fondamentali da modulare al momento dell'analisi per una buona rivelazione dei radicali presenti sono:

- a) **Magnetic field:** è il valore del campo magnetico in cui si ha la massima rivelazione della molecola in esame. L'unità di misura è il Gauss (G);
- b) **Sweep:** è l'intervallo entro il quale viene effettuata la scansione dell'analisi;
- c) **Sweep time:** è il tempo necessario per effettuare l'analisi;
- d) **Modulation amplitude:** è la modulazione dell'ampiezza del segnale;
- e) **Microwave power:** caratterizza l'attenuazione del rumore di fondo ed è espressa in dB;
- f) **Gain:** permette l'amplificazione del segnale registrato.

### **3.3 ANALISI CHIMICO-FISICHE SULLA MATERIA PRIMA**

#### **3.3.1 Contenuto in solidi solubili (SSC)**

La valutazione del residuo secco rifrattometrico con rifrattometro (mod. RFM 81), permette di stabilire la concentrazione di solidi solubili presenti, assimilabili al tenore in zuccheri, espresso in gradi Brix (°Bx).

- **Trattamento dei campioni**

Per effettuare una singola analisi è stato seguito il metodo di Nakamura et al., (2006):

- a) pesare 10 g di petali congelati sottovuoto;
- b) pestare i petali in mortaio per permettere la riduzione del loro volume e la fuoriuscita del succo;
- c) porre il preparato così ottenuto in provetta e sistemare in centrifuga refrigerata a 4°C a 12000g/min per 15 minuti. Il raffreddamento della centrifuga permette una migliore conservazione del preparato.
- d) aspirare il liquido ottenuto e porlo in provetta.

- **Esecuzione dell'analisi**

Calibrare il rifrattometro mettendo una goccia di H<sub>2</sub>O distillata sul lettore ottico. Effettuare l'analisi del campione a temperatura ambiente ponendo una goccia di succo sul lettore coprendo totalmente la lente.

Per ogni campione sono state effettuate due ripetizioni.

#### **3.3.2 pH e acidità titolabile (TA)**

Il pH è stato misurato con pH-metro (Metrohm 649) mentre l'acidità titolabile è stata rilevata mediante titolatore automatico (682 Titroprocessor) con NaOH 0,1M fino a pH 8,20.

- **Trattamento dei campioni**

Il campione è stato preparato con la stessa metodica utilizzata per l'esecuzione dell'analisi del residuo secco rifrattometrico.

- **Esecuzione dell'analisi**

- a) Calibrare lo strumento mediante i tamponi a pH 4 e 7
- b) Prelevare 2mL di succo di rosa e portare a volume a 150mL con H<sub>2</sub>O distillata.
- c) Eseguire l'analisi mantenendo il campione diluito in continua agitazione.

Per ogni campione sono state effettuate due ripetizioni.

### **3.3.3 Acidi organici**

Gli acidi organici sono stati determinati secondo il metodo di Hudina e Stampar (Hudina *et al.*, 2006) e analizzati con l'HPLC Jasco.

#### **Trattamento dei campioni**

- a) Pesare 5g di petali, congelati sottovuoto, in provetta da centrifuga e aggiungere 15mL di H<sub>2</sub>O distillata;
- b) Triturare con Ultra-turrax per circa 1 minuto fino ad ottenere un composto omogeneo; facendo attenzione a pulire bene la lama al termine dell'operazione per non perdere parte del campione;
- c) Centrifugare a temperatura ambiente a 6000g/min per 15 minuti;
- d) Filtrare il surnatante con filtro (Chromacol LTD) a porosità 0,45µm. Il prodotto così ottenuto è stato diluito 5 volte (200µL di campione con 800 µL di fase mobile acido ortofosforico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,02M).

#### **Soluzioni standard**

- a) Preparare singole soluzioni madre di acido chinico, malico e citrico allo 0,01%
- b) Preparare singole soluzioni madre di acido scichimico allo 0,001%
- c) Effettuare le diluizioni come mostrato in tabella 9:

**Tabella 9 Diluizioni acidi organici standard**

<b>Acido standard</b>	<b>Diluizioni (n°volte)</b>
Chinico, malico, citrico	5
	2
	1
Ossalico, scichimico	10
	5
	2
	1

#### **Preparazione della fase mobile acido orto fosforico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,02M**

- a) Prelevare 1,3 mL di H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% e portare a volume a 1L con H<sub>2</sub>O bidistillata.
- b) Far degasare con pompa a vuoto

#### **Condizioni di lavoro**

- a) Colonna: Inertsil ODS-3 (diametro particelle 5µL)
- b) Dimensioni colonna: 0,46x25cm
- c) Velocità del flusso: 0,7 mL/min;
- d) Pressione della colonna: 80 kg/cm<sup>2</sup>;
- e) Lunghezza d'onda: 214 nm;
- f) Volume d'iniezione: 20µL;

- g) Temperatura della colonna: 30°C;
- h) Temperatura dell'autocampionatore: 4°C;
- i) Tempo di corsa: 40 minuti.

### **3.3.4 Carboidrati solubili**

I carboidrati solubili sono stati determinati apportando opportune modifiche al metodo di Norikoshi *et al.*, 2008, e sono stati successivamente rivelati con l'HPLC (Jasco).

#### **• Trattamento campioni**

- a) Pesare 0,2g di petali congelati sottovuoto, e tagliarli in frammenti di circa 5mm;
- b) Porli in un piccolo pallone e aggiungere 2mL di etanolo e 50µL di standard interno trealosio 5%;
- c) Posizionare i palloni in bagno termostato a 70°C e far evaporare per 20 minuti esatti. Evaporeranno 1,5mL del liquido presente nel pallone.
- d) Prelevare i petali con un'ansa e porli in provetta da centrifuga. La soluzione rimanente all'interno del pallone (circa 0,5mL) costituisce la soluzione A.
- e) Nella provetta contenente i petali aggiungere 0,5mL di etanolo, omogeneizzare con vortex e centrifugare a 12000g/min per 10 minuti a 20°C;
- f) Prelevare il surnatante e aggiungerlo alla soluzione A, si ottiene così la soluzione B.
- g) Ripetere l'operazione aggiungendo nuovamente 0,5mL di etanolo alla provetta contenente i petali, omogeneizzare con vortex e centrifugare a 12000g/min per 10 minuti.
- h) Prelevare il surnatante e aggiungerlo alla soluzione B, ottenendo la soluzione C.
- i) Porre il pallone in bagno termostato a 80°C fino a *dryness*.
- j) Dissolvere l'evaporato in 1mL di H<sub>2</sub>O bidistillata, omogeneizzare con vortex e filtrare con filtri (Chromacol LTD) a porosità 0,45µm. L'estratto è stato diluito 5 volte (200µL di campione con 800 µL di H<sub>2</sub>O bi distillata) prima della lettura in HPLC.



- **Soluzioni standard**

- Preparare le soluzioni standard di glucosio e fruttosio alle seguenti concentrazioni: 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 1%.
- Preparare una soluzione madre di trealosio al 5% (standard interno).
- Effettuare le diluizioni per ciascuna vial come mostrato in tabella 10:

**Tabella 10 Diluizioni delle soluzioni standard di glucosio, fruttosio e trealosio**

N° vial	Glucosio	Fruttosio	Trealosio	H <sub>2</sub> O bidistillata
1	200µL 0,1%	-	200µL 0,2%	600µL
2	200µL 0,2%	-	200µL 0,2%	600µL
3	200µL 0,3%	-	200µL 0,2%	600µL
4	200µL 0,4%	-	200µL 0,2%	600µL
5	200µL 0,5%	-	200µL 0,2%	600µL
6	200µL 1%	-	200µL 0,2%	600µL
7	-	200µL 0,1%	200µL 0,2%	600µL
8	-	200µL 0,2%	200µL 0,2%	600µL
9	-	200µL 0,3%	200µL 0,2%	600µL
10	-	200µL 0,4%	200µL 0,2%	600µL
11	-	200µL 0,5%	200µL 0,2%	600µL
12	-	200µL 1%	200µL 0,2%	600µL

- Eseguire la lettura in HPLC

- **Preparazione della fase mobile acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,002M**

- Prelevare 2 mL di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N e portare a volume a 1L con H<sub>2</sub>O bidistillata.
- Far degasare con pompa a vuoto

- **Condizioni di lavoro**

- Colonna: Polyspher® OA- HY (Merck)
- Dimensioni colonna: 0,46x25cm
- Velocità del flusso: 0,45 mL/min;
- Pressione della colonna: 70kg/cm<sup>2</sup>
- Volume d'iniezione: 20µL;
- Temperatura della colonna: 45°C;
- Temperatura dell'autocampionatore: ambiente;
- Tempo di corsa: 15 minuti.

### **3.4 ANALISI BIOCHIMICHE E ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE IN VITRO SULLA MATERIA PRIMA**

#### **3.4.1 Vitamina C totale**

La vitamina C totale è stata estratta secondo i metodi di Davey *et al.*, 2003 e di Helsper *et al.*, 2003 e successivamente dosata con l'HPLC (Jasco).

##### **• Trattamento campioni**

- a) Pesare in *Eppendorf tube* 0,03g di rose liofilizzate per ciascun campione (3 ripetizioni per ogni campione);
- b) Aggiungere in ciascuna *Eppendorf tube* 1mL di acido metafosforico al 6%;
- c) Omogeneizzare con vortex per circa 2 minuti e porre in centrifuga Microfuge E™ per 15 minuti a 6000g/min;
- d) Prelevare il surnatante e metterlo in altre *Eppendorf tube*. Si ottiene l'estratto di acido ascorbico (AA);
- e) Nel campione la vitamina C è presente sotto 2 forme: acido ascorbico (AA) e acido deidroascorbico (DHA). Per rilevare la vitamina C totale (AA+DHA) prelevare 100µL di estratto di AA e farlo reagire, direttamente in vial ambrate, con 100µL di reattivo stock solution 200mM Ditiotreitolo in 400mM Tris-idrossimetil-amminometano. Far riposare per 15 minuti a circa 4°C. Per bloccare la reazione aggiungere 800µL di acido ortofosforico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,02M (fase mobile). Si ottiene così il campione di vitamina C totale da iniettare in HPLC.

##### **• Preparazione del reattivo acido metafosforico 6%**

- a) Pesare 3g di acido metafosforico in un becker;
- b) Aggiungere 15 mL di H<sub>2</sub>O distillata;
- c) Porre in agitazione fino a scioglimento completo;
- d) Trasferire in matraccio da 50 mL e portare a volume.

##### **• Preparazione del reattivo stock solution DTT+Tris base**

- a) Pesare 0,308 g di DTT (Ditiotreitolo) 1mM
- b) Pesare 0,484 g di Tris base (Tris-idrossimetil-amminometano) 1mM
- c) Portare a volume in un unico matraccio da 10 mL. Si ottiene così il DTT alla concentrazione di 200mM e il Tris base a 400mM.

##### **• Soluzione standard acido ascorbico 0,04%**

Effettuare le diluizioni per ciascuna vial come mostrato in tabella 11:

**Tabella 11 Diluizioni per lo standard di acido ascorbico**

n° vial	Diluizione	Standard ascorbico 0,04%	Reattivo DTT+Tris base	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,02M (fase mobile)
1	20	50µL	50µL	900µL
2	200	5µL	5µL	990µL

La fase mobile viene aggiunta dopo la reazione per 15 minuti a 4°C, dell'acido ascorbico con DTT+Tris base.

- **Preparazione della fase mobile acido ortofosforico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,02M**

- a) Prelevare 1,3 mL di H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% e portare a volume a 1L con H<sub>2</sub>O bidistillata.
- b) Far degasare con pompa a vuoto

- **Condizioni di lavoro**

- a) Colonna: Inertsil ODS-3 (diametro particelle 5µL)
- b) Dimensioni colonna: 0,46x25cm
- c) Velocità del flusso: 0,7 mL/min;
- d) Pressione della colonna: 80 kg/cm<sup>2</sup>;
- e) Lunghezza d'onda: 254 nm;
- f) Volume d'iniezione: 20µL;
- g) Temperatura della colonna: 30°C;
- h) Temperatura dell'autocampionatore: 4°C;
- i) Tempo di corsa: 20 minuti.

### **3.4.2 Polifenoli totali**

I polifenoli totali sono stati dosati apportando alcune modifiche al metodo Folin-Ciocalteu descritto da Singleton *et al.*, 1999. Esso si basa sull'ossidazione dei gruppi fenolici da parte del reagente Folin, costituito da una miscela di acidi fosfotungstico e fosfomolibdico. La lettura è stata effettuata con spettrofotometro Jasco UVIDEDEC-320 e la quantificazione mediante retta di calibrazione con standard di acido gallico.

I polifenoli totali sono stati dosati estraendo i campioni con due metodi diversi:

- Estratto tal quale
- Estratto della sola frazione idrofilica

Ciò è stato effettuato in quanto è possibile che il diverso contributo della frazione idrofilica e lipofila che caratterizzano la matrice e la differente solubilità delle due frazioni possa interferire con le misure strumentali (Arranz *et al.*, 2008).

- **Estrazione campione tal quale**

- a) Pesare in *Eppendorf tube* 0,03g di rose liofilizzate per ciascun campione (2 ripetizioni per ogni campione);
- b) Aggiungere in ciascuna *Eppendorf tube* 1mL di soluzione estraente di H<sub>2</sub>O:HCl 0,5mN pH 3;
- c) Omogeneizzare con vortex per circa 2 minuti e porre in centrifuga Microfuge E<sup>TM</sup> a 6000 g/min per 10 minuti;
- d) Prelevare il surnatante e porlo in altre *Eppendorf tube*.

• **Estrazione campione frazione idrofilica**

- a) Pesare in *Eppendorf tube* 0,03g di rose liofilizzate per ciascun campione (2 ripetizioni per ogni campione);
- b) Estrarre la frazione idrofilica aggiungendo in ciascuna *Eppendorf tube* 1mL di soluzione CHCl<sub>3</sub>:MeOH (70:30 v/v);
- c) Omogeneizzare con vortex per circa 2 minuti e porre in centrifuga Microfuge E<sup>TM</sup> a 6000 g/min per 10 minuti;
- d) Rimuovere il surnatante; chiudere le *Eppendorf tube* con carta da filtro e far evaporare il solvente residuo sotto pressione a temperatura ambiente per circa 1 ora.
- e) Il residuo secco così formato è stato poi trattato come descritto nel punto precedente “Estrazione campione tal quale”.

• **Preparazione standard acido gallico 0,08%**

Effettuare le diluizioni per ciascuna *Eppendorf tube* come mostrato in tabella 12:

**Tabella 12** Diluizioni per lo standard di acido gallico

N° <i>Eppendorf tube</i>	Diluizione	Standard acido gallico 0,08%	H <sub>2</sub> O:HCl 0,5mN (soluzione estraente)
1	10	100µL	900µL
2	5	200µL	800µL
3	2	500µL	500µL

• **Esecuzione dell’analisi**

In provetta mettere:

- a) 10mL H<sub>2</sub>O distillata;
- b) 300µL di campione diluito di un fattore 6 (50µL campione + 250µL soluzione estraente H<sub>2</sub>O:HCl 0,5mN);  
300µL di standard di acido gallico alle varie diluizioni e concentrazione madre;  
300µL di soluzione estraente per il bianco;
- c) 2 mL di reattivo Folin. Mescolare;
- d) 4 mL di soluzione acquosa Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%. Mescolare;
- e) Far riposare al buio per 90 minuti;
- f) Effettuare l’analisi misurando l’assorbanza a 730nm.

La lettura effettuata rappresenta la quantità di polifenoli totali presenti nel campione rispetto al bianco (assenza di molecole polifenoliche), successivamente espressa in mgGAE/g. Lo standard utilizzato è l’acido gallico, un acido organico avente attività antiossidante, presente nei petali di rosa (Vinokur et al., 2006). Il risultato finale è espresso in mgGAE/g, ovvero mg di Equivalenti di Acido Gallico/g perché il valore analitico fa riferimento all’utilizzo dell’acido gallico come unico standard, per indicare l’attività antiossidante di tutte le molecole antiradicali che presenti nel campione.

### 3.4.3 Antociani totali

Per la determinazione degli antociani totali contenuti nei petali di alcune delle cultivar campionate (vedi paragrafo del capitolo 5 dei risultati), è stato utilizzato il metodo del pH differenziale a pH 1 e a pH 4.5.

Sono stati preparati i seguenti reagenti:

- TAMPONE POTASSIO CLORIDRATO (pH=1): 1,86g KCl in 980 mL di acqua distillata, corretto a pH=1 con l'aggiunta di HCl concentrato
- TAMPONE SODIO ACETATO (pH=4.5): 54,43g di CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na·3H<sub>2</sub>O in 960 mL di acqua distillata, corretto a pH=4.5 con l'aggiunta di HCl concentrato.
- **Estrazione campione tal quale**
- Per l'estrazione degli antociani totali dai petali liofilizzati delle cultivar considerate, sono state impiegate due soluzioni estraenti (H<sub>2</sub>O/HCl 0.5 mN pH=3 e MeOH/HCl (98:2, v/v)).
- 0,075 g di petali liofilizzati sono stati quindi estratti con 1,5 ml di soluzione estraente; dopo omogeneizzazione con vortex per circa 2 minuti i campioni (3 ripetizioni per campione) sono stati centrifugati con Microfuge E<sup>TM</sup> a 6000 g/min per 10 minuti;
- Il surnatante è stato prelevato per l'esecuzione dell'analisi
- **Esecuzione dell'analisi**

L'analisi colorimetrica è stata condotta mediante spettrofotometro VARIAN (modello Cary 50 Scan, Palo alto, California, U.S.A.) presso il laboratorio della sezione di Chimica e Tossicologia degli alimenti del Dipartimento di Scienze Farmacologiche di Milano.

1 ml di campione estratto veniva miscelato con acqua distillata in un matraccio da 5 ml. Due aliquote da 1 ml ciascuna, venivano trasferite in matracci da 5 ml portandole, poi, rispettivamente a volume, con i tamponi a pH=1 e a pH=4.5; dopo 30 minuti, la differenza di assorbanza delle due rispettive soluzioni veniva letta a 520 nm. Poiché il composto cianidina-3-glucoside (Cyd-3-glu) è una delle sostanze antocianiche presenti nei fiori di rosa (Mikanagi *et al.*, 2000), la concentrazione in antociani totali, espressa in mg/ml, veniva calcolata secondo l'equazione (1):

$$\text{CAT (mg/ml)} = \Delta A \cdot \text{MW} \cdot \text{DF} \cdot 10^3 \cdot \epsilon^{-1} \quad (1)$$

dove

CAT=contenuto in antociani totali

A=(A<sub>520</sub>)<sub>pH1</sub>-(A<sub>520</sub>)<sub>pH4.5</sub>

MW= peso molecolare di Cyd-3-glu (449,2g/mol)

DF= è il fattore di diluizione utilizzato (1:5)

ε= coefficiente di estinzione molare di Cyd-3-glu (26900 L x mol<sup>-1</sup>)

Il contenuto in antociani totali (CAT) è stato poi espresso in mg di Cyd-3-glu per g di prodotto (mg Cyd-3-glu/g p.s.).

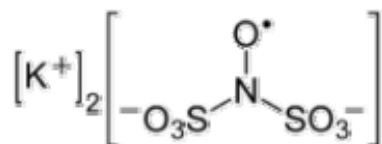
### **3.4.4 Test antiossidanti: sale di Fremy e DPPH**

Per determinare il potenziale antiossidante dei petali di rosa sono stati applicati due metodi: il test del sale di Fremy (radicale nitrosodisolfonato di potassio) e il test del DPPH• (radicale 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl). Tali analisi differiscono fra loro per le condizioni sperimentali, ed hanno come principio comune la generazione di un radicale e lo studio dell'inibizione di questo in seguito all'introduzione del composto in esame.

Anche in questo caso, come per i polifenoli totali, le analisi sono state effettuate sui campioni estratti tal quali e sui campioni in cui è stata estratta la sola frazione idrofilica.

#### **1. Test del sale di Fremy**

Il sale di Fremy è anche conosciuto come potassio nitroso disolfonato  $K_2NO'(SO_3)_2$  ed ha la seguente struttura:



Il sale di Fremy analizzato all'EPR determina uno spettro caratteristico a tre picchi di uguale intensità nell'intorno dei 3300 Gauss (G).

La lettura è stata effettuata con EPR mod. MiniScope MS 200 Magnettech (Berlin, German) seguendo il metodo di Lo Scalzo *et al.*, 2007 e la quantificazione mediante retta di calibrazione con standard di acido gallico.

- **Estrazione campione tal quale**

Vedi paragrafo “3.4.2 Polifenoli totali”.

- **Estrazione campione frazione idrofilica**

Vedi paragrafo “3.4.2 Polifenoli totali”.

- **Preparazione standard acido gallico 0,1%**

Effettuare le diluizioni in provetta come mostrato in tabella 13:

**Tabella 13 Diluizione dello standard di acido gallico**

N° provetta	Diluizione	Standard acido gallico	H <sub>2</sub> O:HCl 0,5mN (soluzione estraente)
1	5	200µL	0,8mL
2	10	200µL	1,8mL
3	20	100µL	1,900mL
4	40	50µL	1,950mL
5	50	50µL	2,450mL
6	100	20µL	1,980mL
7	200	20µL	3,980mL

- **Preparazione tampone fosfato 0,1M**

- Pesare 2,30g di idrogeno fosfato disodico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ );
- Pesare 0,52g di idrogeno fosfato disodico monoidrato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ );
- Portare a volume in un unico matraccio da 200mL. Si ottiene così una soluzione di tampone fosfato 0,1M.

Il pH della soluzione è 7,4 ed è fondamentale che sia stabile in quanto una sua variazione comporta errore di analisi, essendo il sale di Fremy molto suscettibile a questo parametro.

- **Preparazione soluzione sale di Fremy 1mM**

Pesare 2,6834mg di sale di Fremy e portare a volume in matraccio da 10mL con tampone fosfato 0,1M.

- **Esecuzione dell'analisi**

L'esecuzione dell'analisi viene effettuata attraverso due step: il primo di preparazione e svolgimento della reazione in provetta; il secondo di lettura strumentale.

Per lo svolgimento dell'analisi occorre:

- calibrare lo strumento effettuando lo zero, affinché il segnale sia una linea piatta;
- effettuare la lettura del bianco con la soluzione del sale di Fremy;
- preparare la curva di calibrazione con la soluzione standard di acido gallico alle opportune diluizioni;
- effettuare la lettura del campione.

La preparazione delle provette con le diverse soluzioni è visualizzata in tabella 14:

**Tabella 14 Preparazione delle provette per l'analisi all'EPR**

Provette	Tampone fosfato 0,1M	H <sub>2</sub> O:HCl 0,5mN (soluzione estraente)	Standard acido gallico alle varie diluizioni	campione	soluzione sale di Fremy 1mM
<b>Zero</b>	520μL	200μL	-	-	-
<b>Bianco</b>	500 μL	200μL	-	-	20μL
<b>Curva di calibrazione</b>	500 μL	-	200μL	-	20μL
<b>Campione</b>	500 μL	-	-	200μL	20μL

La soluzione sale di Fremy va aggiunta sempre come ultimo reagente e dal momento della sua aggiunta cronometrare 1 minuto, nel corso del quale si ha lo svolgimento della reazione. In questo arco di tempo preparare il capillare per l'esecuzione dell'analisi:

- immergere il capillare all'interno della provetta contenente la soluzione da analizzare (il liquido salirà per capillarità) e asciugare la parte esterna;
- tappare il capillare con della plastilina, facendo attenzione a formare una piccola camera d'aria, in modo che non sia direttamente a contatto con l'analita evitando così un'eventuale alterazione del campione;
- inserire il capillare nell'apposita cella dell'EPR ed eseguire la lettura.

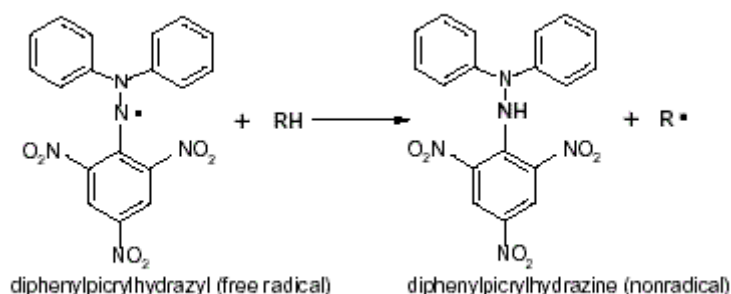
- **Parametri strumentali**

- a) Magnetic field (B0-field): 3349,53G;
- b) Sweep: 68,45;
- c) Sweep time: 60 sec;
- d) Modulation amplitude: 2000mG;
- e) Microwave power (Microwave attenuation): 7dB
- f) Receiver gain: 70

Dall'analisi all'EPR della soluzione del radicale sale di Fremy deriva un segnale con un'ampiezza ben determinata. L'aggiunta di questa soluzione al campione permette la determinazione delle sostanze antiossidanti mediante l'abbattimento dell'ampiezza di questo segnale con proporzionalità diretta all'attività antiossidante dell'analita. Infatti, maggiore è l'abbattimento registrato, maggiore è l'attività antiossidante. L'analisi rivela l'attività antiossidante derivata dalla presenza di tutte le sostanze antiradicaliche presenti nel campione di rosa. Lo standard utilizzato è l'acido gallico e il risultato finale è espresso in mgGAE/g, per le motivazioni descritte nel capitolo "3.5.2 Polifenoli totali, Esecuzione dell'analisi".

## 2. Test del DPPH'

Il DPPH (DiPhenylPicrylHydrazyle) è un catione radicale cromoforo stabile. Quest'analisi di tipo spettrofotometrico permette di valutare la capacità antiossidante in base alla diminuzione di assorbanza che si osserva in seguito al legame degli antiossidanti (RH) presenti nel campione con il radicale per donazione di un idrogeno al DPPH':



La lettura è stata effettuata con spettrofotometro Jasco UVIDEC-320 apportando alcune modifiche al metodo di Brand-Williams *et al.*, 1995 e la quantificazione mediante retta di calibrazione con standard di acido gallico.

- **Estrazione campione tal quale**

Vedi paragrafo "3.4.2 Polifenoli totali".

- **Estrazione campione frazione idrofilica**

Vedi paragrafo "3.4.2 Polifenoli totali".

- **Preparazione soluzione DPPH•**

- a) Pesare 40mg di DPPH' e portare a volume in matraccio da 50mL con EtOH al 96%;



b) Porre 15 minuti in generatore di ultrasuoni, il volume aumenterà per un leggero riscaldamento dell'etanolo, quindi far stabilizzare al buio e successivamente conservare in frigo.

• **Preparazione standard acido gallico 0,08%**

Effettuare le diluizioni in *Eppendorf tube* come mostrato in tabella 15:

**Tabella 15 Diluizioni dello standard di acido gallico**

N° <i>Eppendorf tube</i>	Diluizione	Standard acido gallico 0,08%	H <sub>2</sub> O:HCl 0,5mN (soluzione estraente)
1	2	500µL	500µL
2	5	200µL	800µL
3	10	100µL	900µL
4	20	50µL	950µL
5	50	20µL	980µL
6	100	10µL	990µL

• **Esecuzione dell'analisi**

Per lo svolgimento dell'analisi occorre:

- verificare la stabilità della soluzione di DPPH\*, l'assorbanza dev'essere il più possibile vicino a 1;
- effettuare la lettura del bianco con la soluzione estraente H<sub>2</sub>O:HCl 0,5mN;
- preparare la curva di calibrazione con la soluzione standard di acido gallico alle opportune diluizioni;
- effettuare la lettura del campione, previa diluizione di fattore 20 (50µL di campione in 950µL di soluzione estraente H<sub>2</sub>O:HCl 0,5mN) in *Eppendorf tube*.

Preparare le soluzioni direttamente in cuvetta (tabella 16):

**Tabella 16 Preparazione delle soluzioni in cuvetta**

Cuvette	Etanolo 96%	H <sub>2</sub> O:HCl 0,5mN (soluzione estraente)	Standard acido gallico alle varie diluizioni	campione	Soluzione DPPH*
<b>Stabilità</b>	2,2mL	-	-	-	100µL
<b>Bianco</b>	1,8mL	400µL	-	-	100µL
<b>Curva di calibrazione</b>	1,8mL	-	400µL	-	100µL
<b>Campione diluito</b>	1,8mL	-	-	400µL	100µL

La misura dell'assorbanza è stata effettuata a 517nm a 3 minuti dall'aggiunta della soluzione di DPPH'.

A 517nm la soluzione del radicale DPPH' ha una precisa assorbanza. Confrontandola con quella del campione dopo l'aggiunta della soluzione di DPPH, si ha la determinazione dell'attività antiossidante mediante la registrazione dell'abbattimento dell'assorbanza a 3 minuti di reazione. L'abbattimento registrato ha proporzionalità diretta rispetto l'attività antiossidante dell'analita; infatti, maggiore è l'abbattimento, maggiore è la presenza di antiossidanti presenti nel campione. L'analisi rivela l'attività antiossidante derivata dalla presenza di tutte le sostanze antiradicaliche presenti nel campione di rosa. Lo standard utilizzato è l'acido gallico e il risultato finale è espresso in mgGAE/g, per le motivazioni descritte nel capitolo "3.4.2 Polifenoli totali, Esecuzione dell'analisi".

### 3.4.5 Identificazione di molecole bioattive

L'identificazione di singole molecole fenoliche è stata condotta presso il laboratorio della sezione di Chimica e Tossicologia degli alimenti del Dipartimento di Scienze Farmacologiche di Milano considerando sia campioni di petali di rosa sia alcuni prodotti commercializzati (base-frutta e fiori e campioni di tè). Le prove sono state eseguite in due *step* con l'obiettivo di mettere a punto le metodiche di estrazione e la lettura mediante HPLC.

Nel primo *step* sono stati analizzati i seguenti campioni con l'obiettivo di valutare la presenza della molecola QUERCETINA.

- Karkadè
- Rose (miscela di petali delle cultivar del gruppo Rose Inglesi )
- Beveranda al mirtillo con viola del pensiero (campione liquido)
- Succo d'uva rossa (campione liquido)

Prove di estrazione e di idrolisi:

- *Prova 1*: 2 g di campione vengono messi in infusione in 100 mL di acqua a 90°C per 10 minuti. Il campione viene poi filtrato su filtro 0.45 µm ed iniettato in HPLC. I campioni liquidi sono iniettati tal quali dopo filtrazione su filtro 0.45 µm.
- *Prova 2*: 2 g di campione vengono messi in infusione in 100 mL di metanolo all'1% di acido cloridrico per 45 minuti a temperatura ambiente. Il campione viene poi filtrato su filtro 0.45 µm e 500 µL di soluzione sono lasciati reagire con 500 µL di acido cloridrico 6N per 5 minuti, successivamente iniettati. Per i campioni liquidi 500 µL di soluzione sono iniettati dopo essere stati filtrati e fatti reagire con 500 µL di acido cloridrico 6N per 5 minuti.

Condizioni analitiche HPLC: colonna C8 a temperatura ambiente, fase a gradiente (fase A: acqua, acetonitrile, metanolo, etile acetato e acido acetico 89:6:1:3:1, fase B: acqua, acetonitrile, metanolo, etile acetato e acido acetico 45:50:1:3:1 T(0)→100%A T(10)→100%A T(30)→20%A T(40)→0%A T(45)→0%A), flusso 1mL/min e rivelazione a 280 nm.

Gli standard considerati per individuare il tempo di ritenzione della molecola da valutare e per stimare il corretto andamento del gradiente sono stati: caffeina, catechina, epicatechina, epigallocatechin gallate e quercetina.

Nel secondo *step* sono stati analizzati i seguenti campioni con l'obiettivo di valutare la presenza delle molecole QUERCETINA e KAEMPFEROL.

- Tè verde
- Tè bianco
- Rose (miscela di petali delle cultivar del gruppo Rose Inglesi)
- Succo d'uva rossa (campione liquido)
- Succo ai frutti di bosco (campione liquido)
- Tè nero

Prova di estrazione e di idrolisi:

E' stato seguito il metodo di Perva-Uzunalic *et al.*, (2006). Un quantitativo pari a 1 g di campione o 40 mL (campioni liquidi) viene messo in un pallone con 40 mL di etanolo al 60% e vengono poi aggiunti 5 mL di acido cloridrico 6N. La reazione è termostata a ricadere a 95°C per 1 ora. Il campione viene poi filtrato su filtro 0.45 µm ed iniettato in HPLC.

Condizioni analitiche HPLC: colonna C8 a temperatura ambiente, fase a gradiente (fase A: acqua, acetonitrile, metanolo, etile acetato e acido acetico 89:6:1:3:1, fase B: acqua, acetonitrile, metanolo, etile acetato e acido acetico 90:5:1:3:1 T(0)→100%A T(18)→100%A T(40)→0%A T(45)→0%A T(48)→100%A T (52)→100%A), flusso 1mL/min e rivelazione a 360 nm.

Gli standard di quercetina e kaempferol sono stati iniettati per individuarne il tempo di ritenzione.

### **3.5. ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI**

I dati ricavati dalle analisi sono stati sottoposti alle seguenti elaborazioni statistiche:

- Analisi della varianza, ANOVA, (SAS SYSTEM v9)
- Test di Tukey, (SAS SYSTEM v9)
- Analisi discriminante (Statgraphics v7, Manugistic Inc)
- Analisi delle componenti Principali, *Principal Components Analysis*, PCA (Statgraphics v7, Manugistic Inc)

L'“Analisi della varianza” è conosciuta anche come ANOVA. Questa è una tecnica statistica che permette di confrontare molteplici gruppi di dati definendo sia la variabilità interna al gruppo (*within groups*) sia la variabilità tra gruppi differenti (*between groups*). Questa analisi permette di verificare l'ipotesi di eguaglianza tra le medie dei vari parametri e l'assenza di interazione tra i fattori sperimentali.

A quest'analisi è stato associato il “Test di Tukey” che permette di comparare i dati di diversi parametri tra due gruppi differenti. Più precisamente mette in rapporto le differenze tra due valori ( $Y_A, Y_B$ ) con il loro errore standard (ES):

$$q_s = \frac{Y_A - Y_B}{ES}$$

Il dato ottenuto ( $q_s$ ), viene poi comparato con il valore, definito come “q” ottenuto dalla distribuzione “*studentized range*”. “q” è dato dal rapporto tra la differenza del valore massimo con il valore minimo (range) e la deviazione standard (s):

$$q = \frac{range}{s}$$

Se  $q_s > q$  i dati sono significativamente differenti e sono assegnate lettere diverse per indicare l'appartenenza a gruppi diversi.

Infine i dati sono stati sottoposti ad analisi statistica multivariata, un gruppo di analisi statistiche che permette di analizzare simultaneamente misurazioni riguardanti diverse caratteristiche di un insieme di valori. Gli obiettivi principali di questa metodologia sono la sintesi delle osservazioni, nel loro ordinamento e raggruppamento, nello studio delle interdipendenze tra le variabili, nella formulazione e verifica di ipotesi operative. Nell'ambito di queste tipologie di analisi sono state effettuate l'“Analisi discriminante” e la “PCA”.

La prima si basa sulla determinazione di “funzioni discriminanti”, ricavati attraverso espressioni complesse calcolate automaticamente dal software, permettendo la disposizione dei campioni nello spazio. L'obiettivo dell'analisi discriminante è quello di individuare la sottopopolazione di appartenenza di un'osservazione multidimensionale, in base alla conoscenza campionaria del comportamento delle diverse sottopopolazioni.

La PCA (Principal Components Analysis) invece, si basa sulle “Componenti Principali”. Queste sono il risultato di una trasformazione delle variabili originarie, e sono ricavate attraverso l'impiego di procedure matematiche complesse. Sono ordinate secondo la percentuale di varianza e vengono considerate solo quelle che hanno valori definiti “Eigenvalue” superiori o uguali a 1. Le componenti principali sono poi utilizzate per l'analisi della varianza (ANOVA).

### 3.6 PREPARAZIONE DELLA MISCELA-BASE

In tabella 17 sono elencate le cultivar di rosa utilizzate per la preparazione della miscela-base. Per ogni cultivar sono indicati il gruppo e la specie di appartenenza, il luogo, il nome del costituente e l'anno d'origine.

**Tabella 17 Cultivar di rose utilizzate per la preparazione della miscela-base**

Gruppo	Specie	Cultivar	Origine
Rose inglesi	<i>Rosa hybrida</i>	<i>Jeoff Hamilton</i> ®	Inghilterra, David Austin, 1998
	<i>Rosa hybrida</i>	<i>Eglantyne</i> ®	Inghilterra, David Austin, 1994
Rose antiche	<i>Rosa gallica</i>	<i>Chianti</i>	Inghilterra, David Austin, 1967
	<i>Rosa rugosa</i>	<i>Roseaie de l'Hay</i>	Francia, Cochet-Cochet, 1901
	<i>Rosa rugosa</i>	<i>Belle Poitevine</i>	Francia, 1894

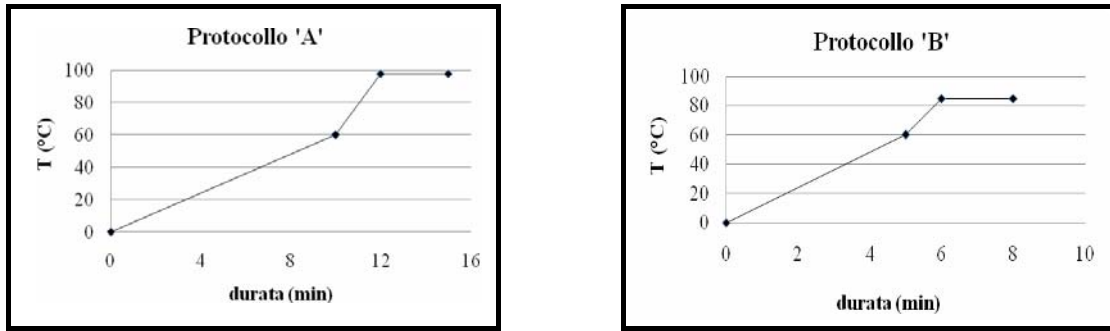
La realizzazione della miscela-base (semilavorato) è stata svolta su scala di laboratorio secondo la ricetta specificatamente messa a punto per i fiori di rosa. In figura 11 viene schematizzato il processo tecnologico seguito per l'ottenimento del semilavorato.



**Figura 11 Preparazione del semilavorato a base di petali di rosa**

### **3.7 PROTOCOLLI DI STABILIZZAZIONE TERMICA**

La miscela-base (semilavorato tal quale), è stata sottoposta ai metodi di stabilizzazione termica (protocolli 'A' e 'B') mostrati in figura 12, seguendo le metodologie impiegate per la preparazione di puree pre-trattate o semilavorati a base di frutta (Silva e Silva, 1997; Prinziavalli et al., 2004). L'esecuzione del trattamento termico ha previsto il trasferimento della miscela-base in un recipiente di rame (capacità 1L); il riscaldamento della miscela è avvenuto impiegando una macchina da cucina professionale (Zanussi) in cui il recipiente veniva posto in corrispondenza del gas-fiamma.



**Figura 12 Protocolli di stabilizzazione termica 'A' e 'B' del semilavorato**

I protocolli di stabilizzazione termica hanno previsto 3 fasi successive:

1. fase di riscaldamento
2. fase di raggiungimento della temperatura massima prefissata
3. fase di sosta alla temperatura massima.

Nel protocollo 'A', durante la fase di riscaldamento, in 10 minuti è stata raggiunta la temperatura di 60°; la temperatura massima (Tmax) di 98°C è stata raggiunta in 2 minuti e la fase di sosta a Tmax ha avuto una durata di 3 minuti. Nel protocollo 'B' la temperatura di 60°C è stata raggiunta in 5 minuti, in 1 minuto è stata raggiunta la Tmax di 85°C e la fase di sosta a Tmax ha avuto una durata di 2 minuti. Nel corso dei processi termici, le temperature e i tempi di trattamento sono stati opportunamente monitorati mediante l'impiego di sonde calibrate, munite di software ELLAB E-Val 2.10. Tali sonde hanno permesso anche di calcolare l'effetto letale' (F), ipotizzando un grado di contaminazione del campione TQ sulla base delle caratteristiche chimico-fisiche del preparato (Migliorini, 2004). In tabella 18 vengono schematizzati i protocolli termici 'A' e 'B'.

**Tabella 18 Temperature e tempi di trattamento per i protocolli termici ‘A’ e ‘B’**

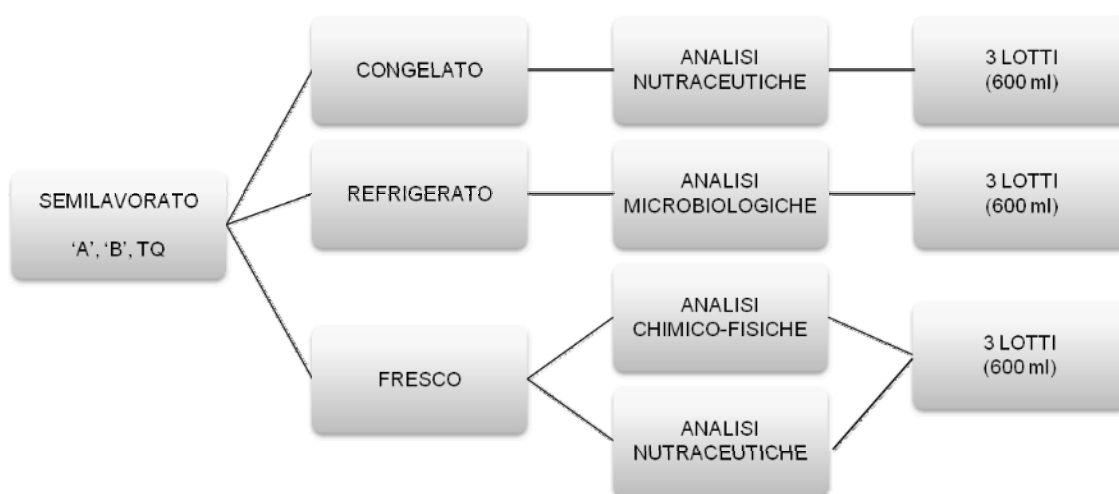
Protocolli termici	Riscaldamento		T max		Sosta	
	T	t	T	t	T	t
‘A’	60	10	98	2	98	3
‘B’	60	5	85	1	85	2

Tmax=temperatura massima raggiunta nel processo termico; T=temperatura in °C; t=tempo in minuti

Al termine dei rispettivi processi termici, la miscela veniva immediatamente raffreddata ponendo il recipiente in una bacinella contenente ghiaccio fondente per ottenere un rapido abbassamento della temperatura fino a 24°C. Successivamente, i preparati sono stati confezionati in contenitori di PET e conservati secondo le modalità mostrate nel paragrafo 3.8.

### **3.8 PIANO SPERIMENTALE PER LE VALUTAZIONI DEL SEMILAVORATO**

Il piano sperimentale seguito, ha previsto la preparazione di 3 tesi di semilavorato per un volume complessivo di 1,8 L. Il volume delle singole tesi di semilavorato utilizzate per le valutazioni analitiche, è stato stabilito pari a 600 ml (figura 13). Ogni tesi è stata suddivisa in 3 lotti, 2 dei quali sono stati stabilizzati rispettivamente con protocollo termico ‘A’ e ‘B’ al momento delle analisi mentre il lotto TQ non è stato trattato. I semilavorati (TQ, ‘A’ e ‘B’) sono stati conservati a temperature differenti in base alle determinazioni analitiche previste (tabella 19).



**Figura 13 Distribuzione delle tesi preparate per tipologia di analisi per i vari campioni di semilavorato**

‘A’=semilavorato stabilizzato con protocollo ‘A’ ; ‘B’=semilavorato stabilizzato con protocollo ‘B’; TQ=campione tal quale

**Tabella 19 Temperature di conservazione dei semilavorati e cadenze temporali dei controlli analitici**

Semilavorato ‘A’-‘B’-TQ	T°C	giorni			mesi
Fresco	25	T0			
Refrigerato	4	T0	T10	T21	
Congelato	-18				T12

T0= 0 giorni; T10=10 giorni; T21=21 giorni; T12=12 mesi

Un aspetto che va precisato e descritto compiutamente, consiste nella scelta di conservare a -18°C per 12 mesi il preparato sia tal quale sia stabilizzato.

Con le matrici convenzionali da destinare alla produzione di yogurt, quelle quindi, base di frutta, si è soliti congelare rapidamente la massa della materia prima subito dopo la raccolta (Maestrelli, 2002). La frutta congelata e conservata nei depositi frigoriferi per i 12 mesi viene con gradualità prelevata dalle celle di stoccaggio e sottoposta alla lavorazione (ciclo termico specifico) che la rende pronta per l'aggiunta allo yogurt, via confezionamento asettico.

In linea teorica si sarebbe potuto seguire la medesima modalità anche per i petali di rosa. Tuttavia, a differenza dei frutti a polpa zuccherina, o altri, il comportamento dei petali si differenzia dalla matrice a base di frutta convenzionale.

Il petalo è assimilabile, morfologicamente, ad una lamina fogliare: sottile e delicata. Il congelamento rapido e la successiva frigoconservazione possono costituire una fase problematica per il petalo di fiore: non viene eseguito nessun pretrattamento di inattivazione enzimatica (Torreggiani et al., 2000), né tantomeno altra azione protettiva a livello di pigmenti e di struttura meccanica. La conseguenza negativa avvertibile, già dopo poche settimane di conservazione, è una forte disidratazione superficiale dovuta sicuramente al ridottissimo spessore della lamina fiorale e indotta dalla fluttuazione della temperatura a causa del ciclo frigorifero. Come anticipato nel paragrafo 3.1 a proposito degli accorgimenti adottati per il trasporto dei petali campionati, non è infrequente che a seguito della disidratazione possa insorgere una successiva grave alterazione denominata "*freeze burn*". L'aspetto della struttura interessata da tale alterazione si presenta esattamente come una scottatura, più o meno localizzata, fortemente imbrunita, presupposto di addizionali difetti come la presenza di "*off flavour*".

Le possibilità di proteggere il prodotto in conservazione sono, commercialmente, molto limitate e si basano quasi esclusivamente sul ricorso al condizionamento sotto vuoto, in apposito film plastico (Maestrelli e Senesi, 2009). Anche in tale caso la delicatezza del tessuto fiorale non assicura una risposta adeguata in termini di integrità meccanica del petalo: è possibile che si verifichino fratture, lesioni, lacerazioni delle lamine, con danneggiamento della matrice e difficoltà di successive preparazioni per la sperimentazione e le prove tecnologiche.

Per tale ragione è stata individuata una soluzione al problema; la preparazione del semilavorato stabilizzato termicamente, viene successivamente congelata e conservata a -18°C. Tale espediente, quindi, se da un lato contraddice il convenzionale tipo di processo industriale dall'altro assicura una soddisfacente stabilità dei micro e macro costituenti, sicuramente meno reattivi e più stabili rispetto all'azione del freddo di quanto non si verifichi con i petali conservati tal quali.

Nel caso del presente lavoro di ricerca, poi, la stabilità biochimica, fisica e morfologica è vista come elemento essenziale nell'insieme di operazioni che partono dal campionamento e, distribuite nell'arco di mesi, si concludono con la formulazione definitiva e l'impiego nella preparazione dello yogurt. Tutto ciò va visto, inoltre, sotto il punto di vista dei controlli analitici e della validazione qualitativa dei componenti nutraceutici e non solo.



### **3.9 ANALISI FISICO-CHIMICHE DEL SEMILAVORATO**

Per i campioni di semilavorato 'A', 'B' e TQ relativi alla tesi di semilavorato fresco (vedi piano sperimentale di figura 13), al tempo 0 (T0) sono stati rilevati i parametri chimico-fisici pH, acidità titolabile (TA), contenuto in solidi solubili (SSC), attività dell'acqua (Aw) e tenore in sostanza secca (s.s). Il parametro viscosità, è stato determinato sul semilavorato tal quale e stabilizzato con protocollo 'A' al momento della preparazione. Il parametro colore, è stato misurato per i campioni di semilavorato stabilizzati ('A' e 'B') e tal quale (TQ) al tempo 0 e dopo 21 giorni di conservazione. Data l'elevata riproducibilità delle letture eseguite, per ogni parametro sono state condotte due determinazioni.

#### **3.9.1 pH, acidità titolabile (TA), contenuto in solidi solubili (SSC), attività dell'acqua (Aw), sostanza secca (s.s.%)**

Gli apparecchi usati per le determinazioni di pH, acidità titolabile e contenuto in solidi solubili sono stati descritti nei paragrafi precedenti del seguente capitolo.

Per il parametro SSC, è stato possibile ottenere la concentrazione in solidi solubili espressa come grado Brix (°Bx), ponendo un piccolo quantitativo del semilavorato sul lettore ottico del rifrattometro. Il parametro TA, espresso in meq/kg di prodotto, è stato determinato titolando 5 g di miscela diluita in 100 ml di acqua distillata con NaOH 0,1 N. Per la determinazione del parametro attività dell'acqua (Aw), la misura è stata eseguita con analizzatore AQUALAB modello CX3 (Decagon Devices, Inc.). Il tenore in sostanza secca è stato rilevato ponendo le provette contenenti 10 g di semilavorato in liofilizzatore (CHRIST ALPHA 1-4LSC) per 24 ore.

#### **3.9.2 Viscosità**

Per la misura della viscosità dei campioni di semilavorato, è stato utilizzato il viscosimetro HAAKE modello VT 500 munito di sistema sensore MV1. Per effettuare tale misura reologica, occorre definire i parametri di flusso cioè le condizioni di misura che permettono rilevazioni non soggettive e riproducibili. La legge fondamentale della viscosità definisce il flusso di un liquido ideale come indicato dall'equazione (2):

$$\tau = \eta \cdot D \quad (2)$$

dove  $\tau$  è lo sforzo di taglio e D è la velocità di scorrimento o gradiente (equazioni 3 e 4):

$$\tau = F / A = N/m^2 = [Pa] \quad (3)^a$$

<sup>a</sup>F=forza; A=area; N=Newton; Pa= Pascal

$$D = dv / dy = cm.s^{-1}/cm = [s^{-1}] \quad (4)$$

dv=caduta di velocità; dy=spessore

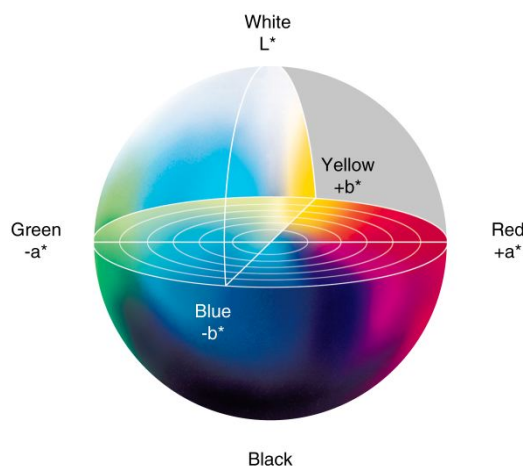
Pertanto, in base all'equazione (2) la viscosità  $\eta$  di un fluido è data dall'equazione 5:

$$\eta = \tau/D = N/m^2.s [Pa \cdot s] \quad (5)$$

In particolare, le misure di viscosità sui campioni di semilavorato (TQ e 'A') sono state condotte utilizzando la modalità di flusso rotazionale tra cilindri coassiali in cui uno dei due cilindri è fermo mentre l'altro ruota, trascinandolo con sé, in modo relativo, strati successivi cilindrici di fluido; l'intercapedine viene riempita dal liquido che subisce lo scorrimento. Il quantitativo di semilavorato utilizzato per ogni misura di viscosità è stato pari a 40 ml mentre la modalità di rilevazione adottata è quella in cui la velocità di scorrimento è stata prefissata (nell'intervallo 0-300 per un tempo di 2 minuti) per poter misurare il relativo sforzo di taglio.

### **3.9.3 Colore**

Il colore di ogni campione di semilavorato è stato misurato secondo la tecnica della colorimetria per riflettanza, mediante un colorimetro spettrofotometro, modello CM-2600d (Minolta Company, Japan), rilevando i rispettivi spettri nel campo del visibile tra 360 e 760 nm. Il colore della sostanza è stato poi espresso mediante una terna di numeri appartenenti allo spazio cromatico  $L^* a^* b^*$ , dove  $L^*$  indica la luminosità,  $a^*$  il grado di rosso-verde,  $b^*$  il grado di blu-giallo. In questo modo ogni dato di colore può essere espresso univocamente ed essere rappresentabile come nella sfera di figura 14.



**Figura 14 Sfera per la rappresentazione delle coordinate  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  nello spazio cromatico**

La misura del colore è stata condotta attraverso il fondo di una capsula cilindrica di vetro ottico Ø 10 cm con pareti nere contenente uno strato di semilavorato del peso di 20 g; sulla parte libera superiore della capsula è stata appoggiata la piastrella bianca di taratura del colorimetro.

### **3.10 ANALISI MICROBIOLOGICHE DEL SEMILAVORATO**

Le analisi microbiologiche sul semilavorato, tal quale e stabilizzato con i protocolli 'A' e 'B', sono state condotte presso il laboratorio di microbiologia del Centro di Ricerca per le produzioni foraggere e lattiero-casearie (CRA-FLC) di Lodi. Durante la frigoconservazione di 21 giorni, ai tempi T0, T10 e T21, è stata monitorata la crescita dei seguenti ceppi microbici :

- coliformi totali ed *Escherichia coli*
- *Pseudomonas sp.*
- sporigeni aerobi
- eumiceti (lieviti e muffe)

#### **3.10.1 Fasi preparatorie dei campioni**

Le fasi preparatorie che hanno preceduto le determinazioni dei contenuti dei ceppi microbici considerati sono state le seguenti:

##### 1. Preparazione dei campioni

Per preparare la prima diluizione decimale del campione ( $10^{-1}$ ), 10 g di ogni campione sono stati addizionati di 90 ml di soluzione diluente sterile (citrato trisodico al 2%, pH 7.5). Il preparato è stato, dunque, omogeneizzato con apparecchio *stomacher* per 30 secondi.

##### 2. Preparazione delle diluizioni

Partendo dal campione omogenato, sono state poi preparate una serie di diluizioni decimali utilizzando come diluente una soluzione salina isotonica sterile (soluzione di Ringer, Oxoid). Dalla prima diluizione si è prelevato 1 ml di campione successivamente aggiunto in tubo contenente 9 ml di diluente (diluizione  $10^{-2}$ ). Dopo miscelazione con agitatore vortex, si è proseguito per diluizioni successive fino ad un massimo di 8 diluizioni decimali (ultima diluizione  $10^{-8}$ ).

##### 3. Preparazione per le conte in/su terreno agarizzato

Per ogni diluizione del campione, si è prelevato 1 ml, seminato poi in scatole Petri all'interno delle quali sono stati aggiunti circa 15 ml di terreno di coltura specifico per la determinazione delle differenti classi di microrganismi. I vari terreni agarizzati vengono preliminarmente sciolti in forno a microonde e poi conservati in bagno termostato a 48°C prima di essere utilizzati.

### **3.10.2 Conte microbiche**

In tabella 20 sono riportate le condizioni analitiche seguite per le determinazioni dei contenuti dei ceppi microbici considerati.

**Tabella 20 Tipi di terreno e condizioni di incubazione dei ceppi microbici determinati**

<i>Ceppi microbici</i>	<i>Tipo di terreno</i>	<i>Condizioni di incubazione</i>
Coliformi totali ed <i>E. coli</i>	selettivo cromogeno, Coli ID (BioMérieux) <sup>a</sup>	37°C per 24 ore
Enterococchi	KAA agar (Merck)	42°C per 24-48 ore in aerobiosi
Eumiceti	YGC agar (Merck)	25°C per 5 giorni in aerobiosi
<i>Pseudomonas sp.</i>	PSE agar (Oxoid)	30°C per 48 ore in aerobiosi
Sporigeni aerobi <sup>b</sup>	TSA agar (Oxoid)	30°C per 48 ore in aerobiosi.

<sup>a</sup>Il terreno selettivo cromogeno consente lo sviluppo e la conta differenziata delle colonie dei coliformi (colorate in blu) rispetto a quelle di *E. coli* (colorate in rosa)

<sup>b</sup>La semina su terreno è avvenuta dopo preliminare trattamento termico di una aliquota della prima diluizione del campione in bagno termostato a 80°C per 10 min

### **3.11 ANALISI NUTRACEUTICHE DEL SEMILAVORATO**

Le analisi nutraceutiche sui campioni di semilavorato (TQ, 'A', 'B'), eseguite presso il laboratorio della sezione di Chimica e Tossicologia degli alimenti del Dipartimento di Scienze Farmacologiche di Milano, hanno riguardato le determinazioni colorimetriche dei polifenoli e antociani totali mediante spettrofotometro VARIAN (modello Cary 50 Scan, Palo alto, California, U.S.A.).

Per l'estrazione dei polifenoli totali e antociani totali dai campioni di semilavorato, sono stati seguiti i metodi di Plessi et al. (2007) con alcune modifiche. L'estrazione dei composti bio-attivi è stata condotta sia dal semilavorato fresco sia dal semilavorato stoccato a  $-18^{\circ}\text{C}$  per 12 mesi, utilizzando due soluzioni estraenti:

- una soluzione acquosa di HCl 0.5 mN pH=3, utilizzata anche per le analisi nutraceutiche condotte sui petali
- una soluzione di metanolo/HCl (98/2, v/v).

In entrambi i casi, 2 grammi di semilavorato sono stati pesati in provetta e diluiti con 5 ml di soluzione estraente; sono stati quindi centrifugati a 15000 rpm per 15 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ . Dopo filtrazione del surnatante, per il medesimo campione, è stata eseguita una seconda estrazione; l'estratto, derivante dall'unione dei surnatanti delle due estrazioni successive, è stato congelato a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento delle analisi.

#### **3.11.1 Polifenoli totali**

I polifenoli totali dei campioni di semilavorato sono stati determinati mediante analisi colorimetrica utilizzando il reagente Folin-Ciocalteu. 100  $\mu\text{l}$  di estratto venivano mescolati in provetta di vetro con 7 ml di acqua distillata, 500  $\mu\text{l}$  del reagente Folin e, dopo 1 minuto, con 1 ml di soluzione acquosa di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5 g in 100 ml). L'assorbanza della miscela è stata misurata a 765 nm dopo 1 h di reazione al buio. La quantificazione del contenuto in polifenoli totali (TPC) è stata effettuata mediante retta di calibrazione con standard di acido gallico e i risultati sono stati espressi in mg di acido gallico equivalenti per 100 g di prodotto (mg GAE/100 g p.f.).

#### **3.11.2 Antociani totali**

Per la determinazione degli antociani totali mediante analisi colorimetrica, è stato utilizzato il metodo del pH differenziale a pH 1 e a pH 4.5. Sono stati preparati i seguenti reagenti:

- TAMPONE POTASSIO CLORIDRATO (pH=1): 1,86g KCl in 980 mL di acqua distillata, corretto a pH=1 con l'aggiunta di HCl concentrato
- TAMPONE SODIO ACETATO (pH=4.5): 54,43g di  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  in 960 mL di acqua distillata, corretto a pH=4.5 con l'aggiunta di HCl concentrato.

L'analisi colorimetrica è stata condotta miscelando con acqua distillata, 1 ml di campione estratto in un matraccio da 5 ml. Due aliquote da 1 ml ciascuna, venivano trasferite in matracci da 5 ml portandole, poi, rispettivamente a volume, con i tamponi a pH=1 e a pH=4.5; dopo 30 minuti, la differenza di assorbanza delle due rispettive soluzioni veniva letta a 520 nm. Poiché il composto cianidina-3-glucoside (Cyd-3-glu) è una delle sostanze antocianiche presenti nei fiori

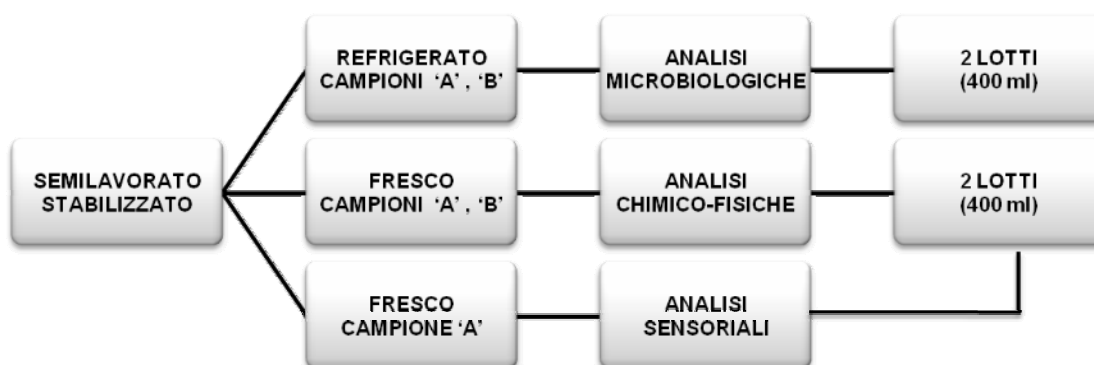
di rosa, la concentrazione in antociani totali, espressa in mg/ml, veniva calcolata secondo l'equazione (1) riportata nel precedente paragrafo 3.4.3.

Il contenuto in antociani totali (CAT) è stato poi espresso in mg di Cyd-3-glu per 100 g di prodotto (mg Cyd-3-glu/100 g p.f.).

### **3.12 FORMULAZIONE PER YOGURT COMMERCIALE**

La formulazione per yogurt commerciale ha previsto la preparazione di 2 tesi di semilavorato per un volume di 400 ml per ogni tesi e per un volume complessivo di 0,8 L. I 2 lotti di una tesi sono stati impiegati, al momento della preparazione (campioni 'A' e 'B' del semilavorato fresco), per le analisi chimico-fisiche e sensoriali. Gli altri 2 lotti di semilavorati stabilizzati, sono stati analizzati da un punto di vista microbiologico durante la refrigerazione, prima di essere utilizzati per la formulazione in yogurt base commerciale.

La formulazione, ha previsto l'inserimento del 15% dei semilavorati stabilizzati in yogurt commerciale (Centrale del Latte, Milano), sotto cappa a flusso laminare (TKA, LAF), in condizioni di sterilità. I contenitori deputati a ricevere i semilavorati stabilizzati e gli yogurt formulati, sono stati pre-sterilizzati con UV per evitare eventuali fattori di contaminazione esterna. Gli yogurt formulati, sono stati poi analizzati per i contenuti microbici durante la refrigerazione (figura15).



**Figura 15 Distribuzione dei lotti di yogurt formulato per tipologia di analisi**

Semilavorato stabilizzato= yogurt formulato

#### **3.12.1 Analisi fisico-chimiche dei campioni di yogurt**

Al tempo 0 (T0), sono stati rilevati i parametri chimico-fisici pH, acidità titolabile (TA), contenuto in solidi solubili (SSC), attività dell'acqua (Aw) e viscosità sia sui campioni di yogurt addizionati del 15% dei semilavorati stabilizzati 'A' e 'B' sia sui campioni di yogurt base. Per le procedure delle varie determinazioni si rimanda al paragrafo 3.9.1 del presente capitolo. L'acidità titolabile dei campioni di yogurt è stata espressa in gradi Soxhlet Henkel (°SH) corrispondenti ai ml di NaOH N/4 necessari per titolare 100 ml di campione.

### **3.12.2 Analisi microbiologiche dei campioni di yogurt**

Presso il laboratorio di microbiologia del Centro di Ricerca per le produzioni foraggere e lattiero-casearie (CRA-FLC) di Lodi, sono state eseguite le analisi microbiologiche sui campioni di yogurt addizionati del 15% dei semilavorati stabilizzati 'A' e 'B' e sui campioni di yogurt base. Come per i controlli microbici dei semilavorati, durante la frigoconservazione di 21 giorni, ai tempi T0, T10 e T21, è stata monitorata la crescita dei seguenti ceppi microbici :

- coliformi totali ed *Escherichia coli*
- *Pseudomonas sp.*
- sporigeni aerobi
- eumiceti (lieviti e muffe)

Per le procedure di preparazione dei campioni e per le condizioni di incubazione dei ceppi determinati, si rimanda al paragrafo 3.10.1. Sui campioni di yogurt, inoltre, sono stati rilevati i contenuti dei batteri lattici (cocchi e bastoncini) veicolati dagli yogurt stessi. In tabella 21 sono riportate le condizioni analitiche seguite per le determinazioni dei contenuti dei batteri lattici.

**Tabella 21 Tipi di terreno e condizioni di incubazione dei batteri lattici veicolati dagli yogurt**

<b>Batteri lattici</b>	<b>Tipo di terreno</b>	<b>Condizioni di incubazione</b>
Streptococchi	M17 agar (Merk)	37°C per 48 ore in aerobiosi
Bastoncini	MRS agar (Merk) a pH 5,4	37°C per 72 ore in anaerobiosi

### **3.12.3 Analisi sensoriale dello yogurt formulato**

La valutazione sensoriale del nuovo prodotto realizzato, ha previsto l'esecuzione di sedute d'assaggio preliminari, nel corso delle quali, il *panel* di assaggiatori prescelto, ha potuto decretare l'idonea formulazione dei campioni di yogurt da testare. Sui campioni di yogurt addizionati del 15% del semilavorato ai petali di rosa (stabilizzato con metodo 'A'), sono stati condotti test di analisi sensoriale descrittiva.

Il metodo di analisi descrittiva viene utilizzato per analizzare le caratteristiche sensoriali percepite in un prodotto, impiegandole, poi, per quantificare le differenze tra campioni assaggiati (UNI U59A1950, 1998). L'analisi descrittiva viene realizzata in sedute con 8-12 giudici ai quali viene chiesto di assegnare un punteggio basandosi sui vari descrittori considerati come odore, sapore e consistenza, per poter ottenere il profilo sensoriale del prodotto. I metodi di analisi sensoriale descrittiva richiedono che il *panel* di giudici sia addestrato, di conseguenza in grado di descrivere compiutamente differenze tra i campioni.

Nel caso specifico, i test sensoriali sui campioni di yogurt formulato, sono stati condotti da un *panel* di 9 giudici addestrati; le sedute d'assaggio sono state effettuate sia sui campioni appena preparati al tempo 0, sia su quelli conservati a 4°C per 3 giorni e 7 giorni. Gli assaggiatori hanno espresso giudizi d'intensità sulle seguenti caratteristiche sensoriali (analisi quantitativa):

- odore
- colore
- dolcezza

- acidità
- aroma
- consistenza
- granulosità

Il *panel* ha espresso anche un giudizio qualitativo, indipendente dalla valutazione d'intensità, per ogni caratteristica percepita. Per la preparazione dei campioni e durante le sedute sensoriali, è stata osservata la norma UNI-ISO 8589 (1990). I campioni di yogurt venivano preparati nella cucina sperimentale (CRA-IAA, Milano) mentre le sedute d'assaggio avevano luogo in apposite cabine individuali in assenza di elementi di disturbo esterni (rumori, odori, illuminazioni anomale). L'espressione dei giudizi d'intensità e di quelli qualitativi sui parametri sensoriali considerati, è avvenuta predisponendo un'apposita scheda di valutazione attraverso un sistema di acquisizione computerizzato (Fizz Acquisition Forms, versione 2.45). La costruzione della scheda d'assaggio prevedeva la definizione della scala di valutazione, (di tipo aperta, lineare, non strutturata, stabilita inserendo opportune indicazioni riguardanti la lunghezza e gli *scores* di inizio e fine scala, espressi in pixel, dal sistema di acquisizione. A livello pratico gli assaggiatori apponevano un segno convenzionalmente stabilito lungo la scala tra gli estremi e i punteggi derivanti erano compresi tra 1 e 9.

Per ogni tempo di analisi e per ogni campione, gli assaggiatori hanno ripetuto due volte la seduta d'assaggio per permettere di verificare l'attendibilità dei giudizi forniti. L'elaborazione statistica dei punteggi d'intensità e qualitativi (SAS ANOVA e Test di Tukey), è stata condotta sui giudizi complessivi mediando quelli singoli, relativi ai campioni conservati a 0-3-7 giorni, in quanto non sono state rilevate differenze statistiche significative durante il tempo di *shelf-life*.



---

***CAPITOLO 4***  
***RISULTATI E DISCUSSIONE***

---

**Materia prima**

---

#### **4.1 SCELTA DELLE CULTIVAR DA INCLUDERE NELLO STUDIO**

Nello schema in figura 16 sono descritte le varietà di rose selezionate per lo studio, in particolare sono riportati i tre siti di raccolta dei campioni e le cultivar analizzate con i rispettivi gruppi di appartenenza.

- Il primo sito di campionamento è un roseto privato a conduzione biologica (“Cascina Brogginà” ad Abbiategrasso (MI)), in cui sono state raccolte le varietà riportate in figura 3. Queste rose, appartenenti al gruppo “rose inglesi” e tutte protette da brevetto, sono state raccolte tra l’ultima settimana di maggio e la prima settimana di giugno nelle stagioni 2006-2008 e sono state scelte soprattutto per l’intensità delle loro fragranze (David Austin, 2009). La concimazione del terreno è stata effettuata in inverno con concime di cavallo, e prima e dopo la potatura di fine inverno è stata somministrata poltiglia bordolese al 30 e al 10% (prodotto fitosanitario ammesso per l’agricoltura biologica come da Regolamento CEE n. 2092/91 del 24 giugno 1991).

- Il secondo sito di campionamento è stato individuato presso il campo sperimentale della scuola di orto-floro-vivaismo della Fondazione Minoprio di Vertemate con Minoprio (CO), in cui sono state prelevate le varietà di rose presentate in figura 3. Queste rose, definite “coprisuolo” sono per lo più utilizzate nell’arredo urbano in quanto caratterizzate da un’alta resistenza alle avversità ambientali e ai parassiti, inoltre non necessitano di pratiche e cure colturali come irrigazioni, concimazioni e trattamenti fitosanitari. Tali varietà sono state raccolte nei giorni di massima fioritura, tra l’ultima settimana di maggio e la prima settimana di giugno nel 2008.

- Il terzo sito di campionamento è il “Museo Giardino Rose Antiche” di Serramazzone (MO), in cui, la seconda settimana di maggio del 2009, sono state prelevate le cultivar elencate in figura 3. Come le rose coprisuolo, anche queste varietà sono molto resistenti alle malattie e non necessitano di cure o pratiche agricole particolari. Sono varietà arbustive, rustiche, rifiorenti, e sono state scelte soprattutto per la loro accesa pigmentazione e per la profumazione caratteristica.

Sono state analizzate rose di varietà e di specie differenti, poiché analogamente a quanto avviene nel settore della frutta e degli ortaggi, è plausibile che anche nell’ambito dei fiori di rosa si possano riscontrare variabilità di composizione tra le cultivar di una medesima specie e tra specie differenti.

Il metodo di campionamento utilizzato per il prelevamento della materia prima è stato quello di recidere circa venti fiori da tre piante differenti per ciascuna cultivar di rosa; questo metodo permette di ottenere campioni che siano rappresentativi dell’area e della cultivar in esame tenendo conto delle possibili variabili quali l’esposizione della pianta a zone di luce e ombra ed eventuali differenze compositive del terreno che potrebbero far variare le caratteristiche del fiore.

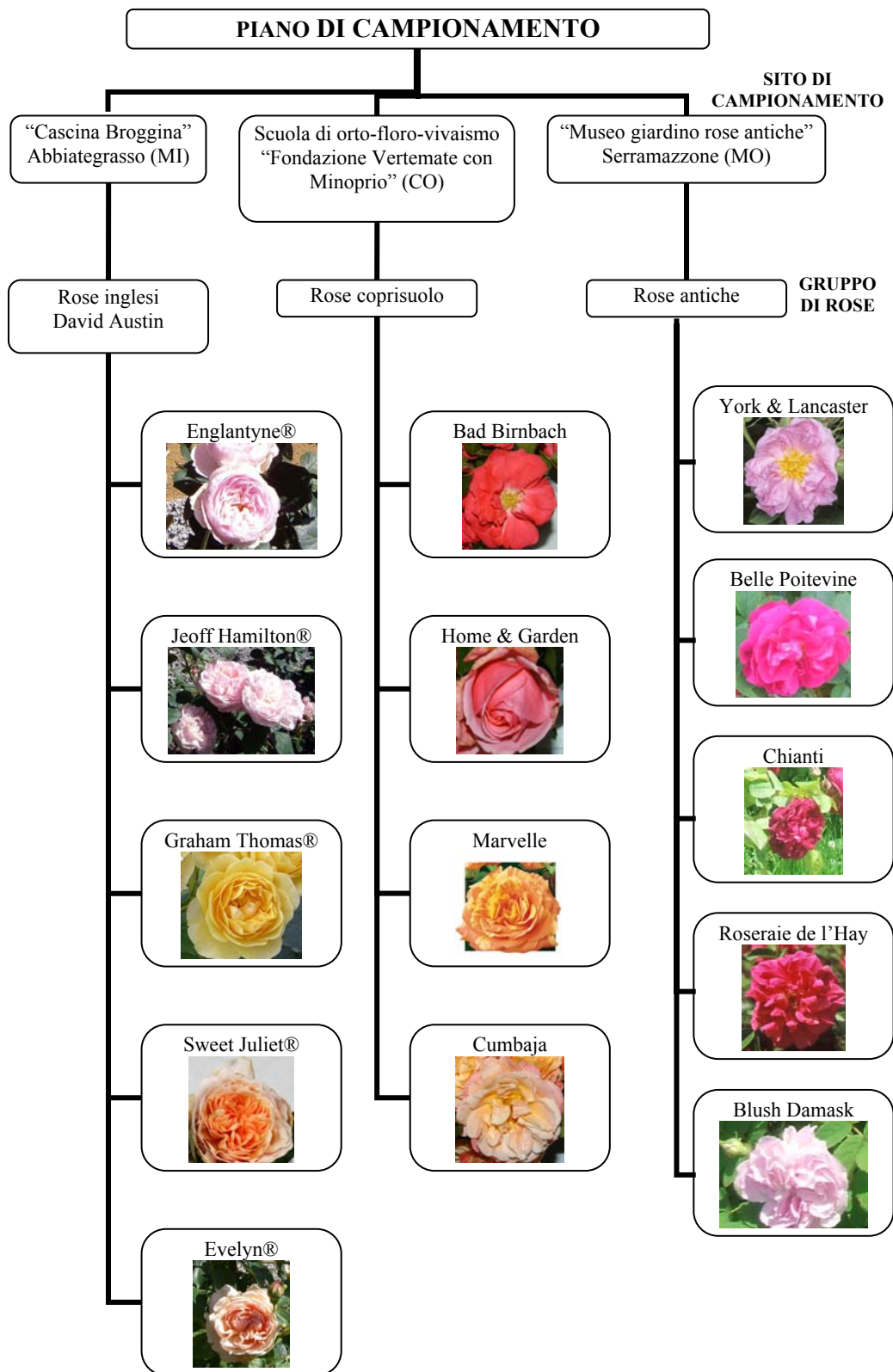


Figura 16 Selezione delle varietà di rose da includere nello studio e siti di produzione

## 4.2 ANALISI ESEGUITE SULLE CULTIVAR DI ROSA

In figura 17 è presentato lo schema relativo all'esecuzione delle analisi sul campione di rosa fresca (congelata sottovuoto) e di rosa liofilizzata.

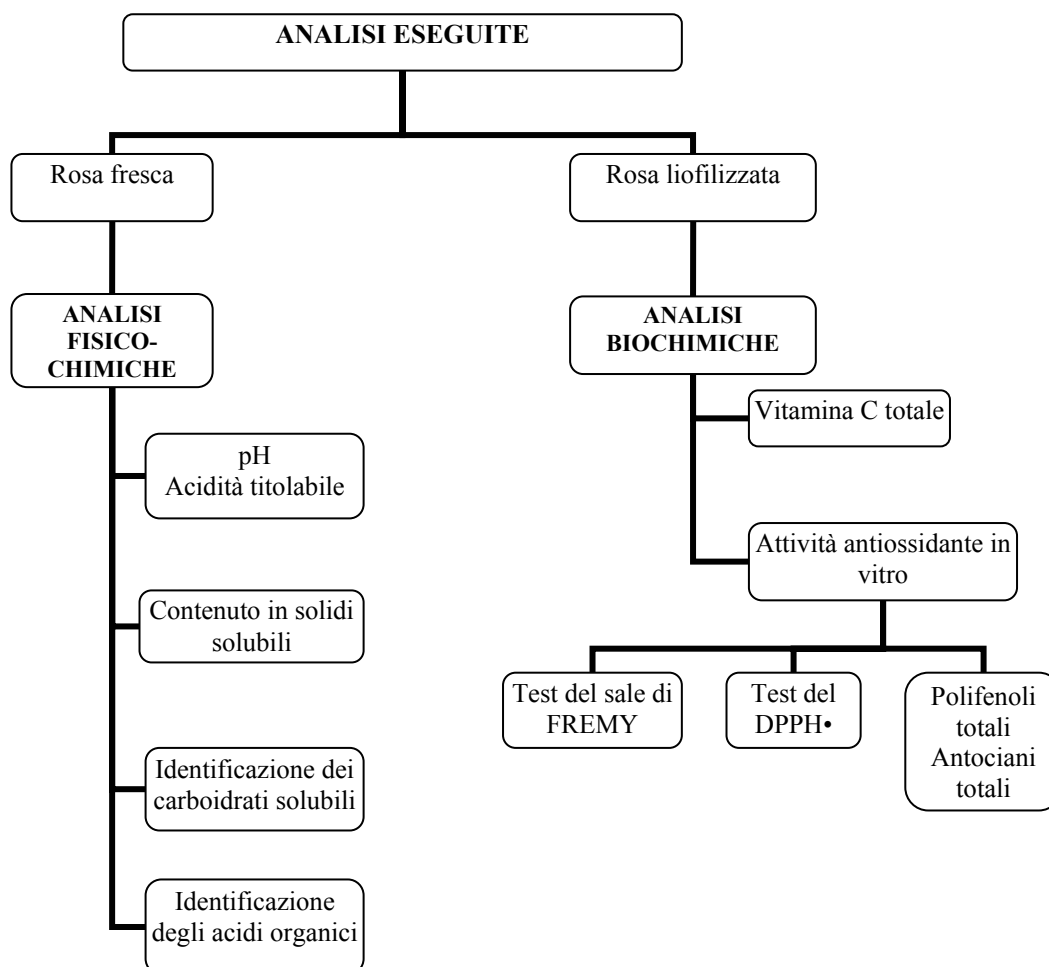


Figura 17 Analisi eseguite sul campione rosa fresca e rosa liofilizzata

### 4.2.1 Contenuto in solidi solubili (SSC), pH, acidità titolabile (TA)

#### 1. Rose inglesi

In tabella 22 sono riportati i risultati relativi alle determinazioni del contenuto in solidi solubili (SSC), dell'acidità titolabile (TA) e del pH per le cultivar di rose inglesi. Per il parametro pH, le 5 cultivar hanno mostrato valori compresi tra 4,89 di *Evelyn* e 5,29 di *Sweet Juliet* non significativamente differenti fra loro. La rosa *Evelyn*, si è distinta per il più basso valore SSC, mentre *Eglantyne* per il valore più elevato.

*Eglantyne* e *Graham Thomas* si sono distinte per i bassi valori del rapporto TA/SSC, mentre *Jeoff Hamilton* ed *Evelyn* per valori significativamente più alti del rapporto TA/SSC.

**Tabella 22 Valori dei parametri SSC, TA, pH e rapporto TA/SSC delle 5 cultivar di rose inglesi**

Cultivar	SSC (°Brix)	TA (meq/kg)	pH	TA/SSC
<i>Eglantyne</i>	7,65 ± 0,03 a	29,20 ± 0,70 a	5,14 ± 0,12 a	3,82 ± 0,08 d
<i>Jeoff Hamilton</i>	7,57 ± 0,05 ab	40,50 ± 0,10 a	5,07 ± 0,07 a	5,35 ± 0,05 b
<i>Graham Thomas</i>	7,38 ± 0,08 b	29,25 ± 0,45 a	4,92 ± 0,04 a	3,96 ± 0,02 cd
<i>Sweet Juliet</i>	6,65 ± 0,09 c	28,30 ± 0,00 a	5,29 ± 0,04 a	4,26 ± 0,06 c
<i>Evelyn</i>	6,46 ± 0,06 d	38,45 ± 0,05 a	4,89 ± 0,08 a	5,95 ± 0,05 a
Significatività	***	ns	ns	***

Per ogni parametro viene riportato il valore medio ( $n=2$ ) e il relativo errore standard. Lettere differenti indicano valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey. Significatività di F: \*\*\*,  $P \leq 0,001$ , ns = non significativo.

## 2. Rose coprisuolo

I valori dei parametri SSC, TA e pH delle rose coprisuolo sono riportati nella tabella 23.

**Tabella 23 Valori dei parametri SSC, TA, pH e rapporto TA/SSC delle 4 cultivar di rose coprisuolo**

Cultivar	SSC (°Brix)	TA (meq/kg)	pH	TA/SSC
<i>Cumbaja</i>	6,92 ± 0,00 b	33,50 ± 0,50 d	5,50 ± 0,13 a	4,84 ± 0,07 c
<i>Marvelle</i>	6,18 ± 0,02 c	37,50 ± 1,00 c	5,71 ± 0,08 a	6,07 ± 0,14 b
<i>Home &amp; Garden</i>	5,98 ± 0,02 c	48,60 ± 1,10 b	4,88 ± 0,40 ab	8,13 ± 0,21 a
<i>Bad Birnbach</i>	7,93 ± 0,01 a	62,65 ± 1,15 a	4,70 ± 0,33 b	7,90 ± 0,14 a
Significatività	***	***	**	***

Per ogni parametro viene riportato il valore medio ( $n=2$ ) e il relativo errore standard. Lettere differenti indicano valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey. Significatività di F: \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ .

Le cultivar di questo gruppo si sono differenziate per tutti i parametri. La cultivar *Bad Birnbach* ha mostrato valori statisticamente più elevati di SSC e TA mentre ha presentato il valore di pH più basso rispetto alle altre cultivar. La rosa *Cumbaja*, invece, si è differenziata per la bassa acidità titolabile e per il minor valore del rapporto TA/SSC. La varietà *Home & Garden* avendo il minor contenuto in solidi solubili associato ad un valore di acidità titolabile superiore alla media del gruppo, ha presentato il più elevato valore del rapporto TA/SSC.

## 3. Rose antiche

I valori relativi a SSC, TA e pH mostrati in tabella 24 sono stati ricavati effettuando una singola lettura per ogni parametro per ciascuna cultivar a causa della ridotta quantità di materia prima disponibile al momento dell'analisi.

Le varietà *Blush Damask* e *York & Lancaster* si sono distinte per i più elevati valori di pH mentre la cultivar *Chianti* per il valore più basso.

Per le analisi di SSC e TA la rosa *York & Lancaster* si è distinta per l'alto valore di TA e per il maggior valore del rapporto TA/SSC mentre la varietà *Blush Damask* ha mostrato un elevato valore di SSC.

**Tabella 24 Valori dei parametri SSC, TA, pH e rapporto TA/SSC delle rose antiche**

<b>Cultivar</b>	<b>SSC (°Brix)</b>	<b>TA (meq/kg)</b>	<b>pH</b>	<b>TA/SSC</b>
<i>York and Lancaster</i>	11,41	78,50	6,14	6,88
<i>Belle Poitevine</i>	9,80	63,90	5,69	6,52
<i>Chianti</i>	11,86	70,10	5,10	5,91
<i>Roseaie de l'Hay</i>	10,96	53,70	5,33	4,90
<i>Blush Damask</i>	13,13	68,30	6,50	5,20

#### 4. Confronto fra i 3 gruppi di rose: inglesi, coprisuolo, antiche

Nella tabella 25 sono presentati i valori medi dei tre gruppi di rose relativi a SSC, TA, pH e rapporto TA/SSC. Il gruppo delle rose antiche ha mostrato alti valori del contenuto in solidi solubili, dell'acidità titolabile e del pH. Le rose coprisuolo hanno presentato il più alto rapporto TA/SSC. Le rose inglesi hanno mostrato i più bassi valori di TA e pH.

**Tabella 25 Valori dei parametri SSC, TA, pH e rapporto TA/SSC per ciascun gruppo di rose.**

<b>Gruppo</b>	<b>SSC (°Brix)</b>	<b>TA (meq/kg)</b>	<b>pH</b>	<b>TA/SSC</b>
Rose inglesi	7,14 ± 0,16 b	33,14 ± 0,17 c	5,06 ± 0,06 b	4,67 ± 0,29 b
Rose coprisuolo	6,75 ± 0,29 b	45,56 ± 0,43 b	5,20 ± 0,19 ab	6,74 ± 0,51 a
Rose antiche	11,43 ± 0,55 a	66,90 ± 0,40 a	5,75 ± 0,26 a	5,88 ± 0,38 ab
Significatività	***	***	*	**

*Per ogni parametro viene riportato il valore medio e il relativo errore standard  
Lettere differenti indicano valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.  
Significatività di F: \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*,  $P \leq 0,05$ .*

#### 4.2.2 Acidi organici

Gli acidi organici quantificati sono stati il chinico, il malico, lo shikimico e il fumarico. Le condizioni di rilevazione in HPLC sono descritte nel paragrafo “3.3.3 Acidi organici”.

Nella figura 18 è presentato un esempio di separazione di acidi organici presenti nell'estratto della rosa *Belle Poitevine*. Gli acidi organici considerati sono stati identificati confrontando i tempi di ritenzione del campione con quelli degli acidi organici standard.

L'analisi è stata effettuata su tre estratti della stessa cultivar; la figura mette in evidenza la buona riproducibilità analitica.

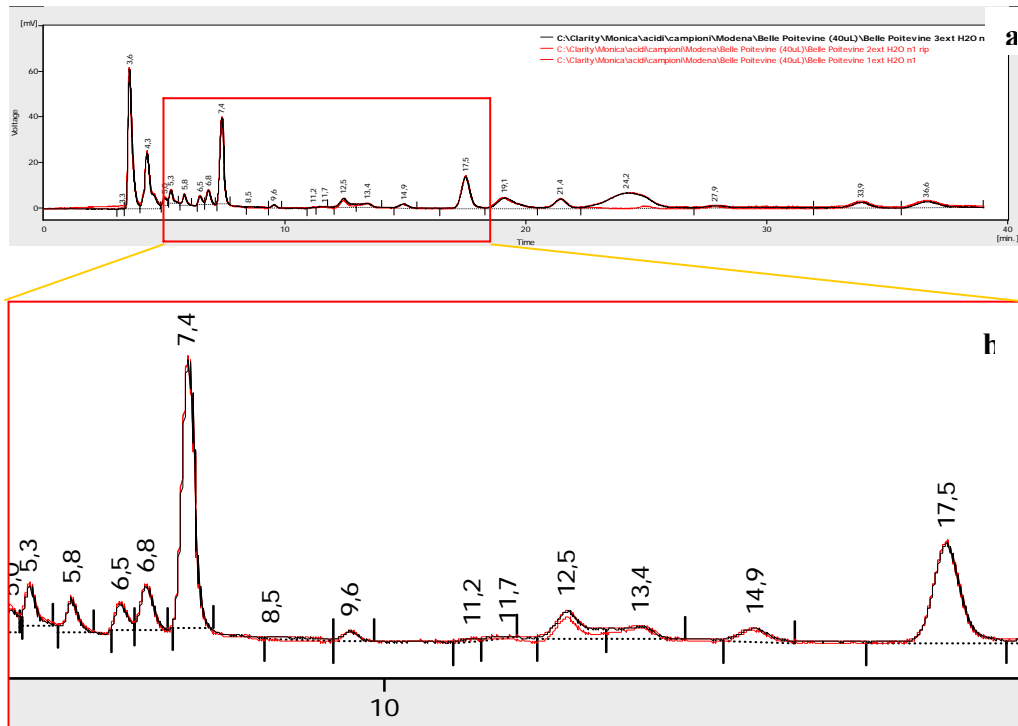


Figura 18 Esempio di separazione HPLC degli acidi organici. Campione *Belle Poitevine* (a). Dettaglio amplificato nell'intervallo 5-18 minuti (b).

Per quantificare ciascun acido organico presente in ogni campione è stata utilizzata la seguente equazione, in cui il dato finale è espresso in mg/100g di peso fresco (fw) (equazione 6):

$$mg / 100gf_w = \left[ \frac{\left( \frac{AREA_{HPLC}}{F_C} \right) \times V_{ESTR} \times F_{DIL}}{PESO_{CAMP}} \right] \times 100 \quad (6)$$

in cui:  $AREA_{HPLC}$  è il valore dell'area del picco in esame ottenuto dall'analisi HPLC,

$F_C$  è il fattore di correzione ricavato dall'equazione della linea di tendenza della retta di taratura di ciascun acido organico standard.

$V_{ESTR}$  è il volume di estrazione, ovvero l'acqua aggiunta al momento della preparazione del campione

$F_{DIL}$  è il fattore di diluizione

$PESO_{CAMP}$  è il peso del campione

## 1. Rose inglesi

In tabella 26 sono riportati i valori medi degli acidi organici espressi in mg/100 fw per le cultivar di rose inglesi considerate. Per quanto concerne l'acido chinico non sono state rilevate differenze tra le varie cultivar, anche se la varietà *Graham Thomas* ha mostrato un contenuto notevole rispetto alle altre. Inoltre questa varietà ed *Evelyn* si sono contraddistinte per il maggior contenuto in acido malico. I quantitativi di acido shikimico sono risultati più alti nelle cultivar *Eglantyne* e *Jeoff Hamilton*, la rosa *Graham Thomas* si è distinta per il quantitativo più elevato di acido fumarico.

**Tabella 26 Valori medi degli acidi organici per le 5 cultivar di rose inglesi**

Cultivar	Chinico	Malico	Shikimico	Fumarico
<i>Eglantyne</i>	85,31 ± 5,02 a	35,64 ± 0,25 b	2,62 ± 0,08 a	283,91 ± 13,38 bc
<i>Jeoff Hamilton</i>	84,30 ± 6,58 a	40,62 ± 2,70 b	2,04 ± 0,06 b	234,41 ± 5,11 c
<i>Sweet Juliet</i>	94,74 ± 16,22 a	36,25 ± 5,56 b	0,71 ± 0,02 c	257,75 ± 25,29 bc
<i>Evelyn</i>	78,96 ± 2,67 a	68,79 ± 2,59 a	0,57 ± 0,02 cd	317,50 ± 17,76 b
<i>Graham Thomas</i>	123,42 ± 33,03 a	65,78 ± 2,20 a	0,46 ± 0,00 d	404,22 ± 14,08 a
Significatività	ns	***	***	***

Per ogni acido organico viene riportato il valore medio (n=3) e il relativo errore standard  
Lettere differenti indicano valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey  
Significatività di F: \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; ns= non significativo.

## 2. Rose coprisuolo

Tra le rose coprisuolo analizzate, la varietà *Bad Birnbach* ha mostrato il più elevato tenore in acido chinico mentre la cultivar *Home & Garden* si è differenziata per il più basso valore di acido malico. Quest'ultima però ha mostrato un valore in acido shikimico considerevole rispetto alle altre; la rosa *Marvelle* si è distinta per il notevole contenuto di acido fumarico (Tabella 27).



**Tabella 27 Valori degli acidi organici per le 5 cultivar di rose coprisuolo**

Cultivar	Chinico	Malico	Shikimico	Fumarico
<i>Home &amp; Garden</i>	175,04 ± 1,82 b	66,01 ± 3,48 b	7,94 ± 0,20 a	320,66 ± 7,90 b
<i>Marvelle</i>	130,17 ± 12,32 b	116,83 ± 10,44 a	2,96 ± 0,23 c	699,02 ± 125,03 a
<i>Bad Birnbach</i>	272,07 ± 3,48 a	121,74 ± 2,06 a	6,47 ± 0,09 b	423,35 ± 10,30 ab
<i>Cumbaja</i>	144,36 ± 20,04 b	100,00 ± 6,99 a	2,33 ± 0,16 c	615,23 ± 46,02 ab
Significatività	**	**	***	**

Per ogni acido organico viene riportato il valore medio ( $n=3$ ) e il relativo errore standard  
 Lettere differenti indicano valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.  
 Significatività di F: \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ .

### 3. Rose antiche

Per il gruppo delle rose antiche, le cultivar hanno mostrato contenuti in acido chinico paragonabili, eccetto la cultivar *Belle Poitevine* che ha presentato il valore più basso. Le varietà *Blush Damask* e *York & Lancaster* si sono distinte per i quantitativi di acido malico statisticamente più elevati. Le rose *York & Lancaster* e *Belle Poitevine* si sono distinte per l'elevato contenuto in acido shikimico mentre la varietà *Chianti* per il minor contenuto. La cultivar *Blush Damask* ha mostrato valori nettamente superiori di acido fumarico rispetto alle altre cultivar (Tabella 28).

**Tabella 28 Valori degli acidi organici per le 5 cultivar di rose antiche**

Cultivar	Chinico	Malico	Shikimico	Fumarico
<i>York &amp; Lancaster</i>	314,99 ± 55,71 a	170,04 ± 13,33 a	12,87 ± 1,01 a	684,89 ± 52,58 ab
<i>Belle Poitevine</i>	130,68 ± 6,87 b	104,45 ± 2,10 b	13,01 ± 0,03 a	521,87 ± 14,44 b
<i>Chianti</i>	308,79 ± 3,34 a	110,98 ± 3,22 b	7,23 ± 0,38 c	616,77 ± 51,56 b
<i>Roseaie de l'Hay</i>	326,19 ± 20,84 a	117,73 ± 10,11 b	8,80 ± 0,44 bc	455,20 ± 22,08 b
<i>Blush Damask</i>	328,12 ± 8,52 a	178,48 ± 7,11 a	10,84 ± 0,38 ab	879,29 ± 94,08 a
Significatività	**	**	***	**

Per ogni acido organico viene riportato il valore medio ( $n=3$ ) e il relativo errore standard  
 Lettere differenti indicano valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.  
 Significatività di F: \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ .

### 4. Confronto fra i 3 gruppi di rose: inglesi, coprisuolo, antiche

Nella tabella 29 sono presentati i valori medi dei tre gruppi di rose relativi ai quattro acidi organici esaminati: chinico, malico, shikimico e fumarico. Il gruppo delle rose antiche ha mostrato valori molto alti per tutti e 4 gli acidi organici considerati, viceversa, il gruppo delle rose inglesi i valori più bassi.

**Tabella 29 Valori di acido chinico, acido malico, acido shikimico e acido fumarico per ciascun gruppo di rose**

Gruppo	Chinico	Malico	Shikimico	Fumarico
Rose inglesi	93,60 ± 6,16 c	49,56 ± 4,98 c	1,29 ± 0,29 c	301,16 ± 21,08 b
Rose coprisuolo	181,13 ± 20,59 b	100,96 ± 8,44 b	4,95 ± 0,87 b	511,72 ± 58,26 a
Rose antiche	283,19 ± 26,12 a	136,70 ± 10,96 a	10,44 ± 0,29 a	618,17 ± 49,05 a
Significatività	***	***	***	***

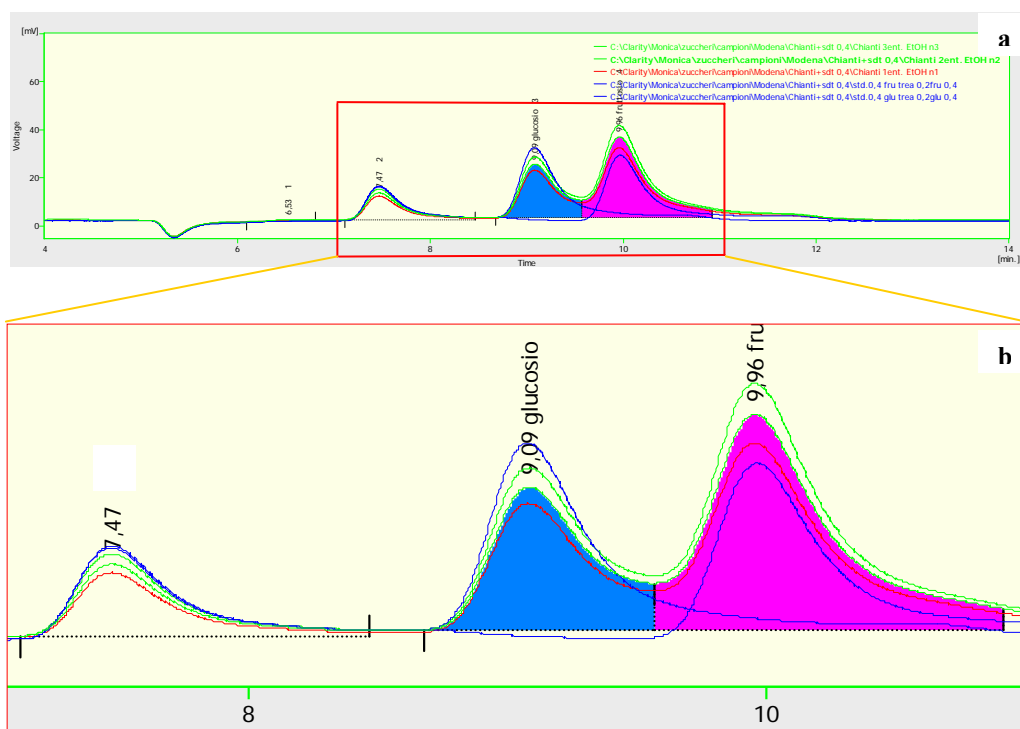
Per ogni acido organico viene riportato il valore medio ( $n=3$ ) e il relativo errore standard. Lettere differenti indicano valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey. Significatività di F: \*\*\*,  $P \leq 0,001$ .

#### 4.2.3 Carboidrati solubili

I carboidrati solubili individuati nei campioni di rose mediante analisi HPLC sono stati il glucosio e il fruttosio; per la loro identificazione sono stati utilizzati i rispettivi standard esterni alle condizioni descritte nel capitolo “3.3.4 Carboidrati solubili”.

Nella figura 19 è rappresentato un esempio di separazione HPLC dei carboidrati presenti nel campione *Chianti*. Al tempo di ritenzione 7,4 minuti corrisponde lo zucchero trealosio, non presente nelle rose e aggiunto ai campioni analizzati come standard interno per verificare il recupero dell’analita durante la fase di estrazione.

L’analisi è stata effettuata su cinque estratti della stessa cultivar; il grafico mette in evidenza la buona riproducibilità analitica.



**Figura 19 Esempio di separazione HPLC dei carboidrati solubili. Campione Chianti (a); dettaglio amplificato nell’intervallo 7-11 minuti (b)**

Per correggere eventuali errori determinati durante la preparazione del campione è stato calcolato il fattore di correzione ( $F_c$ ) (equazione 7):

$$F_c = \frac{W_x}{W_{est}} \times \frac{A_{est}}{A_x} \quad (7)$$

in cui  $W_x$  è la concentrazione di glucosio o fruttosio standard

$W_{est}$  è la concentrazione dello standard esterno

$A_{est}$  è l'area dello standard esterno

$A_x$  è l'area di glucosio o fruttosio standard

L'area dello standard interno è stata utilizzata per la quantificazione dei carboidrati; la concentrazione dello zucchero presente nel campione ( $W_{campione}$ ) espressa in  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , è stata calcolata attraverso la l'equazione 8:

$$W_{campione} = W_{est} \left( \frac{A_{campione}}{A_{int}} \right) \times F_c \quad (8)$$

in cui  $W_{est}$  è la concentrazione dello standard esterno

$A_{campione}$  è l'area dello zucchero presente nel campione

$A_{int}$  è l'area dello standard interno

$F_c$  è il fattore di correzione precedentemente calcolato

Infine, il dato è stato espresso in  $\text{mg}/\text{g}$  di peso fresco (fw) (equazione 9):

$$\text{mg} / \text{g}_{fw} = \frac{W_{campione} \times F_{DIL} \times V_{ESTR}}{PESO_{CAMP}} \quad (9)$$

in cui  $W_{campione}$  è la concentrazione dello zucchero nel campione

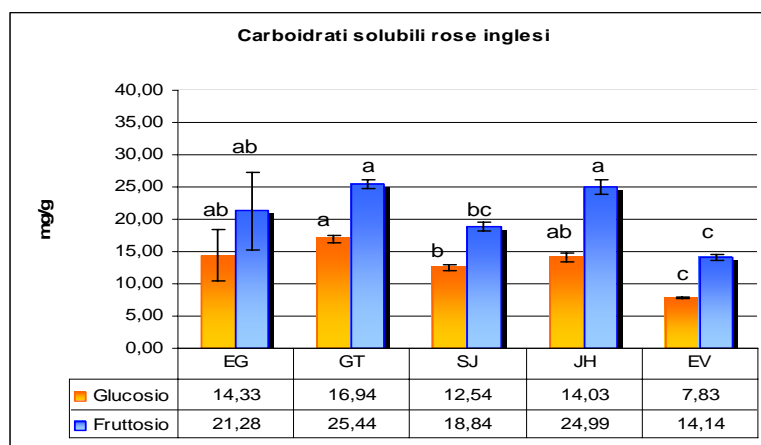
$F_{DIL}$  è fattore di diluizione

$V_{ESTR}$  è il volume di estrazione

$PESO_{CAMP}$  è la quantità di rosa liofilizzata pesata al momento della preparazione del campione

### 1. Rose inglesi

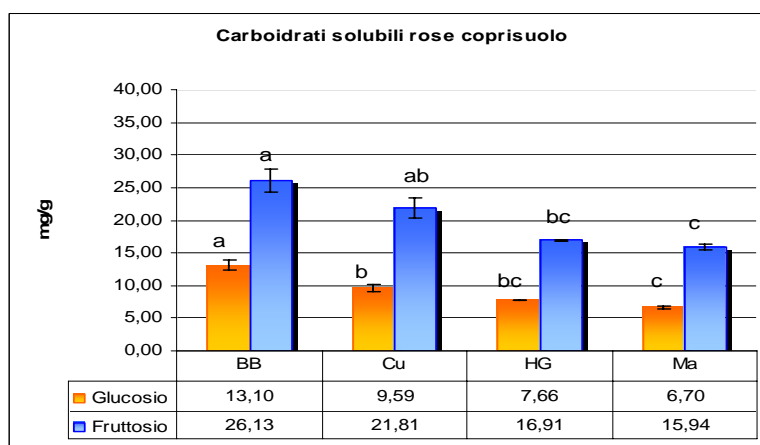
I quantitativi medi di glucosio e fruttosio determinati nelle 5 cultivar di rose inglesi sono illustrati in figura 20. La cultivar *Graham Thomas* ha mostrato un contenuto di glucosio più elevato rispetto alle altre varietà, inoltre, come la rosa *Jeoff Hamilton* è risultata la cultivar più ricca in fruttosio. Viceversa, la rosa *Evelyn* si è differenziata per i valori più bassi di entrambi gli zuccheri.



**Figura 20** Contenuto di glucosio e fruttosio per le 5 rose inglesi cultivar Eglantyne (EG), Graham Thomas (GT), Sweet Juliet (SJ), Jeoff Hamilton (JH), Evelyn (EV)  
 Per ogni zucchero viene riportato il valore medio ( $n=3$ ) e il relativo errore standard  
 A lettere diverse, per ogni zucchero, corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey

## 2. Rose coprisuolo

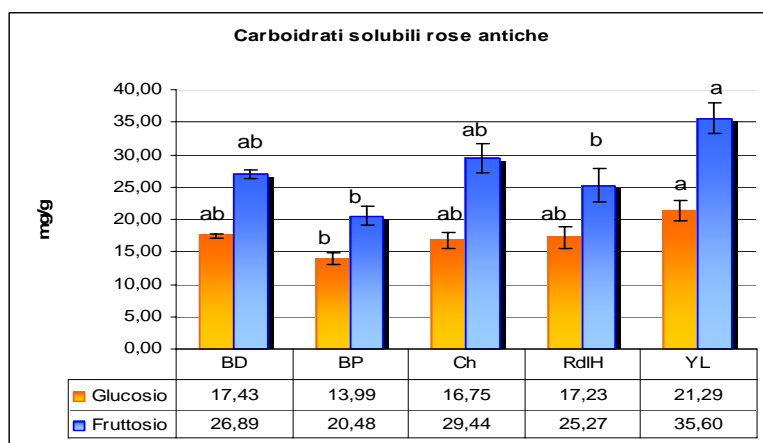
La varietà *Bad Birnbach* si è distinta per i contenuti più alti sia di glucosio sia di fruttosio, mentre la varietà *Marvelle* per i valori più bassi (figura 21).



**Figura 21** Contenuti di glucosio e fruttosio per le 4 cultivar di rose coprisuolo Bad Birnbach (BB), Cumbaja (Cu), Home & Garden (HG), Marvelle (Ma)  
 Per ogni zucchero viene riportato il valore medio ( $n=3$ ) e il relativo errore standard  
 A lettere diverse, per ogni zucchero, corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.

## 3. Rose antiche

Nella figura 22 sono mostrati i contenuti in carboidrati solubili nelle rose antiche. La varietà *York & Lancaster* ha presentato i maggiori contenuti sia di glucosio sia di fruttosio mentre la cultivar *Belle Poitevine* si è differenziata per il minore tenore in zuccheri.



**Figura 22** Contenuti di glucosio e fruttosio per le 5 cultivar di rose antiche York & Lancaster (YL), Belle Poitevine (BP), Chianti (Ch), Roseraie de l'Hay (RDLH), Blush Damask (BD).

*Per ogni zucchero viene riportato il valore medio (n=3) e il relativo errore standard. A lettere diverse, per ogni zucchero, corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.*

#### 4. Confronto fra i 3 gruppi di rose: inglesi, coprisuolo, antiche

Nella tabella 30 sono presentati i valori medi dei tre gruppi di rose relativi ai due carboidrati considerati. Il gruppo delle rose antiche ha presentato i più elevati valori sia di glucosio sia di fruttosio, contrariamente al gruppo delle rose coprisuolo in cui sono stati riscontrati valori più bassi per entrambi gli zuccheri. Inoltre si nota che in tutti e tre i gruppi di rose il fruttosio è risultato presente in concentrazioni superiori rispetto al glucosio.

**Tabella 30** Valori medi di glucosio e fruttosio per i tre gruppi di rosa considerati.

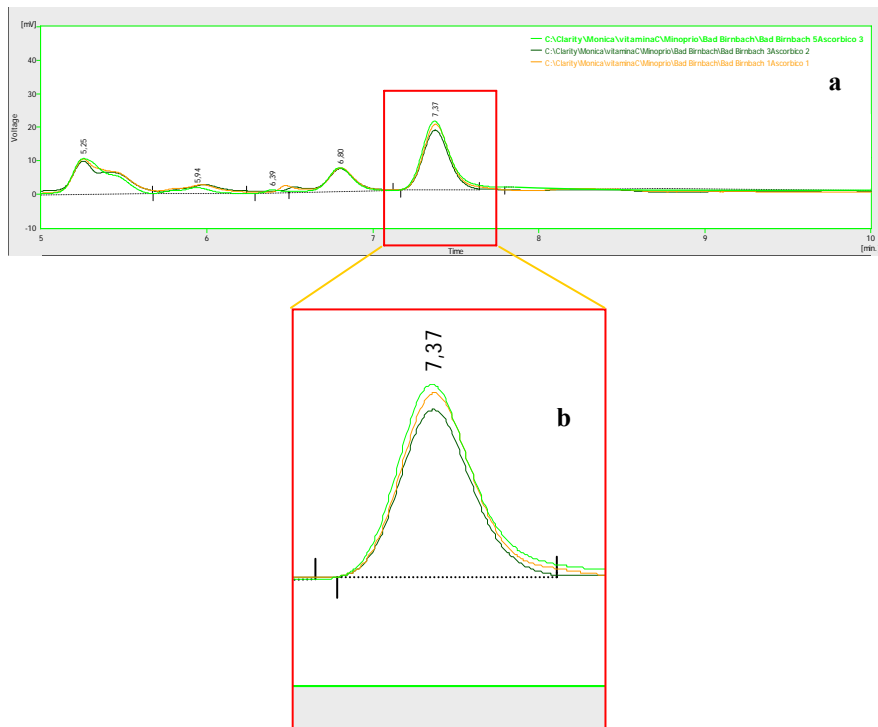
Gruppo	Glucosio	Fruttosio
Rose inglesi	13,56 ± 1,30 b	21,53 ± 1,80 c
Rose coprisuolo	9,18 ± 0,92 c	20,02 ± 1,52 ab
Rose antiche	17,15 ± 1,09 a	27,20 ± 2,07 a
Significatività	***	*

*Per ogni zucchero viene riportato il valore medio (n=3) e il relativo errore standard. Lettere differenti indicano valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey. Significatività di F: \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*,  $P \leq 0,05$*

#### 4.2.4 Vitamina C totale

La figura 23 mostra un esempio di separazione HPLC della vitamina C totale del campione di rosa *Bad Birnbach*. L'identificazione del picco dell'acido ascorbico è stata effettuata confrontando i tempi di ritenzione del campione con quelli dell'acido standard (tempo di ritenzione 7,4 minuti).

Confrontando i tracciati cromatografici sovrapposti di tre analisi eseguite su tre estratti diversi dello stesso campione si è potuta evidenziare la riproducibilità dell'analisi e la buona risoluzione del picco dell'acido ascorbico dagli altri composti presenti negli estratti.



**Figura 23** Esempio di separazione HPLC della vitamina C totale. Campione *Bad Birnbach* (a); dettaglio amplificato nell'intervallo 7,1-7,6 minuti (b).

La quantificazione della vitamina C totale presente nei campioni è stata ottenuta mediante l'equazione 10 ed è espressa in mg/100g di liofilizzato:

$$mg / 100g_{LIOF} = \left[ \frac{\left( \frac{AREA_{HPLC}}{F_C} \right) \times F_{DIL}}{PESO_{CAMP}} \right] \times 100 \quad (10)$$

in cui:  $AREA_{HPLC}$  è l'area del picco in esame

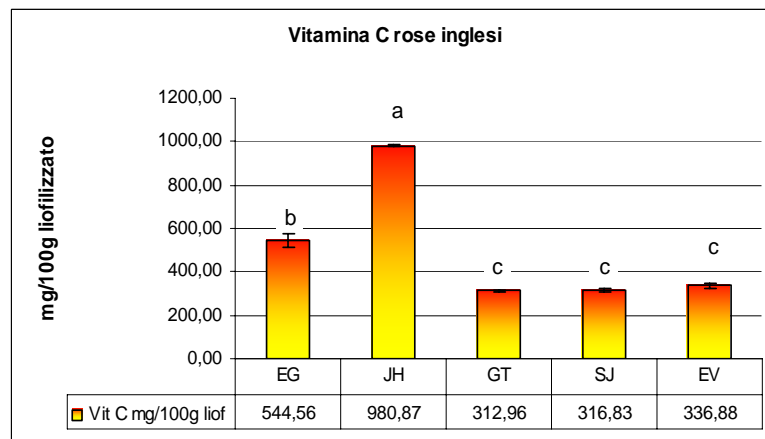
$F_C$  è il fattore di correzione calcolato attraverso l'equazione della linea di tendenza della retta di taratura dell'acido ascorbico standard

$F_{DIL}$  è il fattore di diluizione

$PESO_{CAMP}$  è il peso delle rose liofilizzate per la preparazione del campione

### 1. Rose inglesi

Considerando i contenuti medi di vitamina C totale delle rose inglesi (figura 24), la cultivar *Jeoff Hamilton* si è distinta per i valori più alti e la varietà *Eglantyne* per valori medio-elevati.



**Figura 24** Contenuto di vitamina C totale delle rose inglesi

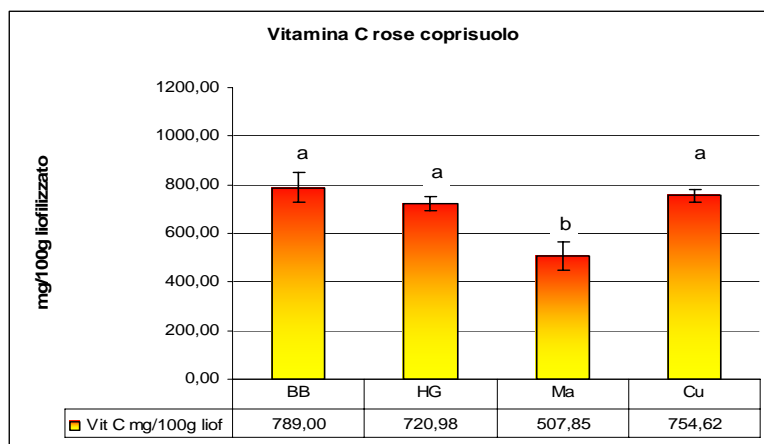
**Eglantyne (EG), Jeoff Hamilton (JH), Graham Thomas (GT), Sweet Juliet (SJ), Evelyn (EV)**

*Viene riportato il valore medio (n=3) e il relativo errore standard*

*A lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey*

### 2. Rose coprisuolo

I contenuti di vitamina C totale del gruppo delle rose coprisuolo sono pressoché paragonabili; le cultivar, infatti, hanno contenuti pari a circa 700 mg/100g di liofilizzato eccetto la varietà *Marville* che ha presentato valori inferiori (Figura 25).



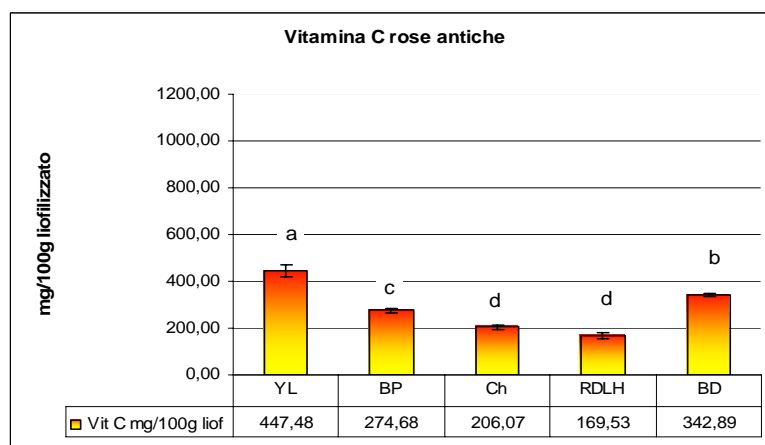
**Figura 25** Contenuto di vitamina C totale delle rose coprisuolo  
Bad Birnbach (BB), Home & Garden (HG), Marvelle (Ma), Cumbaja (Cu)

*Viene riportato il valore medio (n=3) e il relativo errore standard*

*A lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.*

### 3. Rose antiche

Considerando i risultati del contenuto in vitamina C totale delle rose antiche si sono osservati valori differenti tra le varie cultivar. In particolare valori più elevati sono stati evidenziati dalla varietà *York & Lancaster*, viceversa le rose *Roseaie de l'Hay* e *Chianti* hanno mostrato concentrazioni inferiori (Figura 26)



**Figura 26** Contenuto di vitamina C totale ed errore standard delle rose antiche  
York & Lancaster (YL), Belle Poitevine (BP), Chianti (Ch), Roseaie de l'Hay (RDLH),  
Blush Damask (BD).

*Viene riportato il valore medio (n=3) e il relativo errore standard*

*A lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.*

### 4. Confronto fra i 3 gruppi di rose: inglesi, coprisuolo, antiche

Nella tabella 31 sono presentati i valori medi di vitamina C totale dei tre gruppi di rose. Le cultivar del gruppo coprisuolo hanno mostrato contenuti più elevati per questa molecola, viceversa il gruppo delle rose antiche ha presentato i valori più bassi.



**Tabella 31 Valore medio di vitamina C totale nei tre gruppi di rosa considerati.**

<b>Gruppo</b>	<b>Vitamina C totale (mg/100g di liofilizzato)</b>
Rose inglesi	493,32 ± 86,44 ab
Rose coprisuolo	689,46 ± 41,43 a
Rose antiche	288,93 ± 34,76 b
Significatività	***

*Viene riportato il valore medio (n=3) e il relativo errore standard  
Lettere differenti indicano valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.  
Significatività di F: \*\*\*,  $P \leq 0,001$ .*

#### **4.2.5 Polifenoli totali e test antiossidanti del DPPH e del Sale di Fremy**

Per lo studio dell'attività antiossidante delle rose sono stati eseguiti:

- il test del DPPH• (radicale 2,2 diphenyl-1-picryldrazyl) mediante analisi spettrofotometrica
- il test del sale di Fremy (radicale nitrosodisulfonato di potassio) mediante Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR)
- la determinazione dei polifenoli totali mediante analisi spettrofotometrica

Tali analisi sono state effettuate in doppio su campioni tal quali e sulla sola frazione idrofila; la quantificazione è stata effettuata con la retta di taratura dell'acido gallico standard 0,1%.

I risultati ottenuti, espressi in mgGAE/g, sono stati ricavati attraverso il calcolo di diverse formule.

- Per il test del DPPH• è stata calcolata la percentuale di abbattimento, %<sub>ABBATTIMENTO</sub>, (equazione 11), ovvero la capacità del campione di legarsi al radicale DPPH•, riconducibile alla concentrazione di antiossidanti presenti nell'analita:

$$\%_{ABBATTIMENTO} = \left( \frac{A_{BIANCO} - A_{CAMPIONE}}{A_{BIANCO}} \right) \times 100 \quad (11)$$

dove  $A_{BIANCO}$  è l'assorbanza del bianco

$A_{CAMPIONE}$  è l'assorbanza del campione al terzo minuto di reazione con DPPH•.

Il risultato finale è espresso in mgGAE/g (equazione 12):

$$mgGAE / g = \left[ \frac{\left( \frac{\% \text{ ABBATTIMENTO} - F_C}{F_C} \right) \times F_{DIL}}{PESO_{CAMP}} \right] \times 1000 \quad (12)$$

in cui:

$F_C$  è il fattore di correzione della retta di taratura dello standard di acido gallico

$F_{DIL}$  è il fattore di diluizione

$PESO_{CAMP}$  è il quantitativo di campione pesato

- Per il test del sale di Fremy è stata calcolata la percentuale di abbattimento mediante la procedura utilizzata per il test del DPPH•

- Per la determinazione dei polifenoli totali è stata misurata l'assorbanza netta del campione ( $A_{NETTACAMP}$ ) sottraendo all'assorbanza dell'analita ( $A_{CAMPIONE}$ ) quella del bianco ( $A_{BIANCO}$ ) come mostrato nell'equazione 8:

$$A_{NETTACAMP} = A_{CAMPIONE} - A_{BIANCO} \quad (13)$$

Il dato finale è stato espresso in mgGAE/g (equazione 14):

$$mgGAE / g = \left[ \frac{\left( \frac{A_{NETTACAMP}}{F_C} \right) \times V_{ESTR} \times F_{DIL}}{PESO_{CAMP}} \right] \times 1000 \quad (14)$$

dove  $F_C$  è il fattore di correzione

$V_{ESTR}$  è il volume di estrazione

$F_{DIL}$  è il fattore di diluizione

$PESO_{CAMP}$  è il peso di rose liofilizzate utilizzate per la preparazione del campione

### 1. Rose inglesi

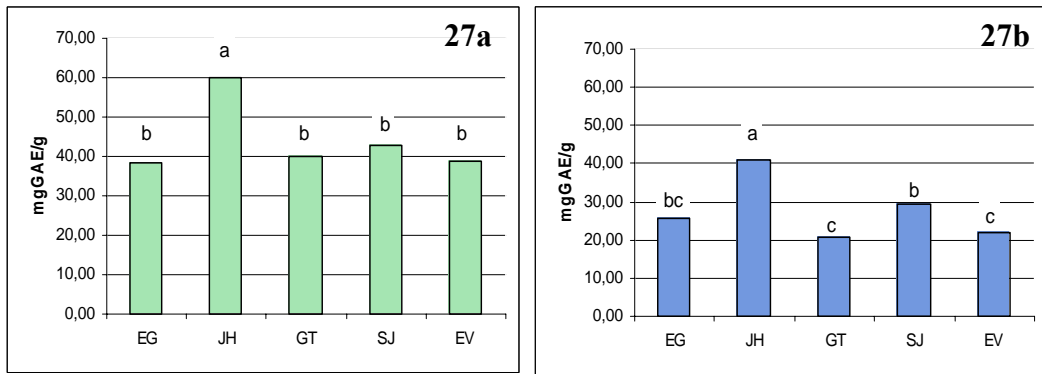
I risultati delle determinazioni dell'attività antiossidante sulle rose inglesi sono presentati in tabella 32.

**Tabella 32** Contenuto di polifenoli totali e attività antiossidante degli estratti tal quali e degli estratti idrofilici delle rose inglesi.

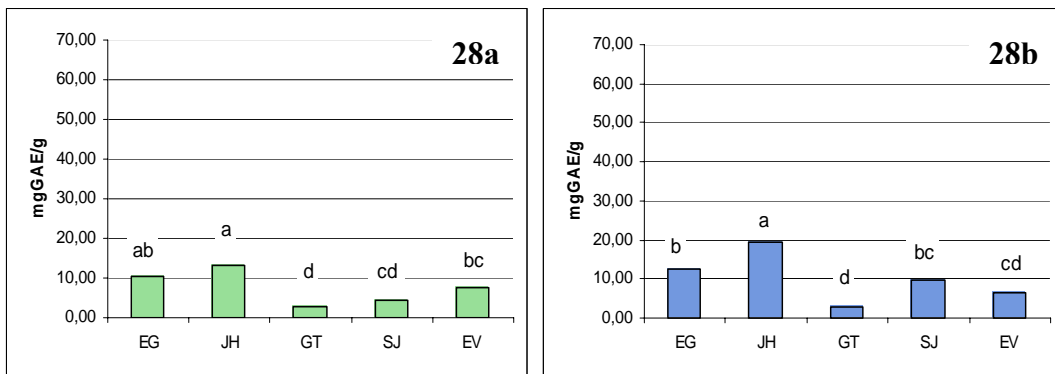
Cultivar	Estratti tal quali (mgGAE/g)			Estratti idrofilici (mgGAE/g)		
	Polifenoli	DPPH	Sale di Fremy	Polifenoli	DPPH	Sale di Fremy
<i>Eglantyne</i>	38,45 ± 2,40	10,56 ± 1,20	12,26 ± 1,50	25,75 ± 0,85	12,53 ± 0,51	12,64 ± 0,49
<i>Jeoff Hamilton</i>	60,15 ± 1,61	13,05 ± 0,42	14,44 ± 2,15	41,16 ± 0,40	19,44 ± 0,74	13,63 ± 0,97
<i>Graham Thomas</i>	39,98 ± 0,68	2,83 ± 0,77	3,69 ± 1,24	20,58 ± 1,19	2,66 ± 0,75	3,19 ± 0,78
<i>Sweet Juliet</i>	42,74 ± 0,63	4,49 ± 0,90	8,18 ± 0,07	29,28 ± 0,53	9,59 ± 121	9,29 ± 0,39
<i>Evelyn</i>	38,96 ± 0,91	7,75 ± 0,41	9,96 ± 0,94	22,13 ± 1,39	6,36 ± 0,62	10,71 ± 0,15
Significatività	**	**	**	**	**	**

Per ogni parametro è indicato il valore medio ( $n=2$ ) e l'errore standard  
Significatività di F: \*\*,  $P \leq 0,01$ .

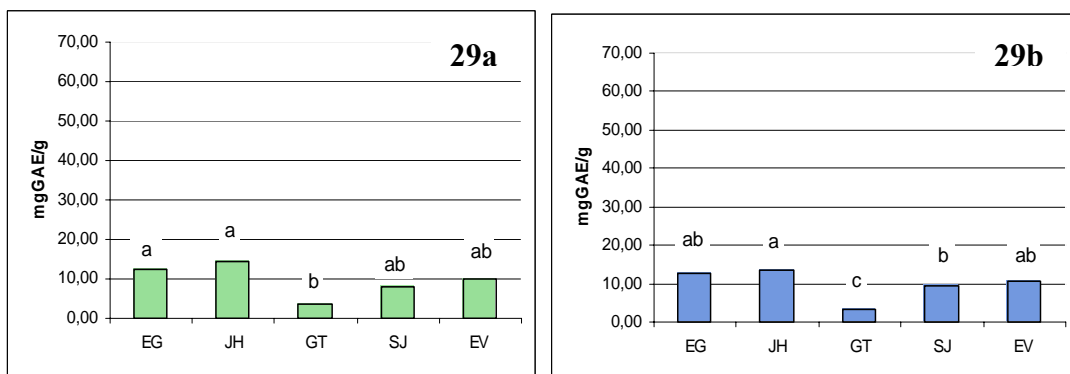
Particolarmente rilevante è il contenuto in polifenoli riscontrato nella cultivar *Jeoff Hamilton* sia nell'estratto tal quale sia in quello idrofilico. Le altre cultivar hanno mostrato un contenuto simile di polifenoli in entrambi i tipi di estratto (figura 27). Con il test del DPPH• è stato possibile evidenziare una maggiore attività antiradicalica degli estratti idrofilici. In entrambi i tipi di estratto, inoltre, per le cultivar *Jeoff Hamilton* ed *Eglantyne* l'attività antiradicalica è risultata più elevata (figura 28). Il test del sale di Fremy conferma i risultati dei test precedenti. Infatti, in generale si può affermare che gli estratti idrofilici sono quelli che hanno determinato un maggior abbattimento verso il radicale sale di Fremy; in questo caso la differenza fra i due tipi di estratto è risultata meno marcata rispetto al test del radicale DPPH•. Le cultivar *Jeoff Hamilton* ed *Eglantyne* si sono distinte per la maggiore attività antiossidante mentre la rosa *Graham Thomas* ha mostrato il valore più basso di abbattimento del radicale (figura 29).



**Figura 27** Contenuto di polifenoli totali negli estratti tal quali (27a) e negli estratti idrofilici (27b) delle rose inglesi



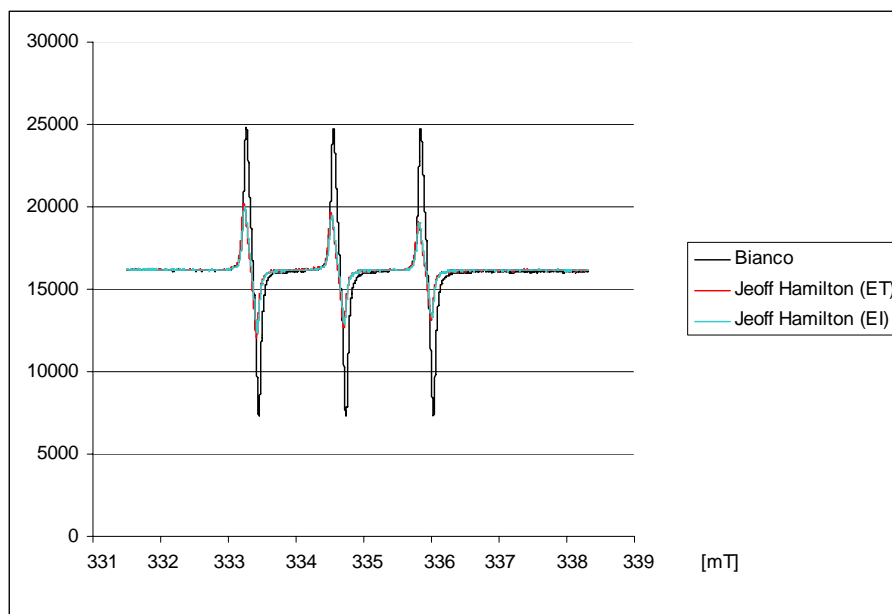
**Figura 28** Test del DPPH• negli estratti tal quali (28a) e negli estratti idrofilici (28b) delle rose inglesi



**Figura 29** Test del sale di Fremy negli estratti tal quali (29a) e negli estratti idrofilici (29b) delle rose inglesi

**Eglantyne (EG), Jeoff Hamilton (JH), Graham Thomas (GT), Sweet Juliet (SJ), Evelyn (EV)**  
*A lettere diverse per ogni grafico corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey*

Nella figura 30 è mostrato lo spettro rilevato per Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR) relativo alla cultivar *Jeoff Hamilton*; il segnale dato dalla soluzione del sale di Fremy (bianco) è abbattuto dalla presenza di molecole antiossidanti presenti sia nell'estratto del campione tal quale (*Jeoff Hamilton* ET), sia nell'estratto idrofilico (*Jeoff Hamilton* EI), ha indicato l'effetto antiradicalico esplicitato dall'estratto vegetale.



**Figura 30** Spettro all'EPR della cultivar *Jeoff Hamilton* estratto tal quale (ET), *Jeoff Hamilton* estratto idrofilico (EI) rispetto al bianco

## 2. Rose coprisuolo

I valori del contenuto in polifenoli totali e dei test dell'attività antiossidante per le rose coprisuolo sono mostrati nella tabella 33.

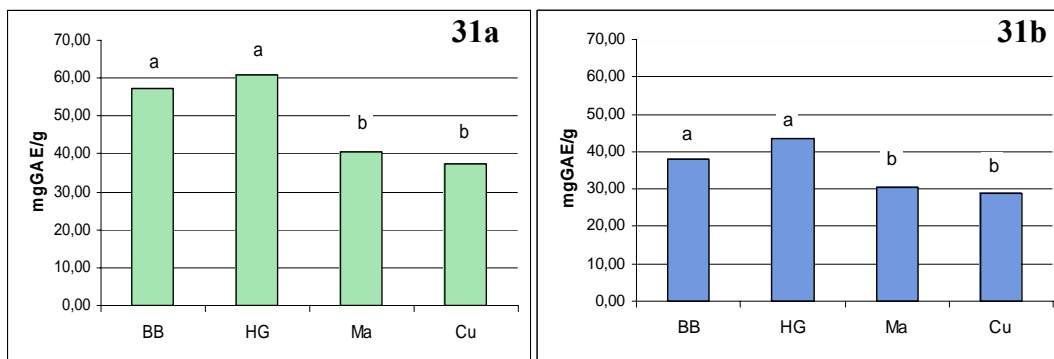
**Tabella 33** Contenuto di polifenoli totali e attività antiossidante degli estratti tal quali e degli estratti idrofilici delle rose coprisuolo.

Cultivar	Estratti tal quali (mgGAE/g)			Estratti idrofilici (mgGAE/g)		
	Polifenoli	DPPH	Sale di Fremy	Polifenoli	DPPH	Sale di Fremy
<i>Bad Birnbach</i>	57,35 ± 2,93	19,24 ± 0,02	21,75 ± 0,76	37,95 ± 0,05	18,88 ± 0,58	25,16 ± 1,98
<i>Home &amp; Garden</i>	60,79 ± 1,09	20,07 ± 0,22	21,67 ± 0,34	43,38 ± 0,95	18,17 ± 0,08	18,80 ± 0,46
<i>Marvelle</i>	40,69 ± 0,49	14,36 ± 0,95	12,71 ± 1,36	30,53 ± 0,07	12,62 ± 0,17	13,55 ± 0,88
<i>Cumbaja</i>	37,24 ± 0,97	11,84 ± 0,47	10,21 ± 1,09	29,00 ± 2,05	10,64 ± 0,20	13,61 ± 0,57
Significatività	**	**	**	**	**	**

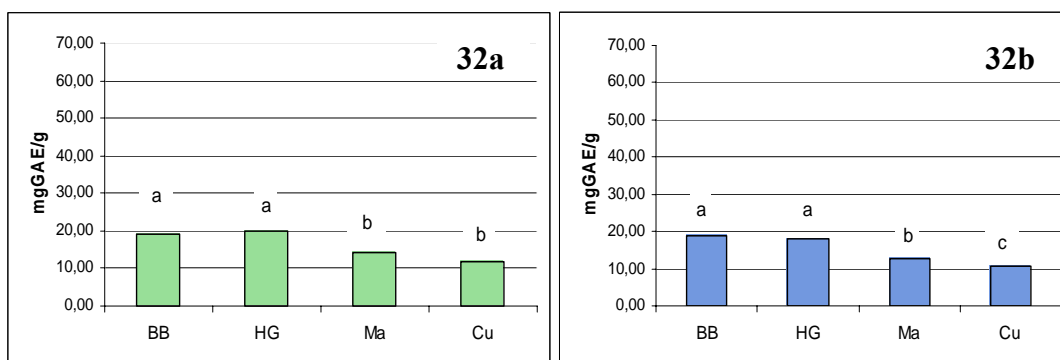
Per ogni parametro è indicato il valore medio ( $n=2$ ) e l'errore standard  
Significatività di F: \*\*,  $P \leq 0,01$ .

Dai risultati dell'analisi dei polifenoli totali sono stati osservati contenuti elevati soprattutto negli estratti tal quali. Nell'ambito delle 4 cultivar copri suolo si sono distinte *Bad Birnbach* e *Home e Garden* per i contenuti maggiori (figura 31). I risultati ottenuti con il test del DPPH•

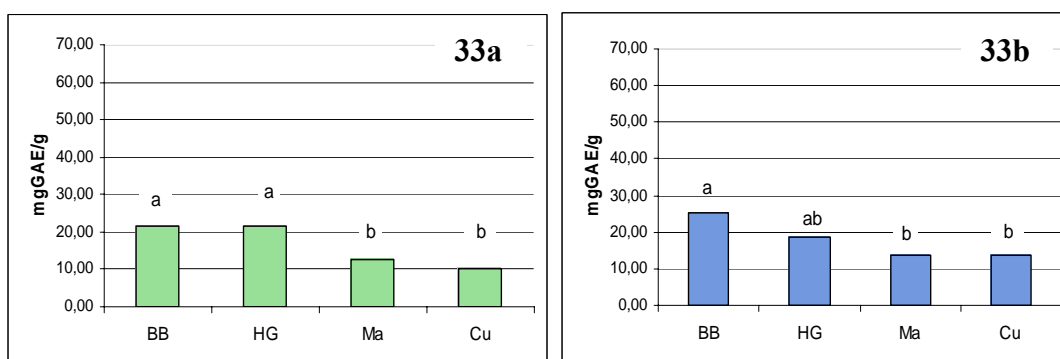
sono paragonabili per entrambi gli estratti e sottolineano quanto già affermato precedentemente per l'analisi dei polifenoli totali, infatti, anche in questo caso valori maggiori di abbattimento radicale sono stati osservati nelle cultivar *Bad Birnbach* e *Home & Garden* (figura 32). Considerando l'esito del test del sale di Fremy, le cultivar *Bad Birnbach* e *Home & Garden* sono risultate quelle con attività antiossidante maggiore, a conferma dei risultati delle analisi dei polifenoli e del test DPPH• (figura 33).



**Figura 31** Contenuto di polifenoli totali negli estratti tal quali (31a) e negli estratti idrofilici (31b) delle rose coprisuolo



**Figura 32** Test antiossidante del DPPH• negli estratti tal quali (32a) e negli estratti idrofilici (32b) delle rose coprisuolo

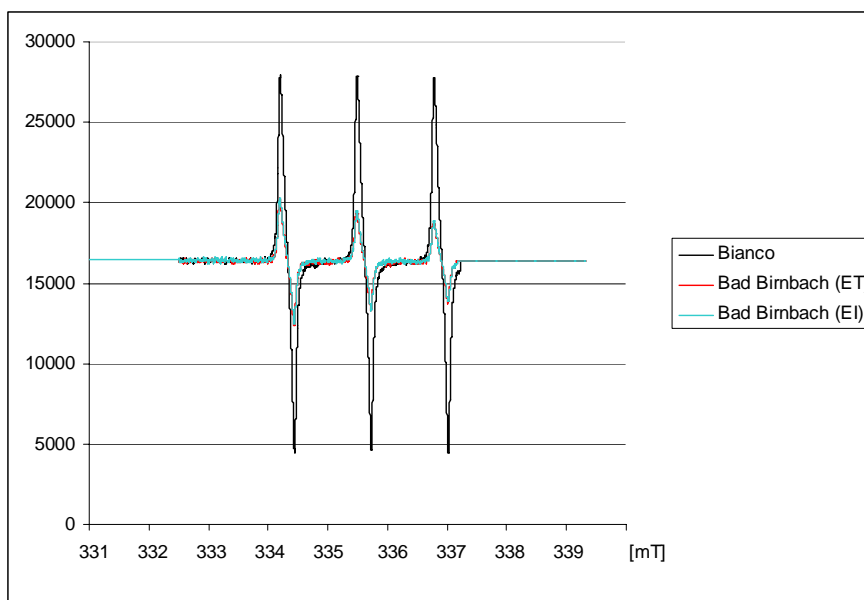


**Figura 33** Test antiossidante del sale di Fremy negli estratti tal quali (33a) e negli estratti idrofilici (33b) delle rose coprisuolo

Bad Birnbach (BB), Home & Garden (HG), Marvelle (Ma), Cumbaja (Cu).

A lettere diverse, per ogni grafico, corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey

Nella figura 34 è mostrato lo spettro all'EPR della cultivar *Bad Birnbach* in cui si osserva l'abbattimento del segnale della soluzione del sale di Fremy (bianco) in presenza degli antiossidanti presenti sia nell'estratto del campione tal quale (*Bad Birnbach* ET), sia nell'estratto idrofilico (*Bad Birnbach* EI).



**Figura 34** Spettro EPR della cultivar *Bad Birnbach* estratto tal quale (ET), *Bad Birnbach* estratto idrofilico (EI) rispetto al bianco

### 3. Rose antiche

I risultati delle analisi del contenuto in polifenoli e dell'attività antiossidante sulle rose antiche sono riportati in tabella 34.

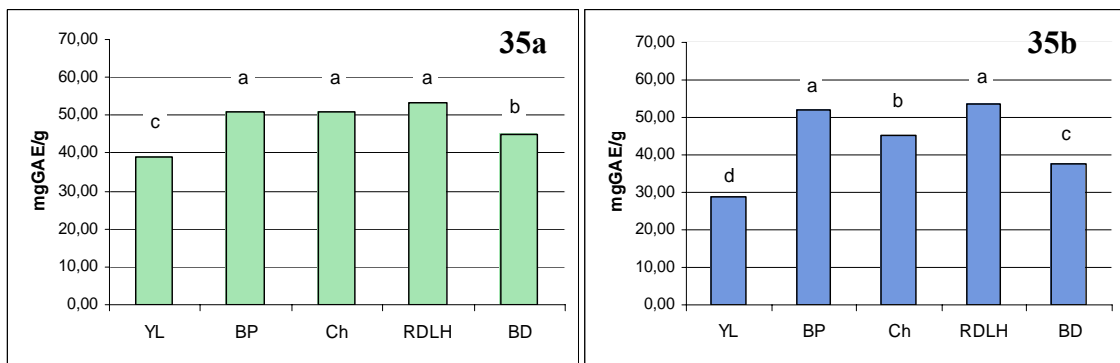
**Tabella 34** Contenuto di polifenoli totali e attività antiossidante degli estratti tal quali e degli estratti idrofilici delle rose antiche

Cultivar	Estratti tal quali (mgGAE/g)			Estratti idrofilici (mgGAE/g)		
	Polifenoli	DPPH	Sale di Fremy	Polifenoli	DPPH	Sale di Fremy
<i>York &amp; Lancaster</i>	39,15 ± 0,00	21,29 ± 0,33	4,49 ± 1,13	28,73 ± 0,78	15,94 ± 0,97	3,73 ± 0,34
<i>Belle Poitevine</i>	50,82 ± 0,29	33,22 ± 0,23	20,37 ± 0,39	51,92 ± 0,37	33,35 ± 0,14	19,96 ± 0,00
<i>Chianti</i>	50,90 ± 0,38	25,32 ± 0,93	10,07 ± 0,29	45,17 ± 0,32	25,91 ± 0,29	10,70 ± 0,59
<i>Roseaie de l'Hay</i>	53,14 ± 1,43	30,68 ± 0,17	14,76 ± 0,35	53,64 ± 0,80	31,43 ± 0,38	15,84 ± 0,52
<i>Blush Damask</i>	44,82 ± 0,41	25,82 ± 0,30	10,42 ± 1,00	37,64 ± 0,01	25,85 ± 1,27	12,15 ± 0,80
Significatività	**	***	***	***	***	***

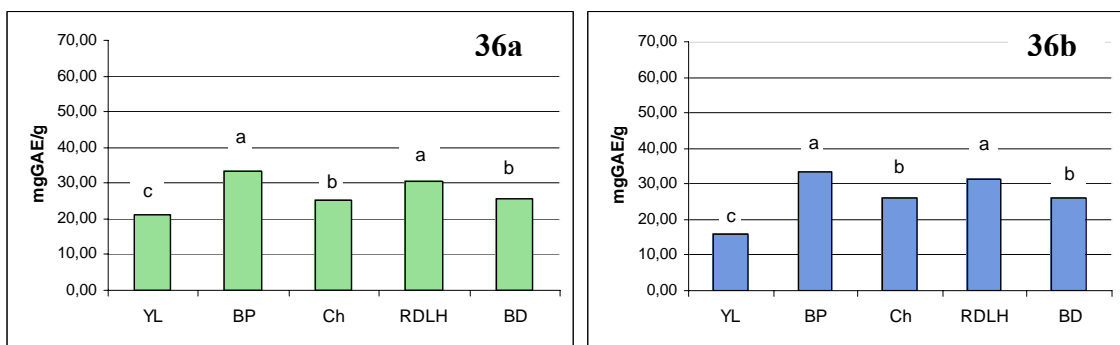
Per ogni parametro è indicato il valore medio ( $n=2$ ) e l'errore standard  
Significatività di F:\*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ .

Per quanto concerne il contenuto in polifenoli totali le cultivar *Belle Poitevine*, *Roseaie de l'Hay* e *Chianti* sono risultate quelle con maggior contenuto di polifenoli totali. *York & Lancaster* ha mostrato un contenuto di polifenoli totali inferiore rispetto alle altre rose antiche (figura 35). Considerando i risultati del test del DPPH•, per entrambi gli estratti, nelle 5 cultivar,

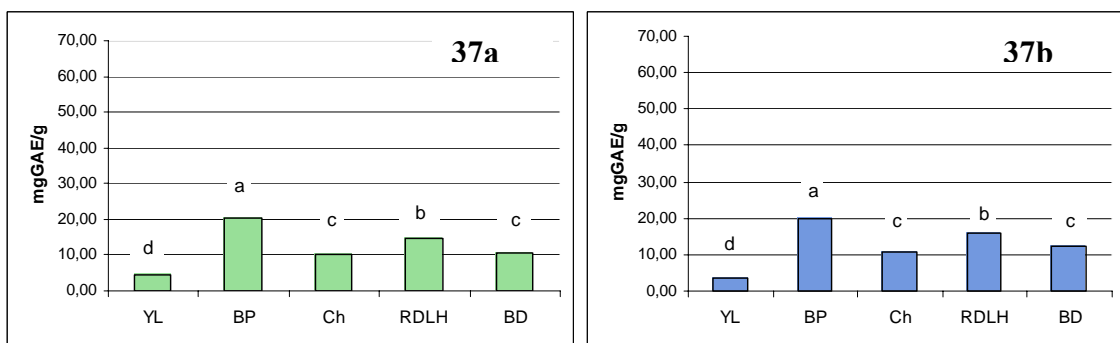
è stato riscontrato il medesimo abbattimento del radicale; in particolare, le rose *Belle Poitevine* e *Roseaie de l'Hay* si sono distinte per un'elevata attività antiossidante mentre valori nettamente inferiori si sono riscontrati per la varietà *York & Lancaster* (Figura 36). Con il test del sale di Fremy le varie cultivar hanno mostrato valori di attività antiossidante differenti. I risultati ottenuti dall'estratto tal quale e da quello idrofilico sono simili, infatti in entrambe i casi *Belle Poitevine* è la cultivar con la maggiore attività antiossidante, seguita da *Roseaie de l'Hay*, viceversa *York & Lancaster* è risultata la varietà con valori di attività più bassi (Figura 37)



**Figura 35** Contenuti di polifenoli totali negli estratti tal quali (35a) e negli estratti idrofilici (35b) per le rose antiche



**Figura 36** Test del DPPH• negli estratti tal quali (36a) e negli estratti idrofilici (36b) per le rose antiche



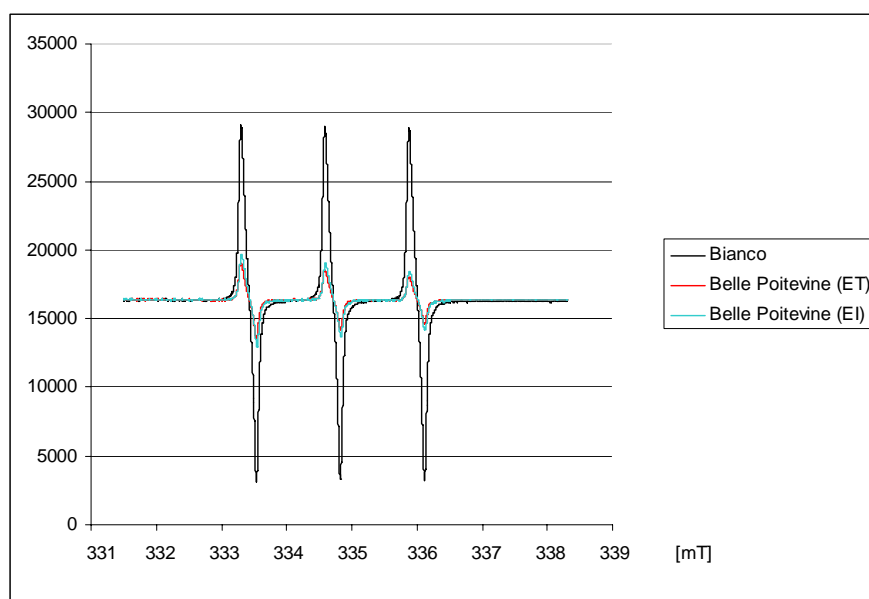
**Figura 37** Test del sale di Fremy negli estratti tal quali (37a) e negli estratti idrofilici (37b) per le rose antiche

**York & Lancaster (YL), Belle Poitevine (BP), Chianti (Ch), Roseaie de l'Hay (RDLH), Blush Damask (BD)**

A lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey



Nella figura 38 è mostrato lo spettro EPR della cultivar *Belle Poitevine*. Il segnale della soluzione del sale di Fremy (bianco) è abbattuto dalla presenza degli antiossidanti del campione sia dell'estratto tal quale (*Belle Poitevine ET*) sia di quello idrofilico (*Belle Poitevine EI*).



**Figura 38** Spettro EPR della cultivar *Belle Poitevine* estratto tal quale (ET), *Belle Poitevine* estratto idrofilico (EI) rispetto al bianco.

#### 4. Confronto fra i 3 gruppi di rose: inglesi, coprisuolo, antiche

Nella tabella 35 sono presentati, per i tre gruppi di rose, i valori medi relativi ai polifenoli totali e all'attività antiossidante misurata con il test del DPPH e il test del sale di Fremy sia dell'estratto tal quale sia dell'estratto idrofilico.

Per i polifenoli dei campioni estratti tal quali non sono stati rilevati valori significativamente differenti fra i tre gruppi di rosa. Negli estratti idrofilici, invece, si osservano contenuti di polifenoli maggiori nel gruppo delle rose antiche. Le cultivar di questo gruppo hanno mostrato un'attività antiossidante rilevante contro il DPPH sia per gli estratti idrofilici sia per gli estratti tal quali. Considerando il test del sale di Fremy, invece, è stata osservata un'attività antiossidante maggiore nel gruppo delle rose coprisuolo in entrambi i tipi di estratto.

**Tabella 35** Contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante degli estratti tal quali e degli estratti idrofilici dei tre gruppi di rose.

Gruppo	Estratti tal quali (mgGAE/g)			Estratti idrofilici (mgGAE/g)		
	Polifenoli	DPPH	Sale di Fremy	Polifenoli	DPPH	Sale di Fremy
Rose inglesi	44,06 ± 2,78 a	7,73 ± 1,28 c	9,70 ± 1,30 b	27,78 ± 2,47 b	10,11 ± 1,92 b	9,89 ± 1,24 b
Rose coprisuolo	49,02 ± 3,90 a	16,38 ± 1,30 b	16,58 ± 2,00 a	35,21 ± 2,23 ab	15,08 ± 1,33 b	17,78 ± 1,85 a
Rose antiche	47,76 ± 1,72 a	27,27 ± 1,41 a	12,02 ± 1,78 ab	43,42 ± 3,09 a	26,50 ± 2,03 a	12,48 ± 1,82 ab
Significatività	n.s.	***	*	***	***	*

Per ogni parametro è indicato il valore medio ( $n=2$ ) e l'errore standard  
 Lettere differenti indicano valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey  
 Significatività di F: \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*,  $P \leq 0,05$ ; ns= non significativo.

### **4.3 ELABORAZIONE STATISTICA DELLE ANALISI CHIMICO-FISICHE E BIOCHIMICHE**

#### **4.3.1 Analisi delle componenti principali**

L'analisi delle componenti principali (PCA), è una tecnica statistica multivariata che ha permesso di evidenziare le differenze fra tutte le cultivar analizzate e fra le varietà all'interno di ciascun gruppo di rose, considerando tutti i parametri esaminati.

In tabella 36 è presentata la legenda delle cultivar esaminate e dei gruppi di rose con la relativa abbreviazione utilizzata nei grafici successivi.

**Tabella 36 Legenda delle cultivar analizzate e relativa abbreviazione utilizzata nei grafici successivi.**

<b>Gruppo</b>	<b>Sigla gruppo</b>	<b>Simbolo</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Sigla cultivar</b>
Rose inglesi	RI	▲	Eglantyne	EG
Rose inglesi	RI	▲	Jeoff Hamilton	JH
Rose inglesi	RI	▲	Sweet Juliet	SJ
Rose inglesi	RI	▲	Evelyn	EV
Rose inglesi	RI	▲	Graham Thomas	GT
Rose coprisuolo	RC	◆	Home & Garden	HG
Rose coprisuolo	RC	◆	Marvelle	MA
Rose coprisuolo	RC	◆	Bad Birnbach	BB
Rose coprisuolo	RC	◆	Cumbaja	CU
Rose antiche	RA	■	York & Lancaster	YL
Rose antiche	RA	■	Belle Poitevine	BP
Rose antiche	RA	■	Chianti	CH
Rose antiche	RA	■	Roseaie de l'Hay	RDLH
Rose antiche	RA	■	Blush Damask	BD

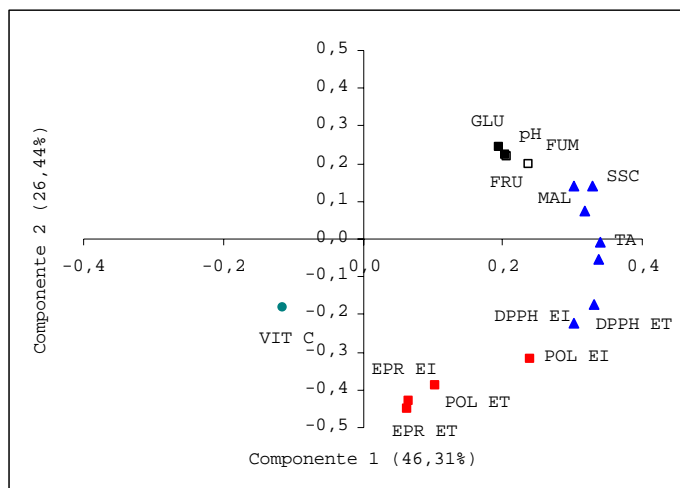
In tabella 37 sono presentati i coefficienti dei singoli parametri analitici considerati relativi alle quattro componenti principali significative (Pcomp1, Pcomp2, Pcomp3, Pcomp4). Tali componenti insieme hanno spiegato l'89,53% della variabilità totale dei dati originali.

**Tabella 37** Analisi delle componenti principali: peso delle singole variabili, autovalori e varianza spiegata per le prime quattro componenti principali. I simboli accanto ai numeri indicano l'appartenenza a componenti principali diverse secondo gli autovalori determinati

Variabili	Sigla variabile	Pcomp1	Pcomp2	Pcomp3	Pcomp4
Acidità titolabile	TA	0,339 ▲	-0,009	-0,047	-0,110
Acido shikimico	SCI	0,338 ▲	-0,055	0,057	-0,011
Test DPPH estratti tal quali	DPPH ET	0,331 ▲	-0,172	0,091	0,131
Contenuto in solidi solubili	SSC	0,329 ▲	0,141	-0,096	0,161
Acido Chinico	CHI	0,318 ▲	0,073	-0,090	-0,112
Test DPPH estratti idrofilici	DPPH EI	0,302 ▲	-0,222	0,003	0,221
Acido Malico	MAL	0,302 ▲	0,142	0,233	-0,272
Polifenoli estratti idrofilici	POL EI	0,240	-0,317 ■	-0,049	0,236
Acido Fumarico	FUM	0,238	0,198	0,401	-0,222
pH	pH	0,206	0,220	0,364	-0,110
Fruttosio	FRU	0,203	0,224	-0,489 ■	-0,266
Glucosio	GLU	0,195	0,245	-0,500 ■	0,039
Polifenoli estratti tal quali	POL ET	0,104	-0,390 ■	-0,307	-0,054
Test EPR estratti idrofilici	EPR EI	0,065	-0,430 ■	0,131	-0,173
Test EPR estratti tal quali	EPR ET	0,064	-0,452 ■	0,051	-0,123
Vitamina C	VIT C	-0,114	-0,180	-0,124	-0,756 ●
Autovalori		7,41	4,23	1,54	1,15
% Varianza spiegata		46,31	26,44	9,61	7,18
% Varianza cumulativa		46,31	72,75	82,35	89,53

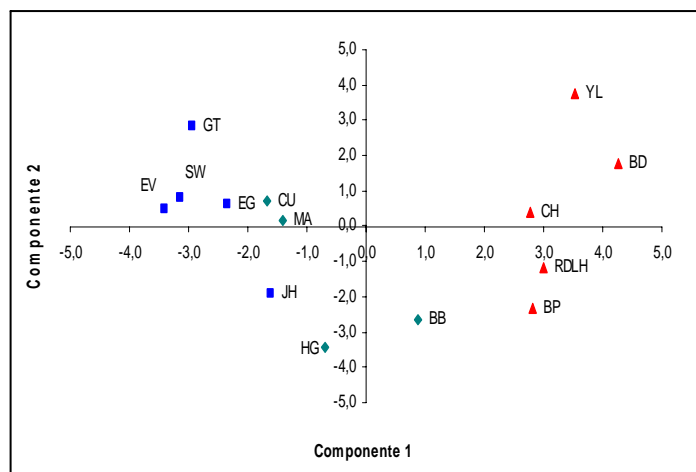
Nella prima componente principale (Pcomp1, varianza spiegata 46,31%) le variabili che hanno maggior peso sono risultate, in ordine decrescente, TA, SCI, DPPH (ET), SSC, CHI, DPPH (EI) e MAL. Nella seconda componente principale (Pcomp2, varianza spiegata 26,44%) le variabili con maggior peso sono risultate EPR (ET), EPR (EI), POL (ET) e POL (EI), mentre nella terza componente principale (Pcomp3, varianza spiegata 9,60%) si sono evidenziati gli zuccheri (GLU e FRU) e nella quarta componente (Pcomp4, varianza spiegata 7,18%) la vitamina C (VIT C).

Confrontando la distribuzione di tutti i parametri secondo le prime due componenti (figura 39) si può notare lungo l'asse di Pcomp1 la vitamina C totale contrapposta a tutti gli altri parametri e lungo l'asse della Pcomp2 una separazione fra i parametri chimico-tecnologici nutrizionali quali pH, acidità, acidi organici, SSC e zuccheri solubili da una parte e i parametri chimico-funzionali quali polifenoli, potere antiossidante e vitamina C dall'altra.



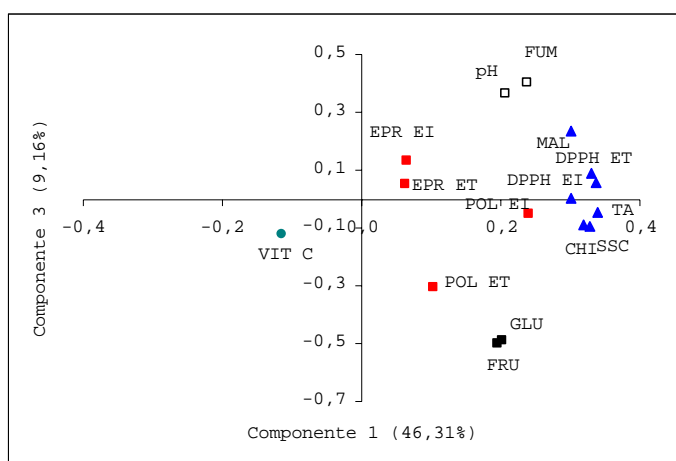
**Figura 39 Scatterplot dei pesi delle variabili per le componenti principali 1 e 2 (i simboli differenti del grafico indicano l'appartenenza a componenti principali diverse secondo i riferimenti riportati nella tabella 37)**

Considerando il grafico dei punteggi delle prime due componenti principali (figura 40) per tutte le cultivar di rose considerate e confrontandolo con il grafico di figura 40, si può osservare come le cultivar pigmentate CH (*Chianti*), RDLH (*Roseaie de l'Hay*) e BP (*Belle Poitevine*), posizionate vicino ai parametri influenzati dalla Pcomp1, siano risultate caratterizzate da più elevati valori di acidità titolabile e grado rifrattometrico, da un maggior contenuto in acidi shikimico e chinico e da un più elevato potere antiossidante misurato con il test DPPH. Le cultivar BB (*Bad Birnbach*) e HG (*Home e Garden*), posizionate vicino ai parametri influenzati dalla seconda componente, sono risultate caratterizzate da un più elevato poter antiossidante misurato con il test EPR e da un maggior contenuto in polifenoli. Considerando la distribuzione di tutti i parametri rispetto all'insieme delle cultivar considerate, la rosa JH (*Jeoff Hamilton*) meno influenzata dai parametri risultati significativi per le prime due componenti, è risultata caratterizzata da un più elevato contenuto in vitamina C. Nella figura 40 è inoltre evidenziata la separazione, lungo l'asse della Pcomp1, delle cultivar di rose antiche (valori positivi) da quelle inglesi e coprisuolo che assumono valori negativi, ad esclusione della BB (*Bad Birnbach*) che ha presentato un valore positivo.



**Figura 40** Scatterplot delle componenti principali 1 e 2 per tutte le cultivar analizzate (i nomi e i simboli delle cultivar sono riportati in tabella 36).

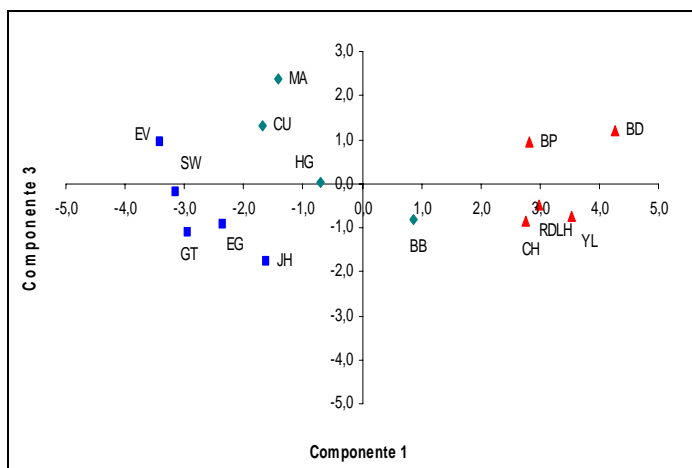
Confrontando la distribuzione di tutti i parametri secondo le componenti 1 e 3 (figura 41), si è potuta notare una maggiore analogia tra i test antiossidanti DPPH ed EPR e i parametri relativi agli acidi organici e al pH da una parte e una maggiore vicinanza dei parametri SSC, GLU, FRU, POL (EI), POL (ET) e VIT C dall'altra.



**Figura 41** Scatterplot dei pesi delle variabili delle componenti principali 1 e 3 (i simboli differenti presenti nel grafico indicano l'appartenenza a componenti principali diverse secondo i riferimenti riportati nella tabella 37).

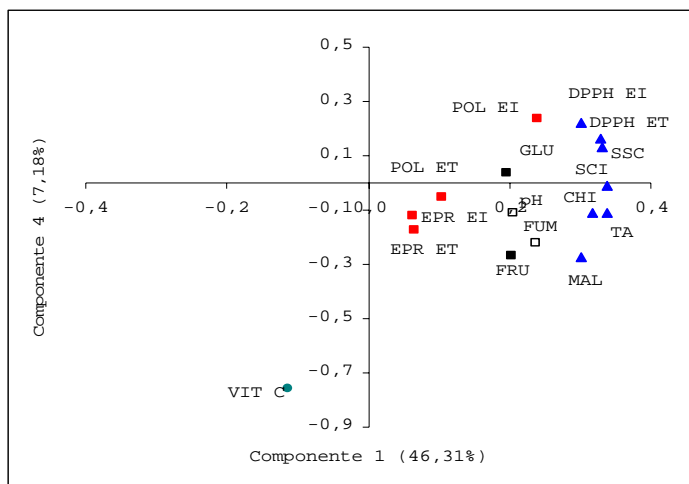
Considerando l'analisi PCA applicata a tutte le cultivar analizzate per i vari parametri chimici considerati (figura 42), le cultivar pigmentate RDLH (*Roseaie de l'Hay*) e BP (*Belle Poitevine*) posizionate vicino ai parametri influenzati dalla componente 1 sono risultate caratterizzate da un maggior contenuto in acido malico e acidità e da un più elevato potere antiossidante misurato con il test DPPH. Le cultivar BB (*Bad Birnbach*), CH (*Chianti*), posizionate vicino ai parametri influenzati dalla componente 3 sono risultate caratterizzate da un maggior contenuto in zuccheri e SSC. Considerando la distribuzione di tutti i parametri rispetto all'insieme delle cultivar testate, le rose JH (*Jeoff Hamilton*) e HG (*Home & Garden*) meno influenzate dai parametri risultati significativi per le componenti 1 e 3, sono risultate

caratterizzate da un più elevato contenuto in vitamina C. Inoltre utilizzando queste due componenti si ottiene una netta separazione nello spazio dei tre gruppi di cultivar.



**Figura 42** Scatterplot delle componenti principali 1 e 3 per tutte le cultivar analizzate (per i nomi e i simboli delle cultivar vedere tabella 36).

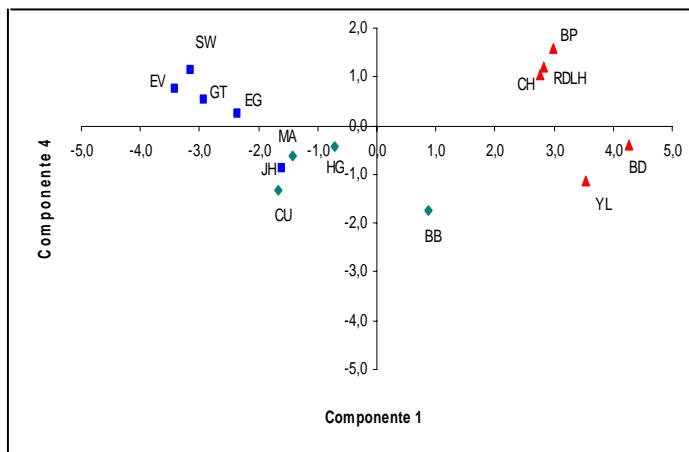
In figura 43 è presentato lo scatterplot relativo alle componenti principali 1 e 4. In generale, confrontando la distribuzione di tutti i parametri secondo le componenti 1 e 4, si è potuta notare una maggiore analogia tra i test antiossidanti DPPH ed EPR con i parametri relativi agli acidi organici e al pH da una parte e una maggiore correlazione dei parametri SSC, GLU e FRU e POL (EI) e POL (ET) e VIT C dall'altra.



**Figura 43** Scatterplot dei pesi delle variabili delle componenti principali 1 e 4 (i simboli differenti indicano l'appartenenza a componenti principali diverse secondo i riferimenti riportati nella tabella 37)

Considerando l'analisi PCA applicata a tutte le cultivar analizzate per i vari parametri chimici considerati (figura 44), le cultivar pigmentate RDLH (*Roseaie de l'Hay*) e BP (*Belle Poitevine*) posizionate vicino ai parametri influenzati dalla componente 1 sono risultate caratterizzate da un maggior contenuto in acido malico e acidità e da un più elevato potere antiossidante misurato con il test DPPH. Le cultivar BP (*Belle Poitevine*), CH (*Chianti*), posizionate vicino ai parametri influenzati dalla componente 1 sono risultate caratterizzate da un

maggior contenuto in SSC e da un maggior poter antiossidante DPPH (ET). Le rose JH (*Jeoff Hamilton*) e CU (*Cumbaya*) vicine al parametro influenzato dalla componente 4 sono risultate caratterizzate da un più elevato contenuto in vitamina C.



**Figura 44 Scatterplot delle componenti principali 1 e 4 per tutte le cultivar analizzate (per i nomi e i simboli delle cultivar vedere tabella 36).**

Nella tabella 38 sono riportati i valori medi e gli errori standard per ciascun gruppo di rose per le 4 componenti principali. I punteggi di ciascuna componente principale per ciascun campione sono stati analizzati tramite la procedura ANOVA. La funzione Pcomp1 assume valori significativamente differenti tra i tre gruppi; il gruppo delle rose antiche ha presentato il valore maggiore e le rose inglesi il minore. Pcomp2 e Pcomp3 non sono statisticamente differenti tra i gruppi, mentre Pcomp4 presenta un valore statisticamente minore per le rose coprisuolo

**Tabella 38 Analisi della varianza ad una via per le 4 componenti principali per i 3 GRUPPI di cultivar**

GRUPPO	Pcomp 1		Pcomp 2		Pcomp3		Pcomp4	
	Valore medio	± errore standard	Valore medio	± errore standard	Valore medio	± errore standard	Valore medio	± errore standard
Rose inglesi	-2,69 c	±0,22	0,57 a	±0,51	-0,61 a	±0,36	0,36 a	±0,24
Rose coprisuolo	-0,73 b	±0,37	-1,3 a	±0,68	0,74 a	±0,47	-1,03 b	±0,21
Rose antiche	3,27 a	±0,20	0,48 a	±0,72	0,01 a	±0,32	0,46 a	±0,36

*Valori medi delle componenti principali e relativo errore standard*

*A lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.*

In tabella 39 sono mostrati i valori medi relativi all'analisi della varianza ad una via per ciascuna cultivar per le 4 componenti principali. Per ogni componente principale a lettere diverse corrispondono differenze significative tra le cultivar indipendentemente dal gruppo di appartenenza (prima colonna) e differenze significative tra le cultivar nell'ambito del gruppo di appartenenza (seconda colonna). Secondo la componente 1 le cultivar che più si discostano tra loro sono risultate EV (*Evelyn*) del gruppo rose inglesi e BD (*Blush Damask*) del gruppo rose antiche. La rosa JH (*Jeoff Hamilton*) del gruppo rose inglesi ha presentato analogie con le rose CU (*Cumbaja*) e MA (*Marvelle*) del gruppo delle rose coprisuolo. All'interno del gruppo rose inglesi, JH ed EV sono le due cultivar che più si discostano fra loro, mentre SW (*Sweet Juliet*) e GT (*Graham Thomas*) hanno mostrato simili caratteristiche per i parametri analizzati. All'interno del gruppo rose coprisuolo, le rose CU e MA si sono differenziate da BB (*Bad Birnbach*) e HG (*Home & Garden*) mentre all'interno del gruppo rose antiche, le rose CH (*Chianti*) e BP (*Belle Poitevine*) hanno mostrato più analogie per i parametri considerati rispetto a BD (*Blush Damask*).

**Tabella 39 Analisi della varianza ad una via per le 4 componenti principali**

Gruppo	Cultivar	PCOMP1			PCOMP2			PCOMP3			PCOMP4		
Rose inglesi	EV	-3,41	a	a	0,49	d	b	0,94	bc	a	0,75	efg	a
	SW	-3,14	ab	ab	0,78	de	b	-0,18	ab	a	1,14	fg	b
	GT	-2,93	ab	ab	2,83	fg	c	-1,09	ab	a	0,54	defg	b
	EG	-2,35	bc	bc	0,6	de	b	-0,92	ab	a	0,23	cdef	ab
	JH	-1,61	cd	c	-1,9	bc	a	-1,76	a	a	-0,88	abc	b
Rose coprisuolo	CU	-1,67	cd	a	0,72	de	b	1,32	bc	bc	-1,32	ab	ab
	MA	-1,41	cd	a	0,14	d	b	2,39	c	c	-0,62	abcd	ab
	HG	-0,7	d	b	-3,45	a	a	0,03	abc	ab	-0,43	bcde	b
	BB	0,86	e	c	-2,64	ab	a	-0,79	ab	a	-1,72	a	a
Rose antiche	CH	2,76	f	a	0,39	d	b	-0,85	ab	a	1,04	fg	b
	BP	2,81	f	a	-2,32	abc	a	0,94	bc	a	1,21	fg	b
	RDLH	2,99	f	ab	-1,18	c	a	-0,47	ab	a	1,58	g	b
	YL	3,53	fg	ab	3,74	g	c	-0,75	ab	a	-1,12	ab	a
	BD	4,26	g	b	1,75	ef	b	1,21	bc	a	-0,39	bcde	a

*A lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey: fondo colorato, differenze tra le medie delle cultivar indipendentemente dal gruppo, fondo bianco differenze tra le medie delle cultivar nell'ambito del gruppo.*



### **4.3.2 Analisi discriminante**

L'analisi discriminante è uno strumento statistico che permette di ottenere delle funzioni in modo tale da consentire la classificazione in una precisa categoria di ogni nuovo campione, utilizzando quali variabili quelle comprese nell'analisi. Le funzioni discriminanti possibili sono pari al numero di gruppi del sistema meno 1, quindi in questo caso, avendo scelto come fattore di discriminazione il gruppo, se ne sono ottenute 2:

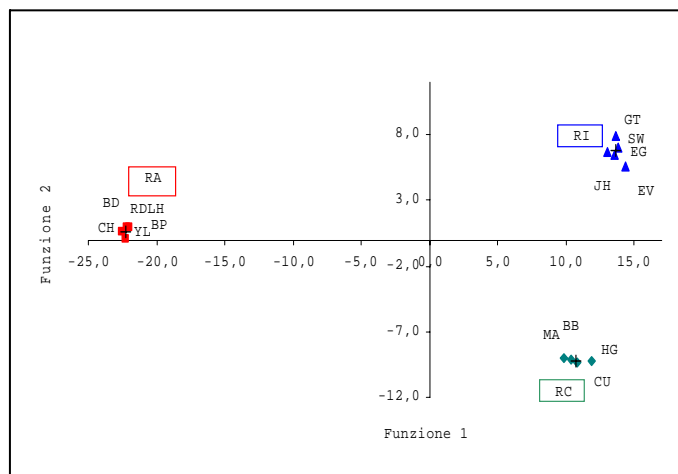
- 1) la prima funzione discriminante spiega l' 87,21% della varianza totale con una correlazione canonica significativa ( $P < 0,0001$ ) di 0,998
- 2) la seconda funzione discriminante spiega il 12,79% della varianza totale con una correlazione canonica significativa ( $P < 0,0001$ ) di 0,989

Nella tabella 40 sono riportati i coefficienti standardizzati delle due funzioni discriminanti. Dai valori della funzione discriminante 1 si osserva che i polifenoli (EI) e i polifenoli (ET) sono le variabili che hanno valori rispettivamente più bassi e più alti fra tutte le altre. Per quanto concerne la funzione discriminante 2, invece, valori opposti sono quelli del glucosio e del fruttosio.

**Tabella 40 Coefficienti delle funzioni discriminanti standardizzati. Le sigle delle variabili corrispondono a quelle riportate in tabella 36**

<b>Sigla Variabili</b>	<b>Funzione discriminante 1</b>	<b>Funzione discriminante 2</b>
pH	-0,270	0,019
TA	-0,915	2,659
SSC	-1,943	1,205
GLU	2,548	8,162
FRU	-3,431	-9,138
CHI	1,170	-1,721
MAL	-1,672	-0,026
SCI	-1,039	-2,078
FUM	1,351	-1,622
VIT C	2,402	1,183
POL (EI)	-4,866	0,315
POL (ET)	3,267	-0,707
DPPH (EI)	-0,634	0,378
DPPH (ET)	-1,629	-0,386
EPR (EI)	2,946	-2,180
EPR (ET)	0,350	0,261

Nella figura 45 sono mostrati i valori delle due funzioni discriminanti per ciascun campione (cultivar/gruppo). La funzione 1 ben discrimina le rose antiche, per i valori minori rispetto alle rose inglesi e coprisuolo. La funzione 2, invece, discrimina le rose coprisuolo dalle rose antiche e dalle rose inglesi. Nella tabella 41 sono presentati i valori dei centroidi per ciascun gruppo di rose.



**Figura 45** Classificazione delle varietà di rose usando l'analisi discriminante canonica. I centroidi di ciascun gruppo sono indicati dalle croci nere (per i nomi e i simboli delle cultivar vedere tabella 35).

**Tabella 41** Valori dei centroidi per ogni gruppo.

Valore del centroide	Funzione discriminante 1	Funzione discriminante 2
RA	-22,250	0,602
RC	10,728	-9,189
RI	13,668	6,750

### **4.3.3 Considerazioni sui risultati della PCA e dell'analisi discriminante**

L'analisi delle componenti principali ha permesso una visione d'insieme di tutti i parametri delle cultivar saggiate, indipendentemente dal gruppo di appartenenza, evidenziando le analogie tra cultivar appartenenti a gruppi differenti.

Le varietà Chianti, *Roseaie de l'Hay* e *Belle Poitevine* si sono distinte per gli alti valori di:

- acidità titolabile
- contenuto in solidi solubili
- acido shikimico
- acido malico
- antiossidanti mediante test del DPPH

Le varietà *Roseaie de l'Hay* e *Belle Poitevine* hanno mostrato anche elevati contenuti di acido malico.

Le cultivar *Bad Birnbach* e *Home Garden* hanno presentato un'attività antiossidante elevata mediante:

- test del sale di Fremy
- contenuto in polifenoli totali

Infine, le rose *Jeoff Hamilton* e *Cumbaja* hanno mostrato un contenuto di vitamina C totale elevato.

L'analisi discriminante, inoltre, ha permesso di evidenziare come ogni gruppo di rosa ben si distingua dagli altri manifestando similarità solo per le cultivar appartenenti al medesimo gruppo.

#### **4.4 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI CHIMICO-FISICHE**

L'indagine condotta relativa alla determinazione dei parametri fisico-chimici per i petali di rosa ha permesso di evidenziarne sia le caratteristiche tecnologiche (pH, acidità titolabile, solidi solubili) sia le caratteristiche nutrizionali (acidi organici e carboidrati solubili). Per quanto riguarda il contenuto in solidi solubili (°Bx), il valore minimo riscontrato è stato quello della cultivar coprisuolo *Home & Garden* (5,98) mentre il valore massimo è stato rilevato nella cultivar *Blush Damask* delle rose antiche (13,13). I valori più bassi di acidità titolabile (meq/Kg) sono stati riscontrati nella cultivar *Sweet Juliet* (28,30) delle rose inglesi mentre il valore più elevato nella rosa *York and Lancaster* delle rose antiche (78,50). Il rapporto tra l'acidità titolabile e il contenuto in solidi solubili è risultato minimo nella cultivar inglese *Eglantyne* (3,82) e più elevato per la cultivar coprisuolo *Home & Garden* (8,13). I valori degli acidi organici (mg/g fw) identificati nelle rose da noi esaminate sono risultati particolarmente elevati nelle cultivar di rose antiche ed in particolare nella rosa *Blush Damask* particolarmente ricca in acido malico (178,48) e acido fumarico (879,89). Il valore più basso di acido malico è stato rilevato nella cultivar inglese *Eglantyne* (35,64) e quello più basso di acido fumarico nella cultivar inglese *Jeoff Hamilton* (234,41). I valori più elevati di acido shikimico sono stati rilevati nelle rose antiche *York and Lancaster* (12,87) e *Belle Poitevine* (13,01) mentre il valore più basso del medesimo acido è stato rilevato nella rosa inglese *Graham Thomas* (0,46). Analogamente i valori più elevati dei carboidrati solubili (mg/g fw) sono stati rilevati nelle rose antiche ed in particolare nella cultivar *York and Lancaster* che ha mostrato i più alti valori di glucosio (21,29) e fruttosio (35,60) contrariamente alla cultivar coprisuolo *Marvelle* che ha presentato i valori minimi sia per il glucosio sia per il fruttosio (6,70 e 15,94). Le diverse cultivar da noi esaminate si sono pertanto ben differenziate per i vari parametri tecnologici e nutrizionali. La determinazione sulla materia prima di tali parametri ha permesso di giudicare l'idoneità delle cultivar per l'eventuale successiva trasformazione; inoltre la conoscenza di tali parametri consente di considerare le possibilità di applicazione di eventuali idonei pre-trattamenti (acidificazione, trattamento con zucchero ecc). Potenzialmente le rose antiche sembrano essere tecnologicamente e nutrizionalmente migliori rispetto alle cultivar degli altri due gruppi. Future indagini, come la determinazione della composizione aromatica potrebbero risultare di notevole interesse per poter esprimere un giudizio più completo sugli aspetti qualitativi tecnologici e nutrizionali delle diverse cultivar esaminate.

Le indicazioni bibliografiche a nostra disposizione hanno permesso di confrontare i valori dei vari parametri determinati con quelli di altre cultivar di rose o con i valori dei parametri riscontrabili anche in altre matrici vegetali sia floricole sia frutticole. Il lavoro di Nakamura et al., (2006) riguardante la determinazione del parametro pH sui petali di diverse cultivar di fiori di *Petunia hybrida*, indica che il pH di tali fiori possa rientrare tra un *range* basso (4,8-5,2) e un *range* più alto (5,5-5,8) di valori. Sulla base di tale indicazione, il valore medio del pH delle rose inglesi e delle rose coprisuolo da noi esaminate rientra nel *range* basso mentre quello delle rose antiche nel *range* alto. Per quanto riguarda il contenuto in solidi solubili, non vi sono attualmente riferimenti scientifici inerenti le rose: i valori da noi riscontrati per le rose inglesi e le rose coprisuolo sono risultati paragonabili a quelli di matrici frutticole appartenenti alla famiglia delle *Rosaceae* come la fragola (Nuzzi et al., 2002). Nel caso delle rose antiche sono stati riscontrati valori di solidi solubili molto più elevati.

Per quanto l'acidità titolabile, il lavoro di Shen et al. del 2007 riguardante la determinazione di alcuni parametri qualitativi del liquore alla rosa (*Rosa hybrida*, cv. *Grand Gala*) riporta un valore espresso in percentuale di acido malico di 0,05 corrispondente a 7,46 meq/Kg non confrontabile con i nostri valori di acidità per il trattamento subito dalla rosa parzialmente disidratata prima dell'immersione in alcool.

Per quanto riguarda gli acidi organici, la quantità di acido malico trovato nei fiori di rosa è risultato superiore a quello riscontrato nei fiori di melo e di pero (Hudina e Stampar, 2006). Nei frutti di melo e di pero gli acidi malico e shikimico sono presenti in grandi quantità rispetto all'acido fumarico (Colaric et al., 2006); nei fiori delle medesime specie invece, la quantità di acido fumarico è comparabile a quella degli altri acidi. Nei petali di rose dei tre gruppi da noi analizzati l'acido fumarico è presente in grosse quantità rispetto agli altri acidi organici e rispetto alle quantità riscontrate nei fiori di pero e di melo. Nei gruppi di rose inglesi, coprisuolo e antiche l'acido shikimico, precursore di differenti composti fra cui l'antiossidante acido gallico e gli aminoacidi aromatici come fenilalanina, triptofano e tirosina, è presente in elevata quantità rispetto alle quantità trovate nei fiori di pero e di melo. Inoltre, nei petali di rosa delle cultivar considerate è stato identificato l'acido chinico riscontrato anche nella fragola (Nuzzi et al, 2002) mentre l'acido citrico non è stato rilevato benché sia presente in molti frutti e in alcuni fiori come l'hibiscus (Maganha et al., 2010). In letteratura, non vi sono studi inerenti gli acidi organici presenti nei petali di rosa; per questo è interessante analizzare altre cultivar di rosa che possano confermare i nostri risultati e comparare i contenuti degli acidi organici.

Norikoshi *et al.* (2008) riporta che il fruttosio è lo zucchero predominante nei petali freschi di alcune cultivar di *Rosa hybrida*. La quantità di glucosio e fruttosio nei petali di rosa della cultivar Sonia della specie *Rosa hybrida* è inferiore rispetto ai quantitativi riscontrati nei gruppi di rose da noi esaminati. Gli zuccheri solubili come saccarosio e sorbitolo presenti in altre matrici floricole come melo o pero non sono stati identificati nei petali di rosa (Hudina e Stampar, 2006). Secondo Ichimura *et al.* (1997), il sorbitolo non è presente nei petali di rosa mentre il saccarosio è stato identificato in altre cultivar di *Rosa hybrida* anche se in piccole quantità rispetto al glucosio e al fruttosio.

#### **4.5 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI BIOCHIMICHE**

Le analisi biochimiche condotte relative alla valutazione di vitamina C totale e alla determinazione dei marcatori funzionali (quantificazione dei polifenoli totali, test del DPPH e test del sale di Fremy) per i petali delle cultivar saggiate hanno permesso di dimostrare la presenza di molecole antiossidanti e quindi il potenziale utilizzo delle rose come alimento funzionale.

Contenuti di vitamina C più rilevanti sono stati evidenziati nella cultivar *Jeoff Hamilton* (980,87 mg/100g di liofilizzato) del gruppo delle rose inglesi; viceversa *Roseaie de l'Hay*, del gruppo delle rose antiche, ha presentato i quantitativi più bassi (169,53 mg/100g di liofilizzato).

I contenuti maggiori di polifenoli totali nell'estratto tal quale sono risultati quelli delle varietà *Jeoff Hamilton* del gruppo delle rose inglesi e *Home & Garden* del gruppo delle rose coprisuolo, aventi entrambi valori di circa 60 mgGAE/g. Viceversa, la rosa *Cumbaja*, del gruppo delle rose coprisuolo, ha presentato il contenuto più basso di polifenoli totali (37,24 mgGAE/g). Risultati differenti sono stati riscontrati per i polifenoli nell'estratto idrofilico, infatti, in questo caso i valori maggiori sono stati quelli della varietà *Roseaie de l'Hay* (53,64 mgGAE/g) del gruppo delle rose antiche mentre quantitativi inferiori sono stati evidenziati nella cultivar *Graham Thomas* (20,58 mgGAE/g) del gruppo delle rose inglesi.

Per quanto riguarda l'attività antiossidante mediante il test del DPPH, i valori maggiori sono stati presentati dal gruppo delle rose antiche sia nell'estratto tal quale sia in quello idrofilico, in particolare il contenuto maggiore è stato evidenziato nella cultivar *Belle Poitevine* (circa 33 mgGAE/g in entrambi gli estratti). La rosa *Graham Thomas* del gruppo delle rose inglesi, invece si è differenziata per i quantitativi più bassi (circa 2 mgGAE/g in entrambi gli estratti).

La valutazione dell'attività antiossidante mediante il test del sale di Fremy ha confermato la varietà *Graham Thomas* (circa 3 mgGAE/g in entrambi gli estratti) la rosa avente minore attività antiossidante. Viceversa, la cultivar *Bad Birnbach*, del gruppo delle rose coprisuolo, si è distinta sia nell'estratto idrofilico (25,16 mgGAE/g) sia in quello tal quale (21,75 mgGAE/g) per l'alto valore di attività antiossidante. Anche la varietà *Home & Garden*, del gruppo delle rose coprisuolo, ha mostrato un alto valore di attività antiossidante (21,67 mgGAE/g) ma solo per l'estratto tal quale.

Come nel caso delle analisi fisico-chimiche, anche per quelle biochimiche le rose considerate hanno mostrato valori differenti per i vari parametri e test eseguiti, permettendo la distinzione delle varietà con caratteristiche funzionali migliori. La cultivar *Belle Poitevine* sembra potenzialmente la rosa più idonea in quanto ha presentato un'alta attività antiossidante sia nel test del DPPH sia nel test del sale di Fremy in entrambi i tipi di estratto (idrofilico e tal quale).

Da ricerche bibliografiche è possibile confrontare i valori da noi riscontrati con quelli di altre varietà di rose o con quelli di altre matrici floricole o frutticole.

Per quanto riguarda l'analisi della vitamina C totale uno dei pochi studi trovati è quello condotto da Helsper *et al.* (2003) sui fiori di *Rosa hybrida* nel quale il valore riportato è quello del solo acido ascorbico. Confrontando i dati si osserva che il contenuto di vitamina C totale riscontrato nei gruppi di rose da noi esaminati è maggiore rispetto al quantitativo di acido ascorbico riportato nello studio sopraccitato. Inoltre, il contenuto di vitamina C totale presente nei petali dei gruppi di rose da noi considerati, è di gran lunga inferiore rispetto a quello

riscontrabile nelle bacche di rosa (Ercisli, 2007) mentre potrebbe essere comparabile a quello rilevato in frutti di rosaceae, come la fragola (Nuzzi et al., 2002).

Nello studio condotto da Vinokur *et al.*, 2006 è stata misurata l'attività antiossidante di diverse cultivar di rosa utilizzate per la preparazione di infusi. Il contenuto di polifenoli totali riscontrati nello studio è simile a quello ritrovato nei gruppi di rose da noi esaminati. In particolar modo si verifica una comparabilità sui contenuti di composti fenolici totali delle rose inglesi *Golden Celebration* (circa 50mgGAE/g) e *Pat Austin* (circa 60mgGAE/g) esaminate nello studio di Vinokur *et al.*. Nel lavoro di Kähkönen *et al.*, (1999) è stata esaminata l'attività antiossidante di estratti di piante contenenti composti fenolici, tra cui quella della *Rosa* sp. Il contenuto di polifenoli totale nei frutti (12,5 mgGAE/g) e nei semi (6,0 mgGAE/g) è risultata inferiore rispetto a quella riscontrata nei petali di rose da noi considerate.

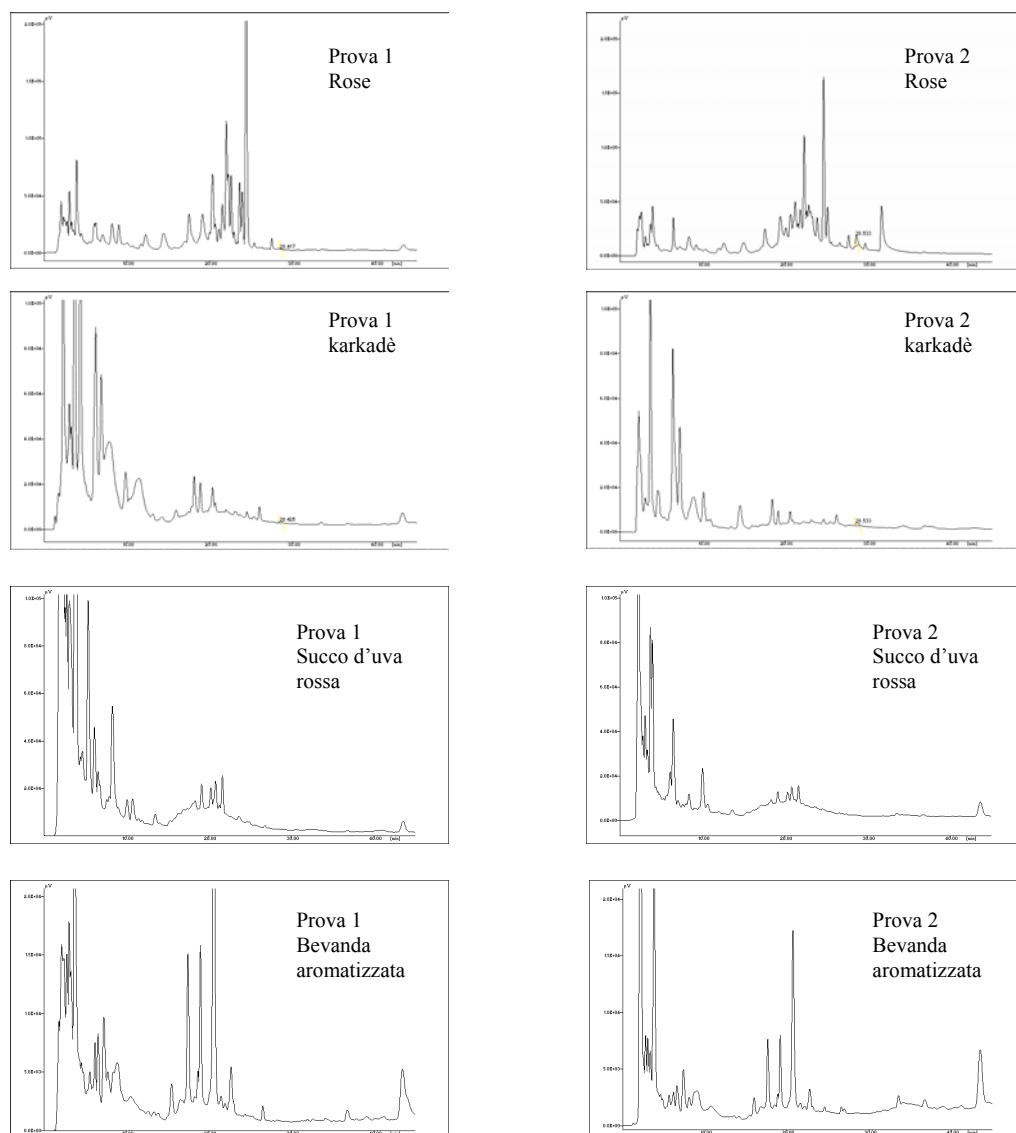
Per quanto riguarda l'attività antiossidante mediante test del DPPH e test del sale di Fremy sono presenti pochi lavori condotti sulla rosa o sulla matrice floricola in generale, e in questi studi particolari sono state utilizzate metodiche differenti rispetto a quelle da noi impiegate che impediscono la comparabilità del risultato. Nello studio di Lo Scalzo et al. (2007) sono state evidenziate le proprietà antiradicaliche dell'uva *Vitis vinifera* L. L'uva è notoriamente conosciuta per i suoi contenuti di molecole antiossidanti. Confrontando le percentuali di abbattimento riportate dallo studio sopracitato e le rose da noi esaminate si rileva che:

- per quanto riguarda il test del sale di Fremy sull'uva si è osservato un abbattimento % inferiore al 10% per la polpa, circa il 40-50% per la buccia e circa il 30% per l'insieme di buccia e polpa. I valori riscontrati nella rosa variano molto a secondo della cultivar considerata, il valore medio è di circa 50% di abbattimento del radicale. Il valore massimo è presentato dalla cultivar *Belle Poitevine* (circa 73%).
- per quanto riguarda il test del DPPH sull'uva è stato registrato un abbattimento di circa 10% nella polpa, 80-90% nella buccia, e valori variabili da 50 a 90% per l'insieme di buccia e polpa. Nella rosa è stato osservato un abbattimento medio di circa il 70%, e anche in questo caso la varietà *Belle Poitevine* ha presentato il valore di abbattimento maggiore (circa 88%).

In generale si può affermare che la quantità di antiossidanti presente nei petali di rosa è paragonabile e per alcune cultivar superiore rispetto a quella dell'uva.

#### **4.6 RISULTATI DELLE PROVE DI IDENTIFICAZIONE DI MOLECOLE BIO-ATTIVE**

In figura 46, sono riportati i cromatogrammi relativi alle prove di estrazione delle sostanze fenoliche per il primo gruppo di campioni considerato (paragrafo 3.4.5 di Materiali e Metodi).



**Figura 46** Cromatogrammi dei campioni analizzati per l'identificazione della molecola quercetina

Per ogni campione, la prova 1 si riferisce all'analisi dopo infusione acquosa a 90°C per 10 minuti mentre la prova 2 all'analisi del campione dopo estrazione e idrolisi. Nei campioni di rose e di karkadè è stato identificato il picco in corrispondenza del tempo di ritenzione della molecola della quercetina (28,5 minuti).

In tutti i cromatogrammi si nota la presenza di più picchi, a tempi di ritenzione inferiori a quelli corrispondenti alla quercetina; tali picchi corrispondono a composti chimicamente non identificati, ma ben separati dalla metodica.

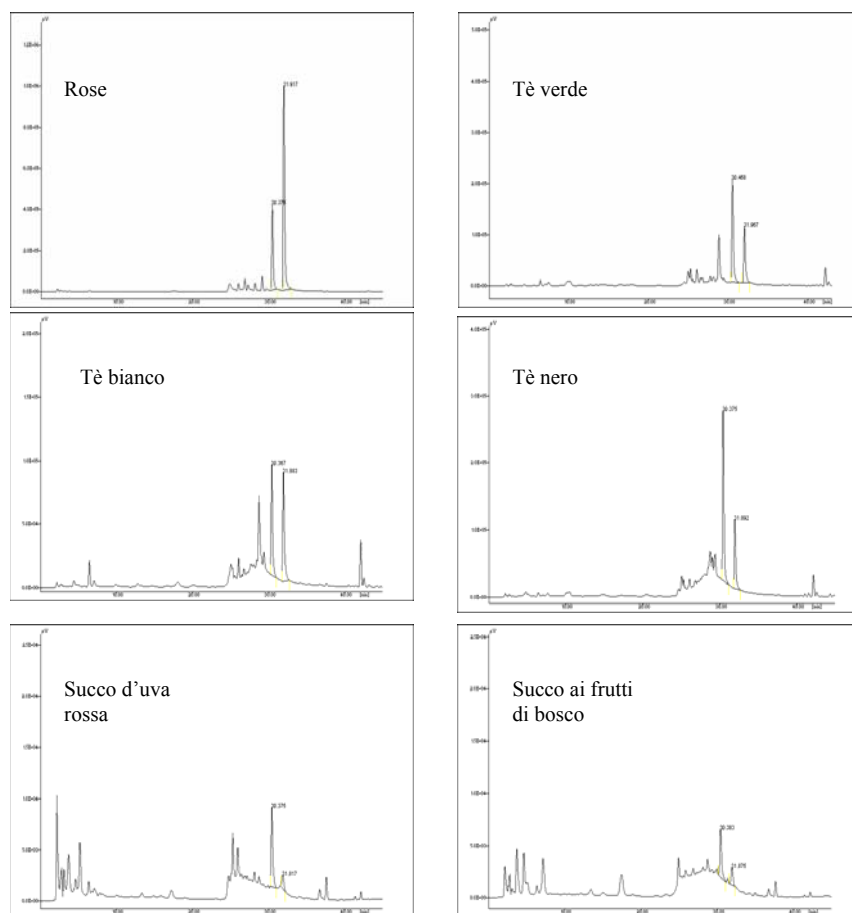


In tabella 42 vengono riassunte le metodiche di estrazione ed idrolisi dei campioni e le osservazioni effettuate sui dati ottenuti.

**Tabella 42** Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti dalle analisi HPLC condotte sui campioni considerati

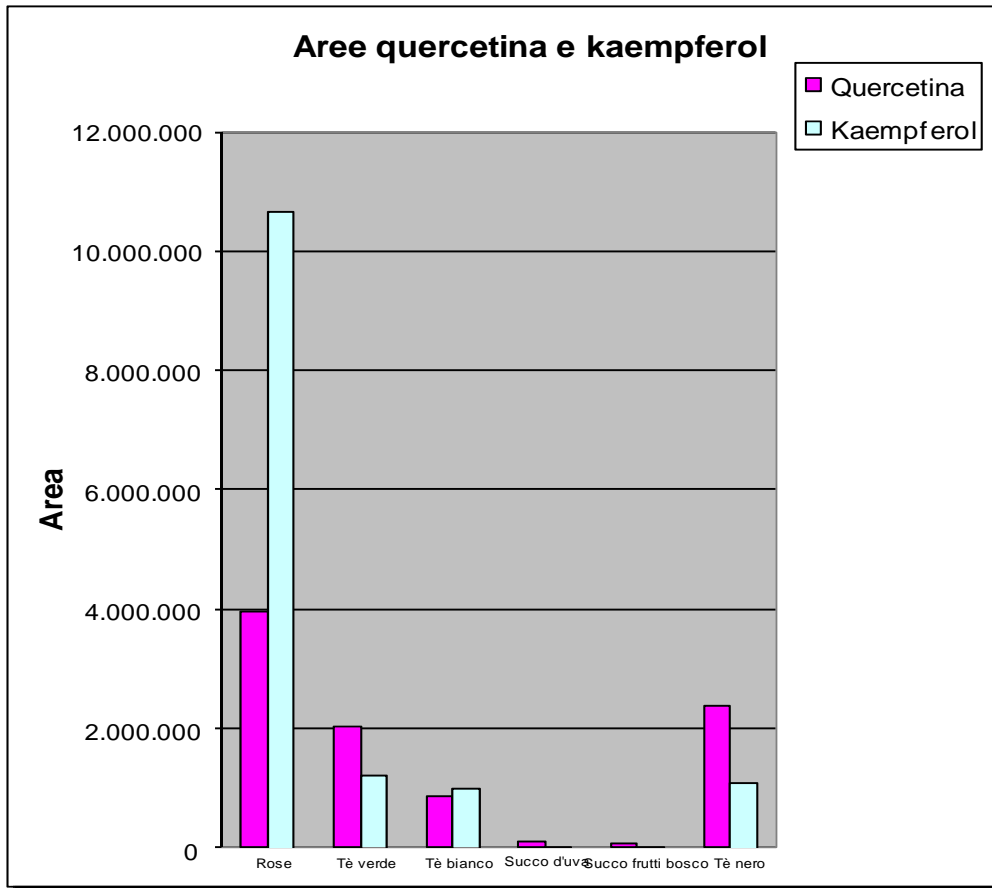
Campione	Estrazioni ed Idrolisi	Osservazioni
Karkadè	Prova 1: 2 g/100 mL H <sub>2</sub> O, 90 °C per 10 minuti	Il cromatogramma mostra un picco di area 15260.75 al tempo di ritenzione specifico della quercetina.
	Prova 2: 2 g/100 mL MeOH all'1% di HCl, temperatura ambiente per 45 minuti.	Dopo aver idrolizzato la soluzione il picco di quercetina ha un area di 28618.
	500 µL soluzione + 500 µL HCl 6N per 5 minuti	Aumento del 93.76 %
Rose	Prova 1: 2 g/100 mL H <sub>2</sub> O, 90 °C per 10 minuti	Il cromatogramma mostra un picco corrispondente alla quercetina con area di 9796.75
	Prova 2: 2 g/100 mL MeOH all'1% di HCl, temperatura ambiente per 45 minuti.	Dopo aver idrolizzato la soluzione il picco di quercetina ha un area di 133489.5.
	500 µL soluzione + 500 µL HCl 6N per 5 minuti	Aumento del 681.29%
Bevanda al mirtillo con viola del pensiero	Prova 1: campione iniettato tal quale	Nei cromatogrammi non sono individuabili picchi al tempo di ritenzione specifico della quercetina.
	Prova 2: 500 µL soluzione sono fatti reagire con 500 µL di HCl 6N per 5 minuti.	
Succo d'uva rossa	Prova 1: campione iniettato tal quale	Nei cromatogrammi non sono individuabili picchi al tempo di ritenzione specifico della quercetina.
	Prova 2: 500 µL soluzione sono fatti reagire con 500 µL di HCl 6N per 5 minuti.	

In figura 47 sono riportati i cromatogrammi relativi alle prove di estrazione e idrolisi per l'identificazione delle sostanze fenoliche (quercetina e kaempferol) per il secondo gruppo di campioni considerato (paragrafo 3.4.5 di Materiali e Metodi).



**Figura 47 Cromatogrammi dei campioni analizzati dopo estrazione e idrolisi per l'identificazione delle molecole quercetina e kaempferol**

In tutti i campioni sono stati identificati i picchi di quercetina e kaempferol (i relativi tempi di ritenzione sono visualizzati sul tracciato) ma le aree rilevate per i 2 picchi, e in particolare per il kaempferol, sono risultate nettamente superiori nel campione di rose. Nel grafico riportato in figura 48, sono confrontate le aree della quercetina e del kaempferol nei differenti campioni sottoposti all'analisi.



**Figura 48** Confronto delle aree rilevate per le molecole quercetina e kaempferol per i vari campioni analizzati

---

***CAPITOLO 5***  
***RISULTATI E DISCUSSIONE***

---

**Semilavorato**

---

## **5.1 SCELTA DELLE CULTIVAR DI ROSA DA UTILIZZARE PER LA PREPARAZIONE DEL SEMILAVORATO**

Lo studio della composizione dei prodotti alimentari è suscettibile di approfondimenti in funzione della disponibilità e della messa a punto di metodiche analitiche con prestazioni sempre più elevate. Da tali approfondimenti della qualità possono derivare anche scelte tecnologiche volte alla massima valorizzazione delle materie prime e alla salvaguardia delle qualità intrinseche. Ciò è valido per numerosissime filiere produttive e ancor più per quella agroalimentare. In generale la qualità può essere definita come il grado di eccellenza o di superiorità di un prodotto ed è il risultato della combinazione di attributi, proprietà o caratteristiche che gli conferiscono un valore in funzione del suo uso (Kader, 2000). La qualità dei fiori così come quella di tutti i prodotti ortofloricoli è definita da fattori qualitativi interni ed esterni. I fattori qualitativi interni sono rappresentati dal contenuto in vitamine, zuccheri, aroma, sapore ecc. I fattori qualitativi esterni permettono invece di apprezzare le caratteristiche visive del prodotto e nell'ambito dei fiori sono rappresentati da taglia, forma, fragranza e armonia cromatica oltre che dall'assenza di danni meccanici provocati da insetti o malattie. A causa dell'alto tasso di deperibilità, tra i parametri che definiscono la qualità dei fiori vi è la durata post-raccolta quindi la facilità e la resistenza alla manipolazione dovuta alle operazioni di raccolta e conservazione.

Per la scelta delle cultivar di rosa da destinare alla trasformazione in semilavorato da utilizzare come ingrediente di particolare interesse nutrizionale per l'industria dello yogurt, sono stati considerati sia gli aspetti qualitativi interni sia quelli esterni. Inoltre, la criticità del fattore produttivo-agronomico di un prodotto biologico non convenzionale come le rose è di fondamentale importanza per la proficua disponibilità di materia prima qualitativamente idonea alla successiva trasformazione. Gli ibridi moderni di rose inglesi brevettate da David Austin e le cultivar di rose antiche campionate sono piante particolarmente fiorifere con forme del fiore a coppa e corolle piene ed opulente; sono anche facilmente coltivabili e naturalmente resistenti alle avversità. Le rose inglesi si caratterizzano per una buona produttività nella stagione primaverile in corrispondenza del picco di fioritura e per un'elevata aromaticità dei petali dovuta all'intensa e insolita fragranza che le contraddistingue (Bianchi *et al.*, 2007). In particolare, lo studio di caratterizzazione aromatica delle cultivar di rose Inglesi campionate (Nuzzi *et al.*, 2009) ha evidenziato come le cultivar *Eglantyne*® e *Jeoff Hamilton*® si siano distinte per la presenza di composti aromatici tipici del fiore di rosa quali nerolo,  $\beta$ -ionone e dei composti aromatici d'impatto (cis e trans rose oxide). Nell'ambito delle rose inglesi, *Eglantyne*® è la cultivar tra le più fiorifere e popolari. Le rose antiche sono notoriamente utilizzate per scopi alimentari proprio in virtù delle loro peculiarità agronomiche di buona produttività e per la loro profumazione caratteristica. Viceversa le rose coprisuolo hanno fiori singoli semplici e indici di fioritura non rilevanti durante i picchi di fioritura (Amoroso *et al.*, 2006); essendo state costituite da *breeder* del centro-Nord Europa, spesso evidenziano difficoltà ad adattarsi alle condizioni climatiche del nostro paese. In un contesto di bassa manutenzione che caratterizza la coltivazione degli ibridi coprisuolo, la resistenza alle più comuni patologie è di fondamentale importanza per una costante produzione fiorifera.

L'analisi discriminante condotta sulle cultivar di rosa campionate, appartenenti al medesimo gruppo per i diversi parametri nutrizionali e funzionali considerati, ha evidenziato la similarità

delle rose di ogni gruppo mentre l'analisi delle componenti principali ha evidenziato la variabilità di composizione chimica di ogni singola cultivar indipendentemente dal gruppo di appartenenza. Tra le rose inglesi, *Jeoff Hamilton*® si è distinta per un elevato contenuto in vitamina C mentre nell'ambito delle rose antiche, *Roseraie de l'Hay*, *Belle Poitevine* e *Chianti* si sono distinte per l'elevata qualità di alcuni importanti parametri nutrizionali e funzionali (acidi organici, contenuto in solidi solubili, attività antiossidante in vitro). Tra gli ibridi di rose coprisuolo vanno considerate le cultivar *Bad Birnbach*, *Home & Garden* e *Cumbaya* per le rilevanti prestazioni in merito all'attività antiossidante e al contenuto in vitamina C. Le cultivar coprisuolo non sono state considerate per la realizzazione del semilavorato a causa della maggiore criticità manifestata riguardo i fattori produttivo-agronomici rispetto alle rose inglesi e alle rose antiche. Le cultivar selezionate per la realizzazione del semilavorato sono state quindi *Eglantyne*® e *Jeoff Hamilton*® del gruppo delle rose inglesi e *Roseraie de l'Hay*, *Belle Poitevine* e *Chianti* del gruppo delle rose antiche. E' opportuno sottolineare come la conduzione secondo le tecniche in uso per l'agricoltura biologica dei roseti non sia ancora sviluppata a livello aziendale e che il reperimento delle cultivar d'interesse è stata resa possibile dall'individuazione di siti di raccolta non convenzionali in cui la coltivazione delle rose avveniva senza l'ausilio di fitofarmaci e in assenza di cure colturali specifiche (concimazioni chimiche, potature, irrigazioni).

## **5.2 PROFILO ANTIOSSIDANTE DELLE CULTIVAR DI ROSA UTILIZZATE PER LA PREPARAZIONE DEL SEMILAVORATO**

Per i risultati dei parametri chimico-fisici e nutrizionali determinati sulle 5 cultivar di rosa, si rimanda al capitolo 4 (paragrafo 4.2). Nelle tabelle 43 e 44 sono riportati i risultati delle analisi biochimiche (composti bio-attivi e test antiossidanti) determinati su ulteriori campioni delle 5 cultivar di rosa destinate alla preparazione del semilavorato.

In tabella 43 viene riportata la resa in sostanza secca dei petali dopo liofilizzazione e il contenuto in composti bio-attivi (polifenoli e antociani totali) estratti in H<sub>2</sub>O/HCl 0,5 mN come operato in precedenza e per tutte le altre cultivar dell'intero studio; per le rose *Jeoff Hamilton*®, *Eglantyne*® e *Chianti* l'estrazione dei composti è stata eseguita anche in MeOH/HCl (98/2, v/v).

**Tabella 43 Contenuto in composti bio-attivi dei petali delle cultivar di rosa prescelte**

<b>COMPOSTI BIO-ATTIVI</b>					
<b>Cultivar</b>	<b>s.s. (%)</b>	<b>Estrazione H<sub>2</sub>O/HCl</b>		<b>Estrazione MeOH/HCl</b>	
		<b>TPC<sup>a</sup></b>	<b>CAT<sup>b</sup></b>	<b>TPC<sup>a</sup></b>	<b>CAT<sup>b</sup></b>
<i>Jeoff Hamilton</i> ®	15,3	32,00 ± 0,59	0,26 ± 0,01	58,40 ± 0,60	0,44 ± 0,07
<i>Eglantyne</i> ®	16,2	19,34 ± 0,57	0,16 ± 0,01	60,21 ± 0,77	0,24 ± 0,08
<i>Chianti</i>	23,0	36,70 ± 3,18	9,54 ± 0,02	112,46 ± 0,69	11,46 ± 0,23
<i>Roseraie de l'Hay</i>	18,4	34,45 ± 1,36	17,52 ± 0,02	-	-
<i>Belle Poitevine</i>	17,5	32,78 ± 4,27	3,80 ± 0,00	-	-

<sup>a</sup>TPC= Contenuto in polifenoli totali (mg GAE/g p.s.); <sup>b</sup>CAT= Contenuto in antociani totali (mg di cianidina 3-glucoside/g p.s.).

Valori medi di 3 determinazioni per ciascun parametro e relativo errore standard

L'estrazione con metanolo ha permesso di rilevare un più elevato tenore in polifenoli e antociani totali presenti nei campioni di rose. Tra gli studi inerenti le proprietà antiossidanti di matrici floricole, il lavoro di Mao *et al.* del 2006 ha mostrato come il contenuto in polifenoli totali dei fiori di *Hemerocallis fulva* L. sia risultato più elevato per le estrazioni condotte con solvente etanolo rispetto alle estrazioni acquose. Il tenore di polifenoli totali estratti in metanolo dalle cultivar esaminate è risultato confrontabile con quello rilevato per la specie *Rosa chinensis* in uno studio di Cai *et al.*, del 2005.

In tabella 44 sono riportati i risultati dei test antiossidanti eseguiti sui petali delle 5 cultivar di rosa e condotti mediante estrazione acquosa.

**Tabella 44 Test di capacità antiradicalica dei petali delle cultivar di rosa prescelte**

Cultivar	TEST ANTIOSSIDANTI	
	DPPH <sup>c</sup>	SALE DI FREMY <sup>d</sup>
<i>Jeoff Hamilton</i> ®	15,17 ± 1,57	14,44 ± 2,14
<i>Eglantyne</i> ®	9,61 ± 0,25	12,63 ± 1,49
<i>Chianti</i>	33,70 ± 1,51	10,07 ± 0,29
<i>Roseaie de l'Hay</i>	15,74 ± 0,07	14,76 ± 0,34
<i>Belle Poitevine</i>	22,33 ± 1,05	20,36 ± 0,39

<sup>c</sup>DPPH=test colorimetrico contro il radicale DPPH (mg GAE/g p.s); <sup>d</sup>Sale di Fremy=test per Risonanza Paramagnetica Elettronica contro il radicale sale di Fremy (mg GAE/g p.s).

Valori medi di 3 determinazioni per ciascun parametro e relativo errore standard

I petali di rosa delle cultivar selezionate possono essere considerati un'ideale base di partenza per la realizzazione di un ingrediente funzionale grazie all'elevato contenuto in composti bio-attivi (polifenoli totali) e per le risposte di potere antiossidante contro i radicali DPPH e Sale di Fremy. I test antiossidanti condotti hanno confermato la presenza di molecole dotate di attività biologica per tutte le cultivar anche per quelle meno ricche in pigmenti antocianici come *Jeoff Hamilton*® ed *Eglantyne*®. Nel complesso i risultati ottenuti in parte divergono da quelli derivanti da matrici vegetali similari per le differenze riguardanti le metodologie di estrazione e per la specificità della matrice analizzata. L'attività antiossidante dei campioni testati dipende dal tipo di radicale libero o dalla sostanza ossidante utilizzata e dalla modalità di esecuzione dei diversi saggi. Il test DPPH, tra i saggi basati sull'impiego di radicali di sintesi, è quello più studiato e applicato per numerose matrici vegetali grazie all'elevata riproducibilità e all'elevata correlazione mostrata con il contenuto in polifenoli totali della matrice analizzata. Lo studio di Youwey *et al.* del 2008, concernente la determinazione del potere *scavenger* mediante test DPPH di estratti acquosi di 69 specie floricole tra cui diverse varietà del genere *Rosa*, ha mostrato come alcune cultivar di *Rosa hybrida* e *Rosa rugosa* si siano caratterizzate per la più elevata attività antiossidante correlata all'elevato tenore in polifenoli totali. In letteratura scientifica non sono state ritrovate informazioni riguardo l'applicazione del test del Sale di Fremy per specie floricole e per le rose. Come anticipato nel capitolo 4 e nel paragrafo 4.5 relativo alla discussione delle analisi biochimiche condotte sull'insieme delle cultivar studiate, è stato possibile riportare la misura *scavenger* contro il radicale sale di Fremy determinata per le cultivar di rose come *Belle Poitevine*, a quella rilevata

dalle bucce dei frutti della specie *Vitis vinifera* L., notoriamente ricchi di molecole antiossidanti (Lo Scalzo *et al.*, 2007).

### **5.3 SCELTA DELLA QUANTITA' DI MATERIA PRIMA PER LA FORMULAZIONE DELLA MISCELA-BASE**

Le specie di rose come la *Rosa gallica* e la *Rosa damascena*, sono da tempo impiegate non solo come guarnizione ma anche come ingrediente di particolare interesse gastronomico in virtù delle peculiari caratteristiche dei loro fiori (Velioglu e Mazza, 1991). Lo studio condotto sulle rose inglesi e antiche, ha consentito di individuare quelle con caratteristiche estrinseche simili alle rose Gallica e Damascena ma dotate anche di rilevanti proprietà nutraceutiche. Le specie studiate hanno anche mostrato caratteristiche sensoriali peculiari, idonee quindi alla formulazione di un ingrediente innovativo per yogurt. Data l'originalità e l'impiego tuttora a livello sperimentale di questa matrice, la preparazione ha dovuto rispondere a criteri tecnologici predefiniti dettati dalle esigenze di una possibile produzione del semilavorato di tipo industriale sostenibile. La produzione biologica non ancora sviluppata a livello aziendale, le rese di produzione strettamente dipendenti dall'andamento stagionale, le caratteristiche organolettiche particolari del prodotto che lo contraddistinguono dalle altre matrici alimentari hanno condotto alla scelta di impiegare una quantità di materia prima dell'ordine del 15%, inferiore alla quantità comunemente adoperata nelle formulazioni a base di frutta (50%) destinate alla produzione di prodotti lattiero-caseari come lo yogurt (Leroy, 2004; Brimar *et al.*, 2003, Prinzivalli *et al.*, 2004). La tecnologia di preparazione della miscela-base è stata quindi messa a punto per i petali di rosa utilizzati per la realizzazione di una nuova formulazione specificatamente studiata per questo tipo di materia prima.



#### **5.4 SCELTA DEI METODI DI STABILIZZAZIONE**

Il pretrattamento del semilavorato (acidificazione e concentrazione mediante aggiunta di zucchero) è stato eseguito al fine di ottenere un ingrediente caratterizzato da condizioni chimiche presumibilmente sfavorevoli allo sviluppo dei microrganismi. Il trattamento termico successivamente condotto è stato messo a punto con l'obiettivo di ridurre l'insorgenza di alterazioni delle caratteristiche nutrizionali del semilavorato stesso (Fellows, 1988). La stabilizzazione termica della miscela è stata effettuata sia per sanificare il prodotto sia per ottenere un rapporto ottimale tra componenti solidi e acqua, risultanti in una struttura più stabile ed una tessitura più cremosa nel prodotto finale (figura 49).



**Figura 49 Stabilizzazione termica del semilavorato in recipiente di rame**

I parametri di processo prefissati per il trattamento termico (temperature e tempi di trattamento per i protocolli 'A' e 'B', specificati nel paragrafo 3.7 del capitolo 3) sono stati monitorati mediante il calcolo strumentale dell' "effetto letale" (F) utile per poter valutare l'effetto del trattamento in rapporto alle caratteristiche fisico-chimiche del prodotto (Migliorini M., 2004).

Nella figura 50 è riportata la curva di temperatura monitorata con sonda ELLAB per la fase di stabilizzazione termica con protocollo 'B' (figura 50.1) e protocollo 'A' (figura 50.2). In ogni grafico vengono visualizzate:

- la curva T relativa al trattamento termico reale
- la curva F, relativa al tempo di trattamento termico teorico necessario per assicurare l' "effetto letale" sulla popolazione microbica presente nel prodotto
- i valori D (tempo di riduzione decimale) e z (gradi di calore necessari per indurre una riduzione decimale di una popolazione microbica) trascritti come  $D_{92^{\circ}\text{C}} = 2/3$  minuti e  $z=7$  e riferiti alle proprietà di termoresistenza dei possibili microrganismi bersaglio.

I valori D e z considerati per il calcolo di F sono quelli stabiliti in letteratura per le conserve molto acide ( $\text{pH}<4,2$ ). Per tali conserve i germi bersaglio sono in genere poco definiti e si considerano solo forme vegetative di microrganismi che già a  $70^{\circ}\text{C}$  vengono distrutte mentre le spore non vengono controllate in quanto a valori di pH acido non riuscirebbero a germinare.

Inoltre, sempre per le conserve molto acide sono individuati quali germi bersaglio anche le muffe, giudicate più termoresistenti.

Con tali parametri, il trattamento con protocollo 'B', relativo al raggiungimento della temperatura di 85°C, sembra essersi rivelato non del tutto efficace in quanto il prodotto non ha raggiunto la temperatura prefissata nei tempi teorici stabiliti. Il trattamento con protocollo 'A' di 98°C sembra essere, invece, risultato efficace anche per le forme più termoresistenti. Questi presupposti sono stati poi verificati con un'opportuna campionatura per l'esecuzione delle relative conte microbiche. Poiché il prodotto stabilizzato con i protocolli 'B' ed 'A' non ha una durabilità lunga come quella dei prodotti sottoposti a trattamenti termici più drastici, dopo il trattamento termico è stato conservato a temperatura costante di 4°C per 21 giorni secondo una cinetica a punti prestabiliti di controllo, in termini di tempo (T0=0 giorni; T10=10 giorni; T21=21 giorni), al fine di monitorare quei microrganismi eventualmente resistenti al calore che potrebbero interferire con la conservabilità e la sicurezza sanitaria del prodotto finale.

**Figura 50 Calcolo di F (effetto letale) con  $D_{92^{\circ}\text{C}}=2\text{-}3$  min e  $z=7$  per le curve di temperatura relative ai protocolli di stabilizzazione termica 'B' (grafico 50.1) ed 'A' (grafico 50.2)**

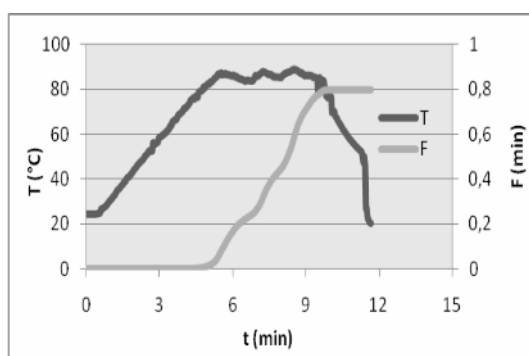


Figura 50.1 Protocollo di stabilizzazione 'B'  
 $T_{\text{max}} = 85^{\circ}\text{C}$

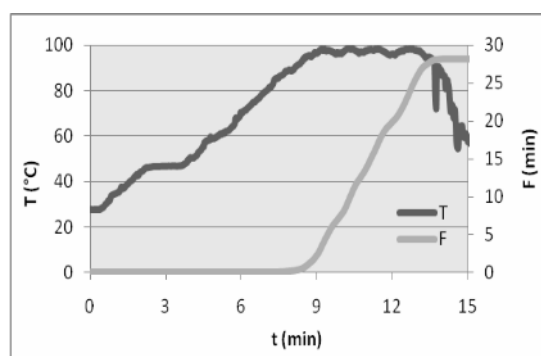


Figura 50.2 Protocollo di stabilizzazione 'A'  
 $T_{\text{max}} = 98^{\circ}\text{C}$

$T_{\text{max}}$ =temperatura massima raggiunta nella fase di sosta durante il processo termico reale

## **5.5 PARAMETRI QUALITATIVI TECNOLOGICI**

Sul semilavorato tal quale e stabilizzato con il calore sono state condotte una serie di determinazioni qualitative. Al momento della preparazione sono stati rilevati i parametri chimico-fisici pH, acidità titolabile (TA), solidi solubili (SSC), attività dell'acqua (Aw), contenuto percentuale di sostanza secca (s.s.) e viscosità. Il colore è stato monitorato nel corso della *shelf-life* per individuare le modificazioni qualitative di questo parametro durante la conservazione.

In tabella 45 sono riportati i valori dei parametri fisico-chimici (pH, TA, SSC, Aw, % s.s.) determinati sul semilavorato tal quale e stabilizzato secondo i due protocolli di stabilizzazione 'A' e 'B'.

Il pretrattamento chimico condotto durante la preparazione del semilavorato ha consentito di ottenere un ingrediente caratterizzato da un grado rifrattometrico medio-alto e da un pH acido. Per la stabilità del preparato sono stati quindi considerati i possibili effetti dell'abbassamento

relativo sia dell'Aw sia del pH e l'effetto del trattamento termico. Per quanto riguarda il parametro Aw non sono state registrate differenze significative tra i campioni che hanno però mostrato un contenuto di umidità significativamente differente. La corrispondenza dei valori di Aw con i valori di grado rifrattometrico registrati per i semilavorati è confermata da quanto riportato da Giannotti *et al.* (2001) a proposito della relazione esistente fra concentrazione di saccarosio e misura Aw di soluzioni osmotiche.

I campioni stabilizzati con il calore con i metodi 'A' e 'B' hanno fatto registrare valori di contenuto in solidi solubili e in acidità titolabile significativamente superiori rispetto al campione tal quale per effetto della concentrazione subita dalla miscela in seguito a cottura.

**Tabella 45 Parametri fisico-chimici del semilavorato a base di petali di rosa**

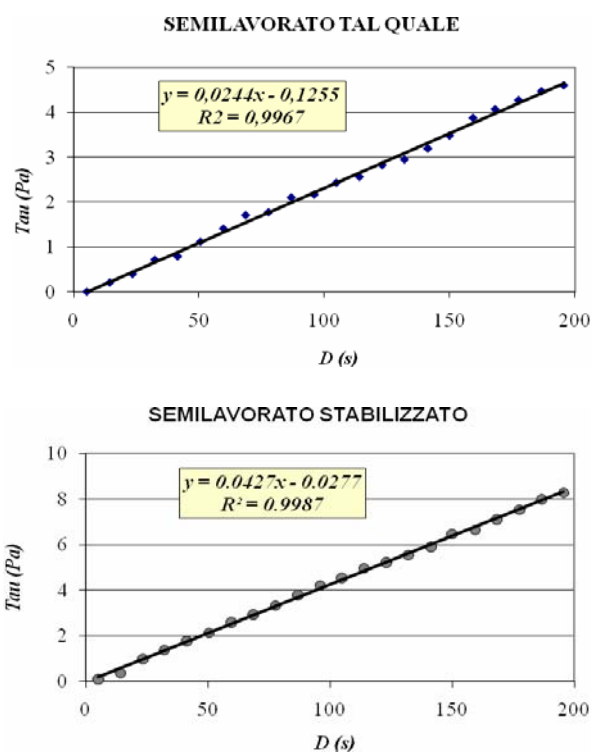
Semilavorato	pH	TA <sup>a</sup> meq/Kg p.f.	SSC <sup>b</sup> °Bx <sup>b</sup>	Aw <sup>c</sup>	s.s. <sup>d</sup> %
Tal quale	3,32 ± 0,14	a 50,6 ± 0,05	c 39,05 ± 0,03	c 0,96 ± 0,002	a 44,2 ± 1,15
Stabilizzato 'B'	3,43 ± 0,16	a 54,3 ± 0,00	b 42,30 ± 0,06	b 0,95 ± 0,001	a 46,0 ± 1,03
Stabilizzato 'A'	3,27 ± 0,19	a 62,9 ± 0,04	a 47,31 ± 0,01	a 0,94 ± 0,001	a 55,4 ± 1,26

<sup>a</sup>TA=acidità titolabile; <sup>b</sup>SSC=contenuto in solidi solubili, <sup>b</sup>Bx=grado rifrattometrico; <sup>c</sup>Aw=attività dell'acqua; <sup>d</sup>s.s.= sostanza secca in 100 g di prodotto

Valori medi di 2 determinazioni e relativo errore standard. A lettere diverse, per colonna, corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.

Considerando il valore critico di Aw riscontrato per il preparato, il tenore di acqua disponibile è soltanto uno dei fattori dai quali dovrebbe dipendere la stabilità del semilavorato. La sopravvivenza e lo sviluppo dei microrganismi nel prodotto sono infatti influenzati non solo dalla composizione chimica e dallo stato fisico ma anche dalla tecnologia di preparazione dei prodotti come commentato da Manas e Pagan, in un lavoro del 2005.

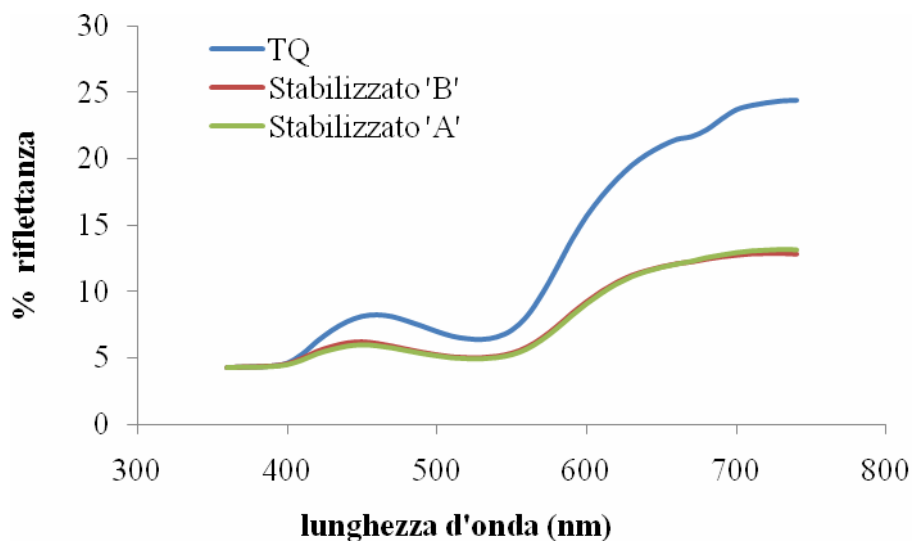
Il parametro viscosità è stato misurato per il semilavorato tal quale e per il semilavorato stabilizzato con protocollo 'A' e in figura 51 è mostrata la "curva di flusso" cioè il grafico dello sforzo di taglio ( $\tau$ ) in funzione della velocità di scorrimento o gradiente (D) che permette di definire il comportamento reologico del prodotto.



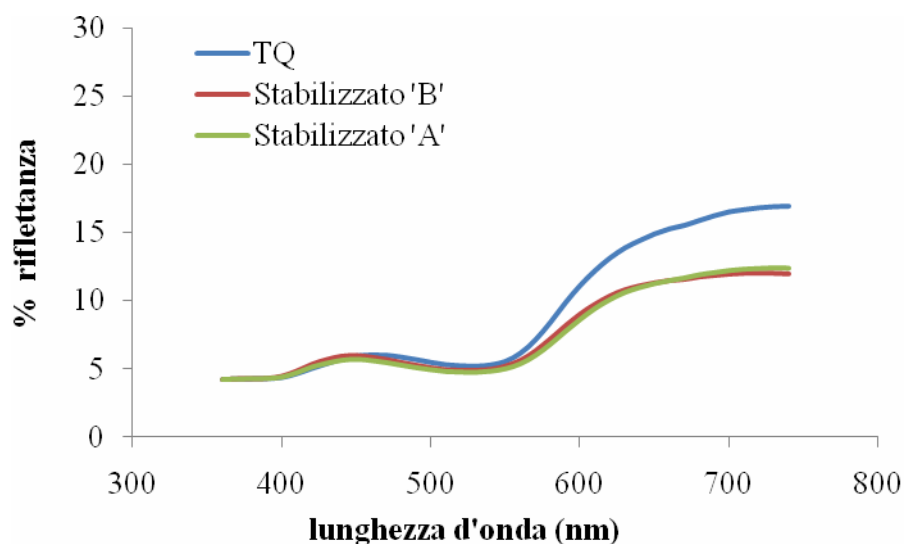
**Figura 51** Curve di flusso relative al comportamento reologico del semilavorato tal quale (sopra) e stabilizzato (sotto)

Il valore medio della viscosità (Pa.s) dei semilavorati è visualizzato dal valore del coefficiente della x delle equazioni lineari che hanno descritto le rispettive curve di flusso; data la linearità delle equazioni, entrambi i semilavorati hanno mostrato un comportamento reologico di tipo newtoniano ossia con il variare del gradiente  $D$  la viscosità è rimasta costante. Il semilavorato stabilizzato si è caratterizzato per un valore di viscosità doppio rispetto a quello del semilavorato tal quale per effetto della concentrazione subita dal preparato dopo il trattamento termico con relativo aumento del contenuto in solidi solubili.

Per quanto riguarda il parametro colore, le misure spettrofotometriche rilevate nel campo del visibile tra 360 nm e 760 nm, sia per il semilavorato tal quale sia per i semilavorati stabilizzati con metodo 'A' e 'B', hanno consentito di monitorare il colore durante la *shelf-life* attraverso il confronto dei relativi spettri di riflettanza. Nelle figure 52.a e 52.b sono presentati gli spettri di riflettanza dei vari campioni. Lo spettro ottenuto per il semilavorato tal quale si è differenziato da quello dei semilavorati trattati con il calore e tale differenza è risultata molto marcata all'inizio della conservazione ( $T_0$ ). Dopo 21 giorni di *shelf-life* ( $T_{21}$ ), lo spettro del semilavorato tal quale non stabilizzato con il calore è mutato in misura maggiore rispetto alle modifiche rilevate dagli spettri dei semilavorati stabilizzati.



**Figura 52.a** Spettro di riflettanza per i semilavorati tal quale (TQ) e stabilizzati ('B' e 'A') rilevati al tempo 0 (T0)



**Figura 52.b** Spettro di riflettanza per i semilavorati tal quale (TQ) e stabilizzati ('B' e 'A') rilevati dopo 21 giorni di shelf life (T21)

In tabella 46 sono riportati i valori medi rilevati per le coordinate cromatiche  $L^*$  (luminosità) e  $a^*$  (tonalità rossa) e per il parametro colorimetrico  $C^*$  (Chroma o saturazione) per i campioni di semilavorato. Al momento della preparazione (T0) il semilavorato tal quale ha presentato valori medi di  $L^*$ ,  $a^*$  e  $C^*$  tali da definire il colore del prodotto come rosso chiaro brillante (figura 53) mentre i medesimi valori riferiti ai semilavorati stabilizzati hanno definito il colore rosso come più saturo e meno brillante. Per tutti i parametri, il campione tal quale si è differenziato dai trattati per valori significativamente superiori sia al tempo 0 sia dopo 21 giorni di conservazione. Il campione stabilizzato con metodo 'A' si è differenziato per il minor valore del parametro  $L^*$  mentre il campione trattato 'B' per valori significativamente inferiori dei parametri  $C^*$  ed  $a^*$  dopo 21 giorni di conservazione.



**Figura 53 Colore del semilavorato tal quale al momento della preparazione**

**Tabella 46 Valori medi delle coordinate colorimetriche al tempo 0 (T0) e dopo 21 giorni di conservazione (T21) sui campioni dei semilavorati tal quale (TQ) e stabilizzati ('B' ed 'A')**

Semilavorato	L*		C*		a*	
	T0	T21	T0	T21	T0	T21
TQ	37,88 a	32,87 b	21,82 a	17,54 b	20,31 a	16,09 b
Stabilizzato 'B'	31,02 c	30,64 e	13,79 c	13,32 f	13,38 c	12,88 f
Stabilizzato 'A'	30,68 d	30,03 f	13,76 d	13,44 e	13,27 d	12,96 e

Valori medi di 2 determinazioni. A lettere diverse, per le colonne relative a ciascun parametro, corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.

## **5.6 ANALISI MICROBIOLOGICHE DURANTE LA SHELF-LIFE**

Le valutazioni microbiologiche sul semilavorato sono state condotte sui lotti di una tesi effettuando le conte microbiche sia sul campione tal quale sia sui semilavorati stabilizzati a 0, 10 e 21 giorni di *shelf-life* a 4°C (T0-T10-T21). Sono stati determinati i contenuti di:

- coliformi, *E. coli*, enterococchi in quanto potenziali indici igienici
- *Pseudomonas spp* ed eumiceti in quanto comuni indici di possibile contaminazione da vegetali.
- batteri sporigeni aerobi in quanto normalmente resistenti ai trattamenti di pastorizzazione.

I valori delle conte microbiche sono stati trasformati in  $\log_{10}$  e i risultati sono stati sottoposti all'analisi della varianza con procedura ANOVA e test di Tukey per la separazione delle medie. Poiché le conte sono risultate  $< 10$  cfu/g per coliformi, *E. coli* ed enterococchi e  $< 100$  cfu/g per *Pseudomonas sp.* in tutti i campioni analizzati durante l'intero periodo di *shelf-life*, i valori logaritmici per questi ceppi microbici non sono stati elaborati statisticamente. Per quanto riguarda le spore di batteri aerobi, sono state ritrovate solo dopo 21 giorni di conservazione nel campione tal quale ( $2,70 \log_{10}$  ufc/g) e nel campione stabilizzato con metodo 'B' ( $2,00 \log_{10}$  ufc/g). La presenza delle spore nel semilavorato stabilizzato con metodo 'B' potrebbe essere

dovuta o a contaminazione casuale del campione o al fatto che le spore siano resistenti alla temperatura raggiunta nella fase di sosta del trattamento termico.

Nelle tabelle 47 e 48 sono riportati i valori medi in  $\log_{10}$  ufc/g delle conte degli eumiceti ritenuti l'unica fonte di contaminazione del prodotto durante la conservazione. Nel campione tal quale (TQ) lo sviluppo delle muffe è risultato contenuto mentre lo sviluppo di lieviti sembra rappresentare il problema maggiore. I trattamenti termici sono risultati efficaci per contenere lo sviluppo dei lieviti nel corso della *shelf-life*. La minore carica iniziale delle muffe nel campione tal quale potrebbe giustificare il fatto che non si siano sviluppate nei campioni stabilizzati nonostante siano giudicate più termoresistenti dei lieviti (tabella 47).

**Tabella 47 Sviluppo degli eumiceti ( $\log_{10}$  ufc/g): confronto tra il semilavorato tal quale (TQ) e i semilavorati stabilizzati ('A' e 'B') durante la *shelf-life* a 4°C**

	T0			T10			T21		
	TQ	'B'	'A'	TQ	'B'	'A'	TQ	'B'	'A'
Lieviti	3,15 a	<2 b	<2 b	2,77 a	<2 b	<2 b	5,17 a	<2 b	2,30 b
Muffe	2,15 a	2,00 a	<2 a	<2,00 a	<2 a	<2 a	<2 a	<2 a	2,00 a

Valori medi di due determinazioni per campione. A lettere diverse in ogni riga, per ogni tempo di *shelf life*, corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey

Nel campione tal quale, i lieviti si sono sviluppati in misura significativa dopo 21 giorni di *shelf-life*. Nei campioni trattati ('B' ed 'A'), le cariche dei lieviti non sono risultate significativamente differenti mentre le muffe sono state rilevate solo nel campione 'B' al tempo 0 (tabella 48).

**Tabella 48 Sviluppo degli eumiceti ( $\log_{10}$  ufc/g) nel semilavorato tal quale (TQ) e confronto tra i trattamenti di stabilizzazione 'A' e 'B' durante la *shelf-life* a 4°C**

	TQ			'A'			'B'		
	T0	T10	T21	T0	T10	T21	T0	T10	T21
Lieviti	3,15 b	2,77 b	5,17 a	<2 a	<2 a	2,30 a	<2 a	<2 a	<2 a
Muffe	2,15 a	<2 a	<2 a	<2 b	<2 b	<2 b	2,00 a	<2 b	<2 b

Valori medi di due determinazioni per campione. Per il TQ a lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey; per i campioni 'A' e 'B' a lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey

Considerando complessivamente i risultati acquisiti, la procedura di preparazione (contenitori presterilizzati agli UV, riempimento dei contenitori sotto cappa a flusso laminare), le caratteristiche tecnologiche del prodotto (pH acido ed elevato grado rifrattometrico) e la modalità di conservazione (refrigerazione del prodotto in contenitori ermetici) hanno consentito di ottenere un semilavorato con apprezzabili caratteristiche microbiologiche. Anche il campione tal quale non stabilizzato ha infatti mostrato solo lo sviluppo di lieviti e di sporigeni aerobi nell'ordine rispettivamente di  $10^5$  e  $10^2$ .

## 5.7 ANALISI DEI CONTENUTI NUTRACEUTICI

Per la valutazione dei composti bio-attivi del semilavorato sono state impiegate 2 diverse tesi per un volume totale di 800 ml e volumi parziali di 200 ml per campione. E' stato individuato quale *marker* analitico, il contenuto in polifenoli e antociani totali considerando che le potenzialità antiossidanti del prodotto dovrebbero essere supportate dall'effettiva attività biologica di tali molecole (Moyer et al., 2002). I semilavorati tal quale e stabilizzati con metodi 'A' e 'B' sono stati analizzati al momento della preparazione e dopo conservazione a -18°C per 12 mesi. Il periodo di conservazione è stato stabilito considerando il limite massimo di giacenza del prodotto (tal quale e stabilizzato) allo stato congelato predisposto per simulare un processo di lavorazione industriale (come indicato nel piano sperimentale, par. 3.8 del capitolo 3). L'estrazione dei composti bio-attivi, polifenoli e antociani totali, è stata condotta sui campioni di semilavorato utilizzando una soluzione acquosa in HCl come operato per i petali liofilizzati per consentire il calcolo delle perdite dovute al processo di trasformazione. Nelle tabelle 49 e 50 sono riportati i risultati relativi ai composti polifenolici e antocianici totali estratti in soluzione acquosa dai semilavorati tal quale (TQ) e trattati termicamente ('A' e 'B').

**Tabella 49 Valori medi dei composti bio-attivi per il semilavorato tal quale (TQ) e per i semilavorati stabilizzati ('A' e 'B')**

Semilavorato	TPC <sup>a</sup>	CAT <sup>b</sup>
TQ	103,81 ± 31,57 b	6,57 ± 1,47 a
Stabilizzato 'A'	149,42 ± 25,70 a	7,65 ± 1,28 a
Stabilizzato 'B'	134,69 ± 40,33 a	7,50 ± 1,01 a

<sup>a</sup>TPC=Contenuto in polifenoli totali (mg GAE/100 g p.f.); <sup>b</sup>CAT=Contenuto in antociani totali (mg di cianidina 3-glucoside/100 g p.f.)

Per ogni campione sono riportati i valori medi di 3 determinazioni e il relativo errore standard. A lettere diverse, per colonna, corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.

I semilavorati stabilizzati hanno mostrato un contenuto medio in polifenoli totali, significativamente superiore rispetto a quello rilevato per il semilavorato tal quale, mentre per il contenuto in antociani totali non sono state registrate differenze significative tra i campioni (tabella 49).

In tabella 50, i risultati relativi ai semilavorati stabilizzati ('A' e 'B') sono stati normalizzati ai valori di sostanza secca del semilavorato tal quale (TQ).

**Tabella 50 Valori medi dei composti bio-attivi per il semilavorato tal quale (TQ) e per i semilavorati stabilizzati ('A' e 'B'). (estrazione acquosa in HCl). Valori normalizzati al contenuto di sostanza secca del semilavorato tal quale. In parentesi è indicata una stima delle perdite medie % dovute al processo di trasformazione**

Semilavorato	TPC <sup>a</sup> (0)	CAT <sup>b</sup> (58)
Tal quale	103,81 ± 31,57 b	6,57 ± 1,47 ab
Stabilizzato 'A'	119,21 ± 20,50 ab	6,11 ± 1,02 b
Stabilizzato 'B'	129,42 ± 38,75 a	7,21 ± 0,97 a

<sup>a</sup>TPC=Contenuto in polifenoli totali (mg GAE/100 g p.f.); <sup>b</sup>CAT=Contenuto in antociani totali (mg di cianidina 3-glucoside/100 g p.f.)

Per ogni campione sono riportati i valori medi di 3 determinazioni e il relativo errore standard. A lettere diverse, per colonna, corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.



Normalizzando i dati, il semilavorato stabilizzato con metodo 'B' ha mostrato valori di polifenoli e antociani totali significativamente superiori rispetto al semilavorato tal quale. Tale risultato, ampiamente confermato dai molteplici studi riguardanti l'effetto dei trattamenti termici sulla stabilità dei componenti bio-attivi di varie matrici vegetali (Ferracane *et al.*, 2008; Miglio *et al.*, 2008), ha dimostrato come la il trattamento termico subito dalla miscela non abbia influito in misura determinante sulla stabilità dei composti nutraceutici considerati, in particolare per i polifenoli totali. Relativamente al contenuto in antociani totali, il campione trattato 'A' ha mostrato un contenuto significativamente inferiore rispetto al trattato 'B'. La trasformazione dei petali di rosa e la realizzazione della miscela-base, ha generato alcune modificazioni del contenuto in composti bio-attivi rispetto a quanto riscontrato per i petali alla raccolta (tabella 43, paragrafo 5.2). Perdite determinate dal processo tecnologico sono state registrate nella miscela per il contenuto in antociani anche per la diluizione operata con zucchero e acqua e quindi a causa del quantitativo di materia prima opportunamente impiegato nella formulazione (15%). La degradazione degli antociani è stata evidenziata anche in studi concernenti la stabilità dei pigmenti nelle confetture con frutti rossi (Plessi *et al.*, 2007) e nei processi di produzione di altre conserve di frutta (Kim and Padilla-Zakour, 2004). Per quanto riguarda invece i polifenoli totali, la loro concentrazione non è stata influenzata dal processo di preparazione della miscela in quanto più stabili e meno suscettibili alle modificazioni indotte dal processo di trasformazione (Lo Scalzo *et al.*, 2010) (tabella 50). In tabella 51 è riportato il contenuto in polifenoli e antociani totali estratti con soluzione acquosa in HCl dai semilavorati tal quale (TQ) e stabilizzati ('A' e 'B') e valutati sia al momento della preparazione sia dopo conservazione a -18°C per 12 mesi. Al momento della preparazione sia per il contenuto in polifenoli sia per il contenuto in antociani, i campioni hanno mostrato valori rispettivamente superiori a quelli rilevati dopo 12 mesi di conservazione. Dopo tale periodo, in particolare per il semilavorato tal quale e per il campione stabilizzato 'A', sono stati registrati contenuti significativamente inferiori in antociani.

**Tabella 51 Valori medi dei composti bio-attivi per il semilavorato tal quale (TQ) e per i semilavorati stabilizzati ('A' e 'B') al momento della preparazione e dopo conservazione a-20°C (estrazione acquosa in HCl). Valori normalizzati al contenuto di sostanza secca del semilavorato tal quale**

Semilavorato	Composti bio-attivi	Conservazione (mesi)		
TQ	TPC <sup>a</sup>	0	144,21 ± 6,60	a
	TPC	12	63,40 ± 0,95	b
'A'	TPC	0	143,16 ± 13,75	a
	TPC	12	95,27 ± 1,40	b
'B'	TPC	0	174,17 ± 27,35	a
	TPC	12	84,67 ± 1,85	b
TQ	CAT <sup>b</sup>	0	8,33 ± 0,86	a
	CAT	12	4,81 ± 0,05	c
'A'	CAT	0	7,26 ± 0,79	ab
	CAT	12	4,95 ± 0,04	c
'B'	CAT	0	8,40 ± 0,45	a
	CAT	12	6,01 ± 0,01	bc

<sup>a</sup>TPC= Contenuto in polifenoli totali (mg GAE/100 g p.f.); <sup>b</sup>CAT= Contenuto in antociani totali (mg di cianidina 3-glucoside/100 g p.f.)

Per ogni campione e per ogni tempo di analisi sono riportati i valori medi di 3 determinazioni e il relativo errore standard. A lettere diverse, per colonna per ciascun parametro, corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.

Una seconda determinazione dei polifenoli e antociani totali dei semilavorati è stata condotta utilizzando come estraente una soluzione di metanolo in HCl (98:2, v/v). In tabella 52 viene riportato il contenuto in polifenoli e antociani totali estratti con la soluzione acquosa in HCl e con la soluzione di metanolo in HCl per i semilavorati tal quale (TQ) e stabilizzati ('A' e 'B').

**Tabella 52 Valori medi dei composti bio-attivi per il semilavorato tal quale (TQ) e per i semilavorati stabilizzati ('A' e 'B') (estrazioni H<sub>2</sub>O/HCl e MeOH/HCl)**

Semilavorato	estrazione	TPC <sup>a</sup>	CAT <sup>b</sup>
TQ	H <sub>2</sub> O/HCl	103,81 ± 31,57 f	6,57 ± 1,47 f
	MeOH/HCl	208,77 ± 64,05 b	10,12 ± 1,12 a
Stabilizzato 'A'	H <sub>2</sub> O/HCl	149,42 ± 25,70 d	7,66 ± 1,28 d
	MeOH/HCl	222,88 ± 45,92 a	9,73 ± 0,63 b
Stabilizzato 'B'	H <sub>2</sub> O/HCl	134,70 ± 40,33 e	7,50 ± 1,01 e
	MeOH/HCl	200,60 ± 46,80 c	9,61 ± 0,75 c

<sup>a</sup>TPC= Contenuto in polifenoli totali (mg GAE/100 g p.f.); <sup>b</sup>CAT= Contenuto in antociani totali (mg di cianidina 3-glucoside/100 g p.f.)

Per ogni campione e per tipologia di estrazione sono riportati i valori medi di 3 determinazioni e il relativo errore standard. A lettere diverse, per ogni campione, corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey.

L'estrazione in metanolo ha permesso di differenziare i contenuti in composti bio-attivi dei campioni in modo statisticamente significativo rispetto all'estrazione acquosa. Il contenuto in polifenoli totali estratto in MeOH/HCl ha mostrato valori significativamente superiori per il semilavorato 'A' mentre per il contenuto in antociani estratti in soluzione di metanolo sono stati riscontrati valori superiori nel semilavorato tal quale e nel semilavorato 'A'. Rispetto all'estrazione acquosa, il campione tal quale ha mostrato valori statisticamente superiori per i composti bio-attivi estratti in metanolo. Considerando la complessità della matrice originaria e la specificità del processo tecnologico di ottenimento del semilavorato, il mezzo di estrazione impiegato ha inciso nella rilevazione dei composti nutraceutici caratterizzanti il semilavorato.

I risultati nutraceutici ottenuti per il semilavorato sono in parte confrontabili con quelli derivanti da matrici vegetali simili tenendo conto delle differenze riguardanti le metodologie di estrazione e la peculiarità del prodotto analizzato. La stabilizzazione termica non ha modificato i contenuti nutraceutici dei campioni, in particolare ha determinato differenziazioni più contenute per i polifenoli totali dopo congelamento confermando come i pretrattamenti subiti dalle matrici vegetali durante i processi di trasformazione (*blanching*, osmodisidratazione) permettano di preservare i danni determinati da successivi processi come quelli termici di risanamento o quelli deputati alle basse temperature adottate durante la conservazione (Lo Scalzo *et al.*, 2006).

L'estrazione con metanolo ha permesso di rilevare un più elevato tenore in polifenoli e antociani totali nel semilavorato a base di petali di rosa, consentendone la comparazione con prodotti trasformati di tipo convenzionale potenzialmente ricchi in antiossidanti, come le marmellate preparate con varietà di fragole particolarmente idonee alla trasformazione industriale e ricche in pigmenti antocianici (Wicklund *et al.*, 2005) e succhi di agrumi (Lo Scalzo *et al.*, 2004).

## **5.8 FORMULAZIONE PER YOGURT BASE COMMERCIALE**

I lotti stabilizzati con i protocolli 'A' e 'B' e relativi ad una seconda tesi di semilavorato (volume complessivo 400 ml) sono stati utilizzati per le prove di formulazione in yogurt commerciale bianco intero (yogurt base). In figura 54 vengono riportate le immagini relative agli *step* seguiti per la formulazione dello yogurt. Nelle immagini presentate vengono visualizzati sia gli yogurt addizionati del 15% dei semilavorati stabilizzati 'A' e 'B' sia lo yogurt bianco.



a) Aggiunta del semilavorato (15%, v/v) allo yogurt base



b) Parziale miscelazione del semilavorato nello yogurt base



c) Completa miscelazione del semilavorato nello yogurt base

**Figura 54 Step a), b), c) relativi alla fase di formulazione dello yogurt bianco commerciale**

### 5.8.1 Valutazioni chimico-fisiche

Al momento della formulazione, sul campione di yogurt base e sugli yogurt rispettivamente addizionati del 15% dei semilavorati trattati 'B' ed 'A', sono stati rilevati i seguenti parametri chimico-fisici: pH, acidità titolabile (TA), contenuto in solidi solubili (SSC), attività dell'acqua (Aw) e viscosità( $\eta$ ). In tabella 53 sono riportati i valori medi dei parametri qualitativi tecnologici rilevati sui campioni di yogurt.

**Tabella 53 Parametri fisico-chimici degli yogurt base e degli yogurt formulati 'A' e 'B'**

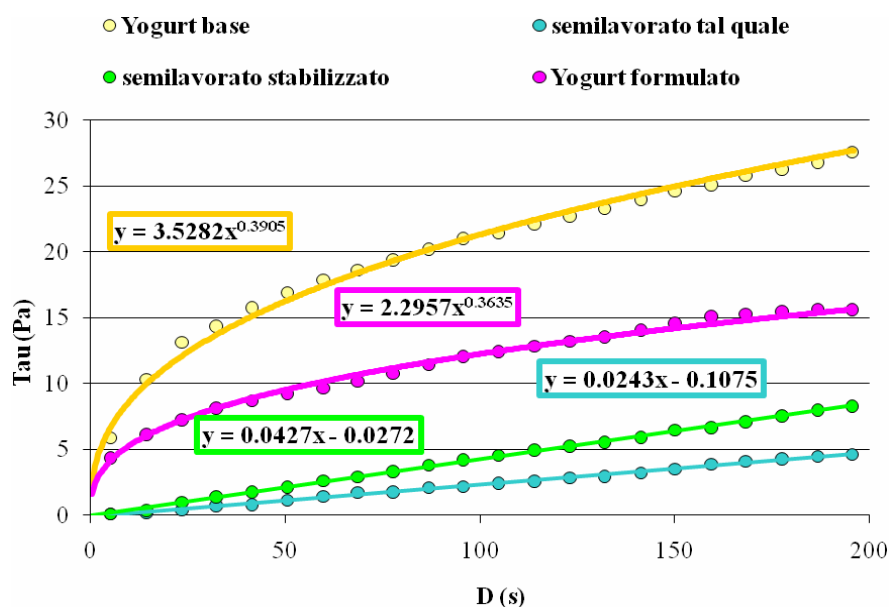
Campione	pH		TA <sup>a</sup>		SSC <sup>b</sup>		Aw <sup>c</sup>	
			°SH		°Bx <sup>b</sup>			
Yogurt base	4,21 ± 0,04	a	47,62 ± 1,06	a	8,70 ± 0,06	c	0,99 ± 0,001	a
Yogurt 'A'	4,13 ± 0,01	a	47,66 ± 0,01	a	13,41 ± 0,35	b	0,98 ± 0,001	a
Yogurt 'B'	4,16 ± 0,01	a	46,78 ± 0,46	a	14,90 ± 0,02	a	0,98 ± 0,001	a

<sup>a</sup>TA=acidità titolabile °SH (Soxhlet-Henkel); <sup>b</sup>SSC=contenuto in solidi solubili, <sup>b</sup>Bx=grado rifrattometrico; <sup>c</sup>Aw=attività dell'acqua; Yogurt 'A'=yogurt con 15% di semilavorato pastorizzato con metodo 'A'; Yogurt 'B'=yogurt con 15% di semilavorato pastorizzato con metodo 'B'

Valori medi di 2 determinazioni e relativo errore standard. A lettere diverse, per colonna, corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey

Lo yogurt base differisce dagli yogurt formulati per il contenuto in solidi solubili; gli yogurt addizionati del 15% del preparato ai petali di rosa hanno infatti mostrato un contenuto significativamente più elevato e confrontabile con il valore SSC riscontrato per lo yogurt addizionato del 7% di un preparato a base di frutti di rosa canina (Tarakci e Kucukoner, 2003). Considerando che nello yogurt base è stato osservato un contenuto SSC medio-basso, l'effetto della formulazione è risultato significativo per l'aumento di questo parametro. Per quanto riguarda i parametri pH e acidità titolabile, i valori rilevati per lo yogurt base e gli yogurt formulati con il semilavorato ai petali di rosa sono risultati confrontabili con quelli comunemente riscontrabili negli yogurt bianchi e negli yogurt con frutta (Zainoldin e Baba, 2009). L'influenza della formulazione non è risultata significativa per questi parametri. La formulazione, inoltre, non ha determinato differenze significative anche per quanto riguarda il parametro Aw.

Relativamente alla misura della viscosità ( $\eta$ ), tale parametro è stato rilevato sia per lo yogurt base sia per lo yogurt formulato con il 15% del semilavorato stabilizzato con metodo 'A'. In figura 55 sono riportate le "curve di flusso" ottenute dai valori dello sforzo di taglio ( $\tau$ ) in funzione della velocità di scorrimento o gradiente (D) sia per i semilavorati tal quale e stabilizzato sia per gli yogurt. Il comportamento reologico dello yogurt differisce da quello dei semilavorati; gli yogurt hanno manifestato un comportamento di tipo pseudoplastico descritto dalla linea di tendenza del tipo potenza relativa ai campioni di yogurt base e yogurt formulato.



**Figura 55** Curve di flusso relative ai comportamenti reologici dei semilavorati (tal quale e pastorizzato) e degli yogurt base e formulato con semilavorato stabilizzato

In tabella 54 sono riportati i valori di viscosità ( $\eta = \tau/D$ , mPa.s) registrati per i diversi campioni in corrispondenza del valore massimo del gradiente  $D$  ( $195\text{s}^{-1}$ ). La formulazione dello yogurt con il semilavorato ai petali di rosa ha determinato una diminuzione della viscosità del prodotto in virtù del differente comportamento reologico del semilavorato (fluidi) rispetto a quello dello yogurt (coagulo).

**Tabella 54** Valori di viscosità ( $\eta$ ) registrati in corrispondenza del valore massimo del gradiente  $D$  per i semilavorati (tal quale e stabilizzato) e gli yogurt (base e formulato)

Campione	$\eta$ (mPa.s)
Semilavorato tal quale	$23,5 \pm 2,5$
Semilavorato stabilizzato 'A'	$42,3 \pm 3,8$
Yogurt base	$140,9 \pm 5,0$
Yogurt e 15% di semilavorato stabilizzato 'A'	$79,8 \pm 4,3$

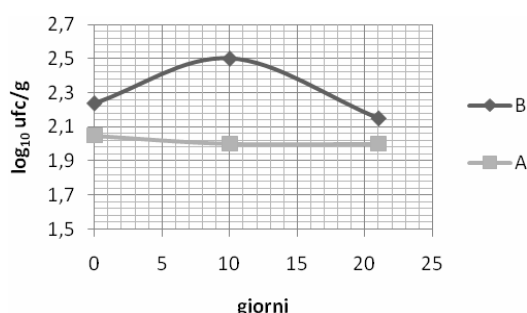
*Valori medi di 2 determinazioni e relativo errore standard*

### **5.8.2 Analisi microbiologiche durante la shelf-life**

I medesimi lotti stabilizzati con i protocolli 'A' e 'B' utilizzati per le prove di formulazione, sono stati analizzati da un punto di vista microbiologico prima dell'aggiunta allo yogurt base. Come per le analisi microbiologiche relative alla tesi precedente (paragrafo 5.6), sono state effettuate le conte di coliformi, *E. coli*, enterococchi, *Pseudomonas spp* e degli eumiceti. Inoltre è stato valutato lo sviluppo di batteri sporigeni aerobi. I valori delle conte microbiche, ove  $> 100$  cfu/g sono stati trasformati in  $\log_{10}$  e i risultati sono stati sottoposti all'analisi della varianza con procedura ANOVA e test di Tukey per la separazione delle medie.

Anche per questa seconda tesi di semilavorato le conte sono risultate <10 cfu/g per coliformi, *E. coli* ed enterococchi e <100 cfu/g per *Pseudomonas sp.* per i semilavorati stabilizzati 'A' e 'B' durante il periodo di *shelf-life*.

In questa seconda tesi, le cariche degli eumiceti (muffe e lieviti) sono risultate < 100 cfu/g per entrambi i semilavorati trattati con il calore mentre è stata rilevata una maggiore concentrazione di batteri sporigeni aerobi. I valori medi dei batteri sporigeni sono risultati superiori nel semilavorato trattato con metodo 'B' ma non significativamente diversi da quelli rilevati per il semilavorato trattato con metodo 'A'. Questo ulteriore dato potrebbe far ritenere che la contaminazione da spore è indipendente dalla temperatura adottata per il processo termico; in ogni caso, lo sviluppo è rimasto moderato durante la conservazione per entrambi i semilavorati (figura 56).



**Figura 56 Andamento dello sviluppo di batteri sporigeni aerobi nei semilavorati stabilizzati**

Sul campione di yogurt base prima dell'aggiunta e sugli yogurt addizionati del 15% di semilavorato sono stati effettuati i seguenti rilievi microbiologici:

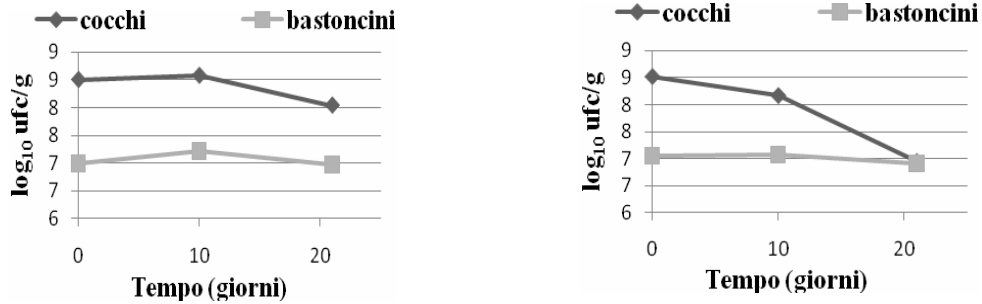
- coliformi, *E. coli*, enterococchi
- *Pseudomonas spp* ed eumiceti
- batteri sporigeni aerobi
- batteri lattici (cocchi e bastoncini) veicolati dallo yogurt.

Per lo yogurt base e per gli yogurt addizionati rispettivamente dei semilavorati 'A' e 'B', le conte sono risultate < 10 cfu/g per coliformi, *E. coli* ed enterococchi e <100 cfu/g per *Pseudomonas sp* ed eumiceti. Nella tabella 55 sono riportati i valori delle conte dei batteri sporigeni aerobi rilevate negli yogurt addizionati dei semilavorati trattati 'B' e 'A' e nei relativi yogurt bianchi. Lo sviluppo delle spore è risultato trascurabile in tutti i campioni.

**Tabella 55 Rilievo dei batteri sporigeni (log<sub>10</sub> ufc/g) nello yogurt base e negli yogurt formulati durante la *shelf-life* a 4°C (valori medi di due determinazioni per campione)**

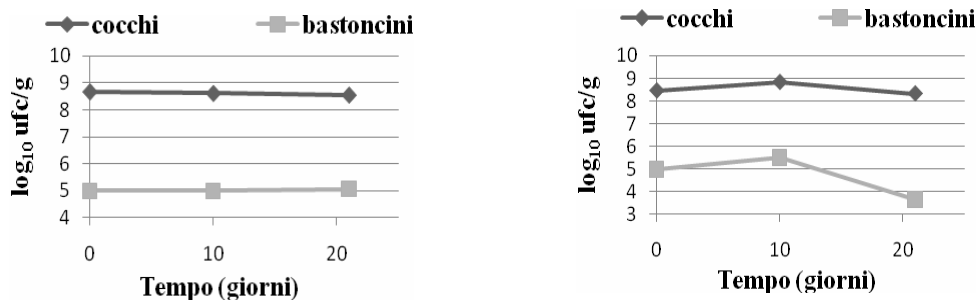
Campioni	T0	T10	T21
Yogurt base	<2	2,00	<2
Yogurt con semilavorato 'B'	2,00	2,00	2,15
Yogurt base	2,30	<2	<2
Yogurt con semilavorato 'A'	<2	<2	<2

Nella figura 57 sono riportati gli andamenti relativi alla vitalità dei batteri lattici (cocchi e bastoncini) durante la conservazione per lo yogurt base e per quello addizionato del semilavorato trattato con metodo 'B'. Nello yogurt base, le cariche dei lattococchi sono risultate più elevate rispetto a quelle dei lattococchi a forma bastoncina. Inoltre l'attività di questi ultimi è rimasta costante mentre per i cocchi, dopo 21 giorni di conservazione, è stata registrata una diminuzione significativa di vitalità. Il medesimo andamento è stato riscontrato per lo yogurt addizionato del semilavorato stabilizzato con metodo 'B'.



**Figura 57 Vitalità di cocchi e bastoncini nello yogurt base (a sinistra) e nello yogurt formulato con il 15% del semilavorato trattato con metodo 'B' (a destra)**

Nella figura 58 sono riportati gli andamenti della vitalità dei batteri lattici (cocchi e bastoncini) nel corso della *shelf-life* a 4°C per lo yogurt base e per lo yogurt addizionato del semilavorato trattato con metodo 'A'. Anche in questa seconda valutazione, il lotto di yogurt base utilizzato ha mostrato cariche di latte- cocchi più elevate rispetto a quelle dei lattobacilli. Nel corso della *shelf-life* l'attività dei cocchi è rimasta costante sia per lo yogurt base sia per lo yogurt addizionato mentre per i lattobacilli, dopo 21 giorni di conservazione, è stata registrata una diminuzione significativa di vitalità in entrambi i campioni.



**Figura 58 Vitalità di cocchi e bastoncini nello yogurt bianco (a sinistra) e nello yogurt formulato con il 15% del semilavorato trattato con metodo 'A' (a destra)**

## 5.9 ANALISI SENSORIALE DELLO YOGURT FORMULATO

Le analisi sensoriali dei campioni di yogurt formulato con il 15% v/v del semilavorato 'A', hanno fornito utili indicazioni circa l'intensità di alcuni parametri caratteristici del nuovo prodotto. In figura 59 è riportata la scheda utilizzata dal *panel* di assaggiatori addestrati per poter esprimere 'oggettivamente' l'intensità dei parametri sensoriali percepiti lungo una scala non strutturata secondo le specifiche riportate nel sottoparagrafo 3.12.3 del capitolo 3. Lo yogurt formulato è stato testato a 0, 3, 7 giorni di *shel-life* e i punteggi medi attribuiti dal *panel* ai vari parametri sensoriali sono presentati in tabella 56.

P.C. 006:1 O.N. 0005 PAGE 002/002

Assaggiare i seguenti prodotti e valutare le caratteristiche elencate ponendo un segno lungo la scala tra gli estremi indicati. Il campione contrassegnato con X non va valutato.

375

Parametro	Scala	Valutazione
Odore	scarsa -> elevata	~1/4
Qualità	sgradevole -> gradevole	~1/2
Colore	scarsa -> elevata	~1/2
Qualità	non invitante -> invitante	~1/3
Dolcezza	scarsa -> elevata	~3/4
Qualità	sgradevole -> gradevole	~3/4
Acidità	scarsa -> elevata	~1/3
Qualità	sgradevole -> gradevole	~3/4
Aroma	scarsa -> elevata	~3/4
Qualità	sgradevole -> gradevole	~3/4
Consistenza	scarsa -> elevata	~1/2
Qualità	sgradevole -> gradevole	~3/4
Granulosità	scarsa -> elevata	~1/3
Qualità	sgradevole -> gradevole	~3/4
Giudizio finale	inaccettabile -> accettabile	~3/4
Commenti		

Figura 59 Scheda-tipo utilizzata dal *panel* di assaggiatori per la valutazione dello yogurt formulato con il 15% v/v di semilavorato ai petali di rosa



**Tabella 56** Punteggi medi relativi all'intensità dei parametri sensoriali percepiti nello yogurt formulato durante la breve *shelf-life* di 7 giorni

	odore	colore	dolcezza	acidità	aroma	consistenza	granulosità
T0	3,1 b	3,1 a	5,7 a	3,0 a	6,3 a	3,1 a	1,8 a
T3	3,4 ab	3,6 a	5,7 a	3,3 a	6,2 a	3,0 a	1,4 a
T7	4,6 a	3,6 a	5,6 a	3,3 a	6,4 a	3,1 a	1,3 a

Valori medi di due determinazioni per assaggiatore e per tempo di *shelf-life*. A lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey

In tabella 57 sono riportati i punteggi d'intensità relativi alla qualità dei parametri sensoriali giudicati.

**Tabella 57** Punteggi medi d'intensità relativi alla qualità dei parametri sensoriali dello yogurt formulato durante la breve *shelf-life* di 7 giorni

	odore	colore	dolcezza	acidità	aroma	consistenza	granulosità
T0	5,3 a	4,9 a	5,7 a	5,5 a	6,1 a	5,4 a	6,3 a
T3	5,2 a	4,9 a	6,1 a	5,6 a	6,0 a	5,2 a	6,2 a
T7	5,4 a	5,4 a	6,3 a	5,7 a	6,6 a	5,3 a	6,6 a

Valori medi di due determinazioni per assaggiatore e per tempo di *shelf-life*. Le lettere corrispondono alla significatività determinata per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey

Considerando i valori medi dei punteggi d'intensità attribuiti ai vari parametri sensoriali (tabella 56), i campioni di yogurt formulato non sono stati differenziati durante la breve *shelf-life*, per i parametri considerati, eccetto per l'odore, giudicato più intenso dopo 7 giorni di conservazione. Gli assaggiatori hanno espresso giudizi d'intensità positivi per la dolcezza e l'aroma, in quanto, per tali parametri, si sono posizionati nella parte destra della scala d'intensità. Per gli altri parametri, il *panel* ha espresso punteggi inferiori alla media della scala; tali punteggi sono tuttavia riferiti a giudizi qualitativi positivi (tabella 57) (giudizi qualitativi positivi, infatti, sono stati assegnati a punteggi d'intensità medio-bassi come nel caso dell'acidità e della granulosità). E' bene ricordare che nei test d'assaggio di nuovi prodotti, il *panel* di assaggiatori, non possedendo una memoria storica di tipo sensoriale per "quei" prodotti, tende a posizionarsi nella zona media della scala d'intensità, producendo uniformità nei giudizi (Pagliarini, 2002).

## **5.10 DISCUSSIONE FINALE DEI RISULTATI**

La scelta delle cultivar di rosa da destinare alla trasformazione in semilavorato è stata condotta soprattutto grazie all'individuazione di quei marcatori chimici utili per poter giudicare in modo obiettivo la qualità compositiva della materia prima. Grande rilievo è stato dato alla composizione nutraceutica delle cultivar prescelte (composti bio-attivi e test antiossidanti) proprio al fine di realizzare un nuovo ingrediente caratterizzato da una notevole valenza alimentare. Considerando la modalità di estrazione con solvente acquoso dei composti nutraceutici, le 5 cultivar si sono distinte per un elevato contenuto in polifenoli totali (compreso tra 36,70 mg GAE/ g p.s. della cultivar *Chianti* e 19,34 mg GAE/ g p.s. della cultivar *Eglantyne*®) e un contenuto in pigmenti antocianici strettamente dipendente dal tipo di colorazione dei petali (Vinokur *et al.*, 2006). Le rose inglesi hanno mostrato un contenuto medio-basso in antociani (0,18 mg di cianidina 3-glucoside/g p.s.); tra le rose antiche pigmentate, *Roseraie de l'Hay* si è distinta, invece, per il contenuto più elevato (17,52 mg di cianidina 3-glucoside/g p.s.). L'estrazione in metanolo dei composti bio-attivi ha confermato l'elevato tenore in composti polifenolici e antocianici della cultivar *Chianti*. Per quanto riguarda l'attività antiossidante espressa come potere *scavenger* nei confronti dei radicali di sintesi DPPH e sale di Fremy, le 5 cultivar di rosa hanno mostrato un'apprezzabile azione, confermata, in parte, da dati di letteratura (Youkey e Yonghong, 2007) con valori compresi tra 9,61 e 33,70 mg GAE/g p.s. contro il radicale DPPH e tra 10,07 e 20,36 mg GAE/g p.s. contro il radicale sale di Fremy.

Il semilavorato è stato ottenuto grazie all'adozione di una specifica relazione proporzionale quantitativa dei petali di rosa delle diverse 5 cultivar e con un impiego complessivo del 15% di materia prima selezionata in rapporto agli altri coadiuvanti quali saccarosio, acqua e acidificante naturale.

Il pre-trattamento chimico (aggiunta di zucchero e acidificazione) e il successivo trattamento termico della miscela secondo i 2 protocolli di tempo e temperatura hanno positivamente interferito e, quindi, permesso di ottenere un semilavorato stabile sia dal punto di vista chimico-fisico sia dal punto di vista microbiologico. Per quanto riguarda l'acidificazione della miscela a base di petali di rosa, condotta per diminuire il pH naturale della matrice (3 contro 5), dati di letteratura confermano come sia in grado di produrre effetti positivi sinergici nei processi di stabilizzazione di matrici vegetali caratterizzate da pH sub-acido o neutro (Munyaka *et al.*, 2010). I trattamenti con soluzioni osmotiche a differente concentrazione nei processi di osmodisidratazione, sono anch'essi particolarmente indicati nel preservare le caratteristiche chimiche e nel prolungare la *shelf-life* di matrici frutticole e orticole sottoposte a trattamenti tecnologici (Dermesonlouoglou *et al.*, 2006; Torreggiani e Bertolo, 2004). La determinazione dei parametri tecnologici sul semilavorato a base di petali di rosa al momento della preparazione (pH e acidità, contenuto in solidi solubili, attività dell'acqua, sostanza secca) e il rilievo delle coordinate cromatiche durante la conservazione, hanno permesso di caratterizzare il nuovo ingrediente e di verificare la riproducibilità dei diversi lotti di produzione.

I trattamenti chimici condotti per la preparazione della miscela-base hanno nel contempo influito positivamente nel rendere il preparato poco favorevole allo sviluppo dei microrganismi patogeni. Infatti, anche nel campione non trattato termicamente, tali agenti di contaminazione non si sono sviluppati. La stabilizzazione termica con la messa a punto dei 2 protocolli di

tempo/temperatura, ha permesso di controllare, invece, i fattori alterativi (muffe e lieviti). Entrambi i protocolli adottati hanno consentito di contenere lo sviluppo degli eumiceti e le cariche rilevate sono risultate nell'ordine di  $10^2$  nei campioni trattati con il calore e di  $10^5$  nel campione tal quale. Per quanto riguarda i batteri sporigeni, lo sviluppo è risultato trascurabile, specie nel campione stabilizzato con tempi e temperatura maggiori. Quindi, sia la procedura di preparazione sia gli accorgimenti tecnologici adottati dopo la stabilizzazione termica (presterilizzazione dei contenitori agli UV, conservazione in contenitori ermetici), hanno consentito di ottenere un ingrediente con caratteristiche microbiologiche adeguate nel corso dell'intero periodo di *shelf-life* considerato (21 giorni).

La scelta di impiegare un ridotto quantitativo di materia prima per la realizzazione dell'ingrediente, ha avuto un effetto valutabile per il contenuto nutraceutico del semilavorato, confermato dal calcolo delle perdite dovute al processo di trasformazione per la formulazione della miscela-base.

Relativamente al contenuto in composti antocianici del semilavorato tal quale, la perdita media stimata dell'ordine del 58%, risulta relazionata in gran parte all'effetto della diluizione, operata nel corso dei pre-trattamenti per la trasformazione dei petali in miscela-base. Infatti, essendo il semilavorato costituito dal 15% di petali, il contenuto degli antociani totali (CAT) rilevato nella miscela-base, se attribuito al 100% di materia prima (petali), va corretto secondo l'equazione (15):

$$CAT_{(mg/100\text{ g di petali})} = CAT_{(mg/100\text{ g semilavorato})} \times 6.7 \quad (15)$$

Il valore medio del contenuto in antociani totali estratto in solvente acquoso dal semilavorato tal quale, corretto secondo l'equazione (15) e pari a 56 mg di cianidina 3-glucoside/100g di petali, è risultato perfettamente confrontabile con quello rilevato in varie preparazioni a base di "frutti rossi" originariamente ricchi in pigmenti antiossidanti come le more (Plessi *et al.*, 2007) o le fragole (Bacchella *et al.*, 2008). Nell'ambito dei frutti di fragola, la varietà *Senga Sengana*, nota anche per l'impiego in formulazioni di tipo industriale di prodotti come lo yogurt (Leroy A., 2004), insieme ad altre varietà particolarmente indicate per la realizzazione di confetture (Wicklund *et al.*, 2005), è risultata ricca in composti antocianici nell'ordine di 40 mg/100 g di frutta. E' plausibile che la quota ritenuta, dei pigmenti antocianici nel semilavorato a base di petali di rosa, possa essere deputata al trattamento condotto con saccarosio; tale zucchero, infatti, è noto per la sua attività protettiva nei confronti dei pigmenti antiossidanti (Wrolstad *et al.*, 1990). Per quanto riguarda, invece, il contenuto in polifenoli totali nel semilavorato, rilevato al momento della preparazione, non sono state registrate perdite dovute alla realizzazione della miscela-base e ciò a conferma della loro più elevata stabilità durante le trasformazioni tecnologiche.

Relativamente al trattamento con il calore del semilavorato, considerando i valori medi rilevati per i composti polifenolici, normalizzati al contenuto di sostanza secca del campione non trattato, i campioni trattati termicamente 'A' e 'B' hanno manifestato contenuti (119 mg GAE/ 100 di p.f nel campione 'A' e 129 mg GAE/ 100 di p.f nel campione 'B') significativamente superiori a quelli rilevati il campione non stabilizzato (104 mg GAE/ 100 di p.f.). Arbitraria ma pratica sembra essere la comparazione del contenuto polifenolico del semilavorato 'B' trattato a 85° C, al momento della stabilizzazione termica (11,7 mg GAE/g di

petali), con quello rilevato dopo 5 minuti di infusione (12,7 mg GAE/g di petali) per la nota bevanda (karkadè) a base di petali di ibisco il cui consumo regolare sembra essere associato ad un effetto protettivo contro i radicali liberi (Prenesti *et al.*, 2007). Anche per i composti antocianici, la stabilità è risultata significativa per il campione 'B' trattato a 85°C rispetto al campione 'A' trattato a 98°C e al campione tal quale. Le estrazioni in solvente metanolico dei composti d'interesse dai campioni stabilizzati con il calore, hanno mostrato valori significativamente superiori solo per il contenuto in polifenoli. Quindi le proprietà nutraceutiche dei semilavorati trattati termicamente sembrano dipendere dal protocollo tempi/temperatura adottato e dalla modalità di determinazione delle proprietà antiossidanti e ciò è confermato da studi come quelli riguardanti il contenuto in antociani e le relative proprietà antiossidanti, di succhi commerciali di arance rosse pastorizzati e sterilizzati (Fiore *et al.*, 2005; Lo Scalzo *et al.*, 2004). Altri lavori scientifici hanno dimostrato come la stabilità del *pool* di composti polifenolici dopo trattamento termico sia relazionata alla neoformazione, deputata allo stress termico stesso, di sostanze polifenoliche potenzialmente antiossidanti. I trattamenti termici subiti da diversi substrati vegetali, indurrebbero processi idrolitici a carico dei polifenoli coniugati con formazione di polifenoli semplici o intermedi di reazione e relativo aumento della concentrazione totale e dell'attività antiossidante (Piva *et al.*, 2008; Lo Scalzo *et al.*, 2010). Alcuni autori hanno anche dimostrato come l'aumento del tenore in polifenoli in matrici vitivinicole sottoposte a trattamenti tecnologici possa essere attribuito alla migliore estraibilità dei composti fenolici indotta dai trattamenti con il calore (Netzel *et al.*, 2003).

Per quanto riguarda la ritenzione dopo 12 mesi di conservazione a -18°C dei composti antiossidanti caratterizzanti il semilavorato ai petali di rosa, le indagini condotte sui lotti disponibili di materiale, sembrano concordare con la molteplicità degli studi che ascrivono all'azione protettiva di alcuni carboidrati, impiegati per i pretrattamenti chimici di frutta destinata alla trasformazione industriale, un ruolo chiave nel preservare la degradazione dei composti antiossidanti durante il congelamento (Lo Scalzo *et al.*, 2006; Oszmianski *et al.*, 2009). Nel caso specifico dei petali di rosa, lo stoccaggio del materiale raccolto, pre-trattato e stabilizzato termicamente, sembra aver fornito buone indicazioni di conduzione tecnologica per la produzione floricola. Infatti, i semilavorati stabilizzati termicamente hanno mostrato un contenuto in polifenoli totali mediamente superiore rispetto al semilavorato tal quale dopo i 12 mesi di stoccaggio allo stato congelato. Considerate le buone prospettive di questa pratica, sono auspicabili ulteriori conferme mediante analisi di verifica.

La valenza nutraceutica del semilavorato ottenuto, lo ha reso quindi idoneo all'impiego come formulazione per yogurt base commerciale. La scelta del quantitativo adottato per la formulazione, è stata condotta sulla base dei risultati di alcuni preliminari test d'assaggio che hanno decretato la formula del 15% v/v la migliore in termini di valutazione dei parametri sensoriali considerati. Un *panel* di assaggiatori addestrati ha poi valutato l'intensità dei parametri sensoriali caratteristici dello yogurt formulato ottenuto.

La determinazione dei parametri tecnologici oggettivi sui campioni di yogurt commerciale e formulato con semilavorato ai petali di rosa al momento della preparazione (pH e acidità, contenuto in solidi solubili, attività dell'acqua e viscosità), hanno permesso di caratterizzare il nuovo alimento e di evidenziare l'effetto della formulazione riguardo alle caratteristiche originali dello yogurt base. L'aggiunta del semilavorato allo yogurt ha determinato un aumento del contenuto in solidi solubili e una diminuzione della viscosità. La viscosità dei prodotti

lattiero-caseari è a sua volta influenzata dalla concentrazione di grassi, proteine, dal pH e dai trattamenti subiti dal latte durante i processi fermentativi (Park, 2007; Djurdjević *et al.*, 2002). Pertanto i valori di viscosità rilevati per lo yogurt base e per lo yogurt formulato divergono in parte da quelli di prodotti simili per il tipo di yogurt base impiegato e per la specificità della formulazione effettuata. La determinazione dei parametri tecnologici per i campioni di yogurt ha permesso di verificare la riproducibilità dei lotti di produzione anche in virtù delle successive indagini microbiologiche. Durante il periodo di conservazione dei campioni di yogurt per 21 giorni, è stata constatata la mancata crescita dei microrganismi patogeni e dei fattori alterativi (eumiceti). Lo sviluppo di batteri sporigeni è risultato trascurabile per tutti i campioni e inferiore a  $10^2$  nello yogurt addizionato del semilavorato trattato a temperatura maggiore. Per quanto riguarda , invece, la vitalità dei lattococchi e dei lattici a forma bastoncellare, sono state riscontrate diminuzioni della loro vitalità dopo 21 giorni di *shelf-life* sia nei lotti di yogurt base impiegati per le rispettive formulazioni (con semilavorato 'A' e 'B') sia negli yogurt formulati. In particolare, il lotto di yogurt base impiegato per la formulazione con il semilavorato 'A', mostrava a T0 (0 giorni), una carica di lattici bastoncini relativamente bassa ( $5 \log_{10}$  ufc/g); la diminuzione della loro vitalità nel corso della *shelf-life*, non sembra, quindi, attribuita all'effetto della formulazione. La diminuzione dei lattococchi veicolati dallo yogurt dopo 21 giorni di conservazione, è stata verificata per il lotto di yogurt base impiegato per la formulazione con semilavorato 'B'. Le cariche complessive dei lattici rilevate per gli yogurt formulati, sono risultate quelle ammissibili, per legge, nel corso della refrigerazione (Tabasco *et al.*, 2007).

---

***CAPITOLO 6***  
***CONCLUSIONI***

---

Il rapporto tra cibo e salute ha una lunga storia. Nell'antichità, prima della nascita dei farmaci moderni, l'alimentazione (associata alla fitoterapia) era uno dei principali mezzi che il medico aveva a disposizione per curare le malattie. Oggi le moderne conoscenze sul valore nutritivo degli alimenti e sui fattori di rischio, insieme all'adeguata assunzione (qualitativa e quantitativa) di cibo, costituiscono la base per la prevenzione di molte patologie. Negli ultimi anni, con la nascita della nutraceutica, la ricerca scientifica in campo alimentare è sempre più indirizzata allo studio delle proprietà combinate, nutritive e farmaceutiche degli alimenti.

La possibilità di arricchire gli alimenti con ingredienti di particolare interesse nutrizionale e tecnologico rappresenta una nuova opportunità per la quale il mercato mostra un interesse crescente, particolarmente quando l'arricchimento risulta effettuato con modalità naturali.

Nell'ambito dello studio intrapreso sulla realizzazione di un nuovo ingrediente alimentare a base di petali di rosa da utilizzare per la formulazione di yogurt commerciali, si è reso necessario individuare alcuni importanti marcatori chimici (*markers*) per poter giudicare la qualità compositiva della materia prima utilizzata e, successivamente, quella del prodotto finito. Maggiore è il numero dei marcatori saggiati, maggiore è la possibilità di evidenziare e promuovere le proprietà dell'alimento. A tale proposito, per lo studio della qualità dei fiori di rosa di cultivar selezionate e coltivate biologicamente, sono stati valutati i parametri chimico-nutrizionali (contenuto in carboidrati solubili e acidi organici) e i contenuti nutraceutici. Tali contenuti sono stati analizzati sia in termini di singole molecole o di gruppi di composti antiossidanti (vitamina C, contenuto in polifenoli e antociani totali), sia in termini di attività antiradicalica, espressa come potere *scavenger* di una molecola rappresentativa del *pool* antiossidante del substrato vegetale, mediante opportuni saggi (test contro i radicali DPPH e Sale di Fremy).

La possibilità di riconoscere in modo esauriente la qualità della matrice floricola analizzata ha quindi permesso di operare un'opportuna discriminazione della materia prima e nello stesso tempo ha consentito di ottimizzare il processo di trasformazione. Le fasi tecnologiche della trasformazione dei petali di rosa, hanno richiesto un'attenta modulazione delle operazioni, considerando la specificità delle formulazioni di alimenti con ingredienti di particolare interesse nutrizionale come quello studiato.

A tale proposito il controllo della qualità ha previsto indagini approfondite sullo stato di conservazione dell'ingrediente a base di petali (semilavorato) e dell'alimento arricchito (yogurt addizionato del semilavorato) con la verifica dell'applicazione di valide condizioni tecnologiche. Tali condizioni sono state ricercate con l'obiettivo preminente di preservare il più possibile il valore nutraceutico della matrice floricola originaria. A tal fine, si è optato per l'adozione di protocolli di stabilizzazione a *step* (pre-trattamento chimico, trattamento fisico, frigoconservazione) che mantenessero integre le peculiarità chimico-fisiche, intrinseche della matrice. Le fasi a *step* del processo tecnologico sono attualmente le più indicate nel sostituire trattamenti tecnologici fisici più drastici o l'impiego di sostanze chimiche conservanti come gli additivi. Tali sostanze, pur prolungando il periodo di validità dell'alimento, se non impiegate in quantità precise secondo dosi stabilite per legge, potrebbero apportare modifiche indesiderate o alterazioni delle proprietà chimiche dell'alimento con effetti dannosi per la salute dei

consumatori. L'ingrediente a base di petali di rosa, realizzato seguendo il processo tecnologico appositamente modulato, è stato poi monitorato attraverso la determinazione dei parametri chimici di processo dal momento della produzione e nel corso della *shelf-life* secondo una cinetica di controllo fissata in funzione della durata commerciale del prodotto ottenuto. Sia l'ingrediente sia il prodotto formulato sono stati esaminati anche da un punto di vista microbiologico, verificando l'assenza di microrganismi patogeni e monitorando lo sviluppo di eventuali ceppi microbici alterativi durante la conservazione. L'ingrediente è stato dunque valutato in termini nutraceutici con la determinazione dei *markers* biochimici già analizzati per la valutazione della materia prima (polifenoli e antociani totali).

La qualità dei prodotti alimentari è costituita da aspetti diversi e prevede la possibilità di essere controllata non solo con mezzi obiettivi ma anche soggettivi. Mentre le determinazioni analitiche di tipo chimico, chimico-fisico e microbiologico sono misure obiettive, la valutazione sensoriale è un mezzo soggettivo che sta manifestando grande importanza nella definizione del valore di un prodotto alimentare il cui destino sarà quello di nutrire, ma anche di soddisfare il consumatore. A tale proposito, è stato possibile effettuare l'analisi sensoriale del prodotto formulato, in termini quantitativi descrittivi, predisponendo un apposito *panel* di assaggiatori addestrati in grado di esprimere giudizi d'intensità sui parametri sensoriali individuati come caratteristici del prodotto (dolcezza, acidità, aroma, colore, consistenza/granulosità).

Complessivamente, l'insieme delle indagini condotte hanno consentito di normalizzare il protocollo per la realizzazione di un semilavorato di particolare interesse nutrizionale, adatto a matrici lattiero-casearie. E' stata infatti accertata la stabilità microbiologica dell'ingrediente e le indagini sui parametri nutraceutici hanno consentito di comparare il semilavorato realizzato con altre preparazioni da frutta potenzialmente e notoriamente ricche in antiossidanti. Inoltre è stata confermata la validità del semilavorato anche rispetto alle trasformazioni tecnologiche nonostante la criticità del fattore produttivo/agronomico.

Attraverso una visione complessiva dei risultati risulta possibile tracciare un profilo qualitativo che assegna alle matrici fiorali rilevanti possibilità di costituire nuove fonti alimentari. Ciò può essere veicolato e suggerito dapprima tramite il loro impiego come ingrediente alimentare e componente di semilavorato ricco di sostanze nutrizionali. Solo successivamente si può ipotizzare il loro utilizzo come prodotto alimentare adattato alla tipologia di IV gamma o per consumo diretto. Sono in gioco in questo ambito i modelli culturali di riferimento (vecchi e nuovi), l'informazione e l'educazione alimentare dei sottogruppi sociali e l'atteggiamento di apertura o di chiusura del consumatore. In questa ricerca si è tentato di assumere il concetto di fiore come alimento/ingrediente portatore di elementi nutritivi, paragonabili a quelli di classi alimentari noti per la loro elevata valenza.

Un ulteriore obiettivo che potrebbe entrare nel novero degli aspetti innovativi dello studio, considerati però come effetti collaterali, riguarda la filiera produttiva attuale e quella che potrebbe essere proposta come fase innovativa. Per essa si immagina che debba nascere un nuovo modello produttivo dei fiori che richiede inderogabilmente l'adozione delle tecniche in uso per l'agricoltura biologica.



Le attuali modalità di produzione trascurano l'aspetto ambientale e quello di accumulo di fitofarmaci nei distretti produttivi, a favore del controllo strettissimo dell'entomofauna e delle varie potenziali fitopatologie. Ciò si traduce in un moltiplicarsi dei fattori di rischio e di pericolo per la salute umana, non soltanto per gli operatori (vedasi i rischi derivati dal lavoro in serra) ma anche per terreni confinanti con le aree di produzione e le relative falde acquifere.

L'introduzione e l'adozione delle tecniche biologiche per la produzione di fiori eduli può rappresentare quindi un valore nuovo e di indubbio interesse per quelle realtà agricole sensibili ai vantaggi di una diversificazione produttiva dell'agroindustria. Si può dunque realisticamente progettare una filiera innovativa che funzioni da serbatoio di materia prima altamente remunerativa (fiore da coltivazione biologica), suscettibile di multifunzionalità (prodotto per consumo diretto o IV gamma e ingrediente da semilavorato di elevata qualità) e basata su un indirizzo di compatibilità ambientale indubitabile.

---

***CAPITOLO 7***  
***RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI***

---

- Agra Press- Notiziario dei Georgofili – Anno XI, n. 3, 31 marzo **2008**, 4.
- Agudo A., Cabrera L., Amiano P., Ardanaz E., Barricarte A., Berenguer T., Chirlaque M.D., Dorronsoro M., Jakszyn P., Larrañaga N., Martínez C., Navarro C., Quirós J.R., Sández M.J., Tormo M.J., González C.A. **2007**. Fruit and vegetable intake, dietary antioxidant nutrient and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish color of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). *Am J. Clin Nutr*, 85, 6, 1634-1642.
- Amoroso G., Piatti R., Frangi P. **2006**. Valutazione comparativa di rose coprisuolo. *Il Floricoltore*, 3, 34-41.
- Andreoli A., Egidi I. **2008**. Alimentazione e Nutrizione Umana. *Società Editrice Esculapio*.
- Arranz S., Perez-Jiménez J., Saura-Calixto F. **2008**. Antioxidant capacity of walnut (*Junglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter. *European Food Research and Technology*, 227: 425-431.
- Austin D. **2009**. [www.davidaustinroses.com](http://www.davidaustinroses.com)
- Bacchella R., Testoni A., Lo Scalzo R. **2008**. Influence of genetic and environmental factors on chimica profile and antioxidant potential of commercial strawberry (*Fragaria* × *Ananassa*, Duchesne). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, ISSN: 1579-4377.
- Bergamini C., Gruppioni N., Menna V., Romagnoli B. **2005**. Aflatossine in spezie, erbe aromatiche, infusionali e officinali. *Rapporti Istisan*, 42:78-85.
- Block G., Langseth L. **1994**. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technol*, 80-84.
- Brand-Miller J. **2005**. Sucrose : Nutritional, Role, Absorption and metabolism. In: Caballero B.,(Ed). *Encyclopedia of Human Nutrition* (second edition), Elsevier Ltd, 204-211.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. **1995**. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30.
- Brimar H., Avitabile Leva A., Torreggiani D., Cattaneo T.M.P. **2003**. Effect of differently processed fruit preparations on the quality strawberry yogurt. *International Dairy Federation special issue*, ISSN: 1025-8515.
- Cai Y.Z., Xing J., Sun M., Zhan Z.Q., Corke H. **2005**. Phenolic Antioxidants (Hydrolyzable Tannins, Flavonols, and Anthocyanins) Identified by LC-ESIMS and MALDI-QIT-TOF MS from *Rosa chinensis* Flowers. *J. Agric. Food Chem*, 53, 9940-9948.
- Cabras P., Martelli A. **2004**. Chimica degli alimenti: nutrient, alimenti di origine vegetale, alimenti di origine animale, integratori alimentari, bevande, sostanze indesiderabili. Piccin, 18-22, 636, 649-656.
- Calabretto A., Avitabile leva A., Shiva T., Senesi E., Torreggiani D., Mercuri A., De Benedetti L., Maestrelli A. **2004**. Utilizzo alimentare dei fiori recisi. Prime esperienze di trasformazione e conservazione. *Atti VII Giornate Scientifiche S.O.I. – Napoli*.
- Capasso F., De Pasquale R., Grandolini G., Mascolo N. **2000**. Farmacognosia: farmaci naturali, loro preparazioni ed impiego terapeutico. *Springer*, 460.
- Caramia G., Frega N., Mozzon M., Malavolta M., Cocchi M., Gagliardini R., Ruffini E. **2001**. Aspetti nutrizionali e condizioni clinico-patologiche: attualità e possibilità terapeutiche. *Relazione XVIII° Congresso Internazionale-Bambino: Progetto Salute. Atti Bambino: progetto Salute*, 278-297.
- Carratù B., Sanzini E. **2005**. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Annali Istituto Superiore di Sanità, Roma*, 41, 1, 7-16.
- Cattaneo T.M.P., Maraboli A., Avitabile Leva A., Torreggiani D. **2002**. Dehydrofreezing in the production of strawberry ingredients: influence on the quality characteristics of fruit yoghurt. *ISHS Acta Horticulturae: IV International Strawberry Symposium*, 567, 791-794.
- Cattaneo T.M.P., Maraboldi A., Avitabile Leva A., Torreggiani D. **2002**. Improvement of Strawberry Ingredients Using Vacuum Infusion: Influence on the quality characteristics of strawberry yogurt. Proceeding IV INTERNATIONAL Strawberry Simposium, July 2000, Tampere, Finland. *Acta Horticulturae*, 567, 787-789.
- Colaric M., Stampar F., Solar A., Hudina M. **2006**. Influence of branch bending on sugar, organic acid and phenolic content in fruits of “Williams” pears (*Pyrus communis* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2463-2467.
- Corea, impiego dei fiori in cucina. [www.crea.it/fiori\\_a\\_colazione.html](http://www.crea.it/fiori_a_colazione.html).

- Cossu M., Juliano C., Pisu R., Alamanni M., C. **2009**. Effects of enrichment with polyphenolic extracts from Sardinian plants on physico-chemical, antioxidant and microbiological properties of yogurt. *Italian Journal of Food Science*, 21, 4, 447-459.
- Davey M.W., Dekempeneer E., Keulemans J. **2003**. Rocked-powered high performance liquid chromatographic analysis of plant ascorbate and glutathione. *Analytical Biochemistry*, 316, 74-81.
- Dayisoylu K.S., Duman A.D., Gezgin Y., Alma H. **2005**. Rose Hips in Yoghurt Manufacturing. *Acta Hort*, 690, 285-288.
- Dermesonlouoglou E.K., Taoukis P.S. **2006**. Osmodehydrofreezing of sensitive fruit and vegetables: effect on quality characteristics and shelf life. *Food Chemistry and Technology*, 1901-1909.
- Djordjević J.D., Maćej O., Jovanović S. **2002**. Viscosity of set-style yogurt as influenced by heat treatment of milk and added demineralized whey powder. *Journal of Agricultural Sciences*, 47, 1, 45-56.
- Dolara P. **1997**. Tossicologia: generale e ambientale, Piccin.
- Environmental Protection Agency. **2010**. [www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/arsenic.html](http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/arsenic.html).
- Ercisli S. **2007**. Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp) species. *Food Chemistry*, 104, 1379-1384.
- FAO/WHO. **2001**. Expert Consultation Evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live active lactic bacteria. Cordoba, Argentina.
- Fellows P. **1988**. *Food Processing Technology*, Ellis Horwood, Chichester
- Ferracane R., Pellegrini N., Visconti A. Graziani G., Chiavaro E., Miglio C., Fogliano V. **2008**. Effects of Different Cooking Methods on Antioxidant Profile, Antioxidant Capacity and Physical Characteristics of Artichoke. *J. Agric. Food Chem*, 56, 8601-8608.
- Fiore A., La Fauci L., Cervellati R., Guerra M.C., Speroni E., Costa S., Galvano G., De Lorenzo A., Bacchelli V., Fogliano V., Galvano F. **2005**. Antioxidant activity of pasteurized and sterile commercial red orange juices. *Mol. Nutr. Food Res*, 49, 1129-1135.
- Friedman H., Vinokur Y., Rot I., Rodov V., Goldman G., Resnick N., Hagiladi A., Umiel N. **2005**. *Tropaeolum majus* L. as edible flowers: growth and postharvest handling. *American Society for Horticultural Science*, 19, 1, 3-8.
- Galli C.L., Corsini E., Marinovich M. **2004**. Tossicologia, Piccin, 87, 356, 369, 289-303.
- Gawron-Gzella A., Dudek-Makuch M. **2007**. The rose-the source of vitamins and other biologically active compounds. *XII Międzynarodowy Sejmik Zielarski*, 53, 2, 141-142.
- Gazzetta Ufficiale. Decreto ministeriale n. 542 12 gennaio **1993**, n. 8.
- Gazzetta Ufficiale. Decreto Ministeriale 14 dicembre **2004**, n. 292.
- Gazzetta Ufficiale. Regolamento CEE n. 466/2001 16 marzo **2001**, n. 77.
- Gazzetta Ufficiale UE. Regolamento CE n. 258/97 14 febbraio **1997**, n. 43.
- Gentile Abbattista I., Cignetti A. **1987**. Fitofarmaci. *Caratteristiche e meccanismi d'azione*, Piccin.
- Giangiacomo R., Toreggiani D., Erba M.L., Messina G. **1994**. Use of osmodehydrofrozen fruit cubes in yogurt. *Italian Journal of Food Science*, 3, 345-349.
- Giannotti A., Sacchetti G., Guerzoni M.E., Dalla Rosa M. **2001**. Microbial aspects on short-time osmotic treatment of kiwifruit. *Journal of Food Engineering*, 49, 265-270.
- Glinnsmann W.H., Irausquin H., Park Y. **1986**. Evaluation of Health Aspect of Sugar Contained in Carbohydrate Sweeteners. Report of the Sugar Task Force. Washington: U.S. Food and Drug Administration.
- Gomes Maganha E., Da Costa Halmenschlager R., Moreira R.R., Pegas H. J.A., De Paule Ramos A.L.L., Saffi J. **2010**. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. *Food Chemistry*, 118, 1, 1-10.
- Hasler C.M. **2005**. Regulation of functional food and nutraceuticals: a global perspective. *Institute of Food Technologists Series, Wiley-Blackwell*, vol.5.
- Helsper J.P.F.G., de Vos C.H., Paul Keiser L.C., Schapendonk A.H.C.M. **2003**. Response of selected antioxidants and pigments in tissues of *Rosa hybrida* and *Fuchsia hybrida* to supplemental UV-A exposure. *Physiologia Plantarum*, 117, 171-178.
- Hrelia S., Leoncini E., Angeloni C. **2009**. Piante per alimenti funzionali e probiotici. In: Ranalli P., (Ed.). *Le piante industriali per una agricoltura multifunzionale*. Avenue media, Milano-Bologna, 39-55.
- Hudina M., Stampar F. **2006**. Influence of frost damage on the sugars and organic acids contents in apple and pear flowers. *European Journal for Horticultural Science*, 71, 4, 161-164.

- Ichimura K., Koata K., Koketsu M., Yamauchi Y., Yamaguchi K., Suto K. **1997**. Identification of methyl B-glucopyranoside and xylose as soluble sugar constituents in roses (*Rosa hybrida* L.). *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 61, 1734-1735.
- International Agency for Research on Cancer. **2010**. [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr).
- Iwalokun B.A., Shittu M.O. **2007**. Effect of *Hibiscus Sabdariffa* (Calyce) Extract on Biochemical and Organoleptic Properties of Yogurt. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6, 2, 172-182.
- Jones P.L., Varady K.A. **2008**. Are functional food redefining nutritional requirements? *Applied Physiology, Nutrition and metabolism*, 33, 118-123.
- Kader A.A. **2000**. Quality of Horticultural Products. *Acta Horticulturae*, 517: 17-20.
- Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Kujala T.S., Heinonem M. **1999**. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Kelly K.M., Behe B.K., Biernbaum K.A., Poff K.L. **2003**. Consumer and professional chef perceptions of three edible-flower species. *American Society for Horticultural Science*, 36, 1, 162-166.
- Kelley K.M., Cameron A.C., Biernbaum J.A., Poff K.L. **2003**. Effect of storage temperature on the quality of edible flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 341-344.
- Kim D.O., Padilla-Kakour O.I. **2004**. Jam processing effect on phenolics and antioxidant capacity in anthocyanin-rich fruits: cherry, plum and raspberry. *J. Food Sci*, 69, 395-400.
- Kramer J., Cantoni C. **1994**. Alimenti, microbiologia e igiene. OEMF Milano.
- Kumar N., Bhandari P., Singh B., Gupta A.P., Kaul V.K. **2008**. Reversed phase-HPLC for rapid determination of polyphenols in flowers rose species. *J. Sep. Sci*, 31, 262-267.
- La Vecchia C., Bosetti C. **2006**. Diet and cancer risk in Mediterranean countries: open issues. *Public Health Nutrition*, 9, 8A, 1077-1082.
- Lambert A.C., Dbidour C., Dierten JP. **2001**. Jardins de fleurs pour les gourmands. *Edition du Chêne*.
- Shafiur Rahman e Marcel Dekker. **1999**. In *Handbook of food preservation*, Inc. New York- Basel, 1/367,4193.
- Leistner L. **1992**. Food preservation by combined methods. *Food Research International* 25, 151-158
- Leroy A. **2004**. Etude, modélisation et renforcement des structures pariétales responsables de la fermeté de la fraise. Application à sa transformation industrielle, *These de Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine*.
- Lo Scalzo R., Fibiani M., Mennella G., Rotino G.L., Dal Sasso M., Culici M., Spallino A., Braga P.C. **2010**. Thermal Treatment of Eggplant (*Solanum meongene* L.) Increases the Antioxidant Content and the Inhibitory Effect on Human Neutrophil Burst. *J. Agric. Food Chem*, 58, 3371-3379
- Lo Scalzo R., Giussani E., Brambila A., Torreggiani D. **2006**. Effect of fruit blanching and carbohydrate addition on phenolics and radical scavenging activity of blueberry juice during frozen storage. In: Polyphenols Communication, 423-424. XXIII International Conferences on Polyphenols. Winnipeg, Manitoba, Canada August 22-25.
- Lo Scalzo R., Iannocari T., Summa C. **2007**. The relationship between the composition of different table grape (*Vitis vinifera* L.) extracts and three method of measuring their free radical scavenging properties. *Italian Journal Food Science*, 19, 329-341.
- Lo Scalzo R., Iannocari T., Summa C., Morelli R., Rapisarda P. **2004**. Effect of thermal treatments on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice. *Food Chemistry* 85, 41-47.
- Maestrelli A. **2002**. La fragola congelata: un percorso tecnologico tra ostacoli e possibilità di sviluppo. In: *Frutticoltura*, anno LXIV – n.1, 27-31.
- Maestrelli A., Senesi E. **2009**. Innovazione nei processi di trasformazione, conservazione e packaging dei prodotti di terza, quarta e quinta gamma. In: Ranalli P., (Ed.). *Le piante industriali per una agricoltura multifunzionale*. Avenue media, Milano-Bologna, 95-105.
- Maestrelli A. Chourot J.M. **2002**. Sélection des cultivars en relation avec la transformation. In: Albagnac G., Varoquaux P., Montigaud J.C., (Eds). *Tecnologies de la transformation des fruits*. Lavoisier, Tec&Doc Editions, Paris, 41-75.
- Maffei M. *Biochimica vegetale*, Piccin, **1998**, 292.
- Maganha E.G., Da Costa Halmenschlager R., Moeira R.R., Pegas J.A.H., De Paula Ramos A.L.L., Saffi J. **2010**. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. *Food Chemistry*, 118, 1, 1-10.
- Maltini E., Torreggiani D., Bertolo G. Stecchini M. **1983**. Recent development in the production of shelf-stable fruit by osmosis. In *Proc of the 6<sup>th</sup> International Congress of Food Science and Technology*, 1, 177. Ed McLoughlin J.V., McKee B.M. boole press, Dublin.

- Manas P., Pagan R. **2005**. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1387-1399.
- Mao L.M., Pan X., Que F., Fang X.H. **2006**. Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze-dried daylily flowers. *European Food Research and Technology* 222: 236-241.
- Mao F., Mao L., Zheng X. **2007**. In vitro and vivo antioxidant activities of daylily flowers and the involvement of phenolic compounds, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 16 (suppl. 1): 196-203.
- Marengi L. **2003**. Cucinare con I fiori. *Centouno ricette profumate, Priuli&VErlicca*.
- McKee T., McKee J.R. **2006**. Biochimica le basi molecolari della vita, McGraw-Hill.
- Miglio C., Chiavaro E., Visconti A., Fogliano V., Pellegrini N. **2008**. Effects of Different Cooking Methods on Nutritional and Physicochemical Characteristics of Selected Vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 139-147.
- Migliorini M. G. **2004**. La produzione delle conserve vegetali. *Quaderno ARSIA*, Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione nel settore Agricolo-forestale, Firenze.
- Mikanagy Y., Saito N., Yokoy M., Tatsuzawa F. **2000**. Anthocyanins in flowers genus *Rosa*, section *Cinnamomeae* (*Rosa*), *Chinensis*, *Gallicanae* and some modern garden roses. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 887-902.
- Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali. **2009**. [www.politicheagricole.it](http://www.politicheagricole.it)
- Mollov P., Mihalev K., Shikov V., Yoncheva N., Karagyozov V. **2007**. Colour stability improvement of strawberry beverage by fortification with polyphenolic copigments naturally occurring in rose petals. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 318-321.
- Moyer R.A., Hummer K.E., Finn C.H., Frei B., Wrolstad R.E. **2002**. Anthocyanins, Phenolics and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: Vaccinim, Rubus and Ribes. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 519-525.
- Munyaka A.W., Oey I., Van Loey A., Hendrickx M. **2010**. Application of thermal inactivation of enzymes during vitamin C analysis to study the influence of acidification, crushing and blanching on vitamin C stability in Broccoli (*Brassica oleracea L. var. italica*). *Food Chemistry*, 120, 591-598.
- Nakamura K., Matsubara K., Watanabe H., Kokubun H., Ueda Y., Oyama-Okubo N., Nakayama M., Ando T. **2006**. Identification of *Petunia hybrida* cultivars that diurnally emit floral fragrances. *Scientia Horticulturae*, 108, 61-65.
- Netzel M., Strass G., Bitsch I., Könitz R., Christmann M., Bitsch R. **2003**. Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wine. *Journal of Food Engineering*, 56, 223-228.
- Ng T.B., Gao W., Li L., Niu S.M., Zhao L., Liu J., Shi L.S., Fu M., Liu F. **2005**. Rose (*Rosa rugosa*) flower extract increase the activities of antioxidant enzymes and their gene expression and reduces lipid peroxidation. *Biochemistry and Cell Biology*, 83, 78-85.
- Ng T.B., He J.S., Niu S.M., Zhao L., Pi Z.F., Shao W., Liu F. **2004**. A gallic acid derivative and polysaccharides with antioxidant activity from rose (*Rosa rugosa*) flowers. *Editor Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56, 537-545.
- Norikoshi R., Imanishi H., Ichimura K. **2008**. A simple and rapid extraction Method of Carbohydrates from petals or sepals of four floricultural plants for determination of their content. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 77, 3, 289-295.
- Nuzzi M., Lovati F., Avitabile Leva A., Lorni P., Testoni A. **2002**. Valutazioni qualitative, strumentali e sensoriali di nuove accessioni di fragola. *Frutticoltura*, LXIV, 12, 59-67.
- Onozaki T., Mato M., Shibata M., Hikedo H. **1999**. Differences in flower color and pigment composition among white carnation (*Dianthus caryophyllus L.*) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 82, 103-111.
- Oszmiański J., Woldyło A., Kolniak J. **2009**. Effect of L-ascorbic acid, sugar, pectin and freeze-thaw treatment on polyphenol content of frozen strawberries. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 581-586.
- Pagliarini E. **2006**. Metodi descrittivi. In: *Valutazione sensoriale, aspetti teorici, pratici e metodologici*, Editore Ulrico Hoepli Milano, 61-65.
- Park Y.W. **2007**. Rheological characteristics of goat and sheep milk, *Small Ruminant Research*, 68: 73-87
- Penney V., Henderson G., Blum C., Johnson-Green P. **2004**. The potential of phytopreservatives and nisin to control microbial spoilage of minimally processed fruit yogurts. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 369-375.



- Perva-Uzunalic A., Škerget M., Knez Ž., Weinreich B., Otto F., Grüner S. **2006**. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, 96, 597-605..
- Pilati L. **2004**. Marketing agro-alimentare. *UNI Service*, 28.
- Piva A., Di Mattia C., Neri L., Dimitri G., Chiarini M., Sacchetti G. **2008**. Heat-induced chemical, physical and functional changes during grape must cooking. *Food Chemistry*, 106, 1057-1065.
- Plessi M., Bertelli D., Albasini A. **2007**. Distribution of metals and phenolic compounds as a criterion to evaluate variety of berries and related jams. *Food Chemistry*, 100, 419-427.
- Pointing J.D., Watters C.C., Forrey R., Jackson R., Stanley W.L. **1966**. Osmotic dehydration of fruits. *Food Technol.*, 20, 1365.
- Prenci E., Berto S., Daniele P.G., Toso S. **2007**. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusion of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry*, 100, 433-438.
- Prinzivalli C., Gaia S., Bertolo G., Torreggiani D. **2004**. Partial air dehydration and CO<sub>2</sub> pre-treatments as innovative steps in the production of persimmon (*Diospyros kaki*, Thunb.) ingredients. *Drying – Proceedings of the 14th International Drying Symposium*, vol.C, 1891-1897.
- Que F., Mao L., Zheng X. **2007**. In vitro and vivo antioxidant activities of daylily flowers and the involvement of phenolic compounds. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 1, 196-203.
- Rinallo C. **2005**. Botanica delle piante alimentari, Piccin, 6,127.
- Sánchez-Moreno C., Plaza L., Elez-Martínez P., De Ancos B., Martín-Belloso O., Cano M.P. **2005**. Impact of High Pressure and Pulsed Electric Fields on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Orange Juice in Comparison with Traditional Thermal Processing. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4403-4409.
- Shen S.C., Tseng K.C., Chao F.T., Wu J.S.B. **2007**. Color quality of rose liqueur. *Journal of Food Quality*, 30, 202-217.
- Silva F., V.M., Silva C.L.M. **1997**. Quality Optimisation of hot Filled Pasteurized Fruit Purees: Container Characteristics and Filling Temperatures. *Journal of Food Engineering*, 32, 351-364.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamanuela-Raventos R.M. **1999**. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Method in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sironi V.A. **2009**. Il cibo come farmaco. Per una cultura alimentare della salute. Teatrino di Villa Reale e Cascina San Fedele nel Parco di Monza.
- Società italiana di Nutrizione Umana. **2010**. [www.sinu.it/larn/carboidr.asp](http://www.sinu.it/larn/carboidr.asp)
- Tabasco R., Paarup T., Janer C., Peláez C., Requena T. **2007**. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal*, 17, 1107-1114.
- Tarakçi Z., Küçüköner E. **2003**. Physical, Chemical, Microbiological and Sensory Characteristics of Some Fruit-Flavored Yoghurt. *YYÜ vet Fak Derg*, 14, 2: 10-14.
- Tateyama C. Ohta M., Uchiyama T. **1997**. Free radical scavenging activities of flower petal extracts. *Journal of the Japanese society for food science and technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 44, 9, 640-646.
- Tavani A., La Vecchia C. **1999**. Beta-Carotene and risk of coronary heart disease. A review of observational and intervention studies. *Biomed Pharmacother*, 53, 409-416.
- Torreggiani D., Bertolo G. **2001**. Osmotic pre-treatments in fruit processing: chemical, physical and structural effects. *J.Food Eng.*, 49, 247-253.
- Torreggiani D., Bertolo G. **2004**. Present and future in process control and optimization of osmotic dehydration. In: Taylor S., L. (Ed.). *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier Academic Press, San Diego, USA, 173-225
- Torreggiani D., Lucas T., Roult-Wack A.L. **2000**. The Pre-treatments of Fruits and Vegetables. In: Kennedy C.J. (Ed.). *Managing Frozen Foods*, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, England, 57-80.
- Velioglu Y.S., Mazza G. **1991**. Characterization of Flavonoids in Petals of *Rosa Damascena* by HPLC and Spectral Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 9, 463-467.
- Villavecchia V., Eigenmann G. **1982**. Nuovo dizionario di merceologia e chimica applicata, Hoepli, 1, 149.
- Vinokur Y., Rodov V., Reznick N., Goldman G., Horev B., Umiel N., Friedman H. **2006**. Rose petal tea as an antioxidant-rich beverage: cultivar effects. *Journal of Food Science*, 71, 1, 42-47.

- Wendisch V.F. **2007**. Amino acid biosynthesis: pathways, regulation and metabolic engineering, *Springer*, 5, 100.
- Wicklund T., Rosenfeld H.J., Martinsen B.K., SundfØr M.W., Lea P., Bruun T., Blomhoff R., Haffner K. **2005**. Antioxidant capacity and colour of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. *LWT – Food Science and Technology*, 38, 387-391.
- Wildman R.E.C. **2007**. Handbook of nutraceuticals and functional food. *CRC Press*.
- World Cancer research Fund (WCRF)/American Institute for Cancer Research. **2007**. Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: a global perspectives.
- World Health Organization. **2010**. [www.who.int/en/](http://www.who.int/en/)
- Wrolstad R.E., Decker E.A., Schwartz S.J., Sporns P. **2005**. Handbook of Food Analytical Chemistry, Water, Proteins; Enzymes, Lipids and Carbohydrates. *Wiley-IEEE*, 463-468.
- Wrolstad R.E., Skrede G., Lea P., Enersen G. **1990**. Influence of Sugar on Anthocyanin Pigment Stability in Frozen Strawberries. *Journal of Food Science*, 55: 1064-1065.
- Youwei Z., Jinlian Z., Yonghong P. **2008**. A comparative study on the free radical scavenging activities of a some fresh flowers in southern China. *LWT – Food Science and Technology*, 41, 1586-1591.
- Youwei Z., Yonghong P. **2007**. Changes ion antioxidant activity in *Rosa rugosa* flowers at different stage of development. *New Zealand Journal Crop and Horticultural Science*, 35, 4, 397-401.
- Zainoldin K.H., Baba A.S. **2009**. The Effects of *Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus* on Physicochemical, Proteolysis and Antioxidant Activity in Yogurt, World Academy of Science. *Engineering and Technology*, 60, 361-366.