

CAPITOLO 5

MATERIALI E METODI

5.1 Preparazione del campione

Nella prima prova sono state utilizzate zucche appena raccolte (ottobre-2005) della varietà “Lunga di Napoli” (*Cucurbita moschata*) prodotte in due aree della Campania estremamente diverse per quanto riguarda le caratteristiche del suolo. È stata presa in considerazione l’area dell’acerrano-nolano con terreno sciolto e ben drenato e quella della Piana del Sele (Eboli) con terreno di impasto tenace con tessitura argillosa.

La seconda prova è stata invece condotta dopo un periodo di stoccaggio dei frutti interi di circa tre mesi (febbraio-2006) e sono state utilizzate zucche della varietà “Moschata di Provenza” (*Cucurbita moschata*) prodotte nell’agro nocerino-sarnese.

Dopo l’arrivo in laboratorio, ciascuna zucca, è stata tagliata in spicchi previa asportazione della buccia; ogni spicchio è stato poi tagliato in cubetti di circa 2cm di lato.

I pezzi accuratamente mischiati sono stati poi, nella prima prova, confezionati direttamente in vaschetta e conservati in frigorifero, nella seconda prova, sono stati suddivisi in due lotti:

- Il primo lotto è stato direttamente confezionato in vaschette di materiale plastico (controllo in aria) e poi conservato a 4°C.
- Il secondo lotto è stato confezionato nelle stesse vaschette in atmosfera protettiva costituita da: 10% ossigeno, 10% anidride carbonica, 80% azoto e poi conservato in frigorifero.

5.2 Il confezionamento

Il confezionamento del prodotto precedentemente preparato è stato realizzato adoperando:

- Termosigillatrice semiautomatica a cassetto con doppio scomparto *Minipack Torre* modello TMS 105; tipo vuoto-immissione di gas.
- Vaschette in polietilene prodotte dalla ditta Coop-box, modelli B5-30 e B5-37.
- Film plastico di copertura OPP+adesivo+LDPE, spessore 100 micron.

5.3 Controlli analitici

Ogni due giorni sui campioni preparati come sopra sono state condotte le seguenti analisi:

5.3.1 Perdita di peso

La perdita di peso, dovuta alla permeabilità del contenitore, è stata determinata mediante pesate con bilancia SATORIUS BP 61 sul prodotto confezionato durante il periodo di conservazione.

5.3.2 Percentuale di sostanza secca

I campioni di zucca sono stati pesati e riposti in stufa (Continental Equipment) ad una temperatura di 60°C, fino a peso costante, per la determinazione della sostanza secca.

$$\%Ss = (Pf / Pi) \times 100$$

5.3.3 Colore

La valutazione del colore è stata eseguita mediante colorimetro MINOLTA CM-2600d che effettua misurazioni nel range 360-740nm.

La determinazione è stata eseguita poggiando la finestra di lettura direttamente sui pezzi di zucca e i parametri valutati sono i valori a^* , b^* e L^* definiti secondo il sistema CIE (1976).

5.3.4 Consistenza

Per analizzare la consistenza del prodotto è stato utilizzato un penetrometro (Fruit firmness tester), dotato di puntale di 0.51cm allo scopo di misurare lo sforzo massimo (kg) offerto dal pezzo di zucca.

5.3.5 Residuo secco rifrattometrico

Parte dei campioni era sminuzzata mediante frullatore per circa 5 minuti senza diluizione. Il prodotto era posto sul rifrattometro ATAGO Palette PR-32 per l'analisi. I risultati sono stati riportati in °Brix e convertiti secondo tale scala dallo stesso strumento.

La scala Brix utilizza l'indice di rifrazione dell'acqua ($n_D=1.3329$) come riferimento (0%), per tale motivo i gradi Brix sono una misura del peso percentuale di zucchero (saccarosio) presente in una soluzione acquosa.

5.3.6 Analisi del pH

La valutazione del pH è stata eseguita sui campioni opportunamente frullati mediante un pHmetro METTLER TOLEDO mod. MP 220. Lo strumento impiegato era capace di standardizzare i valori della concentrazione idrogenionica in funzione della temperatura e forniva valori utili alla temperatura di 25°C.

5.3.7 Analisi della conducibilità elettrica della "polpa"

La misura della conducibilità è stata eseguita sui campioni frullati mediante un CONDUCTIMETER BASIC 30 ideale per misurare la

conducibilità a temperature di riferimento di 20 o 25 °C e coefficiente di temperatura fisso del 2%. La calibrazione automatica su 1 punto (1278 $\mu\text{S}/\text{cm}$ o 11,67 mS/cm) dà la garanzia sulla qualità della misura effettuata.

5.3.8 Analisi della viscosità della “polpa”

L'analisi della viscosità è stata eseguita sui campioni frullati per mezzo di un CONSISTOMETER BOSTWICK, uno strumento che determina la consistenza del campione tramite la misura della distanza che un materiale percorre, a causa del proprio peso, durante un dato intervallo di tempo. Permette all'utilizzatore di predeterminare la formulazione per standardizzare i lotti di produzione. E' costruito in robusto acciaio inossidabile ed è equipaggiato di una bolla e due viti per la regolazione del livello. La porta di apertura a molla è trattenuta da un meccanismo di rilascio che consente un immediato scorrimento del campione. E' dotato, inoltre, di un canale graduato con divisione da cm 0,5 per un'accurata misura del flusso. La graduazione è incisa per evitare cancellazioni.

5.3.9 Determinazione degli zuccheri riduttori con il metodo volumetrico di Fehling

La determinazione degli zuccheri riduttori è stata effettuata su un campione di 20 g di prodotto omogeneizzato, il volume del campione è stato portato a 100 ml con acqua distillata in un matraccio. Dopo 3 minuti sono stati addizionati al campione 10 ml di soluzione satura di acetato di piombo neutro (soluzione defecante). Dopo 10 minuti l'eccesso di piombo è stato eliminato con aggiunta di 15 ml di soluzione satura di ossalato di sodio, agitazione, sedimentazione e filtrazione dopo aver portato a volume di 200 ml con acqua distillata..

In un matraccio a fondo piatto sono stati versati 5 ml di soluzione di Fehling A (solfato rameico, CuSO_4), 5 ml di Fehling B (Tartrato di sodio e potassio, sale di Seignette, $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 + \text{NaOH}$) e 40 ml di acqua, la soluzione è stata riscaldata fino ad ebollizione.

Ad ebollizione, è stato aggiunto, mediante buretta, un volume di soluzione campione poco inferiore a quello necessario per la completa decolorazione del liquido di Fehling; dopo un minuto e sempre con il liquido in ebollizione sono state aggiunte due gocce di blu di metilene allo 0.1% e soluzione campione fino a completa scomparsa della colorazione azzurra dell'indicatore che deve avvenire in un tempo massimo di tre minuti. La colorazione finale deve essere di un colore mattone persistente.

La percentuale di zuccheri riduttori si esprime:

% (p/v) di zucchero riduttore = $(fxd) / (a-0,1)$ dove:

f = fattore dovuto al potere riducente dello zucchero determinato;

- glucosio = 4.945
- fruttosio = 5.350
- invertito = 5.150

d = diluizione della soluzione zuccherina campione ($20/200 = 0.1$);

a = ml di soluzione zuccherina campione utilizzati nella titolazione.

5.3.10 Determinazione di nitrati, fosforo e potassio

Le seguenti analisi sono state eseguite sul campione secco mediante l'ausilio di uno spettrofotometro HACH Modello DR/2000, un microprocessore controllato per assicurare precisione e stabilità. Con questo strumento, dotato di display digitale LCD dot-matrix, i risultati possono essere espressi come % di trasmittanza, di assorbanza o di concentrazione. La determinazione di tali nutrienti prevede una prima fase di estrazione del campione, seguita poi dall'applicazione di un

metodo specifico per ciascun di essi utilizzando l'estratto acquoso filtrato.

Estrazione del campione

1. Aggiungere 0,50 g di tessuto vegetale secco ad una cappa miscelatrice da 250 ml;
2. Aggiungere 100 ml di H₂O deionizzata alla cappa miscelatrice e mescolare ad alta velocità per un minuto;
3. Rimuovere la cappa dall'agitatore e versare 50 ml della mistura agitata in un beaker da 100 ml;
4. Aggiungere un cucchiaino da 3,5 cc di Activated Charcoal Powder e mescolare minuziosamente l'estratto ed il carbone;
5. Porre un imbuto di plastica in un cilindro graduato da 50 ml e porre un filtro di carta piegato nell'imbuto;
6. Versare i contenuti del beaker nell'imbuto e aspettare che l'estratto filtrato si raccolga nel cilindro.

L'estratto filtrato è poi usato per il testing dell'azoto-nitrato, del fosforo e del potassio.

5.3.10.1 Determinazione dei nitrati usando l'Estratto Acquoso

1. Aggiungere 10 ml di estratto acquoso filtrato ad una cella campione e portare al volume di 25 ml con H₂O deionizzata;
2. Aggiungere il contenuto di una bustina di NitraVer 5 Nitrate Reagent Powder Pillow alla cella campione, tappare immediatamente ed agitare per un minuto esatto;
3. Attendere un periodo di reazione di 5 minuti (se è presente NO₃⁻-N si svilupperà un colore ambra);
4. Leggere il campione allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 500 nm;

5. Il bianco viene effettuato portando ad un volume di 25 ml con H₂O deionizzata una seconda cella campione.

Il risultato viene espresso come % di NO₃⁻-N a cui bisogna sottrarre il valore del bianco.

5.3.10.2 Determinazione del fosforo con il Metodo dell'Acido Ascorbico, usando PhosVer 3 Phosphate Reagent

Il metodo PhosVer 3 produce un colore blue con il fosfato ed è libero da comuni interferenze. L'indicatore è combinato con l'acido ascorbico in una formulazione di polvere unica chiamata PhosVer 3 Phosphate Reagent. L'indicatore consiste di molibdato di sodio che forma un complesso con lo ione fosfato. Questo complesso è poi ridotto dall'acido ascorbico per formare una specie blu la cui intensità è proporzionale alla concentrazione di fosfato presente nel campione.

1. Aggiungere 1.0 ml di estratto filtrato in una cella campione e portare ad volume di 25 ml con H₂O deionizzata;
2. Aggiungere il contenuto di una bustina di PhosVer 3 Phosphate Reagent Powder Pillow alla cella campione e agitare immediatamente per miscelare;
3. Attendere un periodo di reazione di 2 minuti (se il fosfato è presente si svilupperà un colore blu);
4. Leggere il campione allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 890 nm;
5. Il bianco viene effettuato portando ad un volume di 25 ml con H₂O deionizzata una seconda cella campione.

Il risultato viene espresso come % di PO₄³⁻-P ed anche in questo caso si sottrae il valore del bianco alla percentuale ottenuta.

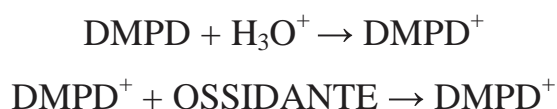
5.3.10.3 Determinazione del potassio con il metodo del Tetrafenilborato, usando i reagenti Potassium 1, 2 e 3

1. Aggiungere 0.5 ml di estratto filtrato in una cella campione e portare ad volume di 25 ml con H₂O deionizzata;
2. Aggiungere i contenuti di una bustina di Potassium 1 Powder Pillow e di Potassium 2 Solution Pillow alla cella campione e agitare per dissolvere il tutto;
3. Aggiungere il contenuto di una bustina di Potassium 3 Powder Pillow alla cella campione, tappare e agitare per 30 secondi;
4. Attendere un periodo di reazione di 3 minuti;
5. Leggere il campione allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 650 nm;
6. Il bianco viene effettuato portando ad un volume di 25 ml con H₂O deionizzata una seconda cella campione.

Il risultato viene espresso come % di K a cui si sottrae il valore del bianco.

5.3.11 Determinazione dell'attività antiossidante idrofila mediante metodo DMPD

Il metodo DMPD (*Fogliano et al., 1999*) si basa sull'utilizzo del cromogeno 4-ammino-N,N-dimetilanilina diidrocloreuro, indicato con la sigla DMPD, composto che non presenta alcun assorbimento spettrofotometrico nel campo del visibile, mentre assume un'intensa colorazione rossa in ambiente acido e in presenza di un opportuno ossidante. Il DMPD forma in tal caso un catione radicalico stabilizzato per risonanza:



Il catione radicalico è fortemente colorato e presenta un picco di assorbanza massimo a 505 nm (con ϵ_{\max} pari a 8,53 in tampone acetato a pH 5,25); a tale lunghezza d'onda è valutato il decremento dell'assorbanza dovuto al sequestro dell'elettrone singoletto da parte dei composti antiossidanti (AO) che risultano più affini per esso:

$\text{DMPD}^{\bullet+} (\text{COLORATO}) + \text{AO} \rightarrow \text{DMPD}^+ (\text{DECOLORATO}) + \text{AO}^{\bullet}$
Quindi l'equilibrio della reazione catione/catione radicalico si sposta verso la forma cationica decolorata proporzionalmente all'attività antiossidante del campione.

Per questo motivo l'attività antiossidante è espressa come percentuale di decremento dell'assorbanza, detta anche percentuale di inibizione, calcolata secondo l'equazione:

$$\text{Abs (\%)} = (1 - \text{Abs}_c / \text{Abs}_b) * 100$$

dove Abs_c è l'assorbanza del catione radicalico dopo l'aggiunta della soluzione di antiossidanti estratti dal campione, mentre Abs_b è l'assorbanza del cosiddetto "bianco", cioè del catione radicalico dopo l'aggiunta di sola acqua deionizzata, quindi senza l'aggiunta di antiossidanti, in modo da ottenere l'assorbanza della soluzione con il cromogeno non inibito.

Preparazione del campione

1 g di ciascun campione, congelato e liofilizzato, era centrifugato con 5 ml di acqua deionizzata a 4°C a 4000 rpm per 5 minuti, dopodichè si raccoglieva il sovrantante e si sottoponeva il pellet ad una seconda centrifugazione con altri 5 ml di acqua deionizzata.

Sui due estratti acquosi ottenuti (tenuti separati) si effettuava la misura dell'attività antiossidante idrofila.

Preparazione della soluzione contenente la specie radicalica

Per il metodo DMPD occorre preparare una soluzione acquosa con cromogeno 0,1 M, un tampone acetato 0,1 M a pH 5,25 ed una

soluzione di cloruro ferrico 0,05 M. Da queste operazioni si otterrà un preparato costituito da 10 ml di tampone, 100 µl della soluzione contenente il DMPD e 20 µl di soluzione di cloruro ferrico, che presenta un'intensa colorazione rosa ed ha un max di assorbimento a 505 nm. Evidentemente con l'aggiunta del cloruro ferrico, cioè di Fe^{3+} , un forte antiossidante, si otterrà il catione radicalico colorato (DMPD^+). Per lo sviluppo omogeneo della colorazione, questo preparato è stato conservato per 10 minuti a 4°C al buio. Nel frattempo si può azzerare lo spettrofotometro leggendo l'assorbanza con una cuvette di plastica contenente la soluzione tampone.

Preparazione della soluzione per il saggio

Trascorsi 10 minuti si è proceduto con il saggio. Sono state preparate in duplicato delle soluzioni contenenti 2 ml del cromogeno, un volume noto della soluzione da testare (20 µl) ed il complemento a 200 µl, a quest'ultima, di acqua deionizzata (volume finale 2,2 ml). La lettura spettrofotometrica è stata effettuata dopo 10 minuti in modo da consentire l'inibizione del catione radicalico.

Retta di taratura

L'attività antiossidante idrofila misurata viene espressa in ***mmol equivalenti di acido ascorbico***. Tale equivalenza è resa possibile dalla conversione dei valori effettuata sulla base della retta di taratura. Sono state preparate una serie di soluzioni a concentrazione nota e variabile di acido ascorbico, che è stato utilizzato come antiossidante idrofilo standard. Partendo da una soluzione di acido ascorbico 0,04% (0,04 g di acido ascorbico puro in 100 ml di acqua deionizzata) sono stati preparati campioni a concentrazione scalare di antiossidante, cioè di acido ascorbico. Di tali campioni è stata letta l'assorbanza analogamente a come è stato descritto nel paragrafo precedente. Dopo di ciò è stata calcolata la percentuale di inibizione secondo

l'equazione già menzionata precedentemente e che di seguito viene riportata:

$$\text{inibizione Abs}_{505} (\%) = (1 - \text{Abs}_c / \text{Abs}_0) * 100$$

dove Abs_0 è l'assorbanza del bianco e Abs_c è quella del campione costituito da cromogeno e soluzione di acido ascorbico, dopo aver aspettato 10 minuti dall'aggiunta di quest'ultima al cromogeno. Si ottengono così dei valori esprimibili in termini di coordinate di una retta:

- X = conc. acido ascorbico ($\mu\text{g/ml}$)
- Y = % di inibizione

e quindi l'equazione di una retta. Per le misurazioni effettuate in questo studio si è adoperata la retta mostrata nella seguente figura:

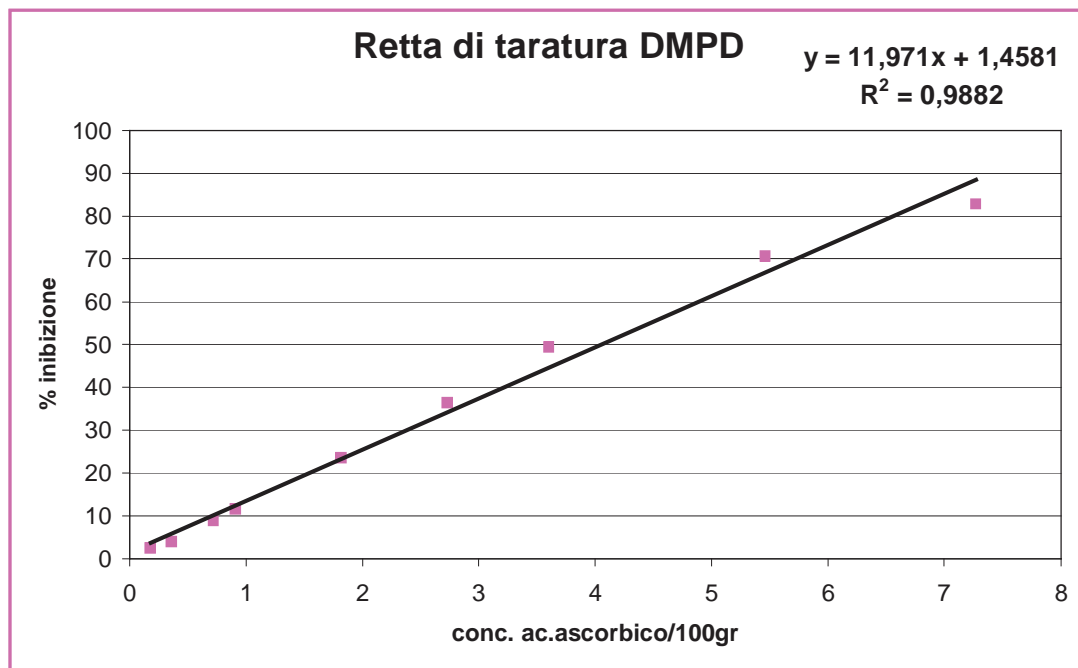


GRAFICO 3.5.1 Retta di taratura DMPD

Calcolo dell'attività antiossidante idrofila

Sostituendo i valori di percentuale di inibizione ottenuti con i campioni contenenti l'estratto nella retta di taratura, si è ricavata l'attività antiossidante idrofila espressa come $\mu\text{g/ml}$ di acido

ascorbico. Attraverso delle conversioni di unità di misura si è arrivati ad esprimerla in **mmol** equivalenti di acido ascorbico.

5.3.12 Determinazione dell'attività antiossidante lipofila mediante metodo ABTS

Il metodo ABTS (*Miller et al., 1995; Miller et al., 1997a e b; Pellegrini et al., 1999*) valuta la formazione di un composto colorato il cui massimo di assorbanza è a 734 nm (con ϵ_{\max} di 18 in metanolo assoluto). Tale metodo si basa sull'utilizzo del cromogeno 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-solfonato) che produce nella forma radicalica un assorbimento tipico a 734 nm. Il meccanismo di funzionamento dell'ABTS è riconducibile a quello già descritto precedentemente nel DMPD.

L'attività antiossidante è valutata come riduzione dell'assorbimento a 734 nm del catione radicalico dell'ABTS in presenza di molecole più affini per l'elettrone singoletto, ovvero di antiossidanti.

Anche in questo caso la valutazione è calcolata come percentuale di decremento dell'assorbanza, detta anche “**percentuale di inibizione**”.

Preparazione del campione

1 g di ciascun campione, congelato e liofilizzato, era centrifugato con 5 ml di alcol metilico a 4°C a 4000 rpm per 5 minuti, dopodichè si raccoglieva il sovrantante e si sottoponeva il pellet ad una seconda centrifugazione con altri 5 ml di metanolo.

Sui due estratti metanolici ottenuti (tenuti separati) si effettuava la misura dell'attività antiossidante lipofila.

Preparazione della soluzione contenente la specie radicalica

La preparazione del catione radicalico ABTS⁺ è stata effettuata secondo quanto descritto da *Pellegrini et al.* (1999). Dunque, a 19,2 mg del sale di ammonio del 2-2'-azinobis-(acido 3-

etilenbenzotiazoline-6-sulfonico) (ABTS) sono stati aggiunti 5 ml di acqua deionizzata ottenendo una concentrazione finale pari a 7 mM. A questa soluzione si sono aggiunti 88 μ l di una soluzione acquosa 140 mM di per solfato di potassio e il preparato così ottenuto è stato conservato al buio a 4°C per almeno 6 ore, in modo da raggiungere un valore stabile di assorbanza. Tale preparato al momento dell'analisi è stato diluito con etanolo (circa 1:88), ottenendo il cromogeno utilizzato per l'analisi dei campioni, ed ha mostrato un'assorbanza pari a 0.700 ± 0.100 nm. Il bianco è stato preparato con 1 ml di cromogeno e 100 μ l di etanolo.

Preparazione della soluzione per il saggio

La soluzione contenente l'estratto in particolare era costituita da:

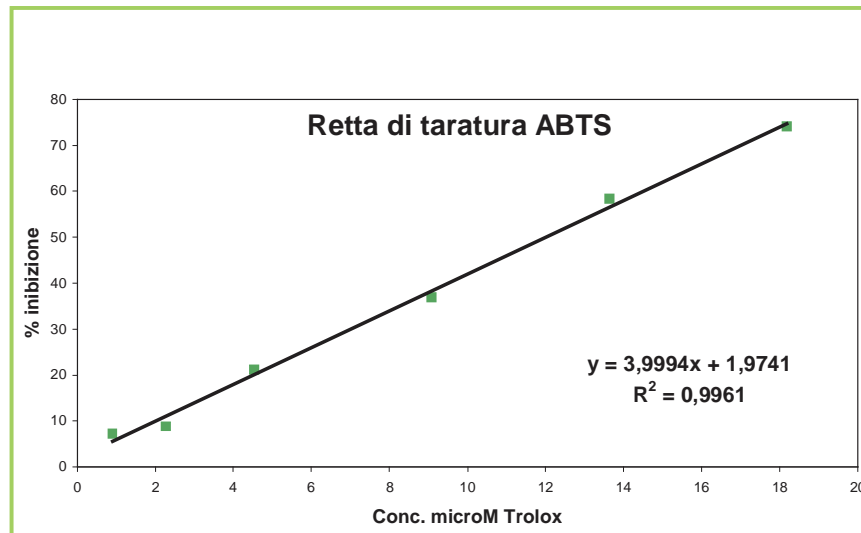
- 1 ml di cromogeno
- 100 μ l di campione opportunamente diluito con metanolo

Ogni campione è stato analizzato in duplicato con l'assorbanza a 734 nm letta 2,5 minuti dopo la preparazione della suddetta diluizione.

Retta di taratura

La retta di taratura viene costruita analogamente a quanto descritto per la retta di taratura per il calcolo della attività antiossidante idrofila.

La differenza fondamentale è il fatto che nel caso della retta di taratura per l'ABTS è stato utilizzato uno standard lipofilo piuttosto che idrofilo. Tale standard è il Trolox, cioè l'analogo idrosolubile dell' α -tocoferolo. La retta di taratura utilizzata nel corso di questo studio è mostrata in figura 4.4.2:



Calcolo dell'attività antiossidante

Sostituendo i valori di percentuale di inibizione ottenuti con i campioni contenenti l'estratto nella retta di taratura, si è ricavata l'attività antiossidante lipofila espressa come **mmol** di trolox /100 g di prodotto fresco.