



REGIONE  
PIEMONTE

FEASR - Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale  
*L'Europa investe nelle zone rurali*

## Programma di sviluppo rurale 2014-2020

Misura 16 – Innovazione e Cooperazione  
Operazione 16.1.1 Costituzione, Gestione e Operatività  
dei Gruppi Operativi del Pei-Agri

# Salumi Liberi

*Progetto per la riduzione dei nitrati/nitriti nei prodotti di salumeria e nel prosciutto cotto*



[www.regione.piemonte.it/svilupporurale](http://www.regione.piemonte.it/svilupporurale)

# Selezione e formulazione di ingredienti vegetali con proprietà batteriostatiche per la riduzione di nitriti e nitrati in prodotti carnei

*Prof. Jean Daniel Coïsson – Prof. Marco Arlorio*

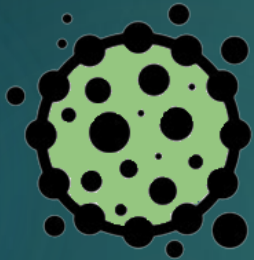


Dipartimento di Scienze del Farmaco  
22 novembre 2023

# CONSERVANTI



Azione antimicrobica



Azione antifungina



Azione antiossidante

**Conservanti di sintesi**

- sorbati
- propionati
- nitriti e nitrati
- BHA e BHT

**Conservanti naturali**

- spezie



# WORKFLOW- SALAME CRUDO

FASE 1:  
SCELTA DELLA SPEZIA OTTIMALE

FASE 2:  
FORMULAZIONE,  
CARATTERIZZAZIONE E  
APPLICAZIONE DELL'INGREDIENTE  
INNOVATIVO



REGIONE  
PIEMONTE

FEASR - Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale  
*L'Europa investe nelle zone rurali*

**Programma di sviluppo rurale 2014-2020**

Misura 16 – Innovazione e Cooperazione  
Operazione 16.1.1 Costituzione, Gestione e Operatività  
dei Gruppi Operativi del Pei-Agri

**Salumi Liberi**  
*Progetto per la riduzione dei nitrati/nitriti nei prodotti di salumeria e nel prosciutto cotto*

Costo complessivo: € 567.321,85  
Contributo pubblico concesso: € 453.857,48  
di cui quota FEASR: €195.703,35



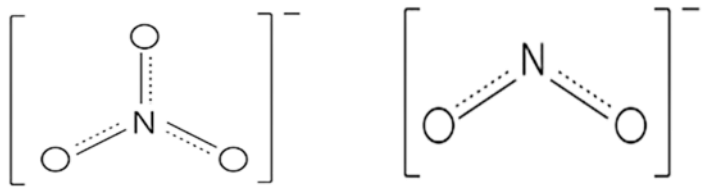
[www.regione.piemonte.it/svilupporurale](http://www.regione.piemonte.it/svilupporurale)





## SCOPO DEL LAVORO PARTE PRIMA

Selezione di una spezia con attività conservante per limitare l'uso di nitrati e nitriti  
Usi di nitrati e nitriti è necessario per inibire la crescita di *C. botulinum*



### Effetti indesiderati:

- cancro allo stomaco
- metaemoglobinemia
- patologie endocrine

### Possibili sostitutivi:

- **Estratti** (noce moscata, timo, salvia, chiodi di garofano, vinaccioli, riso nero, bergamotto, succo di bergamotto)
- **Molecole pure** (catechina, acido caffeico, acido ferulico)
- **Oli essenziali** (tea tree oil, artemisia, salvia, rosmarino, elicrisio)

### Parametri da considerare:

- Compatibilità con il salume
- Azione contro *Clostridium botulinum*
- Capacità antimicrobica e batteriostatica
- Influenza sugli starter microbici

# Risultati di prove di inibizione (DISAFA)

ID	Molecole/Estratto/Olio	mg	ul DMSO	ul Acqua	SA	SE	EC	LM	CS	LI	Lc	Sx	Legenda:		
1B	Estratti	Noce Moscata	333	100	230	*		*	*				20 ul per prova		
2B		Timo	421	100	320									No attività	
3B		Salvia	582	100	480								Leggera attività		
4B		Chiodi di Garofano	650	100	550								Si attività		
6B		Vinaccioli	75	100	600						\	\	\		
7B		Riso nero	73	100	600						\	\	\		
2E		Polvere di Bergamotto	130	60	260	*		*					SE	<i>S. enterica</i>	
FALCON		Succo di Bergamotto	TQ	\	\					\	\	\	SA	<i>S. aureus</i>	
4E	Molecole	Catechina	12	60	60		*	*					LM	<i>L. monocytogenes</i>	
5E		Acido Caffeico	43	100	330						\	\	\	EC	<i>E. coli</i>
6E		Acido Ferulico	32	100	420						\	\	\	CS	<i>C. sporigenus</i>
2I	Olio essenziale	Tea Tree	100	100	800		*				\	\	\	LI	<i>L. lactics</i>
3I		Artemisia	100	100	800						\	\	\	Lc	<i>L. curvatus</i>
4I		Salvia	100	100	800						\	\	\	Sx	<i>S. xylosus</i>
5I		Rosmarino	100	100	800						\	\	\	*	Betteriostatico
6I		Elicrisio	100	100	800						\	\	\		
		Bianco	\	100	200										

# SPEZIE SELEZIONATE



*Salvia officinalis* L.



*Thymus vulgaris* L.



*Syzygium aromaticum*



*Myristica fragrans* L.

# PRODUZIONE ESTRATTI

1. Omogeneizzazione della spezia
2. Pesata del campione
3. Addizione del solvente H<sub>2</sub>O:EtOH 50% v/v in rapporto 1:10
4. Agitazione in continuo
5. Filtrazione
6. Concentrazione con evaporatore rotante
7. Conservazione

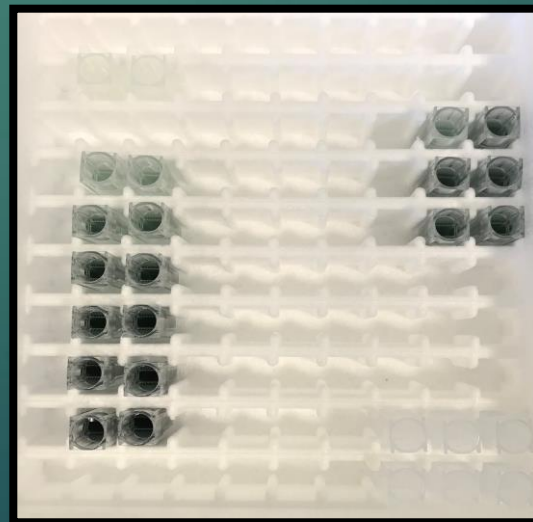
# Caratterizzazione estratti

## PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI:

1. Pesata di 5 mg di estratto
2. Diluizione con 1 mL di MeOH
3. Agitazione con Vortex
4. Conservazione in frigorifero

**1) POLIFENOLI TOTALI**  
**(Saggio di Folin Ciocalteu)**

**2) ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE**  
**(Saggio del DPPH·)**





# CONTENUTO POLIFENOLICO TOTALE

Saggio di Folin-Ciocalteu

Risultati ottenuti con saggio di Folin-Ciocalteu, espressi in mg di GAE\*/g di campione.

(Lettere diverse indicano campioni significativamente differenti per  $p < 0,05$ ).

\*Acido gallico equivalenti.

CAMPIONI	<b>POLIFENOLI TOTALI</b> (mg GAE / g di campione)
SALVIA	34,83 ± 2,76 <sup>b</sup>
TIMO	25,51 ± 0,87 <sup>c</sup>
NOCE MOSCATA	12,29 ± 0,79 <sup>d</sup>
CHIODI DI GAROFANO	99,20 ± 7,97 <sup>a</sup>

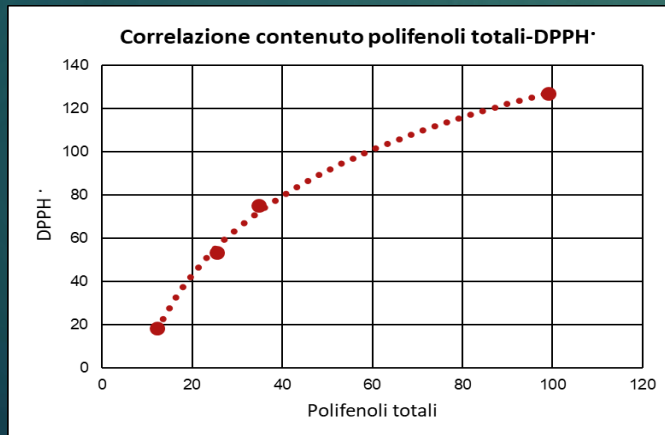
# POTERE ANTIOSSIDANTE

## Saggio del DPPH·

Risultati di attività antiradicalica degli estratti di spezie, espressi in mg di TE\*/g di campione

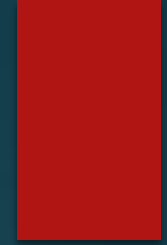
(Lettere diverse indicano campioni significativamente differenti per  $p < 0,05$ ).

\* Trolox equivalenti.



CAMPIONI	ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE (mg TE / g di campione)
SALVIA	75,11 ± 5,81 <sup>b</sup>
TIMO	53,06 ± 3,19 <sup>c</sup>
NOCE MOSCATA	18,20 ± 1,12 <sup>d</sup>
CHIODI DI GAROFANO	126,8 ± 8,71 <sup>a</sup>

# RP-HPLC-DAD



## Colonna cromatografica:

Luna C18 (2) 150 mm x 2 mm  
munita di pre-colonna,  
particelle 100 Å

## Fasi mobili:

Eluente A: H<sub>2</sub>O/HCOOH 0,1% (v/v)

Eluente B: MeOH/HCOOH 0,1% (v/v)

Flusso: 400 µL/min

Rivelatore: 280 e 330 nm

Volume campione : 3 µL

Temperatura: 30°C

Durata separazione  
cromatografica: 75min



## Preparazione degli estratti:

- Prelevare 2,5 mg per ogni estratto
- Diluire con 1 mL MeOH
- Prelevare 200 µL per ciascun campione



# *SALVIA OFFICINALIS*

COMPOSTO	mg/g di estratto secco
Acido protocatecuico	0,131 ± 0,005
Acido clorogenico	5,530 ± 0,040
Acido caffeico	2,013 ± 0,005
Acido ferulico	0,258 ± 0,004
Acido ellagico	10,212 ± 0,108
Miricetina	131,639 ± 2,382
Apigenina	3,674 ± 0,018

# THYMUS VULGARIS



COMPOSTO	mg / g di estratto secco
Acido protocatecuico	0,122 ± 0,009
Acido <i>p</i> -idrossibenzoico	0,106 ± 0,008
Catechina	0,337 ± 0,051
Acido clorogenico	0,931 ± 0,024
Acido caffeico	0,314 ± 0,013
Epicatechina	0,896 ± 0,021
Acido ferulico	0,045 ± 0,004
Rutina	31,991 ± 0,496
Acido ellagico	24,065 ± 0,256
Luteolina	1,156 ± 0,047
Kaempferolo	6,063 ± 0,112

# SYZYGIUM AROMATICUM



COMPOSTO	mg/g di estratto secco
Acido gallico	14,838 ± 0,168
Acido <i>p</i> -idrossibenzoico	0,888 ± 0,005
Acido clorogenico	0,114 ± 0,004
Acido caffeico	2,595 ± 0,014
Acido cumarico	0,341 ± 0,036
Acido ferlico	0,198 ± 0,010
Acido ellagico	7,129 ± 0,097
Luteolina	0,170 ± 0,008
Kaempferolo	0,982 ± 0,007
Apigenina	0,475 ± 0,027

# MYRISTICA FRAGRANS



COMPOSTO	mg/g di estratto secco
Acido gallico	0,024 ± 0,003
Acido protocatecuico	0,354 ± 0,020
Epicatechina	0,559 ± 0,035
Acido ferulico	0,144 ± 0,009
Rutina	5,223 ± 0,172
Acido ellagico	0,108 ± 0,003
Luteolina	0,077 ± 0,014
Kaempferolo	0,235 ± 0,012
Apigenina	1,144 ± 0,020

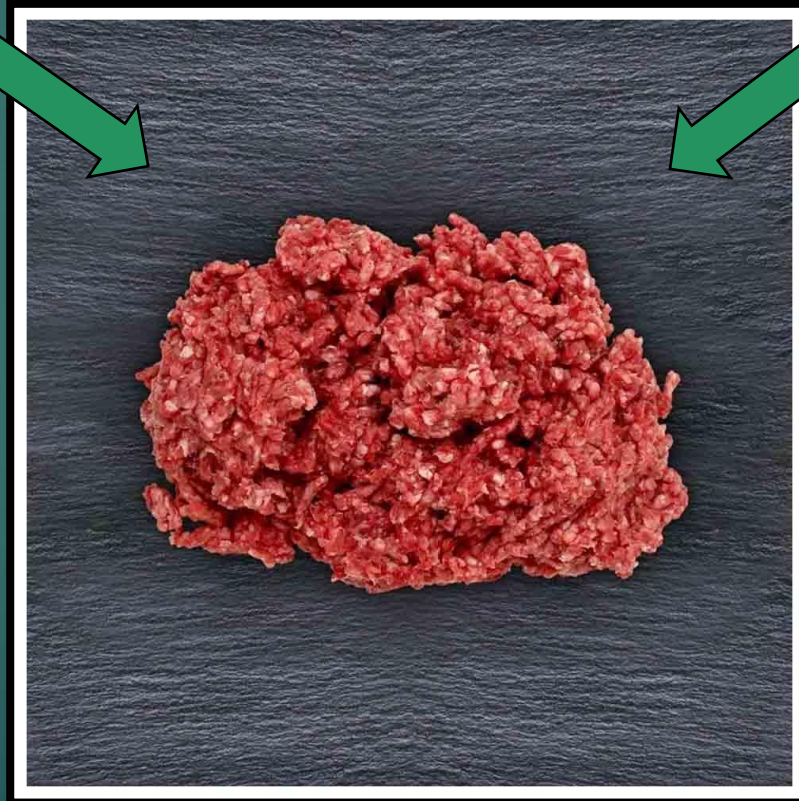
# SPEZIA MODELLO IN CARNE MACINATA



SALVIA



TIMO



PROBLEMI CON LA  
CRESCITA DEGLI STARTER



## SCOPO DEL LAVORO PARTE SECONDA

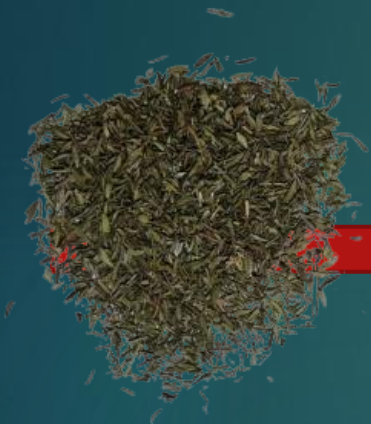
Formulare l'estratto di timo come  
ingrediente innovativo con attività  
conservante per limitare l'uso di nitrati  
e nitriti

TECHLAB





# PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO



Foglie di timo



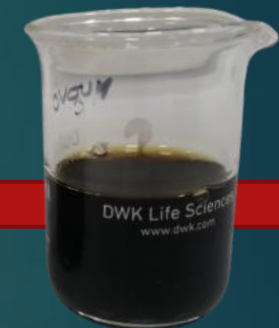
Estrazione in etanolo e  
acqua (1:1)



Filtrazione dell'estratto

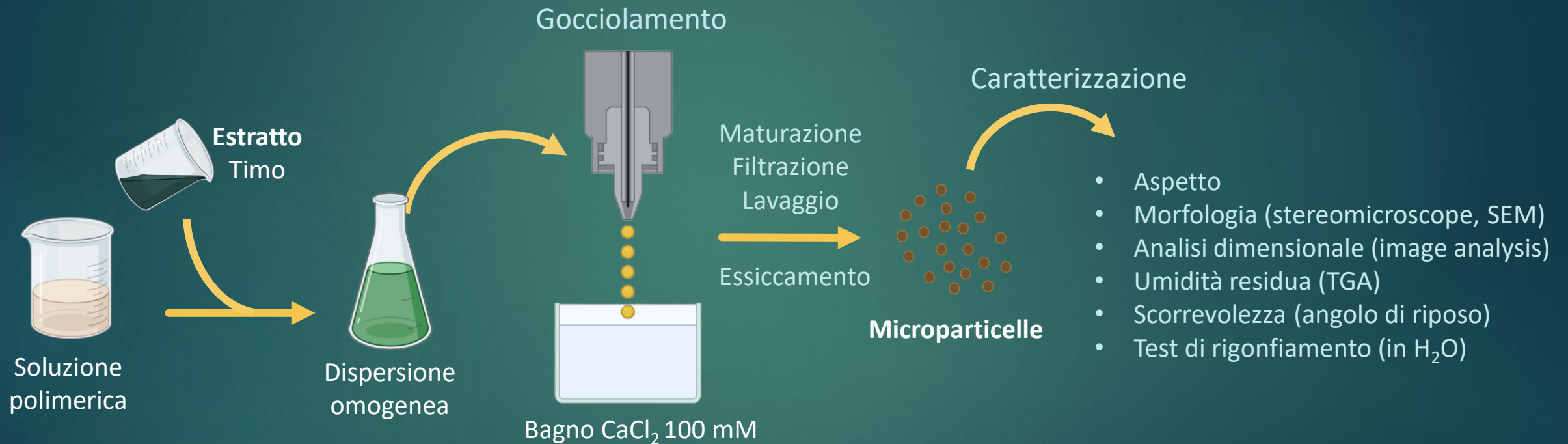


Evaporazione del  
solvente

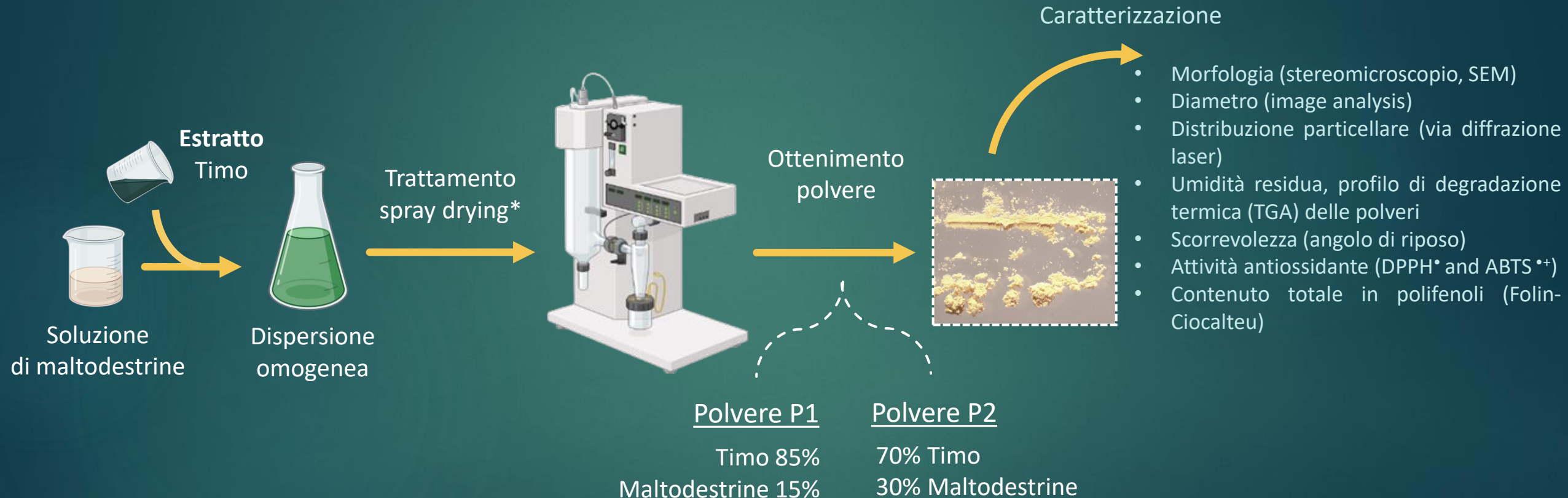


Estratto  
concentrato

## 1) Gelazione ionotropica



## 2) Spray drying



\* Condizioni di processo:  
Temperatura di inlet = 145 °C  
Velocità di flusso = 5-6 g/min

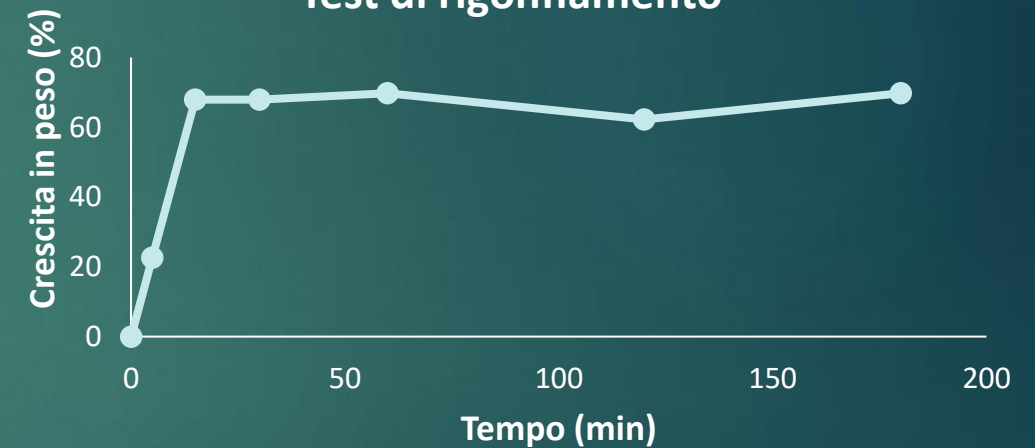
Pressione di atomizzazione = 45-50 mm  
Aspirazione = 100%

Tip = 0.7 mm  
Cap = 1.4 mm

## Gelazione ionotropica



## Test di rigonfiamento



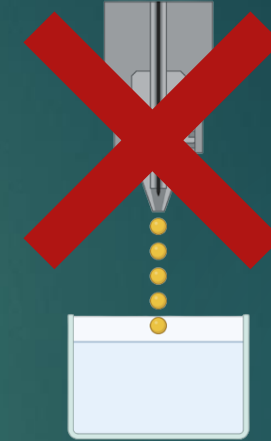
Diametro medio →  $1022 \pm 86 \mu\text{m}$

Sfericità (shape factor) →  $0,78 \pm 0,09$

Scorrevolezza (angolo di riposo) → Buona ( $33 \pm 0,81^\circ$ )

## Gelazione ionotropica

- Difficoltà nell'ottenimento di un grande quantitativo di prodotto
- Eccessiva durezza microparticelle



*Spray drying*



Polvere P1:

85% timo

15% maltodestrine



# CARATTERIZZAZIONE DELLE POLVERI S.D.

1

Umidità  
residua



	P1	P2
Umidità (%)	$7,19 \pm 0,30$	$5,69 \pm 0,61$

Termobilancia

2

Distribuzione  
dimensionale



	P1	P2
D <sub>10</sub> (μm)	$1,60 \pm 0,21$	$1,71 \pm 0,05$
D <sub>50</sub> (μm)	$4,64 \pm 0,62$	$5,06 \pm 0,27$
D <sub>90</sub> (μm)	$9,47 \pm 1,11$	$10,47 \pm 0,50$

Particle Size Analyzer

3

Angolo di  
riposo

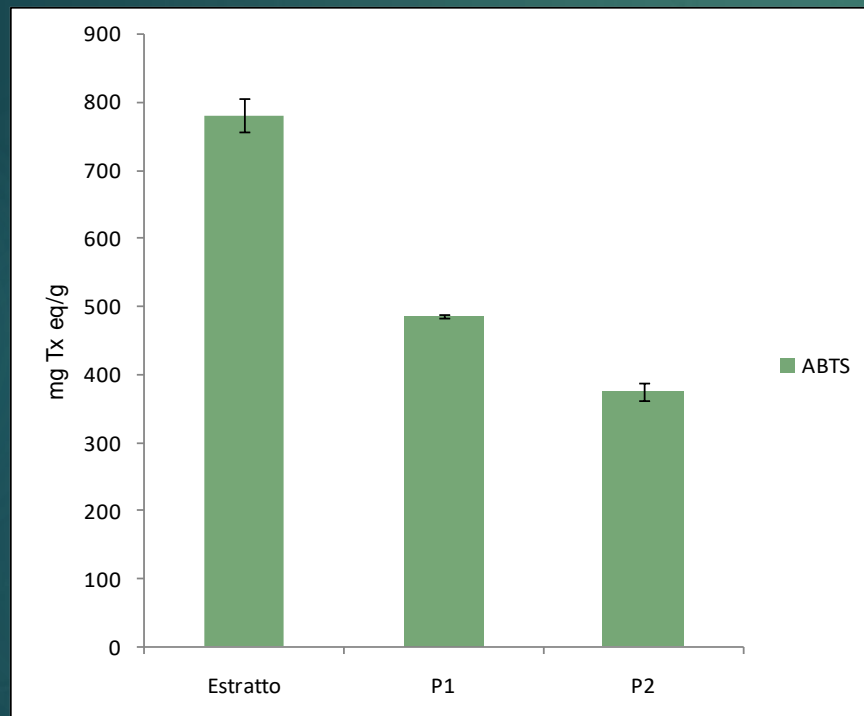


	P1	P2
Angolo (°)	$36,82 \pm 0,74$	$36,12 \pm 0,52$

Powder Flowability  
Tester

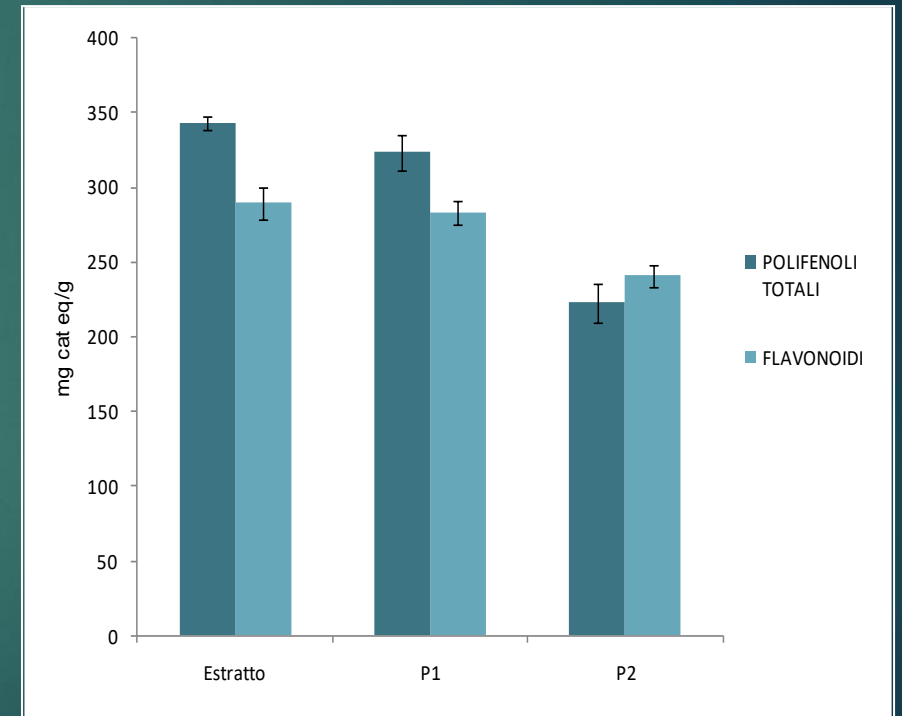
## Attività antiossidante

→ saggio con il radicalcations ABTS<sup>•+</sup>



## Quantificazione polifenoli

Polifenoli totali → saggio di Folin-Ciocalteu  
Flavonoidi → saggio specifico con AlCl<sub>3</sub>





I salami T1 e T2 sono stati prodotti aggiungendo la polvere P1, i salami C3 e C4 sono i salami di controllo





# ETICHETTA NUTRIZIONALE

	Frazione proteica (%)	Frazione lipidica (%)	H <sub>2</sub> O (%)
T1	36,75 ± 2,65	36,41 ± 2,88	20,80 ± 0,69
T2	34,19 ± 1,91	38,43 ± 0,13	19,51 ± 2,34
C3	39,56 ± 2,52	33,95 ± 2,07	22,07 ± 0,28
C4	34,40 ± 1,69	37,87 ± 2,31	16,88 ± 2,96

↓  
metodo Kjeldhal



↓  
estrattore Soxhlet



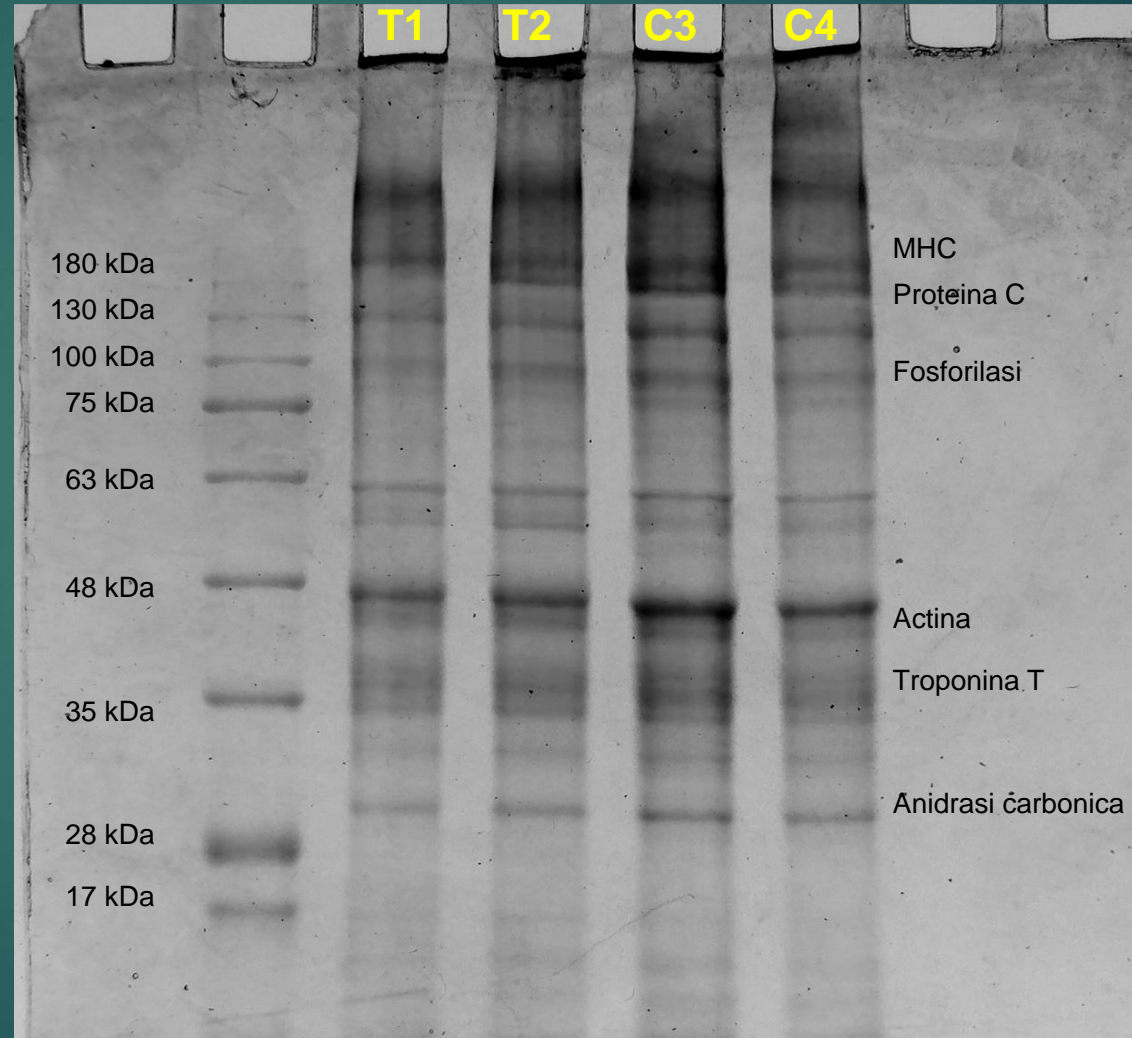
↓  
termobilancia



## FRAZIONE PROTEICA 1

### Valutazione dei processi della proteolisi primaria

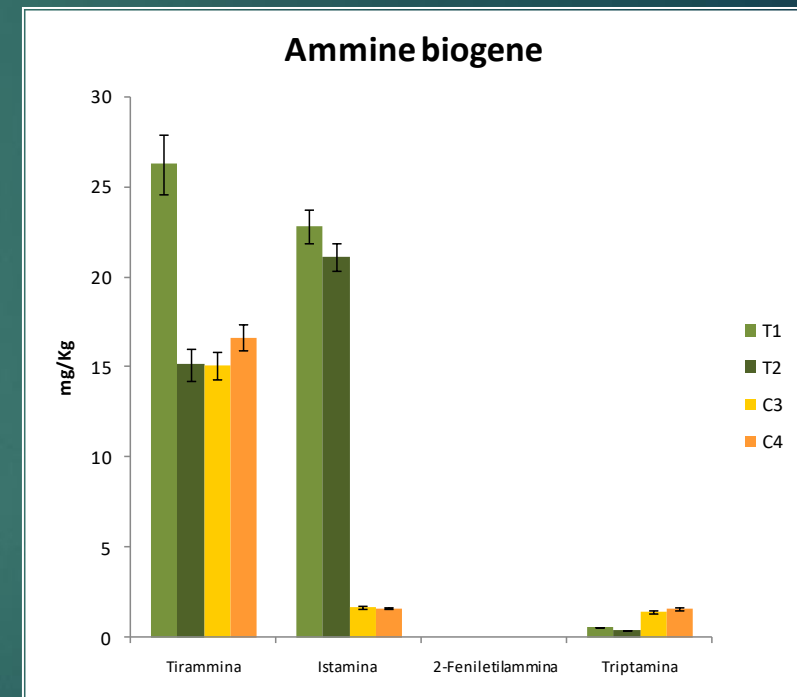
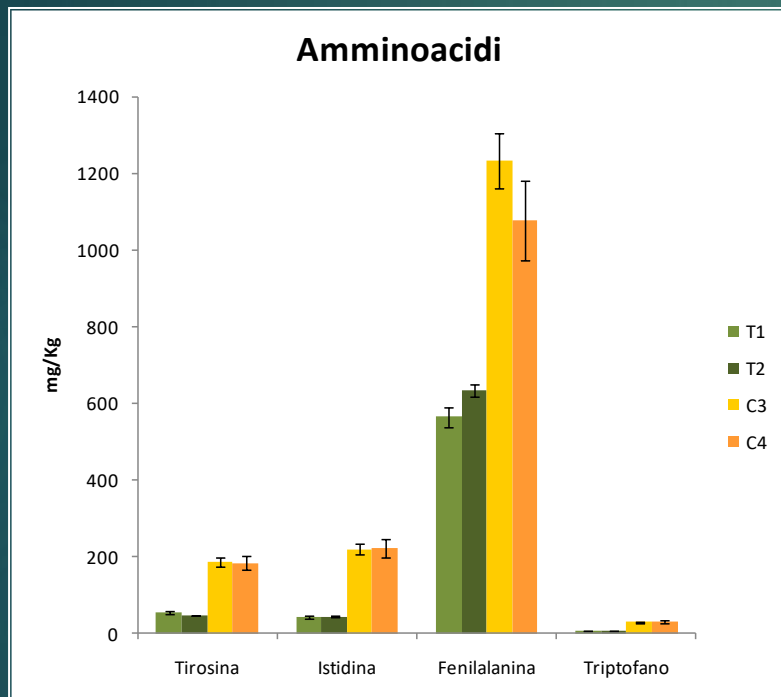
Elettroforesi monodimensionale  
mediante SDS-PAGE



HPLC-UV

Valutazione dei processi di proteolisi secondaria

Valutazione della formazione di ammine biogene



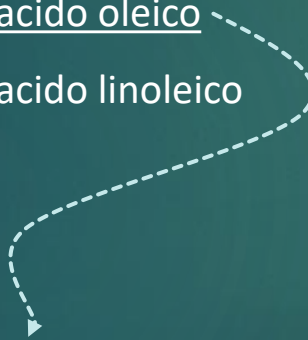
# FRAZIONE LIPIDICA 1

GC-FID

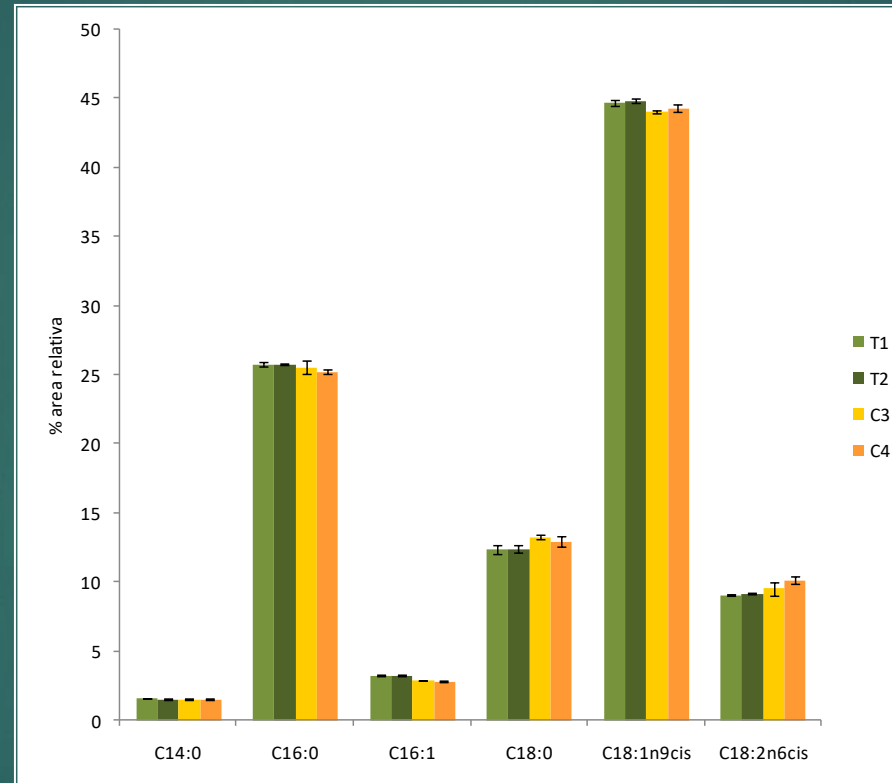


## Composizione in acidi grassi

- C14:0 → acido miristico
- C16:0 → acido palmitico
- C16:1 → acido palmitoleico
- C18:0 → acido stearico
- C18:1n9cis → acido oleico
- C18:2n6cis → acido linoleico



acido grasso presente in maggior quantità

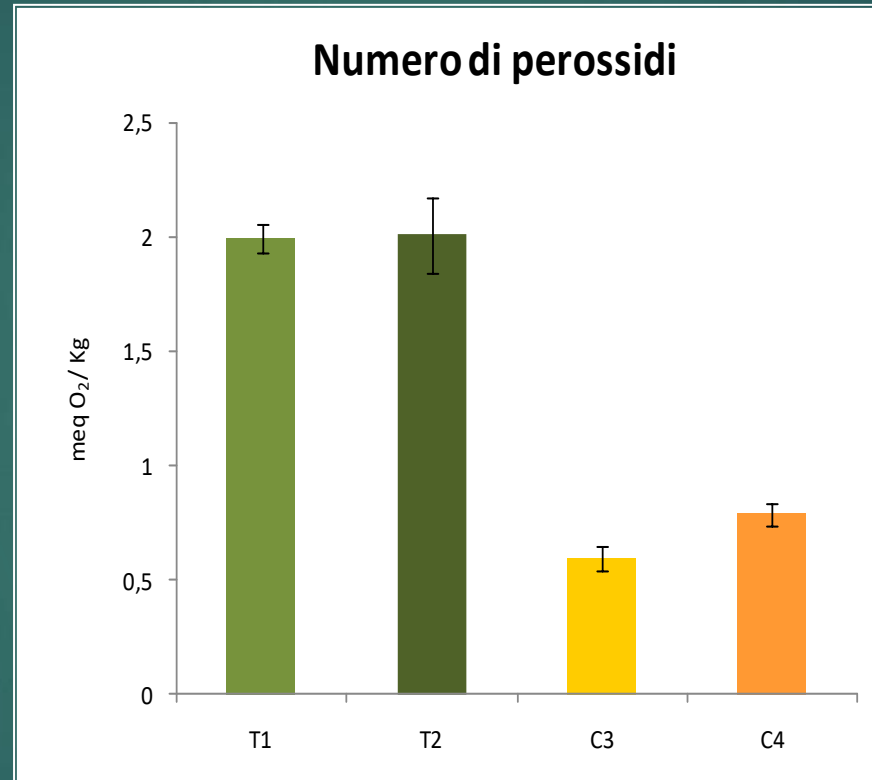


<b>Grassi totali</b>	<b>36,6 %</b>
saturi	15,1 %
insaturi	21,5 %

valori ottenuti dalla media dei 4 campioni

## Ossidazione lipidica

Metodo spettrofotometrico, sfrutta l'ossidazione del Fe(II)

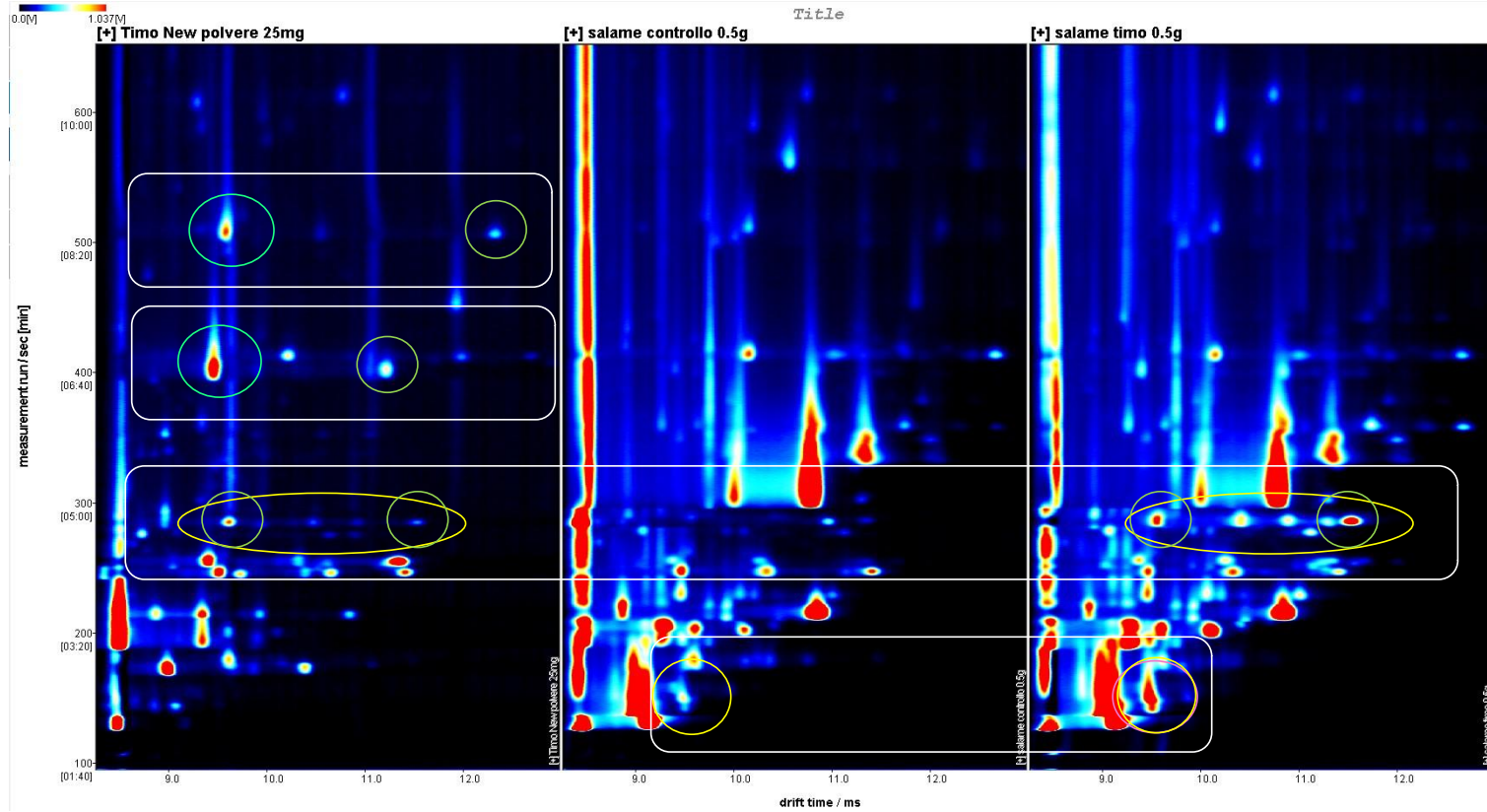


	meq O <sub>2</sub> / Kg di lipide
<b>T1</b>	1,99 ± 0,06 <sup>a</sup>
<b>T2</b>	2,01 ± 0,16 <sup>a</sup>
<b>C3</b>	0,59 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b>C4</b>	0,79 ± 0,05 <sup>b</sup>

prodotti dell'ossidazione primaria

radicali perossidici e idroperossidi

# ANALISI FRAZIONE VOLATILE TRAMITE GC-IMS



POLVERE TIMO

SALAME CONTR.

SALAME CON TIMO

**(E)-2-esenale**  
Sx monomero  
Dx dimero

**2,3 butandiolo**  
Sx monomero  
Dx dimero

**Pentanale**  
Sx monomero  
Dx dimero

**Alcol isopropilico**  
Solo monomero



1. Il trattamento *spray drying* non riduce le concentrazioni di polifenoli
2. Minime variazioni nella composizione della frazione lipidica e della frazione proteica del salume
3. Riduzione dei processi di proteolisi secondaria

Impatto aromatico, di sapore e di colore del prodotto non accettabile alle concentrazioni necessarie, non si è potuto procedere oltre con le fasi di produzione.

# WORKFLOW - PROSCIUTTO

FASE 1:  
RICERCA DI ESTRATTI VEGETALI  
CON COLORE OTTIMALE

FASE 2:  
FORMULAZIONE E/O CARATTERIZZAZIONE

FASE 3: APPLICAZIONE DELL'INGREDIENTE  
INNOVATIVO (Agenform/Laboratorio Camera  
di Commercio)



REGIONE  
PIEMONTE

FEASR - Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale  
*L'Europa investe nelle zone rurali*

**Programma di sviluppo rurale 2014-2020**

Misura 16 – Innovazione e Cooperazione  
Operazione 16.1.1 Costituzione, Gestione e Operatività  
dei Gruppi Operativi del Pei-Agri

**Salumi Liberi**  
*Progetto per la riduzione dei nitrati/nitriti nei prodotti di salumeria e nel prosciutto cotto*

Costo complessivo: € 567.321,85  
Contributo pubblico concesso: € 453.857,48  
di cui quota FEASR: €195.703,35



[www.regione.piemonte.it/svilupporurale](http://www.regione.piemonte.it/svilupporurale)





# SELEZIONE MATRICE

<b>matrice</b>	<b>Fonte</b>
<b>Patata viola</b>	Prodotto MBMed
<b>Carota nera</b>	Ottenuto per spray dry
<b>Mirtillo blu (<i>V. corymbosum</i>)</b>	Ottenuto per spray dry su scarto da lavorazione succhi
<b>Mirtillo viola (<i>V. myrtillus</i>)</b>	Prodotto MBMed
<b>Barbabietola</b>	Prodotto commerciale

# PRODUZIONE ESTRATTO : un esempio



Estratto di carota ottenuto

Allontanamento della maggior parte  
dell'etanolo tramite evaporatore  
rotante

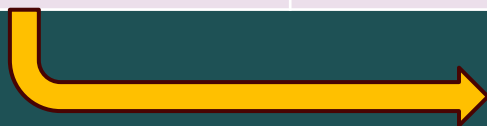
Aggiunta di maltodestrine come agente  
stabilizzante in rapporto 50:50 (50%  
MD e 50% residuo secco)

Atomizzazione allo spray drier  
mantenendo la soluzione in agitazione  
magnetica

- Temperatura in entrata: 150° C
- Temperatura in uscita: 79° C
- Aspirazione: 100% (40 m<sup>3</sup>/h)
- Pompa peristaltica: 0,25%  
( flusso= 7,5 mL7min)



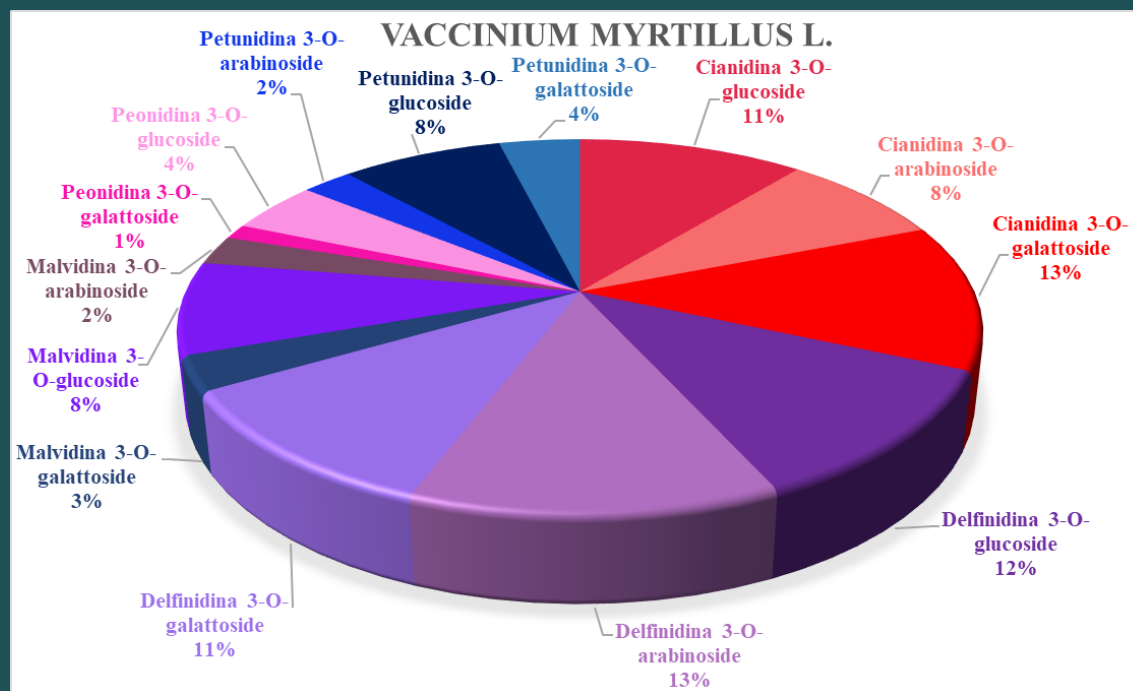
	<b>Polifenoli totali</b> (mg catechina/g campione)	<b>Antociani totali</b> (mg C3GE/g campione)	<b>Potere antiossidante</b> (mg TE/g campione)
<b>Patata viola</b>	23,4 ± 0,5	8,2 ± 0,1	11,5 ± 0,2
<b>Carota nera</b>	62,1 ± 2,5	13,5 ± 0,3	117 ± 4
<b>Mirtillo blu</b>	12,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	3,5 ± 0,4
<b>Barbabietola</b>	22,5 ± 1,0	-	17,0 ± 0,3



3500 mg/Kg di nitrati

# CARATTERIZZAZIONE POLVERE MIRTILLO VIOLA

Polifenoli totali (mg catechina/g campione)	Antociani totali (mg C3GE/g campione)	Antociani monomerici (mg C3GE/g campione)	Proantocianidine (mg PAC/g campione)	Potere antiossidante (mg TE/g campione)
<b>341 ± 3</b>	<b>226 ± 2</b>	<b>216 ± 6</b>	<b>0,850 ± 0,016</b>	<b>556 ± 8</b>



## VALUTAZIONE EFFETTO MATRICE (CON PROSCIUTTO CONTROLLO)

	<b>Antociani totali</b> (mg C3GE/g campione)	<b>Antociani monomerici</b> (mg C3GE/g campione)	<b>Potere antiossidante</b> (mg TE/g campione)
<b>Campione con E250 + polvere mirtillo t0</b>	0,69 ± 0,10	0,60 ± 0,06	23,1 ± 0,7
<b>Campione con E250 + polvere mirtillo t5</b>	0,73 ± 0,06	0,62 ± 0,06	24,16 ± 0,93
<b>Campione no nitrito + polvere mirtillo t0</b>	1,22 ± 0,06	1,10 ± 0,08	18,115 ± 1,03
<b>Campione no nitrito +polvere mirtillo t5</b>	1,95 ± 0,06	1,36 ± 0,05	17,7 ± 1,7



## Selezione dell'estratto di mirtillo

- Colorazione ottimale al pH
- Elevata attività antiossidante
- Compatibilità con la matrice

# RINGRAZIAMENTI

HANNO COLLABORATO ALLO SVOLGIMENTO DELLE ATTIVITA' SPERIMENTALI PRESENTATE



Prof. Marco ARLORIO  
Dott. Matteo BORDIGA  
Dott. Alessandro CANDIANI  
Prof. Jean Daniel COÏSSON  
Dott. Antonio COLASANTO  
Dott.ssa Arianna COLLI  
Dott.ssa Valeria FOCHI  
Dott. Nicolò LACCHIO  
Prof.ssa Monica LOCATELLI  
Dott.ssa Chiara RAGAZZI  
Prof.ssa Lorena SEGALE  
Prof. Fabiano TRAVAGLIA



Grazie per  
l'attenzione!



TECHLAB

