

***Azione 1.1.5 “Sostegno all’avanzamento tecnologico delle imprese attraverso il finanziamento di linee pilota e azioni di valutazioni su larga scala”
PO FESR Sicilia 2014-2020***

**Progetto di ricerca
“Nuovi prodotti dalla trasformazione agroindustriale di
frutti da colture mediterranee e gestione sostenibile dei
sottoprodotti - MedFruit”**

Università di Catania

Allegato 7:

“Valutazione dell'attività antiossidante dei succhi”

- **Università degli Studi di Catania**
- **Università degli studi di Palermo**
- **Citrech snc**
- **Polara s.r.l.**

Caratterizzazione di succhi, puree da fico d'india e melograno

Indice delle attività:

- 1) Determinazione del contenuto in composti antiossidanti di puree e concentrati da melagrana e fico d'India;
- 2) Attività antiossidante di succhi concentrati di melagrana e fico d'India attraverso metodo ORAC;
- 3) Caratterizzazione di succhi concentrati e sciroppi da melagrana, arancia e fico d'India per la formulazione di un a bibita funzionale.

1) Determinazione del contenuto in composti antiossidanti di puree e concentrati da melagrana e fico d'India

Per la produzione delle puree e dei succhi sono state utilizzate circa 20 tonnellate di frutta. La Tabella 1, riporta i campioni prodotti e successivamente analizzati.

Il valore di Brix accanto al nome del succo esprime la diversa concentrazione del campione.

I campioni sono stati suddivisi in diverse aliquote, filtrati con carta filtro all'interno di tubi da 50 mL e subito congelati per le successive analisi.

Tutte le analisi sono state condotte presso il Laboratorio Tecnologie Alimentari del Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente (Di3A) dell'Università degli Studi di Catania.

Tabella 1. Campioni di puree e succhi sottoposti ad analisi

Codice campione	Purea o succo ottenuto dal frutto di
Purea naturale FD (418 LV)	Fico d'india
Purea naturale FD (415 LV)	Fico d'india
Purea naturale FD (411 LV)	Fico d'india
Purea naturale FD (404 LV)	Fico d'india
Purea naturale FD (2307 LV)	Fico d'india
Purea naturale FD (2065 LV)	Fico d'india
Purea naturale FD (2060 LV)	Fico d'india
Purea FD (2291 LV)	Fico d'india
Succo di FD limpido conc. Brix	Fico d'india
Conc limp FD 55 Brix (2350 LV)	Fico d'india
Conc limp FD 55 Brix (2336 LV)	Fico d'india
Conc limp FD 55 Brix (2309 LV)	Fico d'india
Conc limp FD 55 Brix (2305 LV)	Fico d'india
Conc limp FD 55 Brix (2283 LV)	Fico d'india
Conc limp FD 55 Brix (2256 LV)	Fico d'india
Conc limp FD 55 Brix (2211 LV)	Fico d'india
Conc limp FD 55 Brix (2193 LV)	Fico d'india
Conc limp FD 55 Brix (2118 LV)	Fico d'india
Conc limp FD 55 Brix (1801 LT)	Fico d'india
Succo di melagrana BX65 prod 03_12_19	Melograno
Succo di melagrana BX65 prod 06_11_19	Melograno
Succo di melagrana BX65 prod 14_11_19	Melograno
Succo di melagrana BX65 prod 20_11_19	Melograno
Succo di melagrana concentrato BRIX 65	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_001	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_002	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_003	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_004	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_005	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_006	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_007	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_008	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_009	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_010	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_011	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_012	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_013	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_014	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_015	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_016	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_017	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_018	Melograno
Succo di melagrana NFC MG_AG_019	Melograno
Succo di melagrana parfianka NFC MG_AG_020	Melograno

*NFC= not from concentrate

Attività antiossidante dei succhi di fico d'india e di melograno attraverso saggio del DPPH

La valutazione dell'attività antiossidante dei campioni sopra citati (Tabella 1) è stata determinata attraverso il metodo del DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) che prevede la misurazione spettrofotometrica della variazione di assorbanza della soluzione di DPPH dopo reazione con un composto antiossidante.

Il DPPH è un radicale libero relativamente stabile con colorazione viola che ha un picco di assorbimento a 500 nm. Quando un composto antiossidante trasferisce un atomo di idrogeno al radicale, causa una decolorazione della soluzione. Si analizza, quindi, all'UV-Vis la diminuzione del picco a 515 nm del radicale (DPPH) dopo un tempo di incubazione prestabilito. Questa diminuzione (decolorazione) è proporzionale alla carica antiossidante presente nel campione.

L'analisi è stata svolta in cuvette di quarzo utilizzando la seguente miscela: 3 ml di DPPH 50 µl di estratto liquido.

I campioni sono stati lasciati ad incubare al buio per 60 minuti. Successivamente è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 515 nm.

I concentrati limpidi invece registrano il valore di attività antiossidante più basso di 0.60 (mg trolox/L campione), mentre quello più alto di 1.23 (mg trolox/L campione).

I concentrati limpidi hanno dimostrato maggior capacità antiossidante, le puree invece, come per il contenuto di polifenoli, hanno riportato valori molto più bassi rispetto ai concentrati limpidi, sempre dovuto ad un maggiore contenuto in fibre e altri composti. Tali valori, oltre ad essere influenzati dalla concentrazione del succo stesso possono essere determinati, anche se in misura minore, dalle diverse aree di produzione del frutto e dalle diverse pratiche colturali. Cova et al (2015) riporta come, i frutti di fico d'India cresciuti in Sicilia ad altitudini più elevate, esposte direttamente ai raggi ultravioletti del sole, presentino un contenuto più elevato in polifenoli totali e più alti valori di acidità e attività antiossidante.

Risultati

Attività antiossidante dei succhi di fico d'india

L'attività antiossidante di puree e succhi di fico d'india è riportata in figura 10, i risultati ottenuti sono stati espressi come mg di Trolox /L di campione.

I succhi di fico d'india analizzati hanno mostrato valori variabili, in funzione del campione analizzato. Le puree hanno, infatti, registrato valori più bassi in confronto ai concentrati limpidi e ai succhi limpidi. I valori di attività antiossidante per le puree di fico d'india hanno registrato il valore più basso di 0.22 (mg trolox/L campione) ed il valore più alto di 0.52 (mg trolox/L campione).

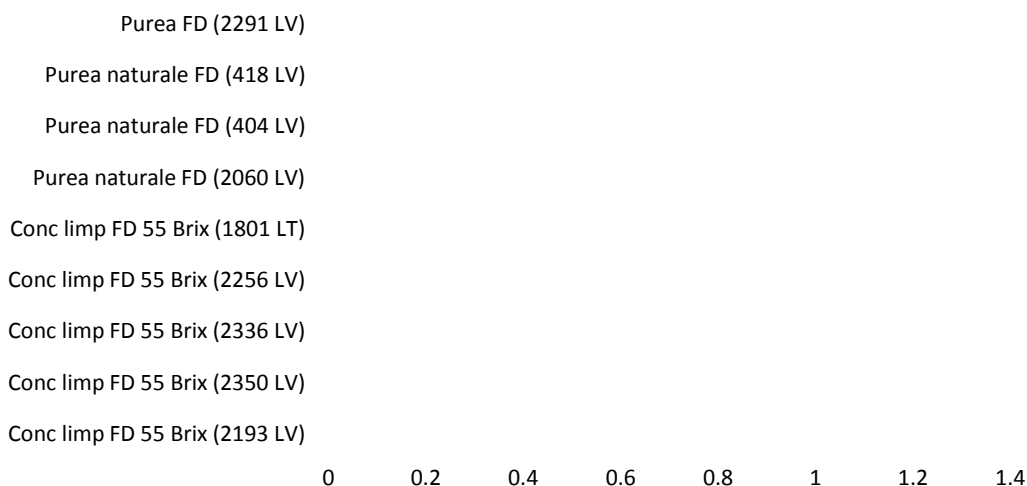


Figura 1. Attività antiossidante nei succhi di fico d'india

Attività antiossidante dei succhi di melagrana

La Figura 2 riporta i valori di attività antiossidante dei succhi di melograno, valutata attraverso il saggio del DPPH. I succhi di melograno, hanno registrato valori di attività antiossidante nettamente superiori in confronto a quelli di fico d'india. Il valore di attività antiossidante più basso è stato di 5.1 (mg trolox/L campione), mentre quello più alto è stato di 27.1 (mg trolox/L campione), quest'ultimo registrato in un succo concentrato a 66 °Brix. Gil et al. (2000), nello studio su attività antiossidante del frutto, utilizzando i metodi ABTS e DPPH, ha confrontato l'attività antiossidante del succo di melograno con vino rosso e tè verde ed ha ottenuto valori di attività antiossidante pari al doppio nei succhi di melograno in confronto a questi due alimenti. L'attività era inferiore nel succo preparato da arilli congelati, dimostrando che durante il processo di congelamento alcuni composti antiossidanti vengono degradati o trasformati, ma questo succo mostrava ancora un'attività antiossidante superiore rispetto al vino rosso e al tè verde.

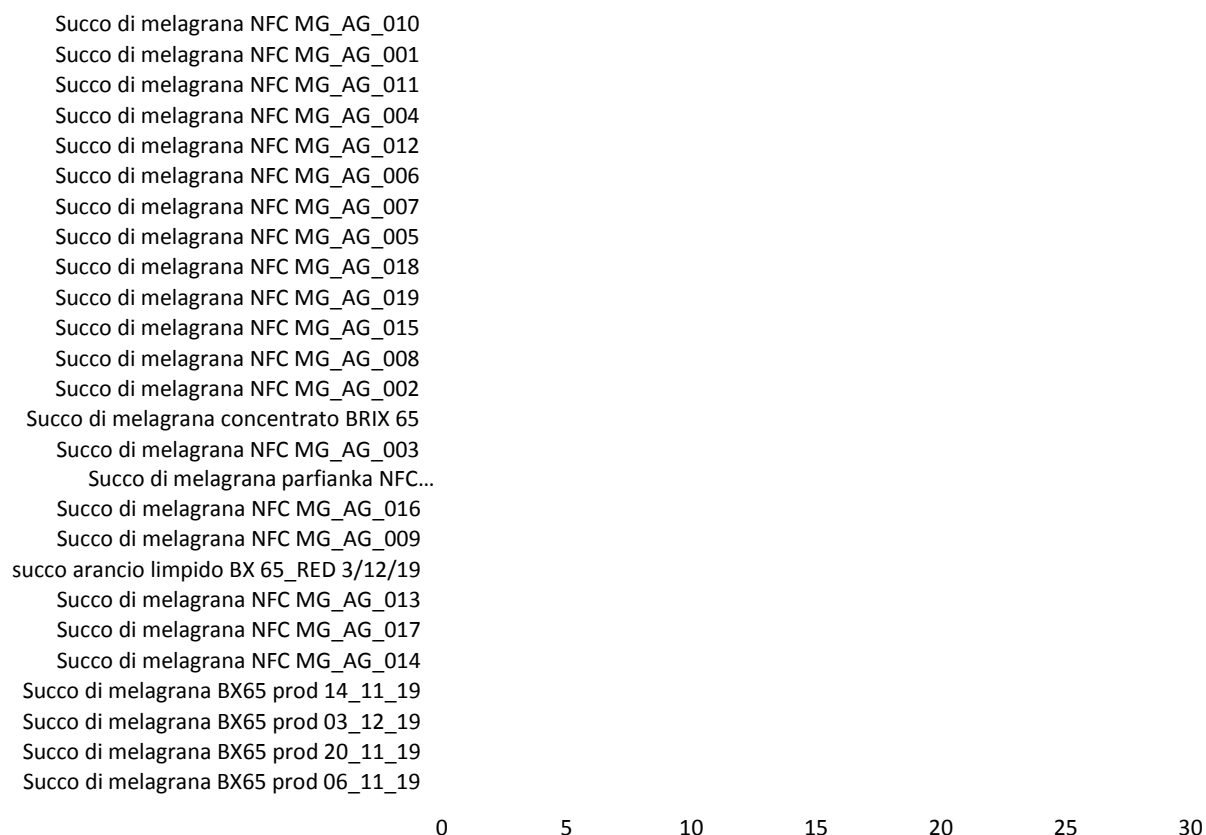


Figura 2. Attività antiossidante nei succhi di melagrana

2) Attività antiossidante di succhi concentrati di melagrana e fico d'India attraverso metodo ORAC

Il test ORAC misura l'inibizione delle ossidazioni indotte dai radicali perossilici, riflette la misura di attività antiossidante mediante trasferimento di atomi di H. I radicali perossilici, generati dal 2,2'-azobis (2-amidinopropano) diidro-cloruro (AAPH), reagiscono con una sonda fluorescente per formare un prodotto non fluorescente, che può essere facilmente quantificato mediante fluorescenza. Sui diversi campioni allo studio è stato eseguito un test ORAC automatizzato su un analizzatore spettrofluorometrico Wallac 1420 (Perkin Elmer, Turku, Finlandia; lunghezza d'onda di eccitazione = 485 nm e filtro di emissione = 515 nm), sulla base di una procedura modificata proposta da Ou et al. (2001). La fluoresceina era la molecola bersaglio dell'attacco dei radicali liberi da AAPH. La reazione è stata condotta in tampone fosfato (pH 7,4) a 37 °C. Venti µL, di ciascun campione opportunamente diluito, e 120 µL di fluoresceina sono stati miscelati nella microplate e pre-incubati per 10 min. Sono stati quindi aggiunti 60 µL di soluzione AAPH e la fluorescenza è stata registrata per 60 min a lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione di 485 e 530 nm, rispettivamente. Come standard è stato utilizzato un campione bianco contenente 20 µL di tampone fosfato e Trolox (10 µM). Tutte le soluzioni sono state preparate al momento prima dell'analisi. Tutti i campioni sono stati

diluiti con tampone (1: 200, v/v) prima dell'analisi ei valori ORAC sono stati espressi come mmol di Trolox equivalenti (TE) per mL di succo utilizzando la curva standard stabilita in precedenza.

I risultati mostrano che

In entrambi i succhi di fico d'india i ritentati hanno valori significativamente più elevati rispetto a permeato e feed. Lo stesso non si può dire per i succhi di melagrana, che mostrano invece uno (MELAGRANA MV 020T 27/07/20) valori più elevati nella frazione feed, l'altro (MELAGRANA NF99 17/06/20) nel ritentato. I campioni di MELAGRANA MV 020T 27/07/20 non mostrano differenze significative per le diverse frazioni.

CAMPIONE	TRATTAMENTO/FRAZIONE	ORAC
Fico d'india MV 020T 12/06/20	FEED	3068
	PERMEATO	3092
	RITENTATO	3808
Fico d'india NF99 17/06/20	FEED	3514
	PERMEATO	--
	RITENTATO	6886
MELAGRANA MV 020T 27/07/20	FEED	10177
	PERMEATO	9925
	RITENTATO	9309
MELAGRANA NF99 17/06/20	FEED	1454
	PERMEATO	222
	RITENTATO	4858
NF99 25/06/20	FEED	1462
	PERMEATO	--
	RITENTATO	4671
UV 150T 13/05/20	FEED	2355
	PERMEATO	2241
	RITENTATO	1975

* Antioxidant capacities TE (Trolox equivalents)

3) Caratterizzazione di succhi concentrati e sciroppi da melagrana, arancia e fico d'India per la formulazione di un a bibita funzionale

MATERIALI E METODI

Determinazione del contenuto in composti bioattivi, attività antiossidante e vitamina C deisucchi concentrati di arancia rossa, melagrana e fico d'India

I succhi concentrati di arancia rossa, melograno e fico d'India, forniti dalla Citrech sono stati caratterizzati e utilizzati per la preparazione di tre formulazioni per lo sviluppo di una bibita funzionale. I succhi presentano il seguente valore in °Brix: arancia rossa 65, melagrana 65 e fico d'India 54.

Polifenoli totali

Il contenuto di polifenoli totali è stato determinato utilizzando il metodo Folin–Ciocalteau (Vazquez-Roncero et al., 1973).

Ciascun campione è stato miscelato con 1,25 mL di reagente Folin–Ciocalteau (FC), successivamente sono stati aggiunti 2,5 mL di carbonato di sodio al 20% (Na_2CO_3).

La miscela è stata portata ad un volume finale di 25 mL e lasciata reagire al buio per 1 h. Dopo il periodo di incubazione, l'assorbanza è stata misurata spettrofotometricamente a 725 nm, utilizzando lo spettrometro UV-Vis lambda 25 Perkin Elmer, e i risultati sono stati espressi in mg/mL.

Antocianine

Per il succo d'arancia rossa la determinazione delle antocianine è stata condotta mediante il metodo del pH differenziale (Rapisarda et al, 1994). Due aliquote di campione sono state poste in due matracci; un matraccio è stato portato a volume con una soluzione a pH 1,0 e un'altra con una soluzione a pH 4,5. Dopo un periodo di incubazione al buio per un'ora è stata misurata l'assorbanza a 510 nm utilizzando lo spettrometro UV-Vis lambda 25 Perkin Elmer. La concentrazione delle antocianine nel succo è stata calcolata applicando la seguente formula:

$$C \left(\frac{mg}{l} \right) = \frac{(Abs_{pH1} - Abs_{pH4,5}) \times PM \times fd \times 1000}{\epsilon}$$

Dove:

Abs pH 1,0 = assorbanza della soluzione a pH 1,0

Abs pH 4,5 = assorbanza della soluzione a pH 4,5

PM = 484,82 (peso molecolare della cianidina-3-glucoside)

fd = fattore di diluizione

ϵ = 24800 (L·cm⁻¹·mol⁻¹) (coefficiente di estinzione molare della cianidina-3-glucoside)

Per il succo di melograno la determinazione delle antocianine è stata condotta mediante il metodo del pH differenziale (Rodriguez-Saona et al., 2004). Per ogni campione di prova, sono state preparate due diluizioni: uno con tampone cloruro di potassio (pH 1,0) e l'altro con tampone acetato di sodio (pH 4,5). Questi sono stati lasciati ad incubare per 15 min a temperatura ambiente e successivamente, l'assorbanza di ciascun campione è stata letta a 510 nm e a 700 nm. Tutte le misurazioni dell'assorbanza sono state eseguite utilizzando lo spettrofotometro UV-Vis lambda 25 Perkin Elmer. L'assorbanza (A) è stata calcolata applicando la seguente formula:

$$A = (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH1} - (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH4,5}$$

La concentrazione delle antocianine nel succo è stata calcolata applicando la seguente formula:

$$C \left(\frac{mg}{l} \right) = \frac{A \times M \times DF \times 1000}{\epsilon \times l}$$

Dove:

A = assorbanza calcolata precedentemente

M = 449,2 (massa molare della cianidina-3-glucoside)

DF = fattore di diluizione

ϵ = 26,900 (L·cm⁻¹·mol⁻¹) (coefficiente di estinzione molare della cianidina-3-glucoside)

l = lunghezza cuvette

Betalaine

Per il succo di fico d'India le betacianine e le betaxantine sono state valutate in accordo con Ruiz-Gutierrez et al. (2015). I campioni opportunamente diluiti sono stati analizzati spettrofotometricamente a 536 nm e 481 nm, rispettivamente per betacianina e betaxantina, utilizzando il peso molecolare (PM) e il coefficiente di estinzione molare (ϵ) in acqua di betanina (PM = 550 g / mol; ϵ = 60.000 L·cm⁻¹·mol⁻¹) e indicaxantina (PM = 308 g / mol; ϵ = 48.000 L·cm⁻¹·mol⁻¹).

Attività antiossidante

I campioni sono stati analizzati per la loro attività antiossidante utilizzando il metodo descritto da Brand-Williams et al. (1995). Il test è stato condotto come descritto in precedenza per i campioni al punto 1.

Vitamina C

La quantità di vitamina C è stata determinata per ogni succo mediante una titolazione iodimetrica diretta. La soluzione titolante è la soluzione di Lugol (I₂/I⁻), le soluzioni da titolare, che contengono acido ascorbico in incognito, sono i succhi concentrati, mentre l'amido svolge da indicatore (in presenza di I₃⁻ forma un complesso bluastro). La determinazione prevede due titolazioni: la prima

titolazione su una soluzione di acido ascorbico a titolo noto (soluzioni standard); la seconda sui campioni con quantità non nota di acido ascorbico.

La quantità di vitamina C viene calcolata secondo la seguente formula:

$$g \text{ di acido ascorbico nel campione} = mL \text{ di Lugol utilizzati} \times \frac{g \text{ di acido ascorbico in standard}}{mL \text{ Lugol utilizzati per standard}}$$

Formulazione delle bibite

Presso l'azienda Bibite Polara s.r.l., sono state formulate tre bevande contenenti le stesse quantità di succo di melograno, fico d'India e arancia rossa, ma un diverso dolcificante. Inoltre, in tutte e tre i formulati è stata utilizzata la medesima quantità di acido citrico, sodio benzoato, coloranti e aromi. La preparazione delle bibite ha previsto due fasi principali: la prima fase ha previsto la preparazione di uno sciroppo di 200 mL seguendo il dosaggio degli ingredienti riportati in tabella 1; mentre la seconda è stata realizzata diluendo lo sciroppo con acqua fino ad ottenere 1 litro di bevanda.

Tabella 1 – Formulazione degli sciroppi

		SCIROPPO		
		1° FORMULAZIONE	2° FORMULAZIONE	3° FORMULAZIONE
	H2O	100,27 g	61 g	61 g
zucchero	saccarosio	95 g	47,5 g	47,5 g
	zucch. Arancia	X	73 g	73 g
	maltitolo	X	X	14,6 g
	acido citrico	1 g	1 g	1 g
	sodio benzoato	0,15 g	0,15 g	0,15 g
succo	arancia rossa	18,96 g	18,96 g	18,96 g
	melograno	12,8 g	12,8 g	12,8 g
	fico d'India	13,25 g	13,25 g	13,25 g
colorante	vegetable blend	0,8 g	0,8 g	0,8 g
	carota nera	0,4 g	0,4 g	0,4 g
aroma	melograno	0,02 g	0,02 g	0,02 g
	arancia rossa	0,04 g	0,04 g	0,04 g

Determinazioni chimico-fisiche

Determinazione dell'umidità relativa e residuo secco

La percentuale di sostanza secca (RS%) è stata determinata essiccando il campione a 105°C fino a peso costante con un bilancio elettronico dell'umidità (Eurotherm, Gibertini®, Novate Milanese, Italia). I valori sono stati determinati su due repliche indipendenti per ciascun campione, costituite da 10 g di prodotto. Il valore finale è stato espresso come media dei risultati di ognuna delle due repliche $\pm$ deviazione standard.

Determinazione del pH, dell'acidità titolabile e °Brix

Il pH è stato misurato utilizzando un pHmetro Eutech pH 700 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e posizionando una sonda pH (Eutech pH 700 Meter) direttamente nei campioni da analizzare.

L'acidità libera, espressa come acido citrico (%) è stata determinata su 25 mL dei campioni diluiti con acqua distillata e titolati con NaOH (0,1 N) fino a pH 8,1.

L'acidità % è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$Ac\% = (ml\ usati\ per\ titolare \times 0,64)/10$$

Il contenuto di solidi solubili di ciascun campione è stato determinato utilizzando un rifrattometro ed espresso come °Brix.

I valori sono stati determinati su tre repliche e il risultato espresso come media dei tre valori $\pm$ la deviazione standard.

Composti bioattivi, attività antiossidante e vitamina C

I composti bioattivi, l'attività antiossidante e la vitamina C delle diverse bibite, formulate come ripotato in **tabella 1**, sono stati valutati con i metodi precedentemente descritti per i succhi concentrati.

Analisi del colore

Le differenze di colore tra i campioni sono state analizzate utilizzando un colorimetro portatile Konica Minolta CM-2500d (Brema, Germania).

Il colore è stato valutato secondo il sistema CIELAB prendendo in considerazione le coordinate L*, a* e b*, dove:

- L*: indica la luminosità e può assumere valori che vanno da 0 a 100;
- a*: indica la tendenza del colore che va dal verde al rosso; assume valori negativi quando il colore del campione tende più al verde, valori positivi quando il colore del campione tende più al rosso;
- b*: indica la tendenza del colore che va dal blu al giallo; assume valori negativi quando il colore del campione tende più al blu, valori positivi quando il colore del campione tende più al giallo.

I risultati sono stati espressi come media di sei letture $\pm$ deviazione standard.

RISULTATI

Valutazione dei composti bioattivi e dell'attività antiossidante dei succhi utilizzati per la preparazione degli sciroppi

Polifenoli

Come si evince dalla **Figura 3.1**, il succo concentrato di melograno, in confronto ai succhi concentrati di fico d'India e arancia rossa presenta il maggior contenuto di polifenoli. I valori rilevati nel succo concentrato di melograno sono di 12.45 ± 1.17 mg di acido gallico equivalenti/mL di campione (mg GAE/mL), mentre i succhi concentrati di arancia rossa e fico d'India hanno rivelato rispettivamente valori di 4.84 ± 0.42 e 2.97 ± 0.14 (mg GAE/mL). La tecnologia di concentrazione ha permesso di ottenere dei succhi con contenuto in polifenoli totali superiore in confronto ai succhi non concentrati.

Figura 3.1 - Contenuti in polifenoli totali dei campioni di succhi concentrati.

Antocianine

La **Figura 2.1** mostra come varia il contenuto in antocianine nei campioni concentrati di succo di arancia rossa e di melograno. Il contenuto in antocianine nei campioni di succhi di arancia rossa è pari a 80.5 ± 20 mg/L, mentre quello rivelato nel succo di melograno è pari a 1585.14 ± 441 mg/L.

Figura 2.1 - Contenuto in antocianine nei succhi concentrati di arancia rossa e melograno

Betalaine

La **figura 3.3** riporta il contenuto in betanina e indicaxantina nel succo concentrato di fico d'india.



Figura 3.3 - Contenuto in betanina e indicaxantina del succo concentrato di fico d'India.

Attività antiossidante

I tre succhi concentrati presentano valori molto variabili tra loro, e come si può dedurre dalla **Figura 3.4** il succo concentrato di melograno rivela la più alta attività antiossidante con un valore pari a 6.22 ± 0.09 (mg trolox/L). Il succo concentrato di arancia rossa presenta un valore pari a 3.40 ± 0.17 (mg trolox/L), mentre il succo concentrato di fico d'India presenta la più bassa attività antiossidante con un valore pari a 0.59 ± 0.27 (mg trolox/L).

Figura 3. 4 - Attività antiossidante dei succhi concentrati

Vitamina C

La **Figura 3. 5** mostra il contenuto in vitamina C dei campioni di succo di frutta.

Il succo concentrato di arancia rossa è quello che rivela il più alto contenuto di vitamina C, pari al 0.69 ± 0.02 %, mentre i succhi concentrati di fico d'india e di melograno presentano un contenuto in vitamina C simile tra loro e pari a $0.11 \pm 0.00\%$ e 0.12 ± 0.01 %, rispettivamente per il fico d'india e il melograno.

Le arance contengono un contenuto in Vitamina C molto elevato, che varia in funzione di diversi fattori come: la cultivar, lo stadio di maturazione, le condizioni pedoclimatiche ecc. (De ancós et al., 2020). Le arance fresche possono avere un contenuto in vitamina C variabile da 30 mg/100 mL a 60 mg/100 mL, ma i processi che portano a produrre un succo concentrato possono determinare la perdita di una grande quantità di questo composto (Lee & Coates, 2003; Stinco et al., 2012).

Considerando che i succhi da noi utilizzati sono stati concentrati almeno 5 volte, i campioni hanno presentato un elevato contenuto in Vitamina C (%).

Figura 3.5 - Contenuto in Vitamina C nei campioni di succhi di frutta

Valutazione dei formulati ottenuti

Le bibite ottenute (**Fig. 3.6**) utilizzando i succhi concentrati di arancia rossa, melograno e fico d'india, seguendo la formulazione riportata in **tabella 1**, sono state valutate per i principali parametri chimico-fisici e per il contenuto in composti bioattivi. Inoltre, la variazione del colore di ciascun formulato è stata valutata fino a 10 giorni di frigo conservazione.



Figura 3.6 - Formulazioni delle bibite ottenute

Valutazione delle proprietà chimico-fisiche

Residuo secco, °Brix, pH e acidità delle bibite formulate

La **Figura 3.7** evidenzia come le bevande formulate utilizzando la stessa quantità di succhi concentrati ma diversi dolcificanti (Tab. 1), presentano valori di residuo secco simili, sebbene la formulazione n°3 è quella che presenta il valore più elevato di RS%.

Figura 3.7 - Residuo secco di ciascuna bibita formulata utilizzando la stessa quantità di succhi concentrati, ma un diverso dolcificante.

In **Tabella 2** sono riportati i valori di °Brix, pH e acidità titolabile di ciascuna bibita. Tra tutte le formulazioni la 1° formulazione, in cui è presente il saccarosio come dolcificante, presenta valori di °Brix leggermente inferiori in confronto alle altre due. Nel complesso tutte le formulazioni mantengono valori stabili di °Brix durante tutto il periodo preso in esame. Il pH delle formulazioni ottenute si è mantenuto pressoché stabile fino a 5 giorni di conservazione, mentre dopo 10 giorni di conservazione tutte le bibite hanno evidenziato un lieve abbassamento dei valori di pH e un conseguente modesto aumento dell'acidità percentuale.

Tabella 1 - °Brix, pH e acidità delle bibite formulate

		1°	2°	3°
		FORMULAZIONE	FORMULAZIONE	FORMULAZIONE
°Brix	gg.			
	0	12.00±0.00	13.17±0.12	13.00±0.00
	3	11.87±0.32	13.23±0.15	13.03±0.06
	5	12.07±0.06	13.40±0.01	13.10±0.12
	10	12.17±0.06	13.40±0.01	12.87±0.00
pH	0	3.55 ± 0.01	3.49 ± 0.01	3.53 ± 0.02
	3	3.57 ± 0.01	3.51 ± 0.01	3.51 ± 0.01

Valutazione dei composti bioattivi, dell'attività antiossidante e della vitamina C

Polifenoli totali

Come si evince dalla **figura 8**, a presentare la più alta concentrazione di polifenoli è la prima formulazione con un valore pari a 0.32 (mg di acido gallico/ml di campione). La seconda e terza formulazione presentano valori pressoché simili, rispettivamente pari a 0.22 e 0.24 (mg di acido gallico/ml di campione). Tali valori di polifenoli totali, sono da considerarsi veramente elevati, soprattutto se paragonati a quelli presenti in una bibita commerciale. L'analisi dei polifenoli totali riscontrati in una bibita "Polara arancia rossa" ha infatti evidenziato come il contenuto in polifenoli totali sia pari a 0.06 (mg GAE/mL).

Figura 6 - Polifenoli totali delle bibite

Antocianine

Tra le tre formulazioni la seconda risulta essere quella con la più alta concentrazione di antocianine con un valore pari a 33 (mg GAE/ml), seguita dalla terza formulazione con un valore pari a 29 (mg GAE/ml). La prima formulazione presenta una concentrazione abbastanza più bassa rispetto alle altre, pari a 22 (mg GAE/ml). Ciò magari è dovuto al fatto che la sua composizione non prevede l'aggiunta di zucchero d'arancio a differenza delle altre due formulazioni (**Fig. 9**).

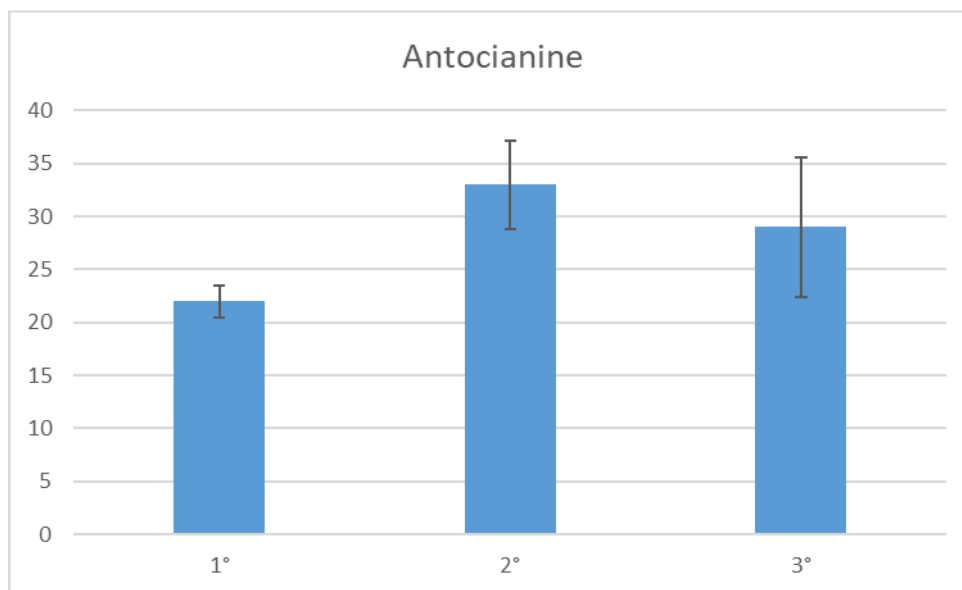


Figura 7 - Antocianine nelle bibite

Attività antiossidante

L'attività antiossidante è stata valutata in diversi giorni dal giorno di produzione, e precisamente al 3°, 5° e 10° giorno (**Fig. 10**). Tutte le formulazioni presentano lo stesso andamento: dal 3° al 5° giorno l'attività antiossidante di ciascun campione, rimane pressoché stabile, mentre dopo dieci giorni di conservazione si inizia ad evidenziare un forte decremento dell'attività antiossidante in tutti i campioni. In particolare, dopo tre giorni di conservazione, tra le tre formulazioni, la seconda mostra la più alta attività antiossidante con un valore pari a 0.64 (mg trolox/L campione), seguita dalla terza con un valore pari a 0.60 (mg trolox/L campione) e dalla prima con un valore pari a 0.56 (mg trolox/L campione). Tali valori dopo dieci giorni di conservazione si riducono rispettivamente a 0.20, 0.21 e 0.23 (mg trolox/L campione).

Le bibite formulate presentano dei valori davvero elevati di attività antiossidante, basti pensare che la stessa analisi condotta su un infuso di tè verde ci ha fornito valori di attività antiossidante pari a 0.64 mg/L di trolox equivalenti.

Figura 8 - Attività antiossidante delle bibite

Vitamina C

La **Figura 11** evidenzia il contenuto in vitamina C di ciascuna bevanda. Le formulazioni contenenti lo zucchero di arancia evidenziano valori più alti di vitamina C, rispettivamente di 0.53 ± 0.01 e 0.47 ± 0.07 per la seconda e la terza formulazione.

L'apporto in Vitamina C nelle bevande è sicuramente prevalentemente dato dall'utilizzo del succo concentrato di arance rosse che nonostante venga aggiunto a ciascuna formulazione in quantità leggermente inferiore al 2%, si ritrova in quantità relativamente elevata in ciascuna bevanda. Basti considerare infatti che, tale composto è molto suscettibile alle temperature, al pH, alla presenza di ossigeno e luce (Ball, 2004).

Figura 9 - Contenuto in Vitamina C delle bibite.

Valutazione del colore

Per tutte e tre le formulazioni è stata svolta l'analisi del colore immediatamente dopo la produzione e dopo dieci giorni di conservazione (**Fig. 12**). Per la coordinata L^* i valori più alti sono stati registrati per la prima e terza formulazione (rispettivamente 27,68 e 34,23) al giorno 0, i quali però subiscono una variazione al 10° giorno, nel dettaglio per la prima formulazione aumenta a 33,85, mentre per la terza formulazione diminuisce a 31,72. Il valore più alto di a^* si è riscontrato nella prima e terza formulazione, registrando un lieve aumento al 10° giorno (39,7 per la prima formulazione e 42,75 per la terza formulazione); mentre per la seconda formulazione si nota un evidente intensificarsi del colore rosso, che aumenta da un valore di 31,12 (giorno 0) a 40,16 (10° giorno). Per la coordinata b^* il valore più alto si registra per la prima formulazione (32,13), il quale si mantiene nel tempo. Invece, per la seconda e terza formulazione si riscontra un evidente aumento, rispettivamente da 19,42 a 30,94 e da 29,21 a 35,51.

Figura 10 - Valori di L*, a* e b* ottenuti dall'analisi del colore

References

- Ball, G.F.M. *Ball Vitamins: Their role in the human body* Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK (2004).
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.*, 28, 25–30.
- De Ancos, B, Rodrigo, MJ, Sánchez-Moreno, C, Cano, P, Zacarías, L. (2020). Effect of high-pressure processing applied as pretreatment on carotenoids flavonoids and vitamin C in juice of the sweet oranges 'Navel' and the red-fleshed 'Cara Cara'. *Food Research International* 132: 109105.
- Lee, H. S., & Coates, G. A. (1999). Thermal pasteurization effects on color of red grapefruit juices. *Journal of Food Science*, 64(4), 663-666.
- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49(10), 4619-4626.
- Rapisarda, P., Fallico, B., Izzo, R., & Maccarone, E. (1994). A simple and reliable method for determining anthocyanins in blood orange juices [Sicily]. *Agrochimica* (Italy).
- Rodriguez-Saona, L.E.; Wrolstad, R.E. F1-Anthocyanins. In *Handbook of Food Analytical Chemistry, Volume 2: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components*; Wrolstad, R.E., Acree, T.E., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D., Sporns, P., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2004; pp. 6–69. ISBN 978-0-471-70908-4.
- Ruiz-Gutiérrez, M.G.; Amaya-Guerra, C.A.; Quintero-Ramos, A.; Pérez-Carrillo, E.; Ruiz-Anchondo, T.d.J.; Báez-González, J.G.; Melendez-Pizaro, C.O. Effect of extrusion cooking on bioactive compounds in encapsulated red cactus pear powder. *Molecules* 2015, 20, 8875–8892.

Stinco, C. M., Fernández-Vázquez, R., Escudero-Gilete, M. L., Heredia, F. J., Meléndez-Martínez, A. J., & Vicario, I. M. (2012). Effect of orange juice's processing on the color, particle size, and bioaccessibility of carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(6), 1447-1455.

Vazquez-Roncero, A.; Janer del Valle, C.; Janer del Valle, M.L. Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas Aceites* 1973, 24, 350–355.