



UNIVERSITÀ DI PISA



Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali

Corso di Laurea Magistrale in Produzioni Agroalimentari e Gestione degli Agroecosistemi

Tesi di Laurea Magistrale

Effetto dell'integrazione della dieta di vitelloni Maremmani con lino estruso sull'ossidazione dei lipidi intramuscolari della carne refrigerata

Studentessa

Oriana Gava

Relatore

Prof. Marcello Mele

Correlatore

Prof. Guido Ferruzzi

Anno Accademico 2012 – 2013

RIASSUNTO

Le raccomandazioni di autorità sanitarie come l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Security Authority*, EFSA) e l'*American Heart Association* (AHA) indicano la necessità di ridurre i grassi alimentari, che nei paesi sviluppati raggiungono il 40% dell'energia totale giornaliera fornita dagli alimenti, in modo tale da non superare il 30% dell'apporto calorico giornaliero; allo stesso tempo, la percentuale di acidi grassi saturi (*Saturated Fatty Acids*, SFA) dovrebbe essere controllata, per non eccedere il 10% delle calorie giornaliere, mentre si ritiene utile incrementare il tenore di acidi grassi polinsaturi (*Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFA), allo scopo di aumentare il rapporto PUFA/SFA, portandolo a circa 0,4. Dal momento che molte delle carni reperibili sul mercato presentano valori del suddetto rapporto intorno a 0,1, tale alimento è stato spesso ritenuto tra i maggiori responsabili dello sbilanciamento del rapporto PUFA/SFA nella dieta del consumatore nei paesi sviluppati. Per questo motivo, negli ultimi anni, la ricerca nel settore zootecnico ha mostrato un crescente interesse nello studio e nello sviluppo di tecniche e sistemi di allevamento finalizzati al miglioramento della qualità della carne, in particolare per ciò che riguarda l'incremento dei PUFA, allo scopo di riequilibrare il suddetto rapporto. Sulla base di queste considerazioni, il presente lavoro di tesi origina da una ricerca finalizzata al miglioramento della qualità della carne bovina Maremmana, mediante l'incremento del contenuto in PUFA ω 3 nel grasso intramuscolare. A tal fine, la dieta degli animali, allevati secondo il sistema tradizionale basato su pascolo e finissaggio in *feedlot*, è stata integrata con una fonte ricca di acidi α -linolenico (*Alfa-Linoleic Acid*, ALA). In particolare, sono stati usati i semi di lino estruso che, in precedenti lavori (Luciano et al., 2013; Mele et al., 2013), si erano dimostrati efficaci nel miglioramento del profilo lipidico della carne. Scopo della tesi è stato quello di valutare la stabilità ossidativa del grasso intramuscolare della carne arricchita in condizioni di refrigerazione a 4° C per una durata di sei giorni. La valutazione del processo ossidativo, infatti, consente di avere un quadro completo degli aspetti nutrizionali di un alimento, in quanto alcuni prodotti dell'ossidazione lipidica possono pregiudicare la qualità del prodotto con ripercussioni negative sulla salute umana. Il presente lavoro di tesi è stato effettuato su campioni di carne di 20 vitelloni di razza Maremmana, metà ingrassati con una dieta contenente un mangime al 20% di semi di lino estrusi (gruppo S) e metà ingrassati con una dieta di controllo senza fonti grasse aggiunte (gruppo C). I campioni di muscolo *Longissimus dorsi* sono stati opportunamente macinati e disposti a forma di medaglioni (spessore 2 cm) in vaschette di PET (*Polyethylene Terephthalate*), coperti con pellicola alimentare in PE (*Polyethylene*) e conservati a 4°C in frigorifero. Sono stati valutati tre tempi di conservazione: Tempo 0, T0, (prodotto preparato al momento), Tempo 2, T2, (dopo due giorni di conservazione) e Tempo 6, T6, (dopo 6 giorni di conservazione). I campioni di carne a ciascun tempo di conservazione sono stati analizzati per la composizione chimica centesimale, il contenuto di acidi grassi totale e colesterolo, e per i principali prodotti di ossidazione: perossidi, dieni, prodotti reattivi alla malonaldeide (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, TBARs), acidità libera, prodotti di ossidazione del colesterolo (*Cholesterol Oxidation Products*, COPs), e la dotazione di antiossidanti, quali vitamina A e carotenoidi. L'integrazione con semi di lino ha comportato un incremento significativo (85%) del contenuto di PUFA ω 3 rispetto al gruppo di controllo. L'incremento di questa frazione di acidi grassi ha reso la carne più suscettibile all'ossidazione durante il periodo di conservazione. Questa maggiore suscettibilità è stata

rilevata in particolare nel livello di TBARs, che dopo due giorni incrementa significativamente solo nel gruppo trattato (141%), mentre nella carne di controllo si mantiene costante. Anche i COPs hanno mostrato un andamento simile anche se l'incremento significativo nel gruppo trattato si è avuto dopo sei giorni di conservazione, perché il processo di ossidazione del colesterolo si manifesta più lentamente di quello degli acidi grassi polinsaturi, evidenziabile con l'analisi dei TBARs. Il contenuto di sostanze antiossidanti come vitamina A e caroteni diminuisce significativamente già dopo 2 giorni e raggiunge valori vicini allo zero dopo sei giorni, in entrambe le tipologie di carne. In conclusione, la carne del gruppo di controllo si è dimostrata molto stabile all'ossidazione, probabilmente in relazione al buon contenuto di partenza di sostanze antiossidanti. Al contrario, quella del gruppo trattato, malgrado contenesse quantità comparabili di antiossidanti, ha evidenziato già dopo due giorni aumenti significativi dei prodotti di ossidazione degli acidi grassi e, successivamente, del colesterolo, denotando che l'incremento di PUFA ω 3 nel grasso intramuscolare necessita di essere accompagnato da più elevati tenori di sostanze antiossidanti di quelle normalmente presenti nel grasso intramuscolare di vitelloni allevati secondo la tecnica tradizionale prevista per la razza Maremmana. Tali aspetti dovrebbero essere presi in considerazione anche per lo sviluppo di adeguate tecniche di conservazione e di preparazione di tagli di carne arricchita in PUFA ω 3.

Sommario

IL MERCATO E LA PRODUZIONE DI CARNE BOVINA IN ITALIA	6
LA CARNE BOVINA.....	7
GENERALITÀ.....	7
IL MUSCOLO.....	8
LA TRASFORMAZIONE DEL MUSCOLO IN CARNE.....	11
QUALITÀ DELLA CARNE BOVINA	14
IL CONCETTO DI QUALITÀ	14
I FATTORI CHE CONCORRONO ALLA DETERMINAZIONE DELLA QUALITÀ	14
LE COMPONENTI DELLA QUALITÀ.....	17
STRATEGIE PRODUTTIVE DI CARNE FUNZIONALE.....	36
IL SIGNIFICATO NUTRIZIONALE DELLA CARNE NELL'EVOLUZIONE UMANA	40
LA RAZZA MAREMMANA	44
QUALITÀ DELLA CARNE	46
PROSPETTIVE.....	48
SHELF LIFE DELLA CARNE REFRIGERATA	49
FATTORI CHE DETERMINANO LA SHELF LIFE	49
FATTORI INTRINSECI.....	49
FATTORI ESTRINSECI	49
L'OSSIDAZIONE DEI LIPIDI	54
CHIMICA DELL'OSSIDAZIONE LIPIDICA NELLA CARNE.....	55
RUOLO DEI PRODOTTI DELL'OSSIDAZIONE LIPICA NELLA SALUTE UMANA.....	60

GLI ANTIOSSIDANTI.....	62
CHAIN BREACKING ANTIOXIDANTS.....	62
PREVENTIVE ANTIOXIDANTS.....	63
DESCRIZIONE DEL PIANO SPERIMENTALE.....	66
PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	69
FASE SPERIMENTALE.....	70
ESTRAZIONE DEI LIPIDI TOTALI	70
DETRMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE ACIDICA.....	70
SOSTANZE REATTIVE ALL'ACIDO TIOBARBITURICO (TBARs).....	71
COMPOSIZIONE IN ACIDI GRASSI LIBERI (FFA).....	71
COLESTEROLO TOTALE, PRODOTTI DI OSSIDAZIONE DEL COLESTEROLO (COP _s), VITAMINA A E CAROTENOIDI	71
ANALISI STATISTICA.....	72
OSSIDAZIONE DELLA CARNE	76
VITAMINA A	76
CAROTENOIDI.....	77
ACIDI GRASSI LIBERI (FFA).....	79
MALONILDIALDEIDE – SOSTANZE REATTIVE ALL'ACIDO TIOBARBITURICO (TBARs).....	81
COLESTEROLO	83
PRODOTTI DI OSSIDAZIONE DEL COLESTEROLO (COPS)	84
7 α -IDROSSICOLESTEROLO.....	87
7 β -IDROSSICOLESTEROLO	90

α -EPOSSICOLESTEROLO	91
7-CETOCOLESTEROLO	93
TRIOLO	95
COPs vs TBARS	97
Bibliografia	101
Sitografia	116
Fonti Normative	117

INTRODUZIONE

IL MERCATO E LA PRODUZIONE DI CARNE BOVINA IN ITALIA

Il seguente paragrafo è stato redatto facendo particolare riferimento a Federici (2012). Nel decennio 2001-2011, il sistema zootecnico italiano si è caratterizzato per un graduale e costante declino del settore del bovino da carne; infatti, il peso del valore agricolo di tale attività produttiva si è ridotto del 5,5% rispetto al totale della produzione di carne, del 3,7 % nei confronti del complesso del comparto zootecnico e dello 0,7 % verso l'intera agricoltura.

La struttura e l'organizzazione della filiera della carne bovina sono particolarmente articolate; tale complessità è da imputare da un lato all'elevato numero degli operatori, determinato dalla considerevole frammentazione della filiera a livello agricolo ed industriale, e dall'altro ai notevoli flussi di importazione sia da paesi dell'Unione Europea (UE) che extraeuropei (non-UE).

Un altro problema che riguarda il mercato della carne bovina è rappresentato dai diversi interessi ed obiettivi dei settori che compongono l'intera filiera di produzione. Molto spesso, infatti, gli interessi sono settoriali e non convergono verso l'obiettivo comune di soddisfare le esigenze del consumatore. Generalmente gli allevatori tengono conto dei problemi quantitativi legati alla produzione, i trasformatori pongono l'attenzione sull'aspetto remunerativo del prodotto, mentre i distributori mirano a privilegiare un rapido smercio a svantaggio della frollatura (Resconi et al., 2010; De Stefanis et al., 1990), provocando un peggioramento della qualità del prodotto finale, che in ultima analisi non è bene accetto al consumatore.

Dal punto di vista produttivo la filiera presenta differenze di tipo organizzativo e strutturale negli allevamenti, con un grande numero di piccoli e piccolissimi allevamenti, spesso a conduzione familiare, ubicati in zone marginali e/o in regioni meridionali che si contrappongono al numero esiguo di grandi aziende altamente specializzate, localizzate generalmente nelle regioni settentrionali.

Le categorie merceologiche caratterizzanti la filiera produttiva sono tre. La prima è costituita dal vitello proveniente da razze da latte, alimentato prevalentemente con polvere di latte sino al raggiungimento di 230-250 kg di peso vivo all'età di 5-6 mesi. La maggior parte di questo prodotto proviene da Lombardia e Veneto, le regioni più vocate alla produzione di latte. Questo settore rappresenta circa il 12% della produzione. Alla seconda categoria appartiene la vacca a fine carriera proveniente sempre da allevamenti italiani da latte e pertanto anche questa prevalentemente localizzata nel Nord-Est, che costituisce circa il 13% del mercato. La terza e più importante categoria del comparto è rappresentata dal vitellone, con oltre il 74% dell'offerta complessiva di carne bovina. Nel 2011, la maggior parte degli animali avviati al macello derivava da aziende nazionali che ingrassano per il 45% soggetti di origine estera e per il 55% di origine nazionale, provenienti da allevamenti specializzati da carne, ma anche da latte. È evidente che questi ingenti flussi in entrata rendono il settore fortemente dipendente dall'estero.

Sulla base dei modelli di allevamento adottato, che dipende dalla razza allevata, dal sistema di alimentazione, dalla localizzazione, ecc., si può operare un'ulteriore distinzione in "vitellone intensivo", allevato in ambiente confinato nella pianura Padano-Veneta (Veneto, Piemonte, Emilia Romagna, Lombardia) e alimentato con insilato di mais e concentrati, e "vitellone estensivo", generalmente allevato in Piemonte, nell'Appennino centro-meridionale e nelle isole. A quest'ultima categoria appartengono per lo più le razze tipiche italiane, allevate seguendo la tecnica della linea vacca-vitello: alimentazione al pascolo integrata con concentrati, finissaggio in stalla e macellazione al raggiungimento di circa 650 kg.

L'aumento dell'offerta dei paesi Sud-Americani e dei paesi Asiatici, la riforma della Politica Agricola Comune (PAC), la flessione dell'economia e dei redditi dei paesi comunitari, l'allargamento ai paesi dell'est dell'Europa, le nuove esigenze del consumatore unite alle necessità

interne di ciascuna impresa operante nel settore della carne bovina, hanno portato alla realizzazione di progetti volti all'ottenimento di un prodotto qualitativamente valido e sempre più uniforme e standardizzato, che risponda alle attuali richieste dei consumatori. In questo quadro risulta estremamente difficile per gli allevatori realizzare gli investimenti necessari a sviluppare politiche di qualità, fatta eccezione per gli interventi minimali richiesti dalla normativa e dal mercato.

Un'eccezione è rappresentata dalle aziende che producono per i mercati di nicchia; queste ultime potrebbero riscuotere un certo successo, soprattutto puntando sulle strategie di diversificazione basate sull'allevamento di razze autoctone, come la Razza Maremmana, su marchi di tutela comunitaria di denominazioni geografiche, su metodi di produzione biologica o su sistemi comunque percepiti dal consumatore come naturali. Altra possibilità per garantire una maggiore remunerazione del prodotto potrebbe essere quella della filiera corta, una soluzione commerciale che consentirebbe di recuperare la marginalità della produzione sfruttando canali locali grazie ad accordi diretti con la distribuzione.

LA CARNE BOVINA

GENERALITÀ

La carne fresca è quell'alimento di origine animale costituito da una qualsiasi delle parti commestibili (compreso il sangue) di ungulati domestici, volatili d'allevamento, lagomorfi e selvaggina (cacciata e allevata), che non ha subito alcun trattamento salvo refrigerazione, congelamento, surgelazione e confezionamento sotto vuoto o in atmosfera controllata (Reg. 178/2002/CE; Reg.853/2004/CE). Ad eccezione dei suini, dopo la macellazione è necessaria la risoluzione del *rigor mortis* tramite la "frollatura"; al termine di tale periodo di maturazione, il prodotto prende il nome di carne. Per l'uomo, tale alimento è fonte di proteine di alto valore biologico ed aminoacidi essenziali, che, non essendo sintetizzabili dall'organismo, devono essere assunti con la dieta.

La carne bovina è composta dai tessuti connettivo, muscolare e adiposo.

Il connettivo tiene insieme i muscoli, con i quali è intimamente connesso, e si trova tra le fibre muscolari, tra i fasci di fibre, fra un muscolo e l'altro, tra i muscoli e i tessuti (vasi sanguigni e nervi), con cui essi interagiscono. La quantità di connettivo è direttamente proporzionale all'età dell'animale e al grado di attività del muscolo ed è decisiva nella determinazione della tenerezza della carne; poiché i muscoli di movimento degli arti ne contengono di più rispetto ai muscoli di supporto toracici e lombari, questi ultimi forniscono i tagli più pregiati.

Il tessuto muscolare è il più rappresentato. Le fibre sono le unità di base; si tratta di cellule lunghe e sottili associate nei fasci muscolari, i quali, singolarmente o riuniti in gruppo, compongono il muscolo. I muscoli contengono in proporzione variabile fibre a contrazione lenta, dette "rosse", per l'elevato contenuto di mioglobina e fibre a contrazione veloce, dette "bianche", di diametro maggiore. Mentre le fibre rosse presiedono alle attività lente e costanti, come camminare, e sfruttano grassi come fonte energetica, le fibre bianche, sono specializzate per sforzi violenti, ma intermittenti, e producono energia a partire dal glicogeno, zucchero delle cellule muscolari, importante nel processo di frollatura.

Nella carne bovina, si individuano tre tipi di grasso; segnatamente: grasso intracellulare, invisibile perché situato all'interno delle fibre; grasso intercellulare, nella membrana connettivale che avvolge il muscolo; grasso di deposito, al di fuori dei muscoli, che si differenzia dai due precedenti perché costituito prevalentemente da acidi grassi saturi. Negli animali giovani, gli adipociti costituenti il tessuto adiposo si depositano principalmente sulle fibre muscolari, originando il "grasso di marezatura" (Figura 1); con l'avanzare dell'età, e in particolare durante il periodo d'ingrasso, il tessuto lipidico aumenta anche nel sottocute, dove, soprattutto in certe

regioni del corpo, si accumula formando i “tasti” o “maneggiamenti”, coperture adipose, la cui entità stima lo stato di ingrassamento generale dell’animale (Secchiari et al., 2009).



Figura 1. Il grasso della carne bovina.

Essendo il ritmo di sviluppo del tessuto adiposo, più ritardato nel tempo rispetto a quello dei tessuti osseo, muscolare e nervoso, la deposizione di grasso è un processo lungo che si realizza con il progredire dell’età/peso dell’animale. Dunque, il tessuto adiposo viene sempre più a incidere sul peso della carcassa rispetto ai tessuti muscolare e osseo, alterando il rapporto fra muscolo, grasso e osso che determina il valore commerciale della carcassa. Il grasso, comunque, è la componente più variabile del corpo in relazione al tipo genetico e alla qualità e quantità degli alimenti assunti dall’animale. In generale, le razze tardive tendono ad ingrassare in età più avanzata rispetto a quelle precoci e la carne dei maschi contiene meno grasso di quella delle femmine (Secchiari et al., 2009).

Infine, è importante sottolineare che il processo di sviluppo dell’animale è regolato da fattori intrinseci, quali le peculiarità genetiche di ogni specie, razza e individuo, il sesso e la componente endocrina, ed estrinseci, tra cui spiccano l’alimentazione e le tecniche di allevamento.

IL MUSCOLO

Il tessuto muscolare scheletrico è formato da fibre muscolari striate, lunghe cellule cilindriche polinucleate (lunghezza 10-30 cm, diametro 0,1-0,5 mm) circondate da una membrana citoplasmatica, il sarcolemma, e raggruppate in fasci. I fasci di fibre sono avvolti da una capsula di tessuto connettivo fibrillare denso, l’epimisio, da cui si dipartono i setti connettivali che scompongono ulteriormente il muscolo in tanti fascetti di fibre muscolari. Il connettivo diventa sempre più delicato e prende il nome di perimisio le parti ancora più interne del perimisio formano una delicata rete di connettivo ancora più sottile, l’endomisio, che riveste ogni singola fibra muscolare.

Oltre ai numerosi nuclei ed agli organuli citoplasmatici, nel citoplasma delle fibre muscolari, o sarcoplasma, sono immerse le miofibrille (circa 100 milioni/cm²), sede della contrattilità. Si tratta di strutture di forma cilindrica, con un diametro di 1-3 μm, orientate secondo l’asse maggiore della fibra, le quali, osservate al microscopio a contrasto di fase, presentano una striatura trasversale (da cui l’attributo “striato”) distribuita omogeneamente per tutta la lunghezza delle singole fibre, che appare come un susseguirsi di dischi chiari e scuri, le bande, alternati regolarmente. Dall’esame al microscopio a luce polarizzata emerge che la banda scura è birifrangente o anisotropa, da cui l’appellativo “banda A”, diversamente quella chiara ha un comportamento isotropo e prende il nome di “banda I”. Inoltre, la banda A presenta nella parte centrale una banda H più chiara, mentre nel centro della banda I si osserva una linea sottile, la linea Z. Il tratto di miofibrilla compreso tra due linee Z è chiamato sarcomero e rappresenta l’unità funzionale del tessuto muscolare striato:

ciascuna miofibrilla non è altro che il ripetersi di sarcomeri. A loro volta le miofibrille sono formate da unità più piccole disposte longitudinalmente e parallele le une alle altre: miofilamenti spessi e sottili (Figure 2 e 3).

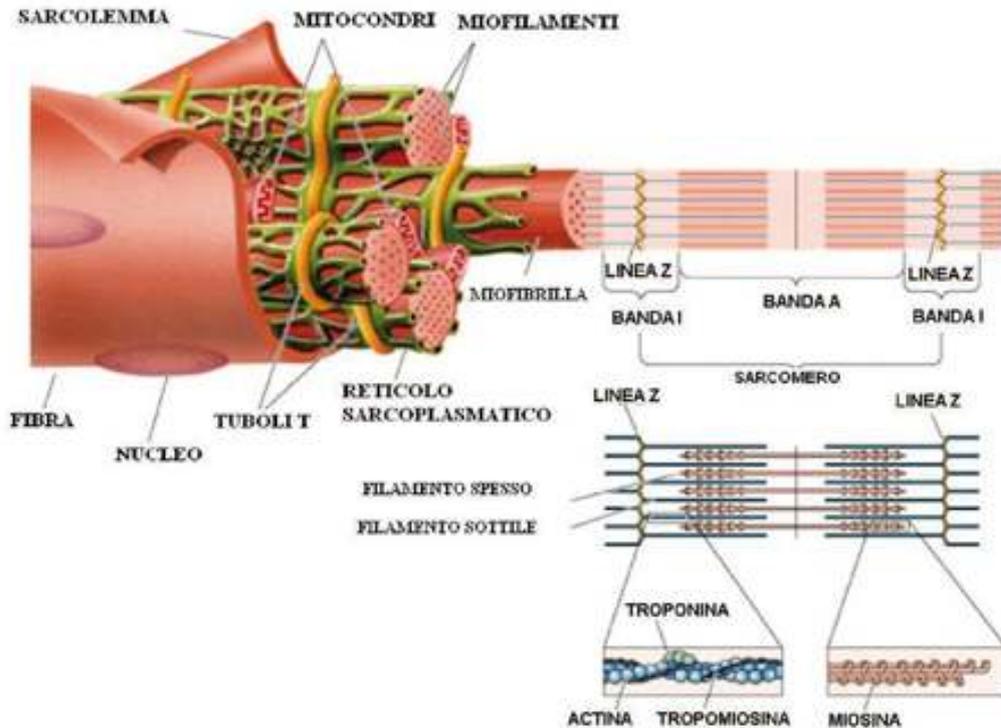


Figura 2. Organizzazione interna della fibra muscolare (Pozzi et al., 2008).

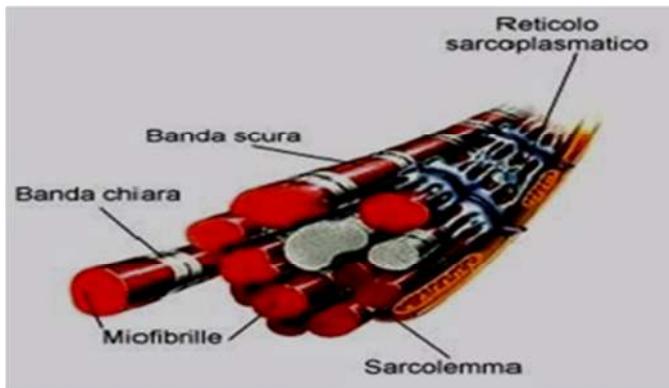


Figura 3. La disposizione delle bande nella fibra muscolare.

Il miofilamento spesso (diametro 10-12 nm, lunghezza 1,5 μ m), è costituito prevalentemente da miosina, ma contiene anche proteina M, miomesina e creatin fosfochinasi muscolare (CPK), proteina C, proteina H, titina (connectina); esso occupa tutta l'estensione del disco scuro, dal quale si dipartono delle appendici laterali, sporgenti rispetto alla superficie del filamento stesso, dette ponti trasversi.

La molecola di miosina presenta una parte bastoncellare (coda) ed una parte globosa (testa), corrispondente ai ponti trasversi; la testa globosa è costituita dalle subunità S1, nella quale sono presenti ATP, ATPasi e un sito di legame per l'actina globulare, ed S2.

Il miofilamento sottile (diametro 5-7 nm, lunghezza 0,8-1µm) è costituito da actina (componente principale) e da proteine accessorie, o regolative, come tropomiosina B e troponina, importanti ai fini della contrazione muscolare. In particolare, nella molecola di troponina si individuano tre subunità: troponina T, capace di legarsi alla tropomiosina, troponina I, capace di legare l'actina, e troponina C, interposta tra le altre due e capace di legare gli ioni Ca^{2+} .

IL MECCANISMO DI CONTRAZIONE E RILASCIAMENTO

Gli ioni Ca^{2+} ; liberati dal reticolo sarcoplasmatico (reticolo endoplasmatico delle fibre muscolari, cfr. Figura 3) nel sarcoplasma a seguito della trasmissione del segnale nervoso, interagiscono con la subunità C della troponina; le tre subunità rinsaldano i legami reciproci e si avvicinano fra loro, scoprendo i siti di legame dell'actina per la miosina, che vi si lega tramite i ponti trasversi. L'ATPasi della subunità S1 della miosina scinde, quindi, l'ATP presente nella stessa subunità nel modo seguente:



$$G = 7,3 \text{ kcal/mol (T = 25 } ^\circ\text{C e pH = 7)}$$

L'energia fornita dalla scissione dell'ATP determina un'oscillazione del ponte trasverso, che trascina il filamento di actina verso il centro del sarcomero. L'arrivo di una nuova molecola di ATP provoca il distacco della subunità S1 dall'actina; in assenza di ATP il distacco non avviene e il complesso actina-miosina prende il nome di "complesso *rigor*". L'accorciamento del sarcomero è dovuto allo scorrimento dei filamenti sottili verso il centro del sarcomero, trascinati dal movimento dei ponti trasversi della miosina.

Finché permane lo stimolo ed è presente ATP, si ripetono cicli di attacco, oscillazione e distacco, con accorciamento di tutti i sarcomeri, miofibrille e fibre del muscolo.

Al cessare dello stimolo per la contrazione, il Ca^{2+} rientra nel reticolo sarcoplasmatico e i legami tra le subunità di troponina tornano all'assetto delle condizioni di riposo; essendo i siti dell'actina globulare per la miosina di nuovo mascherati, i ponti trasversi non possono più agganciarsi all'actina globulare. A questo punto prevalgono le forze del rilasciamento muscolare, cioè l'azione dei muscoli antagonisti e la trazione esercitata dalle inserzioni tendinee, che riportano i sarcomeri nello stato di riposo.

Prendendo in considerazione le caratteristiche istochimiche, si individuano tre tipi di cellule muscolari. Le *Fast Glycolytic* (FG) sono fibre a contrazione rapida, anaerobiche, che utilizzano il glicogeno come substrato; le *Slow Oxidative* (SO) sono fibre ad ossidazione lenta, aerobiche, che utilizzano i lipidi come substrato; infine, le *Fast Oxidative Glycolytic* (FOG), sono fibre a contrazione soprattutto rapida, prevalentemente aerobiche ma anche anaerobiche (Klont et al., 1998).

Inoltre, a seconda che la via metabolica seguita per produrre ATP sia aerobica o anaerobica si distinguono fibre rosse ossidative (corrispondenti alle SO) e fibre bianche glicolitiche (corrispondenti alle FG); esistono anche fibre dette "giganti" con attività metabolica intermedia. La prevalenza relativa dei tipi di fibre determina il colore del muscolo e conseguentemente della carne. Le fibre rosse hanno dimensioni minori delle bianche, contengono una maggiore quantità di ferro, lipidi; mitocondri, enzimi connessi con il metabolismo ossidativo e di mioglobina; quest'ultima è una molecola con funzione di accumulo di ossigeno simile all'emoglobina ed è responsabile della colorazione rossa. I muscoli "rossi", oltre a contenere una minore quantità di ATP e di azoto, presentano alti livelli di O_2 , maggiore fosforilazione ossidativa e glicolisi prevalentemente aerobica; tuttavia, essi si distinguono dai "bianchi" per la lenta dissociazione dell'ATP, che riduce la velocità di insorgenza dell'irrigidimento cadaverico (*rigor mortis*) dopo la macellazione (De Rensis, 2001; (Gianfaldoni et al., 1998). Al contrario, nelle fibre bianche la dissociazione dell'ATP (presente

anche in minore quantità) è rapida, per cui i muscoli in cui prevalgono entrano precocemente nel *rigor mortis*.

LA TRASFORMAZIONE DEL MUSCOLO IN CARNE

Nel periodo *post mortem* ha inizio il processo degradativo a carico del tessuto muscolare, al cui interno si verificano reazioni enzimatiche, grazie alle quali la durezza si riduce, e altre reazioni quali l'ossidazione lipidica e la formazione di nucleotidi come l'ipoxantina, potenziatore dell'aroma; inoltre, si formano ammoniaca, idrogeno solforato, acetaldeide, acetile e acetone che, entro certi limiti, sono favorevoli per il sapore (Pozzi et al., 2008) In prima analisi, tali trasformazioni dipendono dall'iniziale ricchezza del muscolo in glicogeno, il cui tasso è responsabile dell'acidificazione, evento indispensabile per l'intenerimento del muscolo. I principali cambiamenti nella struttura del muscolo sono la scomparsa della linea Z e della linea M, la perdita dell'allineamento trasversale dei dischi Z, della linea M e degli altri elementi contrattili, la scomparsa della troponina-T, la frammentazione delle miofibrille, la degradazione della titina e della nebulina (Ouali, 1992).

MODIFICAZIONI DEL MUSCOLO DOPO LA MACELLAZIONE

Il reticolo sarcoplasmatico è formato da un sistema continuo di canalicoli, o cisterne, i sarcotubuli, che avvolgono le singole miofibrille; questo organello è costituito da proteine intrinseche, tra cui l'enzima ATPasi Ca^{2+} e Mg^{2+} dipendente, che preleva il Ca^{2+} dal sarcoplasma "pomandolo" nei sarcotubuli, ed estrinseche, come la calsequestrina ed una proteina ad alta affinità per il Ca^{2+} , con il compito di trattenere il Ca^{2+} nei sarcotubuli. Contemporaneamente la temperatura corporea inizia ad abbassarsi.

Dato che *post mortem*, i sarcotubuli non trattengono più il Ca^{2+} e di conseguenza la concentrazione del Ca^{2+} libero aumenta. Per questo motivo i muscoli si contraggono e rilassano senza sosta finché, esaurita l'ATP, non si irrigidiscono; sopraggiunge così lo stato di irrigidimento cadaverico noto come *rigor mortis*. Infatti, cessate le funzioni vitali dell'intero organismo, l'attività metabolica delle fibre muscolari è caratterizzata da un iniziale consumo anaerobio di creatinfosfato (CP) in attesa dell'avvio del processo glicolitico. Successivamente, ha luogo la respirazione dell'ossigeno residuo a spese del glicogeno, lo zucchero di riserva delle fibre muscolari, a seguito della quale si produce adenosintrifosfato (ATP).

Esaurito l' O_2 , si attiva la glicolisi anaerobia e l'ATP viene consumata. La scomparsa del glicogeno e dell'ATP determinano l'acidificazione del sarcoplasma. Infatti, il glicogeno subisce una fermentazione lattica ed è trasformato quantitativamente in acido lattico in 12-24 ore. Mancando la circolazione ematica, l'acido lattico rilasciato da quest'ultima reazione, che nell'animale vivo è un prodotto di scarto, non può essere smaltito, per cui si accumula nel sarcoplasma (Adrian et al., 2009). Parallelamente gli enzimi ATPasi idrolizzano l'ATP, con formazione di ADP, fosfato inorganico e liberazione di un protone (Valin, 1986). Di conseguenza, il pH del muscolo si abbassa, passando da 6,8-7,2 a 5,4-5,8, valori, questi ultimi, che inibiscono gli enzimi glicolitici (Hannula et al., 2004).

Inoltre, il ripristino di ATP non è più possibile a causa dell'inibizione della catena respiratoria in ambiente anaerobico ed essendo tale molecola necessaria per la contrazione muscolare e per il successivo distacco del complesso actina-miosina (Lawrie, 1983), il muscolo si irrigidisce. Quando l'ATP è esaurita e il 100% dei complessi actina-miosina si sono formati il muscolo si trova nel *rigor mortis*; nel bovino ciò accade a 20-24 ore dalla morte, con un picco massimo a 1-3 giorni. Infine, è utile sottolineare che l'accorciamento tipico del *rigor mortis* interessa solo una parte delle fibre muscolari e, contrariamente a quanto avviene negli animali in vita, è irreversibile (Bendall, 1973).

LA FROLLATURA

La tenerezza è il parametro qualitativo più influente nel determinare l'accettabilità della carne da parte del consumatore, tuttavia finché permane la rigidità cadaverica il tessuto muscolare non è adatto per l'alimentazione essendo duro e tiglioso. Per questo motivo, dopo aver ucciso, dissanguato, scuoiato e privato di testa e zampe l'animale, la carcassa viene suddivisa in mezzane, che sono lasciate in apposite celle frigorifere, a 0-4°C e umidità relativa (UR) 75-88%, per 10-14 giorni (Figura 4).



Figura 4. Tagli di bovino in una cella di frollatura.

Questo intervallo di tempo, di durata variabile a seconda della temperatura ambiente, prende il nome di frollatura; si tratta di un periodo di maturazione durante il quale le componenti proteiche sono interessate da una serie di modificazioni degradative ed amicrobiche, responsabili della conversione del tessuto muscolare in carne (Scanziani et al., 2008). La frollatura viene praticata per favorire la scomparsa della rigidità cadaverica e il graduale aumento della tenerezza, tuttavia essa determina anche alcuni cambiamenti che conferiscono al prodotto un colorito più pallido, un sapore più gustoso e delicato e una maggiore succosità.

Terminata la frollatura, il muscolo ha le caratteristiche tipiche della carne alimentare.

La riduzione del pH sarcoplasmatico, provocata dal rilascio degli acidi lattico e fosforico, e l'attacco enzimatico sono responsabili della risoluzione del *rigor mortis* e quindi dell'intenerimento del tessuto muscolare; infatti, la tenerezza è un parametro qualitativo estremamente importante. Normalmente, il *rigor mortis* si risolve in 10-13 giorni a 0 °C, 4-5 giorni a 10 °C, 30-40 ore a 20 °C e 10 -11 ore a 30 °C; inoltre, la velocità del processo rallenta con l'età degli animali.

La riduzione della temperatura corporea e l'aumento del Ca^{2+} libero, a causa della perdita della capacità di recuperarlo da parte del reticolo sarcoplasmatico, rendono le proteine muscolari facilmente denaturabili ad opera dalle calpaine e dalle catepsine.

Subito dopo la morte dell'animale si attivano le calpaine, proteasi tioliche, cisteiniche, citoplasmatiche Ca^{2+} - dipendenti; questi enzimi possono essere tessuto-specifici e ubiquitari (Pozzi et al., 2008). Questi ultimi sono ulteriormente suddivisi in μ - ed m-calpaine, per la cui attività sono necessarie concentrazioni di Ca^{2+} libero di 10-50 μM e 200-300 μM rispettivamente. Poiché in un animale in vita la concentrazione del Ca^{2+} sarcoplasmatico libero è circa 1 μM , mentre *post mortem* arriva a 100 μM , le calpaine si attivano solo dopo la macellazione. Queste proteasi scindono le proteine della linea Z: troponina T, troponina I, tropomiosina, α -actinina, titina e nebulina

(Koohmaraie, 1992). Inoltre, la quantità di calpaine è inversamente proporzionale all'età dell'animale e positivamente correlata con la forza di taglio (Wulf et al., 1997).

Le catepsine sono proteasi lisosomiali responsabili della scissione dei costituenti proteici cellulari in peptidi e amminoacidi. L'attività di tali enzimi è favorita dalle basse temperature, quali quelle dei locali di conservazione (0 – 4°C), e si esplica in ambiente acido, per cui la catalisi è massima quando il pH raggiunge il suo valore terminale di circa 5,5. A tal proposito è utile ricordare che tale valore di pH è temporaneo, perché tende ad aumentare fino a stabilizzarsi su valori di 5,6-5,8, a seguito della parziale neutralizzazione dell'acido lattico che si realizza grazie alla liberazione di Ca^{2+} e Na conseguente alla denaturazione proteica (Cappelli et al. 1998).

Tra le diverse catepsine note, le L e le B svolgono il ruolo più significativo nella frollatura della carne; queste ultime, in particolare, degradano la miosina, la troponina T e l'actina.

È utile sottolineare che questi fenomeni avvengono all'interno della fibra muscolare, senza coinvolgere né il collagene né l'elastina (Adrian et al., 2009); tuttavia, sono stati osservati alcuni enzimi lisosomiali capaci di idrolizzare il collagene del tessuto connettivo (Koohmaraie et al., 1991), aspetto questo di rilevante importanza ai fini della tenerezza della carne (Calkins et al., 1988).

Le modalità di raffreddamento *post mortem* condizionano le caratteristiche del prodotto finale; in particolare, l'attività enzimatica dipende dalla temperatura, infatti una bassa intensità di raffreddamento migliora l'attività delle proteasi (Valin, 1986; Moeller et al., 1976; Dutson et al., 1977), dal pH e dalla velocità con la quale vengono raggiunti i loro valori finali. Il monitoraggio di tali parametri risulta, quindi, essenziale.

La temperatura della carcassa è determinata dalla quantità di grasso extramuscolare e dalla temperatura degli ambienti di macellazione e conservazione, che condiziona la velocità di raffreddamento. Con la refrigerazione il *rigor mortis* compare tardivamente, per il rallentamento del consumo di ATP e l'accelerazione del rilascio di Ca^{2+} ; al contrario, ad alte temperature il pH cala bruscamente, l'ATP diminuisce velocemente e l'irrigidimento compare precocemente (*heat rigor*).

La temperatura ideale per l'inizio del *rigor mortis* è di 15-16 °C.

Per quanto riguarda il pH, con una riduzione graduale si ottiene un prodotto più tenero, rispetto a quello sottoposto a un calo brusco e repentino.

In linea di massima, tanto maggiore è la temperatura di conservazione quanto minore dovrebbe risultare il tempo di frollatura, tuttavia ciò innalza il rischio di andare incontro a contaminazione microbica; ne consegue che la frollatura a temperatura relativamente elevata richiede impianti e condizioni operative di alta igiene. Di seguito si descrive, a titolo di esempio, un modello di frollatura: (i) raffreddamento della carcassa a 0 - 3 °C per 1-2 giorni; (ii) taglio in mezzene o quarti; (iii) conservazione delle mezzene/quarti a 2 – 3°C per 10-12 giorni; (iv) mantenimento della temperatura a valori di 5 – 7°C per circa 24 ore; (v) taglio finale e avvio alla vendita.

È utile anche ricordare che la maturazione è più veloce e più intensa nei soggetti giovani (Valin, 1986), rispetto agli adulti, probabilmente in conseguenza dell'evoluzione qualitativa del collagene, la cui quantità, tra l'altro, aumenta con l'età; in aggiunta, la velocità e l'intensità di maturazione dipendono anche dal tipo di muscolo: le fibre bianche maturano più velocemente di quelle rosse, anche in virtù dei diversi enzimi che contengono (Faucon, 1990).

Infine, l'intenerimento della carne può essere incrementato mediante interventi artificiali; in particolare, si tratta della sospensione delle carcasse/mezzene, che in alcuni muscoli determina uno stiramento benefico per la tenerezza, della stimolazione elettrica delle carcasse, che accelera la fermentazione del glicogeno cui consegue una rapida acidificazione e quindi una precoce attivazione delle proteasi, e dell'applicazione di enzimi proteolitici esogeni, come tripsina pancreatica, papaina, ficina, bromelina.

QUALITÀ DELLA CARNE BOVINA

IL CONCETTO DI QUALITÀ

La definizione di “qualità di un alimento” abbraccia una pluralità di nozioni. Infatti, mentre in lingua italiana tale termine indica genericamente l’insieme delle proprietà estrinseche ed intrinseche del prodotto (Vocabolario della Lingua Italiana Treccani, 2013), le norme di riferimento per il commercio, elaborate dall’Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione delle Norme (*International Organization for Standardization*, ISO), precisano che la qualità è il grado con cui un insieme di caratteristiche (elementi distintivi) intrinseche soddisfano i requisiti, ossia le esigenze o aspettative che possono essere espresse, implicite o cogenti. Inoltre, l’ISO introduce la nozione di “soddisfazione del cliente”, che fa riferimento alla percezione del grado di soddisfazione dei suddetti requisiti e descrive le situazioni di conformità o non conformità come risultanti dal soddisfacimento o meno di un requisito.

I cinque requisiti fondamentali di un prodotto di qualità sono sicurezza, specificità, ripetibilità, buone caratteristiche sensoriali e valore nutrizionale adeguato (UNI EN ISO 9000:2005).

SICUREZZA

Questa caratteristica, la più importante tra quelle citate, rappresenta un prerequisito di ogni produzione alimentare, essendo gli aspetti sanitari gli unici capaci di arrecare un danno diretto alla salute umana.

SPECIFICITÀ

Con questo termine si indica un attributo, o un insieme di attributi, che rende un particolare alimento distinguibile da tutti gli altri; tale caratteristica, o insieme di caratteristiche, può essere direttamente percepibile a livello sensoriale oppure ricavabile per interpretazione di misure strumentali, che abbiano mostrato costanza temporale.

RIPETIBILITÀ

Tale proprietà consiste nella capacità di un prodotto di presentare sempre gli stessi caratteri di specificità, che sono quindi riscontrabili dal consumatore in occasione di ogni acquisto.

CARATTERISTICHE SENSORIALI

Nel caso della carne le caratteristiche sensoriali sono valutate soddisfacenti quando essa è gustosa, tenera, succulenta, priva di sapori od odori sgradevoli e presenta un colore specifico attraente, caratteristico della specie animale, dell’età e del taglio. Questo requisito è un importante elemento della specificità.

VALORE NUTRIZIONALE

Questa proprietà è definita dall’insieme dei fattori dieteticamente pregevoli e in grado di prevenire l’insorgenza di affezioni dismetaboliche o addirittura di promuovere la salute. Per attribuire un giudizio di valore a questo requisito ci si basa sui risultati delle misure sperimentali volte a determinare il contenuto di vitamine, micro- e macro-elementi, la quantità e il valore biologico delle proteine e gli aspetti quali-quantitativi dei lipidi presenti. Il quadro lipidico, in particolare, è fra gli elementi di maggiore peso nella determinazione della qualità della carne, determinandone importanti caratteristiche dietetiche, sensoriali e tecnologiche; in particolare, la tendenza all’ossidazione degli acidi grassi è il parametro che più di ogni altro influisce sulla conservabilità (*shelf life*) di tale alimento.

I FATTORI CHE CONCORRONO ALLA DETERMINAZIONE DELLA QUALITÀ

Per studiare la produzione della carne, si devono considerare i cambiamenti che hanno luogo durante lo sviluppo, l’accrescimento e l’ingrasso degli animali in allevamento. In particolare, con la crescita non solo la composizione chimica del muscolo scheletrico si evolve con modi e tempi che dipendono da specie, razza e sesso dell’animale, ma anche i rapporti tra i tessuti corporei dell’animale variano, determinando un incremento della resa direttamente proporzionale all’età;

tuttavia oltre una certa età si osserva una prevalenza del tessuto adiposo su muscolo ed ossa, che incide sul valore commerciale della carcassa (Secchiari et al., 2009). Nel complesso, si verifica un innalzamento della concentrazione delle proteine sieroplasmatiche e fibrillari, e soprattutto della mioglobina, responsabile del colore rosso carico delle fibre muscolari degli adulti, una graduale contrazione delle percentuali di acqua ed un incremento sia dei lipidi che della componente minerale (Secchiari et al., 2009). Il grasso è la componente più variabile del corpo ed è in relazione al tipo genetico e alla qualità e quantità degli alimenti assunti dall'animale. In generale le razze più precoci tendono ad ingrassare più precocemente di quelle ad accrescimento più lento e la carne dei maschi contiene meno grasso di quella delle femmine (Secchiari et al., 2009).

Non si può quindi prescindere dall'esame dei fattori intrinseci, come tipo genetico e sesso, ed estrinseci, tra cui le tecniche di allevamento e la dieta, implicati nel processo di sviluppo dell'animale. Infine, due momenti cruciali per la produzione di carne sono il trasporto al macello e la macellazione vera e propria.

FATTORI INTRINSECI

Per poter valutare le caratteristiche della carne, bisogna innanzitutto fare riferimento alla razza dell'animale macellato. Infatti, le razze selezionate per la produzione della carne possiedono caratteristiche distintive che sono trasferite al prodotto finale. Inoltre, spesso ad una certa razza è abbinata anche una certa tipologia di allevamento e quindi di alimentazione degli animali. Tra i parametri più rilevanti si citano la diversa precocità, le caratteristiche delle fibre muscolari, la differente distribuzione del grasso e la presenza di ipertrofia muscolare (Marshall, 1994). Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto, è opportuno sottolineare la maggiore suscettibilità agli eventi stressanti e la minore resistenza allo sforzo fisico, legata al minor potenziale respiratorio, degli individui di razze con ipertrofia muscolare; in presenza di una gestione inadeguata degli animali nelle fasi che precedono la macellazione, tali peculiarità si ripercuotono sul valore del pH finale, innalzandolo e elevando quindi il rischio di ottenere carni scure (Shackelford et al., 1994).

Inoltre, a livello dei singoli muscoli, la disposizione delle fibre muscolari nel muscolo e il loro metabolismo influenzano la qualità del prodotto finale (Wegner et al., 2000); in particolare, si fa riferimento a taglia, tipo, capacità ossidative, attività metabolica, contenuto in glicogeno e contenuto/solubilità del collagene delle singole fibre.

A livello del singolo individuo, l'età e il sesso degli animali contribuiscono alla determinazione della qualità della carne. In particolare, la diversa precocità tra maschi e femmine può portare a differenze sostanziali nello stato di ingrassamento e nell'età alla macellazione, che, come si è visto condizionano significativamente la qualità del prodotto finale. Differenze nella tenerezza possono essere spiegate da variazioni nelle caratteristiche delle fibre collagene (Purchas et al., 2005; Purslow, 2005), dipendenti dal sesso e dall'età del bovino. Il collagene che si forma per stimolazione di testosterone tra i 9 e 12 mesi è caratterizzato da elevata solubilità, condizione che conferisce alle carni di questi soggetti una tenerezza simile a quella di femmine e castrati. Dopo i 16 mesi invece il contenuto di collagene tende a valori pressoché costanti ma perde progressivamente di solubilità rendendo la carne più dura (Marchello et al., 1970; Choat et al., 2006).

FATTORI ESTRINSECI

Negli animali da carne, la tecnica di allevamento e l'alimentazione influenzano le performance produttive e la qualità organolettica e nutrizionale del prodotto (Iacurto et al., 2005; Keane M.G. et al., 1998; Keane M. G., 2004; Maltin et al., 1998; Sinclair et al., 1998; Razminiwicz et al., 2006). Ad esempio, i bovini allevati al pascolo forniscono una carne più scura rispetto a quelli di stalla; tale effetto dipende dalla dieta e dall'attività fisica e da fattori quali pH e infiltrazione adiposa (grasso di mazzatura) (Priolo et al., 2001).

Dal tipo di alimentazione dipendono anche la quantità e il tipo di composti volatili, e di conseguenza l'aroma, della carne (Ha et al., 1991; Sutherland et al., 1996; Elmore et al., 2000;

Young et al., 1997, Young et al., 2003; Geay et al., 2002). I composti volatili dei prodotti alimentari di origine animale possono essere presenti per un trasferimento diretto dagli alimenti o per una neosintesi metabolica (sintesi endogena), che nei bovini si realizza anche per attività dei microrganismi ruminanti (Suzuki et al., 1985). Inoltre, alcune di queste molecole derivano dal pascolo, perciò la loro presenza dipende anche da variabili quali la stagione, la collocazione geografica del pascolo, la sua composizione botanica o il tempo che gli animali trascorrono al pascolo (Mariaca et al., 1997; Fernández-García et al., 2002; Viallon et al., 1999; Viallon et al., 2000).

È importante che gli alimenti zootecnici consentano adeguati apporti di ferro e vitamina E (tocoferolo). Infatti, la quantità di ferro è in stretta relazione con i livelli di mioglobina, per cui disponibilità e concentrazione di tale microelemento sono fondamentali per conferire al prodotto finale le caratteristiche colorimetriche richieste dal mercato e dal consumatore. L'importanza della vitamina E si manifesta a vari livelli. Un importante beneficio in termini qualitativi è dato dall'azione antiossidante che la molecola esercita sulla mioglobina; da ciò si evince che, essendo l'erba fresca ricca di vitamina E, la carne degli animali al pascolo è meno soggetta all'imbrunimento durante la conservazione (Scollan et al., 2006). Al tocoferolo si attribuisce anche la capacità di ridurre il fenomeno dell'essudazione della carne e di attenuare i processi di irrancimento lipidico tipici della conservazione, con una *shelf life* di 7-14 giorni in condizioni simili a quelle di vendita (Taylor et al., 1994). La riduzione dell'ossidazione dell'ossimioglobina in metamioglobina e dei processi di irrancimento lipidico rappresentano i meccanismi alla base del prolungamento della vita commerciale della carne.

L'infiltrazione adiposa è rappresentata dal grasso intramuscolare presente nella carne, composto da trigliceridi, fosfolipidi e da composti non saponificabili come il colesterolo.

L'età dell'animale e il tipo di alimentazione ricevuta influiscono sul grasso della carne in termini quantitativi e qualitativi. Nei bovini di razze italiane tra i 12 e i 36 mesi, le percentuali di grasso nei tessuti sono generalmente 0,5 - 3,7%, mentre in soggetti di razze precoci ed estere si può raggiungere il 12%. Ricorrendo ad opportune tecniche di allevamento e di alimentazione è possibile manipolare la quantità di grasso, portandola ai valori richiesti dal mercato, che attualmente sono piuttosto bassi. Tuttavia, un'adeguata presenza di grasso intramuscolare è importante, perché determina la morbidezza, la succosità e l'aroma della carne cotta, che, con una percentuale di lipidi troppo bassa risulterebbe asciutta e insipida. In aggiunta, la quantità di grasso di marezzatura, più chiaro del tessuto muscolare e capace di conferire una certa luminosità, influenza il colore della carne; ciò spiegherebbe la minore intensità cromatica della carne di animali allevati in stalla rispetto a quella di soggetti provenienti dai pascoli (Crouse et al., 1984; Priolo et al., 2001).

Gli acidi grassi ingeriti dagli animali con la dieta possono essere depositati immutati nei tessuti adiposi o andare incontro a processi enzimatici, quali l'elongazione e la desaturazione, che hanno luogo nel muscolo, o la bioidrogenazione dei MUFA e PUFA, che ha luogo nel rumine. Ad esempio, per elongazione e desaturazione nel muscolo dell'acido α -linolenico, appartenente alla serie ω -3, si originano gli acidi eicosapentenoico (*Eicosapentaenoic Acid*, EPA) e docosaesaenoico (*Docosahexaenoic acid*, DHA), attivi nella prevenzione delle malattie cardiocircolatorie (Simopoulos, 1999). L'elevato contenuto di fibra dell'erba favorisce lo sviluppo della microflora cellulolitica ruminale, di cui *Butyrivibrio fibrisolvens*, uno dei ceppi batterici responsabili della bioidrogenazione ruminale (Kepler et al., 1967), è un esempio. In particolare, nella bioidrogenazione ruminale dell'acido linoleico si producono come intermedi di reazione due acidi grassi con riconosciute proprietà nutraceutiche, il rumenico (*Rumenic Acid*, RA) e il vaccenico (*Vaccenic Acid*, VA); quindi, contenendo l'erba verde dei pascoli più acido α -linolenico dei concentrati, la carne degli animali che se ne cibano può risultare più ricca in CLA e acido vaccenico (French et al., 2000; Santos Silva et al., 2002; Aurousseau et al., 2004).

In aggiunta, la carne di animali alimentati con erba verde, presenta quantità di acidi grassi ω 3 pari anche al doppio rispetto a quella degli animali nutriti in stalla con mangime concentrato, la quale invece si caratterizza per l'elevato tenore in acidi grassi ω 6 (Aurousseau et al., 2004). Tale

considerazione risulta particolarmente significativa se si considera che, secondo le linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (WHO, 2003), il rapporto n-6/n-3 nella dieta umana non dovrebbe eccedere il valore di 4.

Per quanto riguarda il pH finale, ad esempio, nel muscolo degli animali alimentati in stalla con mangimi concentrati si registrano valori più bassi che in quello dei bovini allevati al pascolo; ciò è collegato all'attività fisica e al conseguente ridotto accumulo di glicogeno, cui consegue un basso potenziale glicolitico (Daly et al., 1999).

TRASPORTO AL MACELLO

La qualità della carne peggiora nel caso in cui gli animali siano sottoposti a condizioni stressanti prima (digiuno) e durante il viaggio verso il mattatoio e nel periodo di sosta in attesa della macellazione (Schaefer et al., 1997; Knowles T.G., 1999; Maria et al., 2003; Hogan et al., 2007; Gregory, 1996). Infatti, la mobilitazione delle riserve energetiche il consumo del glicogeno muscolare per stress (Poso et al., 2005; Lacourt et al., 1985) non consente al muscolo di raggiungere un normale pH acido *post mortem*, compromettendo non solo l'idoneità alla trasformazione (carne DFD), ma anche la sicurezza microbiologica e la *shelf life* dell'alimento (McVeigh et al., 1982), con evidenti problemi di commercializzazione e perdite economiche per i produttori.

Spesso i macellatori richiedono che agli animali sia sospesa l'alimentazione a partire dal giorno precedente l'abbattimento, in modo tale da massimizzare le rese e ridurre quantità e costo del materiale da smaltire. Tuttavia, digiuni pre-macellazione eccedenti le 12 ore sono in grado di alterare pH, colore, tenerezza e succosità della carne, compromettendone, in definitiva, la qualità (Jones et al., 1990; Fernandez et al., 1996; Schaefer et al., 2001)

Al fine di limitare lo stress, in azienda i soggetti devono essere movimentati con tranquillità, allestendo percorsi semplici e privi di rischi e usando rampe di carico-scarico ricoperte di paglia, non ripide; oltre a ciò, i mezzi di trasporto devono essere idoneamente attrezzati per consentire loro un adeguato comfort, rappresentando il viaggio di per sé e il tempo di attesa pre-macellazione eventi particolarmente stressanti, da cui la definizione "fatica di trasporto".

LA MACELLAZIONE

La macellazione inizia con lo stordimento dell'animale mediante un'apposita pistola con proiettile captivo. Questo momento è importante per due motivi; in primo luogo, evita la percezione del dolore nelle fasi successive, come previsto dalla Council Directive 93/119/CE del 22/12/1993; secondariamente, un'esecuzione imprecisa di tale pratica determina un incremento dell'incidenza dell'alterazione nota come "puntinatura" (*blood splash*) nei tagli di prima qualità, con comparsa del sapore di sangue e riduzione della *shelf-life* (Lammens et al., 2006; Gregory, 2005). La fase successiva è la iugulazione, ossia il taglio dei principali vasi sanguigni, che interrompe l'afflusso del sangue al cervello e provoca la morte dell'animale per dissanguamento. Anche in questo caso la corretta esecuzione è fondamentale, perché, quando i vasi sanguigni si svuotano solo parzialmente, il sangue può ristagnare in alcune zone della carcassa, con aumento della proliferazione batterica, riduzione delle rese allo spollo per i maggiori scarti di dissezione e comparsa di colorazioni e *flavour* anomali (Gregory, 2005).

LE COMPONENTI DELLA QUALITÀ

L'interpretazione del concetto di qualità si è evoluta al variare delle preferenze del consumatore, che sono strettamente legate al modello di vita seguito; tuttavia il grado di apprezzamento dipende anche da quale componente: organolettica, nutritiva, sanitaria, tecnologica od economica, prevale nel definire l'accettabilità del prodotto.

Nel settore alimentare, esistono numerose variabili coinvolte nella definizione di qualità, che per di più si caratterizzano per soggettività e forti legami culturali e familiari. A ciò si aggiunge la

tendenza del consumatore contemporaneo a richiedere prodotti standardizzati e dotati di caratteristiche costanti, sicuri dal punto di vista igienico-sanitario, con alto valore nutrizionale e basso contenuto energetico e possibilmente con effetti migliorativi sulla salute. Alla luce di quanto esposto, si comprende il frequente ricorso alla nozione di “Qualità Totale”, articolata nelle componenti qualità organolettica, qualità nutrizionale, qualità igienico-sanitaria e qualità tecnologica, schematizzabile con la seguente relazione:

$$\text{Qualità Totale} = \text{Q. Igienico-Sanitaria} + \text{Q. Tecnologica} + \text{Q. Organolettica} + \text{Q. Nutrizionale}$$

QUALITÀ IGIENICO-SANITARIA

Questa componente è la *conditio sine qua non* per poter definire la carne “alimento” e, cibarsene non deve comportare alcun rischio per la salute del consumatore; quindi è necessario garantire l’assenza nel prodotto di ogni sostanza con possibile azione nociva (infettiva, parassitaria, radioattiva, ecc.). In particolare, si considerano aspetti quali la provenienza delle carni da animali vivi non affetti da malattie, l’assenza nella carne di parassiti e di microrganismi patogeni, il rispetto dei limiti di tolleranza fissati dalle norme vigenti per la concentrazione di residui di farmaci, antibiotici, antiparassitari, elementi radioattivi, e l’assenza totale di residui di sostanze ad azione ormonale o antiormonale, per le quali il limite di tolleranza è uguale a zero, essendo vietate dalla legislazione comunitaria (“Pacchetto Igiene”, Reg. (CE) 853/ 2004).

Il Servizio Veterinario delle ASL (Aziende Unità Sanitarie Locali) ha il compito di garantire che le aziende operino nel rispetto dei suddetti requisiti di qualità; inoltre, il DLgs 26/5/97, n.155, entrato in vigore l’1/4/2000, che recepisce le Dir.93/43/CE e 96/3/CE¹, ha reso obbligatoria per i soggetti implicati nella filiera produttiva l’applicazione del sistema di analisi dei punti critici di controllo del rischio HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*), utilizzato per individuare ed eliminare tutte le possibili fonti di rischio per la salute umana che si possono incontrare durante il processo produttivo.

QUALITÀ TECNOLOGICA

Tale componente della qualità totale descrive l’attitudine della carne ad essere trasformata e conservata e per questo è di grande interesse tanto per il consumatore, quanto per i settori della macellazione e della distribuzione. La capacità di ritenzione idrica, il pH e l’attitudine alla conservazione in condizioni di refrigerazione² sono i parametri che meglio consentono di definire la qualità tecnologica della carne.

CAPACITÀ DI RITENZIONE IDRICA (WATER HOLDING CAPACITY, WHC)

Tra i criteri qualitativi che si riflettono sulle attitudini tecnologiche della carne, la capacità di ritenzione idrica è la tendenza del prodotto a rigonfiarsi per l’incorporazione di acqua esogena, legata alla facoltà delle proteine di trattenere una quantità di acqua più o meno grande, oltre a quella di costituzione. Questo comportamento dipende dalla percentuale di acqua libera del muscolo (95%), cioè quella trattenuta solo meccanicamente dalle fibre muscolari e dal tessuto connettivo e

¹Questa normativa è stata sostituita dal Regolamento CE 178/2002 e dal Regolamento CE 852/2004.

Data l’ampia gamma di imprese alimentari prese in considerazione dal Regolamento CE 852/2004 e la grande varietà di prodotti alimentari e di procedure di produzione applicate agli alimenti, nel 2005 la Commissione europea ha redatto delle linee guida generali (Commissione delle Comunità Europee, 2005) sullo sviluppo e l’applicazione delle procedure basate sui principi del sistema HACCP, come documento diretto ad aiutare tutti coloro che intervengono nella catena della produzione alimentare. Tali linee-guida si ispirano principalmente ai principi enunciati nel *Codex Alimentarius* CAC/RCP 1-1996 Rev 4-2003 9 (Ministero della Salute, 2013).

² Per la trattazione di questo parametro si rimanda al capitolo sull’ossidazione dei lipidi intramuscolari.

che, al contrario dell'acqua legata (5%), non ha legami chimici con le proteine. Ad una bassa capacità di ritenzione idrica corrisponde una alta quantità di acqua espulsa durante la masticazione e quindi una elevata succosità (Lawrie, 1983); tale parametro è inoltre correlato positivamente con la tenerezza (Gigli et al., 1994). La WHC è estremamente variabile dipendendo da razza, età, sesso, alimentazione, sistema di allevamento, modalità di macellazione, tipo di muscolo e caratteristiche proprie del singolo individuo (Lawrie, 1983).

Qualsiasi tipo di carne subisce una trasudazione liquida, la cui entità dipende da fattori intrinseci, quali razza, età e tipo di muscolo, ed estrinseci, come la modalità di conservazione e tipo di taglio; in particolare, la consistenza dell'essudato è condizionata dai cambiamenti del muscolo successivi alla macellazione, dipendendo soprattutto da quelli che influenzano il valore di pH finale e le variazioni volumetriche delle miofibrille, esistendo una stretta correlazione tra i fenomeni glicolitici post-mortali e la formazione di liquido di trasudazione.

Per quanto riguarda la terminologia tecnica, nelle carni fresche, scongelate e cotte questo fenomeno è indicato come *weep* (v. ing. *to weep*: essudare), *drip* (v. ing. *to drip*: sgocciolare) e *shrink* (v. ing. *to shrink*: restringersi), rispettivamente.

In condizioni normali, nella carne fresca la WHC diminuisce per vari motivi, tra cui l'abbassamento del pH, la riduzione della ionizzazione delle molecole deputate a legare acqua in prossimità del loro punto isoelettrico, e l'avvicinamento delle miofibrille, seguito dall'espulsione di acqua per riduzione dello spazio tra i filamenti (Cattaneo et al., 2003).

È rilevante, infine, sottolineare che i fattori influenti sul fenomeno della trasudazione delle carni fresche partecipano anche allo sviluppo dello *shrink*; a causa delle alte temperature raggiunte durante la cottura, che determinano una rapida denaturazione delle proteine muscolari, con indebolimento dei legami fisici con l'acqua.

Dalla capacità di ritenzione idrica dipendono direttamente le perdite di sgocciolamento (*weep losses*), di scongelamento e di cottura (*shrink* o *cooking losses*) (percentuale di liquidi persi rispetto al peso iniziale del campione), da considerarsi comunque peggiorative per la qualità, determinando la riduzione della succosità e la fuoriuscita, con l'acqua, dei composti nutritivi idrosolubili della carne (Dell'Orto e Sgoifo Rossi, 2000). Le *weep losses* si verificano per refrigerazione della sola carne fresca sono calcolabili come calo da frigo, ad esempio ponendo il campione in frigorifero a sgocciolare per 24 ore (Lawrie, 1983; Panella et al., 1995). Tali perdite possono incidere negativamente al momento dell'acquisto, perché il consumatore, imputando la presenza di essudato al di sotto della carne cruda a scarsa freschezza del prodotto, non ne gradisce la vista (Dell'Orto e Sgoifo Rossi, 2000). Le *drip losses*, invece, sono legate, a fattori intrinseci alla carne e fattori tecnologici. Tra questi ultimi, è di rilievo la velocità di congelamento, che deve essere alta; infatti, con un tempo di congelamento lungo si formano grandi cristalli di ghiaccio voluminosi, con distruzione della struttura cellulare del tessuto e perdita della capacità di trattenere i liquidi (Grau, 1978; Lawrie, 1983). A tal proposito, si ricorda che il grasso sottocutaneo esercita un'azione protettiva sul muscolo capace di rallentare il calo di temperatura durante il congelamento (Renieri et al., 1993). Al contrario, le *cooking losses* coinvolgono sia l'acqua che il grasso (Grau, 1978) e anch'esse influenzano negativamente la scelta del consumatore, il quale tende a collegarle con un eccessivo e fraudolento tenore idrico del prodotto al quale, in ultima analisi, attribuisce uno scarso valore nutritivo. Le perdite di cottura dipendono dalla temperatura e quindi dalla modalità di cottura; infatti, alte temperature accrescono il fenomeno della denaturazione proteica e agevolano la perdita di grasso fuso, specialmente in tagli ricchi di tessuto adiposo. Inoltre, aumenti di temperatura graduale determinano perdite più ingenti di salti repentini, i quali favoriscono la formazione di una crosta esterna di proteine coagulate (rosolatura) che riduce le perdite (Lawrie, 1983; Lusetti, 1983).

pH

La misura di questo parametro, effettuata al momento della macellazione (pH_0) e dopo 24 ore (pH_{24}), consente di valutare le potenzialità del muscolo a trasformarsi in carne di buona qualità e di individuarne l'attitudine alla conservazione, perché bassi valori di pH limitano la crescita microbica, con prevenzione delle alterazioni (Dell'Orto et al., 2000). Al fine di ottenere una carne di buona qualità, dopo la macellazione il pH deve abbassarsi per effetto dell'aumento della concentrazione di acido lattico prodotto dalla glicolisi anaerobica; tuttavia è importante che il calo sia graduale, perché un'acidificazione troppo rapida induce la denaturazione delle proteine e la riduzione della capacità di ritenzione idrica (Lawrie, 1983; Lanza e Biondi, 1990). La modalità di conservazione influenza il pH e in particolare, con il congelamento la concentrazione idrogenionica si abbassa in misura maggiore rispetto alla sola refrigerazione (Moore et al., 1998).

Anche lo stress psico-fisico, soprattutto immediatamente prima della macellazione, induce cambiamenti di pH, innescando un incremento del consumo delle riserve muscolari di glicogeno, che si traduce in una scarso glicolisi anaerobia *post mortem*, con insufficiente calo di pH, che risulta in carni DFD (Lawrie, 1983; Sarti, 1992c; Renieri et al., 1993; Dell'Orto e Sgoifo Rossi, 2000); viceversa un calo del pH troppo rapido può dare carni pallide, molli, essudative o PSE (Renieri et al., 1993). Poiché i complessi enzimatici attivi *post mortem* nei muscoli hanno specifici e caratteristici valori ottimali di pH, la tenerezza, l'aroma, il potere di ritenzione idrica e il colore della carne sono influenzati dal pH stesso; da tali considerazioni emerge la grande importanza di questo parametro nelle trasformazioni del muscolo dopo la macellazione (Panella et al., 1995; Dell'Orto e Sgoifo Rossi, 2000).

QUALITÀ ORGANOLETTICA

I parametri che si prendono in esame per valutare i caratteri organolettici degli alimenti sono numerosi; per quanto concerne la carne i più rilevanti sono colore, odore e sapore e consistenza. Per valutare tali caratteri si ricorre spesso al *panel test*, un'analisi di tipo soggettivo, basata sui risultati di una prova di assaggio svolta da un gruppo di assaggiatori scelti e/o addestrati *ad hoc* (*panel*), che provvedono a descrivere le sensazioni visive, olfattive, gustative e tattili del prodotto in esame, servendosi di moduli prestampati appositamente predisposti.

COLORE

Essendo un aspetto di facile e immediata valutazione, altamente correlato con tutte le altre caratteristiche qualitative della carne, il colore è il primo indicatore di qualità per il consumatore; ad esempio, nella carne di vitellone il rosso vivo è sinonimo di elevata freschezza ed ogni scostamento da tale livello di riferimento è interpretato come indice di cattive condizioni di conservazione e, in ultima analisi, di scadente qualità.

Questa caratteristica dipende in gran parte dal tipo di attività del muscolo in esame, dal suo contenuto in mioglobina, che aumenta rapidamente durante i primi 30 mesi di vita per poi attestarsi su tassi di incremento ridotti, dal livello di ossigenazione-ossidazione di tale proteina, e dalla glicolisi post mortale. A seconda dello stato di ossidazione della mioglobina, la carne può assumere i colori rosso porpora, (mioglobina ridotta), rosso vivo (mioglobina ossigenata), rosso bruno (mioglobina ossidata) e, nel caso di gravi alterazioni del pigmento, bruno-grigiastre o verdi (Lawrie, 1983). Inoltre, alcune variazioni fisiche del muscolo, quali riduzione del pH, presenza di rete miofibrillare chiusa e molto riflettente, possono dare invece carne pallida (Panella et al., 1995).

Un altro fattore che influenza il colore della carne è il pH. Infatti, tanto più alto è il pH finale quanto maggiore è l'attività residua dei citocromi nel tessuto muscolare, che determina un'elevata ritenzione idrica, contribuendo al precoce scadimento qualitativo della carne e alla prevalenza di una colorazione scuro. Quest'ultimo aspetto dipende sia dall'incremento della capacità della carne di assorbire la luce, con limitazione della riflessione e conseguentemente della percezione del colore rosso da parte dell'occhio umano, che da una minore formazione di ossimioglobina a causa della competizione enzimatica per l'ossigeno. Inoltre, anche l'evoluzione del pH nelle fasi

immediatamente successive alla macellazione riveste notevole importanza nella determinazione del colore. In particolare, una diminuzione troppo rapida comporta la riduzione del potenziale di ritenzione idrica della carne, con evidente alterazione cromatica, cui consegue la produzione delle carni pallide, lasse ed essudative (*Pale Soft and Essudative*, PSE). Tale difetto compare come diretta conseguenza di una troppo lenta diminuzione della temperatura *post mortem*, soprattutto a livello delle masse muscolari profonde, ma è più frequente nei suini che nei ruminanti. Nei bovini è più comune avere valori finali di pH subottimali, che sono all'origine delle carni scure, asciutte e compatte (*Dark Firm and Dry*, DFD), caratterizzate da colore bruno-violaceo, tessitura eccessivamente compatta, ritenzione idrica elevata, superficie asciutta, e aroma poco intenso per la scarsa presenza di acido lattico. Il fenomeno è causato dal precoce consumo del glicogeno, innescato dall'instaurarsi di condizioni eccessivamente stressanti per l'animale o da un'impropria gestione nutrizionale dei soggetti in fase di pre-macellazione.

Infine, l'intensità cromatica dipende anche dal tipo genetico dell'animale, dalla sua età, dal sesso, dalla dieta e dal tipo di allevamento. Per quanto riguarda gli alimenti zootecnici, riveste grande importanza il loro contenuto di molecole ad azione antiossidante (Sampels, 2013). Infine, è rilevante precisare che essendo i muscoli degli animali allevati al pascolo molto tonici, ben irrorati di sangue e ricchi di mioglobina, la loro carne ha una colorazione più intensa, pur risultando più dura di quella dei soggetti provenienti da stabulazione fissa. Tale risultato dipenderebbe sia dalla maggiore attività fisica dei primi, che dal minore contenuto di glicogeno dei loro muscoli (Vestergaard et al., 2000).

ODORE E SAPORE

L'odore, di cui l'aroma è un aspetto, è caratteristico di ogni specie animale ed è bene apprezzabile dopo un certo tempo dalla macellazione; è influenzato dal sesso e dal tipo di alimentazione

Il sapore è tipico di ogni specie animale ed è strettamente legato alle condizioni di allevamento; ad esempio, le carni di bovini di razza Maremmana allevati al pascolo nella Maremma toscana e laziale (ANABIC, 2012) sono particolarmente gustose, perché gli animali si alimentano delle essenze spontanee della macchia, particolarmente ricche di oli essenziali (Goracci et al., 2007).

Data la loro complementarità, odore e sapore sono generalmente presi in considerazione insieme.

L'odore contribuisce alla determinazione del *flavour*, l'impressione sensoriale globale prodotta dalla combinazione delle sensazioni gustative, olfattive e tattili che si sviluppano mangiando (Blitz et al., 2000). Tale percezione è generata dall'interazione di una molteplicità di composti chimici; afferenti alle categorie delle sostanze aromatiche volatili, i cui recettori sono di tipo olfattivo e localizzati a livello della mucosa nasale, e delle sostanze gustative non volatili, avvertibili per contatto con i recettori della cavità orale e responsabili dei quattro sapori fondamentali, dolce, acido, salato, amaro). È da rilevare anche l'esistenza di particolari composti ad azione sinergica, responsabili dell'intensificazione del *flavour* degli altri a seguito della cottura; in particolare, i processi implicati nel potenziamento di tale carattere organolettico sono le reazioni di Maillard, tra aminoacidi e zuccheri riducenti, la degradazione dei grassi e la parziale degradazione della tiamina (Vitamina B1). A titolo di esempio, nella carne bovina arrostita, le tipiche note arrostito-aspre e arrostito-caramellate si sviluppano a seguito della reazione di Maillard tra gli aminoacidi liberi e il glucosio, mentre le note aromatiche simili al grasso sono dovute all'ossidazione parziale degli acidi grassi insaturi della frazione lipidica, quali linoleico e linolenico (Cerny et al., 1993). In questo senso, l'aroma nella carne è dovuto più al tessuto adiposo che non a quello muscolare (Lanza e Biondi, 1990), dato che il primo è in grado di "intrappolare" aromi originati da altri composti chimici, per poi liberarli durante la cottura e, soprattutto, perché buona parte delle sostanze volatili sprigionatesi durante la cottura derivano dall'ossidazione dei lipidi (Elmore et al., 2000). Inoltre, l'intensità del *flavour* è correlata positivamente con la presenza degli acidi grassi a catena lineare

stearico, oleico e linolenico e negativamente con la quantità di acido linoleico. Il fatto che poi tale maggiore intensità dell'aroma sia gradita o meno al consumatore è strettamente legato alle tradizioni, usi e abitudini alimentari individuali e collettive (Sañudo et al., 2000a; Alfonso e Sañudo, 2000).

CONSISTENZA

La consistenza, o *texture*, è un insieme di proprietà della struttura di un alimento, che il consumatore percepisce a livello sensoriale; secondo la norma ISO 5492 questo termine indica “[...] tutti gli attributi meccanici (geometrici e di superficie) di un alimento percepibili attraverso recettori meccanici, tattili, visivi e, quando appropriato, uditivi.”(ISO, 1992). Tali proprietà sono spesso qualificate come reologiche, essendo la reologia degli alimenti quella branca della scienza alimentare impegnata nello studio delle modalità con cui la consistenza cambia al variare delle condizioni ambientali, principalmente pressione e temperatura.

Al fine di produrre un alimento bene accetto alla maggioranza dei consumatori, bisogna tenere presente che animali giovani forniscono carni dotate di minore consistenti e maggiore tenerezza rispetto a quelle ottenute da soggetti adulti, le quali risultano più dure e talvolta tigliose; oltre a ciò, una carne risulta tenera e saporita quando deriva da un muscoli provvisti con un adeguato tenore in grasso e sottoposti ad una appropriata frollatura.

Per valutare la *texture* del tessuto muscolare si ricorre alla descrizione delle sue componenti, ossia tessitura e grana, entrambe dipendenti in primo luogo dal muscolo in esame e definite dal diametro dei fasci di fibre muscolari nei quali il muscolo è diviso ad opera del tessuto connettivo (Lusetti, 1983). La grana può essere finissima (vitello), fine (vitellone), media (vitellone, manzo), grossolana (vacca, toro) e si valuta esaminando l'aspetto della sezione trasversale di un taglio di carne, perpendicolare alle fibre muscolari; in particolare, quando la superficie di taglio appare morbida e vellutata la grana si dice fine ed è indicativa di un ridotto diametro dei fasci di fibre, mentre se la superficie di taglio è ruvida e asciutta la grana si dice grossolana, è imputabile a un grande diametro dei fasci ed è tipica degli animali anziani. Invece, per valutare la tessitura si seziona il muscolo nel senso delle fibre e lo si stira leggermente per evidenziare la disposizione longitudinale dei fasci muscolari del primo ordine in relazione alla quantità di tessuto connettivo. La tessitura può essere lassa o compatta; ad esempio, nei bovini la tessitura della carne è lassa nel vitello e nella vacca a fine carriera, compatta nel toro e a carattere intermedio nel vitellone.

Il consumatore percepisce la consistenza di un alimento mangiandolo, per cui si può definire una carne tenera se facilmente masticabile, fibrosa se triturandola con i denti se ne percepiscono le fibre, succosa, quando mordendola fuoriesce l'acqua e coesiva quando è difficile da inghiottire (Carlucci et al., 1999).

La tenerezza è la proprietà reologica più influente nell'orientare le preferenze dei consumatori (Risvik, 1994). ed è data da masticabilità, morbidezza, pastosità, succosità, quantità e specie dei residui dopo la masticazione, compattezza, robustezza e lunghezza delle fibre (Grau, 1978). L'entità di tale parametro dipende dalla quantità e dalle caratteristiche del tessuto connettivo presente nel muscolo, con particolare riferimento al collagene, alla sua solubilità e al grado di ramificazione delle sue strutture (Grau, 1978, Renieri et al., 1993).

È possibile definire la tenerezza come l'attitudine della carne a lasciarsi deformare e tagliare, che dipende dalla durezza di base e dalla durezza miofibrillare.

La durezza di base dipende dalla quantità e qualità di fibre di collagene (connettivo) del muscolo; a livello commerciale, tanto maggiore è il tenore in collagene, quanto più elevata è la durezza e minore il pregio (quarto anteriore). Per quanto riguarda la correlazione della durezza con l'età si evidenziano due aspetti contrastanti. Infatti, durante lo sviluppo e l'accrescimento delle strutture anatomiche la molecola di collagene si infittisce con legami inter- ed intra-molecolari (Caserio et al., 1985). Tuttavia, durante la crescita dell'animale è osservabile un intenerimento del tessuto muscolare, causato verosimilmente da un'iniziale riduzione della percentuale di connettivo,

conseguente all'aumento di volume delle fibre muscolari, a cui non corrisponde un altrettanto veloce invecchiamento del collagene; ad esempio, la carne di un vitellone di 12-18 mesi è dotata di maggiore tenerezza di quella di un vitello di 6 mesi, ma quella di un adulto di 30 mesi è significativamente più dura (Campodoni et al., 1988). Inoltre, individui di sesso femminile forniscono una carne più tenera di quella dei maschi; infatti, non solo la maggiore precocità ne consente la macellazione ad un'età inferiore, ma nel loro tessuto muscolare è presente un ridotto quantitativo di collagene maturo.

Dato che la frollatura non determina effetti rilevanti sul collagene, per risolvere la durezza è essenziale la cottura.

La durezza miofibrillare è una caratteristica dipendente dalla struttura miofibrillare del muscolo dopo la macellazione, per cui legata alle condizioni di *rigor mortis* e alla sua risoluzione.

Altri fattori che partecipano, per via diretta o indiretta, alla determinazione della tenerezza sono il diametro delle fibre muscolari, il contenuto in grasso, la modalità di lavorazione della carne dopo la macellazione e la condizione psicofisica dell'animale nel periodo immediatamente precedente la macellazione. In particolare, il diametro delle fibre muscolari influenza il parametro in esame in modo direttamente proporzionale, mentre il contenuto in grasso, se adeguato, determina una diluizione delle fibre connettivali responsabile dell'intenerimento del prodotto (Martens et al., 1982).

Anche le condizioni di mantenimento della carcassa dopo la macellazione, quali temperatura, velocità di raffreddamento e metodo di sospensione, svolgono un ruolo nel processo di intenerimento.

Di particolare rilievo ai fini dell'ottenimento di una consistenza gradita al consumatore è il controllo del pH raggiunto dalla carne al termine della glicolisi *post mortem*. Infatti, ad un incremento del pH da 5.5 a 6.0 la tenerezza è associata l'indurimento, a un pH finale maggiore di 6.0 si verifica un intenerimento, mentre al raggiungimento di un valore di pH pari a 6.8 la carne assume una consistenza gelatinosa.

In ultima analisi, la condizione psicofisica dell'animale nelle ore a ridosso della macellazione è di fondamentale importanza, perché lo stress modifica le caratteristiche della carne, e in particolare il colore, la tenerezza e il pH (Lucifero et al., 1985).

Nei *panel test*, la percezione della tenerezza è valutabile chiedendo agli assaggiatori di attribuire un punteggio al comportamento del prodotto rispetto alla resistenza alla penetrazione dei denti, alla tendenza a suddividersi in frammenti durante la masticazione e all'entità del residuo che rimane in bocca al termine della masticazione.

Anche la succosità è una caratteristica estremamente importante per definire il gradimento di una carne; in essa si individuano una componente immediata, data dalla sensazione di umidità dei primi atti masticatori dovuta alla rapida liberazione dei liquidi contenuti nell'alimento, ed una prolungata, conseguente all'azione stimolante sulla salivazione esercitata dai grassi della carne. Questo spiega perché consumando carni povere di grasso intramuscolare, come quelle derivanti da animali giovani (Lawrie, 1983), si avverte una iniziale sensazione di succosità, che repentinamente muta in secchezza. Nei *panel test*, tale proprietà è valutata come quantità di liquido rilasciata dal campione dopo due di atti masticatori (Campo et al., 1999) o come percezione di umidità totale in bocca al termine della masticazione (Sañudo et al., 2000b). Naturalmente tutti i fattori che determinano delle perdite d'acqua, come lo scongelamento o talune modalità di cottura, determinano una diminuzione della succosità, che è strettamente legata alla capacità di ritenzione idrica (Lawrie, 1983).

QUALITÀ NUTRIZIONALE

Tale caratteristica fa riferimento alla presenza nella carne di caratteristiche dietetiche favorevoli per la salute del consumatore, con particolare riferimento a proteine ed aminoacidi essenziali, lipidi

ed acidi grassi essenziali³, vitamine e sali minerali, la cui importanza relativa ha subito variazioni nel corso del tempo. Infatti, in passato si valutavano positivamente l'apporto energetico e l'attitudine alla cottura della carne grassa, mentre la società contemporanea preferisce carne magra con alto valore nutrizionale e apportatrice di sostanze necessarie per mantenere un buono stato di salute, quali aminoacidi essenziali (*Essential Amino Acid*, EAA), vitamine, minerali in forma organica ed acidi grassi essenziali. Per di più, oggi le scelte alimentari del consumatore sono orientate anche da fattori come la protezione da squilibri nutrizionali (funzione equilibratrice della dieta), le attività salutari di tipo extra-nutrizionale, neuro-ormonale, pro-immunitario e psico-dietetico e le proprietà nutraceutiche, come l'azione anticolesterolemizzante.

La carne bovina ha una composizione chimica variabile in relazione ai differenti fattori, ma nel complesso è un alimento di elevato valore nutrizionale, ricco di proteine, vitamine, tra cui B9, B8 e B12, e minerali, quali ferro, rame, zinco, fosforo, potassio, selenio, rame e cobalto, in forme facilmente assimilabili dall'uomo; inoltre, non bisogna trascurare l'apporto di lipidi, mentre è la frazione glucidica è di scarso rilievo.

La composizione chimica media della carne delle più comuni specie d'allevamento selezionate a scopo alimentare è riportata in Tabella 1.

Tabella 1. Composizione della carne (Secchiari, 2008)

CARNI	Acqua	Proteine	Lipidi	Energia		Sodio	Potassio	Ferro	Calcio	Fosforo	B1	B2	PP	Vit A	Vit
	g	g	g	kcal	kJ	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	ret. eq. mg	C mcg	E mg
Agnello	70,1	20,0	8,8	159	666	88	350	1,7	10	190	0,15	0,28	6,00	tr	0
Anatra domestica	68,8	21,4	8,2	159	667	110	290	1,3	12	200	0,19	0,18	7,70	80	0
Bovino adulto – tagli anter.	20,5	7,0	145	607	43	291	1,3	10	180	0,10	0,15	4,80	tr	0	
Bovino adulto – tagli poster.		21,5	3,4	117	488	55	335	1,6	4	190	0,11	0,18	4,70	tr	0
Bufalo			1,1												
Capretto	74,8	19,2	5,0	122	510			1,0	9	220	0,25	0,10	5,70		0
Cavallo	74,9	19,8	6,8	143	597	74	331	3,9	4	231	0,04	0,18	5,54		0
Coniglio crudo	74,9	19,9	4,3	118	495	67	360	1,0	22	220	0,03	0,30	6,30		0
Daino	75,8	21,0	1,2	95	397	81	349	2,8	16	403	0,22	0,48	6,40		
Fagiano	69,2	24,3	5,2	144	602	70	290				0,17	0,19	11,30		0
Gallina	66,0	20,9	12,3	194	813			1,6	15	205	0,30	0,10	4,00		0
Maiale, leggero (coscio)	75,2	20,2	3,2	110	459	76	370	1,6	12	233	1,35	0,20	4,50	tr	0
Maiale, pesante (coscio)	72,9	20,4	5,1	128	533	76	370	1,7	8	176	0,31	0,31	3,80	5	0
Pollo crudo	69,5	19,0	10,6	171	717	62	300	0,6	5	160	0,08	0,14	5,00	tr	0
Struzzo crudo		76,1	20,9	0,9	92	384									
Tacchino crudo	73,6	18,2	6,9	135	564									tr	0

³ Benché l'attributo "essenziali" sia correntemente usato, oggi si preferisce sostituirlo con "indispensabili", in quanto, seppur in misura limitata, il nostro organismo è in grado di creare delle riserve di questi acidi grassi nei depositi lipidici (Secchiari et al., 2011)

Di seguito, si prendono in esame gli aspetti principali della qualità nutrizionale della carne bovina, con particolare riferimento al contenuto di proteine, lipidi, sali minerali, vitamine e alle eventuali proprietà funzionali di alcuni di questi nutrienti.

PROTEINE

Per l'uomo, la carne è innanzitutto fonte di proteine; se si considera che il fabbisogno proteico giornaliero dell'uomo adulto, consigliato da FAO/WHO/ONU (FAO, 2011) e dal *Food Nutrition Board* della *National Academy of Sciences* negli USA (USDA, 2002/2005), è pari a 0,5-1 g/kg peso corporeo, a seconda dell'età, del sesso, dello stato fisiologico e del livello di attività fisica), si può affermare che 100 g di carne bovina coprono circa la metà di tale fabbisogno.

Le sostanze proteiche sono necessarie per costruire i protoplasmi e le membrane cellulari (funzione plastica), anche se talvolta possono essere consumate per produrre energia, in luogo di glucidi e lipidi; si tratta di molecole con strutture e funzioni diversificate, distinguibili in proteine fibrillari, sarcoplasmatiche e stromatiche (Secchiari, 2008).

Alle proteine fibrillari appartengono, ad esempio actina, miosina, tropomiosina e troponina, che sono responsabili della contrazione muscolare e fondamentali per la capacità di trattenere l'acqua. Tra le proteine sarcoplasmatiche si trovano l'emoglobina e la mioglobina, fondamentali per il colore della carne, gli enzimi citoplasmatici coinvolti nel metabolismo glucidico e lipidico e gli enzimi mitocondriali liberati per rottura delle membrane di tali organelli. Nelle proteine stromatiche rientrano principalmente collagene ed elastina, che insieme determinano la durezza di base del prodotto (Secchiari, 2008).

Tali sostanze proteiche, per di più, sono di notevole qualità, per varie peculiarità; in particolare, hanno un coefficiente di utilizzazione digestiva molto elevato, perché presentano sequenze di amminoacidi (AA) tali da favorire l'azione degli enzimi proteolitici gastrici ed intestinali (Lucifero et al., 1988), hanno una composizione amminoacidica completa e bilanciata, per la presenza di AA essenziali, ed hanno un valore biologico (VB)⁴ prossimo all'ottimo teorico. Infine, si evidenzia che le proteine delle carni molto ricche di collagene hanno un VB più basso delle altre, perché le proteine connettivali sono più povere di amminoacidi essenziali rispetto a quelle miofibrillari (Lucifero et al., 1988).

Per quanto riguarda gli AA e la loro funzione fisiologica nell'uomo, si segnala l'abbondanza di arginina; si tratta di un AA, essenziale durante l'infanzia e lo sviluppo, con azione stimolante nei confronti dell'ormone della crescita (*Growth Hormone*, GH), aspetto che contribuisce a spiegare il rapporto tra il consumo di carne e la statura media della popolazione. Un altro AA essenziale è il triptofano, implicato nell'aumento della produzione di serotonina, neurotrasmettitore ad effetto calmante e saziante, responsabile del potere appagante e tranquillante della carne. È inoltre rilevante la presenza nella carne di AA a catena ramificata (*Branched Chain Amino Acid*, BCAA), quali leucina, isoleucina e valina, che rappresentano approssimativamente il 35% degli AA essenziali presenti nel muscolo (49 g/kg) e il 40% di quelli necessari al fabbisogno giornaliero dell'adulto (35 mg/kg/d). In particolare, i BCAA sono direttamente fruibili come fonte energetica, ottimizzano il processo di gluconeogenesi intervenendo nelle reazioni di transaminasi alla base della formazione

⁴ Il VB corrisponde al rapporto tra azoto trattenuto e azoto assorbito e si può determinare con metodi chimici, microbiologici e biologici (Bonsembiante, 1976; Bonsembiante et al., 1969), con i quali si può stimare l'efficienza nutrizionale della proteina, in ordine alla sua attività plastica, cioè ai fini della costruzione e del rinnovo delle strutture organiche del corpo (Secchiari, 2008).

di alanina dall'acido piruvico, hanno azione detossificante nei confronti dell'ammoniaca e prevengono o riducono le formazioni di serotonina durante l'esercizio fisico (Secchiari, 2008).

LIPIDI

Un'altra componente importante della carne è costituita dai lipidi, sostanze che nell'organismo umano assolvono a molte ed importanti funzioni; essi infatti sono fonte di energia, entrano a far parte della struttura della membrana cellulare determinandone la funzionalità (Bettini, 1987), forniscono gli acidi grassi essenziali all'organismo e favoriscono l'assorbimento intestinale delle vitamine liposolubili.

I lipidi sono un gruppo di sostanze eterogenee, formate da carbonio (C), idrogeno (H), ossigeno (O) e occasionalmente fosforo (P), azoto (N) e zolfo (S), hanno in comune la solubilità nei solventi organici (acetone, alcoli, etere dietilico, idrocarburi) e l'insolubilità in acqua; quest'ultima caratteristica ne rende possibile il trasporto nel plasma, per raggiungere i tessuti, solo per associazione con particolari lipoproteine, tra cui quelle ad alta densità (*High Density Lipoprotein*, HDL), a bassa densità (*Low Density Lipoprotein*, LDL) e a densità molto bassa (*Very Low Density Lipoprotein*, VLDL).

Nei bovini, il grasso è localizzato al di sotto della cute e fra gli organi, come tessuto di riempimento; esso, inoltre, è in stretto rapporto con il tessuto connettivo lasso e i suoi accumuli costituiscono una riserva energetica utilizzabile in caso di penuria o assenza di alimenti.

Nella parte edibile della carcassa, il grasso si distribuisce nelle due frazioni periferica, eliminabile al momento del consumo, e localizzata. Quest'ultima costituisce il grasso di marezzatura e si trova tra i fasci di fibre e tra le fibre muscolari, per cui non può essere eliminata dal consumatore; l'entità di tale frazione, che serve come riserva energetica, dipende dalla razza, dall'età e dallo stato nutrizionale dell'animale.

Il grasso di marezzatura è caratterizzato dalla prevalenza dei trigliceridi ed è importante perché partecipa alla determinazione delle qualità tecnologica e nutrizionale della carne bovina; inoltre, nelle preparazioni culinarie si usa generalmente il muscolo privato del grasso periferico.

I lipidi della carne si distinguono in due frazioni; in particolare, la frazione saponificabile, che apporta acidi grassi, ed è costituita da trigliceridi, digliceridi, monogliceridi e fosfolipidi, e la frazione insaponificabile, che non apporta acidi grassi ed è rappresentata da colesterolo, vitamine liposolubili (soprattutto A ed E), pigmenti liposolubili, generalmente carotenoidi quali caroteni (molecole non contenenti ossigeno, come il β -carotene, precursore della vitamina A) e xantofille (molecole contenenti ossigeno), e alcuni ormoni.

Nella carne, i trigliceridi sono localizzati nel citoplasma delle cellule adipose e rappresentano una riserva di energia e di acidi grassi essenziali, mentre i fosfolipidi e il colesterolo (Figura 5), essendo costituenti delle membrane cellulari, formano il grasso funzionale. A tal proposito, si evidenzia che tutte le cellule animali dipendono dal colesterolo per irrigidire la struttura del doppio strato fosfolipidico di membrana, condizione necessaria per poter controllare la pressione osmotica citoplasmatica (Secchiari, 2008).

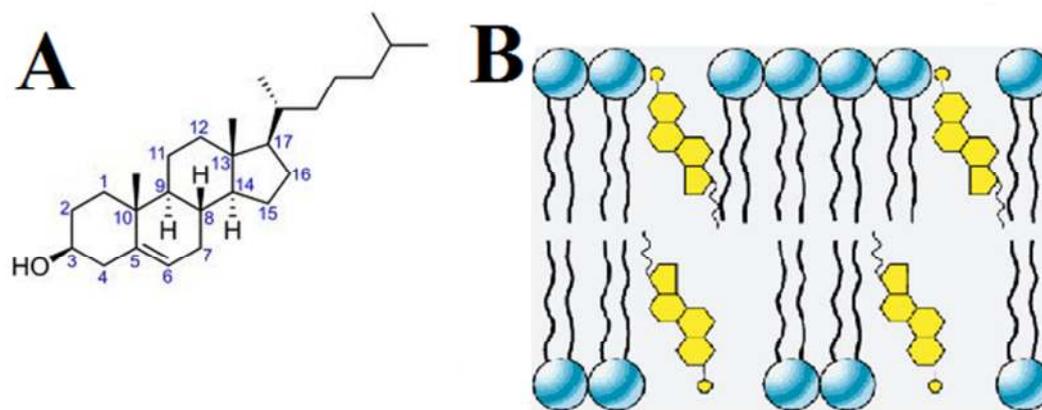


Figura 5. A: Struttura della molecola di colesterolo. B: Collocazione delle molecole di colesterolo all'interno del doppio strato fosfolipidico delle membrane cellulari.

I trigliceridi sono costituiti da glicerolo esterificato con tre molecole di acidi grassi, che possono differenziarsi per il livello di insaturazione (saturi, monoinsaturi e polinsaturi) e per la lunghezza della catena.

I fosfolipidi sono esteri del glicerolo, in cui gli acidi grassi occupano le posizioni 1 e 2, mentre in posizione 3 si trova un gruppo fosforico; a sua volta legato ad una base organica contenente azoto. Quindi, nella molecola di un fosfolipide si distingue una parte polare e idrofila (testa), da cui si dipartono due catene (code) non polari e idrofobe. Tali molecole, disposte in modo caratteristico, formano la struttura portante delle membrane cellulari.

Una parte dei lipidi della carne bovina deriva dalla biosintesi a livello dei tessuti, a partire da acetato e butirrato, mentre il resto ha origine alimentare, cioè dagli acidi grassi contenuti negli alimenti.

Gli acidi grassi assunti con la dieta non sono incorporati come tali nei tessuti organici, ma, una volta nel ruminante, subiscono alcune modificazioni ad opera della flora batterica e della microfauna protozoica, a seguito delle quali gli acidi grassi insaturi sono saturati, con produzione di metaboliti finali saturi e di vari prodotti intermedi, che hanno rilievo a livello nutrizionale. Come conseguenza di tali cambiamenti, il grasso bovino ha un rapporto SFA/UFA prossimo all'unità e maggiori quantità di acido stearico e oleico rispetto a quello di altri animali d'allevamento, come suino del coniglio.

Da quanto sopraesposto risulta anche evidente come la composizione del grasso intramuscolare dipenda dal tipo di alimenti assunti dall'animale. In particolare, il rapporto acidi grassi non essenziali/essenziali nella carne degli animali selvatici è di 3:1, mentre in quella dei ruminanti domestici è di circa 50:1 (Antongiovanni *et al.*, 1990). Tale effetto è imputabile alle essenze fresche ricche di acidi grassi polinsaturi di cui la dieta degli animali selvatici è ricca, per contro la dieta seguita dai bovini d'allevamento, specialmente di tipo intensivo, è basata su foraggi conservati e mangimi concentrati, i quali favoriscono i processi di bioidrogenazione ruminale responsabili dell'accumulo di acidi grassi saturi.

Acidi grassi (Fatty Acid, FA)

La molecola di un FA è costituita da una catena idrocarburica alifatica con un gruppo carbossilico (-COOH) terminale. In natura, il numero di atomi di carbonio di suddette catene è compreso tra 4 (C4) e 22 (C22). In presenza di soli legami singoli le molecole prendono il nome di acidi grassi saturi (*Saturated Fatty Acid*, SFA), mentre se nella catena è presente almeno un doppio legame si parla di acidi grassi insaturi (*Unsaturated Fatty Acid*, UFA) e, in particolare, di acidi grassi monoinsaturi (*Monounsaturated Fatty Acids*, MUFA) e acidi grassi polinsaturi (*Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFA) quando i doppi legami sono 1 o in numero superiore,

rispettivamente. A ciascuna molecola è attribuito un nome secondo le norme della IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), anche se per molte di esse è più usato il nome comune; inoltre, nella letteratura scientifica sono estremamente frequenti le notazioni abbreviate del tipo C_n:m, in cui n è il numero di atomi di C della catena alifatica e m è il numero di doppi legami. La nomenclatura IUPAC, i nomi comuni e la notazione abbreviata dei più comuni SFA e UFA sono riportate nelle seguenti tabelle (Tabella 2 e 3, rispettivamente).

Tabella 2. Nome sistematico, nome comune e notazione abbreviata dei più comuni acidi grassi saturi (Akoh et al., 2002)

Systematic name	Common name	Shorthand
Methanoic	Formic	1:0
Ethanoic	Acetic	2:0
Propanoic	Propionic	3:0
Butanoic	Butyric	4:0
Pentanoic	Valeric	5:0
Hexanoic	Caproic	6:0
Heptanoic	Enanthic	7:0
Octanoic	Caprylic	8:0
Nonanoic	Pelargonic	9:0
Decanoic	Capric	10:0
Undecanoic	—	11:0
Dodecanoic	Lauric	12:0
Tridecanoic	—	13:0
Tetradecanoic	Myristic	14:0
Pentadecanoic	—	15:0
Hexadecanoic	Palmitic	16:0
Heptadecanoic	Margaric	17:0
Octadecanoic	Stearic	18:0
Nonadecanoic	—	19:0
Eicosanoic	Arachidic	20:0
Docosanoic	Behenic	22:0
Tetracosanoic	Lignoceric	24:0
Hexacosanoic	Cerotic	26:0
Octacosanoic	Montanic	28:0
Tricontanoic	Melissic	30:0
Dotriacontanoic	Lacceroic	32:0

Tabella 3. Nome sistematico, nome comune e notazione abbreviata dei più comuni acidi grassi insaturi (Akoh et al., 2002)

Systematic name	Common name	Shorthand
<i>c</i> -9-Dodecenoic	Lauroleic	12:1 ω 3
<i>c</i> -5-Tetradecenoic	Physeteric	14:1 ω 9
<i>c</i> -9-Tetradecenoic	Myristoleic	14:1 ω 5
<i>c</i> -9-Hexadecenoic	Palmitoleic	16:1 ω 7
<i>c</i> -7, <i>c</i> -10, <i>c</i> -13-Hexadecatrienoic	—	16:3 ω 3
<i>c</i> -4, <i>c</i> -7, <i>c</i> -10, <i>c</i> -13-Hexadecatetraenoic	—	16:4 ω 3
<i>c</i> -9-Octadecenoic	Oleic	18:1 ω 9
<i>c</i> -11-Octadecenoic	<i>cis</i> -Vaccenic (Asclepic)	18:1 ω 7
<i>t</i> -11-Octadecenoic	Vaccenic	^a
<i>t</i> -9-Octadecenoic	Elaidic	^a
<i>c</i> -9, <i>c</i> -12-Octadecadienoic	Linoleic	18:2 ω 6
<i>c</i> -9- <i>t</i> -11-Octadecadienoic acid	Ruminic ^b	^a
<i>c</i> -9, <i>c</i> -12, <i>c</i> -15-Octadecatrienoic	Linolenic	18:3 ω 3
<i>c</i> -6, <i>c</i> -9, <i>c</i> -12-Octadecatrienoic	γ -Linolenic	18:3 ω 6
<i>c</i> -6, <i>c</i> -9, <i>c</i> -12, <i>c</i> -15-Octadecatetraenoic	Stearidonic	18:4 ω 3
<i>c</i> -11-Eicosenoic	Gondoic	20:1 ω 9
<i>c</i> -9-Eicosenoic	Gadoleic	20:1 ω 11
<i>c</i> -8, <i>c</i> -11, <i>c</i> -14-Eicosatrienoic	Dihomo- γ -linolenic	20:3 ω 6
<i>c</i> -5, <i>c</i> -8, <i>c</i> -11-Eicosatrienoic	Mead's	20:3 ω 9
<i>c</i> -5, <i>c</i> -8, <i>c</i> -11, <i>c</i> -14-Eicosatrienoic	Arachidonic	20:4 ω 6
<i>c</i> -5, <i>c</i> -8, <i>c</i> -11, <i>c</i> -14, <i>c</i> -17-Eicosapentaenoic	Eicosapentaenoic (EPA)	20:5 ω 3
<i>c</i> -13-Docosenoic	Erucic	22:1 ω 9
<i>c</i> -11-Docosenoic	Cetoleic	22:1 ω 11
<i>c</i> -7, <i>c</i> -10, <i>c</i> -13, <i>c</i> -16, <i>c</i> -19-Docosapentaenoic	DPA	22:5 ω 3
<i>c</i> -4, <i>c</i> -7, <i>c</i> -10, <i>c</i> -13, <i>c</i> -16, <i>c</i> -19-Docosahexaenoic	DHA	22:6 ω 3
<i>c</i> -15-Tetracosenoic	Nervonic (Selacholeic)	24:1 ω 9

^aShorthand nomenclature cannot be used to name *trans* fatty acids.

^bOne of the conjugated linoleic acid (CLA) isomers.

Nei ruminanti, la biosintesi dei FA si svolge principalmente nel tessuto adiposo e nella ghiandola mammaria. A livello cellulare, gli acidi grassi con catene fino a 16 atomi di carbonio sono sintetizzati nel citoplasma per azione di due enzimi (Chilliard et al., 2001), uno dei quali catalizza la formazione di malonil-CoA a partire dall'acido acetico, mentre l'altro interviene nella condensazione ciclica del malonil-CoA con molecole di β -idrossibutirrato e/o di acetato (Barber et al., 1997). Il processo prosegue per successive condensazioni, determinando la formazione di di FA fino a C16; alternativamente, come avviene in molti tessuti, l'allungamento procede per sintesi mitocondriale; nei tessuti muscolari dal C16 si arriva al C22.

Inoltre, è da rilevare che la reattività dei PUFA li rende particolarmente suscettibili all'ossidazione, il principale fenomeno degradativo che ha luogo durante la conservazione della carne.

Gli UFA presentano isomeria *cis-trans*; in particolare, negli isomeri *cis*, che in natura sono la maggioranza, i due H a livello di un doppio legame sono disposti sullo stesso lato della catena, mentre nei *trans* si trovano su lati opposti. Ad esempio, nel tessuto muscolare il MUFA maggiormente rappresentato è l'acido oleico (*Oleic Acid*, OA), C18:1 *cis*-9.

I PUFA sono generalmente classificati a seconda della posizione del primo doppio legame che si incontra contando i C a partire dalla posizione ω ; in questo modo si individuano i gruppi (serie) degli ω 3, ω 6, ω 7 e ω 9 (Tabella 4). Nel corpo umano gli acidi grassi della serie ω 7 ed ω 9 non sono essenziali, in quanto sintetizzati a partire dal C16:0 e C18:0, rispettivamente; al contrario, i PUFA delle serie ω 6 e ω 3 sono essenziali, perché, non essendo sintetizzabili a livello endogeno devono essere assunti con la dieta. I più importanti PUFA essenziali sono il linoleico (*Linoleic Acid*, LA), C18:2 ω 6 e il linolenico (*Linolenic Acid*, LNA), C18:3 ω 3, in quanto precursori di tutti gli altri PUFA ω 6 e ω 3 e, in particolare, degli acidi arachidonico (*Arachidonic Acid*, AA), C 20:4 ω 6, eicosapentaenoico (*Eicosapentaenoic Acid*, EPA), C20:5 ω 3, e docosoesaenoico (*Docosahexaenoic Acid*, DHA), C22:6 ω 3, tipici del grasso dei pesci, ma presenti in quantità variabile nella componente lipidica del latte e delle carni di tutte le specie animali.

Nella carne sono presenti anche acidi grassi a catena ramificata (*Branched Chain Fatty Acids*, BCFA), che generalmente hanno una sola ramificazione rappresentata da un gruppo metilico (-CH₃); tali composti sono a loro volta riuniti nelle due serie "iso" e "anteiso" a seconda che il metile sia legato al penultimo o al terz'ultimo C della catena, rispettivamente. I BCFA sono particolarmente presenti nel grasso della carne dei ruminanti, perché sono sintetizzati per elongazione di precursori che originano dall'attività batterica ruminale (Secchiari et al., 2011).

Aspetti legati alla salute umana

Il seguente paragrafo è in parte basato su una rielaborazione dei contenuti della pubblicazione "La qualità nutrizionale della carne di soggetti di razza Bovina Maremmana" (Secchiari et al., 2011).

Gli SFA sono noti per contribuire all'aumento dei livelli di LDL colesterolo ematico, da cui le raccomandazioni FAO- OMS secondo le quali i lipidi totali nella dieta non dovrebbero eccedere il 30% dell' introito energetico, mentre per i soli SFA si consiglia di mantenersi entro il 7-10% del contenuto calorico totale. In particolare, gli acidi grassi C 12:0 (a. laurico), C14:0 (a. miristico), e C16:0 (a. palmitico), determinano un incremento di LDL colesterolo (colesterolo "cattivo") e quindi della colesterolemia totale; tra i suddetti FA, il C14:0 emerge per l'elevato potenziale d'innalzamento del colesterolo serico, pari a 4 volte quello del C16:0. Invece, gli SFA a corta catena (C4-C10) e l'acido stearico (C18:0) non influenzano il tasso ematico di colesterolo. A tal proposito si evidenzia che nell'uomo il C18:0 viene trasformato in C18:1 *cis*9 (acido oleico), per intervento dell'enzima Stearoil CoA Desaturasi (SCD), la cui presenza è associata alla diminuzione

del colesterolo LDL, con miglioramento del rapporto LDL/HDL e riduzione della colesterolemia totale.

Molti PUFA, tra cui LA e LNA, entrano a far parte di varie membrane cellulari ed hanno un ruolo importante nel trasporto dei lipidi e nell'attività di alcuni enzimi lipoproteici; tali FA sono inoltre i precursori della sintesi degli eicosanoidi, tra cui prostaglandine, trombossani e leucotrieni, sostanze ormonali che regolano molte funzioni fisiologiche come la coagulazione del sangue, la pressione venosa, la contrazione della muscolatura liscia e la risposta immunitaria.

Vi è un crescente interesse riguardo i BCFA per il loro potenziale effetto anticarcinogeno; infatti, uno studio sulle cellule della muscolatura liscia vascolare umane, di ratto e di maiale ha evidenziato che i BCFA favoriscono l'attuazione di un meccanismo di induzione dell'apoptosi delle cellule cancerogene, inducendo l'attivazione e la secrezione del fattore α della necrosi tumorale (TNF- α), che neutralizza quasi completamente gli anticorpi responsabili del blocco dell'apoptosi (Idel et al.,2002).

Per quanto riguarda gli acidi grassi *trans* (*Trans Fatty Acid*, TFA), le loro implicazioni negative sulla salute umana sono analoghe o superiori a attribuite agli acidi grassi saturi (Pedersen, 2001); infatti, oltre ad agire negativamente sulla colesterolemia totale, innalzando il colesterolo LDL e facendo diminuire il colesterolo HDL (Hunter 2006; Almendingen et al.,1995), possono essere correlati con patologie coronariche. Nella dieta umana, i grassi vegetali idrogenati (Innis et al., 1999) costituiscono la maggiore fonte di acidi grassi *trans*; invece, i TFA derivanti dai processi di bioidrogenazione ruminale, come quelli che si trovano nel grasso della carne bovina, hanno minore rilievo. Nel grasso della carne, il TFA più rappresentato è l'acido vaccenico (*Vaccenic Acid*, VA), C18:1 *trans*-11, di cui non sono noti effetti negativi sulla salute umana e, inoltre, nell'uomo è metabolizzato, per intervento dell'enzima SCD, ad acido rumenico (*Rumenic Acid*, RA), C18:2 *cis*-9, *trans*-11, isomero dell'acido linoleico coniugato (*Conjugated Linoleic Acid*, CLA) dotato di interessanti proprietà bioattive.

Infine, in riferimento al colesterolo, bisogna considerare che, essendo un lipide insaturo, quello naturalmente presente nella carne viene ossidato durante la conservazione, con formazione dei COPs (*Cholesterol Oxidation Products*), molecole inodori e quindi insidiose perché non rilevabili con l'olfatto, al contrario dei prodotti di ossidazione degli acidi grassi, le cui alterazioni organolettiche (odore e sapore) li denunciano chiaramente. I COPs hanno vari effetti negativi sulla salute umana, quali angiotossicità, aterogenicità, induzione di mutagenesi e carcinogenesi, modificazione della fluidità delle membrane cellulari e inibizione della sintesi di colesterolo. La descrizione dei COPs sarà ripresa nel capitolo sull'ossidazione lipidica.

VITAMINE

La carne bovina è una importante fonte di vitamine idrosolubili, quali quelle del gruppo B, e liposolubili, come A, D ed E (Tabella 1).

Vitamina A (retinolo)

A proposito della vitamina A, tale molecola è contenuta nella carne, mentre nei vegetali di cui gli animali si nutrono sono presenti i caroteni, e soprattutto il β -carotene, suoi precursori (provitamina A) nella via biosintetica. Nell'uomo, il fabbisogno di vitamina A viene coperto per ingestione diretta oppure per sintesi nel fegato o nelle pareti dell'intestino, a partire dalla provitamina. Le concentrazioni della molecola e della provitamina nel grasso delle carni variano in dipendenza della quantità di foraggio fresco ricco di caroteni consumato dagli animali. Il retinolo è indispensabile per i processi visivi e per le ossa, è importante per la crescita e la maturazione sessuale, mantiene integra la pelle e le mucose, ha proprietà antinfettive, interviene nella sintesi del DNA, previene la formazione di calcoli; inoltre, i carotenoidi svolgono attività antiossidante e proteggono la pelle da un'eccessiva esposizione solare.

Vitamina E (tocoferolo)

I tocoferoli sono un gruppo di stereoisomeri, il più attivo dei quali è l' α -tocoferolo. Quando i bovini ingeriscono la vitamina E con i cereali e l'erba verde, tale molecola è presente nei tessuti corporei ed è il più importante antiossidante liposolubile degli organismi superiori. Essa è associata alle membrane biologiche in un rapporto di una molecola ogni 1000-2000 molecole di fosfolipidi. L'azione antiossidante può essere di tipo diretto o indiretto. L'azione diretta si esplica nei confronti dei radicali dell'ossigeno derivanti dal metabolismo cellulare (fisiologico o patologico). L'azione indiretta è rivolta verso i prodotti radicalici di derivazione lipidica e fosfolipidica, generati a seguito dell'azione lesiva dei radicali dell'ossigeno. In entrambi i casi, il tocoferolo cede un elettrone a un radicali dell'ossigeno oppure a un radicale lipidico o fosfolipidico, originando un radicale tocoferossile. Nel primo caso si ottiene un prodotto non radicalico dell'ossigeno, mentre nel secondo si forma un prodotto lipidico non radicalico, con conseguente interruzione della reazione a catena di perossidazione lipidica. Infine, il radicale tocoferossile viene riossidato a tocoferolo dall'acido ascorbico, che si trasforma in radicale ascorbico e successivamente in acido deidroascorbico. Infine, è rilevante aggiungere che, trovandosi anche associata alle LDL, la vitamina E impedisce la perossidazione della componente lipidica di tali lipoproteine, che altrimenti andrebbero incontro alla formazione della placca aterosclerotica.

Vitamina D (D2, ergosterolo; D3, colecalciferolo)

La vitamina D è un gruppo di pro-ormoni liposolubili, le cui forme principali sono le vitamine D2, presente nei vegetali, e D3, sintetizzata dagli animali. Nei mammiferi, le due molecole si formano a partire dal 7-deidrocolesterolo per esposizione alla luce solare visibile e dei raggi ultravioletti; nell'uomo tale reazione ha luogo a carico del 7-deidrocolesterolo della cute e rappresenta la fonte di approvvigionamento principale di colecalciferolo, che si aggiunge all'assunzione con gli alimenti di origine animale. La vitamina D è implicata nell'assorbimento intestinale del calcio, nel metabolismo del calcio nelle ossa e nell'attività muscolare.

Vitamine del gruppo B

Le sostanze appartenenti a questo gruppo sono coenzimi che agiscono a vari livelli del processo metabolico.

La vitamina B1 (tiamina), presente nella carne e in molti alimenti vegetali, forma il coenzima della tiamina pirofosfato carbossilasi, che interviene in varie carbossilazioni ossidative, come quella dell'acido piruvico.

La vitamina B2 (riboflavina), presente nella carne e nel latte, è un costituente delle flavoproteine (flavin-mononucleotide, FMN, e flavin-adenin-dinucleotide, FAD), importanti nelle reazioni di trasferimento dell'H nel metabolismo di AA, FA e glucidi e nelle reazioni di redox della respirazione cellulare. Il ruolo metabolico della riboflavina si riflette anche sul processo di crescita somatica, da cui la definizione di "fattore idrosolubile dell'accrescimento".

La vitamina PP, o B3, (niacina) è presente nel fegato e nella carne alimentare. Nell'organismo, tale sostanza è rappresentata dall'acido nicotinico che si trasforma in nicotinammide, da cui derivano i coenzimi NAD (nicotinammide adenina dinucleotide) e NADP (nicotinammide adenina dinucleotide fosfato), attivi a livello di numerose deidrogenasi pirimidiniche.

La vitamina B5 (acido pantotenico), presente in tutti gli alimenti, costituisce il coenzima A (CoA), che regola il metabolismo degli acidi grassi, di alcuni steroidi e di alcuni aminoacidi.

A proposito della vitamina B12 (cobalamina), è rilevante notare che non ne esistono vere e proprie fonti non carnee e che la carne di manzo è in grado di fornirne più del 30% della Dose Giornaliera Raccomandata (*Recommended Daily Allowance*, RDA) (Dell'Orto et al., 2013). La cobalamina, con struttura simile a quella del gruppo eme dell'emoglobina, partecipa al metabolismo della purina e del gruppo metile labile, trasferendo unità monocarboniose. Si tratta di una molecola essenziale per la maturazione delle cellule della serie rossa del midollo osseo, che agisce anche a livello del metabolismo del tessuto nervoso.

SALI MINERALI

Nella carne bovina sono presenti diversi oligoelementi (micro-nutrienti), tra cui ferro (Fe), potassio (K), fosforo (P), rame (Cu), Zinco (Zn), cromo (Cr) e Selenio (Se), in forma organica, la quale ne favorisce la buona biodisponibilità e l'elevata tollerabilità. Le azioni biometaboliche che derivano da tali aspetti determinano un'ottima attività nutrizionale dei minerali, che non si riscontra quando gli elementi sono in forma inorganica, come nei vegetali e nei supplementi dietetici. A questo proposito, emerge l'importanza della carne di manzo come fonte di micronutrienti essendo in grado di apportare più del 30% della dose giornaliera raccomandata di Zn e più del 15% di quella di Fe, K e P. Inoltre, tale carne è piuttosto povera in sodio e pertanto il suo consumo non provoca ritenzione idrica, né ipertensione arteriosa.

Nell'alimentazione uomo, è di particolare significato l'apporto di Fe legato al consumo della carne fresca, perché l'assimilazione di tale microelemento è, in larga misura, funzione della sua forma chimica nell'alimento; in particolare, la carne contiene ferro eminico (legato alla mioglobina), la cui percentuale di assorbimento è approssimativamente pari al 40% e quindi molto maggiore di quella relativa alla forma non eme presente nei vegetali, che generalmente si attesta sul 3-5%. Ad esempio, alcuni alimenti di origine vegetale, come i legumi secchi, sono piuttosto ricchi di Fe, contenendone 80-90 mg/kg, di cui però solo il 7% è assorbibile a livello intestinale; invece, la carne bovina fresca ne possiede 19-20 mg/kg, con una percentuale di assorbimento del 20% circa. Infatti, gran parte della dotazione di Fe del muscolo è nel gruppo eme della mioglobina, per cui, al contrario di quanto avviene per il Fe inorganico dei tessuti vegetali, non forma complessi con molecole, quali i fitati, che lo rendono indisponibile. Per di più, in ambienti alcalini, come il tessuto dell'intestino tenue, il ferro eminico non è soggetto a fenomeni ossidativi che lo renderebbero insolubile inficiandone l'assorbimento. Inoltre, ai fini dall'assimilabilità del ferro, è significativo il rapporto Fe-eme/Fe-non eme: il 60% circa del ferro totale presente nella carne bovina è eminico. (Secchiari et al., 2009).

Infine, nell'alimentazione umana è importante il modo in cui gli alimenti sono associati; ciò riveste un significato importante nel caso dell'assorbimento del Fe presente nei vegetali. Infatti, alcuni AA costituenti le proteine della carne bovina, come la cisteina, presentano gruppi sulfidrilici che legano gli ioni ferro liberi, fissandoli, con formazione di complessi, quale ad esempio cisteina-Fe, estremamente solubili. Di conseguenza, l'assimilabilità del Fe contenuto nell'alimento vegetale passa dal 3-5% al 10-12% (effetto carne) (Secchiari et al., 2009).

PROPRIETÀ NUTRACEUTICHE

I prodotti di origine animale contribuiscono in maniera significativa all'apporto per l'uomo di sostanze funzionali, che possono cioè apportare benefici alla salute, oltre il loro tradizionale ruolo nutritivo (Hornstra, 1999). In particolare, il grasso della carne dei ruminanti, malgrado sia spesso messo sotto accusa per il suo contenuto di acidi grassi saturi, è fonte anche di molecole con interessanti proprietà nutrizionali (Nudda et al., 2010).

Tra questi molecole, spicca il CLA che, secondo la *National Academy of Science*, è l'unico FA di cui è stata inequivocabilmente dimostrata l'attività anticarcinogena su animali da laboratorio (NRC, 1996). L'interesse per questo gruppo di molecole deriva dalla scoperta, in hamburger di manzo, di una sostanza capace di inibire alcune forme di tumore chiaramente indotte (Pariza et al., 1979); una volta isolata, la sostanza risultò costituita da una serie di isomeri posizionali e geometrici dell'acido linoleico contenenti due doppi legami coniugati, che vennero chiamate CLA (isomeri dell'acido linoleico coniugato).

Il CLA presente nella carne dei ruminanti origina principalmente per bioidrogenazione ruminale dell'acido linoleico (Griinari et al., 1999) e, in misura maggiore, per sintesi endogena nei tessuti a partire dal *trans*-11 C18:1(VA), a sua volta un intermedio del processo di bioidrogenazione ruminale dell'acido linoleico e linolenico, per intervento dell'enzima SCD. Quindi l'alimentazione

è il fattore più importante nel determinare il contenuto di CLA del tessuto muscolare dei ruminanti, e di conseguenza della loro carne. In effetti, è possibile aumentare il peso di tali composti nella frazione lipidica fornendo agli animali alimenti naturalmente ricchi (o arricchiti per supplementazione) di PUFA e in particolare di acido α -linolenico, i quali inducono l'accumulo di VA nel rumine (Secchiari et al., 2011).

La sottostante tabella (Tabella 4) riporta un elenco dei diversi isomeri finora identificati e caratterizzati nella carne; la maggiore attenzione è rivolta agli isomeri *cis*-9, *trans*-11 (RA) e *trans*-10, *cis*-12 (CLA).

Tabella 4. Distribuzione degli isomeri del CLA nella carne dei ruminanti (Martins et al., 2007).

	Manzo (intensive)	Manzo (all. Estensivo)	agnello
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -11	1.08	1.42	-
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	59.89	78.35	77.31
<i>cis</i> -11, <i>trans</i> -13	1.10	0.72	0.15
<i>cis</i> -12, <i>trans</i> -14	1.21	1.35	0.64
<i>trans</i> -7, <i>cis</i> -9	12.09	9.17	8.04
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	3.79	2.12	0.22
<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -13	1.26	1.22	6.86
<i>trans</i> -6, <i>trans</i> -8	-	0.23	0.04
<i>trans</i> -7, <i>trans</i> -9	15.03	0.81	0.56
<i>trans</i> -8, <i>trans</i> -10	0.37	0.38	0.37
<i>trans</i> -9, <i>trans</i> -11	1.16	2.14	2.17
<i>trans</i> -10, <i>trans</i> -12	1.04	0.59	0.74
<i>trans</i> -11, <i>trans</i> -13	0.57	1.03	1.80
<i>trans</i> -12, <i>trans</i> -14	0.55	0.48	1.10

Il *cis*-9, *trans*-11, l'isomero biologicamente più attivo, è in grado di inibire lo sviluppo di carcinomi epidermici, mammari e gastrointestinali in animali da laboratorio (Ip *et al.*, 1999). Inoltre, nel medesimo modello animale ha anche mostrato proprietà anti-arteriosclerosi e un'azione modulatrice sul sistema immunitario (Nudda et al., 2010). Nell'uomo, tali effetti si possono verosimilmente ottenere consumando 700-800 mg al giorno di RA (Watkins et al., 2003).

Il *trans*-10, *cis*-12 è coinvolto nel metabolismo dei lipidi e ha dimostrato la capacità di ridurre il grasso corporeo in topi (DeLany et al., 1999) e nell'uomo (Blankson et al., 2000).

In aggiunta, i CLA possono determinare incrementi nella massa muscolare dei maiali, verosimilmente per l'aumento dei processi lipolitici e la contemporanea diminuzione della lipogenesi (Enjalbert et al., 1998) e sembrano coinvolti nella modulazione della risposta cellulare al TNF- α ; la significatività di quest'ultimo punto emerge se si considera che il TNF- α implicato in diverse patologie croniche quali cachessia, aterosclerosi, carcinogenesi e obesità (Chouinard et al., 1999).

Oltre al CLA, per valutare le proprietà salutistiche dei prodotti alimentari che presentano una componente lipidica, come la carne bovina, si deve considerare il loro rapporto PUFA ω 6/ ω 3. L'acido arachidonico (AA) è un importante PUFA della serie ω 6 che svolge un'azione positiva sul feto e nel processo di sviluppo del sistema nervoso; tuttavia, i metaboliti dell'AA, e in particolare trombossani e prostaciline di tipo 1 e 2, sono implicati nei processi pro-infiammatori e probabilmente anche in quelli di aterogenesi e di cancerogenesi. I PUFA ω 3, e soprattutto EPA e DHA, inducono la diminuzione del colesterolo e delle VLDL, sono antiaggreganti piastrinici,

regolano la pressione arteriosa e modulano il ritmo cardiaco (proprietà antiaritmica), riducono l'adesività dei neutrofili alle cellule dell'endotelio basale e hanno attività antinfiammatoria. In particolare, l'EPA riduce dei livelli dei lipidi ematici, esplica effetto antiinfiammatorio, antiaritmico e antitrombotico per riduzione dei trombossani pro aggreganti (TXA₂) e aumenta le prostaciline vasodilatatorie (PGI₃), riducendo, in ultima analisi, la coagulabilità del sangue, prevenendo le aritmie e stabilizzando il battito cardiaco. Il DHA, oltre alla riduzione dei trigliceridi ematici, esercita effetto anti-infiammatorio e anti-ipertensivo, induce la diminuzione della microalbuminuria, protegge e migliora la funzionalità della retina, contrastando anche, in caso di diabete, i fenomeni di apoptosi cellulare. Infine, tale FA si fissa nelle membrane della retina, dei nervi e del cervello, divenendo componente essenziale del sistema nervoso e favorendone la maturazione durante lo sviluppo embrionale e post embrionale (Secchiari et al., 2011).

Altre importanti sostanze bioattive presenti nella carne sono carnosina, glutatione e acido α -lipoico.

La carnosina è un dipeptide formato da β -alanina e L-istidina presente in larga quantità nei muscoli scheletrici, soprattutto bianchi (Chan e Decker, 1994), di cui sono state dimostrate le proprietà antiossidanti e anti-invecchiamento; tale molecola agisce prevalentemente sui prodotti secondari di ossidazione dei lipidi e la sua attività è collegata alla capacità di chelare i metalli ed alla possibilità di eliminare i radicali liberi (Secchiari, 2008). Il glutatione è un tripeptide formato da glicina, cisteina e glutammina, presente in quantità rilevanti solo nella carne bovina e suina e, in misura minore, in quella avicola. Nelle cellule umane, tale composto agisce insieme al Se nella detossificazione dai radicali liberi, come cofattore della glutatione perossidasi (Bray e Taylor, 1993).

L'acido α -lipoico (*Alpha Lipoic Acid*, ALA) è un cofattore degli enzimi coinvolti nella decarbossilazione ossidativa localizzato nei mitocondri delle cellule animali (Witt e Rustow, 1998), perciò è presente soprattutto nei muscoli rossi e, in modo particolare, negli animali che praticano intensa attività fisica (Secchiari, 2008). Essendo solubile tanto in acqua, quanto nei grassi, l'ALA esercita la sua azione antiossidante sia a livello del citoplasma che a livello delle membrane cellulari. Nell'uomo il quantitativo di ALA naturalmente presente è troppo scarso per poter determinare il suddetto effetto antiossidante; è quindi consigliabile seguire un regime alimentare che prevede alimenti ricchi di tale sostanza.

STRATEGIE PRODUTTIVE DI CARNE FUNZIONALE

FINALITÀ

Negli ultimi anni, e soprattutto nei paesi industrializzati, i consumatori hanno cominciato a prestare un interesse crescente nei confronti della propria dieta, con sempre maggiore attenzione nei confronti di cibi capaci di svolgere effetti positivi sulla salute e in particolare sulla prevenzione dell'insorgenza di alcune malattie. I cibi dotati di simili proprietà sono definiti "alimenti funzionali" se dimostrano in maniera soddisfacente di influire positivamente su una o più funzioni specifiche dell'organismo, diverse dai normali effetti nutrizionali, e pertanto consentendo il miglioramento dello stato di salute e del benessere e/o per la riduzione del rischio di malattia (EUFIC, 2006). Questa tendenza ha origine dalle nuove conoscenze rese disponibili dal mondo della ricerca scientifica nei campi della produzione agroalimentare e della nutrizione umana, sempre più impegnato nell'analisi del rapporto tra un alimento, o componente alimentare, e il miglioramento dello stato di salute e del benessere oppure la riduzione del rischio di malattia.

Abbinati a uno stile di vita sano, gli alimenti funzionali possono dare un contributo concreto alla salute e al benessere, ad esempio riducendo il rischio di contrarre gravi patologie quali le malattie cardiovascolari (*Cardiovascular Diseases*, CVDs), il cancro e l'osteoporosi, o riducendone l'insorgenza.

Si noti, che possono fregiarsi dell'appellativo "funzionale" non solo gli alimenti integrali naturali e quelli cui è stato aggiunto o sottratto un componente con mezzi tecnologici o biotecnologici, ma anche quelli in cui è stata modificata la natura e/o la biodisponibilità di uno o più componenti, o una qualsiasi combinazione di queste possibilità (EUFIC, 2006)

Componenti alimentari oggetto di grande interesse da parte della ricerca, sono gli isomeri coniugati dell'acido linoleico (CLA), di cui sono state dimostrate l'attività anticarcinogenica e ipocolesterolemica, l'azione stimolante sul sistema immunitario e sul metabolismo lipidico, le proprietà preventive nei confronti delle cosiddette malattie non trasmissibili (*Non Communicable Diseases*, NCDs), tra cui diabete, CVDs, cancro e malattia renale cronica (*Chronic Kidney Disease*, CKD) e gli effetti di promozione della crescita e di miglioramento dello sviluppo della massa muscolare (Smith et al., 2010; Thom et al. 2001; McGuire et al., 2000; Blankson et al., 2000; Bateman II et al., 1998). Poiché la biosintesi dei CLA è strettamente collegata alla bioidrogenazione ruminale dell'acido linoleico e dell'acido α -linolenico, i prodotti di origine animale provenienti dall'allevamento delle specie ruminanti ne sono la principale fonte naturale.

Al di là dell'aumento dei prezzi di vendita al dettaglio, le ripetute raccomandazioni nutrizionali e dietetiche che consigliano di ridurre il consumo dei grassi saturi per prevenire malattie cardiovascolari (Maijala, 2000), hanno contribuito alla riduzione del consumo di carne bovina, la cui componente lipidica è caratterizzata da una più alta percentuale di acidi grassi saturi rispetto a quella di altri tipi di carnee (Santos-Silva, 2002; (Bessa et al., 2000).

Se consideriamo che il consumo medio di coniugati dell'acido linoleico nell'uomo (in riferimento al peso vivo) è più basso della dose che si ritiene efficace nel ridurre i tumori nei modelli animali, appare interessante approfondire le conoscenze circa le possibilità di aumentarne gli apporti.

Questo obiettivo si può perseguire in due modi: incrementando il consumo di grasso presente nella carne e nel latte dei ruminanti o aumentando il tenore di coniugati dell'acido linoleico di tali prodotti. Quest'ultimo approccio sembra il più pratico, presentando il vantaggio di aumentare il valore nutritivo e dietetico dell'alimento, senza elevare il consumo giornaliero di lipidi (Gramenzi, et al., 2005; (Dhiman et al., 1999).

Poiché il contenuto di CLA nella carne dipende dalla quantità di tali acidi grassi effettivamente disponibile per l'assorbimento intestinale e dall'efficienza di trasformazione a livello tissutale dell'acido vaccenico in CLA tramite l'azione dell'enzima delta-9 desaturasi, manipolare l'alimentazione dei bovini in maniera da ottenere un elevato output di CLA e di acido vaccenico dal ruminante è una strategia utile al fine di aumentarne la quota disponibile per la successiva

deposizione nei tessuti. La bioidrogenazione ruminale dipende dal tipo e dalla quantità di acidi grassi, dal rapporto foraggi/concentrati e dal contenuto azotato nella dieta (Chouinard et al., 2001; Avila et al., 2000; Kalsheur et al., 1997a; Kalsheur et al., 1997b; Dhiman et al., 1999); questi fattori possono influenzare il rapporto dei prodotti intermedi e finali della bioidrogenazione stessa, condizionando così direttamente e indirettamente il tenore di CLA nel grasso della carne bovina. Una delle strategie nutrizionali più efficaci per indurre una maggiore produzione reticolo-ruminale di CLA e di acido vaccenico consiste nell'elevare l'assunzione di acido linoleico (C18:2) o di acido α -linolenico, principali precursori di tali molecole (Dhiman et al., 2000). Le migliori fonti di acido linoleico tra gli alimenti zootecnici sono il mais, i semi integrali di oleoproteaginose e gli oli che ne derivano (Blaxter & Webster, 1991; Kelly et al., 1998). Per quanto riguarda l'acido α -linolenico, il seme di lino risulta particolarmente idoneo; infatti, contiene più del 30% di olio, con l'85% circa di acidi grassi insaturi costituiti per più del 50% circa da acido α -linolenico (C18:3) (Mele, 2009).

STRATEGIE PRODUTTIVE

Numerosi autori hanno affrontato il tema dello sviluppo di strategie produttive finalizzate ad ottenere una carne funzionale, dotata di caratteristiche salutari e protettive nei confronti della salute umana (Jiménez-Colmenero et al., 2001; Arhiara, 2006; Arhiara et al., 2010; Decker et al., 2010; Fernández-Gines et al., 2005; Jiménez Colmenero et al., 2012; Jiménez-Colmenero, 2007a; Jiménez-Colmenero et al., 2006; Weiss et al., 2010; Zhang et al., 2010). Tali strategie sono fondamentalmente indirizzate verso l'aumento dei composti benefici e la riduzione di quelli implicati nell'insorgenza di varie malattie (Tabella 5) e possono essere suddivise in tre categorie (Figura 6).

Tabella 5. Componenti considerate nello sviluppo di carne con funzioni protettive nei confronti della salute umana (Begoña

Olmedilla et al., 2013).

Target condition/function (markers)	Compounds associated with beneficial effect	Compounds associated with a
Cardiovascular		
- Lipids	- MUFA, n-3 PUFA, CLA, dietary fiber, phytosterols, vitamins C and E, bioactive peptides, histidyl dipeptides, L-carnitine, lycopene.	- Fat, SFA, trans-fatty acids, ch
- Blood pressure	- Bioactive peptides, vegetable/plant proteins	- Sodium
- Obesity	- CLA, dietary fiber, creatine	- Fat, SFA, trans-fatty acids
- Others	- Folic acid, vitamins B ₆ and B ₁₂ , lycopene, lutein, selenium, taurine, Coenzyme Q10, extracts of fruits, herbs and spices rich in flavonoids and phenolic compounds.	
Cancer	- Dietary fiber, folic acid, vitamin E, selenium, CLA, probiotics, histidyl dipeptides, lycopene, extracts of fruits, herbs and spices rich in flavonoids and phenolic compounds.	- Nitrite (nitrosamines), lipid inorganic phosphate, polycycl heterocyclic amines, iron
Bone diseases	- Calcium, magnesium, L-carnitine	
Immunological status	- Probiotics, selenium, iron	
Anemia (iron-deficiency)	- Iron	
Migraine and allergy		- Biogenic amines
Growth and development	- Iodine	- Allergens (gluten, lactose)

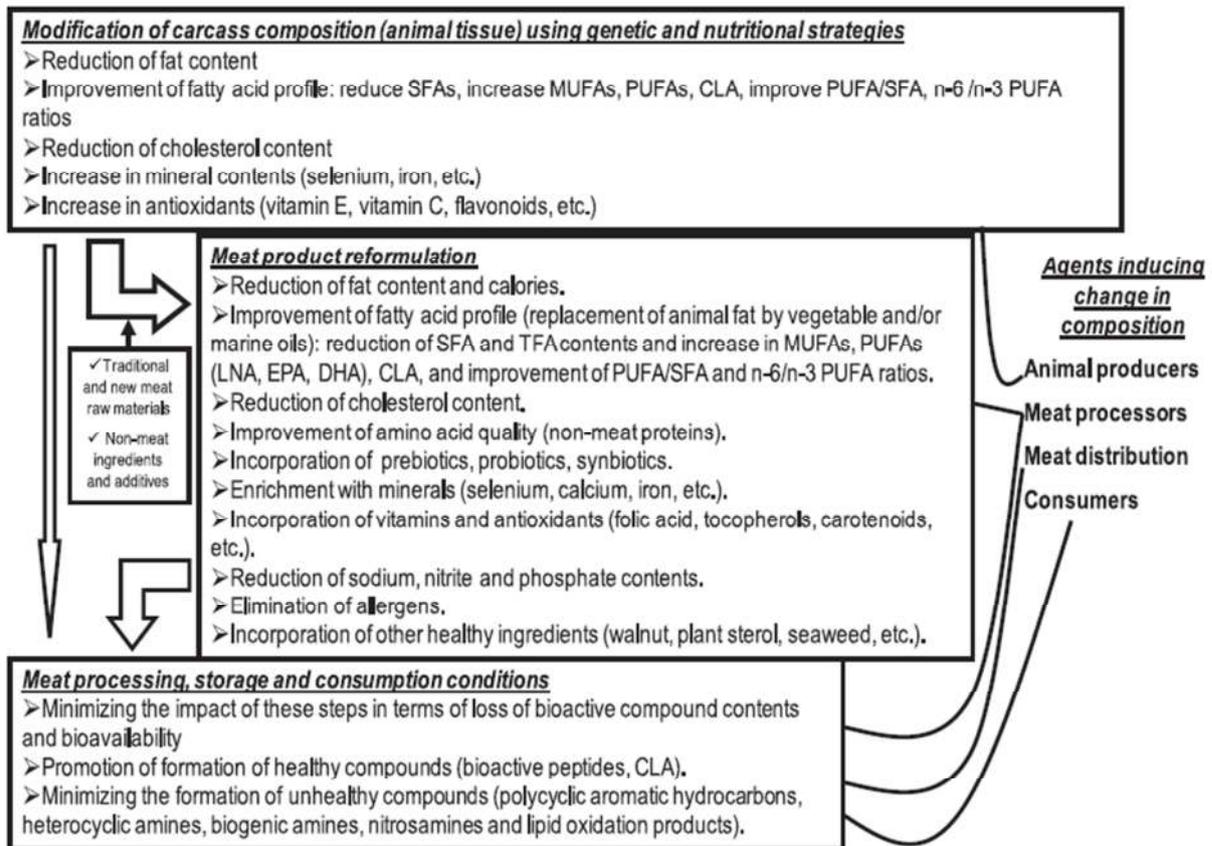


Figura 6. Strategie per migliorare alcuni attributi qualitativi della carne (Jiménez Colmenero et al., 2012, modificato).

In particolare, le strategie atte a modificare la composizione in nutrienti della carcassa prevedono azioni dirette sugli animali in vita, mediante approcci di tipo genetico (selezione della razza) o di tipo nutrizionale. Il secondo gruppo di interventi comprende le tecniche che consentono di modificare la composizione del prodotto finito, mediante sottrazione o aggiunta delle componenti desiderate (riformulazione). Questa strategia prevede anche azioni mirate a migliorare la stabilità della carne durante la conservazione; in pratica per aumentare la *shelf life*, vengono studiate ed implementate nuove modalità di confezionamento o di trattamento della superficie esterna del prodotto (Begoña Olmedilla et al., 2013).

Tra tutte le possibili alternative operative, l'intervento a livello di allevamento degli animali rappresentano il metodo più diretto per arricchire la carne con le componenti desiderate (Begoña Olmedilla et al., 2013).

Date le loro implicazioni nella salute umana, i lipidi sono la componente a cui recentemente è stata rivolta la maggiore attenzione, in termini tanto quantitativi, quanto qualitativi. In effetti, vi sono stati numerosi tentativi di modifica della razione allo scopo di aumentare il tenore in MUFA e PUFA della frazione lipidica della carne bovina. In particolare, sono state testate fonti lipidiche vegetali, come olii essenziali, piante e foraggi ricchi di PUFA $\omega 3$, e fonti marine, tra cui alghe e olii di pesce. Entrambi i tipi di integrazione hanno mostrato effetti positivi (Raes et al., 2004; Scollan et al., 2006; Wood et al., 2008) su diverse specie animali: avicoli, suini, bovini ed ovini (Lynch et al., 2000; Raes et al., 2004; Schmid et al., 2006).

Tra le fonti vegetali riveste particolare interesse il seme di lino (Daun et al., 2003). In particolare, l'apporto energetico di tale seme è paragonabile a quello della soia e del girasole, il contenuto in proteina è simile a quello di girasole, colza e cotone e la composizione amminoacidica ricalca in parte quella della soia (Maddock et al., 2005). Tuttavia, al contrario dei semi di soia, mais, cotone e girasole, il lino presenta una prevalenza dei PUFA $\omega 3$ (principalmente acido α -linolenico) sugli $\omega 6$ (Maddock et al., 2005). Dunque, questo seme è considerato particolarmente indicato per

l'applicazione in sistemi di allevamento finalizzati al miglioramento della frazione lipidica della carne. L'unico accorgimento necessario per garantire un'ottimale utilizzazione di tale alimento da parte dell'animale è un preventivo trattamento a caldo (estrusione, laminatura, tostatura, ecc.), per degradare la linamarina, un glucoside tossico per gli animali.

IL SIGNIFICATO NUTRIZIONALE DELLA CARNE NELL'EVOLUZIONE UMANA

Gli studi antropologici hanno chiarito il ruolo di primo piano svolto dalla nutrizione nel condizionamento dell'evoluzione delle specie al pari dei fattori climatici, geologici e ambientali (Biondi et al., 2006; Gregorio et al., 2008). Il nostro profilo genetico è stato plasmato da influenze di tipo nutrizionale per i 2,5-4,5 milioni di anni intercorsi tra la divisione delle prime linee evolutive umane da quelle degli scimpanzé (5-7 milioni di anni fa) e la comparsa del genere *Homo* (intorno a 2,5 milioni di anni fa), mentre l'agricoltura intensiva, la lavorazione industriale, la sedentarietà e la grande disponibilità di cibo sono fenomeni troppo recenti perché sia stato possibile sviluppare una qualche forma di adattamento genetico (Gregorio et al., 2008). La discrepanza evolutiva fra il pattern genetico del Paleolitico e l'odierno stile di vita nei Paesi industrializzati è alla base di patologie dismetaboliche che per millenni sono state di scarsa rilevanza evolutiva in quanto responsabili di morbilità e mortalità in soggetti di età avanzata, a cui per altro pochi giungevano, e comunque in fase post-riproduttiva (Gregorio et al., 2008).

Rispetto agli altri primati moderni, l'uomo presenta delle peculiarità biochimiche più vicine ai carnivori obbligati; si citano ad esempio l'insufficiente capacità di sintetizzare la taurina (presente in quantità nei cibi animali) dagli aminoacidi precursori di origine vegetale (Laidlow et al., 1988; Gregorio et al., 2008), la bassa efficienza nel produrre acidi grassi C20-22 a partire dai precursori C18 presenti nei vegetali e la capacità di sintetizzare l'acido ascorbico a partire dal glucosio (Milton, 1999). In aggiunta, l'anatomia comparata ci dice che i pongidi, le scimmie moderne più vicine a noi dal punto di vista genetico, hanno un intestino molto più lungo e metabolicamente attivo del nostro, perché la loro dieta è prevalentemente vegetariana (Leonard et al., 1994; Aiello et al., 1995). Anzi, la preferenza genetica e il progressivo adattamento a cibi con elevata densità energetica ha prodotto un ulteriore progressivo accorciamento dell'intestino anche in epoche storiche, tanto che oggi possediamo un intestino significativamente più corto di quello delle mummie egizie (Milton, 1999).

Homo sapiens è l'unico superstite di un processo evolutivo a cui hanno preso parte specie di ominidi, tutti dotati di simili capacità intellettive, che in alcuni casi hanno condiviso i medesimi habitat per migliaia di anni (Tattersall, 2006).

L'elemento di maggiore rilievo che emerge alla luce di questo lunghissimo sviluppo è l'aumento del volume cerebrale dai 400 cc dei primi australopitechi ai 1400 cc dell'uomo moderno (Leonard et al., 1994; Cunnane et al., 2003). Per tutto il Terziario, fino alla prima glaciazione (Donau 2,5 milioni di anni fa) il 95% dell'apporto nutrizionale degli australopitechi era costituito da fogliame, frutti oleosi e tuberi, mentre il rimanente 5% era rappresentato da uova, insetti e piccoli animali (Milton, 1993); pur essendo una dieta prevalentemente a base di carboidrati (Brand-Miller et al., 1994) era comunque più varia rispetto a quella di altri primati coevi (Scott et al., 2005) (Teaford et al., 2000).

Con l'avvento del genere *Homo*, e in particolare di *Homo erectus*, l'espansione cerebrale fu decisiva, con un terzo in più di volume cerebrale in meno di 500000 anni. Considerando che nell'adulto il 20-25% del metabolismo basale è legato all'attività cerebrale (Aiello et al., 1995) (Aiello et al., 2002), tale accrescimento è stato possibile grazie a circostanze ambientali favorevoli, capaci di soddisfare l'aumentata richiesta nutrizionale e metabolica (Cunnane et al., 2003).

Il passaggio a una dieta carnea determinò una maggiore disponibilità di proteine e di grassi animali contenenti grandi quantità di acidi grassi polinsaturi a lunga catena preformati: le prime sono responsabili dell'aumento di statura, mentre i secondi favorirono lo sviluppo della massa cerebrale. Un ruolo speciale in tal senso potrebbe essere stato svolto dall'acido docosoesaenoico (DHA), acido grasso di cui è riconosciuto un ruolo funzionale nel sistema nervoso centrale (Martinez, 1992).

L'espansione cerebrale è un fenomeno complesso, che richiese importanti cambiamenti nell'espressione genica. Oggi tali mutamenti sono imputati al miglioramento della qualità alimentare legato al consumo continuativo di cibi animali in grandi quantità (Aiello et al., 1995;

Cunnane et al., 1993; Broadhurst et al., 1998; Broadhurst et al., 2002). In effetti, solo alimenti con una densità energetica sufficiente avrebbero potuto garantire il lusso metabolico di un cervello dall'architettura sofisticata, che rese gli ominidi competitivi come specie carnivora (Cunnane et al., 1993) e consentì loro di diventare pericolosi cacciatori di gruppo efficacemente armati (Gregorio et al., 2008).

Gli antropologi hanno evidenziato due transizioni fondamentali nell'alimentazione dell'uomo preistorico. La prima transizione ha avuto luogo approssimativamente 2 milioni di anni fa, nel Paleolitico superiore, con il passaggio ad una dieta prevalentemente carnea (Biondi et al., 2006) ed è correlata all'irrigidimento del clima causato dalle glaciazioni (Donau, circa 2,5 milioni di anni fa, seguita da Gunz, Mindel, Riss e Wurm, 950.000, 400.000, 200.000, 70.000 anni fa, rispettivamente), che determinò un riassetto della flora e della fauna a livello globale. In particolare, le conifere sostituirono la foresta subtropicale e, più sud, si estesero le praterie, dove si stabilirono molti erbivori migrati dalle inospitali regioni settentrionali, che peraltro erano soli animali in grado di sfruttarle come fonte di cibo. La caccia divenne dunque l'attività prevalente con cui gli ominidi si procacciavano il cibo, tanto che sono stati rinvenuti numerosi reperti con indiscutibili segni di caccia e macellazione datati intorno ai 500.000 anni a.C. (Richards, 2002). Inoltre, secondo l'ipotesi della *shore based diet*, una dieta basata su prodotti ittici, come molluschi, crostacei e pesce spiaggiato, facilmente reperibili in zone costiere o fluviali, avrebbe consentito un'adeguata assunzione di acidi grassi (Aiello et al., 1995; Broadhurst et al., 1998; Broadhurst et al., 2002).

Si può affermare che la dipendenza dell'uomo dai cibi animali divenne via via più marcata nelle ultime fasi del Paleolitico. Infatti, la stima della quantità e qualità dell'apporto proteico nel lungo periodo (10 anni) nella dieta degli uomini di Neanderthal europei (circa 26000 anni fa), effettuata mediante la misura dei rapporti isotopici $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ nel collagene osseo e nell'idrossiapatite dello smalto dentale, ha rivelato valori paragonabili a quelli riscontrabili in carnivori ai vertici della catena alimentare, con una percentuale di carne nella dieta prossima al 90% (Martinez, 1992). Risultati analoghi sono stati ottenuti in fossili di *Homo sapiens* (Gregorio et al., 2008).

I dati paleoantropologici concordano con quelli derivanti dalle ricerche etnografiche effettuate sulle ultime tribù esistenti di cacciatori-raccoglitori, la cui dieta è costituita per il 66-75% da animali cacciati o pescati. Si riporta in tabella la composizione media in macronutrienti della dieta paleolitica (Eaton et al., 1985; O'Keefe et al., 2004) (Tabella 6).

Tabella 6. I macronutrienti nella dieta paleolitica.

	Eaton et al., 1985	O'Keefe et al., 2004
Proteine (%)	37	19-35
Carboidrati (%)	41	22-40
Grassi (%)	22	28-47

Come si può notare, si tratta sostanzialmente di un regime alimentare iperproteico, con una elevata densità in grassi a scapito dei carboidrati. Sebbene le percentuali differiscano significativamente da quelle attualmente raccomandate dalle attuali linee guida in materia di prevenzione cardiovascolare. (Cordain et al., 2002), nelle attuali popolazioni di cacciatori-raccoglitori l'incidenza di dislipidemia e malattie cardiovascolari è molto ridotta. Sicuramente ciò non dipende solo dalla dieta, ma anche d'altri fattori, quali stress ridotto, notevole attività fisica, niente fumo, ridotto introito di sale ecc., tuttavia è necessario sottolineare che la carne degli erbivori selvatici ha una composizione lipidica diversa da quella degli animali d'allevamento. In particolare, negli animali selvatici la quantità di grasso depositata nel tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale sotto forma di trigliceridi, principalmente acidi grassi saturi (*Saturated Fatty Acids*, SFA), ha un andamento stagionale con un picco che viene mantenuto solo per pochi mesi (Cordain et al., 2005),

mentre sono sempre presenti i fosfolipidi muscolari, composti principalmente da acidi grassi monoinsaturi (*Mono-Unsaturated Fatty Acids*, MUFA) e polinsaturi (*Poly-Unsaturated Fatty Acids*, PUFA), con un rapporto $\omega 6/\omega 3$ spesso vicino all'unità, valore questo considerato come ottimale per prevenire il rischio di alcune patologie dell'apparato cardio-vascolare (il rapporto $\omega 6/\omega 3$ nell'alimentazione occidentale moderna spesso è superiore a dieci, mentre il valore massimo consigliato nella dieta è 4 (WHO, 2005). L'alimentazione dei cacciatori-raccoglitori era anche caratterizzata da un basso introito di acidi grassi *trans*, capaci di influire negativamente sul colesterolo HDL e LDL (Eaton et al., 1988).

Il secondo sostanziale cambiamento nella dieta dell'uomo si è avuto nel Mesolitico, a partire da circa 12.000 anni fa. Nel Vicino Oriente, grazie ad un forte innalzamento di temperatura che determinò l'instaurarsi di ambienti umidi, ricchi di cereali selvatici e selvaggina, soprattutto gazzelle, si ebbe la prima graduale affermazione delle tecniche di coltivazione e allevamento. Tuttavia, il passaggio completo da un'economia di predazione (caccia-raccolta) ad una di produzione (agricoltura), che ha costituito la base per lo sviluppo successivo di tutte le grandi civiltà è avvenuto intorno al 7500 a.C. (Rotilio et al., 2008). La carne di animali domestici può essere considerata un *novel food* del Neolitico, un alimento con cui l'uomo del Paleolitico non è venuto in contatto (Rotilio et al., 2008). Inoltre, in tale periodo si è affermato l'uso preferenziale dei cereali come fonte di energia, a scapito della carne (Figura 7).

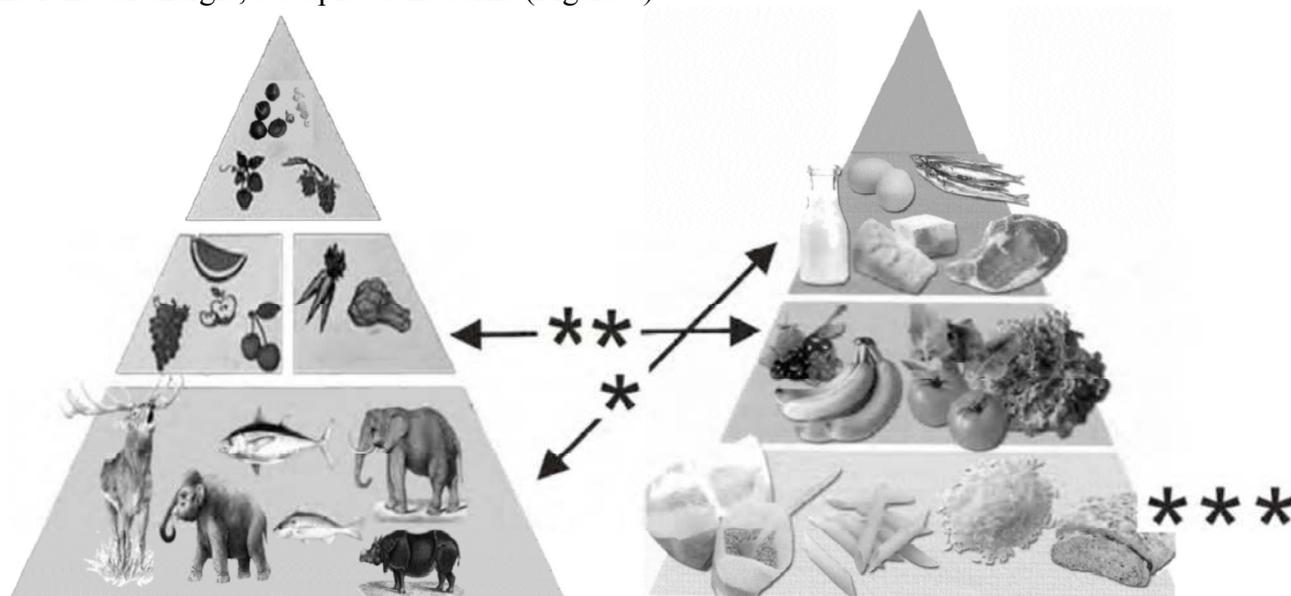


Figura 7. Ipotetica piramide alimentare del Paleolitico a confronto con quella di una moderna società post-agricola (Rotilio

et al., 2008). * Posizione della piramide invertita. ** Posizione della piramide stabile, rinforzata da noci e bacche al vertice della piramide paleolitica. *** Posizione che entra nella piramide nell'era post-paleolitica.

L'introduzione dell'agricoltura e dell'allevamento animale hanno garantito una non più sporadica e incerta disponibilità di cibi contenenti nutrienti di alto valore, quali aminoacidi essenziali, vitamine e ioni minerali e ricchi di energia concentrata e prontamente spendibile. Si è quindi innescata una vera e propria rivoluzione nutrizionale, che ha reso possibile l'aumento di popolazione e la formazione delle prime società stanziali.

Ciò non significa che i primi agricoltori vivessero in condizioni migliori rispetto ai loro antenati cacciatori-raccoglitori; si consideri che la percentuale di proteine animali si ridusse dal 90% al 10% dell'introito alimentare e di conseguenza l'altezza media diminuì di 15-20 cm (Eaton et al., 1985; Cohen, 1989). Infatti, dal punto di vista della resa energetica, la caccia rendeva 10.000-15.000 kcal/ora di lavoro, con animali di grande taglia, e 2500-6000 kcal/ora di lavoro, con animali piccoli, mentre con l'agricoltura si

arrivava solo a 700-1300 kcal/ora di lavoro (Lev-Ran, 1999). Tuttavia, un ettaro di superficie agricola può nutrire assai più contadini di quanti cacciatori possa sostenere un ettaro di superficie utilizzata per la caccia (Gregorio et al., 2008).

L'introduzione dell'allevamento determinò un cambiamento qualitativo dei grassi degli alimenti carnei. In particolare, la continua somministrazione di cibo agli animali e l'integrazione della razione con i cereali evitarono l'abbattimento stagionale dei grassi, causando al contrario un rapido accumulo dei SFA nel tessuto adiposo; ciò determinò la riduzione del rapporto PUFA/ SFA da 1,41, caratteristico della selvaggina, a 0,44, tipico della carne del bestiame (il rapporto PUFA/SFA nella dieta consigliato dai moderni nutrizionisti è 1,00), e l'incremento del rapporto $\omega 6/\omega 3$ della carne, a scapito degli $\omega 3$, soprattutto a lunga catena (*Long Chain Poly-Unsaturated Fatty Acids*, LC-PUFA) (Rotilio et al., 2008).

L'accoppiamento di cibi più energetici e stili di vita più sedentari è peraltro considerato la causa della comparsa di patologie che sono andate poi ad aumentare fino ai nostri giorni, in particolare la cosiddetta "sindrome metabolica", data dall'associazione di obesità, ipertensione e diabete. Il fatto è che questi cambiamenti sono avvenuti troppo rapidamente, in termini evolutivi, perché il "genotipo risparmiatore" (*thrifty genotype*) della nostra specie, adattatosi alla sporadica e incerta acquisizione di alimenti nel corso di circa due milioni di anni, abbia avuto la possibilità di riequilibrarsi. Infatti, nelle nuove condizioni la capacità di conservare le energie alimentari sotto forma di tessuto adiposo in previsione di lunghi periodi di carestia non era più necessaria. Oggi molti studiosi concordano sul fatto che alcune malattie, diffuse soprattutto nei Paesi occidentali, sono conseguenza di questo mancato adattamento. A tal proposito è interessante notare come nelle popolazioni che hanno cambiato stile di vita da poco, come inuit, esquimesi, popolazioni africane, polinesiane e americani nativi, la "sindrome metabolica" assuma una gravità maggiore (Eaton et al., 1985).

Secondo la teoria del *thrifty genotype* (Neel, 1962), i geni che consentono un efficace immagazzinamento dell'energia nei periodi di abbondanza di cibo conferiscono all'individuo un vantaggio in termini di sopravvivenza nei successivi periodi di carestia. Essendo l'alimentazione dell'uomo paleolitico basata sulla caccia, questi doveva utilizzare le proteine come principale fonte energetica; era perciò necessario un sistema metabolico in grado di convertire le proteine in glucosio, risparmiare il glicogeno epatico e il glucosio circolante per le prioritarie esigenze del cervello e accumulare efficientemente i lipidi. Queste necessità possono essere soddisfatte con i meccanismi insulino-resistenza epatica, con gluconeogenesi attivata, insulino-resistenza muscolare, con ridotta utilizzazione periferica di glucosio e aumento dell'attività liposintetica e antilipolitica dell'insulina (Gregorio et al., 2008). Perciò il *thrifty genotype*, selezionato in ere difficili e giunto fino ai nostri giorni, comporterebbe una pressione selettiva verso l'insulino-resistenza. È la cosiddetta "sindrome del fallimento dell'omeostasi genetica" (Neel, 1962). Purtroppo questa teoria, nonostante gli ampi consensi ricevuti e la sua popolarità, non è mai stata confermata.

LA RAZZA MAREMMANA

In Italia, le aziende che producono per i mercati locali e di nicchia, puntando sulle strategie di diversificazione legate all'allevamento di razze autoctone, sui marchi di tutela comunitari e su metodi di produzione di tipo biologico, sono eccezioni nel comparto zootecnico (Federici, 2012). Un esempio di tale realtà produttiva è l'allevamento della razza Maremmana, praticato nella Maremma toscana e laziale, sua zona di origine (Sargentini et al., 2006), con le maggiori consistenze nelle province di Roma, Viterbo e Grosseto (Tabella 8) (ANABIC, 2012).

Tabella 7. . Allevamenti di bovini di razza Maremmana aderenti all ANABIC e relativo numero di capi iscritti al Libro

Genealogico al 31/12/2012. I dati (ANABIC, 2012) provengono dai rilievi effettuati dalle Associazioni Provinciali Allevatori (APA).

REGIONE	PROVINCIA	Allevamenti	Vacche	Manze	Giovani	Tori	Capi Totali
Basilicata	Matera	1	44	19	27	0	90
Lazio	Frosinone	1	1	1	0	0	2
	Latina	4	199	80	67	3	349
	Roma	102	3180	911	606	74	4771
	Rieti	2	19	4	7	1	31
	Viterbo	29	1419	475	622	35	2551
Marche	Pesaro	1	10	5	3	0	18
Toscana	AREZZO	3	12	13	10	1	36
	GROSSETO	44	905	274	641	54	1874
	LIVORNO	1	18	8	16	1	43
	PISA	1	3	2	0	0	5
	SIENA	2	5	16	9	1	31
TOTALE		191	5815	1808	2008	170	9801

La razza bovina Maremmana può essere definita autoctona del territorio italiano, sulla base di numerose testimonianze archeologiche e letterarie che ne dimostrano la presenza da tempi preistorici; gli attuali rappresentanti di tale gruppo discenderebbero direttamente da una o più popolazioni di uro (*Bos primigenius*), progenitore selvatico dei contemporanei (Giorgetti A., 2003; Giorgetti et al., 2009; Ciani et al., 2001). Nel complesso, i bovini macroceri italiani caratterizzati da mantello grigio più o meno intenso e cute pigmentata, quali Maremmana, Romagnola e Podolica, i medioceri e i brachiceri (Chianina, Calvana, Marchigiana, Piemontese, Modenese) sono spesso definiti "razze podoliche"; la denominazione deriva da Podolia, regione dell'attuale Ucraina, ritenuta a lungo il loro luogo d'origine comune. Secondo questa interpretazione, i suddetti bovini giunsero in Italia con i barbari dopo il crollo dell'impero romano, nel 476 d.C.. Tuttavia, questa lettura non è corretta, perché ignora presenze importanti di macroceri nel nostro Paese in epoche di gran lunga antecedenti l'era cristiana (Giorgetti A., 2003; Giorgetti et al., 2009) e pertanto l'appellativo "podolico" risulta improprio.

La Maremmana è provvista di una solida struttura corporea, con treno anteriore molto sviluppato e arti estremamente solidi. Le caratteristiche distintive dal punto di vista estetico sono il collo con giogaia sviluppata, il mantello grigio, più scuro nei maschi e più chiaro nelle femmine (nei primi mesi di vita il mantello è fromentino) e, soprattutto, le lunghe corna, a semiluna nei maschi e a lira nelle femmine. I maschi adulti possono raggiungere i 700-1000 kg e le femmine i 500-600 kg (Sargentini et al., 2006).

Oggi, l'indirizzo produttivo degli allevamenti di Maremmana è la carne, mentre in passato la peculiare rusticità di questi animali era valorizzata con il lavoro agricolo (duplice attitudine) e non mancano testimonianze, tra cui Faelli (1903), Casorri (1905), Giuliani (1928), Mascheroni (1929), Bonadonna (1950), relative a quotidiane pratiche di mungitura e caseificazione (triplice attitudine)

Le potenzialità dell'allevamento di questa razza sono legate all'eccezionale frugalità, che rende gli animali capaci di utilizzare al meglio, e dunque valorizzare, la macchia mediterranea e dei boschi cedui tipici dell'entroterra maremmano e alla notevole capacità di accrescimento compensativo (Sargentini et al., 2006)

Un'altra importante caratteristica della Maremmana è la resistenza ai patogeni che, unita alla rusticità, rende questi animali particolarmente adatti all'allevamento brado e capace di produrre carne di qualità anche in ambienti difficili, non adatti per altri tipi genetici. L'ambiente tipico di allevamento delle mandrie di riproduttori è quello del pascolo arbustivo nella macchia mediterranea, soprattutto in estate e inverno. La femmina produce quantità di latte tali da assicurare ai vitelli un buon accrescimento e quindi un adeguato peso allo svezzamento (180-220 kg); nelle fasi successive, per aumentare l'efficienza di ingrasso dei vitelli, il finissaggio avviene generalmente praticato in ambienti confinati piuttosto semplici, come i *feedlot*⁵, (Sargentini et al., 1996).

Negli anni novanta del secolo scorso la comunità scientifica ha iniziato ad interessarsi alla salvaguardia della biodiversità; infatti, la conservazione delle risorse genetiche animali tipiche di un territorio ha un ruolo significativo, in termini ecologici, sociali e culturali, nel garantire la sopravvivenza economica delle comunità rurali e di molte aree marginali (Marsan et al., 2008; Matassino, 1996; ConsDABI, 2002). In particolare, vari studi sono stati indirizzati al recupero del germoplasma autoctono e il mantenimento della biodiversità, al fine di non perdere il patrimonio genetico. Tra i bovini, una delle razze a cui la ricerca ha prestato attenzione è appunto la Maremmana, di cui sono stati indagati l'interazione con il territorio e le caratteristiche genetiche (Iacurto et al., 2003). La carne della razza è stata inoltre oggetto di analisi di laboratorio e organolettiche, volte a definirne i vari aspetti di qualità (Iacurto et al., 2003; Giorgetti et al., 1995; Poli, et al., 1996; Sargentini et al., 2000; Bozzi et al., 1998; Gigli, et al., 1998; Martini, et al., 2001; Sargentini et al., 2001). Più recentemente, l'attenzione dei ricercatori si è spostata verso gli aspetti legati alla salute umana; in particolare, l'analisi e la valutazione della frazione lipidica hanno rivelato le interessanti proprietà nutraceutiche, tra cui un elevato tenore di UFA e un ottimo rapporto PUFA $\omega 6/\omega 3$, di questa carne (Secchiari et al., 2011).

Infine, è interessante notare che negli ultimi 15 anni l'allevamento di quest'antica razza sembra in notevole ripresa (Figura 8).

⁵ I *feedlot* sono grandi recinti all'aperto parzialmente dotati di ripari per il sole e le intemperie.

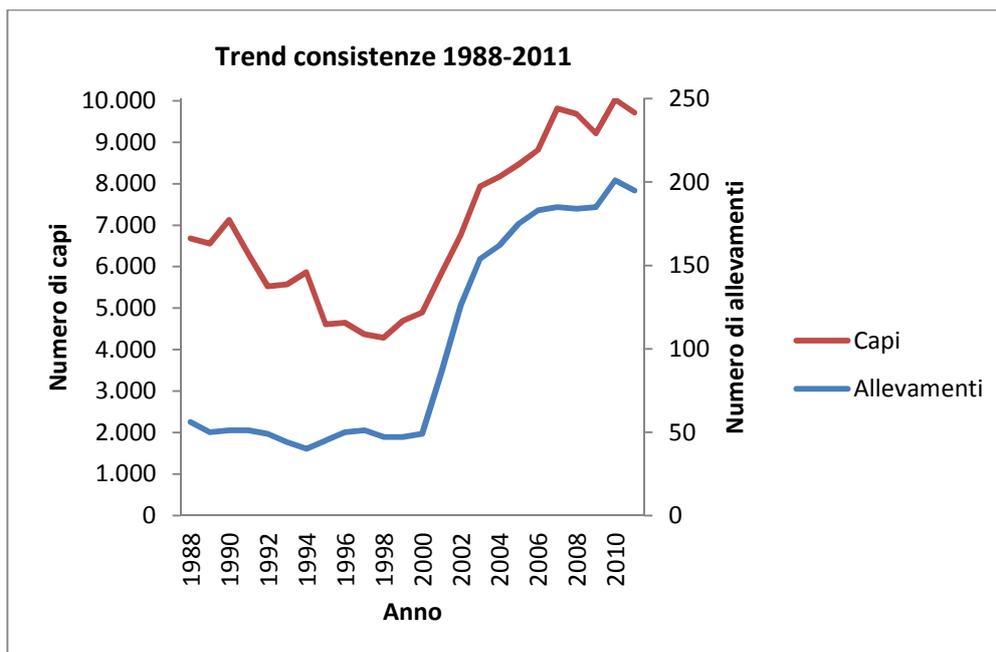


Figura 8. Variazione del numero di allevamenti di bovini di razza Maremmana aderenti all'ANABIC e relativo numero di capi iscritti al Libro Genealogico nel periodo 1998-2011. I dati (ANABIC, 2012) provengono dai rilievi effettuati dalle Associazioni Provinciali degli Allevatori (APA).

QUALITÀ DELLA CARNE⁶

Per poter descrivere i caratteri qualitativi della carne di Maremmana, sono state usate come termine di confronto, le misure relative alle produzioni con Indicazione Geografica Protetta (IGP) Vitellone Bianco dell'Appennino Centrale (Consorzio di Tutela Vitellone Bianco dell'Appennino Centrale, 2011), cui appartengono le razze Chianina, Marchigiana e Romagnola, unica IGP per le carni fresche (Tabella 9).

Tabella 8. Parametri qualitativi medi della carne di Vitellone Bianco dell'Appennino Centrale previsti dal disciplinare di produzione (Consorzio di Tutela Vitellone Bianco dell'Appennino Centrale, 2011).

CARATTERISTICHE FISICHE	
L	> 30
H = arctan b/a	> 20
croma	25-45
Resistenza al taglio (crudo)	< 3,5 kg/cm ²
Resistenza al taglio (cotto)	< 2,5 kg/cm ²
Drip loss	< 3%
Cooking loss	< 35%

CARATTERISTICHE CHIMICHE	
Estratto Etereo sul TQ (EE)	< 3%
Proteine sul TQ	> 20%
Ceneri sul TQ	< 2%
UFA/SFA	> 1,0

⁶ I dati e tabelle usati per la redazione del seguente paragrafo sono di Secchiari et al., 2011.

Per quanto riguarda le caratteristiche fisiche (Tabella 10), le misure di colore (L, a, b e croma) sono paragonabili a quelle delle altre razze, mentre i dati di resistenza al taglio (WBS) differiscono in modo sostanziale e non rientrano nei limiti previsti dal disciplinare dell'IGP. Invece, nel caso delle perdite d'acqua, la carne di Maremmana presenta caratteristiche migliori a livello di entrambe le componenti *drip loss* e *cooking loss*.

Tabella 9. Caratteristiche fisiche delle carni di Maremmana a confronto con quelle di Podolica, Chianina (IGP) e Marchigiana (IGP).

	Osservazioni (numero)	Maremmana	Podolica	Chianina	Marchigiana
L	45	40.16 a	37.01 b	40.31 a	42.77 a
a	32	17.15	17.22	22.93	23.84
b	31	9.18	8.44	7.97	13.24
croma	37	21.08 b	19.83 ab	26.17 ab	27.34 a
WBS kg (carne cruda)	50	11.62 b	9.44 b	16.56 a	14.51 ab
WBS kg (carne cotta a bagnomaria)	27	15.98 a	11.91 ab	13.17 a	13.15 a
Drip Loss %	24	1.36 b	-	1.30 b	1.51 b
Cooking loss %	41	32.54 a	24.37 bc	31.10 ab	29.60 abc

La composizione chimica della carne è riportata in Tabella 11. I dati relativi alla Maremmana sono paragonabili a quelli misurati nelle altre razze e rientrano nei limiti previsti dal disciplinare dell'IGP.

Tabella 10. Composizione chimica delle carni di Maremmana a confronto con quelle di Podolica, Chianina (IGP) e Marchigiana (IGP).

	Osservazioni (numero)	Maremmana	Podolica	Chianina	Marchigiana
Umidità %	58	74.81	74.72	74.88	74.89
Proteine %	65	22.01	21.98	22.92	22.85
EE%	81	1.41 a	1.76 ab	1.86 ab	2.06 b
Ceneri %	61	1.16 ab	1.26 a	1.05 bc	1.04 b

Passando alle caratteristiche del grasso (Tabella 12), i tenori di SFA, MUFA e PUFA delle tre razze appaiono confrontabili. A tal proposito, si osserva che la componente lipidica della carne di Maremmana presenta un apprezzabile contenuto di PUFA $\omega 3$, ma anche un elevato livello di PUFA $\omega 6$; nonostante ciò, il rapporto $\omega 6/\omega 3$ (circa 6) è il più basso dei tre e quello che più si avvicina al valore ottimale di 4. Inoltre, il disciplinare dell'IGP impone che il rapporto UFA/SFA superi l'unità, come consigliato dalle linee guida dell'OMS. Il valore di tale parametro nella Maremmana è 1,25, superiore a quello della Marchigiana, pari a 0,99, e pertanto conforme alle prescrizioni del suddetto disciplinare.

Tabella 11. Caratteristiche del grasso delle carni di Maremmana a confronto con quello di Podolica, Chianina (IGP) e

Marchigiana (IGP).

	Osservazioni (numero)	Maremmana	Podolica	Chianina	Marchigiana
SFA	68	44.05 c	44.98 bc	49.90 ab	51.31 a
MUFA	66	34.84	36.36	36.25	33.40
PUFA	52	20.34	20.44	15.07	17.36
n-3	54	2.96 a	2.34 ab	1.18 b	1.64 ab
n-6	54	17.38	17.57	13.88	15.63
PUFA/S FA	52	0.48	0.47	0.32	0.33
n6/n3	52	6.01 b	6.74 ab	12.95 a	10.38 ab

In conclusione, le componenti della qualità della carne dei vitelloni Maremmani rispondono generalmente a quelle delle razze dell'IGP Vitellone Bianco dell'Appennino Centrale, con alcune pregevoli caratteristiche distintive rispetto alle razze di confronto, quali il minore contenuto di grasso, il positivo rapporto UFA/SFA e il più favorevole rapporto $\omega 6/\omega 3$. Tali aspetti sono imputabili tanto al tipo genetico, quanto al tradizionale sistema di allevamento al pascolo.

PROSPETTIVE

Poiché con il tradizionale allevamento brado la qualità del prodotto finale è fortemente dipendente dalla stagione dell'anno, sarebbe auspicabile un miglioramento delle pratiche gestionali, o l'implementazione di nuovi sistemi, che consenta di commercializzare carne con caratteristiche costanti e quindi in linea con le richieste del mercato. A tal proposito e alla luce di quanto sopra esposto, si ritiene utile approfondire lo studio degli effetti dell'integrazione dietetica con alimenti naturalmente ricchi in PUFA, come i semi di lino, sulla composizione acidica della carne. Oltre a ciò un altro interessante ambito di indagine riguarda l'attitudine della carne di Maremmana alla conservazione in ambiente refrigerato, con particolare riferimento al frigorifero domestico. Tale caratteristica è importantissima dati gli attuali sistemi di distribuzione e vendita, sempre più strettamente collegati alla GDO (Grande Distribuzione Organizzata), e dalle abitudini di acquisto e consumo degli italiani; in particolare, oggi si tende a ridurre il numero settimanale degli eventi acquisto dei prodotti alimentari, per poi conservarli nel frigorifero domestico fino al consumo.

SHELF LIFE DELLA CARNE REFRIGERATA

Le caratteristiche sanitarie, sensoriali e nutrizionali della maggior parte degli alimenti peggiorano durante la conservazione; tale perdita di qualità che si protrae nel tempo può essere considerata come una trasformazione del prodotto, dipendente dalla temperatura ambientale (Ross, 1998). La *shelf life* (vita di scaffale) è l'intervallo di tempo tra la produzione, che nel caso della carne bovina corrisponde al sezionamento della carcassa, e l'inaccettabilità; si tratta dunque del periodo durante il quale tutte le principali caratteristiche organolettiche e nutrizionali dell'alimento rimangono inalterate e oltre il quale non è più consigliabile mangiare un certo cibo, potendone derivare malnutrizione e/o malattie, al di là dell'insoddisfazione a livello edonistico. Da quanto esposto si evince che lo studio dell'attitudine alla conservazione è un momento fondamentale della sviluppo di un prodotto alimentare (Robertson, 2012).

FATTORI CHE DETERMINANO LA SHELF LIFE

La *shelf life* della carne è influenzata da fattori intrinseci al prodotto, inclusa la frollatura, e da fattori estrinseci, quali le condizioni di conservazione e le caratteristiche dell'imballaggio, e può essere modificata agendo su di essi (Singh et al., 2003).

FATTORI INTRINSECI

I fattori intrinseci sono pH, quantità di acqua libera, livello delle popolazioni microbiche e concentrazione di enzimi e composti reattivi; questi parametri sono controllabili scegliendo opportunamente le materie prime e i parametri di processo.

In base alla natura dei cambiamenti che possono verificarsi durante la conservazione, si individuano alimenti deperibili o a breve *shelf life*, semi-deperibili o a media *shelf life* e *shelf stable* o a lunga *shelf life*.

I prodotti deperibili (latte fresco, carne, pesce, i prodotti ortofrutticoli pronti per il consumo, frutta e verdura fresca) devono esser conservati a bassa temperatura, per refrigerazione tra 0 e 4°C o surgelamento a meno di -18°C.

Gli alimenti semi-deperibili contengono inibitori naturali (formaggio, tuberi, uova) o hanno subito un moderato trattamento atto a prolungarne la conservabilità (latte pastorizzato, prosciutto di Praga, verdure in salamoia) e pertanto resistono meglio alle condizioni ambientali o all'eventuale mancato rispetto della catena del freddo.

I prodotti *shelf stable* sono stabili a temperatura ambiente in quanto difficilmente attaccabili dai microrganismi a causa del loro basso contenuto di umidità (cereali, noci, caramelle) o perché hanno subito trattamenti quali la sterilizzazione a caldo (cibi in scatola), l'aggiunta di conservanti (bibite analcoliche) o l'essiccamento (uva passa, grissini).

FATTORI ESTRINSECI

Tra i fattori estrinseci, la temperatura, l'umidità relativa, la luce, la pressione totale e parziale di diversi gas e gli stress meccanici, compresa la manipolazione da parte del consumatore, possono influire sulla velocità delle reazioni che determinano l'alterazione dell'alimento; inoltre, molti di questi elementi sono influenzati dalla modalità di confezionamento, che quindi si ripercuote direttamente sulla rapidità del processo di deterioramento.

Le componenti nutritive della carne rendono tale prodotto un ambiente ideale per la crescita e lo sviluppo della flora microbica, compresi pericolosi patogeni (Aymerich et al., 2008); per questo motivo, l'inibizione della proliferazione microbica è lo scopo principale delle tecnologie atte alla conservazione della carne, benché esse prevengano efficacemente anche da altri tipi di degradazione qualitativa, quali le alterazioni cromatiche e soprattutto l'ossidazione dei lipidi.

Tali tecniche si suddividono in base al parametro di controllo; segnatamente, inibizione diretta della proliferazione microbica, applicazione di alta pressione idrostatica e conservazione a bassa temperatura (Zhou et al., 2010). Oggi tali sistemi di sono sempre più spesso usati in combinazione, secondo il principio della creazione di ostacoli multipli (*Hurdle Technology*, HT) (Lawrie et al., 2006)

INIBIZIONE MICROBICA

L'azione diretta contro i microrganismi si effettua mediante l'applicazione di radiazioni ionizzanti oppure per mezzo di conservanti e/o antimicrobici, che possono essere molecole di sintesi (diossido di carbonio, ozono, acido lattico e lattato di sodio), composti naturali (oli essenziali, chitosano, nicina, lisozima) oppure sostanze prodotte da particolari batteri lattici (batteriocine) (Zhou et al., 2010; Diez et al., 2009)

ALTA PRESSIONE IDROSTATICA (HIGH HYDROSTATIC PRESSURE, HHP)

Questa tecnologia è di particolare interesse perché consente di inattivare i microrganismi e gli enzimi responsabili della degradazione dell'alimento senza indurre alcuna alterazione a livello sensoriale e nutrizionale (Patterson, 2005).

Tuttavia, ad oggi le indagini sulla stabilità ossidativa degli alimenti di origine animale trattati con HHP hanno prodotto risultati contraddittori (Orlien et al., 2000; (Wiggers et al., 2004; (Tume et al., 2010; Rivas-Cañedo et al., 2009)

BASSA TEMPERATURA (REFRIGERAZIONE)

La refrigerazione, la più tradizionale delle tecniche di conservazione della carne fresca, è una delle pratiche maggiormente efficaci nel contrastare la degradazione qualitativa della carne (Delmore, 2009; Koutsoumanis et al., 2005) e fondamentale per garantirne un'adeguata *shelf life*. È un requisito di base per la conservazione della carne, anche in concomitanza degli interventi citati in precedenza. Inoltre, temperature al di sotto del limite minimo dell'intervallo ottimale di crescita e sviluppo dei microrganismi più pericolosi inibiscono efficacemente la degradazione ad opera della flora microbica patogena, per cui sono richieste per garantire la sicurezza sanitaria del prodotto.

Dopo la macellazione, la carcassa del bovino dovrebbe essere immediatamente raffreddata per raggiungere una temperatura uniforme di 1,7°C, al fine di prevenire al meglio l'attività dei microrganismi; inoltre, per prevenire l'eccessiva perdita di liquidi, l'indurimento e l'alterazione cromatica, è importante regolare la temperatura l'umidità e la circolazione dell'aria nelle celle frigorifere. (Mascheroni, 2012). Ad esempio, la carcassa del bovino contiene un 70% d'acqua e il suo raffreddamento avviene principalmente per evaporazione (*evaporative cooling*) dalle superfici esterne; ciò determina una perdita di liquidi tale da ridurne il peso del 2% in una notte. Per evitare questo fenomeno, la carcassa viene lavata o spruzzata con acqua (*spray chilling*) (Mascheroni, 2012). In aggiunta, la temperatura delle celle frigorifere deve essere sufficientemente bassa da evitare la perdita di colore, ma non tale da determinare il congelamento, perciò un adeguato raffreddamento richiede molte ore. L'aria delle celle è mantenuta a -1 e 0°C mediante sistemi di circolazione forzata e ventilazione; la temperatura d'ingresso della carcassa bovina è di 37-39°C e raggiungere il valore raccomandato di 3-4°C in circa 15 ore (Mascheroni, 2012)

CONFEZIONAMENTO

Esiste un'ampia gamma di polimeri termoplastici comunemente usati come materiali d'imballaggio, che si differenziano, in linea di massima, per il grado di resistenza (barriera) al passaggio di molecole a basso peso molecolare, come gas, vapore acqueo e vapori organici. La porosità del materiale, direttamente proporzionale allo spessore, e, soprattutto, i processi di soluzione-diffusione a livello delle pareti dell'imballaggio influiscono sulla capacità di tali sostanze di penetrare all'interno della confezione. Ad esempio, i polimeri di spessore più ridotto, come le pellicole alimentari per uso domestico, offrono una bassa protezione essendo generalmente soggetti

a entrambe le suddette forme di permeabilità. Infine, è evidente che il livello di protezione dell'alimento è strettamente legato anche all'integrità della confezione, comprese le saldature e le chiusure.

La scelta del materiale dipende dal tipo di alimento e dalla modalità di conservazione.

La carne fresca, alimento deperibile, è conservata per refrigerazione e comunemente confezionata sottovuoto (*Vacuum Packaging*, VP) o in atmosfera modificata (*Modified Atmosphere Packaging*, MAP).

Il VP conserva il prodotto in carenza di O₂ (<500 ppm). Entro due giorni dal confezionamento ogni residuo di ossigeno è praticamente consumato dalla respirazione della carne, processo che contribuisce anche all'aumento della pressione parziale di CO₂. Se queste condizioni sono accompagnate da un normale basso pH (minore di 5,8), la flora batterica risulta severamente inibita o completamente bloccata; in tal caso la shelf life della carne bovina mantenuta a temperatura di refrigerazione può superare le 10 settimane (Lambden et al., 1985). Al contrario, con un pH elevato o un'alta percentuale di grasso, il cui pH è tendenzialmente neutro, l'attività microbica aumenta e con essa la velocità di deteriorazione della carne; ad esempio, una carne bovina DFD (con un alto pH) comincia ad alterarsi dopo 6 settimane (Lambden et al., 1985). Il VP consiste nell'inserire grossi tagli di carne del peso di 3-15 kg in contenitori (sacchi) flessibili, ma abbastanza resistenti, di plastica. In particolare, il film usato deve essere impermeabile all'umidità, per prevenirne la perdita, e ai gas, per evitare l'ingresso dell'O₂; inoltre, per impedire che le estremità taglienti delle ossa perforino il sacco, il materiale d'imballaggio è rinforzato con una tela di cotone impregnata di cera. Il "metodo della retrazione in sacchi" è una delle più diffuse tecniche di confezionamento sottovuoto della carne. La pratica operativa prevede innanzitutto l'inserimento dell'alimento in un sacco termoretraibile, generalmente un film coestruso a triplo strato EVA-copolimero/PVC-copolimero/EVA a barriera per l'O₂; si procede aspirando l'aria residua; si sigilla l'apertura del contenitore con ganasce calde e, infine, il sacco viene termoretrato per immersione in acqua a 90°C; a questo punto l'involucro aderisce strettamente alla carne. I tagli primari e secondari così confezionati sono distribuiti ai punti rivenditori al dettaglio e quindi ulteriormente sezionati. I piccoli tagli finali sono, infine, posti in vassoi monouso di polistirene (PS) e avvolti in film permeabili all'O₂ (di solito LDPE saldato a caldo), per l'esposizione e la vendita al pubblico. Il consumatore dovrebbe mantenere il prodotto preincartato in frigorifero fino al momento del consumo, senza danneggiarne l'imballaggio. A tal proposito è utile sottolineare che, secondo la normativa vigente (Reg. (UE) n. 1169/2011), le etichette dei prodotti preincartati devono riportare la data del confezionamento, ma la data di scadenza non è obbligatoria; tuttavia, la carne fresca tagliata a fettine sottili e macinata, compresi gli hamburger, dovrebbe essere consumata entro 24 ore dal confezionamento, mentre per i tagli un po' più grandi si può arrivare a 2-3 giorni. Una shelf life così breve è da imputare all'elevata area superficiale che di tali tipi di prodotto espongono alla luce e all'ossigeno, i maggiori responsabili dell'incremento di velocità dei processi ossidativi (Jacobsen, 2008; Nawar, 1984). È evidente che spesso l'alimento viene mantenuto nel frigorifero domestico per periodi più lunghi. Inoltre, nei punti vendita della GDO, molte persone tendono ad acquistare confezioni di maggiori dimensioni per avvantaggiarsi di un minor prezzo al kg. Aperto l'imballaggio alla prima occasione di consumo, la carne rimasta viene lasciata nella vaschetta d'origine e riposta nel frigorifero avvolta con la pellicola per alimenti in PVC o PE. Condizioni di questo tipo determinano ovviamente un'elevata esposizione all'O₂ e di conseguenza un rapido deterioramento delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali del prodotto.

Le sollecitazioni meccaniche provocate dal VP sulla carne determinano perdite per gocciolamento, perciò tale tecnica non è indicata per i piccoli tagli. In questo caso, l'allungamento della shelf life si ottiene ricorrendo al MAP, che conserva l'alimento grazie alla totale sostituzione dell'aria del contenitore con un gas o una miscela di gas di composizione predeterminata. Ovviamente, la scelta del materiale dell'imballaggio è un momento fondamentale dell'applicazione di questa tecnologia; infatti esso deve costituire un'efficace barriera per l'O₂, pena la vanificazione

della modificazione dell'atmosfera interna. I polimeri più usati per il confezionamento della carne refrigerata sono riportati in Tabella 13.

Tabella 12. Materiali normalmente usati per il confezionamento della carne refrigerata (Mondry, 1996).

Tipo di confezione	Materiali per i fondi	Materiale per i coperchi (se presenti)
Imballaggio flessibile sottovuoto	PA - LDPE, e film coestrusi a 5 strati	
Imballaggio flessibile per MAP	PA- LDPE	OPA-LDPE
	PA-EVOH- LDPE	
	PA- EVOH- PA -LDPE	PET-PVdC-LDPE
	PP-EVOH -LDPE	
	LDPE-EVOH-LDPE	
Imballaggio rigido sottovuoto	APET	OPA-LDPE
	PVC o PVC-LDPE	PET-PVdC-LDPE
	PS-EVOH -LDPE	OPA-LDPE-EVOH-LDPE
Imballaggio rigido per MAP	PVC	OPA-LDPE
	PVC-LDPE o PVC -EVOH-LDPE	PET-PVdC-LDPE
	APET	OPA-LDPE-EVOH-LDPE
	APET-LDPE-o APET-EVOH-LDPE	PET-LDPE-EVOH-LDPE
	PS-EVOH-LDPE	
Skin packaging	PVC-LDPE	Alcune combinazioni di sette o più strati che incorporano EVOH come barriera ai gas
	PS -EVOH-LDPE	
	APET	
	APET-LDPE	

Vi sono tre categorie di MAP per la carne. Il primo tipo di MAP, in ordine cronologico, è quello “ad alta percentuale ossigeno”, che prevede atmosfere contenenti il 20-30% di CO₂, il 60-80% di O₂ e fino al 20% di N₂ ed è abbinato alla refrigerazione, tanto per aumentare la stabilità del colore quanto per ritardare il deterioramento da attività microbica dei prodotti in vendita. L'eccesso di O₂ rende, però, questo metodo poco adatto al prolungamento della *shelf life* della carne fresca; infatti, dopo soli 5-10 ore dal confezionamento cominciano a manifestarsi colorazioni sgradite e segni di irrancidimento (Taylor, 1985). Un secondo tipo di MAP è quello “con bassa percentuale di ossigeno”; in questo caso, l'aria interna alla confezione è la sostituita per iniezione (*gas flush*). In particolare, prevede l'impiego di CO₂, da sola o in miscela con N₂ o aria, e, di norma, produce un'estensione della *shelf life* paragonabile a quella del VP. Invece, il *gas flush* con N₂ è finalizzato ad ottenere un'atmosfera al 100% di N₂ ed ha un'applicazione piuttosto circoscritta alla conservazione carne fresca, con un prolungamento della *shelf life* uguale a quello ottenuto con VP. Il terzo tipo di MAP è quello “a bassissima percentuale di ossigeno” o “ad alta saturazione di CO₂”, talvolta definito “confezionamento in atmosfera controllata” (*Controlled Atmosphere Packaging*, CAP; l'acronimo della tecnologia è CAPTECH) (Gill, 2003). Si tratta di una tecnica di confezionamento altamente specialistica, inizialmente sviluppata per prolungare la *shelf life* della carne fresca di agnello neozelandese refrigerata per venderla nell'emisfero boreale. Dovendo ostacolare l'ingresso dell'O₂ il più efficacemente possibile, i sacchetti per la CAPTECH sono generalmente costituiti o da un poliaccoppiato contenente uno strato di alluminio o da un biaccoppiato con un film metallizzato (Bell, 2001; Gill, 1990). Inserita la carne in questi speciali contenitori, innanzitutto si elimina l'aria, poi si inseriscono i sacchetti in una camera a pressione per facilitare la fuoriuscita dell'aria residua, e, infine, li si riempie con CO₂ aumentando allo stesso tempo la pressione esterna. È importante introdurre più CO₂ di quanta ne serva per saturare la carne (1,5 L/kg carne) per evitare l'implosione dell'imballaggio (Gill, 2003); inoltre, per determinare una riduzione dell'O₂ fino ai valori desiderati, inferiori alle 500 ppm (0,05%), la CO₂ usata deve essere esente da O₂ o contenerne al massimo lo 0,03% (Kropf, 2000). Prevedendo la conservazione a -1°C,

una delle difficoltà operative della presente tecnologia è impedire il congelamento del prodotto; nonostante ciò l'utilizzo su scala industriale di questo sistema è incrementato notevolmente, soprattutto per la conservazione per lunghi periodi di porzioni pronte per la vendita di manzo e agnello, con una shelf life di 18 e 20 settimane, rispettivamente (Gill, 1990).

Infine, sono degni di menzione gli imballaggi attivi (*Active Packaging*, AP) ed intelligenti (*Smart Packaging*, SP).

Gli AP sono confezioni in cui sono stati volontariamente aggiunti, nel materiale d'imballaggio o nello spazio di testa, costituenti ausiliari capaci di migliorare le prestazioni del sistema d'imballaggio. La Tabella 14 mostra i principali tipi di AP, mentre in Tabella 15 si riportano i composti naturali incorporati nei materiali usati per l'AP della carne.

Tabella 13. Esempi selezionati di imballaggi attivi (Day, 2003).

Imballaggio attivo	Meccanismo	Applicazione nel settore alimentare
Assorbitori di O ₂	composti ferrosi, metallo/acido, catalizzatori metallici (per esempio platino), ascorbato/sali metallici, enzimi	pane, torte, riso cotto, biscotti, pizza, pasta, formaggio, carni e pesci lavorati, caffè, snack, alimenti e bevande disidratati
Assorbitori/emettitori di CO ₂	ossido di ferro/idrossido di calcio, carbonato ferroso/alide metallico, ossido di calcio/carbone attivo, ascorbato/bicarbonato di sodio	caffè, carne e pesce freschi, frutta secca, snack, torte tipo pan di Spagna
Assorbitori di etilene	permanganato di potassio, carbonio attivato, argille/zeoliti attivate	ortofrutta
Sostanze che rilasciano conservanti	acidi organici, zeolite di argento, estratti di erbe e di spezie, BHA/BHT come antiossidanti, vitamina E come antiossidante	cereali, carne, pesce, pane, formaggio, snack, ortofrutta
Emettitori di etanolo	etanolo microincapsulato	pizzette, torte, pane, biscotti, pesce, prodotti da forno
Assorbitori di umidità	tappetini di polivinilacetato, argille e minerali attivati, gel di silice	pesce, carne, pollame, snack, cereali, alimenti disidratati, sandwiches, ortofrutta
Assorbitori di odori/ Aromi	triacetato di cellulosa, carta acetilata, acido citrico, sali di ferro/ ascorbato, carbonio/argilla/zeolite attivata	succhi di frutta, snack fritti, pesce, cereali, frutta, prodotti lattiero caseari, pollame

BHA= idrossianisolo butilato; BHT= idrositoluene butilato

Tabella 14. Composti naturali incorporati nei polimeri degli AP della carne (Zhou et al., 2010).

Active component	Polymer/carrier	Substrate
Nisin	Silicon coating	Beef tissue
	PE	Beef carcass tissue
Lactic acid	Alginate	Lean beef muscle
Tocopherol	LDPE	Beef
Rosemary extract	Polystyrene	lamb steaks
Thyme, rosemary and sage spice	Cross-linked caseinate and whey protein film	Ground beef
Oregano extract	Polystyrene	lamb steaks
Chitosan	Chitosan	Cooked ham
Chitosan	Chitosan	Culture media - <i>Listeria monocytogenes</i>
Triclosan	Plastic matrix	Food borne pathogenic bacteria and bacteria associated with meat surface

Abbreviations: PE—polyethylene, LDPE—low density PE.

Gli SP sono confezioni contenenti, internamente o esternamente, un indicatore che informa su alcuni aspetti della storia della confezione e/o della qualità del prodotto contenuto. Si elencano brevemente gli imballaggi intelligenti più usati raggruppati in base al loro scopo. In particolare, gli SP progettati per migliorare la qualità e il valore del prodotto sono gli indicatori di qualità, gli indicatori tempo-temperatura (*Time Temperature Indicator*, TTI), quali VITSAB™, TEMPTIME™, Monitor Mark™, e gli indicatori di concentrazioni gassose. Un'altra funzione degli SP è rendere l'imballaggio più pratico; a tale scopo si impiegano inchiostri termocromatici, indicatori di cottura a microonde (*Microwave Cooking Indicator*, MCI) e identificatori a radiofrequenza (RFID). Infine, tale confezionamento è ideato anche per proteggere in prodotto dal taccheggio, dalle contraffazioni e dalle manomissioni, con ologrammi, inchiostri e colori speciali; tuttavia, questa tecnologia non è molto usata nel settore alimentare, dato il basso prezzo medio dei prodotti.

L'OSSIDAZIONE DEI LIPIDI

Se si intende preservare le caratteristiche sensoriali, nutritive e funzionali della carne durante la conservazione, non si può prescindere dalla conoscenza del processo di natura non microbiologica maggiormente coinvolto nel decadimento qualitativo di tale prodotto durante la conservazione (Secchiari et al., 2011; Jeremiah et al., 2001; Medina et al., 2009), seppur in ambiente refrigerato. Infatti, tale meccanismo di alterazione dei lipidi determina l'irrancidimento, con produzione di odori e aromi sgradevoli, e lo sviluppo di una varietà di sostanze, tra cui alcune ad azione avversa nei confronti della salute umana e tossiche (Medina et al., 2009; Ames et al., 1993; Dobarganes et al., 2003; Enser, 1987). Gli effetti negativi dell'ossidazione della carne fresca sono tali da richiedere notevole attenzione da parte della scienza alimentare (Sampels, 2013). I meccanismi che comportano perdite qualitative nella carne fresca refrigerata sono sintetizzati nella sottostante tabella (Tabella 16)

Tabella 15. Conseguenze dell'ossidazione lipidica (Akoh et al., 2002)

Consequence

Fresh flavors

Off-flavors (warmed over/rancid)

Cholesterol oxidation products with potentially detrimental health implications

Protein denaturation and functionality changes

Pigment changes

Myoglobin (red) → metmyoglobin (brown)

Loss of red (carotenoid) pigmentation

L'inevitabilità dell'ossidazione dei grassi rappresenta un limite per la *shelf life* e pertanto condiziona la commercializzazione e la distribuzione della carne, soprattutto quando è ricca di PUFA $\omega 3$ (Gray et al., 1996), come quella che si ottiene da animali allevati al pascolo o con diete ricche in $\omega 3$.

Oltre a ciò, i prodotti della perossidazione lipidica, e in particolare le aldeidi, sono in grado di reagire con alcuni AA per formare carbonili e aggregati proteici (Uchida et al., 1996; Buttkus, 1966), con peggioramento del quadro nutrizionale. In aggiunta, l'instabilità dei FA della carne rossa nei confronti dei processi ossidativi produce anche alterazioni cromatiche (Faustman et al., 1990; Scaife, 2000) tali da rendere il prodotto inaccettabile agli occhi del consumatore. Dunque, spesso si ricorre all'aggiunta di antiossidanti per aumentare la *shelf life* dei prodotti di origine animale, con particolare riferimento alla possibilità di mantenerne quanto possibile inalterate le caratteristiche organolettiche e dietetiche (Kazimierczak, et al., 2008; Ladikos et al., 1990). Note le positive

implicazioni per la salute umana legate al consumo di PUFA $\omega 3$ a lunga catena con la dieta, la ricerca nel settore zootecnico rivolge sempre maggiore attenzione quei sistemi produttivi che consentono di ottenere carne naturalmente ricca di tali FA (Wood et al., 2003). Tuttavia, data la maggiore reattività chimica dei doppi legami rispetto ai singoli, favorire un alto livello di insaturazione nel grasso intramuscolare predispone tale componente alla perossidazione; quindi l'incremento della percentuale di PUFA nella frazione lipidica della carne deve essere accompagnato dall'aumento del contenuto di antiossidanti. Integrare la dieta al pascolo di razze bovine con alimenti ricchi di UFA come i semi di lino estrusi, è una strategia efficace per arricchire in modo naturale i tessuti animali di PUFA, garantendo allo stesso tempo l'apporto di antiossidanti provenienti dal pascolo.

In effetti, il contenuto di molecole ad azione antiossidante dei prodotti di origine animale può essere aumentato non solo *ex ante*, agendo sulla loro alimentazione, ma anche *ex post* aggiungendo queste sostanze al prodotto finito confezionato. L'efficacia dell'una o dell'altra strategia dipende dal tipo di antiossidante (Sampels, 2013). In generale, gli antiossidanti liposolubili, come il tocoferolo agiscono efficientemente quando assunti con la dieta, contrariamente a quelli idrosolubili, come l'acido ascorbico, più attivi se aggiunti con la lavorazione (Morrissey, 1998; Bou et al., 2001). Per di più, tali molecole mostrano azione sinergica, ad esempio le vitamine E e C (Parcker et al., 1979).

Di seguito si descrive il meccanismo di ossidazione dei lipidi.

CHIMICA DELL'OSSIDAZIONE LIPIDICA NELLA CARNE

La perossidazione dei lipidi è una reazione radicalica a catena i cui principali reagenti sono gli UFA intramuscolari e l'O₂ atmosferico (Figura 9); un altro importante componente di membrana interessato dall'ossidazione è il colesterolo.

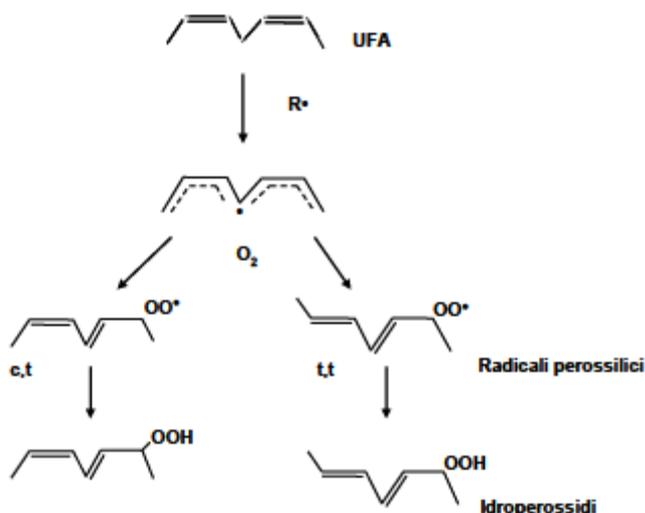
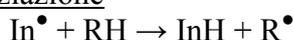


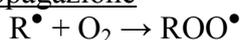
Figura 9. Ossidazione degli acidi grassi insaturi (Ursini, 1990).

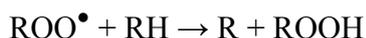
Il processo si sviluppa nelle tre fasi di iniziazione, propagazione e terminazione, di seguito descritte (Akoh et al., 2002).

1. Iniziazione

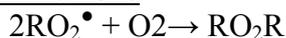


2. Propagazione





3. Terminazione



1. Iniziazione

La prima fase del processo di perossidazione lipidica si avvia quando il lipide (RH) è attaccato da una molecola sufficientemente reattiva (iniziatore, In) da staccare un atomo H, riducendosi (InH); si forma così un radicale lipidico (R^\bullet). Tale rimozione diventa più facile all'aumentare del grado di insaturazione dell'acido grasso, per cui i PUFA sono particolarmente suscettibili all'ossidazione. Sul C della catena lipidica privato di un H, rimane un elettrone spaiato, con formazione di un radicale (R^\bullet) (Akoh et al., 2002).

Nella carne la molecola che promuove l'inizio della perossidazione può essere un complesso ferro-ossigeno (radicali ferrile, Fe^{IV} , e perferrile, Fe^{V}) o una delle specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Tali molecole sono normalmente presenti nelle cellule animali, che le producono in caso di stress endogeno o esogeno; si tratta in genere di radicali liberi, tra cui il radicale idrossile (OH^\bullet), l'anione superossido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e radicali di composti organici come i perossi- (ROO^\bullet) ed alcossi- (RO^\bullet) radicali; inoltre, sono ROS anche molecole non radicaliche come il perossido d'idrogeno (H_2O_2), l'acido ipocloroso (HClO) e gli idroperossidi ed epossidi dei lipidi endogeni (Akoh et al., 2002).

2. Propagazione

Questa fase è la base della successiva reazione a catena e comprende vari processi (Figura 10) Reazioni della fase di propagazione (Akoh et al., 2002).

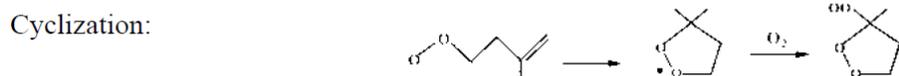
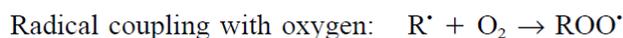


Figura 10. Reazioni della fase di propagazione (Akoh et al., 2002).

Il radicale lipidico (R^\bullet) tende a stabilizzarsi per riarrangiamento molecolare, formando un diene coniugato, che, nei sistemi biologici, può partecipare a varie reazioni. In particolare, in condizioni aerobiche, il più comune destino dei dieni coniugati è la reazione con O_2 per formare ROO^\bullet (Min et al., 2005); invece, in presenza di concentrazioni di O_2 molto basse, tali molecole tendono a reagire tra loro o con i componenti di membrana come proteine o colesterolo (Frank et al., 1989). Inoltre, la formazione dei dieni coniugati è accompagnata dal cambiamento della configurazione dei doppi legami dalla forma cis alla trans, che induce gli UFA ad “impaccarsi” strettamente, con formazione

di placche rigide all'interno del il doppio strato lipidico ossidato (Coolbear et al., 1983). La presenza di dieni coniugati è pertanto uno dei più importanti indicatori della perossidazione lipidica nella carne (Min et al., 2005).

Nella fase di propagazione, ROO^\bullet strappa un H dalla molecola di un FA vicino, determinando la formazione di un idroperossido lipidico (ROOH). Inoltre, avendo un potenziale di riduzione standard più elevato di quello della molecola lipidica, ROO^\bullet ossida preferenzialmente altri PUFA, propagando la reazione a catena:

L'idroperossido lipidico è un intermedio caratteristico della perossidazione lipidica, la cui identificazione fornisce in genere una valida conferma del processo in corso.

Gli ROOH sono molecole più polari rispetto ai FA, perciò sono in grado di danneggiare la struttura e le funzioni delle membrane, con effetti deleteri per cellule e tessuti. Inoltre, queste molecole vanno incontro a varie reazioni, a seconda dell'ambiente cellulare. In particolare, in presenza di condizioni che rendono difficile la donazione di protoni, gli ROOH tendono a subire combinazione, addizione intermolecolare, riarrangiamento intramolecolare, isomerizzazione a livello dei doppi legami, formazione di dimeri ed oligomeri; inoltre, essi partecipano a reazioni con altre molecole di O_2 , da cui si originano numerosi composti secondari, tra cui perossidi ciclici, dicitioendoperossidi prostaglandina-simili e derivati multi-idroperossilici. Un'altra complicazione è dovuta al fatto che l'asportazione di un H dalla catena di un PUFA può avvenire in diversi punti della catena (Min et al., 2005).

Gli idroperossidi ciclici e i dicitioendoperossidi sono precursori della malonildialdeide (MDA), uno dei prodotti finali più caratteristici della lipoperossidazione nella carne; per questo motivo, tale molecola è usata nella pratica di laboratorio come indicatore dello stress ossidativo e del danno cellulare (Botsoglou et al., 1994; Halliwell et al., 1993; Raharjo et al., 1993). Un esempio di analisi è il saggio dei TBARs (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*); infatti i prodotti della reazione della malonildialdeide con l'acido tiobarbiturico presentano una colorazione, di intensità direttamente proporzionale alla concentrazione dell'indicatore, che risulta misurabile per via colorimetrica.

3. Terminazione

Nell'ultima fase del processo di ossidazione lipidica i radicali ROO^\bullet reagiscono tra loro e/o si autodistruggono originando un prodotto non radicalico. Numerosi derivati secondari degli idroperossidi si decompongono per via omolitica o eterolitica per intervento di catalizzatori metallici originando un'ampia gamma di composti volatili e non volatili, tra cui aldeidi, chetoni, alcoli, alcani, alcheni e furani, responsabili dell'alterazione organolettica dell'alimento (Frankel et al., 1987); in particolare, dai PUFA ω_6 si formano esanale, 1-octan-3-olo, 2-nonenale, 4-idrossi-2-trans-nonenale (4-hydroxy-2-trans-nonenal, 4-HNE) e 4-idrossidodecanale (4-HDDE), mentre dai PUFA ω_3 derivano propanale, 4-eptanale, 2,4-eptadienale, 2-esenale, 2,4,7-decatrienale, 1,5-octadien-3-olo, 2,5-octadien-

1-olo, 1,5-octadien-3-one, 2,6-nonadienale (Decker et al., 1992, Frankel et al., 1993) e 4-idrossiesenale (4-HHE).

Il 4-HNE, il 4-HHE e il 4-HDDE (che deriva esclusivamente dalla perossidazione dell'acido arachidonico) appartengono alla famiglia delle 4-idrossialchenali aldeidi reattive della famiglia

delle 4-idrossialchenali e alle quali si sta rivolgendo l'attenzione di molti ricercatori per i numerosi effetti fisiologici o patologici che risultano essere dose-dipendente (Riahi et al., 2010; Cohen et al., 2011).

Tra tali sostanze volatili, le aldeidi sono uno dei gruppi più rappresentati; si tratta di molecole estremamente reattive implicate, come messaggeri tossici secondari, nella propagazione ed espansione delle reazioni radicaliche iniziali (Esterbauer et al., 1991); inoltre, le aldeidi generate nel processo di perossidazione lipidica sono in grado di reagire con le proteine; tale interazione origina

prodotti di addizione che sono coinvolti nel meccanismo di degradazione della stabilità e della funzionalità delle proteine stesse (Lynch et al, 2001). Oltre a ciò, le aldeidi determinano un incremento dell'ossidazione dell'ossimioglobina e dell'attività pro-ossidante della metamioglobina e una diminuzione della riduzione enzimatica della metamioglobina; quest'ultimo processo è direttamente implicato nell'alterazione cromatica e organolettica della carne (Faustman et al., 2010). Le prime aldeidi ad originarsi per ossidazione lipidica della carne durante la conservazione sono propanale, pentenale, esanale e HNE (Lynch et al, 2001); quest'ultimo è citotossico negli animali, compreso l'uomo, perché si lega alle proteine inibendone le funzioni (Okada et al., 1999). In aggiunta, caratteristiche quali stabilità ed elevata reattività rendono queste molecole dannose verso altri costituenti cellulari ed extracellulari, come gli acidi nucleici e le proteine, causando alterazione della funzionalità cellulare (Del Rio et al., 2005).

Infine, è rilevante sottolineare che il processo descritto è implicato nella modificazione ossidativa delle LDL e gioca un ruolo fondamentale nell'aterogenesi (Tribble, 1999).

OSSIDAZIONE DEL COLESTEROLO

I processi di perossidazione lipidica a carico delle membrane biologiche e delle lipoproteine danno origine agli ossisteroli, i prodotti di ossidazione del colesterolo (COPs) (Lyons and Brown, 1999; Salonen, 2000); tali molecole, che possono originarsi anche dalle reazioni enzimatiche del catabolismo del colesterolo (Salonen, 2000), sono degli indicatori molecolari del processo perossidativo (Miyajima et al., 2001).

Come conseguenza dell'attacco radicalico al colesterolo si verifica, come negli altri UFA, il distacco di un H sul C7, con formazione di un sito radicalico. Data la presenza dell'elettrone spaiato, la molecola reagisce rapidamente con l'O₂ producendo un radicale perossilico, il quale è sufficientemente reattivo da strappare un ulteriore H da un lipide; si genera così il 7 α -idroperossicolesterolo (7 α -OOH), un idroperossido. Per successiva epimerizzazione, si forma il 7 β -idroperossicolesterolo (7 β -OOH), isomero, più stabile, del 7 α -OOH, che diventa la componente maggioritaria. Tuttavia, i due idroperossidi sono comunque instabili e pertanto subiscono in breve tempo altre due trasformazioni, in particolare, dalla riduzione si producono i corrispondenti idrossiderivati, come il 7 α -idrossicolesterolo (7 α -OH) e il 7 β -idrossicolesterolo (7 β -OH), dalla disidratazione si forma un oxoderivato, il 7-chetocolesterolo (7-cheto) (Adachi et al., 2001; Salonen, 2000). Tali molecole (7 α -OOH, 7 β -OOH, 7 α -OH, 7 β -OH e 7-cheto) sono note nell'insieme come ossisteroli 7-ossigenati e rappresentano i principali ossisteroli derivanti dalla perossidazione lipidica delle membrane biologiche e delle lipoproteine (Salonen, 2000); in particolare durante l'ossidazione delle lipoproteine, c'è una sostanziale formazione di 7 β -OH e 7-cheto (Salonen, 2000; Zieden et al., 1999).

L'autossidazione e la degradazione ossidativa da radicali liberi (non enzimatica) del colesterolo mediata sono mostrate in Figura 11 e 12, rispettivamente..

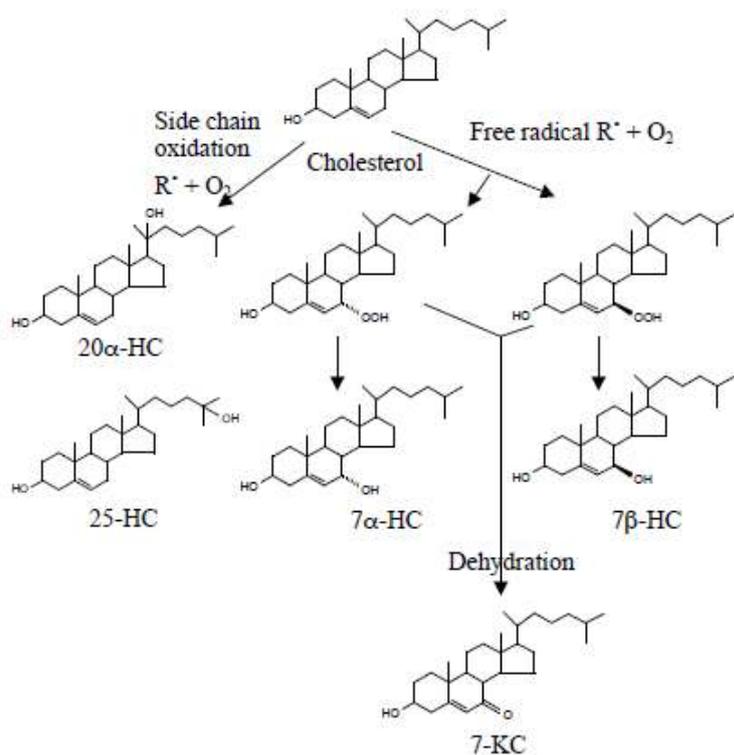


Figura 11. Reazioni di autoossidazione del colesterolo: formazione di idroperossidi 7 α -idroperossicolesterolo (7 α -HC), 7 β -idroperossicolesterolo (7 β -HC) e 7-choetocolesterolo (7-KC).

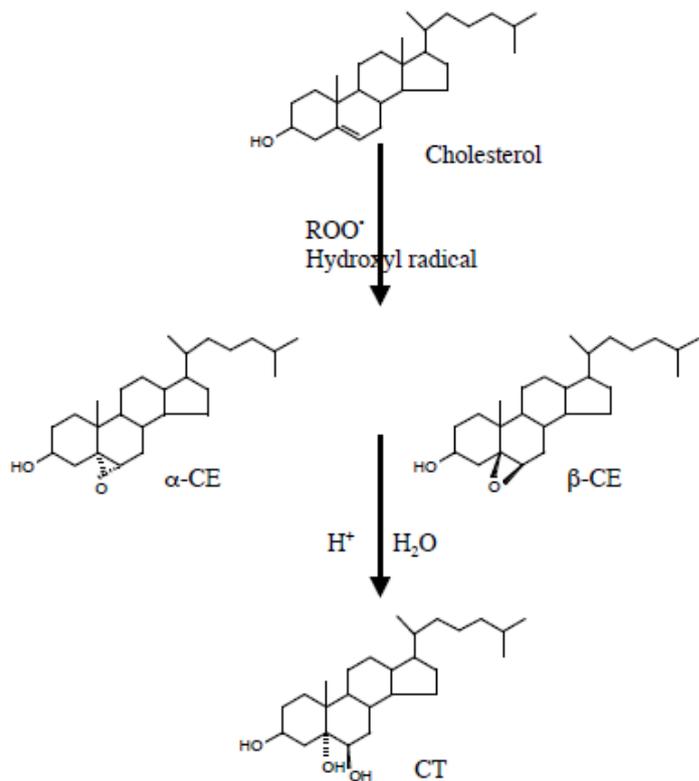


Figura 12. Ossidazione del colesterolo mediata da radicali liberi: formazione di epossidi (α -epossicolesterolo, α -CE; β -epossicolesterolo, β -CE) e triolo (CT).

Inoltre, il colesterolo può andare incontro anche a fotossidazione innescata dall'esposizione alla radiazione luminosa, secondo lo schema riportato in Figura 13.

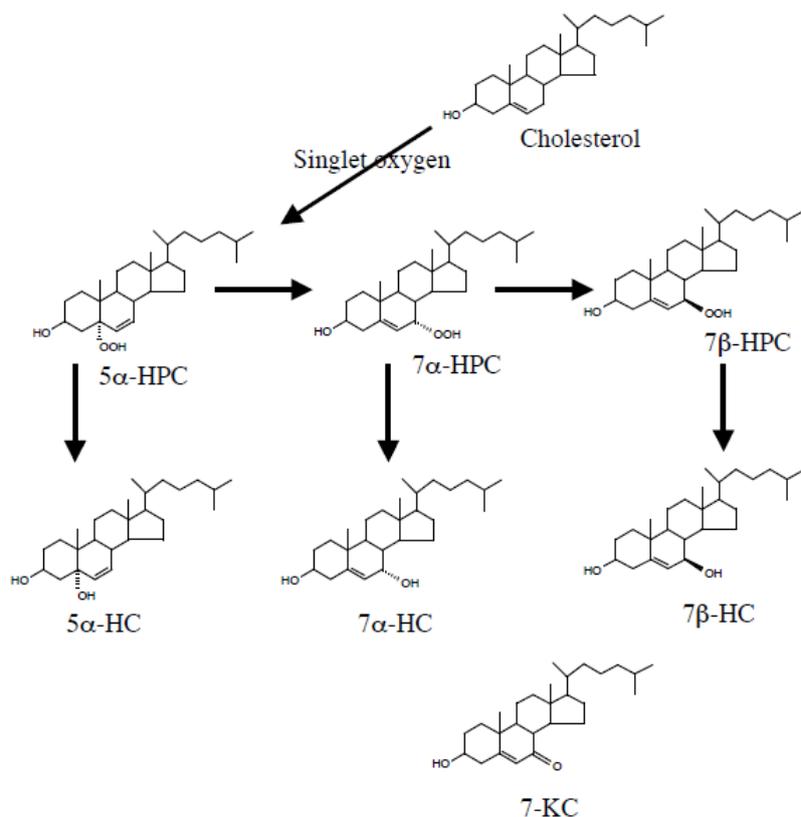


Figura 13. Fotossidazione del colesterolo.

Per quanto riguarda la carne, tale fenomeno si manifesta a partire dalle prime fasi di produzione al macello; tuttavia, la fotossidazione ha un significato rilevante in conseguenza dell'esposizione dell'alimento ridotto in piccole parti (fettine, macinato, ecc.) sui banchi dei punti vendita.

RUOLO DEI PRODOTTI DELL'OSSIDAZIONE LIPICA NELLA SALUTE UMANA

FAMIGLIA DELLE 4-IDROSSIALCHENALI (4-HHE, 4-HNE, 4-HDDE)

Il ruolo di questi composti nella salute umana è stato indagato esaustivamente da Riahi et al. (2010) e Cohen et al. (2011), i cui lavori sono stati presi come riferimento per la redazione del seguente paragrafo.

Alle normali concentrazioni fisiologiche, i 4-idrossialchenali presenti nelle cellule non determinano citotossicità, ma hanno, al contrario, funzioni regolatrici, di segnale e, talvolta, di protezione dai danni ossidativi: gli effetti citotossici sono direttamente correlati con la loro concentrazione.

La forte lipofilia di queste molecole ne favorisce l'accumulo nei fosfolipidi e nelle proteine di membrana, cui si legano covalentemente, modificando, in ultima analisi la fluidità e la funzione delle membrane cellulari.

Le molecole di questa famiglia interagiscono anche con il DNA, originando modifiche nell'espressione genica.

Il 4-HNE, la molecola più studiata, è capace di reagire con i gruppi amminici e tiolici di varie molecole biologiche, alterandone struttura e funzioni. Per questo motivo, l'incremento dei tassi di

aldeidi reattive nel plasma e nei liquidi biologici è messo in relazione con l'insorgenza di alcune patologie, quali morbo di Alzheimer, SLA, cirrosi epatica e diabete.

Di recente, è stato evidenziato che il livello di glucosio nell'ambiente esterno alle cellule pancreatiche è in grado di avviare un segnale, a seguito del quale la membrana rilascia PUFA $\omega 6$ per la produzione *in situ* di 4-HNE, che ha funzioni regolatrici nei confronti dei recettori PPAR delta per la risposta insulinica. Questi ultimi sono sensori cellulari responsabili della risposta infiammatoria nei macrofagi, del cambiamento ossidativo mitocondriale da glicolitico a lipolitico, e della regolazione del metabolismo del glucosio e della sensibilità insulinica.

Infine, si evidenzia che gli effetti negativi di queste aldeidi sono neutralizzati dalla presenza di glutazione perossidasi (GPx) e da un enzima disattivante le aldeidi (FALDH).

MALONILDIALDEIDE (MDA)

La MDA è il principale prodotto terminale della perossidazione lipidica; tuttavia, la presenza di questa molecola nelle cellule animali può essere anche il risultato di altri meccanismi, come, ad esempio, i processi enzimatici coinvolti nella sintesi delle prostaglandine (Del Rio et al., 2005).

Oltre che tossica, la malonildialdeide è mutagenica, perché reagisce con i gruppi funzionali delle proteine e del DNA, modificandone la struttura molecolare (Burcham, 1998); in aggiunta, noto il coinvolgimento della perossidazione lipidica nell'eziologia del cancro, quest'aldeide costituisce sia un *marker* che la causa del processo di iniziazione della patologia (Del Rio et al., 2005). Infatti, elevati livelli plasmatici di MDA sono stati trovati in soggetti affetti da tumori gastrici, al seno, al polmone e alla cervice uterina e in pazienti con leucemia cronica (Del Rio et al., 2005).

Un'altra importante e diffusa patologia la cui eziologia è in stretta relazione con lo stress ossidativo è il diabete di tipo 2 (diabete mellito non-insulino dipendente, NIDDM). Infatti, in pazienti affetti da NIDDM sono stati misurati livelli plasmatici di MDA significativamente superiori rispetto a quelli riscontrati in soggetti sani; in questo caso all'aumento dei livelli di MDA corrispondeva anche la diminuzione dei livelli di glutazione ed acido urico (Dierckx et al., 2003). Inoltre, i diabetici affetti da complicanze aggiuntive, come neuropatia, nefropatia o retinopatia presentavano concentrazioni plasmatiche di MDA più elevate rispetto a quelli che non mostravano alcuna complicazione (Martin-Gallan et al., 2003).

Infine, un'elevata quantità di MDA è stata trovata anche nel plasma di pazienti affetti da aterosclerosi (Tamer et al., 2002) e da cirrosi (Loguercio and Federico, 2003).

PRODOTTI DI OSSIDAZIONE DEL COLESTEROLO (CHOLESTEROL OXIDATION PRODUCTS, COPs)

I COPs mostrano molte azioni nocive, quali citotossicità, angiotossicità, carcinogenicità, mutagenicità, inibizione della mitosi, incremento dell'apoptosi ed effetti pro-ossidanti (Adachi et al., 2001; Smith and Johnson, 1989). Inoltre, diverse condizioni patologiche, sono collegate ad un aumento dei livelli plasmatici di queste molecole. Ad esempio, essendo presenti nelle placche aterosclerotiche, si ritiene che i COPs giochino un ruolo attivo nello sviluppo di quest'alterazione (Adachi et al., 2001); uno dei più abbondanti ossisteroli rinvenuti in placche aterosclerotiche umane è il 7-cheto (Brown et al., 1997).

Un aumento degli ossisteroli 7 α -OH, 7 β -OH e 7-cheto è stato osservato anche nel cervello e negli organi viscerali di soggetti affetti da una malattia associata all'accumulo di ferro, l'aceruloplasminemia, (Miyajima et al., 2001). Questi pazienti presentano un danno cellulare, che è una diretta conseguenza dello stress ossidativo derivante dall'accumulo di ferro; tale accumulo, negli stessi individui, è associato ad un incremento della concentrazione dei prodotti della perossidazione lipidica nel siero e nel liquido cerebrospinale (Miyajima et al., 1998).

Infine, studi su ratti diabetici mostrano che l'aumento degli ossisteroli 7α -OH, 7β -OH e 7-cheto nel muscolo cardiaco ha un ruolo importante nella patogenesi delle cardiomiopatie (Adachi et al., 2001; Matsui et al., 1997).

GLI ANTIOSSIDANTI

Gli antiossidanti sono sostanze, generalmente presenti in piccole concentrazioni, capaci di prevenire o evitare l'ossidazione di un substrato predisposto all'ossidazione. Per quanto riguarda l'ossidazione lipidica, tali molecole agiscono ritardando la fase di propagazione (*chain breaking antioxidants*) o proteggendo i lipidi dai promotori dell'ossidazione (*preventive antioxidants*). I *chain breaking antioxidants* possono intercettare direttamente il ROO^\bullet , promotore del processo ossidativo o interrompere indirettamente la cascata di propagazione radicalica; in quest'ultimo caso, viene ostacolata la formazione di ROS oppure ne viene bloccata l'azione di iniziazione (Laguerre et al, 2007).

Prima di procedere alla descrizione dei principali sistemi antiossidanti, si ritiene importante sottolineare, che i diversi sistemi enzimatici agiscono spesso in cooperazione e sinergia.

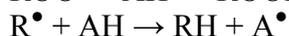
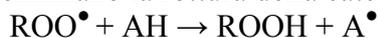
CHAIN BREACKING ANTIOXIDANTS

Appartengono a questa categoria i composti fenolici mono- o poli- idrossilati con diversi sostituenti sugli anelli aromatici, quali tocoferoli, tocotrienoli, flavonoidi, acidi ed alcoli fenolici e stilbeni.

Si distinguono due meccanismi principali; in particolare quello tipico dei tocoferoli e quello del β -carotene.

Tocoferoli

Nelle ossidazioni lipidiche, questi antiossidanti (AH) si comportano da donatori di H e determinano la rottura della catena di radicali, formando radicali più stabili (P. Capella et al., 1997)



Il tipo di protezione fornito corrisponde ad un rallentamento della fase di iniziazione, che quindi si prolunga (P. Capella et al., 1997).

In presenza di queste molecole, al momento dell'attacco del FA da parte di una sostanza ossidante, si determina una fase *lag* durante la quale il substrato non subisce l'ossidazione; tale fase termina con l'esaurimento dell'antiossidante. A questo punto, la perossidazione del FA prende avvio ed procede fino all'esaurimento del substrato, come accade in assenza di antiossidanti.

Il grafico della cinetica di reazione di un *chain breaking antioxidant* (ad esempio l' α -tocoferolo) è rappresentato in Figura 14.

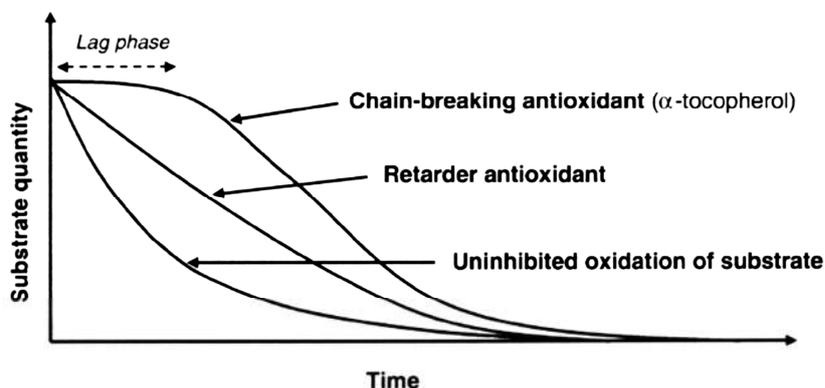
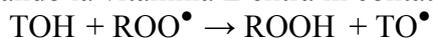


Figura 14. Azione dei chain breaking antioxidants sull'ossidazione lipidica.

La vitamina E (come α -tocoferolo) (TOH) è il più importante di questi composti nei lipidi plasmatici, essendo presente in concentrazioni almeno 15 volte superiori rispetto agli altri (Burton et al., 1983); essa, inoltre, è un indispensabile componente delle membrane cellulari. Quando la vitamina E entra in contatto con un radicale perossilico, la reazione

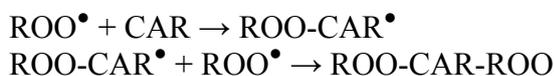


avviene con una velocità 10^4 volte superiore rispetto alla reazione di propagazione; di conseguenza, quantità relativamente piccole di vitamina E sono sufficienti per un'efficace azione antiossidante.

Il tocoferil radicale (TO^\bullet) può essere nuovamente ridotto ad α -tocoferolo ad opera di agenti riducenti intracellulari come ascorbato, glutatione e diidrolipoato (Packer and Kagan, 1993).

β -carotene

Sebbene il trasferimento dell'H al ROO^\bullet , questa molecola ostacola la cascata ossidativa attraverso la formazione di un complesso con il radicale, con produzione di un composto non radicalico che rappresenta il termine della reazione a catena; si presentano di seguito le reazioni di tale processo:



PREVENTIVE ANTIOXIDANTS

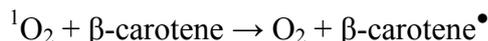
Questo gruppo comprende gli antiossidanti che influiscono sulla velocità di iniziazione e controllano la fonte di produzione dei radicali liberi prima della fase di propagazione (Capella, 1997). Data l'ampia gamma di fattori di iniziazione esistenti, i *preventive antioxidants* hanno diversi meccanismi di azione, tra cui la chelazione dei metalli presenti in tracce, l'inattivazione dell'ossigeno singoletto e la detossificazione dai ROS) operata da sistemi enzimatici antiossidanti endogeni (Laguerre et al., 2007). Al contrario di quanto visto per i *chain breaking antioxidant*, i *preventive antioxidants*, riducono il tasso di ossidazione senza generare una fase *lag* distinta.

Disattivatori dell'ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$)

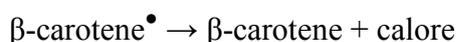
La specie chimica più importante di questa categoria è rappresentata dai carotenoidi, le molecole più efficienti nella disattivazione dell' $^1\text{O}_2$.

Sono note circa 600 strutture di carotenoidi naturali, molte delle quali C40; ve ne sono di semplici, come quelle dei caroteni (licopene, β -carotene) o contenenti gruppi funzionali ossigenati, come le xantofille (astaxantina, luteina). I meccanismi d'azione antiossidanti dei carotenoidi si manifestano attraverso diversi, ma complementari, meccanismi di azione. Ad esempio, queste molecole sono in grado di inattivare (*quenching*) sia radicali liberi che l' $^1\text{O}_2$.

Prendendo in considerazione quest'ultimo meccanismo di azione, si può scrivere la seguente reazione:



Dunque, l'ossigeno singoletto $^1\text{O}_2$ viene trasformato in ossigeno molecolare (O_2) e l'energia dell'antiossidante allo stato eccitato ($\beta\text{-carotene}^\bullet$) è dissipata per interazione con il solvente o con l'ambiente in cui opera, secondo la reazione seguente:



Dissipato l'eccesso di energia, il β -carotene rigenerato è pronto per un altro ciclo di inattivazione dell' $^1\text{O}_2$. Una molecola di carotenoide può estinguere circa 1000 molecole di $^1\text{O}_2$ prima di essere degradata.

Infine, è utile segnalare che anche i tocoferoli e i tioli possono agire da *quencher*s dei confronti dell' $^1\text{O}_2$, contribuendo a proteggere i sistemi biologici dai danni ossidativi.

Detossificatori di ROS

Questo processo avviene principalmente mediante alcuni sistemi enzimatici antiossidanti endogeni delle cellule eucariote, tra cui la superossido dismutasi (SOD), la glutatione perossidasi (GSH – Px) e la catalasi (CAT)

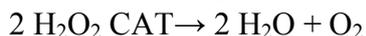
La SOD catalizza la dismutazione dell'anione superossido($^2\text{O}_2^{\bullet-}$) in H_2O_2 e O_2 , secondo la seguente reazione;



La GSH – Px ha attività detossificante nei confronti di H_2O_2 , idroperossidi perossinitriti; in particolare, questo enzima accelera l'ossidazione del glutatione (GSH) da parte del H_2O_2 , che è a sua volta ad H_2O , come descritto di seguito:



La CAT ha come unico substrato H_2O_2 , il quale è ridotto in acqua e ossigeno molecolare, come mostrato nella sottostante reazione:



Anche l'ascorbato, considerato il più importante antiossidante nei liquidi cellulari, rimuove efficacemente i ROS (Sies et al., 1992), intercettando efficacemente le sostanze ossidanti nella fase acquosa prima che queste possano attaccare i FA. Tale molecola, può anche rigenerare la vitamina E, riducendo il TO^{\bullet} a TOH. Tuttavia, l'ascorbato è in grado di ridurre il Fe ferrico ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) e il Cu rameico ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$), aumentando in tal modo l'attività proossidante di questi

metalli e generando $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^{\bullet} (Buettner et al., 1996). Per questo motivo, l'ascorbato si comporta tanto da proossidante, quanto da antiossidante; in particolare l'azione proossidante prevale a basse concentrazioni e quella antiossidante ad alte concentrazioni (Buettner et al., 1996).

Oltre a quanto esposto occorre sottolineare che anche luteina, ed altri carotenoidi, ubichinolo, tioli ed acido urico, sono capaci di interrompere le reazioni a catena indotte dai radicali liberi (Stocker et al., 1991). Inoltre, nel muscolo sono presenti alcune proteine di stoccaggio e trasporto, quali transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, metallotioneine e carnosina (Thurnham, 1990; Chan and Decker, 1994), che sequestrano i metalli di transizione in forme chimiche nelle quali non possono più catalizzare la conversione di $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 nel molto più pericoloso OH^{\bullet} (Halliwell, 1995). Infine, anche il retinolo svolge un ruolo importante mantenendo l'integrità tissutale e limitando il rilascio di ferro libero, altamente catalitico.

SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è verificare come l'integrazione della dieta con semi di lino estrusi influisca sulla stabilità ossidativa, e di conseguenza sulla *shelf life*, della carne di vitelloni maremmani conservata in ambiente refrigerato.

La sperimentazione origina da una riflessione sulle caratteristiche qualitative della carne bovina in relazione al rapporto tra acidi grassi saturi (SFA) e insaturi (MUFA, PUFA), e tra gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) $\omega 6$ e $\omega 3$.

La carne dei bovini di razza Maremmana presenta di per sé caratteristiche dietetiche mediamente più favorevoli rispetto ad altre razze bovine (Tabella 8), dovute tanto al tipo genetico quanto alla tradizionale forma di allevamento al pascolo, che comporta notevole attività fisica e alimentazione a base di erba ed essenze della macchia mediterranea. Al di là dell'innegabile legame con il territorio della Maremma, l'allevamento di tale antica razza, che pure è in recupero rispetto al passato (Tabella 7), dovrebbe essere incoraggiato facendo leva anche sulle potenzialità del prodotto finale come alimento funzionale. A tal proposito, si ritengono oltremodo utili gli studi finalizzati al miglioramento della frazione lipidica della carne bovina Maremmana verso un incremento del già apprezzabile contenuto in PUFA $\omega 3$ e verso un'ulteriore riduzione del rapporto PUFA $\omega 6/\omega 3$. Tuttavia, l'arricchimento in tali acidi grassi, bersaglio degli iniziatori del processo ossidativo a cascata, potrebbe agire negativamente sulla *shelf life* della carne, anche in funzione del grado di protezione antiossidante presente nella carne al momento della macellazione.

Per questo motivo venti vitelloni di razza Maremmana, metà maschi castrati e metà femmine, suddivisi in due gruppi omogenei, sono stati allevati secondo il tradizionale sistema al pascolo con integrazione o meno di lino estruso nel mangime durante la fase di finissaggio, al fine di promuovere un incremento significativo del contenuto di $\omega 3$ nel grasso intramuscolare.

Questo modello sperimentale è stato utilizzato per valutare la stabilità della carne nei confronti dei fenomeni ossidativi a tre tempi di conservazione in frigorifero (4 – 6°C): 0, 2 e 6 giorni (T0, T2, T6, rispettivamente).

MATERIALI E METODI

DESCRIZIONE DEL PIANO SPERIMENTALE

Il presente lavoro di tesi aveva come obiettivo la valutazione della *shelf life* della carne di bovini Maremmani, allevati mediante processi produttivi innovativi finalizzati al miglioramento della composizione acidica del grasso intramuscolare..

La sperimentazione è stata svolta presso l'allevamento di bovini di razza Maremmana della Comunità Montana delle Colline Metallifere (GR). Ad un'età di 6-8 mesi, dopo lo svezzamento, 20 vitelli (10 maschi e 10 femmine) di razza Maremmana sono stati assegnati a due gruppi sperimentali; segnatamente, gruppo di controllo e gruppo sperimentale. Tutti i vitelli maschi sono stati preventivamente castrati secondo le norme previste dal Reg. (CE) 834/07 per le produzioni biologiche. Per i primi tre mesi, gli animali dei due gruppi sono stati alimentati con una dieta a base di fieno e un mangime concentrato contenente granelle di cereali e favino; le quantità di alimenti, commisurate ai fabbisogni della razza, sono state determinate in modo tale da consentire un accrescimento giornaliero di circa 1 kg. Si noti che gli animali sono stati allevati ed alimentati nel rispetto della normativa vigente in materia di agricoltura biologica (Reg. (CE) 834/07 e Reg. (CE) 889/08).

A partire dall'inizio della primavera, ai vitelli di 9-11 mesi è stato garantito l'accesso continuo e regolare al pascolo per l'intero periodo di disponibilità dell'erba, cioè fino alla fine di giugno. In questa fase, la razione degli animali era basata quasi esclusivamente sul pascolo, la cui offerta è stata razionata per mezzo di recinzioni elettrificate. Nel periodo era comunque prevista una minima integrazione di mangime concentrato, simile a quello utilizzato nella prima fase di allevamento.

Nella stagione estiva, gli animali hanno continuato ad avere accesso al pascolo; tuttavia, data la scarsità di erba, la razione era basata su fieni e su mangime concentrato in ragione di 3 kg/capo/die (Figure 15 e 16).



Figura 15. Distribuzione del mangime agli animali in allevamento.



Figura 16. Animali in allevamento. Particolare dei recinti.

In questa fase la composizione del mangime è stata diversificata sulla base dello scopo della sperimentazione; in particolare, il mangime del gruppo sperimentale conteneva semi di lino in ragione del 20% della sostanza secca (ss), mentre al gruppo di controllo è stato fornito un mangime identico a quello precedentemente descritto. In tal modo si è voluto verificare la possibilità di mantenere elevati livelli di omega-3 nella carne anche in assenza di un adeguato apporto di erba fresca.

A 16-18 mesi di età, i 20 vitelloni sono stati avviati ad una fase di finissaggio di 3 mesi, durante la quale è continuata l'alimentazione differenziata tra i gruppi. In particolare, il gruppo sperimentale ha continuato a ricevere il mangime contenente semi di lino in quantità tale da garantire ad ogni soggetto l'assunzione 1 kg di semi di lino al giorno; invece, al gruppo di controllo è stato somministrato un mangime senza alcuna integrazione lipidica. Nel complesso le due razioni risultavano isoproteiche ed isoenergetiche. In quest'ultima fase di allevamento, tutti i vitelloni sono stati mantenuti in condizioni di stabulazione conformi a quanto previsto dalla normativa in materia di agricoltura biologica (Reg. (CE) 834/07 e Reg. (CE) 889/08), senza accesso regolare e continuo al pascolo.

Raggiunti i 550 kg, gli animali di età compresa tra i 18 e i 22 mesi sono stati avviati al macello della Tirrenia Carni S. r. l. a San Vincenzo (LI), dove si sono svolte le operazioni di macellazione, frollatura (15 giorni) e sezionamento (Figura 17).



Figura 17. Uno dei tagli destinati alle analisi di laboratorio, con il relativo numero identificativo.

Dai tagli primari, è stato prelevato il muscolo *Longissimus dorsi* (Figura 18), su quale sono state eseguite le analisi volte allo studio della stabilità ossidativa della frazione lipidica di tale carne. Al momento del campionamento, il muscolo, suddiviso in tre parti (Figura 14) è stato immerso in azoto liquido, per prevenire l'instaurarsi di processi di ossidazione durante il trasporto in laboratorio, e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi.

Al fine di valutare la *shelf life* della carne, sono stati previsti tre livelli di ossidazione; in particolare, 0 giorni (T0), 2 giorni (T2) e 6 giorni (T6). Il giorno di inizio delle analisi e della prova di stabilità ossidativa, la porzione distale del *Longissimus dorsi* è stata suddivisa in tre sottocampioni (Figura 18), destinati ai diversi periodi di conservazione (T0, T2, T6) stabiliti allo scopo di evidenziare la progressione dei fenomeni ossidativi ed i conseguenti cambiamenti a livello chimico e nutrizionale prodotti dalla conservazione in frigorifero domestico ($4 - 6^{\circ}\text{C}$).

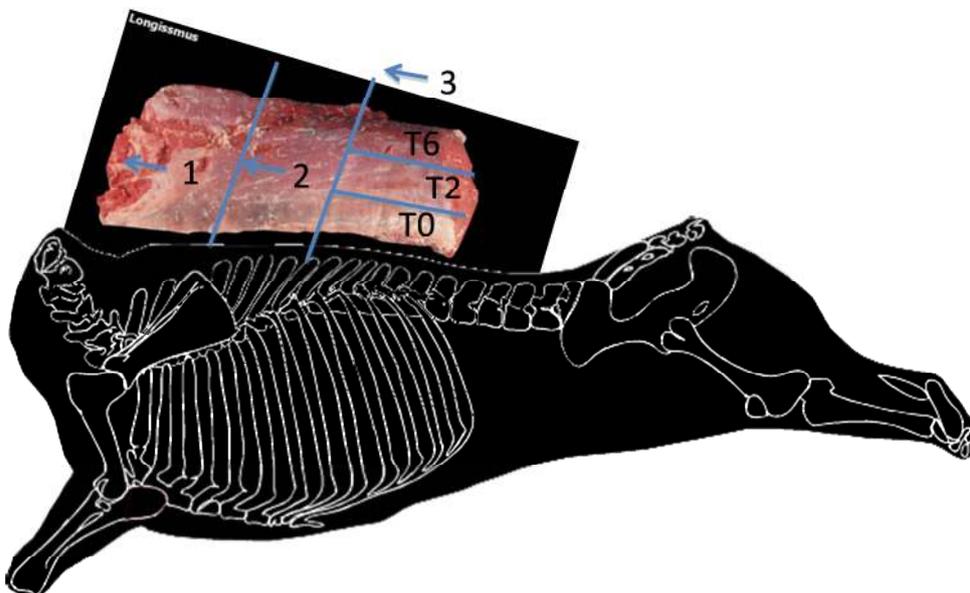


Figura 18. Posizionamento del *Longissimus dorsi* nella mezzena e schema del campionamento, dove si evidenziano i sottocampioni destinati ai diversi periodi di conservazione (T0, T2, T6).

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Essendo stati conservati a -80°C , lo scongelamento dei campioni è stato effettuato in modo graduale, con un primo passaggio a -20°C e quindi a 4°C .

Ciascun sottocampione è stato preparato secondo il medesimo protocollo. In particolare, la porzione di carne è stata innanzitutto ridotta in piccoli pezzi con un coltello (Figura 19, immagini 1 e 2), i quali sono stati macinati con un tritatutto elettrico (Figura 19, immagine 3); una volta preparati, i medaglioni di carne macinata spessi 2 cm (Figura 19, immagine 4) sono stati disposti in vaschette in PET per alimenti, preventivamente numerate con l'identificativo del campione e la sigla del periodo di trattamento (T0, T2, T6), e avvolti con pellicola alimentare in PE (Figura 19, immagine 5).

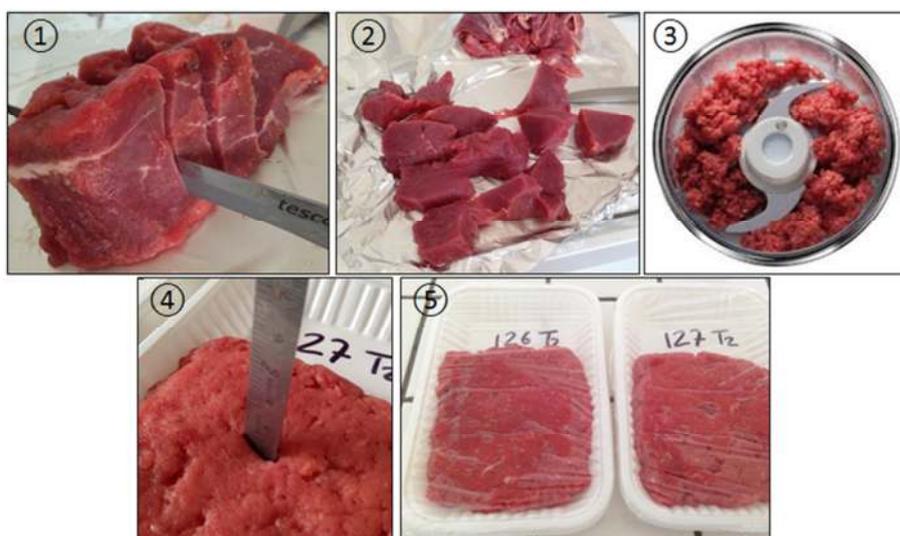


Figura 19. Sequenza delle operazioni di preparazione del campione destinato all'analisi. ①, ②: taglio del sottocampione e riduzione in piccoli pezzi. ③: macinatura con tritatutto. ④: preparazione dei medaglioni spessi 2 cm. ⑤: confezionamento in vaschette di PET avvolte con pellicola alimentare in PE da riporre in un comune frigorifero domestico per la conservazione a $4 - -6^{\circ}\text{C}$.

I campioni del T0 sono stati immediatamente avviati al laboratorio, mentre le altre vaschette (T2 e T6) sono state collocate su due diversi ripiani di un comune frigorifero domestico e conservate a $4 - -6^{\circ}\text{C}$ per 2 (T2) e 6 giorni (T6).

FASE SPERIMENTALE

I campioni T0 sono stati analizzati subito dopo la preparazione, mentre le vaschette di PET contenenti i T2 e i T6, avvolti con pellicola alimentare in PE, sono state prelevate dopo 2 e 6 giorni, rispettivamente, di conservazione in un comune frigorifero domestico (4 - 6°C).

ESTRAZIONE DEI LIPIDI TOTALI

I lipidi totali sono stati determinati in accordo con Folch et al. (1957), che si descrive di seguito in modo schematico secondo la sequenza operativa.

1. Macinare opportunamente il campione; pesarne 25 g con la bilancia tecnica e porlo in una bottiglia *Sovirel* con tappo a vite da 500 mL.
2. Aggiungere in bottiglia 200 mL di una soluzione cloroformio:metanolo = 1 :1 (V/V); a tale scopo, in genere si calcolano 8 mL di soluzione per ogni grammo di campione, evitando in ogni caso di scendere al di sotto dei 30 mL.
3. Omogeneizzare con omogeneizzatore (Ultra-Turrax®) per 3 minuti.
4. Porre la bottiglia in stufa a 60°C per 20 minuti; trascorsi i primi 10 min, fare sfiatare il solvente evaporato svitando di poco il tappo.
5. Una volta raffreddato il campione, aggiungere alla bottiglia 100 mL di cloroformio ed omogeneizzare nuovamente per 2 minuti.
6. Filtrare il contenuto della bottiglia in un'altra bottiglia e aggiungere 100 mL di una soluzione acquosa di KCl 1 M; agitare vigorosamente e riporre la bottiglia in frigo, dove deve sostare per tutta la notte.
7. Il mattino successivo, trasferire il contenuto della bottiglia in un imbuto separatore, attendere che le due fasi si separino e raccogliere la fase organica (sottostante) in una beuta da 500 mL con collo a smeriglio con 2 cucchiaini di sodio solfato anidro; agitare e porre in frigo per due ore.
8. Usando carta da filtro, filtrare il tutto attraverso sodio solfato anidro (una spatola) in un pallone tarato e portare a secchezza mediante evaporatore rotante.
9. Tenere il pallone per qualche ora in un essiccatore sottovuoto e, infine, riprendere il campione con una miscela di esano: isopropanolo = 4:1 (V/V).

DETRMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE ACIDICA

La determinazione della composizione acidica è stata effettuata dopo trans-esterificazione base catalizzata a freddo con metilato sodico in soluzione metanolica 0.5N (Christie, 1982). La trans-esterificazione è stata effettuata sui lipidi totali (LT) estratti con il metodo Folch et al. (1957). Si descrive in modo schematico la fase operativa.

1. Aggiungere ai campioni 1 mL di agente metilante ed agitare vigorosamente con un agitatore a vibrazione vortex e attendere 15 min.
2. Estrarre gli esteri metilici degli acidi grassi con 0.5 mL di esano contenente gli standard interni (esteri metilici del C9:0 e C19:0).
3. Iniettare 1 µL di esteri metilici degli acidi grassi ottenuti come sopra riportato in un gascromatografo dotato di rilevatore ad ionizzazione di fiamma (FID) e di una colonna capillare altamente polare di 100m di lunghezza, 0.25mm di diametro interno e di 0.25µm di spessore della fase stazionaria. La determinazione della composizione in acidi grassi è stata effettuata in temperatura programmata (Tabella 17). La temperatura dell'iniettore era di 270 °C, mentre quella del rilevatore di 300 °C; il gas di trasporto utilizzato era He ad un flusso di 250 kPa misurato in testa alla colonna e l'iniezione, in modalità split, è avvenuta a pressione costante; il rapporto di splittaggio era fissato in 1/80.

Tabella 16. Temperatura programmata utilizzata per la determinazione della composizione in acidi grassi.

<i>Stadio</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo isoterma (min)</i>	<i>Gradiente (°C/min)</i>
1	150	4	2
2	180	18	2
3	200	1	5
4	240	4	

SOSTANZE REATTIVE ALL'ACIDO TIOBARBITURICO (TBARs)

Si riporta di seguito lo schema seguito per il protocollo relativo alla determinazione delle TBARs.

1. Omogeneizzare il grasso (3 g accuratamente pesati) in una soluzione al 5% p/V di acido tricloroacetico (TCA) in acqua e centrifugare a 5.000 giri/min per 40 min a 6°C.
2. Prelevare il surnatante, filtrarlo e farlo reagire a bagnomaria a 93°C per 20 min con una soluzione di TBA 40mM, attendendo lo sviluppo della reazione colorimetrica.
3. Attendere il raffreddamento del campione ed eseguire la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 525 nm.

La quantificazione della malonaldeide (MDA) è stata effettuata inserendo il dato relativo alla lettura in un'equazione di regressione ottenuta con cinque soluzioni standard di MDA ad altrettante diluizioni. Il dato è stato espresso in mg di MDA/kg di carne (tal quale, TQ).

COMPOSIZIONE IN ACIDI GRASSI LIBERI (FFA)

La composizione in acidi grassi liberi è stata determinata dopo aver solubilizzato i campioni di LT con una miscela di cloroformio : metanolo = 2 : 1. Gli acidi grassi non esterificati (FFA) sono stati separati dalla frazione esterificata mediante estrazione in fase solida (SPE) utilizzando colonnine con fase amino propilica (NH₂) (Kaluzny et al., 1995). Il sistema di eluenti utilizzato per allontanare i lipidi neutri è stato cloroformio: isopropanolo = 2 : 1; invece, gli FFA sono stati separati usando come eluente una soluzione al 2% di acido acetico in etere dietilico. Gli FFA così separati sono stati esterificati, dopo l'aggiunta C19:0 non metilato come standard interno, utilizzando una soluzione al 10% di trimetilsilildiazometano (TMSCHN₂) in esano, che conferisce alla soluzione una colorazione gialla. Dopo aver agitato e lasciato il campione in sosta per far avvenire la reazione, il TMSCHN₂ in eccesso è stato eliminato aggiungendo acido acetico goccia a goccia fino alla scomparsa della colorazione gialla. Quindi, sono stati addizionati H₂O ed etere di petrolio al fine di ottenere la separazione delle fasi. La fase superiore, prelevata con una pipetta *pasteur* è stata poi filtrata e portata a secco in corrente d'azoto. Il campione è stato poi nuovamente disciolto in esano ed iniettato nel gascromatografo. L'iniezione è stata effettuata a split chiuso, che è stato mantenuto in tali condizioni per i primi due minuti di corsa, quindi le condizioni operative hanno ricalcato quelle utilizzate per la determinazione della composizione acidica totale (Tabella 15).

COLESTEROLO TOTALE, PRODOTTI DI OSSIDAZIONE DEL COLESTEROLO (COPs), VITAMINA A E CAROTENOIDI

Sono stati preparati due campioni, uno per la determinazione di colesterolo, vitamina A e carotenoidi e l'altro per la determinazione dei COPs. Gli standard interni usati sono diidrossicolesterolo, per il colesterolo, 19-idrossicolesterolo, per i COPs, retinolo, per la vitamina A, e apocarotenal, per i carotenoidi. Aggiunti gli standard interni il campione di LT accuratamente

pesato è stato sottoposto a saponificazione a freddo utilizzando KOH in soluzione metanolica 1N. La saponificazione (Hulstiof et al., 2006) è stata fatta direttamente sui LT; i campioni, accuratamente pesati, sono stati mantenuti nella soluzione saponificante e in agitazione per tutta la notte in provette protette dalla luce, al fine di limitare i processi di fotoossidazione. La mattina successiva il campione è stato sottoposto a 3 lavaggi successivi; in particolare, un primo lavaggio con acqua, per eliminare i saponi degli acidi grassi, e due lavaggi con etere, per raccogliere l'insaponificabile. Quest'ultima frazione veniva poi riunita in pallone tarato, portata a secchezza con evaporatore rotante e nuovamente pesata. Infine, la frazione insaponificabile è stata solubilizzata in 3 mL di esano : isopropanolo = 4 : 1 (V/V).

Per quanto riguarda il campione destinato alla determinazione dei COPs, per eliminare il colesterolo in eccesso, una parte della frazione insaponificabile è stata sottoposta a separazione in fase solida utilizzando colonnine SPE-NH₂.

Prima di effettuare la separazione il campione è stato parzialmente portato a secco in corrente d'azoto e caricato sulla colonnina previa condizionamento con 3 mL di esano. L'eluizione con tre diverse soluzioni eluenti a polarità crescente ha permesso di ottenere tre frazioni; in particolare, la prima frazione, eluita con esano : etilacetato = 95 : 5 V/V, è scartata, la seconda, eluita con esano : etilacetato = 9 : 1 V/V, costituisce i fitosteroli, e la terza, eluita con acetone rappresenta i COPs.

La parte di insaponificabile privata del colesterolo e la parte dell'insaponificabile non sottoposta ad SPE, sono state portate a secco sotto flusso d'azoto e sono state poi silanizzate utilizzando una miscela di piridina : esametildisilazano : trimeticlorosilano = 5 : 2 : 1 V/V/V. Il campione è stato nuovamente portato a secco e poi ripreso con 300 µL di esano.

La separazione e la quantificazione dei COPs, del colesterolo sono state ottenute con due corse successive, iniettando i campioni derivatizzati in un GC equipaggiato con una colonna capillare apolare di 25 m di lunghezza di 0.25 mm di diametro e di 0.25 µm di spessore della fase stazionaria, tramite confronto con i picchi cromatografici dei rispettivi SI. Le determinazioni del colesterolo e dei COPs sono state effettuate in temperatura programmata (Tabella 18).

Tabella 17. Temperatura programmata utilizzata per la determinazione del contenuto in colesterolo e in COPs.

<i>Stadio</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo isoterma (min)</i>	<i>Gradiente (°C/min)</i>
1	250	0	1
2	270	0	10
3	350		

La determinazione della vitamina A e dei carotenoidi è stata effettuata tramite HPLC UV-DAD alle seguenti condizioni: soluzione A, metanolo : acetonitrile : H₂O = 10 : 170 : 20 e soluzione B, metanolo : etilacetato = 70 : 30. È stata usata una Colonna C18 in fase inversa. Le letture UV-DAD sono a 325 nm per il retinolo e a 450 nm per carotenoidi, xantofille e apocarotenal.

ANALISI STATISTICA

I dati sono stati elaborati con il programma Jump® (SAS), secondo il seguente modello lineare:

$$y_{ijz} = \mu + T_i + S_j + T_i \times S_j + A_z(T) + \varepsilon_{ijz}$$

dove,

y_{ijz} = FFA [g/100g LT; mg/100g TQ]; TBARs [mg malonaldeide/kg TQ]; Colesterolo [g/100g TL; mg/100g TQ]; COPs [µg/g TL; µg/100 g TQ]

μ = media

T_i = effetto dell' i -esimo trattamento (controllo, sperimentale)

S_j = effetto del j -esimo periodo di conservazione (0, 2, 6 giorni)

A_z = effetto random del z -esimo animale entro trattamento (da 1 a 20)

ε_{ijz} = effetto residuo

Le differenze fra le medie stimate sono state considerate significative per $P < 0,05$.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il presente lavoro aveva come obiettivo la valutazione del livello di ossidazione della carne di vitelloni Maremmani a seguito dell'incremento di PUFA ω 3 nella frazione lipidica. Il grasso intramuscolare della carne di Maremmana ha mostrato un maggior contenuto di UFA (circa il 36 g/100 g di lipidi totali) rispetto agli SFA (circa 25 g/100 di lipidi totali), a prescindere dal trattamento. Tra gli UFA, il contenuto di MUFA è risultato superiore a quello dei PUFA (25 vs. 8,7 g/100 g di lipidi totali). La composizione acidica della carne di maremmana ottenuta dalla prova sperimentale è in linea con quanto riportato in letteratura per la carne della medesima razza e per quella di razze italiane (Tabella 19), soprattutto in relazione alla ripartizione tra acidi grassi saturi (SFA) ed insaturi (MUFA, PUFA); tuttavia si notano importanti differenze quando si prende in considerazione la composizione della componente insatura. In particolare, la carne del gruppo sperimentale emerge per il rapporto PUFA ω 6/ ω 3 inferiore a 4, soglia consigliata dall'OMS (WHO, 2005). Da notare che il contenuto di acidi grassi polinsaturi è risultato particolarmente elevato sia nel gruppo sperimentale sia nel gruppo controllo, anche in confronto ai dati in letteratura riferibili al grasso intramuscolare di vitelloni ingrassati al pascolo. Luciano et al. (2011), infatti, hanno riportato valori di contenuto di PUFA nel grasso intramuscolare non superiori al 10% del totale degli acidi grassi, relativamente a femmine di Charolaise \times Limousine ingrassate su pascolo per circa 11 mesi prima della macellazione.

Tabella 18. Composizione acidica (g/100 g di acidi grassi totali) del grasso dei vitelloni del gruppo di controllo e dello sperimentale a confronto con quella di altri bovini di razza Maremmana, Chianina, Podolica, Marchigiana (Secchiari et al., 2011), Frisona, Piemontese, Limousin (Bruciapaglia et al., 2014)

Classi Acidi Grassi	Maremmana Controllo	Maremmana Sperimentale	Maremmana	Podolica	Chianina	Marchigiana	Frisona	Piemontese	Limousin
SFA	44,42	41,85	44,05	44,98	49,90	51,31	47,25	46,05	49,25
MUFA	28,99	32,00	34,84	36,36	36,25	33,40	42,08	32,08	35,68
PUFA	26,59	25,15	20,34	20,44	15,07	17,38	10,69	21,87	15,08
PUFA ω 6	22,71	19,26	17,38	17,57	13,80	15,63	9,81	20,59	14,06
PUFA ω 3	3,89	5,89	2,96	2,34	1,18	1,64	0,595	1,01	0,800
PUFA ω 6/ ω 3	5,84	3,27	6,01	6,74	12,95	10,38	16,35	20,39	17,58

La Tabella 20, inoltre, mette in evidenza il confronto tra la carne del gruppo controllo e la carne del gruppo sperimentale, per quanto riguarda la composizione in classi di acidi grassi. Dall'analisi dei risultati emerge che il gruppo Sperimentale è caratterizzato da un significativo maggior contenuto di PUFA ω 3 (1,298 vs. 2,414 g/100g di lipidi totali), con un incremento dell' 85%. Il maggior contenuto di PUFA ω 3 è giustificato dall'utilizzo dei semi di lino estruso nel gruppo Sperimentale, che è naturalmente ricco di acido α -linolenico, capostipite degli acidi grassi della serie ω 3. Questo effetto è in linea con precedenti lavori che hanno utilizzato il lino come integrazione alimentare dei ruminanti al fine di incrementare il contenuto di PUFA ω 3 (Jeronimo et al., 2009; Luciano et al., 2012; Nassu et al., 2011; Mele et al., 2013). L'incremento di PUFA ω 3 è in linea con Nassu et al. (2011) che ha rilevato un incremento del 100% su bovini di razza British.

Il rapporto UFA/SFA è risultato pari a 1,25 per il gruppo Controllo e 1,38 per il gruppo Sperimentale. Questa differenza non è stata statisticamente significativa, permettendo di concludere che la carne di entrambi i gruppi è al di sopra dello 0,4, che rappresenta il valore minimo suggerito

dai nutrizionisti (WHO, 2005), inoltre ha soddisfatto ampiamente il limite minimo richiesto per le carni dell'IGP "Vitellone Bianco dell'Appennino Centrale", che è pari a 1.

Le percentuali di PUFA del Trattato e del Controllo sono simili; tuttavia si rileva un diverso peso relativo degli acidi grassi $\omega 6$ e $\omega 3$. Infatti, nei campioni di carne del gruppo Trattato il contenuto di PUFA $\omega 6$ era pari al 6,6% e gli $\omega 3$ il 2,4 %, con un rapporto PUFA $\omega 6/\omega 3$ pari a 2,75; nel Controllo, invece, i PUFA $\omega 6$ erano il 7,5% e gli $\omega 3$ l'1,3 %, con un rapporto PUFA $\omega 6/\omega 3$ pari al 5,76%. E' evidente, pertanto, che la modifica dell'alimentazione ha determinato un miglioramento qualitativo del prodotto; infatti, la carne del Trattato aveva un rapporto PUFA $\omega 6/\omega 3$ più favorevole, tipico di animali allevati al pascolo e ben al di sotto del valore massimo di 4 consigliato dall'OMS.

Tabella 19. Composizione acidica (g/100g di lipidi totali) espressa come classi di acidi grassi.

Classi di acidi grassi	Gruppi		ES	P<F
	Controllo	Trattato		
SFA	26,313	24,931	1,074	0,374
UFA	32,953	34,481	0,989	0,289
PUFA	8,761	8,671	0,559	0,911
MUFA	24,505	26,265	1,115	0,279
PUFA $\omega 6$	7,482	6,642	0,489	0,241
PUFA $\omega 3$	1,298	2,414	0,101	<0.001

* Errore Standard

Legenda: SFA: acidi grassi saturi; UFA: acidi grassi insaturi; MUFA: acidi grassi monoinsaturi; PUFA: acidi grassi polinsaturi

OSSIDAZIONE DELLA CARNE

La Figura 20 mostra come si presentavano i T2 e i T6 al termine del periodo di conservazione previsto.



20. T2 e T6 dopo 2 e 6 giorni di conservazione, rispettivamente.

L'imbrunimento della carne è un effetto atteso del processo di ossidazione e si verifica comunemente dopo alcuni giorni di conservazione. Tuttavia, sulla base dei risultati ottenuti nella modificazione del profilo acidico del grasso intramuscolare dei vitelloni del gruppo trattato (Tabella 20), è sembrato opportuno studiare più nel dettaglio l'andamento del processo ossidativo dei lipidi intramuscolari nella carne dei due gruppi sperimentali. A tale scopo, sono state prese in considerazione la variazione di alcune sostanze antiossidanti naturalmente presenti nel grasso della carne e l'evoluzione dei prodotti primari e secondari dell'ossidazione dei lipidi.

VITAMINA A

I risultati relativi alla determinazione della vitamina A espressi sui lipidi totali (LT) e sul tal quale (TQ) sono riportati nei grafici in Figura 21 e 21, rispettivamente. Il contenuto di vitamina A della carne si attesta su circa 7 $\mu\text{g/g}$ di LT e 11 $\mu\text{g}/100\text{g}$ di TQ. Questi valori sono in accordo con Walshe et al. (2006), che ha rilevato 11,5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ di TQ in *Longissimus dorsi* di bovini, senza evidenziare differenze tra il sistema biologico e convenzionale.

Osservando il grafico in Figura 21, si nota che in 6 giorni si ha una riduzione del contenuto di vitamina A, raggiungendo valori praticamente prossimi allo zero. In particolare, la concentrazione media della vitamina A nei LT dei due gruppi passa da circa 7 mg/g LT al tempo 0 (T0) a circa 0,1 mg/g LT al tempo 6 (T6), con una riduzione del 98%. La diminuzione più consistente, tuttavia, si è verificata già dopo due giorni di conservazione, raggiungendo in entrambi i gruppi valori inferiori ad 1 mg/g LT. Non sono state rilevate differenze significative tra il gruppo di controllo e lo sperimentale per tutto il periodo di conservazione. Per questo motivo, si può concludere che il trattamento con lino non ha influito né sul contenuto né sull'ossidazione di vitamina A e che l'intensità del processo ossidativo è stata uguale nei due gruppi.

Se si osserva il grafico in Figura 22, riportante la quantità di vitamina A rispetto al TQ, si nota che anche in questo caso non vi sono differenze tra il gruppo di controllo e lo sperimentale. Tuttavia, al contrario del grafico in Figura 21, tale figura evidenzia differenze di significatività tra la carne al T2 e al T6. In particolare, nei due gruppi la concentrazione media di vitamina A si attesta su valori di poco inferiori a 11 $\mu\text{g}/100\text{gTQ}$ al T0, per ridursi drasticamente a circa 1,7 $\mu\text{g}/100\text{gTQ}$ al T2 e raggiungere gli 0,4 $\mu\text{g}/100\text{gTQ}$ al T6.

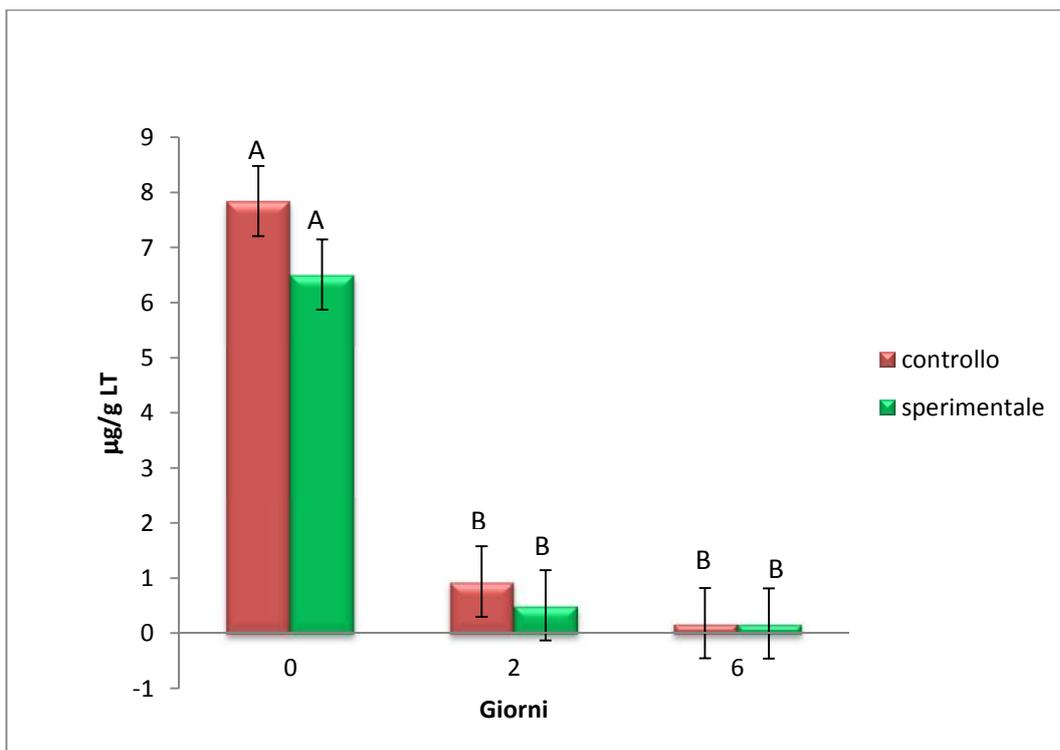


Figura 21. Quantità di vitamina A nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto ai lipidi totali (LT). Errore standard = 0,638. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere diverse per $P < 0,05$.

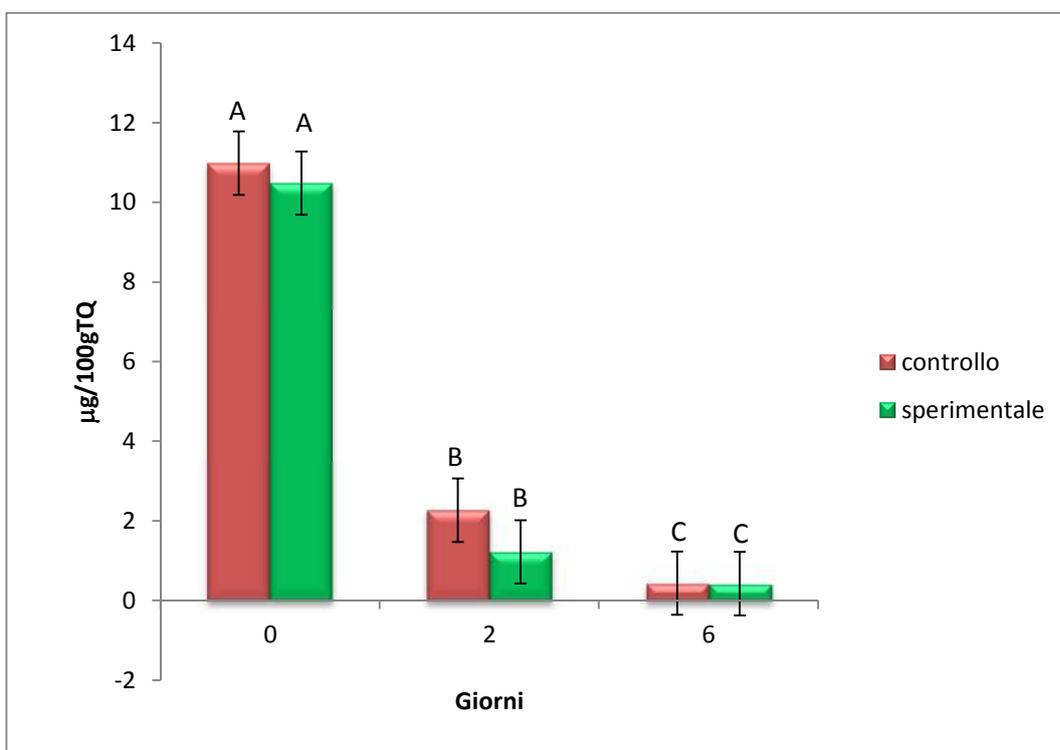


Figura 22. Quantità di vitamina A nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto al tal quale (TQ). Errore standard = 0,796. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere diverse per $P < 0,05$.

CAROTENOIDI

I risultati relativi alla determinazione dei carotenoidi espressi sui lipidi totali (LT) e sul tal quale (TQ) sono riportati nei grafici in Figura 23 e 24, rispettivamente. Il contenuto di carotenoidi della carne si attesta intorno a 4,8 $\mu\text{g/g}$ di LT e 7 $\mu\text{g}/100\text{g}$ di TQ. Da un confronto con il lavoro di Walshe et al. (2006), i valori del presente lavoro sono inferiori a quelli di bovini di differenti razze allevati in ambienti dove la disponibilità di pascolo è più elevata. Questo aspetto mette in evidenza che gli animali interessati dalla sperimentazione, pur avendo trascorso un lungo periodo al pascolo, non hanno accumulato un livello di carotenoidi paragonabile a quello riscontrato in animali ingrassati al pascolo. Sembra pertanto che l'effetto pascolo sul contenuto di carotenoidi del grasso intramuscolare si perda nel corso dei mesi di finissaggio in *feedlot*.

Osservando il grafico in Figura 23, si nota che in 6 giorni si è verificata una graduale riduzione del contenuto di carotenoidi, arrivando praticamente a zero nei LT e a circa 1 $\mu\text{g}/100\text{g}$ sul TQ, senza differenze statisticamente significative tra il gruppo sperimentale e quello di controllo.

In particolare, la concentrazione media dei carotenoidi nei LT dei due gruppi passa dai 4,8 $\mu\text{g/g}$ LT del T0, ai 3,9 $\mu\text{g/g}$ LT del T2, per finire con gli 0,5 $\mu\text{g/g}$ LT del T6, con una riduzione del 90%. Data la mancanza di differenze significative tra il gruppo di controllo e lo sperimentale tanto nel livello di partenza, quanto nella concentrazione a seguito del periodo di conservazione, si può concludere che il trattamento con lino non ha influito né sul contenuto né sull'ossidazione dei carotenoidi. Si può inoltre affermare che l'intensità del processo ossidativo è stata uguale nei due gruppi. Tuttavia, il maggiore effetto sui livelli di carotenoidi nei LT, si osserva dopo due giorni, con una riduzione media nei due gruppi del 59% tra il T0 e il T2; successivamente, il contenuto di carotenoidi continua significativamente a decrescere, anche se in modo meno repentino, con un decremento del 31% tra il T2 e il T6. Pertanto, si evince che la suscettibilità all'ossidazione dei carotenoidi è inferiore a quella della vitamina A, a conferma della maggiore instabilità di quest'ultima rispetto ai carotenoidi.

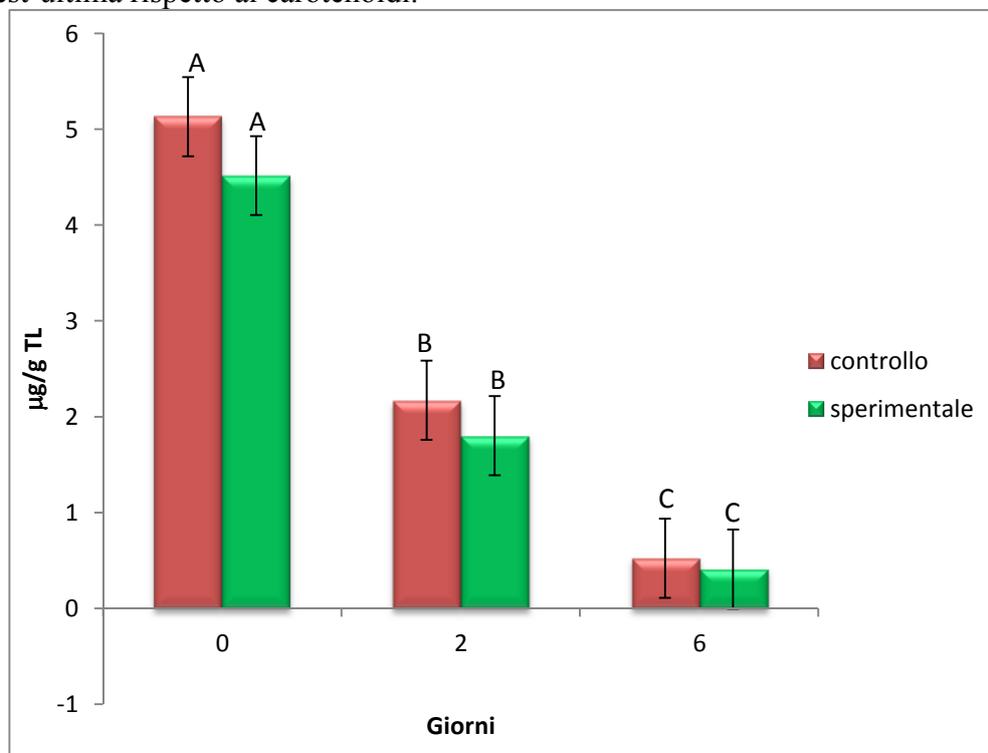


Figura 23. Quantità di carotenoidi nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto ai lipidi totali (LT). Errore

standard = 0,413. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere diverse per $P < 0,05$.

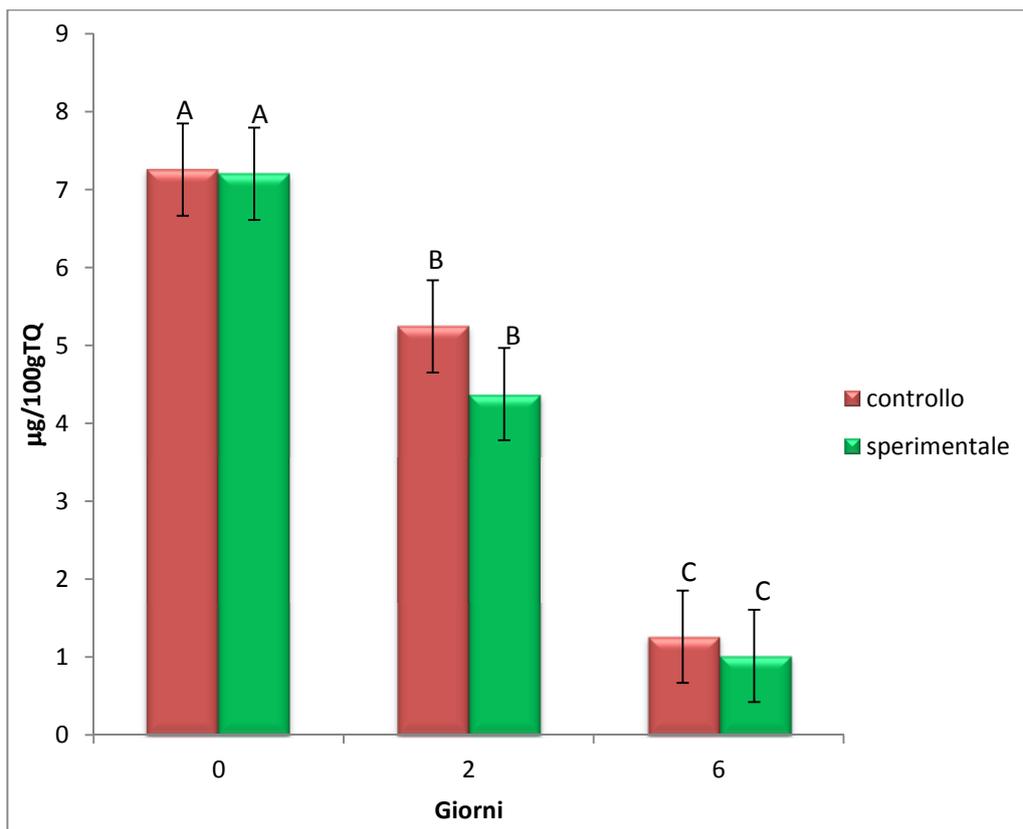


Figura 24. Quantità di carotenoidi nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto al tal quale (TQ). Errore

standard = 0,592. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere diverse per $P < 0,05$.

ACIDI GRASSI LIBERI (FFA)

La misura dell'acidità libera consente di rilevare il primo stadio di degradazione della frazione lipidica. Infatti, gli acidi grassi presenti nel tessuto adiposo della carne sono esterificati a formare varie tipologie di molecole, quali trigliceridi, fosfolipidi e esteri del colesterolo. Durante la conservazione, tali molecole possono andare incontro ad idrolisi per intervento di vari enzimi lipolitici (lipoprotein-lipasi, lipasi ormone-sensibili, fosfolipasi A), liberando acidi grassi (FFA). Gli acidi grassi liberi sono rapidamente interessati dai fenomeni responsabili dell'iniziazione della catena ossidativa, pertanto un'alta concentrazione iniziale (nel presente lavoro di tesi, T0) di tali molecole suggerisce una predisposizione dei lipidi intramuscolari all'ossidazione; oltre a ciò, l'osservazione di un incremento di concentrazione di FFA dopo un periodo di conservazione (nel presente lavoro di tesi, T2 e T6) indica che il prodotto è stato oggetto di ossidazione. A tal proposito, si ricorda che l'ossidazione degli acidi grassi favorisce lo sviluppo di molecole responsabili di odori sgradevoli, pregiudicando la qualità della carne.

Nel presente lavoro è stato determinato il contenuto di FFA al T0, T2 e T6, al fine di valutarne l'andamento durante il periodo di conservazione.

Le Figure 25 e 26 riportano l'andamento degli acidi grassi liberi espressi sui LT e sul TQ rispettivamente. Come si può notare in entrambe le figure, gli acidi grassi liberi aumentano in maniera significativa durante il periodo di conservazione. Nei sei giorni di prova, il livello di acidi grassi liberi è incrementato di circa 4 volte in entrambi i gruppi; questo incremento è stato significativamente percepibile già dopo due giorni. È interessante rilevare che nei primi due giorni l'andamento dell'idrolisi è stato praticamente identico per entrambi i gruppi, mentre a 6 giorni il gruppo controllo ha mostrato un significativo incremento rispetto al gruppo sperimentale.

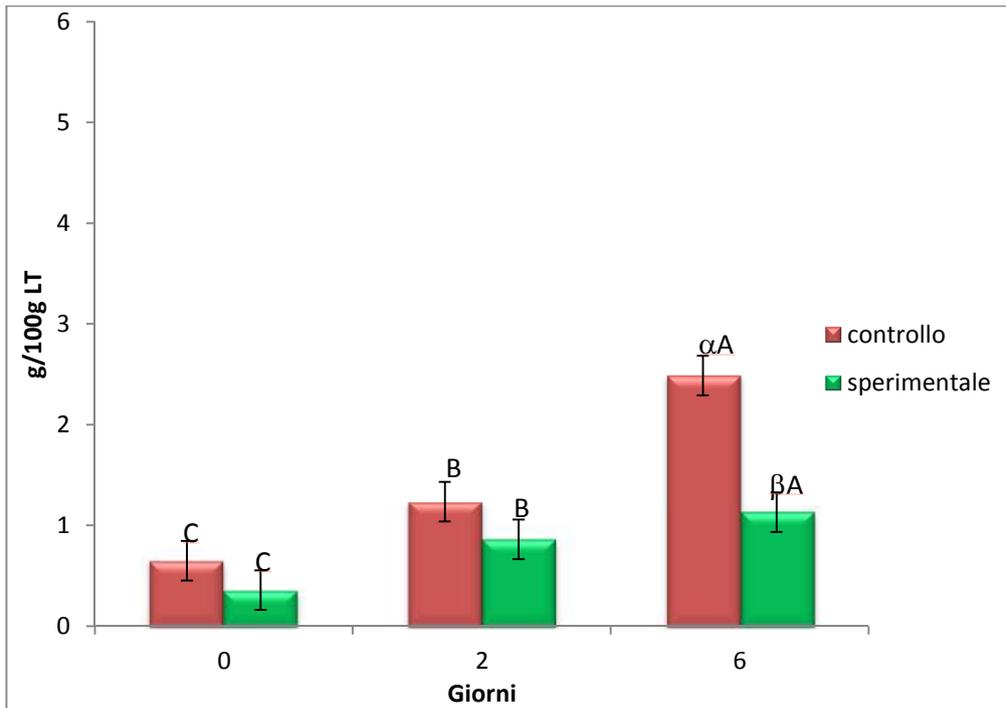


Figura 25. Quantità di acidi grassi liberi nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto ai lipidi totali (LT). Errore standard = 0,196. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere greche per trattamento (controllo sperimentale); lettere diverse per $P < 0,05$.

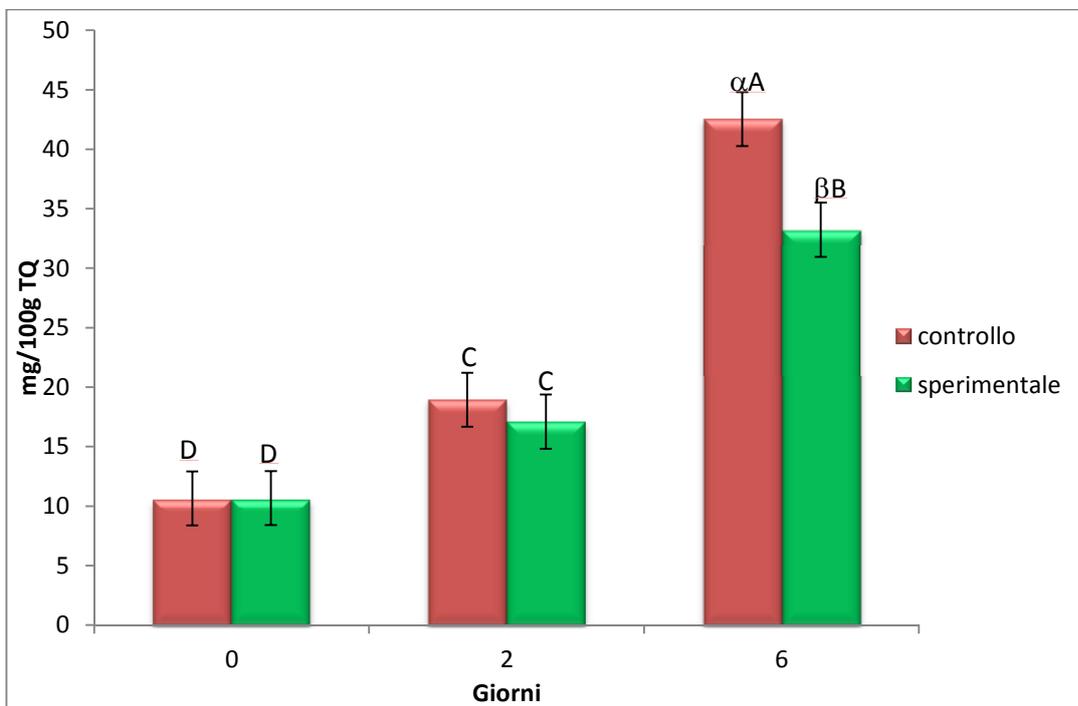


Figura 26. Quantità di acidi grassi liberi nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto al tal quale (TQ). Errore standard = 2,273. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere greche per trattamento (controllo sperimentale); lettere diverse per $P < 0,05$.

MALONILDIALDEIDE – SOSTANZE REATTIVE ALL'ACIDO TIOBARBITURICO (TBARs)

La perossidazione dei FFA porta alla formazione di prodotti primari (dieni coniugati e perossidi) e secondari (TBARs), importanti indicatori del livello di avanzamento dell'ossidazione delle suddette molecole. Nel presente lavoro sono state prese in considerazione le TBARs, che rappresentano il prodotto finale di questo complesso processo biochimico. La Figura 27 riporta i risultati espressi sul TQ nel periodo di conservazione. Come si può notare, già dopo due giorni di conservazione la carne del gruppo sperimentale presenta valori significativamente più alti rispetto al gruppo controllo, la cui carne, non mostrando variazioni statisticamente differenti, si rivela più stabile nei confronti dell'ossidazione lipidica. Questa stabilità garantisce alla carne del gruppo controllo di essere conservata per un più lungo periodo di tempo, senza pregiudicare le caratteristiche organolettiche. Questo dato è in linea con quanto rilevato da Luciano et al. (2013) su carne di agnelli alimentati con semi di lino.

Il gruppo controllo ha mostrato livelli di TBARs più bassi del gruppo sperimentale, nonostante il livello di acidi grassi liberi fosse significativamente più alto (Figura 27). Questo aspetto è dovuto al minor contenuto di PUFA ω -3, infatti questi acidi grassi sono quelli più suscettibili all'ossidazione. Essendo la carne del gruppo sperimentale più ricca di PUFA ω 3 (Tabella 20) è giustificato il maggior livello di TBARs. Rapportando il contenuto dei TBARs al livello di PUFA ω 3 si nota che non ci sono differenze significative tra i due gruppi (Figura 28). Tale risultato sta ad indicare che la carne del gruppo sperimentale presenta un livello di TBARs più alto perché è più ricca di PUFA ω -3 e non perché il processo di ossidazione sia più spinto. Il tasso di ossidazione degli acidi grassi di entrambi i gruppi è, pertanto, simile.

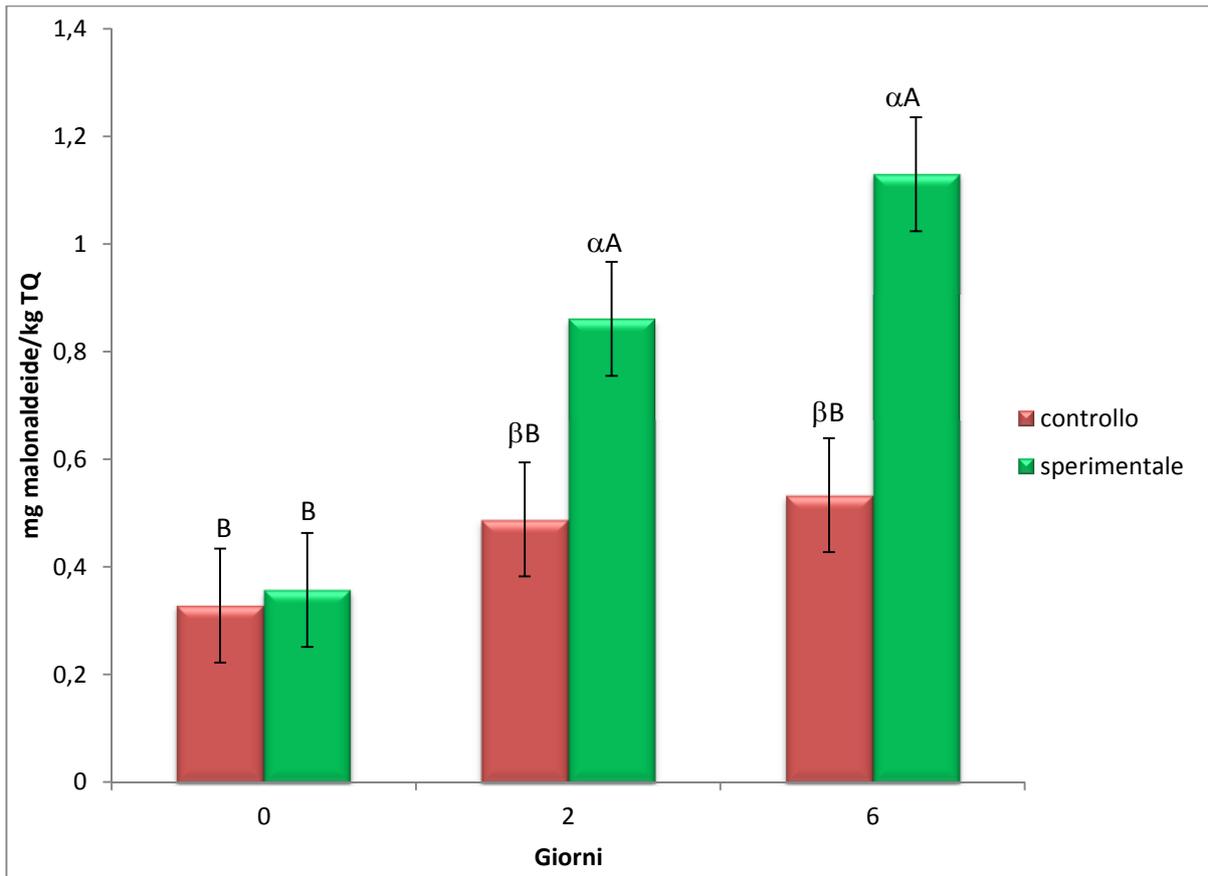


Figura 27. Quantità di malonaldeide (TBARs) nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto al tal quale (TQ).

Errore standard = 0,106. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere greche per trattamento (controllo sperimentale); lettere diverse per $P < 0,05$.

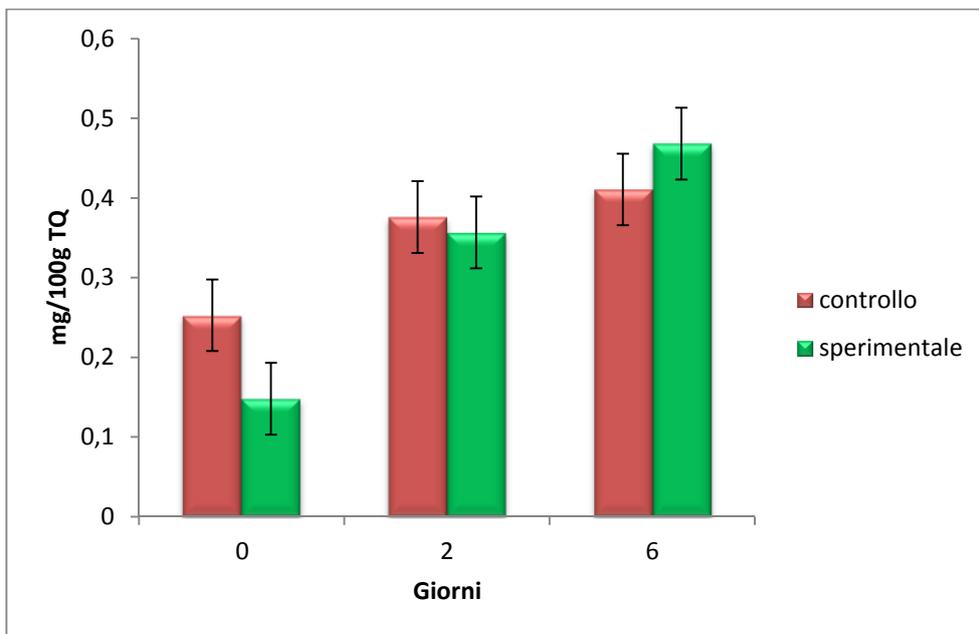


Figura 28. Quantità di malonaldeide (TBARs) normalizzata al contenuto di PUFA omega 3 sul tal quale (TQ). Errore standard

= 0,045.

COLESTEROLO

I risultati relativi alla determinazione del colesterolo espressi sui LT e sul TQ sono riportati nei grafici in Figura 29 e 30, rispettivamente.

Esaminando il grafico in Figura 29, si osserva che l'andamento della concentrazione di colesterolo nei LT è lo stesso nel gruppo di controllo e nello sperimentale. In particolare, partendo da una concentrazione media della molecola di 2,2 g/100g LT al T0, si passa a 2,1 g/100g LT al T2, con una riduzione del 4,5%; successivamente, tra il T2 e il T6, la quantità di colesterolo sui LT non si altera in maniera statisticamente significativa. Pertanto, a fronte di una iniziale riduzione, tra il secondo e il sesto giorno di conservazione il peso del colesterolo sui LT rimane stabile. Infine, si può notare che le tre concentrazioni di colesterolo del gruppo sperimentale sono mediamente inferiori del 17% rispetto a quelle del controllo; tuttavia tali differenze non sono statisticamente rilevanti.

Il grafico che riporta le concentrazioni di colesterolo rispetto al TQ (Figura 30), misurate al T0, al T2 e al T6, mostra il medesimo andamento di quello appena descritto per i LT. Si osserva, comunque, una più marcata riduzione della concentrazione media dei due gruppi tra il T0 e il T2, che passa da 34 mg/100g TQ a poco meno di 32 mg/100g TQ, con un decremento del 5,8%. Anche in questo caso, per nessuno dei due gruppi vi è una differenza statisticamente significativa tra il T2 e il T6. Tuttavia, mentre nel gruppo sperimentale i dati relativi al T2 e al T6 hanno entrambi valori di poco inferiori a 32 mg/100g, nel gruppo di controllo si osserva un andamento decrescente, passando da circa 32 mg/100g al T2 a circa 31 mg/100g al T6 (3%). Tali differenze, comunque, non sono rilevanti in termini statistici.

Il trattamento basato su un mangime contenente lino non ha influito sulla quantità iniziale di colesterolo della carne dei due gruppi, controllo e trattato. Un risultato identico è stato rilevato anche da Luciano et al. (2013) su ovini alimentati con e senza integrazione di lino. Ciò è giustificabile con il fatto che, la sintesi endogena di colesterolo è in buona parte indipendente dal tipo di alimentazione dell'animale.

L'andamento decrescente della concentrazione della molecola si spiega, invece, con lo sviluppo dei fenomeni ossidativi a carico della componente insatura dei lipidi cellulari, cui il colesterolo appartiene.

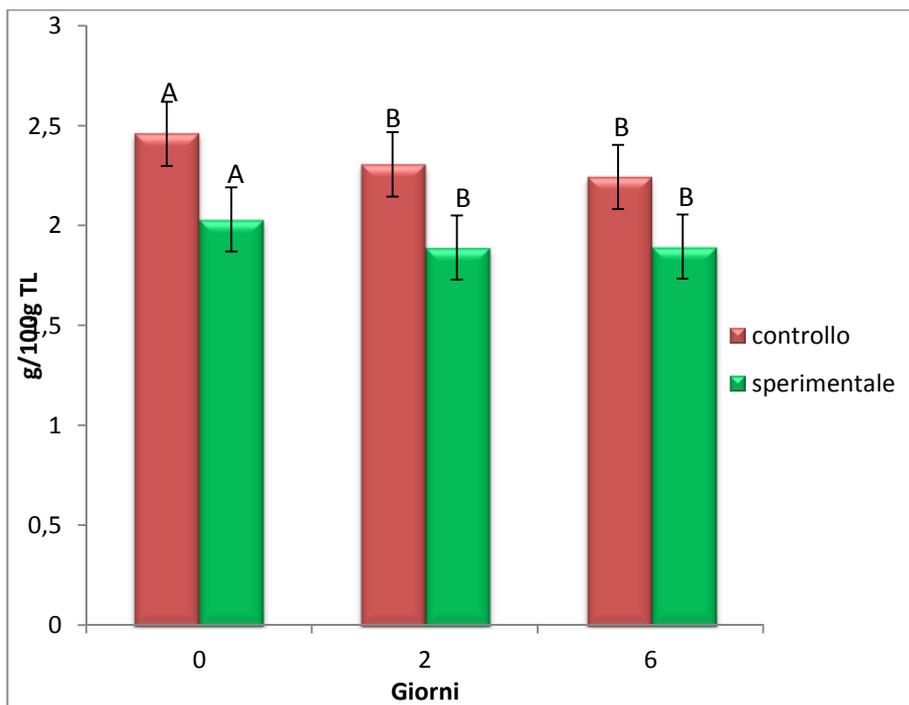


Figura 29. Quantità di colesterolo nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto ai lipidi totali (TL). Errore standard = 0,161. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere diverse per P<0,05.

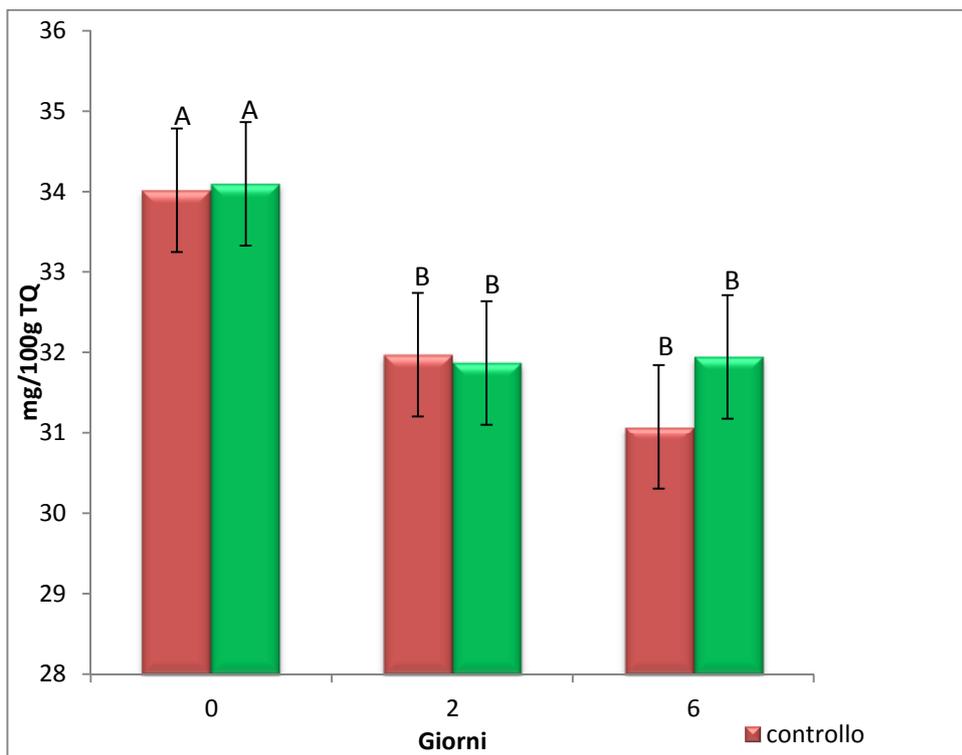


Figura 30. Quantità di colesterolo nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto al tal quale (TQ). Errore standard = 0,768. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere diverse per P<0,05.

PRODOTTI DI OSSIDAZIONE DEL COLESTEROLO (COPS)

I risultati relativi alla determinazione dei prodotti di ossidazione del colesterolo (COPs) espressi sui lipidi totali (LT) e sul tal quale (TQ) sono riportati nei grafici in Figura 31 e 32, rispettivamente.

Per quanto riguarda il livello dei COPs sui LT, solo dopo 6 giorni di conservazione si sono apprezzate differenze statisticamente significative tra i due gruppi (Figura 31). In particolare, nel gruppo di controllo il contenuto di COPs si è mantenuto costante nei 6 giorni di conservazione. Al contrario, nel gruppo sperimentale si è osservato un incremento quasi doppio della concentrazione di tali molecole sui LT al T6, passando da 67,787 $\mu\text{g/g}$ TL a 120,840 $\mu\text{g/g}$ TL con un aumento del 80%. Se si confrontano i risultati ottenuti nel gruppo di controllo e nello sperimentale dopo 6 giorni, si osserva che la carne degli animali alimentati con lino presenta il 46% di COPs in più rispetto a quella del gruppo di controllo.

Da quanto esposto, si evince che il trattamento alimentare con lino ha influito in modo significativo sulla suscettibilità della carne all'ossidazione. Ciò dipende dal maggiore grado di insaturazione dei lipidi intramuscolari della carne derivante dagli animali cui è stato somministrato il lino (Tabella 20). Infatti, essendo una fonte di PUFA $\omega 3$, tale alimento favorisce l'incremento della biosintesi di PUFA, e in particolare di quelli a lunga catena $\omega 3$. La carne del gruppo sperimentale è dunque predisposta all'ossidazione lipidica, che essendo un processo a cascata si sviluppa in modo incrementale all'aumentare della quantità di substrato. Dunque, il colesterolo presente nella carne arricchita è risultato maggiormente soggetto all'ossidazione.

L'andamento della quantità di COPs sul TQ (Figura 32) durante la conservazione rispecchia fedelmente quello descritto per le misure sui LT. In particolare, i due gruppi, controllo e sperimentale, non differiscono in modo statisticamente rilevante per quanto riguarda i valori relativi al T0 e al T2, con una concentrazione media complessiva di circa 117 $\mu\text{g}/100$ g TQ. Similmente a quanto visto in precedenza, il gruppo sperimentale la concentrazione dei COPs sul TQ cresce del 4,4% tra il T2 e il T6, passando da circa 118 $\mu\text{g}/100$ g TQ a 123 $\mu\text{g}/100$ g TQ.

L'incremento dei COPs nella carne del gruppo sperimentale a T6, è confermato anche dal rapporto tra COPs e colesterolo come riportato in Figura 33. Nel gruppo di controllo non si rilevano variazioni statisticamente significative tra il T0 e il T6, periodo durante il quale il suddetto rapporto si attesta sullo 0,36%. Di contro, a fronte di un valore medio tra T0 e T2 statisticamente uguale a quello del gruppo di controllo, tra il T2 e il T6 il rapporto COPs/colesterolo nella carne del gruppo sperimentale aumenta del 82%, raggiungendo lo 0,664%.

Il dato relativo al contenuto di COPs è molto importante nell'ottica della qualità e salubrità della carne per il consumatore. Infatti, la presenza di elevati contenuti di COPs nella carne può aumentare il rischio di molte malattie (Peng et al., 1991). In particolare, è stato rilevato che questa suscettibilità incrementa quando i COPs superano lo 0,5 % del colesterolo (Lercker et al., 2000). Nel caso del presente studio, la carne del gruppo controllo si mantiene su valori inferiori a tale limite, mentre quella del gruppo sperimentale lo supera abbondantemente (0,664), ma solo dopo 6 giorni di conservazione. Questo dato indica come la carne sperimentale non sia predisposta alla conservazione prolungata senza l'ausilio di sostanze antiossidanti endogene od esogene, in quanto dopo 6 giorni raggiunge livelli di ossidazione pericolosi per la salute del consumatore.

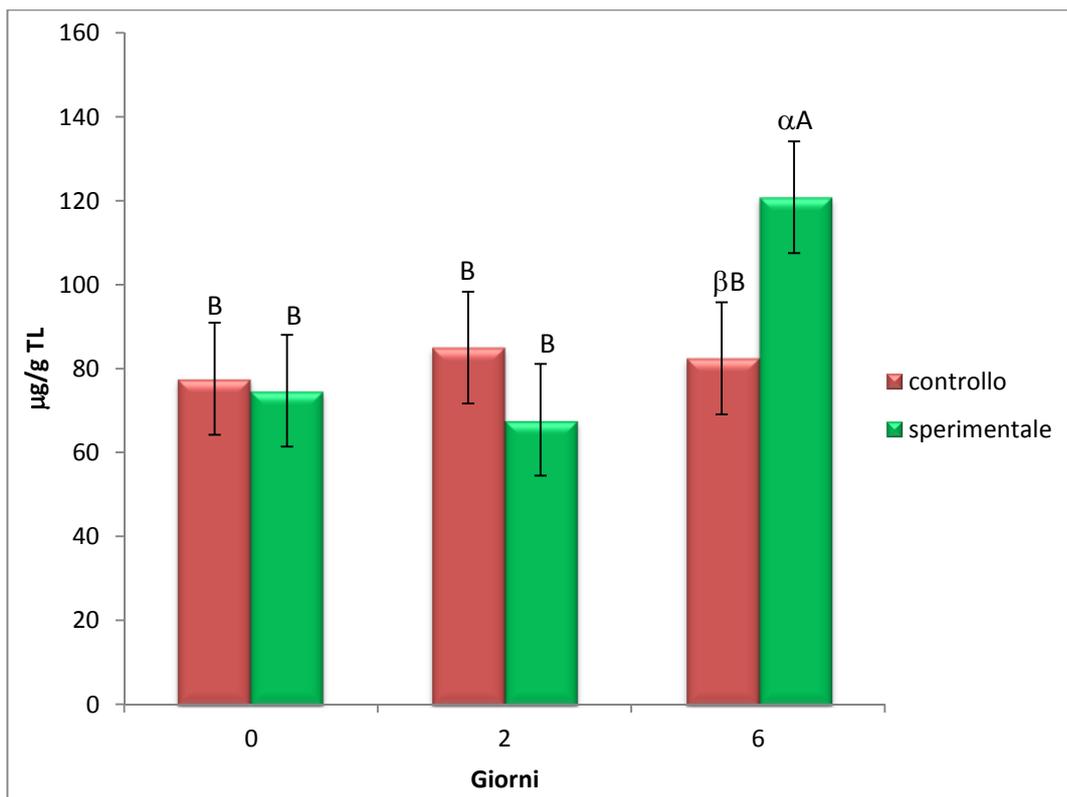


Figura 31. Quantità di prodotti di ossidazione del colesterolo (COPs) nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto ai lipidi totali (LT). Errore standard = 13,343. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere greche per trattamento (controllo sperimentale); lettere diverse per P<0,05.

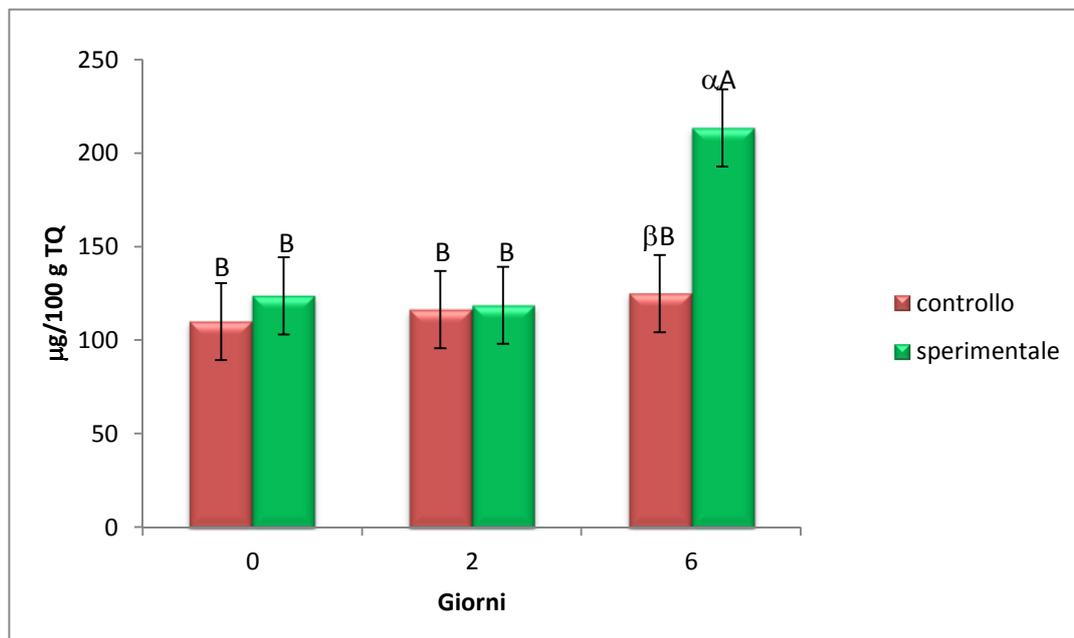


Figura 32. Quantità totale di prodotti di ossidazione del colesterolo (COPs) nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto al tal quale (TQ). Errore standard = 20,642. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere greche per trattamento (controllo sperimentale); lettere diverse per P<0,05.

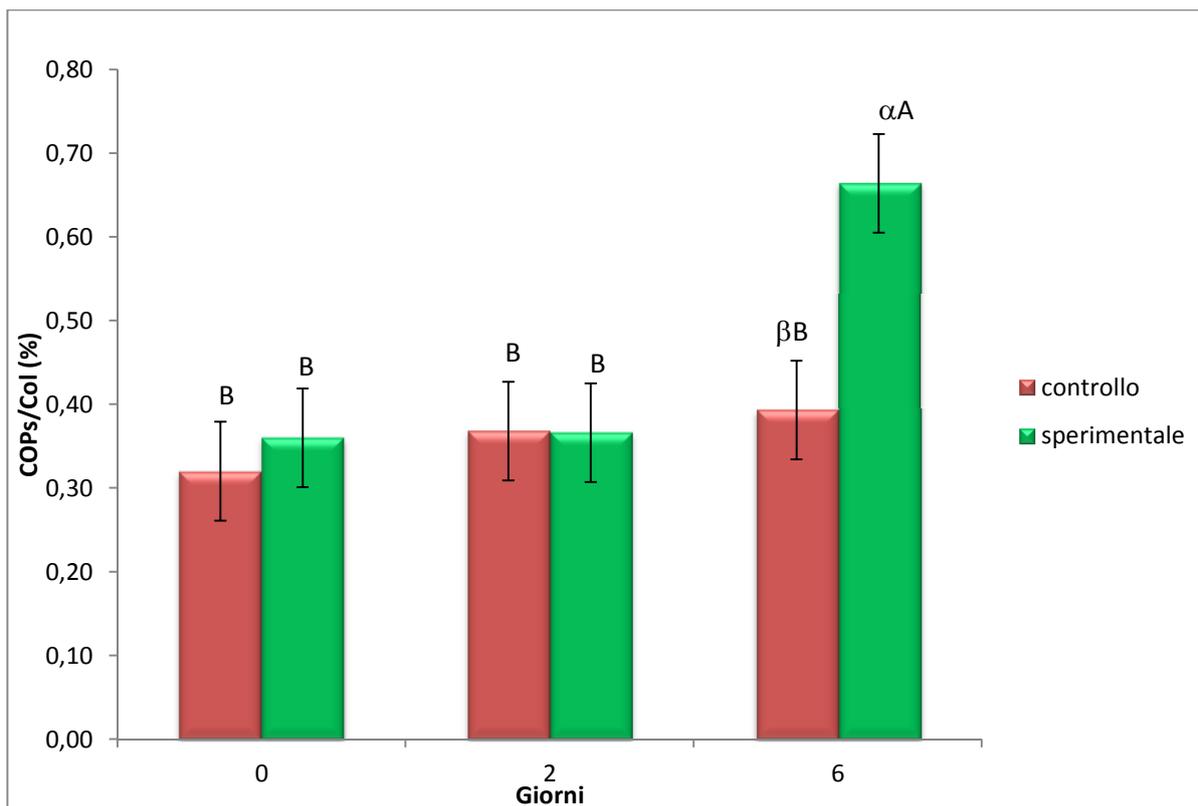


Figura 33. Rapporto tra quantità totale di prodotti di ossidazione del colesterolo (COPs) e colesterolo nel gruppo di controllo

e nel gruppo sperimentale. Errore standard = 0,059. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere greche per trattamento (controllo sperimentale); lettere diverse per $P < 0,05$.

7 α -IDROSSICOLESTEROLO

Le Figure 34 e 35 mostrano l'andamento della concentrazione del 7 α -idrossicolesterolo nel gruppo di controllo e nello sperimentale espressa sui lipidi totali (LT) e sul tal quale (TQ). Insieme al 7 β -idrossicolesterolo, questo idroperossido è uno dei maggiori componenti dei prodotti dell'ossidazione del colesterolo ed è noto per gli effetti avversi sulla salute umana.

Osservando il grafico in Figura 34 si nota che il livello di 7 α -idrossicolesterolo nella frazione lipidica della carne varia in modo speculare nel gruppo di controllo rispetto allo sperimentale. In particolare, in termini di rilevanza statistica il livello iniziale (T0) dell'idroperossido è più alto nel gruppo di controllo, con circa 17 $\mu\text{g/g}$ TL, contro i 10,6 $\mu\text{g/g}$ TL dello sperimentale, corrispondenti ad un aumento del 60%. Inoltre, nel gruppo di controllo si nota che la concentrazione di 7 α -idrossicolesterolo al T0 è statisticamente diversa da quelle rilevate ai tempi T2 e T6 (circa 9,7 $\mu\text{g/g}$ TL medi), che invece non differiscono l'una dall'altra; in particolare, la concentrazione della molecola decresce del 42% passando dal T0 al T2. Invece, nel gruppo sperimentale la concentrazione di tale molecola ha un andamento crescente; infatti, il valore medio di partenza al T0 e al T2, misure di uguale significatività statistica, è pari a 9 $\mu\text{g/g}$ TL, mentre al T6, si arriva a 13 $\mu\text{g/g}$ TL, con un incremento del 44%.

La Figura 35 mostra lo stesso dato di concentrazione del 7 α -idrossicolesterolo espresso sul campione TQ. Il grafico presenta un andamento del tutto simile a quello precedente, decrescente nel gruppo di controllo e crescente nello sperimentale. In particolare, nel gruppo di controllo la quantità di 7 α -idrossicolesterolo passa dai 24 $\mu\text{g}/100$ g TQ del T0 ai 14 $\mu\text{g}/100$ g TQ, con un decremento del 40%. Nel gruppo sperimentale, invece, si registrano circa 18 $\mu\text{g}/100$ g TQ al T0, circa 13

$\mu\text{g}/100\text{ g TQ}$ al T2 e circa $23\ \mu\text{g}/100\text{ g TQ}$ al T6, con un incremento del 27% tra l'inizio e la fine del periodo di conservazione e del 77% tra il T2 e il T6. Occorre, in ogni modo, precisare che, data l'elevata variabilità individuale riscontrata, l'analisi statistica dei dati ottenuti nella fase sperimentale non ha consentito di attribuire alcun livello di significatività alle misure di concentrazione del 7α -idrossicolesterolo espresse sul TQ.

In conclusione, gli animali che non hanno consumato lino presentano concentrazioni iniziali di 7α -idrossicolesterolo più alte in ragione del minore rapporto UFA/SFA e della più bassa concentrazione di PUFA ω -3. Poiché gli acidi grassi sono tanto più soggetti alla perossidazione, quanto maggiore è il numero di insaturazioni nella loro catena, il colesterolo, contenente 1 legame doppio tra i C 5 e 6, è soggetto ad autossidazione, per cui si consuma originando i suoi prodotti di ossidazione primaria. Esaurendo il colesterolo che va incontro ad autossidazione, i 7-idroperossidi si riducono, mancando il substrato di reazione. Gli animali che hanno ricevuto l'integrazione con mangime contenente lino estruso, invece, mostrano un andamento opposto, con un deciso incremento di concentrazione del 7α -idrossicolesterolo dopo 6 giorni di conservazione. Questo comportamento dipende dalla maggiore dotazione in acidi grassi polinsaturi della carne, che, data la maggiore insaturazione, sono attaccati in via preferenziale dagli iniziatori del processo ossidativo. Inoltre, essendo la degradazione ossidativa dei lipidi una reazione a catena, la cascata si ripercuote su tutti i lipidi insaturi della matrice, tra cui il colesterolo. Al T2 la concentrazione non è ancora aumentata perché, probabilmente, la maggior parte dei fenomeni ossidativi si realizzano ancora a carico degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena, substrato preferenziale. Dopo 6 giorni, invece, i fenomeni ossidativi hanno interessato anche parte del colesterolo e ciò si manifesta con l'incremento dei suoi prodotti di ossidazione primari, tra cui il 7α -idrossicolesterolo. Il maggior contenuto di 7α -idrossicolesterolo nel T0 della carne controllo rispetto al T2 e T6 dipende dal fatto che questo è il primo prodotto dell'ossidazione del colesterolo e che successivamente si converte in altri prodotti con il proseguire del processo degradativo. Nel gruppo sperimentale, al contrario, l'andamento è crescente a dimostrazione che il processo ossidativo è continuamente alimentato dall'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi.

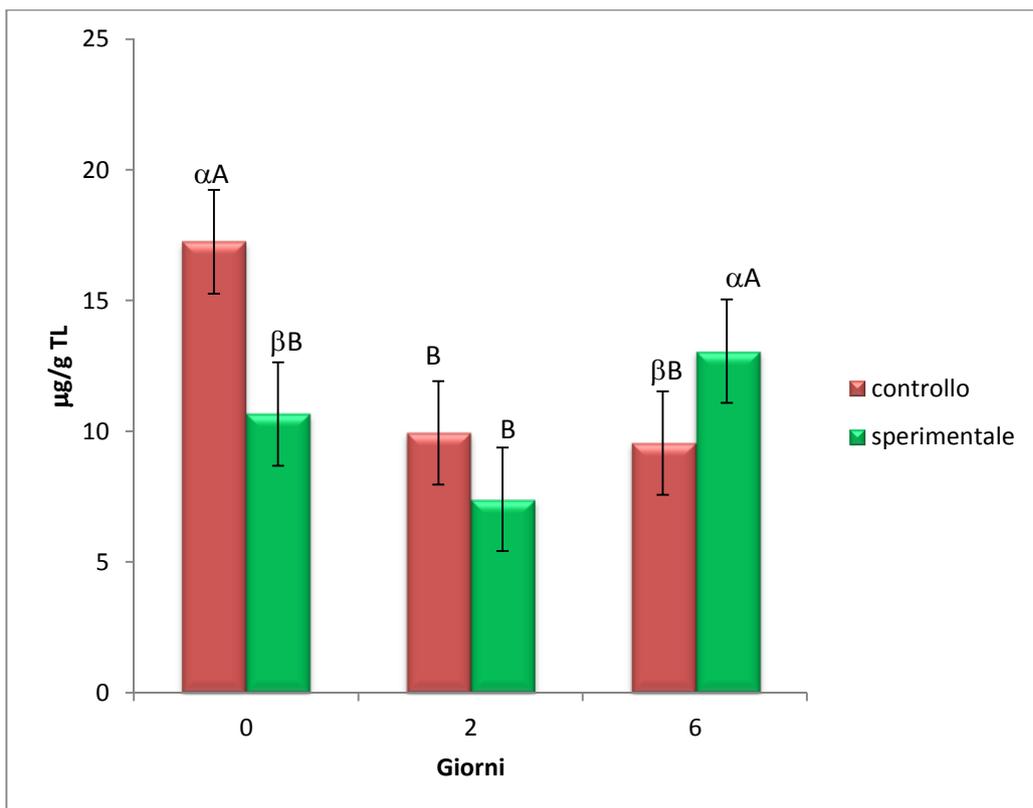


Figura 34. Quantità di prodotti di 7 α -idrossicolesterolo, un prodotto dell'autossidazione del colesterolo (COP), nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto ai lipidi totali (LT). Errore standard = 1,981. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere greche per trattamento (controllo sperimentale); lettere diverse per P<0,05.

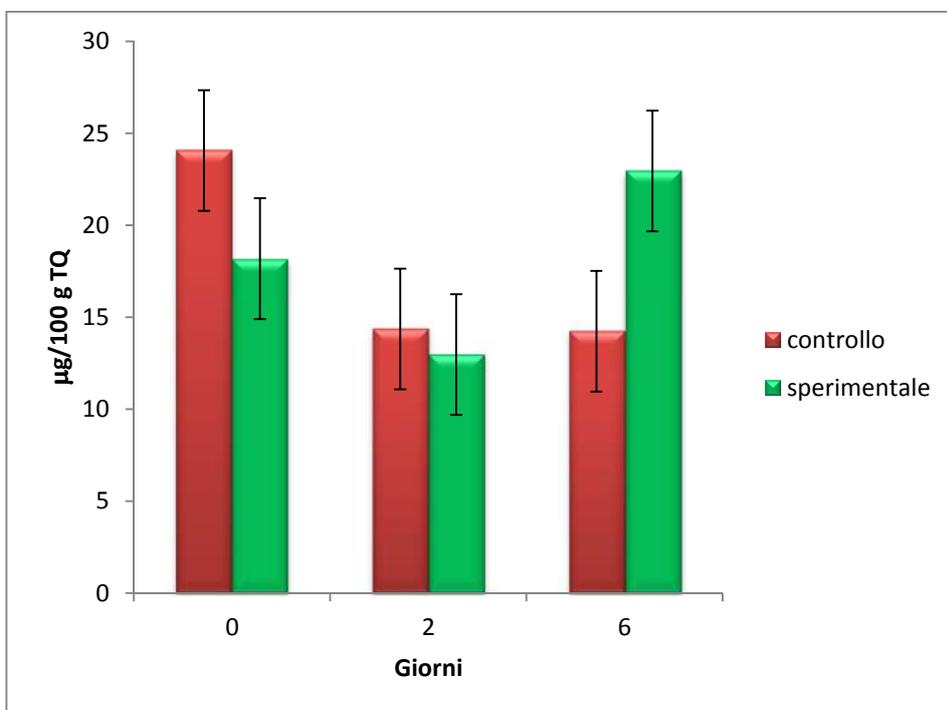


Figura 35. Quantità di prodotti di 7 α -idrossicolesterolo, un prodotto dell'autossidazione del colesterolo (COP), nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto al tal quale (TQ). Errore standard = 3,281.

7 β -IDROSSICOLESTEROLO

Le Figure 36 e 37 mostrano l'andamento della concentrazione del 7 β -idrossicolesterolo, importante prodotto primario dell'autossidazione del colesterolo, nel gruppo di controllo e nello sperimentale, espressa sui lipidi totali (LT) e sul tal quale (TQ). Come gli altri COPs, la molecola in esame presenta controindicazioni per la salute umana, essendo implicata in vari processi degenerativi, tra cui aterogenesi e carcinogenesi.

Relativamente al gruppo di controllo, il grafico dell'andamento temporale durante la conservazione dei valori di concentrazione del 7 β -idrossicolesterolo sui LT (Figura 36), evidenzia un netto aumento quantitativo da circa 6 $\mu\text{g/g}$ TL del T0 a circa 35 $\mu\text{g/g}$ TL del T2, con un tasso di incremento del 483%. Dopo tale picco, i valori numerici calano del 34%, raggiungendo approssimativamente i 23 $\mu\text{g/g}$ TL al T6. Passando al gruppo sperimentale, si osserva un diverso comportamento dei livelli della molecola in esame, con un incremento della concentrazione durante la conservazione. In particolare, al T0 la concentrazione del 7 β -idrossicolesterolo oltrepassa di poco i 12 $\mu\text{g/g}$ TL, al T2 si attesta sui 23 $\mu\text{g/g}$ TL e al T6 supera i 33 $\mu\text{g/g}$ TL, con un tasso d'incremento del 175% circa. Bisogna tuttavia sottolineare che le misure relative al T2 e al T6 risultano equivalenti dal punto di vista statistico, tanto per il gruppo di controllo, quanto per lo sperimentale.

Osservando il grafico che riporta i valori di concentrazione della stessa molecola sul TQ (Figura 34), si nota un andamento del tutto simile a quello già descritto per il grafico di Figura 37. In particolare, i campioni del gruppo di controllo mostrano circa 8 $\mu\text{g}/100$ g TQ al T0, 47 $\mu\text{g}/100$ g TQ al T2 e oltre 37 $\mu\text{g}/100$ g TQ al T6, con un primo aumento del 487% tra il T0 e il T2 e un successivo decremento del 21% tra il T2 e il T6; tuttavia, quest'ultima differenza di concentrazione non è statisticamente significativa. Passando al gruppo sperimentale, la quantità iniziale (T0) di 7 β -idrossicolesterolo è 19 $\mu\text{g}/100$ g TQ, sale a 39 $\mu\text{g}/100$ g TQ al T2 e oltrepassa i 56 $\mu\text{g}/100$ g TQ al T6, con un tasso di incremento del 184% nell'intero periodo di conservazione.

Tale diverso andamento nei due gruppi, sperimentale e controllo, si spiega con le modifiche di composizione acidica indotte dall'integrazione dietetica con semi di lino estruso. Infatti, nel gruppo di controllo, quello con la minore dotazione iniziale di PUFA omega 3, substrato preferenziale degli iniziatori della perossidazione lipidica, il colesterolo è rapidamente interessato da autossidazione, con produzione dei 7-idroperossidi. Invece, nel gruppo sperimentale i primi prodotti di ossidazione sono stati i PUFA ω 3, mentre l'autossidazione del colesterolo si avvia solo in un secondo momento. Tuttavia, in questo caso i processi ossidativi sono più spinti, data la reazione a cascata, per questo motivo, in ultima analisi, si produce un maggiore quantitativo di 7 β -idrossicolesterolo.

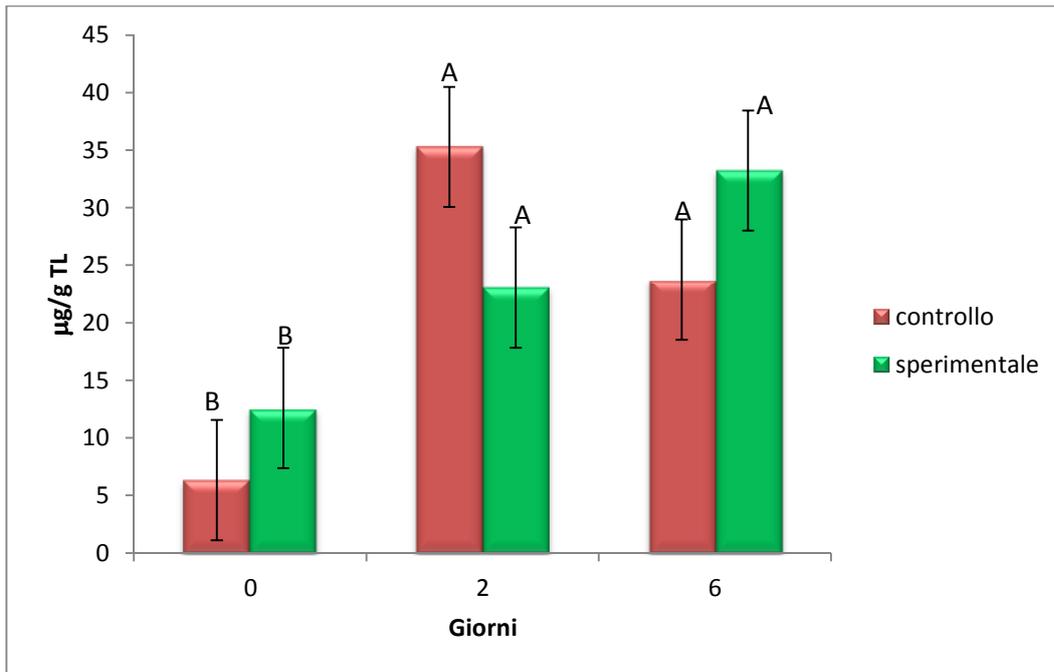


Figura 36. Quantità di prodotti di 7β-idrossicolesterolo, un prodotto dell'autoossidazione del colesterolo (COP), nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto ai lipidi totali (LT). Errore standard = 5,225. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere diverse per P<0,05.

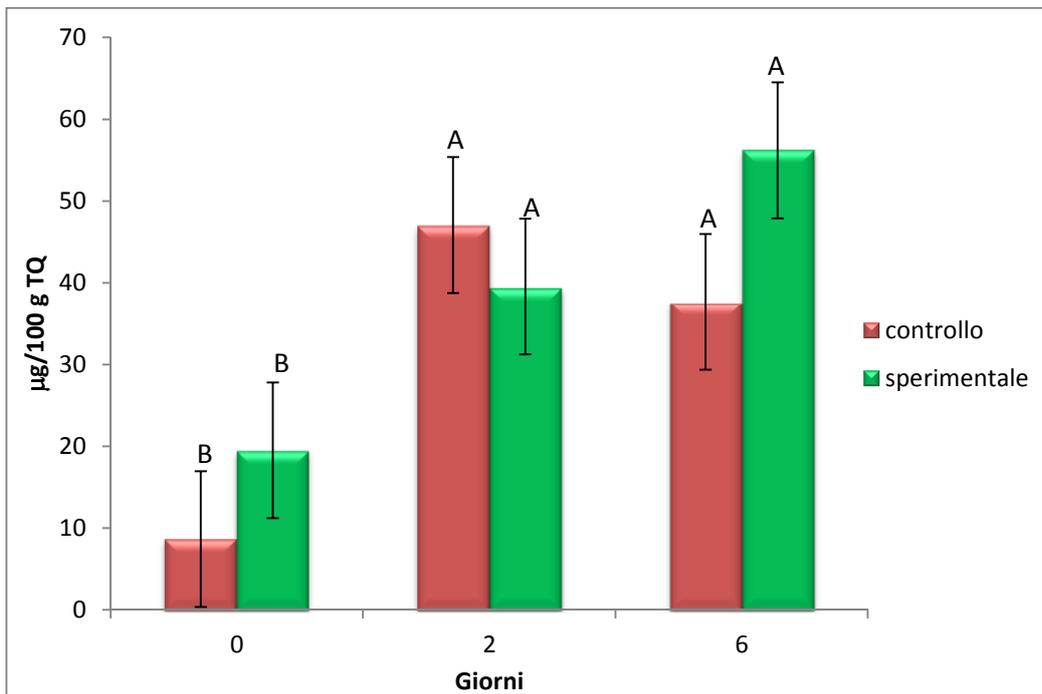


Figura 37. Quantità totale di 7β-idrossicolesterolo, un prodotto dell'autoossidazione del colesterolo (COP), nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto al tal quale (TQ). Errore standard = 8,307. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere diverse per P<0,05.

***α*-EPOSSICOLESTEROLO**

Le Figure 38 e 39 rappresentano i grafici della variazione di concentrazione dell' α -epossicolesolesterolo, COP primario, che si origina per intervento di iniziatori idrossiradicalici.

I due grafici mostrano il medesimo andamento, con una riduzione di concentrazione dell'epossido tra il T0 e il T2, seguita da un aumento tra il T2 e il T6. Inoltre, si rileva che i valori di concentrazione iniziali (T0) e quelli finali (T6) sono equivalenti dal punto di vista statistico, tanto nel gruppo di controllo, quanto nello sperimentale. In particolare, nei due gruppi i valori medi di concentrazione sui lipidi totali (LT) si attestano sui 12 $\mu\text{g/g}$ TL al T0 e al T6 e sui 9 $\mu\text{g/g}$ TL al T2, con un tasso di variazione del 25%; passando alle misure effettuate sul campione tal quale (TQ) si osserva una concentrazione media nei due gruppi di circa 19 $\mu\text{g}/100$ g TQ al T0 e al T6 e di circa 10 $\mu\text{g}/100$ g TQ al T2, con un tasso di variazione del 47%.

In conclusione, la maggiore concentrazione iniziale di epossidi rispetto agli idroperossidi si spiega considerando che questi COPs primari si originano per iniziazione radicalica. Gli idrossiradicalici agiscono sul colesterolo non appena la carne viene esposta all'ossigeno atmosferico, quindi i COPs in esame si producono a partire dalle fasi di lavorazione successive alla macellazione. Essendo già presenti al T0, gli epossidi tendono a diminuire perché subiscono ulteriori trasformazioni, per cui al T2 se ne rileva una minore presenza. Tuttavia, l'esposizione all'ossigeno tra il T2 e il T6 favorisce il proseguimento del fenomeno di ossidazione iniziata da radicali che determina la formazione di nuovi epossidi. Dunque, non si osservano effetti significativi dell'integrazione alimentare con lino sull'andamento della concentrazione dell' α -epossicolesolesterolo.

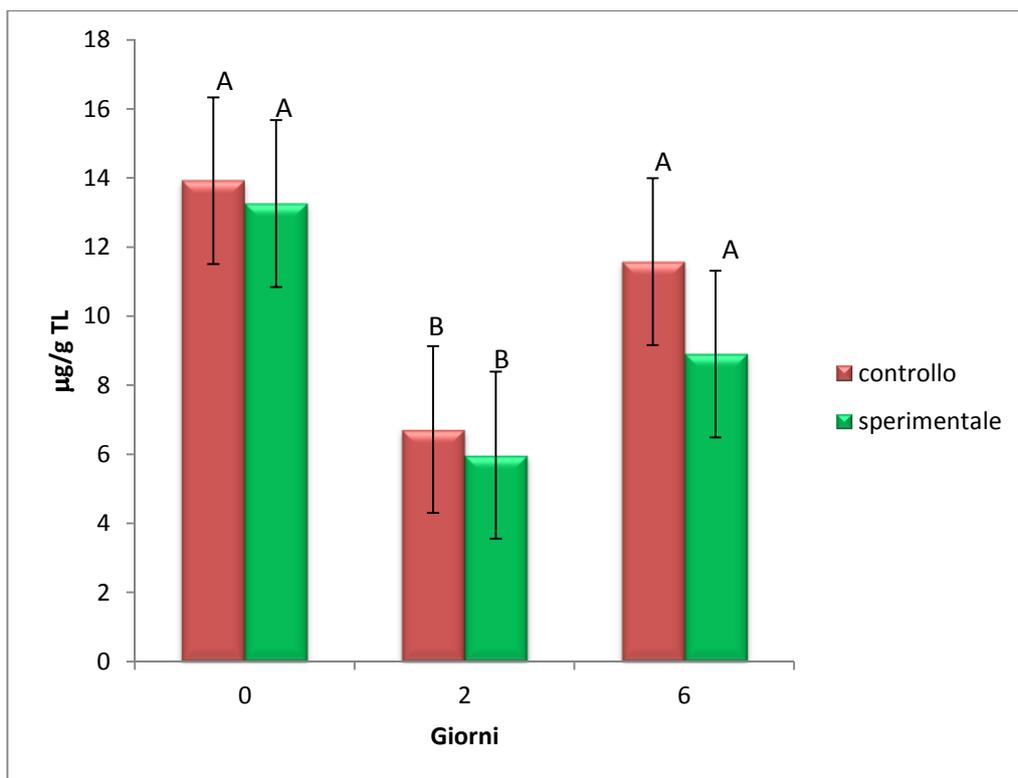


Figura 38. Quantità di prodotti di α -epossicolesolesterolo, un prodotto di ossidazione del colesterolo (COP), nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto ai lipidi totali (LT). Errore standard = 2,415. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere diverse per $P < 0,05$.

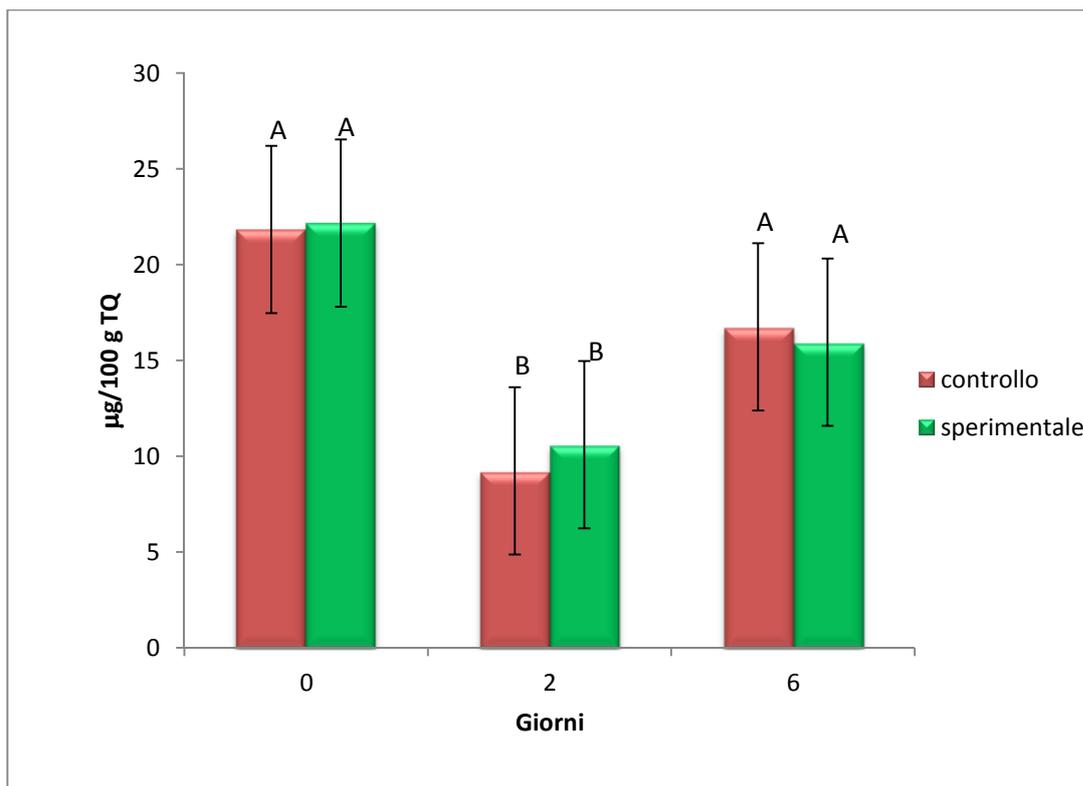


Figura 39. Quantità totale di α -epossicolesolesterolo, un prodotto di ossidazione del colesterolo (COP), nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto al tal quale (TQ). Errore standard = 4,367. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere diverse per $P < 0,05$.

7-CETOCOLESolesterolo

Le 40 e 41 rappresentano l'andamento del 7-chetocolesolesterolo espresso su LT e TQ, Le 37 e 38 rappresentano l'andamento del 7-chetocolesolesterolo espresso su LT e TQ, rispettivamente. Come si può notare, i due gruppi sostanzialmente non differiscono l'uno dall'altro e i valori di concentrazione si mantengono abbastanza costanti durante il periodo di conservazione. Trattandosi di uno dei prodotti finali dell'ossidazione del colesterolo, è difficile osservare incrementi rilevanti di questa molecola in 6 giorni.

Si nota, in ogni modo, un significativo aumento del livello del 7 chetocolesolesterolo nella carne del gruppo sperimentale a sei giorni di conservazione, che raggiunge un valore pari a 93,159 $\mu\text{g}/100\text{g}$ TQ, con un incremento del 93% rispetto al gruppo controllo (48,424 $\mu\text{g}/100\text{g}$ TQ). Questo dato è in accordo con quanto rilevato da Lercker et al. (2000) sulla carne bovina e su altri prodotti di origine animale e conferma ulteriormente il maggior livello di ossidazione della carne del gruppo sperimentale rispetto al controllo, supportando l'ipotesi che il maggior contenuto di PUFA $\omega 3$ favorisce l'iniziazione dei processi ossidativi. Infatti, dopo 6 giorni in frigorifero, il colesterolo dei campioni di carne derivata dagli animali alimentati con lino si trova in uno stadio di ossidazione più avanzato rispetto a quello dei campioni del gruppo di controllo; dunque, al T6 la carne del gruppo sperimentale ha già iniziato ad accumulare i prodotti finali del catabolismo ossidativo del colesterolo.

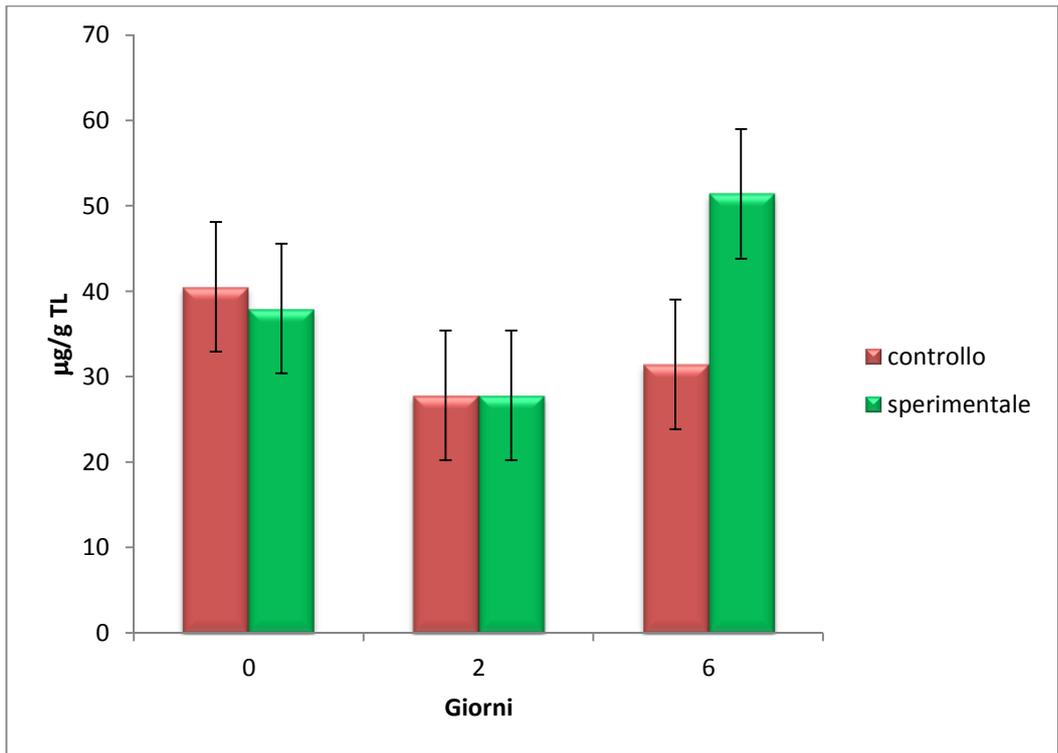


Figura 40. Quantità totale di 7-chetocolesterolo, un prodotto di ossidazione del colesterolo (COP) secondario, nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto ai lipidi totali (LT). Errore standard = 7,591.

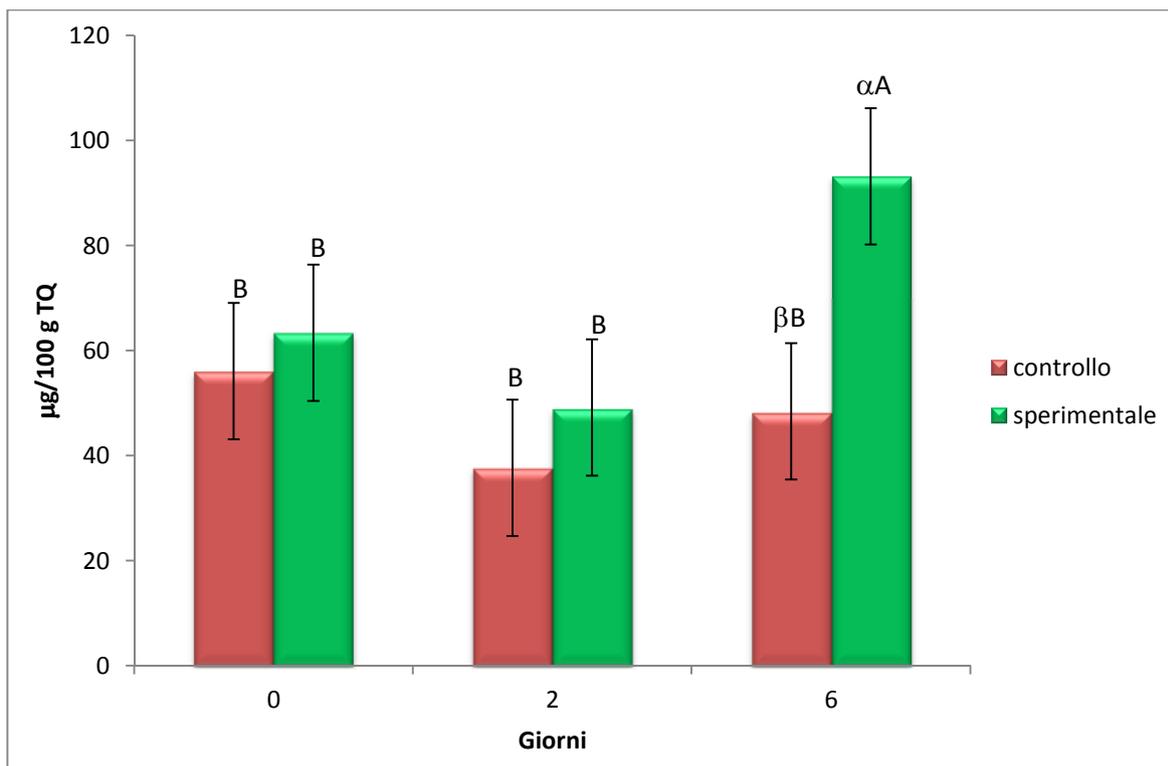


Figura 41. Quantità totale di 7-chetocolesterolo, un prodotto di ossidazione del colesterolo (COP) secondario, nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto al tal quale (TQ). Errore standard = 12,979. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere greche per trattamento (controllo sperimentale); lettere diverse per $P < 0,05$.

TRIOLO

I risultati relativi al contenuto di triolo sono riportati nelle Figure 42 e 43. Analizzando le due Figure, si osserva che la concentrazione media di triolo nel gruppo di controllo e nello sperimentale è praticamente 0 al T0, passa a circa 5 µg/100g TQ al T2 e raggiunge i 10 µg/100g TQ al T6.

Una differenza significativa tra i due gruppi si rileva dopo 6 giorni di conservazione, con valori superiori nel gruppo sperimentale (14 µg/g LT e 25,2 µg/100g TQ) rispetto al gruppo di controllo (6,1 µg/1g LT e 8,7 µg/100g TQ). Tale maggiore contenuto di triolo nella carne del gruppo sperimentale al T6 è si motiva allo stesso modo di quello osservato nel paragrafo precedente per il 7-chetocolesterolo. Infatti, anche il triolo è uno dei prodotti finali dell'ossidazione del colesterolo; pertanto si riesce a rilevare un contenuto significativo di questa molecola solo con il procedere della conservazione. Quanto esposto supporta ancora una volta l'ipotesi che l'arricchimento in PUFA, soprattutto ω3, rende la carne del gruppo sperimentale instabile nei confronti dei processi ossidativi e quindi maggiormente soggetta ai conseguenti processi degradativi a livello organolettico, nutrizionale e salutistico rispetto a quella del gruppo di controllo.

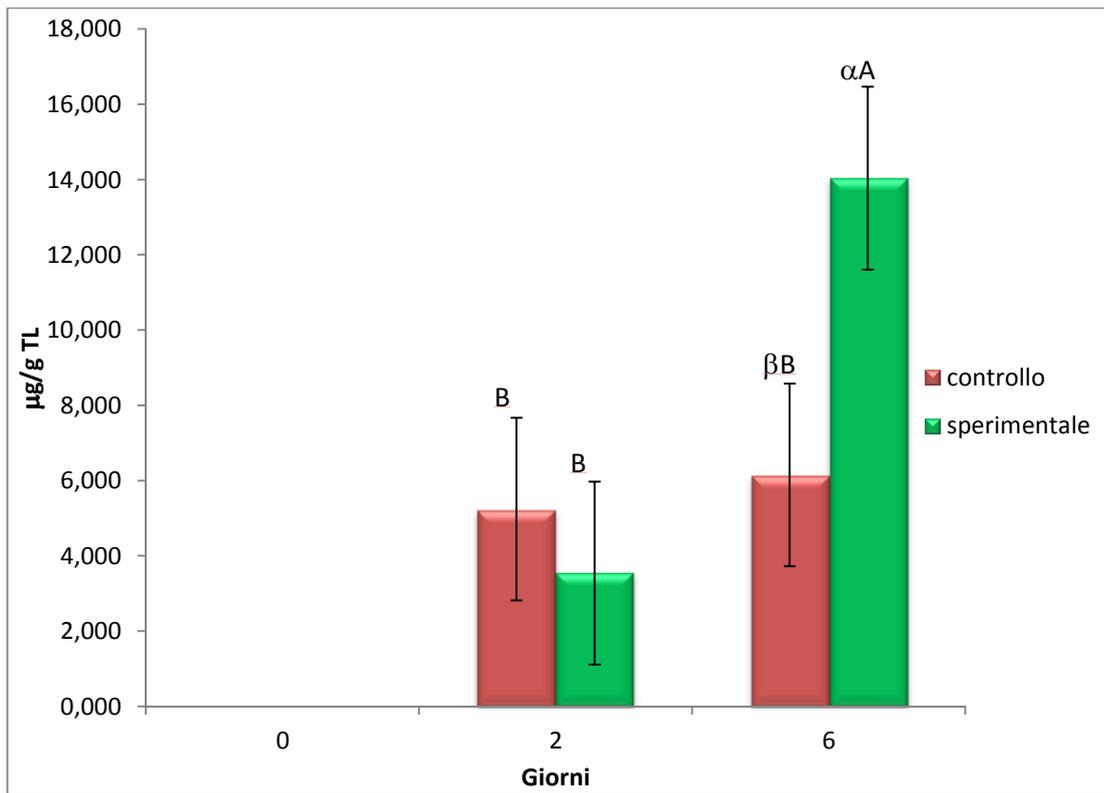


Figura 42. Quantità totale di triolo, un prodotto di ossidazione del colesterolo (COP) secondario, nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto ai lipidi totali (LT). Errore standard = 2,428. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere greche per trattamento (controllo sperimentale); lettere diverse per $P < 0,05$.

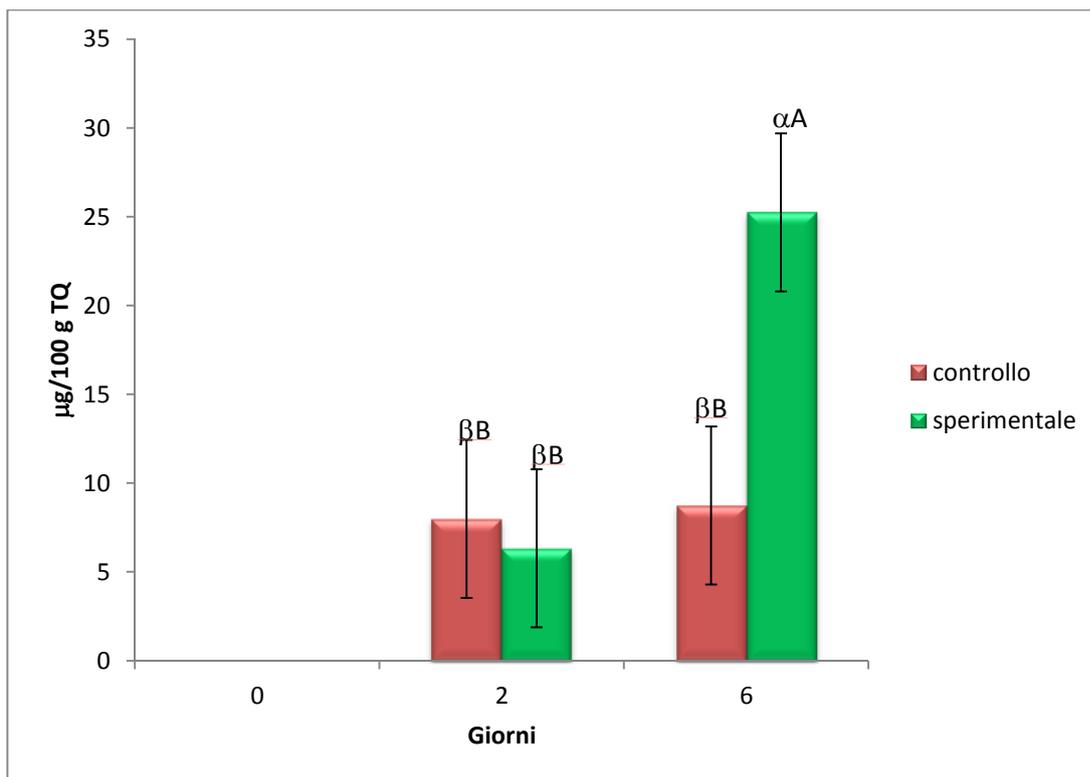


Figura 43. Quantità totale di triolo, un prodotto di ossidazione del colesterolo (COP) secondario, nel gruppo di controllo e nel gruppo sperimentale rispetto al tal quale (TQ). Errore standard = 4,447. Lettere latine per tempi di conservazione (T0, T2, T6); lettere greche per trattamento (controllo sperimentale); lettere diverse per $P < 0,05$.

COPs vs TBARS

Il trattamento alimentare con lino ha dimostrato un marcato effetto sul contenuto di 7 β -idrossicolesterolo, triolo, COPs totali e COPs/Colesterolo%. Questo risultato è in accordo con quanto rilevato da Luciano et al. (2013) e conferma la stretta relazione di questi prodotti con l'incremento dei TBARS. Infatti, l'andamento dell'ossidazione è simile sia per gli acidi grassi che per il colesterolo, come dimostrato dalla correlazione riportata nelle Figure 44-47.

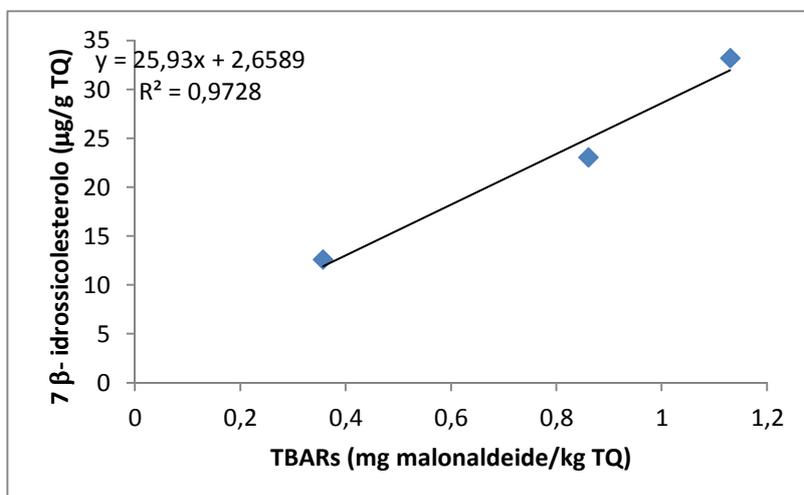


Figura 44. Confronto tra 7 β -idrossicolesterolo e TBARS.

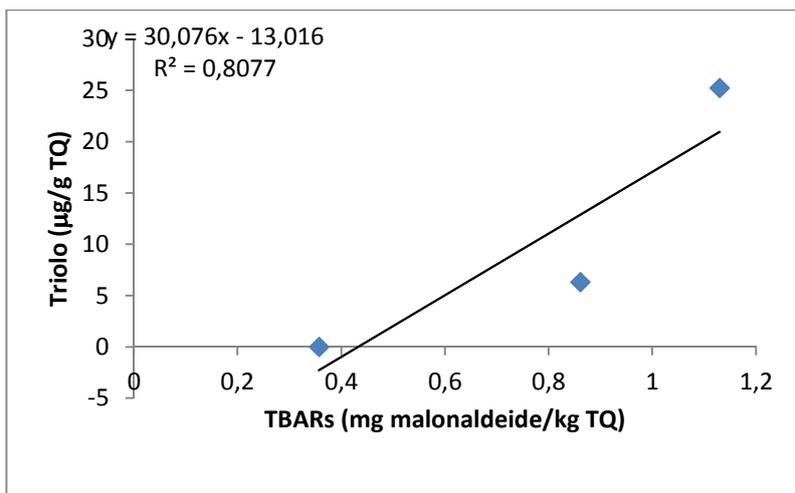


Figura 45. Confronto tra triolo e TBARs.

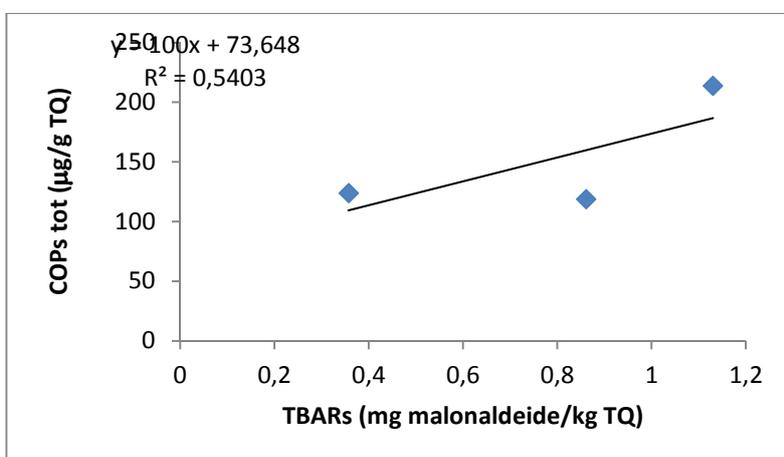


Figura 46. Confronto tra COPs totali e TBARs.

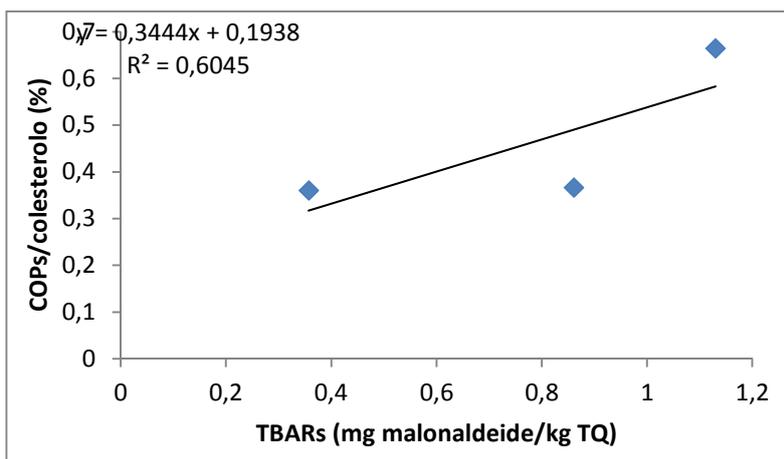


Figura 47. Confronto tra COPs/colesterolo e TBARs.

CONCLUSIONI

L'obiettivo generale del presente lavoro di tesi era valutare l'effetto dell'integrazione alimentare con semi di lino estruso sulla stabilità ossidativa della carne di vitelloni di razza Maremmana allevati secondo il metodo tradizionale. La somministrazione di un mangime al 20% di semi di lino estrusi ha comportato un aumento dell'85% dei PUFA $\omega 3$ nel grasso intramuscolare. Tuttavia, tale incremento non è stato accompagnato da un innalzamento della concentrazione di molecole ad azione antiossidante, quali vitamina A e carotenoidi, malgrado gli animali abbiano trascorso un periodo preventivo al pascolo.

Le differenze nella stabilità ossidativa tra le carni dei due gruppi di animali hanno cominciato ad emergere già a partire dal secondo giorno di conservazione, con l'incremento dei prodotti di ossidazione dei PUFA, espressi come concentrazione delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARs) nel solo gruppo sperimentale. Infatti, nonostante i più alti livelli di acidità libera, misurata come acidi grassi liberi (FFA), le TBARs della carne del gruppo di controllo al T2 e al T6 non si discostano significativamente dal livello di partenza (T0). Ciò si spiega, se si considera che la minore dotazione in PUFA $\omega 3$ rende l'alimento meno attaccabile da parte degli iniziatori radicalici. La diretta dipendenza dell'innalzamento delle TBARs dall'aumento della quota di PUFA $\omega 3$, conseguente all'alimentazione con lino, è confermata dall'assenza di differenze significative tra i due gruppi, quando la concentrazione di TBARs è normalizzata rispetto ai PUFA omega-3.

Prendendo in considerazione i prodotti di ossidazione del colesterolo (COPs) si hanno ulteriori conferme della maggior suscettibilità all'ossidazione della carne arricchita in PUFA $\omega 3$ rispetto a quella di controllo. L'andamento sostanzialmente crescente dei livelli dei COPs primari e, soprattutto, i picchi dei COPs secondari 7-chetocolesterolo (da 49 $\mu\text{g}/100\text{ g TQ}$ al T2 a 93 $\mu\text{g}/100\text{ g TQ}$ al T6) e triolo (da 6 $\mu\text{g}/100\text{ g TQ}$ al T2 a 25 $\mu\text{g}/100\text{ g TQ}$ al T6) sono evidenti indicatori di un'avanzata degradazione della frazione lipidica.

Dunque, l'alimentazione con lino si è dimostrata una strategia efficace per migliorare la frazione lipidica della carne di bovini Maremmani allevati al pascolo, che presenta un maggior tenore in PUFA $\omega 3$ e un più basso rapporto PUFA $\omega 6/\omega 3$ rispetto al controllo. Tuttavia, data la maggiore reattività chimica dei doppi legami rispetto ai singoli, favorire un alto livello di insaturazione nel grasso intramuscolare predispone tale componente all'iniziazione della cascata ossidativa. Tale fenomeno degradativo comporta alterazioni organolettiche, tra cui l'alterazione cromatica e lo sviluppo di molecole volatili sgradevoli, e, soprattutto, un peggioramento della qualità nutrizionale della carne. Infatti, i prodotti dalle reazioni ossidative a carico dei lipidi sono sostanze capaci di arrecare danno alla salute umana se ingerite con gli alimenti. In particolare, ci si riferisce ai COPs, alla malonildialdeide e alla famiglia delle 4-idrossialchenali, molecole note perché coinvolte, tra l'altro, nell'induzione del diabete mellito di tipo 2, di vari processi mutageni e di carcinogenesi, nell'aterogenesi e nello sviluppo di alcune disfunzioni cardiovascolari.

In conclusione, per apprezzare le pregevoli caratteristiche nutrizionali e funzionali della carne di Maremmana arricchita con PUFA $\omega 3$ è necessario consumarla il giorno stesso dell'acquisto o al massimo entro due giorni, a causa dell'elevata predisposizione della componente lipidica ai fenomeni ossidativi. Infatti, dopo più di due giorni di conservazione in frigorifero, benché adeguatamente protetto con un apposito film plastico per alimenti, tale prodotto contiene sostanze dannose per la salute umana. In particolare, le concentrazioni di COPs totali rilevate superano la soglia limite di rischio per varie patologie (Lercker et al., 2000). Per questo motivo, per mettere in commercio questa carne è necessario prevedere un adeguato sistema di confezionamento in atmosfera modificata a bassa (*gas flush* con CO_2 o N_2) o bassissima percentuale di ossigeno (CAP a -1°C), con l'ausilio di imballaggi attivi e/o l'applicazione di antiossidanti. Per quanto riguarda gli antiossidanti, è particolarmente interessante l'azione protettiva svolta dalle foglie di alcune piante aromatiche, quali rosmarino, origano e timo. Infine, sarebbe opportuno integrare l'alimentazione

degli animali durante la fase di allevamento con sostanze antiossidanti, al fine di aumentare anche il livello di base di protezione antiossidante della carne.

Riferimenti bibliografici

Bibliografia

- Adachi, J., Kudo, R., Ueno, Y., Hunter, R., Rajendram, R., Want, E., and Preedy, V. R. (2001). Heart 7-hydroperoxycholesterol and oxysterols are elevated in chronically ethanol-fed rats. *J. Nutr* 131, 2916-20.
- Adrian, J., Frangne, R., & Potus, J. (2009). *Dizionario degli alimenti*. Tecneche Nuove.
- Aiello, L. C., & Key, C. (2002). Energetic consequences of being a *Homo erectus* female. *American Journal of Human Biology*, (14), 551-565.
- Aiello, L. C. & Wheeler, P. (1995). The expensive tissue hypothesis: the brain and the digestive system in human and primate evolution. *Current Anthropology*, (36), 199-221.
- Akoh, C. C., & Min, D. B. (2002). *Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (Second ed.). New York: Marcel Dekker.
- Alfonso, M., Sanudo, C. (2000) La calidad de la canal y la carne ovina en Europa. *Mundo Ganadero*, 125 60-67.
- Ames, B.N., M.K. Shigenaga and T.M. Hagen (1993). Oxidants, Antioxidants, And The Degenerative Diseases Of Aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 7915-7922.
- Arhiara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219–229.
- Arhiara, K., & Ohata, M. (2010). Functional meat products. In F. Toldrá (A cura di), *Handbook of meat processing* (p. 423–439). Ames, Iowa, Wiley-Blackwell.
- Aurousseau B., Bauchart D., Calichon E., Micol D., Priolo A. 2004. Effect of grass or concentrate feeding system and rate of growth on triglyceride and phospholipid and their fatty acids in the M. longissimus thorachis of lambs. *Meat Sci.*, 66 531-541.
- Avila, C. D., DePeters, E. J., Perez-Monti, H., Taylor, J. S., & Zinn, R. A. (2000). Influences of saturation ratio of supplemental dietary fat on digestion and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1505-1519.
- Aymerich, T., Picouet, P. A., & Monfort, J. M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78, 14–129.
- Bateman II, H., & Jenkins, T. C. (1998). Influence of soybean oil in high fiber diets fed to nonlactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. *Journal of Dairy Science*, 81(9), 2451-2458.
- Begoña-Olmedilla, A., Jiménez-Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F.J. (2013) Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Science*, 95, 919–930
- Bell, R. G. (2001). Meat packaging: protection, preservation and presentation. In Y. H. Hui, W.-K. Nip, R. W. Rogers, & O. A. Young (A cura di), *Meat Science and Application*. New York: Marcel Dekker.
- Benchtel (1986). Muscle as food. Academic Press (p. 3-91, 2091).

- Bendall, J. R. (1973). Post mortem changes in muscle. In G. H. Bourne, Structure and function of muscle (2nd edition ed., Vol. III, p. 243–309). New York: Academic Press.
- Bessa, R. J., J. Santos-Silva, J., Ribeiro, J. M., & Portugala, A. V. (2000). Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livestock Production Science*, 63(3).
- Biondi, G., Martini, F., Rickards, O., & Rotilo, G. (2006). In carne e ossa. Bari-Roma: Editori Laterza.
- Blankson, H., Stakkestad, J., Fagertun, H. H., Thom, E., & Wadst, O. (2000). Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *The Journal of nutrition*, 130(12), 2943-2948.
- Blaxter, K. L., & Webster, A. J. (1991). Animal production and food: real problems and paranoia. *Animal Production*, 53(3), 261-269.
- Blitz, I.L., Shimmi, O., Wunnenberg-Stapleton, K., O'Connor, M.B., Cho, K.W. (2000). Is chordin a long-range- or short-range-acting factor? Roles for BMP1-related metallo-proteases in chordin and BMP4 auto-feedback loop regulation. *Dev. Biol.* 223, 120–138.
- Bonadonna, T. (1950). Bovini, Equini. In T. Bonadonna, *Zootecnia Speciale* (Vol. II). Milano: Cisalpino.
- Bonsembiante, M. (1976). *Notiziario ASSALZOO*, 12.
- Bonsembiante, M., & Parigi Bini, R. (1969). Metodi di stima del valore biologico delle proteine. *Alimentazione animale*, 13(2), 81-94.
- Bosset, B. J.O. (1997). Occurrence of volatile mono- and sesquiterpenoids in highland and lowland plant species as possible precursors for flavor compounds in milk and dairy products. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4423-4434.
- Bou, R., et al. (2001). Influence of dietary fat source, alpha-tocopherol, and ascorbic acid supplementation on sensory quality of dark chicken meat. *Poultry Science*, 80(6), 800-807.
- Bozzi, R., Sargentini, C., Negrini, R., Forabosco, F., & Giorgetti, A. (1998). Valorizzazione della razza bovina Maremmana. 2. Caratteristiche fisico chimiche delle carni. IV Congresso Nazionale Biodiversità: Germoplasma locale e sua valorizzazione, (p. 1061 – 1064). Alghero (SS).
- Brand-Miller, J. C., & Colagiuri, S. (1994). The carnivore connection: dietary carbohydrate in the evolution of NIDDM. *Diabetologia*, 37, 1280-1286.
- Bray, T.M, Taylor, C.G. (1993). Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress. *Canad. J Phys Pharm.*, 71(9), 746-51.
- Broadhurst, C. L., Cunnane, S., & Crawford, M. A. (1998). Rift Valley lake fish and shellfish provided brain-specific nutrition for early Homo. *British Journal of Nutrition*, 79, 3-21.
- Broadhurst, C., Wang, Y., Crawford, M. A., Cunnane, S. C., Parkington, J. E., & Schmidt, W. (2002). Brain-specific lipids from marine, lacustrine or terrestrial food resources; potential impact on early African Homo sapiens. *Comp Biochemistry and Physiology*, 131 (Part B), 653-673.
- Bruciapaglia, A., Lussiana, C., Destefanis, G. (2014) Fatty acid profile and cholesterol content of beef at retail of Piemontese, Limousin and Friesian breeds. *Meat Science*, 96, 568–573

- Buettner, G. R., & Jurkiewicz, B. A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation research*, 145(5), 532-541.
- Burton, G. W., Cheeseman, K. H., Doba, T., Ingold, K. U., & Slater, T. F. (1983). Vitamin E as an antioxidant in vitro and in vivo. In *Biology of Vitamin E. Ciba Foundation Symposium* 101, 4-18.
- Buttkus, H. (1966). Preparation And Properties Of Trout Myosin. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 23(4), 563-573.
- Calkins, C. R., & Seideman, S. C. (1988). Relationships among calcium-dependent protease, cathepsins B and H, meat tenderness and the response of muscle to aging. *Journal of Animal Science*, 66, 1186-1193.
- Campodoni G., Poli B. (1988) La qualità della carne. In *Nuovi orientamenti dei consumi e delle produzioni alimentari* (p. 83-88).
- Cattaneo, P., Stella, S., Cozzi, M., (2003). Variazioni nella capacità di ritenzione idrica della carne bovina in relazione alla provenienza, *Large Animal Review*, 9, 5.
- Cappelli, P., & Vannucchi, V. (1998). *Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazione*. Zanichelli.
- Carlucci, A., Napolitano, F., Girolami, A., Monteleone, E. (1999) Methodological approach to evaluate the effects of age at slaughter and storage temperature and time on sensory profile of lamb meat. *Meat Science*, 52, 391-395.
- Casorri, V. (1905). *L'Agro Romano, le sue trasformazioni*. Roma: Centenari & C.
- Cerny, C., Grosch, W. (1993), Quantification of character-impact odor compounds of roasted beef. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 196, 417-422.
- Chan, K. M., Decker, E. A., & Faustman, C. (1994). Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(4), 403-426.
- Choat, W. T., Paterson, J. A., Rainey, B. M., King, M. C., Smith, G. C., Belk, K. E., et al. (2006). The effects of cattle sex on carcass characteristics and *longissimus* muscle palatability. *Journal of Animal Science*, 84, 1820-1826.
- Chouinard, P. Y., Corneau, L., Butler, W. R., Chilliard, Y., Drackley, J. K., & Bauman, D. E. (2001). Effect of Dietary Lipid Source on Conjugated Linoleic Acid Concentrations in Milk Fat. *Journal of Dairy Science*, 84(3), 680-690.
- Christie, W.W. (1995). Composition and structure of milk lipids. In Fox, P. F., (Eds.) *Advanced Dairy Chemistry-2: Lipids*. Chapman and Hall, London (p. 1-36).
- Church e& Wood (1991). *The manual of manufacturing meat quality*. Elsevier Applied Science (p. 3-161, 2941).
- Ciani, F., & Matassino, D. (2001). Il bovino grigio allevato in Italia: origine. Nota1: il bovino macrocero. *Taurus*, 6, 89-99.
- Cohen, M. N. (1989). *Health and the rise of civilization*. New Haven: Yale University Press.
- Consorzio per la Sperimentazione, Divulgazione e Applicazione di Biotecniche Innovative (ConsDABI). (2002). *La risorsa genetica animale (Biodiversità)*. MiPAF-ISZ -Biodiversità e risorse genetiche, 2, 11-31.

- Coolbear, K.P., Keough, K.M. (1983). Lipid peroxidation and gel to liquid-crystalline transition temperatures of synthetic polyunsaturated mixed-acid phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta*, 732, 531-540.
- Cordain, L., Eaton, S. B., Miller, J. B., Mann, N., & Hill, K. (2002). The paradoxical nature of hunter-gatherer diets: meat-based, yet non-atherogenic. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 (Suppl 1), S42-S52.
- Cordain, L., Eaton, S. B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B. A., et al. (2005). Origins and evolution of the western diet: health implications for the 21st century. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 341-54.
- Crouse, J.D., Cross, H.R., Seideman, S.C. (1984). Effects of a grass or grain diet on the quality of three beef muscles. *J. Anim. Sci.*, 58 619-625.
- Cunnane, C. S. & Crawford, M. A. (2003). Survival of the fattest: fat babies were the key to evolution of the large human brain. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136 (Part A), 17-26.
- Cunnane, S. C., Harbige, L. S., & Crawford, M. A. (1993). The importance of energy and nutrient supply in human brain evolution. *Nutrition and Health*, 9, 219-235.
- Day, B. P. (2003). Active packaging. In R. Coles, D. McDowell, & M. Kirwan (Eds.), *Food Packaging Technology*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Daly, C.C., Young, O.A., Graafhuis, A.E., Moorhead, S.M., Easton, H.S. (1999). Some effects of diet on beef meat and fat attributes. *New Zeal. J. Agric. Res.*, 42, 279-287.
- Daun, J.K., Barthet, V.J., Chornick, T.L and Duguid, S. (2003). Structure, composition and variety development of flaxseed. In *Flaxseed in Human Nutrition* (2nd edition) (p. 1-40), AOCS Press, Champaign, IL.
- De Rensis, F. (2001). *Fisiologia degli animali domestici*. San Lazzaro di Savena (BO): Giraldi.
- De Stefanis, G., & Barge, M. T. (1990). Aspetti qualitativi della produzione della qualità della carne bovina. *Parliamo di...produzione della carne bovina*, (p. 59-80). Fossano.
- De Lany, J.P., Blohm, F., Truett, A.A., Scimeca, J.A. and West, D.B. (1999) Conjugated Linoleic Acid Rapidly Reduces Body Fat Content in Mice Without Affecting Energy Intake, *Am. J. Physiol.* 276, R1172–R1179.
- Decker, E.A., Hultin, H.O. (1992). Lipid peroxidation in muscle foods via redox iron. In *Lipid Peroxidation in Foods*. ACS Symposium Series 500. St. Angelo AJ (A cura di). American Chemical Society, Washington, DC, USA.
- Decker, E. A. & Park, Y. (2010). Healthier meat products as functional foods. *Meat Science*, 86, 49–55.
- Dell'Orto, V., & Cheli, F. (2013). La carne rossa in un approccio nutrizionale totale. In *Intersezioni*, 1-4.
- Dell'Orto, V., Sgoifo, Rossi, C.A. (2000) Aspetti nutrizionali e gestionali per la produzione di carne bovina di qualità. *L'Informatore Agrario*, 14, 45-56.
- Delmore, R. J. (2009). ISSUU - Beef Shelf Life by Beef Checkoffs. Tratto il giorno 11 24, 2013 da Beef Research: http://issuu.com/beefcheckoff/docs/beef_shelf-life_fact_sheet

- Dhiman, T. R., Satter, L. D., Pariza, M. W., Galli, M. P., Albright, K., & Tolosa, M. X. (2000). Conjugated Linoleic Acid (CLA) Content of Milk from Cows Offered Diets Rich in Linoleic and Linolenic Acid. *Journal of Dairy Science*, 83(5), 1016-1027.
- Dhiman, T., Olson, K. C., MacQueen, I. S., & Pariza, M. W. (1999). Conjugated linoleic acid content of meat from steers fed soybean oil. *Journal of Dairy Science*, 82(Suppl.1), 84.
- Diez, A. M., Santos, E. M., Jaime, I., & Rovira, J. (2009). Effectiveness of combined preservation methods to extend the shelf life of Morcilla de Burgos. *Meat Science*, 81, 171–177.
- Dobarganes, C. and Marquez-Ruiz, G. (2003). Oxidized fats in foods. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 6(2), 157-163.
- Dutson, T. R., Yates, L. D., L. D., Smith Carpenter, G. C., & Ho, Z. L. (1977). Rigor mortis onset before chilling. *Proc. Recip. Meat Conf.*, 30, 79.
- Eaton, S. B., & Konner, M. (1985). Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *New England Journal of Medicine*, 312, 283-289.
- Eaton, S. B., Konner, M., & Shostak, M. (1988). Stone agers in the fast lane: chronic degenerative diseases in evolutionary perspective. *American Journal of Medicine*, 84, 739-749.
- Elmore, J.S., Mottram, D.S., Enser, M., Wood, J.D. (2009). The effects of diet and breed on the volatile compounds of cooked lamb. *Meat Science*, 55, 149-159
- Enjalbert, F., Nicot, M. C., Bayourthe, C. & Moncoulon, R. (1998). Duodenal infusions of palmitic, stearic or oleic acids differently affect mammary gland metabolism of fatty acids in lactating dairy cows. *The Journal of nutrition*, 128(9), 1525-1532.
- Enser, M. (1987). What is lipid oxidation? *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 1, 151-153.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.*, 11, 81-128.
- Faelli, F. (1903). Razze Bovine, Equine, Suine, Ovine e Caprine. Milano: Hoepli.
- Faucon, A. (1990). Relazione sul tema "Qualità della carne bovina". Torino.
- Faustman, C. and R.G. Cassens (1990). The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review. *Journal of Muscle Foods*, 1, 217-243.
- Federici, C. (2012). Il sistema carne bovina nel 2011. In D. Rama (Ed.), Il mercato della carne bovina. Rapporto 2012 (p. 223. 11-21). Milano: Franco Angeli.
- Fernández-Gines, J. M., Fernández-López, J., Sayas-Barbera, E., & Perez-Alvarez, J. A. (2005). Meat products as functional foods: A review. *Journal of Food Science*, 70, R37–R43.
- Fernandez, X., Monin, G., Culioli, J., Legrand, I. & Quilichini, Y. (1996). Effect of duration of feed withdrawal and transportation time on muscle characteristics and quality in Friesian-Holstein calves. *Journal of Animal Science*, 74, 1576–1583.

- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957) A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues, *J. Biol. Chem.*, 226, 497–509.
- Frank, H, Thiel, D, MacLeod, J. (1989). Mass spectrometric detection of cross-linked fatty acids formed during radical-induced lesion of lipid membranes. *Biochem. J.*, 260, 873-878.
- French, P., Stanton, C., Lawless, F., O'Riordan, E.G., Monahan, F.J., Caffrey, P.J., Moloney, A.P., (2000). Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grass, grass silage, or concentrate-based diets. *J. Anim. Sci.*, 78 2849-2855.
- Frankel, EN. (1987). Secondary products of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*, 44, 73-85.
- Frankel, E.N. (1993). Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oils vs. oxidized vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(8), 767-772.
- Gavarrà, R., & Català, R. (2002). Mass transfer in food/plastic packaging systems. In J. Welti-Chanes, G. V. Barbosa-Canovas, & J. M. Aguilera (A cura di), *Engineering and Food for the 21st Century*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Gaviraghi, A. (2010). Nuovi sistemi d'indagine per la caratterizzazione della qualità della carne bovina. Milano: Università degli Studi di Milano.
- Gianfaldoni, D., & Galafassi, M. V. (1998). Igiene e Qualità delle carni rosse. Eventi post-mortali del tessuto muscolare scheletrico e qualità delle carni, 98. Pisa.
- Gigli, S., Iacurto, M., Giorgetti, A., Bozzi, R., Poli, B. M., Franci, O., et al. (1998). Caratteristiche della qualità della carne di una razza specializzata da carne (Chianina) ed una razza rustica (Maremmana) allevate in Italia. *Taurus Speciale*, 11, 87-92.
- Gigli, S., Failla, S., Iacurto, M., Bonanno, A., Alabiso, M., Mormile, M. (1994) Stima e correlazione dei parametri qualitativi della carne di agnelli appartenenti a diversi tipi genetici. In: *Atti del XLVIII congresso della SISV (Società Italiana di Scienze Veterinarie), Giardini Naxos (ME), 28 settembre-1 ottobre*: 214.
- Gill, C. O. (1990). Controlled atmosphere packaging of chilled meat. *Food Control*, 1, 74-78.
- Gill, C.O. (2003). Active packaging in practice: meat. In R. Ahvenainen (Ed.), *Novel Food Packaging Techniques*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Giorgetti, A. (2003). Quaderni dei Georgofili. La razza bovina Maremmana. Giornata di studio su "Valorizzazione del germoplasma bovino autoctono toscano". III, (p. 59-100). Firenze: Editrice Innocenti.
- Giorgetti, A., Rondina, D., Martini, A., & Forabosco, F. (1999). Slaughter and carcass characteristic of Maremmana young bulls aged from 12 to 20 months. *ASPA XIII Congress. Recent progress in Animal Production Science*, (p. 671-673). Piacenza.
- Giorgetti, A., Rondina, D., Sargentini, C., Martini, A., Funghi, R., Bozzi, R., et al. (1995). Meat and carcass characterization of Maremmana cattle aged 12 and 18 months. *International Symposium on Mediterranean Animal Germplasm and Future Human Challenges*, 85, p. 89-92. Benevento: EAAP.
- Giorgetti, A., Sargentini, C., Martini, A., & Tocci, R. (2009). La razza Maremmana: origini paleontologiche e caratteristiche produttive. Sulle tracce delle podoliche (p. 320). Matera.
- Giuliani, R. (1928). *Rivista di Zootechnia*, 5, 371-381.

- Gramenzi, A., Formigoni, A., Giammarco, M., & Fusaro, I. (2005). Effetti dei coniugati dell'acido linoleico. *L'Informatore Agrario*, 29, 46-48.
- Gregory, N. (2005). Recent concerns about stunning and slaughter. *Meat Science*, 70, 481-491.
- Gray, J.I., Gomma, E.A. and D.J. Buckley. D.J. (1996). Oxidative Quality and Shelf Life of Meats. *Meat Science*, 43(1), S111-S123.
- Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J.-F., Culioli, J. (2001). Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod. Nutr. Dev.*, 41 1-26.
- Goracci, J., Uzielli, M. N., Giuliotti, L., Benvenuti, M. N. (2007). Pascolo e bosco: un legame fondamentale per l'allevamento bovino brado in Toscana, *Taurus Speciale*, 6, 103.
- Grau, R. (1978). Carne e prodotti carnei. Edagricole, Bologna.
- Gregorio, F., & Sudano, M. (2008). Rassegna- Archeologia dell'alimentazione umana. *Giornale Italiano di Diabetologia e Metabolismo*, 28, 223-232.
- Griinari, J. M., Nurmela, K., Dwyer, D. A., Barbano, D. M., & Bauman, D. E. (1999). Variation of milk fat concentration of conjugated linoleic acid and milk fat percentage is associated with a change in ruminal biohydrogenation. *Journal of Animal Science*, 77(Suppl. 1), 117-118.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Lörliger, J. & Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601-617.
- Hannula, T., & Eero, P. (2004). The effect of cooling rate on beef tenderness: The significance of pH at 7 C. *Meat Science*, 67(3), 403-408.
- Homstra, G. (1999). Lipids in functional foods in relation to cardiovascular disease. *Lipids*, 12, S456-S466.
- Hulshof, P. J. M., van Roekel-Jansen, T., van de Bovenkamp, P, West, C. E. (2006). *J. Food Comp. Anal.*, 19 67.
- Hunter, J. E. (2006). Dietary trans fatty acids: review of recent human studies and food industry responses. *Lipids*, 41(11), 967-992.
- Iacurto, M., Gigli, S., & Giorgetti, A. (2003). La qualità della carne: aspetti organolettici e dietetici. *Eurocarni*, 9, 123-125.
- Idel, S., Ellinghaus, P., Wolfrum, C., Nofer, J. R., Gloerich, J., Assmann, G. & Seedorf, U. (2002). Branched chain fatty acids induce nitric oxide-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49319-49325.
- Innis, S. M. & King, D. J. (1999). *Trans* fatty acids in human milk are inversely associated with concentrations of essential all-*cis* n-6 and n-3 fatty acids and determine trans, but not n-6 and n-3, fatty acids in plasma lipids of breast-fed infants. *The American journal of clinical nutrition*, 70(3), 383-390.
- Insani, E. M., Eyherabide, A., Grigioni, G., Sancho, A. M., Pensel, N. A., & Descalzo, A. M. (2008). Oxidative stability and its relationship with natural antioxidants during refrigerated retail display of beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3), 444-452.

- Ip, C., Banni, S., Angioni, E., Carta, G., McGinley, J., Thompson, H. J., & Bauman, D. (1999). Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *The Journal of nutrition*, 129(12), 2135-2142.
- Jacobsen, C. (2008). Preventing lipid oxidation in seafood. In T. Borresen (Ed.), *Improving Seafood Products for the Consumer* (p. 426-460). Woodhead Publishing.
- Jeremiah, L.E. (2001). Packaging alternatives to deliver fresh meats using short- or longterm distribution. *Food Research International*, 34(9), 749-772.
- Jerónimo, E., Alves, S. P., Prates, J. A., Santos-Silva, J., & Bessa, R. J. (2009). Effect of dietary replacement of sunflower oil with linseed oil on intramuscular fatty acids of lamb meat. *Meat science*, 83(3), 499-505.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., & Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: Their role as functional foods. *Meat Science*, 59, 5–13.
- Jiménez-Colmenero, F., Reig, M., & Toldrá, F. (2006). New approaches for the development of functional meat products. In L. M. L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Advanced technologies for meat processing* (p. 275–308). Boca Raton, London, New York. Taylor & Francis Group.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007a). Meat based functional foods. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of food products manufacturing* (p. 989–1015). New Jersey: John Wiley & Son, Inc.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007b). Healthier lipid formulation approaches in meat based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 567–578.
- Jiménez Colmenero, F., Herrero, A., Cofrades, S., & Ruiz-Capillas, C. (2012). Meat and functional foods. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of meat and meat processing* (p. 225–248) (2nd edition). Boca Raton: CRC Press. Taylor & Francis Group.
- Jones, S. J., Starkey, D. L., Calkins, C. R., & Crouse, J. D. (1990). Myofibrillar protein turnover in feed-restricted and realimented beef cattle. *Journal of Animal Science*, 68, 2707–2715.
- Kalsheur, K. F., Teter, B. B., Piperova, L. S., & Erdman, R. A. (1997b). Effect of Fat Source on Duodenal Flow of Trans-C18:1 Fatty Acids and Milk Fat Production in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 80(9), 2115-2126.
- Kalsheur, K. F., Teter, B. B., Piperova, L. S., & Erdman, R. A. (1997a). Effect of Dietary Forage Concentration and Buffer Addition on Duodenal Flow of Trans-C18:1 Fatty Acids and Milk Fat Production in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 80(9), 2104-2114.
- Kaluzny, M., Duncan, L. A., Merritt, M. V., & Epps, D. E. (1985). Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research*, 26 135–140.
- Kay, J. K., Mackle, T. R., Auld, M. J., N. A. Thomson, & Bauman, D. E. (2004). Endogenous Synthesis of cis-9, trans-11 Conjugated Linoleic Acid in Dairy Cows Fed Fresh Pasture. *Journal of Dairy Science*, 87(2), 369-378.
- Kazimierczak, R., et al. (2008). Antioxidant content in black currants from organic and conventional cultivation. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 11(2), 11.

- Kelly, M., Kolver, E. S., Bauman, D. E., Van Amburgh, M. E., & Muller, L. D. (1998). Effect of Intake of Pasture on Concentrations of Conjugated Linoleic Acid in Milk of Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*, 81(6), 1630-1636.
- Kepler, C.R., Tove, S.B. (1967). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III Purification and properties of a linoleate delta 12-*cis*, delta 11-*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrosolvens*. *J. Biol. Chem.*, 242 5686-5692.
- Klont, R. E., Brocks, I. & Eikelenboom, G. (1998). Muscle Fibre Type and Meat Quality. *Meat Science*, 49(Suppl. 1), 219-229.
- Koohmaraie, M. (1992). The role of Ca²⁺ -dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 74, 239-245.
- Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D. H., Crouse, J. D., & Mersman, H. J. (1991). Postmortem proteolysis in *longissimus* muscle from beef, lamb, and pork carcasses. *Journal of Animal Science*, 69, 617-624.
- Koutsoumanis, K.P. & Taoukis, P. (2005). Meat safety, refrigerated storage and transport: Modeling and management. In J. N. Sofos (Ed.), *Improving the Safety of Fresh Meat* (p. 503–561). Cambridge, UK: Woodhead/Publishing.
- Kropf, D. H. (2000). Modified Atmosphere Packaging. In F. Francis (Ed.), *Wiley's Encyclopedia of Food Science and Technology* (Vol. 3, p. 11561-1567). New York: Wiley.
- Lacourt, A., Tarrant, P. V. (1985). Glycogen depletion patterns in myofibres of cattle during stress. *Meat Science*, 15 85-93.
- Ladikos, D. and Lougovois, V. (1990). Lipid Oxidation in Muscle Foods - A Review. *Food Chemistry*, 35(4), 295-314.
- Laidlow, S.A., Shultz, T.D., Cecchino, J.T., & Kopple, J.D. (1988). Plasma and urine taurine levels in vegans. *American Journal of Clinica Nutrition*, 47, 660-663.
- Lambden, A. E., Chadwick, D., & Gill, C. O. (1985). Technical note: oxygen permeability at sub-zero temperatures of plastic film used for vacuum-packaging meat. *Journal of Food Technology*, 20, 281-283.
- Lammens, V., Van de Water, G., Coenegrachts, J., Driessen, B., Peeters, E., Geers, R. (2006). Head current during and blood splashes after electrical stunning in relation to characteristics of the pig's body. *Meat Science*, 72, 140-145.
- Lanza, A., Biondi, L. (1990) Miglioramento e valutazione della qualità della carne negli ovi-caprini. In *Atti del II Simposio Internazionale: "Nuove prospettive della ricerca sugli ovi-caprini."*, Varese-Ville Ponti, 23 novembre (p.129-170).
- Lawrie, R. A., & Ledward, D. A. (2006). *Lawrie's Meat Science* (Seventh English edition). Woodhead Publishing Limited.
- Leonard, W.R., Robertson, M.L., Snodgrass, J.J. & Kuzawa, C. (1994). Evolutionary perspectives on human nutrition: the influence of brain and body size on diet and metabolism. *American Journal of Human Biology*, 6, 77-88.
- Lercker, G. & Rodriguez-Estrada, M. T. (2000). Cholesterol oxidation: Presence of 7-ketocholesterol in different food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 625–631.

- Lev-Ran, A. (1999). Thrifty genotype: how applicable is it to obesity and type 2 diabetes? *Diabetes Reviews*, 1, 1-22.
- Luciano, G., Vasta, V., Monahan, F. J., López-Andrés, P., Biondi, L., Lanza, M., & Priolo, A. (2011). Antioxidant status, colour stability and myoglobin resistance to oxidation of *longissimus dorsi* muscle from lambs fed a tannin-containing diet. *Food Chemistry*, 124(3), 1036-1042.
- Luciano, G., Pauselli, M., Servili, M., Mourvaki, E., Serra, A., Monahan, F. J., Mele, M. (2012). Dietary olive cake reduces the oxidation of lipids, including cholesterol, in lamb meat enriched in polyunsaturated fatty acids. *Meat Science*, 93(3) 703-714.
- Lucifero, M., & Giorgetti, A. (1988). La carne e fattori endogeni ed esogeni all'animale che ne influenzano la produzione di qualità con particolare riferimento alla specie bovina. Roma: CNR.
- Lucifero, M., Jannella G.G., & Secchiari, P. (1977). Origine, evoluzione, miglioramento e prospettive della razza bovina Maremmana. Bologna, Edagricole.
- Lusetti, L. (1983) Principi di scienza dell'alimentazione. Ed. Calderini, Bologna.
- Lynch, M.P., Faustman, C., Silbart, L.K., Rood, D., Furr, H.C. (2001). Detection of lipid-derived aldehydes and aldehyde: protein adducts in vitro and in beef. *J. Food Sci.*, 66, 1093-1099.
- Lynch, P. B., & Kerry, J. P. (2000). Utilizing diet to incorporate bioactive compounds and improve the nutritional quality of muscle foods. In Decker, E.A., Faustman, C. & López-Bote, C. (Eds.), *Antioxidant in muscle foods. Nutritional strategies to improve quality* (p. 455–480). New York: John Wiley & Sons.
- Maddock, T. D., Anderson, V. L., & Lardy, G. P. (2005). Using flax in livestock diets. NDSU - Extension Service. North Dakota State University, Fargo, ND.
- Maijala, K. (2000). Cow milk and human development and well-being. *Livestock Production Science*, 65(1), 1-18.
- Marchello, J. A., Ray, D. E., & Hale, W. H. (1970). Carcass characteristics of beef cattle as influenced by season, sex, and hormonal growth stimulants. *Journal of Animal Science*, 31, 690–696.
- Mariaca, R.G., Berger, T.F.H., Gauch, R., Imhof, M.I., Jeangros, Fernández-Garcia, E., Serrano, C., Nuñez, M. (2002). Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese. 2. Seasonal variation. *J. Dairy Res.*, 69 595-604.
- Marsan, A.P., Crepaldi, P., Colli, L., Pellicchia, M. & Negrini, R. (2008). Econogene Consortium. La genetica molecolare per lo studio della biodiversità ovi-caprina in Europa. *Large Animals Review*, 14(Suppl. 4), 25.
- Marshal, D. M. (1994). Breed differences and genetic parameters for body composition traits in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 72, 2745-2755.
- Martinez, M. (1992). Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *Journal of Pediatrics*, 120, 129-138.
- Martini, A., Giorgetti, A., Rondina, D., Sargentini, C., Bozzi, R., Moretti, M., et al. (2001). The Maremmana, a rustic breed ideal for organic productions. Experimental experiences. *4th Workshop of the Network for Animal Health and Welfare in Organic Agriculture (NAWHOA)*, (p. 211-218). Wageningen.
- Martins, G.J., Plachez, C, Powell, E.M. (2007) Loss of embryonic MET signaling alters profiles of hippocampal interneurons. *Dev. Neurosci*, 29,143–158.

- Mascheroni, E. (1929). Zootecnia Speciale. In AA.VV., Nuova Enciclopedia Agraria. UTET.
- Mascheroni, R. H. (2012). In Mascheroni, R.H. (Ed.), Operations in Food Refrigeration. Boca Raton - London - New York: CRC Press.
- Matassino, D. (1996). L'animale autoctono quale bene culturale. Ruolo del germoplasma animale autoctono nella salvaguardia del territorio. 45, p. 11-12. Bari: Terra pugliese.
- McGuire, M. A., & McGuire, M. K. (2000). Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci. 1999. Journal of Animal Science*, 77, 1-8.
- McVeigh, M.J.M., Tarrant, P.V. (1982). Behavioural stress and skeletal muscle glycogen metabolism in young bulls. *Journal of Animal Science*, 54 790-800.
- Medina, I., Gallardo, J.M. and Aubourg, S.P. (2009). Quality preservation in chilled and frozen fish products by employment of slurry ice and natural antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(8), 1467-1479.
- Mele, M. (2009). Designing milk fat to improve healthfulness and functional properties of dairy products: from feeding strategies to a genetic approach. *Italian Journal of Animal Science*, 8(Suppl. 2), 365-373.
- Mele, M., Serra, A., Pauselli, M., Luciano, G., Lanza, M., Pennisi, P., Morbidini, L. (2013). The use of stoned olive cake and rolled linseed in the diet of intensively reared lambs: effect on the intramuscular fatty-acid composition. *Animal*, 1-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731113001924>
- Milton, K. (1993). Diet and primate evolution. *Scientific American*, 269, 86-93.
- Milton, K. (1999). Nutritional characteristic of wild primate foods: do the diets of our closest living relatives have lessons for us? *Nutrition*, 15, 488-498.
- Min, B. and Ahn, D.U. (2005). Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products -A Review. *Food Science and Biotechnology*, 14(1), 152-163.
- Moeller, P. W., Fields, P. A., P. A., Dutson, T. R., Landmann, W. A., & Carpenter, Z. L. (1976). Effect of high temperature conditioning on subcellular distribution and levels of lysosomal enzymes. *Journal of Food Science*, 41, 216-217.
- Mondry, H. (1996). Packaging systems for processed meat. In T. A. Raimundo, A. Severini, & F. M. Smulders (Eds.), Meat quality and meat packaging (p. 323-356). Utrecht, The Netherlands: European Consortium for Continuing Education in Advanced Meat Science and Technology (ECCEADMST).
- Morrissey, P.A., et al. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, S73-S86.
- National Research Council (NRC). (1996). Carcinogens and anticarcinogens in the human diet. Washington DC.
- Nawar, W. W. (1984). Chemical changes in lipids produced by thermal processing. *Journal of Chemical Education*, 61(4), 299-302.
- Neel, J. V. (1962). Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress". *American Journal of Human Genetics*, 14, 353-362.

- Nudda, A. & Pulina, G. (2010). La Nutraceutica e i prodotti dell'ovinicoltura. Conferenza "I prodotti degli ovini sardi" (p. 1-15). Macomer: Associazione Regionale Allevatori della Sardegna. Consultabile on-line all'indirizzo <http://www.ara.sardegna.it/index.aspx?m=81&f=3&idf=150>.
- Nassu, R. T., Dugan, M. E. R., He, M. L., McAllister, T. A., Aalhus, J. L., Aldai, N., & Kramer, J. K. G. (2011). The effects of feeding flaxseed to beef cows given forage based diets on fatty acids of *Longissimus thoracis* muscle and backfat. *Meat Science*, 89(4), 469-477.
- Okada, K., Wangpoengtrakul, C., Osawa, T., Toyokuni, S., Tanaka, K., Uchida, K. (199). 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 274, 23787-23793.
- O'Keefe, J. H., & Cordain, L. (2004). Cardiovascular disease resulting from a diet and lifestyle at odds with our palaeolithic genome: how to become a 21st-century hunter-gatherer. *Mayo Clin Proc.*, 79, 101-108.
- Orlien, V., Hansen, E. & Skibsted, L. H. (2000). Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism. *European Food Research & Technology*, 211, 99-104.
- Ouali, A. (1992). Proteolytic and physicochemical mechanism involved in meat texture development. *Biochimie*, 74, 251.
- Pariza, M. W., Ashoot, S. H., Chu, F. S. & Lund, D. B. (1979). Effects of temperature and time on mutagen formation in pan fried hamburger. *Cancer Letters*, 7, 63-69.
- Packer, J.E., Slater, T.F. and Willson, R.L. (1979). Direct observations of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278, 737-739.
- Packer, L., & Kagan, V. E. (1993). Vitamin E: The antioxidant harvesting center of membranes and lipoproteins. In *Vitamin E in health and disease*, 179-192.
- Panella, F., Morbidini L., Sarti, F.M. & Sarti D.M. (1995). Caratteristiche delle carcasse e qualità delle carni ovine, con particolare riferimento alla razza merinizzata. In *Atti del Convegno "L'allevamento ovino e caprino in Basilicata: orientamento, attività selettive e patologie"*, Latronico (PZ), 14 dicembre (p. 41-70).
- Patterson, M. F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1400-1409.
- Pedersen, J. I. (2001). More on trans fatty acids. *British Journal of Nutrition*, 85(03), 249-250.
- Peng, S. K., Hu, B. & Morin, R. (1991). Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 5, 144-152.
- Poli, B. M., Giorgetti, A., Sargentini, C., Bozzi, R., Funghi, R., Martini, A. et al. (1996). Studio sui parametri qualitativi della carne di vitelloni maremmani di 12 e 18 mesi di età. *Taurus Speciale*, 7(6), 59-68.
- Poso, A.R., Puolanne, E. (2005). Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Science*, 70 423-434.
- Pozzi, S. M., & Sgoifo Rossi, C. A. (2008). Qualità della carne bovina: gli attori della trasformazione del muscolo in carne. *Eurocarni*, 1, 141-149.
- Purchas, R. W., & Busboom, J. R. (2005). The effect of production system and age on levels of iron, taurine, carnosine, coenzyme Q10 and creatine in beef muscle and liver. *Meat Science*, 70, 589-596.

- Purslow, P. P. (2005). Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Science*, 70, 435-447.
- Raes, K., De Smet, S., & Demeyer, D. (2004). Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 113, 199–221.
- Renieri, C., Silvestrelli, M., Stradaoli, G., Cavallucci, C., Trabalza Marinucci, M. (1993) La qualità della carne nella razza ovina Fabrianese. *L'Allevatore di Ovini e Caprini*, 5, 7-11.
- Resconi, V. C., Campo, M. M., Font i Furnols, M., Montossi, F., & Sañudo, C. (2010). Sensory quality of beef from different finishing diets. *Meat Science*, 86(3), 865-869.
- Richards, M. P. (2002). Brief review of the archaeological evidence for Palaeolithic and Neolithic subsistence. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 1270-1278.
- Risvik, E. (1994). Sensory properties and preferences. *Meat Science*, 36(1), 67-77.
- Rivas-Cañedo, A., Fernández-García, E., & Nuñez, M. (2009). Volatile compounds in fresh meats subjected to high pressure processing: Effect of the packaging material. *Meat Science*, 81, 321–328.
- Robertson, G. L. (2012). Food Packaging. Principles and Practice. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Rodriguez-Estrada, M. T., Penazzi, G., Caboni, M. T., Bertacco, G., & Lercker, G. (1997). Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of hamburgers. *Meat Science*, 45, 365–375.
- Ross, E. W. (1998). Mathematical modeling of quality loss. In Taub, I.A. & Singh, R.P. (Eds.), Food storage stability. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Rotilio, G., & Marchese, E. (2008). Il significato nutrizionale della transizione neolitica nell'evoluzione umana. *Mundus*, 1(1), 133-137.
- Santos-Silva, J., Bessa, R.J.B, Santos-Silva, F. (2002). Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs: II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Production Science*, 77(2), 187-194.
- Sañudo, C., Enser, M.E., Campo, M.M., Nute, G.R., Maria, G., Sierra, I., Wood, J.D. (2000a) Fatty acid composition and sensory characteristics of lamb carcasses from Britain and Spain. *Meat Science*, 54, 339-346
- Sargentini, C., Lucifero, M., Giorgetti, A., Martini, A., & Bozzi, R. (2001). Accrescimenti e qualità della carne di vitelli Maremmani allevati biologicamente. *I Conv. Naz. Zootecnia biologica italiana: risultati e prospettive*, (p. 71-78). Arezzo.
- Sargentini, C., Negrini, R., Bozzi, R., Funghi, R., Martini, A., Rondina, D., et al. (1996). Performance in vita e *post-mortem* di vitelli maremmani puri. *Taurus Speciale*, 7(6), 69-80.
- Sargentini, C., Rondina, D., Bozzi, R., Funghi, R., Giorgetti, A., & Martini, A. (2000). Qualità della carcassa e delle carni di bovini maremmani allevati in feedlot. *XXXV International Symposium of Società Italiana per il Progresso della Zootecnia*, (p. 339-345). Ibla (RG).
- Sargentni, C., & Bozzi, R. (2006). Maremmana. In AA.VV, Risorse genetiche animali autoctone della Toscana (p. 81-90). Firenze: Azienda Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione del Settore Agricolo (ARSIA) - Regione Toscana.

- Sarti, D.M. (1992c) Qualità delle carni ovine. In *Ovinicoltura - UNAPOC, Roma*: 311-314.
- Scaife, J.R., et al. (2000). Influence of alpha-tocopherol acetate on the short- and long-term storage properties of fillets from Atlantic salmon *Salmo salar* fed a high lipid diet. *Aquaculture Nutrition*, 6(1), 65-71.
- Schaefer, A.L., Jones, S.D. M., Stanley, R.W. (1997). Welfare and hygiene during pre-slaughter handling. *Meat Science*, 43, S35-S46.
- Schaefer, A. L., Dubeski, P. L., Aalhus, J. L., Tong, K. W. (2001). Role of nutrition in reducing *ante mortem* stress and meat quality aberration. *Journal of Animal Science*, 79 91-101.
- Schmid, A., Collomb, M., Sieber, R., & Bee, G. (2006). Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review. *Meat Science*, 73, 29–41.
- Scollan, N., Hocquette, J. F., Nuernberg, K., Dannenber, D., Richardson, I., Moloney A. (2006). Innovations in beef production system that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science*, 74 17-33.
- Scott, S. S., Ungar, P. S., Bergstrom, T. S., Brown, C. A., Grine, F. E., Teaford, M. F., et al. (2005). Dental microwear texture analysis shows within species diet variability in fossil hominins. *Nature*, 693-5, 693-695.
- Secchiari, P. L. (2008). Aspetti del valore nutrizionale e nutraceutico degli alimenti di origine animale. *Italian Journal of Agronomy - Rivista di Agronomia*, 3(Suppl. 1), 73-101.
- Secchiari, P. L., Carnier, P., Priolo, A., & Mele, M. (2009). Basi genetiche e fisiologiche della qualità degli alimenti di origine animale. *Italian Journal of Agronomy - Rivista di Agronomia*, 4(Suppl. 1), 81-102.
- Secchiari, P. L., Casarosa, L., Serra, A., & Mele, M. (2011). La qualità nutrizionale della carne di soggetti di razza Bovina Maremmana. I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili. La Razza Bovina Maremmana, 8(Suppl. 1).
- Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Weeler, T. L., & Cundiff, L. V. (1994). Effect of biological type of cattle on the incidence of the dark firm, dry condition in the *Longissimus dorsi* muscle. *Journal of Animal Science*, 72, 337-343.
- Sies, H., Stahl, W., & Sundquist, A. R. (1992). Antioxidant functions of vitamins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 669(1), 7-20.
- Simopoulos, A.P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 70, 560S-569S.
- Singh, T. K., & Cadwallader, K. R. (2003). The shelf life of foods: an overview. In H. W. K. R. Cadwallader (Ed.), *Freshness and Shelf Life of Foods* (Vol. ACS Symposium Series #836). Washington, DC: American Chemical Society.
- Smit, L., Liesbeth, A., Baylin, A., & Campos, H. (2010). Conjugated linoleic acid in adipose tissue and risk of myocardial infarction. *The American journal of clinical nutrition*, 92(1), 34-40.
- Stocker, R., Bowry, V. W. & Frei, B. (1991). Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(5), 1646-1650.

- Suzuky, J., Bailey, M.E. (1985). Direct sampling capillary GLC analysis of flavor volatiles from ovine fat. *J. Agric. Food Chem.*, 33 343-347.
- Tattersall, I. (2006). Once we were not alone. In I. Tattersall, *Evolution: A Scientific American Reader* (p. 280-298). Chicago: University of Chicago Press.
- Taylor, A. (1985). Packaging fresh meat. In R. A. Lawrie (Ed.), *Development in Meat Science* (Vol. 3). Essex, England: Elsevier applied Science Publishers.
- Taylor, A. A., Vega, L., Wood, J. D. & Angold, M. (1994). Extending colour shelf life of MA packed beef by supplementing feed with vitamin E. *Proceedings of the 40th International Congress of Meat Science and Technology*, (vol. IVA) Paper 44.
- Taylor, A. A., Nute, G. R., & Warkup, C. C. (1995). The effect of chilling, electrical stimulation and conditioning on pork eating quality. *Meat Science*, 39(3), 339-347.
- Teaford, M. F., & Ungar, P. S. (2000). Diet and the evolution of the earliest human ancestors. *PNAS*, 97, 3506-3511.
- Thom, E., Wadstein, J., & Gudmundsen, O. (2001). Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *Journal of International Medical Research*, 29(5), 392-396.
- Thurnham, D. I., & Singkamani, R. (1991). The acute phase response and vitamin A status in malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(2), 194-199.
- Tume, R. K., Sikes, A. L., & Smith, S. B. (2010). Enriching *M. sternomandibularis* with alpha-tocopherol by dietary means does not protect against the lipid oxidation caused by high-pressure processing. *Meat Science*, 84, 66-70.
- Uchida, K. and E.R. Stadtman (1993). Covalent Attachment Of 4-Hydroxynonenal To Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase - A Possible Involvement Of Intramolecular And Intermolecular Cross-Linking Reaction. *Journal of biological Chemistry*, 268(9), 6388-6393.
- Valin, C. (1986). Caracteristiques qualitatives et technologiques des viandes bovines: influence des conditions d'abattage et de la technologie. In 15^{ème} *Journées du Grenier de Theix. Ceyrat (France). 5-7 Jun 1984.*
- Varnam & Sutherland (1995). *Meat and meat products*. Chapman & Hall.
- Vestergaard, M., Oksbjerg, N., Henckel, P., (2000). Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on muscle fibre characteristics and meat colour of *semitendinosus*, *longissimus* and *supraspinatus* muscle of young bulls. *Meat Science*, 54, 177-186.
- Viallon, C., Verdier-Metz, I., Denoyer, C., Pradel, P., Coulon, J.B., Berdagué, J.L. (1999). Desorbed terpenes and sesquiterpenes from forages and cheeses. *J. Dairy Res.*, 66, 319-326.
- Viallon, C., Martin, B., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Garel, J.P., Coulon, J.B., Bedagué, J.L. (2000). Transfer of monoterpenes and sesquiterpenes from forages into milk fat. *Lait*, 80, 635-641.
- Watkins, B. A. & Li, Y. (2003). CLA in functional food: enrichment of animal products. *Advances in conjugated linoleic acid research*, 2, 174-188.
- Wegner, J., Albrecht, E., Fielder, I., Teusher, F., Papstein, H. J., & Ender, K. (2000). Growth- and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *Journal of Animal Science*, 78(6), 1485-1496.

- Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V., & Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science*, 86, 196–213.
- WHO - World Health Organization. (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. Ginevra: WHO.
- WHO - World Health Organization. (2005). Preventing chronic diseases: a vital investment. Department of Chronic Diseases and Health Promotion. Ginevra: WHO Press.
- Wiggers, S. B., Kroger-Ohlson, M. V., & Skibsted, L. H. (2004). Lipid oxidation in high pressure processed chicken breast during chill storage and subsequent heat treatment: effect of working pressure, packaging atmosphere and storage time. *European Food Research & Technology*, 219, 167–170.
- Witt W, Rustow B. (1998). Determination of lipoic acid by precolumn derivatization with monobromobimane and reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, 705(1), 127-31.
- Wood, J.D., et al. (2003). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, 66(1), 21-32.
- Wood, J. D., Enser, M., Richardson, R. I., & Whittington, F. M. (2008). Fatty acids in meat and meat products. In C. K. Chow (Ed.), *Fatty acids in foods and their health implications* (p. 87–107). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Wulf, M. D., O'Connor, F. D., Tatum, J. D., & Smith, G. C. (1997). Using objective measures of muscle color to predict beef *longissimus dorsi* tenderness. *Journal of Animal Science*, 75, 684-692.
- Young, O.A., Berdagué, J.-L., Viallon, C., Rousset-Akrim, S., Theriez, M. (1997). Fat-borne volatiles and sheep meat odour. *Meat Science*, 45, 183-200.
- Young, O.A., Lane, G.A., Priolo, A., Fraser, K. (2003). Pastoral and species flavour in lambs raised on pasture, lucerne or maize. *J. Sci. Food Agric.*, 83 93-104
- Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86, 15–31.
- Zhou, G., Xu, X. L., & Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science*, 86, 119–128.

Sitografia

- Associazione Nazionale Allevatori Bovini da Carne, – ANABIC – Consistenze al 31/12/2012 – <http://www.anabic.it/index1.htm>
- Codex Alimentarius – Codice internazionale raccomandato di pratiche generali e principi di igiene http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1225_listaFile_itemName_3_file.pdf
- Consorzio di Tutela Vitellone Bianco dell'Appennino Centrale – Il Disciplinare <http://www.vitellonebianco.it/disciplinare.php>
- EUFIC – European Food Information Council – I Fondamenti 06/2006 – <http://www.eufic.org/article/it/expid/basics-alimenti-funzionali/>

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations –
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5686e/y5686e00.pdf>

ISO – International Organization for Standardization – ISO 9000 Quality Management –
http://www.iso.org/iso/home/standards/management-standards/iso_9000.htm

Ministero della Salute – [Ministero della Salute, 2013;
http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=1225&area=sicurezzaAlimentare&menu=igiene

USDA – United States Department of Agriculture – National Agricultural Library –
<http://www.ion.edu/Global/News%20Announcements/~media/C5CD2DD7840544979A549EC47E56A02B.ashx>

Vocabolario della Lingua Italiana Treccani, 2013 – <http://www.treccani.it/vocabolario/qualita/>

Fonti Normative

Commissione delle Comunità Europee – Progetto di Guida all'applicazione delle procedure basate sui principi del sistema HACCP e alla semplificazione dell'attuazione dei principi del sistema HACCP in talune imprese –
http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1225_listaFile_itemName_0_file.pdf

Regolamento (CE) N. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare – <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:031:0001:0024:IT:PDF>

Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale
http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/veterinary_checks_and_food_hygiene/f84002_it.htm

REGOLAMENTO (CE) N. 834/2007 DEL CONSIGLIO del 28 giugno 2007 relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici e che abroga il regolamento (CEE) n. 2092/91 <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:189:0001:0001:IT:PDF>

REGOLAMENTO (CE) N. 889/2008 DELLA COMMISSIONE del 5 settembre 2008 recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici, per quanto riguarda la produzione biologica, l'etichettatura e i controlli <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:250:0001:0084:IT:PDF>

Regolamento (UE) n. 1169/2011 del Parlamento europeo e del Consiglio del 25/10/2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i Reg.(CE) n. 1924/2006 e (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga la Dir. 87/250/CEE della Commissione, la Dir. 90/496/CEE del Consiglio, la Dir. 1999/10/CE della Commissione, la Dir. 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le Dir. 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il Reg. (CE) n. 608/2004 della Commissione
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:01:IT:HTML>