



LECORDETTI MARCO

5^A Corso Chimici

a.s. 2012 / 2013

“ DULCIS IN FUNGO “

IL CONTRIBUTO NUTRIZIONALE DEI FUNGHI
NELL'ALIMENTAZIONE UMANA



In collaborazione con l'Associazione Micologica Fidentina "Carlo Oriani"



SOMMARIO

SCOPO	4
INTRODUZIONE	4
I fattori nutrizionali	4
I macronutrienti	4
Gli antiossidanti (metaboliti secondari dei funghi)	5
Il genere Boletus (gruppo edulis) in gastronomia	7
PARTE SPERIMENTALE	8
Le ricette	9
Primo piatto	9
Secondo piatto	11
Omogeneizzazione del campione	13
Determinazione della perdita all'essiccamento (acqua)	14
Procedura sperimentale	14
Ottimizzazione delle pesate	14
Determinazione della materia grassa	16
Determinazione delle ceneri	17
Procedura sperimentale	17
Determinazione del contenuto proteico	18
Procedura sperimentale	18

Determinazione dei carboidrati	19
Determinazione degli zuccheri riducenti.....	19
Determinazione del contenuto totale in acidi fenolici	19
Determinazione dei flavonoidi totali	19
Determinazione HPLC di acidi fenolici	19
Messa a punto del metodo.....	20
Scelta della colonna	20
Scelta della miscela eluente	20
Ottimizzazione del gradiente di eluizione.....	20
Estrazione del campione	23
RACCOLTA ED ELABORAZIONE DATI.....	23
RISULTATI E DISCUSSIONE	27
CONCLUSIONI	28
RINGRAZIAMENTI	28
BIBLIOGRAFIA	29

SCOPO

Questa ricerca riguarda la determinazione dei macronutrienti e di alcuni metaboliti secondari (antiossidanti fenolici) in diverse preparazioni gastronomiche realizzate appositamente dall'Istituto Magnaghi di Salsomaggiore Terme. In particolare, sono stati esaminati un primo piatto ed un secondo piatto a base di funghi del genere *Boletus edulis* preparati in doppio, con e senza i funghi. Dal confronto dei valori ottenuti per la stessa pietanza con e senza i funghi, si vuole stimare il contributo di questi ultimi. Per valutare il contenuto di composti fenolici antiossidanti si metterà a punto una metodica quantitativa LC-DAD.

INTRODUZIONE

Vengono passati in esame i principali componenti dei funghi, in particolare quelli del genere *Boletus edulis*, che è oggetto di questo studio.

I fattori nutrizionali

Sono da considerarsi tali tutte le sostanze introdotte con l'alimentazione che forniscono un apporto calorico diretto o intervengono nei processi metabolici svolti dall'organismo sia per ottenere energia sia per tutte le funzioni svolte. In genere si considerano importanti per la nutrizione tutti quei fattori che contribuiscono a definire lo stato di salute. Come forma di prevenzione dal rischio di malattie croniche, in un recente rapporto dell'OMS, si raccomanda di seguire una dieta controllata che prevede un apporto energetico giornaliero così suddiviso

- grassi tra il 15 e il 30% (di cui grassi saturi non oltre il 10%)
- carboidrati fra il 55 e il 75% (di cui zuccheri semplici meno del 10%)
- proteine non oltre il 15%

non più di 5 grammi di sale al giorno (preferibilmente iodato),

almeno 400 grammi rispettivamente di frutta e verdura.

I macronutrienti

Sono rappresentati da proteine, carboidrati e grassi. Tutte queste sostanze devono essere associate in determinate quantità percentuali affinché la dieta sia ben equilibrata.

Le proteine hanno un potere calorico di 4 kcal/gr e sono composte da catene di aminoacidi. Esse sono diffuse in natura come costituenti di tessuti sia animali che vegetali.

I carboidrati rappresentano il fattore nutritivo che fornisce energia di più rapida utilizzazione e si suddividono in monosaccaridi (glucosio, fruttosio), oligosaccaridi (saccarosio o zucchero comune) e polisaccaridi (amidi). Il loro potere calorico è di 4 kcal/gr.

I grassi rappresentano il fattore nutritivo più calorico in quanto apportano 9 kcal/gr. I loro costituenti essenziali sono rappresentati dagli acidi grassi che si dividono in saturi ed insaturi. I primi si trovano negli alimenti di origine animale (carne, burro, formaggio); i secondi in quelli di origine vegetale (olio di oliva, olio di mais, margarine) e nel pesce.

Gli antiossidanti (metaboliti secondari dei funghi)

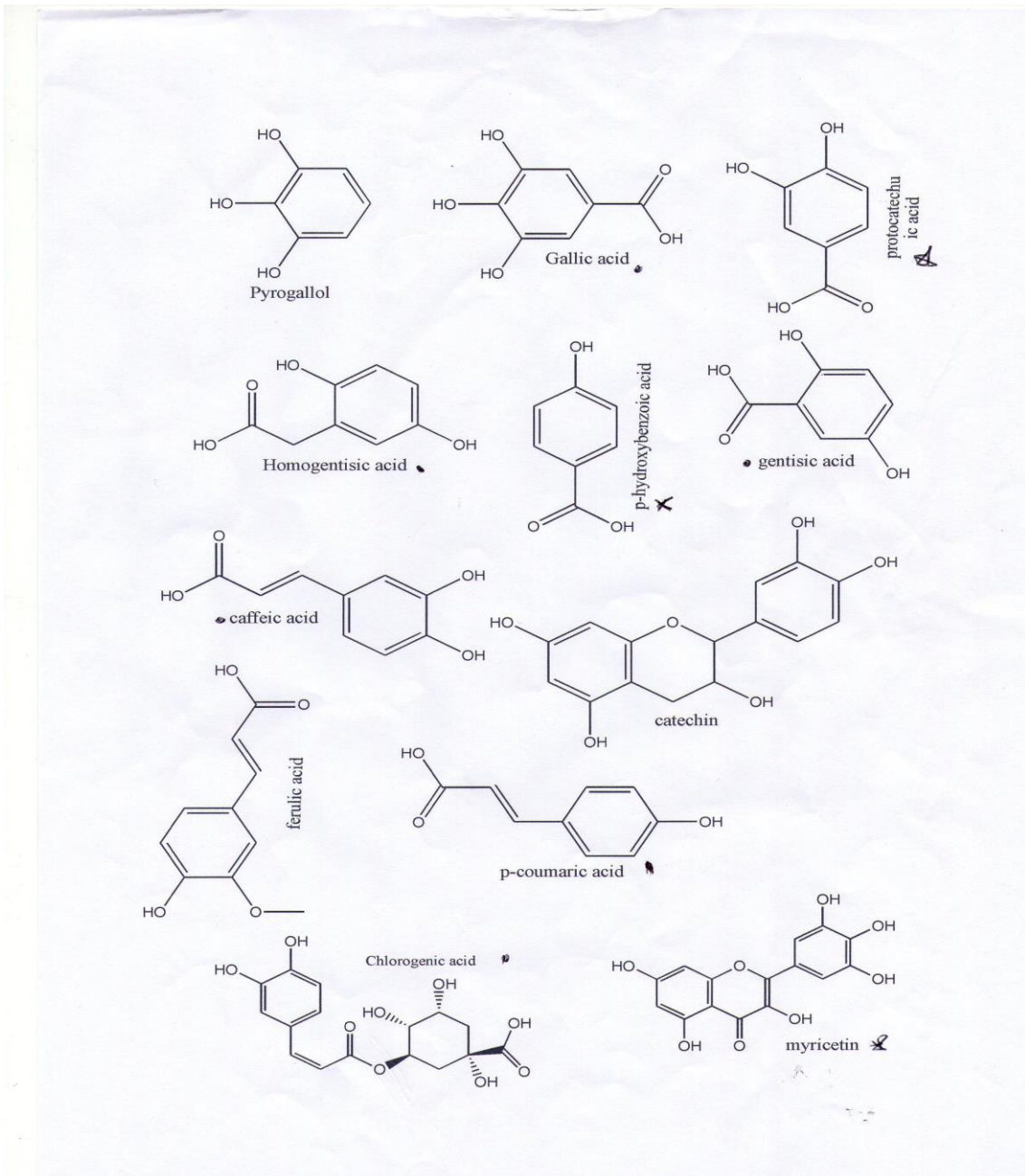
Studi epidemiologici sulla relazione tra abitudini alimentari e rischio di malattia indicano come l'alimentazione abbia un diretto impatto sullo stato di salute. E' generalmente accettato che gli

alimenti di origine vegetale quali frutta, verdura, cereali, legumi, frutta secca esercitino benefici effetti sulla salute in particolar modo nel ritardare le malattie legate all'età. In relazione all'aumento dell'età media della popolazione dei paesi sviluppati sono in continuo aumento le malattie cardiovascolari (CVD), quelle neurodegenerative, il diabete di tipo II ed alcuni tipi di cancro (specie quelli che interessano l'apparato gastrointestinale). Questi problemi hanno spinto

l'OMS a raccomandare l'incremento del consumo di alimenti di origine vegetale, per migliorare lo stato di salute e ritardare gli effetti dell'invecchiamento. Tuttavia questo consiglio è basato su studi che focalizzano la loro attenzione solo su un numero esiguo di sostanze vegetali; inoltre, il beneficio è spesso associato ad un uso prolungato di queste sostanze. La capacità di alcuni alimenti vegetali di ridurre il rischio di patologie croniche è stata associata, almeno in parte, alla presenza di metaboliti secondari generalmente definiti come "phytochemicals" che mostrano possedere molteplici attività biologiche. Queste sostanze possiedono un'attività modesta se confrontata con quella dei farmaci ma, siccome sono ingeriti frequentemente in elevate quantità, possono esercitare un certo effetto biologico. I phytochemicals presenti nella dieta ed associati ai benefici effetti sulla salute sono rappresentati dai glucosinolati, dai composti solforati, dai terpenoidi e in particolare monoterpeni, carotenoidi e fitosteroli, da diverse sostanze fenoliche come le antocianine, i flavoni, i flavan-3-oli, gli isoflavoni, gli stilbenoidi, l'acido ellagico e derivati e, in misura minore da saponine e betaine. Le loro proprietà benefiche sono state, almeno in parte, legate alle loro capacità antiossidanti in grado di limitare i radicali liberi, ritenuti cofattori

nello sviluppo di molte patologie degenerative, di infiammazioni croniche, nell'ossidazione delle LDL, del DNA ecc. (2)

Non esiste una dose raccomandata per gli antiossidanti per cui il loro apporto al regime dietetico è comunque da considerarsi positivo.



"Acidi fenolici"

Il genere *Boletus* (gruppo *edulis*) in gastronomia

Fanno parte del gruppo dell'*edulis* quattro specie di funghi, il *B. edulis*, il *B. aereus*, il *B. aestivalis*, e il *B. pinophilus*. Molto meglio conosciuto come fungo porcino è particolarmente apprezzato in gastronomia ed utilizzato per preparare una grandissima varietà di ricette dall'antipasto al dolce. Esso contiene:

carboidrati	5.60	sodio	0.006
Grassi	0.40	Vitamina B1	0.00003
Proteine	2.80	Vitamina B2	0.00037
calcio	0.009	Vitamina C	0.0025
Ferro	0.001	Vitamina E	0.00063
Fosforo	0.015		

Tabella del contenuto in grammi per 100 gr di *Boletus*

Il contenuto in acidi fenolici espresso in ppm riferiti al fungo secco per il *B. edulis* è desumibile dalla seguente tabella ². Fra parentesi la deviazione standard calcolata su sei punti.

	<i>A. bisponus</i>	<i>B. edulis</i>	<i>C. cibarius</i>	<i>C. cornucopioides</i>	<i>C. gambosa</i>	<i>H. marzuolus</i>	<i>L. deliciosus</i>	<i>P. ostreatus</i>
Caffeic acid	15.54 (0.42)	15.09 (1.07)	16.34 (0.30)	n.d.	14.92 (0.02)	14.59 (0.07)	15.51 (0.51)	n.d.
Catechin	0.51 (0.01)	n.d.	5.82 (0.74)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Chlorogenic acid	63.73 (0.74)	62.79 (0.70)	n.d.	n.d.	63.04 (0.62)	n.d.	62.70 (0.21)	n.d.
p-Coumaric acid	10.38 (0.10)	0.87 (0.01)	n.d.	n.d.	n.d.	4.69 (0.19)	n.d.	11.15 (0.85)
Ferulic acid	16.37 (1.89)	n.d.	10.38 (0.40)	14.03 (0.57)	14.52 (0.55)	n.d.	11.43 (0.85)	20.16 (0.16)
Gallic acid	94.90 (4.50)	212.96 (8.25)	161.83 (3.78)	118.78 (2.01)	113.24 (2.84)	165.20 (3.48)	162.42 (10.09)	290.34 (3.61)
Gentisic acid	n.d.	60.85 (3.97)	53.97 (1.31)	n.d.	38.55 (2.50)	158.46 (2.48)	57.67 (1.89)	292.62 (3.42)
p-Hydroxybenzoic acid	15.39 (0.71)	24.07 (0.89)	15.68 (1.03)	6.28 (0.27)	11.30 (0.33)	5.49 (0.48)	21.40 (1.64)	4.69 (1.59)
Homogentisic acid	344.430 (15.87)	2290.97 (13.90)	316.76 (9.46)	851.86 (9.77)	4280.11 (7.03)	340.71 (3.17)	366.80 (7.91)	629.86 (1.54)
Myricetin	22.26 (1.72)	17.98 (0.76)	23.27 (0.29)	35.91 (0.98)	20.75 (0.39)	n.d.	20.86 (0.86)	21.99 (0.89)
Protocatechuic acid	16.21 (4.78)	168.46 (5.60)	42.79 (1.42)	5.31 (0.25)	36.96 (2.54)	14.59 (0.80)	18.64 (0.32)	19.32 (0.84)
Pyrogallol	258.70 (3.95)	n.d.	91.09 (0.83)	92.34 (1.69)	240.07 (3.38)	n.d.	26.28 (0.30)	n.d.

n.d.: not detected.

L'apporto energetico di 100 gr di porcino è stimato in 29 Kcal circa.

PARTE SPERIMENTALE

FASE I

Progettazione delle ricette da parte dell'Istituto Alberghiero di Salsomaggiore e realizzazione a cura degli studenti seguiti dallo chef Bontempo.



Gli studenti del Magnaghi all'opera

Le ricette

(tutte le ricette sono riferite per quantità a quattro persone)

Primo piatto

I cannelloni di risotto ai funghi porcini su cespuglio di bosco con la sua salsa, parmigiano croccante e fantasia di caramello all'aceto balsamico.

Per i cannelloni:

300 g di riso tipo Carnaroli

270 g di funghi porcini freschi o congelati (trifolati)

1 spicchio d'aglio senza anima (parte interna)

20 g di cipolla

5 cl olio di oliva

2 l di brodo vegetale

70 g di burro

4 fette di prosciutto

70 g di parmigiano reggiano grattugiato

10 cl di vino bianco secco

30 g di prezzemolo fresco tritato

Per la salsa:

300 ml di latte intero fresco

15 g di burro

15 g di farina tipo 00

100 g di funghi porcini freschi o surgelati (trifolati)

Per il cespuglio di bosco:

30 g di timo fresco

30 g di prezzemolo riccio

Per la finitura:

100 g di parmigiano reggiano stagionato

20 g di timo fresco

5 cl di caramello all' aceto balsamico

Pulire i funghi porcini, rosolare nell'olio lo spicchio d'aglio e aggiungere i funghi. Bagnare con del vino bianco, lasciare evaporare e condire i funghi con sale e prezzemolo tritato. A parte tostare il riso in un fondo di olio e cipolla tritata. Bagnare con vino bianco, lasciare evaporare e iniziare la cottura con brodo, aggiungere a circa metà cottura i funghi preparati precedentemente. Cuocere il riso per circa 18/20 minuti. Mantecare con tocchetti di burro freddi e parmigiano. Stendere il riso su una teglia e lasciare raffreddare.

Stendere le fette di prosciutto, disporre su ogni fetta una parte del risotto preparato e arrotolare il prosciutto su se stesso. Disporre i cannelloni così preparati in una pirofila precedentemente imburata. Con il latte, la farina e il burro preparare una besciamella a cui aggiungere i funghi trifolati (rosolati in padella come il riso). Versare la besciamella sui cannelloni di prosciutto, cospargere con del parmigiano reggiano e gratinare in forno alla temperatura di circa 180° C per 15 minuti.

A parte, con una padella antiaderente, preparare delle cialde di parmigiano.

Scaldare la padella antiaderente, versare del parmigiano fino a quando quest'ultimo non si sarà fuso. Togliere dalla padella e lasciare raffreddare. Si può anche modellare.

Per la finitura:

Disporre i cannelloni nel piatto, creare un cespuglio con il timo e il prezzemolo riccio, disporre una o due cialde di parmigiano sui cannelloni e variegare a piacere con il caramello all'aceto balsamico.



Il primo piatto ultimato

Secondo piatto

La nocetta di vitello farcita con porcini, basilico fresco e menta fresca, su zuppetta di funghi e pane tostato

Per la nocetta:

480 g di noce di vitello tagliata a fette

350 g di funghi porcini (trifolati)

200 g di patate lesse

120 g di formaggio tipo fontina

40 g di basilico fresco

20 g di menta fresca

30 g di parmigiano grattugiato

1 spicchio d'aglio senza anima

3 cl di vino bianco secco

Noce moscata q.b.

1 uovo

Per la pastella

200 g di farina tipo 00

50 g acqua

150 g di pane grattugiato

Sale q.b.

Per la zuppa:

200 g di funghi porcini

1 spicchio d'aglio senza anima

2 cl di vino bianco

1 foglia di alloro

10 g di prezzemolo fresco

150 ml di brodo vegetale

10 g di maizena

10 g di concentrato di pomodoro

Per la finitura:

10 g di rosmarino fresco

4 fette di pane casareccio leggermente tostate

Battere le fette di noce di vitello e salare. A parte rosolare in padella i funghi con l'aglio, aggiungendo vino bianco per sfumare e prezzemolo tritato. Aggiungere i funghi alle patate lesse precedentemente schiacciate e condire con il formaggio tipo fontina tagliato a piccoli dadini, basilico fresco, menta fresca leggermente tritata parmigiano, uovo e un pizzico di noce moscata.

Farcire la carne chiudendola da un lato. Appiattare la giuntura con l'aiuto di un batti carne. A parte preparare una pastella con acqua e farina e immergervi la carne e passarla subito nel pane grattugiato e impanare. Rosolare la carne in padella in abbondante olio da entrambi i lati.

A parte preparare la zuppa, facendo brasare funghi con aggiunta di concentrato di pomodoro in un tegame per circa 15 minuti. Legare con la maizena sciolta in un po' d'acqua.

Finitura del piatto:

Completare la cottura della nocetta di vitello in forno a 170° C per circa 12 minuti. Adagiare nel piatto, nappare con la zuppa di funghi, decorare con un rametto di rosmarino fresco e il pane tostato.



Il secondo piatto ultimato

FASE II

Il prodotto così preparato viene omogeneizzato ed analizzato dalla classe quinta del Corso Chimici del Berenini divisa in gruppi. Tutte le analisi vengono eseguite almeno in doppio.

Omogeneizzazione del campione

Per garantire che le pesate del campione siano rappresentative e ripetibili si tratta l'intera pietanza con un omogeneizzatore a lama ottenendo una purea omogenea che viene conservata a – 20°C .

Determinazione della perdita all'essiccamento (acqua)

Tale operazione viene eseguita anche come trattamento preliminare per la determinazione delle ceneri.

Procedura sperimentale

1. Portare a peso costante una capsula di porcellana a fondo piatto.
2. Pesare circa esattamente fra i 6 ed i 10 grammi di campione omogeneizzato direttamente nella capsula.
3. Porre la capsula in stufa a 107°C per 19 ore
4. Raffreddare in essiccatore e portare a peso costante.
5. Calcolare la % di acqua con la formula
6. $\% \text{ acqua} = [(\text{massa capsula} + \text{prodotto secco}) - (\text{massa capsula})] \times 100 / (\text{massa prodotto fresco})$

Ottimizzazione delle pesate

È importante per la determinazione dei macronutrienti stimarne preventivamente la composizione percentuale nella pietanza, in modo da utilizzare la quantità di campione adeguata al metodo di analisi utilizzato.

Si riportano quindi le composizioni per ogni ingrediente utilizzato e, tenendo conto della quantità di acqua presente, delle quantità previste dalla ricetta e delle masse di pietanze realizzate, si calcolano le quantità attese di proteine, grassi e carboidrati (in rosso in tabella).

PRIMO PIATTO CON FUNGHI

Ingrediente	quant. (grammi)	%	nell'alimento			grammi nella pietanza			nella pietanza		
			prot. %	grassi %	carb. %	proteine	grassi	carb. %	prot. %	grassi %	carb. %
Riso carnaroli	300	8,56	8	0,89	78	24,00	2,67	234,00	1,04	0,12	10,17
Funghi porcini	370	10,55	2,5	0,1	4,3	9,25	0,37	15,91	0,40	0,02	0,69
Cipolla	20	0,57	1,1	0,1	9,34	0,22	0,02	1,87	0,01	0,00	0,08
Olio di oliva	46	1,31	0	100	0	0,00	46,00	0,00	0,00	2,00	0,00
Burro	85	2,42	0,85	81,11	0,06	0,72	68,94	0,05	0,03	3,00	0,00
Prosciutto cotto	40	1,14	19,8	14,7	0,9	7,92	5,88	0,36	0,34	0,26	0,02
Parmigiano reggiano	170	4,85	38,46	28,61	4,06	65,38	48,64	6,90	2,84	2,11	0,30
Prezzemolo	60	1,71	2,97	0,79	6,33	1,78	0,47	3,80	0,08	0,02	0,17
Latte intero	300	8,56	3,15	3,25	4,8	9,45	9,75	14,40	0,41	0,42	0,63
Farina	15	0,43	13,21	2,5	71,97	1,98	0,38	10,80	0,09	0,02	0,47
Timo	50	1,43	5,56	1,68	24,45	2,78	0,84	12,23	0,12	0,04	0,53
Caramello	50	1,43	1,5	0,1	65,9	0,75	0,05	32,95	0,03	0,00	1,43
Brodo vegetale	2000	57,05	0,46	0,06	2,63	9,20	1,20	52,60	0,40	0,05	2,29
Totale peso fresco	3506	100				% nella pietanza			5,80	8,05	16,78
totale peso pietanza	2300										

PRIMO PIATTO SENZA FUNGHI

Ingrediente	quant. (gr.)	%	nell'alimento			grammi nella pietanza			nella pietanza		
			prot. %	grassi %	carb. %	proteine	grassi	carb. %	prot. %	grassi %	carb. %
Riso carnaroli	300	9,57	8	0,89	78	24	2,67	234	1,14	0,13	11,14
Funghi porcini			2,5	0,1	4,3	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Cipolla	20	0,64	1,1	0,1	9,34	0,22	0,02	1,868	0,01	0,00	0,09
Olio di oliva	46	1,47	0	100	0	0	46	0	0,00	2,19	0,00
Burro	85	2,71	0,85	81,11	0,06	0,7225	68,9435	0,051	0,03	3,28	0,00
Prosciutto cotto	40	1,28	19,8	14,7	0,9	7,92	5,88	0,36	0,38	0,28	0,02
Parmigiano reggiano	170	5,42	38,46	28,61	4,06	65,382	48,637	6,902	3,11	2,32	0,33
Prezzemolo	60	1,91	2,97	0,79	6,33	1,782	0,474	3,798	0,08	0,02	0,18
Latte intero	300	9,57	3,15	3,25	4,8	9,45	9,75	14,4	0,45	0,46	0,69
Farina	15	0,48	13,21	2,5	71,97	1,9815	0,375	10,7955	0,09	0,02	0,51
Timo	50	1,59	5,56	1,68	24,45	2,78	0,84	12,225	0,13	0,04	0,58
Caramello	50	1,59	1,5	0,1	65,9	0,75	0,05	32,95	0,04	0,00	1,57
Brodo vegetale	2000	63,78	0,46	0,06	2,63	9,2	1,2	52,6	0,44	0,06	2,50
Totale peso fresco	3136	100				% nella pietanza			5,91	8,80	17,62
totale peso pietanza	2100										

SECONDO PIATTO CON FUNGHI

Ingrediente	quant. (gr.)	%	nell'alimento			grammi nella pietanza			nella pietanza		
			prot. %	grassi %	carb. %	proteine	grassi	carb. %	prot. %	grassi %	carb. %
Noce di vitello	480	15,43	18,89	9,14	0	90,672	43,872	0	3,07	1,49	0,00
Funghi porcini	550	17,68	2,5	0,1	4,3	13,75	0,55	23,65	0,47	0,02	0,80
Patate lesse	200	6,43	2,86	0,1	17,2	5,72	0,2	34,4	0,19	0,01	1,17
Fontina	120	3,86	25,6	31,14	1,55	30,72	37,368	1,86	1,04	1,27	0,06
Basilico	40	1,29	3,15	0,64	2,65	1,26	0,256	1,06	0,04	0,01	0,04
Menta	20	0,64	3,29	0,73	8,41	0,658	0,146	1,682	0,02	0,00	0,06
Parmigiano grattugiato	30	0,96	38,46	28,61	4,06	11,538	8,583	1,218	0,39	0,29	0,04
Vino bianco secco	50	1,61	0,07	0	2,6	0,035	0	1,3	0,00	0,00	0,04
Uovo	30	0,96	12,58	10,61	1,12	3,774	3,183	0,336	0,13	0,11	0,01
Farina 00	200	6,43	13,21	2,5	71,97	26,42	5	143,94	0,90	0,17	4,88
Acqua	500	16,08	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Pane grattugiato	150	4,82	13,25	5,3	71,98	19,875	7,95	107,97	0,67	0,27	3,66
Prezzemolo fresco	10	0,32	2,97	0,79	6,33	0,297	0,079	0,633	0,01	0,00	0,02
Brodo vegetale	600	19,29	0,46	0,06	2,63	2,76	0,36	15,78	0,09	0,01	0,53
Maizena	10	0,32	0,48	0,3	83,85	0,048	0,03	8,385	0,00	0,00	0,28
Concentrato di pomodoro	10	0,32	4,32	0,47	18,91	0,432	0,047	1,891	0,01	0,00	0,06
Rosmarino	10	0,32	3,31	5,86	20,7	0,331	0,586	2,07	0,01	0,02	0,07
Pane tostato	100	3,22	9	4	54,4	9	4	54,4	0,31	0,14	1,84
Totale peso fresco	3110	100				% nella pietanza			7,37	3,80	13,58
totale peso pietanza	2950										

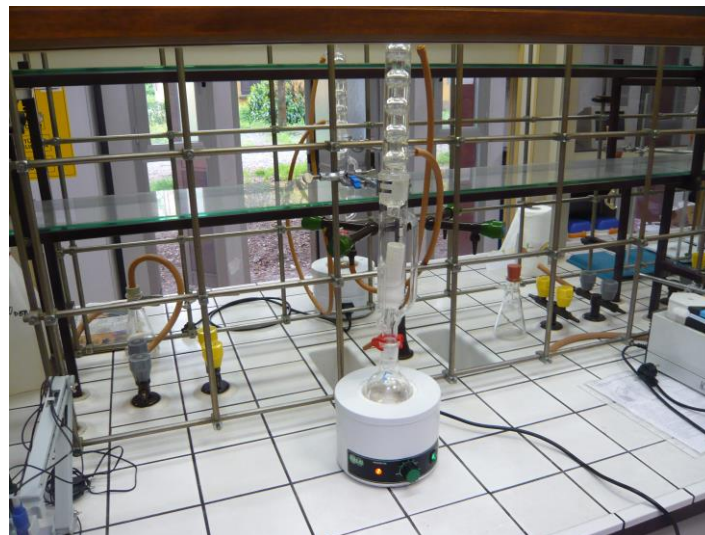
SECONDO PIATTO SENZA FUNGHI

Ingrediente	quant. (gr.)	%	nell'alimento			grammi nella pietanza			nella pietanza		
			prot. %	grassi %	carb. %	proteine	grassi	carb. %	prot. %	grassi %	carb. %
Noce di vitello	480	18,75	18,89	9,14	0	90,672	43,872	0	3,94	1,91	0,00
Funghi porcini		0,00	2,5	0,1	4,3	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Patate lesse	200	7,81	2,86	0,1	17,2	5,72	0,2	34,4	0,25	0,01	1,50
Fontina	120	4,69	25,6	31,14	1,55	30,72	37,368	1,86	1,34	1,62	0,08
Basilico	40	1,56	3,15	0,64	2,65	1,26	0,256	1,06	0,05	0,01	0,05
Menta	20	0,78	3,29	0,73	8,41	0,658	0,146	1,682	0,03	0,01	0,07
Parmigiano grattugiato	30	1,17	38,46	28,61	4,06	11,538	8,583	1,218	0,50	0,37	0,05
Vino bianco secco	50	1,95	0,07	0	2,6	0,035	0	1,3	0,00	0,00	0,06
Uovo	30	1,17	12,58	10,61	1,12	3,774	3,183	0,336	0,16	0,14	0,01
Farina 00	200	7,81	13,21	2,5	71,97	26,42	5	143,94	1,15	0,22	6,26
Acqua	500	19,53	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Pane grattugiato	150	5,86	13,25	5,3	71,98	19,875	7,95	107,97	0,86	0,35	4,69
Prezzemolo fresco	10	0,39	2,97	0,79	6,33	0,297	0,079	0,633	0,01	0,00	0,03
Brodo vegetale	600	23,44	0,46	0,06	2,63	2,76	0,36	15,78	0,12	0,02	0,69
Maizena	10	0,39	0,48	0,3	83,85	0,048	0,03	8,385	0,00	0,00	0,36
Concentrato di pomodoro	10	0,39	4,32	0,47	18,91	0,432	0,047	1,891	0,02	0,00	0,08
Rosmarino	10	0,39	3,31	5,86	20,7	0,331	0,586	2,07	0,01	0,03	0,09
Pane tostato	100	3,91	9	4	54,4	9	4	54,4	0,39	0,17	2,37

Totale peso fresco	2560	100	% nella pietanza			8,85	4,85	16,39
totale peso pietanza	2300							

Tablelle per le quantità attese di macronutrienti**Determinazione della materia grassa**

Il metodo si basa su estrazione con Soxhlet dei campioni preventivamente essiccati in stufa.



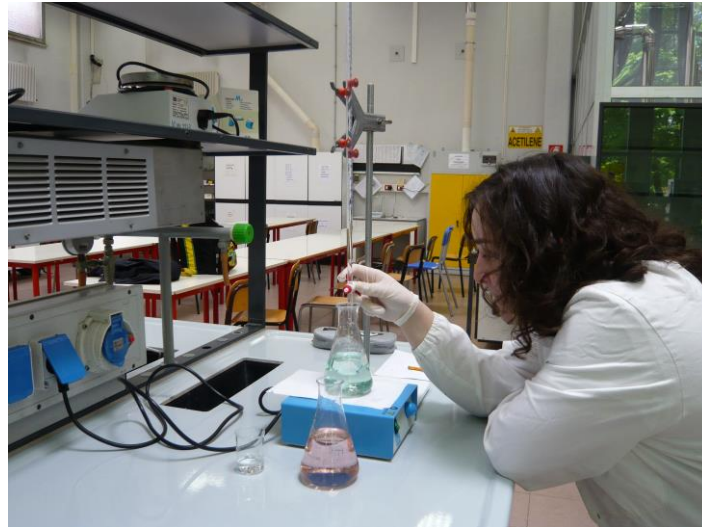
Determinazione delle ceneri



Procedura sperimentale

Il campione usato per la determinazione dell'umidità viene portato su bunsen e bruciato lentamente quindi in muffola a 450°C fino a colorazione debolmente grigia. Lasciare raffreddare in essiccatore e pesare.

Determinazione del contenuto proteico



Procedura sperimentale

- Introdurre in un provettone Kjeldhal circa esattamente 1 grammo di campione tal quale
- Aggiungere il catalizzatore al selenio con aggiunta di solfato rameico (1 pastiglia)
- Aggiungere 20 mL di acido solforico concentrato
- Digerire sino ad ottenere una soluzione limpida in apparecchio di Kjeldhal alla temperatura di 470 °C
- Lasciar raffreddare e distillare in corrente di vapore previa aggiunta di 180 mL di NaOH 32% per 6 minuti raccogliendo il distillato in 50 mL di soluzione di acido borico al 2% in presenza di indicatore misto
- Titolare il distillato con acido cloridrico 0,1N sino a viraggio dell'indicatore (da verde a rosa)
- Calcolare la percentuale di proteine con la seguente formula

$$\% \text{ proteine} = \frac{N_{\text{HCl}} \times \text{mL}_{\text{HCl}} \times 14 \times 100 \times 6,38}{1000 \times g_{\text{campione}}}$$

In cui N_{HCl} è la normalità dell'acido

mL_{HCl} è il volume in mL di acido utilizzati nella titolazione

g_{campione} è la massa del campione tal quale

Determinazione dei carboidrati

La determinazione dei carboidrati è stata eseguita per differenza:

$$\% \text{ carb.} = 100 - (\% \text{ prot} + \% \text{ grassi} + \% \text{ H}_2\text{O} + \% \text{ ceneri})$$

Determinazione degli zuccheri riducenti

La determinazione è stata effettuata utilizzando il metodo di Fehling.

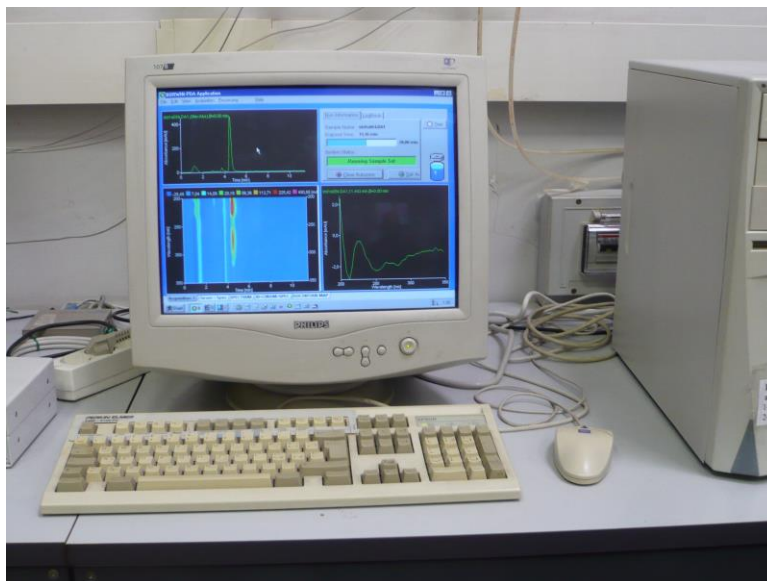
Determinazione del contenuto totale in acidi fenolici

È stato utilizzato il metodo Folin- Ciocalteu⁽⁴⁾

Determinazione dei flavonoidi totali

Tale determinazione viene effettuata per quantificare il contenuto di flavonoidi totali. In seguito vengono mostrate le procedure sperimentali seguite (spettrofotometria UV/VIS).

Determinazione HPLC di acidi fenolici



Tale determinazione viene effettuata per poter valutare il contenuto di ogni acido fenolico oltre che per stimare la differenza nella quantità di antiossidanti nelle varie pietanze con e senza i funghi.

Messa a punto del metodo

La matrice da analizzare è particolarmente complessa e gli analiti sono molteplici per cui è necessario mettere a punto un metodo che tenga conto anche delle peculiarità della strumentazione presente in laboratorio.

Scelta della colonna

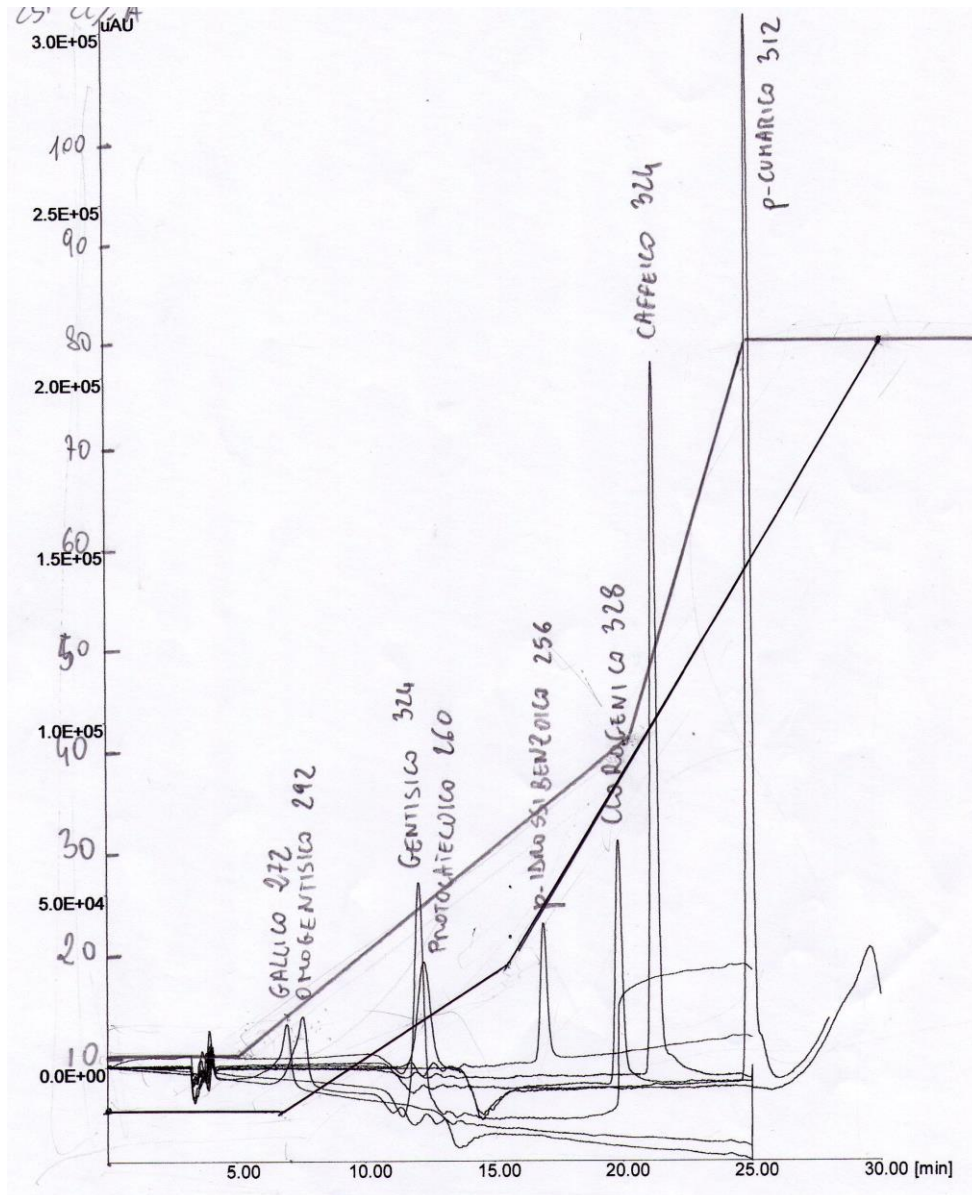
È stata scelta una colonna non polare in quanto la fase stazionaria deve essere simile per polarità agli analiti in questione che sono essenzialmente sostanze apolari. Occorre una elevata efficienza in quanto la miscela da separare è piuttosto complessa. La colonna ritenuta più idonea per la separazione è una Hypersil ODS ad elevata ricopertura con una lunghezza di 25 cm, diametro interno di 4,6 mm e dimensione particellare della fase stazionaria di 5 micrometri.

Scelta della miscela eluente

Allo scopo di garantire la massima interazione con la fase stazionaria, la miscela dovrebbe contenere gli acidi fenolici in forma protonata, perciò sarebbe ideale l'uso di una soluzione tampone a pH 2.7 in quanto la pKa dell'analita a maggior acidità, l'acido gallico, presenta un valore di 4.7 circa. Inoltre, al fine di ottenere una buona separazione, occorre utilizzare un gradiente di eluizione che presenti una elevata percentuale di modificante organico, in quanto alcuni componenti presentano una elevata affinità con la fase stazionaria con conseguente permanenza eccessiva in colonna. L'elevata presenza di modificante organico, tuttavia, potrebbe causare fenomeni di precipitazione del tampone. Si preferisce quindi utilizzare una soluzione di acido acetico in alternativa al tampone. Il modificante organico che si utilizza deve avere inoltre una elevata costante dielettrica per cui la scelta ricade sul metanolo.

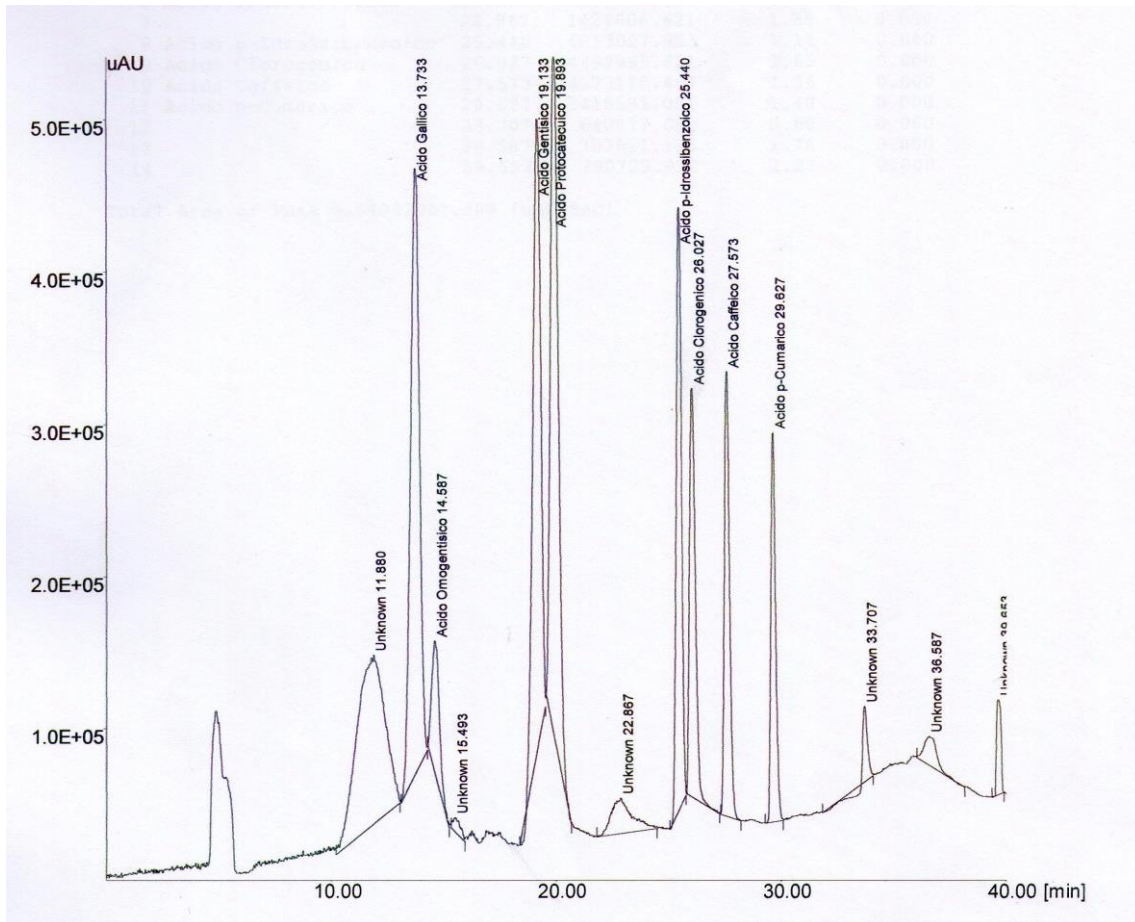
Ottimizzazione del gradiente di eluizione

È essenzialmente un processo empirico che prevede di utilizzare alcune iniezioni di prova seguite da correzioni successive del gradiente di eluizione. Il metodo usato utilizza il cromatogramma di una miscela di standard in cui sull'asse delle ordinate viene posta la percentuale di modificante organico evidenziando con una linea spezzata il gradiente utilizzato.



Cromatogramma per l'ottimizzazione del gradiente di eluizione

Si può osservare che i primi picchi necessitano di maggior separazione per cui si disegna una seconda linea spezzata (linea più in basso) che preveda un rallentamento nelle condizioni iniziali, utilizzando una minor percentuale di modificante organico. Anche la seconda rampa presenterà una minore pendenza e quindi una crescita più lenta della forza dell'eluente.



Cromatogramma riferito a condizioni ottimizzate

La separazione è accettabile e l'identificazione dei picchi è stata effettuata iniettando singolarmente gli standard di ogni analita e registrando lo spettro di ciascuno.

Le condizioni ottimizzate risultano essere le seguenti:

Flusso: 0,6 ml/min

Eluente A: Acido acetico 0,1% - metanolo (95 – 5)

Eluente B: Metanolo

Gradiente di eluizione

Step1: Per 7 minuti 100% A

Step2: In 8 minuti all' 85% A

Step3: in 15 minuti al 22% A

Step4: per 10 minuti al 22% A

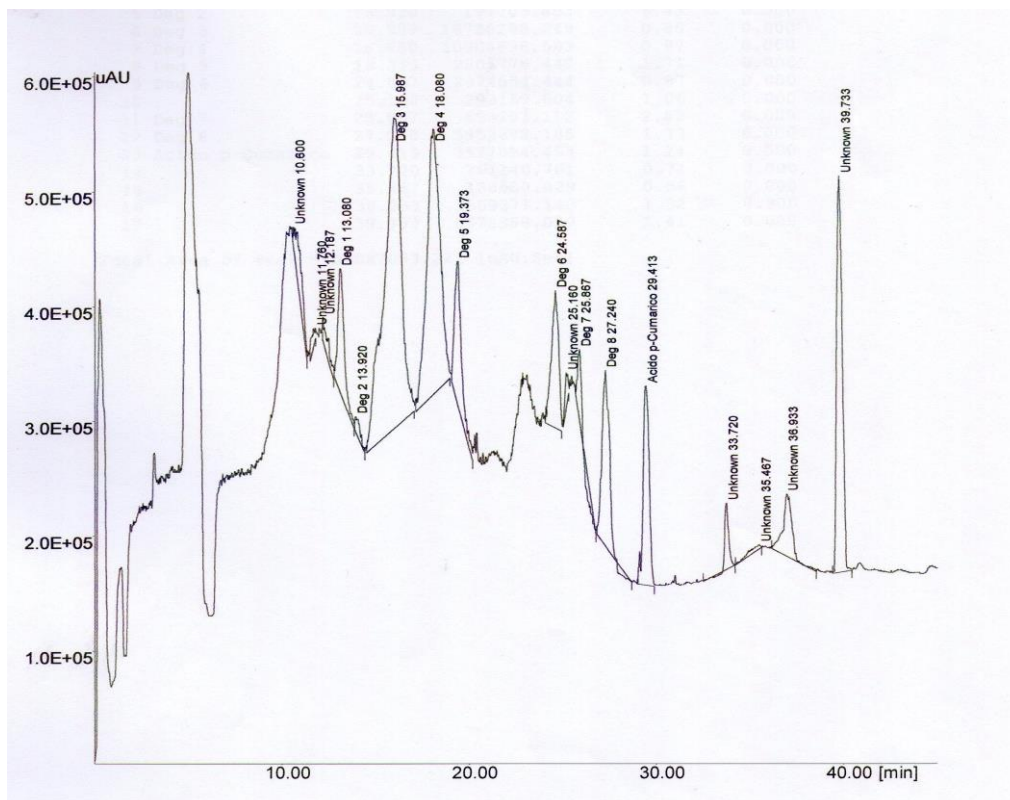
L'acquisizione viene effettuata in modalità maxABS ovvero utilizzando il massimo assorbimento possibile per ogni analita compreso fra i 200 e i 380 nm.

Estrazione del campione

Il metodo di estrazione prevede la procedura descritta da Praveen K. e altri ⁽³⁾ con alcune modifiche: 5 gr di campione vengono estratti con 15 ml di metanolo a 65°C per 24 ore. Si filtra e il residuo viene estratto con altri 40 ml di metanolo a 65 °C per 24ore. Gli estratti vengono raccolti e distillati al rotavapor. Per l'analisi in campione viene recuperato con 3 ml di metanolo.

RACCOLTA ED ELABORAZIONE DATI

Vengono integrati i cromatogrammi di standard e campioni. Si nota immediatamente che nei campioni non sono presenti gli analiti, ma diversi picchi con spettri riconducibili comunque a composti fenolici. Per verificare che tali picchi siano dovuti comunque alle sostanze previste si procede a trattamento termico (cottura) della miscela standard per 15 minuti in ambiente acquoso. La miscela così trattata presenta gli stessi picchi presenti nel campione a dimostrazione della effettiva presenza delle sostanze previste nelle materie prime prima della cottura.



Cromatogramma riferito alla miscela standard dopo trattamento di cottura

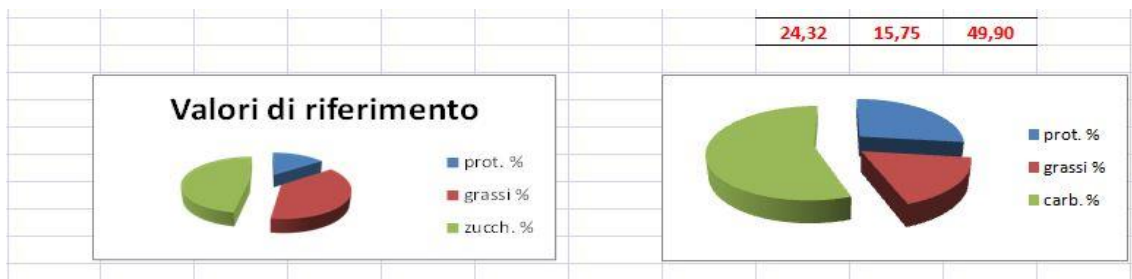
Di seguito si riportano in forma di tabella i risultati analitici elaborati per i macronutrienti.

VALORI NUTRIZIONALI (riferiti a 100 grammi di pietanza)

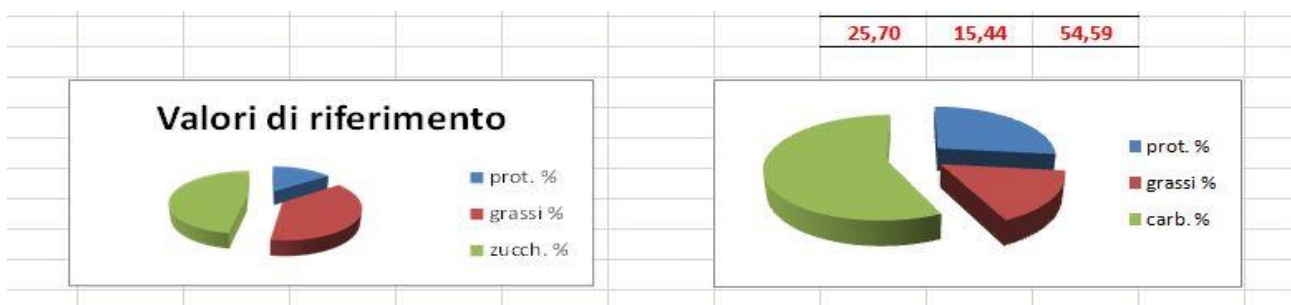
campione	perdita all'essiccamento (acqua)	Proteine	Carboidrati	Zuccheri riducenti	Ceneri	Grassi
Primo con funghi	69,3	7,72	15,84	n.d.	2,14	5
Primo senza funghi	67,2	8,16	17,33	n.d.	2,41	4,9
Secondo con funghi	75,55	11,35	3,2	n.d.	1,7	8,2
Secondo senza funghi	70,35	15,12	5,58	n.d.	1,75	7,2
Funghi trifolati						

In seguito vengono riportati i diagrammi che mostrano le percentuali dei macronutrienti nei piatti esaminati, riferite ai valori standard dell'OMS per una dieta equilibrata

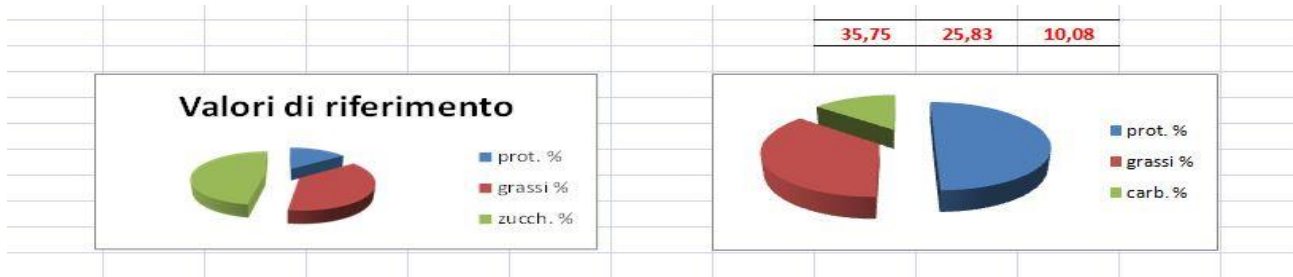
Primo piatto con funghi



Primo piatto senza funghi



Secondo piatto con funghi



Secondo piatto senza funghi

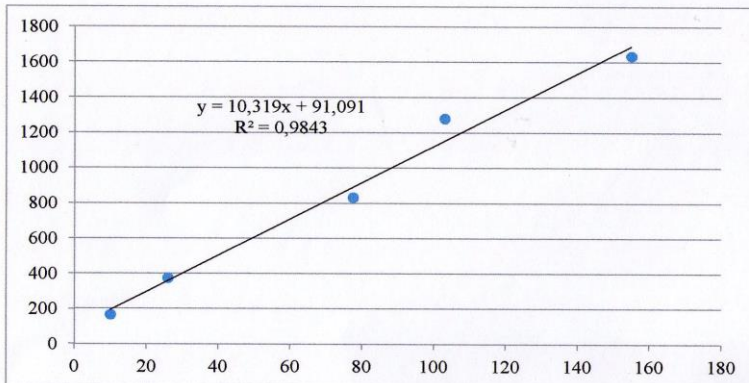


La determinazione degli acidi fenolici totali con il metodo di Folin-Ciocalteu ha fornito i seguenti risultati

Determinazione dei fenoli totali con metodo di Folin-Ciocalteu e ppm di antiossidanti

	ppm	A (mAU)	
	10	166,7	
	26	374,9	
	77,5	831,9	
	103	1280,2	
	155	1635,3	
F	128,98	1380,8	dil 1:19
CCF	115,66	1284,6	dil 1:19
CSF	89,72	988,2	dil 1:19
ICF	99,65	1119,4	
ISF	83,42	925,2	

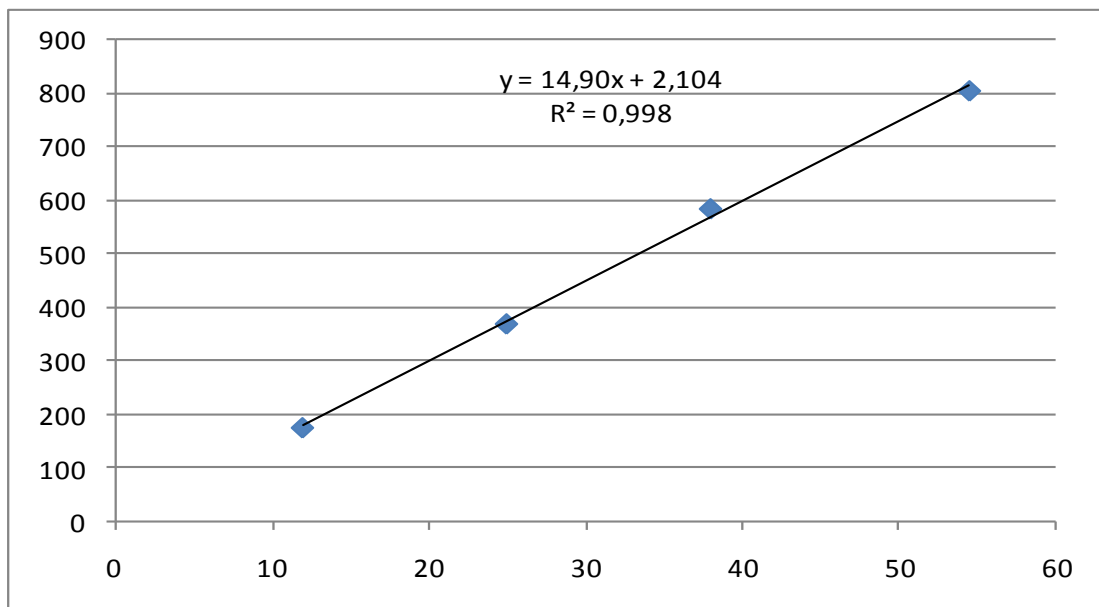
ppm DI ANTIOSSIDANTI
1031,84
925,28
717,76
39,86
33,37



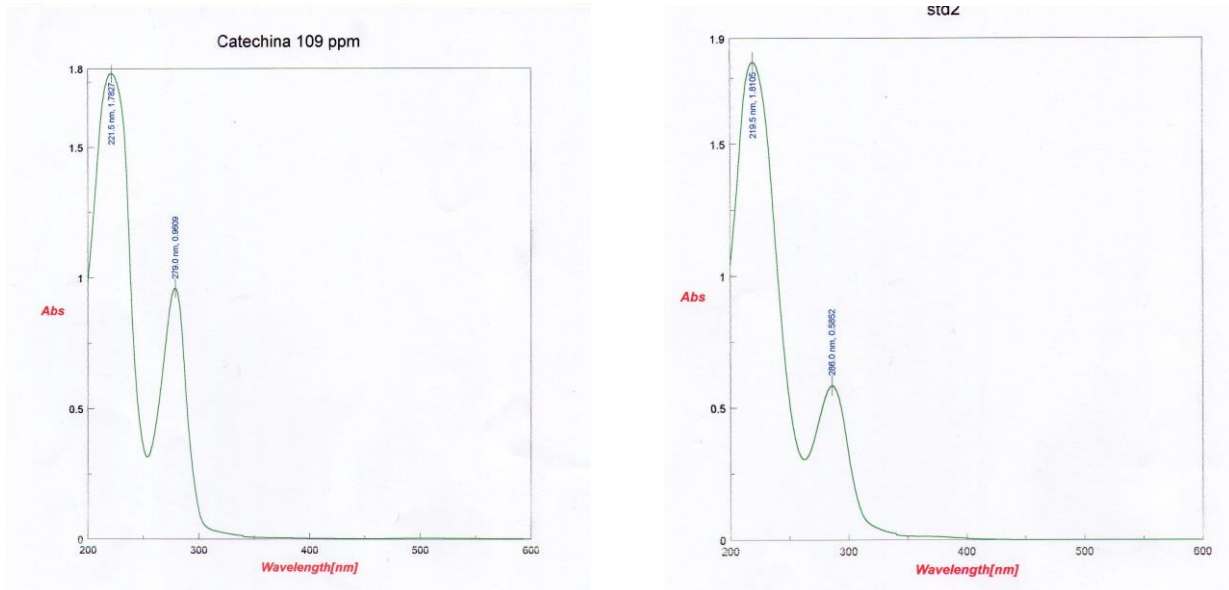
In cui F è riferito ai funghi trifolati, CCF al secondo piatto con funghi, CSF al secondo piatto senza funghi, ICF al primo piatto con funghi e ISF al primo piatto senza funghi.

La determinazione dei flavonoidi totali ha fornito i seguenti risultati:

Il metodo utilizzato, ⁽³⁾ che prevede la formazione di un complesso colorato fra flavonoidi e AlCl₃ che assorbe a 415 nm, non ha portato a risultati attendibili. Un ulteriore articolo di letteratura più recente, che prevede uno shift di assorbimento nell'UV dello stesso complesso rispetto alla catechina pura dipendente dalla concentrazione di catechina, verificato in laboratorio ha fornito dati attendibili, ma la complessità della matrice non ha reso possibile una determinazione quantitativa.



Curva di calibrazione per il complesso Catechina / Alluminio

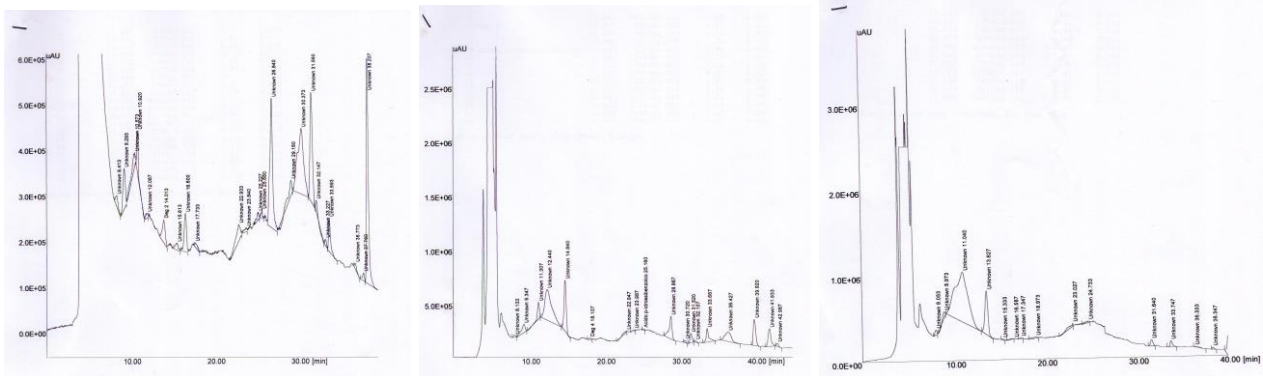


Spettri della catechina pura (a sinistra) e del complesso catechina / Alluminio (a destra)

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi cromatografica degli acidi fenolici evidenzia la loro degradazione, ma la determinazione secondo il metodo di Folin-Ciocalteu dimostra che anche questi prodotti di degradazione manifestano attività antiossidante. Una valutazione quantitativa dei prodotti di degradazione non risulta possibile in quanto non vi è una diretta corrispondenza fra le aree dei prodotti non degradati e quelli degradati. Rimane comunque possibile una valutazione semiquantitativa riferita al confronto fra le somme delle aree dei prodotti degradati nelle pietanze con e senza funghi. Da un'analisi delle aree dei cromatogrammi riferiti ai funghi trifolati e alle pietanze si evidenzia una elevata concentrazione di antiossidanti nel fungo trifolato ed il rapporto fra le aree dei cromatogrammi riferiti alle pietanze con e senza funghi evidenzia che per il secondo piatto questa concentrazione è maggiore del 30% nel piatto con funghi. La stessa analisi per il primo piatto evidenzia una maggiore concentrazione nella pietanza con funghi del 21%. Considerando la percentuale di fungo fresco utilizzata per le preparazioni (17,68% per il secondo e 10,55% per il primo), il contenuto in acqua delle pietanze, si può concludere che il contributo dei funghi non è influenzato dal tipo di cottura o dagli altri ingredienti presenti. Il rapporto fra l'aumento percentuale di antiossidanti dovuto al fungo e la percentuale di fungo presente riferita alla sostanza secca non varia sensibilmente e precisamente vale 6,2893 per il secondo piatto e 6,2204 per il primo piatto con una differenza dell' 1,1%. Alle stesse conclusioni si arriva elaborando i dati ottenuti con la metodica di Folin-Ciocalteu la quale fornisce una stima quantitativa della capacità antiossidante in termini di Acido Gallico Equivalente (GAE). Dal tracciato cromatografico e dagli

spettri rilevati si può inoltre osservare che nelle pietanze sono presenti anche altri antiossidanti non riferibili agli acidi fenolici, anche se in misura inferiore. Tali prodotti provengono presumibilmente anch'essi dal medesimo pattern biochimico dello Shikimato e sono riconducibili a cumarine ed altre sostanze con caratteristiche alcaloidi.



Cromatogrammi riferiti (da sinistra a destra) a: funghi trifolati, secondo piatto con funghi e secondo piatto senza funghi

CONCLUSIONI

Il lavoro svolto dimostra che la presenza di funghi in un piatto ne aumenti apprezzabilmente le proprietà antiossidanti. Tali proprietà si mantengono anche dopo cottura, indipendentemente dalle modalità con cui la cottura viene effettuata e dal tipo di ingredienti associati, sebbene le molecole antiossidanti di partenza si trasformino in altre, non identificate in questo studio. Il contributo dei funghi riferito ai macronutrienti è senz'altro trascurabile in quanto le percentuali di questi presenti nel fungo sono minime. Un leggero effetto di "diluizione" dovuto alla grande percentuale di acqua presente nei funghi viene rilevato.

RINGRAZIAMENTI

Il lavoro è stato svolto con la collaborazione a vario titolo di:

- la classe 5A CH
- l'Università degli Studi di Parma (prof. Corradini)
- l'Istituto Alberghiero Magnaghi di Salsomaggiore Terme

BIBLIOGRAFIA

- 1** Carmine Negro Antonio Miceli, METABOLITI SECONDARI E PROPRIETÀ NUTRACEUTICHE ; *ARACNE editrice S.r.l.* **marzo 2011**
- 2** I. Palacios, M. Lozano, C. Moro, M. D'Arrigo, M.A. Rostagno, J.A. Martínez , A. García-Lafuente , E. Guillamón , A. Villares, Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms; *Food Chemistry*. **marzo 2011**
- 3** Praveen K., Ramamoorthy, Awang Bono; Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of morinda citrifolia fruit extracts from various extraction processes. *Journal of engineering science and technology*. **Vol. 2 No 1 (2007) 70 – 80**
- 4** S. Heleno, L Barros, M. J. Sousa Targeted metabolites analysis in wild boletus species LWT- food science and technology 2011