

Ricerche condotte ad oggi

Obbiettivo finale della ricerca è usare il pâté come ingrediente per alimenti innovativi in maniera da aumentare l'apporto giornaliero di composti fenolici da olio extravergine di oliva garantendo benefici economici al processo di produzione dell'olio.

Caratterizzazione della materia prima.

Nei primi 4 anni gli studi dell'università hanno permesso di valutare il contenuto di polifenoli del pâté appena ottenuto in frantoio e dopo qualche mese di conservazione in diverse condizioni.

Di seguito una tabella del lavoro già pubblicato, che riassume le indagini effettuate.

Table 2

Phenolic content of pâté samples quantified by the internal standard method according to the IOC protocol for biophenols from olive oils; data are the mean (SD) of three independent measurements, expressed as mg_{dry}/kg on dry matter basis. In each column, different letters indicate significant differences at $p < 5\%$. M, mill of Monteschiavo; TE, mill of Terre dell'Etruria; FD, freeze-dried; S1FD, S2FD, S4FD, freeze-dried after 1, 2, 4 months of storage in non-controlled conditions.

Sample	Hydroxytyrosol									Tyrosol								
	Free			Glucoside			Total			Free			Glucoside			Total		
M13-FD	12,074	(156)	B	1394	(62)	E	13,468	(218)	C	383	(10)	B	1336	(18)	F	1719	(28)	C
M14-FD	2883	(43)	A	371	(17)	A	3253	(60)	A	85	(8)	A	85	(8)	A	170	(16)	A
TE15-FD	4103	(131)	A	1532	(68)	E	5635	(199)	B	382	(5)	B	844	(24)	E	1226	(29)	B
TE15-S4FD	21,499	(2888)	D	1682	(203)	F	23,181	(3090)	E	3175	(373)	G	770	(68)	D	3945	(441)	F
TE16-FD	11,317	(415)	B	844	(36)	C	12,161	(451)	C	840	(23)	C	710	(21)	D	1550	(44)	C
TE16-S1FD	12,383	(154)	B	1056	(79)	D	13,438	(233)	C	1814	(42)	D	594	(64)	C	2408	(107)	D
TE16-S2FD	15,130	(414)	C	1011	(25)	D	16,141	(440)	D	2457	(58)	E	270	(9)	B	2727	(67)	E
TE16-S4FD	16,886	(319)	C	565	(12)	B	17,451	(331)	D	2847	(60)	F	62	(2)	A	2909	(63)	E

Sample	Verbascoside			Caffeic acid			β-OH acteoside 1			β-OH acteoside 2			Luteolin			Oleuropein derivatives			Total phenols		
	M13-FD	3380	(15)	C	90	(3)	A	292	(12)	D	343	(8)	C	456	(8)	A	9200	(186)	D	49,550	(421)
M14-FD	118	(13)	A	nd	49	(7)	A	69	(11)	AB	1203	(43)	B	2767	(79)	A	27,695	(524)	A		
TE15-FD	6702	(168)	E	219	(30)	A	1272	(16)	F	1405	(43)	D	1020	(102)	B	13,232	(357)	E	52,969	(2019)	CD
TE15-S4FD	5006	(914)	D	4038	(502)	C	1616	(86)	G	1812	(134)	E	3234	(530)	D	3695	(571)	B	75,748	(6276)	E
TE16-FD	2509	(89)	B	3070	(75)	B	420	(4)	E	310	(6)	C	1186	(111)	B	5225	(214)	C	45,573	(1525)	B
TE16-S1FD	546	(22)	A	4982	(69)	D	202	(11)	C	151	(12)	B	1685	(49)	C	3514	(366)	B	48,507	(1154)	BC
TE16-S2FD	379	(17)	A	5409	(156)	E	122	(12)	B	97	(15)	AB	1650	(54)	C	3474	(87)	B	52,367	(923)	CD
TE16-S4FD	154	(10)	A	4907	(121)	D	44	(6)	A	33	(9)	A	1703	(40)	C	3550	(81)	B	51,123	(850)	CD

Il pâté viene raccolto immediatamente dopo la frangitura e sottoposto a congelamento nel più breve tempo possibile. Successivamente viene essiccato a bassa temperatura in maniera da togliere tutta l'acqua presente (circa 80%). Questo ha un duplice vantaggio:

- permette di ottenere un prodotto facilmente conservabile che mantiene intatto nel tempo il suo contenuto in polifenoli;
- permette di ottenere un prodotto ideale, facilmente utilizzabile come ingrediente alimentare per i test nelle diverse formulazioni.

Dopo l'essiccamento mediante liofilizzazione, il pâté viene macinato e quella che si ottiene è una polvere molto omogenea e fine, come mostrato nella seguente immagine:



Modalità di conservazione.

Sono state fatte diverse prove, in cui la disidratazione è avvenuta sia immediatamente dopo il congelamento che qualche mese dopo. In questa maniera si è voluto valutare la possibilità di mantenere il pâté in congelatori dopo la frangitura delle olive, in modo tale da poterlo poi lavorare ed utilizzare dopo la fine della campagna olearia, così da favorire la gestione da parte dei frantoi.

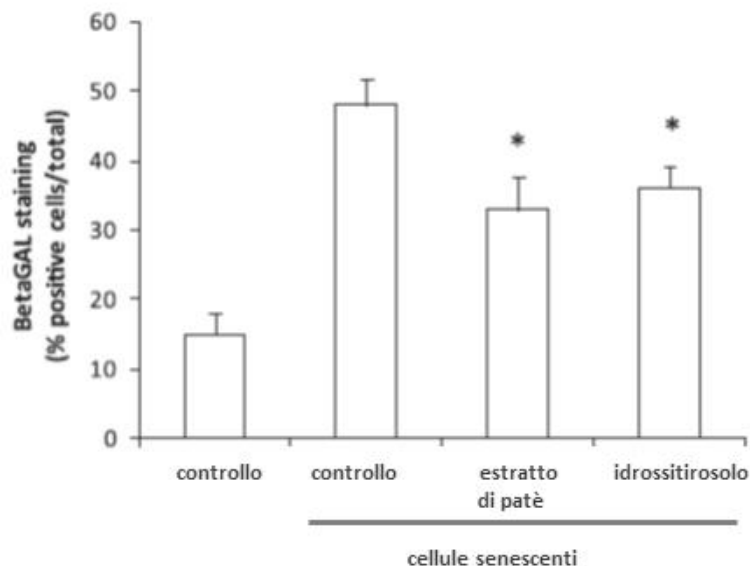
Le analisi hanno permesso di evidenziare che **1 grammo di pâté essiccato contiene mediamente gli stessi polifenoli contenuti in circa 200 grammi di olio extravergine di oliva**. Tali contenuti erano simili nelle diverse campagne olearie, con la sola eccezione del 2014, annata caratterizzata da un fortissimo attacco di mosca dell'olivo, che ha compromesso la qualità della produzione sia di olio sia dei sottoprodotti. Le analisi hanno anche mostrato che:

- i polifenoli si conservano bene quando il pâté è mantenuto a bassa temperatura (congelatore a -20°C) prima di essere essiccato.
- dopo essiccamento, il pâté rimane stabile sia per quanto riguarda il contenuto fenolico, sia per quanto riguarda le caratteristiche organolettiche per molti mesi.

Valutazione dell'effetto antinvecchiamento.

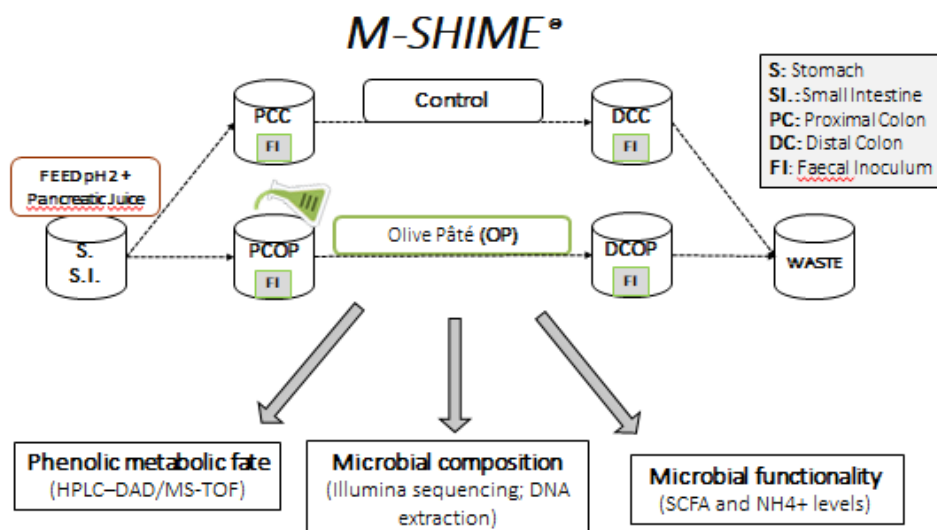
Parallelamente è stato svolto uno studio per la valutazione dell'effetto antinvecchiamento su cellule umane (fibroblasti cutanei) in coltura. Queste cellule invecchiano in coltura, diventando non più capaci di proliferare, e per questo vengono usate come modello per l'invecchiamento dell'organismo. Questi studi hanno dimostrato che i composti presenti nel patè, somministrati alle cellule in forma di estratti, rallentano il processo di invecchiamento, mantengono la capacità delle cellule di crescere, senza nessuna tossicità associata. Inoltre, questi effetti sono risultati paragonabili, in termini di efficacia, con quelli dell'idrossitirosolo puro, a indicare che i composti presenti nel patè sono biologicamente attivi almeno tanto quanto l'idrossitirosolo puro.

Il grafico sotto mostra l'andamento di un marcatore di senescenza, Beta-GAL, in cellule giovani, senescenti, trattate con estratto di patè o con idrossitirosolo. Si osserva come il marcatore aumenti nell'invecchiamento delle cellule, ma sia ridotto con uguale efficienza dall'estratto e dall'idrossitirosolo puro.



Valutazione dell'effetto sul microbiota intestinale mediante sistema M-SHIME

Il patè è stato anche utilizzato per valutare il suo effetto sul microbiota intestinale attraverso dei test in vitro effettuati all'Università di Ghent utilizzando un gastrosimulatore, il sistema M-SHIME, uno dei più avanzati ad oggi disponibili. La figura che segue riassume le analisi effettuate.



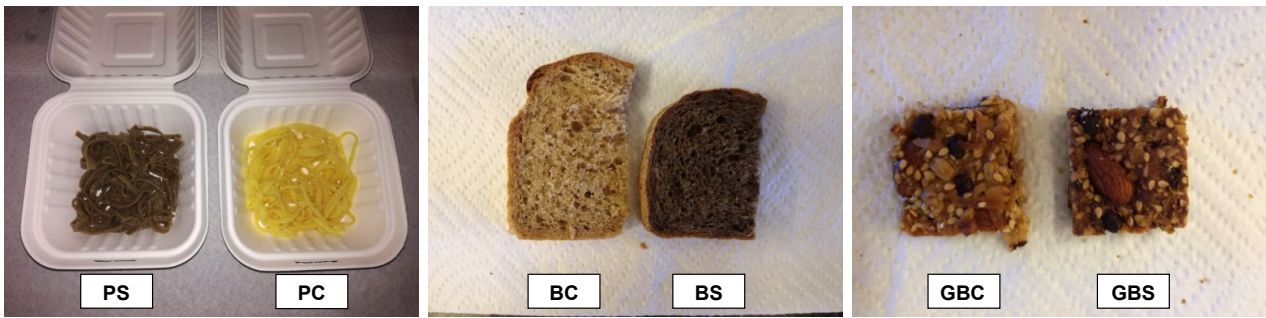
Dopo la somministrazione del paté essiccato per 9 giorni consecutivi nel sistema M-Shime, la funzionalità delle microbiota non risultava inibita (analisi degli acidi grassi a corta catena o SCFA). Si è osservata invece una riduzione della concentrazione di alcune specie microbiche come le *Fusobacteriaceae* una famiglia spesso associata alla sintomatologia dell'intestino irritabile. Inoltre, si è anche osservato un incremento della concentrazione di specie benefiche quali *Lactobacillaceae* and *Bifidobacteriaceae*.

Formulazione di alimenti addizionati col pâté e valutazione sensoriale.

Il pâté essiccato, ricco di polifenoli e di importanti proprietà nutrizionali, è dunque un prodotto adatto per essere usato come ingrediente alimentare nell'ottica di una dieta che sia preventiva per la salute umana. È da sottolineare che il prodotto è ottenibile in forma essiccata applicando solo processi fisici e questo lo rende accettabile come nuovo possibile ingrediente alimentare con proprietà funzionali.

Tuttavia, affinché un ingrediente alimentare possa essere commercializzato con successo, è necessario che i consumatori apprezzino i prodotti alimentari che lo contengono come ingrediente.

Per questo motivo, sono state effettuate prove di arricchimento di 3 prodotti alimentari di largo consumo, quali pasta, pane e barrette ai cereali, e tali prodotti sono stati poi sottoposti ad analisi sensoriale coinvolgendo in totale ben 175 consumatori di questi prodotti. Per ognuno dei tre alimenti, è stata formulata una ricetta di controllo, senza il pâté e una ricetta arricchita con opportune percentuali di pâté. I prodotti ottenuti, pronti ad essere consumati sono riportati nella figura seguente.



Questa parte dello studio, condotta dal Dottor Lorenzo Cecchi, afferente gruppo della professoressa Mulinacci del Dipartimento di NEUROFARBA, è stata svolta in California, nell'ambito del progetto FOODOLEAPLUS. La ricerca si è svolta in collaborazione con uno dei centri all'avanguardia a livello mondiale nel settore dell'analisi sensoriale di prodotti alimentari: quello del professor Jean-Xavier Guinard dell'Università della California, Davis.

Per prima cosa si è andati a valutare quanti dei polifenoli presenti nel pâté aggiunto agli alimenti arricchiti fossero ancora presenti nei prodotti pronti ad essere consumati. I risultati hanno mostrato che erano presenti circa il 10% di polifenoli nella pasta, il 50% nel pane e il 75% nella barretta di cereali. Questo significa che **per beneficiare del claim salutistico dell'EFSA associato all'olio vergine di oliva, sono sufficienti 63 g di pasta, 18 di pane e 12 di barrette ai cereali al giorno.**

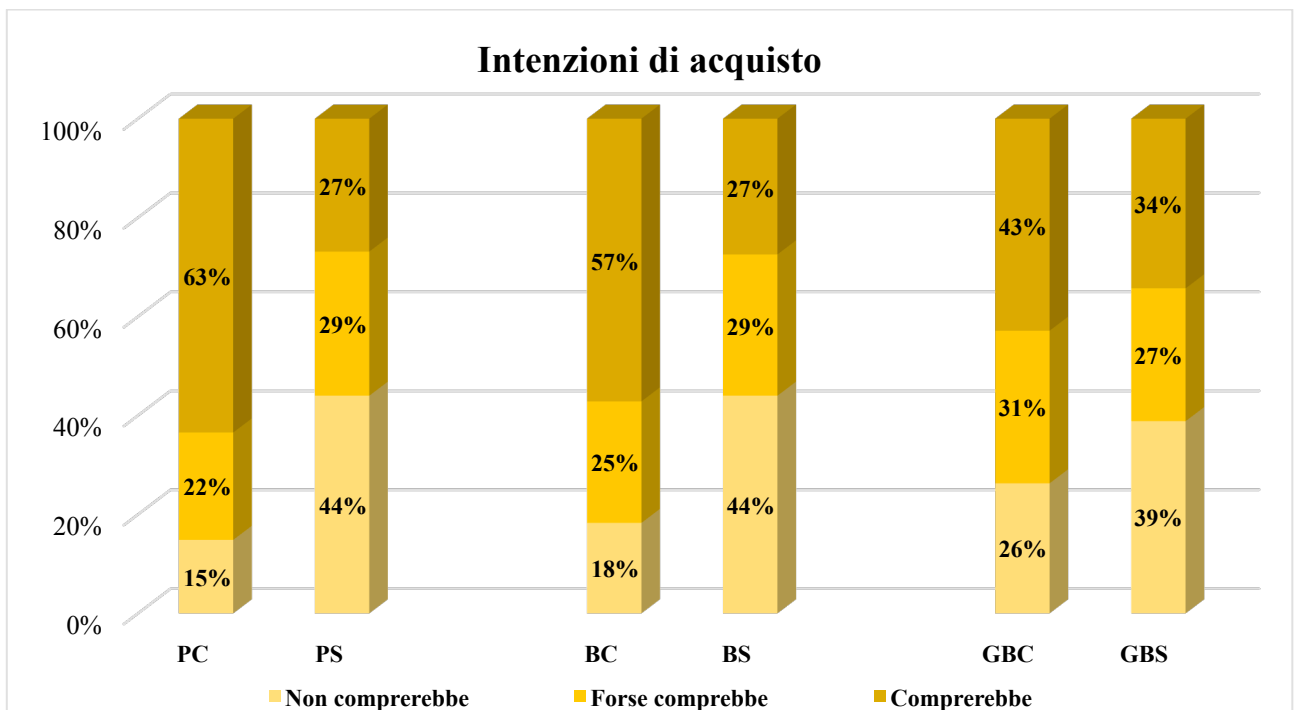
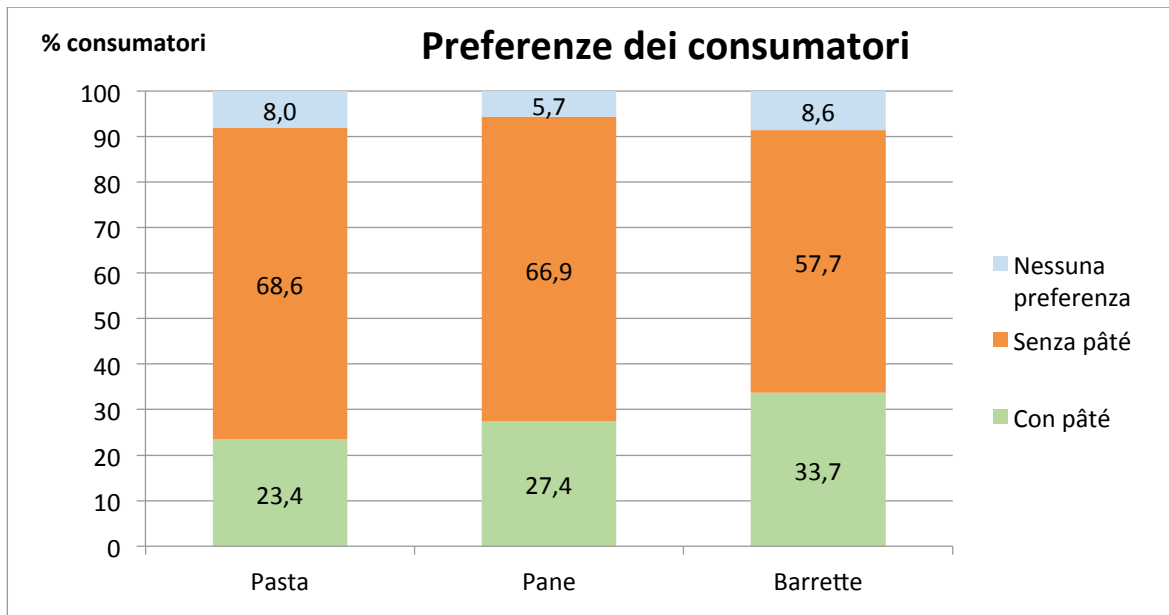
Successivamente sono state condotte le analisi sensoriali. Ai 175 consumatori è stato chiesto di assaggiare, uno dopo l'altro, i 6 prodotti, ed è stato chiesto di compilare un questionario con domande studiate per valutare l'accettabilità sensoriale di tali prodotti da parte dei consumatori e per capire quali fossero le loro preferenze e la loro disponibilità ad acquistare questo tipo di alimenti arricchiti.

Tutti i prodotti sono stati mediamente accettati dai consumatori per quanto riguarda ognuno degli aspetti proposti: gusto complessivo, aspetto, consistenza e odore/gusto/sapore. Solo per l'aspetto della pasta c'è stato qualche problema di accettabilità, dovuta alla poca abitudine dei consumatori californiani a vedere pasta di colore scuro. Questo risultato indica comunque chiaramente che i prodotti arricchiti di pâté sono accettati dai consumatori californiani e che il pâté può essere utilizzato come ingrediente alimentare in prodotti di largo consumo nell'ottica di una dieta che sia preventiva della salute.

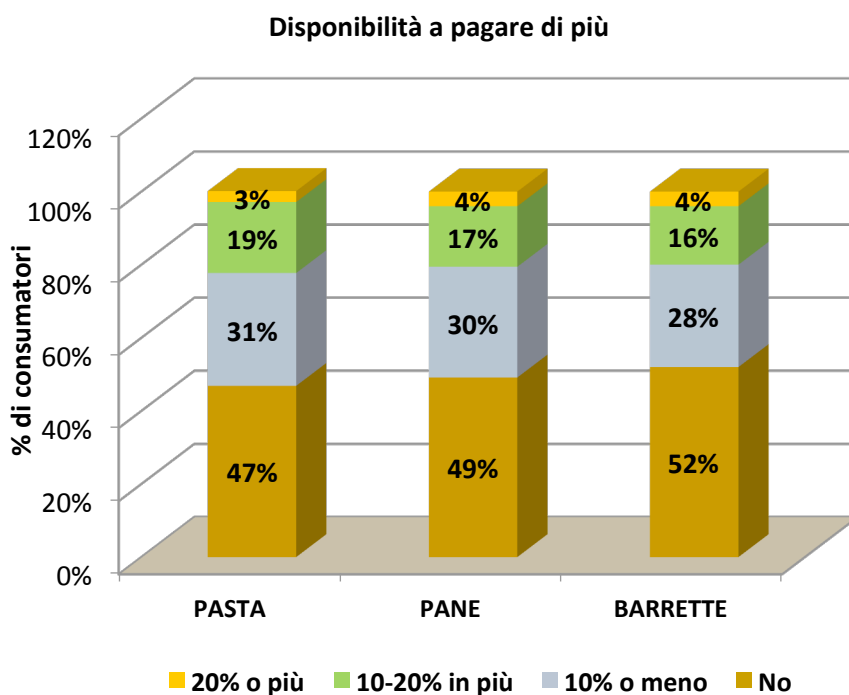
Nei grafici di seguito sono riportati altri interessanti risultati messi in luce dal test.

- Una % importante di consumatori ha addirittura preferito il campione arricchito col pâté: 23.4% per la pasta, 27.4% per il pane e 33.7% per le barrette ai cereali;
- la percentuale di consumatori che ha dichiarato che non comprerebbe i prodotti arricchiti è al di sotto del 45%;

- circa la metà dei consumatori ha dichiarato di essere disponibile a pagare di più (alcuni fino al 30% in più) per i prodotti arricchiti con polifenoli ottenuti dalla produzione di olio extravergine di oliva.



PC, pasta senza pâté; PS, pasta con pâté; BC, pane senza pâté; BS, pane con pâté; GBC, barrette senza pâté; GBS, barrette con pâté



Lo studio ci dice che l'uso del pâté come ingrediente alimentare è chiaramente accettato dai consumatori californiani (e quindi, con ogni probabilità, anche da quelli italiani e non solo) e garantisce un apporto di polifenoli in misura nettamente maggiore rispetto allo stesso olio extravergine di oliva e dunque con benefici in termini di potenzialità antiossidanti ancora più significativi.

La possibilità di utilizzo del pâté come ingrediente in prodotti di larga scala potrebbe trovare applicazioni che permetterebbero di ricavare valore aggiunto da parte dei produttori di olio da quelli che ad oggi vengono considerati scarti". Per quanto sottolineato in precedenza, il pâté, fra le diverse tipologie di scarti prodotti ad oggi in frantoio, è quello che ha realmente buone possibilità di ampio utilizzo applicativo.

Test clinico su soggetti sani

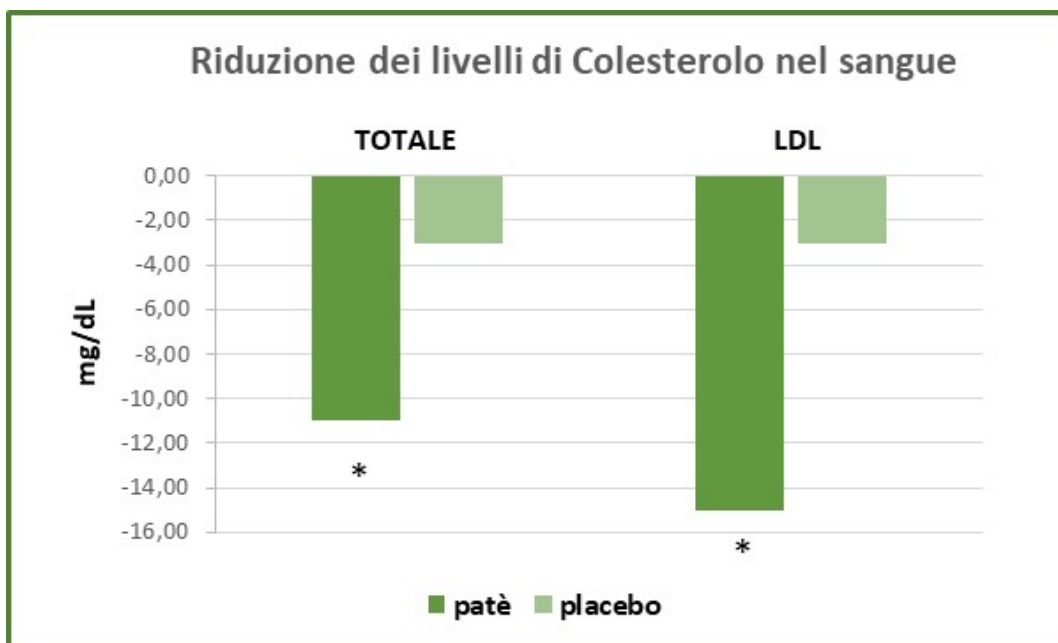
Il prodotto è stato formulato in compresse contenenti 0.75 g di patè essiccato ciascuna, e queste sono state utilizzate in uno studio di intervento nell'uomo, per valutare gli effetti su alcuni parametri di rischio cardiovascolare. Sono state prodotte per controllo anche compresse "placebo" contenenti solo gli eccipienti.

Inizialmente 21 soggetti volontari giovani e sani sono stati reclutati dall'Unità di Nutrizione Clinica di Careggi (responsabile prof. Francesco Sofi). Le caratteristiche di base di questi soggetti indicavano una biochimica normale del sangue, con una tendenza a valori elevati di colesterolo (media 197 mg/dL), legata presumibilmente al tipo di alimentazione e al basso livello di attività fisica. Due dei soggetti non hanno completato lo studio; i 19 rimasti sono stati sottoposti a un protocollo detto cross-over, in cui nella prima fase, 10 soggetti hanno assunto compresse a base di patè, e 9 soggetti compresse placebo,

per 2 mesi. Dopo una fase di sospensione di ogni intervento per 1 mese (wash-out), i trattamenti sono stati invertiti: chi aveva avuto il patè nella prima fase ha assunto il placebo nella seconda e viceversa, per altri due mesi. In questo modo ogni soggetto ha assunto nelle due fasi sia patè che placebo, e ha potuto funzionare come “controllo” di sé stesso. La dose giornaliera era costituita da 4 compresse, che fornivano una dose di idrossitirosolo pari a 29 mg/die. All’inizio e alla fine di ogni fase ai soggetti è stato fatto un prelievo ematico, e sul sangue è stato valutato il profilo lipidico e glicemico, e il danno al DNA nelle cellule bianche (leucociti).

Sul profilo glicemico non sono stati osservati effetti del trattamento, anche perché i soggetti presentavano valori pienamente normali di glicemia e insulinemia.

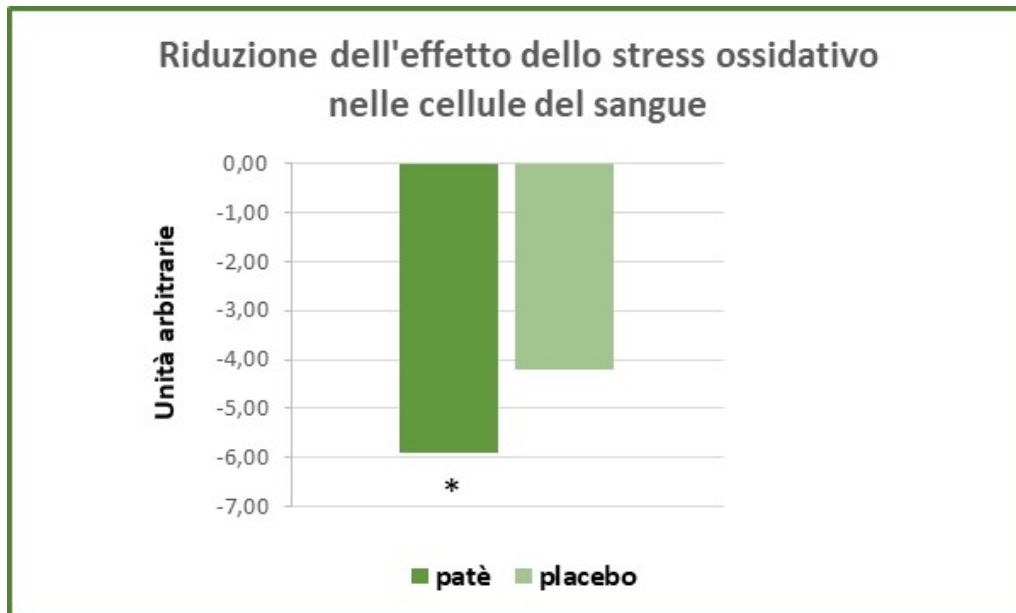
Sul profilo lipidico invece abbiamo osservato una riduzione dei livelli di colesterolo totale e LDL dopo trattamento con patè, e non con placebo. In particolare, il colesterolo totale si è ridotto da 202 a 191 mg/dL (-11, differenza statisticamente significativa) dopo assunzione di patè, e da 200 a 197 (-3, non significativa) dopo placebo. Parallelamente, il colesterolo LDL si è ridotto da 130 a 115 mg/dL (-15, differenza statisticamente significativa) dopo assunzione di patè, e da 125 a 122 (-3, non significativa) dopo placebo. Questi dati sono riassunti nel grafico sotto:



È interessante notare che queste riduzioni risultavano ancora maggiori considerando solo i soggetti con livelli di colesterolo totale di partenza maggiori di 200 mg/dL: in questo caso la riduzione dopo patè ammontava a 18 mg/dL.

Per quanto riguarda il danno al DNA nei leucociti, i soggetti mostravano livelli di partenza bassi, e non abbiamo trovato differenze nei livelli basali di danno fra trattamento con patè e con placebo. Tuttavia,

quando abbiamo sottoposto le cellule ematiche a stress ossidativo, incubandole per 5 min con un agente ossidante (H_2O_2), abbiamo indotto un forte aumento di danno ossidativo sul DNA. Questo danno indotto è risultato inferiore dopo assunzione di patè (-5.9, differenza statisticamente significativa), ma non dopo assunzione di placebo (-4.2, differenza non significativa). Questi dati sono mostrati nel grafico successivo:



Complessivamente, i dati fin qui raccolti nello studio clinico indicano che l'assunzione di 3 g di patè essiccato al giorno per 2 mesi riduce due importanti fattori di rischio cardiovascolare, la dislipidemia e lo stress ossidativo. Il dato appare tanto più interessante in quanto ottenuto in soggetti giovani e clinicamente sani: questo indica un potenziale uso di questo prodotto nella prevenzione primaria, ma anche la possibilità di usarlo con effetti ancora maggiori in soggetti a maggior livello di rischio (più anziani, ipercolesterolemici, ipertesi, etc.).