

## INDICE

1. INTRODUZIONE .....	3
1.1 Il ruolo della texture e della struttura sulla ritenzione e rilascio degli aromi.....	4
1.2 .....I fattori che influenzano il rilascio di composti aromatici durante il consumo .....	11
1.3 Strumenti analitici convenzionali dei composti aromatici .....	14
1.3.1 <i>Tecniche dello spazio di testa</i> .....	16
1.4. Strumenti analitici innovativi per lo studio dei composti aromatici in vivo.....	20
I PARTE .....	28
STUDIO SUL MECCANISMO DI RILASCIO E RITENZIONE DI SOSTANZE AROMATICHE VOLATILI DA MATRICI A BASE DI IDROCOLLOIDI.....	28
1. INTRODUZIONE.....	29
2. SCOPO E STRUTTURA.....	31
3. MATERIALI E MEDODI .....	32
3.1 Preparazione dei campioni .....	32
3.2 Misure reologiche.....	33
3.3 Analisi dello spazio di testa statico .....	34
3.4 Retta di taratura .....	35
4. RISULTATI E DISCUSSIONE .....	37
4.1 Prove reologiche.....	37
4.2 Analisi dello spazio di testa statico .....	38
4.3 Analisi quantitativa del limonene rilasciato.....	40
5. CONCLUSIONI.....	45
II PARTE.....	46
L'ANALISI DEI COMPOSTI ORGANICI VOLATILI IN VIVO ATTRAVERSO L'APPLICAZIONE DEL DESORBIMENTO TERMICO ACCOPPIATO CON GC-MS.....	46
1. INTRODUZIONE.....	47
2. SCOPO E STRUTTURA.....	49
3. MATERIALI E METODI.....	51
3.1 Estrazione dei composti organici volatili del caffè mediante spazio di testa statico. ....	51

3.2	Preparazione dei tubi di campionamento per l'analisi del respiro.....	52
3.3	Materiali adsorbenti .....	52
3.4	Procedura di campionamento del respiro.....	53
3.5	Desorbitore termico ed autocampionatore .....	55
3.6	Gas cromatografia-MS .....	56
3.7	Procedura di pulizia dei tubi.....	57
3.8	Analisi dei dati.....	58
4.	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>59</b>
4.1	<b>Caratterizzazione e quantificazione percentuale dei composti volatili del caffè.</b> .....	<b>59</b>
4.1.1	<i>Static headspace analysis .....</i>	<i>60</i>
4.1.2	<i>Mouthpace analysis .....</i>	<i>62</i>
4.1.3	<i>Confronto tra le due tecniche di campionamento.....</i>	<i>63</i>
4.2	<b>Cinetica di rilascio dei composti organici volatili in mouthspace .....</b>	<b>64</b>
5	<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>69</b>
6	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUZIONE

Il flavour di un alimento è dovuto all'insieme dei suoi composti volatili e non, che vengono percepiti dal consumatore attraverso i recettori olfattivi (aroma) e gustativi (taste). È un fattore molto rilevante ai fini della decisione di scelta del consumatore, tanto da essere definito “la chiave del piacere sensoriale”.

La valutazione analitica del flavour non è agevole e, fino ad oggi, l'attenzione si è concentrata sulla determinazione della frazione volatile, in quanto è considerata fondamentale nella definizione del flavour globale ed è più facilmente rilevabile attraverso gli strumenti analitici attualmente disponibili, quali ad esempio la gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) o la gas-cromatografia olfattometrica (Taylor & Linfoth, 1996).

Dunque, l'interesse degli scienziati, da sempre, è stato rivolto all'isolamento ed all'analisi dei composti aromatici, sebbene questa non rappresenti una sfida semplice. Un aroma cosiddetto “semplice” può contenere, infatti, 100-300 composti volatili (ad esempio le fragole). Di questi composti, solo un numero limitato è responsabile dell'aroma dell'alimento. In alcuni casi, è possibile che un unico composto aromatico possa essere associato ad un aroma (ad esempio la benzaldeide è riconosciuta da molti come cherry); in altri, e più frequenti, una complessa miscela di numerosi composti aromatici, presenti in opportune proporzioni, è in grado di dar luogo al flavour tipico di un alimento, come nel caso dell'aroma di arancia.

La notevole diversità chimica e la differente quantità di composti aromatici rende ulteriormente complessa l'analisi del flavour, soprattutto considerando che alcuni composti fortemente impattanti sull'aroma sono presenti in concentrazioni molto ridotte.

Tutto ciò spiega perché sono state sviluppate numerose tecniche analitiche per isolare ed analizzare i composti aromatici (Rega, 2003).

### **1.1 Il ruolo della texture e della struttura sulla ritenzione e rilascio degli aromi.**

La composizione e la struttura dell'alimento hanno una forte influenza sul rilascio dei composti aromatici, i quali possono essere dissolti, adsorbiti, legati, intrappolati, incapsulati o limitati nella diffusione dai componenti della matrice alimentare. L'importanza relativa di ognuno di questi meccanismi varia con le proprietà dei composti aromatici e con le proprietà chimico-fisiche dei costituenti dell'alimento (van Ruth *et al.*, 2000).

Lo studio dell'influenza della struttura e della composizione dell'alimento sul rilascio di composti aromatici ci consente di capire i principi che regolano il rilascio del flavour e la percezione durante il consumo e, dunque, può essere utile per la formulazione di alimenti con caratteristiche di flavour migliorate. Questo è di particolare importanza per prodotti a basso contenuto calorico, per esempio con una ridotta quantità di grassi, zucchero o alcol, cioè laddove

ad una variazione nella quantità dei componenti macro-molecolari corrisponde una modificazione dei meccanismi di rilascio e ritenzione dei composti volatili. La composizione del prodotto ha, infatti, una forte influenza sulle interazioni che si stabiliscono tra composti volatili e non-volatili, a differenza della struttura dell'alimento che, invece, agisce sul trasporto dei composti nella cavità orale e nasale.

Tra i altri componenti macromolecolari, è stato evidenziato che le proteine sono capaci di influenzare la volatilità mediante adsorbimento fisico reversibile (interazioni di van der Waals) e/o mediante legami covalenti irreversibili (come nel caso delle aldeidi).

I carboidrati, mono- e disaccaridi possono, invece, esibire un effetto salting-out, causando un aumento della volatilità relativa nei confronti dell'acqua, mentre i polisaccaridi possono sopprimere la volatilità dei composti come risultato di interazioni molecolari non-specifiche. Differenti studi hanno mostrato che aumentando la concentrazione di polisaccaridi aumenta la densità dell'alimento, inducendo una sostanziale depressione nel rilascio del flavour e, quindi, nella percezione. I lipidi sono, infine, gli ingredienti alimentari che hanno l'effetto più importante sulla ripartizione dei composti aromatici tra il prodotto e la fase vapore (Stephan *et al.*, 2000). Questi adsorbono e dissolvono la maggior parte dei composti aromatici organici ed influenzano fortemente la loro percezione. I composti aromatici si

ripartiscono tra il prodotto e la fase gassosa in funzione delle loro proprietà fisiche; dunque, data la loro natura idrofobica, generalmente, si concentrano soprattutto nella fase lipidica, per cui si riduce notevolmente la loro ripartizione in fase gassosa o acquosa ed tende ad aumentare la soglia di percezione del flavour (van Ruth *et al.*, 2000). Dunque, i lipidi modificano i parametri termodinamici e cinetici dei sistemi alimentari, influenzando la volatilità ed il trasferimento di massa degli aromi.

Gli agenti di texture hanno anch'essi una notevole influenza sul rilascio delle sostanze aromatiche: il loro effetto deriva dalla modificazione della viscosità che induce un significativo decremento del flavour percepito oltre una concentrazione critica ( $c^*$ ) a cui comincia l'intrappolamento. L'incremento di viscosità, infatti, ostacola il processo attraverso il quale le molecole aromatiche sono trasferite dall'interno del campione verso la sua superficie esterna, dove possono essere percepiti (Juteau *et al.*, 2004).

Weel *et al.* (2002) hanno studiato l'effetto di idrocolloidi, quali alginato di sodio, xantani e idrossipropilcellulosa, presenti in sistemi liquidi, sui meccanismi di rilascio del flavour, rivelando anch'essi una riduzione nella percezione del flavour a seguito dell'incremento della concentrazione di idrocolloidi.

Roberts *et al.* (1996) hanno anch'essi investigato l'azione di idrocolloidi, quali il saccarosio, la gomma guar e il carbossimetilcellulosa, sul rilascio di sei

differenti composti aromatici. Dai loro risultati si evince, però, che la riduzione nel rilascio del flavour - cioè la diminuzione della volatilità - in funzione dell'aumento di viscosità, si verifica solo per i composti aromatici a più alta volatilità (quali l' $\alpha$ -pirene, l'etil 2-metilbutirrato, etc.); per i composti meno volatili (quali la vanillina, il maltitolo, etc.) tale fenomeno non si manifesta. Dunque, soluzioni con una viscosità simile non inducono la stessa percezione del flavour, indicando che sia la viscosità che i legami che si instaurano incidono sul rilascio e sulla percezione del flavour. In aggiunta le misure globali di texture possono nascondere strutture differenti. Per esempio, in letteratura è stato riportato che due sospensioni di amido con differente struttura granulare (derivante da differenti processi meccanici) può portare a gel simili (ossia con un modulo di Young simile tra loro quando veniva applicata una compressione uniassale). Il composto aromatico in questi due gel era ritenuto in modo differente (Juteau *et al.*, 2004).

Guichard *et al.* (1991) hanno osservato che in una marmellata a base di fragole, l'aggiunta di pectine ad alta metossilazione induce una riduzione sia del rilascio che della percezione del flavour, mentre l'aggiunta di pectine a bassa metossilazione comporta solo un effetto molto più limitato, sebbene la consistenza della marmellata ottenuta con i due tipi di pectine sia giudicata simile da una giuria di assaggiatori. In un sistema modello che riproduce la preparazione della marmellata, la riduzione del rilascio del flavour deriva,

presumibilmente, dalla formazione di network di catene di pectine ad alta metossilazione, che potrebbero ostacolare la migrazione molecolare all'interfaccia gel/vapore, in quanto non è stata verificata alcuna interazione molecolare tra le pectine ed i composti aromatici. In questo caso, all'equilibrio, non si osserva più alcun effetto dell'aggiunta di polimeri, in quanto l'influenza della viscosità è annullata e, solo in condizioni dinamiche, si verifica che l'aggiunta di agenti strutturanti influenza la velocità di rilascio del flavour.

La volatilità dei composti aromatici dipende, oltre che dalle caratteristiche e dalla struttura della matrice alimentare, anche dalle caratteristiche chimico-fisiche dell'aroma stesso. Tra queste, assume notevole importanza il peso molecolare: maggiore è il peso molecolare, più lento sarà il rilascio del composto volatile. Questo comportamento è stato osservato - ad esempio - per alcuni esteri incapsulati con gomma arabica; in particolare, l'etil-esanoato (peso molecolare 144) era sempre meglio ritenuto dell'etil-butirrato (peso molecolare 116). Lo stesso andamento è stato osservato anche per una miscela di 16 composti aromatici incapsulati in glucosio o maltosio.

La correlazione tra peso molecolare del composto aromatico e la sua ritenzione deriva probabilmente dalla maggiore abilità dei composti a più basso peso molecolare a diffondere attraverso la matrice. In effetto, visto che la molecola non è lineare, peso e dimensione molecolare sono strettamente collegati tra loro: maggiore è il peso molecolare, maggiore è la dimensione

della molecola e, dunque, più lenta è la sua velocità di diffusione. Come conseguenza di ciò, il composto aromatico non raggiunge rapidamente la superficie della matrice.

L'ingombro sterico del composto aromatico può, infatti, determinare anche la completa inclusione all'interno del carrier. Comunque, la forma del composto aromatico, ed in particolare la posizione e la natura dei suoi gruppi funzionali, sembra avere un effetto molto rilevante sulla natura e sulla forza delle interazioni che si stabiliscono con la matrice. In generale, tra i gruppi chimici funzionali, quelli meglio trattenuti dai carboidrati sono gli alcoli, seguono le aldeidi, i chetoni e gli esteri (simili tra loro) ed, infine, gli acidi. Numerose sono però le eccezioni rispetto a questo trend, per cui non è sufficiente prendere in considerazione solo i gruppi funzionali dei composti aromatici (anche perché un composto aromatico può avere più di un gruppo funzionale), ma è necessario considerare anche la polarità del composto. Genericamente il composto più polare è anche il meno ritenuto. Questo fenomeno potrebbe essere ascrivibile alla maggiore solubilità in acqua dei composti più volatili, che comporta una più veloce diffusione attraverso la matrice (Goubet *et al.* 1998).

De Roos (2003) racchiude, in due i principali fattori, il controllo della velocità di rilascio dei composti aromatici da un alimento, ossia nella loro volatilità (fattore termodinamico) e nella loro resistenza al trasferimento di massa dal

prodotto all'aria (fattore cinetico). La volatilità relativa di un composto aromatico rappresenta la sua capacità di raggiungere la fase gassosa, quando è introdotto in una soluzione o in una miscela (Goubet *et al.*, 1998) ed è espressa come rapporto tra la concentrazione del composto aromatico nell'aria e nel prodotto in esame, in condizioni di equilibrio:

$$P_{ap} = C_a / C_p \quad [1]$$

dove  $P_{ap}$  rappresenta il coefficiente di ripartizione tra l'aria ed il prodotto, mentre  $C_a$  e  $C_p$  le concentrazioni ( $\text{g L}^{-1}$ ) del composto aromatico nell'aria e nel prodotto, rispettivamente.

Il coefficiente di ripartizione aria-prodotto è funzione della composizione dell'alimento e della temperatura, ma non è influenzato dalla texture e dalla struttura.

È necessario sottolineare che una qualsiasi alterazione della microstruttura di una macromolecola, come il cambiamento conformazionale di una proteina, deve essere considerato un cambiamento della struttura del prodotto e come tale andrà a modificare l'equilibrio tra le fasi.

La velocità di raggiungimento dell'equilibrio è determinato dal coefficiente di trasferimento di massa  $k$ , che è una misura della velocità a cui il soluto diffonde tra le fasi. Solo la resistenza al trasferimento di massa ( $1/k$ ) è

influenzata dalla texture e dalla microstruttura del prodotto. L'effetto della resistenza al trasferimento di massa diventa chiaro solo in condizioni dinamiche, cioè quando le fasi di equilibrio sono disturbate. In condizioni di trasferimento di massa fortemente controllate, il rilascio e la ritenzione del flavour è determinata dalla diffusione (de Roos, 2003).

In un prodotto non omogeneo, inoltre, i composti volatili sono spesso compartimentalizzati. Si può assumere, quindi, che in un sistema disomogeneo, la ritenzione o il rilascio del flavour è determinato dal microambiente in cui si trovano i composti aromatici.

## **1.2 I fattori che influenzano il rilascio di composti aromatici durante il consumo**

Quando un alimento o una bevanda vengono consumati, il loro flavour è percepito attraverso una serie di eventi. I composti responsabili del flavour vengono, infatti, rilasciati e trasferiti ai recettori sensoriali. In questa fase, le molecole che stimolano tali recettori devono trovarsi disciolte in fase acquosa per giungere alle cellule recettrici del gusto. Simultaneamente, attraverso il respiro, si ha il trasferimento delle molecole aromatiche ai recettori olfattivi.

La natura e l'intensità dello stimolo aromatico dipende non solo dalla presenza e dalla concentrazione dei composti aromatici nel nasofaringe, ma anche da tutti i processi di rilascio e di trasferimento. Questi includono la struttura e la

composizione dell'alimento, la temperatura ed il pH della bocca, il flusso di saliva, la velocità a cui l'alimento è miscelato durante la masticazione (Piggott & Schaschke, 2001). La respirazione e la diluizione con la saliva provocano, inoltre, continui cambiamenti in termini di volume, composizione e viscosità del prodotto.

Le modificazioni che possono subire gli alimenti durante il consumo sono più o meno significative in funzione della natura dell'alimento stesso. Quest'ultimo può, infatti, trovarsi in differenti stati fisici: da semplice liquido (ad esempio una bevanda) a complessa matrice eterogenea (ad esempio i cereali per la colazione) (Taylor & Linfoth, 1996).

I cambiamenti chimico-fisici che si verificano negli alimenti durante il consumo comportano, dunque, una differente percezione del flavour, che si manifesta soprattutto quando i composti volatili sono il risultato di reazioni enzimatiche che si sviluppano durante il consumo; oppure quando il loro rilascio dipende dall'idratazione dell'alimento durante la masticazione e la deglutizione; o - ancora - quando il suo contenuto in grassi è in grado di modificare la solubilità del composto aromatico. Nel caso di alimenti con elevate quantità di lipidi, infatti, la fusione in bocca dei grassi o l'inversione di fase dell'emulsione (ossia il cambiamento da acqua in olio a olio in acqua) può causare un sostanziale cambiamento nel rilascio dei composti volatili (Taylor & Linfoth, 1996).

Nei cereali da colazione, ad esempio, la masticazione e il miscelamento con la saliva serve ad idratare la matrice, dando luogo ad un cambiamento dei componenti da uno stato vetroso ad uno gommoso con un livello di idratazione ed un profilo di temperatura che si modificano continuamente durante ogni atto di masticazione.

Da ciò si evince che riprodurre in un sistema modello quanto accade in bocca è estremamente difficile (Taylor & Linforth, 1996).

Comunque, data la difficoltà di effettuare misure direttamente in bocca, si è cercato di simulare, attraverso sistemi modello, alcuni dei processi che intervengono in bocca durante il consumo, quali ad esempio l'idratazione o la temperatura.

Ingham *et al.* (1995) hanno evidenziato che la masticazione è uno dei fattori che maggiormente influenza il profilo dei composti volatili a livello dell'epitelio olfattivo. Infatti, mettendo a confronto i profili aromatici delle fragole ottenuti mediante le tecniche del *nosespace* e del *headspace*, hanno mostrato che tali profili erano molto simili tra di loro solo quando il campionamento dello spazio di testa veniva effettuato previa triturazione delle fragole mediante uno stomacher, in modo da simulare il processo di masticazione.

Altri fattori, quali l'aggiunta di acqua o la riduzione delle dimensioni del prodotto, che intervengono durante la masticazione, influenzano anche essi il rilascio di composti volatili.

Brauss *et al.* (1999) hanno aggiunto un dispositivo di idratazione ad un campionatore dello spazio di testa dinamico al fine di studiare l'effetto dell'idratazione sul rilascio del flavour dai biscotti. Dai loro risultati si evince che il rilascio di alcuni composti, come il 3-metilbutanale, è strettamente correlato all'idratazione del prodotto, mentre per altri, come l'anelolo, tale fenomeno non si manifesta. Questo differente comportamento è, probabilmente, ascrivibile alle diverse proprietà chimico-fisiche, ed in particolare di polarità, esistenti tra i due composti volatili.

### **1.3 Strumenti analitici convenzionali dei composti aromatici**

Come abbiamo accennato in precedenza sono numerose le tecniche analitiche sviluppate per isolare e caratterizzare i composti aromatici da matrici alimentari e l'utilizzo di una tecnica piuttosto che di un'altra dipende fortemente dall'obiettivo perseguito.

L'isolamento dell'aroma dagli alimenti si basa generalmente sia sulla volatilità sia sulla solubilità dei composti aromatici. I metodi di estrazione con solventi, ad esempio, si avvalgono esclusivamente della solubilità dei composti

aromatici, al contrario le tecniche che applicano l'analisi dello spazio di testa sfruttano la loro volatilità.

I metodi chimici, quali la distillazione oppure l'estrazione, hanno lo scopo di analizzare la totalità dei composti volatili presenti nell'alimento, ma non sono in grado di rappresentare in modo reale i costituenti volatili responsabili della percezione durante il consumo.

Le tecniche dello spazio di testa, sia statiche che dinamiche, permettono - invece - di analizzare direttamente gli effluvi rilasciati dall'alimento, senza distruggere o modificarne la struttura e senza utilizzare sostanze chimiche. Consentono, dunque, di determinare il coefficiente di ripartizione vapore-liquido ( $P_{ap}$ ), mediante l'analisi della fase vapore sopra il prodotto utilizzando la gas-cromatografia (Druaux & Voilley, 1997).

Il loro svantaggio deriva dal fatto che non sempre permettono di rilevare accuratamente ciò che è presente a livello dei recettori olfattivi e gustativi. Permettono, infatti, di descrivere con accuratezza la composizione totale volatile di un alimento prima del suo consumo, ma molto spesso non sono in grado di fornire dati che descrivano la percezione del profilo aromatico di un alimento durante il consumo e quindi correlabili ai risultati dell'analisi sensoriale. Forniscono, dunque, una misura dei composti disponibili come potenziali stimolanti (Piggott, 2000).

A questo punto è necessario effettuare una breve disamina circa i metodi di spazio di testa, statici e dinamici, disponibili per l'isolamento dei composti volatili da una matrice alimentare.

### *1.3.1 Tecniche dello spazio di testa.*

Tra le tecniche dello spazio di testa ricordiamo il campionamento con lo spazio di testa statico (o spazio di testa all'equilibrio). La tecnica prevede che il campione venga inserito in un contenitore di vetro sigillato (*vial*) dove si pone in equilibrio con il suo vapore, ricco soprattutto delle componenti più volatili. Il vapore viene poi iniettato in colonna, evitando così gli inconvenienti dovuti all'introduzione di sostanze poco volatili o di grandi masse di solvente.

Nel caso di un vapore in equilibrio con la soluzione liquida, la concentrazione dei componenti volatili nella fase vapore è regolata, in condizioni ideali, dalla legge di Raoult:

$$p_i = \chi p_0$$

dove  $p_i$  è la pressione parziale di ciascun componente nella fase vapore;  $p_0$  la pressione di vapore di ciascun componente alla temperatura della *vial*;  $\chi$  è la frazione molare di ciascun componente nella soluzione.

Nel cromatogramma che si ottiene analizzando lo spazio di testa, i picchi hanno un'area ( $S$ ) proporzionale alla concentrazione di ciascun componente nella fase vapore (e quindi nella fase liquida):

$$S = f\chi p_0$$

dove  $f$  è il fattore di risposta del rivelatore.

Dato che  $p_0$  è costante per ogni componente (a temperatura costante) e anche  $f$  può essere ritenuto costante, la precedente equazione si può scrivere nella forma più semplice:

$$S = f' \chi$$

Il fattore  $f'$  viene determinato sperimentalmente.

La composizione dello spazio di testa dipende dalla ripartizione dei composti volatili tra l'aria e le differenti fasi presenti nell'alimento (acqua, lipidi).

Questo metodo appare, quindi, particolarmente utile per lo studio del rilascio dei composti volatili da bevande omogenee in cui la masticazione o la miscelazione tra i componenti dell'alimento non sono rilevanti e può essere applicato, soprattutto, per investigare i cambiamenti che occorrono, nel rilascio dei composti volatili da un alimento liquido, a seguito di una modificazione della composizione (Piggott & Schaschke, 2001).

I vantaggi di questa tecnica sono rappresentati dalla semplicità e dalla rapidità di campionamento; per contro, ha lo svantaggio di avere una bassa sensibilità, per cui è possibile la determinazione soprattutto dei composti a più alta volatilità. Altri svantaggi derivano dalla possibile condensazione dei composti

all'interno della siringa utilizzata per il campionamento e dal loro adsorbimento sul setto del contenitore.

Un'ulteriore tecnica di campionamento dello spazio di testa è quella condotta in condizioni dinamiche o anche detta *purge-and-trap*, in cui un gas inerte è fatto passare attraverso il campione termostato per un periodo di tempo sufficiente ad estrarre tutti o la maggior parte dei composti volatili. Seuvre *et al.* (2000) hanno, ad esempio, utilizzato come gas inerte l'azoto, fatto passare attraverso la fase liquida a velocità di flusso costante. Ad intervalli regolari, un campione della fase vapore veniva iniettato nel gas cromatografo e rivelato. Dall'elaborazione dei dati è stato possibile determinare il coefficiente di ripartizione vapore-liquido dei composti aromatici investigati.

La tecnica dello spazio di testa dinamico prevede i composti volatili ricercati siano concentrati in una banda stretta, per cui è necessario l'utilizzo di una trappola. I metodi più comuni per fare ciò sono:

1. intrappolamento criogenico
2. adsorbimento su letto adsorbente desorbibile
3. trappole in colonna di vapore
4. criointrappolamento su colonna

I soluti, una volta intrappolati, saranno liberati dalla matrice, separati in una colonna e rivelati (Stevenson *et al.*, 1996).

La sensibilità del metodo, ossia la quantità di composti volatili intrappolati, dipende strettamente dal tempo di esposizione del campione (Piggott & Schaschke, 2001).

Gli svantaggi delle tecniche dello spazio di testa dinamico sono rappresentati dall'espulsione di una notevole quantità di vapore acqueo insieme con l'analita; dalla diminuzione della capacità di adsorbimento dell'adsorbente utilizzato per la concentrazione dei volatili ed, infine, dalla diffusione delle sostanze non ritenute dalle trappole (Stevenson *et al.*, 1996).

Una nuova metodologia di estrazione è la microestrazione in fase solida che è una semplice tecnica di adsorbimento dei composti aromatici presenti nello spazio di testa su materiali adsorbenti. Il campionamento con questa tecnica non richiede né l'estrazione con solventi e le successive fasi di purificazione, né il complicato apparato purge-and-trap.

Un'unità SPME è costituita da un contenitore e una fibra di silica fusa legata ad uno strato di fase stazionaria. Quando un rivestimento SPME è esposto nello spazio di testa di un recipiente, contenente il campione chiuso ermeticamente, si verifica un processo di ripartizione all'equilibrio tra il campione ed il coating SPME.

La ripartizione all'equilibrio dei composti aromatici tra lo spazio di testa del campione ed il coating SPME dipende una serie di condizioni sperimentali, a cui – peraltro- l'analisi SPME è piuttosto sensibile, quali: temperatura e tempo

di esposizione ad una data temperatura, volume di campione e concentrazione di campione nel contenitore. Dunque, l'applicazione di questa tecnica per lo studio dei composti aromatici degli alimenti e delle bevande richiede numerose modifiche al fine di migliorare la riproducibilità, la sensibilità e la risoluzione del cromatogramma.(Jia *et al.*, 1998).

#### **1.4. Strumenti analitici innovativi per lo studio dei composti aromatici in vivo.**

Il coefficiente di ripartizione tra le fasi, come accennato in precedenza, fornisce informazioni sull'interazione matrice - flavour solo in condizioni di equilibrio. Durante il consumo, invece, tale equilibrio non si raggiunge (van Ruth *et al.*, 2000).

Dunque, per ottenere dei dati che meglio riflettano il pattern di composti volatili che giungono ai recettori olfattivi durante il consumo, sono stati messi a punto nuovi strumenti analitici quali il *campionatore del respiro orale e nasale*, basati sull'analisi dell'aria espirata durante il consumo di un alimento, consentendo così di misurare il "reale" rilascio aromatico nel cavo orale (Piggott, 2000).

Gli studi che impiegano "l'analisi del respiro" emesso dalla bocca oppure dal naso hanno permesso di ottenere importanti informazioni. In particolare, queste tecniche dimostrano che i composti volatili vengono rilasciati con

differenti cinetiche durante il consumo e che la concentrazione dei singoli composti del flavour si modifica nel tempo. Sulla base di queste indicazioni è, dunque, possibile costruire le cinetiche di rilascio di ciascun composto aromatico, ossia le cosiddette curve di *time-release* (TR).

Il vantaggio consiste nel poter confrontare le curve time-release con le curve sensoriali *time-intensity* (TI), determinando, così, quali composti sono coinvolti nella percezione del flavour (Taylor & Linfoth, 1996).

Il test time-intensity è considerato un metodo sensoriale dinamico, in quanto consente di registrare il cambiamento di una caratteristica sensoriale in un determinato lasso di tempo. Il risultato del test TI è tipicamente una curva che mostra come varia l'intensità della sensazione aromatica la quale generalmente aumenta subito dopo l'assaggio del campione, per poi decadere nel tempo. La tecnica è stata inizialmente adoperata per investigare il comportamento nel tempo di molecole dolci, amare o astringenti; in particolare, per studiare eventuali cambiamenti temporali nella percezione gustativa, in seguito alla modifica di un costituente della matrice. Successivamente, è stata utilizzata per verificare le modalità di rilascio di composti volatili aromatici dagli alimenti, nonché il cambiamento degli attributi di texture.

I comuni metodi sensoriali richiedono ai panelisti di valutare l'intensità percepita dando un singolo punteggio. In questo modo, è possibile ottenere o stimare solo il picco di intensità di un attributo sensoriale: 2 prodotti

potrebbero, ad esempio, avere lo stesso profilo medio di tempo, ma differire per la velocità con cui raggiungono il loro picco massimo di intensità. I metodi di analisi convenzionali, quali la QDA, trattano - dunque - i parametri sensoriali come fenomeni statici (Dijksterhuis & Piggott, 2001; Peyvieux & Dijksterhuis, 2001).

Il test time-intensity, dal punto di vista sensoriale, e le tecniche di campionamento del *mouthspace* oppure del *nosespace*, dal punto di vista strumentale, si configurano -dunque - come i metodi di analisi più innovativi ed efficaci nello studio del rilascio dei composti aromatici durante il consumo.

La tecnica del campionamento del *mouthspace* oppure del *nose-space* prevede l'introduzione di un tubo di plastica, rispettivamente, in bocca oppure nelle narici dell'operatore (Fig. 1). Quando questi consuma l'alimento, l'aria espirata viene intrappolata nel tubo e, successivamente, analizzata mediante gascromatografia (Stevenson *et al.*, 1996).



**Fig. 1** Principio di applicazione del campionatore del nosespace.

Attualmente, i due approcci maggiormente seguiti per l'analisi dei composti volatili durante il consumo sono: 1. l'adsorbimento dei composti volatili su trappole di Tenax o su materiali simili, il successivo desorbimento mediante pompe da vuoto e la rivelazione attraverso la gas-cromatografia; 2. input diretto all'interno dello spettrometro di massa attraverso un'apposita interfaccia.

Entrambi i metodi ovviamente presentano degli svantaggi.

L'intrappolamento su Tenax, come derivato della convenzionale analisi dello spazio di testa dinamico, è stato usato con successo per lo studio del rilascio del flavour in bocca da un ampio numero alimenti o sistemi modello. È risultato molto valido per l'analisi dei composti volatili da caramelle alla menta, da pomodori e dal formaggio, mostrando un pattern di composti differente rispetto a quello raccolto con la tecnica dello spazio di testa.

Ingham *et al.* (1995), adoperando la tecnica del *nose-space* e l'intrappolamento su Tenax hanno descritto il profilo dei composti volatili delle fragole liberati durante il consumo, rilasciati nella fase di espirazione.

Lo svantaggio nell'utilizzo delle trappole di Tenax per bloccare i composti aromatici deriva dal notevole dispendio di tempo necessario per ottenere dati sufficienti a plottare un singolo profilo di rilascio dei composti volatili ed un tempo di risoluzione più lungo (tipicamente , 15-30 s), rispetto all'input diretto (che fornisce un responso breath-by-breath) (Piggott & Schaschke, 2001).

Weel *et al.* (2002) hanno, invece, monitorato la concentrazione del flavour nel nose-space, rilasciato da cinque gel proteici con differente durezza, mediante il TI test e la tecnica dell'MS-nose, sviluppata da Taylor e collaboratori, che consiste nell'utilizzo di uno spettrometro di massa equipaggiato con una sorgente di ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI), che consente l'analisi del respiro.

L'APCI-MS (Atmospheric Pressure Chemical Ionization - Mass Spectrometry) fornisce informazioni rapide e dettagliate sul rilascio di composti volatili durante la respirazione campionando l'aria espirata dal naso. Essa prevede l'intrappolamento di una piccola parte del respiro emesso dai panelisti, durante l'assunzione di un campione, in una sorgente attraverso una *transferline* di silica fusa disattivata e riscaldata. I composti volatili vengono ionizzati mediante una scarica che causa un effetto corona e trasferiti poi nella regione

di vuoto spinto dello spettrometro di massa. Si ottiene così una ionizzazione chimica che, a pressione atmosferica, risulta molto efficiente per effetto dell'alta velocità di collisione delle particelle (Linforth *et al.*, 1999).

Questa tecnica ha dato soddisfacenti riscontri nello studio del rilascio dei composti volatili durante il consumo (Ingham *et al.*, 1995, Brauss *et al.*, 1999) dimostrando la dipendenza della velocità di rilascio dei composti aromatici dal contenuto di macromolecole presenti negli alimenti.

Con questa tecnica, Brauss *et al.*, (1999) hanno, infatti, dimostrato la dipendenza della velocità di rilascio dei composti aromatici dello yogurt dal contenuto in grassi e dei biscotti dalla velocità di idratazione.

Linforth *et al.* (1999) e Baek *et al.* (1999) hanno studiato, sempre attraverso l'utilizzo dell'APCI-MS, combinato con il *Time Intensity test*, il rilascio di composti volatili da differenti gel durante la masticazione, monitorando la composizione volatile del respiro. Mediante un'analisi di regressione, è stata evidenziata una correlazione lineare esistente tra le curve time-release (TR) e time-intensity (TI) e, dunque, tra i cambiamenti di concentrazione dei composti volatili nel corso del consumo (stimolo chimico) e l'intensità della percezione di tali composti (risposta percepita). In particolare, i profili TI mostravano differenze significative per i differenti gel utilizzati, con un  $I_{\max}$  che diminuiva ed un  $T_{\max}$  che incrementava, all'aumentare della concentrazione di gelatina.

In questo processo di correlazione, è necessario considerare - però - anche l'influenza di alcuni fattori fisiologici, responsabili di possibili fenomeni di adattamento o di ritardo nella percezione sensoriale del flavour. Tra questi possiamo citare la velocità di masticazione, il flusso di saliva, la deglutizione, etc. (Harvey & Barra, 2003). Se, ad esempio, la masticazione avviene molto lentamente, è possibile il verificarsi di un fenomeno di adattamento dei sensi, che può causare un discostamento tra le curve TR e TI. Al contrario, una masticazione troppo rapida può comportare un ritardo nella percezione sensoriale (Linthorpe *et al.*, 1999).

Per contro, l'utilizzo dell'APCI-MS per l'analisi del nose-space comporta alcuni svantaggi: i costi iniziali sono molto sostenuti; non consente di effettuare un'analisi di carattere quantitativo e, poiché l'identificazione dei composti volatili si basa solo sulla determinazione della massa delle molecole, è necessario conoscere in anticipo quali composti sono presenti nella matrice o, preliminarmente, effettuare un'analisi qualitativa mediante estrazione dei volatili con lo spazio di testa e successiva rivelazione GC-MS. In questo modo, non solo è possibile determinare le molecole presenti, ma anche se le masse che devono essere monitorate sono uniche per i composti di interesse (Harvey & Barra, 2003).

Anche l'interpretazione dei dati è piuttosto complessa; di fatti, il segnale è proporzionale alla quantità di composto aromatico per unità di tempo, che a

sua volta è funzione sia dalla velocità di flusso dell'aria espirata sia dalla concentrazione del flavour. Un respiro più rapido avrà, sul segnale, esattamente lo stesso effetto di un incremento della concentrazione del composto aromatico (Normand *et al.*, 2004).

Dunque, è necessario un compromesso tra tempo di risoluzione e sensibilità: i metodi di intrappolamento sono più lenti, ma hanno il vantaggio che i composti volatili collezionati possono essere separati mediante cromatografia. L'approccio attraverso l'APCI-MS fornisce, invece, un responso rapido, per l'elevato grado di tempo di risoluzione, ma presenta ancora limiti derivanti dall'incapacità di distinguere i composti che hanno lo stesso ione molecolare derivante dalla frammentazione (Piggott & Schaschke, 2001).

Nella presente lavoro è stato seguito, da un lato, un approccio metodologico convenzionale (analisi dello spazio di testa statico) per studiare il rilascio di molecole aromatiche da un sistema modello, in funzione della concentrazione di un idrocolloide (I caso studio); dall'altro, un approccio di tipo innovativo (*breath analysis*) per rilevare i composti volatili da una matrice alimentare direttamente durante il consumo. La separazione e l'identificazione dei composti volatili è stata condotta mediante desorbimento termico e successiva analisi GC-MS. I risultati ottenuti con la tecnica del mouthspace sono stati confrontati con quelli derivanti dall'estrazione mediante lo spazio di testa statico (II caso studio).

## **I PARTE**

# **STUDIO SUL MECCANISMO DI RILASCIO E RITENZIONE DI SOSTANZE AROMATICHE VOLATILI DA MATRICI A BASE DI IDROCOLLOIDI**

## 1. INTRODUZIONE

Gli idrocolloidi, adoperati in basse concentrazioni, sono ampiamente utilizzati come agenti responsabili della struttura degli alimenti. Molti studi hanno dimostrato che essi possono influenzare la velocità e l'intensità del rilascio del flavour attraverso l'intrappolamento fisico delle molecole di flavour nella matrice oppure mediante legami specifici o non (Hansson *et al.*, 2001, Secouard *et al.*, 2003).

La gomma xantano è un polisaccaride di origine batterica, ampiamente utilizzato in numerose applicazioni industriali. La fonte più comune di questo polisaccaride è il batterio *Xanthomonas campestris*.

Le maggiori applicazioni della gomma xantano a livello industriale derivano dal fatto che quando la gomma xantano è dispersa, sia in acqua calda che in acqua fredda, le dispersioni acquose che ne derivano sono tixotropiche.

Da un punto di vista reologico, presenta, dunque, proprietà intermedie tra quelle di una soluzione e di un gel. Questo comportamento deriva dal fatto che lo xantano in soluzione presenta una conformazione ordinata, rigida e forma un tenue network tridimensionale derivante dalla debole associazione, l'una accanto all'altra, di catene ben organizzate. Sebbene le soluzioni di xantano scorrano liberamente, mostrano uno spettro meccanico simile a quello dei gel:  $G'$  supera  $G''$  a tutte le frequenze, con una piccola dipendenza dalla frequenza in entrambi i moduli.

In pratica, la debole struttura simil-gel che si forma esibisce, anche a basse concentrazioni del polimero, una inusuale alta viscosità, che può essere utilizzata per dare consistenza alle soluzioni acquose e permettere la stabilizzazione di emulsioni e sospensioni per lunghi periodi di tempo.

Il comportamento pseudoplastico dei deboli gel di xantano è abbastanza differente da quello degli “entangled coils”. In particolare, siccome è necessario un determinato stress per rompere il network, la viscosità (definita come il rapporto tra lo stress applicato e la velocità di deformazione generata) incrementa progressivamente con l’aumentare della velocità di deformazione (*shear rate*), fino a raggiungere un valore di equilibrio.

La gomma xantano ha numerose applicazioni in campo alimentare; viene, infatti utilizzata per la formulazione di salse, sughi e desserts, in quanto grazie alle proprietà tixotropiche delle sue dispersioni, questi prodotti possono essere riscaldati o refrigerati senza perdere le loro proprietà di texture.

## 2. SCOPO E STRUTTURA

Lo scopo di questo studio è quello di esaminare come e se delle soluzioni a diversa concentrazione di gomma xantano (dunque, a differente viscosità) potessero influenzare il rilascio del limonene in un sistema modello.

Sono state, dunque, preparate delle soluzioni di xantano a concentrazione variabile aggiunte di una stessa quantità di limonene.

Il metodo utilizzato per verificare la quantità di limonene rilasciato è lo spazio di testa statico. Le soluzioni, dunque, sono state poste in vials ermeticamente chiuse e riscaldate in batch fino al raggiungimento dell'equilibrio con la fase vapore. Lo spazio di testa dei campioni è stato analizzato mediante HRGC-FID.

La concentrazione di limonene nelle differenti matrici è stata calcolata mediante una retta di taratura, preventivamente costruita.

La viscosità è stata misurata mediante un reometro a strain controllato.

### 3. MATERIALI E MEDODI

#### 3.1 Preparazione dei campioni

Sono state preparate delle soluzioni acquose contenente una concentrazione di gomma xantano variabile dallo 0 all'1%.

Schematicamente, la formulazione prevedeva:

Soluzione 1: Solvente: acqua

Addensante: gomma xantano (0.1-1%)

Disperdente: saccarosio (10%)

Soluzione 2: Composto aromatico: limonene (50ppm)

Standard Interno: etanolo

La gomma xantano ed il saccarosio sono stati miscelati tra loro e gentilmente dispersi in acqua, portando a volume fino a 100 ml (Soluzione 1). La soluzione è stata posta in agitazione per una notte a temperatura ambiente e, successivamente, raffreddata ancora per una notte a 5°C, in modo da permettere allo xantano di riportarsi nella sua forma nativa.

A questo punto è stata aggiunta una soluzione di limonene in etanolo (Soluzione 2), in quantità tale che la concentrazione di etanolo rappresentasse lo 0,5% della soluzione finale e la concentrazione di limonene fosse pari a 50 ppm. L'etanolo è stato utilizzato come standard interno.

L'intero sistema (Soluzione 1 + Soluzione 2) è stato posto in agitazione per altri 15 min a temperatura sub-ambiente, in modo da permettere il miscelamento del composto aromatico e dello standard. Difatti, sebbene la solubilità del limonene risenta moderatamente della variazione di temperatura, l'introduzione del composto aromatico a basse temperature consente di limitarne la sua volatilità, minimizzando la perdita di aroma durante l'introduzione nella matrice.

### **3.2 Misure reologiche**

Su tutti i campioni sono stati eseguiti test in regime stazionario utilizzando un reometro rotazionale a deformazione controllata, Rheometric Scientific RFSII (Rheometric, Inc. Piscataway, NY), equipaggiato con una geometria a cilindri coassiali, caratterizzata da un cilindro esterno con diametro di 34 mm e da un cilindro interno con diametro di 32 mm ed un'altezza di 33 mm. Una volta preparata la sospensione da analizzare, 12 ml di substrato sono stati prelevati ed inseriti nel cilindro interno. Le curve di viscosità della gomma xantano sono state ottenute sottoponendo i campioni a test di *steady rate sweep*, eseguiti a 37°C con una velocità di deformazione compresa tra 0,01 e 1000. I dati presentati sono il risultato della media dei valori ottenuti da almeno 3 ripetizioni effettuate su ogni campione.

### 3.3 Analisi dello spazio di testa statico

La cinetica di rilascio del composto volatile, per ciascuna matrice, è stata monitorata mediante la tecnica dello spazio di testa statico. Dunque, al fine di stabilire il tempo di condizionamento necessario per il raggiungimento dell'equilibrio tra la fase liquida e la fase vapore, 1 ml della miscela - sopra descritta - è stato posto in vial da 20 ml chiuse ermeticamente e condizionate in batch a 37°C fino a 5 h.

Individuato il tempo necessario per il raggiungimento dell'equilibrio tra le due fasi, è stata verificata la concentrazione di limonene rilasciata nello spazio di testa delle matrici a diversa concentrazione di xantano.

Lo spazio di testa è stato analizzato mediante HRGC-FID (Agilent 6890).

Il gas-cromatografo prevedeva l'utilizzo di una colonna HP-5MS Agilent, 30m, 0.25 mm ID, film thickness 0.25  $\mu$ m. Le condizioni gas-cromatografiche utilizzate sono state le seguenti:

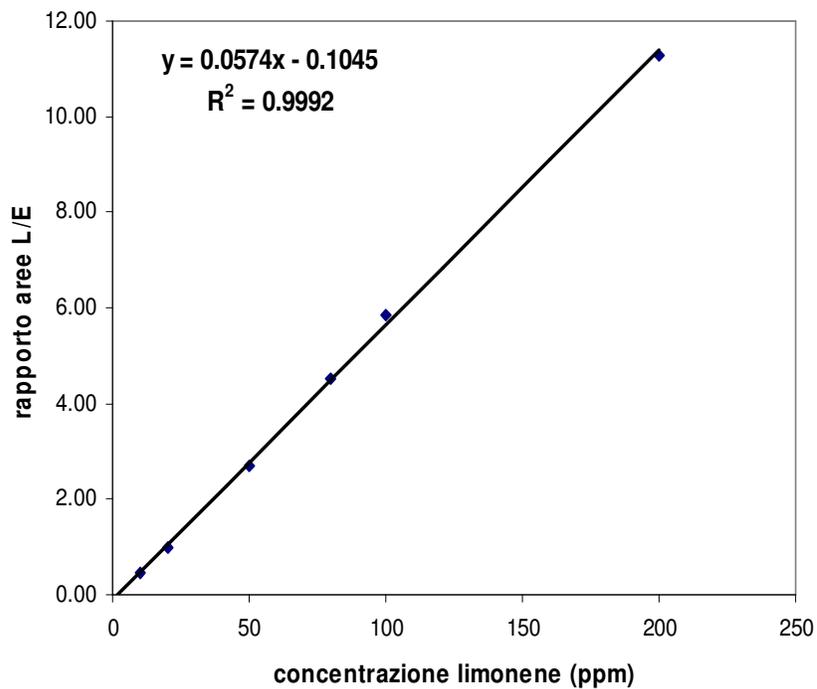
Vaporizzatore a temperatura programmata (PTV): 50°C per 5 secondi, incremento di temperatura di 300°C/min fino a 250°C per 3 minuti.

Camera: 40°C per 1 minuto, incremento di 2°C/min fino a 120°C per 1 minuto.

Il rapporto di splittaggio era pari a 2:1. Il gas di trasporto utilizzato era elio con flusso in colonna di 1.2 ml/min.

### 3.4 Retta di taratura

La concentrazione di limonene rilasciata nello spazio di testa, nelle differenti matrici, è stata calcolata sperimentalmente mediante l'utilizzo curva di taratura nell'intervallo di concentrazioni 10-200 ppm (Fig. 2).



**Fig. 2** Retta di taratura per il limonene

Per la costruzione della retta di taratura è stato utilizzato il metodo della standardizzazione interna che consente di ottenere risultati molto accurati e affidabili. In pratica, sono state preparate delle soluzioni a concentrazione nota di limonene (da 10 a 200 ppm) a cui è stata aggiunta una quantità

costante e nota di un composto definito *standard interno*. Lo standard interno deve essere un composto non presente nella miscela da analizzare, ben risolto dagli altri componenti, con un tempo di ritenzione simile a quello del composto aromatico da analizzare e non capace di reagire con il campione.

Nel caso specifico, il composto scelto come standard interno è l'etanolo.

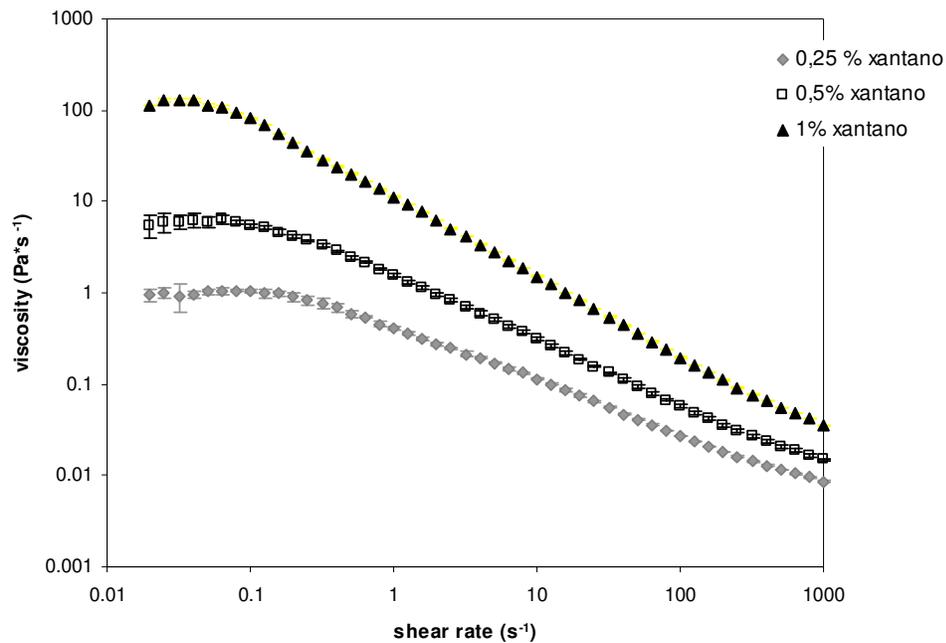
Dunque, attraverso questa tecnica, per la quantificazione dell'analita non abbiamo fatto riferimento all'area del picco, bensì al rapporto tra l'area del picco del composto da analizzare (limonene) e l'area del picco dello standard interno (etanolo). La retta di taratura che abbiamo così costruito ci ha consentito di ovviare a problemi tecnici di riproducibilità del sistema di iniezione e di eventuali derive della sensibilità del rivelatore

Mediante l'equazione della retta che deriva dall'interpolazione dei punti ottenuti sperimentalmente è stato possibile risalire alla concentrazione effettiva di limonene presente nello spazio di testa delle soluzioni a diversa concentrazione di xantano.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Prove reologiche

Le prove reologiche mettono in evidenza un comportamento pseudoplastico della soluzione idrocolloidale a base di xantano, ossia la viscosità apparente ( $\eta$ ) (rapporto tra sforzo e velocità di deformazione) è funzione della velocità di deformazione ( $\dot{\gamma}$ ). In particolare,  $\eta$  decresce all'aumentare della velocità di deformazione tendendo ad assumere un valore costante per valori elevati di  $\dot{\gamma}$  (Fig. 3). Tutte le curve di flusso mostrano il primo plateau newtoniano, che risulta più esteso nelle curve a bassa concentrazione di gomma xantano. I risultati sperimentali mostrano un'evidente dipendenza della viscosità apparente dalla concentrazione di xantano. Più precisamente, il valore di  $\eta$  aumenta all'aumentare della percentuale di gomma xantano, in particolare in corrispondenza dei bassi valori della velocità di deformazione.

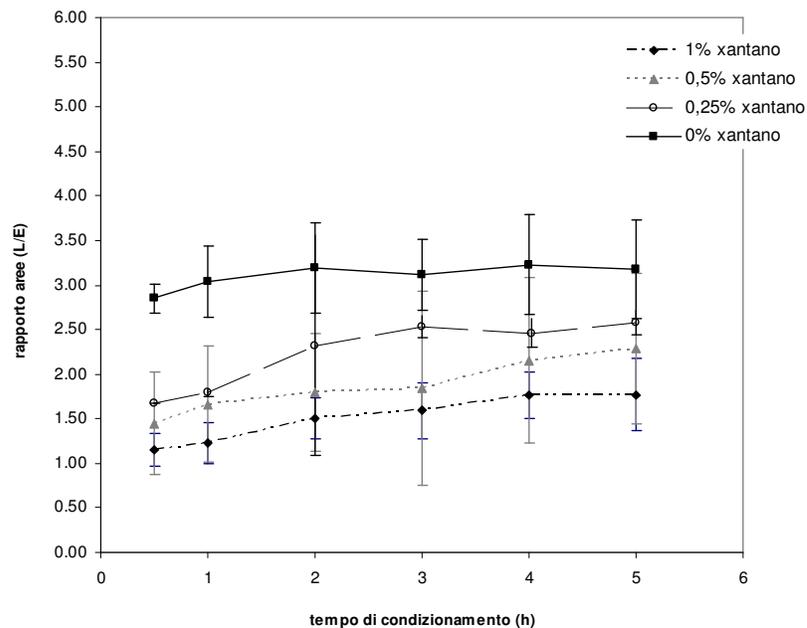


**Fig. 3** Curve di flusso delle matrici a differenti concentrazioni di gomma xantano.

## 4.2 Analisi dello spazio di testa statico

Per stabilire il tempo necessario affinché si stabilisse un equilibrio liquido-gas, è stato monitorato il rilascio del composto aromatico, ad intervalli regolari di tempo fino a 5 ore, tempo oltre il quale, per tutte le concentrazioni, non si verificavano variazioni significative dell'area del picco del limonene. Nella figura 4 sono riportate le cinetiche di rilascio del limonene (espresso come rapporto tra l'area del picco del limonene e dell'etanolo) in soluzioni a

differenti concentrazioni di gomma xantano durante il tempo di condizionamento in batch a 37°C.



**Fig. 4** Cinetica di rilascio del limonene nel corso del condizionamento in batch in soluzioni a diverse concentrazioni di gomma xantano.

I dati sperimentali mostrano l'evidente effetto della concentrazione di xantano sul rilascio del limonene. In particolare, si osserva che la soluzione contenente lo 0% di xantano (dunque, costituita solo da acqua, saccarosio e soluzione di limonene in etanolo) è quella a cui corrisponde il maggior rilascio di limonene e la più rapida cinetica, raggiungendo condizioni di equilibrio già dopo 0,5h di condizionamento in batch. Difatti, dall'analisi della varianza si evince che non ci sono differenze significative tra i campioni ai diversi tempi di

condizionamento ( $p > 0,5$ ). La matrice priva di xantano, dunque, non oppone una forte resistenza al trasferimento molecolare verso l'ambiente circostante (fattore cinetico), permettendo l'instaurarsi, in tempi molto brevi, di una condizione di equilibrio tra le due fasi (liquido-gas) (de Ross, 2003).

L'effetto cinetico si evidenzia ancor più nel corso delle restanti prove eseguite aumentando la concentrazione di xantano, nel corso delle quali si osserva l'aumento del tempo necessario al raggiungimento dell'equilibrio fra le fasi, al crescere della concentrazione di idrocolloide. Tuttavia, è evidente come con la crescita del contenuto di xantano si abbia una riduzione della concentrazione di limonene rilasciata dalla matrice, suggerendo che oltre alla resistenza opposta dalle maglie dello xantano al rilascio del limonene potrebbe essere intervenuto anche un fenomeno di carattere termodinamico, per cui una parte di limonene rimane intrappolata in modo stabile piuttosto alla matrice.

### **4.3 Analisi quantitativa del limonene rilasciato**

La concentrazione effettiva del limonene (espressa in ppm) rilasciata nello spazio di testa dalle differenti matrici a base di xantano è stata calcolata mediante la retta di taratura precedentemente costruita (Fig. 2).

Nella tabella 1 viene riportato: il rapporto dell'area del picco del limonene e dell'etanolo dopo 0,5 h e dopo 5 h di condizionamento in batch a 37°C, nelle diverse matrici analizzate; la quantità di limonene rilasciata nello spazio di testa

del sistema dopo 0,5 h e 5 h di condizionamento ed, infine, la variazione della concentrazione del composto aromatico rispetto al controllo (0% xantano) dopo 0,5 e 5 h.

**Tab. 1** Variazioni della concentrazione di limonene nelle matrici a diversa concentrazione di xantano.

Concentrazione xantano	Rapporto L/E (t=0.5h)	Rapporto L/E (t=5h)	Concentrazione limonene (ppm) (t=0,5h)	Concentrazione limonene (ppm) (t=5h)	$\Delta$ [limonene]%(t=0.5h)	$\Delta$ [limonene]%(t=5h)
0.00%	2.85	3.15	51.5	56.6	0.0	0.0
0.25%	1.68	2.58	31.0	46.8	39.7	17.4
0.50%	1.45	2.29	27.1	41.8	47.4	26.2
1.00%	1.15	1.77	21.9	32.7	57.5	42.3

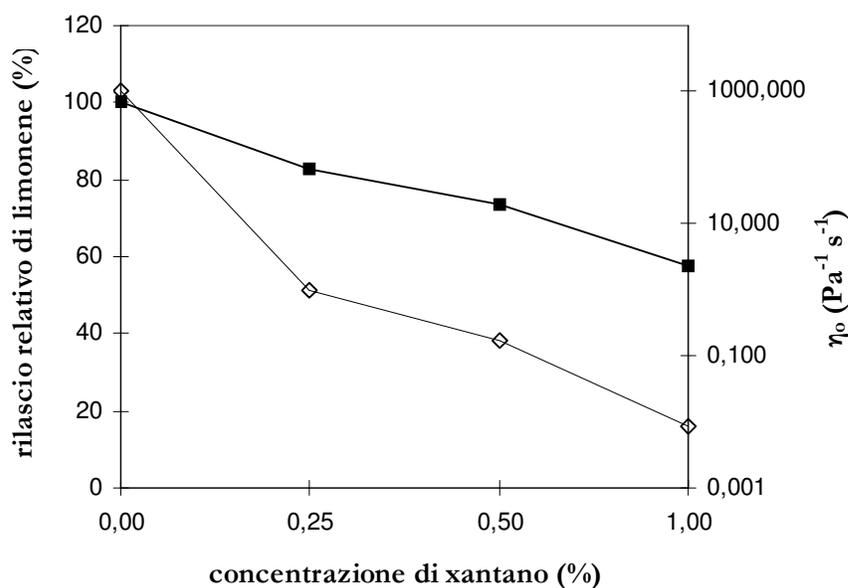
Nello specifico, nella soluzione senza xantano (0%) ci si attende che la quantità di limonene rilasciata sia proprio pari a 50 ppm. Sostituendo i valori ottenuti sperimentalmente nell'equazione della retta si ottiene, infatti, un valore effettivo prossimo a 50 (51.5 ppm) dopo 0,5 h. Nelle matrici contenenti xantano, la concentrazione di limonene rilasciato tende a diminuire notevolmente, arrivando a circa 22 ppm nella soluzione con 1% di gomma dopo 0,5 h di condizionamento. Inoltre, è possibile osservare come già nella soluzione contenente lo 0,25% di xantano nelle prime fasi di condizionamento (0,5 h) si abbia un notevole intrappolamento di limonene; difatti, la variazione percentuale di composto rilasciato nello spazio di testa, rispetto al controllo, è pari a circa il 40% (la percentuale di limonene rilasciato è, dunque, pari al 60%

della quantità iniziale). Per tempi più lunghi (fino 5 h) è, invece, evidente il recupero, nello spazio di testa del sistema, di buona parte del composto aromatico precedentemente intrappolato (la variazione percentuale rispetto al controllo dopo 5 h diventa pari a 17.4%).

Nelle matrici con una concentrazione di idrocolloide dello 0,5% si osserva un andamento analogo alla precedente soluzione; dunque, si assiste ad una riduzione iniziale della concentrazione di limonene per tempi di condizionamento brevi ed un parziale recupero per tempi più lunghi.

Nelle matrici con 1% di xantano, invece, la concentrazione dopo 0,5 h di condizionamento è di circa 22 ppm, ossia pari al 42% del limonene inizialmente presente nella soluzione, ed arriva a 33 ppm dopo 5h. Dunque, a differenza dei casi precedenti, anche dopo tempi lunghi di condizionamento la quantità di limonene rilasciata nello spazio di testa rimane nettamente inferiore a quella della soluzione controllo, per cui all'aumentare della concentrazione di xantano, la forza del gel tende ad incrementare e, quindi, una parte delle molecole di composto aromatico rimane intrappolata nelle maglie dello xantano in modo piuttosto stabile.

Nella figura 5 viene mostrato il rilascio di limonene (a 5 h di equilibrio) come funzione della concentrazione di xantano.



**Fig. 5** Rilascio di limonene ■ e inverso della velocità di deformazione, nel plateau newtoniano, ◇ in funzione della concentrazione di xantano.

Dal grafico si evince come già una concentrazione di 0,25% di xantano riduca notevolmente la quantità di limonene rilasciata per effetto di fenomeni di ingombro sterico. Il fenomeno si accentua maggiormente con l'aumento della concentrazione dell'idrocolloide, fino a raggiungere – con l'aggiunta dell'1% di xantano - il massimo livello di ritenzione di limonene nel mezzo (che nel caso specifico corrisponde a circa il 57% di rilascio relativo). In aggiunta, è possibile osservare una buona correlazione tra l'inverso velocità di deformazione nel tratto del plateau newtoniano ( $1/\eta_0$ ) di queste matrici e la percentuale di limonene rilasciata dalle stesse, il che conferma il rilevante ruolo della viscosità sulla ritenzione di questo composto aromatico. In

aggiunta, l'incremento lineare della ritenzione di limonene, come funzione della concentrazione di xantano, potrebbe anche essere dovuto ad interazioni legame-specifico tra il composto aromatico e l'idrocolloide (Secouard *et al.*, 2003).

## 5. CONCLUSIONI

In conclusione, si può asserire che la struttura della matrice e, quindi, le sue proprietà reologiche hanno un significativo effetto sul rilascio delle sostanze volatili. La cinetica di rilascio risulta tanto più rallentata quanto più alta è la concentrazione dell'idrocolloide utilizzato; tuttavia - in termini relativi - per concentrazioni ridotte di xantano (0,25%), si assiste ad una maggiore riduzione di limonene rilasciato rispetto al controllo: il gap tra le due soluzioni ( 0% e 0,25% di gomma xantano) è piuttosto rilevante. Al contrario, una differenza molto meno marcata si registra tra le tre soluzioni a concentrazione più elevate di xantano (da 0,25% a 1%).

Nel corso del condizionamento in batch, inoltre, una parte del limonene viene recuperata, ma non totalmente, indicando un suo possibile intrappolamento stabile con la matrice.

## **II PARTE**

### **L'ANALISI DEI COMPOSTI ORGANICI VOLATILI IN VIVO ATTRAVERSO L'APPLICAZIONE DEL DESORBIMENTO TERMICO ACCOPPIATO CON GC-MS**

## 1. INTRODUZIONE

Il caffè è la bevanda più popolare al mondo dopo il tè. Il suo grande successo deriva dal piacevole aroma percepibile sia attraverso i recettori olfattivi sia durante il consumo. Il caffè espresso presenta caratteristiche aromatiche peculiari dovute principalmente alla schiuma, che intrappola i composti aromatici volatili e regola la loro emissione.

Il flavour del caffè dipende dal tipo di caffè utilizzato e dal grado di tostatura. Difatti, è stato riportato in letteratura che la riduzione dell'odore tostato dopo il riscaldamento del caffè è causato principalmente dalla diminuzione della quantità di tre composti zolfo (2-furfuriltiolo, metionale e 3-mercapto-3-metilbutil formato) ed è stato assunto che questi composti odoriferi si modificano a seguito di processi di ossidazione, degradazione termica e/o idrolisi (Kumazawa & Masuda, 2003).

La composizione della frazione volatile del caffè è stata studiata per molti anni e molte centinaia di composti sono stati riportati come costituente dell'aroma di caffè (Maeztu *et al.*, 2001). Ad oggi, addirittura, sono intorno a 900 le molecole volatili rilevate, sebbene il numero totale comprenda composti riscontrati in differenti matrici: caffè verde e caffè tostato (a tutti i livelli di tostatura), caffè di differente origine botanica e derivanti da diversi trattamenti post-raccolta, etc... Per molti anni gli scienziati hanno, infatti, concentrato la loro attenzione principalmente sull'identificazione dei composti volatili del

caffé. Intorno al 1970, è apparso - però - chiaro che, sebbene la frazione volatile del caffè fosse molto complessa, solo una piccola parte di questi composti - circa il 5% - era odorifera (Yeretzian, 2003). Queste sostanze bioattive sono definite *key odorants*. Recenti studi circa i composti odoriferi del caffè hanno portato ad identificare 28 importanti *key odorants*.

## 2. SCOPO E STRUTTURA

In questo lavoro viene illustrata la tecnica del desorbimento termico accoppiata con un sistema di rilevazione GC-MS per la caratterizzazione e la quantificazione dei composti aromatici che si sprigionano durante il consumo dal caffè espresso (*breath analysis*).

La *breath analysis* è confrontata con la tecnica dello spazio di testa statico, in modo da verificare eventuali differenze o similitudini nel pattern di composti rilevati con le due differenti tecniche.

La *breath analysis* prevede:

- il campionamento dell'aria espirata dalla bocca degli assaggiatori mediante un apposito “campionatore del respiro”;
- l'adsorbimento dei composti aromatici su trappole di *Tenax* e carbone nero grafitato poste lungo un tubo,
- il loro successivo desorbimento termico
- analisi gas-cromatografica, con rivelazione MS della componente volatile presente nella matrice alimentare.

Questa tecnica analitica non è nuova, ma è stata in parte abbandonata, perchè richiedeva tempi di indagine eccessivi, addirittura dell'ordine di qualche settimana per avere un pattern di dati tali da poter costruire una curva di rilascio nel tempo dei composti aromatici. Lo sviluppo di autocampionatori - accoppiati con il desorbitore termico - in grado di alloggiare, e quindi di

analizzare in sequenza, 100 campioni per volta ha reso attualmente questa metodologia nuovamente interessante e meritevole di attenzione da parte di ricercatori interessati allo studio della componente aromatica e della dinamica di percezione durante l'assunzione di cibi e bevande.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Estrazione dei composti organici volatili del caffè mediante spazio di testa statico.**

Per l'estrazione dei composti organici volatili del caffè mediante la tecnica dello spazio di testa statico, 5 ml di caffè sono stati posti in vial da 20 ml chiuse ermeticamente, condizionate in batch a 40°C. Lo spazio di testa è stato analizzato mediante Gas-cromatografo Agilent 6890 con rivelatore Spettrometro di Massa Agilent 5973. La colonna cromatografica utilizzata era HP-5MS Agilent, 30 m, 0.25 mm ID, film thickness 0.32 µm. Le condizioni gas-cromatografiche utilizzate sono state le seguenti: Vaporizzatore a temperatura programmata (PTV): 50°C per 5 secondi, incremento di temperatura di 500°C/min fino a 280°C per 3 minuti. Camera: 40°C per 2 minuti, incremento di 7°C/min fino a 250°C per 2 minuti. Il rapporto di splittaggio era pari a 5:1. Il gas di trasporto utilizzato era elio con flusso in colonna di 1.2 ml/min. Lo spettrometro di massa operava in modalità scan in un range di massa da 35 a 400 amu (2s/scan), con un potenziale di ionizzazione di 70 eV.

Il riconoscimento dei composti è avvenuto mediante il confronto dei loro spettri di massa e del loro tempo di ritenzione con quelli del database (NIST 98 e Wiley275).

### 3.2 Preparazione dei tubi di campionamento per l'analisi del respiro

I tubi di Tenax e Carbone nero grafitato (Markes International Ltd., UK), prima dell'utilizzo, sono stati condizionati termicamente, mantenendoli per 2h a 320°C e successivamente per 30 min a 335°C, utilizzando, come gas carrier, azoto ultra puro (99,99999%) ad una portata di 50ml/min.

Successivamente al condizionamento, i tubi venivano chiusi con tappi in ottone del diametro di ¼ di pollice e conservati in ambiente refrigerato. Il tappo veniva rimosso immediatamente prima del campionamento (Fig. 6).



**Fig 6** Tubi di materiali adsorbenti per il campionamento del respiro

### 3.3 Materiali adsorbenti

La scelta dei materiali adsorbenti è stata condotta sulla base della loro affinità verso i composti volatili da analizzare e della loro capacità a trattenerli. Il

Tenax ha una buona affinità verso i composti con un punto di ebollizione compreso tra 60 a 300°C mentre il carbone nero grafitato ha maggiore affinità per i composti basso-bollenti, con punto di ebollizione variabile da 40 a 140°C, dunque, per i composti più volatili. L'utilizzo delle due trappole in serie consente di esplorare un ampio spettro di analiti e di proteggere il materiale adsorbente più forte (Tenax) dall'acqua che viene intrappolata da quello più debole (Rabaud *et al.*, 2002).

### **3.4 Procedura di campionamento del respiro**

Il campionamento ha previsto la partecipazione di 8 assaggiatori, ai quali veniva chiesto di ingerire la bevanda dopo averla tenuta per 5 s in bocca e di respirare, in modo regolare, all'interno di un campionatore del respiro BioVOC (Markes International Ltd., UK). L'espirsto veniva raccolto ad intervalli di 10s per un periodo di 1 min.

Ai soggetti veniva chiesto di respirare per 10s all'interno del campionatore anche prima dell'assunzione dell'alimento, in modo da poter ottenere per ciascun soggetto il pattern di composti volatili già presenti naturalmente nel suo respiro. Per ogni assaggiatore la prova veniva ripetuta almeno per tre volte.

Il campionatore BioVOC (Fig. 7) è costituito da un cilindro di materiale inerte e da un pistone, che viene avvitato all'estremità superiore del cilindro. Quando

è necessario effettuare il campionamento, il pistone viene svitato, e sostituito con una sorta di bocchino in cartone rigido monouso (*mouthpiece*) attraverso il quale l'assaggiatore può respirare ed evitare il contatto diretto della bocca con il campionatore stesso. Una volta che l'operatore ha terminato, viene rimosso il bocchino dall'estremità superiore ed inserito il tubo di materiale adsorbente nell'estremità opposta (che è molto più ristretta). Il pistone viene avvitato all'estremità superiore ed effettuando una pressione su di esso è possibile il trasferimento dell'aria, intrappolata nel campionatore, all'interno del tubo di materiale adsorbente. Quest'ultimo viene rimosso, chiuso alle estremità con due diffusori, per evitare perdite di campione, e posizionato nell'apposito alloggiamento dell'autocampionatore.



**Fig. 7** Campionatore per il respiro BioVOC.

Dopo ogni fase di espirazione il campionatore è stato opportunamente pulito attraverso il flussaggio di aria al suo interno. L'effettivo livello di pulizia è stato testato iniettando nel tubo adsorbente aria aspirata dall'ambiente circostante e facendo partire un normale ciclo di analisi, in modo da verificare l'assenza di tutti i composti volatili caratteristici del campione analizzato.

### 3.5 Desorbitore termico ed autocampionatore

I tubi di materiale adsorbente sono stati inseriti in un autocampionatore multitubo ULTRA™ (Markes International Ltd., UK), collegato al desorbitore termico UNITY™ (Markes International Ltd., UK) (Fig. 8) che presenta al suo interno un sistema di criointrappolamento degli analiti desorbiti dal tubo.



**Fig. 8** Autocampionatore multitubo ULTRA™ e desorbitore termico UNITY™

Dunque, una volta inserito nell'apposito alloggio, su ogni tubo è stato eseguita un test di pressione, per verificare che non ci fossero perdite (*leak test*). Successivamente, il tubo è stato sottoposto ad un flussaggio con azoto puro al 99.9999% per 1 min (*prepurge phase*) per rimuovere tutta l'aria presente prima di aumentare la temperatura del sistema. Infatti, anche piccolissime tracce di ossigeno potrebbero provocare l'ossidazione degli analiti, generando artefatti e compromettendo la qualità dei dati.

A questo punto è stata effettuata la fase di desorbimento del tubo per 3 min (*primary desorption*), incrementando la temperatura fino a 300°C, in modo tale da consentire il trasferimento del campione su una trappola di Tenax mantenuta a -10°C la quale, a sua volta, è stata riscaldata e desorbita a 300°C per 2 min (*secondary desorption*). Questa procedura ha permesso il rapido trasferimento dei volatili ad un gas-cromatografo attraverso una transferline riscaldata a 150°C.

### **3.6 Gas cromatografia-MS**

La separazione dei composti volatili è stata effettuata mediante un gas cromatografo HP 6890 (Agilent Technologies, USA), fornito di una colonna capillare di 30 m di lunghezza x 0.32mm di diametro interno, con spessore del film di 0.52 µm (HP-5MS, Agilent Technologies, USA). Il gas carrier era elio

puro al 99.9999% e la velocità del flusso è stata mantenuta costante, durante tutta la corsa, a 1,5 ml/min.

La temperatura del forno è stata impostata pari a 40°C per 2 min, e successivamente aumentata fino a 250°C ad una velocità di 7 °C/min e tenuta alla temperatura finale per 2 min.

L'identificazione degli analiti è stata condotta mediante uno spettrometro di massa HP 5973 (Agilent Technologies, USA).

Lo spettrometro di massa operava in modalità scan in un range di massa da 35 a 400 amu (2s/scan), con un potenziale di ionizzazione di 70 eV.

Il riconoscimento dei composti è avvenuto mediante il confronto dei loro spettri di massa e del loro tempo di ritenzione con quelli del database (NIST 98).

### **3.7 Procedura di pulizia dei tubi**

A seguito di ogni fase di desorbimento termico, è stato condotto un ciclo di pulizia dei tubi (*tube conditioning*) di circa 1,5 h a 300°C in modo da allontanare tutti i composti ancora legati alla fase adsorbente e che possono inficiare la bontà dei dati successivamente acquisiti.

### 3.8 Analisi dei dati

La velocità di rilascio dei composti volatili espirati a seguito del consumo del caffè per tempi di espirazione più lunghi di quelli sperimentali è stata predetta mediante un modello empirico di rilascio nel tempo. In particolare, è stata applicata un'equazione cinetica che prevede un termine associato alla massima concentrazione del composto ed una costante di velocità [Eq.1].

$$y = \frac{a}{1 + acx} \quad [\text{Eq. 1}]$$

Dove:

$a$  è la massima concentrazione del composto volatile

$c$  è la costante di velocità di rilascio.

$t$  è il tempo (variabile indipendente).

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Caratterizzazione e quantificazione percentuale dei composti volatili del caffè.

I composti organici volatili (VOC) del caffè, estratti mediante spazio di testa statico (SHS), sono stati identificati attraverso HRGC-MS, in modo da effettuare un'analisi qualitativa delle sostanze presenti nella bevanda immediatamente dopo la sua preparazione.

In parallelo, su uno stesso campione di caffè espresso, è stata condotta la *breath analysis*. Dunque, l'aria espirata dagli assaggiatori, a seguito dell'ingestione della bevanda, è stata campionata attraverso un apposito “campionatore del respiro”, intrappolata su materiali adsorbenti ed analizzata mediante HRGC-MS. Mediante uno spettrometro di massa è stato possibile, successivamente, caratterizzare ed identificare i composti organici volatili (VOC). In tabella 2 sono riportate le sostanze volatili presenti nello spazio di testa dei campioni di caffè espresso, mentre in tabella 3 quelle presenti nel *mouthspace* dopo 10 s di espirazione.

#### 4.1.1 *Static headspace analysis*

I composti maggiormente presenti nello spazio di testa del caffè sono rappresentati dal 2 metil furano (22.9%), 2 metil butanale (17,2%), furano (13.9%), 2 metil propanale (11,4%) ed 3 metil butanale (10,3%) (tab.2).

**Tab. 2.** Composti organici volatili presenti nel caffè espresso estratti mediante spazio di testa statico.

N°	tempo di ritenzione (min)	nome del composto	Percentuale
1	1,48	furano	13.9%
2	1,57	metil acetato	4.4%
3	1,68	2 metil propanale	11.4%
4	1,83	acetaldeide	2.6%
5	1,90	2 metil furano	22.9%
6	2,09	metantiolo	3.5%
7	2,31	3 metil butanale	10.3%
8	2,4	2 metil butanale	17.2%
9	2,72	pentanale	1.0%
10	2,78	2,3 pentadione	2.5%
11	2,96	2,5 dimetil furano	0.9%
12	3,26	2 vinil furano	0.6%
13	3,61	1 metil-1H pirrolo	4.1%
14	3,97	pirrolo	0.5%
15	4,2	piridine	0.1%
16	4,82	3 esanone	0.4%
17	5,83	1 etil 1H pirrolo	0.3%
18	6,58	4 metil pirimidine	0.6%
19	6,75	furfurale	0.1%
20	8,17	2-furan metanolo	1.2%
21	10,80	2,6 dimetil pirazina	0.3%
22	12,87	5 metil furfurale	0.2%
23	14,24	furfuril proprionato	0.2%
24	14,32	2 furan metanol acetate	0.9%

Questi composti sono tutti piuttosto volatili ed alcuni – quali il 2 metil butanale, il 2 metil propanale ed il 3 metil butanale - sono riportati in letteratura come *key odorants*, ossia composti strettamente correlati con l'aroma (Maetzu et al., 2001).

Come accennato in precedenza, il numero di sostanze volatili identificate nel caffè è estremamente elevato (addirittura circa 900 sono i composti identificati e caratterizzati con diverse tecniche); di essi, però, solo una piccola frazione è considerata odorifera (*key odorants*) (Yeretzian et al. , 2003).

In particolare, le aldeidi sopra citate- che rappresentano il prodotto della degradazione di Strecker della Valina, Isoleucina e Leucina - sono responsabili dell'aroma di malto/cereali. Tra le sostanze identificate con questa tecnica, oltre ai composti indicati, sono considerati *key odorants* il metantiolo, l'acetaldeide e il 2,3 pentadione. In particolare, il metantiolo è associato alla freschezza del caffè ed al flavour sulfureo; l'acetaldeide, insieme con il propanale, è responsabile dell'aroma fruttato; il 2,3 pentadione – assieme al 2,3 butandione - è correlato al flavour di burro (Maetzu et al., 2001; Bücking & Steinhart, 2002).

#### 4.1.2 Mouthpace analysis

I composti maggiormente presenti nel *mouthspace* (tabella 3) sono le piridine che rappresentano più del 20% della frazione volatile totale, seguite dal 2-furan-metanolo (13,2%), dal furfurale (11,3%) e dalla metil-pirazina (11,2%).

**Tab. 3** Composti organici volatili presenti nel caffè espresso rilasciati in *mouthspace*.

N°	tempo di ritenzione (min)	nome del composto	Percentuale
1	6,41	2,3 butandione	2,38%
2	6,71	2 metil furano	0,72%
3	7,67	3 metil butanale	0,80%
4	8,30	2 pentanone	0,44%
5	8,48	2,3 pentadione	1,48%
6	9,48	pirazina	3,90%
7	9,72	1 metil-1H pirrolo	0,48%
8	9,79	piridine	20,07%
9	9,99	pirrolo	3,26%
10	11,37	2-metil diidro-3(2H)furanone	3,04%
11	11,85	metil pirazina	11,16%
12	11,96	4 metil pirimidine	0,51%
13	12,11	furfurale	11,32%
14	12,58	2-furan metanolo	13,24%
15	12,81	2 metil 2 butanone	1,16%
16	14,21	2-6 dimetil pirazina	7,61%
17	14,33	2 etil-pirazina	2,80%
18	14,39	2,3 dimetil pirazina	0,57%
19	15,58	5 metil furan 2carbossaldeide	2,05%
20	16,21	2 furan metanol acetate	4,96%
21	16,45	2 etil 6-metil pirazina	1,76%
22	16,54	2 etil 5-metil pirazina	1,05%
23	16,74	1 metil 1H pirrol 2carbossaldeide	1,76%
24	18,42	2 etil 3,5 dimetil pirazina	1,58%
25	18,71	2 metossi fenolo	1,02%
26	20,81	1 (2furanilmetil)1H pirrolo	0,87%

Questi, sebbene presenti in elevate quantità, non sono annoverati tra quelli responsabili dell'aroma di caffè. Al contrario, i principali *key odorants* identificati mediante *breath analysis* sono: tra le aldeidi, ancora il 3 metilbutanale; tra i chetoni, il 2,3 butandione ed il 2,3 pentadione; tra le pirazine, sono stati identificati 3 composti odoriferi (la 2 etil -3,5 dimetil pirazina, la 2 etilpirazina e la 2 etil - 6metil pirazine). Tra questi, la 2 etil -3,5 dimetil pirazina, una delle più importanti sostanze aromatiche del caffè, è stata correlata con il flavour tostato/bruciato, di terra/di stantio (Bücking & Steinhart, 2002). In aggiunta, Maetzu et al. (2001) ritengono che anche le altre due pirazine citate siano correlate con le stesse percezioni aromatiche.

#### 4.1.3 *Confronto tra le due tecniche di campionamento*

Confrontando le due tabelle, ottenute con le due differenti tecniche, è possibile osservare che nel *mouthspace* le molecole più volatili, quali ad es. l'acetaldeide e il 2 metil propanale, - presenti invece nello spazio di testa - non sono rilevabili; dunque, è ipotizzabile che si allontanino già prima che il caffè venga posto in bocca e che siano percepibili solo olfattivamente oppure che, data la loro elevata volatilità, non vengano trattiene dai materiali adsorbenti presenti nei tubi.

Inoltre, le due tecniche insieme consentono di rilevare la maggior parte dei composti riportati in letteratura come responsabili dell'aroma di caffè: la

tecnica dello spazio di testa statico ha permesso di identificare le sostanze odorifere più volatili e percepibili soprattutto olfattivamente, la *breath analysis* quelle maggiormente persistenti nella cavità orale e percepibili gustativamente.

#### **4.2 Cinetica di rilascio dei composti organici volatili in mouthspace**

La caratterizzazione e la quantificazione percentuale dei composti del caffè espresso rappresentano solo il primo step del nostro lavoro. L'aria espirata dagli assaggiatori è stata, infatti, raccolta per circa 1 min in modo da monitorare nel tempo l'evoluzione ed il rilascio delle sostanze presenti in *mouthspace*.

Accertata, dunque, la riproducibilità dei giudici (effetto replica ed effetto assaggiatore), è stato possibile costruire le curve di rilascio dei composti nel tempo, in modo da identificare i composti maggiormente persistenti in bocca.

In figura 9 a-c, sono riportate le curve relative alla cinetica di rilascio di tre dei principali composti odoriferi del caffè, rappresentativi rispettivamente della classe delle aldeidi, dei chetoni e delle pirazine.

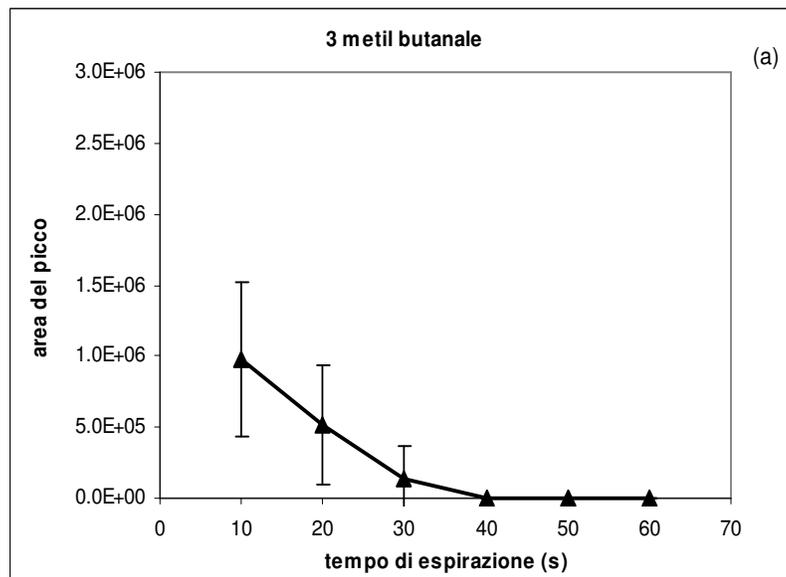
In particolare, tra le aldeidi, il 3-metil butanale (a), già presente in piccole concentrazioni subito dopo l'ingestione della bevanda, tende a ridursi rapidamente fino a scomparire dopo 40 s di espirazione.

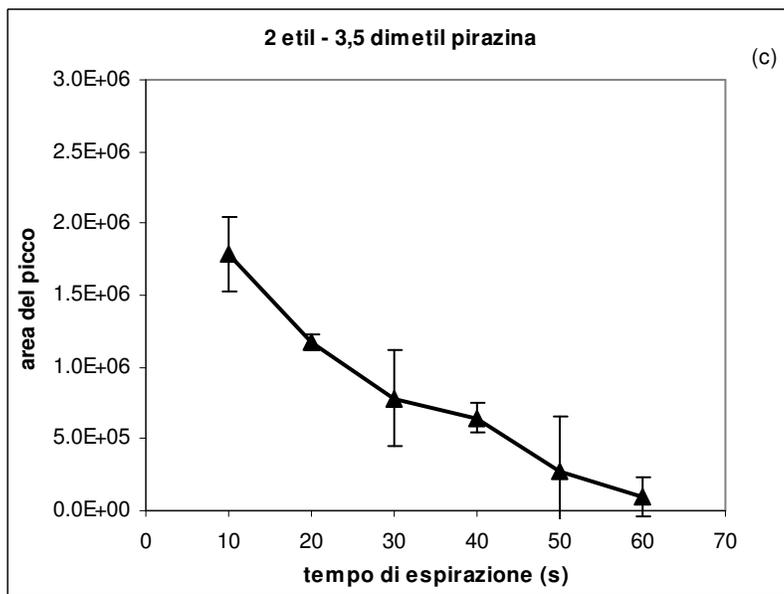
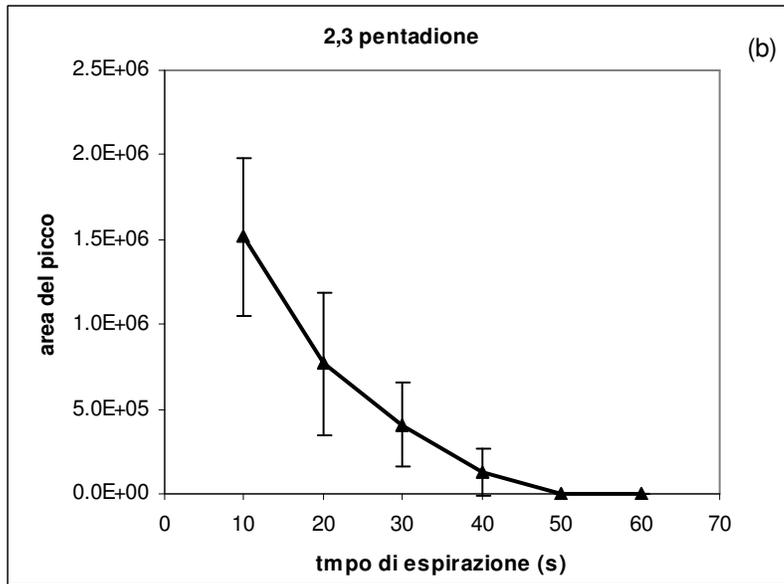
Tra i chetoni, il 2,3 pentandione (b), responsabile insieme con altri composti della stessa classe dell'aroma di burro, dopo 20 s di espirazione si dimezza

rispetto al valore iniziale; dopo 50 s la sua concentrazione scende al sotto della soglia di rilevabilità dello strumento.

Un andamento analogo, seppure più lento, si osserva per la 2 etil-3,5 dimetil pirazina (c) (associata al flavour di tostato/bruciato): dunque, si riduce notevolmente nel tempo, anche se dopo 60 s è ancora presente.

Come osservato, ogni composto volatile viene rilasciato con una differente velocità. Di conseguenza, vi sono sostanze (più volatili) che vengono rilasciate più velocemente ed altre che, stabilendo – probabilmente - legami più forti con la mucosa buccale, vengono rilasciate più lentamente. Pertanto, queste ultime appaiono rilevabili anche per tempi lunghi di espirazione.

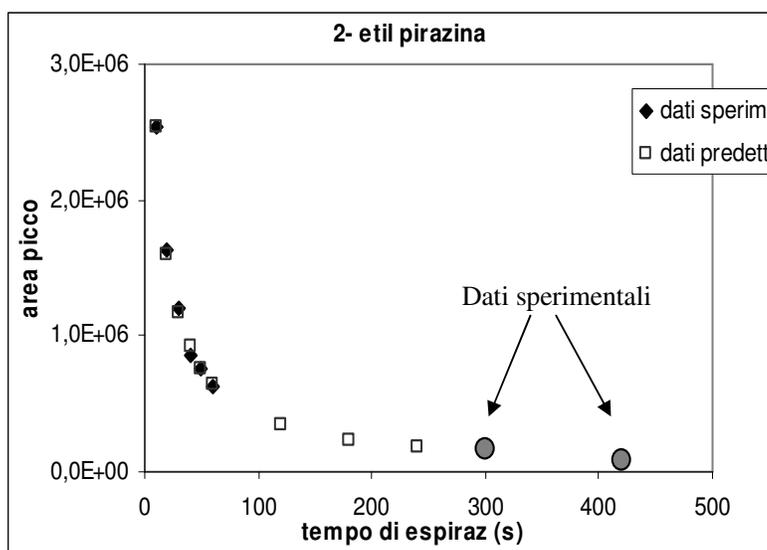




**Fig. 9 a-c** Curve di velocità di rilascio del 3 metilbutanale, 2,3 pentadione and 2 etil -3,5 dimetil pirazina

Per i composti che dopo 60 s di espirazione sono ancora rilevati, è possibile prevederne il comportamento per tempi più lunghi, mediante l'applicazione di cinetiche di rilascio.

Per la 2 etilpirazina (un altro composto odorifero), un'equazione cinetica di 2° ordine è in grado di *fit* piuttosto bene i dati sperimentali (fino a 60 s) e, dunque, è stato possibile predirne l'evoluzione anche per tempi di espirazione maggiori di quelli sperimentali (nel caso specifico, fino a 420 s) (Fig. 10).



**Fig. 10.** Confronto tra dati sperimentali e dati predetti di rilascio nel tempo della 2- etil pirazina.

In aggiunta, per verificare se il modello applicato potesse essere effettivamente valido a descrivere il comportamento di rilascio del composto in esame, in un

intervallo di tempo più ampio, è stato chiesto agli assaggiatori di respirare all'interno del campionatore BioVOC anche dopo 300 e 420 s dall'ingestione del caffè. Come è possibile osservare in figura 10, il gap tra i valori sperimentali ed i valori predetti è piuttosto ridotto (i punti sono pressoché sovrapponibili), il che è indicativo della bontà del modello utilizzato.

## 5 CONCLUSIONI

Questa tecnica è risultata valida per identificare e quantificare i composti volatili presenti nel respiro a seguito dell'ingestione di un alimento (nel caso specifico di caffè espresso) e per seguirne la cinetica di rilascio. I composti identificati mediante la *breath analysis* non sono perfettamente sovrapponibili a quelli identificati con lo spazio di testa statico. In particolare, con il campionamento in *mouthspace*, non è stato possibile rilevare i composti più fortemente volatili, probabilmente percepibili soprattutto olfattivamente.

Ulteriori indagini sull'utilizzo di questa metodica saranno necessarie al fine di testare la capacità discriminativa dello strumento verso altre matrici alimentari; in particolare nell'ipotesi di alimenti solidi e semi-solidi.

## 6 BIBLIOGRAFIA

Beak, I., Linforth, R.S.T., Blake, A. and Taylor, A. (1999). Sensory perception is related to the change of volatile concentration in nose during eating of model gels. *Chem. Senses*: 24, 155-160.

Brauss M.S., Balders B., Linforth R.S.T., Avison S. & Taylor A.J. (1999). Fat content, baking time, hydration and temperature affect flavour release from biscuits in model mouth and real systems. *Flavour and Fragrance Journal*: 14, 351-357.

Brauss M.S., Linforth R.S.T. & Taylor A.J. (1998). Effect of variety, time of eating, and fruit-to-fruit variation on volatile release during eating to tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 46, 2287-2292.

Brauss M.S., Linforth R.S.T., Cayeux I., Harvey B. & Taylor A.J. (1999). Altering the fat content affects flavour release in a model yogurt system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 47, 2055-2059.

Bücking, M. & Steinhart, H. (2002). Headspace GC and sensory analysis characterization of the influence of different milk additives on the flavour release of coffee beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1529-1534.

de Roos, K.B. (2003). Effect of texture and microstructure on flavour retention and release. *International Dairy Journal*: 13, 593-605.

Dijksterhuis G.B. & Piggott J.R., (2001). Dynamic methods of sensory analysis. *Trends in Food Science and Technology*: 11, 284-290.

Druaux, C. & Volley, A. (1997). Effect of food composition and microstructure on volatile flavour release. *Trends in Food Science & Technology*, 8: 364-368.

Goubet, I., Le Quere J. L. and Voilley A. J. (1998). Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and of their physical state. A Review *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1981-1990.

Guichard, E. (2000). Interaction of food matrix with small ligands influencing flavour and texture. *Food Chemistry*, 71, (3): 299-300.

Guichard E., Issanchou, S., Descourvieres, A. and Etievan, P. (1991) Pectin concentration, molecular weight and degree esterification: influence on volatile composition and sensory characteristics of strawberry jam. *Journal of Food Science*, 56: 1621-1627.

Hansson, A., Andersson, J. & Leufen, A. (2001). The effect of sugar and pectin on flavour release from a soft drink-related model system. *Food Chemistry*, 73: 363-368.

Harvey, B.A. & Barra, J. (2003). Real time and headspace analysis of flavour volatiles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55: 261-269.

Ingham, K.E., Linforth, R.S.T. & Taylor, A.J. (1995). The effect of eating on aroma release from strawberries. *Food Chemistry*, 54, (3):283-288.

Juteau, A., Cayot, N., Chabanet, C., Doublier, J.L. and Guichard, E. (2004). Flavour release from polysaccharide gels: different approaches for the determination of kinetic parameters. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 394-402.

Kumazawa K. e Masuda H. (2003). Investigation of the Change in the Flavor of a Coffee Drink during Heat Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2674-2678.

Linforth, R.S.T., Baek, I., Taylor, A.J. (1999). Simultaneous instrumental and sensory analysis of volatile release from gelatine and pectin/ gelatine gels. *Food Chemistry*, 65: 77-83.

- Maetzu, L., Sanz, C., Andueza, S., De Peña M.P., Bello, J. and Cid, C. (2001). Characterization of espresso coffee aroma by static headspace GC-MS and sensory flavor profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5437-5444.
- Normand, V., Avison, S. and Parker, A. (2004). Modelling the kinetics of flavour release during drinking. *Chem.Senses*, 29: 235-245.
- Peyvieux, C. & Dijksterhuis, G. (2001). Training a sensory panel for TI: a case study. *Food Quality and Preference*, 12: 19-28.
- Piggott, J.R. (2000). Dynamism in flavour science and sensory methodology. *Food Research International*, 33: 191-197.
- Rabaud, N.E., Ebeler, S.E., Ashbaugh, L.L. and Flocchini, R.G. (2002). The application of thermal desorption GC/MS with simultaneous olfactory evaluation for the characterization and quantification of odor compounds from a dairy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5139-5145.
- Rega, B. (2003). Texture-Flavour interactions: How physico-chemical data explain sensory perception in orange juice. *Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Agroalimentari XVI Ciclo*.
- Roberts, D.D., Elmore, J.S., Langley, K.R. and Bakker, J. (1996). Effect of sucrose, guar gum and carboxymethylcellulose on the release of volatile

flavour compound under dynamic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 1321-1326.

Secouard, S., Malhiac, C., Grisel, M. & Decroix, B. (2003). Release of limonene from polysaccharide matrices: viscosity and synergy effect. *Food Chemistry*, 82: 227-234.

Seuvre A.M., Espinoza Diaz M.A. & Voilley A., (2000). Influence of the food matrix structure on the retention of aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 48, 4296-4300.

Stephan A., Bucking M., Steinhart H. (2000). Novel analytical tools for food flavours. *Food Research International*: 33, 199-209.

Stevenson R.J., Chen X.D. & Mills O.E. (1996). Modern analyses and binding studies of flavour volatiles with particular reference to dairy protein products. *Food Research International*: 3-4 (29), 265-290.

Taylor, A.J. & Linfoth, R.S.T. (1996). Flavour release in the mouth. *Trends in food science and technology*. 7: 444-448.

Taylor, A.J., Linfoth, R.S.T., Harvey, B.A., Blake, A. (2000). Atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry for in vivo analysis of volatile flavour release. *Food Chemistry*, 71: 327-338.

van Ruth, S.M., O'Connor, C.H., Delahunty, C.M. (2000). Relationship between temporal release of aroma compounds in a model mouth system and their physico-chemical characteristics. *Food Chemistry*, 71: 393-399.

Weel, K. G. C., Boelrijk, A. E. M., Alting, A. C., Van Mil, P. J. J. M., Burger, B. V., Gruppen, H., Voragen, A. G. and Smit, G. (2002). Flavor release and perception of flavored whey protein gels: perception is determined by texture rather than by release. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5149-5155.

Yeretzian C., Jordan, A., Lindinger W. (2003). Analysing the headspace of coffee by proton-transfer-reaction mass-spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 223-224: 115-139.