

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DIPARTIMENTO DI SCIENZA DEGLI ALIMENTI



Tesi di Dottorato di Ricerca

Scienze e tecnologie delle produzioni
agro-alimentari

XX ciclo

**Applicazione di metodi strumentali per il controllo della qualità
e dell'ossidazione in alimenti lipidici**

Tutor

Prof. Raffaele Sacchi

Coordinatore

Prof. Salvatore Spagna Musso

Dottoranda

Dott.ssa Ilaria Battimo

*“La scienza è sempre imperfetta.
Ogni volta che risolve un problema,
ne crea almeno dieci nuovi.”
Georg Christoph Lichtenberg*

Alla mia famiglia

INDICE

PRESENTAZIONE DEL LAVORO	6
CAPITOLO I. IL NASO ELETTRONICO.....	9
1.1. INTRODUZIONE.....	9
1.1.1 Architettura del naso elettronico.....	10
1.1.2 I sensori utilizzati nei nasi elettronici.....	11
1.1.3 Elaborazione statistica dei dati.....	15
1.1.4 Applicazione agli alimenti.....	17
1.1.5 Conclusioni.....	21
1.2 MESSA A PUNTO DEL METODO DI ANALISI.....	23
1.2.1. Costruzione di un pattern di riferimento per i principali difetti (rancido, avvinato e riscaldo) presenti negli oli extra vergini di oliva.....	26
1.2.2 Costruzione di un pattern di riferimento per l'attributo di fruttato.....	29
1.3 BIBLIOGRAFIA.....	34
CAPITOLO II. MESSA A PUNTO DELLE CONDIZIONI DI ANALISI DELLE SOSTANZE VOLATILI MEDIANTE HEADSPACE-SOLID PHASE MICROEXTRACTION (SPME)-GC/MS.....	38
2.1 INTRODUZIONE.....	38
2.1.1 Principio di funzionamento e ottimizzazione delle condizioni.....	39
2.1.2 Parametri che influenzano l'efficienza estrattiva della tecnica della microestrazione in fase solida.....	41
2.1.3 Applicazione agli alimenti.....	46
2.1.4 Confronto tra le tecniche di analisi applicate allo studio dei composti volatili dell'olio di oliva.....	49
2.1.5 Conclusioni.....	53
2.2 MESSA A PUNTO DEL METODO DI ANALISI.....	54
2.2.1 Analisi qualitativa dei composti volatili presenti negli oli di oliva.....	57
2.2.2. Analisi quantitativa dei principali composti volatili presenti negli oli di oliva.....	63
2.3 BIBLIOGRAFIA.....	72
CAPITOLO III. VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DEGLI OLI VERGINI DI OLIVA E MONITORAGGIO DELLA SHELF-LIFE	79
3.1 INTRODUZIONE: QUALITÀ DELL'OLIO EXTRA-VERGINE D'OLIVA	79
3.1.2 I componenti volatili e la qualità sensoriale dell'olio extra vergine di oliva.....	86
3.1.3 I composti chiave del flavour dell'olio extra vergine di oliva.....	88
3.1.4 Off-flavour di rancido.....	90
3.1.5 Off-flavour fermentativi.....	90
3.1.6 L'ossidazione lipidica e la shelf-life degli oli imbottigliati	92
3.2. OBIETTIVI E DISEGNO SPERIMENTALE	96
3.3. MATERIALI E METODI.....	97
3.3.1. Campionamento.....	97
3.3.2 Disegno Sperimentale.....	98
3.3.3 Determinazione indice di maturazione.....	99
3.3.4 Determinazione del grado di infestazione mosca olearia	100
3.3.5 Lavorazione materia prima.....	100
3.3.6 Determinazioni analitiche e panel test	101
3.3.7 Determinazione dell'acidità.....	101
3.3.8 Determinazione del numero di perossidi.....	102
3.3.9 Determinazione degli indici spettrofotometrici nell'ultravioletto	103
3.3.10 Determinazione della composizione in acidi grassi	105
3.3.11 Caratterizzazione della componente fenolica.....	106
3.3.12 Composizione in tocoferoli.....	107
3.3.13 Determinazione del colore	108
3.3.14 Analisi sensoriale	108

3.3.15	Analisi delle sostanze volatili mediante Solid Phase Microextraction (SPME) (vd. § 2.2)	109
3.3.16	Analisi delle sostanze volatili mediante naso elettronico (vd. § 1.2)	109
3.3.17	Analisi delle Componenti Principali	110
3.4	RISULTATI E DISCUSSIONE	111
3.4.1	Indici di qualità	111
3.4.2	Composizione in acidi grassi	112
3.4.3	Valutazione della composizione fenolica e tocoferolica	115
3.4.4	Pigmenti	117
3.4.5	Analisi sensoriale	117
3.4.6	Analisi dei composti volatili mediante naso elettronico e mediante SPME-GC/MS	120
3.5	VALUTAZIONE DELLA SHELF-LIFE	125
3.5.1	Indici di qualità	125
3.5.2	Valutazione della composizione fenolica	127
3.5.3	Analisi sensoriale e analisi dei composti volatili mediante naso elettronico	131
3.5.4	Analisi dei composti volatili mediante SPME-GC/MS	134
3.5.5	Prova di shelf-life	139
3.6	CONCLUSIONI	149
3.7	BIBLIOGRAFIA	151
CAPITOLO IV APPLICAZIONE DEL NASO ELETTRONICO AL MONITORAGGIO DEL PROCESSO DI FRITTURA		156
4.1	INTRODUZIONE	156
4.1.1	Tipologie di frittura	158
4.1.2	Il Processo di frittura	158
4.1.3	La chimica della frittura	159
4.1.4	Modificazioni dell'olio durante la frittura	164
4.1.5	Caratteristiche degli oli di frittura	165
	Olio di arachide	166
	Olio di palma	166
	Olio di girasole	167
	Olio di oliva	167
4.1.6	Metodi analitici per la valutazione della degradazione dell'olio sottoposto a frittura	168
4.2	OBIETTIVI E DISEGNO SPERIMENTALE	169
4.3	MATERIALI E METODI	170
4.3.1	Campionamento	170
4.3.2	Determinazione dell'acidità (vd. § 3.3.7)	171
4.3.3	Determinazione degli indici spettrofotometrici (vd. § 3.3.9)	171
4.3.4	Determinazione del colore	171
4.3.5	Determinazione degli acidi grassi a catena corta	172
4.3.6	Valutazione del flavour mediante NE (vd. § 1.2)	174
4.3.7	Determinazioni di composti polari in oli di frittura	174
4.3.8	Valutazione organolettica dell'alimento fritto	175
4.3.9	Analisi statistica (vd. § 3.3.17)	176
4.4	RISULTATI E DISCUSSIONE	177
4.4.1	Parametri qualitativi	177
4.4.2	Valutazione dei Composti Polari Totali nell'olio di frittura	180
4.4.3	Determinazione del colore dell'olio di frittura	181
4.4.4	Composizione in acidi grassi	182
4.4.5	Valutazione del flavour che si sviluppa durante la frittura rilevato mediante Naso Elettronico	186
4.4.6	Valutazione organolettica dell'alimento fritto	188
4.5	CONCLUSIONI	190
4.6	BIBLIOGRAFIA	191
CAPITOLO V. VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ E DELL'OSSIDAZIONE DI ALICI SOTTO SALE DURANTE LA MATURAZIONE		194
5.1	INTRODUZIONE	194

5.1.1	<i>La salagione del pesce</i>	195
5.1.2	<i>La stagionatura della alici sotto sale</i>	197
5.1.3	<i>Engraulis encrasicolus (Linneo)</i>	198
5.1.4	<i>La qualità nutrizionale delle alici</i>	200
5.1.5	<i>I lipidi del pesce, lipolisi e ossidazione</i>	202
5.1.6	<i>Tecnica di pesca e trasformazione industriale delle alici sotto sale</i>	205
5.1.7	<i>Cambiamenti del flavour durante la conservazione dei prodotti ittici</i>	206
5.2	OBIETTIVI DELLA RICERCA	209
5.3	MATERIALI E METODI	210
5.3.1	<i>Campionamento</i>	210
5.3.2	<i>Disegno Sperimentale</i>	212
5.3.3	<i>Determinazioni analitiche</i>	212
5.3.3.1	<i>Estrazione dei lipidi</i>	213
5.3.3.2	<i>Determinazione della composizione in classi lipidiche</i>	213
5.3.3.3	<i>Analisi spettrofotometrica</i>	214
5.3.3.4	<i>Valutazione della perossidazione lipidica in campioni di pesce mediante TBA TEST</i>	215
5.3.3.5	<i>Analisi Sensoriale delle Alici</i>	216
5.3.3.6	<i>Valutazione del flavour mediante Naso Elettronico</i>	217
5.3.3.7	<i>Valutazione del flavour mediante la Microestrazione in Fase Solida accoppiata alla gas-massa (SPME-GC/MS)</i>	217
5.4	RISULTATI E DISCUSSIONE	222
5.4.1	<i>Analisi quantitativa dei lipidi totali</i>	222
5.4.2	<i>Composizione delle classi lipidiche e sua evoluzione durante la maturazione</i>	224
5.4.3	<i>Indici di osidazione</i>	228
5.4.4	<i>Valutazione mediante Naso Elettronico del flavour che si sviluppa durante la maturazione delle alici sotto sale</i>	231
5.4.5	<i>Qualità sensoriale</i>	233
5.4.6	<i>Analisi dei composti volatili mediante SPME-GC/MS</i>	234
5.5	CONCLUSIONI	239
5.6	BIBLIOGRAFIA	240

Presentazione del lavoro

Negli ultimi anni l'accresciuta consapevolezza del consumatore nei riguardi della qualità degli alimenti ha creato aspettative sempre maggiori per alimenti caratterizzati da elevati standard di qualità e sicurezza. La qualità di un alimento, rappresenta l'insieme delle caratteristiche di un prodotto in grado di soddisfare le esigenze espresse e implicite (ISO 9000). La valutazione sensoriale di un prodotto alimentare, in termini di aspetto fisico, odore, colore e sapore contiene nel suo complesso moltissime informazioni. In particolare l'aroma di un alimento, dovuto alla presenza di molte sostanze chimiche volatili, conferisce caratteristiche e qualità uniche, e quindi rappresenta un parametro sensoriale di estremo interesse. La possibilità di misurare e identificare l'aroma e le caratteristiche di sapori persistenti di un prodotto permette di ottenere una molteplicità di informazioni direttamente correlate alla accettabilità ed alle caratteristiche nutrizionali e qualitative in termini di salubrità e sicurezza del prodotto. Questo ha comportato una crescente necessità e interesse verso sistemi di monitoraggio non distruttivi a elevata versatilità, sensibilità, accuratezza, economicità d'esercizio, semplicità d'impiego e soprattutto rapidità di risposta analitica. Uno di questi è il cosiddetto "naso elettronico". La ricerca in questo campo, negli ultimi anni, ha permesso la realizzazione di sensori sempre più affidabili e stabili nel tempo, permettendo la realizzazione di sistemi olfattivi artificiali utilizzabili non solo in laboratorio ma anche direttamente sugli impianti di produzione per il monitoraggio in continuo degli odori in modo da rendere oggettive le misure così ottenute. Tale strumento, caratterizzato da un insieme di sensori aspecifici, offre una misura globale dell'odore di un prodotto, operando in maniera simile all'olfatto umano, non essendo in grado di identificare le singole molecole. Per questo motivo, nonostante tali strumenti rappresentino il futuro tecnologico per le analisi di routine, restano di grande importanza le tecniche strumentali che consentono di caratterizzare in maniera specifica i composti che caratterizzano il *flavour* degli alimenti.

Tra le tecniche di concentrazione/estrazione della frazione volatile di alimenti lipidici negli ultimi anni è stata introdotta, in alternativa alla tecnica del *purge and trap* per il

pre-arricchimento del campione prima dell'analisi cromatografica, la Microestrazione in Fase Solida dello spazio di testa statico (HS-SPME), sviluppata nei primi anni '90 da Arthur e Pawliszyn per studiare gli inquinanti nelle acque ed estesa, in seguito, all'analisi del flavour degli alimenti. La tecnica prevede una prima fase di concentrazione/estrazione dei componenti volatili mediante l'esposizione allo spazio di testa di una fibra in silice fusa rivestita da un film relativamente sottile di fase stazionaria polimerica. Durante questa fase si stabilisce un equilibrio tra le concentrazioni degli analiti presenti nello spazio di testa del campione e il rivestimento polimerico della fibra. Dopo un opportuno tempo di estrazione, la fibra viene ritirata nell'ago e rimossa dalla vial contenente il campione per essere inserita direttamente nell'iniettore del GC per la successiva fase di desorbimento. L'SPME presenta numerosi vantaggi come la semplicità, la rapidità, l'eliminazione di solventi, l'alta sensibilità, l'utilizzo di piccole quantità di campione e il basso costo.

Questo lavoro di tesi ha avuto perciò come obiettivo la valutazione del possibile impiego del Naso Elettronico e della MicroEstrazione in Fase Solida accoppiata alla GC/MS nel controllo di qualità e dell'ossidazione in alimenti lipidici.

In particolare, il **capitolo I** è stato dedicato allo studio del Naso Elettronico, al suo funzionamento e alla messa a punto della metodica di analisi applicata al controllo di qualità degli oli di oliva. Per l'applicazione del naso elettronico all'analisi degli oli è stato necessario creare una banca dati, analizzando campioni di riferimento per creare la memoria dello strumento.

L'attività di ricerca discussa nel **capitolo II** ha riguardato il funzionamento dell'analisi SPME-GC/MS e la messa a punto della metodica di analisi. Per ottenere oltre all'analisi qualitativa anche un'analisi quantitativa, è stato necessario analizzare una serie di composti standard a diverse concentrazioni in modo da ottenere delle rette di taratura di riferimento.

Nel **capitolo III** viene riportata l'applicazione del NE e della SPME-GC/MS nel controllo di qualità degli oli vergini di oliva. L'attuale normativa europea prevede che un olio per essere commercializzato con la definizione di "vergine extra" debba presentare oltre a valori degli indici analitici nei limiti prefissati, l'assenza di qualsiasi difetto organolettico (*off-flavour*). L'unico metodo previsto dal regolamento comunitario per la rilevazione degli *off-flavour* è l'analisi sensoriale (panel-test)

svolta secondo la metodologia sviluppata dal Consiglio Oleicolo Internazionale (COI). Quindi è di grande interesse l'utilizzo di strumentazioni analitico-sensoriali in grado di valutare in maniera oggettiva oli diversi, semplicemente in base alla percezione dell'aroma senza bisogno di effettuare nessun tipo di analisi chimica o pretrattamento del campione. Per questo motivo, in questa parte del lavoro sperimentale è stata anche effettuata una prova di *shelf-life* con oli raccolti nella campagna olearia 2004-2005 e provenienti dalla penisola Sorrentina, con l'obiettivo di valutare il contributo di suddette metodiche nel discriminare sia diversi aromi che caratterizzano gli oli extravergini che i principali difetti (*off-flavour*), ed in particolare la rancidità.

L'attività di ricerca discussa nel **capitolo IV** ha riguardato il processo di frittura. Tale processo di cottura, soprattutto quando viene applicato nei trattamenti industriali degli alimenti, modifica le proprietà organolettiche e nutrizionali dei cibi. Infatti il grasso o l'olio usato come mezzo di trasferimento del calore è esposto per lunghi periodi ad alte temperature a contatto con gli alimenti, che risultano quindi modificati nella composizione chimica e nelle proprietà fisiche. Durante il riscaldamento prolungato, l'olio subisce molte reazioni, che possono essere classificate come reazioni di idrolisi, ossidazione e polimerizzazione (White, 1991). Molti fattori, come la natura del grasso usato come mezzo di frittura, la temperatura del processo, il *turn over* dell'olio e la composizione degli alimenti, influenzano i cambiamenti chimico-fisici che si manifestano durante la frittura. Una rapida valutazione della degradazione degli oli durante il processo di termo-ossidazione potrebbe essere quindi estremamente vantaggiosa. Il naso elettronico potrebbe dare un utile contributo in tal senso. Questa parte del lavoro di tesi di dottorato ha avuto lo scopo quindi di utilizzare il naso elettronico per monitorare la degradazione degli oli durante il processo di frittura, e di confrontare i risultati ottenuti con quelli derivanti dalle analisi convenzionali.

Infine, il **capitolo V** ha riguardato l'applicazione del naso elettronico e della microestrazione in fase solida accoppiata alla gas massa all'analisi di prodotti ittici e in particolare al monitoraggio del *flavour* e dell'ossidazione lipidica durante il processo di maturazione delle alici sotto sale.

Capitolo I. IL NASO ELETTRONICO

1.1. Introduzione

L'odore di una sostanza è una caratteristica che permette la sua identificazione soggettiva mediante il senso dell'olfatto, quindi la condizione fondamentale per la percezione è che l'odore deve essere annusato, cioè le sostanze odorose devono trovarsi allo stato di vapore per essere inalate attraverso le narici, giungere nella parte superiore della cavità nasale e entrare in contatto con i recettori olfattivi. Per la valutazione dell'odore si ricorre all'analisi sensoriale mediante "panel test" cioè all'elaborazione dei risultati di una prova di assaggio olfattivo effettuato da un gruppo (panel) di persone addestrate, le quali provvedono a descrivere le sensazioni olfattive e a dare un voto all'odore del prodotto in esame, quando richiesto. Nel caso dei prodotti alimentari, l'analisi dell'odore è condotta insieme a quella gustativa per la valutazione dell'aroma o *flavour* del prodotto, data la complementarità dei due sensi, strettamente collegati tra loro (Polesello, 1999).

In risposta alla crescente richiesta di analisi sensoriali oggettive per controllare la qualità dei prodotti alimentari, la ricerca ha imboccato strade che solo pochi anni fa non erano immaginabili.

Perciò, non sorprende che negli ultimi anni siano stati fatti numerosi sforzi per introdurre strumenti di misura che funzionano in maniera simile all'olfatto umano, ma che abbiano l'oggettività di uno strumento. Il concetto di "sistema olfattivo artificiale" formato da una serie di sensori, è stato proposto nel 1982 da Persand and Dodd. Ma solo agli inizi degli anni 90 comparvero i primi strumenti disponibili sul mercato.

Gardner and Barlett hanno proposto una definizione di "naso elettronico", secondo la quale "un naso elettronico è uno strumento che comprende una serie di sensori chimici non specifici e un appropriato sistema di trattamento dei dati, in grado di caratterizzare e riconoscere odori semplici e complessi" che viene attualmente utilizzata (Gardner *et al.*, 1994).

1.1.1 Architettura del naso elettronico

Un naso elettronico è costituito da tre componenti principali (Gardner *et al.*, 1994, 1999; Nagle *et al.*, 1998):

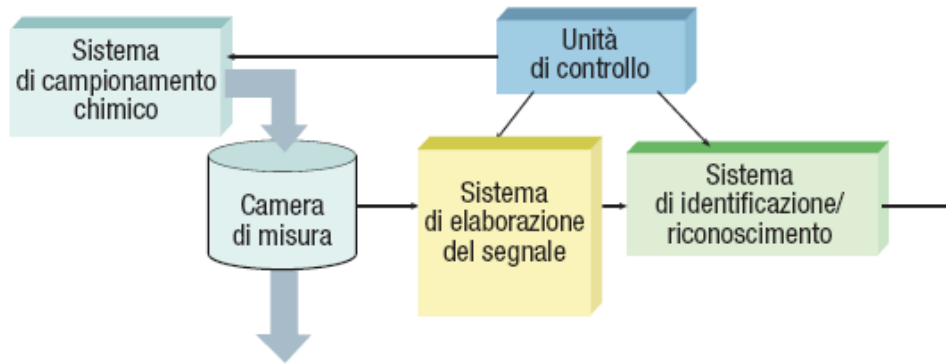
- sistema di rilevazione dei gas;
- sistema di elaborazione dei segnali provenienti dai sensori;
- sistema di identificazione/riconoscimento degli odori;

Questi tre componenti con differenti funzionalità sono connessi in cascata. In un tipico naso elettronico il sistema di rilevazione dei gas è composto da un sistema di campionamento chimico e da una matrice di sensori, normalmente caratterizzata da una scarsa selettività, cioè sensibili ad una vasta gamma di composti chimici. La matrice dei sensori è costituita da un insieme di elementi con caratteristiche diverse, in modo che l'insieme delle loro risposte rappresenti un pattern caratteristico per ciascuna miscela chimica.

In genere, la matrice di sensori è alloggiata in una camera di misura realizzata con un materiale chimicamente inerte (PVC, vetro o acciaio inossidabile), in cui fluisce un gas di riferimento (per esempio aria sintetica o azoto).

Il gas di riferimento viene utilizzato per stabilire la linea di base per la risposta dei sensori. Per effettuare la misura vera e propria il sistema di campionamento chimico provvede a iniettare, in condizioni controllate, l'odorante nella camera di misura, producendo una variazione quasi istantanea dell'atmosfera chimica e, dunque, una risposta transitoria dei sensori.

La condizione di regime viene raggiunta in un tempo che varia da pochi secondi fino ad alcuni minuti, a seconda della tipologia dei sensori, delle condizioni operative e dell'odorante sotto esame. La misura si conclude iniettando nuovamente nella camera il gas di riferimento, ripulendo, così, il materiale attivo che costituisce i sensori e riportando la loro risposta alla linea di base. Il sistema di elaborazione provvede, dapprima, alla pre-elaborazione delle risposte dei sensori, che consiste nella riduzione delle derive, attraverso opportune tecniche di compensazione, e nella normalizzazione dei dati. Successivamente, esegue la compressione dell'informazione attraverso l'estrazione di alcuni parametri caratteristici (feature extraction) e l'eliminazione delle informazioni ridondanti (Fort *et al.*, 2003).



Il sistema di riconoscimento degli odori, in genere, non è altro che un classificatore implementato con una rete neurale. Il classificatore neurale infatti impara a distinguere i pattern rappresentativi delle miscele di interesse utilizzando gli esempi contenuti in un data base costruito durante una fase di apprendimento. In realtà, i nasi elettronici, oltre a una classificazione di odori, possono fornire, sfruttando la medesima architettura ma strutturando in maniera diversa la rete neurale, una stima della concentrazione di un odorante o le caratteristiche dell'odore stesso come potrebbero essere percepite da un esperto umano (Gutierrez *et al.*, 1999; Hines *et al.*, 1999; Keller, 1999).

Il funzionamento di un naso elettronico ricalca, perciò, quello del sistema olfattivo umano: si basa su una struttura fisica che prevede un numero elevato di sensori (recettori), in grado di rispondere ad una vasta gamma di odoranti, su di un insieme efficiente di comprensione dell'informazione (bulbo olfattivo) e, infine, su di un sistema di elaborazione sofisticato che apprende da un insieme di esempi, come il cervello

1.1.2 I sensori utilizzati nei nasi elettronici

L'elemento chiave di un naso elettronico è rappresentato dalla matrice di sensori. Ci sono varie possibili scelte per la realizzazione degli stessi ma tutti operano su una variazione di conducibilità elettrica.

I sensori ideali devono soddisfare criteri ben precisi e si possono riassumere in:

- ✚ alta sensibilità verso i composti chimici volatili;
- ✚ bassa sensibilità verso l'umidità e la temperatura;

- ✚ media selettività: ogni sensore deve riconoscere diversi tipi di molecole, se ogni sensore riconoscesse un composto soltanto sarebbe necessario un numero di sensori elevatissimo per costruire un naso elettronico;
- ✚ alta stabilità, riproducibilità ed affidabilità;
- ✚ sufficiente tempo di recupero;
- ✚ robustezza e durabilità;
- ✚ facilità di calibrazione;
- ✚ piccole dimensioni.

Una prima classificazione li divide in due gruppi: sensori caldi (MOS e MOSFET) e sensori freddi (CP e QCM) (Shaller *et al.*, 1998).

Quelli maggiormente utilizzati sono i sensori MOS (Metal Oxide Semiconductors). Sono costituiti da una lamina ceramica riscaldata internamente da una resistenza elettrica, ricoperta in superficie da uno strato di film di ossidi semiconduttori. Gli ossidi di metalli utilizzati possono essere di due tipi:

Semiconduttori donatori o di tipo “n” (principalmente sono ossido di zinco, biossido di stagno, biossido di titanio e ossidi di ferro III) che rispondono ai composti ossidanti;

Semiconduttori accettori o di tipo “p” (principalmente ossidi di nichel e cobalto) che rispondono ai composti riducenti.

Il principio di funzionamento si basa sulla variazione di conducibilità dell'ossido in presenza di odoranti rispetto al valore assunto dalla conducibilità stessa in condizioni di riferimento. L'interazione chimica determina un trasferimento di elettroni tra la superficie del materiale semiconduttore e le molecole di gas adsorbite, che viene misurata con una variazione della conducibilità dei materiali impiegati.

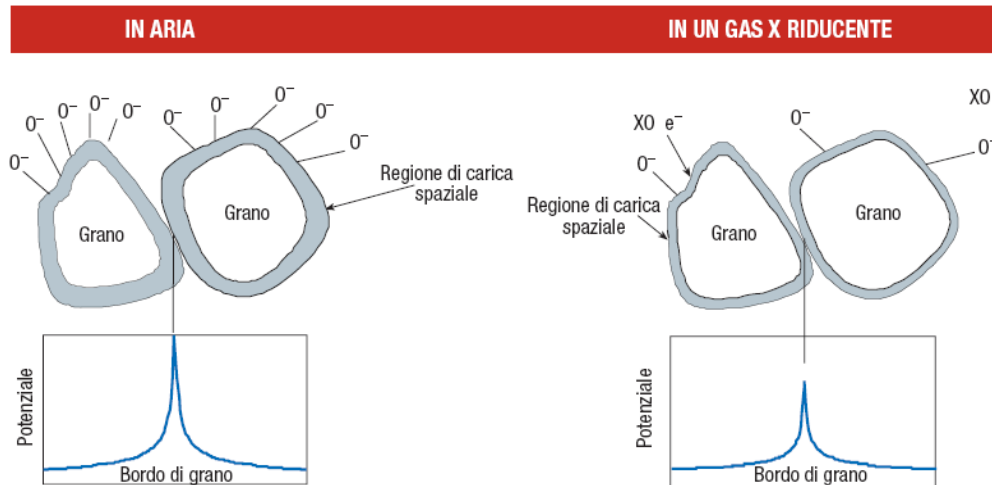
In particolare questa variazione è determinata dall'ossidazione superficiale delle sostanze che compongono l'aroma e dalla riduzione dell'ossigeno precedentemente adsorbito ed attivato sulla superficie del sensore stesso (Suman *et al.*, 2001).

Inoltre la variazione è dovuta a una reazione irreversibile tra l'odorante e specie di ossigeni adsorbite sulla superficie del semiconduttore come O^- , O_2^- , O^{2-}

La specie più reattiva è O^- , che si forma quando l'ossigeno viene adsorbito, legandosi al semiconduttore secondo la seguente equazione:



Nei semiconduttori di tipo n, l'adsorbimento degli ioni O^- crea una regione di carica spaziale sulla superficie dei grani di SnO_2 e una barriera di potenziale sui bordi di grano che si oppone alla conduzione



Lo spessore della regione di carica spaziale dipende a sua volta dalla concentrazione di ossigeno adsorbita, che dipende a sua volta dalla concentrazione di ossigeno nel gas in cui è posto il sensore.

Perciò, quando il sensore è immerso nell'aria la concentrazione di ossigeno è elevata. D'altra parte, quando il sensore viene esposto a un gas X riducente, questo reagisce con le specie di ossigeno adsorbite O^-_m come segue: $X + O^-_m \rightarrow XO_m + e^-$

Questa reazione brucia ossigeno e libera gli elettroni che si trovano legati agli ioni di ossigeno, abbassando la resistenza del sensore. Viceversa, se il sensore è esposto a un gas ossidante come il biossido di azoto la resistenza aumenta poiché il gas viene adsorbito sotto forma di ioni negativi sulla superficie del semiconduttore (Fort *et al.*, 2003).

La variazione della resistenza è perciò dovuta all'adsorbimento del gas ossidante, nell'ipotesi però che la quantità di ossigeno adsorbito resti costante (Gardner *et al.*, 1999). Sono stati proposti molti approcci per modificare la selettività dei sensori a ossido di stagno, un metodo largamente utilizzato consiste nel drogare con metalli nobili il film semiconduttore, ottenendo una variazione verso alcuni gas.

I metalli hanno, infatti, una funzione catalitica verso alcuni gas e l'aggiunta di metalli modifica la formazione della regione di carica spaziale. I metalli che hanno lavoro di

estrazione maggiore dell'affinità elettronica del semiconduttore si legano con gli elettroni in banda di conduzione producendo un innalzamento della resistenza del sensore. L'ossigeno viene adsorbito sia dal metallo che dall'ossido di stagno e, quindi, viene rilasciato da entrambe le superfici per effetto dell'interazione con un gas, si ottiene una più elevata variazione della resistenza dell'ossido e dunque una risposta maggiore.

I metalli maggiormente utilizzati sono il platino (Pt) e il palladio (Pd), ma sono stati utilizzati anche l'alluminio (Al) e l'oro (Au)(Ampuero *et al.*, 2003).

Un'altra tecnica per modificare la risposta dei sensori a ossido di stagno si basa sul controllo e la variazione della temperatura di lavoro del film attivo. Questi sensori vengono utilizzati a elevata temperatura di lavoro del film e ciò produce un sensibile miglioramento della loro risposta sia in termini di prontezza che di sensibilità. Ciascuna specie ha una diversa temperatura ottimale di ossidazione e questo giustifica, anche, come al variare della temperatura operativa sia la sensibilità che la selettività del sensore varino. L'elevata temperatura facilita, inoltre, la liberazione degli ioni OH⁻, rendendo i sensori meno sensibili al vapore acqueo, che può fortemente influenzare la risposta fornita.

Per questo motivo molta attenzione deve essere posta alla metodica di analisi seguita, per assicurarsi che un'apparente discriminazione fra due campioni non sia invece dovuta ad una differenza nel loro grado di umidità.

I sensori MOSFET (Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor) funzionano in maniera simile a quelli MOS, la struttura ricalca infatti quella di un normale MOS, solo che in questo caso l'elettrodo è ricoperto da un metallo catalizzatore.

I MOSFET sono quindi costituiti da tre strati:

- ✚ Silicio semiconduttore
- ✚ Isolante ad ossido di silice
- ✚ Metallo catalitico (generalmente palladio (Pd), platino (Pt)) che viene chiamato *gate* .

Il principio di rilevazione si basa sulla variazione della conducibilità elettrica del canale transistor provocata dalle reazioni chimiche che avvengono sullo strato attivo, che modificano la carica del gate.

Molto spesso in commercio troviamo nasi elettronici costituiti da un insieme di sensori MOS E MOSFET.

Gli altri tipi di sensori utilizzati detti freddi sono: i Conductive Polymers (CP) e Quartz Crystal Microbalance (QCM).

I CP sono caratterizzati da una struttura chimica comune a tutti i principali polimeri conduttori, cioè costituiti da una catena lineare di doppi legami coniugati. Questi polimeri nel loro stato fondamentale, sono dei semiconduttori, la conducibilità è ottenuta mediante il drogaggio con sali inorganici che fungono da catalizzatori nella fase di polimerizzazione. Essi hanno una selettività media e una graduale diminuzione della conducibilità nel tempo, per cui la loro durata è limitata a 2-6 mesi.

I QCM sono costituiti da cristalli piezoelettrici di quarzo opportunamente ricoperti da una matrice in grado di generare interazioni specifiche con gli analiti. Il loro funzionamento si basa sulla diminuzione della frequenza d'oscillazione dei cristalli in funzione dell'aumento di massa temporaneo sulla superficie del materiale dovuto all'interazione con la matrice stessa. Questi sensori possono perciò presentare un altissima selettività, ma hanno sensibilità medio-bassa e risposta dipendente principalmente da variazione di temperatura (Suman *et al.*, 2002).

1.1.3 Elaborazione statistica dei dati

Una fase essenziale nell'analisi effettuate mediante naso elettronico per qualsiasi alimento è l'elaborazione dei dati. Infatti, insieme ai progressi in elettronica, nello sviluppo di nuovi sensori, c'è stato un ampio sviluppo di metodiche statistiche per interpretare i dati che si ottengono dalle analisi mediante naso elettronico.

Le tecniche commercialmente disponibili si dividono in tre grandi categorie:

- ✚ Analisi Grafiche
- ✚ Analisi Multivariate
- ✚ Analisi mediante rete neurale artificiale (ANN)

La scelta del metodo dipende dai dati disponibili e dal tipo di risultato richiesto (Shaller *et al.*, 1998).

Analisi grafiche

L'analisi grafica è la forma più semplice di trattamento dei dati che può essere usato con il naso elettronico. Questa opzione è conveniente quando bisogna visualizzare il confronto di campioni con un singolo campione di riferimento, spesso quando ci sono molti dati, l'analisi grafica diventa più complicata e può essere necessario un altro tipo di approccio.

Analisi multivariata

L'analisi di dati a più variabili riguarda generalmente la riduzione di dati, essa riduce un'alta dimensionalità in un problema a più variabili dove le variabili sono in parte correlate permettendo che le informazioni siano visualizzate in una più piccola dimensione (in genere due o tre variabili). Esistono diverse tecniche di analisi multivariate, le più utilizzate sono: PCA (Principal Component Analysis) e PLS (Partial Least Squares).

L'analisi delle componenti principali è essenzialmente una tecnica di riduzione dei dati: essa cerca di ridurre la dimensionalità della matrice dei dati trasformando le variabili originarie e conservando il maggior numero di informazioni. L'obiettivo della PCA è quello di determinare pochi fattori (le componenti principali) che contengono il maggiore numero di osservazioni possibili dei dati originari. La prima componente principale è la migliore combinazione lineare delle variabili originarie e spiega la massima variazione dei dati tra tutte le possibili combinazioni. La seconda componente principale è la combinazione lineare delle variabili osservate che spiega la massima variazione dei dati non ancora spiegate dalla prima componente principale. I risultati sono rappresentati nelle matrici degli *Score* e dei *Loadings*. Lo *score plot* mostra differenze o similarità tra i campioni. Il *loading plot* ci dice quanto ciascun sensore contribuisce a ciascuna componente principale e come le risposte dei singolo sensori sono correlate tra loro.

L'analisi delle variabili latenti è un metodo di regressione in cui bisogna fornire informazioni circa le proprietà del campione, per esempio informazioni sulle classi o sulla concentrazione. L'analisi PLS può essere considerata come due analisi PCA:

una sui dati misurati dai sensori (matrice X) e una sugli attributi del campione (matrice Y). La PLS fornisce *score plots* e *loading plots* che meglio descrivono la combinazione dei segnali dei sensori e le proprietà note dei campioni.

Rete neurale artificiale (ANN)

La Rete Neurale è un metodo di Cluster Analysis che consente di simulare il metodo di analisi delle informazioni caratteristiche del sistema olfattivo umano. L'ANN permette di creare un modello (fase di training) con il quale è possibile classificare i campioni in esame. Il processo si divide in tre fasi: creazione di un modello (fase di training), validazione del modello e predizione di una misura non nota.

1.1.4 Applicazione agli alimenti

L'applicazione del naso elettronico, in questi ultimi venti anni, agli alimenti e ai processi alimentari ha visto un notevole sviluppo. È stato utilizzato per una vasta gamma di applicazioni come il controllo di qualità di prodotti grezzi e trasformati; il monitoraggio di un processo produttivo, la classificazione di odori ma anche la rilevazione microbica di agente patogeni (Gardner *et al.*, 1998, Gibson *et al.*, 1997). Inoltre ci sono state numerose applicazioni nel campo medico, cosmetico e ambientale (Hodgins, 1995). Di seguito si riportano alcune applicazioni del naso elettronico agli alimenti.

Carne

Visto che in Italia il consumo di carne e dei suoi derivati è elevato, la maggior parte delle pubblicazioni, tra i prodotti alimentari, è stata rivolta a prodotti **carnei**. Il primo studio sui prodotti carnei è stato condotto in Francia, da Berdague *et al.*, (1993). In esso era mostrato come il naso elettronico poteva differenziare la percezione degli odori che risultavano dalla maturazione di salsicce non condite e rapidamente discriminare le differenti composizioni di prodotti carnei derivanti da animali diversi. Da allora fino a oggi il numero di pubblicazioni scientifiche riguardo a tale argomento è notevolmente cresciuto, e ha riguardato l'analisi dei composti volatili sia delle carni fresche, che dopo un tempo di refrigerazione. Tali studi sono stati

applicati sia a carni bovine, che suine e in questi ultimi anni anche alle carni di pollo (Boothe *et al.*, 2002).

Grano

La prima applicazione del naso elettronico per classificare i diversi tipi di **grani** è stata effettuata da Stetter *et al.*, (1993). Successivamente un gruppo dei ricercatori svedesi ha classificato un totale di 235 campioni di frumento, di orzo e avena (Borjesson *et al.*, 1996).

Caffè

Il **caffè** è considerato un prodotto alimentare che risulta caratterizzato da un aroma complicato in quanto è caratterizzato da più di 600 composti; per questo motivo è stato scelto da una casa produttrice di sistemi artificiali come caso studio per convalidare il proprio strumento (Tan *et al.*, 1996). Oltre alla classificazione degli odori mediante naso elettronico, in Giappone sono stati effettuati studi che differenziano i vari gusti di caffè mediante una lingua elettronica usando come sensori delle membrane lipidiche (Schaller *et al.*, 1998).

Birra

Il primo studio che riguardava l'applicazione del naso elettronico alla **birra** è stato segnalato da Pearce *et al.*, (1993), per studiare diverse birre (quattro/cinque marche della birra inglese) e le loro materie prime (luppolo, foglie e malto). Sono stati ottenuti incoraggianti risultati sia nella discriminazione di marche differenti che tra le diverse materie prime utilizzate, questi risultati sono stati confermati con successivi studi effettuati da Bailey *et al.*, (1995) che hanno discriminato birre adulterate con tracce di diacetile o di dimetil-solfuro (200 µg/kg) usando sensori diversi da quelli utilizzati da Pearce e i suoi collaboratori .

Funghi

Nel **1995** il laboratorio di chimica Agro-industriale e l'Istituto Politecnico Nazionale di Toulouse hanno pubblicato i risultati preliminari, ottenuti dall'applicazione del naso elettronico allo studio dei funghi. Sono state differenziate nove specie di funghi mediante tre differenti nasi elettronici caratterizzati da diversi sensori MOS. In tutti e tre i casi si sono ottenuti delle buone discriminazioni (Schaller *et al.*, 1998).

Latte e Formaggi

I primi studi che hanno riguardato l'applicazione del naso elettronico ai **formaggi** risalgono al 1995 effettuati da Zannoni. In questo lavoro sono stati studiati diversi formaggi: Parmigiano Reggiano, Gorgonzola, Emmenthal, formaggio svizzero e altri prodotti meno noti. I diversi tipi di formaggio sono stati differenziati facilmente, ma si sono verificati alcuni problemi riguardo la ripetibilità dei risultati, infatti i risultati erano strettamente collegati con il campione analizzato in quanto data la particolare forma dei formaggi, pezzi diversi (a seconda se sono in prossimità della crosta o meno) possono avere un differente aroma. Per questo motivo si ritenne necessario intraprendere nuove ricerche per poter utilizzare lo strumento in analisi di routine. Nello stesso anno, Harper e i suoi collaboratori, usando un naso elettronico con diversi sensori MOS, hanno concluso che solo cinque acidi grassi a basso peso molecolare sono importanti per differenziare l'aroma di questi tipi di prodotti, come l'acido acetico, l'acido propionico, l'acido butirrico, l'acido isovalerico e l'acido capronico (Harper *et al.*, 1996).

Nel 2001 Capone *et al.*, hanno utilizzato il naso elettronico per studiare l'aroma del latte e valutare i diversi tipi di latte, principalmente in relazione al differente trattamento termico (UHT, pastorizzato, sterilizzato). Il trattamento termico infatti potrebbe coinvolgere alcune reazioni chimiche in grado di condurre alla formazione di nuovi composti e così al cambiamento della composizione dell'aroma del latte. I risultati preliminari hanno mostrato che l'analisi effettuata mediante naso elettronico ha permesso di ottenere una correlazione fra la rancidità ed i giorni di invecchiamento del latte. I risultati ottenuti sembrano essere promettenti per lo sviluppo di un naso elettronico dedicato al controllo della qualità del latte per l'industria dei latticini, principalmente quando è necessario un controllo in linea.

Nel 2005 Labreche e i suoi collaboratori hanno pubblicato un interessante studio riguardo la possibilità di determinare la shelf-life del latte mediante naso elettronico. In particolare, alcuni campioni di latte sono stati monitorati per 52 giorni e conservati a temperatura ambiente a 5°C. Parallelamente all'analisi strumentale, i cambiamenti del latte sono stati studiati anche tramite la valutazione del conteggio microbico.

I risultati ottenuti, concordi con quelli ottenuti mediante le tecniche microbiologiche tradizionali, hanno mostrato che la misura generata dal naso elettronico può essere

usata per rilevare sia lo sviluppo dei batteri nel latte di partenza che durante la shelf-life. E quindi si stanno progettando delle prove in linea per dimostrare come questo strumento può essere usato facilmente per i prodotti lattiero-caseari e per il controllo della loro freschezza.

Prodotti ittici

Una delle principali applicazioni del naso elettronico riguarda la freschezza dei prodotti alimentari, e quindi anche la determinazione della *shelf-life*. Sono stati pubblicati da diversi autori interessanti risultati riguardo la freschezza di prodotti ittici (Di Natale *et al.*, 2001). Nel 1992 sono stati condotti alcuni studi per seguire il deterioramento di tre specie di pesci differenti (una specie simile al merluzzo, merluzzo e salmone rosso) usando dei sensori MOS. I campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente o in ghiaccio ed i dati raccolti sono stati confrontati con le analisi ottenute mediante valutazione sensoriale. I risultati ottenuti sono abbastanza promettenti tanto da richiedere ulteriori ricerche sull'uso di sensori nella valutazione della freschezza dei pesci. (Shaller *et al.*, 1998). Nel 1995, poi, un naso elettronico basato sui sensori MOSFET era stato messo a punto con successo con per predire l'età del filetto di merluzzo (Shaller *et al.*, 1998). Nel 2003 Vazquez *et al.*, hanno applicato il naso elettronico per monitorare il processo di maturazione delle alici sotto sale.

Olio

La qualità di un olio risulta fortemente influenzata dai processi di raccolta e di lavorazione utilizzati. In funzione di questi parametri, a parità di materia prima, è possibile ottenere oli che possiedono caratteristiche organolettiche e chimico-fisiche differenti. Una delle principali problematiche connesse alla qualificazione dell'olio extra vergine di oliva è l'individuazione di difetti di produzione e conservazione, attualmente valutati da panel di assaggiatori mediante le metodiche codificate dal COI (Consiglio Oleicolo Internazionale). In quest'ottica l'utilizzo di strumentazioni analitico-sensoriali in grado di valutare in maniera rapida e oggettiva oli diversi, semplicemente in base alla percezione dell'aroma e senza bisogno di effettuare nessun tipo di analisi chimica o pretrattamento del campione, è di grande interesse (Ricci *et al.*, 2001). Per questo motivo numerosi autori hanno applicato tale metodica

per lo studio della valutazione della qualità degli oli (Guadamarra *et al.*, 2000; Stella *et al.*, 2000; Ricci *et al.*, 2001; Angerosa 2002; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2003, 2004; Bretzmes, 2005), ma anche per la determinazione dei difetti negli oli (Aparicio *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2000; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2002; Cerrato Oliveros *et al.*, 2002; Camurati *et al.*, 2003; Procida *et al.*, 2005). Inoltre ci sono anche studi che hanno voluto verificare la possibile utilizzazione di tale metodica nella discriminazione di oli in base all'origine geografica (Guadamarra *et al.*, 2000; Cosio *et al.*, 2006;) o in base alla varietà (Guadamarra *et al.*, 2001; Cimato *et al.*, 2006).

1.1.5 Conclusioni

Dalle numerose pubblicazioni effettuate su questo strumento è possibile capire come tale campo sia ancora in pieno sviluppo. Il naso elettronico è un sistema originalmente creato per imitare le funzioni del naso umano, esso risulta caratterizzato da un insieme di sensori che dovrebbero operare in maniera simile all'olfatto umano. Sono stati fatti numerosi progressi in questo campo e ci sono molti e differenti tipi di sensori che possono essere usati e assemblati a seconda dello scopo per il quale vengono usati. Qualunque tipo di sensore, comunque, è ancora lontano dalla sensibilità e selettività di un naso umano. Per questo motivo lo scopo di tali sistemi non è quello di sostituire completamente il naso umano o altri metodi analitici. Un panel sensoriale è necessario per definire la qualità del prodotto voluta, che poi può essere usata per addestrare i nasi elettronici. I metodi analitici tradizionali come l'analisi gas-cromatografica delle sostanze volatili saranno sempre necessari per determinare qualitativamente e/o quantitativamente perchè un campione alimentare differisce da altri. Il naso elettronico, quindi può essere utile per un rapido test di "sì o no" di un prodotto rispetto ad altri prodotti. Potrebbe sostituire occasionalmente l'analisi sensoriale e perfino lavorare meglio di un panel sensoriale nel lavoro routine, o nei casi in cui devono essere rilevati i gas non odorosi o irritanti. Di conseguenza, un naso elettronico può essere considerato come un interessante strumento per rapide prove di qualità in diverse applicazioni alimentari. Chiaramente dovendo simulare l'olfatto umano, i costruttori tendono a integrare diverse tecnologie di sensori in un unico strumento in maniera da poterlo usare in maniera

indifferenziata su tutti gli alimenti. Nella pratica, però, è stato osservato come risulta difficile utilizzare un singolo strumento per ogni applicazione possibile in quanto dovrebbe essere caratterizzato da un grande numero di sensori e da una elaborata analisi statistica che richiederebbe molto tempo per l'addestramento. Per questo motivo la tendenza in questo campo sarà quella di generare sistemi specifici per applicazione specifiche (Neaves *et al.*, 1995).

1.2 Messa a punto del metodo di analisi

A seguito della valutazione dei diversi metodi di analisi dei composti volatili dell'olio extra vergine di oliva riportati in letteratura, mediante naso elettronico, è stata messa a punto una metodica di analisi che garantisce una elevata riproducibilità delle misure e una ottimizzazione delle condizioni operative.

Lo strumento utilizzato nel presente lavoro di tesi è un Naso Elettronico PEN2 (Airsense Analytics, Germania) dotato di 10 sensori MOS (Semiconduttori ad ossido-riduzione) posizionati in una camera del volume di 1,8 ml (**Figura 1.2.1.**) (Strumentazione fornita al Dipartimento di Scienza degli Alimenti dal Centro Regionale di Competenza delle Produzioni Agro-Alimentare, Università di Salerno).



Figura 1.2.1: Strumentazione portatile (naso elettronico PEN 2) impiegata nella presente ricerca.

Partendo dalla metodica descritta da Guadamarra *et al.* (2000), sono state effettuate diverse prove variando alcuni parametri dello strumento, quali:

- volume di campione;
- temperatura e tempi di riscaldamento;
- tempo di acquisizione;
- tempo di azzeramento.

In particolare le condizioni operative del Sistema Olfattivo Artificiale (SOA) usate sono le seguenti:

- volume olio 1 ml a 30°C
- tempo di acquisizione 100 sec

- delay 300 sec
- flusso campione 400 ml/min
- flusso zero gas 600 ml/min.

Il metodo di analisi prevede le seguenti fasi:

- si pone 1 ml di olio in una vial da 20 ml e si chiude ermeticamente il tutto con un tappo a ghiera e setto silicone/teflon;
- si pone la vial in un bagnetto a 30°C per un periodo di 20 min;
- si sottopone lo spazio di testa del campione ad aspirazione per 100 sec inserendo l'ago posto all'estremità della sonda attraverso il setto della vial;
- per evitare fenomeni di depressione si pone contemporaneamente all'interno della vial stessa un ulteriore ago collegato ad un filtro a carbone attivo;
- si lascia azzerare lo strumento per 300 sec.

Secondo quanto precedentemente discusso, per poter creare una memoria dello strumento è stato necessario analizzare una serie di oli e iniettare le serie di riferimento degli Standard COI relative ai principali difetti.

Secondo quanto riportato nell'allegato 12 del Regolamento CEE 25/68 per ottenere le scale di diluizioni dei principali difetti si parte dalla determinazione della "soglia media" del gruppo di assaggiatori. Si sceglie il difetto che si vuole diluire, con la maggiore e più chiara intensità possibile.

Prendendo un'aliquota di ciascuno di essi si preparano campioni, a differenti concentrazioni per successive diluizioni con il supporto oleoso adeguato finché nelle due o tre ultime diluizioni non sia possibile scoprire differenza con il bicchiere che contiene soltanto il supporto. Un'ultima coppia la formeranno due bicchieri di supporto oleoso. La serie si completerà con bicchieri di concentrazioni superiori, fino a un totale di otto. Si deve preparare una quantità sufficiente di campioni delle differenti concentrazioni per dare serie complete di ciascun attributo a ciascuno dei candidati. Per stabilire la "soglia media" dei candidati per ciascun attributo si presenterà loro un bicchiere con 15 ml di una qualsiasi delle concentrazioni preparate, insieme con un altro bicchiere con 15 ml del solo supporto. Il candidato, fatta la prova, deve indicare se sono uguali o diverse, la stessa prova si ripete per le altre concentrazioni dell'attributo studiato. Si annota il numero di risposte corrette ottenute per ciascuna concentrazione dal complesso di candidati e si riferisce come

percento del numero di prove eseguite. Si rappresenta in ordine crescente, nelle ascisse le concentrazioni provate e nelle ordinate il percento di identificazioni corrette fatte per ciascuna concentrazione. Questa concentrazione "soglia" può essere distinta per ciascun olio di un lotto, e dipende dall'intensità dell'attributo in detto olio; deve essere simile per i distinti gruppi di candidati di distinti "panel"; non è vincolata a nessuna abitudine, consuetudine o preferenza tendenziale; è, perciò, un punto di riferimento comune a qualsiasi gruppo umano normale e può servire per rendere omogenei i distinti "panels" soltanto per la loro sensibilità olfatto-gustativa. Partendo dalla concentrazione soglia del gruppo ottenuta, si prepara una serie di concentrazioni crescenti e decrescenti in maniera che questa "concentrazione soglia" corrisponda al posto 10 di questa scala. Logicamente le concentrazioni 11 e 12 saranno più diluite e pertanto sarà molto difficile scoprirvi l'esistenza dell'olio con l'attributo scelto. Dalla concentrazione C10, gli altri campioni possono prepararsi mediante la formula:

$$C10 \times a^n,$$

dove "a" è una costante corrispondente al fattore di diluizione uguale a 1,5 e "n" l'esponente che varierà da 9 a -2.

Per esempio: posta la soglia ottenuta per l'olio rancido = 0,32, sarà C10 = 0,32 e dato che a = 1,5 la serie di campioni avrà le seguenti concentrazioni:

Tabella 1.2.1: Concentrazioni dei campioni della scala

Campione	Concentrazione
1	12,3
2	8,20
3	5,47
4	3,65
5	2,43
6	1,62
7	1,08
8	0,72
9	0,48
10	0,32
11	0,21
12	0,14

1.2.1. Costruzione di un pattern di riferimento per i principali difetti (rancido, avvinato e riscaldo) presenti negli oli extra vergini di oliva.

Nelle seguenti figure si riportano i *pattern* di riferimento, costruiti per il difetto di avvinato, riscaldo e rancido. Per la costruzione dei pattern dei difetti sono stati utilizzati i campioni di standard COI, opportunamente diluiti secondo quanto previsto dall'allegato 12 del Regolamento CEE 25/68 come descritto precedentemente in maniera dettagliata

Nella **figura 1.2.1.1** si riporta il *pattern* relativo al difetto di avvinato.

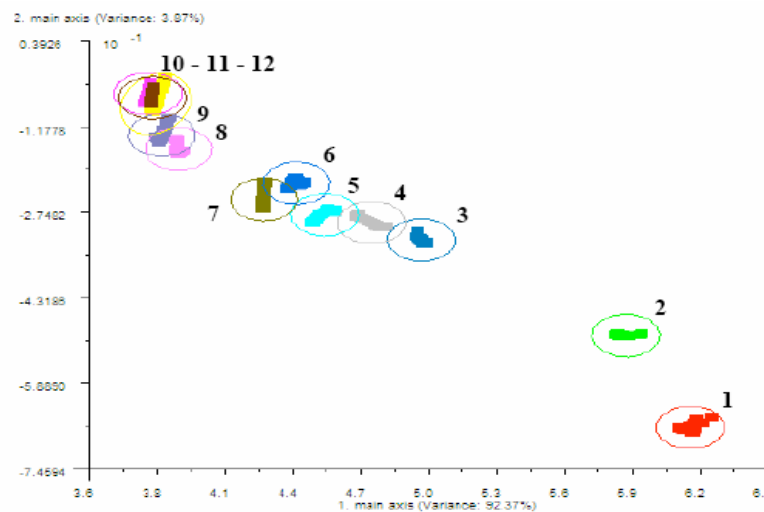


Figura 1.2.1.1: *pattern* relativo ai campioni caratterizzati dal difetto di avvinato, ottenuti dalla diluizione del difetto puro

Come si può osservare, lo strumento riesce a discriminare le diverse intensità del difetto all'interno dei dodici campioni della scala. In particolare dal pattern costruito si osserva una grande sensibilità nei confronti dei campioni con alta (1-2) e media (3-4-5-6-7) intensità, mentre lo strumento risulta meno sensibile nel discriminare i campioni con una più bassa intensità (8-9-10-11-12). D'altronde questo risultato appare concorde con quanto si riscontra normalmente durante le prove di riallineamento effettuate con gli assaggiatori (Regolamento CEE 25/68). Infatti le differenze esistenti, tra campioni contigui della scala, risultano poco evidenti nel momento in cui la concentrazione del difetto scende al di sotto della soglia media.

Nella **Figura 1.2.1.2** si riporta il *pattern* relativo al difetto di riscaldo.

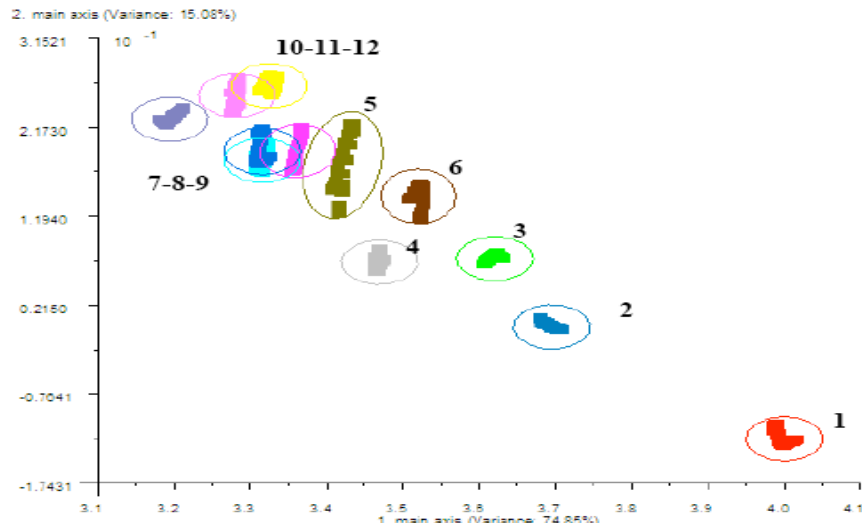


Figura 1.2.1.2: *pattern* relativo ai campioni caratterizzati dal difetto di riscaldamento, ottenuti dalla diluizione del difetto puro

Come si può osservare, lo strumento non riesce a discriminare perfettamente le diverse intensità dei campioni della scala, per la sovrapposizione dei campioni a intensità intermedia, per cui lo strumento risulta poco sensibile a tale scopo.

Nella **figura 1.2.1.3** si riporta il *pattern* relativo al difetto di rancido.

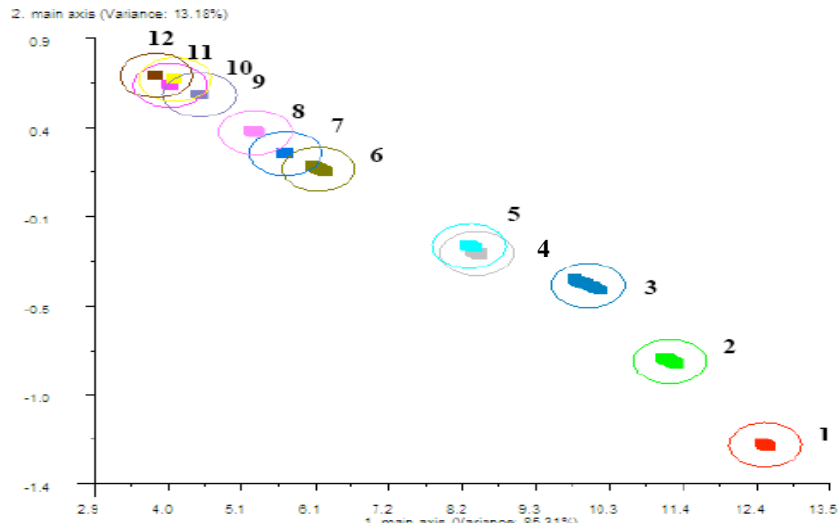


Figura 1.2.1.3: *pattern* relativo ai campioni caratterizzati dal difetto di rancido, ottenuti dalla diluizione del difetto puro

Come si può osservare, dalla **Figura 1.2.1.3** lo strumento riesce a discriminare le intensità crescenti del difetto all'interno dei dodici campioni della scala. In particolare si evidenzia una maggiore linearità della scala nei confronti di tale difetto rispetto agli altri sopra descritti.

I *pattern* su riportati, si riferiscono alla capacità dello strumento di discriminare le diverse intensità di ciascun difetto. Questa situazione è però, difficilmente riscontrabile in un campione reale, caratterizzato da un profilo sensoriale complesso.

La compresenza di più difetti, può rendere molto complicata la loro identificazione, pertanto per avere una migliore rappresentazione di una situazione reale, i tre *pattern* costruiti sono stati messi a confronto mediante una analisi delle componenti principali (PCA).

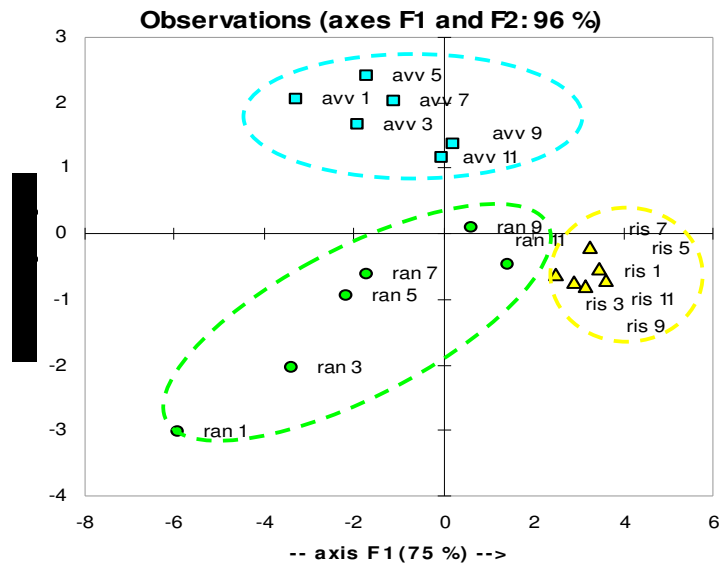


Figura 1.2.1.4. Loading plot (varianza spiegata 96%) ottenuto dai dati relativi alle diverse scale (avvinato, riscaldamento e rancido) analizzate mediante naso elettronico

Dallo *score plot* si può osservare la capacità dello strumento di discriminare i tre difetti oggetti dello studio, e in particolare la maggiore sensibilità e linearità di risposta riscontrata nei confronti del difetto di rancido.

1.2.2 Costruzione di un pattern di riferimento per l'attributo di fruttato.

L'attributo di fruttato è un carattere molto complesso dell'olio vergine di oliva. I composti che lo contraddistinguono sono soprattutto aldeidi ed esteri a sei atomi di carbonio (Salas *et al.*, 1999). Questi ultimi hanno odori che ricordano quelli delle foglie o di frutti o vegetali non completamente maturi, con diverse sfumature, come ad esempio dell'erba appena taglia; per questo motivo sono ritenuti responsabili delle cosiddette “note verdi” dell'olio di oliva. A causa della loro elevata concentrazione e della bassa soglia di percezione contribuiscono in modo essenziale alla formazione dell'aroma degli oli vergini di oliva di alta qualità, che deriva dall'equilibrio fra attributi “verde” e “fruttato”.

Per la costruzione di una scala indicatrice di tali sentori, si è adoperata una soluzione di trans-2-esenale opportunamente diluita sulla base delle quantità riportate in letteratura (Morales *et al.*, 2005).

Tale aldeide è infatti la principale responsabile delle cosiddette note verdi dell'olio di oliva, poiché solitamente rappresenta il 40-50% di tutte le sostanze volatili.

Nella **Figura 1.2.2.1** si riporta il *pattern* relativo alla diversa intensità della trans-2-esenale in un olio rettificato.

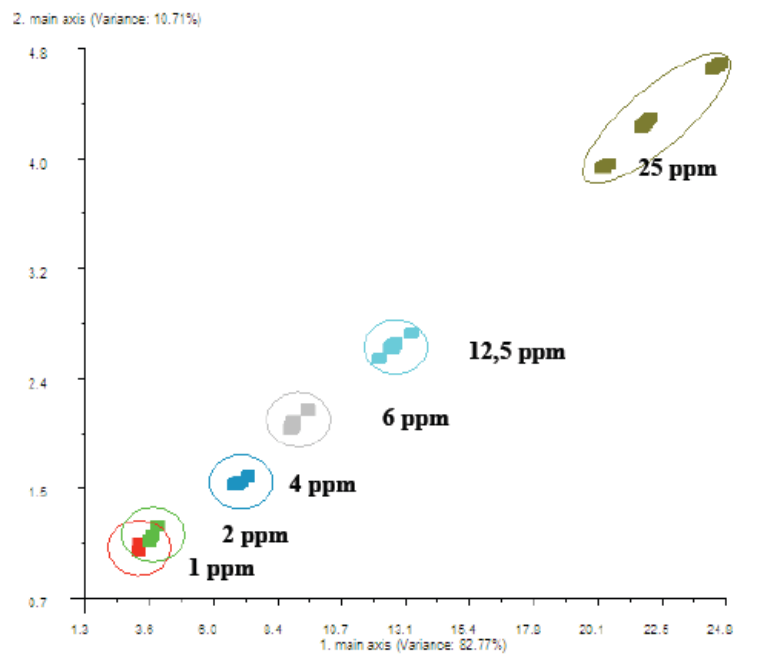


Figura 1.2.2.1 Pattern relativo ad una soluzione di trans-2-esenale in olio rettificato a 25ppm e relative diluizioni

Il naso elettronico si è dimostrato capace di una valutazione quantitativa, riuscendo a discriminare le diverse intensità del composto analizzato. Il risultato raggiunto è poco indicativo, poiché il naso elettronico, per definizione, non identifica i singoli composti che costituiscono un odore, ma ne offre un'analisi complessiva. Pertanto, per confermare la capacità dello strumento di riconoscere e discriminare le diverse intensità dell'attributo in un olio extra vergine di oliva, si è costruita una nuova scala utilizzando un olio reale tal quale e le sue relative diluizioni. L'olio utilizzato è stato scelto sulla base del giudizio di un panel addestrato e dei risultati ottenuti dall'analisi quali-quantitativa dei composti volatili.

La mediana dell'attributo di fruttato è risultata pari a 7, mentre l'analisi strumentale condotta mediante SPME-GC/MS ha mostrato un quantitativo di trans-2-esenale pari 25 ppm. Di seguito si riporta il *pattern* relativo a tale olio (**Figura 1.2.2.2**):

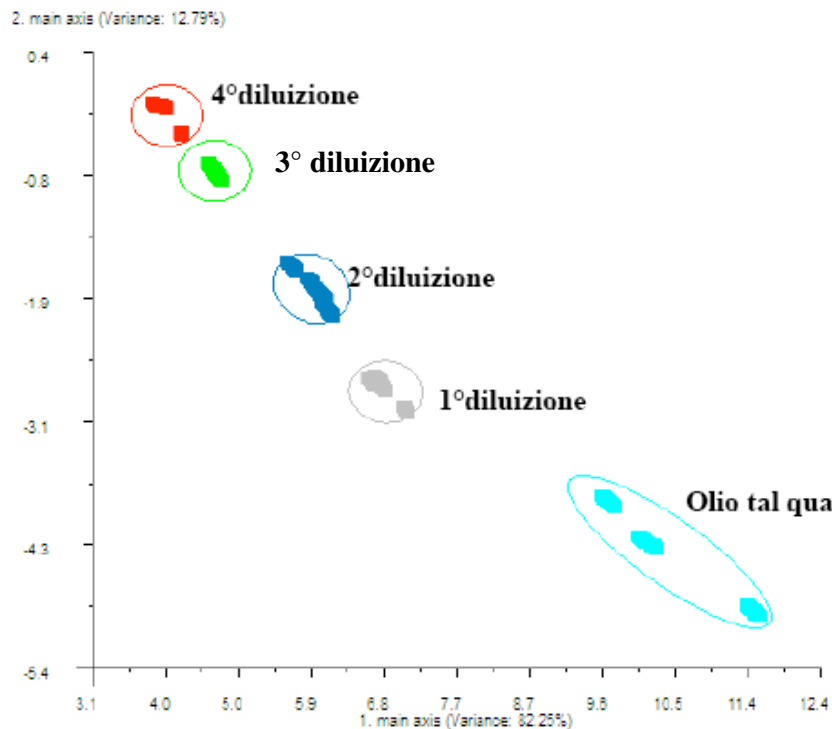


Figura 1.2.2.2. *Pattern* relativo all'olio tal quale e relative diluizioni rilevato dall'analisi mediante naso elettronico.

Come si può osservare il naso elettronico riesce a discriminare i diversi campioni che compongono la scala, garantendo delle buone separazioni tra il campione tal quale e le sue diverse diluizioni.

Dopo avere effettuato queste operazioni preliminari per verificare le attitudini e le capacità del naso elettronico è stata valutata anche la capacità dello stesso di discriminare gli oli vergini di oliva in base alla loro origine geografica; a tale scopo sono stati utilizzati 23 oli, riportati in **tabella 1.2.2.1**, rientranti tutti nella categoria degli oli extravergini dal punto di vista analitico e sensoriale (dati non mostrati), appartenenti a diverse varietà e provenienti da diverse zone. La **figura 1.2.2.3** mostra la capacità del naso elettronico di separare i campioni di **tabella 1.2.2.1** in base all'origine geografica, confermando i risultati di Guadamarra *et al.*, (2001). Infatti dalla analisi delle componenti principali (varianza spiegata dalle prime due componenti pari al 78%) (XLSTAT Addinsoft version 6.1 - Parigi, Francia) è possibile osservare come i diversi oli si raggruppano in base alla zona di provenienza.

In particolare i campioni **1f**, **2f**, **3f** di diverse varietà (*Minucciola*, *Nocellara* e *Frantoio*), provenienti dalla Penisola Sorrentina e prodotti nella stessa azienda olivicola, mostrano come, l'ambiente di produzione prevale sull'effetto varietà. Essi infatti si differenziano nettamente dagli oli ottenuti in un diverso comprensorio della stessa area DOP (campioni **4f**, **5f**, **6f** e **8f**).

Tabella 1.2.2.1. *Campioni di olio extravergine di oliva utilizzati per la valutazione dell'origine geografica mediante NE.*

	Varietà	Provenienza
1f	Nocellara	Penisola Sorrentina
2f	Minucciola	Penisola Sorrentina
3f	Frantoio	Penisola Sorrentina
4f	Minucciola	Penisola Sorrentina
5f	Minucciola	Penisola Sorrentina
6f	Minucciola	Penisola Sorrentina
7f	Minucciola	Penisola Sorrentina
8f	Minucciola	Penisola Sorrentina
11f	Ogliarola	Irpinia
12f	Ravece	Irpinia
13f	Ravece/Ogliarola	Irpinia
14f	Ravece	Irpinia
15f	Ravece/Ogliarola	Irpinia
30f	Tonda Iblea	DOP Monti Iblei
31f	Tonda Iblea	DOP Monti Iblei
32f	Tonda Iblea	DOP Monti Iblei
33f	Tonda Iblea	DOP Monti Iblei
34f	Tonda Iblea	DOP Monti Iblei
35f	Tonda Iblea	DOP Monti Iblei
36f	Moraiolo/Correggiol	DOP Terre di Siena
37f	Moraiolo/Correggiol	DOP Terre di Siena
adf	Ortice	Sannio
asf	Ortice	Sannio
bsf	Ortice	Sannio
bdf	Ortice	Sannio

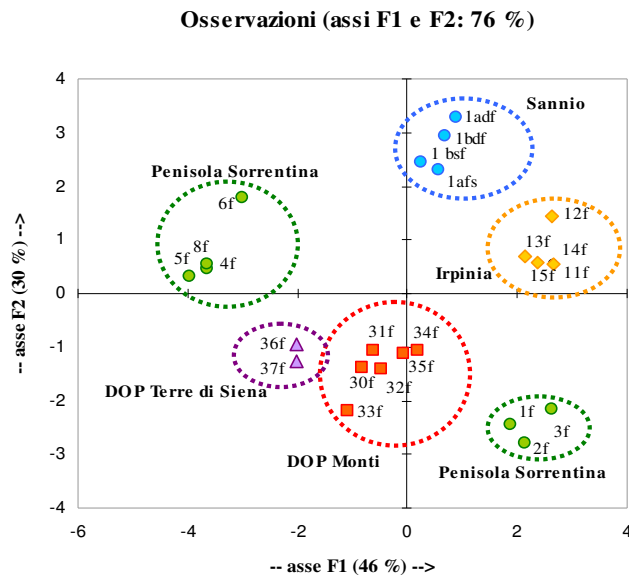


Figura 1.2.2.3 Analisi delle Componenti Principali (PCA), varianza spiegata 76%, dei dati ottenuti dal naso elettronico dei campioni di olio elencati in 1.2.2.1..

Per verificare, inoltre, la capacità del naso elettronico di valutare la qualità degli oli, e quindi di poter distinguere tra oli esenti da difetti da quelli difettati, sono state analizzate le serie dei principali difetti di standard COI, opportunamente diluiti secondo quanto riportato nell'allegato 12 del Regolamento CEE 25/68, precedentemente discusso. I tre difetti analizzati sono chiamati con le loro iniziali, per cui nella **figura 1.2.2.4**, le sigle si riferiscono ai difetti (avvinato, riscaldamento e rancido) mentre i numeri indicano la scala diluita (il numero 1 corrisponde alla maggiore intensità del difetto, mentre il numero 11 alla minore intensità).

Come è possibile osservare dalla **figura 1.2.2.4**, il naso elettronico riesce a separare i gruppi dei diversi difetti analizzati, nonché a differenziare oli difettati da oli extravergini. È evidente come i campioni fruttati (da **1f** a **15f**, tabella 1.2.2.1.) si posizionino in regioni dello spazio non sovrapponibili a quelle dei difetti. Da questi primi risultati, è possibile dedurre che il naso elettronico da noi utilizzato, e la metodica di analisi messa a punto ci consentono di discriminare gli oli in base alla qualità e all'origine geografica. Chiaramente la validazione dei risultati ottenuti dipende dalla costruzione di una banca dati corposa, che ci consenta di raccogliere le

impronte sensoriali legate a tipicità e provenienza. Man mano che sarà possibile ottenere tali dati avremo sempre più uno strumento preciso e indicativo.

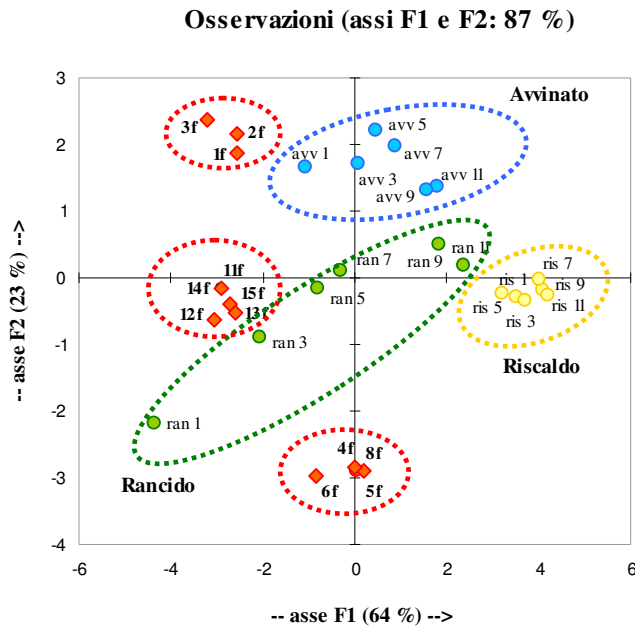


Figura 1.2.2.4. *Analisi delle Componenti Principali, varianza spiegata 87%, dei dati ottenuti dal naso elettronico di campioni di difetti standard (avvinato, riscaldo e rancido) e di oli extra vergini (da 1f a 15f, Tabella 1.2.1.1.).*

Al fine di confermare l'abilità dello strumento nel discriminare sia diversi aromi che caratterizzano gli oli extravergini che i principali difetti, ed in particolare la rancidità degli oli per determinarne la *shelf-life*, è stata effettuata per 18 mesi una prova di *shelf-life* con oli raccolti nella campagna olearia 2004-2005 e provenienti dalla Penisola Sorrentina. Tali risultati verranno discussi dettagliatamente nel **capitolo III**.

1.3 Bibliografia

Ampuero S., Bosset J.O. (2003). The electronic nose applied to dairy products: a review. *Sensors and Actuators B*, 94: 1-12.

Angerosa F. (2002). Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104: 639–660.

Aparicio R., Rocha S.M., Delgadillo I., Morales M.T. (2000). Detection of Rancid Defect in Virgin Olive Oil by the Electronic Nose. *J. Agric. Food Chemistry*, 48: 853-860.

Arthur C.L., Pawliszyn J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* 62: 2145-2148.

Bailey T.P., Hammond R. V., Persaud K. C. (1995). Application for an electronic aroma detector in the analysis of beer and raw materials. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, 53: 39–42.

Berdague J.L., Talou T. (1993). Exemples d'application aux produits carnes des senseurs de gaza semi-conducteurs. *Sciences des Aliments*, 13: 141–148.

Boothe D.H., Arnold J.W. (2002). Electronic nose analysis of volatile compounds from poultry meat samples, fresh and after refrigerated storage. *J. Sci. Food Agric.* 82: 315-322.

Borjesson T., Eklov T., Jonsson A., Sundgren H., Schnurer J. (1996). Electronic nose for odour classification of grains. *Cereal Chemistry*, 73: 457–461.

Bretzmes J., Cabré P., Rojo S., Llobet E., Vilanova X., Correig X. (2005). Discrimination Between Different Samples of Olive Oil Using Variable Selection Techniques and Modified Fuzzy Artmap Neural Networks. *Ieee Sensors Journal*. 5: 463-470.

Camurati F., Cristofanilli G., Bonadonna M., Colle E., Dalcanale E. (2003). Riconoscimento dei difetti negli oli vergini di oliva: confronto fra panel test e sistemi olfattivi artificiali. *Riv. Ita. Sos. Grasse* 80: 65-70.

Capone S., Epifani M., Quaranta F., Siciliano P., Taurino A., Vasanelli L. (2001). Monitoring of rancidity of milk by means of an electronic nose and a dynamic PCA analysis. *Sensors and Actuators B* 78: 174-179.

Cerrato Oliveros M. C., Pérez Pavón J. L., Pinto C. M, Laespada M. F., Cordero B. M., Forina M. (2002). Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors as a fast alternative for the detection of adulteration of virgin olive oils. *Analytica Chimica Acta* 459: 219–228.

- Cimato A., Dello Monaco D., Distante C., Epifani M., Siciliano P., Taurino A.M., Zuppa M., Sani G. (2006). Analysis of single-cultivar extra virgin olive oils by means of an Electronic Nose and HS-SPME/GC-MS methods. *Sensors and actuators B* 114: 674-680.
- Cosio M. S., Ballabio D., Benedetti S., Gigliotti C. (2006). Geographical origin and authentication of extra virgin olive oils by an electronic nose in combination with artificial neural networks. *Analytica Chimica Acta* 567: 202–210.
- Di Natale C., Olafsdottir G., Einarsson S., Martinelli E., Paolesse R., D'Amico A. (2001). Comparison and integration of different electronic noses for freshness evaluation of cod-fish fillets. *Sensors and actuators B* 77: 572-578.
- Fort A., Rocchi S., Ulivieri N., Vignoli V. (2003). Sistemi olfattivi artificiali. *Mondo Digitale*, 2: 64-70.
- Garcia-Gonzalez D.L., Aparicio R. (2002). Detection of vinegary defect in virgin olive oils by metal oxide sensors. *J. Agric. Food. Chem.* 50: 1809-1814.
- Garcia-Gonzalez D.L., Aparicio R. (2003). Virgin olive oil quality classification combining neural network and MOS sensors. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 3515-3519.
- Garcia-Gonzalez D.L., Aparicio R. (2004). Classification of different quality virgin olive oils by metal-oxide sensors. *Eur. Food. Res. Technol.* 218: 484-487.
- Gardner J.W., Craven M., Dow C., Hines E. L. (1998). The prediction of bacteria type and culture growth phase by an electronic nose with a multi-layer perception network. *Measurement Science and Technology*, 9:120–127.
- Gardner J.W; Barlett P.N. (1994). Brief history of electronic nose. *Sensor and actuator B*. 18: 211-220.
- Gardner J.W; Bartlett P.N. (1999). *Electronic Noses: principles and applications*. Oxford University.
- Gibson T. D., Prosser O., Hulbert J. N., Marshall R. W., Corcoran P., Lowery P., Ruckkeene E. A., Heron S. (1997). Detection and simultaneous identification of microorganisms from headspace samples using an electronic nose. *Sensors and Actuators B*, 44: 413–422.
- Guadamarrá A., Rodríguez-Méndez M.L., de Saja J.A., Ríos J.L., Ollas J.M. (2000). Array of sensors based on conducting polymers for the quality control of the aroma of the virgin olive oil. *Sensors and actuators B* 69: 276-282.
- Guadamarrá A., Rodríguez-Méndez M. L., Sanz C., Ríos J. L., de Saja J. A. (2001). Electronic nose based on conducting polymers for the quality control of the olive oil aroma discrimination of quality, variety of olive and geographic origin. *Analytica Chimica Acta* 432: 283-292.

- Gutierrez-Osuna R., Nagle H.T. (1999). A method for evaluating data-preprocessing techniques for odour classification with an array of gas sensors. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, Vol. 29, 5: 626-632.
- Gutierrez-Rosales F., Rios, J. J., Gomez-Rey M. L. (2003). Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on line HPLC electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6021-6025.
- Harper W. J., Sohn S., Da Jou K. (1996). The role of fatty Acids in the Aroma Profiles of Swiss Cheese as determined by an Electronic Nose. Olfaction and Electronic Nose, 3rd International Symposium, Toulouse.
- Hines E L., Llobet E., Gardner J W. (1999). Electronic noses: a review of signal processing techniques. IEE Proceedings on Circuits, Devices and Systems, Vol. 146, Issue 6: 297-310.
- Hodgins D. (1995). The development of an electronic 'nose' for industrial and environmental applications. *Sensors and Actuators B*, 26-27: 255-258.
- Karakam H., Kutlu S., Kose S. (2002). Effect of salt concentrations and temperature on the quality and shelf-life of brined anchovies. *International Journal of Food and Technology*, 37:19-28.
- Keller PE. (1999). Overview of electronic nose algorithms. IJCNN '99, International Joint Conference on Neural Networks, Vol. 1: 309-312.
- Morales M.T., Aparicio R., Aparicio-Ruiz R., Garcia Gonzalez D.L. (2000). Detection of defects in virgin olive oil by the electronic nose. *Flavour and fragrance chemistry*. 151-161.
- Morales M. T., Luna G., Aparicio, R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chem.* 91: 293-301.
- Nagle H.T., Gutierrez-Osuna R., Schiffman S.S. (1998). The how and why of electronic noses. *IEEE Spectrum*, Vol. 35, 9: 22-31. Publisher: IEEE, USA.
- Neaves P.I., Heatfield J. V. (1995). A new generation of integrated electronic noses. *Sensors and actuators B* 27: 223-231.
- Pearce T. C., Gardner J. W., Friel S., Bartlett P. N., Blair N. (1993). An electronic nose for monitoring the flavour of beer. *Analyst*, 118: 371-377.
- Persaud K., Dodd G.H. (1982) Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose. *Nature*, 299, 352-355.
- Polesello A. (1999). Il naso elettronico. Laboratorio 2000.

- Procida G., Giomo A., Cichelli A., Conte L.S. (2005). Study of volatile compounds of defective virgin olive oils and sensory evaluation: a chemometric approach. *J Sci Food Agric* 85: 2175–2183.
- Ricci C., Allai M., Ribechini L., Dal canale E., Caglioti L. (2001). Valutazione della qualità dell'olio extra vergine di oliva mediante naso elettronico a sensori MOS. *Riv. Ita. Sost. Grasse* 78: 85-92.
- Salas J. J., Sánchez J., (1999). Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europaea*) fruit. *Plant science*. 143: 19-26.
- Shaller E., Bosset J.O., Escher F. (1998). Electronic Noses and their application to food. *Lebensm-Wiss. Technology*, 31: 305-316.
- Stella R., Barisci J. N., Serra G., Fallace G.G., De Rossi D. (2000). Characterisation of olive oil by an electronic nose based on conducting polymer sensors. *Sensors and actuators B* 63: 1-9.
- Stetter J. R., Findlay M.W., Schroeder K. M. JR., Yue C., Penrose W. R. (1993). Quality classification of grain using a sensor array and pattern recognition. *Analytica Chimica Acta*, 284: 1–11.
- Suman M., Ricci C., Cristofanilli G., Dalcanale E., Borsellini U., Sensi L. (2002) AOS: From Study to Quality Control. *Italia Imballaggio*, 540: 70-76.
- Tan T. T., Loubet F., Labreche S., Amine H. (1996). The Electronic Nose: Discrimination, stability, calibration and transferability. Case Study: Coffee. Olfaction and Electronic Nose, 3rd International Symposium, Toulouse.
- Vazquez M. J.; Lorenzo R. A., Cela R. (2003). The use of an “electronic nose” device to monitor the ripening process of anchovies. *Int. Journal of Food Science and Technology* 38: 273-284.
- White P. J. (1991). Methods for measuring changes in deep-fat frying oils. *Food Technology*, 45: 75-79.
- Zannoni M. (1995). Preliminary results of employ of an artificial nose for the evaluation of cheese. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 46: 277–289.

Capitolo II. Messa a punto delle condizioni di analisi delle sostanze volatili mediante Headspace-Solid Phase Microextraction (SPME)-GC/MS

2.1 Introduzione

La crescente domanda del consumatore per la sicurezza e la qualità nutrizionale degli alimenti unita alla maggiore competitività del mercato mettono in evidenza l'importanza delle analisi dei prodotti alimentari. Chiaramente tali analisi non sono semplici se consideriamo la complessità delle matrici alimentari. Il metodo ideale di analisi dovrebbe comprendere in una sola fase l'isolamento, la preconcentrazione e la determinazione quantitativa di analiti, indipendentemente dalla complessità della matrice alimentare (Wardencki *et al.*, 2004), ma la maggior parte delle tecniche di analisi non sono sensibili sufficientemente per permettere l'analisi diretta dei campioni alimentari senza la necessità di isolare e preconcentrare gli analiti. Ogni fase che noi aggiungiamo in una procedura analitica aumenta la probabilità di far perdere e contaminare il campione e di farci commettere maggiori errori. Per questo motivo è desiderabile ridurre il numero di fasi da usare nella preparazione dei campioni senza diminuire la qualità dell'analisi stessa (Witkiewicz, 1995; Smith, 2003). In tale ottica rientra una delle recenti tecniche analitiche introdotte nel campo dell'analisi degli alimenti: la Solid-Phase MicroExtraction (SPME); infatti è stata sviluppata per combinare la preparazione e l'analisi del campione in una sola fase.

La SPME presenta i vantaggi di essere sensibile, semplice, poco laboriosa e di non implicare l'uso di solventi. D'altro canto, però, tale tecnica analitica presenta alcuni svantaggi: oltre ad essere piuttosto dispendiosa in termini di tempo, può comportare il rischio di contaminazioni ed eventuale formazione di artefatti dovuta all'uso di temperature elevate (Kataoka *et al.*, 2000).

Tale tecnica può essere applicata con successo sia per i composti polari che non, nei campioni che si trovano allo stato solido liquido o gassoso e può essere facilmente accoppiata a vari strumenti analitici come GC, GC-MS, HPLC and LC-MS. (Kataoka *et al.*, 2000).

La microestrazione in fase solida dello spazio di testa statico (HS-SPME), sviluppata

nei primi anni '90 da Arthur e Pawliszyn per studiare gli inquinanti nelle acque ed estesa, in seguito, all'analisi del *flavour* degli alimenti, negli ultimi anni è stata introdotta, in alternativa alla tecnica del *purge and trap* per il pre-arricchimento del campione prima dell'analisi cromatografica.

2.1.1 Principio di funzionamento e ottimizzazione delle condizioni.

Il procedimento di concentrazione/estrazione degli analiti mediante HS-SPME è illustrato in **figura 2.1.1.1**

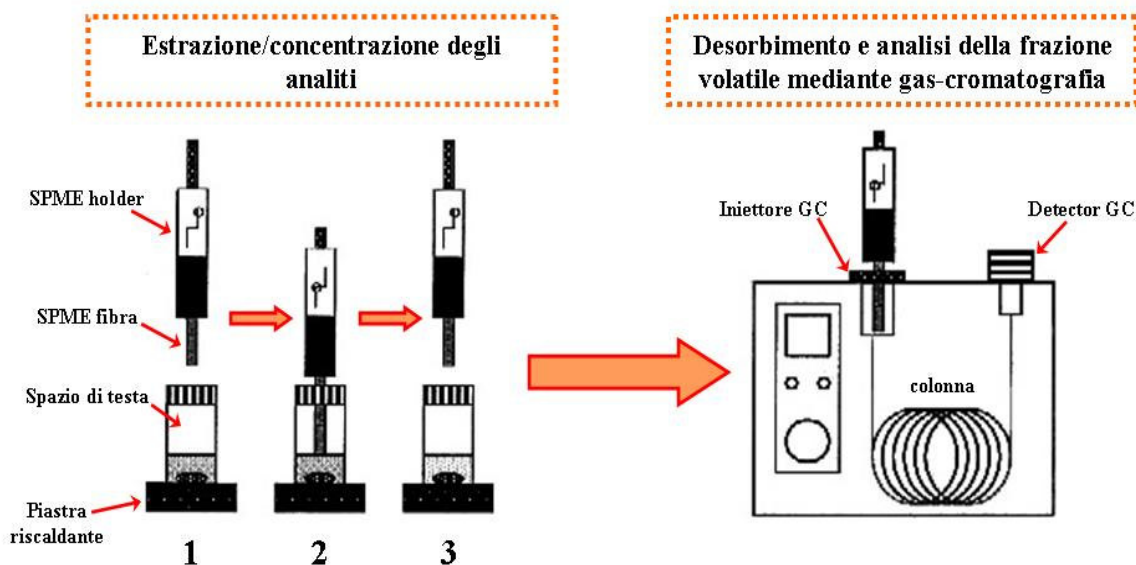


Figura 2.1.1.1 Procedimento di concentrazione/estrazione della frazione volatile mediante analisi HS-SPME e successivo desorbimento/analisi mediante analisi gas-cromatografica.

Fase 1. Forare il setto della vial contenente il campione;

Fase 2. Esporre la fibra allo spazio di testa;

Fase 3. Rimuovere l'holder.

La tecnica prevede una prima fase di concentrazione/estrazione dei componenti volatili (**figura 2.1.1.1** fasi 1 e 2) mediante l'esposizione allo spazio di testa di una fibra in silice fusa rivestita da un film relativamente sottile di fase stazionaria polimerica (**figura 2.1.1.2**). Durante questa fase si stabilisce un equilibrio tra le concentrazioni degli analiti presenti nello spazio di testa del campione e il rivestimento dei polimeri sulla fibra. La quantità di analita adsorbita sulla fibra dipende dallo spessore del polimero e dal tempo/temperatura di esposizione; la

selettività può essere alterata attraverso il cambiamento del tipo di polimero di rivestimento o del suo spessore, in quanto i composti volatili richiedono un rivestimento più spesso rispetto ai composti semivolatili (Kataoka *et al.*, 2000; Wardenki *et al.*, 2004). Dopo un opportuno tempo di estrazione, la fibra viene ritirata nell'ago e rimossa dalla *vial* contenente il campione (**figura 2.1.1.1**, fase 3) per essere inserita direttamente nell'iniettore del GC per la successiva fase di desorbimento.

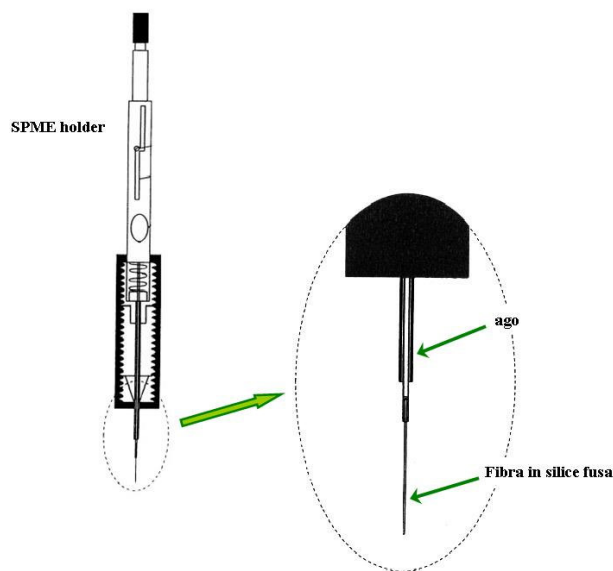


Figura 2.1.1.2. Holder utilizzato per l'analisi HS-

Per ottenere una maggiore accuratezza e precisione attraverso l'analisi SPME, sono molto importanti sia il tempo di campionamento che gli altri parametri utili per raggiungere l'equilibrio nello spazio di testa del campione. Inoltre è molto importante scegliere la misura della *vial* che deve essere usata per il campionamento così come la scelta del volume di campione da utilizzare, che deve restare costante. Esistono due metodiche di campionamento mediante l'utilizzo della fibra: una che prevede l'immersione della fibra nel campione e l'altra che invece prevede l'esposizione della fibra allo spazio di testa del campione. Le due metodiche si basano su una diversa cinetica di migrazione dei composti volatili sulla fibra, anche se entrambi gli approcci sono risultati complementari (Yang e Peppard, 1994).

Quando si effettua un campionamento mediante l'immersione della fibra nella soluzione da analizzare, è importante che l'altezza con la quale la fibra è immersa nel campione sia sempre la stessa. Per ottenere una maggiore sensibilità utilizzando l'esposizione della fibra allo spazio di testa e non immergendola direttamente nel campione, la quantità di campione da analizzare dovrebbe essere minima in modo da aumentare lo spazio di testa (Zhang e Pawliszyn, 1993). Infatti l'equilibrio dei composti è ottenuto molto più rapidamente nello spazio di testa del campione che immergendo la fibra, perché gli analiti possono diffondere più rapidamente attraverso

lo spessore della fibra. Queste caratteristiche possono essere manipolate per avvantaggiare l'adsorbimento selettivo dei componenti del campione, in modo appropriato. L'utilizzo dello spazio di testa è ideale per minimizzare le interferenze con l'analita, e può prolungare la shelf-life della fibra (Zhang e Pawliszyn 1993).

La microestrazione in fase solida può essere usata rapidamente per effettuare uno screening di campioni o quando usata come metodo estrattivo insieme alla presenza di uno standard interno, può essere un valido aiuto per un'analisi quantitativa.

Il numero di estrazioni che possono essere effettuate con una singola fibra dipende dalla cura con cui si effettua il montaggio e con cui si opera, ma anche dalla natura dei composti dei campioni che vengono analizzati. Nella maggior parte dei casi, con una fibra è possibile effettuare dalle 50 alle 100 estrazioni (Bollettino Supelco 923, 1998).

2.1.2 Parametri che influenzano l'efficienza estrattiva della tecnica della microestrazione in fase solida

Nei prodotti alimentari o nelle matrici complesse spesso è riscontrabile un vasto numero di analiti presenti in piccole quantità e per questo motivo è necessaria la preparazione di campioni alimentari e la preconcentrazione di analiti per l'analisi finale. Le tecniche che prevedono l'analisi dello spazio di testa (come ad esempio lo spazio di testa dinamico, statico, l'spme) rappresentano una vera garanzia in questo ambito (Sides *et al.*, 2000, Snow e Slack, 2002).

L'analisi SPME in special modo è capace di soddisfare maggiormente queste richieste ed è per questo che negli ultimi anni sono aumentate le pubblicazioni scientifiche riguardo l'uso di tale tecnica.

L'efficacia della preconcentrazione degli analiti usando la tecnica dell'spme dipende da molti parametri come: il tipo di fibra, il volume del campione, il tempo e la temperatura di estrazione, il metodo di estrazione, il desorbimento degli analiti dalla fibra e l'eventuale aggiunta di sale. (Supelco Note 56, 1998; Zhang e Pawliszyn, 1993).

✚ Tipi di fibre

La sensibilità della tecnica della microestrazione dipende principalmente dal valore di una costante di distribuzione degli analiti ripartiti tra il campione e la fase stazionaria della fibra adsorbente.

Quindi la quantità di composti adsorbiti dal rivestimento della fibra può essere calcolato mediante la seguente formula:

$$n=C_0*V_1*V_2*K/(K*V_1+V_2)$$

dove n è la massa assorbita dal rivestimento

V_1 e V_2 sono i volumi del rivestimento e della soluzione

K è il coefficiente di ripartizione dell'analita tra il rivestimento e la soluzione

C_0 è la concentrazione iniziale dell'analita nella soluzione da analizzare.

Il tipo di fibra dovrebbe essere scelto in base alle specie che si vogliono analizzare, la regola generale “il simile scioglie il simile” applicata all'SPME è vera, per es. i composti polari sono assorbiti da fibre polari e i composti non polari da fibre non polari. In commercio esistono diversi tipi di fibre come è possibile osservare dalla

Tabella 2.1.2.1

Tabella 2.1.2.1 Diversi tipi di fibre adsorbenti disponibili in commercio. Tratto dal bollettino 923 di Supelco, 1998

Stationary Phase	Recommended Use
Polydimethylsiloxane (PDMS)	
100µm/ non-bonded	Volatiles
30µm/ non-bonded	Non polar semivolatiles
7µm/ non-bonded	Moderately polar to non polar semivolatiles
Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB)	
65µm/ partially crosslinked	Polar semivolatiles
60µm/ partially crosslinked	General purpose (for HPLC only)
Carbowax/Divinylbenzene (CW/DVB)	
65µm/ partially crosslinked	Polar analytes
Carbowax/Templated Resin (CW/TPR)	
50µm/ partially crosslinked	Surfactants (for HPLC only)
Polycrylate	
85µm/ partially crosslinked	Polar semivolatiles

L'efficienza della preconcentrazione dipende non solo dal tipo di fibra usato ma anche dallo spessore della fibra. Nell'SPME, comunque, poichè solo 1 cm di fibra è esposta al campione, il rivestimento della fibra deve essere o non polare o fortemente polare. Le piccole differenze della polarità della fase stazionaria che sono usate in gas-cromatografia potrebbero non produrre un apprezzabile differenza di selettività nel caso dell'analisi SPME (Bollettino Supelco 923, 1998). Film spessi, permettono l'estrazione di un più alto numero di analiti paragonati all'utilizzo di film sottili. Le fibre con film spessi sono molto più efficaci nel caso di composti volatili, consentendo un migliore trasporto all'iniettore gas-cromatografico senza perdite.

D'altro canto, le fibre con film sottili sono raccomandate per l'isolamento e la preconcentrazione di sostanze con un alto punto di ebollizione perché consentono fasi di estrazione e desorbimento realizzabili in tempi relativamente brevi (Wardencki *et al.*, 2004).

L'effetto dello spessore del film (PDMS polydimethylsilane) di una fibra SPME sulla efficienza di arricchimento e selezione dei composti dopo 15 minuti di esposizione ad una soluzione acquosa è mostrato in **Tabella 2.1.2.1**

Tabella 2.1.2.1 Effetto dello spessore che ricopre la fibra SPME sul recupero dei analiti (fibre di PDMS, campione esposto per 15 minuti). Tratto dal bollettino 923 di Supelco, 1998

Analyte	Fiber coating thickness on relative recovery (%)		
	100µm	30µm	7µm
Benzene	2	1	<1
Toluene	5	1	<1
Ethylobenzene	6	4	1
1,3-Dichlorobenzene	15	5	1
Naphthalene	13	4	1
Fluorene	29	18	6
Phenanthrene	37	27	16
Anthracene	49	38	32
Pyrene	69	54	47
Chrysene	100	100	100
Benzo(a)anthracene	105	91	96
Benzo(a)pyrene	119	127	131

Un rivestimento della fibra spesso avrà una maggiore estrazione di alcuni analiti rispetto a un rivestimento sottile, mentre un rivestimento sottile è usato per permettere una rapida diffusione e un rilascio di composti con un più alto punto di ebollizione durante il desorbimento termico (Wardencki *et al.*, 2004).

È importante che la fibra venga pulita prima dell'analisi di ciascun campione allo scopo di rimuovere i contaminanti che forniscono un alto rumore di fondo al cromatogramma. La pulizia può essere fatta inserendo la fibra in un iniettore ausiliare.

Volume di campionamento

All'inizio, quando si sono effettuati i primi studi mediante l'SPME, per incrementare l'efficienza di estrazione, si tendeva a minimizzare il volume dello spazio di testa nella vial (Yang e Peppard, 1994; Pawliszyn, 1997). In genere, la vial è riempita a metà delle sue capacità, ma in uno studio effettuato da Pawliszyn nel 1997 è stato dimostrato come l'equilibrio raggiunto è tre volte più veloce mettendo 1 cm³ di liquido in una vial da 5 cm³, anziché mettendo 10 cm³ di liquido in una vial da 50 cm³ (Pawliszyn, 1997).

Temperatura e tempo di estrazione

La costante di distribuzione di una sostanza tra la fibra e il campione dipende anche dalla temperatura. Un incremento della temperatura di estrazione facilita il trasporto degli analiti dalla soluzione allo spazio di testa, accelerando l'adsorbimento di particolari sostanze sulla fibra. D'altra parte, un eccessivo incremento della temperatura può causare un prematuro desorbimento di analiti. Generalmente, la temperatura ottimale dipende dalla composizione della matrice, dai composti e dalla fase stazionaria usata. Il tempo di esposizione è un altro fattore importante, un tempo più lungo favorisce l'occupazione di molti siti sulla fibra da parte delle molecole dell'analita, ma un tempo prolungato, quando tutti i siti sono occupati, non ha effetto sull'efficienza della preconcentrazione e in qualche caso può causare desorbimento (Zhang e Pawliszyn, 1993). Il tempo e la temperatura sono parametri strettamente collegati tra loro, (Mestres *et al.*, 2000) ad es. un incremento di temperatura richiede un tempo di analisi più breve, perciò accelera il tempo di analisi.

Sale

L'aggiunta di un agente esterno come il sale aumenta l'efficienza di estrazione di molti analiti, in particolare dei composti polari e volatili ma diminuisce la solubilità degli stessi in soluzione, perciò aumenta la quantità di analita assorbito sulla fibra (Wardenki *et al.*, 2004). Il sale non è necessario per aumentare l'estrazione degli analiti con alti coefficienti di distribuzione, deve essere usato sempre in tracce e può introdurre picchi di interferenza (Bollettino Supelco 923, 1998).

Modalità di estrazione

La fibra può essere esposta al campione in due modi, attraverso l'immersione diretta della fibra SPME all'interno della soluzione del campione (estrazione diretta) oppure mediante l'esposizione della fibra allo spazio di testa. Il campionamento dei composti volatili di un campione di una matrice complessa è generalmente fatto mediante il metodo che prevede l'esposizione della fibra allo spazio di testa. In questo caso si prolunga la shelf-life della fibra, perché non c'è contatto diretto con il campione (Wardencki *et al.*, 2004). D'altra parte, immergendo direttamente la fibra all'interno della soluzione è possibile l'estrazione di composti volatili minori, ma in questi casi, la fibra usata si deteriora più facilmente, aumentando i costi dell'analisi. (Kataoka *et al.*, 2000). Perciò, quando possibile, è preferibile il campionamento dello spazio di testa.

Desorbimento degli analiti dalla fibra

La selezione dei parametri di desorbimento è ugualmente importante per ottimizzare le condizioni di estrazione (Wardencki *et al.*, 2004). Generalmente è usato il desorbimento termale nell'iniettore del gas cromatografo, questo dovrebbe avvenire nel più breve tempo possibile, e inoltre la temperatura dell'iniettore dovrebbe essere più alta del punto di ebollizione dei composti con un più alto punto di ebollizione. È chiaro che la temperatura da utilizzare può essere limitata dalla resistenza termale della fibra usata.

Derivatizzazione

Gli analiti sono frequentemente presenti nei campioni in tracce e in una miscela complessa. I componenti di una matrice che sono simili o presenti in concentrazione alte possono interferire, o spesso ostacolare, la loro determinazione. La conversione di analiti in derivati con altre strutture chimiche, potrebbe determinare la differenziazione dei componenti della matrice. Tale pratica rappresenta una buona soluzione in molte situazioni. Durante il processo di derivatizzazione gli analiti acquisiscono nuove proprietà fisiche e chimiche, che potrebbero interferire con la rilevazione degli analiti stessi (Wardencki *et al.*, 2001, 2003).

2.1.3 Applicazione agli alimenti

L'applicazione della tecnica SPME, accoppiata ai diversi strumenti analitici come GC, GC-MS, HPLC e LC-MS, agli alimenti e ai processi alimentari, negli ultimi dieci anni ha subito un notevole sviluppo. Tale metodica infatti è stata utilizzata per una vasta gamma di applicazioni come la determinazione del *flavour* e degli *off-flavour* degli alimenti (Kataoka *et al.*, 2000), per l'analisi dei contaminati presenti nelle acque (Arthur e Pawliszyn, 1990), per l'analisi dei pesticidi isolati da differenti matrici (Wan, 1995; Jimenez *et al.*, 1998; Beltran *et al.*, 2000; Fidalgo-Used *et al.*, 2003), per la determinazione dei residui di solventi negli oli vegetali (Evans *et al.*, 1997; Grimaldi *et al.*, 1999) e per l'analisi dei composti dell'aroma (Chin *et al.*, 1996; Ferrira *et al.*, 1996; Galipo *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2001) e per l'analisi dello spazio di testa di piante aromatiche e medicinali (Bicchi *et al.*, 2000).

Di seguito si riportano alcune applicazioni della microestrazione in fase solida agli alimenti.

Carne

Dopo l'aspetto e la consistenza, il *flavour* è la più importante caratteristica della qualità della carne percepita dal consumatore (Campo, 2003).

Per questo motivo molti lavori hanno usato la SPME per analizzare i composti volatili della carne. Tale metodica è stata usata da Nielsen *et al.*, nel 1996 per rilevare la formazione delle aldeidi nella carne di maiale cotta e da Brunton *et al.* nel 2000 per

rilevare la formazione delle aldeidi nella carne di tacchino cotta. Nel 1997 è stata usata l'analisi SPME da Sen *et al.*, per determinare i livelli delle nitrosammine nel prosciutto affumicato e da Ruiz *et al.*, nel 1998 per l'analisi dei composti volatili del prosciutto essiccato invece Andres e collaboratori nel 2002 hanno monitorato lo sviluppo dei composti volatili durante il processo di essiccazione del prosciutto. Sempre per lo studio delle carni, Elmor *et al.*, nel 2001 hanno analizzato i composti volatili della carne di maiale cotta e nel 2007 Soncin *et al.*, hanno pubblicato uno studio preliminare sulla frazione volatile della carne cruda di maiale, dell'anatra e dell'oca.

Bevande analcoliche

I primi studi sull'analisi del *flavour* mediante SPME risalgono al 1994 (Yang e Peppard, 1994), nel 1996 Steffen e Pawliszyn hanno messo a punto un metodo di analisi mediante HS-SPME-GC-FID per l'analisi di 17 composti volatili responsabili del *flavour* dei succhi di frutta. Hanno messo a confronto due tipi di fibre presenti in commercio: la fibra di PA (Polyacrylate) e la fibra di PDMS (Polydimethylsiloxane). La prima è riuscita a estrarre un maggiore numero di composti volatili responsabili del *flavour* rispetto alla seconda. L'aggiunta di sale al campione, in entrambi i rivestimenti delle fibre, ha aumentato la quantità di analiti estratti (Steffen e Pawliszyn, 1996).

Tale tecnica, negli anni successivi, è stata utile anche per l'analisi del *flavour* dei frutti e per l'aroma dei volatili in numerose bevande (Elmore *et al.*, 1997; Bicchi *et al.*, 1997; Servili *et al.*, 1998). Il caratteristico aroma nella frutta è determinato principalmente da una miscela complessa di aldeidi, alcool, esteri e composti solforati. Servili *et al.*, nel 1998 hanno rilevato 190 composti volatili nel succo di pomodoro mediante HS-SPME-GC-MS.

Birra

I costituenti della birra comprendono più di 800 composti e molti di questi determinano il *flavour* caratteristico contribuendo all'amarezza, alla dolcezza, all'acidità, al sapore di luppolo, di alcool e di frutta. Jelen *et al.*, nel 1998 usando una tecnica di HS-SPME hanno determinato 12 alcool e esteri presenti nella birra. Hanno

confrontato tale metodica con un tecnica di campionamento mediante iniezione diretta, entrambi i metodi hanno dato un alta ripetibilità e una buona linearità, i risultati ottenuti con i due metodi hanno mostrato un buona correlazione. Ma l'estrazione mediante HS-SPME ha mostrato una maggiore sensibilità per l'estrazione della maggior parte dei composti esaminati rispetto all'analisi effettuata mediante iniezione diretta (Jelen *et al.*, 1998).

Vino

L'aroma del vino è molto complesso in quanto risulta influenzato da diversi fattori: come l'ambiente (suolo, clima), la varietà di uva e lo stadio di maturazione, le condizioni di fermentazione, i fattori biologici (il ceppo di lievito e gli altri componenti della microflora enologica), e il processo di produzione (Bonino *et al.*, 2003). Esso è caratterizzato da diverse classi di composti chimici, come gli idrocarburi, i terpeni, gli alcool, gli esteri, le aldeidi e gli acidi che risultano caratterizzati da una vasta gamma di volatilità e di polarità. Anche se alcuni composti sono presenti in alta concentrazione (100 mg/l), la maggior parte di essi è presente in concentrazioni di ug/l o ng/l. Di conseguenza, l'estrazione e la concentrazione della maggior parte dei volatili solitamente risulta necessaria prima dell'analisi. De la Calle Garcia *et al.*, a partire dal 1996 hanno effettuato diversi studi per analizzare i composti che caratterizzano il bouquet del vino usando le due metodologie di campionamento, una mediante l'esposizione diretta della fibra al vino e l'altra mediante l'esposizione allo spazio di testa del campione. L'analisi ottenuta esponendo al fibra allo spazio di testa del campione ha generato profili più completi del bouquet del vino rispetto all'analisi ottenuta immergendo la fibra direttamente nel campione (De la Calle Garcia *et al.*, 1996; 1997). Da allora numerosi studi sono stati condotti su tale matrice per caratterizzare il bouquet aromatico dei diversi vini (De la Calle Garcia *et al.*, 1998a, b Bonino *et al.*, 2003).

Olio di oliva

L'olio di oliva è una miscela complessa costituita da due principali gruppi di sostanze: le sostanze saponificabili che rappresentano il 98% della composizione chimica dell'olio e sono caratterizzate dai trigliceridi, dagli esteri degli acidi grassi e

dagli acidi grassi liberi; e le sostanze insaponificabili che rappresentano il 2% e che sono caratterizzate da sostanze con strutture chimiche differenti, come gli steroli, i pigmenti, i fenoli, i flavonoidi e i composti volatili. Questi composti volatili sono i principali responsabili del *flavour* dell'olio. Negli ultimi anni molti studi sono stati pubblicati sull'analisi dei composti volatili dell'olio mediante l'utilizzo dell'SPME, e molti composti sono stati identificati (Bentivenga *et al.*, 2001; Flamini *et al.*, 2003, Jelen *et al.*, 2000; Vichi *et al.*, 2003, 2007).

I componenti volatili possono essere usati per controllare la qualità di un olio di oliva (Angerosa, 2002) per rilevare una possibile adulterazione dell'olio (Lorenzo *et al.*, 2002) o per determinare il possibile difetto di rancido (Morales *et al.*, 1997) o per determinare la varietà di oliva usata (Lorenzo *et al.*, 2002).

2.1.4 Confronto tra le tecniche di analisi applicate allo studio dei composti volatili dell'olio di oliva

L'aroma dell'olio di oliva è una miscela complessa che contiene aldeidi, idrocarburi alifatici e aromatici, alcool alifatici e triterpenici, chetoni, acidi, esteri che dipendono da fattori ambientali (per esempio clima e terreno), fattori agronomici, dalla varietà di oliva, dal grado di maturazione delle olive e da fattori tecnologici, come il processo di estrazione e di imbottigliamento dell'olio di oliva (Angerosa *et al.*, 1996, 2004; Aparicio, 2003).

Per questo motivo una delle pratiche più diffuse che prevede l'analisi dell'aroma e del *flavour* degli alimenti è l'analisi sensoriale effettuata mediante un panel di assaggiatori esperti. Tale metodica, ufficializzata nel caso dell'analisi degli oli vergini di oliva, secondo il regolamento CEE 2568/91, prevede l'utilizzo di un panel di assaggiatori esperti, opportunamente addestrati.

Bisogna dire che il gusto e l'olfatto dipendono più dalle caratteristiche chimiche delle diverse molecole "odorose" che dalla loro concentrazione (Pelosi, 1994; Rossiter, 1996), dunque l'analisi del Panel test, secondo il metodo C.O.I. si dimostra per alcuni aspetti positiva e per altri negativa. Gli aspetti positivi sono dati dal fatto che il Panel test è l'unico mezzo ufficialmente riconosciuto per verificare la qualità dell'olio di oliva e poterlo così classificare in una delle 4 categorie merceologiche

previste dal Regolamento CEE, inoltre è stato strutturato in modo tale da avere un giudizio quanto più oggettivo, ripetibile e riproducibile. Gli aspetti negativi sono legati alla diversa sensibilità dei giudici ad odori e sapori; ogni giudice valuta in base alla propria soglia sensoriale, alle abitudini alimentari, allo stato di salute ed alle esperienze pregresse (Solinas, 1990; Gasparoli e Fedeli, 1987). Un altro svantaggio è dato dal numero limitato di degustazioni che è possibile effettuare per ogni seduta poiché l'olfatto umano dopo l'assaggio di un certo numero di campioni si satura. Per tale analisi occorrono grandi quantità di campione e necessità di elaborazione statistica dei dati. Prima però è necessario istruire e formare un panel (Gasparoli e Fedeli 1987; Solinas, 1990), questo implica dei costi elevati per le prestazioni dei giudici e per le attrezzature da impiegare. L'analisi sensoriale, quindi nonostante venga impiegata normalmente nella valutazione sensoriale degli oli e delle altre matrici alimentari, suscita, però, ancora delle perplessità a causa dell'uso degli assaggiatori come strumenti di misura. Negli ultimi tempi, proprio a causa di queste perplessità, si stanno mettendo a punto nuovi metodi analitici per l'individuazione dei composti responsabili degli *off-flavour*, servendosi anche del confronto con le valutazioni sensoriali del *Panel* (Solinas *et al.*, 1987; Angerosa *et al.*, 1998, Guadamarra *et al.*, 2000; 2001). L'approccio analitico per la determinazione dei composti responsabili del *flavour* e degli *off-flavour* è orientato all'individuazione dei composti presenti in tracce, ad evitare la formazione di artefatti ed ottenere rapidi ed affidabili metodi per l'identificazione e la quantificazione dei composti responsabili dei differenti aromi (Angerosa, 2002). Diversi passaggi sono richiesti per la determinazione quantitativa e la conseguente identificazione dei composti volatili attraverso i metodi sviluppati:

- 1) separazione della frazione volatile,
- 2) analisi cromatografica
- 3) quantificazione ed identificazione dei picchi (Teranishi, 1988).

La separazione dei singoli componenti aromatici, in genere, è effettuata tramite gas-cromatografia ad alta risoluzione (HRGC), mentre la successiva identificazione può essere effettuata con l'utilizzo degli standard o con una gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS). Tutti i passaggi, in ogni caso sono molto importanti (Reineccius, 1988) e perciò devono essere osservati e valutati

attentamente per ottenere dati comparabili. I metodi riportati in letteratura per questo tipo di analisi possono essere divisi in due gruppi: tecniche con o senza arricchimento. Tra i metodi che prevedono uno stadio preliminare di arricchimento, i più utilizzati sono:

- ✚ lo Spazio di testa dinamico (Dynamic Head Space)
- ✚ la Micro-estrazione in fase solida (Solid-Phase Microextraction)
- ✚ il Saggio di diluizione degli isotopi stabili (SIDA)

Mentre tra quelli che non prevedono un arricchimento, i più diffusi sono:

- ✚ l'analisi dello Spazio di testa statico (SHS)
- ✚ l'iniezione diretta (DI).

Il DHS (detto anche sistema *Purge and trap*) è una tecnica di analisi molto apprezzata per la sua sensibilità, essa consiste nell'insufflare un gas inerte, di solito azoto, all'interno del campione, in questo modo si estrae la componente aromatica, che successivamente viene intrappolata in una cartuccia assorbente. Terminata questa fase la cartuccia viene riscaldata e le sostanze volatili vengono liberate, crioc concentrate ed iniettate on-line nell'HRGC o al GC-MS. Altra tecnica molto utilizzata è l'SHS. Si riempie una provetta lasciando un certo volume di spazio di testa, si riscalda il sistema, opportunamente chiuso in maniera ermetica, fino a quando non si instaura un equilibrio termo-dinamico tra la fase liquida e quella gassosa. Dopo di che si preleva un certo volume dello spazio di testa e si inietta al GC. L'iniezione diretta (DI), invece, opera tra la separazione componente aromatica e la matrice oleosa direttamente nel gas-cromatografo utilizzando una pre-colonna che "filtra" la fase più pesante iniettando quella più leggera (Sacchi, 2003).

Sulla combinazione di queste tre tecniche è basato il funzionamento della micro-estrazione in fase solida (SPME), precedentemente discussa. Il saggio di diluizione degli isotopi stabili (SIDA) è una tecnica utilizzata soprattutto per la quantificazione degli analiti, infatti prevede l'utilizzo di isotopi dei composti, che si desidera quantificare, arricchiti di deuterio. Conoscendo la quantità iniettata di isotopi per differenza si ricava la quantità iniziale dei composti vergini (Guth e Grosch, 1993).

Ovviamente tutte le tecniche, con o senza arricchimento, hanno i loro pregi e i loro difetti. Nella **Tabella 2.1.4.1** sono mostrati i principali metodi con relativi problemi e sensibilità.

Tabella 2.1.4.1: Le più comuni tecniche per la quantificazione dell'aroma dell'olio vergine di oliva e loro problematiche.

Tecniche	Sensibilità	Problematiche	Riferimento bibliografico
<i>Tecniche senza arricchimento</i>			
Iniezione diretta (DI)	bassa	Possibile degradazione dei prodotti	Mordret <i>et al.</i> , 1985 Morales e Tsimidou, 2000
Spzio di testa statico (SHS)	bassa	Concentrazioni molto basse, spesso al di sotto dei threshold di rilevabilità dello strumento	Morales e Tsimidou, 2000
<i>Tecniche con arricchimento</i>			
Spzio di testa dinamico (DHS)	alta	Temperature, volume del campione, quantità assolute del gas utilizzato per l'estrazione, caratteristiche chimico-fisiche del materiale utilizzato per la trappola e relative dimensioni	Werkhoff e Bretschneider, 1987 Snyder <i>et al.</i> , 1988 Morales <i>et al.</i> , 1994
Microestrazione in fase solida (SPME)	media	Estrazione di un più basso numero di composti rispetto al DHS. Le principali differenze riguardano i composti volatili con un più basso peso molecolare	Servili <i>et al.</i> , 1997 Kanavouras <i>et al.</i> , 2004
Saggio di diluizione degli isotopi stabili (SIDA)	alta	sintesi di un alto numero di composti volatili deuterati	Guth e Grosch, 1993

Generalmente le tecniche che non prevedono un arricchimento sono poco utilizzate. Richiedono infatti una quantità di campione considerevole, e, come nel caso dell'SHS, riusciamo ad analizzare solo composti molto volatili, mentre i composti "pesanti" restano intrappolati nel campione (Morales e Tsimidou, 2000). Tali metodi avrebbero però, il pregio di analizzare la componente aromatica dell'olio così come si presenta al nostro naso (Gasparoli *et al.*, 1986).

L'utilizzo del DHS, invece, se da un lato riesce ad analizzare composti pesanti e quelli presenti a livello di tracce, dall'altro sottopone le sostanze volatili a stress termici, dovuti a continui riscaldamenti ad alte temperature, seguiti da criocencentrazioni con azoto liquido. Tutto ciò può portare a possibili problemi di ossidazioni e di formazioni di composti di neo-formazione. Sarebbe quindi opportuno ed auspicabile trovare un buon compromesso tra le diverse tecniche e quando non è possibile, utilizzare più di una, per aver una visione completa del profilo aromatico di un olio di oliva.

In tale contesto perciò, negli ultimi anni, hanno trovato ampio impiego e utilizzo i nasi elettronici per un rapido screening dei campioni e la microestrazione in fase solida per l'analisi quali-quantitativa.

2.1.5 Conclusioni

In conclusione, la tecnica SPME è frequentemente scelta da molti analisti come un efficiente tecnica di preparazione di campioni per l'analisi GC o GC-MS o LC-MS o HPLC (Wardencki *et al.*, 2004).

Sia l'analisi qualitativa che quantitativa presentano alcuni vantaggi:

- ✚ un tempo di preparazione dei campioni molto ridotto
- ✚ l'eliminazione dei solventi organici tossici
- ✚ la possibilità di analizzare composti semi-polari e non polari in campioni gassosi, liquidi o solidi
- ✚ l'alta sensibilità verso alcune classi di composti, anche se tale sensibilità dipende dal detector usato
- ✚ la necessità di un piccolo volume di campione
- ✚ un costo relativamente basso di analisi
- ✚ la sensibilità per l'automazione
- ✚ l'utilizzo di una strumentazione semplice e possibilità di campionamento in situ

Gli svantaggi legati alla tecnica della microestrazione in fase solida riguardano il recupero relativamente basso degli analiti in alcune condizioni e la bassa precisione delle determinazioni, secondo alcuni autori, che limitano la possibilità di un'accurata analisi qualitativa e quantitativa.

2.2 Messa a punto del metodo di analisi

Al fine di valutare la sensibilità della tecnica SPME-GC/MS nello studio qualitativo del *flavour* di oli vergini di oliva è stata messa a punto una metodica di concentrazione/estrazione dei composti volatili, partendo da quella riportata da Vichi *et al.* (2003 a), mediante l'uso di una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 μm (Supelco, Bellefonte, USA). Infatti la scelta dell'appropriato rivestimento della fibra è uno step molto importante nell'ottimizzazione della procedura dell'SPME. È possibile osservare la differenza dell'assorbimento delle fibre da alcuni picchi presi in considerazione con le loro aree percentuali. Nello studio effettuato da Vichi *et al.*, (2003 a), sono state prese in considerazione le diverse fibre presenti in commercio (polydimethylsiloxane (PDMS), carboxen-polydimethylsiloxane (CAR-PDMS), polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS-DVB) e divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS) e dopo numerose prove si è giunti alla conclusione che la fibra DVB-CAR-PDMS è quella maggiormente suscettibile all'analisi dello spazio di testa della frazione volatili degli oli, sia per un'analisi qualitativa, in quanto rispetto alle altre fibre riconosceva un maggior numero di composti, sia per l'analisi quantitativa in quanto la risposta nei confronti degli standard iniettati era più lineare (Vichi *et al.*, 2003 a). Per questo motivo, prima di effettuare le sperimentazioni si è deciso di verificare quanto osservato da Vichi *et al.*, (2003), mettendo a confronto due fibre presenti in commercio, la PDMS e la DVB-CAR-PDMS, che avevano mostrato una maggiore sensibilità nei confronti degli oli. Come suggerito dall'azienda produttrice, le fibre prima del loro utilizzo sono state appropriatamente condizionate per un'ora a 180°C.

L'analisi GC/MS è stata effettuata mediante un gas-cromatografo/spettrometro di massa (GC/MS QP5050 Shimadzu, Milano, Italia); colonna utilizzata: SupelcowaxTM10 (Supelco, Bellefonte, USA) di 60 m x 0,32 mm, 0,5 μm . Le condizioni usate per l'analisi GC sono state le seguenti: gas di trasporto, elio ad una velocità di flusso di 1,4 ml/min, pressione iniziale 52 kPa; temperatura della colonna, iniziale 40°C per 4 minuti, incremento di temperatura di 3,5°C/min fino a 240°C per 3 minuti. Le condizioni per l'analisi MS sono state: sorgente ionica ad impatto

elettronico, 70 eV; temperatura interfaccia 250°C, temperatura sorgente ionica 200°C; mass range da 30 a 250 amu; velocità di scansione di 0,4 scan/s.

In **Figura 2.2.1** si riporta un esempio di cromatogramma TIC ottenuto dall'analisi di un olio extra vergine di oliva mediante l'utilizzo delle due diverse fibre.

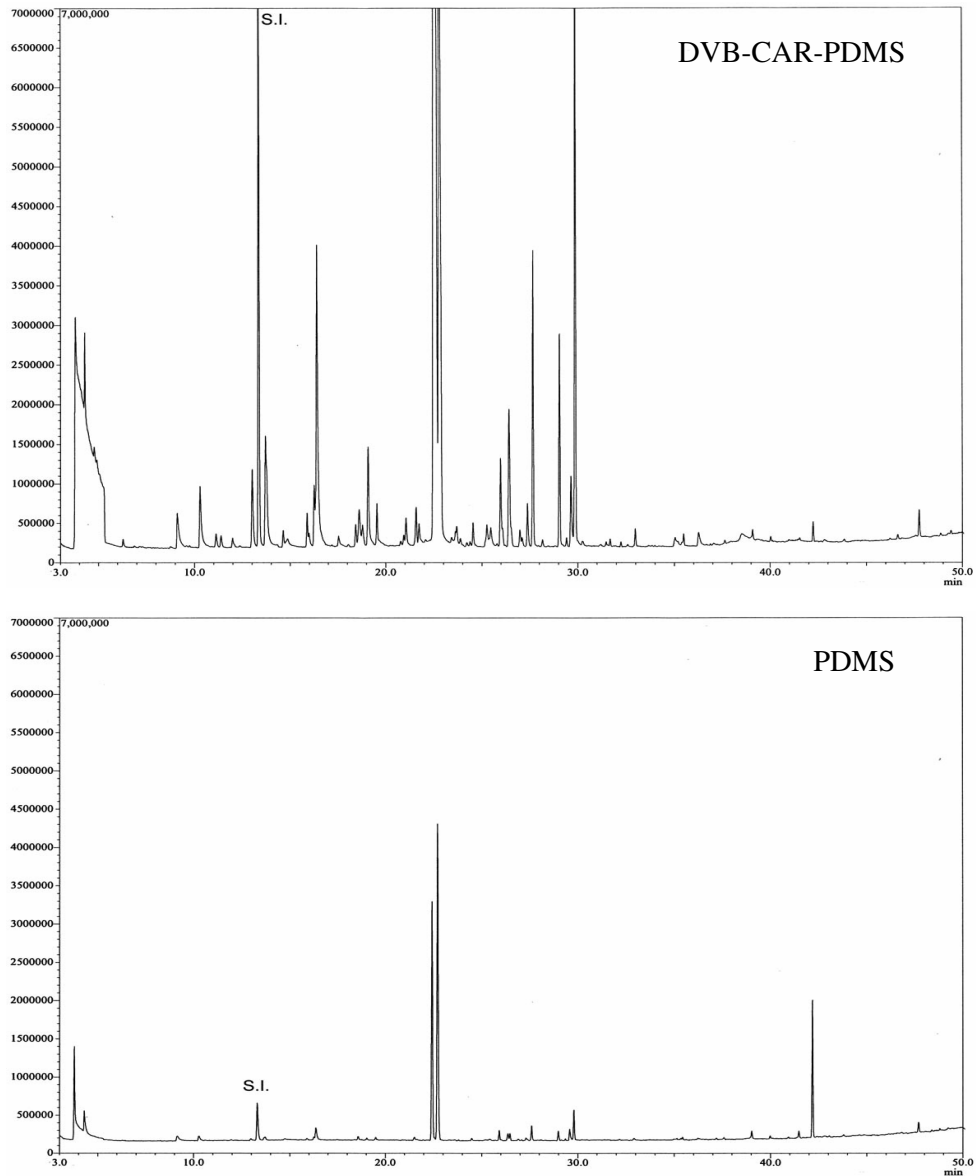


Figura 2.2.1 Esempio di cromatogramma (TIC) ottenuto dall'analisi GC/MS delle sostanze volatili di un olio extra vergine di oliva campionate via SPME mediante l'utilizzo di due fibre adsorbenti (DVB-CAR-PDMS e PDMS).

Come è possibile osservare dalla **Figura 2.2.1**, esiste una differente sensibilità tra le due fibre utilizzate nei confronti della matrice oleosa, e confermando i dati di Vichi *et al.*, (2003 a) la fibra DVB-CAR-PDMS si mostra più adatta per l'analisi dello spazio di testa degli oli.

Per ottenere le condizioni ottimali di campionamento mediante SPME è stata preparata una soluzione contenente alcuni composti standard in una soluzione di olio di oliva deodorato, in una concentrazione pari a 5000 ppm, la scala delle soluzioni alle diverse concentrazioni sono state ottenute attraverso le diluizioni della soluzione madre preparata con l'olio deodorato. Per poter determinare il tempo ottimale di esposizione della fibra allo spazio di testa del campione, la fibra è stata esposta per diversi periodi di tempo allo spazio di testa della soluzione di standard preparata. Dopo diverse prove, avendo utilizzato diverse quantità di campione, si è giunti alla conclusione di utilizzare come volume di campione una quantità pari a 3 ml di olio.

A 3 ml di olio rettificato, sono stati aggiunti 3 μ l della soluzione di standard preparata alla concentrazione di 2 ppm; essi sono stati quindi introdotti in una vial da 15 ml chiusa ermeticamente con tappo munito di setto.

Per favorire il trasferimento dei composti volatili nello spazio di testa della vial, il campione è stato posto su un agitatore termico ad una temperatura di 40°C per un tempo di 10 minuti e successivamente è stata esposta la fibra per periodi di tempo di 10, 20, 30, e 40 minuti e poi è stata inserita, per 10 minuti, nell'iniettore del GC/MS e mantenuta a 230°C (fase di desorbimento).

Si è quindi proceduto all'analisi GC/MS. Il valore medio dell'area (in triplice analisi) ottenuta per i quattro tempi è stato preso in considerazione per alcuni composti chimici appartenenti alle diverse classi chimiche (aldeidi, chetoni, alcoli) (**Figura 2.2.2**).

Il tempo di campionamento è stato quindi fissato per 30 minuti, infatti dall'osservazione della **Figura 2.2.2**. è possibile notare come la maggior parte dei composti presi in esame hanno mostrato il massimo assorbimento ad un tempo di 30 minuti, per tempi maggiori in qualche caso l'assorbimento è rimasto costante, in qualche altro caso si è verificato una saturazione dei siti presenti sulla fibra per cui il maggiore tempo di esposizione non ha mostrato un maggior assorbimento dei composti.

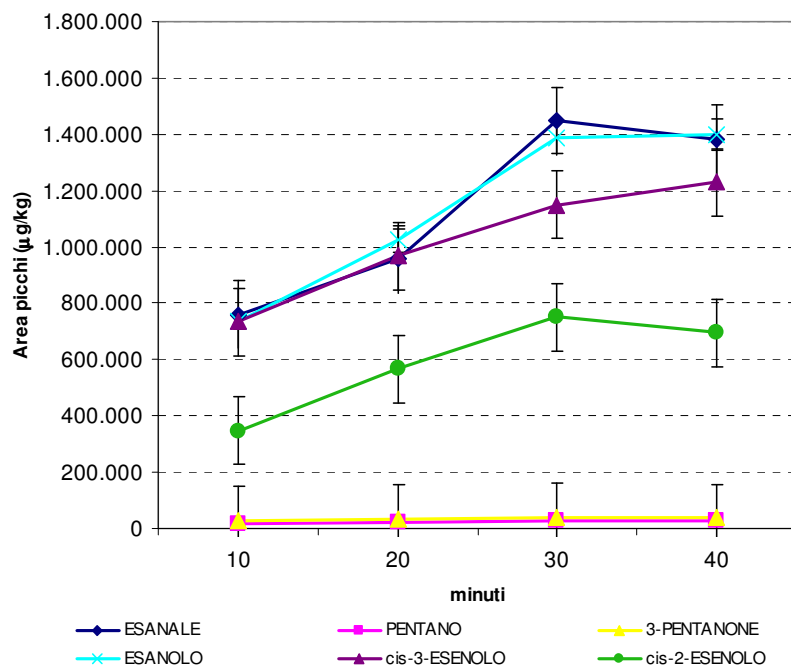


Figura 2.2.2 Valore medio dell'area ottenuta per 4 diversi tempi (10, 20, 30 e 40 minuti) dall'analisi SPME-GC/MS di composti chimici appartenenti alle diverse classi chimiche prese in esame.

Quindi dopo le diverse prove atte a definire la quantità di campione da analizzare e le diverse condizioni operative, l'analisi è stata condotta su 3 ml di campione posto in una vial da 15 ml chiusa ermeticamente con tappo munito di setto. Per favorire il trasferimento dei composti volatili nello spazio di testa della vial, il campione è stato posto su un agitatore termico ad una temperatura di 40°C per un tempo di dieci minuti. Successivamente la fibra, introdotta mediante l'apposito supporto nello spazio di testa, è stata esposta per 30 minuti mantenendo le suddette condizioni di termo-agitazione. Dopo tale periodo la fibra è stata inserita, per 10 minuti, nell'iniettore del GC/MS mantenuto a 230°C.

2.2.1 Analisi qualitativa dei composti volatili presenti negli oli di oliva

Dopo la messa a punto del metodo di analisi, la fase successiva per la determinazione del flavour degli oli mediante la microestrazione in fase solida è stata quella di identificare le principali sostanze volatili presenti nello spazio di testa dei campioni. Per questo motivo, partendo dagli studi presenti in letteratura (Angerosa *et al.*, 1997;

Morales *et al.*, 1997; Aparicio e Morales, 1998; Morales *et al.*, 2005; Vichi, 2003 b) sono stati utilizzati i seguenti composti standard per GC: pentano $\geq 99,9\%$, eptano 99% , ottano (anidro) $+99\%$, ottene 98% , tetraidrofurano $99,9\%$, butanale $\geq 99\%$, etilacetato $99,8\%$, 2-butanone $99,9\%$, 3-metil-butanale 97% , etilisobutirrato 99% , 3-pentanone 99% , pentanale 97% , 1-penten-3-one $\geq 97\%$, toluene $99,9\%$, esanale 95% , 2-metil-1-propanolo $\geq 99,9\%$, trans-2-pentanale 95% , 1-penten-3-olo 98% , 2-eptanone $\geq 99,9\%$, 1-eptanale $\geq 95\%$, 3-metil-1-butanolo $+99\%$, trans-2-esenale 98% , 1-pentanolo $\sim 99\%$, esilacetato 99% , 2-ottanone $\geq 99,5\%$, 1-ottanale 99% , cis-2-pentenolo 98% , cis-3-esenil acetato 98% , trans-2-eptenale 98% , esanolo 99% , trans-3-esen-1-olo 98% , cis-3-esen-1-olo 95% , nonanale 95% , trans-2-esen-1-olo 96% , cis-2-esenolo 95% , trans-2-ottenale $\geq 99,9\%$, decanale 99% , trans,trans-2,4-eptadienale 97% , benzaldeide $\geq 99,5\%$, trans-2-nonenale 97% , 1-ottanolo 99% , undecanale 97% , trans-2-decenale $\sim 97\%$, 1-nonanolo $\geq 99,5\%$, trans,trans-2,4-nonadienale 90% , trans,trans-2,4-decadienale 85% (SIGMA-Aldrich, Steinheim, Germania).

Le soluzioni degli standards, per un totale di 46 composti, sono state preparate in olio vegetale rettificato fresco. Come standard interno (SI) per l'analisi quantitativa è stato utilizzato l'isobutilacetato purissimo $\geq 99,8\%$, (SIGMA-Aldrich, Steinheim, Germania).

L'identificazione dei picchi, corrispondenti alle sostanze volatili presenti nello spazio di testa, è stata effettuata mediante il confronto degli spettri di massa e dei tempi di ritenzione (R.T.) delle differenti sostanze volatili con i tempi di ritenzione degli standards puri iniettati nelle stesse condizioni operative. Per gli altri composti l'identificazione è stata effettuata utilizzando le librerie (NIST 27, NIST 147, SZTERP) presenti nel software di acquisizione, con una probabilità di riconoscimento maggiore dell'85-90% ed avvalendosi dei dati presenti in letteratura (Vichi *et al.*, 2003 a, 2006). Le identificazioni che davano una probabilità più bassa della certezza non sono stati presi in considerazione. Sono stati analizzati diversi campioni di olio extravergine, in **Figura 2.2.1.1** si riporta un esempio di cromatogramma ottenuto dall'analisi di un olio della varietà *Coratina* mediante l'analisi SPME-GC/MS.

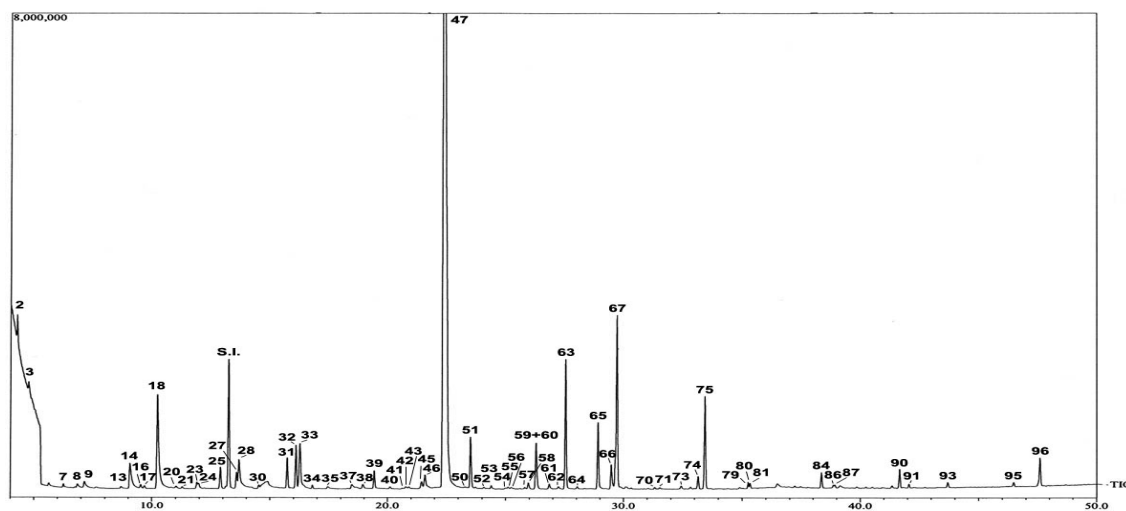


Figura 2.2.1.1 Cromatogramma della corrente ionica totale (TIC) di un olio extra vergine di oliva della varietà *Coratina* analizzati mediante SPME-GCMS. Identificazione dei picchi come in **Tabella 2.2.1.1**.

L'identificazione dei picchi cromatografici è riportata in **Tabella 2.2.1.1**. Sono stati isolati e caratterizzati 96 composti responsabili del *bouquet* aromatico di un olio extravergine di oliva di buona qualità. È stato spesso evidenziato che i principali composti volatili responsabili delle note verdi di un olio sono i composti a 5 e/o 6 atomi di carbonio derivanti da reazioni enzimatiche a catena, meglio conosciute come “cascata delle lipossigenasi” (**Figura 2.2.1.2**) (Angerosa, 2002).

In seguito alla rottura delle cellule oleifere, durante l'operazione di frangitura, si assiste al rilascio di enzimi (lipossigenasi) che vanno ad agire sugli acidi grassi liberi, principalmente acido linoleico ed acido linolenico, portando alla formazione di 9- e soprattutto 13-idroperossidi. Dal 13-idroperossido, sia dell'acido linoleico che dell'acido linolenico, si articolano una serie di reazioni a catena ad opera di enzimi endogeni dell'olivo che portano alla formazione di aldeidi, alcoli ed esteri a 6 atomi di carbonio (Angerosa, 1998).

Recenti studi hanno evidenziato un'ulteriore serie di reazioni enzimatiche che, sempre a partire dal 13-idroperossido, portano anche alla formazione di composti carbonilici ed alcolici a 5 atomi di carbonio, nonché alla formazione di alcuni penteni dimeri (Angerosa *et al.*, 1998).

Tabella 2.2.1.1. Composti volatili presenti nell'olio della varietà *Coratina* rilevati mediante analisi SPME GC/MS.

N° Picco	Tempo di ritenzione	Composto	N° Picco	Tempo di ritenzione	Composto
1	4.015	Pentano	49	22.842	Beta ocimene (cis)
2	4.287	Esano	50	23.268	1-Pentano
3	4.773	1,4 o 1,3 -pentadiene	51	23.487	Beta ocimene (trans)
4	4.891	1,4 o 1,3 -pentadiene	52	24.019	Stirene
5	4.939	Eptano	53	24.392	n-Esilacetato
6	5.068	Acetaldeide	54	25.020	2-Ottanone
7	6.270	Ottano	55	25.054	1,2,4 Trimetilbenzene
8	6.850	Acetone	56	25.193	Ottanale
9	7.140	Metilacetato	57	25.765	4,8 dimetil-1,3,7-nonatriene
10	7.247	Ottene	58	25.917	2-Pentenolo (trans)
11	7.928	Tetraidrofurano	59	26.267	2-Pentenolo (cis)
12	8.401	Butanale	60	26.294	3-Esenilacetato (cis)
13	8.691	Etilacetato	61	26.898	2-Eptanale (trans)
14	9.064	Metanolo	62	27.186	6-metil-5-epten-2-one
15	9.120	2-Butanone	63	27.578	Esanolo
16	9.526	2-Metilbutanale	64	27.993	3-Esenolo (trans)
17	9.698	3-Metilbutanale	65	28.908	3-Esenolo (cis)
18	10.246	Etanolo	66	29.485	Nonanale
19	10.662	1 Metossi-esano	67	29.702	2-Esenolo (trans)
20	11.025	1,5-esadiene, 3,4-dietil	68	30.049	2-Esenolo (cis)
21	11.286	1,5-esadiene, 3,4-dietil	69	31.044	2-Ottanale (trans)
22	11.363	Etilisobutirrato	70	31.281	3-Ottanolo
23	11.862	3-Pentanone	71	31.593	Eptanolo
24	11.944	Pentanale	72	32.030	Alfacubebene
25	12.841	1,5-ottadiene, 3-etil	73	32.505	2,4-Eptadienale
26	13.027	1-metossi-3-esene (cis)	74	33.209	Ciclosativene
27	13.586	1,5-ottadiene, 3-etil	75	33.434	Alfa copaene
28	13.626	1-Penten-3-one	76	33.517	Decanale
29	14.261	1 Propanolo	77	33.609	2-4-Eptadienale (trans,trans)
30	14.477	Toluene	78	34.203	Alchene n.i.
31	15.673	3,7-decadiene	79	34.870	Benzaldeide
32	16.045	3,7-decadiene	80	34.980	2-Nonenale (trans)
33	16.217	Esanale	81	35.386	Ottanolo
34	16.469	2 Metil propanolo	82	36.749	Alfabergamontene
35	17.395	2-Pentanale (cis)	83	37.340	Undecanale
36	17.889	Isoamilacetato	84	38.360	Metilbenzoato
37	18.441	2-Pentanale (trans)	85	38.823	Beta farnesene
38	18.898	Xilene (meta o para)	86	38.827	2-Decenale (trans)
39	19.388	3-Pentenolo	87	38.896	Nonanolo
40	20.112	3-metil-2-butenolo	88	40.940	2-4-Nonadienale (trans,trans)
41	20.595	2-Eptanone	89	41.391	Terpene n.i.
42	20.749	Eptanale	90	41.720	Alfa murolene
43	20.913	Xilene (orto o para)	91	42.113	Alfa farnesene
44	21.310	Limonene	92	43.107	Beta sesquifellandrene
45	21.416	3-Metilbutanolo	93	43.651	Metilsalicilato
46	21.569	3-Esenale (cis)	94	44.470	2-4-decadienale (trans,trans)
47	22.379	2-Esenale (trans)	95	46.439	Benzil alcol
48	22.548	Alchene	96	47.645	2-Feniletanolo

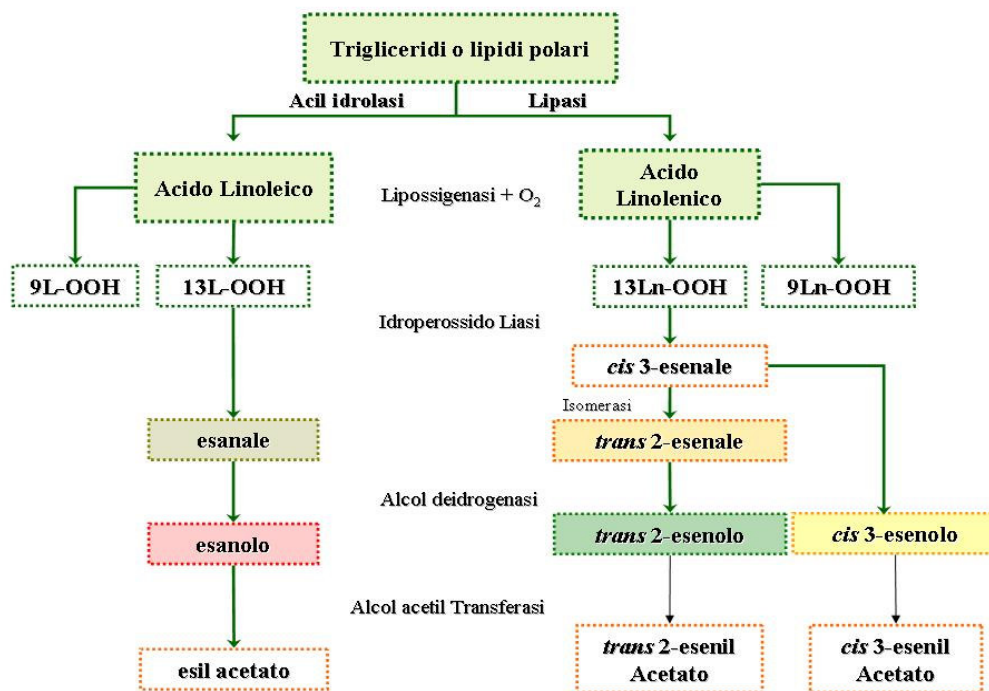


Figura 2.2.1.2. Cascata delle lipossigenasi.

L'attività degli enzimi coinvolti nella reazione a catena viene influenzata sia da fattori genetici sia da fattori ambientali. Tale influenza si manifesta con un diverso profilo quali-quantitativo della frazione volatile.

Tramite l'analisi HS-SPME/GCMS della frazione volatile sono stati identificati nei campioni di olio alcuni idrocarburi monoterpenici e sesquiterpenici. Sebbene presenti in minime quantità nell'olio extravergine di oliva, essi mostrano un'alta differenziazione dipendente dalla varietà e dall'area geografica di produzione. Mentre gli altri composti volatili normalmente presenti negli oli di oliva sono grandemente influenzati da fattori tecnologici, la presenza di idrocarburi terpenici è determinata essenzialmente dalla varietà e dalle condizioni di coltivazione dell'olivo. La loro presenza, infatti, viene influenzata sia dalle condizioni ambientali in cui cresce la pianta sia dalla varietà (Zunin *et al.*, 2005). La presenza di α -copaene ed α -murolene conferma quanto riportato in letteratura da Zunin *et al.* (2005), i quali affermarono che tali composti terpenici siano "tipici" di oli prodotti nella macrozona Italia.

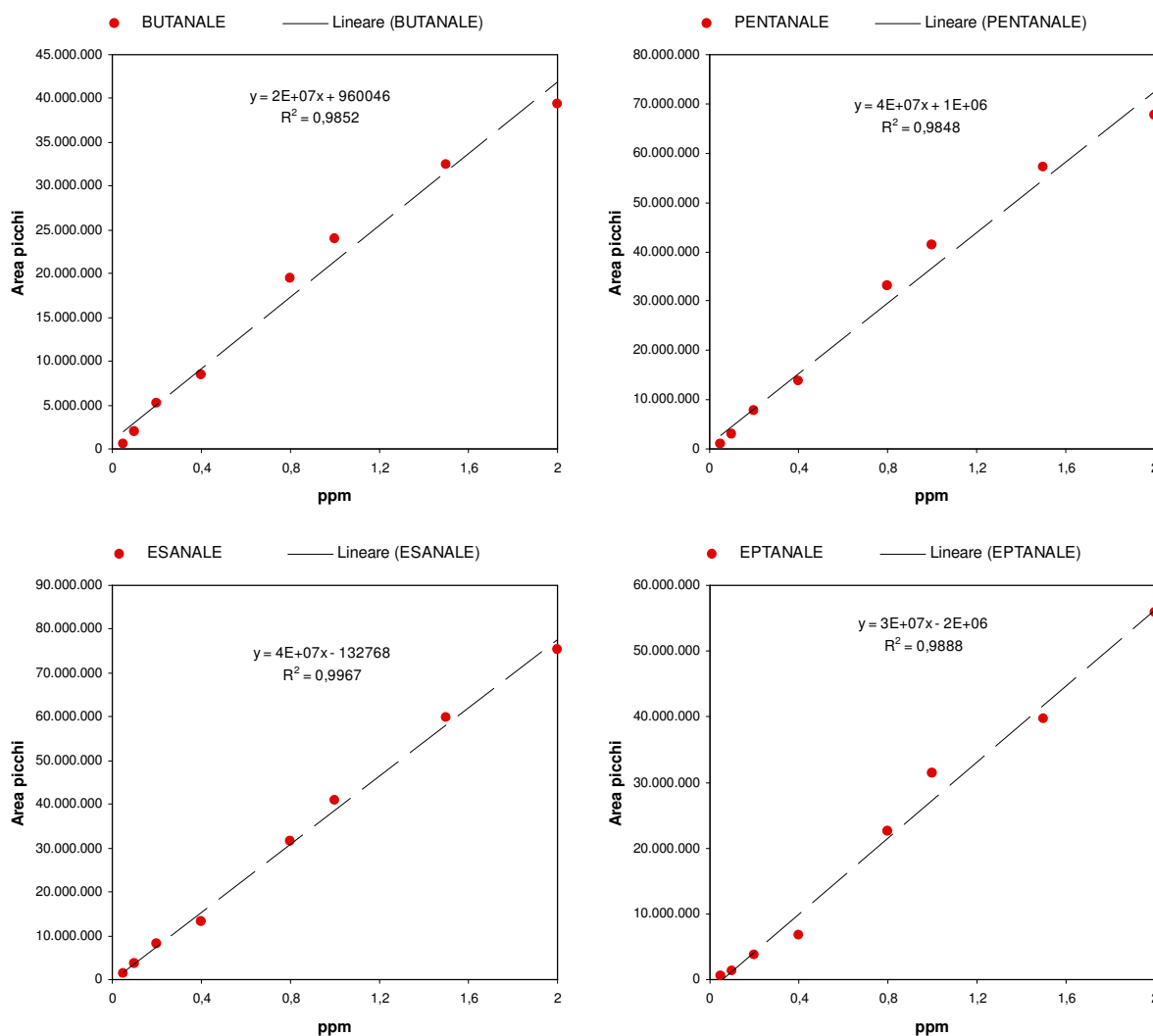
Per la determinazione dei monoterpeni e sesquiterpeni negli oli di oliva si usano

tradizionalmente delle metodiche laboriose che prevedono delle estrazioni preparative differenziate che richiedono grandi impieghi di solventi e di tempo. Di recente diversi autori hanno tentato, con successo, di applicare la metodica SPME, più rapida e senza impiego di solventi, alla determinazione simultanea dei monoterpeni e sesquiterpeni negli oli di oliva; ciò fa auspicare un loro più sistematico utilizzo nella caratterizzazione degli oli di oliva (Vichi *et al.*, 2006).

2.2.2. Analisi quantitativa dei principali composti volatili presenti negli oli di oliva

Nelle condizioni precedentemente descritte sono state analizzate le miscele di standards con concentrazioni che variano in un range tra 0,05-2 ppm (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 1,5; 2), i fattori assoluti di risposta dei composti standard sono stati calcolati come le pendenze delle regressioni lineari dell'area totale del picco in funzione della concentrazione.

In **Figura 2.2.2.1** si riportano i grafici delle aldeidi semplici analizzate e si riportano i valori delle aree rilevate in funzione delle diverse concentrazioni prese in esame.



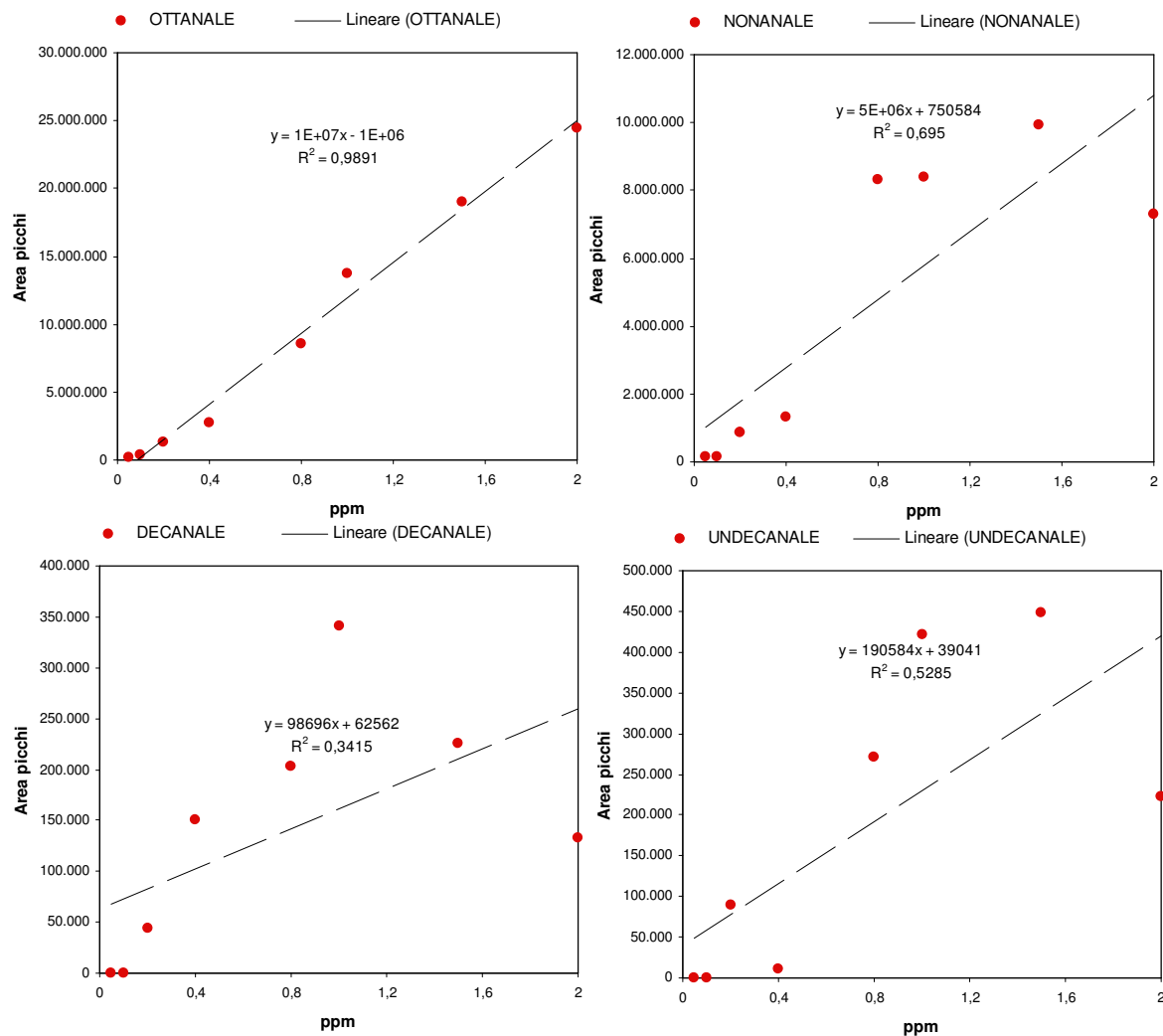
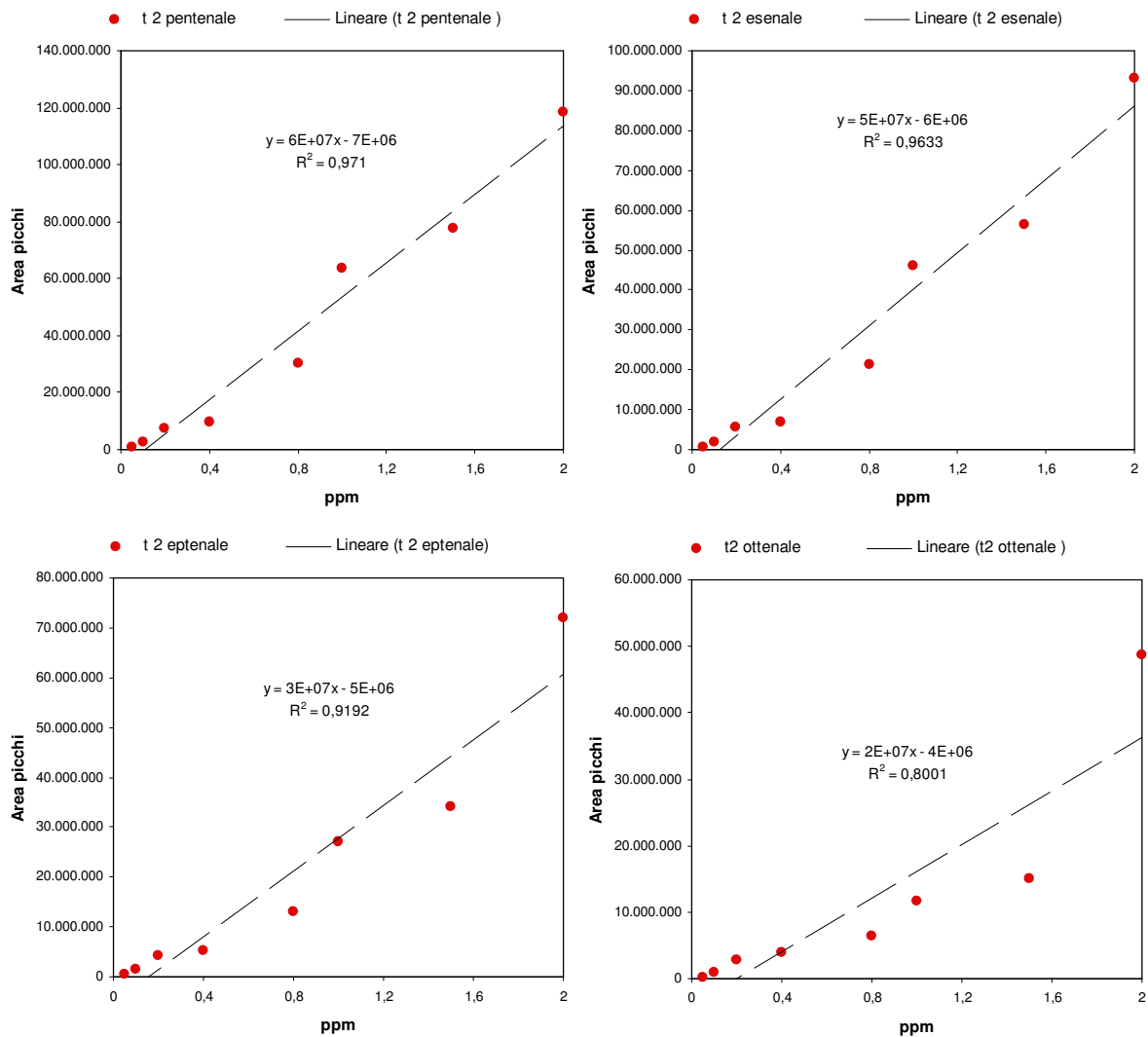


Figura 2.2.2.1 Rette di taratura ottenute per le aldeidi semplici analizzate mediante SPME-GC/MS (butanale, pentanale, esanale, eptanale, ottanale, nonanale, decanale, undecanale).

Come è possibile osservare dalla **Figura 2.2.2.1** la fibra ha mostrato una risposta lineare nei confronti delle aldeidi semplici, in tutto il range di concentrazioni preso in esame, in particolare fino alle aldeidi con otto atomi di carbonio, nei confronti della nonanale, decanale e della undecanale la fibra invece non ha mostrato un andamento lineare in tutto il range di concentrazione considerato, infatti per tali composti all'aumentare della concentrazione della soluzione non sempre si è verificato un aumento dell'area del composto adsorbito dalla fibra.

Quindi per calcolare il fattore di risposta relativo per tali composti abbiamo deciso di considerare un range di valori più ristretto nel quale si è verificata la condizione di linearità (**Tabella 2.2.2.1**).

Un'analogia situazione si è verificata nel caso delle aldeidi complesse, infatti anche in questo caso la fibra ha mostrato una risposta lineare nei confronti delle aldeidi complesse in tutto il range di linearità, fino a quelle con otto di carbonio e nei confronti della 2-4 eptadienale, invece nei confronti della 2-4 nonadienale, della 2-4 decadienale, della *trans* 2-nonenale e della *trans* 2-decenale la fibra invece non ha mostrato un andamento lineare in tutto il range di concentrazione considerato, infatti, anche in questo caso per tali composti all'aumentare della concentrazione della soluzione non sempre si è verificato un aumento dell'area del composto rilevato dalla fibra. Tale condizione è possibile osservarla in **Figura 2.2.2.2** dove si riportano i grafici delle aldeidi complesse analizzate.



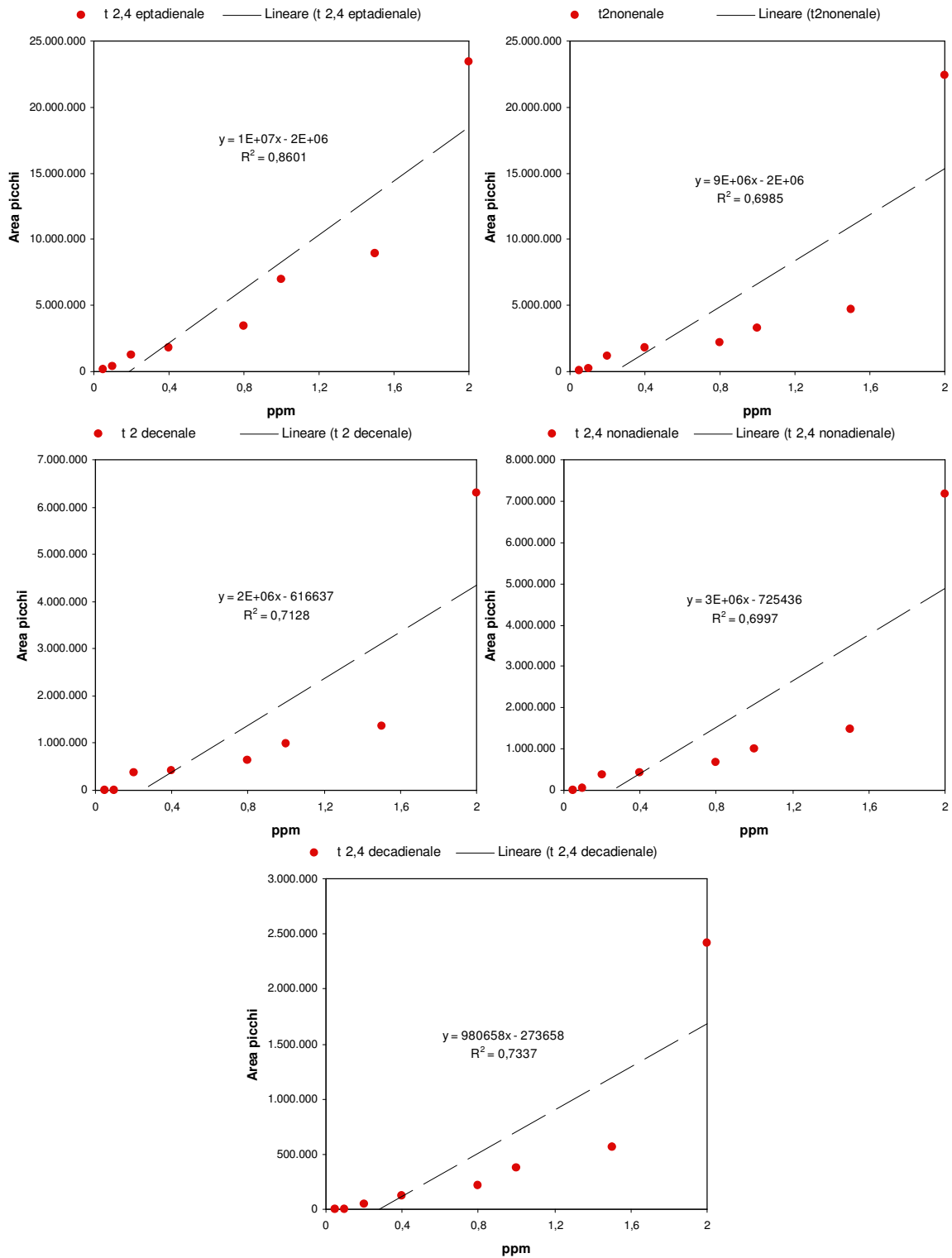
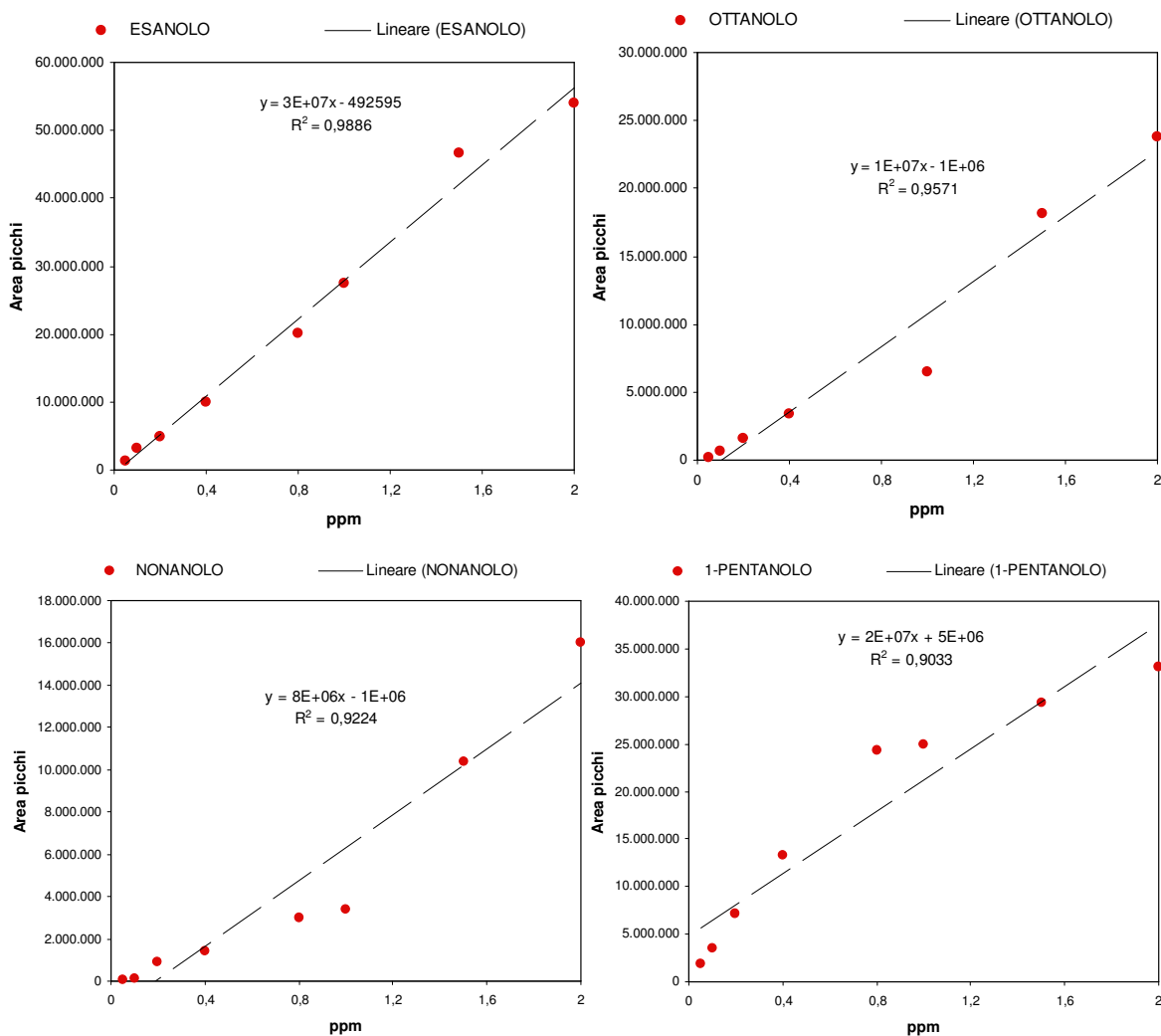


Figura 2.2.2.2 Rette di taratura ottenute per le aldeidi complesse analizzate mediante SPME-GC/MS (*trans*-2-pentenale, *trans*-2-esenale, *trans*-2-eptenale, *trans*-2-ottenale, *trans*-2-nonenale, *trans*-2-decenale, *trans, trans* 2-4 eptadienale, *trans, trans* 2-4 nonadienale, *trans, trans* 2-4 decadienale).

Sicuramente da tali risultati è possibile dedurre la fibra non mostra una risposta lineare nei confronti delle aldeide, semplici o complesse, con un numero di atomi di carbonio superiore a otto, in quanto tali composti sono caratterizzati da una minore volatilità e non sempre si riesce a strapparli dalla matrice oleosa e distribuirli nello spazio di testa in maniera uniforme.

Nei confronti degli alcoli analizzati la fibra ha mostrato una buona linearità per tutti i composti presi in esame in tutto il range considerato. In **Figura 2.2.2.3** si riportano i grafici degli alcoli analizzati e si riportano i valori delle aree rilevate in funzione delle diverse concentrazioni prese in esame.



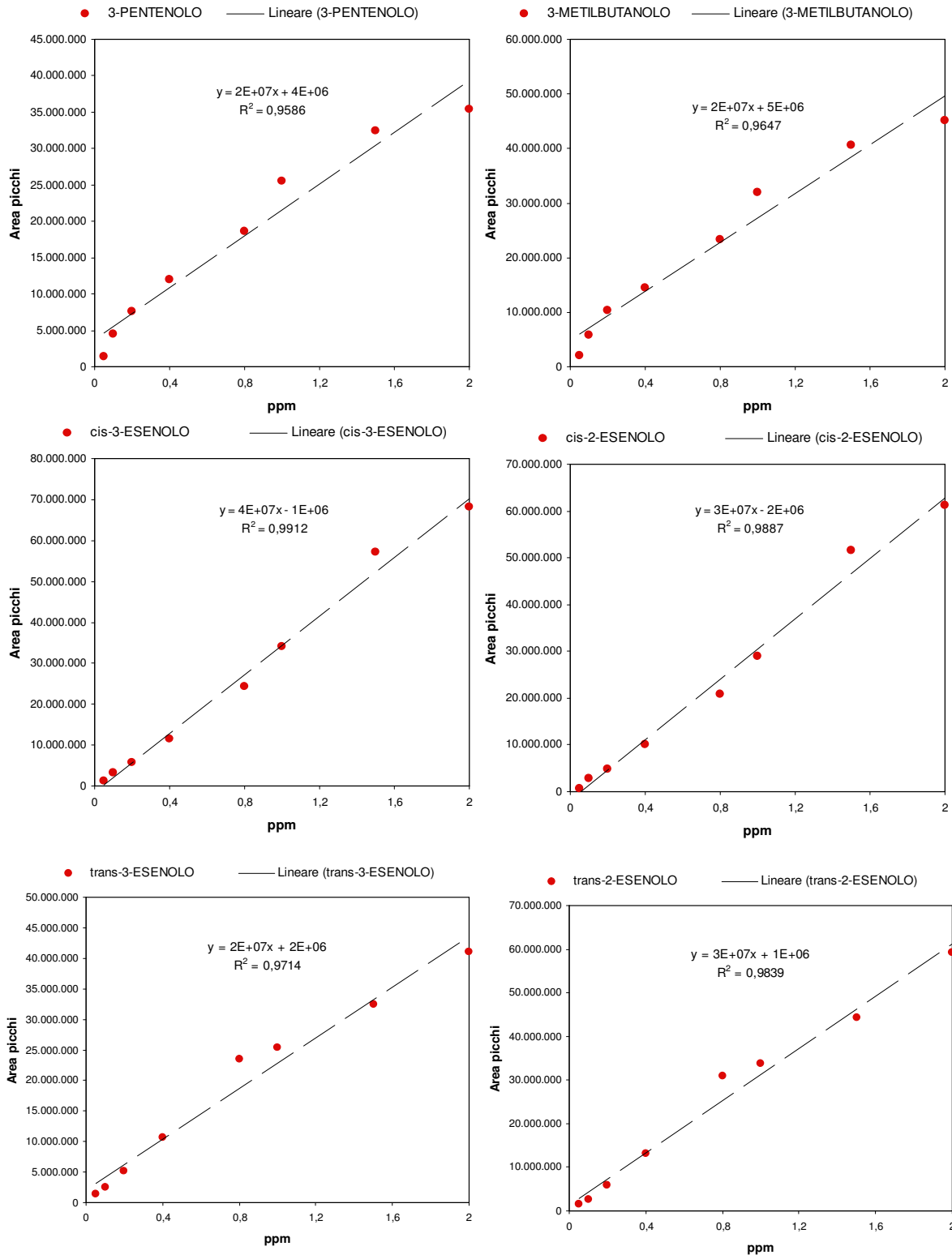


Figura 2.2.2.3 Rette di taratura ottenute per gli alcoli analizzati mediante SPME-GC/MS (esano, ottano, nonano, 1-pentano, 3-penteno, 3-metilbutano, *cis*-3-eseno, *cis*-2-eseno, *trans*-3-eseno, *trans*-2-eseno).

Anche nei confronti dei chetoni analizzati la fibra ha mostrato una buona linearità per tutti i composti presi in esame in tutto il range considerato. In **Figura 2.2.2.4** si riportano i grafici degli alcoli analizzati e si riportano i valori delle aree rilevate in funzione delle diverse concentrazioni prese in esame

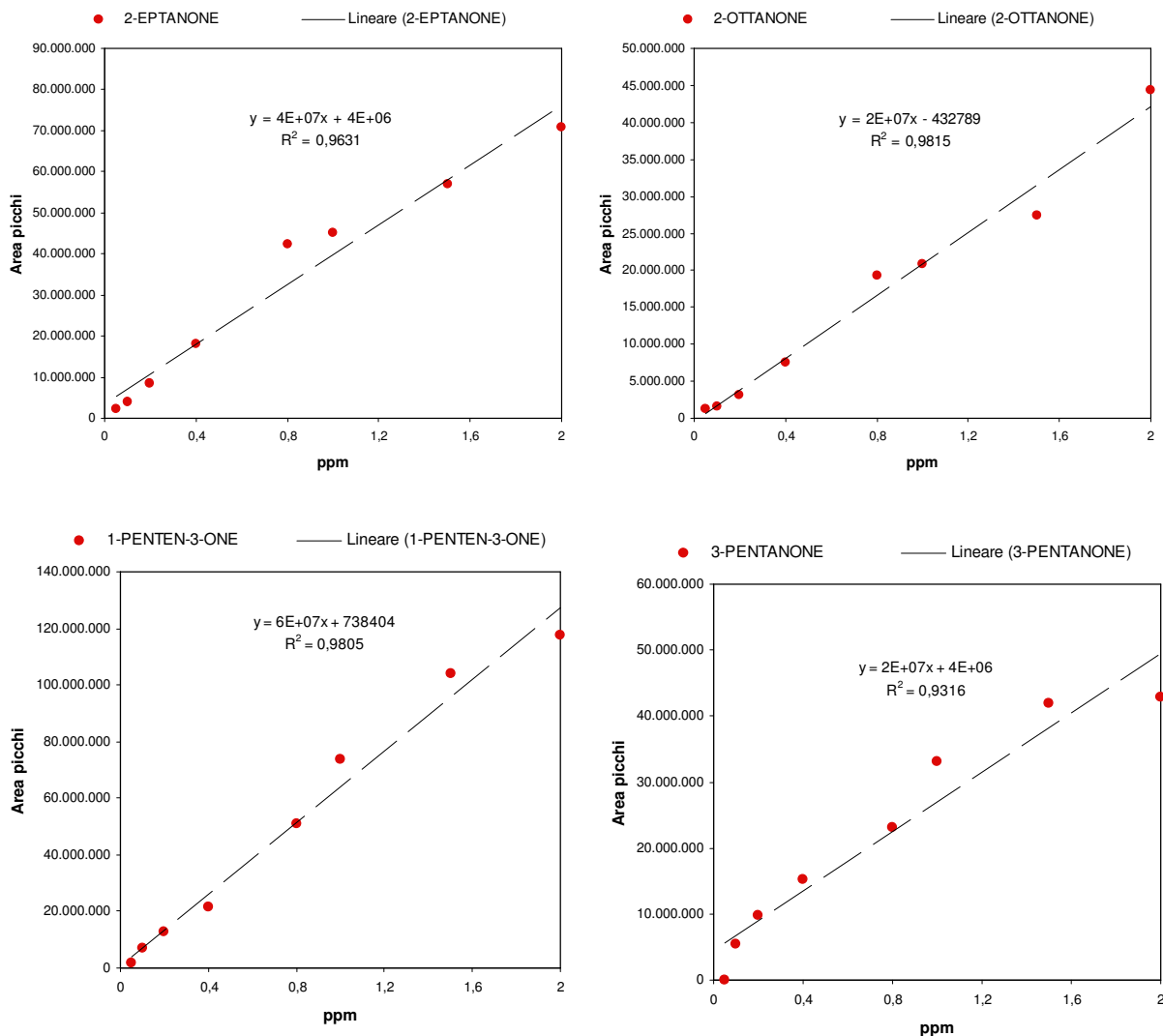


Figura 2.2.2.4 Rette di taratura ottenute per i chetoni analizzati mediante SPME-GC/MS (2-eptanone, 2-ottanone, 1-penten-3-one, 3-pentanone).

In **Tabella 2.2.2.1** si riportano i valori del fattore di risposta dei composti standard analizzati, il valore dell' R^2 calcolato sia in condizioni normali, ovvero considerando tutti i punti delle diluizioni considerati, sia nel tratto di linearità dei composti, e il relativo tratto di linearità considerato.

Tabella 2.2.2.1 Valori del fattore di risposta dei composti standard analizzati, valore dell' R^2 calcolato sia in condizioni normali, ovvero considerando tutti i punti delle diluizioni considerati, sia nel tratto di linearità dei composti (R^{2*}), e il relativo range di linearità considerato.

Composti	R^2	R^{2*}	Range di linearità (ppm)	R.F.
Butanale	0,99	0,99	0-2	20.000.000
Pentanale	0,98	0,98	0-2	40.000.000
Esanale	1,00	1,00	0-2	40.000.000
Eptanale	0,99	0,99	0-2	30.000.000
Ottanale	0,99	0,99	0-2	10.000.000
Nonanale	0,70	0,94	0-1,5	8.000.000
Decanale	0,34	0,98	0-1	346.986
Undecanale	0,52	0,93	0-1	418.239
trans-2-Pentanale	0,97	0,97	0-2	60.000.000
trans-2-Esenale	0,96	0,96	0-2	50.000.000
trans-2-Eptenale	0,92	0,95	0-1,5	20.000.000
trans-2-Ottenale	0,80	0,97	0-1,5	10.000.000
t, t, 2-4 Eptadienale	0,86	0,96	0-1,5	6.000.000
trans-2-Nonenale	0,70	0,96	0-1,5	3.000.000
trans-2-Decenale	0,71	0,96	0-1,5	907.991
t, t, 2-4 Nonadienale	0,70	0,97	0-1,5	967.890
t,t, 2-4 Decadienale	0,73	0,98	0-1,5	389.575
3-Metilbutanolo	0,96	0,96	0-2	20.000.000
1-Pentanolo	0,90	0,98	0-1	30.000.000
3-Pentenolo	0,96	0,98	0-1,5	20.000.000
cis-2 -Pentenolo	0,96	0,96	0-2	30.000.000
Esanolo	0,99	0,99	0-2	30.000.000
cis-3-Esenolo	0,99	0,99	0-2	40.000.000
cis-2-Esenolo	0,99	0,99	0-2	30.000.000
trans-3-Esenolo	0,98	0,98	0-2	20.000.000
trans-2-Esenolo	0,98	0,98	0-2	30.000.000
Ottanolo	0,94	0,98	0-1	7.000.000
Nonanolo	0,92	0,99	0-1	4.000.000
2-Butanone	0,88	0,94	0-1	20.000.000
2-Eptanone	0,96	0,96	0-2	40.000.000
2-Ottanone	0,98	0,98	0-2	20.000.000
3-Pentanone	0,93	0,98	0-1,5	30.000.000
1-Penten-3-one	0,98	0,99	0-1,5	70.000.000
3-Metilbutanale	0,97	0,97	0-2	10.000.000
n-Esilacetato	0,98	0,98	0-2	40.000.000
cis-3-Esenilacetato	0,97	0,97	0-2	40.000.000
Benzaldeide	0,98	0,98	0-2	20.000.000
Pentano	0,95	0,97	0-1,5	3.000.000
Eptano	0,84	0,91	0-1,5	20.000.000
Ottano	0,75	0,94	0-1	30.000.000
Ottene	0,78	0,95	0-1	40.000.000
Tetraidrofurano	0,94	0,98	0-1	60.000.000
Etilisobutirrato	0,83	0,94	0-1	20.000.000
Isobutilacetato	0,84	0,95	0-1	30.000.000

I fattori di risposta relativi sono stati ottenuti come il rapporto tra il fattore di risposta assoluto di ogni composto standard e quello dello standard interno calcolato alla concentrazione presente nei campioni di olio.

Per questo motivo i fattori di risposta assoluti per i composti che non hanno mostrato una buona linearità sono stati calcolati in un range più ristretto, come suggerito nel lavoro di Vichi *et al.*, (2003 a).

Tali risultati sperimentali verranno discussi nel capitolo successivo ottenuti dall'analisi SPME-GC/MS effettuata su oli extravergini di oliva provenienti dalla Penisola Sorrentina. L'analisi delle sostanze volatili effettuata mediante la tecnica della microestrazione in fase solida ha avuto l'obiettivo di valutare il contributo di tale metodica nel discriminare sia diversi aromi che caratterizzano gli oli extravergini che i principali difetti (*off-flavour*), ed in particolare la rancidità.

2.3 BIBLIOGRAFIA

Andres A.I., Cava R., Ruiz J. (2002). Monitoring volatile compounds during dry-cured ham ripening by solid-phase microextraction coupled to a new direct-extraction device. *Journal of Chromatography A*, 963: 83-88.

Angerosa F. (1998). La qualità organolettica degli oli vergini di oliva. *Frutticoltura* 7/8, 47-50.

Angerosa F. (2002). Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *Eur. J. Lipid sci. Technol.* 104: 639-660.

Angerosa F., Camera L., d'Alessandro N. (1997). Quantitation of some flavour components responsible of the "green" attributes in virgin olive oils. *J. High Resol. Chromatography*, 20: 648-653.

Angerosa F., Camera L., d'Alessandro N., Mellerio G. (1998). Characterization of seven new hydrocarbon compounds present in the aroma of virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 648-653.

Angerosa F., Lanza B., Marsilio V. (1996). Biogenesis of "fusty" defect in virgin olive oils. *Grasas Aceites*. 47:142-150.

Angerosa F., Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposto S., Montedoro G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: Occurrence and their relationship with the quality. *J Chromatogr A*, 1054: 17-31.

Aparicio R. (2003). Olive oil characterization. In: *Handbook of Olive Oil*. Eds. R. Aparicio, J. Harwood, Mundi-Prensa, Madrid (Spain), pp. 281-335.

Aparicio R., Morales M.T. (1998). Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem*, 46: 1116-1122.

Arthur C.L., Pawliszyn J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* 62: 2145-2148.

Beltran J., Lòpez, F.J., Hernandez F. (2000). Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 885:389-394.

Bentivenga G., D'Auria M., De Luca E., De Bona A., Mauriello G. (2001). The use of SPME-GC-MS in the analysis of flavor of virgin olive oil. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 78:157-162.

Bicchi C.P., Panero O.M., Pellegrino G.M., Vanni A.C. (1997). Characterization of Roasted Coffee and Coffee Beverages by Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography and Principal Component Analysis. *J. Agric. Food Chem*, 45: 4680-4686.

Bicchi C., Drigo S., Rubiolo P. (2000). Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction gas-chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 892: 469-485.

Bonino M., Scellino R., Rizzi C., Aigotti R., Delfinia C., Baiocchie C. (2003). Aroma compounds of an Italian wine (Ruche) by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS. *Food Chemistry* 80: 125-133.

Brunton N.P., Cronin D.A., Monahan F.J., Durcan R. (2000). A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chemistry*, 68: 339-345.

Campo M., Nute G. R., Wood J.D., Elmore S. J., Mottram D. S., Enser M. (2003). Modelling the effect of fatty acids in odour development of cooked meat in vitro: part I, sensory perception *Meat Science*, 63, Issue 3: 367-375.

Chin H.W., Bernhard R.A., Rosenberg M. (1996). Solid phase microextraction for cheese volatile compound analysis. *Journal of Food Science*, 61: 1118-1128.

De La Calle Garcia D.; Reichenbaecher M.; Danzer K.; Hurlbeck C.; Bartsch C. and Feller K.H. (1997) Investigations on wine bouquet components by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography (SPME-CG) using different fibers. *J. High Resolut. Chromatogr*, 20: 665-668.

De la Calle Garcia D.; Reichenbaecher M.; Danzer K.; Hurlbeck C.; Bartsch C. and Feller K.H. (1998). Use of solid phase microextraction capillary gas chromatography (SPME-GC) for the varietal characterization of wines by means of chemometrical methods. *Fresenius J. Anal. Chem*, 360: 784-787.

De la Calle Garcia D.; Reichenbaecher M.; Danzer K.; Hurlbeck C.; Bartsch C. and Feller K-H. (1998). Analysis of wine bouquet components using headspace solid-phase microextraction-capillary gas chromatography *J. High Resolut. Chromatogr*, 21: 373-377.

Elmore S., Erbahadir M. A., Donald S., Mottram J. (1997). Comparison of Dynamic Headspace Concentration on Tenax with Solid Phase Microextraction for the Analysis of Aroma Volatiles. *J. Agric. Food Chem*, 45: 2638-2641.

Elmore J.S., Mottram D.S., Hierro E. (2001). Two-fibre solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile aroma compounds in cooked pork *Journal of Chromatography A*: 233-240.

Evans T.J., Butzke C.E., Ebeler S.E. (1997). Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 786: 293-298.

Ferrira V., Sharman M., Cacho J.F., Dennis J. (1996). New and efficient microextraction, solid-phase extraction method for the gas chromatographic analysis of wine volatiles. *Journal of Chromatography A*, 731: 247–259.

Fidalgo-Used N., Centineo G., Blanco-Gonzalez E., Sanz-Mendel A. (2003). Solid-phase microextraction for organochlorine pesticides determination in fish tissue by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Chromatography A*, 1017: 35–44.

Flamini G., Cioni P. L., Morelli I. (2003). Volatiles from leaves, fruits, and virgin oil from *Olea europaea* Cv. Olivastra Seggianese from Italy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1382-1386.

Galipo A.R.C., Canhoto A.J., Walla M.D., Morgan S.L. (1999). Analysis of volatile fragrance and flavour compounds by headspace solid phase microextraction and GC–MS. *Journal of Chemical Education*, 76: 245–248.

Gasparoli A. e Fedeli E. (1987). Valutazione dei componenti volatili negli oli alimentari: un approccio alla tecnica “Purge and Trap”. *Riv. It. Sost. Grasse*. 64: 453-460.

Gasparoli A., Fedeli E., Manganiello B. (1986). Olio di oliva vergine: valutazione dei caratteri organolettici attraverso tecniche strumentali. *Riv. It. Sost. Grasse*. 63: 571-582.

Grimaldi R., de Paz F., Rivara L., de Piane L. (1999). Arricchimento dei solventi aromatici presenti in oli vergine di oliva e successivo strippaggio e dosaggio mediante l'utilizzo di tecnica GC–MS. *Bolletino dei Chimici Igienisti*, 50: 115–119

Guadamarra A., Rodriguez-Méndez M. L., Sanz C., Ríos J. L., de Saja J. A. (2001). Electronic nose based on conducting polymers for the quality control of the olive oil aroma discrimination of quality, variety of olive and geographic origin. *Analytica Chimica Acta* 432: 283-292.

Guadamarra A., Rodriguez-Mendez M.L., de Saja J.A., Ríos J.L., Ollas J.M. (2000). Array of sensors based on conducting polymers for the quality control of the aroma of the virgin olive oil. *Sensors and actuators B* 69: 276-282.

Guth H., Grosch W. (1993). Quantitation of a potent odorans of virgin olive oil by stable isotope dilution assay. *J.A.O.C.S.* 70: 513-518.

Jelen H:H., Wlazły K., Sowicz E.W., Kaminski E. (1998). Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Some Alcohols and Esters in Beer: Comparison with Static Headspace Method. *J. Agric. Food Chem*, 46: 1469-1473.

Jelen H. H., Obuchowska M., Zawirska-Wojtasiak R., Wasowicz E. (2000). Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2360-2367.

Jimenez J.J., Bernal J.L., del Nozal M.J., Martin M.T., Mayorga, A.L. (1998). Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 829: 269–277.

Kataoka H., Lord H. L., Pawliszyn J. (2000). Application of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chrom. A*, 880: 35-62.

Lorenzo I. M., Pavon J. L. P., Laespada M. E. F., Pinto C. G., Cordero B. M. (2002 a). Detection of adulterants in olive oil by headspace-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 945: 221-230.

Lorenzo I. M., Pavon J. L. P., Laespada M. E. F., Pinto C. G., Cordero B. M., Henriques L. R., Peres M. F., Simoes, M. P., Lopes P. S. (2002 b). Application of headspace-mass spectrometry for differentiating sources of olive oil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374: 1205-1211.

Mestres M., Marti M.P., Busto O., Gausch, J. (2000). Analysis of low-volatility organic sulphur compounds microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881: 583–590.

Morales M. T., Tsimidou M. (2000). The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality. In: Handbook of olive oil. Analysis and properties. Eds. J. Harwood, R. Aparicio, Aspen publication, Gaithersburg, MD (USA) pp. 393-458.

Morales M.T., Luna G., Aparicio R. 2005. Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chem.* 91: 293-301.

Morales M.T., Rios J.J., Aparicio R. 1997. Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2666-2673.

Nielsen J.H., Sorensen B., Skibsted L.H., Bertelsen G. (1997). Oxidation in pre-cooked minced pork as influenced by chill storage of raw muscle. *Meat Science* 46: 191-197.

Pawliszyn J. (1997). Solid Phase Microextraction. Theory and Practice. 25–55. New York: John Wiley & Sons.

Pelosi P. (1994). Odorant-binding proteins. *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 199-228.

Reineccius G. A. (1988). Isolation of food flavors. In: *Flavor chemistry of lipid food*. Eds. D.B. Min, T.H.Smouse, AOCS Press champaign pp. 26-34.

Rocha S., Ramalheira V., Barros A., Delgadillo I., Coimbra M.A. (2001). Headspace solid phase microextraction (SPME) analysis of flavor compounds in wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 5142–5151.

Rossiter K. (1996). Structure-activity Relationships. *Chemical Reviews*, 8: 3201-3240.

Ruiz J., Cava R., Ventanas J., Jensen M.T. (1998). Headspace Solid Phase Microextraction for the Analysis of Volatiles in a Meat Product: Dry-Cured Iberian Ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4688-4694.

Sacchi R. (2003). Appunti e lucidi dalle lezioni di industrie agrarie (tecnologia degli oli, grassi e derivati) Laboratorio di ricerca sugli oli e grassi. Dipartimento di scienza degli alimenti . Università di Napoli Federico II.

Sen N.P., Seaman S. W., Page B.D. (1997). Rapid semi-quantitative estimation of N-nitrosodibutylamine and N-nitrosodibenzylamine in smoked hams by solid-phase microextraction followed by gas chromatography-thermal energy analysis. *Journal of Chromatography A*, 788: 131-140.

Servili M., Selvaggini R., Begliomini A.L., Montedoro G.F. (1998). Effect of Thermal Treatment in the Headspace Volatile Compounds of Tomato Juice. *Dev. Food Science*, 40:315-330.

Sides A., Robards K., Helliwell S. (2000). Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. *Trends in Analytical Chemistry*. 19: 322–330.

Smith R. M. (2003). Before the injection modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1000: 3–27.

Snow N.H., Slack G.C. (2002). Headspace analysis in modern gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. 21: 608–617.

Solinas M. (1990). La qualità dell'olio di oliva e i fattori che la influenzano. In: Problematiche qualitative dell'olio di oliva, Sassari, 6 novembre, 23-56.

Solinas M., Angerosa F., Cucurachi A. (1987). Connessione tra prodotti di neoformazione ossidativi delle sostanze grasse e insorgenza del difetto di rancidità all'esame organolettico. Nota 2. Determinazione quantitativa. *La rivista delle Sostanze Grasse*. 64: 137- 145.

Soncin S., Chiesa L.M., Cantoni C., Biondi P.A. (2007). Preliminary study of the volatile fraction in the raw meat of pork, duck and goose. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 436-439.

Steffen A., Pawliszyn J. (1996). Analysis of Flavor Volatiles Using Headspace Solid-Phase Microextraction *J. Agric. Food Chem.*, 44: 2187-2193.

Supelco Bulletin 923 (1998). Solid phase microextraction: theory and optimization of conditions. (available from: <http://www.sigmaaldrich.com>).

Supelco Note 56 (1998). Fast analysis of volatile organic compounds by solid phase microextraction/capillary GC. Supelco Note 56. (available from: <http://www.sigmaaldrich.com>).

Teranishi R. (1988). Development of methodology for flavor chemistry past, present and future. *Flavor chemistry of lipid food*. D.B. Min, T. H. Smouse, AOCS Press, champaign pp. 13-25

Vichi S., Castellote A. I., Pizzale L., Conte L. S., Buxaderas S., Lòpez-Tamames E. (2003 a). Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase MicroExtraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 983:19-33.

Vichi S., Pizzale L., Conte L.S., Buxaderas S., Lopez-Tamames E. (2003 b). Solid-Phase Microextraction in the Analysis of Virgin Olive Oil Volatile Fraction: Modifications Induced by Oxidation and Suitable Markers of Oxidative Status *J. Agric. Food Chem.*, 51: 6564-6571.

Vichi S., Guadayol J.M., Caixach J., Lòpez-Tamames E., Buxaderas S. (2006). Monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons of virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1125:117-123.

Wan, P.I. (1995). Alternative hydrocarbon solvents for cottonseed extraction. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 72: 653–659.

Wardencki W., Michulec M., Curalo J. (2004). A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *Inter. J. Food Sci. Technol.* 39: 703-717.

Wardencki W., Orlita J., Namiesnik J. (2001) Comparison of extraction techniques for gas chromatographic determination of volatile carbonyl compounds in alcohols. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 369, 661–670.

Wardencki W., Sowinski, P., Curyo J. (2003). Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 984, 89–96.

Witkiewicz Z. (1995). *Podstawy Chromatografii*. 401–430. Warszawa: WNT.

Yang X., Peppard T. (1994). Solid-phase microextraction for flavor analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42: 1925–1933.

Zhang Z., Pawliszyn, J. (1993). Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 65: 1843–1852.

Zunin P., Boggia R., Salvadeo P., Evangelisti F. (2005). Geographical traceability of West Liguria extravirgin olive oils by the analysis of volatile terpenoid hydrocarbons. *J. Chrom. A.*, 1089: 243-249.

Capitolo III. Valutazione della qualità degli oli vergini di oliva e monitoraggio della shelf-life

3.1 Introduzione: Qualità dell'olio extra-vergine d'oliva

L'olio extra vergine di oliva è il prodotto ottenuto da un processo puramente meccanico dei frutti sani dell'olivo (*Olea Europea Sativa L.*), che risponde ai requisiti fissati dal Regolamento CE 1989/03. Un siffatto olio è caratterizzato da un *flavour* fragrante e delicato che è stato apprezzato fin dall'antichità da tutti i popoli del bacino mediterraneo, sua naturale zona di provenienza, e che ne ha diffuso il consumo anche nei paesi in cui era praticamente sconosciuto (Nord Europa, Canada, Stati Uniti) (Morales *et al.*, 1995; Angerosa, 1998).

L'olio extra vergine di oliva oltre ad essere un condimento di grande pregio nutrizionale, come dimostra il ruolo di primaria importanza riservatogli nella “dieta mediterranea” è soprattutto un grande alimento, dotato di una ricca carica sensoriale che lo rende unico tra gli oli vegetali. Il primo impatto del nostro organismo con un alimento è legato, infatti, alle sue caratteristiche organolettiche: colore, odore, sapore. Questo è valido anche per l'olio vergine di oliva, soprattutto se si pensa che esso contribuisce al patrimonio organolettico di una preparazione gastronomica e influisce positivamente o negativamente sulla sua accettabilità globale (Gasparoli e Fedeli, 1987; Giomo, 1999). Oltre alle ottime caratteristiche organolettiche, un olio di alta qualità è dotato di altrettanti pregi nutrizionali, legati principalmente agli effetti benefici che ha sulla salute umana, infatti, essendo un grasso vegetale ricco di acidi grassi monoinsaturi e di sostanze antiossidanti (polifenoli e tocoferoli, principalmente) è in grado di contrastare l'azione dei radicali liberi. Inoltre favorisce il metabolismo e l'assorbimento dei grassi e delle vitamine A, E, K e D (Visioli e Galli, 1998). Il consumo dell'olio d'oliva contribuisce a prevenire molte malattie croniche, soprattutto quelle cardiovascolari. Protegge stomaco e apparato digerente; agisce su colesterolo e arteriosclerosi, abbassa i livelli di LDL (colesterolo “cattivo”) e incrementa l'HDL (colesterolo “buono”) (Viola, 1997). Previene il deterioramento delle cellule e l'insorgenza di tumori ed ancora, è utile nella vecchiaia perché favorisce l'assorbimento del calcio e la sua mineralizzazione, prevenendo l'osteoporosi (Curci, 2001).

Per questi motivi l'olio extra vergine di oliva risulta essere un alimento di grande pregio e dalla duplice attitudine: edonistica e salutistica.

L'olio extravergine d'oliva si distingue da tutti gli altri oli vegetali perché deriva da un frutto e non da semi e perché viene ottenuto esclusivamente mediante operazioni di tipo fisico-meccanico. La qualità di un olio extravergine, dunque, dipende in misura preponderante dalla qualità delle olive e, secondariamente, dalle tecnologie impiegate nell'estrazione. L'olio è contenuto nella polpa dell'oliva sottoforma di grosse gocce (olio vacuolare o libero) e di piccole goccioline (olio citoplasmatico o legato), più difficile da estrarre (Sacchi *et al.*, 2003). È costituito per circa il 98% da trigliceridi, esteri di glicerolo con tre acidi grassi. Nell'olio di oliva gli acidi grassi sono in parte saturi (i principali sono acido palmitico e acido stearico), in quantità maggiore sono monoinsaturi (preponderante è l'acido oleico) e in misura minore polinsaturi, con due o tre doppi legami (acido linoleico e acido linolenico). Il grado di insaturazione influenza la suscettibilità dell'olio all'ossidazione da parte dell'ossigeno atmosferico con formazione degli idroperossidi, i quali possono andare incontro ad ulteriori reazioni, con formazione di prodotti secondari di ossidazione, che, se volatili, contribuiscono alla insorgenza della rancidità (Sacchi *et al.*, 2003).

L'importanza della composizione in acidi grassi di un olio risiede nel fatto che essa è in grado di influenzarne molti aspetti, quali:

- l'aspetto organolettico (fluidità);
- lo stato fisico (crystallizzazione dei trigliceridi saturi a basse temperature);
- la stabilità all'ossidazione (minore per gli acidi grassi polinsaturi).

La composizione in acidi grassi ha importanti ripercussioni anche a livello nutrizionale, dato che la composizione lipidica della dieta può incidere sulla regolazione del livello di colesterolo nel sangue (Grundy, 1986). Le più recenti acquisizioni della ricerca medica, infatti, assegnano all'acido oleico un ruolo determinante nel mantenere il livello ottimale delle HDL (High Density Lipoproteins), lipoproteine responsabili del giusto tasso ematico di colesterolo, modificando positivamente i fattori di rischio per le malattie cardiovascolari (Viola, 1997). Elevate concentrazioni di acido oleico, però, si riscontrano anche in altri oli come quello di nocciola o di girasole "ad alto oleico", quindi il grande pregio nutrizionale dell'olio di oliva non è dovuto soltanto alla sua equilibrata composizione

in acidi grassi, ma soprattutto alla presenza dei cosiddetti “componenti minori”. Questi, sebbene rappresentino non oltre il 2% in peso dell’olio, comprendono più di 200 composti diversi la cui concentrazione varia da poche ppm a qualche centinaia di ppm. Tra i componenti minori quelli che assumono particolare importanza sono:

- ✚ i composti volatili;
- ✚ le sostanze antiossidanti;
- ✚ i pigmenti;
- ✚ gli steroli;
- ✚ gli idrocarburi;
- ✚ i fosfolipidi;
- ✚ gli alcoli terpenici.

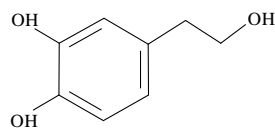
Responsabili del flavour di un olio vergine di oliva, in particolare delle sue “note verdi”, sono composti volatili quali aldeidi, chetoni, alcoli ed esteri, che derivano prevalentemente dall’azione enzimatica delle lipossigenasi, alcol deidrogenasi, esterasi ed isomerasi. Il componente più abbondante è la trans-2-esenale, caratterizzata da odore di erba tagliata di fresco o di mandorla amara (Morales *et al.*, 1999). Al gruppo delle sostanze antiossidanti appartengono tocoferoli e composti fenolici, attualmente considerati i più importanti antiossidanti naturali che determinano l’eccezionale stabilità dell’olio di oliva durante la conservazione e nei processi di cottura (Montedoro *et al.*, 1992). Queste sostanze, pur avendo strutture chimiche differenti, hanno in comune la capacità di agire da radical-scavengers, e cioè di generare radicali stabili dopo aver ceduto un elettrone ai radicali messi in gioco nel processo di ossidazione, neutralizzandoli (Vitagliano, 1982).

Tutte le diverse forme dei tocoferoli (α - β - γ - δ) hanno azione antiossidante; l’ α -tocoferolo, però, è la forma assorbita in via preferenziale dall’organismo (pro-vitamina E) ed è quella più abbondante nell’olio di oliva, anche se la sua concentrazione è strettamente influenzata dalla varietà e dal grado di maturazione delle olive.

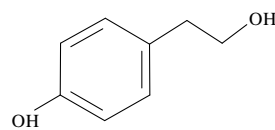
I composti fenolici, oltre ad intervenire nella prevenzione dell’ossidazione dell’olio, svolgono anche molte altre azioni: contribuiscono alla definizione dei caratteri organolettici, determinando, in particolare, la sensazione di amaro-piccante non sempre positivamente accettata dal consumatore (Solinas *et al.*, 1990; McEwan *et al.*,

1994); proteggono il frutto dell'olivo dall'attacco di parassiti, come la larva della mosca olearia; svolgono un'azione inibitoria nei confronti degli enzimi del nostro organismo che agiscono sulla pressione arteriosa (Sacchi et al., 2003); presentano proprietà antinfiammatorie, antiaterogene, antitumorali (Visioli *et al.*, 2002; Markmann, 2007; Fernander *et al.*, 2006; Escrich *et al.*, 2006).

I composti fenolici, denominati anche “biofenoli”, sono costituiti da due frazioni: una semplice ed una complessa, detta anche idrolizzabile. Nella prima frazione, che rappresenta solitamente meno del 20% dei fenoli totali, sono stati identificati acidi fenolici e fenil-alcoli, tra i quali rivestono particolare importanza il tirosolo (p-idrossifeniletanolo, Ty) e l'idrossitirosolo (3,4-didrossifeniletanolo, OHTy).



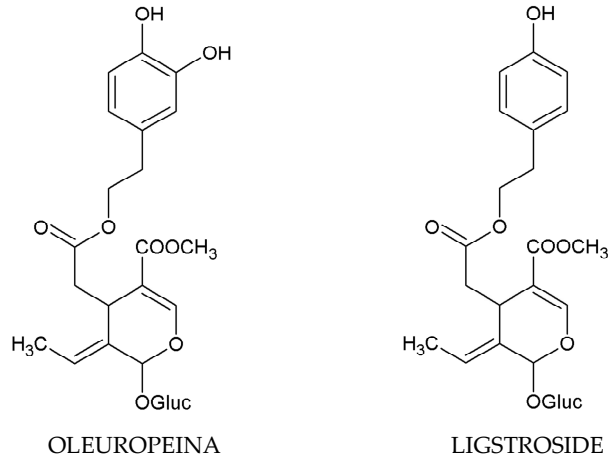
IDROSSITIROSOLO



TIROSOLO

La seconda frazione, invece, è formata da strutture complesse che costituiscono oltre l'80% della componente fenolica totale e contengono, a livello molecolare, il tirosolo e l'idrossitirosolo. La resistenza dell'olio all'ossidazione è da mettere in relazione, più che al patrimonio di fenoli totali, soprattutto alla dotazione di fenoli complessi che contengono l'idrossitirosolo; infatti quest'ultimo, così come tutti gli o-difenoli, contribuisce maggiormente alla stabilità dell'olio. Il rilascio nell'olio di tali componenti avviene a partire da precursori amari presenti nel frutto, tra cui i più abbondanti sono l'oleuropeina e il ligstroside, glucosidi di natura fenolica presenti nell'oliva, ma non nell'olio (Vitagliano, 1982). Il loro contenuto nel frutto diminuisce con il progredire della maturazione per effetto di β -glicosidasi che liberano lo zucchero generando agliconi in parte liposolubili: la forma dialdeidica e la forma aldeidica dell'acido elenolico esterificato con idrossitirosolo (OHTy-EDA), le stesse esterificate con tirosolo (Ty-EDA), la forma dialdeidica del decarbossimetil acido elenolico esterificato con l'OHTy (OHTy-DEDA). Dall'idrolisi degli agliconi

dell'oleuropeina e del ligstroside, ad opera di esterasi, si liberano tirosolo, idrossitirosolo ed acido elenolico (Montedoro *et al.*, 1993).



I pigmenti responsabili del colore dell'olio vergine di oliva sono le clorofille ed i carotenoidi. Le clorofille, che si distinguono, in base alla formula chimica, in clorofille A e B, e feofitine A e B, sono presenti nell'olio in quantità variabili tra 1 e 20 ppm, soprattutto come feofitina A. Il contenuto totale dipende dal sistema di frangitura, dalle temperature di processo e dalla tecnologia di estrazione (generalmente è maggiore in oli estratti per centrifugazione che in oli estratti per pressione), oltre che dalla varietà e dal grado di maturazione del frutto (maggiore nelle olive poco mature). Oltre ad essere responsabili del colore verde dell'olio, questi composti possono assumere il ruolo di agenti pro-ossidanti, in particolare nel processo di fotossidazione di oli conservati alla luce, esercitando al contrario un'azione antiossidante al buio (Endo *et al.*, 1984; Kiritsakis e Dugan, 1985; Usuki *et al.*, 1984).

I carotenoidi sono invece i principali responsabili del colore giallo, evidente in oli ottenuti da olive mature, dove il contenuto di clorofilla è significativamente ridotto. Tali pigmenti mostrano un'azione protettiva nei confronti della fotossidazione (Sacchi *et al.*, 2003).

Gli idrocarburi sono un gruppo estremamente eterogeneo di composti che possono essere suddivisi in idrocarburi saturi, tra cui il nonacosano è il predominante, e

idrocarburi insaturi, il cui componente più rappresentato è lo squalene, importante per la sua partecipazione alla riduzione del livello di colesterolo nel sangue e per la sua capacità di interdire la proliferazione di alcune cellule tumorali (Psomiadou e Tsimidou, 1999). In definitiva, la composizione chimica dell'olio vergine di oliva, che dipende sia dal tipo di materia prima utilizzata sia dalla particolare tecnica estrattiva puramente fisica, grazie alla quale è possibile inglobare i componenti minori che andrebbero invece persi con i processi di estrazione al solvente e di rettificazione (Solinas *et al.*, 1990), è strettamente collegata alla qualità nutrizionale dell'alimento.

Con il termine “qualità” si intende “l'insieme delle proprietà e delle caratteristiche di un prodotto che conferiscono ad esso la capacità di soddisfare esigenze espresse o implicite del consumatore” (Peri, 1995; Magli e Rotondi, 1998).

I parametri di qualità per l'attribuzione della categoria merceologica ad un olio di oliva vergine sono dettati dal Reg. CEE 2568/91 e successive modifiche (Reg. CE 796/02; Reg. CE 1989/03).

Tabella 3.1.1 Parametri di qualità per la classificazione degli oli vergini d'oliva.

CATEGORIA	ACIDITÀ	N° DI PEROSSIDI	INDICI SPETTROFOTOMETRICI			VALUTAZIONE ORGANOLETTICA	
			K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK	Md *	Mf *
Vergine extra	≤ 0.8	≤ 20	≤ 2.5	≤ 0.22	≤ 0.01	0	≥ 0
Vergine	≤ 2.0	≤ 20	≤ 2.6	≤ 0.25	≤ 0.01	≤ 2.5	> 0
Lampante	> 2	-	-	-	-	> 2.5	-

* Md: Mediana del difetto; Mf: Mediana del fruttato

La misura dell'acidità è la più antica determinazione utilizzata per la valutazione della qualità dell'olio e per la sua classificazione merceologica. Questo parametro fornisce elementi utili per valutare lo stato di degrado dell'oliva prima dell'estrazione; i trigliceridi dell'olio, infatti, si degradano a seguito dell'azione di un enzima, la lipasi, che si trova nell'oliva ed esercita la sua attività all'interno del frutto se questo ha subito lesioni cellulari. La lipasi, in presenza di acqua, idrolizza il legame esistente tra l'acido grasso ed il glicerolo, producendo acidi grassi liberi che costituiscono l'acidità libera dell'olio.

Il numero di perossidi misura lo stato di ossidazione primaria degli acidi grassi. Questo parametro, determinato sull'olio appena prodotto, fornisce un'indicazione

dello stato sanitario e di degrado dell'oliva. Il doppio legame tra gli atomi di carbonio è responsabile dell'ossidazione dell'olio da parte dell'ossigeno con formazione di idroperossidi, molecole decisamente instabili che si decompongono in prodotti di ossidazione secondari, quali aldeidi e chetoni, responsabili del difetto di rancido. Il doppio legame va incontro a modifiche anche quando l'olio è sottoposto a trattamenti di rettificazione, con formazione di doppi legami coniugati. Sia questi ultimi che i prodotti secondari di ossidazione comportano una variazione dell'intensità di assorbimento nella regione dell'UV (Sacchi *et al.*, 2003).

I processi ossidativi possono essere rivelati attraverso la misura delle costanti spettrofotometriche:

- K_{232} (valore dell'estinzione specifica a 232 nm, lunghezza d'onda cui corrisponde il massimo d'assorbimento dei dieni coniugati);
- K_{270} (valore dell'estinzione specifica 270 nm, lunghezza d'onda cui corrisponde il massimo d'assorbimento dei trieni coniugati).
- ΔK (andamento della curva di assorbimento nell'intervallo 264-272 nm; mette in luce la presenza dei composti di ossidazione secondari).

Pari importanza rispetto alla determinazione dei parametri analitici, ai fini dell'attribuzione della categoria merceologica, assume la valutazione organolettica (Panel test). Il metodo, introdotto nel 1991 con il Reg. CEE 2568 e modificato dal Reg. CE 796/02, consente di valutare nella maniera il più possibile oggettiva il profilo organolettico di un olio di oliva vergine. L'oggettività è garantita essenzialmente dalla standardizzazione delle condizioni di assaggio e dall'elaborazione statistica delle valutazioni effettuate indipendentemente dagli 8-12 assaggiatori esperti costituenti la giuria.

Accanto agli indici di qualità ufficiali, che consentono di attribuire ad un olio la categoria merceologica, è possibile ricorrere a parametri analitici non ufficiali allo scopo di caratterizzare in maniera più completa un olio dal punto di vista qualitativo.

Informazioni utili sulla qualità di un olio possono essere fornite, infatti, da:

- profilo in composti volatili, responsabili del flavour dell'olio;
- contenuto e composizione di tocoferoli, ad azione antiossidante e vitaminica;
- contenuto e composizione di composti fenolici, che influenzano il profilo organolettico, la stabilità all'ossidazione, la qualità nutrizionale dell'olio;

- contenuto di pigmenti, responsabili del colore dell'olio ed in parte coinvolti nei meccanismi ossidativi.

3.1.2 I componenti volatili e la qualità sensoriale dell'olio extra vergine di oliva

Il patrimonio aromatico di un olio vergine di oliva è costituito da composti non volatili e da composti volatili che stimolano gli organi di senso dando origine al *flavour* (percezione gusto-olfattiva-tattile) (Solinas, 1990).

I composti non volatili sono soprattutto gli agliconi dei glucosidi amari naturalmente presenti nelle olive che vengono sottoposti a rottura enzimatica durante la frangitura e sono responsabili delle sensazioni tipicamente gustative di amaro, piccante ed astringente. Alla carica amara contribuiscono soprattutto i composti secoiridoidi (esteri dell'acido elenolico con il tirosolo e l'idrossitirosolo) ai quali si devono anche le sensazioni di piccante ed astringente perché stimolano le terminazioni libere del trigemino (Angerosa, 1998, Andrews *et al.*, 2003, Gutierrez-Rosales *et al.*, 2003).

La maggior parte delle sensazioni organolettiche percepite durante l'assaggio di un olio extra vergine di oliva sono, tuttavia, dovute alle stimolazioni della mucosa olfattiva da parte dei composti volatili.

Essi sono caratterizzati da:

- basso peso molecolare (< 300 Da);
- elevata volatilità per raggiungere facilmente l'epitelio olfattivo;
- sufficiente idrosolubilità per diffondere nella mucosa che ricopre le cellule olfattive;
- buona liposolubilità per attraversare le membrane lipidiche e giungere alle proteine recettoriali.

L'olio vergine di oliva immagazzinato nel vacuolo delle cellule oleifere contiene solo piccolissime quantità di composti volatili derivanti dal metabolismo degli acidi grassi o dalla conversione di alcuni amminoacidi. La maggior parte di questi composti, derivanti da un olio di buona qualità, si originano dall'ossidazione enzimatica degli acidi linolenico e linoleico (Angerosa, 2002).

I componenti responsabili delle note olfattive appartengono a diverse classi chimiche quali aldeidi, chetoni, alcoli, esteri, idrocarburi, eteri.

Essi non esistono o esistono solo in tracce nelle cellule intatte, si formano in seguito all'attivazione di una serie di reazioni enzimatiche che, nel loro insieme, vanno sotto il nome di cascata delle lipossigenasi (Angerosa, 2002).

Il fenomeno è da considerarsi quale conseguenza della dilacerazione della struttura cellulare nella fase di molitura (Angerosa, 1998) poiché gli enzimi coinvolti sono naturalmente presenti nell'oliva ma iniziano ad agire solo al momento della frangitura a seguito della lacerazione della drupa.

La via delle lipossigenasi, già riportata in **figura 2.2.1.2**, si articola in quattro fasi principali che vedono coinvolti i seguenti enzimi: Lipossigenasi, Idroperossido liasi, Isomerasi, alcol deidrogenasi, alcol acetil transferasi. La lipossigenasi è un enzima non eme contenente ferro, che catalizza le ossidazioni della sequenza 1,4-pentadiene degli acidi grassi polinsaturi per produrre i loro corrispondenti idroperossidi. In particolare tale enzima ha la caratteristica di catalizzare in maniera preferenziale la formazione degli idroperossidi in posizione 13-OOH, che a seguito dell'azione sequenziale dell'idroperossido liasi si decompongono dando origine a composti aldeidici a sei atomi di carbonio, tra cui l'esenale e la *cis*-3-esenale. Quest' ultima isomerizza rapidamente dando origine alla

trans-2-esenale, un'aldeide caratterizzata da un odore fresco, di erba tagliata e di mandorla amara che solitamente rappresenta il 40-50% di tutte le sostanze volatili dell'olio extra vergine di oliva di buona qualità; questo composto di conseguenza viene considerato il principale responsabile delle cosiddette "note verdi" dell'olio vergine di oliva. La cascata continua per azione dell'alcol deidrogenasi che provvede a trasformare le aldeidi nei corrispettivi alcoli, rendendo le note erbacee meno aggressive sia per le proprietà sensoriali degli alcoli che per il loro *threshold* (soglia minima di percezione) nettamente più elevato. Infine l'esterificazione operata dall'alcol acetil transferasi determina la produzione di esteri, caratterizzati da un impatto più dolce, floreale, e di frutta matura.

La composizione quali-quantitativa dei componenti volatili dipende dalla quantità e dall'attività dei diversi enzimi, che a loro volta sono condizionati principalmente da fattori genetici, dallo stato di maturazione delle drupe, dalle modalità di conservazione delle olive prima della lavorazione, dal grado di infestazione della mosca olearia e soprattutto dalla tecnologia di estrazione e conservazione dell'olio.

3.1.3 I composti chiave del flavour dell'olio extra vergine di oliva

I composti-chiave che determinano il *flavour* di un olio extra vergine di oliva sono principalmente le aldeidi, gli alcoli e gli esteri che si generano dalla cascata delle lipossigenasi (Angerosa, 2002). Ognuno di questi composti è caratterizzato da un diverso descrittore sensoriale e da un proprio *threshold* (soglia minima di percezione), in **Tabella 3.1.3.1** sono riportati tutti i composti della via delle lipossigenasi con i relativi descrittori ed i *threshold*. Il *threshold* è una valutazione molto importante, infatti molti composti pur avendo una concentrazione molto bassa possono incidere notevolmente sul profilo sensoriale, se ad essi è associato un *threshold* molto basso (Guth e Grosch, 1991).

Tabella 3.1.3.1: Composti a sei atomi di carbonio prodotti dal pathway delle lipossigenasi.

Composto	Descrittore	Threshold (µg/kg)	Riferimento bibliografico
esanale	fruttato, mela verde, verde erba	75 60	Guth e Grosch, 1991 Morales <i>et al.</i> , 1999
<i>cis</i> -3-esenale	erba tagliata	1,3	Reiners e Grosh, 1998
<i>trans</i> -2-esenale	erba tagliata, verde, mandorla	257 1200	Reiners e Grosh, 1998 Morales <i>et al.</i> , 1999
esanolo	foglia verde, fruttato, pomodoro	400	Morales <i>et al.</i> , 1996
<i>trans</i> -2-esenolo	foglia, erba verde, fiori selvatici	8000	Guth e Grosch, 1991
<i>cis</i> -3-esenolo	foglia verde, banana verde	364 6000	Reiners e Grosh, 1998 Aparicio e Morales, 1998
esil acetato	fruttato dolce	600	Morales <i>et al.</i> , 1996
<i>trans</i> -2-esenil acetato	fruttato	-	Olias <i>et al.</i> , 1993
<i>cis</i> -3-esenil acetato	fruttato	750	Guth e Grosch, 1991
<i>trans</i> -3-esenolo	verde	1500	Aparicio e Morales, 1998
<i>trans</i> -3-esenale	verde, carciofo, fiori	450	Guth e Grosch, 1993

Un esempio è la *cis*-3-esenale che conferisce all'olio un odore tipico di erba appena tagliata e nonostante sia rilevato in tracce, contribuisce notevolmente alla formazione dell'aroma poiché ha un *threshold* di 3 µg/kg. Il fenomeno opposto si verifica con la

trans-2-esenale, che ha un *threshold* molto alto per cui, pur essendo il composto più abbondante tra i volatili dell'olio extra vergine, contribuisce in minima parte all'aroma finale. Oltre ai composti prodotti dalla via della lipossigenasi, ci sono molti altri composti che si originano da altre vie metaboliche e che possono incidere sul profilo sensoriale, molte volte condizionando anche in negativo l'aroma finale (*off-flavour*). Le principali vie oltre alle lipossigenasi, riguardano: fermentazione di zuccheri, conversione di alcuni amminoacidi, metabolismo di acidi grassi e scissione omolitica dei 13-idroperossidi (Angerosa, 2002). Recentemente proprio con quest'ultima via si è cercato di spiegare la presenza considerevole di composti C₅, in particolare alcoli e altri composti carbonilici (Angerosa *et al.*, 2000). In verità questa via risulta essere un'ulteriore *branch* della cascata delle lipossigenasi, infatti i composti di partenza sono sempre i 13-idroperossidi, che attraverso la formazione di alcossi radicali, portano alla neogenesi dei prodotti C₅. Tutto questo è già stato dimostrato negli oli di semi di soia (Salch *et al.*, 1995). Alcuni di questi composti C₅ risultano contribuire ad alcune note verdi (Angerosa *et al.*, 2000).

Nella **Figura 3.1.3.1** sono mostrate le principali vie di formazione di questi composti volatili e i loro prodotti finali.



Figura 3.1.3.1: Principali vie di formazione dei composti volatili responsabili dell'aroma dell'olio vergine di oliva.

Appare chiaro quindi, che l'aroma di un olio extra vergine non è dato solo dai composti derivanti dalle lipossigenasi, ma come in un grande mosaico in cui ci sono tanti altri piccoli tasselli, si possono verificare fenomeni di interferenza sinergica o talvolta antagonistica. Può capitare infatti che si verifichi il cosiddetto "effetto maschera", dovuto agli off-flavour che si generano da altre vie di formazione (Angerosa *et al.*, 2000).

3.1.4 Off-flavour di rancido

Quando gli stessi acidi grassi modificati dalle lipossigenasi (Linoleico, linolenico) sono sottoposti a fenomeni di autossidazione o di termossidazione, le aldeidi che si formano sono di tipo diverso, e spesso presentano nella loro struttura doppi legami coniugati (2-4 alca-dienali). Queste aldeidi contribuiscono a conferire all'olio l'odore tipico del rancido e fritto. La loro composizione dipenderà dalla composizione iniziale del grasso e dalle condizioni esterne, in quanto l'ossidazione che avviene a temperatura ambiente origina prodotti diversi rispetto a quelli che si ottengono ad alte temperature, come nella frittura. I principali composti volatili correlabili al difetto di rancido (**Tabella 3.1.4.1**) sono prodotti dell'ossidazione non enzimatica degli acidi grassi insaturi, i più abbondanti sono: ottano, nonano, esanale, *trans*-2-eptenale e *trans*-2-nonenale (Angerosa *et al.*, 1995; Solinas *et al.*, 1987; Morales *et al.*, 2004).

3.1.5 Off-flavour fermentativi

Gli oli presentanti l'*off-flavour* di riscaldamento sono caratterizzati da elevate concentrazioni di idrocarburi, esteri, acidi carbossilici e chetoni. In particolare i principali marcatori di questo difetto sono: il n-ottano, l'ottene, la 2- metilbutanale, il 2-butanolo, l'etil acetato, l'acido acetico, l'acetaldeide e diversi altri riportati in **Tabella 3.1.4.1**.

Tabella 3.1.4.1: Composti marcatori dei principali difetti

Composti	Riferimento Bibliografico	Difetto
<i>n</i> -ottano	<i>Di giovacchino e Serraiocco, 1995</i>	<i>Riscaldo</i>
2-metil propanale	<i>Angerosa et al, 1995</i>	<i>Riscaldo</i>
Acetone	-	<i>Riscaldo</i>
metil acetato	-	<i>Riscaldo</i>
Ottene	<i>Angerosa et al, 1995</i>	<i>Riscaldo</i>
2-ottene	-	<i>Riscaldo</i>
etil acetato	<i>Di giovacchino e Serraiocco, 1995</i>	<i>Riscaldo</i>
2-metil butanale	-	<i>Riscaldo</i>
3-metil butanale	-	<i>Riscaldo</i>
etil isobutirrato	-	<i>Riscaldo</i>
Decano	-	<i>Riscaldo</i>
metil butirrato	-	<i>Riscaldo</i>
2-butanolo	<i>Angerosa et al, 1995</i>	<i>Riscaldo</i>
etil butirrato	-	<i>Riscaldo</i>
pentil acetato	-	<i>Riscaldo</i>
1-pentano	-	<i>Riscaldo</i>
acido acetico	<i>Di giovacchino e Serraiocco, 1995</i>	<i>Riscaldo</i>
acido butirrico	-	<i>Riscaldo</i>
acido pentanoico	-	<i>Riscaldo</i>
Acetaldeide	<i>Angerosa et al, 1995</i>	<i>Riscaldo</i>
etil acetato	-	<i>Avvinato</i>
2-metil propanolo	<i>Di giovacchino e Serraiocco, 1995</i>	<i>Avvinato</i>
2-metil butanolo	<i>Angerosa et al, 1995</i>	<i>Avvinato</i>
3-metil butanolo	<i>Di giovacchino e Serraiocco, 1995</i>	<i>Avvinato</i>
Etanolo	<i>Angerosa et al, 1995</i>	<i>Avvinato</i>
Ottanolo	-	<i>Avvinato</i>
<i>n</i> -ottano	<i>Di giovacchino e Serraiocco, 1995</i>	<i>Rancido</i>
Nonano	-	<i>Rancido</i>
1-pentenil acetato	-	<i>Rancido</i>
esanale	<i>Solinas et al, 1987°</i>	<i>Rancido</i>
trans,2-pentenale	-	<i>Rancido</i>
eptanale	<i>Solinas et al, 1987°</i>	<i>Rancido</i>
2-eptenale	<i>Solinas et al, 1987°</i>	<i>Rancido</i>
acido acetico	-	<i>Rancido</i>
trans,2-nonenale	-	<i>Rancido</i>
acido,2-metil pentanoico	-	<i>Rancido</i>
trans-2-esenale	<i>M.T.Morales et al,2004</i>	<i>Rancido</i>
ottanale	-	<i>Rancido</i>
nonanale	-	<i>Rancido</i>
2,4-eptadienale	-	<i>Rancido</i>
decanale	-	<i>Rancido</i>
acido butanoico	-	<i>Rancido</i>
acido esanoico	-	<i>Rancido</i>
acido eptanoico	-	<i>Rancido</i>

Gli oli presentanti il difetto di avvinato-inacetito presentano una elevata concentrazione di alcoli, un lieve incremento degli esteri e una minore quantità di aldeidi rispetto al contenuto medio presente negli oli extra vergini. In particolare l'etil acetato, il 2-metil butanolo, il 3-metil butanolo, l'esanolo, il 2-pentenolo e l'ottanolo sono da ritenersi buoni marcatori del difetto di avvinato (Angerosa *et al.*, 1995, Di Giovacchino e Serraiocco, 1995).

Tali off-flavour, che si originano per effetto delle fermentazioni lattiche ed alcolico acetiche, si possono formare non solo nello stoccaggio prolungato delle olive ma anche per la fermentazione della pasta di olive che residua sui diaframmi filtranti per pressione.

3.1.6 L'ossidazione lipidica e la shelf-life degli oli imbottigliati

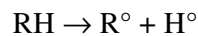
L'olio, durante il periodo di conservazione, subisce un processo di degradazione ossidativa. Per ossidazione non si intende una singola reazione chimica, ma il risultato di una serie di alterazioni che si verificano a carico degli acidi grassi, in particolare di quelli insaturi, per azione dell'ossigeno che, in presenza di catalizzatori (luce, metalli, calore), forma una complessa miscela di composti di ossidazione.

Nel processo di autossidazione (ossidazione a temperatura ambiente: 20-40°C), l'ossigeno atmosferico conduce alla formazione di idroperossidi (prodotti primari di ossidazione) a partire dagli acidi grassi insaturi tramite un meccanismo di azione radicalico.

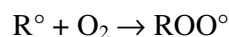
Le fasi fondamentali di questo processo sono quattro:

- *INDUZIONE*
- *PROPAGAZIONE*
- *DECOMPOSIZIONE DEGLI IDROPEROSSIDI*
- *TERMINAZIONE*

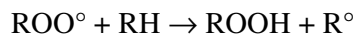
Nella prima fase d'**iniziamento** si ha la formazione di radicali liberi molto instabili, a partire da un acido grasso che ha perso un atomo di idrogeno da un metilene allilico (carbonio adiacente ad un carbonio impegnato in un doppio legame), grazie all'azione della luce ultravioletta e all'azione catalizzante dei metalli presenti nell'olio (Frankel, 1998):



In seguito il radicale, reagendo velocemente con l'ossigeno, porta alla formazione di un radicale perossidico:



Questo composto molto reattivo continua a reagire con gli acidi grassi insaturi, portando alla formazione di idroperossidi (prodotti di ossidazione primari) e altri radicali, che ricominciano il ciclo:



Da questo punto ha inizio una reazione a catena in quanto il radicale ottenuto, in presenza di ossigeno, forma nuovamente un radicale perossidico ripetendo il processo (**propagazione**) e determinando così l'accumulo di idroperossidi.

I prodotti dell'ossidazione primaria, gli idroperossidi, sono composti inodori, incolori, molto instabili. Dalla loro decomposizione, favorita da temperature elevate, prendono origine i prodotti "secondari" che, invece, possono presentare un forte impatto sensoriale. Possono, infatti, essere altobollenti, quindi non volatili, oppure bassobollenti, e quindi volatili e responsabili dell'odore di "rancido" o "fritto".

In assenza di ossigeno, il processo si interrompe e il numero di idroperossidi rilevabili risulta basso, ma, se l'ossigeno non manca e la temperatura è relativamente alta, si producono numerose molecole di questi composti decisamente instabili che si decompongono in prodotti di ossidazione secondari, individuabili in molecole volatili e non, responsabili di difetti organolettici degli oli (Frankel, 1998).

Quindi nella fase di **decomposizione** gli idroperossidi si decompongono formando composti tossici e/o maleodoranti che danneggiano sia la qualità nutrizionale che organolettica dell'olio (irrancidimento).

Il numero di molecole che si originano nella fase di decomposizione degli idroperossidi è molto alto. In relazione al numero di doppi legami presenti negli acidi grassi insaturi, si possono formare diverse specie di idroperossidi. La decomposizione di ognuno di questi idroperossidi può dare origine a diverse molecole (chetoni, aldeidi, ossiacidi, idrocarburi, ecc.) che possono simultaneamente contribuire al profilo sensoriale dell'olio. Si è osservato che dall'ossidazione in vitro dell'acido linoleico si sono formate 80-85 specie diverse di molecole.

Risulta quindi difficile misurare con un unico metodo analitico l'effettivo stato di ossidazione di un olio. Un primo passo consiste nello stabilire il grado di ossidazione iniziale con la determinazione del numero di perossidi. A questo andrebbe affiancata la misura di un marcatore dello stadio secondario dell'ossidazione, ad esempio uno

dei composti volatili (aldeidi, idrocarburi) o non volatili che vengono a prodursi (Frankel, 1998).

La fase di **terminazione** avviene, almeno teoricamente, quando due radicali si incontrano dando origine ad un prodotto inattivo (dimeri). I dimeri sono molecole che si trovano negli oli, ma affinché due radicali liberi si incontrino è necessario che l'olio sia riscaldato fortemente in maniera tale che i moti molecolari siano molto intensi. Questo si verifica nella frittura, dove si ritrovano molecole che hanno un ponte -O-O- tra due trigliceridi, molecole che, dunque, hanno un peso molecolare circa doppio rispetto ai trigliceridi normali. L'analisi dei dimeri è un indice specifico degli oli termossidati. Si deve, infatti, distinguere tra ossidazione a temperatura ambiente, o auto-ossidazione, e ossidazione indotta dalle alte temperature, o termo-ossidazione. La prima assume importanza soprattutto ai fini della conservazione dell'olio, mentre quella ad alta temperatura, nei processi di cottura (frittura, cottura al forno, ecc).

La terminazione, inoltre, può avvenire per stabilizzazione del radicale con un antiossidante. Le molecole naturali che fungono da *antiossidanti* possono presentare diversi meccanismi di azione: alcune bloccano la fase di iniziazione (chelatori di metalli, quali ad esempio l'acido ascorbico), altre (*radical scavengers*, quali fenoli e tocoferoli) rallentano la fase di propagazione, "catturando" i radicali liberi, sono queste ultime, in particolare, ad intervenire nella fase di terminazione.

Per questo motivo, la qualità dell'olio imbottigliato, può essere fortemente compromessa da fenomeni di ossidazione e foto-ossidazione, che alterano le caratteristiche organolettiche e nutrizionali del prodotto. La reazione è innescata, in presenza di ossigeno, da una fonte energetica quale il calore o la radiazione luminosa e procede fino alla completa alterazione del prodotto. L'entità della fotodegradazione di un olio imbottigliato dipende, dunque, dal comportamento (trasmittanza, assorbanza, riflessione) del materiale di imbottigliamento nei confronti della luce visibile e della radiazione ultravioletta e dalle sue proprietà barriera nei confronti dell'ossigeno atmosferico, nonché dalle condizioni di stoccaggio del prodotto confezionato.

3.2. Obiettivi e disegno sperimentale

La parte di lavoro riportata nel presente capitolo della tesi ha avuto l'obiettivo di valutare lo stato ossidativo degli oli sottoposti a una prova di *shelf-life* di 18 mesi, impiegando oltre alle normali analisi di *routine* (numero di perossidi, indici spettrofotometrici, contenuto di composti fenolici e analisi sensoriale) anche le due metodiche strumentali innovative (naso elettronico e microestrazione in fase solida accoppiata alla gas-massa) sviluppate nella presente tesi al fine di valutare il contributo di tali metodiche nel discriminare sia i diversi aromi che caratterizzano gli oli che i difetti e in particolare la rancidità. In dettaglio sono stati sviluppati i seguenti punti:

- Caratterizzazione chimico-compositiva e sensoriale degli oli della penisola Sorrentina
- Caratterizzazione del profilo aromatico di oli della penisola Sorrentina mediante la tecnica della Microestrazione in fase solida (SPME).
- Verifica della capacità del naso elettronico di riconoscere oli di diverse varietà, e oli della stessa varietà ma provenienti da diverse aziende olearie.
- Studio dell'evoluzione del profilo aromatico e sensoriale degli oli nel corso di una *shelf-life* di 18 mesi.

3.3. Materiali e metodi

3.3.1. Campionamento

Le olive utilizzate nel presente lavoro di tesi sono state fornite da cinque Aziende Agricole della Penisola Sorrentina. Nella **Tabella 3.3.1.1** sono riportate le caratteristiche descrittive delle aziende che hanno fornito gli oli, in particolare il sistema di irrigazione usato, la difesa utilizzata contro il danno da *Bactrocera Oleae*, le caratteristiche del suolo e l'altitudine degli oliveti sul livello del mare.

Tabella 3.3.1.1 Descrizione delle Aziende Agricole della Penisola Sorrentina fornitrici delle olive utilizzate nel lavoro di tesi.

Azienda agricola	Comune	Sistema di irrigazione	Difesa fitosanitaria contro <i>Bactrocera Oleae</i>	Caratteristiche pedologiche	Altitudine m.l.m	Tipo di coltivazione dell'olivo
Il Capitolo	Sorrento	Sommersione a conca	n 2 trattamenti a partire da metà settembre con Dimetoato	suolo di origine calcarea	50 m	specializzato
Osvaldo Galano	Sorrento	Aspersione	n 3 trattamenti con Poltiglia bordolese a da metaluglio ogni 20g. In caso di forti attacchi, trattamenti con Dimetoato o Fenthion.	suolo di origine tufacea	110-140 m	consociato
L'Arcangelo	Vico Equense	Localizzato mediante gocciolatori	n. 2 trattamenti preventivi con pietre di rame disciote in calce ad inizio accrescimento frutti. Campionamento con trappole a feromoni e all'aumentare delle catture trattamento con verderame + Dimetoato.	suolo di origine calcarea	250-300 m	specializzato
La Villanella	Massa Lubrense			suolo di origine calcarea	50 m	consociato
Le Peracciole	Massa Lubrense		Biologico	suolo di origine calcarea	70-180 m	specializzato
Volpe Franco	Vico Equense			suolo di origine calcarea	200-250 m	specializzato

Nella **Tabella 3.3.1.2** invece vengono fornite le informazioni riguardo la varietà di olive utilizzate per lo studio, la data di raccolta e quella di trasformazione, la % di attacco della mosca olearia e l'indice di maturazione.

Tabella 3.3.1.2 Varietà di olive utilizzate per lo studio

Sigla	Varieta'	Az.Agr.	raccolta	trasformazione	Dacus %	I.M.
PN	Nocellara		14/10/2004	15/10/2004	26%	0,4
PF	Frantoio	Le Peracciole	14/10/2004	15/10/2004	75%	2,4
PM	Minucciola		14/10/2004	15/10/2004	77%	3,1
VM	Minucciola	La Villanella	18/10/2004	19/10/2004	6,5%	3,1
OM	Minucciola	Galano Osvaldo	18/10/2004	19/10/2004	5%	0,9
CM	Minucciola	Il Capitolo	18/10/2004	19/10/2004	23%	1,9
RM	Minucciola	L' Arcangelo	18/10/2004	19/10/2004	0%	1,9
FM	Minucciola	Volpe Franco	18/10/2004	19/10/2004	0%	1,2

I campioni di olio, dopo la lavorazione sono stati trasportati nel laboratorio Oli e grassi di Portici, dove sono state effettuate le analisi per la caratterizzazione e poi sono stati conservati al buio per una prova di *shelf-life*. Le analisi sono state ripetute dopo un anno e dopo diciotto mesi di conservazione.

Le olive (circa 50 Kg) per ogni campione, sono state trasportate in cassette di plastica presso l'impianto di trasformazione dell'Azienda Agricola Sperimentale Improsta della regione Campania sita nel comune di Battipaglia (Salerno).

Le olive hanno subito, *in primis*, le seguenti operazioni:

- Determinazione dell'indice di maturazione;
- Determinazione del grado di infestazione da mosca olearia.

3.3.2 Disegno Sperimentale

Il disegno sperimentale seguito in questa parte del lavoro di tesi è schematizzato in **Figura 3.3.2.1**. Sono stati analizzati otto oli provenienti dalla Penisola Sorrentina e comprendenti le varietà di *Minucciola*, *Frantoio* e *Nocellara*. Gli oli sono stati analizzati appena prodotti e dopo 12 e 18 mesi di conservazione al buio. Sui campioni sono state effettuate le principali analisi di *routine* per valutare lo stato ossidativo degli oli, ma anche le analisi con le tecniche strumentali innovative precedentemente discusse.

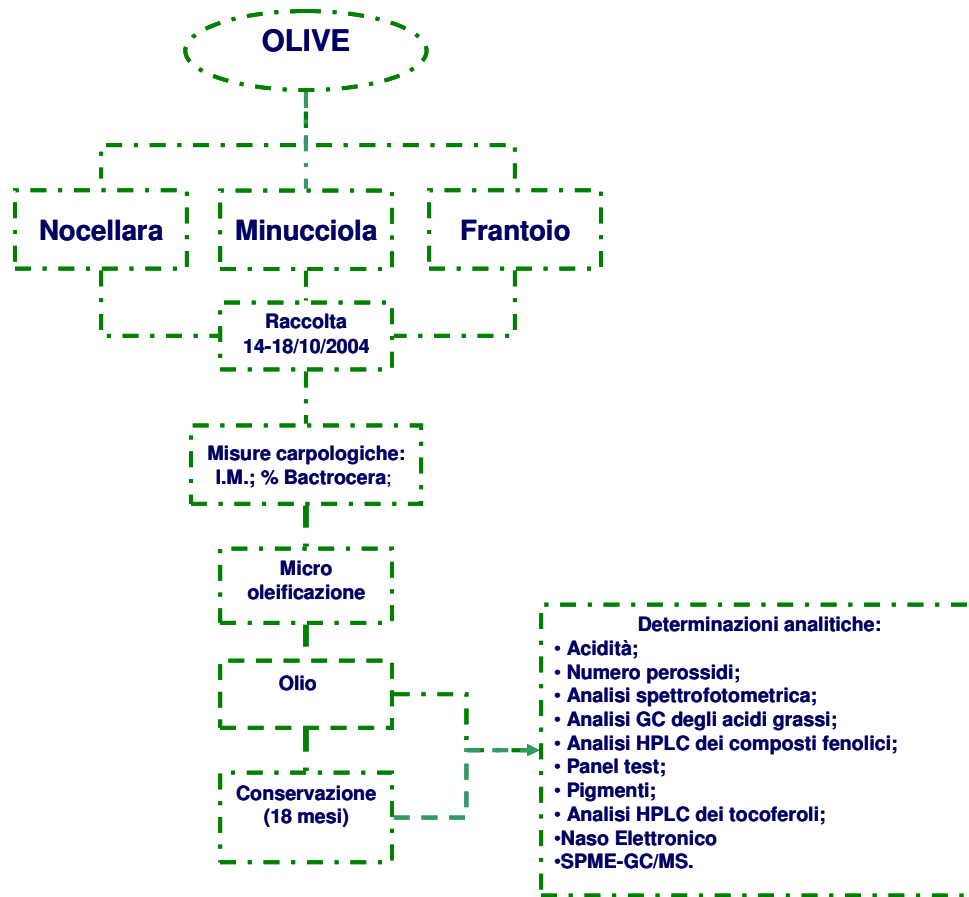


Figura 3.3.2.1 Disegno sperimentale relativo alle determinazioni analitiche effettuate sui campioni di olio sottoposti alla prova di conservazione.

3.3.3 Determinazione indice di maturazione

È stata prelevata per ogni campione un'aliquota di 100 olive su cui si è determinato l'indice di maturazione secondo la procedura proposta dall'Istituto Nazionale di Ricerche Agronomiche — Stazione di Jaèn (Spagna), che fa riferimento alla pigmentazione dell'oliva e per il cui calcolo si utilizza la seguente formula:

$$IM = \frac{(0 * N_0) + (1 * N_1) + (2 * N_2) \dots + (7 * N_7)}{100}$$

dove N è il numero di olive appartenenti ai sette stadi di maturazione individuato nella scheda di rilevamento:

0 = Olive con pelle verde intenso o verde scuro

1 = Olive con pelle gialla o verde - giallognola

- 2 = Olive con pelle giallognola con macchie o zone rossastre
- 3 = Olive con pelle rossastra o violetto chiara
- 4 = Olive con pelle nera e polpa totalmente verde (chiara)
- 5 = Olive con pelle nera e polpa violetta fino a metà
- 6 = Olive con pelle nera e polpa violetta fin quasi al nocciolo
- 7 = Olive con pelle nera e polpa quasi totalmente scura

3.3.4 Determinazione del grado di infestazione mosca olearia

Per ogni campione è stata presa un'aliquota di 100 olive e si è rilevata la percentuale di frutti danneggiati dalla mosca olearia (*Bactrocera Olea*).

3.3.5 Lavorazione materia prima

L'impianto di microleificazione utilizzato (Oliomio tipo Mini 50, Toscana Enologica Mori, Firenze) opera in condizioni standard e su un ridotto quantitativo di olive (15-20 kg). Esso è costituito da un sistema di frangitura a martelli i quali agiscono su una griglia forata. Le olive frantumate cadono nella gramola. La coclea di alimentazione provvede a muovere la pasta dalla gramola e a spingerla all'interno della centrifuga decanter. La centrifuga decanter, comandata da un motore elettrico collegato al frangitore, provvede alla separazione dell'olio dall'acqua e dalla sansa (2 fasi). Per la sansa è previsto uno scarico motorizzato a coclea mentre per l'olio un condotto a caduta libera. I campioni di olive, prima della trasformazione, hanno subito lavaggio e defogliazione. La frangitura ha avuto una durata media di 7-10 minuti. Le olive frantumate sono state gramolate per 20 minuti a temperatura di circa 30°C. Al termine della lavorazione di ogni campione, sono state lavate con acqua a pressione tutte le parti operative del microfrantoio. I campioni di olio ottenuti sono stati posti in bottiglie di vetro scuro da 750 ml, accompagnati da una specifica scheda descrittiva riportante la data di raccolta, di trasformazione, la provenienza delle olive, la sigla del campione, la varietà, la percentuale di infestazione da mosca olearia, l'indice di maturazione e la resa al frantoio.

I campioni così imbottigliati sono stati trasportati in laboratorio, filtrati con garze di cotone idrofilo e conservati al buio a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 5$) in bottiglie di vetro scuro da 75 ml fino al momento delle analisi.

3.3.6 Determinazioni analitiche e panel test

Per ciascun campione di olio la caratterizzazione chimica è stata condotta attraverso le seguenti determinazioni analitiche:

- determinazione dell'acidità;
- determinazione del numero di perossidi;
- determinazione degli indici spettrofotometrici UV;
- analisi della composizione in acidi grassi (gas-cromatografia degli esteri metilici, GC-EMAG);
- estrazione ed analisi HPLC della componente fenolica;
- determinazione della composizione in tocoferoli;
- determinazione dei pigmenti (clorofilla e carotenoidi);
- analisi sensoriale (panel test);
- analisi dello spazio di testa mediante Microextraction Solid Phase (SPME)
- analisi delle sostanze volatili mediante naso elettronico (NE).

Tutte le determinazioni analitiche sono state effettuate in tre repliche; i risultati sono stati trattati statisticamente effettuando l'analisi delle componenti principali (PCA) e l'analisi della varianza (ANOVA), mediante l'utilizzo del *software* Excel STAT Addinsoft version 7.1.

3.3.7 Determinazione dell'acidità

Principio del metodo. L'olio vergine di oliva è costituito per il 98-99% da trigliceridi, esteri del glicerolo con acidi grassi a lunga catena (soprattutto C_{16} e C_{18}); una parte degli acidi grassi, tuttavia, si trova allo stato libero, non sotto forma di esteri, ed è questa frazione che determina l'acidità degli oli. La misura dell'acidità è forse la più antica determinazione utilizzata per la valutazione della qualità dell'olio

e per la sua classificazione commerciale. La conoscenza di questo parametro fornisce elementi utili per valutare lo stato di degrado dell'oliva e della struttura dell'olio (trigliceride) a seguito dell'azione di un enzima, la lipasi, che si trova nell'oliva ed esercita la sua attività all'interno del frutto dopo la raccolta, se questo ha subito lesioni cellulari. Tale enzima idrolizza il legame esistente tra l'acido grasso e il glicerolo, producendo acidi grassi liberi che costituiscono l'acidità dell'olio.

La determinazione prevede la titolazione degli acidi grassi liberi mediante una soluzione di idrossido di potassio (KOH) 0,10 N, fino al punto di equilibrio della reazione di neutralizzazione, evidenziato da un indicatore (Regolamento CEE 2568/91).

Procedimento. In una beuta da 200 ml si pesa esattamente una quantità di olio pari a circa 5 g. Si aggiungono 100 ml di una miscela etanolo-etero etilico (1:2 v/v) neutralizzata e si agita fino a soluzione completa. Si aggiungono 5 gocce di fenolftaleina all'1% e si titola con la soluzione alcalina fino a viraggio.

Espressione dei risultati. L'acidità, espressa in % di acido oleico è data da:

$$(V * N * 282) / (P * 10)$$

dove:

V = volume (ml) di soluzione di idrossido di potassio consumato;

N = normalità della soluzione di idrossido di potassio;

P = peso (g) del campione prelevato.

3.3.8 Determinazione del numero di perossidi

Principio del metodo. La determinazione del numero di perossidi misura l'ossidazione che subiscono gli acidi grassi insaturi dei trigliceridi ad opera dell'ossigeno dell'aria e dell'azione catalitica dell'enzima lipossigenasi. Il contatto tra olio ed enzimi, presenti nella fase acquosa della polpa, è favorito da lesioni cellulari dovute a traumi della drupa. Durante le varie fasi produttive, l'olio si trova a contatto con l'acqua di vegetazione e ciò favorisce l'attività ossidante degli enzimi, che consiste nell'inserimento dell'ossigeno sugli atomi di carbonio adiacenti a quelli che hanno il doppio legame, con conseguente formazione degli idroperossidi. Con la

separazione dell'olio dall'acqua di vegetazione, gli enzimi proteici e, quindi, solubili in acqua, vengono allontanati, per cui l'olio non è più soggetto ad ossidazione enzimatica ma può essere effetto dell'autoossidazione.

Il numero di perossidi è, quindi, una misura dell'ossidazione primaria di un olio, che viene seguita, poi, da un'ossidazione secondaria che consiste nella decomposizione degli idroperossidi con formazione di aldeidi, chetoni e altre sostanze volatili responsabili del difetto di rancido.

La determinazione viene effettuata mediante titolazione dello iodio molecolare liberatosi dallo ioduro di potassio con soluzione di tiosolfato di sodio 0,01 N (Regolamento CEE 2568/91).

Procedimento. In una beuta da 300 ml si pesa una quantità di olio, variabile da 1 a 10 g, in funzione del numero di perossidi presunto, si aggiungono 25 ml di miscela acido acetico glaciale-cloroformio (3:2 v/v) e si agita fino a soluzione completa. Si aggiunge 1 ml di soluzione satura di ioduro di potassio, si chiude la beuta e si agita con movimento rotatorio per 1 min, quindi si lascia a riposo al buio per 5 min esatti, tempo necessario per l'ossidazione dello ioduro a iodio da parte degli idroperossidi. Si aggiungono 75 ml di acqua distillata e alcune gocce di salda d'amido, indicatore che si colora di blu-viola in presenza di iodio, si titola con il tiosolfato fino a scomparsa del colore.

Espressione dei risultati. Il valore del numero di perossidi è dato da:

$$NP = V * N * 100 / m$$

dove:

V = volume (ml) di soluzione di tiosolfato consumato;

N = normalità della soluzione di tiosolfato;

m = massa del campione.

3.3.9 Determinazione degli indici spettrofotometrici nell'ultravioletto

Principio del metodo. Gli acidi grassi dell'olio di oliva sono caratterizzati da un diverso grado di insaturazione; essi sono in parte saturi (acido palmitico) in gran parte monoinsaturi (acido oleico) ed, in misura minore, polinsaturi (acido linoleico e

linolenico). I doppi legami tra gli atomi di carbonio (R-CH=CH-R') sono presenti in forma isolata. Quando si ha la formazione degli idroperossidi vi è la formazione di doppi legami coniugati che comportano una variazione nell'intensità di assorbimento nella regione dell'UV.

La coniugazione di due doppi legami determina un maggior assorbimento spettrofotometrico nella regione dell'UV alla lunghezza d'onda di 232 nm, mentre la coniugazione di tre doppi legami comporta un aumento dell'assorbimento alla lunghezza d'onda di 270 nm. A questa stessa lunghezza d'onda presentano massimi di assorbimento anche i prodotti secondari di ossidazione, derivanti dalla decomposizione degli idroperossidi (2,4-alcadienali).

L'ossidazione primaria, quindi, che comporta la formazione degli idroperossidi, fa aumentare l'assorbimento a 232 nm, mentre l'ossidazione secondaria, con formazione di composti carbonilici secondari, determina un aumento a 270 nm. I valori di tali assorbimenti sono espressi come estinzione specifica $E_{1\% \text{ 1cm}}$, cioè estinzione di una soluzione della sostanza grassa all'1% in spessore di 1 cm, e sono indicati con K (coefficiente di estinzione).

Procedimento. In un matraccio da 10 ml si pesano accuratamente 0,1000 g di olio portando a volume con esano spettrofotometricamente puro in modo da ottenere una soluzione all'1% (peso/volume). Sulla soluzione viene effettuata la lettura allo spettrofotometro, contro un bianco costituito dal solvente, alle lunghezze d'onda di 232 e 270 nm e a 262, 268 e 274 per il calcolo del ΔK inteso come:

$$\Delta K = K_{268} - \frac{K_{262} + K_{274}}{2}$$

Per l'analisi è stato utilizzato uno spettrofotometro a doppio raggio UV-visibile Shimadzu mod.UV-1601 (Shimadzu Italia, Milano).

3.3.10 Determinazione della composizione in acidi grassi

Principio del metodo. La composizione in acidi grassi è stata determinata mediante analisi gascromatografica dei relativi esteri metilici. Gli esteri metilici degli acidi grassi sono stati ottenuti tramite reazione di transesterificazione a freddo (Christie, 1982).

Dall'esame del cromatogramma si può risalire alla composizione qualitativa e quantitativa in acidi grassi dell'olio in esame.

Procedimento. A 0,4 ml di soluzione esanica di olio all'1% sono stati aggiunti 0,2 ml di soluzione metanolica di KOH 2N e si è agitato vigorosamente per 1 minuto; dopo aver ottenuto la completa separazione delle due fasi, 2 µl della fase superiore esanica sono stati prelevati ed iniettati nel gascromatografo.

Per l'analisi sono stati utilizzati:

- un gascromatografo SHIMADZU (mod. GC-17A) con rilevatore a fiamma di idrogeno (F.I.D.); software di acquisizione Class-VP Chromatography data system vers. 4.6 (Shimadzu Italia, Milano);
- una colonna capillare FAME da 60 m, i.d. 0,25 mm, con fase stazionaria 50 % Cianopropyl-Methyl Phenyl Silicone di 0,25 mm di spessore (Quadrex Corporation, New Heaven, U.S.A.).

Sono state adottate le seguenti condizioni operative:

- camera mantenuta a 170°C per i primi 20 minuti e successivo incremento termico di 10°C / min fino ad una temperatura di 220°C mantenuta per 5 min;
- temperatura iniettore: 250°C;
- temperatura FID: 250°C;
- gas di trasporto: elio;
- gas ausiliare: azoto;
- flusso di elio in colonna: 2 ml/min;
- rapporto di splittaggio: 1/60;
- quantità iniettata: 1 µl.

L'identificazione dei picchi è stata effettuata confrontando i tempi di ritenzione (R.T.) dei diversi acidi grassi con i tempi di ritenzione ottenuti iniettando una miscela di standards di esteri metilici di acidi grassi puri (Larodan, Malmoe, Svezia), nelle condizioni operative suddette.

3.3.11 Caratterizzazione della componente fenolica

Principio del metodo. Le sostanze fenoliche hanno una importanza notevole nella determinazione della qualità di un olio in quanto, non solo determinano la qualità organolettica contribuendo al fruttato (nota amaro-piccante) ma, essendo molecole antiossidanti, contribuiscono alla stabilità e conservabilità dell'olio. Il carattere amaro-piccante è dovuto ad alcune sostanze derivanti dalla parziale idrolisi dell'oleuropeina, molecola naturalmente presente nell'oliva; la loro ulteriore idrolisi nel corso della maturazione porta alla formazione di fenoli semplici che hanno un ridotto carattere amaro.

La componente fenolica è costituita da due diverse frazioni: una semplice ed una complessa, idrolizzabile. La prima frazione è rappresentata quasi interamente dal p-idrossifeniletanolo (tirosolo) e dal 3,4-diidrossifeniletanolo (idrossitirosolo). La seconda frazione, che è molto più abbondante, è formata da strutture complesse che contengono il tirosolo (agliconi del ligstroside) e l'idrossitirosolo (agliconi dell'oleuropeina), oltre ai legnami (pinoresinolo e 1-acetossipinoresinolo) vi sono altri composti non identificati.

Le sostanze fenoliche sono state determinate seguendo un metodo messo a punto per la loro estrazione quantitativa dall'olio e sono state analizzate mediante HPLC.

Partendo dalla metodica classica di estrazione descritta da Vasquez-Roncero (1978), si sono apportate alcune modifiche allo scopo di minimizzare i volumi di solvente utilizzati.

Procedimento. Un'aliquota di campione di olio (10 g) disciolto in esano (10 ml) è stata estratta in imbuto separatore con una miscela acqua/metanolo (40/60 v/v) (3x7ml); l'estratto idroalcolico ottenuto è stato lavato con esano per eliminare eventuali contaminazioni oleose e centrifugato per 10 minuti a 3500 giri/min.; la fase metanolica è stata raccolta in un pallone ed evaporata sottovuoto in evaporatore rotante (40°C). Il residuo è stato ripreso con 2 ml di metanolo ed un'aliquota di tale soluzione è stata utilizzata per l'analisi HPLC.

Per la separazione delle sostanze fenoliche si è utilizzata la cromatografia HPLC. È stata considerata come metodica di riferimento quella di Tsimidou *et al.*, (1992).

Le fasi eluenti utilizzate sono state le seguenti:

- acqua + acido trifluoroacetico (TFA) al 3%;

- metanolo 20% + acetonitrile 80%.

È stato utilizzato un gradiente di eluizione che parte dal 5% di metanolo/acetonitrile per arrivare in un tempo di 35 min al 98%.

Sono stati utilizzati:

- un HPLC (SHIMADZU, mod.LC-10ADVP) provvisto di rivelatore UV-Vis DIODE ARRAY (SHIMADZU, mod.SPD-M10AVP) e software di acquisizione Class-VP Chromatography data system vers. 4.6 (Shimadzu Italia, Milano);

- una colonna a fase inversa (Spherisorb S5 ODS3 250 x 4,6 mm i.d.). Flusso in colonna: 1 ml/min. Quantità iniettata: 20µl.

L'analisi quantitativa dei singoli componenti è stata condotta con riferimento ad uno standard esterno (tirosolo) impiegato per la costruzione della retta di calibrazione. L'identificazione dei principali picchi è stata effettuata per comparazione con i tempi di ritenzione di standard puri e sulla base degli spettri UV rilevati con il detector DAD. L'analisi quantitativa è stata condotta ad una lunghezza d'onda del rivelatore: 279 nm.

3.3.12 Composizione in tocoferoli

Principio del metodo. I tocoferoli sono i più conosciuti tra gli antiossidanti naturali, si ritrovano prevalentemente nei grassi vegetali dove svolgono la loro azione antiossidante come miscela di α - β - γ - δ -tocoferoli.

I tocoferoli dell'olio sono stati determinati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) su colonna a fase inversa.

Procedimento. A 0.20 g di olio sono aggiunti 3 ml di etile acetato. L'analisi quantitativa dei singoli tocoferoli è stata condotta con riferimento ad uno standard esterno (α -tocoferolo) impiegato per la costruzione della retta di calibrazione. I risultati sono stati espressi come α -tocoferolo (mg/kg di olio) (Tonolo e Marzo, 1989).

Le fasi eluenti utilizzate sono state le seguenti:

- a) metanolo + acqua + acetonitrile (73.2 : 1.8 : 25 v/v/v);
- b) acetato di etile.

È stata utilizzata una eluizione isocratica dell'eluente **a** per un tempo di 19 min; dopo completa eluizione dei tocoferoli si è eseguito un lavaggio della colonna passando, in circa un minuto, nelle stesse condizioni di flusso dal 100% di eluente **a** al 100% di eluente **b**; dopo il tempo necessario al lavaggio (circa 15 min) si è passati nuovamente al 100% dell'eluente **a**.

Sono stati utilizzati:

- un HPLC (SHIMADZU, mod.LC-10ADVP) provvisto di rilevatore UV-Vis DIODE ARRAY (SHIMADZU, mod.SPD-M10AVP) e software di acquisizione Class-VP Chromatography data system vers. 4.6 (Shimadzu Italia, Milano);
- una colonna a fase inversa (Spherisorb S5 ODS3 250 x 4,6 mm i.d.). Flusso in colonna : 1,8 ml/min. Quantità iniettata: 20µl.
- l'analisi è stata condotta ad una lunghezza d'onda del rilevatore di 290 nm.

3.3.13 Determinazione del colore

Principio del metodo. Nell'olio di oliva il colore caratteristico è dato dalla clorofilla a cui si associano i carotenoidi: tali pigmenti si ritrovano nell'oliva al di sotto della cuticola nei primi stadi del parenchima. La clorofilla, oltre all'impatto sul colore verde dell'olio, in presenza di luce è un agente pro-ossidante. I carotenoidi, responsabili del colore giallo degli oli ottenuti da olive mature dove il contenuto di clorofilla è minore, presentano un'azione protettiva sull'olio da eventuali processi di fotossidazione.

Procedimento. La determinazione della clorofilla e dei carotenoidi viene effettuata misurando l'assorbimento della soluzione di olio in esano (1:1 v/v) a determinate lunghezze d'onda: a 670 nm per la clorofilla, a 415-450-475 nm per i carotenoidi (Minguez *et al.*, 1991).

3.3.14 Analisi sensoriale

La caratterizzazione organolettica dei campioni di olio è stata effettuata, presso la sala di analisi sensoriale del Dipartimento di Scienza degli Alimenti, da un *panel* (giuria) di assaggiatori addestrati secondo quanto previsto dal Regolamento CE

796/02. Gli assaggiatori, allenati in sedute periodiche a riconoscere le sensazioni caratteristiche dell'olio ed a valutarne l'intensità, hanno esaminato il profilo sensoriale di ciascun campione. Le sedute di assaggio dei campioni sono state guidate da un capo-panel che ha avuto il compito di coordinare il lavoro degli assaggiatori di elaborare i risultati delle schede di assaggio che ogni assaggiatore è stato tenuto a compilare per ciascun olio degustato. In tal modo è stata valutata la presenza dei pregi oltre che di eventuali difetti. Affinché un olio possa essere classificato come "extravergine" deve risultare che la mediana del difetto sia uguale a zero e la mediana del fruttato maggiore di zero. Al di sotto di tale punteggio l'olio viene declassato nelle varie categorie inferiori (Reg CE 796/02).

3.3.15 Analisi delle sostanze volatili mediante Solid Phase Microextraction (SPME) (vd. § 2.2)

L'analisi quantitativa dei principali composti volatili presenti negli oli è stata calcolata attraverso il calcolo del fattore di risposta relativo mediante la seguente formula:

$$\text{Fattore di risposta relativo: } \frac{\text{Area X}}{\text{Area S.I.}} * \text{Quantità S.I.} * \frac{\text{Fattore di risposta S.I.}}{\text{Fattore di risposta X}}$$

dove:

l'area X è l'area del composto identificato

l'area S.I. è l'area dello standard interno, ovvero dell'isobutil acetato

la quantità S.I. è la quantità dello standard interno iniettato con l'olio pari a 2 ppm

il fattore di risposta S.I. è il fattore di risposta assoluto nel range di linearità dello S.I.

il fattore di risposta X è il fattore di risposta assoluto nel range di linearità del composto X

3.3.16 Analisi delle sostanze volatili mediante naso elettronico (vd. § 1.2)

3.3.17 Analisi delle Componenti Principali

L'Analisi delle Componenti Principali (PCA, Principal Component Analysis) consente di esplorare le possibili relazioni intercorrenti tra variabili, rendendo agevole la descrizione e la rappresentazione di fenomeni multidimensionali. Scopo primo della PCA è ottenere un piccolo gruppo di combinazioni lineari (Componenti Principali) da un insieme di numerose variabili (quantitative) di partenza (Gherghi, 1990). Se consideriamo un sistema di assi cartesiani, dove su ciascun asse sono riportati i valori assunti da una variabile, possiamo associare a ciascuna osservazione un punto del grafico, punto che sarà detto di dispersione. In pratica, si ricercano i parametri chimici e sensoriali che presentano una variabilità massima da zona a zona, cioè si ricercano le variabili sensoriali più significative per caratterizzare i diversi oli. Per l'effettuazione della PCA è stato utilizzato il software XISTAT Addinsoft version 7.1 (Parigi, Francia).

3.4 Risultati e discussione

Di seguito sono riportati e discussi i risultati ottenuti dalle analisi chimico-compositive e sensoriali effettuate sui campioni di oli monovarietale. Tali analisi sono state effettuate, prima di sottoporre gli oli a una prova di *shelf-life*, al fine di verificare il rispetto dei requisiti dei parametri chimici e sensoriali stabiliti dal regolamento CE 1989/03. Inoltre è stata effettuata una caratterizzazione della frazione volatile.

3.4.1 Indici di qualità.

In tabella **3.4.1.1** vengono riportati i valori degli indici di qualità e dell'analisi sensoriale relativi agli oli monovarietali.

Tabella 3.4.1.1 Valori degli indici di qualità (media \pm dev.st., n=3) riscontrati nei campioni di olio ottenuti dalle olive di diverse varietà della Penisola Sorrentina.

Sigla	Varieta'	perossidi		acidità		k_{232}		k_{270}		Dk	Mediana del fruttato	Mediana del difetto
CM	Minucciola	5,30 \pm 0,09	0,5 \pm 0,02	1,90 \pm 0,02	0,18 \pm 0,00	-0,008 \pm 0,00	4,40	0,00				
OM	Minucciola	6,80 \pm 0,14	0,5 \pm 0,05	1,77 \pm 0,00	0,19 \pm 0,01	-0,006 \pm 0,00	5,00	0,00				
RM	Minucciola	3,60 \pm 0,04	0,3 \pm 0,00	1,68 \pm 0,01	0,17 \pm 0,00	-0,007 \pm 0,00	5,00	0,00				
VM	Minucciola	6,70 \pm 0,63	0,5 \pm 0,01	1,45 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	-0,004 \pm 0,00	4,20	0,00				
PF	Frantoio	8,00 \pm 0,01	0,4 \pm 0,02	1,73 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	-0,003 \pm 0,00	4,00	0,00				
PN	Nocellara	5,30 \pm 0,01	0,3 \pm 0,00	1,62 \pm 0,08	0,10 \pm 0,01	-0,004 \pm 0,00	5,20	0,00				
PM	Minucciola	7,60 \pm 0,19	0,5 \pm 0,01	1,56 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	-0,004 \pm 0,00	4,50	0,00				
FM	Minucciola	2,59 \pm 0,14	0,3 \pm 0,03	1,63 \pm 0,01	0,16 \pm 0,00	-0,007 \pm 0,00	5,00	0,00				

Dall'osservazione dei dati si osserva come i parametri chimici (valori di acidità, numero dei perossidi ed UV) rientrino ampiamente nei limiti stabiliti per la categoria degli oli extra vergini di oliva (**tabella 3.1.3.1**) per tutti i campioni oggetto dello studio. Anche i risultati ottenuti mediante l'analisi sensoriale confermano che tutti i campioni sottoposti alla sperimentazione rientrano nella categoria degli oli extravergini di oliva.

3.4.2 Composizione in acidi grassi

Il particolare equilibrio nella composizione in acidi grassi dell' olio di oliva è proprio uno degli elementi su cui si basa la rivalutazione di questo prodotto quale grasso fondamentale in una dieta lipidica equilibrata. Esso è caratterizzato da un elevato rapporto tra acidi grassi insaturi e saturi con netta predominanza dell' acido oleico che, in quanto monoinsaturo, è piuttosto stabile alla conservazione e alla cottura. Una prolungata permanenza dell' oliva sulla pianta determina, invece, una progressiva diminuzione dell'acido palmitico e dell'oleico ed un aumento del linoleico. Quest'acido grasso, polinsaturo e facilmente ossidabile, determina una riduzione delle caratteristiche organolettiche e della stabilità del prodotto, favorendo l'insorgere del difetto di rancido (Ambrosino *et al.*, 2000).

La **Figura 3.4.2.1** mostra un esempio di profilo gascromatografico relativo agli esteri metilici degli acidi grassi di un campione di olio oggetto della sperimentazione.

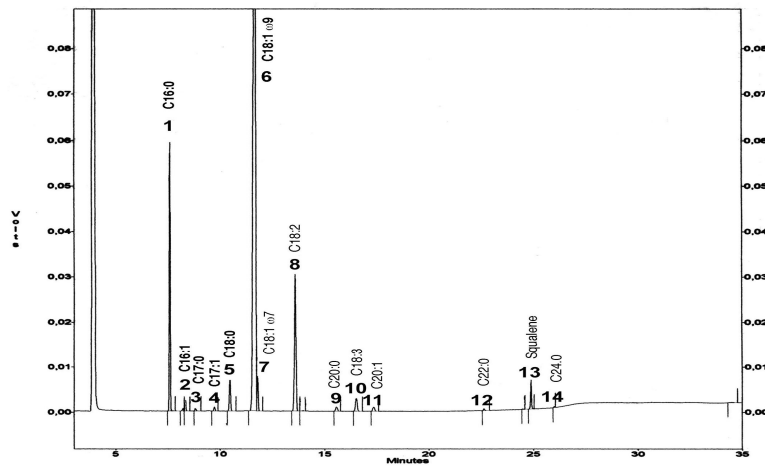


Figura 3.4.2.1 Esempio di profilo gascromatografico relativo agli esteri metilici degli acidi grassi di un campione di olio oggetto della sperimentazione.

In tabella **3.4.2.1** è riportato il contenuto percentuale dei principali acidi grassi riscontrati nei campioni di olio oggetto dello studio.

Tabella 3.4.2.1 Composizione percentuale in acidi grassi (media \pm dev.st., n=3) riscontrati nei campioni di olio ottenuti da olive monovarietali della penisola sorrentina.¹

Acidi grassi	PF	PN	PM	CM	OM	RM	VM	FM		
	frantoio	nocellara	minucciola	minucciola	minucciola	minucciola	minucciola	minucciola	minucciola	minucciola
C _{16:0}	Acido palmitico	14,70 \pm 0,06	14,15 \pm 0,01	15,71 \pm 0,05	15,83 \pm 0,02	14,28 \pm 0,03	13,70 \pm 0,04	15,63 \pm 0,01	13,23	0,00
C _{16:1}	Acido palmitoleico	1,06 \pm 0,01	1,25 \pm 0,01	1,19 \pm 0,06	1,17 \pm 0,01	0,90 \pm 0,02	0,92 \pm 0,00	1,16 \pm 0,01	0,82	0,00
C _{17:0}	Acido eptadecanoico	0,05 \pm 0,02	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,05 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00	0,06	0,00
C _{17:1}	Acido eptadecenoico	0,05 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,06	0,00
C _{18:0}	Acido stearico	2,40 \pm 0,08	3,04 \pm 0,03	3,39 \pm 0,01	3,89 \pm 0,00	2,86 \pm 0,08	3,56 \pm 0,02	3,69 \pm 0,02	3,20	0,00
C _{18:1}	Acido oleico	67,81 \pm 0,01	67,45 \pm 0,10	65,62 \pm 0,02	63,25 \pm 0,13	68,21 \pm 0,17	69,37 \pm 0,02	63,00 \pm 0,00	71,41	0,00
C _{18:1⁷}	Acido vaccenico	2,81 \pm 0,06	2,86 \pm 0,06	2,34 \pm 0,00	2,26 \pm 0,01	2,35 \pm 0,06	1,92 \pm 0,13	2,35 \pm 0,00	1,86	0,00
C _{18:2}	Acido linoleico	9,41 \pm 0,02	8,92 \pm 0,10	10,01 \pm 0,06	11,83 \pm 0,07	9,39 \pm 0,02	9,13 \pm 0,52	12,46 \pm 0,02	7,53	0,00
C _{20:0}	Acido arachico	0,39 \pm 0,01	0,36 \pm 0,03	0,47 \pm 0,02	0,51 \pm 0,01	0,44 \pm 0,05	0,48 \pm 0,02	0,45 \pm 0,02	0,48	0,00
C _{18:3}	Acido linolenico	0,63 \pm 0,01	0,59 \pm 0,02	0,49 \pm 0,01	0,54 \pm 0,07	0,57 \pm 0,10	0,54 \pm 0,01	0,53 \pm 0,05	0,56	0,00
C _{20:1}	Acido eicosenoico	0,23 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,17 \pm 0,13	0,16 \pm 0,02	0,24 \pm 0,00	0,17 \pm 0,00	0,18 \pm 0,04	0,22	0,00
C _{22:0}	Behenico	0,10 \pm 0,01	0,11 \pm 0,00	0,13 \pm 0,02	0,12 \pm 0,00	0,13 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02	0,12 \pm 0,00	0,12	0,00
	Squalene	0,32 \pm 0,05	0,92 \pm 0,04	0,25 \pm 0,02	0,20 \pm 0,01	0,38 \pm 0,01	0,36 \pm 0,00	0,18 \pm 0,00	0,41	0,00
C _{24:0}	Lignoicoico	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,05	0,00
	O/L	7,21	7,56	6,56	5,35	7,27	7,60	5,06	9,49	
	Insaturi/Saturi	4,64	4,58	4,03	3,87	4,58	4,57	3,99	4,81	

¹ decodifica campioni **Tabella 3.3.1.2**

La composizione in acidi grassi riscontrata negli oli della varietà *Minucciola*, tipica della Penisola Sorrentina, rispecchia la composizione media riscontrata in precedenti studi (AAVV, 2003). Infatti tale varietà risulta caratterizzata mediamente da un tenore in acido oleico non elevato (65%), mentre l'acido linoleico spesso supera il 10 %, e con un rapporto oleico/linoleico pari al 7%. L'acido linoleico, invece è presente in concentrazioni contenute. In **Figura 3.4.2.2.** si riportano il *loading plot* e lo *score plot* risultante dall'analisi delle componenti principali (varianza spiegata 76%) effettuata sugli acidi grassi rilevati nei campioni di olio sottoposti a sperimentazione.

Il contenuto percentuale dei principali acidi grassi riscontrati invece nei campioni di olio ottenuti da olive monovarietali di *Nocellara del Belice* e *Frantoio* provenienti dallo stesso ambiente di coltivazione, presenta una composizione differente, infatti come è possibile osservare dallo *score plot* i campioni di olio ottenuti da quest'ultime varietà si posizionano in una regione dello spazio lontana dai campioni della varietà *Minucciola*. Tali campioni infatti presentano un maggior contenuto di acido vaccenico, linoleico e di squalene rispetto ai campioni della varietà *Minucciola*.

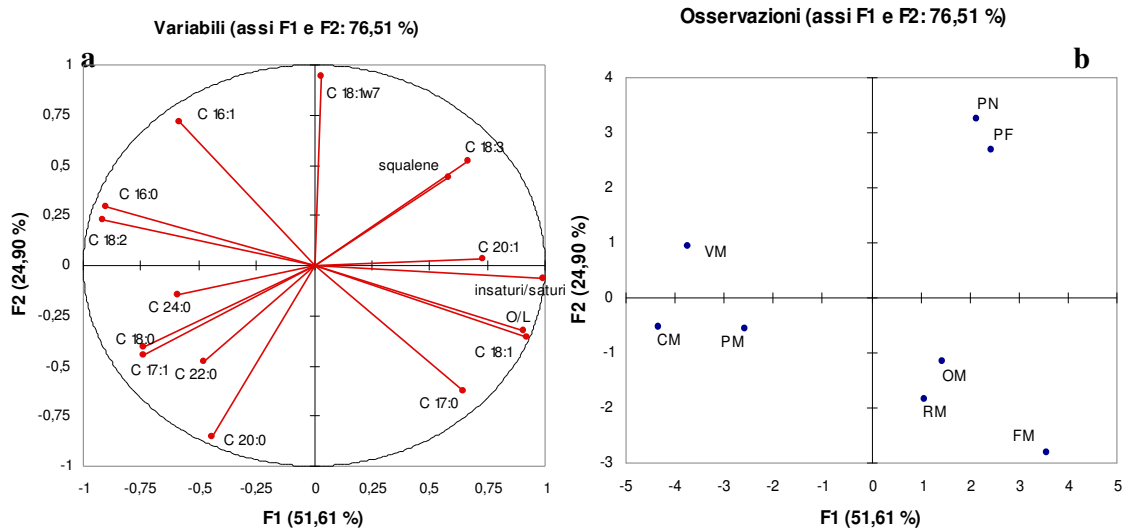


Figura 3.4.2.2 Loading plot (a) e score plot (b) risultante dalla PCA (totale varianza spiegata: 76%) effettuata sugli acidi grassi ottenuti dai campioni sottoposti a sperimentazione

Dall'analisi delle componenti principali riportata in **Figura 3.4.2.2** è possibile osservare come la composizione in acidi grassi della varietà *Minucciola* dei diversi campioni, risulta differenziata in funzione dell'altitudine, infatti i campioni OM, RM,

e FM sono quelli provenienti dalle aziende che si trovano collocate a una maggiore altitudine sul livello del mare (**Tabella 3.3.1**) e quindi caratterizzate da un maggior rapporto acidi grassi insaturi/saturi come riportato in letteratura (Mousa e Gerasopoulos, 1996). L'alto rapporto per le alte quote è probabilmente correlato al fatto che la più bassa temperatura favorisce l'insaturazione dell'olio. Simili risultati sono stati riportati in letteratura da Osman *et al.*, (1994). Il più alto livello di acidi grassi insaturi negli oli di alta altitudine, rispetto a quelli di bassa altitudine può accelerare la deteriorazione ossidativa (Kiritsakis, 1991). Comunque è chiaro che la composizione acidica dell'olio di oliva risulta fortemente influenzata dalla cultivar, dallo stato di maturazione del frutto e dalle condizioni pedoclimatiche (Montedoro *et al.*, 2003).

3.4.3 Valutazione della composizione fenolica e tocoferolica

In **Figura 3.4.3.1** sono riportati i dati inerenti la dotazione totale in composti fenolici rilevati negli oli della Penisola Sorrentina.

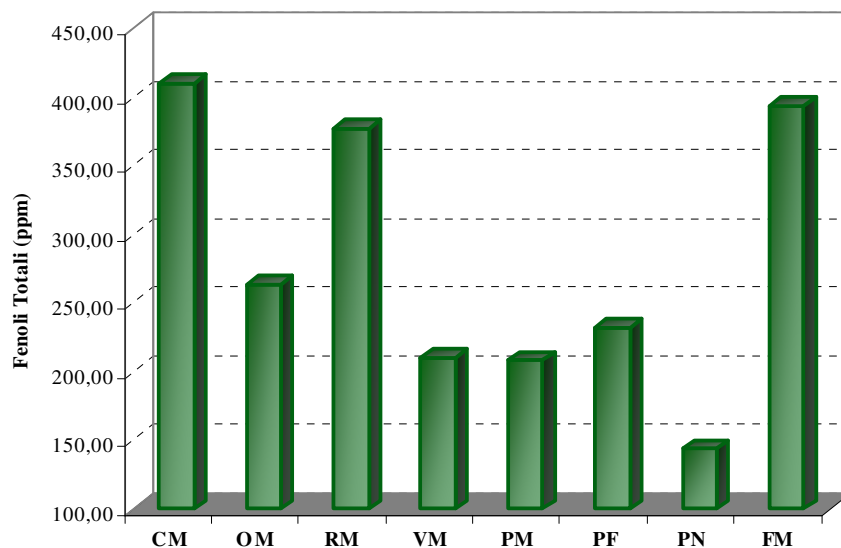


Figura 3.4.3.1. Fenoli totali rilevati sui campioni di olio sottoposti alla sperimentazione.

La caratterizzazione della componente fenolica effettuata mediante HPLC sui campioni oggetto dello studio viene riportata in **Tabella 3.4.3.1**

Le varietà *Frantoio* e *Minucciola* appaiono caratterizzate da un medio contenuto di composti fenolici totali (circa 200-230ppm), mentre l'olio ottenuto dalle olive della varietà *Nocellara del Belice* si presenta meno ricco di tali composti. Tale differenza è da attribuire, in particolar modo, alla minore presenza del composto OHTy-EA, aglicone dell'oleuropeina, caratterizzato da un'elevata attività antiossidante e del Ty-EDA e del Ty-EA, agliconi del ligstroside. Tutte le varietà risultano, invece, prive o poco ricche di idrossitirosolo libero (OHTy) e, probabilmente, ciò è attribuibile allo stadio di maturazione poco avanzato delle olive ed alla rapida lavorazione delle stesse (entro le 24 h dalla raccolta) che ha evitato l'idrolisi fenolica.

Tabella 3.4.3.1 Composizione fenolica (ppm tirosolo) (media \pm dev.st, n=3) riscontrata nei campioni di olio monovarietali al tempo iniziale

Composti fenolici	PF	PN	PM	CM	OM	RM	VM	FM
	frantoio	nocellara	minucciola	minucciola	minucciola	minucciola	minucciola	minucciola
OHTy idrossitirosolo	nq ²	nq	nq	0,35 \pm 0,03	3,14 \pm 0,78	0,08 \pm 0,05	2,74 \pm 0,1	nq
Ty tirosolo	4,98 \pm 0,82	4,64 \pm 0,83	2,29 \pm 0,14	1,63 \pm 0,08	8,13 \pm 1,79	0,74 \pm 0,13	5,15 \pm 0,25	0,62 \pm 0,05
r.t. 14	3,87 \pm 0,86	5,7 \pm 0,14	1,64 \pm 0,49	2,96 \pm 0,09	7,24 \pm 3,35	1,66 \pm 0,34	2,01 \pm 0,45	1,79 \pm 0,00
OHTy-EDA forma dialdeidica della decarbossimetiloleuropeina aglicone	21,85 \pm 0,43	34,24 \pm 0,36	53,04 \pm 3,19	149,85 \pm 1,61	40,89 \pm 3,18	125,16 \pm 1,48	42,89 \pm 0,9	136,94 \pm 0,61
Ty-EDA forma dialdeidica della decarbossimethyligstroside aglicone	113,2 \pm 0,09	59,56 \pm 0,07	68,9 \pm 3,8	104,6 \pm 1,89	64,05 \pm 1,09	81,27 \pm 1,79	60,1 \pm 0,88	80,78 \pm 4,00
PR pinosesinolo	61,99 \pm 0,24	21,31 \pm 0,13	22,12 \pm 1,04	48,81 \pm 3,24	76,48 \pm 2,05	62,79 \pm 4,28	62,39 \pm 2,43	69,61 \pm 4,10
OHTy-EA forma aldeidica dell'oleuropeina aglicone	13,83 \pm 0,39	12,42 \pm 0,24	44,83 \pm 1,45	82,47 \pm 0,7	37,55 \pm 10,21	65,40 \pm 6,44	26,69 \pm 1,35	72,73 \pm 3,38
Ty-EA forma aldeidica del ligstroside aglicone	12,71 \pm 0,79	5,93 \pm 0,11	15,15 \pm 0,6	18,81 \pm 0,74	25,64 \pm 15,2	14,48 \pm 2,13	8,16 \pm 0,38	14,43 \pm 1,53
Totali	232,4 \pm 3,44	143,82 \pm 1,47	207,98 \pm 10,42	409,50 \pm 1,19	263,12 \pm 29,11	377,08 \pm 36,85	210,14 \pm 6,74	392,76 \pm 13,75

²nq= non quantificabile

In **Tabella 3.4.3.2** si riporta il contenuto in tocoferoli degli oli monovarietali.

Tabella 3.4.3.2 Composizione in tocoferoli (ppm α tirosolo) (media \pm dev.st, n=3) riscontrata nei campioni di olio monovarietali al tempo iniziale

Tocoferoli	PF	PN	PM	CM	OM	RM	VM	FM
	frantoio	nocellara	minucciola	minucciola	minucciola	minucciola	minucciola	minucciola
α -tocoferolo	73,00 \pm 1,37	107,00 \pm 1,46	93,00 \pm 5,51	109,00 \pm 2,50	133,00 \pm 0,26	104,00 \pm 0,63	118,00 \pm 10,80	98,00 \pm 1,15
β + γ -tocoferolo	nq	nq	nq	nq	2,00 \pm 0,41	nq	nq	1,56 \pm 0,23
δ -tocoferolo	nq	nq	nq	nq	1,00 \pm 0,30	nq	nq	1,15 \pm 0,16

n.q = non quantificabile

Per tutte le varietà si riscontra un basso tenore in tocoferoli, con valori inferiori ai 110 ppm, ad eccezione del campione OM (133 ppm). L'olio ottenuto dalle olive della varietà *Frantoio* si presenta meno ricco di tali composti. In tutti i campioni si riscontra la presenza dell' α -tocoferolo che è il maggior tocoferolo presente nell'olio di oliva (Boatella, 1975; Andrikopoulos *et al.*, 1989).

3.4.4 Pigmenti

La misura dei pigmenti, effettuata mediante spettrofotometria nel visibile, è riportata in **Tabella 3.4.4.1**

Tabella 3.4.4.1 Valori degli assorbimenti spettrofotometrici alle lunghezze d'onda 450 nm e 670 nm (media \pm dev.st., n=3) riscontrati nei campioni di olio monovarietali oggetto dello studio

		Clorofilla		Carotenoidi	
		ABS 670 nm		ABS 450 nm	
PF	frantoio	0,410	\pm 0,02	1,095	\pm 0,05
PN	nocellara	0,206	\pm 0,01	0,734	\pm 0,03
PM	minucciola	0,358	\pm 0,00	1,269	\pm 0,00
CM	minucciola	0,265	\pm 0,00	0,922	\pm 0,01
OM	minucciola	0,195	\pm 0,00	0,708	\pm 0,00
RM	minucciola	0,205	\pm 0,01	0,751	\pm 0,02
VM	minucciola	0,182	\pm 0,01	0,754	\pm 0,01
FM	minucciola	0,314	\pm 0,00	1,110	\pm 0,00

I valori di tali indici si presentano molto variabili, probabilmente ciò può essere legato alla diversa esposizione degli oliveti da cui provengono gli oli.

3.4.5 Analisi sensoriale

In **Figura 3.4.5.1** sono riportati i profili sensoriali di tre campioni di olio appartenenti alle tre varietà e provenienti dallo stesso ambiente di coltivazione, ottenuti dalla caratterizzazione organolettica effettuata dal panel di assaggiatori

esperti sugli oli oggetto dello studio, mentre in **Tabella 3.4.5.1** sono riportati i valori delle mediane degli attributi sensoriali relativi alla descrizione del profilo aromatico dei campioni analizzati rilevato mediante panel test.

Dall'osservazione dei profili sensoriali si evidenzia come l'olio di Nocellara del Belice presenti una elevata nota di fruttato di oliva ed una chiara percezione di mela e pomodoro verde, tipica di questa varietà. Inoltre, sono presenti medie percezioni di erba e foglia e decise percezioni di piccante ed amaro. L'olio di Frantoio si presenta equilibrato nelle sue percezioni di fruttato, erba e foglia, con leggere note di pomodoro e mela. L'olio di Minucciola presenta delle note fruttate più attenuate con una maggiore percezione di foglia rispetto alla percezione di erba; inoltre il panel ha evidenziato note di erbe aromatiche tipiche degli oli della Penisola Sorrentina. Tali note sono state riscontrate per tutti gli oli della varietà Minucciola sottoposti ad analisi.

Tabella 3.4.5.1 Valori delle mediane degli attributi sensoriali riscontrati nei campioni sottoposti a sperimentazione e rilevati mediante panel test

	Fruttato di oliva	Mela	Foglia	Erba	Amaro	Piccante	Dolce	Mandorla	Pomodoro verde	Vegetale amaro	Erbe aromatiche
CM	4,4	0,0	3,6	1,7	6,4	5,7	0,7	0,6	0,8	2,1	0,3
VM	4,1	0,0	3,1	1,1	3,9	3,9	2,1	1,4	0,7	0,2	1,1
RM	5,0	0,6	2,1	1,8	5,2	4,7	1,3	1,0	1,7	1,2	1,1
OM	5,0	0,3	2,1	1,7	4,3	5,6	2,1	1,3	1,8	0,1	0,7
FM	5,0	0,4	1,7	3,1	5,0	5,7	1,0	0,6	1,6	1,7	0,8
PM	4,5	1,6	1,6	0,7	3,6	3,9	3,3	1,6	0,3	0,2	1,1
PF	4	0,8	1,4	2,1	3,4	4,6	3,5	1,3	1,5	0,0	0,0
PN	5,2	1,8	1,9	2,5	3,9	5,1	3,3	1,6	2,7	1,0	0,0

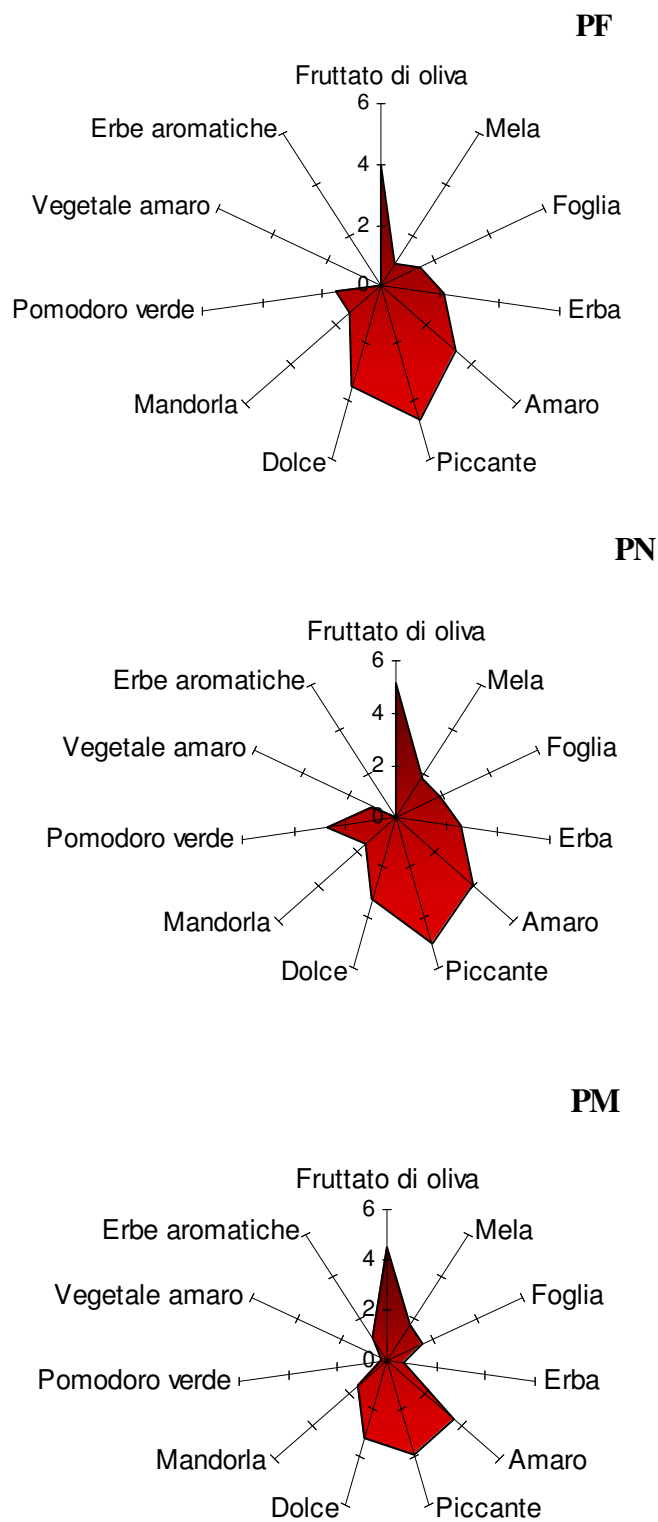


Figura 3.4.5.1 Profili sensoriali degli oli ottenuti da olive della varietà *Frantoio* (PF), *Nocellara del Belice* (PN) e *Minucciola* (PM).

3.4.6 Analisi dei composti volatili mediante naso elettronico e mediante SPME-GC/MS

In **Figura 3.4.6.1** si riporta il *biplot* derivante dall'analisi delle componenti principali (Varianza spiegata 90%) ottenuta dall'analisi effettuata sulle risposte dei sensori del Naso Elettronico. Come è possibile osservare dal *biplot*, lo strumento riesce a discriminare i diversi campioni. Le differenze tra i diversi campioni della stessa varietà potrebbero essere dovute alla diversa altitudine a cui sono collocati gli uliveti e al diverso tipo di coltivazione a cui sono stati sottoposti. Infatti alcuni oliveti sono consociati con agrumi altri invece specializzati. Per il naso elettronico i campioni PM, PF e PN, vengono differenziati in quanto appartenenti a tre varietà diverse, ma allo stesso tempo vengono posizionati nello stesso quadrante probabilmente perchè prodotti nella stessa azienda olivicola.

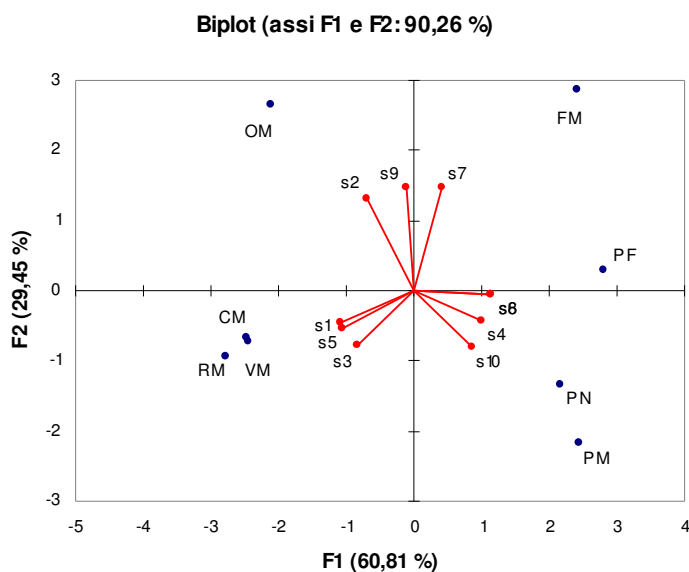


Figura 3.4.6.1 Biplot risultante dalla PCA effettuata sulle risposte del naso elettronico sui campioni di olio iniziali

Per completare la caratterizzazione iniziale degli oli oggetto dello studio, è stata effettuata l'analisi SPME-GC/MS con la metodica messa a punto e descritta nel § 2.2. Il quadro compositivo delle sostanze volatili rilevato mediante l'analisi SPME-GC/MS è riportato in **Tabella 3.4.6.1**

Sono stati identificati 83 composti, presenti in concentrazioni variabili nei diversi campioni.

L'analisi della frazione volatile di oli extravergini di oliva, effettuata col tecnica SPME-GC/MS, ha permesso di trarre delle interessanti considerazioni circa l'applicabilità della metodica allo studio dei marcatori chimici dei pregi e delle note tipiche. In **tabella 3.4.6.2** si riportano i valori relativi alle principali classi di composti volatili rilevati negli oli extravergine di oliva della Penisola Sorrentina.

Tabella 3.4.6.2. Composizione della frazione volatile, espressa in $\mu\text{g S.I./kg}$ di olio ed in percentuale sul totale degli oli oggetto dello studio analizzati mediante SPME-GC/MS.

		Aldeidi	Alcoli	Chetoni	Terpeni	Esteri	Totali
PM	$\mu\text{g/Kg}$	29723	15069	2793	2051	3846	53482
	%	56	28	5	4	7	
CM	$\mu\text{g/Kg}$	38663	9703	2499	898	3538	55301
	%	70	18	5	2	6	
FM	$\mu\text{g/Kg}$	40730	8868	1174	665	6784	58221
	%	70	15	2	1	12	
OM	$\mu\text{g/Kg}$	86412	15798	5315	1355	2672	111551
	%	77	14	5	1	2	
VM	$\mu\text{g/Kg}$	42047	14987	2414	1236	5315	65999
	%	64	23	4	2	8	
PF	$\mu\text{g/Kg}$	42165	18517	3570	5465	2620	72337
	%	58	26	5	8	4	
PN	$\mu\text{g/Kg}$	18055	14878	2341	2039	3077	40390
	%	45	37	6	5	8	
RM	$\mu\text{g/Kg}$	45172	9822	1696	722	6783	64196
	%	70	15	3	1	11	

Alla somma delle aldeidi hanno contribuito i composti (5, 8, 15, 17, 19, 24, 28, 29, 38, 43, 50, 52, 58, 63, 66, 67, 71, 74, 79 e 81); alla somma degli alcoli i composti (3, 6, 16, 20, 22, 27, 31, 41, 46, 47, 48, 51, 55, 56, 59, 64, 68, 69, 72, 75, 76, 82, 83); alla somma dei chetoni i composti (2, 4, 7, 11, 23, 33, 36, 39, 40, 45, 49, 53, 65); alla somma dei terpeni i composti (21, 25, 26, 32, 34, 60, 61, 77, 78); alla somma degli esteri i composti (9, 10, 18, 35, 42, 44, 57, 70, 80) di **tabella 3.4.6.1**

Osservando gli istogrammi riportati in **figura 3.4.6.2**, è evidente come l'**olio OM**, proveniente da olive della varietà *Minucciola* presenti un maggiore contenuto in volatili totali rispetto agli altri oli, mentre l'**olio PN**, proveniente da olive della varietà *Nocellara*, risulta meno ricco in composti volatili totali. L'**olio PF**, proveniente da olive della varietà *Frantoio*, presenta un medio contenuto di composti volatili totali e un più alto contenuto di composti terpenici.

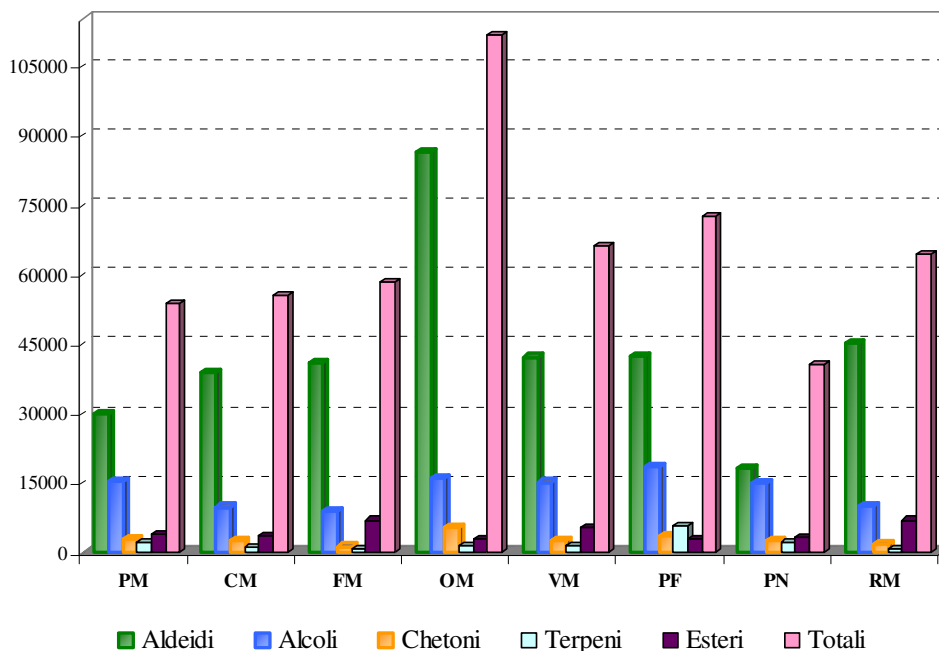


Figura 3.4.6.2. Composizione della frazione volatile degli oli oggetto dello studio analizzati mediante HS-SPME/GCMS

La somma delle aldeidi rappresenta più dell'50% dei volatili totali presenti negli oli e questo ci evidenzia come gli oli siano degli extravergini di buona qualità in quanto caratterizzati per la maggior parte da tutti quei composti responsabili del *bouquet* aromatico di un olio extravergine di oliva di buona qualità (Aparicio e Morales, 1998; Angerosa, 2002).

Le altre classi di composti (chetoni, terpeni ed esteri) sono presenti tutti in quantità modeste.

In **Figura 3.4.6.3** si riportano il *loading plot* e lo *score plot* risultante dall'analisi delle componenti principali (varianza spiegata 90%) effettuata sulle principali classi di composti volatili che caratterizzano il *flavour* degli oli sottoposti ad analisi.

Dall'analisi delle componenti principali riportata in **Figura 3.4.6.3** è possibile osservare come i campioni vengano differenziati in funzione della composizione delle sostanze volatili. In particolare il campione OM si differenzia dagli altri per il maggior contenuto di composti volatili, i campioni PM, PF e PN, seppur appartenenti a tre varietà diverse, vengono raggruppati probabilmente in quanto prodotti nella stessa azienda olivicola. Nel complesso la distribuzione dei campioni nello spazio rispecchia quella ottenuta dai dati relativi alle risposte dei sensori del naso elettronico (**figura 3.4.6.1**).

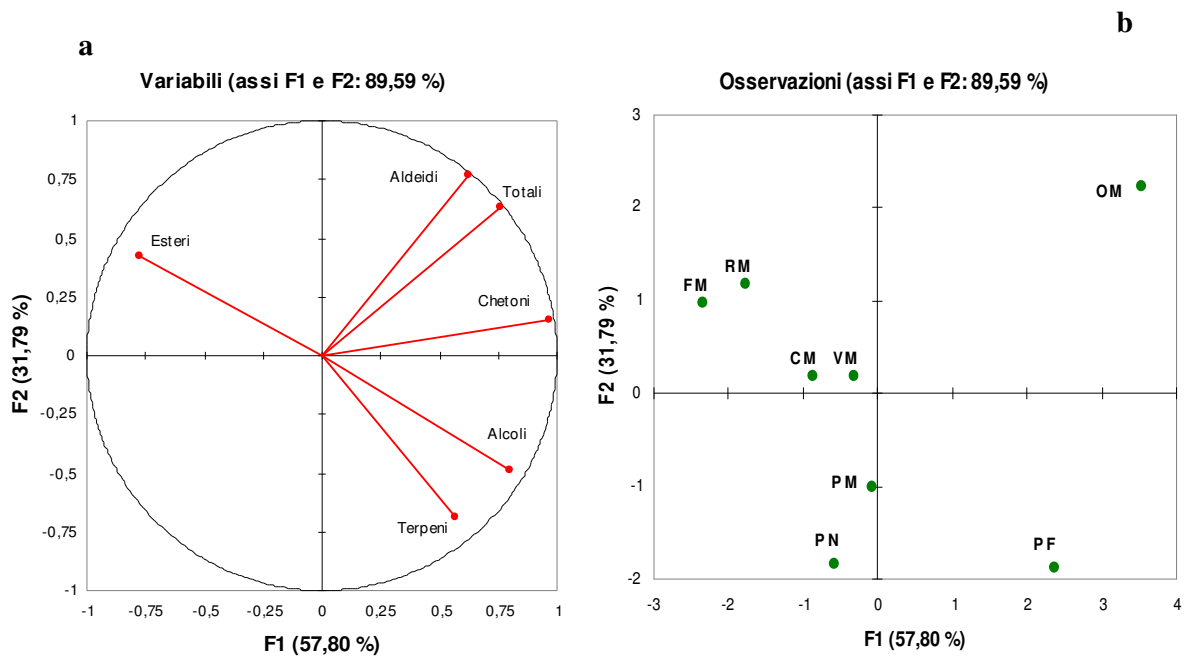


Figura 3.4.6.3 Loading plot (a) e score plot (b) risultante dalla PCA (totale varianza spiegata: 90%) effettuata sulle principali classi di composti volatili che caratterizzano il flavour degli oli sottoposti ad analisi.

3.5 Valutazione della shelf-life

Gli oli campionati, dopo la caratterizzazione iniziale sono stati sottoposti a un periodo di conservazione e analizzati dopo 12 e 18 mesi.

3.5.1 Indici di qualità.

In **Tabella 3.5.1.1** vengono riportati i valori degli indici di qualità relativi agli oli iniziali oggetto della sperimentazione e dopo 12 e 18 mesi di conservazione di conservazione al buio e a temperatura ambiente ($20 \pm 5^\circ\text{C}$).

Tabella 3.5.1.1 Valori degli indici di qualità (media \pm dev.st., n=3) riscontrati nei campioni di olio iniziali e dopo 12 e 18 mesi di conservazione¹.

Sigla		Acidita'	Perossidi	k ₂₃₂	k ₂₇₀	Δk
CM	0	0,50 ^a \pm 0,02	5,30 ^a \pm 0,09	1,90 ^a \pm 0,02	0,18 ^a \pm 0,00	-0,008 ^a \pm 0,00
	12	0,54 ^b \pm 0,03	5,31 ^a \pm 0,16	2,04 ^b \pm 0,01	0,15 ^b \pm 0,00	-0,004 ^b \pm 0,00
	18	0,56 ^b \pm 0,01	6,22 ^b \pm 0,06	2,22 ^c \pm 0,01	0,20 ^c \pm 0,00	-0,005 ^c \pm 0,00
OM	0	0,50 ^a \pm 0,05	6,80 ^a \pm 0,14	1,77 ^a \pm 0,00	0,19 ^a \pm 0,01	-0,006 ^a \pm 0,00
	12	0,49 ^b \pm 0,01	5,95 ^b \pm 0,10	1,89 ^b \pm 0,00	0,14 ^b \pm 0,00	-0,003 ^b \pm 0,00
	18	0,57 ^c \pm 0,01	7,40 ^c \pm 0,14	1,95 ^c \pm 0,05	0,20 ^c \pm 0,04	-0,001 ^c \pm 0,00
RM	0	0,30 ^a \pm 0,00	3,60 ^a \pm 0,04	1,68 ^a \pm 0,01	0,17 ^a \pm 0,00	-0,007 ^a \pm 0,00
	12	0,35 ^a \pm 0,00	4,13 ^b \pm 0,13	1,79 ^b \pm 0,01	0,12 ^b \pm 0,00	-0,001 ^b \pm 0,00
	18	0,38 ^b \pm 0,02	7,20 ^c \pm 0,00	2,04 ^c \pm 0,01	0,16 ^c \pm 0,00	-0,004 ^c \pm 0,00
VM	0	0,50 ^a \pm 0,01	6,70 ^a \pm 0,63	1,45 ^a \pm 0,01	0,10 ^a \pm 0,01	-0,004 ^a \pm 0,00
	12	0,64 ^b \pm 0,01	6,62 ^a \pm 0,07	1,80 ^b \pm 0,07	0,12 ^b \pm 0,00	-0,001 ^b \pm 0,00
	18	0,68 ^c \pm 0,00	7,70 ^b \pm 0,42	1,79 ^c \pm 0,02	0,14 ^b \pm 0,01	-0,001 ^b \pm 0,00
PF	0	0,40 ^a \pm 0,02	8,00 ^a \pm 0,01	1,73 ^a \pm 0,01	0,12 ^a \pm 0,01	-0,003 ^a \pm 0,00
	12	0,52 ^b \pm 0,03	5,51 ^b \pm 0,45	2,03 ^b \pm 0,00	0,19 ^b \pm 0,00	0,004 ^b \pm 0,00
	18	0,56 ^c \pm 0,01	7,20 ^a \pm 0,28	2,16 ^c \pm 0,01	0,24 ^c \pm 0,00	0,005 ^c \pm 0,00
PN	0	0,30 ^a \pm 0,00	5,30 ^a \pm 0,01	1,62 ^a \pm 0,08	0,10 ^a \pm 0,01	-0,004 ^a \pm 0,00
	12	0,39 ^b \pm 0,04	6,43 ^b \pm 0,27	2,09 ^b \pm 0,00	0,12 ^b \pm 0,00	-0,005 ^b \pm 0,00
	18	0,39 ^b \pm 0,02	7,30 ^c \pm 0,42	1,94 ^c \pm 0,06	0,18 ^c \pm 0,05	-0,001 ^c \pm 0,00
PM	0	0,50 ^a \pm 0,01	7,60 ^a \pm 0,19	1,56 ^a \pm 0,00	0,12 ^a \pm 0,00	-0,004 ^a \pm 0,00
	12	0,54 ^b \pm 0,06	6,35 ^b \pm 0,16	1,99 ^b \pm 0,01	0,17 ^b \pm 0,00	-0,002 ^b \pm 0,00
	18	0,56 ^b \pm 0,01	8,00 ^a \pm 0,57	2,17 ^c \pm 0,00	0,27 ^c \pm 0,00	0,004 ^b \pm 0,00
FM	0	0,29 ^a \pm 0,02	2,59 ^a \pm 0,14	1,63 ^a \pm 0,00	0,16 ^a \pm 0,00	-0,007 ^a \pm 0,00
	12	0,28 ^a \pm 0,01	3,73 ^b \pm 0,16	1,82 ^b \pm 0,00	0,21 ^b \pm 0,00	-0,002 ^b \pm 0,00
	18	0,30 ^a \pm 0,00	3,97 ^b \pm 0,24	1,83 ^b \pm 0,00	0,17 ^b \pm 0,02	-0,005 ^c \pm 0,00

¹ lettere diverse sulla stessa colonna indicano valori significativamente ($p < 0,05$) differenti (ANOVA)

Dall'osservazione dei dati è possibile notare come i parametri chimici rientrino nei limiti stabiliti per la categoria degli oli extra-vergini di oliva anche per i campioni dopo 18 mesi di conservazione. Tale situazione si verifica per tutti gli oli analizzati

ad eccezione dei campioni PF e PM che dopo 18 mesi di conservazione superano i limiti stabiliti per legge per i valori del K_{270} e del ΔK .

In **Figura 3.5.1.1** si riportano il *loading plot* e lo *score plot* risultante dall'analisi delle componenti principali (varianza spiegata 88%) effettuata sugli indici di ossidazione rilevati nei campioni di olio.

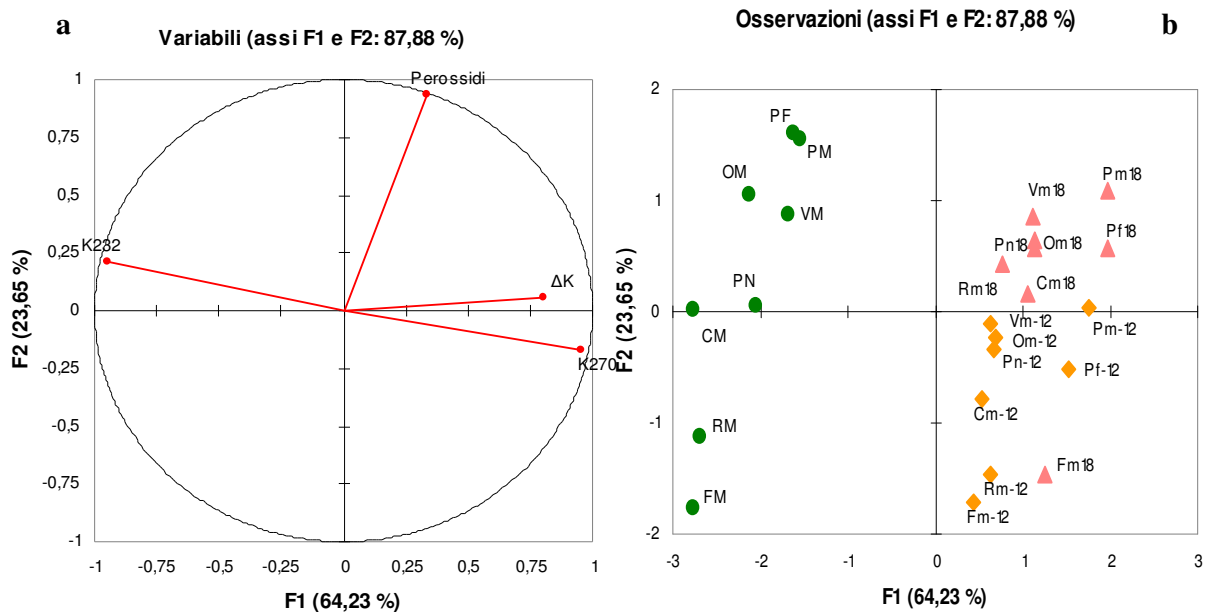


Figura 3.5.1.1 Loading plot (a) e score plot (b) risultante dalla PCA (totale varianza spiegata: 88%) effettuata sugli indici di ossidazione ottenuti dai campioni della penisola Sorrentina.

Dallo *score plot* riportato in **Figura 3.5.1.1** è possibile osservare come i campioni vengano distinti in funzione del periodo di conservazione. I campioni analizzati subito dopo la trasformazione e quindi caratterizzati da indici di ossidazione più bassi si trovano nella parte sinistra dello *score plot*, mentre i campioni sottoposti alla prova di conservazione si raggruppano nella parte destra. In particolare, gli oli dopo conservazione si dividono in due gruppi ben distinti caratterizzati dagli oli dopo 12 e dopo 18 mesi di conservazione, fa eccezione il campione FM a 18 mesi in quanto si colloca nella regione dello spazio dei campioni a 12 mesi, questo perché risulta caratterizzato da più bassi indici di ossidazione secondari e come vedremo in seguito dalla discussione dei dati sensoriali non risulta nemmeno caratterizzato del difetto di rancido.

3.5.2 Valutazione della composizione fenolica

Negli oli, durante la conservazione, il contenuto e l'evoluzione delle sostanze fenoliche ad azione antiossidante sono influenzati dall'entità delle reazioni di idrolisi e di ossidazione (autoossidazione e fotossidazione) che avvengono parallelamente e che sono a loro volta soggette a diversi altri fattori (composizione iniziale, temperatura, radiazione luminosa, tipo di contenitore, quantità di ossigeno).

La composizione fenolica determinata mediante HPLC sui campioni oggetto dello studio viene riportata in **Tabella 3.5.2.1**

In **Figura 3.5.2.1** si riporta un esempio di profili fenolici ottenuti mediante HPLC di un campione di olio ai diversi tempi di conservazione.

Nel corso della conservazione, come mostrato in **Figura 3.5.2.1**, si è assistito ad un incremento del contenuto di fenoli semplici (OHTy e Ty).

Tale incremento, statisticamente significativo (ANOVA $p < 0,05$) (**tabella 3.5.2.1**) si è verificato in tutti gli oli oggetto dello studio e può essere spiegato dal fatto che gli oli ottenuti mediante un processo di micro-oleificazione hanno subito solo una blanda filtrazione per cui l'acqua residua ha accelerato le reazioni di idrolisi a carico dei fenoli complessi contenenti OHTy e Ty (Fregapane et al., 2006; Sacchi et al., 1995).

Per quanto riguarda i fenoli complessi OHTy-EDA e Ty-EDA si è osservato un decremento di tali composti dopo 12 mesi di conservazione, mentre dopo 18 mesi per alcuni oli si è verificato un ulteriore decremento, per gli altri il contenuto di fenoli è rimasto invariato al valore che avevano raggiunto a 12 mesi (**tabella 3.5.2.1**). Situazione inversa si è verificata per i fenoli complessi OHTy-EA e Ty-EA, in quanto si è osservato un aumento di tali composti fino a 12 mesi di conservazione, e un successivo decremento negli oli dopo 18 mesi.

Tale aumento potrebbe essere spiegato dal fatto che gli oli appena prodotti si sono mostrati torbidi e quindi durante il processo di separazione, con la metodica utilizzata che prevede l'utilizzo di un imbuto separatore, si è potuto verificare una minore estrazione dei componenti fenolici. Durante la conservazione, invece, tutte le mucillagini e i sedimenti sono decantati e sono stati allontanati mediante la filtrazione su garze sterili prima delle analisi. Questo ha potuto determinare una maggiore estraibilità dei composti fenolici e quindi l' "apparente" aumento di quest'ultimi nel corso della conservazione.

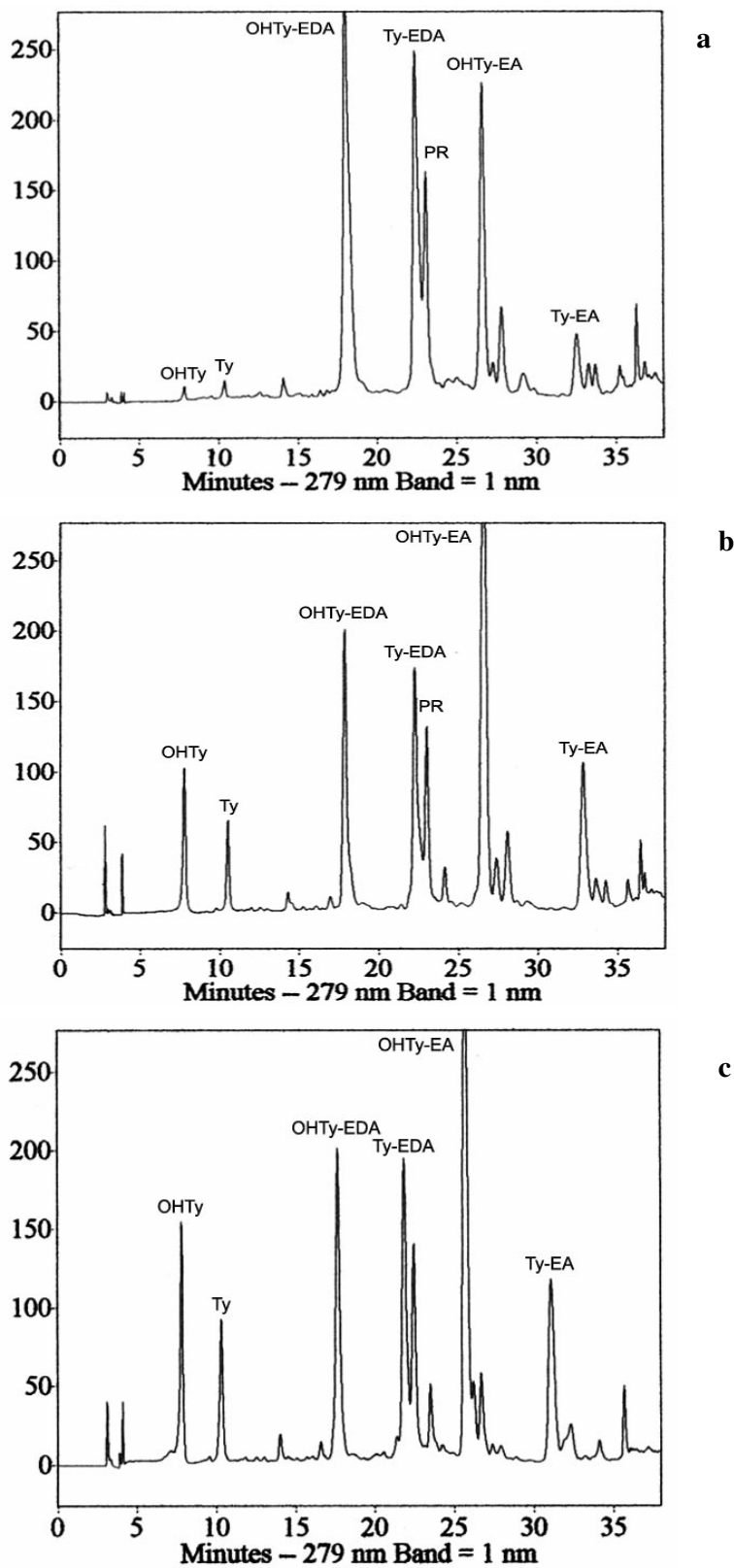


Figura 3.5.2.1 Esempio di profili fenolici rilevati mediante HPLC del campione CM iniziale (a) e dopo 12 (b) e 18 (c) mesi di conservazione.

Tabella 3.5.2.1. Composizione fenolica (ppm tirosolo) (media \pm dev.st., n=3) riscontrata nei campioni di olio sottoposti alla prova di conservazione

Sigla		OHTy	Ty	r.t 14	OHTy-EDA	Ty-EDA	PR	OHTy-EA	Ty-EA	Totali
CM	0	0,35 ^a \pm 0,03	1,63 ^a \pm 0,08	2,96 ^a \pm 0,09	149,85 ^a \pm 1,61	104,60 ^a \pm 1,89	48,81 ^a \pm 3,24	82,47 ^a \pm 0,70	18,81 ^a \pm 0,74	409,50 ^a \pm 1,19
	12	23,64 ^b \pm 2,36	13,70 ^b \pm 1,00	3,43 ^b \pm 0,05	44,02 ^b \pm 5,88	44,03 ^b \pm 9,01	39,16 ^b \pm 0,74	129,75 ^b \pm 16,27	41,72 ^b \pm 4,19	355,22 ^b \pm 2,90
	18	32,69 ^c \pm 0,71	21,68 ^c \pm 0,12	3,73 ^c \pm 0,08	64,71 ^c \pm 0,14	63,48 ^c \pm 0,55	42,14 ^b \pm 0,90	129,90 ^b \pm 1,33	50,47 ^c \pm 0,45	424,55 ^c \pm 0,04
OM	0	3,14 ^a \pm 0,78	8,13 ^a \pm 1,79	7,24 ^a \pm 3,35	40,89 ^a \pm 3,18	64,05 ^a \pm 1,09	76,48 ^a \pm 2,05	37,55 ^a \pm 10,21	25,64 ^a \pm 15,20	263,12 ^a \pm 29,11
	12	16,37 ^b \pm 3,45	15,02 ^b \pm 2,81	7,40 ^a \pm 0,08	29,70 ^b \pm 3,13	61,50 ^a \pm 8,01	81,40 ^a \pm 2,74	49,24 ^a \pm 6,17	24,16 ^a \pm 2,22	300,56 ^a \pm 4,10
	18	19,84 ^c \pm 0,39	20,11 ^c \pm 1,34	5,20 ^a \pm 0,67	28,78 ^b \pm 1,82	57,98 ^b \pm 2,74	81,91 ^a \pm 4,06	44,74 ^a \pm 2,52	26,52 ^a \pm 3,34	300,83 ^a \pm 16,87
RM	0	0,08 ^a \pm 0,05	0,74 ^a \pm 0,13	1,66 ^a \pm 0,34	125,16 ^a \pm 1,48	81,27 ^a \pm 1,79	62,79 ^a \pm 4,28	65,40 ^a \pm 6,44	14,48 ^a \pm 2,13	377,08 ^a \pm 36,85
	12	11,47 ^b \pm 1,08	7,05 ^b \pm 0,31	3,52 ^b \pm 0,24	71,97 ^b \pm 0,34	65,65 ^b \pm 0,77	65,86 ^a \pm 0,66	112,18 ^b \pm 1,49	31,82 ^b \pm 0,75	385,28 ^a \pm 5,16
	18	17,09 ^c \pm 0,11	12,24 ^c \pm 0,27	3,17 ^b \pm 0,39	69,62 ^b \pm 6,43	65,55 ^b \pm 3,62	69,51 ^a \pm 4,65	99,41 ^c \pm 10,94	33,16 ^b \pm 2,96	385,52 ^a \pm 28,04
VM	0	2,74 ^a \pm 0,10	5,15 ^a \pm 0,25	2,01 ^a \pm 0,45	42,89 ^a \pm 0,90	60,10 ^a \pm 0,88	62,39 ^a \pm 2,43	26,69 ^a \pm 1,35	8,16 ^a \pm 0,38	210,14 ^a \pm 6,74
	12	16,88 ^b \pm 1,47	17,04 ^b \pm 1,50	5,82 ^b \pm 0,01	29,89 ^b \pm 1,13	50,97 ^b \pm 0,62	69,43 ^b \pm 0,12	36,08 ^b \pm 2,36	16,26 ^b \pm 0,43	258,15 ^b \pm 7,61
	18	17,45 ^b \pm 1,26	20,06 ^c \pm 0,84	3,41 ^c \pm 0,23	27,73 ^c \pm 1,48	52,59 ^b \pm 2,40	70,87 ^b \pm 2,83	32,11 ^c \pm 1,54	14,77 ^c \pm 0,99	254,76 ^b \pm 11,58
PF	0	nq ^a	4,98 ^a \pm 0,82	3,87 ^a \pm 0,86	21,85 ^a \pm 0,43	113,19 ^a \pm 0,09	61,99 ^a \pm 0,24	13,83 ^a \pm 0,39	12,71 ^a \pm 0,79	232,41 ^a \pm 3,44
	12	1,14 ^b \pm 0,02	11,90 ^b \pm 1,19	5,93 ^b \pm 0,10	18,62 ^b \pm 0,62	88,03 ^b \pm 7,29	59,06 ^b \pm 2,73	12,11 ^b \pm 1,00	15,43 ^b \pm 0,59	227,98 ^a \pm 11,14
	18	2,57 ^c \pm 0,11	16,24 ^c \pm 0,03	4,45 ^a \pm 0,01	18,68 ^b \pm 1,83	101,30 ^c \pm 0,14	67,73 ^c \pm 0,13	13,73 ^a \pm 0,95	27,56 ^c \pm 0,28	268,02 ^b \pm 1,30
PN	0	nq ^a	4,64 ^a \pm 0,83	5,70 ^a \pm 0,14	34,24 ^a \pm 0,36	59,56 ^a \pm 0,07	21,31 ^a \pm 0,13	12,42 ^a \pm 0,24	5,93 ^a \pm 0,11	143,82 ^a \pm 1,47
	12	7,47 ^b \pm 0,35	10,93 ^b \pm 1,23	10,43 ^b \pm 0,62	15,18 ^b \pm 1,37	28,68 ^b \pm 2,71	24,51 ^b \pm 1,09	11,39 ^b \pm 0,27	17,32 ^b \pm 2,24	141,68 ^b \pm 0,48
	18	4,40 ^c \pm 0,04	10,16 ^b \pm 0,12	6,84 ^c \pm 0,14	29,46 ^c \pm 1,33	53,90 ^c \pm 0,55	23,74 ^b \pm 0,90	11,79 ^c \pm 0,08	10,82 ^c \pm 0,45	166,88 ^c \pm 0,71
PM	0	nq ^a	2,29 ^a \pm 0,14	1,64 ^a \pm 0,49	53,04 ^a \pm 3,19	68,90 ^a \pm 3,80	22,12 ^a \pm 1,04	44,83 ^a \pm 1,45	15,15 ^a \pm 0,60	207,98 ^a \pm 10,42
	12	10,38 ^b \pm 1,09	10,74 ^b \pm 1,21	5,54 ^b \pm 1,15	35,55 ^b \pm 2,05	52,61 ^b \pm 2,55	20,46 ^a \pm 1,30	51,60 ^b \pm 3,65	28,78 ^b \pm 2,28	231,42 ^b \pm 15,29
	18	12,13 ^c \pm 0,07	14,85 ^c \pm 0,66	2,55 ^a \pm 0,21	35,31 ^b \pm 1,19	61,12 ^a \pm 8,30	24,86 ^b \pm 0,95	51,46 ^b \pm 2,38	19,75 ^c \pm 1,52	237,79 ^b \pm 15,29
FM	0	nq ^a	0,62 ^a \pm 0,05	1,79 ^a \pm 0,00	136,94 ^a \pm 0,61	80,87 ^a \pm 4,00	69,61 ^a \pm 4,10	72,73 ^a \pm 3,38	14,43 ^a \pm 1,53	392,76 ^a \pm 13,75
	12	51,52 ^b \pm 8,15	12,01 ^b \pm 1,14	0,74 ^b \pm 0,57	28,40 ^b \pm 3,80	31,31 ^b \pm 7,55	38,75 ^b \pm 9,13	71,63 ^a \pm 4,67	24,50 ^b \pm 8,13	274,66 ^b \pm 23,38
	18	16,25 ^c \pm 0,20	9,11 ^c \pm 0,54	2,46 ^c \pm 0,04	74,22 ^c \pm 0,54	74,15 ^a \pm 2,09	72,48 ^a \pm 0,37	145,55 ^b \pm 1,74	45,22 ^c \pm 1,31	455,21 ^c \pm 0,42

n.q= non quantificabile

In **Figura 3.5.2.2.** si riportano il *loading plot* e lo *score plot* risultante dall'analisi delle componenti principali (varianza spiegata 70%) effettuata sugli indici di ossidazione e sulla composizione fenolica rilevati nei campioni di olio ai diversi tempi di conservazione.

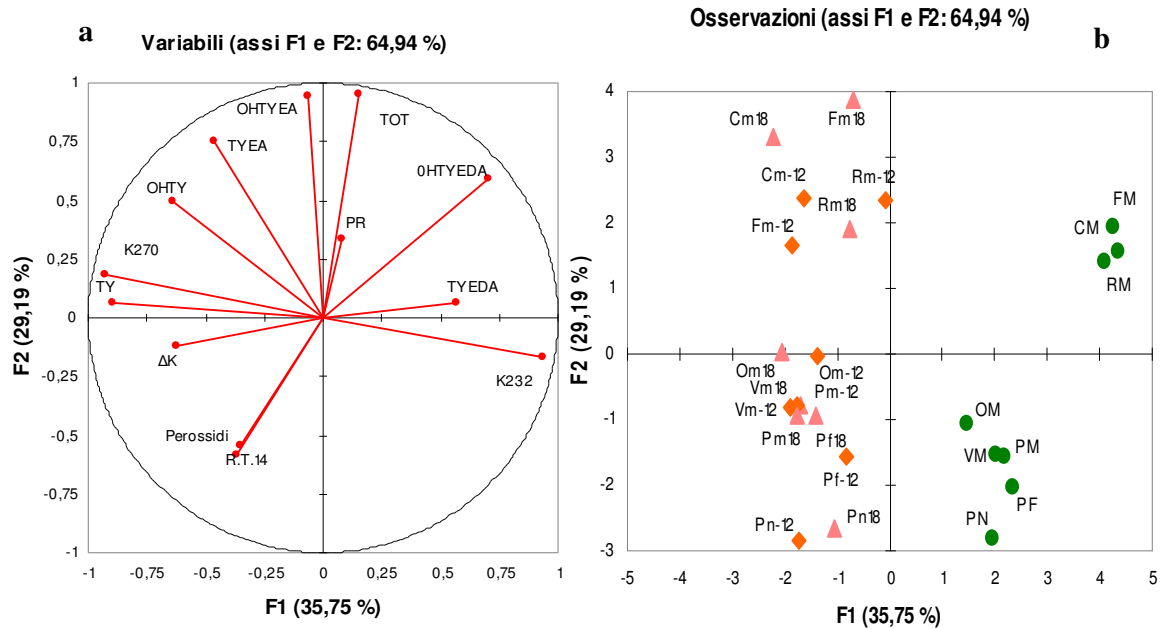


Figura 3.5.2.2 Loading plot (a) e score plot (b) risultante dalla PCA (totale varianza spiegata: 70%) effettuata sugli indici di ossidazione e sulla composizione fenolica ottenuti dai campioni sottoposti alla prova di conservazione.

Dallo *score plot* riportato in **Figura 3.5.2.2.** è possibile osservare come lungo la prima componente principale i campioni si differenzino in funzione del periodo di conservazione. A destra dello *score plot* possiamo osservare i campioni iniziali caratterizzati da più bassi indici di ossidazione e da un maggior contenuto di OHTy-EDA e Ty-EDA mentre non si osservano ulteriori differenziazioni tra i campioni analizzati dopo 12 e 18 mesi di conservazione.

3.5.3 *Analisi sensoriale e analisi dei composti volatili mediante naso elettronico*

Con l'introduzione della valutazione organolettica quale parametro obbligatorio nel Regolamento CE 2568/91 in cui, nell'Allegato I, è stato per la prima volta indicato un valore derivato dalla valutazione organolettica a cui riferirsi per definire le varie categorie di oli vergini di oliva si è evidenziata l'esigenza della ricerca di un metodo strumentale che possa sostituire o affiancare l'elemento umano nella valutazione sensoriale degli oli vergini di oliva. Per rispondere a questa esigenza negli ultimi dieci anni sono stati proposti e sviluppati diversi sistemi olfattivi artificiali (SOA). I sistemi olfattivi artificiali detti comunemente nasi elettronici, come precedentemente discusso sono strumenti formati da un insieme di sensori con parziale specificità ed un appropriato sistema di trattamento dei dati, in grado di caratterizzare e riconoscere odori semplici e complessi (Gardner e Barlett, 1994). Un sistema elettronico elimina anche gli svantaggi legati alla presenza di *panel* umani, quali per esempio la soggettività del giudizio, cioè la variabilità individuale, e l'adattamento, cioè la diminuzione della sensibilità durante esposizioni prolungate a un odore. La valutazione dell'impronta aromatica mediante un "naso elettronico" è una intrigante opportunità per gli studi di *shelf life*, consentendo di parametrizzare rapidamente ed oggettivamente l'evoluzione delle molte reazioni degradative che influenzano i caratteri del *flavour* di un alimento. Le applicazioni del naso elettronico sono per la maggior parte indirizzate alla caratterizzazione e/o discriminazione rapida di prodotti: in questo caso, l'"impronta olfattiva" registrata dai sensori del naso elettronico è correlata, mediante tecniche statistiche multivariate, ad altri indicatori di qualità o alla percezione sensoriale. Ancora poche, anche in questo caso, sono le ricerche che sfruttano l'abilità e la rapidità di risposta di tali attrezzature per la descrizione della cinetica di marker qualitativi durante la conservazione (ad esempio, per gli oli vergini di oliva, il monitoraggio dei difetti legati alla conservazione, quali rancido e morchia) o durante la trasformazione dei prodotti alimentari.

Per questo motivo questa parte del lavoro di tesi di dottorato è stata impostata per approfondire tale aspetto nello studio della conservazione degli oli. I campioni di olio extravergine di oliva oggetto dello studio sono stati sottoposti ad analisi sensoriale (Panel Test) e strumentale (SPME/GCMS e Naso Elettronico).

In **Tabella 3.5.3.1** vengono riportati i valori delle mediane degli attributi sensoriali rilevati mediante panel test degli oli al tempo iniziale e dopo 12 e 18 mesi di conservazione.

Tabella 3.5.3.1 Valori delle mediane degli attributi sensoriali relativi alla descrizione del profilo sensoriale

		Fruttato di oliva	Mela	Foglia	Erba	Amaro	Piccante	Dolce	Mandorla	Pomodoro verde	Vegetale amaro	Erbe aromatiche	Rancido
CM	0	4,4	0,0	3,6	1,7	6,4	5,7	0,7	0,6	0,8	2,1	0,3	0,0
	12	2,0	0,0	1,3	0,0	4,6	2,4	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0
	18	1,5	0,0	0,0	0,0	3,0	2,6	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5
VM	0	4,1	0,0	3,1	1,1	3,9	3,9	2,1	1,4	0,7	0,2	1,1	0,0
	12	2,2	0,0	1,6	0,0	3,6	2,0	3,3	1,0	0,0	0,0	0,0	1,6
	18	1,0	0,0	0,0	0,0	1,7	1,0	3,7	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2
RM	0	5,0	0,6	2,1	1,8	5,2	4,7	1,3	1,0	1,7	1,2	1,1	0,0
	12	3,3	0,0	1,8	0,0	4,8	3,5	1,5	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0
	18	2,5	0	1,2	0,0	4,0	3,0	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0
OM	0	5,0	0,3	2,1	1,7	4,3	5,6	2,1	1,3	1,8	0,1	0,7	0,0
	12	2,8	0,0	1,0	0,0	4,0	3,0	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8
	18	1,5	0,0	0,0	0,0	2,7	2	4,7	3	0,0	0,0	0,0	3,0
FM	0	5,0	0,4	1,7	3,1	5,0	5,7	1,0	0,6	1,6	1,7	0,8	0,0
	12	3,4	0,0	1,3	1,0	4,2	3,5	2,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
	18	2,5	0,0	1,2	0,0	2,7	3,5	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
PM	0	4,5	1,6	1,6	0,7	3,6	3,9	3,3	1,6	0,3	0,2	1,1	0,0
	12	3,0	0,0	0,8	0,0	4,0	3,2	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0
	18	2,0	0,0	0,0	0,0	2,5	3,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,3
PF	0	4,0	0,8	1,4	2,1	3,4	4,6	3,5	1,3	1,5	0,0	0,0	0,0
	12	1,8	0,0	1,0	0,0	2,1	2,1	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0
	18	1,5	0,0	0,0	0,0	2,0	3,0	5,2	0,0	0,0	0,0	0,0	3,7
PN	0	5,2	1,8	1,9	2,5	3,9	5,1	3,3	1,6	2,7	1,0	0,0	0,0
	12	3,0	0,0	1,3	0,0	2,5	3,2	2,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0
	18	2,5	0,0	0,0	0,0	3,0	3,0	4,0	1,0	0,0	0,0	0,0	3,0

Come è possibile osservare dalla **Tabella 3.5.3.1** il profilo sensoriale degli oli è apparso differenziato per i diversi tempi di conservazione, in particolare gli attributi di fruttato amaro e piccante sono stati riscontrati in tutti i campioni, anche dopo 18 mesi di conservazione, seppur attenuati. Le note di erba, mela, pomodoro verde e erbe aromatiche invece sono state rilevate solo nei campioni iniziali, infatti durante la conservazione tali note si sono attenuate e l'insorgenza del difetto di rancido non ha permesso di farle percepire agli assaggiatori.

Nella **Figura 3.5.3.1** si mostra il loading plot delle variabili (a) e lo score plot dei campioni (b) ottenuti mediante l'analisi delle componenti principali sui dati relativi alla descrizione del profilo sensoriale.

Lungo la prima componente principale (varianza spiegata 60%) i campioni vengono discriminati in funzione del difetto di rancido, a destra dello *score plot* si osservano i campioni al tempo iniziale, al centro i campioni dopo 12 mesi e a sinistra i campioni dopo 18 mesi di conservazione.

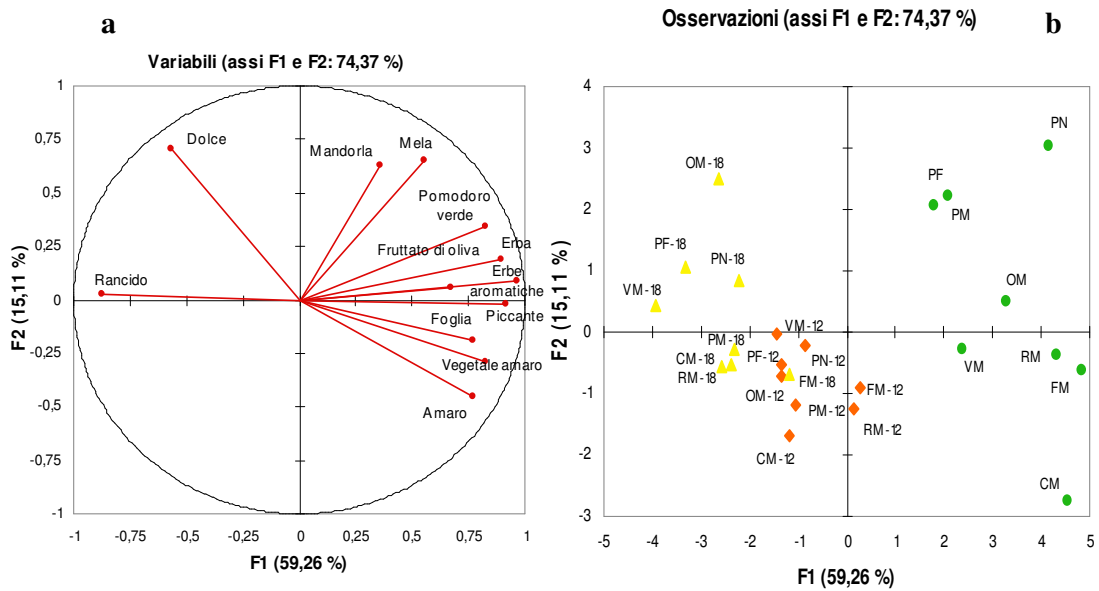


Figura 3.5.3.1 Loading plot (a) e score plot (b) risultante dalla PCA (totale varianza spiegata: 75%) effettuata sui dati relativi alla descrizione del profilo sensoriale.

Dopo l’analisi sensoriale effettuata sui campioni, è stato analizzato anche lo spazio di testa degli oli mediante Naso Elettronico.

In **Figura 3.5.3.2** si riporta il biplot ottenuto mediante l’analisi delle componenti principali (varianza spiegata 78%), dei dati ottenuti dal naso elettronico.

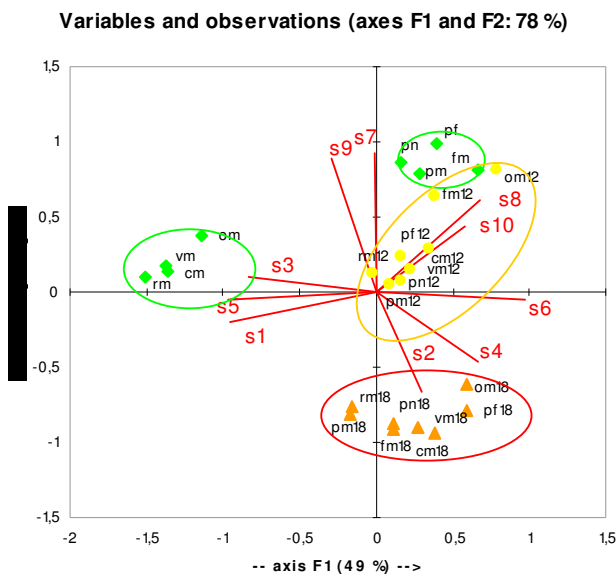


Figura 3.5.3.2. Analisi delle Componenti Principali (PCA), varianza spiegata 78%, dei dati ottenuti sulle risposte dei sensori del naso elettronico.

Dal biplot si osserva come esiste una buona discriminazione dei campioni oggetto di studio ai diversi tempi di conservazione. In particolare, il naso elettronico distingue due gruppi di oli “freschi” provenienti da diverse aree. Dopo 12 e 18 mesi di conservazione con l’insorgere del difetto di rancido il naso elettronico non è più

capace di separare i due gruppi ma risulta evidente l'abilità dello strumento di discriminare i campioni con una intensità crescente del difetto di rancido (**Tabella 3.5.3.1**).

In **Figura 3.5.3.3** si riporta l'analisi delle componenti principali effettuata sulle risposte dei sensori del naso elettronico e sui dati del panel test (mediana del difetto e del fruttato). Anche in questo caso è possibile osservare una buona separazione tra i campioni al tempo iniziale e dopo 12 e 18 mesi conservazione. Il *biplot* mostra una buona correlazione tra i dati sensoriali e quelli ottenuti mediante naso elettronico.

Da questi risultati è possibile osservare come il naso elettronico riesca a discriminare oli extra vergini di oliva "freschi" caratterizzati da "note verdi" da quelli "vecchi" caratterizzati da una crescente intensità del difetto di rancido confermando i dati ottenuti da Aparicio *et al.* (2000).

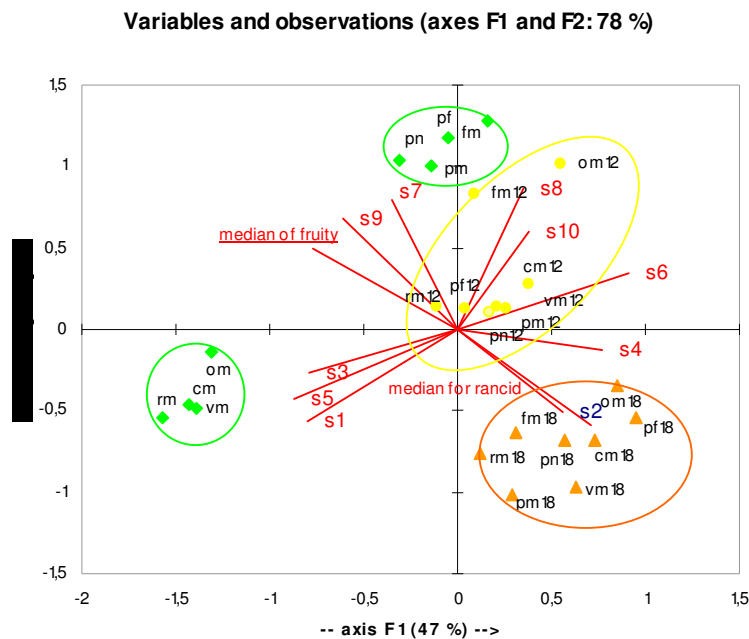


Figura 3.5.3.3. Analisi delle Componenti Principali (PCA), varianza spiegata 78%, dei dati ottenuti sulle risposte dei sensori del naso elettronico e sui dati ottenuti mediante panel test .

3.5.4 Analisi dei composti volatili mediante SPME-GC/MS

Per studiare i cambiamenti ossidativi che si verificano negli oli attraverso l'analisi dello spazio di testa mediante SPME l'attenzione è stata focalizzata sui principali prodotti di ossidazione secondaria derivanti dall'acido oleico, linoleico e linolenico, insieme ad altri composti che mostrano una concentrazione variabile durante i processi ossidativi (Vichi *et al.*, 2003 b). La selezione dei composti volatili

responsabili del difetto di rancido negli oli è stata fatta in accordo con i dati presenti in letteratura (Aparicio *et al.*, 2000; Vichi *et al.*, 2003 b; Morales *et al.*, 1997; Morales *et al.*, 2005, Kalua *et al.*, 2007), ma anche tenendo presente i composti standard iniettati e le relative rette di taratura ottenute. La concentrazione dei principali composti marcatori del difetto di rancido negli oli ottenuta mediante *spme* è riportata in **Tabella 3.5.4.1**

Durante l'ossidazione sono state monitorate diverse aldeidi, solo il comportamento della pentanale non è stato considerato perché coeluisce con il 3-pentanone sulla colonna usata, come precedentemente segnalato (Vichi *et al.*, 2003 b). Si è verificato un aumento della nonanale e dell'esnale (picchi 50 e 15, rispettivamente di **Figura 3.5.4.1.**). La presenza dell'eptanale, dell'ottanale e della nonanale, in oli conservati, può essere attribuita a reazioni di decomposizione degli idroperossidi formati dell'autossidazione dell'acido oleico. La quantità di esnale invece è dovuta sia all'autossidazione che alla cascata della lipossigenasi, con la formazione di 13-LOOH (idroperossido dell'acido linoleico) (Olias *et al.*, 1993; Vichi *et al.*, 2003 b).

Per le 2-alchenali analizzate si sono osservati aumenti durante il periodo di conservazione, ad eccezione della *trans*-2-esnale (picco 29); che ha mostrato comportamenti variabili nei diversi oli e non ha mostrato differenze statisticamente significative (Anova $p < 0,05$). La sua presenza è attribuita principalmente all'ossidazione enzimatica dell'acido linoleico piuttosto che all'autossidazione dell'acido linolenico (Przybylski *et al.*, 1995). Gli aumenti delle 2-alchenali analizzate (*trans*-2-eptenale, *trans*-2-ottanale, *trans*-2-nonanale, *trans*-2-decenale) sembrano originarsi da reazioni secondarie di prodotti dell'ossidazione primaria del 16-e 13-idroperossido dell'acido linolenico e 9-idroperossido dell'acido oleico (Vichi *et al.*, 2003 b).

In **figura 3.5.4.1** si riporta un esempio di profilo cromatografico relativo a un olio extravergine di oliva (**PM**) al tempo 0 (**a**) e dopo 18 mesi (**b**).

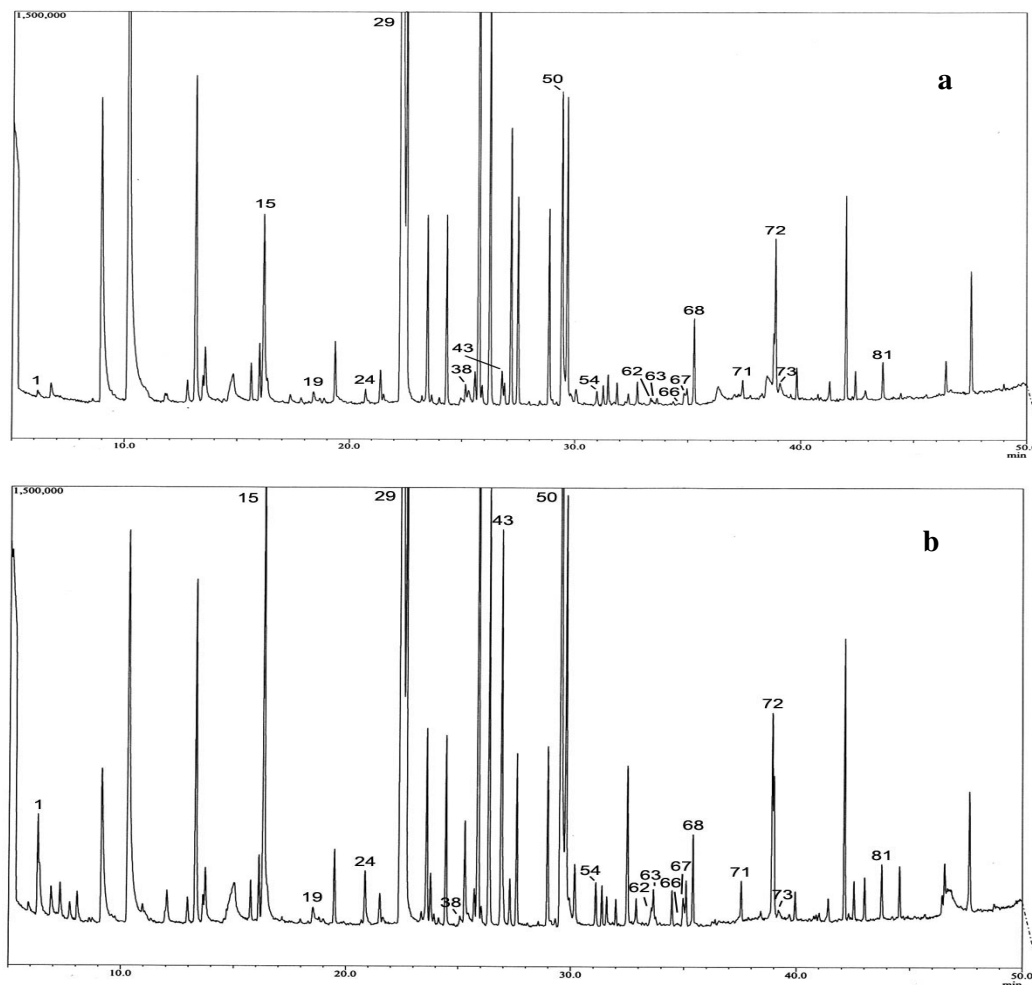


Figura 3.5.4.1 Cromatogramma (TIC) ottenuto dall'analisi GC/MS delle sostanze volatili dell'olio PM campionato via SPME al tempo 0 (**a**) e dopo 18 mesi di conservazione (**b**) Identificazione dei picchi come in **Tabella 3.4.6.1**.

Nello spazio di testa dei campioni sono stati osservati anche aumenti della 2,4 eptadienale (picco 63), 2,4 nonadienale (picco 73) e 2,4 decadienale (picco 81) che derivano dalla decomposizione 12- idroperossido dell'acido linolenico e 9- idroperossido dell'acido oleico. Tali composti hanno mostrato una buona risposta, in quanto è stato osservato un loro aumento in funzione del periodo di conservazione.

In generale, negli oli sottoposti a conservazione si sono osservate differenze nella concentrazione dei principali composti volatili presi in esame tra i campioni iniziali e dopo 12 mesi di conservazione, dopo 18 mesi non sempre si sono verificate differenze statisticamente significative. Quindi la valutazione dei prodotti di

ossidazione che presentano l'acido oleico come loro precursore dovrebbe essere un reale modo per valutare la condizione ossidativa di un olio in quanto la loro presenza nello spazio di testa dell'olio di oliva è dovuta esclusivamente all'ossidazione chimica. Infatti l'ossidazione enzimatica interessa soltanto l'acido linoleico e linolenico portando alla formazione dei composti volatili del C₆. Sia l'ottano che la nonanale derivano dall'autossidazione dell'acido oleico e per questo motivo possono essere considerati dei buoni indici della degradazione ossidativa, ma siccome l'ottano non sempre è rilevabile in grosse quantità, la nonanale resta un buon indice della degradazione ossidativa, come riscontrato in precedenti studi (Aparicio, 2000; Vichi *et al.*, 2003 b).

In **Figura 3.5.4.2** si riporta l'analisi delle componenti principali effettuata sulle risposte dei sensori del naso elettronico, sui dati del panel test (mediana del difetto e del fruttato) e sui composti volatili che hanno mostrato un maggior aumento durante la prova di conservazione.

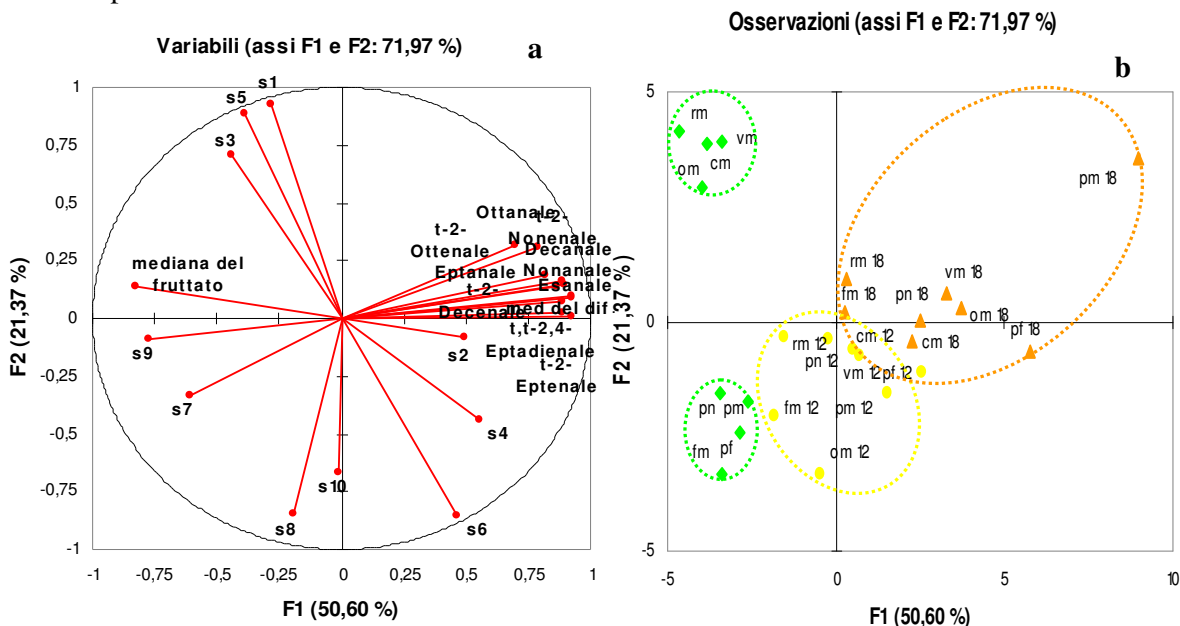


Figura 3.5.4.2 Loading plot (a) e score plot (b) risultante dalla PCA (totale varianza spiegata: 72%) effettuata sui dati ottenuti dalle risposte dei sensori del naso elettronico, dai dati ottenuti mediante panel test e dai composti volatili marcatori dell'ossidazione determinati mediante SPME-GC/MS.

Dallo *score plot* si osserva come esiste una discreta discriminazione dei campioni oggetto di studio ai diversi tempi di conservazione. In particolare, come precedentemente rilevato dal naso elettronico, è possibile distinguere due gruppi di oli "freschi" provenienti da diverse aree. Dopo 12 e 18 mesi di conservazione con

l'insorgere del difetto di rancido risulta evidente la classificazione dei campioni con una intensità crescente del difetto di rancido.

Dai dati rilevati emerge, quindi, la possibilità di utilizzare le tecniche del NE e della SPME-GC/MS quali utili strumenti per il monitoraggio della *shelf-life* degli oli. La combinazione dei dati ottenuti dalle due metodiche consente, inoltre, una buona discriminazione degli oli sottoposti a conservazione.

Questo studio effettuato sugli oli provenienti dalla penisola Sorrentina ci ha suggerito il possibile impiego delle due tecniche strumentali per una verifica rapida e oggettiva della conservazione degli oli. La sperimentazione effettuata presenta dei limiti nel campionamento in quanto, essendo degli oli prodotti da piccole aziende, non è stato possibile richiedere ai produttori grosse quantità di olio tale da mettere a punto una prova di *shelf-life* che consentisse dei prelievi mensili. Per questo motivo non si sono potuti valutare né la cinetica di ossidazione né l'*end point* della vita di scaffale durante la conservazione degli oli. Si è deciso quindi di effettuare un'altra prova sperimentale in collaborazione con il CRIOL, Centro Ricerche per l'industria Olearia di Montesarchio (BN), nell'ambito del progetto "Controllo Qualità ed Innovazione Tecnologica nell'Industria Olearia.

Tale prova sperimentale, ancora in corso, in quanto non sono ancora trascorsi 18 mesi, ha consentito di ottenere alcuni risultati preliminari che vengono brevemente discussi nel successivo paragrafo.

3.5.5 Prova di *shelf-life*

Si è proceduto con l'allestimento di una prova di conservazione mirata a valutare l'ossidazione che si manifesta nel corso di una *shelf-life* di un olio extravergine imbottigliato in contenitori di PET (polietilentereftalato). Un olio extravergine è stato sottoposto ad una prova di conservazione a temperatura ambiente in condizioni di luce diffusa e al buio. In particolare l'olio è stato imbottigliato in contenitori di PET della capacità di 0,5l . Dopo la caratterizzazione chimico-fisica ed organolettica iniziale, 18 bottiglie da 0,5 l sono state conservate al buio mentre altre 18 sono state poste su uno scaffale alla stessa distanza tra loro ed esposte a luce diffusa (300-700 LUX) ed a temperatura ambiente (20 ± 5 °C).

Durante la prova di conservazione sono state effettuati prelievi a tempi diversi, in particolare dopo 35, 60, 109, 187, 251 e 330 gg di conservazione.

L'esperimento è stato realizzato in modo da riprodurre il più possibile le condizioni di conservazione reali, che possono verificarsi nel corso della distribuzione e della conservazione in supermercati e punti vendita, dove l'olio imbottigliato può sostare per diversi mesi a temperatura ambiente ed in condizioni di luce diffusa. La conservazione al buio invece ha cercato di riprodurre le condizioni di conservazione casalinghe o di deposito.

In **tabella 3.5.5.1** si riportano i valori dell'acidità e del numero di perossidi rilevati nell'olio nel corso della conservazione.

Tabella 3.5.5.1 . Valori dell'acidità e del numero di perossidi rilevati nell'olio nel corso della conservazione (media \pm dev.st; n=3).

Tempo (giorni di conservazione)	Acidità (% ac. oleico)		Numero di perossidi (meq O ₂ attivo/kg olio)	
	Luce	Buio	Luce	Buio
0	0,75 \pm 0,01	0,75 \pm 0,01	11,30 \pm 0,33	11,30 \pm 0,33
35	0,74 \pm 0,01	0,75 \pm 0,00	11,38 \pm 0,05	11,39 \pm 0,15
60	0,71 \pm 0,00	0,76 \pm 0,03	16,63 \pm 0,11	17,05 \pm 0,00
109	0,69 \pm 0,02	0,73 \pm 0,01	9,93 \pm 0,13	10,28 \pm 0,47
167	0,85 \pm 0,04	0,87 \pm 0,03	12,61 \pm 0,78	14,15 \pm 0,35
251	0,82 \pm 0,00	0,78 \pm 0,00	12,49 \pm 0,29	13,86 \pm 0,10
330	0,79 \pm 0,01	0,80 \pm 0,00	13,77 \pm 0,15	14,94 \pm 0,49

Dalla **tabella 3.5.5.1** è possibile osservare come l'olio al tempo zero presenta un livello di acidità libera vicino al limite massimo previsto per gli extravergini (0.80%). Tale parametro si è mantenuto sostanzialmente costante nel corso della conservazione, solo dopo il quarto mese di conservazione si è assistito ad un lieve incremento di tale indice. Ciò ha comportato il decadimento qualitativo di tale olio. Infatti è stato superato il limite di 0.80% in corrispondenza del prelievo effettuato a 167 gg di conservazione sia nell'olio conservato alla luce sia in quello al buio (**figura 3.5.5.1 a**).

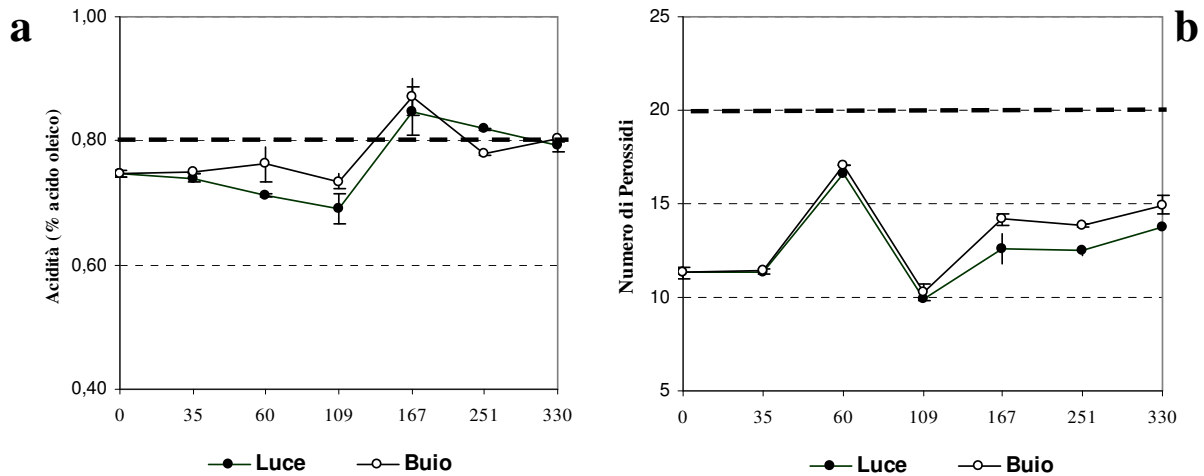


Figura 3.5.5.1. Evoluzione dell'acidità (a) e del numero di perossidi (b) nell'olio nel corso di 12 mesi di conservazione.

Sostanzialmente negli oli non si è assistito ad un'intensa attività lipolitica nel corso della conservazione, confermando le ottime proprietà barriera nei confronti dell'umidità delle bottiglie in PET utilizzate. L'esposizione alla luce non ha influenzato l'evoluzione di tale indice nel corso della conservazione a temperatura ambiente. In relazione al numero di perossidi in tutti gli oli si è assistito ad incremento del valore nei primissimi mesi di conservazione seguito da un decremento fino al quarto mese di conservazione (**figura 3.5.5.1 b**). In tale fase l'ossigeno presente nello spazio di testa della bottiglia e disciolto nella fase oleosa ha reagito con gli acidi grassi insaturi dell'olio con formazione degli idroperossidi (ossidazione primaria), successivamente tali composti altamente instabili si sono decomposti e la velocità di decomposizione è risultata maggiore di quella di formazione e, non entrando ulteriore ossigeno nel contenitore, si è assistito al decremento del numero di perossidi (ossidazione secondaria). Tale andamento è in accordo con quanto riportato da altri autori (Gutierrez e Fernandez, 2002; Caponio *et al.*, 2005).

Dopo il quarto mese di conservazione a temperatura ambiente, in tutti gli oli si è assistito ad un lieve incremento del numero di perossidi, che potrebbe essere attribuito all'ingresso di ossigeno dall'esterno all'interno del contenitore (il PET non è completamente impermeabile all'ossigeno) e di conseguenza nell'olio. È da sottolineare che in oltre 12 mesi di conservazione in nessun olio è stato superato il

limite di 20 meq di O₂ attivo/kg olio previsto dall'attuale normativa per gli oli extravergini di oliva.

L'effetto della luce sull'evoluzione di tale indice, e quindi sull'ossidazione primaria, è stato evidente solo dopo il quarto mese di conservazione.

Negli oli conservati in PET al buio, il valore del numero di perossidi si è mantenuto più alto rispetto agli oli conservati alla luce. Ciò è da attribuire all'effetto della radiazione luminosa che ha inciso velocizzando la reazione di decomposizione rispetto a quella di formazione. Tale ipotesi trova conferma negli indici di ossidazione secondaria, mostrati in **tabella 3.5.5.2**, più alti negli oli imbottigliati in PET e conservati alla luce.

Tabella 3.5.5.2. Valori degli indici spettrofotometrici (K_{232} , K_{270} e ΔK) rilevati nell'olio nel corso della conservazione (media \pm dev.st; $n=3$).

Tempo (giorni di conservazione)	Indici Spettrofotometrici					
	K_{232}		K_{270}		ΔK	
	Luce	Buio	Luce	Buio	Luce	Buio
0	1,83 \pm 0,03	1,83 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,003 \pm 0,001	0,003 \pm 0,001
35	1,84 \pm 0,01	1,98 \pm 0,01	0,13 \pm 0,00	0,11 \pm 0,00	0,009 \pm 0,000	0,002 \pm 0,001
60	1,86 \pm 0,01	2,03 \pm 0,05	0,15 \pm 0,00	0,12 \pm 0,01	0,011 \pm 0,001	0,002 \pm 0,000
109	1,92 \pm 0,01	2,07 \pm 0,01	0,19 \pm 0,00	0,11 \pm 0,01	0,013 \pm 0,000	0,002 \pm 0,000
167	1,95 \pm 0,02	2,23 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,014 \pm 0,000	0,003 \pm 0,001
251	1,96 \pm 0,02	2,24 \pm 0,01	0,23 \pm 0,00	0,13 \pm 0,01	0,017 \pm 0,000	0,003 \pm 0,001
330	1,94 \pm 0,05	2,25 \pm 0,03	0,25 \pm 0,02	0,18 \pm 0,01	0,017 \pm 0,001	0,003 \pm 0,000

Nel corso del tempo solo un lieve incremento è stato evidenziato in tutti gli oli per il valore del K_{232} , indice di ossidazione primaria. (**figura 3.5.5.2**)

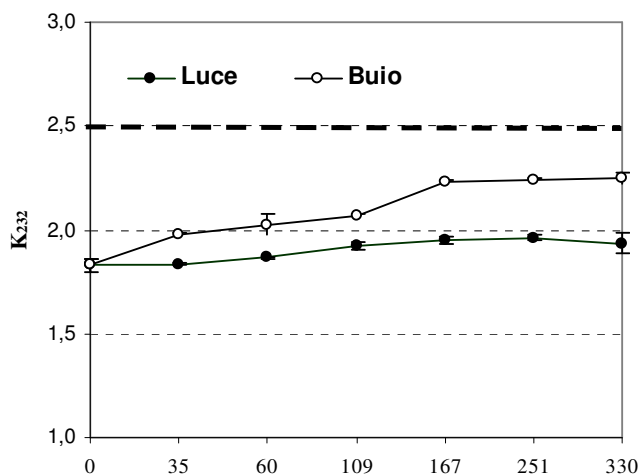


Figura 3.5.5.2. Evoluzione del K_{232} nell'olio nel corso della conservazione (media \pm dev.st; $n=3$).

In nessun olio è stato superato il limite di 2.5 previsto per la categoria extravergine. L'evoluzione del K_{232} in tale olio è stata significativamente influenzata ($p < 0.05$) dall'esposizione alla luce. Analogamente a quanto evidenziato per il numero di perossidi, il valore del K_{232} è risultato più elevato negli oli al buio, indicando una più lenta velocità di decomposizione degli idroperossidi formati. Tale osservazione trova riscontro nell'evoluzione degli indici secondari di ossidazione (K_{270} e ΔK).

Differenze significative e rilevanti, infatti sono state infatti evidenziate per il K_{270} ed il ΔK (tabella 3.5.5.2 e figura 3.5.5.3).

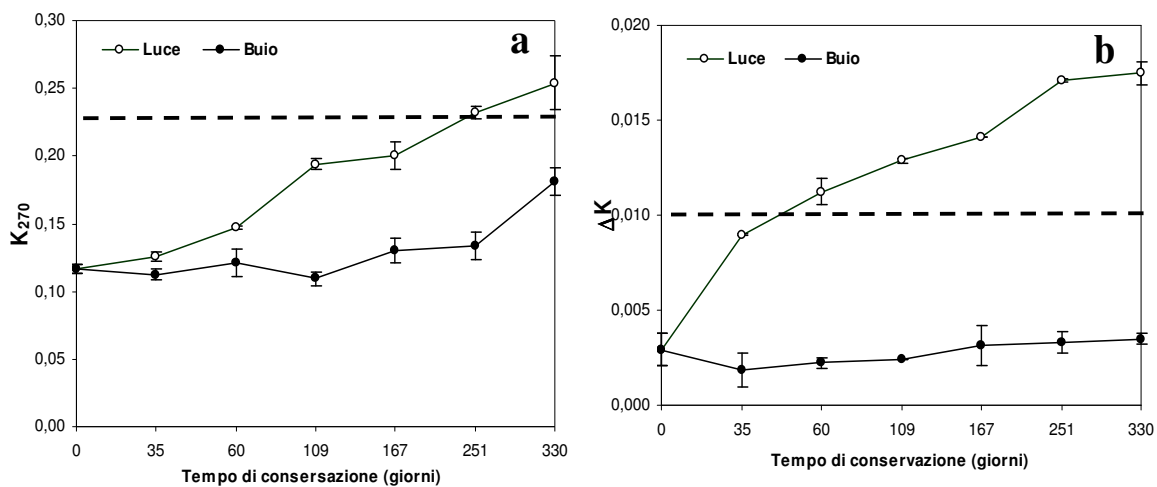


Figura 3.5.5.3. Evoluzione del K_{270} (a) e del ΔK (b) nell'olio nel corso della conservazione (media \pm dev.st; $n=3$).

Con il trascorrere del tempo negli oli il valore del K_{270} , così come del ΔK , è andato aumentando per l'accumularsi dei prodotti secondari di ossidazione generati dalla decomposizione degli idroperossidi.

Tale incremento è risultato significativamente più marcato negli oli imbottigliati in PET conservati alla luce rispetto a quelli non esposti alla luce.

Infatti, dopo soli 2 mesi circa di conservazione negli oli imbottigliati in PET e conservati alla luce è stato superato il limite di 0,01 per il valore del ΔK previsto dalla legislazione vigente per la categoria extravergine.

Negli stessi oli nel corso della conservazione è stato superato anche il limite previsto per il K_{270} di 0.22, dopo 251 giorni.

Negli oli conservati al buio si è assistito solo ad un lieve incremento del K_{270} e del ΔK indicando come tale modalità di conservazione risulti efficace nel limitare l'ossidazione a carico degli acidi grassi e nel mantenere nel corso del tempo la qualità dell'olio imbottigliato.

Per tali parametri infatti, non sono stati mai superati nel corso di 11 mesi di conservazione a temperatura ambiente i limiti previsti dalla normativa vigente per l'olio extravergine di oliva.

Nella **figura 3.5.5.4**, è riportata l'evoluzione dei punteggi relativi agli attributi “rancido” e “fruttato” percepiti nell'olio nel corso di 11 mesi di conservazione. L'analisi sensoriale è stata condotta dal gruppo di assaggiatori professionisti operante presso il CRIOL.

Dopo il primo mese circa di conservazione, sia nell'olio esposto alla luce sia in quello al buio, è stato percepito il difetto di “rancido” dovuto all'accumularsi di prodotti secondari di ossidazione. Il difetto è stato percepito mediamente con maggior intensità negli oli esposti alla luce, confermando quanto evidenziato con l'evoluzione del ΔK e del K_{270} .

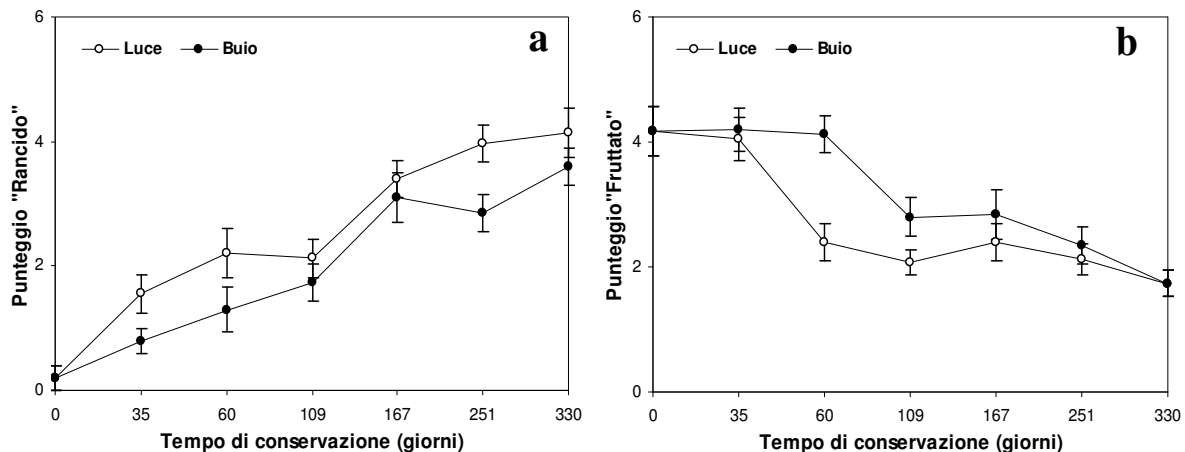


Figura 3.5.5.4. Evoluzione del punteggio dell'attributo “rancido” (a) e dell'attributo “fruttato” (b) nell'olio nel corso conservazione (media \pm dev.st).

L'intensità di percezione dell'attributo di pregio “fruttato” ha invece subito un decremento nel corso degli 11 mesi di conservazione (**figura 3.5.5.4 b**).

L'analisi sensoriale ha pertanto confermato quanto evidenziato dall'evoluzione degli altri indici analitici, cioè la necessità di preservare gli oli dal contatto con la luce al fine di evitare uno scadimento qualitativo degli stessi

Nella **Figura 3.5.5.5** si mostra il *loading plot* (a) e lo *score plot* (b) ottenuti dall'analisi delle componenti principali effettuata sui dati relativi alle risposte dei sensori del naso elettronico.

È possibile osservare come il Naso Elettronico riesca a discriminare l'olio al tempo iniziale dagli altri oli. Tuttavia nel corso della prova di *shelf-life* lo strumento non riesce a effettuare grosse differenze tra gli oli conservati al buio e quelli sottoposti alla luce, ma si osserva un andamento crescente, lungo la seconda componente principale, all'aumentare dei giorni di conservazione.

I risultati ottenuti dal naso elettronico risultano molto simili a quelli rilevati dal panel umano, infatti anche gli assaggiatori non hanno percepito grosse differenze nella percezione del difetto di rancido tra oli conservati al buio e quelli conservati alla luce.

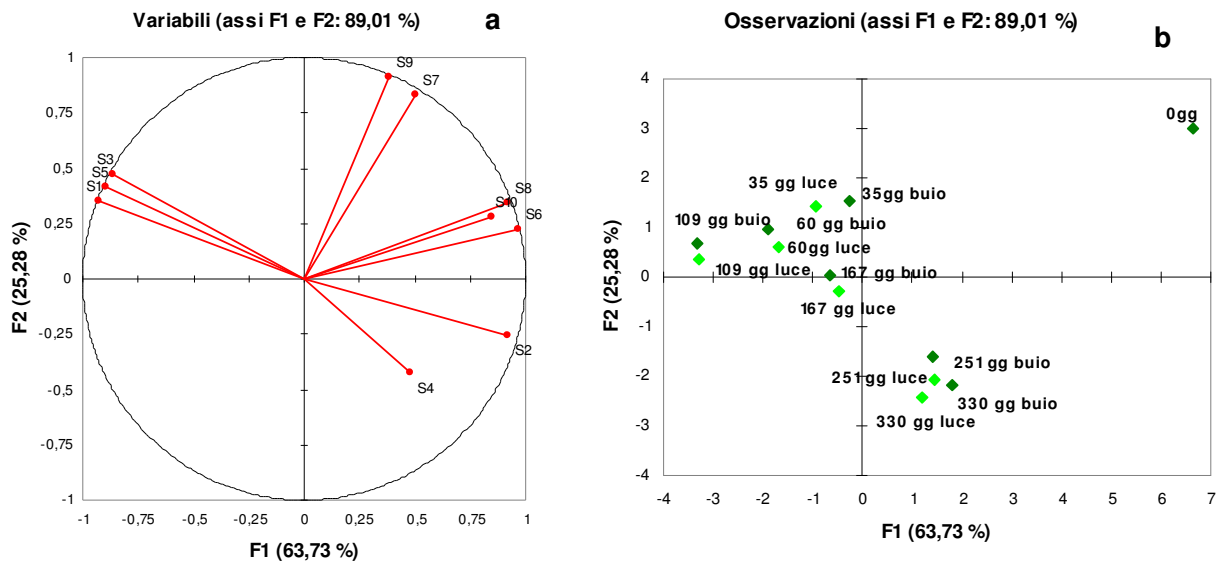


Figura 3.5.5.5 *Loading plot* (a) e *score plot* (b) risultante dalla PCA (totale varianza spiegata: 89%) effettuata sulle risposte dei sensori del naso elettronico degli oli utilizzati per la prova di *shelf-life*.

Gli oli analizzati nei prelievi intermedi da 35 gg a 167 gg di conservazione vengono riuniti in un unico gruppo, invece gli oli analizzati a 251 e 330 gg (dopo 9 e 11 mesi di conservazione) vengono distinti nettamente dagli altri principalmente sulla base dei sensori S4 e S2.

Tale situazione è stata osservata anche durante i risultati precedentemente discussi, nell'analisi degli oli della Penisola Sorrentina, infatti gli oli dopo 18 mesi di

conservazione venivano distinti nettamente dagli oli iniziali e dagli oli dopo 12 mesi conservazione in base alle risposte dei sensori S2 e S4 (**Figura 3.5.3.3**).

In **figura 3.5.5.6** si riportano le correlazioni ottenute tra l'insorgere del difetto di rancido percepito dagli assaggiatori e le risposte dei sensori S2 e S4 del naso elettronico negli oli conservati alla luce e al buio.

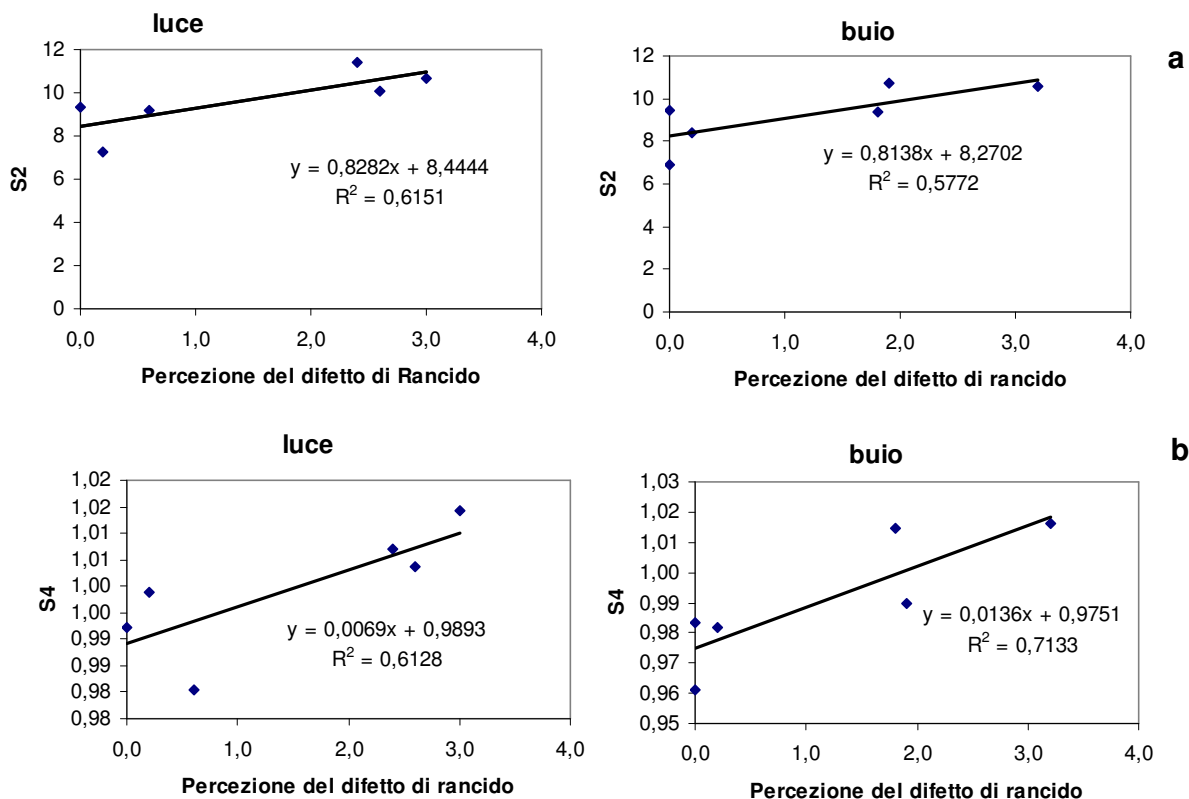


Figura 3.5.5.6 Correlazione effettuata sulla risposta dei sensori S2 (a) e S4(b) del naso elettronico e la percezione del difetto di rancido alla luce e al buio degli oli utilizzati per la prova di *shelf-life*.

Dai grafici è possibile osservare come vi sia una certa correlazione tra la percezione del difetto di rancido rilevata dagli assaggiatori e le risposte dei sensori S2 e S4 del naso elettronico. Negli oli conservati al buio la correlazione sembra essere lievemente maggiore.

Gli oli sono stati sottoposti anche all'analisi delle sostanze volatili mediante SPME-GC/MS e si è cercato di verificare se durante la prova di conservazione con l'aumentare della percezione del difetto di rancido da parte degli assaggiatori si rilevava anche un aumento delle principali aldeidi che hanno mostrato un aumento nel corso della precedente prova effettuata.

In **Figura 3.5.5.8** si riporta l'evoluzione del contenuto delle due aldeidi considerate migliori marcatori dell'*off flavour* di rancido (Aparicio *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 1997; Morales *et al.*, 2005; Kalua *et al.*, 2007, Vichi *et al.*, 2003 b).

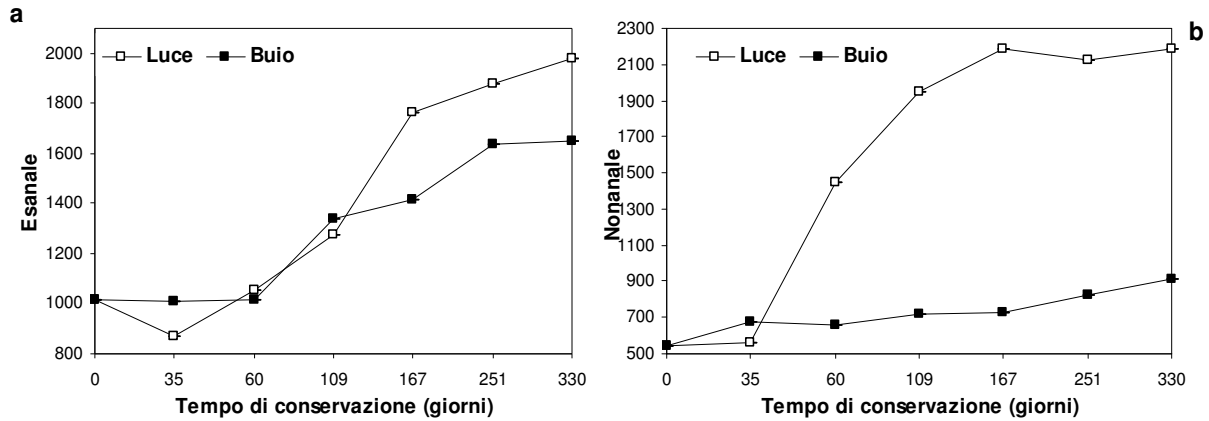


Figura 3.5.5.8. Evoluzione durante la prova di conservazione dell'esanale (a) e della nonanale (b) nell'olio conservato alla luce ed al buio.

Come si può osservare dalla figura **3.5.5.8 a** l'incremento dell'esanale nel corso della conservazione risulta graduale e non si riscontrano grosse differenze tra gli oli conservati alla luce ed al buio. Un andamento diverso mostra la nonanale (**figura 3.3.5.8 b**) in quanto l'olio conservato alla luce presenta un netto incremento già al secondo prelievo (60 gg) diversamente da quanto accade al buio dove rimane pressoché costante.

Anche l'osservazione dell'evoluzione delle 2-alchenali durante la conservazione ha mostrato un buon riscontro. In **Figura 3.5.5.9** si riporta l'evoluzione del contenuto della *trans*-2-eptanale e *trans* 2-ottanale correlate anch'esse dell'*off flavour* di rancido (Angerosa *et al.*, 1995; Solinas *et al.*, 1987).

In entrambe le 2-alchenali l'incremento nel corso della conservazione risulta maggiore negli oli esposti alla luce rispetto a quelli conservati al buio.

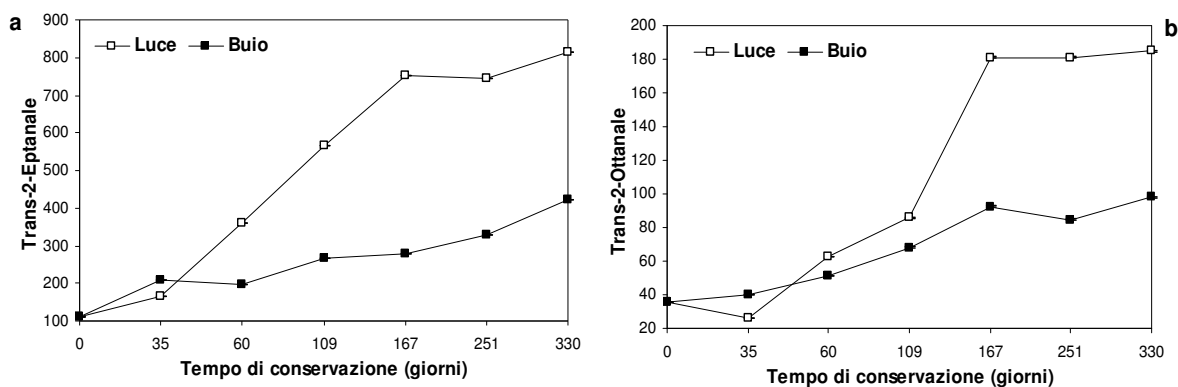


Figura 3.5.5.9. Evoluzione durante la prova di conservazione della *trans*-2 eptanale (a) e della *trans*-2-ottanale (b) nell'olio conservato alla luce ed al buio.

Correlando le risposte dei sensori S2 e S4 alla quantità delle sostanze volatili dosati via SPME-GC/MS non si sono riscontrate correlazioni significative, a conferma del fatto che più che una singola sostanza i sensori valutano l'insieme dei composti del *flavour* con una bassa specificità.

3.6 Conclusioni

Sulla base dei risultati ottenuti nel presente capitolo della tesi di dottorato è possibile trarre le seguenti considerazioni conclusive:

- ✓ la caratterizzazione chimico-compositiva degli oli della Penisola Sorrentina ha rilevato, per la maggior parte degli oli analizzati, come anche dopo 18 mesi di conservazione gli indici di qualità rientrano nei limiti previsti dal Reg. CEE 1989/03 per la categoria degli extravergini;
- ✓ l'analisi del profilo sensoriale ha evidenziato come esistano delle differenze tra gli oli della varietà *Minucciola* e gli oli della varietà *Frantoio* e *Leccino*, in tutti gli oli analizzati appartenenti alla varietà *Minucciola* sono state riscontrate note tipiche di erbe aromatiche attribuibili al fattore varietale;
- ✓ la caratterizzazione del profilo aromatico effettuato mediante la tecnica della microestrazione in fase solida (SPME) accoppiata alla gas-massa ha permesso l'identificazione di 83 composti. Il profilo aromatico è apparso complesso e si sono evidenziate differenze quantitative sia nei diversi campioni al tempo iniziale che dopo il periodo di conservazione.
- ✓ il naso elettronico si è mostrato in grado di differenziare gli oli delle diverse varietà. Inoltre ha mostrato una buona abilità nel discriminare gli oli a differenti tempi di conservazione;
- ✓ monitorando l'evoluzione del profilo aromatico degli oli mediante l'analisi delle sostanze volatili effettuata con la SPME-GC/MS nel corso di una prova di conservazione di 18 mesi, e una successiva prova di *shelf-life*, ancora in corso, si è osservato come l'insorgere del difetto di rancido abbia determinato

l'aumento di alcuni composti volatili (esanale, nonanale, *trans*-2-eptanale, *trans*-2-ottanale) correlati con tale difetto.

- ✓ alla luce di questi risultati il naso elettronico appare uno strumento analitico efficace nell'analisi degli oli vergini di oliva, che ulteriormente perfezionato, potrà affiancare e facilitare il ruolo degli assaggiatori nel controllo di *routine* della qualità degli oli vergini di oliva; risulta infatti in grado di discriminare oli esenti da difetti e oli presentante il difetto di "rancido". In particolare la prova effettuata ci ha consentito di valutare come solo alcuni sensori risultino particolarmente utili nella discriminazione di oli "rancidi". Questo ha suggerito l'ipotesi di sviluppare, in collaborazione con la casa produttrice della strumentazione utilizzata nasi elettronici più semplici specificamente progettati per questo tipo di utilizzo.

Le prove effettuate nel corso della presente tesi hanno confermato i vantaggi forniti dallo strumento rispetto all'analisi sensoriale e alle tecniche tradizionali di analisi dell'aroma che possiamo riassumere nei seguenti punti:

- tempi di risposta molto ridotti e quindi possibilità di un adeguato campionamento effettuato su di uno stesso lotto di produzione;
- assenza di pretrattamenti dei campioni prima dell'analisi;
- risultati espressi in maniera semplice, sintetica e facilmente interpretabili;
- possibilità di monitorare processi continui.

Attualmente i problemi che si riscontrano nella messa a punto di un naso elettronico sono solo quelli di garantire adeguata sensibilità, selettività e ripetibilità delle misure. L'ottimizzazione di questi parametri dipende essenzialmente dalla tipologia di sensori adottati e dalla metodica di analisi seguita. I sensori MOS utilizzati in questo lavoro di tesi hanno dimostrato buona affidabilità, consentendo misure stabili nelle risposte emesse per i numerosi campioni analizzati.

3.7 Bibliografia

AAVV (2003). Gli oli di oliva monovarietali in Campania. Edizione finanziata dall'UE (Reg. CE 2407/01), Portici, pp 1-83.

Ambrosino M. L., Della Medaglia D., Paduano, A., Sacchi, R. (2000). Ottimizzazione della conservazione e *shelf-life* dell'olio extravergine di oliva. Istituto G. Tagliacarne (Roma). Ed. Programma DIT per la diffusione dell'innovazione tecnologica.

Andrewes P., Johanneke L.H.C.B., de Joode T., Groenewegen A., Alexandre H. (2003). Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1415-1420.

Andrikopoulos K. N., Hassapidou N.M., Manoukas A. G. (1989). The tocopherol content of Greek olive oils. *J Sci Food Agric* 46 503-509.

Angerosa F. (1998). La qualità organolettica degli oli vergini di oliva. *Frutticoltura* 7/8, 47-50.

Angerosa F. (2002). Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *Eur. J. Lipid sci. Technol.* 104: 639-660.

Angerosa F. (2000). Sensory of olive oils. In: Handbook of olive. Analysis and properties. Eds. J. Harwood, R. Aparicio, Aspen publication, Gaithersburg, MD (USA) pp. 355-392.

Aparicio R., Morales M.T. (1998). Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1116-1122.

Aparicio R., Rocha S.M., Delgadillo I., Morales M.T. (2000). Detection of Rancid Defect in Virgin Olive Oil by Electronic Nose. *J. Agric. Food Chemistry.* 48: 853-860.

Boatella R. (1975). Analysis of the tocopherols of vegetable oils by gas phase Chromatography. *J Ann Chromatogr* 27 163-167

Curci V. (2001). Manuale dell'olio d'oliva. Calderini ed agricole, Bologna.

Di Giovacchino L., Serraiocco A. (1995). Influenza dei sistemi di lavorazione delle olive sulla composizione dello spaziosi testa degli oli. *Riv. It. Sost. Grasse.* 72: 443-450.

Fernander E., Gallus S., La Vecchia C. (2006). Nutrition and Cancer risk: an overview. *J. Br. Menopause Soc.* 12: 139-142.

- Endo Y., Usuki R., Kaneda T. (1984). Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation of methyl linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 781-784.
- Escrich E., Solanas M., Moral R., Costa I., Grau L. (2006). Are the olive oil and other dietary lipids related to cancer? Experimental evidence. *Clin. Transl. Oncol.* 8: 868-83.
- Frankel E.N. (1998). Lipid Oxidation. The Oily Press, Dundee (Scotland).
- Gardner J.W; Barlett P.N. (1994). Brief history of electronic nose. Sensor and actuator B. 18: 211-220.
- Gasparoli A. e Fedeli E. (1987). Valutazione dei componenti volatili negli oli alimentari: un approccio alla tecnica "Purge and Trap". *Riv. It. Sost. Grasse.* 64: 453-460.
- Giomo A. (1999). La qualità dell'olio d'oliva extra vergine come viene percepita dai consumatori. *Olivo & Olio.* 3: 33-48.
- Grundy S.M. (1986). Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *N. Engl. J. Med.*, 314: 745-748.
- Guth H. and Grosch W. (1991). A Comparative Study of the Potent Odorant of Different Virgin Olive Oils. *Fat. Sci. Technol.* 9: 335-339.
- Guth H., Grosch W. (1993). Quantitation of a potent odorants of virgin olive oil by stable isotope dilution assay. *J.A.O.C.S.* 70: 513-518.
- Gutierrez-Rosales F., Rios J.J., Gomez-Rey M.L. (2003). Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on line HPLC electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6021-6025.
- Kalua C.M., Allena M.S., Bedgood jr D.R., Bishop A.G., Prezler P.D., Robards K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: a critical review. *Food Chem.* 100: 273-286.
- Kiritsakis A. and Dugan L. R. (1985) Studies in photooxidation of olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62: 896-982.
- Kiritsakis A. (1991). Olive Oil. American Oil Chemist's Society, Champaign, IL, USA.
- Magli M., Rotondi A. (1998). L'olio di oliva per i consumatori particolarmente attenti all'aspetto salutistico nutrizionale. *Olivo & olio*, 7: 63-68.
- Markmann P. (2007) Olive Oil can prevent cancer-a comment. *Ugeskr Laeger.* 169-615.
- Mc Ewan J. A. (1994). Consumer attitudes and olive oil acceptance: the potential consumer. *Grasas y Aceites*, 45: 9-15.

- Montedoro G., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A. (1993). Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil-3- Spectroscopic characterizations of secoridoid derivatives, *J. Agric. Food Chem.* 41: 2228-2234.
- Montedoro G. F., Servili M., Pannelli G. (2003). «Le caratteristiche del prodotto e le relazioni con le variabili agronomiche» tratto da. *Olea*, Trattato di olivicoltura a cura di Fiorino P. Ed agricole-Edizioni Agricole de Il Sole 24 ORE.
- Morales M. T., Angerosa F., Aparico R. (1999). Effect of extraction of virgin olive oil on the lipoxygenase cascade: Chemical and sensory implications. *Grasas y Aceitas*, 50: 115-121.
- Morales M. T., Alonso, M. V., Rios, J. J. e Aparicio, R. (1995). Virgin olive oil aroma: relationship between volatile compounds and sensory attributes by chemometrics. *J. Agri. Food Chem.* 43: 2925-2931.
- Morales M. T., Aparicio R. (1996). Influence of Olive Ripeness on the Concentration of Green Aroma Compounds in Virgin Olive Oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 11: 171-178.
- Morales M.T., Luna G., Aparicio R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chem.* 91: 293-301.
- Morales M.T., Rios J.J., Aparicio R. 1997. Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2666-2673.
- Mousa Y.M., Gerasopoulos D. (1996). Effect of Altitude on Fruit and Oil Quality Characteristics of “Mastoides” Olives. *J Sci Food Agric*, 345-350.
- Olias M. J., Pérez A.G., Rios J.J., Sanz L.C. (1993). Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the “green” odor notes. . *J. Agri. Food Chem* 41: 2368-2373.
- Osman M., Metzidakis I., Gerasopoulos D., Kiritsakis A.(1994). Qualitative changes in olive oil collected from trees grown at two altitudes. *Riv Ital Sost Gras LXXI* 187-190.
- Peri C. (1995). *Qualità: concetti e metodi*. Ed. Franco Angeli, Milano.
- Przybylski R.; Michael Eskin N. A. (1995). Methods to Measure Volatile Compounds and the Flavor Significance of Volatile Compounds. In *Methods to Assess Quality and Stability of Oils and Fat-Containing Foods*; Warner, K., Michael Eskin, N. A., Eds.; AOCS Press: Champaign, IL.
- Regolamento (CE) n. 1831/2003 della Commissione del 6 Novembre 2003 che modifica il regolamento (CEE) n.2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa d’oliva nonché ai metodi ad essi attinenti. *Gazz. Uff. Com. Europ* 13/11/03 NL 295/57.

Regolamento CE 796/02 del 6 maggio 2002 recante modifica del Reg. CEE 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa di oliva, nonché ai meto ad essi attinenti. Gazz. Uff. Com. Europ. 15/5/02 NL. 128.

Regolamento CEE n° 2568/91 del 11 Luglio (1991), relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa d'oliva, nonché ai metodi ad essi attinenti, Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea 5/9/91 NL 248.

Reiners J., Grosch W. (1998). Odorants of virgin olive oils with different flavor profiles. *J. Agri. Food Chem.* 46: 2754-2763.

Rotundo A., Rotundo S. (1988). "Olivo da Olio" la cultivar di olivo più diffusa in Penisola Sorrentina. *L'informatore Agrario*, 51, 67-72.

Sacchi R., Della Medaglia D.A., Ambrosino M.L., Paduano A., Spagna Musso S. (2003). Linee Guida per la Qualità dell'Olio Vergine di Oliva – IV edizione, opera finanziata dall'UE nell'ambito del programma di miglioramento Qualitativo dell'olio di oliva (Reg. CE 2407/03), Portici, pp 1-80

Sacchi R. (2005). Appunti dalle lezioni del corso di Industrie Agrarie (Tecnologia degli Oli, Grassi e Derivati) Biblioteca Facoltà di Agraria, Portici.

Sacchi R., Ambrosino M.L., Della Medaglia D. A., Paduano A., Spagna Musso S. (1999). L'Olio della Penisola Sorrentina, collana di monografie sugli oli della Campania, edizione finanziata dall'UE (Reg. CE 2430/97), Portici, pp 1-83.

Salch Y. P., Grove M. J., Takamura H., Gardner H. W. 1995. Characterization of a C-5, 13-cleaving enzyme of 13-(S)-hydroperoxide of linoleic acid by soybean seed. *Plant physiology*. 108: 1211-1218.

Solinas M.; Angerosa F.; Cucurachi A. (1987). Connessione tra prodotti di neoformazione ossidativa delle sostanze grasse e insorgenza del difetto di rancidita all'esame organolettico. Nota 2. Determinazione quantitativa. *Riv. Ital. Sos. Grasse* 64: 137-145.

Solinas M. (1990). Caratteristiche degli oli vergini di oliva e marchio di qualità. *L'informatore agrario*, 47: 19-25.

Solinas M. (1990). La qualità dell'olio di oliva e i fattori che la influenzano. In: Problematrice qualitative dell'olio di oliva, Sassari, 6 novembre, 23-56.

Usuki R., Endo Y., Kaneda T. (1984). Prooxidant activities of chlorophylls and pheophytins on the photooxidation of edible oils. *Agric. Biol. Chem.* 48: 991-994.

Vichi S, Castellote A. I, Pizzale L, Conte L. S, Buxaderas S, Tamames E.L. (2003 a). Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace Solid-Phase Microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Journal of Chromatography A* 983:19-33

Vichi S., Pizzale L., Conte L.S., Buxaderas S., Lopez-Tamames E. (2003 b). Solid-Phase Microextraction in the Analysis of Virgin Olive Oil Volatile Fraction: Modifications Induced by Oxidation and Suitable Markers of Oxidative Status *J. Agric. Food Chem.*, 51: 6564-6571.

Viola P. (1997). L'olio di oliva e la salute. Consiglio oleicolo internazionale, Madrid (Spagna).

Visioli F., Galli C. (1998). Olive oil phenols and their potential effect on human health. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4292-4296.

Visioli F., Poli A., Galli C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medical Research Review*, 22(1): 65-75.

Vitagliano M. (1982). Industrie Agrarie, seconda edizione, UTET Torino.

Capitolo IV Applicazione del naso elettronico al monitoraggio del processo di frittura

4.1. Introduzione

La frittura per immersione di olio (*deep-frying* o *deep fat frying*) è un processo di cottura ampiamente utilizzato sia a livello industriale che a livello domestico per la preparazione di un elevato numero di prodotti (patate, carne, pesce, *snack*, etc.). La frittura ha acquistato una certa importanza nell'alimentazione moderna perchè è facile da usare, veloce e poco costosa inoltre gli alimenti acquistano particolari caratteristiche organolettiche che ne influenzano la palatabilità e rendono l'alimento accettabile dal punto di vista del consumatore (Saguy *et al.*, 1998). Per questo motivo l'impiego di tale metodo di preparazione degli alimenti è in continuo aumento nonostante i salutisti spingano verso una riduzione del consumo di olio e fritture nella dieta del mondo occidentale (Orthofer *et al.*, 1996).

Durante il processo di frittura si instaurano dei fenomeni chimici e chimico-fisici complessi a causa dell'accoppiamento tra trasferimento di calore e di massa tra l'alimento e il mezzo di frittura (Vitrac *et al.*, 2000). Tale complessità è legata ai continui cambiamenti della composizione degli alimenti e del mezzo di frittura dovuti ad un progressivo deterioramento dell'olio.

La qualità di un olio usato per friggere nella frittura ad immersione contribuisce alla qualità dell'alimento fritto: la qualità del mezzo di frittura e dell'alimento fritto in quell'olio sono strettamente correlati (Blumenthal, 1991). La parte di olio della frittura che viene assorbita dall'alimento può risultare variabile a seconda del tipo di olio usato e dall'alimento fritto (Saguy *et al.*, 1998).

L'aumento più drastico è stato riscontrato nelle patatine fritte (*chips*) (**Tabella 4.1.1**), dove è stato osservato che la quantità di grasso durante la frittura aumenta dallo 0.1% nelle patate crude fino ad un massimo di circa il 40% nelle patatine fritte. Ma anche molti altri alimenti fritti assumono importi significativi di olio durante la frittura (Mattaus, 2007).

Quindi la funzione principale dell'olio è quella di mezzo di cottura per lo scambio di calore, ma diventa anche responsabile dell'odore e del gusto tipico dei prodotti fritti.

Tabella 4.1.1 Contenuto % di grasso riscontrato in differenti alimenti fritti (Mattaus, 2007).

Prodotti	Contenuto di grasso (%)	
	Alimento crudo	Alimento dopo la frittura
Pollo	3,9	9,9
Pesce persico	1,2	13,1
Patatine (chips)	0,1	35-40
French fires	0,1	15
Ciambelle	5,2	21,9
Sardine	10	35

Durante questo processo non solo si formano i composti desiderati, ma anche composti con effetti nutrizionali avversi e con potenziale rischio per la salute del consumatore (Mattaus, 2007).

Purtroppo, gli *off-flavour* si presentano se l'olio usato è deteriorato o se viene usato per un periodo di tempo più lungo, perché come conseguenza del trattamento termico si verificano molti processi chimici deterioranti, con conseguenti cambiamenti della composizione chimico-fisica dell'olio.

I processi chimici deterioranti nascono da una serie di reazioni complesse come autossidazione, polimerizzazione, termossidazione, isomerizzazione, ciclizzazione e idrolisi. Durante la frittura, inoltre, avvengono ulteriori modificazioni come la gelatinizzazione dell'amido, la reazione di Maillard, la denaturazione delle proteine e una diminuzione dell'umidità dell'alimento che si manifestano con un rigonfiamento del prodotto, la formazione di una crosta sottile, la comparsa di un colore dorato e di un gradevole sentore di fritto. La crosta è la principale responsabile della croccantezza di un prodotto fritto e gioca un ruolo fondamentale nell'assorbimento di olio (Parisini, 2005).

L'entità delle alterazioni che avvengono durante la frittura, dipende da diversi fattori, alcuni dei quali sono strettamente collegati al processo stesso, come la temperatura e la durata del trattamento, l'impiego di una frittura continua o discontinua, etc; altri riguardano l'alimento sottoposto al trattamento, quindi la sua composizione (umidità,

lipidi, proteine); altri ancora dipendono dall'olio o dal grasso usato per friggere, dalla sua qualità iniziale, dal grado di insaturazione, etc. (Varela, 1985). In particolare, riguardo alla resistenza all'ossidazione dei diversi oli e grassi impiegati, è stato dimostrato che la presenza di quantità cospicue di acidi grassi polinsaturi è strettamente correlata con la velocità delle degradazioni ossidative (Frankel, 1991).

4.1.1 Tipologie di frittura

Nell'ambito della frittura ad immersione è possibile distinguere tre differenti tipologie di processo:

la **frittura industriale**, utilizzata per prodotti fritti con una *shelf-life* prolungata (*snacks*), è un processo continuo in cui l'alimento viene immerso in olio vegetale di media qualità. In questa tipologia di frittura l'olio non viene sostituito frequentemente, ma allontanato con il cibo fritto in continuo e semplicemente rabboccato.

la **frittura da rosticceria** è un processo semi-continuo in cui vengono alternati periodi di lavoro a periodi di "riposo" dell'olio. In questa tipologia di frittura l'olio viene sostituito almeno una volta alla settimana.

la **frittura domestica** è un processo discontinuo che prevede l'utilizzazione di minime quantità di olio (1-2 litri), eliminato in genere subito dopo il processo e riutilizzato per un ridotto numero di fritture (Parisini, 2005).

4.1.2 Il Processo di frittura

La *deep-frying* è un procedimento complesso che implica temperature elevate, cambiamenti strutturali significativi sia sulla superficie che nel cuore dell'alimento fritto, e un simultaneo trasferimento di calore e di massa risultante in un flusso in direzioni opposte di vapore acqueo e di olio (Kochhar e Gertz, 2004).

La frittura di un alimento completamente immerso in un bagno di olio avviene solitamente portando il grasso circostante ad una temperatura di circa 180-200°C, in

presenza di ossigeno e di vapore acqueo proveniente dall'alimento stesso (Fritsch, 1981; Parisini, 2005).

In queste condizioni si osserva un susseguirsi di reazioni, quali:

- ✓ riduzione della temperatura dell'olio durante l'immersione dell'alimento nel grasso di frittura;
- ✓ modificazioni a scapito di componenti presenti nell'alimento (denaturazione delle proteine, gelatinizzazione dell'amido, etc.);
- ✓ formazione di vapore a partire dall'acqua contenuta nell'alimento;
- ✓ disidratazione della superficie dell'alimento con formazione della crosta;
- ✓ assorbimento di olio da parte dell'alimento stesso;
- ✓ termossidazione dell'olio (Fritsch, 1981).

4.1.3 La chimica della frittura

La frittura, nonostante la semplicità e la rapidità di preparazione è un processo molto complesso dal punto di vista chimico (Perkins, 1996; Frankel, 1998). I grassi sottoposti a riscaldamento, infatti, subiscono un elevato numero di modificazioni che coinvolgono un ampio spettro di reazioni quali (Orthofer e Cooper, 1996):

- ✓ idrolisi;
- ✓ termossidazione;
- ✓ ciclizzazione;
- ✓ polimerizzazione.

Idrolisi

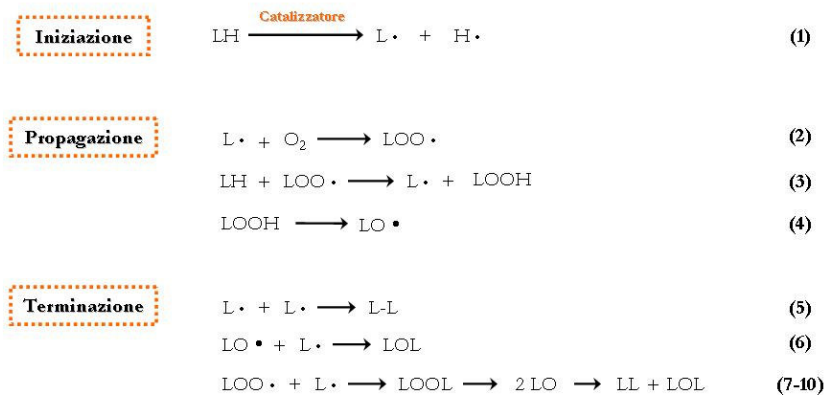
L'alimento, a contatto con l'olio caldo del bagno di frittura, rilascia una certa quantità di acqua sotto forma di vapore. È proprio la presenza del vapore che causa l'idrolisi del grasso con formazione di digliceridi e acidi grassi liberi. I digliceridi così formati possono ulteriormente essere idrolizzati in monogliceridi e, infine, in glicerolo e acidi grassi liberi (Perkins, 1996). Gli acidi grassi liberi sono a loro volta

molto reattivi, si ossidano rapidamente e possono anche promuovere la termossidazione solubilizzando catalizzatori metallici (Frankel, 1998).

Ossidazione

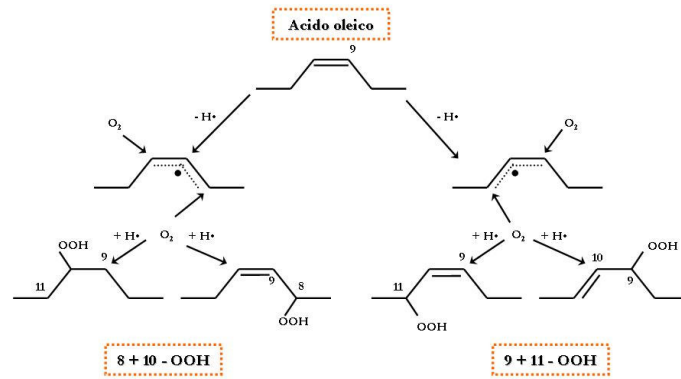
Il meccanismo di ossidazione dei grassi insaturi durante la frittura è ampiamente influenzato dalla temperatura di processo e dalla disponibilità di ossigeno. Alle alte temperature, infatti, mentre da un lato viene accelerata la termossidazione dell'olio, dall'altro si ha una diminuzione della concentrazione di ossigeno il quale diventa un fattore limitante il processo di reazione (Frankel, 1998).

I radicali alchilici ($L\cdot$), formati nella reazione (1), tendono ad accumularsi in quanto la velocità della reazione d'ossigenazione (2) è diminuita. Anche le reazioni di terminazione (5-10) acquistano più importanza a causa delle reazioni di condensazione tra radicali alchilici con formazione di prodotti stabili di elevato peso molecolare:



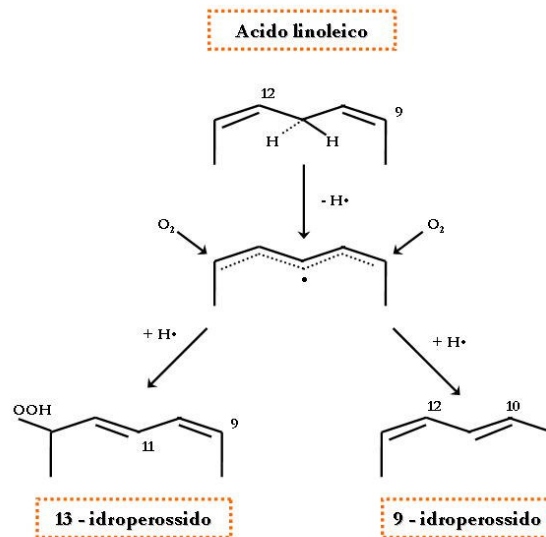
A temperature superiori a 140°C, gli idroperossidi formati nella reazione (3) si decompongono rapidamente in una moltitudine di prodotti volatili e non volatili.

Nell'ossidazione degli acidi grassi monoinsaturi (acido oleico) il punto di maggiore reattività è rappresentato dal carbonio in posizione α al doppio legame. L'ossidazione comporta la rottura omolitica del legame C-H sul carbonio in posizione 8 o 11 con formazione di due radicali allilici ibridi:



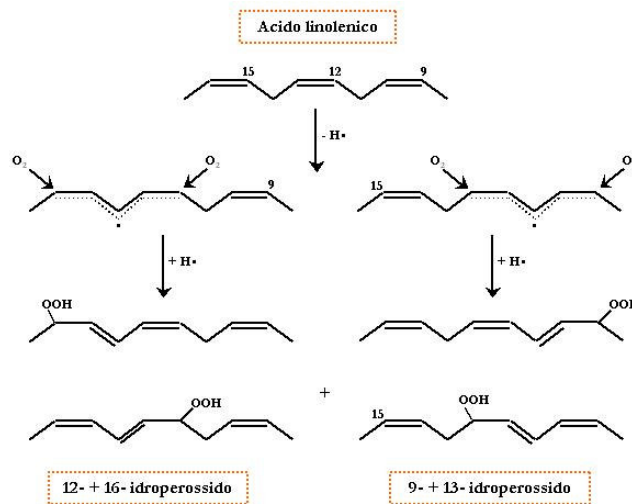
L'attacco dell'ossigeno sugli atomi di carbonio dei radicali delocalizzati dà origine a quattro radicali idroperossidici con configurazione sia *cis* che *trans*, quindi a quattro idroperossidi.

L'acido linoleico, acido grasso con due insaturazioni, presenta una velocità di reazione superiore a quella dell'acido oleico per la presenza di un gruppo metilenico diallilico in grado di perdere con maggiore rapidità un atomo di idrogeno. Si forma, così, un intermedio radicalico stabilizzato per risonanza (radicale pentadienilico) che reagisce con l'ossigeno per dare origine ad una miscela di 9- e 13-idroperossidi coniugati:



La miscela contiene quattro idroperossidi diversi, due *cis,trans* e due *trans,trans*.

Il meccanismo di ossidazione dell'acido linolenico è basato su quello dell'acido linoleico e prevede l'estrazione di un idrogeno dai carboni C₁₁ o C₁₄ con produzione di quattro radicali. Il successivo attacco dell'ossigeno dà i corrispondenti idroperossidi:



Durante il processo di frittura gli idroperossidi tendono a decomporsi facilmente dando origine ad una varietà di prodotti di ossidazione secondaria (aldeidi, chetoni, alcoli, idrocarburi, etc.) (Frankel 1998).

La decomposizione termica dei monoidroperossidi produce radicali alcossilici che subiscono β -scissione omolitica per formare aldeidi, radicali alchilici ed olefinici.

La degradazione degli idroperossidi comporta anche la formazione di acidi grassi a corta catena legati ai trigliceridi (Marquez-Ruiz e Dobarganes, 1996a). Studi su sistemi modello, infatti, hanno dimostrato che il metil-ottanoato (C_{8:0}) è un prodotto significativo dell'ossidazione degli esteri metilici degli acidi grassi (Frankel 1982, Frankel, 1985).

La quantificazione degli acidi grassi a corta catena può essere una misura dell'ossidazione di grassi ed oli vegetali sottoposti a riscaldamento poiché durante la frittura i composti volatili che si formano in seguito all'ossidazione lasciano continuamente l'olio a causa dell'elevata temperatura del processo e dell'influenza

del vapore mentre gli acidi grassi a corta catena rimangono legati ai trigliceridi come “*markers*” degli intermedi di ossidazione (Dobarganes *et al.*, 1986).

La formazione di acidi grassi a corta catena ha inizio dai radicali derivanti dagli idroperossidi allilici e comporta la scissione β -omolitica del legame C-C su entrambi i lati del carbonio che porta l'ossigeno. Da un lato, la frammentazione produce prima un radicale attaccato allo scheletro trigliceridico e, dopo l'aggiunta di un idrogeno, un acido grasso a corta catena legato al trigliceride (Marquez-Ruiz and Dobarganes, 1996).

Inoltre, ci si potrebbero teoricamente aspettare degli acidi grassi insaturi a media catena dal 13-idroperossido dell'acido linoleico e dal 10- e dall'11-idroperossido dell'acido oleico. Tuttavia, la loro formazione dovrebbe coinvolgere la formazione di un radicale vinilico prima dell'aggiunta di un idrogeno, il quale sembra essere un intermedio improbabile (Frankel *et al.*, 1984).

Di conseguenza, tra gli acidi grassi a corta catena legati, derivanti dai principali idroperossidi insaturi, i composti che si ritrovano con più probabilità sono il C_{7:0} e il C_{8:0} che provengono rispettivamente dall'8-idroperossido e dal 9-idroperossido.

Polimerizzazione

Durante il processo di frittura, le alte temperature e la presenza di aria, favoriscono lo sviluppo di reazioni di polimerizzazione tra gli acidi grassi polinsaturi rappresentati principalmente negli oli dall'acido linoleico (L) originando un gruppo complesso di nuovi composti. Tale reazione contribuisce in maniera significativa alla formazione di composti ad alto peso molecolare soprattutto nella fase di terminazione della reazione radicalica, con formazione di dimeri ossigenati (LOL e LOOL) e dimeri non ossigenati (L-L) (Dobarganes, 1998).

Alle elevate temperature di frittura le reazioni di ossidazione sono accelerate, la decomposizione degli idroperossidi è più rapida della loro formazione, la decomposizione bimolecolare contribuisce ad aumentare la concentrazione di radicali trigliceridici ed, infine, la bassa solubilità dell'ossigeno giustifica l'elevata concentrazione di dimeri non ossigenati presenti negli oli termossidati.

Ad alte temperature, inoltre, può avvenire la polimerizzazione non radicalica con reazioni di Diels-Alder tra acidi grassi con dieni coniugati o tra acidi grassi coniugati

e non, per formare dimeri non polari di cicloesene insaturo non sostituito (Frankel, 1998).

La complessità dei composti formati deriva non solo dai differenti gruppi funzionali che possono risultare dall'ossidazione degli acidi grassi insaturi, ma anche dalla presenza nel grasso di un alto contenuto di trigliceridi contenenti più di un gruppo acilico insaturo nella molecola. Questa complessità giustifica le difficoltà degli studi volti alla conoscenza della struttura e del meccanismo di formazione dei dimeri e degli oligomeri dei trigliceridi.

Ciclizzazione

Negli oli sottoposti ad elevate temperature si assiste anche alla formazione di dimeri ciclici in seguito all'addizione intramolecolare di radicali dimerici intermedi ai doppi legami nella stessa molecola (Neff *et al.*, 1988).

4.1.4 Modificazioni dell'olio durante la frittura

Durante la frittura, l'olio subisce delle modificazioni e se tale frittura è prolungata nel tempo l'olio può deteriorarsi.

Le reazioni di degradazione che avvengono durante la frittura sono: l'ossidazione, la polimerizzazione e l'idrolisi. Queste reazioni producono diversi cambiamenti fisici e chimici nell'olio: l'aumento della viscosità, la produzione di composti volatili, di composti polari e di acidi grassi liberi, lo sviluppo di colore e la tendenza dell'olio a formare schiuma. Si verificano anche diminuzioni del numero di iodio, dell'indice di rifrazione e della tensione superficiale (Frankel, 1998).

Alcuni cambiamenti che avvengono nell'olio durante la frittura sono visibili (White, 1991). Il cambiamento visivo più evidente nell'olio durante l'uso prolungato è l'imbrunimento. L'alimento, quando viene fritto, può rilasciare vari composti nell'olio, come carboidrati, proteine, fosfati, composti contenenti zolfo, e tracce di metalli. Molti di questi composti contribuiscono alla formazione del colore reagendo con la matrice grassa o con i prodotti della sua degradazione (Jacobson, 1991).

La velocità con cui l'olio si inscurisce può essere influenzata quindi dal tipo di alimento che viene fritto.

La fonte di alcuni dei composti colorati nell'olio di frittura, così come dello sviluppo di *flavour*, è da attribuire alle reazioni di imbrunimento non enzimatico (reazioni di Maillard) (Nawar, 1985).

Durante la reazione di Maillard, i gruppi amminici, normalmente di un amminoacido libero o di una catena laterale di una proteina, si combinano con un carbonio carbonilico per formare un ammino composto (Jacobson, 1991). Inoltre, le aldeidi derivanti dall'ossidazione dei lipidi possono reagire con gli intermedi della reazione di Maillard per formare catene di pirazine alchil-sostituite, e composti eterociclici contenenti zolfo (Frankel, 1998).

I lipidi, inoltre, contribuiscono alla formazione di *flavour* sia desiderabili sia indesiderabili. La quantità dei composti volatili che si formano dipende dalla lunghezza del tempo di riscaldamento dell'olio e dal tipo di alimento fritto. I prodotti di decomposizione volatili formati dagli oli termossidati, hanno approssimativamente la stessa composizione di quelli formati durante la *deep-frying*, eccetto l'assenza di pirazine (Perkins, 1996).

Recentemente, è stata posta particolare attenzione sulla formazione, durante la frittura di prodotti amidacei, di acrilammide. Tale sostanza è stata classificata come cancerogena per l'uomo ed è per questo che va tenuta sotto controllo.

Il meccanismo di formazione dell'acrilammide durante la cottura a temperature elevate non è ancora molto chiaro, ma, da recenti studi, risulta essere collegata con la reazione di Maillard tra amminoacidi e zuccheri riducenti. L'asparagina, il principale amminoacido presente nella patata, sembra esserne il precursore (Perdaschi *et al.*, 2005; Vatter e Shetty, 2004). Il contenuto di acrilammide dosato nelle patate fritte appare correlato positivamente al colore dell'alimento fritto (Perdaschi *et al.*, 2005).

4.1.5 Caratteristiche degli oli di frittura

Per la scelta di un appropriato mezzo di frittura è importante valutarne le proprietà chimico-fisiche e nutrizionali, in quanto parte dell'olio viene assorbito dall'alimento durante il processo di frittura.

Le principali caratteristiche chimico-fisiche che deve avere un olio destinato alla frittura sono:

- ✓ buona stabilità ossidativa;
- ✓ elevato del punto di fumo;
- ✓ basso punto di schiuma.

Dal punto di vista chimico-nutrizionale deve, inoltre, presentare:

- ✓ un basso livello di acidi grassi insaturi;
- ✓ una alta concentrazione di acido oleico (75-80%);
- ✓ una bassa concentrazione di acido linoleico;
- ✓ una bassissima concentrazione di acido linolenico (< 0,2%).

La presenza, seppure in minime quantità, di composti minori con proprietà antiossidanti, quali idrocarburi, steroli, tocoferoli, rende gli oli maggiormente stabili alle alte temperature (ossidazione) prolungandone il periodo di utilizzo (Kochhar, 2001). Tra gli oli vegetali quelli più utilizzati in frittura sono gli oli di semi quali l'olio di semi di arachide, l'olio di ravizzone, l'olio di girasole alto oleico, *blend* di olio di soia/olio di ravizzone e olio di palma frazionato. A livello industriale viene utilizzato principalmente olio di palma e/o palma-oleina per l'operazione di pre-frittura di alimenti surgelati (bastoncini di pesce, crocchette, patate fritte).

Olio di arachide

L'olio di arachide viene estratto dai semi di *Arachys hypogea*, i quali contengono circa il 50% di olio. I semi vengono privati del germe e, successivamente macerati. Si ottiene così una farina che viene in seguito sottoposta a pressione o all'estrazione con solventi, dando origine ad un olio caratterizzato da un elevato contenuto in acido oleico (45-65 %) ed in acido linoleico (20-45 %). L'olio di semi di arachide si presenta fluido a temperatura ambiente. È un olio di elevato pregio in quanto presenta una composizione chimica simile a quella dell'olio di oliva ed una buona stabilità alle alte temperature (punto di fumo ~ 180°C). Per tali motivi viene utilizzato sia a crudo, come condimento, che in frittura.

Olio di palma

L'olio di palma può essere estratto dal mesocarpo e/o dal seme del frutto della palma da olio (*Elaeis guineensis*). È composto per il 50% da grassi saturi, per il 40% da

grassi monoinsaturi e per il restante 10% da grassi polinsaturi. Dal punto di vista alimentare è paragonabile al burro, in quanto cristallizza facilmente a temperatura ambiente. L'olio di palma risulta essere ricco in vitamina A. L'olio di palma è diffusamente utilizzato nella frittura industriale dal momento che è caratterizzato da un elevato punto di fumo e da una particolare resistenza alla termossidazione conferitagli dalla sua composizione in acidi grassi ma anche perché si sviluppano odori piacevoli durante la frittura. Tuttavia questa stessa composizione trigliceridica può rappresentare una criticità qualora sia necessario avere all'atto dell'utilizzo l'olio in forma liquida: l'elevato contenuto in acidi grassi saturi gli conferisce un elevato punto di congelamento, a volte superiore alla temperatura ambiente.

Olio di girasole

L'olio di girasole viene estratto dai semi del girasole (*Helianthus Annuus*) e viene comunemente usato per la preparazione di miscele per frittura nonché nelle industrie cosmetiche, come emolliente.

La composizione acidica di un olio di girasole è influenzata dalla varietà e dalle condizioni ambientali di crescita della pianta.

Olio di girasole alto oleico: 82% di acido oleico, 9% di acido linoleico, 9% di grassi saturi;

Olio di girasole alto linoleico: 20% di acido oleico, 69% di acido linoleico, 11% di grassi saturi.

In ogni caso si presenta fluido a temperatura ambiente.

Olio di oliva

L'olio di oliva è considerato un ottimo olio di frittura in quanto presenta un basso livello di acidi grassi saturi, un punto di fusione relativamente basso e un punto di fumo di 210°C. Presenta, inoltre, un basso contenuto di acido linoleico (C_{18:3}) ed una favorevole combinazione di vari antiossidanti, tra cui i composti fenolici. L'olio extra vergine di oliva è il migliore, in assoluto, ed è anche il più costoso e viene, per questo motivo, raramente utilizzato per friggere (Rossel, 2001).

4.1.6 Metodi analitici per la valutazione della degradazione dell'olio sottoposto a frittura

L'olio destinato a frittura deve rispondere a particolari esigenze quali la facilità e la prontezza di utilizzo e il mantenimento di un certo standard qualitativo nel corso di una prolungata esposizione ad elevate temperature. Numerosi sono i metodi proposti per valutare l'entità della degradazione ossidativa subita da un olio in seguito ad un processo di frittura e molteplici sono i parametri proposti come indice di ossidazione. Il *metodo ufficiale* per valutare tale degradazione ossidativa è la determinazione gravimetrica dei composti polari (Circolare del Ministero della Sanità, n.1/1991). Oltre al metodo ufficiale esistono altre metodiche per la determinazione ed il monitoraggio della degradazione ossidativi degli oli:

- ✓ *metodi tradizionali* quali la valutazione del colore, la determinazione degli acidi grassi liberi, la misura del punto di fumo e della viscosità;
- ✓ *metodi standard* come la determinazione dei dieni coniugati mediante misura dell'assorbimento a 232 nm, la determinazione della composizione acidica;
- ✓ *metodi veloci*, come la determinazione della costante dielettrica (Orthofer e Cooper, 1996).

Numerose informazioni sui composti generatisi nel corso della termossidazione possono essere tratte dall'impiego della cromatografia sterica ad alta risoluzione (HPSEC), che, applicata alla frazione polare estratta dal grasso di frittura, è in grado di separare e quantificare gli acidi grassi liberi, i digliceridi (prodotti di idrolisi), i trigliceridi monomerici ossidati (autossidazione), ed i trigliceridi dimerici e polimerici (termossidazione) (Dobarganes *et al.*, 1988).

Ciascuno di tali metodi presenta lati positivi e negativi e nessuno è in grado di effettuare una valutazione esaustiva e del tutto affidabile delle alterazioni subite dall'olio, per cui un giudizio sulla stabilità ossidativa di un olio nel corso di un processo di frittura può essere formulato soltanto integrando le informazioni tratte da diverse tipologie di analisi. Per questo motivo una rapida valutazione della degradazione degli oli durante il processo di termo-ossidazione potrebbe essere estremamente vantaggiosa. Il naso elettronico potrebbe essere lo strumento in grado di fornire una rapida e globale analisi della degradazione dell'olio (Savarese *et al.*, 2007; De Marco *et al.*, 2007).

4.2. Obiettivi e disegno sperimentale

Questa parte del lavoro di dottorato è nata dalla collaborazione con il CRIOL, Centro Ricerche per l'industria Olearia, nell'ambito del progetto "Controllo Qualità ed Innovazione Tecnologica nell'Industria Olearia attivato nell'ambito di un progetto MIUR DL 297 in collaborazione con l'industria Olearia Biagio Mataluni (Montesarchio, BN).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'opportunità di impiegare il naso elettronico nel monitoraggio dell'evoluzione subita da un olio nel corso di un processo di frittura e di confrontare il giudizio del naso elettronico sulla degradazione dell'olio con quello derivante dall'integrazione delle informazioni tratte da analisi convenzionali (acidità; indici spettrofotometrici, composti polari totali, acidi grassi a corta catena, rapporto tra acido linoleico e acido palmitico, colore). La valutazione della degradazione dell'olio nel corso del processo di termossidazione e allo stesso tempo delle caratteristiche organolettiche dell'alimento fritto è stata effettuata riproducendo le condizioni nelle quali comunemente viene effettuata la frittura domestica, a tale scopo tre miscele di oli vegetali sono state sottoposte a prove di frittura di patate (*french fries*) pre fritte e surgelate.

4.3. Materiali e Metodi

4.3.1 Campionamento

Al fine di sviluppare gli obiettivi precedentemente descritti sono state realizzate, presso il Laboratorio di Ricerca sugli Oli e Grassi del Dipartimento di Scienza degli Alimenti, delle prove di frittura con patate surgelate utilizzando, come bagno di frittura, tre diversi oli vegetali: un olio di palma, una miscela palma-girasole e un olio di semi vari, normalmente del commercio (olita). In **Tabella 4.3.1.1** si riportano gli indici qualitativi di partenza degli oli utilizzati.

Tabella 4.3.1.1. Valori degli indici di qualità (media \pm deviazione standard) riscontrati negli oli vegetali utilizzati nel presente lavoro di tesi.

Tipologie di oli impiegati		Acidità (%)	K_{232}	K_{270}	ΔK
Olio A	Miscela Palma-Girasole	0,09 \pm 0,01	2,25 \pm 0,00	1,35 \pm 0,01	0,17 \pm 0,00
Olio B	Olio di Palma	0,09 \pm 0,01	2,17 \pm 0,01	0,58 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01
Olio C	Olio di semi vari (Olita)	0,10 \pm 0,00	3,37 \pm 0,01	2,76 \pm 0,01	0,35 \pm 0,01

Il disegno sperimentale seguito per le prove di frittura è schematizzato in **Figura 4.3.1.1**

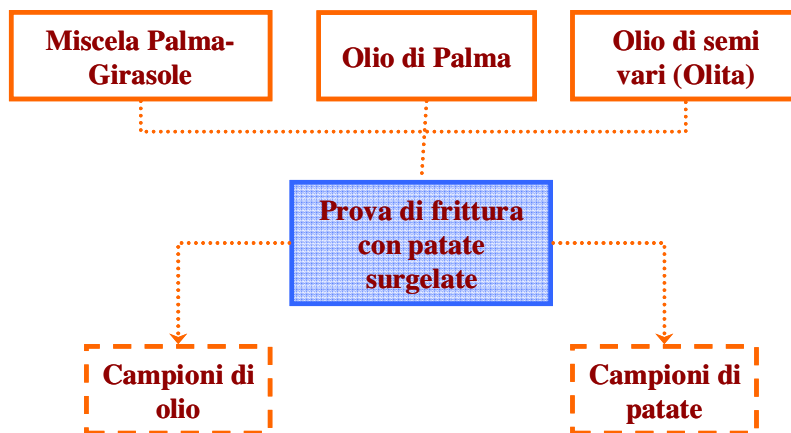


Figura 4.3.1.1 Disegno sperimentale relativo alle prove di frittura effettuate nel presente lavoro di tesi.

La valutazione della degradazione dell'olio nel corso del processo di termossidazione e allo stesso tempo delle caratteristiche organolettiche dell'alimento fritto è stata effettuata riproducendo le condizioni nelle quali comunemente viene effettuata la frittura domestica.

Sono stati effettuati, per ciascun olio, in una friggitrice elettrica della capacità di 1 litro, due cicli di frittura discontinua della durata di 4 ore ciascuno, intervallati da una pausa di 1 ora. Ogni 30 minuti è stata effettuata una frittura di un campione di patate surgelate, per un totale di 8 frittiture per ciascun olio. Campioni di olio (50 ml) sono stati prelevati dopo 0, 4 e 8 ore di frittura e congelati (-20°C) prima di essere sottoposti ad analisi.

4.3.2 Determinazione dell'acidità (vd. § 3.3.7)

4.3.3 Determinazione degli indici spettrofotometrici (vd. § 3.3.9)

4.3.4 Determinazione del colore

Il "*colore*" di un materiale in generale, e di un olio in particolare è dovuto alla capacità posseduta da alcune sostanze presenti in esso (clorofille, xantofille, carotenoidi, porfirine), di assorbire radiazioni comprese tra i 380 ed i 770 nm (spettro del visibile), ed emettere radiazioni corrispondenti al colore complementare di quello assorbito.

Il colore di un olio è un attributo qualitativo molto importante, infatti dal punto di vista commerciale, è il primo elemento che colpisce il consumatore e concorre insieme all'aroma ed al gusto alla determinazione, da parte di questi, di un giudizio qualitativo. Il colore può essere utilizzato come marcatore macroscopico dell'evoluzione di un olio, infatti, rappresenta uno dei parametri che va soggetto a modificazioni palesi nel corso della shelf-life. Il colore è menzionato e rappresenta un parametro di tipicità, nei disciplinari di produzione degli oli D.O.P. La valutazione del colore può essere utilizzata come verifica indiretta dell'efficienza del sistema di decolorazione nei processi di rettifica. Viste le suddette implicazioni pratiche che il colore di un olio ha, sorge spontanea l'esigenza di un metodo di valutazione di esso che si svincoli dalla soggettività della valutazione comparativa

con scale convenzionali precostituite, ed utilizzi uno strumento oggettivo affidabile e ripetibile quale lo spettrofotometro.

Procedimento. I campioni di olio, prelevati a diversi tempi di frittura, sono stati sottoposti ad una valutazione del colore mediante spettrofotometria. È stata misurata l'assorbanza a diverse lunghezze d'onda (445, 495, 560, 595 e 625 nm) utilizzando la paraffina come bianco. I valori tristimolo (X, Y e Z) sono stati successivamente calcolati secondo la metodica stabilita dalla Commissione Internazionale sull'Illuminazione (C.I.E., *Commission Internationale d'Eclairage*):

$$X = (0,19 \times T_{445}) + (0,38 \times T_{560}) + (0,13 \times T_{595}) + (0,28 \times T_{625})$$

$$Y = (0,21 \times T_{495}) + (0,62 \times T_{560}) + (0,17 \times T_{625})$$

$$Z = (0,94 \times T_{445}) + (0,24 \times T_{495})$$

dove:

T_{XXX} = valore della trasmittanza alla lunghezza d'onda di XXX nm.

Sono state, inoltre, calcolate le tre principali caratteristiche mediante le quali viene identificato un colore secondo il modello HSB (*Hue, Saturation, Brightness*):

Tinta (o lunghezza d'onda dominante);

Saturazione, ovvero quantità di parte cromatica rispetto a quella acromatica;

Trasparenza o luminosità relativa (Y%), che assume valore nullo per il nero e 100% per l'incolore.

Strumentazione Per l'analisi è stato utilizzato uno spettrofotometro UV-visibile Shimadzu mod. UV-1601 (Shimadzu Italia, Milano), cuvette in plastica monouso, paraffina. Dopo aver tarato la linea di base dello strumento con la paraffina, si procede alla determinazione dello spettro di trasmittanza nel visibile del campione di olio.

4.3.5 Determinazione degli acidi grassi a catena corta

Per determinare la formazione e l'evoluzione di acidi grassi a corta catena, che si formano negli oli a seguito di riscaldamento a temperatura elevata e frittura, si è tenuta presente la metodica proposta da Marquez-Ruiz e Dobarganes (1996a).

Principio del metodo. Il metodo prevede il dosaggio degli acidi grassi a corta catena ($C_{7:0}$ e $C_{8:0}$) originatisi dalla rottura dei radicali alcossido, derivanti dagli idroperossidi allilici, mediante gas-cromatografia dei relativi esteri metilici.

Procedimento. 20 μ l di olio/grasso sono stati sciolti in 2 ml di esano, è stato aggiunto 1 ml di soluzione 2N di KOH in metanolo. Dopo aver sottoposto la provetta a vigorosa agitazione, per 60 secondi, e aver atteso la separazione delle fasi, sono stati prelevati 0,9 ml della fase esanica limpida e sono stati aggiunti 100 μ l di una soluzione madre contenente lo standard interno $C_{9:0}$ in concentrazione pari a 500 ppm (in modo da avere una concentrazione dello S.I. nella soluzione finale pari a 50 ppm). Dopo ulteriore agitazione, 2 μ l di campione sono stati iniettati al gas-cromatografo.

Strumentazione. Per l'analisi sono stati utilizzati:

gascromatografo Shimadzu (mod. GC-17A) con rilevatore a fiamma di idrogeno (F.I.D.); software di acquisizione Class-VP Chromatography data system vers. 4.6 (Shimadzu Italia, Milano);

colonna capillare FAME (Quadrex Corporation, New Heaven, U.S.A.) da 50 m x 0,25 mm i.d., fase stazionaria 50 % Cianopropyl-Methyl Phenyl Silicone di 0,25 m di spessore.

Condizioni operative. L'analisi gascromatografica è stata condotta nelle seguenti condizioni:

camera mantenuta inizialmente a 80°C per 9 minuti, incremento termico di 10°C/min fino ad arrivare ad una temperatura di 170°C mantenuta per 12 min e, dopo un ulteriore incremento di 10°C/min, a 220°C per 6 min;

temperatura iniettore: 250°C;

temperatura F.I.D.: 250°C;

gas di trasporto: elio;

gas ausiliare: azoto;

flusso di elio in colonna pari a 2 ml/min;

rapporto di splittaggio 1/70.

Espressione dei risultati. Per il calcolo del contenuto di acidi grassi a corta catena nei campioni in ppm si è utilizzata la seguente proporzione:

$$C_{9:0} \div 50 \text{ ppm} = C_{8:0} \div x$$

dove:

$C_{9:0}$ = area assoluta dello standard

50 ppm = contenuto di standard C9:0 presente nella soluzione

x = contenuto (in ppm) di C8:0 nella soluzione iniettata

La quantità x calcolata dalla precedente proporzione si riferisce ad 1 ml di soluzione olio esano transesterificata. In tale volume sono contenuti 10 mg di olio. Per esprimere la quantità di C8:0 (mg/10g di olio) in g/Kg (mg/g) occorre quindi dividere per un fattore di 10.

4.3.6 Valutazione del flavour mediante NE (vd. § 1.2)

4.3.7 Determinazioni di composti polari in oli di frittura

E' stato utilizzato il metodo suggerito dalla circolare 1/91 dell'istituto Superiore di Sanità per la determinazione dei composti polari minori negli oli di frittura (Circolare del Ministero della Sanità, 1991).

Principio del metodo. I composti polari dell'olio e del grasso in esame sono separati per cromatografia su colonna di silice dai composti non polari. I composti polari (trattenuti dalla colonna) si calcolano per differenza tra il peso del campione introdotto in colonna e quello dei composti non polari presenti nella frazione fluída.

Procedimento. Preparazione della colonna cromatografia. Si impiega una colonna di vetro, lunga 45 cm, del diametro interno di 21mm. In fondo alla colonna si pone un batuffolo di cotone e quindi si riempie con circa 30 ml di solvente di eluizione costituito da una miscela di etere di petrolio (30°-50°C) ed etere etilico (87:13 v/v). Si introducono dall'alto 25 g di gel di silice (finezza delle particelle 70-230 mesh), umidificato con acqua (5%), insieme a circa 80 ml del solvente di eluizione. Si completa la preparazione della colonna facendo depositare, sopra al gel di silice, circa 4 g di sabbia di mare calcinata.

Cromatografia su colonna. Circa 2,5 g di campione di olio, esattamente pesati (con approssimazione di 0.001 g) vengono posti in un pallone taratola 50 ml e sciolti in 20

ml del solvente di eluizione. Si introducono i 20 ml di questa soluzione in colonna, facendo attenzione a non sollevare la sabbia in superficie si lasciano fluire, e l'eluato viene raccolto in un pallone da 250 ml, preventivamente essiccato a 105°C ed esattamente pesato. L'eluizione dei trigliceridi non polari viene completata aggiungendo 150 ml del solvente di eluizione 60-70 min. Durante quest'operazione si deve prestare attenzione a che la parte superiore della colonna non vada mai a secco. Per la determinazione gravimetrica il solvente viene eliminato con l'aiuto di un evaporatore rotante usando un bagno ad acqua a temperatura non superiore a 60°C evitando perdite dovute a formazione di schiuma. Si completa l'evaporazione sotto azoto. Si pesa nuovamente il pallone e per differenza si calcola la percentuale di composti polari.

Espressione dei risultati. Il contenuto di composti polari in % (m/m) è dato dalla seguente formula

$$\frac{(m - m')}{(m \times 100)}$$

dove:

m' = massa in grammi della frazione non polare;

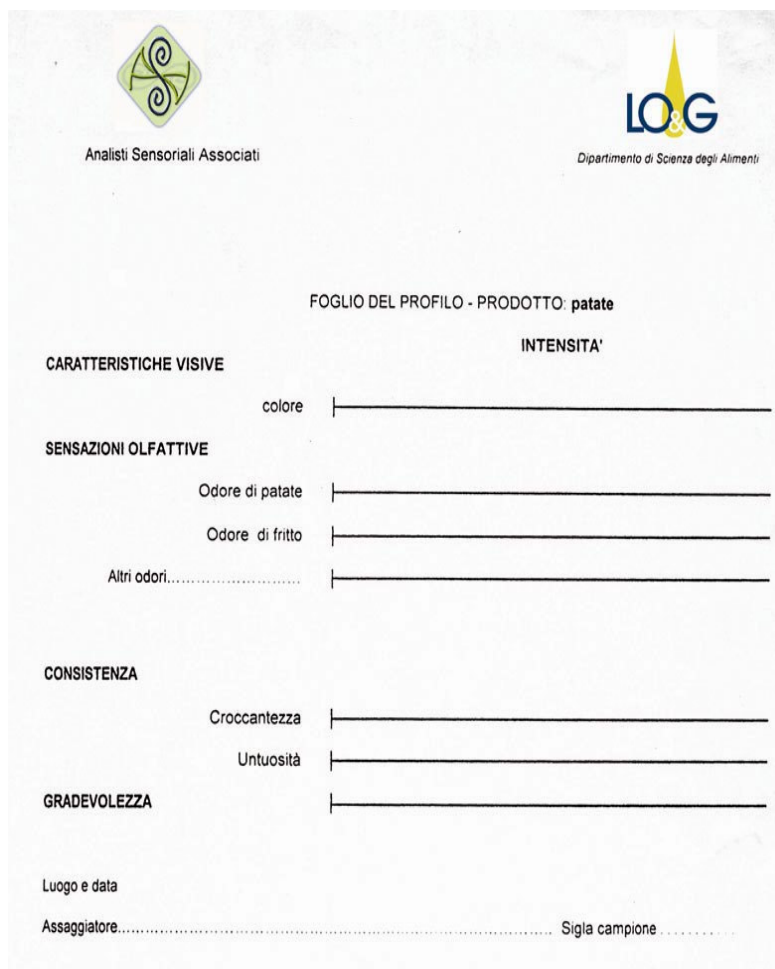
m = la massa in grammi del campione contenuto in 20 ml di soluzione aggiunta in colonna.

4.3.8 Valutazione organolettica dell'alimento fritto

La valutazione organolettica dei campioni di patate fritte nei tre oli utilizzati nel presente lavoro di tesi è stata effettuata presso il Laboratorio di Ricerca sugli Oli e Grassi, Dipartimento di Scienza degli Alimenti (Facoltà di Agraria, Portici, Napoli). La giuria da assaggio è stata selezionata tra consumatori abituali di tale tipologia di prodotto e addestrata al riconoscimento delle caratteristiche olfattive, gustative e tattili utilizzate come descrittori.

Agli assaggiatori è stato chiesto di quantificare gli attributi riscontrati nei vari campioni di patate, utilizzando una scala edonistica non strutturata della lunghezza di 10 centimetri. La scheda di assaggio utilizzata è riportato in **Figura 4.3.2.7.1**

L'intensità dei vari attributi è stata espressa come media dei punteggi di ogni singolo assaggiatore.



The image shows a sensory evaluation form for fried potatoes. At the top left is the logo for 'Analisti Sensoriali Associati' (Sensory Analysts Association), and at the top right is the logo for 'LOG Dipartimento di Scienza degli Alimenti' (Department of Food Science). The title of the form is 'FOGLIO DEL PROFILO - PRODOTTO patate' (Profile Sheet - Product potatoes). The form is organized into several sections, each with a list of attributes and a corresponding horizontal line for rating intensity. The sections are: 'CARATTERISTICHE VISIVE' (Visual Characteristics) with 'colore' (color); 'SENSAZIONI OLFATTIVE' (Olfactory Sensations) with 'Odore di patate' (potato odor), 'Odore di fritto' (fried odor), and 'Altri odori.....' (Other odors.....); 'CONSISTENZA' (Consistency) with 'Crocantezza' (crispness) and 'Untuosità' (oiliness); and 'GRADEVOLEZZA' (Palatability). At the bottom, there are fields for 'Luogo e data' (Location and date), 'Assaggiatore.....' (Taster.....), and 'Sigla campione.....' (Sample code.....).

Figura 4.3.2.7.1 Scheda di assaggio utilizzata per la valutazione organolettica dei campioni di patate fritte.

4.3.9 *Analisi statistica (vd. § 3.3.17)*

4.4 Risultati e discussione

Gli oli alimentari utilizzati nel presente lavoro di tesi sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico e chimico-fisico, al fine di correlare l'evoluzione degli indici per il monitoraggio dell'ossidazione e della degradazione termica alla composizione iniziale degli oli.

Di seguito vengono riportati e discussi i risultati ottenuti dalle analisi effettuate sui campioni di olio sottoposti al processo di frittura.

4.4.1. Parametri qualitativi

I valori dei parametri di qualità riscontrati nei tre diversi oli durante 8 ore di frittura in presenza di alimento sono riportati in **Tabella 4.4.1.1**

Allo scopo di evidenziare differenze significative tra i diversi tempi di frittura i dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA ad una via).

Tabella 4.4.1.1. Valori degli indici di qualità riscontrati nei tre diversi campioni di olio durante la frittura per 8 ore in presenza di alimento.

	Acidità (% acido oleico)			K ₂₃₂			K ₂₇₀			ΔK		
	Olio iniziale	4 ore di frittura	8 ore di frittura	Olio iniziale	4 ore di frittura	8 ore di frittura	Olio iniziale	4 ore di frittura	8 ore di frittura	Olio iniziale	4 ore di frittura	8 ore di frittura
Olio A	0,09 ^a	0,12 ^b	0,20 ^c	2,249 ^a	8,197 ^b	9,315 ^c	1,346 ^a	2,985 ^b	3,906 ^c	0,165 ^a	0,287 ^b	0,340 ^c
Olio B	0,09 ^a	0,17 ^b	0,25 ^c	2,165 ^a	5,60 ^b	7,209 ^c	0,577 ^a	2,301 ^b	2,751 ^c	0,030 ^a	0,199 ^b	0,228 ^c
Olio C	0,10 ^a	0,18 ^b	0,24 ^c	3,369 ^a	6,485 ^b	7,616 ^c	2,757 ^a	3,609 ^b	4,046 ^c	0,355 ^a	0,356 ^a	0,364 ^a

Valore medio risultante da tre determinazioni

^{a-c} lettere diverse indicano differenza significativa ($p \leq 0,05$) tra i diversi tempi di frittura per uno stesso olio

Come ci si attendeva, si è assistito ad un incremento, nel corso della frittura, di tutti gli indici considerati.

In **Figura 4.4.1.1** si riportano i valori dell'acidità libera rilevati nei tre oli sottoposti a frittura per immersione (deep-frying) in presenza di patate.

L'incremento di tale parametro con l'aumentare delle ore di frittura nei tre oli utilizzati è risultato significativo ($p \leq 0,05$).

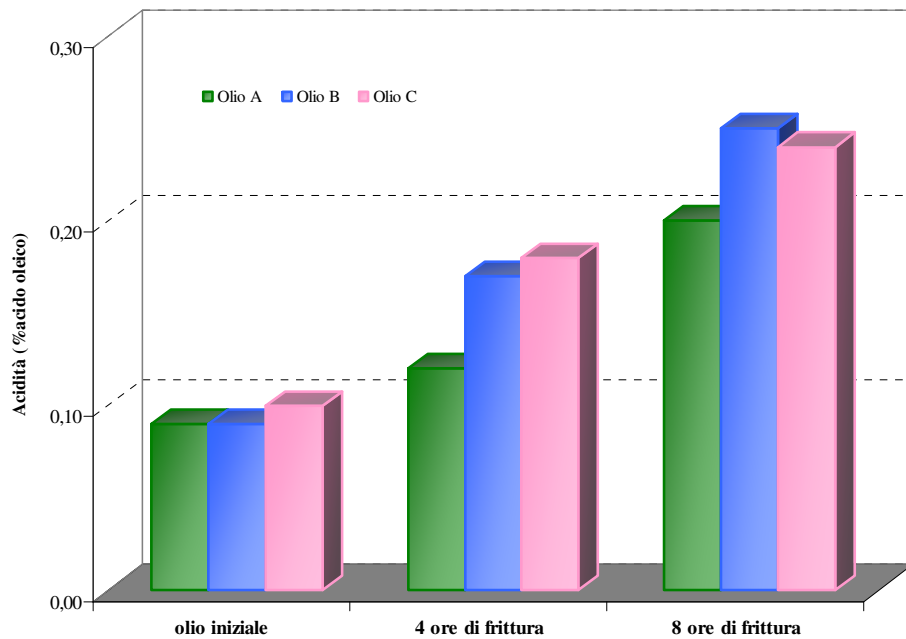


Figura 4.4.1.1. Andamento dell'acidità libera rilevata nei campioni di olio durante 8 ore frittura.

Tale incremento risulta maggiore negli oli B e C rispetto all'olio A, che invece mostra un maggiore incremento del K_{232} (**Figura 4.4.1.2**).

In ogni caso, l'aumento percentuale del valore di acidità libera è dovuto alle reazioni di ossidazione, idrolisi e pirolisi che, favorite dall'incremento di temperatura e dalla presenza dell'alimento (passaggio di acqua dall'alimento all'olio), provocano la rottura dei legami di estere della struttura trigliceridica favorendo l'aumento degli acidi grassi liberi nell'olio (Frankel, 1998).

In **Figura 4.4.1.2** si riporta l'andamento degli indici spettrofotometrici, K_{232} (**a**), K_{270} (**b**) e ΔK (**c**) rilevati nei tre oli utilizzati nel corso delle prove di frittura.

Dall'osservazione degli indici spettrofotometrici è possibile notare come l'olio B risulti meno sensibile allo stress ossidativo, in quanto presenta valori dei dieni e trieni coniugati, prodotti derivanti dalla degradazione degli idroperossidi, più bassi degli altri due oli analizzati, anche al termine delle otto ore di frittura.

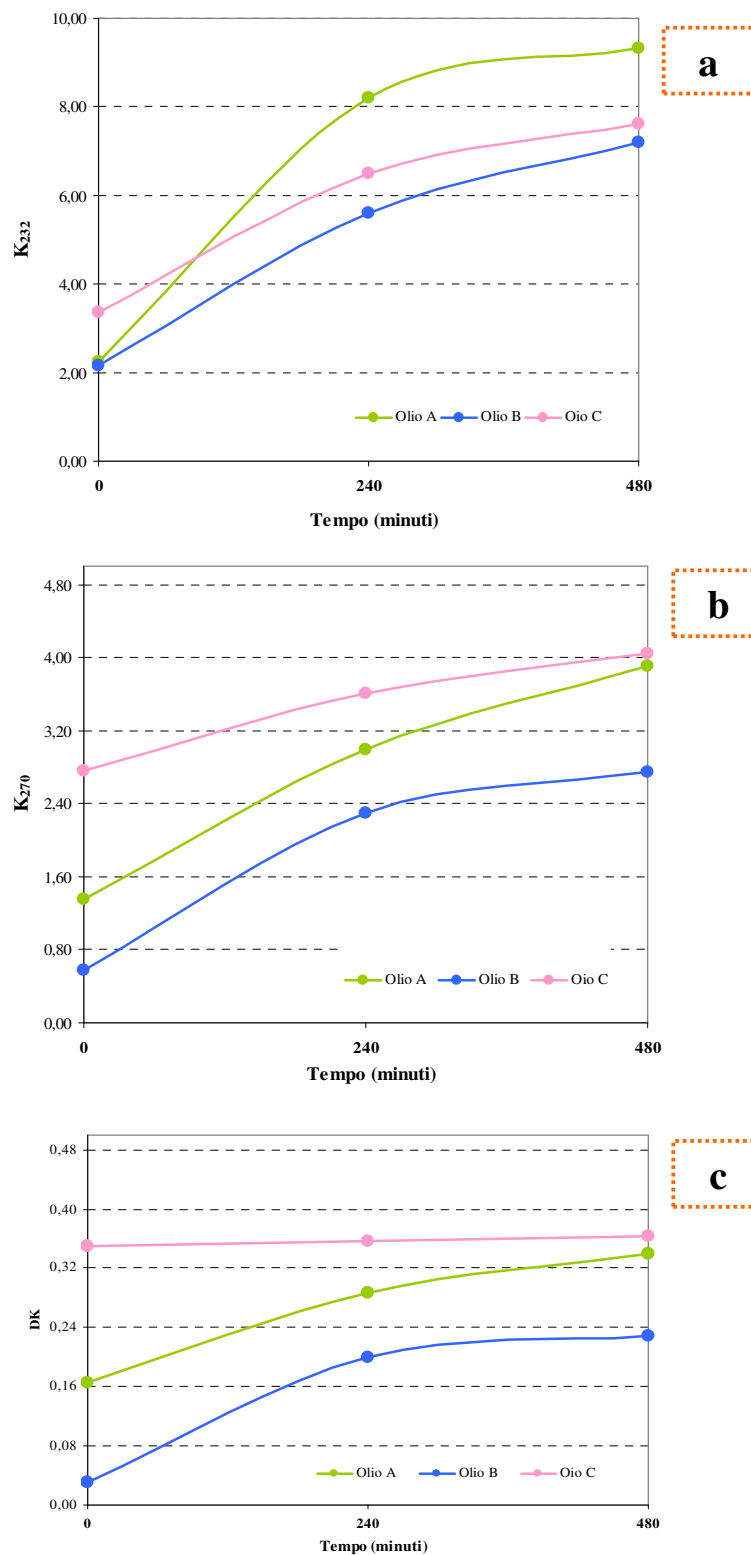


Figura 4.4.1.2. Andamento del K_{232} (a), del K_{270} (b) e del ΔK (c) per i tre oli alimentari oggetto di studio durante le 8 ore di *deep-frying*.

4.4.2 Valutazione dei Composti Polari Totali nell'olio di frittura

La determinazione dei Composti Polari Totali (CPT) negli oli di frittura è importante a fine di valutarne lo stato di degradazione. Tali composti, infatti, derivano da reazioni a carico dei trigliceridi e da composti solubili in olio e derivanti dall'alimento in esso fritto.

La determinazione dei composti polari rappresenta un ottimo per valutare la qualità globale di un olio sottoposto a trattamento termico, adottata come metodo ufficiale in molti paesi.

In **Figura 4.4.2.1** si riporta l'andamento dei CPT nei campioni di olio a diversi tempi di frittura in presenza di patatine prefritte surgelate.

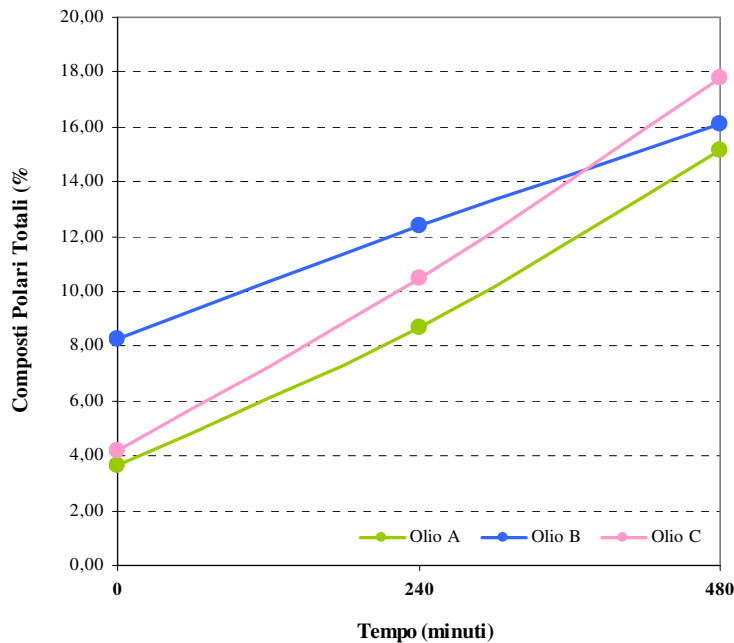


Figura 4.4.2.1. Evoluzione del livello dei Composti Polari Totali riscontrato nei campioni di olio utilizzati per il processo di frittura.

Al termine delle 8 ore di frittura il livello dei composti polari totali risulta essere superiore nell'olio C (17,7%) rispetto all'olio B (16,10%) ed all'olio A (15,16%). Questi ultimi due presentano un valore finale simile pur partendo da un diverso valore iniziale (3,6% per l'olio A contro 8,3% dell'olio B). Al termine dell'intera prova di frittura, comunque, tutti e tre gli oli presentano valori di CPT inferiori al limite massimo del 25% suggerito dalla legislazione italiana (Circolare del Ministero

della Sanità, 1/1991) ed internazionale, superato tale valore, infatti, gli oli dovrebbero essere scartati.

4.4.3 Determinazione del colore dell'olio di frittura

Sui campioni di olio è stata effettuata anche la valutazione del colore mediante analisi spettrofotometrica. È stata misurata l'assorbanza alle lunghezze d'onda di 445; 495; 560; 595 e 625 nm e si è proceduto al calcolo dei tre valori tristimolo (X; Y; Z) secondo il metodo CIE e alla valutazione della luminosità relativa o trasparenza (Y%), della saturazione e della tinta (o lunghezza d'onda dominante). I dati quantitativi sono riportati in **tabella 4.4.3.1**

Tabella 4.4.3.1. Valori relativi ai parametri calcolati per la determinazione del colore dei campioni di olio oggetto di studio.

	Valori tristimolari C.I.E.			Saturazione ($\sigma\%$)	Lunghezza dominante (tinta)
	X	Y (luminosità)	Z		
Olio A T0	92	96	93	0,11	571
Olio A T4	87	92	81	0,17	571
Olio A T8	76	82	50	0,96	572
Olio B T0	84	91	68	0,25	571
Olio B T4	80	86	66	0,24	572
Olio B T8	67	74	37	0,25	573
Olio C T0	93	97	97	0,09	571
Olio C T4	73	78	61	0,23	572
Olio C T8	31	30	11	0,61	605

L'evoluzione del colore dei tre oli nel corso del processo di frittura viene mostrata in **figura 4.4.3.1**

Tutti e tre gli oli utilizzati nel processo di frittura, come atteso, mostrano un progressivo imbrunimento nel corso del processo di frittura, che comunque nelle otto ore è sembrato non compromettere significativamente la loro qualità in relazione a tale attributo.

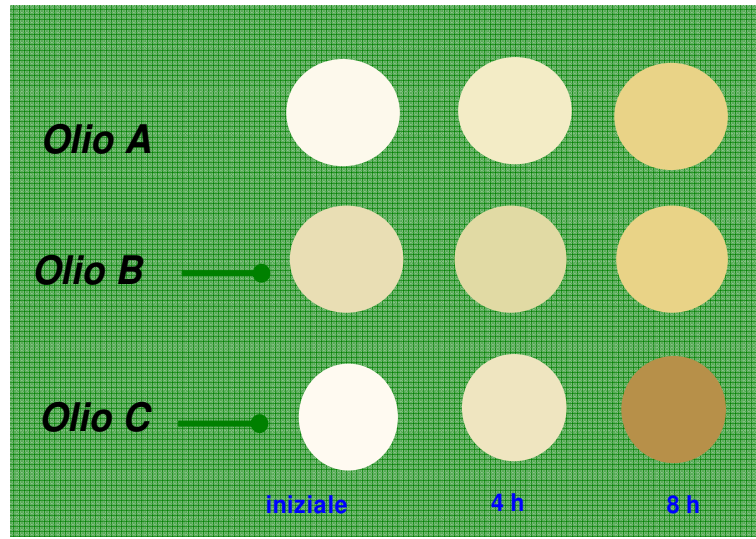


Figura 4.4.3.1. Evoluzione del colore determinato nei campioni di olio durante il processo di frittura.

4.4.4 Composizione in acidi grassi

Nel corso del prolungato processo di frittura, la composizione acidica di un olio va incontro a modificazioni dovute a fenomeni di ciclizzazioni e polimerizzazioni, nonché a reazioni pirolitiche, idrolitiche e ossidative favorite dalle condizioni di frittura (Xu *et al.*, 1999).

L'acido linoleico e l'acido palmitico, in particolare, sono frequentemente utilizzati come indicatori dell'entità della degradazione subita dall'olio, dal momento che il primo, caratterizzato da due insaturazioni, è più suscettibile all'ossidazione rispetto all'acido palmitico che, in quanto saturo, risulta più resistente da questo punto di vista. Di conseguenza, il rapporto tra contenuto di acido linoleico e contenuto in acido palmitico (C18:2/C16:0) può essere impiegato per indicare l'entità della degradazione ossidativa subita da un olio in un processo di frittura (Che Man e Tan, 1999). La composizione acidica dei tre oli utilizzati nel corso della sperimentazione è mostrata in **Tabella 4.4.4.1**

Come atteso, il contenuto percentuale di acidi grassi polinsaturi (quale l'acido linoleico) tende a diminuire nel corso del processo di frittura, e contemporaneamente si osserva un aumento dell'incidenza percentuale dell'acido palmitico.

Tabella 4.4.4.1 Composizione percentuale in acidi grassi rilevata nei campioni di olio iniziale (T0) dopo 4 ore (T4) e dopo 8 ore di frittura (T8).

Acidi grassi (%)	Olio A			Olio B			Olio C		
	Tempo frittura (min)			Tempo frittura (min)			Tempo frittura (min)		
	0	240	480	0	240	480	0	240	480
laurico	0,09	0,09	0,09	0,25	0,25	0,25	0,03	0,04	0,04
miristico	0,39	0,43	0,44	0,9	0,97	0,98	0,19	0,22	0,25
palmitico	16,53	18,49	18,68	32,62	34,74	35,53	12,24	13,46	14,92
t-palmitoleico	0,00	0,03	0,03	0,05	0,05	0,04	0,02	0,02	0,02
palmitoleico	0,14	0,15	0,14	0,23	0,22	0,21	0,15	0,12	0,11
eptadecanoico	0,05	0,05	0,05	0,07	0,08	0,08	0,06	0,06	0,06
eptadecenoico	0,03	0,05	0,04	0,01	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03
stearico	3,49	3,60	3,68	3,51	3,44	3,71	3,47	3,60	3,70
t-oleico	0,04	0,07	0,09	0,07	0,02	0,13	0,05	0,08	0,08
oleico	33,13	34,26	33,96	45,43	45,45	45,15	28,92	28,50	29,69
vaccenico	0,79	0,79	0,79	0,96	0,91	1,01	1,10	1,04	0,09
t-linoleici	0,24	0,29	0,29	0,29	0,31	0,31	0,18	0,34	0,37
linoleico	43,70	40,33	40,28	14,44	12,08	11,17	49,57	48,43	46,51
arachico	0,29	0,30	0,31	0,33	0,35	0,36	0,32	0,33	0,34
t-linolenici	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,03	0,28	0,28	0,27
linolenico	0,18	0,17	0,15	0,24	0,21	0,18	1,96	1,86	1,72
eicosenoico	0,16	0,17	0,18	0,18	0,17	0,17	0,19	0,19	0,19
bebenico	0,44	0,42	0,45	0,09	0,07	0,07	0,48	0,50	0,49
lignocericico	0,18	0,17	0,18	0,08	0,13	0,12	0,18	0,24	0,22
C18:2/C16:0	2,64	2,18	2,16	0,44	0,35	0,31	4,05	3,60	3,12

Il rapporto tra acido linoleico e acido palmitico subisce, quindi un decremento al procedere della degradazione ossidativa subita dall'olio.

La **figura 4.4.4.1** mostra l'andamento di tale indice nel corso del processo di frittura.

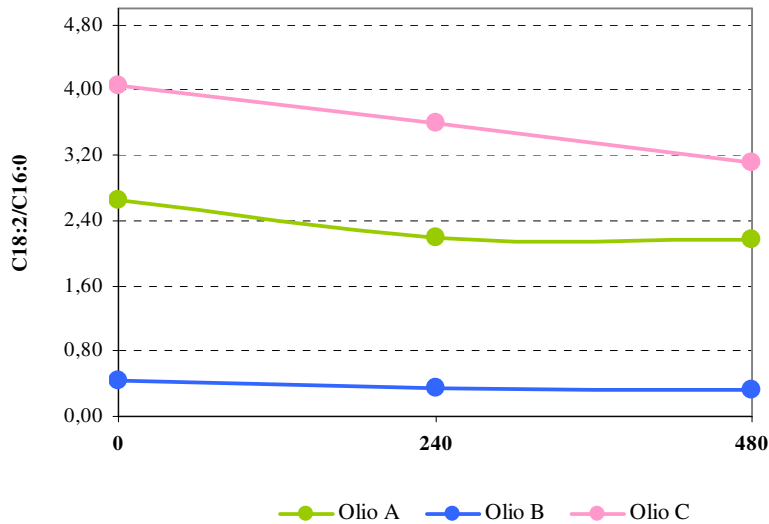


Figura 4.4.4.1 Variazione del rapporto tra acido oleico ed acido palmitico nei tre oli durante le 8 ore di frittura.

Il valore del rapporto linoleico/palmitico è di gran lunga più alto nell'olio C rispetto agli altri due oli usati data la grande diversità nella composizione acidica tra i tre oli di partenza; il decremento di tale indice risulta, comunque, più veloce nell'olio C rispetto agli altri due oli. Tali risultati confermano i dati ottenuti con l'analisi spettrofotometrica, e con la misura del contenuto di composti polari, dove l'olio C ha sempre mostrato un maggiore stato di degradazione durante il processo di frittura.

Determinazione del metil-ottanoato

L'acido grasso a corta catena $C_{8:0}$ costituisce un prodotto secondario di ossidazione originato dalla degradazione degli idroperossidi: le elevate temperature raggiunte durante la frittura provocano la rottura del lato del carbonile dell'oleil-8-idroperossido e degli oleil-e linolenil-9-idroperossidi per dar luogo alla formazione sia di acidi grassi a corta catena ($C_{7:0}$ e/o $C_{8:0}$) legati alla struttura del trigliceride sia di aldeidi insature, alcune delle quali sono responsabili nei cibi dei flavour di "rancido", di "pesce" e di "fritto" (Frankel, 1998).

In **figura 4.4.4.2** sono riportati i valori del metil-ottanoato riscontrati nei tre oli

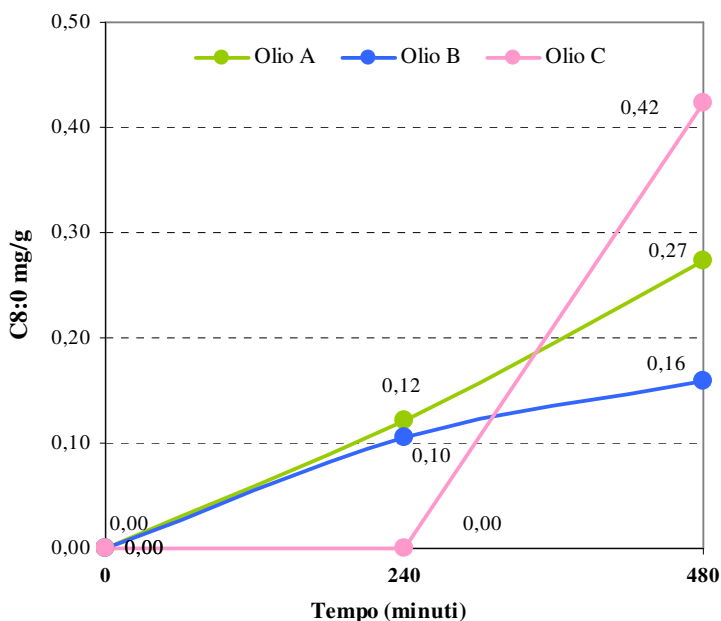


Figura 4.4.4.2: Andamento del metil-ottanoato rilevato nei tre oli durante il processo di frittura

È possibile osservare come l'aumento di tale composto sia diverso nei tre oli nel corso della frittura. Per le prime quattro ore di frittura l'aumento di tale composto è simile per gli oli A e B, nelle successive quattro ore, invece, nell'olio A si verifica un incremento di metil-ottanoato decisamente più veloce che non nell'olio B. Questo andamento è simile a quello mostrato dall'assorbimento a 270 nm: entrambi i parametri, infatti, sono indici di prodotti secondari di ossidazione originatisi nel corso della frittura.

Per semplificare i risultati dei dati sperimentali e ottenere una visione globale dell'evoluzione chimico-fisica subita dagli oli durante il processo di frittura è stata effettuata un'analisi delle componenti principali sui valori dei parametri utilizzati come indici della degradazione subita dell'olio fin'ora discussi. Lo *score plot* di **figura 4.4.4.3**, mostra come sia possibile evidenziare una distinzione sia tra le tre miscele testate, sia tra diversi tempi di frittura. Gli oli si differenziano lungo la seconda componente principale principalmente per il rapporto acido linoleico/palmitico. Infatti, la composizione in acidi grassi è diversa tra le tre miscele di oli utilizzati a dimostrazione della loro diversa origine vegetale. I tempi di frittura si differenziano, invece, lungo la prima componente principale.

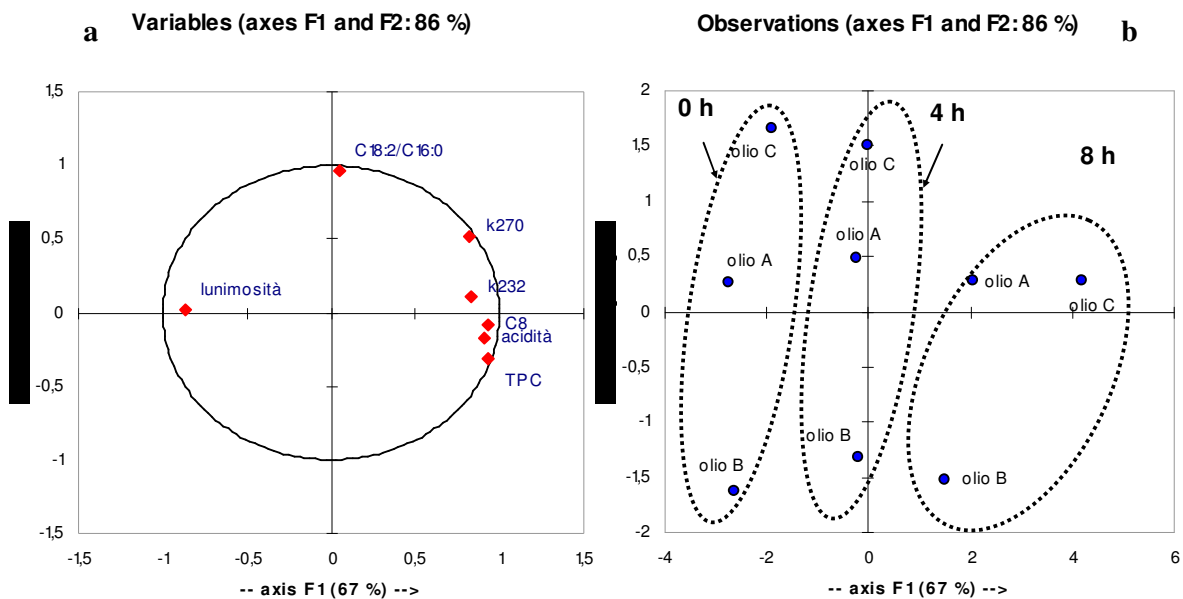


Figura 4.4.4.3. Loading plot (a) e score plot (b) risultanti dalla PCA (varianza spiegata 86%) effettuata sui valori degli indici analitici misurati.

4.4.5 Valutazione del flavour che si sviluppa durante la frittura rilevato mediante Naso Elettronico

Durante il processo di frittura, a causa di modificazioni chimiche e chimico-fisiche a carico degli acidi grassi polinsaturi presenti nell'olio, si ha la formazione di composti volatili responsabili del tipico "odore" di fritto. Lo sviluppo di *flavour* e di *off-flavour* durante la frittura incide direttamente sull'accettabilità dell'alimento fritto da parte del consumatore. Per tale motivo è di fondamentale importanza monitorare la formazione di odori e sapori anomali sia nell'olio utilizzato sia nel prodotto fritto.

Il Naso Elettronico si è mostrato idoneo a tale scopo, grazie alla semplicità e sinteticità di giudizio, all'immediatezza della valutazione ed all'assenza di pretrattamenti del campione. Al fine di verificare l'applicabilità del naso elettronico come strumento utile per monitorare il processo di frittura, è stata effettuata una prova preliminare con un olio di oliva raffinato (deodorato) selezionato perchè non avendo odori iniziali che possono influenzare la risposta dei sensori, le eventuali variazioni osservate sarebbero state determinate solo da composti generati durante la termossidazione. Lo scopo della prova è stato quello di verificare se il naso elettronico risulta capace di distinguere i diversi gradi di degradazione dell'olio e per ottimizzare le condizioni operative e i parametri del metodo di analisi.

In **figura 4.4.5.1** si ripotano il *loading plot* e lo *score plot* risultante dall'analisi delle componenti principali effettuata sulle risposte dei sensori del naso elettronico sui campioni di olio raccolti ai diversi tempi di frittura.

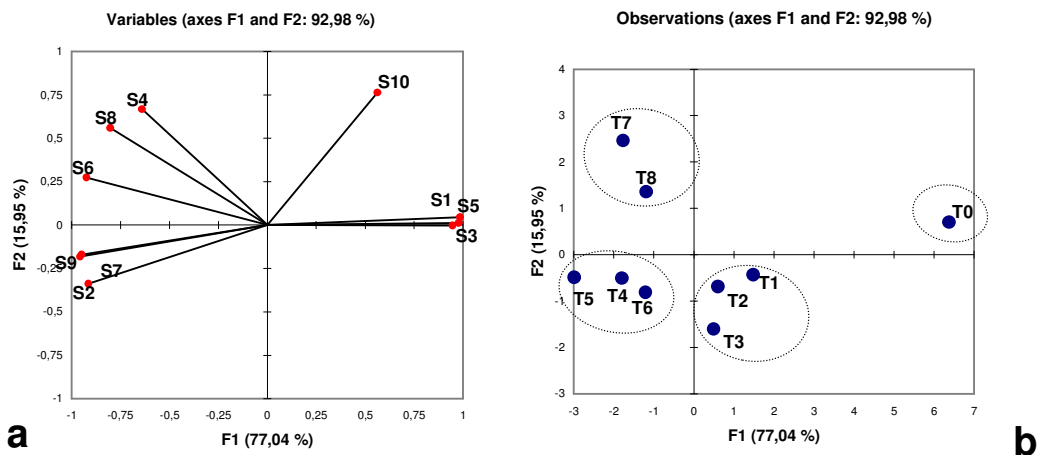


Figura 4.4.5.1 *Loading plot* (a) e *score plot* (b) risultante dall'analisi delle componenti principali (varianza spiegata 93%) effettuata sulle risposte dei sensori del naso elettronico all'olio di oliva rettificato utilizzato per il test di frittura.

Si può osservare che gli oli fritti ai differenti tempi danno risposte dei sensori diverse, come mostrato in **figura 4.4.5.1 a**. In particolare, sono evidenti quattro raggruppamenti: l'olio iniziale (T0), è stato chiaramente distinto dagli altri campioni, dando segnali più intensi per i sensori S1, S3 e S5; gli oli raccolti durante le prime tre ore di frittura (T1, T2 e T3), costituiscono un gruppo separato, così come gli oli delle successive tre ore di frittura (T4, T5, T6). Un altro gruppo è stato formato dagli oli raccolti alla fine del processo (T7 e T8), raccolti dopo 7 e 8 ore di frittura rispettivamente, che hanno dato segnali più intensi per i sensori S4, S6 e S8. Anche se il comportamento di ciascun sensore in risposta alle caratteristiche dell'olio devono ancora essere valutate a fondo, in questo studio preliminare il naso elettronico si è dimostrato in grado di distinguere oli che hanno subito un differente grado di degradazione termica. Perciò, dopo questa prova preliminare, il NE è stato applicato per l'analisi delle tre miscele di olio (A, B, C) utilizzate per la prova frittura con patatine fritte. La **figura 4.4.5.2** mostra l'analisi delle componenti principali ottenuta dai dati risultanti dalle risposte dei sensori del naso dei tre oli dopo 0, 4 e 8 ore di frittura.

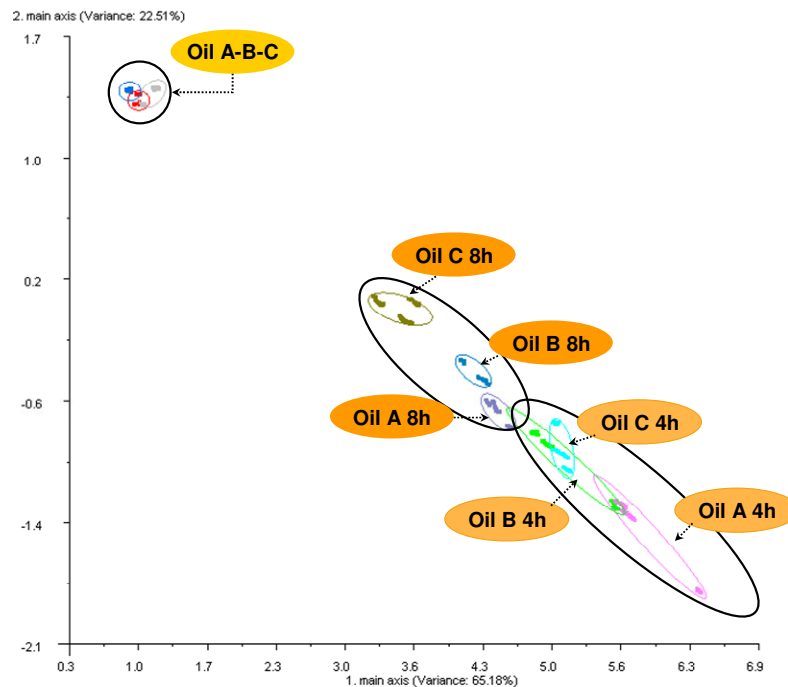


Figura 4.4.5.2. Analisi delle componenti principali ottenuta mediante il *software* Winmuster versione 1.6 (Airsense Analytics Germany) sulle risposte dei sensori del NE ai tre oli analizzati (A, B, C) ai differenti tempi di frittura (0, 4, 8).

Anche in questo caso, si può osservare una distinzione tra i diversi tempi di frittura; gli oli iniziali, in particolare sono chiaramente differenziati dagli oli fritti.

Dall'elaborazione dei dati del naso elettronico, è stata ottenuta una distinzione tra gli oli, ma diversa da quella ottenuta dall'integrazione di diversi parametri analitici (**figura 4.4.4.3**), infatti in questo caso non è possibile osservare un andamento lineare dei tre tempi di frittura.

4.4.6 Valutazione organolettica dell'alimento fritto

In **Figura 4.4.6.1** si riporta l'andamento delle intensità medie riscontrate per l'attributo "colore" nelle patate fritte nei tre diversi oli a diversi tempi di frittura. È evidente come l'alimento fritto nell'olio C presenti una colorazione gialla più intensa rispetto allo stesso fritto nell'olio A e B. Per quanto riguarda questi ultimi due oli, le patatine fritte nell'olio B hanno presentato una colorazione gialla più intensa rispetto alle stesse fritte nell'olio A, tali differenze non sono però così evidenti nelle ultime due frittiture (T7 e T8). Questi risultati confermano quanto visto con la valutazione del colore dell'olio mediante spettrofotometria, infatti l'olio C risultava essere più scuro rispetto agli altri due oli.

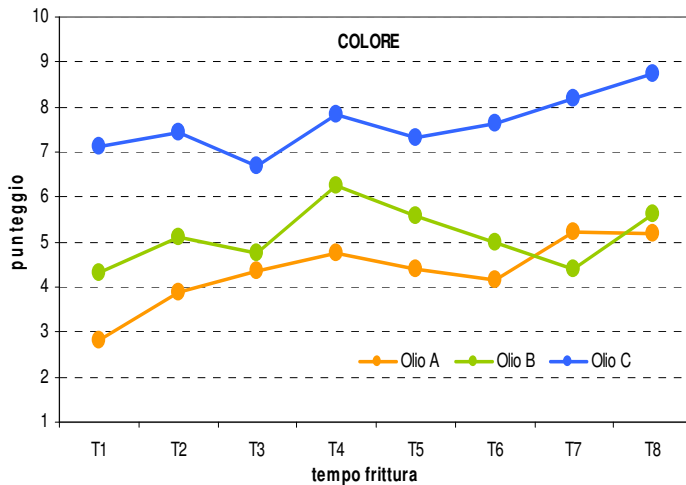


Figura 4. 4. 6. 1. Evoluzione dell'attributo "colore" delle patate fritte nei tre diversi oli utilizzati per la sperimentazione.

Per quanto riguarda il descrittore "odore tipico di fritto" non si sono evidenziate differenze tra gli alimenti fritti nei tre diversi oli (**Figura 4.4.6.2**). Risulta, invece, evidente un incremento graduale dell'intensità di tale attributo con l'aumentare del numero di frittiture.

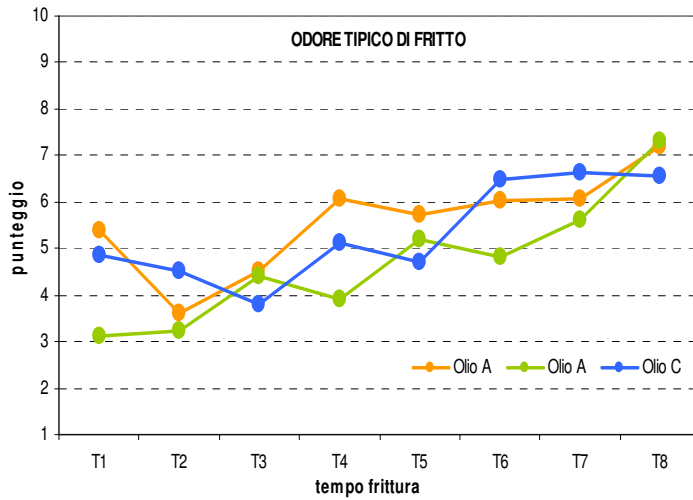


Figura 4. 4. 6. 2. Evoluzione dell'attributo "odore tipico di fritto" delle patate fritte nei tre diversi oli vegetali utilizzati per la sperimentazione.

Per quanto riguarda la "gradevolezza", (**Figura 4.4.6.3**) le patate fritte nell'olio C sono risultate meno gradevoli di quelle fritte negli altri due oli. In generale le patate fritte nell'olio B sono risultate più gradevoli, anche se rispetto all'olio A, tali differenze sono minime.

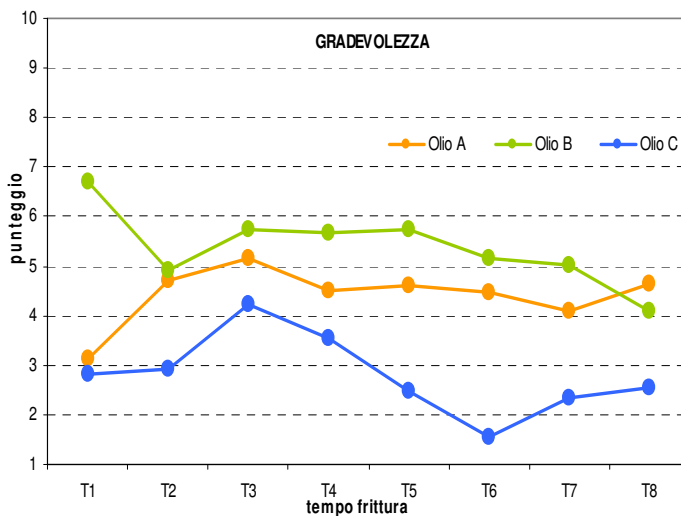


Figura 4. 4. 6. 3. Evoluzione della "gradevolezza" delle patate fritte nei tre diversi oli vegetali utilizzati per la sperimentazione.

4. 5. Conclusioni

Con riferimento al lavoro sperimentale effettuato è possibile trarre le seguenti considerazioni conclusive:

- ✓ I tre oli testati hanno fornito diverse attitudini alla frittura sia per quanto riguarda i parametri ossidativi che per le misure di tipo sensoriale. In particolare i parametri analizzati come gli indici spettrofotometrici, i composti polari e la determinazione del metil-ottanoato hanno messo in risalto la minore stabilità all'ossidazione dell'olio C (olio di semi vari);
- ✓ i dati ottenuti in questo studio, sia pure da considerare preliminare ad una piena applicazione della tecnica del NE nello studio della frittura, hanno dimostrato la capacità del naso elettronico di discriminare oli caratterizzati da diversi gradi di degradazione termica causata dalla frittura prolungata. Ciò induce a valutare come promettenti le applicazioni del NE in questo contesto.
- ✓ dalla valutazione congiunta delle diverse misure indipendenti effettuate, si è osservato un andamento crescente dello stato degradativo degli oli sottoposti al processo di frittura discontinua; tale risultato non è stato ottenuto dall'elaborazione delle risposte dei sensori del naso elettronico. Appare chiaro quindi che, per valutare se tale risultato rappresenti un limite del possibile impiego del naso elettronico al monitoraggio del processo di frittura occorrerà effettuare ulteriori sperimentazioni e ricerche.

4. 6. Bibliografia

Blumenthal M. (1991). A new look at the chemistry and physics of deep-fat frying. *Food technology* 45: 68-71.

Che Man Y.B., Tan C:P: (1999). Effects of natural and synthetic antioxidant on changes in refined, bleached and deodorized palm olein during deep-fat frying of potato chips. *JAOCS*, 76,3: 331-339.

Circolare Ministero Sanità n.1dell'11 gennaio (1991) Oli e grassi impegnati per friggere alimenti.

De Marco E., Savarese M., Parisini C., Battimo I., Falco S. and Sacchi R. (2007) Frying performance of a sunflower/palm oil blend in comparison with pure palm oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*.109: 237-246.

Dobarganes C., Rios J.J., Perez-Camino M.C: (1986). Relaciones entre la composición de aceites vegetales y los componentes volátiles producidos durante su termoxidación. *Grasas y aceites*, 37:61-67.

Frankel E.N. (1982). Volatile lipid oxidation products. *Prog. lipid Res* , 22: 1-33.

Frankel E.N. (1984). Lipid oxidation: Mechanism, products and biological significance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 1908-1917.

Frankel E.N. (1991). Recent advances in lipid oxidation. *J. Sci. Food Agric.* 54: 495-511.

Frankel E.N. (1998). Lipid Oxidation. *The Oily Press*, Dundee (Scotland).pp 303.

Frankel E:N: (1985) Chemistry of autoxidation: mechanism, products and flavour significance, in *Flavor Chemistry of Fats and Oils*, Ed. Mine T.H. Smouse American Oily Press, Dundee (Scotland).

Fritsch C.W. (1981). Measurements of frying fat deterioration: A brief review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58: 272-274.

Jacobson G. A. (1991). Quality control in deep-fat frying operations. *Food Technology* 45: 72-74.

Kochhar S.P. (2001). The composition of frying oils in Frying improving quality edited by J: B: Rossel CRCPress.

- Kochhar S.P., Gertz C. (2004). New theoretical and practical aspects of the frying process. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106: 722-727.
- Marquez-Ruíz G., Dobarganes C. (1996). Short chain fatty acid formation during thermoxidation and frying. *J. Sc. Food Agric.* 70: 120-126.
- Matthaus B. (2007). Use of palm oil for frying in comparison with other high-stability oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109: 400-409.
- Nawar W. W. (1985). Flavor Chemistry of Fats and Oils, Ed. D.B. Min and T.H. Smouse, *American Oil Chemists' Society*, Champaign, pp 93-103.
- Neff W.E, Frankel E.N., Fujimoto K. (1988). Autoxidative dimerization of methyl linolenate and its monohydroperoxides, hydroperoxy epidioxides and dihydroperoxides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65: 616-623.
- Orthofer F.T., Cooper D.S. (1996). Evaluation of used frying oil. In: *Deep Frying, Nutrition and Pratical Applications*, edited by E.G Perkins and M.D.Erickson, American Oil Chemists' Society, Champaign, pp 283-335.
- Orthofer F.T., Gurkin S., Liu K. (1996). Dynamic of frying. In: *Deep frying, Nutrition and Pratical Applications*. Ed. E.G Perkins and M.D.Erickson, American Oil Chemists' Society, Champaign, pp 223-244.
- Parisini C. (2005). Interazioni tra olio vergine di oliva e matrici alimentari nei processi di conservazione e cottura. Tesi di Dottorato di Riceca, 17° ciclo in Scienze e Tecnologie delle Produzioni Agro-alimentari. Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Facoltà di Agraria, Portici.
- Perdaschi F., Moyano P., Kaack K., Granby K. (2005). Color changes and acrylamide formation in fried potato slices. *Food Res. Intern.* 38: 1-9.
- Perkins E.G. (1996). Volatile odor and flavor components formed in deep frying. In *Deep Frying, Nutrition and Pratical Applications*, edited by E.G Perkins and M.D.Erickson, *American Oil Chemists' Society*, Champaign, pp 42-48.
- Rossel J. B. (2001). Factors affecting the quality of frying oils and fats. In *Frying improving quality* edited by J. B. Rossel CRC Press.
- Saguy S.I., Ufheil G., Livings S. (1998). Oil uptake in deep-fat frying: review. *OCL* 5: 30-35.
- Savarese M., Parisini C., De Marco E., Battimo I., Falco S., Sacchi R. (2007) Application of Electronic Nose in the control of frying process. A preliminary study. *Riv. Ital. Sost. Grasse.* 84, 1: 31-37.
- Varela G. (1985). Current facts about the frying of foods. In: *Frying of foods*, Morton ID eds. VCH Chirchester, England, pp. 9-25.

Vitrac O., Trystram G., Raoult-Wack A.L. (2000). Deep-fat frying of food: heat and mass transfer, transformations and reactions inside the frying material. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102: 529-538.

White P.J. (1991). Methods for measuring changes in deep-fat frying oils. *Food Technology* 45: 75-79.

Xu X.Q., Viet H.T., Palmer M., White K., Salisbury P. (1999). Chemical and physical analyses and sensory evaluation of six deep-frying oils. *JAACS*, 76: 1091-1099.

CAPITOLO V. Valutazione della qualità e dell'ossidazione di alici sotto sale durante la maturazione

5.1 Introduzione

La Campania rappresenta, sotto il profilo della domanda di prodotti ittici, un polo di consumo particolarmente importante; non a caso, infatti, il consumo pro-capite di prodotti della pesca è notevolmente superiore alla media nazionale.

La produzione ittica locale riesce a coprire poco più dell'8% del fabbisogno regionale; essa, infatti, negli ultimi anni, è rimasta sostanzialmente invariata a causa della compensazione tra due opposte tendenze: da un lato la progressiva riduzione dello sforzo di pesca (minor numero di battelli operanti e riduzione del tonnellaggio di stazza lorda impegnato), e dall'altro l'aumento del livello di produzione da parte delle singole unità produttive.

Le coste campane hanno un ruolo di primo piano nella produzione ittica campana ed il settore della pesca conserva un significativo peso economico ed occupazionale, che si unisce al valore tradizionale e culturale di un'attività che è parte integrante dell'identità e dell'immagine di questo territorio.

La produzione ittica si caratterizza fortemente per una tipologia di specie catturata che non trova ancora adeguata valorizzazione sul mercato, quella del "pesce azzurro" che generalmente abbonda nei nostri mari. Questa prerogativa offre la massima garanzia al consumatore di freschezza ed economicità, oltre al fatto di essere presente nella maggior parte dei mercati ittici tutto l'anno (www.azzurrodelgolfo.it).

Quella di "pesce azzurro" è una denominazione di uso generale e non corrisponde ad un gruppo scientifico definito di specie marine; un po' come il "pesce bianco" oppure i "frutti di mare". Con il termine "pesce" si intendono le carni e le altre parti edibili di animali acquatici forniti dalle attività di pesca e dall'acquacoltura (Cappelli e Vannucchi, 1998). Si definiscono "azzurri" quei pesci dalla colorazione dorsale blu scuro e ventrale argentea, anche se possono essere considerati appartenenti a questa categoria molti pesci che per forma e dimensione non hanno nulla in comune con gli "azzurri" più conosciuti, che sono le sarde e le alici. L' *Engraulis encrasicolus* (Linneo, 1758), conosciuto più comunemente come alice o acciuga, è un prodotto

della pesca molto antico dell'area Mediterranea. La sua tradizionale conservazione è ottenuta tramite un processo di salagione che è rimasto immutato durante gli ultimi duemila anni.

Nonostante le proprietà organolettiche e nutrizionali che questo pesce possiede, i consumatori sono più orientati verso la scelta di pesci considerati pregiati, scarsi nei nostri mari e quindi in gran parte importati.

La pesca del pesce azzurro viene effettuata da imbarcazioni dette cianciole o lampare e le specie maggiormente insidiate sono le alici e le sarde.

Questa tecnica di pesca richiede condizioni meteomarine ottimali, per cui essa riveste un carattere tipicamente stagionale, con inizio tra marzo ed aprile, e disarmo tra ottobre e novembre.

Molto redditizia è la pesca con fonti luminose, che permette di richiamare banchi di pesce in prossimità delle barche. In questo caso si lavora con un peschereccio principale e due o tre piccole barche di appoggio dotate di fonte luminosa (www.azzurrodelgolfo.it).

5.1.1 La salagione del pesce

I due terzi del pescato mondiale sono destinati al consumo diretto come pesce fresco e un terzo circa viene invece conservato. La conservazione degli alimenti è l'insieme delle tecniche che servono a rallentare i processi alterativi a cui questi vanno incontro, mantenendo inalterate il più possibile le proprietà organolettiche e nutrizionali della materia prima. Perciò, l'uomo, da sempre, si è servito di metodi di conservazione, tanto semplici quanto efficaci, quali la salagione, lo zuccheraggio, l'essiccamento allo scopo di conservare il cibo per lunghi periodi.

La salagione rappresenta uno dei procedimenti più antichi tra quelli adottati per la conservazione degli alimenti ed, in particolare, per il mantenimento dei prodotti ittici. Il sale, oltre ad essere un ingrediente importante in cucina, viene impiegato da secoli in molti processi di conservazione degli alimenti.

L'azione conservativa del cloruro di sodio è riconducibile all'effetto disidratante che esso svolge a carico della matrice alimentare e si basa sul principio che il sale, posto a contatto con l'alimento, attira l'acqua in esso contenuta, disidratandolo.

Esistono due procedure per effettuare la salagione che variano in funzione dell'alimento da conservare:

- ✓ salagione ad umido
- ✓ salagione a secco

La salagione ad umido è un trattamento rapido, utilizzato per la conservazione di grandi quantità di prodotto, che può essere salato per immersione in salamoia o per iniezione della salamoia nell'alimento. Questo metodo si attua disciogliendo il sale in acqua per poi ottenere una soluzione la cui concentrazione varia a seconda dell'alimento da trattare. Questo tipo di salagione ha un'azione più lenta e meno intensa ed è quindi adatta per le preparazioni più delicate, tuttavia, ha l'inconveniente di mantenere nel prodotto un più alto grado di umidità, per cui il periodo di conservazione è più breve.

La salagione a secco consiste nel cospargere il prodotto di sale, non troppo grosso, al fine di favorire una distribuzione uniforme e una penetrazione più rapida nei tessuti.

Il pesce appena pescato, previa eviscerazione, decapitazione e lavaggio, subisce, spesso sulle stesse imbarcazioni, una salagione preliminare. Quella definitiva verrà fatta in scatole, vasi o barili, alternando pesce e sale e pressando il tutto. Seguirà poi un periodo di maturazione. Il sale, una volta penetrato nelle carni, le rende più tenere e seleziona la flora batterica naturale, favorendo le specie che, durante la maturazione, producono sostanze responsabili dell'aroma e del gusto.

I procedimenti e le percentuali di sale, comunque, variano a seconda del tipo di pesce. Le alici vengono lavorate quasi tutte a mano, perché di piccole dimensioni e molto delicate. Ciò incide abbastanza sul prezzo del prodotto finito. La domanda di alici salate e filetti sott'olio, abbastanza alta nel nostro Paese, non può venir soddisfatta dalla produzione nazionale a causa della costante diminuzione di questo tipo di pescato, per cui una buona fetta di questi prodotti proviene dall'Argentina, dalla Spagna, dalla Turchia e dal Nord Africa (Cappelli e Vannucchi, 1998).

La salagione, soprattutto a livello locale, è usata come un modo alternativo di conservazione, per permettere che le alici possano essere consumate anche fuori stagione. La pratica della salagione delle alici avveniva già in tempi antichi ed ora è una comune tradizione in alcuni paesi del Mediterraneo. Le alici salate del

commercio italiano sono prodotte prevalentemente in Spagna e Marocco. In Turchia, la salagione è praticata soltanto nelle aree rurali in maniera non commerciale, ed è stato osservato che non sempre sono osservate condizioni igieniche di processo ideali. Pertanto, questo prodotto, di solito, soffre di una rilevante perdita di qualità (Karakam *et al.* 2002).

5.1.2 La stagionatura della alici sotto sale

Nell'ambito dei paesi dell'Unione Europea, l'Italia, è la principale produttrice di alici fresche (*Engraulis encrasicolus* L.), ma in contrasto con questo dato di fatto indubbiamente positivo bisogna rilevare che un'ingente quantità di pescato viene esportata per essere in parte reimportata, a prezzo notevolmente maggiorato, come prodotto lavorato (alici salate e filetti di acciughe all'olio) (Baldrati *et al.*, 1975).

Le alici salate sono semiconserve poiché non vengono sottoposte ad alcun trattamento termico, neppure blando, una volta confezionate in contenitori ermetici e, quindi, hanno una *shelf-life* più limitata rispetto alle conserve, che al contrario subiscono il processo di sterilizzazione.

La loro stabilità nel tempo è legata, dunque, all'elevato contenuto di sale, alla bassa attività dell'acqua ed alle condizioni di magazzinaggio.

La maturazione è una complessa sequenza di reazioni che dipende da diversi parametri relativi alle condizioni fisico-chimiche di maturazione (temperatura, pH, concentrazione ionica, attività dell'acqua) e dalla biologia del pesce (contenuto di grasso, enzimi, batteri). Come risultato di queste reazioni, il prodotto finito acquisisce una tenera consistenza insieme con lo sviluppo del colore rosa e un forte e caratteristico *flavour*.

E' stato riconosciuto che la maturazione delle alici sotto sale ha luogo seguendo vie enzimatiche. L'importanza attribuita agli enzimi tissutali contro gli enzimi microbiologici è controversa. La ricerca ha indicato che gli intestini dell'alice sono particolarmente importanti. L'eviscerazione parziale, praticata a livello industriale, elimina una parte degli enzimi digestivi che, altrimenti, svilupperebbero nel pesce un sapore amaro. Comunque, una perfetta eviscerazione conduce ad una considerevole

più lenta maturazione, e il pesce non acquisisce il caratteristico *flavour* (Triqui e Reineccius, 1995).

Per quanto concerne l'individuazione di un indice oggettivo atto a definire la completa maturazione delle alici, si ritiene che esse possano essere considerate mature quando la concentrazione degli amminoacidi liberi raggiunge un valore di circa 20g/100g di amminoacidi totali (Baldrati *et al.*, 1975, Pirazzoli *et al.*, 1981). A valori inferiori, il prodotto non può essere considerato completamente maturo, mentre, per concentrazioni superiori, il prodotto comincia ad andare incontro a quei fenomeni di sovramaturazione che si manifestano, soprattutto, attraverso una progressiva perdita di consistenza da parte del pesce.

Non sempre la maturazione procede regolarmente; talvolta, possono instaurarsi delle condizioni favorevoli allo sviluppo di microrganismi alofili che determinano la putrefazione del prodotto. Le cause di queste alterazioni possono derivare da diversi fattori: un contenuto di sale ed una pressatura insufficienti, il grado di freschezza della materia prima ed infine le condizioni di magazzinaggio.

Altre volte invece, il prodotto, pur non alterandosi, va incontro a maturazioni estremamente lente oppure è soggetto a reazioni chimiche che ne provocano l'irrancidimento, inconveniente questo legato all'alto contenuto lipidico del pesce. In generale le alici a più alto contenuto lipidico sono quelle che richiedono le maggiori attenzioni, soprattutto per quanto concerne lo spurgo del grasso nelle primissime fasi di lavorazione (Baldrati *et al.*, 1975).

5.1.3 *Engraulis encrasicolus* (Linneo)

L'*Engraulis encrasicolus* (Linneo, 1758), conosciuto più comunemente come alice o acciuga, appartiene all'ordine dei Clupeiformi.

Si tratta di pesci di piccole dimensioni, la taglia massima è intorno ai 20 cm, quella più comune è di 11-12 cm. Presentano corpo affusolato, con ventre liscio ed arrotondato, la testa è allungata (circa il 25% della lunghezza totale) con ampie aperture branchiali. Il muso è prominente ed acuto.

La bocca, nella parte inferiore della testa, è grande ed oltrepassa il margine posteriore degli occhi. L'unica pinna dorsale è posta a circa metà del corpo in posizione

avanzata rispetto alle pinne posteriori. Le pinne pettorali sono sottili ed allungate e sono in posizione ventrale.

La colorazione, tipica delle specie pelagiche, è azzurra con sfumature verdastre sul dorso, argentea sui fianchi e sul ventre. Le pinne sulla coda sono grigio chiaro, le altre biancastre (**Figura 5.1.3.1**).



Figura 5.1.3.1. Engraulis encrasicolus

Engraulis encrasicolus è una specie pelagica che vive in branchi numerosi e si sposta continuamente tra il Mar Mediterraneo, il golfo della Guinea ed il Mar Baltico.

In autunno ed in inverno si rifugiano nelle profondità marine dove l'acqua è più calda (100-200 m), mentre soggiornano vicino alla costa per il resto dell'anno.

L'acciuga è una specie *curialina* (si adatta bene a differenti salinità) e tollera variazioni comprese tra il 5 ed il 41%, questa caratteristica le permette di penetrare per alimentarsi in lagune, laghi salmastri od estuari.

Si nutre di plancton (piccoli crostacei, larve di molluschi, ecc.) e di fitoplancton (plancton vegetale). Infatti, il plancton è un insieme di organismi pelagici che vengono trasportati passivamente dalle correnti nei mari e nei laghi. Il plancton si divide in *zooplancton*, plancton animale e *fitoplancton*, plancton vegetale. A queste categorie appartengono microrganismi quali: alghe, protozoi, larve di diversi animali, minuscoli crostacei ed alcuni vermi. Il plancton costituisce un importante risorsa alimentare per molti organismi dell'ambiente acquatico.

L'acciuga ha sessi separati. La maturità sessuale è raggiunta al termine del primo anno di vita (taglia di circa 9 cm) e la riproduzione avviene da aprile a novembre, sotto costa. Le uova emesse, fino a 40.000 per ogni femmina, sono galleggianti, senza gocce oleose, ellittiche, con diametro di circa 1mm. Queste, dopo due o tre

giorni schiudono e, le larve, larghe circa 2 mm, danno avvio alla vita gregaria. La vita massima di questi pesci è di circa 4 anni.

5.1.4 La qualità nutrizionale delle alici

Il consumo dei prodotti ittici, ed in particolare del pesce azzurro, ha un ruolo estremamente importante nella dieta, visto il notevole apporto di:

- proteine di elevato valore biologico (la salagione non comporta in genere perdite apprezzabili di nutrienti; il pesce essiccato deve la sua importanza alla ricchezza in proteine di elevato valore nutritivo dato che la composizione in amminoacidi essenziali rimane praticamente inalterata) (Fidanza, 1996);
- sali minerali, tra cui fosforo, iodio, calcio e fluoro;
- vitamine A, D, E, K, tiamina, riboflavina. Nell'acciuga è stata riscontrata una quantità elevata di niacina, circa 14 mg per 100 g di parte edibile (Fidanza, 1996);
- acidi grassi polinsaturi, in particolare quelli della serie ω -3, dei quali i prodotti ittici sono l'unica fonte alimentare significativa (Orban, 1996).

Diversi studi epidemiologici su popolazioni caratterizzate da una bassa incidenza di malattie cardiovascolari, hanno indicato che diete ricche in oli di pesce possono promuovere cambiamenti positivi in alcune proprietà dei lipidi del sangue implicati nello sviluppo di queste malattie (Cronin e Sullivan, 1990; Mattson e Grundy, 1985).

I grassi dei pesci sono in grado di contrastare più validamente di quelli dei mammiferi l'accumulo di colesterolo nel nostro sistema vascolare e di frenare la formazione di quelle "placche ateromatose" all'interno dei vasi sanguigni che possono ostacolare progressivamente il regolare flusso del sangue (Fidanza, 1996).

Quindi i lipidi di origine marina, ricchi di acidi grassi mono (MUFA) e polinsaturi (PUFA), appaiono più utili per il nostro metabolismo che non quelli dei mammiferi, formati essenzialmente da acidi grassi saturi (www.uniprom.it).

Tra i PUFA omega-3 ci sono l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesenoico (DHA). Questi acidi grassi, precursori degli eicosanoidi (prostaglandine, trombossani e leucotrieni), svolgono azioni positive sulla regolazione del metabolismo lipidico, azioni antiateromatose e antitrombotiche. Di conseguenza, ad essi sono state assegnati ruoli preventivi nei riguardi di malattie cardiovascolari (contribuiscono ad un "ambiente vascolare meno incline

all'occlusione"), dell'ipertensione, del diabete, del cancro, dell'artrite reumatoide, della psoriasi e di altre malattie infiammatorie ed autoimmuni. Inoltre essi sono ritenuti particolarmente importanti in tutte le fasi dell'accrescimento e dello sviluppo della specie umana (Fidanza, 1996).

Gli acidi grassi polinsaturi, contenenti almeno due doppi legami, con lunghezza di catena di 18 o più atomi di carbonio, vengono classificati in famiglie o serie metaboliche, in base alla loro struttura e al loro metabolismo (Galli, 1993; Holman, 1970).

I PUFA, a seconda della distanza del primo doppio legame dal metile terminale, vengono in distinti in tre serie che vengono denominate ω -9, ω -6 ed ω -3.

I mammiferi, pur avendo necessità di disporre di un'adeguata quantità di polinsaturi ω -6 ed ω -3, non sono in grado di operare desaturazioni in queste posizioni (Viola, 1997).

Per tale motivo, i capostipiti di queste serie, l'acido linoleico (ω -6) e l'acido α -linolenico (ω -3), costituiscono la famiglia degli acidi grassi essenziali e devono essere assunti con l'alimentazione.

Gli acidi grassi insaturi possono subire nell'organismo l'allungamento della catena con l'aggiunta di ulteriori insaturazioni ad opera di alcune desaturasi. Tra i substrati delle due serie, oltre che con l'acido oleico (ω -9), esiste una competizione a livello delle desaturasi.

L'acido α -linolenico (ω -3) è il substrato preferenziale ed è convertito negli acidi grassi polinsaturi superiori molto più attivamente dell'acido linoleico (ω -6), a sua volta più efficacemente convertito rispetto all'oleico (ω -9).

In assenza dell'acido linolenico (ω -3) e linoleico (ω -6), l'oleico (ω -9), essendo l'unico substrato per le desaturasi, può essere trasformato negli acidi grassi più insaturi, come l'acido eicosatrienoico (ETA), il cui accumulo può essere quindi considerato come un marker della carenza di acidi grassi essenziali (Galli, 1993).

Gli acidi grassi essenziali a catena lunga svolgono anche una funzione "strutturale". Entrando, infatti, nella composizione dei fosfolipidi di membrana, ne aumentano la fluidità ed intervenengono nell'attivazione degli enzimi legati alla membrana stessa (Turchetto e Biagi, 1997; Fidanza, 1996).

Le prostaglandine si distinguono in monoenoiche, dienoiche, trienoiche. a seconda degli acidi grassi polinsaturi da cui derivano. Nell'organismo prevalgono le prostaglandine dienoiche derivanti dall'acido arachidonico (20:4 ω -6), quelle monoenoiche derivanti dall'acido γ -linolenico (18:3 ω -6) e che sono molto poco diffuse in natura, mentre quelle trienoiche, derivanti dall'acido eicosapentaenoico (20:5 ω -3), sono proporzionali alla quantità di acidi grassi della serie ω -3 presenti nella dieta.

Le prostaglandine dienoiche risultano avere una maggiore attività biologica nell'attivazione delle cellule che partecipano ai processi trombotici e infiammatori, a differenza delle prostaglandine trienoiche che hanno una minore attività, per cui un aumento della loro formazione (PGI₃, TXA₃, PGE₃) può considerarsi favorevole poiché conduce ad un miglioramento del quadro lipidico (riduzione della trigliceridemia ed aumento delle HDL) e soprattutto ad una riduzione dell'aggregazione piastrinica (Viola, 1997), a causa della loro marcata azione antitrombotica e vasodilatatrice in contrapposizione all'azione delle prostaglandine derivanti dagli acidi grassi polinsaturi ω -6 (acido arachidonico).

Il rapporto tra ω -3 e ω -6 nella dieta è, pertanto, un importante fattore nell'insieme delle influenze dietetiche sullo stato di salute, visto che un appropriato apporto di acidi grassi polinsaturi può contribuire alla prevenzione delle patologie cardiovascolari, dell'ipertensione, delle malattie infiammatorie croniche e dei tumori. L'apporto dietetico considerato ottimale è quello che vede gli acidi grassi ω -6 e ω -3 in rapporto 4:1 o 6:1, sebbene nell'alimentazione di gran parte della popolazione le quantità di acidi grassi ω -6 sono assai maggiori di quelle indicate, con un rapporto ω -6: ω -3 superiore a 10:1 che può giungere fino a 30:1 laddove sia particolarmente elevato il consumo di oli e margarine di semi e basso il consumo di prodotti ittici, soja, etc (Scalfi e Sacchi, 1993).

5.1.5 I lipidi del pesce, lipolisi e ossidazione

I lipidi del pesce costituiscono la componente più variabile, potendo oscillare tra lo 0,5 ed il 22%. I fattori che influenzano la composizione lipidica sono: la specie, l'età,

il sesso, il particolare momento del ciclo riproduttivo, l'ambiente, l'alimentazione, l'epoca della cattura.

In base alla percentuale lipidica i pesci si suddividono in:

- magri (lipidi < 3%): acciuga, merluzzo, nasello, sogliola, palombo, spigola, trota, luccio;
- semimagri (lipidi 3-8%): dentice, sardina, cefalo, triglia;
- grassi (lipidi > 8%): anguilla, sgombro, tonno, aringa, salmone.

La frazione saponificabile è data da trigliceridi, fosfolipidi, ed in minor misura cere. L'insaponificabile è costituito da idrocarburi tra i quali abbonda lo squalene, vitamine liposolubili (A e D) e da steroli, soprattutto colesterolo (Cappelli e Vannucchi, 1998).

Il grasso, di consistenza fluida per l'alto grado di insaturazione, può avere una dislocazione muscolare, sottocutanea e viscerale (tipica dei pesci grassi), epatica.

Nei pesci possiamo distinguere due tipi di grassi:

- di deposito, che sono costituiti essenzialmente da trigliceridi. Sono localizzati soprattutto nella regione della testa, nel sottocute, nella regione ventrale e si accumulano nel peritoneo che avvolge i visceri addominali e nelle gonadi;
- strutturali, costituiti, in genere, da lipidi complessi, fosfolipidi e dal colesterolo (www.uniprom.it).

Per quanto concerne gli acidi grassi si può affermare che, a differenza di grassi di origine animale o vegetale, quello di pesce ne contiene una più ampia varietà; presenta un considerevole tasso di acidi grassi a lunga catena (20 e 22 atomi di C) e fra questi, significative quantità di EPA (C20:5) e DHA (C22:6). Questi acidi grassi, presenti anche nel fitoplancton, appartengono alla serie n-3 che ha come capostipite l'acido α -linolenico. Palmitico ed oleico rappresentano circa il 30% degli acidi grassi, gli n-3 oscillano tra il 13 ed il 35%, gli n-6 sono inferiori al 5%. I polinsaturi, nei trigliceridi, occupano preferenzialmente la posizione sn-2 del glicerolo (Cappelli e Vannucchi, 1998).

Da uno studio effettuato da Gokoglu *et al* (1999) sulla variazione stagionale del contenuto di grassi delle alici si è rilevato che il contenuto di grasso mostra un massimo a novembre e un minimo a marzo. Le alici, infatti, consumano buona parte del grasso del loro corpo al momento della "frega", fra marzo ed aprile, per

ricostituire le loro riserve nel periodo autunnale. Quindi durante l'inverno le loro carni hanno un contenuto di grassi massimo (7%), mentre in primavera e in estate hanno solo lo 0,5 % di grassi. Questo è uno dei motivi per cui per le acciughe pescate nel periodo primaverile il processo di maturazione si completa in circa quattro mesi, mentre occorrono circa dieci mesi per quelle pescate nel periodo autunnale (www.atlanteparchi.com).

Dopo la morte, i pesci vanno rapidamente incontro a numerose alterazioni a causa della labile struttura e della particolare composizione chimica dei tessuti. Infatti, è proprio nella fase iniziale di lavorazione (eviscerazione, filettatura, decapitazione) che nelle alici potrebbero verificarsi fenomeni di ossidazione lipidica a causa della facile penetrazione dell'ossigeno nei tessuti (Pirati e Guidi, 1971).

Seppure il processo di irrancidimento ossidativo dovesse avere inizio, Baldrati e collaboratori, (1975), hanno messo in evidenza che la diminuzione dei valori di rancidità si manifesta prevalentemente nelle prime fasi della lavorazione, quando i grassi più ossidati, quelli presenti nelle zone tessutali superficiali e nelle cavità ventrali dei pesci, per effetto della penetrazione del sale e della pressatura esercitata (spurgo continuo), fuoriescono e vengono allontanati in seguito alla continua immissione di salamoia pulita.

L'irrancidimento dei lipidi edibili è un serio problema in molti settori dell'industria alimentare: negli alimenti l'ossidazione dei lipidi non produce solamente difetti a livello sensoriale ma è anche responsabile di uno scadimento delle qualità nutrizionali oltre che della formazione di prodotti secondari nocivi per la salute (Frankel, 1998). L'ossidazione è un fenomeno a carico dei lipidi insaturi, costituenti fondamentali della struttura delle membrane biologiche e garanti della loro integrità funzionale. È evidente pertanto che l'ossidazione lipidica può causare importanti danni biologici che possono essere messi in relazione con il tipo di dieta, eventualmente non supportata da una adeguata concentrazione di antiossidanti (Rovellini *et al.*, 1997). I fattori che influiscono sull'ossidazione delle sostanze grasse sono: la quantità e disponibilità di ossigeno presente, la presenza di metalli, di enzimi, di attivatori come la luce e apporti energetici in generale. E' difficile valutare l'effetto di uno specifico fattore nel processo di ossidazione in quanto essi operano simultaneamente (Frankel, 1998; Rovellini *et al.*, 1997).

Rispetto agli acidi grassi saturi, i monoinsaturi e i polinsaturi sono maggiormente esposti alle reazioni di ossidazione, per cui tendono più facilmente dei primi ad andare incontro ad ossidazione e poi ad irrancimento. Ciò spiega perché i prodotti della pesca tendono ad irrancire molto più facilmente delle carni di mammiferi, se lasciati all'aria.

L'ossidazione lipidica è spesso riferita ad un significativo numero di composti volatili che possono essere prodotti dagli acidi grassi polinsaturi (PUFA). Gli idroperossidi, formati come prodotti primari dell'autossidazione lipidica, sono rapidamente decomposti a produrre una varietà di composti volatili secondari di basso peso molecolare. Le aldeidi sono i principali prodotti volatili secondari responsabili di odori e aromi che assumono minore importanza durante la conservazione e i trattamenti ai cibi (Medina *et al.*, 1999). Inoltre, si dovrebbe tener conto che i composti di ossidazione primaria non conferiscono odore al cibo e solo i prodotti di ossidazione secondaria sono responsabili della rancidità (Guillén e Ruiz, 2004).

5.1.6 Tecnica di pesca e trasformazione industriale delle alici sotto sale

Nel Mediterraneo viene praticata per catturare il pesce azzurro esclusivamente la tecnica di pesca denominata “pesca volante”. In tale tipo di pesca si sfrutta una coppia di pescherecci che, procedendo appaiati a distanza adeguata, trascinano delle reti molto grandi, che calate a profondità diverse attirano i pesci con delle sorgenti luminose. Al momento opportuno la rete viene ritirata e issata alternativamente su una delle due navi, svuotata dei pesci e immediatamente rigettata in mare (www.uniprom.it). Il processo di produzione, in questo caso, segue le tappe dell'immagazzinamento e stivaggio in vasche con sale e salamoia, e solo successivamente della scapatura ed eviscerazione, concludendosi con l'inscatolamento e lo stoccaggio in cella frigorifera (15°C) (**Figura 5.1.6.1**).

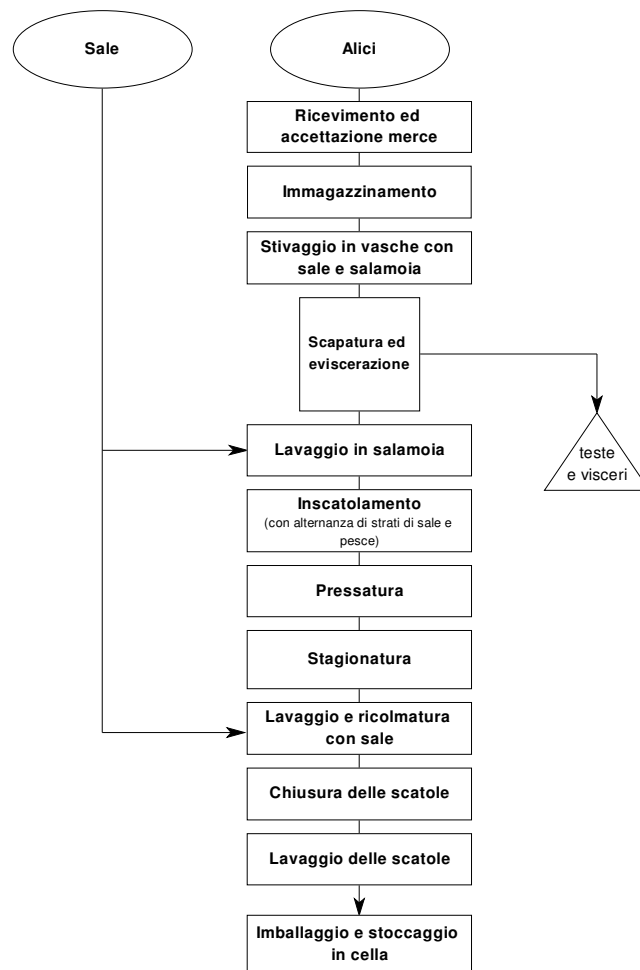


Figura 5.1.6.1 Diagramma di flusso della produzione di alici salate.

5.1.7 Cambiamenti del flavour durante la conservazione dei prodotti ittici

La qualità dei prodotti ittici, e in particolare delle alici sottoposte a maturazione, risulta influenzata dallo sviluppo del *flavour* che si manifesta nel corso della conservazione e che ne determina l'accettabilità da parte del consumatore.

Molte ricerche sono state condotte in passato per studiare il *flavour* dei prodotti ittici e sono stati identificati più di trecento composti sia nei pesci freschi che in quelli sottoposti a cottura o maturazione (Triqui e Zouine, 1999; Morita *et al.*, 2003; Triqui e Bouchriti, 2003).

Come con molti altri alimenti fermentati, non esiste un metodo obiettivo certo per seguire la maturazione e per determinare il tempo adeguato in cui il prodotto può essere immesso sul mercato (Vazquez et al., 2003).

La valutazione sensoriale è di solito il metodo utilizzato per seguire il processo di maturazione. Tuttavia, nelle esigenze pratiche delle industrie contemporanee, vi è sempre più la richiesta di metodi per misurare obiettivamente l'aroma e la qualità del pesce (Josephson *et al.*, 1996) e i sistemi olfattivi artificiali potrebbero rispondere a questa esigenza.

Il *flavour* dei pesci freschi infatti risulta caratterizzato da composti volatili come gli alcoli e i chetoni a lunga catena che diminuiscono nei primissimi giorni di conservazione, mentre i metaboliti microbici (alcoli a corta catena e ammine) aumentano esponenzialmente. Questi composti sono molto volatili e quindi abbondanti nello spazio di testa dei campioni da analizzare. In più, a causa della loro polarità, emettono segnali sensibili che possono essere rilevati dai sensori del naso elettronico. Non sorprende quindi che questi strumenti possono essere utilizzati non solo per controllare la freschezza, ma anche monitorare i processi di deterioramento, di fermentazione e di maturazione dei pesci (Vazquez *et al.*, 2003).

D'altro canto anche il monitoraggio dei composti volatili che si modificano durante il processo di maturazione a cui ovengono sottoposte le alici potrebbe essere un metodo oggettivo per la valutazione della qualità e dell'eventuale deterioramento del prodotto. In uno studio effettuato da Triqui e Reineccius, nel 1995 sono stati analizzati i cambiamenti del *flavour* che si sviluppano durante il processo di maturazione delle alici mediante l'analisi gas cromatografica e sia l'analisi qualitativa che quantitativa hanno mostrato cambiamenti nel corso della conservazione. Tali cambiamenti sono da attribuire all'ossidazione lipidica che si manifesta durante la conservazione, principalmente a carico degli acidi grassi omega 3, di cui i pesci sono ricchi e un ruolo importante può essere attribuito all'enzima lipossigenasi che avvia la perossidazione lipidica nell'acciuga ma esistono anche altri enzimi come la mieloperossidasi dei leucociti presenti nel sangue, che possono essere attivati soprattutto dopo la salatura (Triqui e Reineccius, 1995).

Comunque dagli studi presenti in letteratura (Triqui e Reineccius, 1995) è stato osservato che nessun composto volatile da solo appare come un fattore determinante sull'impatto del *flavour* del prodotto maturo, e quindi il caratteristico sapore delle acciughe salate può essere spiegato solo dall'equilibrio dei diversi composti volatili.

Infatti lo sviluppo del *flavour* nell'acciuga è concomitante con numerosi cambiamenti biochimici che avvengono a carico dei componenti lipidici e proteici e tali interazioni potrebbero influenzare anche la volatilità dei composti tipici del *flavour* dell'acciuga attraverso il processo di maturazione.

È chiaro che se il processo di maturazione non viene effettuato in condizioni di temperatura e umidità adeguate, e se la materia prima non viene prontamente lavorata si possono sviluppare *off-flavour* indesiderati che compromettono la qualità del prodotto finito.

Per questo motivo in questa parte del lavoro di tesi si è voluto valutare l'impiego del naso elettronico per il monitoraggio della maturazione durante la conservazione delle alici, ed è stata effettuata una prima caratterizzazione qualitativa dei composti che caratterizzano il *flavour* al fine di identificare eventuali composti chiave da utilizzare come possibili marcatori della maturazione.

5.2 Obiettivi della ricerca

Il lavoro sperimentale svolto in questa parte del lavoro di dottorato ha avuto l'obiettivo di valutare il possibile impiego del Naso Elettronico e della Microestrazione in fase solida accoppiata alla gas massa nel controllo di qualità e dell'ossidazione nel processo di maturazione delle alici sotto sale. In particolare, il contributo dato dalla presente tesi al lavoro sperimentale condotto, ha riguardato:

- ✓ la messa a punto di un metodo di analisi mediante Naso Elettronico e mediante SPME-GC/MS per l'analisi di una matrice solida come quella delle alici;
- ✓ la verifica della capacità del Naso Elettronico di monitorare il processo di maturazione delle alici sotto sale analizzate a differenti tempi di conservazione;
- ✓ lo studio dell'ossidazione della componente lipidica durante 210 giorni di maturazione delle alici sotto sale;
- ✓ la valutazione della variabilità del profilo sensoriale delle alici sottoposte a maturazione;
- ✓ la caratterizzazione quali-quantitativa del *flavour* che caratterizza questi alimenti mediante la microestrazione in fase solida accoppiata alla gas-massa.

5.3 MATERIALI E METODI

5.3.1 Campionamento

I campioni di alici (*Engraulis encrasicolus*) utilizzati nel presente lavoro di tesi sono stati acquistati, nel Novembre 2006, presso il mercato ittico di Torre del Greco (Napoli), con provenienza da Ravenna. La pezzatura media riscontrata è stata di 40 pesci/ Kg.

10 Kg di pesce fresco sono stati suddivisi in 2 aliquote, denominate A e B, costituite ciascuna da 5 kg. Ciascuna aliquota è stata immediatamente sottoposta alle operazioni di decapitazione ed eviscerazione, effettuate manualmente, seguita dalle operazioni di lavaggio con salamoia satura, sgocciolatura e distribuzione del pesce in contenitori di vetro adottando la tecnica del confezionamento “testa-coda” a strati alterni di sale e di pesce (**Figura 5.3.1.1**).



Figura 5.3.1.1. Disposizione delle alici nei vasetti secondo la tecnica “testa-coda” a strati alterni di sale e di pesce.

Le condizioni di preparazione dei vasetti sono state le seguenti:

numero di pesci per strato: 10-11

numero degli strati di pesce: 18-19

quantità di sale utilizzata 2-2,1 Kg.

I vasetti sono stati sottoposti a pressatura mediante la sovrapposizione di opportuni pesi. Il “grado di pressatura”, inteso come la pressione esercitata in corrispondenza del tappo di legno sullo strato superficiale di ciascun vasetto è stato di $0,013 \text{ g/cm}^2$.

Per la salagione è stato utilizzato un sale marino del commercio. Un campione di alici fresche non trattate col sale ha costituito il campione di controllo iniziale (tempo zero). I vasetti sono stati conservati a temperatura ambiente ($20 \pm 0,5 \text{ °C}$). Nel corso di questa prova non si è ritenuto di dover effettuare la maturazione in condizioni di temperatura controllata, per riprodurre le condizioni che si verificano normalmente nelle preparazioni casalinghe e industriali.

In **Figura 5.3.1.2.** si riporta il diagramma di flusso della preparazione dei campioni.



Figura 5.3.1.2. Diagramma di flusso della lavorazione dei campioni di alici utilizzati nel presente lavoro di tesi.

5.3.2 Disegno Sperimentale

Il disegno sperimentale seguito nel progetto di ricerca è schematizzato nella **Figura 5.3.2.1**.

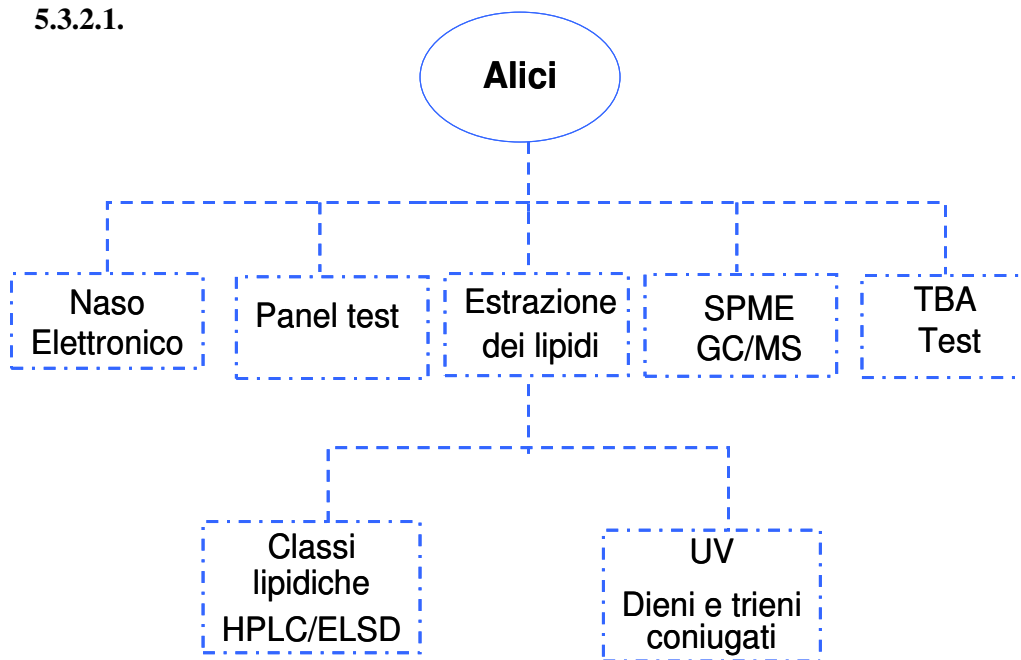


Figura 5.3.2.1. Disegno sperimentale relativo alle determinazioni eseguite sui campioni di alici sotto sale oggetto del presente lavoro di tesi.

Dai campioni di alici sono stati estratti i lipidi mediante estrazione a freddo. L'estratto lipidico è stato utilizzato per la valutazione dello stato di ossidazione primaria attraverso l'analisi dei dieni e dei trieni coniugati mediante spettrofotometria agli UV. La valutazione dello stato di ossidazione secondaria mediante test del TBA è stata effettuata sul campione tal quale. L'analisi sensoriale è stata effettuata a partire dal 3 mese di maturazione dei campioni sotto sale. Inoltre è stato valutato l'evoluzione del profilo sensoriale mediante l'utilizzo del Naso Elettronico e della frazione volatile mediante la tecnica della SPME.

5.3.3 Determinazioni analitiche

Tutte le determinazioni sono state effettuate in tre repliche. L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata mediante Analisi della Varianza (ANOVA). Per l'analisi

multivariata è stata utilizzata l'analisi delle componenti principali (PCA), che consente di esplorare le possibili relazioni intercorrenti tra variabili, rendendo agevole la descrizione e la rappresentazione di fenomeni multidimensionali. Scopo primo dell'applicazione della PCA è stato quello di ottenere un piccolo gruppo di combinazioni lineari (Componenti Principali) da un insieme di variabili (quantitative) di partenza (Gherghi, 1990). È stato utilizzato un software Excel STAT Addinsoft version 6.1.

5.3.3.1 Estrazione dei lipidi

L'estrazione dei lipidi è stata effettuata secondo la metodica di Bligh e Dyer (1959). Una quantità pari a 5 g di campione di alici deliscate e spellate è stata triturrata con l'aggiunta di 0,020 g di antiossidante (BHT) e miscelata con 5 ml di cloroformio e 10 ml di metanolo. Il tutto è stato omogeneizzato per 1 minuto con un omogeneizzatore Ultraturrax mod. T 25 B, (Kilka-Werke, Germany); in seguito, sono stati aggiunti 5 ml di cloroformio e 10 ml di acqua ed il tutto è stato omogeneizzato di nuovo e poi centrifugato per 5 minuti a 3000 giri al minuto. Da questo processo si ottiene un sistema di tre fasi: fase acquosa, fase solida, fase cloroformica. La fase acquosa superficiale è stata eliminata, la fase cloroformica sottostante prelevata e la fase solida è stata omogeneizzata con l'ulteriore aggiunta di 5 ml di cloroformio, 5 ml di metanolo e 5 ml d'acqua. Dopo centrifugazione è stata eliminata la fase acquosa superficiale e la fase cloroformica, così ottenuta, aggiunta a quella separata precedentemente. Il residuo organico è stato disidratato con l'aggiunta di solfato di sodio anidro e filtrato su carta. La fase cloroformica ottenuta è stata quindi evaporata sotto vuoto in evaporatore rotante (Rotovapor, mod.VV2000, Heidolph) a 35°C. Il residuo è stato ripreso con 4 ml di esano e conservato in vials chiuse sotto flusso di azoto a -20°C fino al momento dell'analisi.

5.3.3.2 Determinazione della composizione in classi lipidiche

Il profilo compositivo dei lipidi estratti è stato definito attraverso l'analisi HPLC degli estratti su colonna in silice e rivelazione dei picchi mediante Evaporative Light

Scattering Detector (ELSD), secondo il metodo messo a punto nel Dipartimento di Scienze degli Alimenti di Portici. I campioni sono disciolti (10 mg/ml) in una miscela di solventi composta da isotano/THF (99:1, v/v). Le classi di lipidi sono separate mediante HPLC in fase normale e quantificate mediante ELSD. L'apparato HPLC utilizzato è stato un cromatografo WELLCHROM mod. K 1001 e Solvent organizer mod. K 1500 (Knauer, Germany) provvisto di rivelatore ELSD mod. PL-BLS 1000 (Polymer Laboratories Ltd, UK). La separazione cromatografica è stata effettuata mediante una colonna Luna 5 μ Silica, 750 mm x 4,6 mm (Phenomenex). Flusso di colonna 1,6 ml/min, quantità iniettata 20 μ l. Fasi mobili A: isotano/THF (99:1, v:v); B: isotano/2-propanolo/etilacetato/acido formico-2-propanolo (2:98) (65:20:15:1, v:v). Gradiente: da 100 a 10% A in 8 min; da 10 a 5% A in 3 min; da 5 a 95% A in 1 min; 95% A per 3 min; da 95 a 100% A in 1 min; 100% A per 2 min.

5.3.3.3 Analisi spettrofotometrica

Principio del metodo. Durante il processo di ossidazione, gli acidi grassi insaturi danno origine a sistemi di due o più legami coniugati che comportano una variazione nell'assorbimento nella regione dell'UV.

La coniugazione di due doppi legami determina un maggior assorbimento spettrofotometrico nella regione dell'UV, alla lunghezza d'onda di 232 nm (perossidieni). In particolare, nei lipidi di origine marina l'assorbimento può avvenire alla lunghezza d'onda di intervallo 232-234 nm (Warner ed Eskin, 1995). La coniugazione di tre doppi legami comporta un aumento dell'assorbimento intorno a 270 nm. A questa stessa lunghezza d'onda presentano massimi di assorbimento anche i prodotti carbonilici coniugati, derivanti dalla decomposizione degli idroperossidi. I valori di tali assorbimenti sono espressi come estinzione specifica $E_{1\% \ 1 \text{ cm}}$, cioè assorbanza misurata su una soluzione della sostanza grassa all'1% posta in una cuvette con percorso ottico di 1 cm, e sono indicati con K (coefficiente specifico di estinzione) seguito dalla lunghezza d'onda.

Procedimento. In un matraccio da 10 ml sono stati pesati accuratamente 0,01 g di grasso estratto dai campioni portando a volume con esano spettrofotometricamente puro in modo da ottenere una soluzione allo 0.1% (peso/volume). Sulla soluzione è

stata effettuata la lettura allo spettrofotometro alle lunghezze d'onda di 232, 234, 270 nm, contro un bianco costituito dal solvente.

Per l'analisi è stato utilizzato uno spettrofotometro SHIMADZU UV 16 01 a doppio raggio.

5.3.3.4 Valutazione della perossidazione lipidica in campioni di pesce mediante TBA TEST

Principio del metodo. La malondialdeide (MDA) è uno dei maggiori prodotti della degradazione degli idroperossidi lipidici, per cui è utilizzata come marker del grado di perossidazione.


Il metodo più comune per la misura della MDA negli alimenti e nei campioni biologici è il test dell'acido tiobarbiturico (TBA). Esso si basa su una quantificazione spettrofotometrica dei composti rosa che si formano a pH basso ad alte temperature per reazione di 1 molecola di MDA con 2 molecole di TBA. Tali composti hanno un massimo assorbimento a 532-535 nm e vengono usualmente indicati con la sigla T-BARS. Il valore dei T-BARS è espresso in equivalenti di malondialdeide, standard usato per la costruzione della retta di taratura in quanto uno dei principali marker dei processi di ossidazione lipidica.

Procedimento. E' stato seguito il metodo spettrofometrico riportato in Maraschilello *et al.*, (1999). A 0,5 g di campione di alici sono stati aggiunti 10 ml di acqua bidistillata ed il tutto è stato omogeneizzato per 1 minuto con un omogeneizzatore ULTRATURRAX mod. T 25 B, (Kilka-Werke, Germany); sono stati in seguito aggiunti 2,5 ml di acido tricloroacetico (TCA) al 25% e il tutto, dopo agitazione, è stato refrigerato a 4°C per 15 minuti. Sono stati recuperati 3,5 ml di surnatante a cui sono stati aggiunti 1,5 ml di soluzione di TBA allo 0,6%; tutto è stato posto per 30 minuti in bagnetto a 70°C. Sui campioni, dopo raffreddamento, è stata effettuata la lettura spettrofotometrica a 532 nm, contro un bianco costituito da una soluzione di 2,5 ml di acqua bidistillata, 1 ml di TCA al 25% e 1,5 ml di TBA allo 0,6%. Si calcola poi la concentrazione di MDA equivalente nel campione, in riferimento alla retta di taratura e considerando le diluizioni che si sono avute nel processo di estrazione.


Per l'analisi è stato utilizzato uno spettrofotometro SHIMADZU UV 16 01 a doppio raggio.

5.3.3.5 Analisi Sensoriale delle Alici

Per la valutazione delle caratteristiche sensoriali dei campioni di alici è stato utilizzato un Panel di assaggiatori precedentemente selezionati ed addestrati (Buono, 2004; Ambrosino *et al.*, 2004). Per ogni descrittore è stata utilizzata una scala non strutturata ancorata all'origine ed avente lunghezza di 10 cm. Sulla scheda sono stati riportati i descrittori che contribuiscono alla definizione delle caratteristiche organolettiche delle alici salate (**Figura 5.3.3.5.1**).



Analisti Sensoriali Associati



Dipartimento di Scienza degli Alimenti

FOGLIO DEL PROFILO - PRODOTTO: **Alici salate**

	INTENSITA'
CARATTERISTICHE VISIVE	
Omogeneità cromatica	_____
Rosa	_____
Bruno	_____
SENSAZIONI OLFATTIVE	
Odore tipico di alici sotto sale	_____
Mare	_____
Pesce crudo	_____
Putrido	_____
Rancido	_____
Altro	_____
CONSISTENZA	
Compattezza	_____
Gommosità	_____
Succulenza	_____
Secchezza	_____
CARATTERISTICHE GUSTATIVE	
Sapore tipico (pasta d'acciughe)	_____
Amaro	_____
Salato	_____
Dolce	_____
Carne essiccata (prosciutto)	_____
Acido	_____
Sangue crudo	_____
Putrido	_____
Rancido	_____
Altro	_____
GRADEVOLEZZA	_____
Luogo e data	
Assaggiatoref	:..
	Sigla campione

Figura 5.3.3.5.1. Scheda di valutazione del profilo sensoriale della alici.

5.3.3.6 Valutazione del flavour mediante Naso Elettronico

Partendo dalla metodica messa a punto per l'olio descritta nel capitolo 1 sono state effettuate diverse prove variando alcuni parametri dello strumento, quali:

- quantità di campione;
- temperatura e tempi di campionamento;
- tempo di acquisizione;
- tempo di azzeramento.

In particolare le condizioni operative del NE usate nell'analisi dei campioni di alici sono state le seguenti:

- 4 gr di alici tal quali a 30°C per 20 min
- tempo di acquisizione 300 sec
- delay 500 sec
- flusso campione 400 ml/min
- flusso zero gas 600 ml/min.

Il metodo di analisi prevede le seguenti fasi:

- le alici, preventivamente separate dalla pelle esterna, deliscate e sfilettate, sono state sminuzzate e 4 gr di campione tal quale sono stati posti in una vial da 20 ml chiusa ermeticamente con un tappo a ghiera dotato di setto silicone/teflon;
- si pone la vial in un bagnetto a 30°C per un periodo di 20 min;
- si sottopone lo spazio di testa del campione ad aspirazione per 300 sec inserendo l'ago posto all'estremità della sonda attraverso il setto della vial eseguendo la misura;
- per evitare fenomeni di depressione si pone contemporaneamente all'interno della vial stessa un ulteriore ago collegato con l'aria esterna mediante un filtro a carbone attivo;
- si lascia azzerare lo strumento per 500 sec.

5.3.3.7 Valutazione del flavour mediante la Microestrazione in Fase Solida accoppiata alla gas-massa (SPME-GC/MS).

Al fine di valutare la sensibilità della tecnica SPME-GC/MS nello studio qualitativo del *flavour* di alici sottoposte al processo di maturazione è stata messa a punto una

metodica di concentrazione/estrazione dei composti volatili, mediante l'uso di una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 μm (Supelco, Bellefonte, USA). In uno studio effettuato da Ho *et al.*, (2006) sull'*Arenga Pinnata*, sono state prese in considerazione diverse fibre presenti in commercio (polydimethylsiloxane (PDMS), polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS-DVB) e divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS) e polyacrylate (PA)) e dopo numerose prove si è giunti alla conclusione che la fibra DVB-CAR-PDMS è quella maggiormente suscettibile all'analisi dello spazio di testa della frazione volatili dei pesci per un'analisi qualitativa. Per questo motivo, prima di effettuare le sperimentazioni sulle alici si è deciso di verificare quanto osservato da Ho *et al.*, (2006), mettendo a confronto due fibre presenti in commercio, la PDMS e la DVB-CAR-PDMS, che erano state testate anche per l'analisi degli oli. Come suggerito dall'azienda produttrice, le fibre prima del loro utilizzo sono state appropriatamente condizionate per un'ora a 180°C.

L'analisi GC/MS è stata effettuata mediante un gas-cromatografo/spettrometro di massa (GC/MS QP5050 Shimadzu, Milano, Italia); colonna utilizzata: SupelcowaxTM10 (Supelco, Bellefonte, USA) di 60 m x 0,32 mm, 0,5 μm . Le condizioni usate per l'analisi GC sono state le seguenti: gas di trasporto, elio ad una velocità di flusso di 1,4 ml/min, pressione iniziale 52 kPa; temperatura della colonna, iniziale 40°C per 4 minuti, incremento di temperatura di 3,5°C/min fino a 240°C per 3 minuti. Le condizioni per l'analisi MS sono state: sorgente ionica ad impatto elettronico, 70 eV; temperatura interfaccia 250°C, temperatura sorgente ionica 200°C; mass range da 30 a 250 amu; velocità di scansione di 0,4 scan/s.

In **Figura 5.3.3.7.1** si riporta un esempio di cromatogramma TIC ottenuto dall'analisi di un acciuga mediante l'utilizzo delle due diverse fibre.

Come è possibile osservare dalla **Figura 5.3.3.7.1**, esiste una differente sensibilità tra le due fibre utilizzate nei confronti delle acciughe campionate, e la fibra DVB-CAR-PDMS si mostra più adatta per l'analisi dello spazio di testa di questo tipo di prodotto.

Per verificare la reale capacità della fibra di poter analizzare l'alimento ittico tal quale, è stata analizzata una quantità di campione pari a 4 gr. In particolare le alici, preventivamente separate dalla pelle esterna, deliscate e sfilettate, sono state

sminuzzate in piccoli pezzettini e 4 gr di campione sono stati posti in una vial da 15 ml chiusa ermeticamente con tappo munito di setto perforabile.

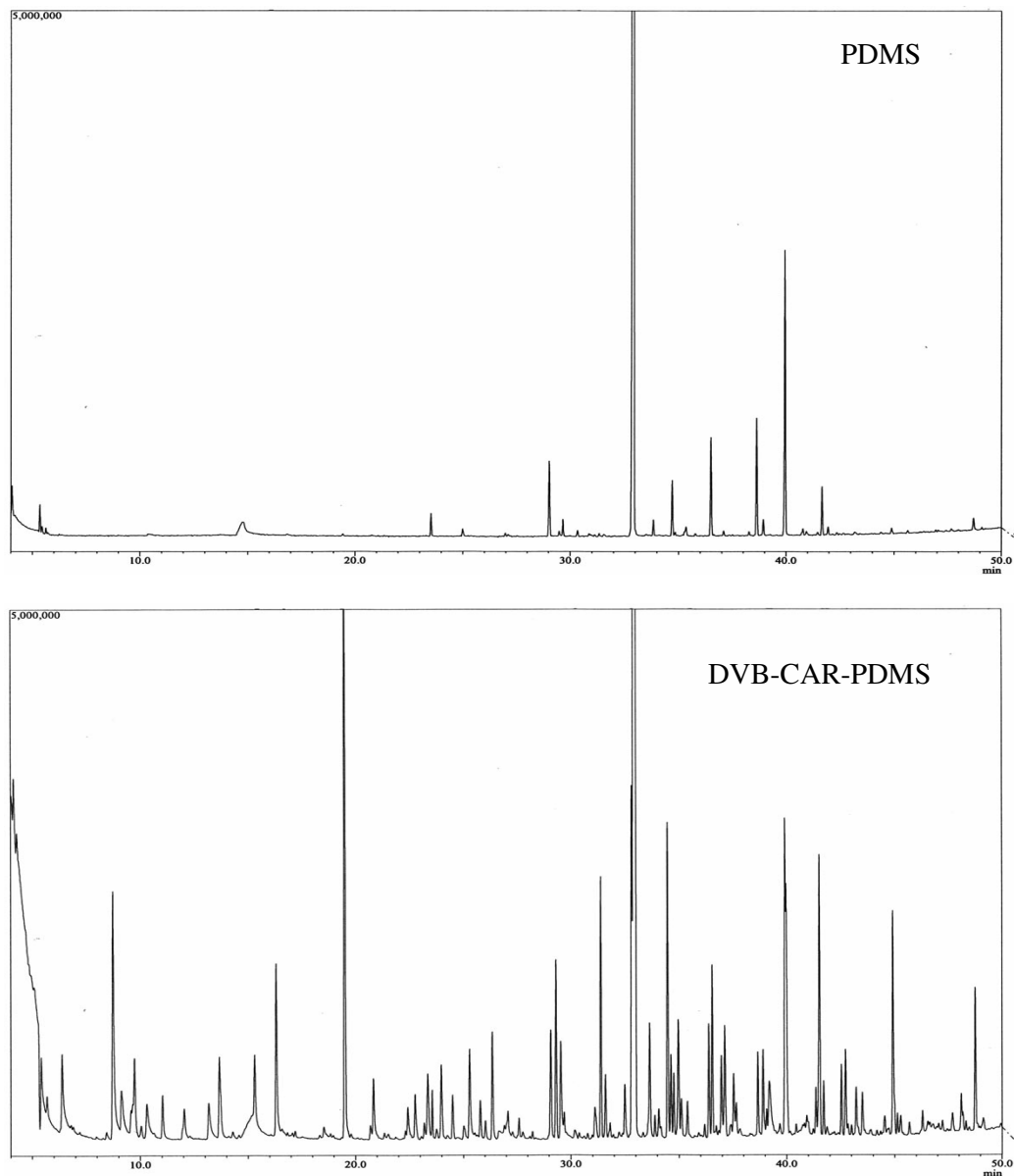


Figura 5.3.3.7.1 Esempio di cromatogramma (TIC) ottenuto dall'analisi GC/MS delle sostanze volatili di un'acciuga campionate via SPME mediante l'utilizzo di due fibre adsorbenti (DVB-CAR-PDMS e PDMS).

Scelta la fibra da utilizzare, per poter determinare il tempo e la temperatura ottimale di esposizione della fibra allo spazio di testa del campione, la fibra è stata esposta per diversi periodi di tempo e a diverse temperature allo spazio di testa dei campioni di acciughe. Per favorire il trasferimento dei composti volatili nello spazio di testa della vial, il campione è stato posto su un agitatore termico ad una temperatura di 30 °C e

40°C per un tempo di 10 minuti, e successivamente è stata esposta la fibra per periodi di tempo di 10, 20, 30, e 40 minuti e poi è stata inserita, per 10 minuti, nell'iniettore del GC/MS e mantenuta a 230°C (fase di desorbimento). Si è quindi proceduto all'analisi GC/MS.

È stata scelta la temperatura di 30°C in quanto a questa temperatura si è osservata una maggiore efficienza nel campionamento (**Figura 5.3.3.7.2**). Tale temperatura di campionamento riduce anche la possibile formazione di artefatti e simula le condizioni di campionamento del naso elettronico dove è stata utilizzata una temperatura di 30°C. Inoltre, in uno studio effettuato da Chopin *et al.*, (2007) per valutare l'interazione delle fibre di miosina del pesce con i prodotti di ossidazione dei lipidi, mediante la tecnica SPME, è stata utilizzata questa temperatura di condizionamento.

Per determinare invece la scelta del tempo di campionamento si è proceduto come discusso nel § 2.2.2.

Quindi, dopo le diverse prove atte a definire la quantità di campione da analizzare e le diverse condizioni operative, l'analisi è stata condotta su 4g di campione posto in una vial da 15 ml chiusa ermeticamente con tappo munito di setto. Per favorire il trasferimento dei composti volatili nello spazio di testa della vial, il campione è stato posto su un agitatore termico ad una temperatura di 30°C per un tempo di dieci minuti. Successivamente la fibra, introdotta mediante l'apposito supporto nello spazio di testa, è stata esposta per 30 minuti mantenendo le suddette condizioni di termo-agitazione. Dopo tale periodo la fibra è stata inserita, per 10 minuti, nell'iniettore del GC/MS mantenuto a 230°C.

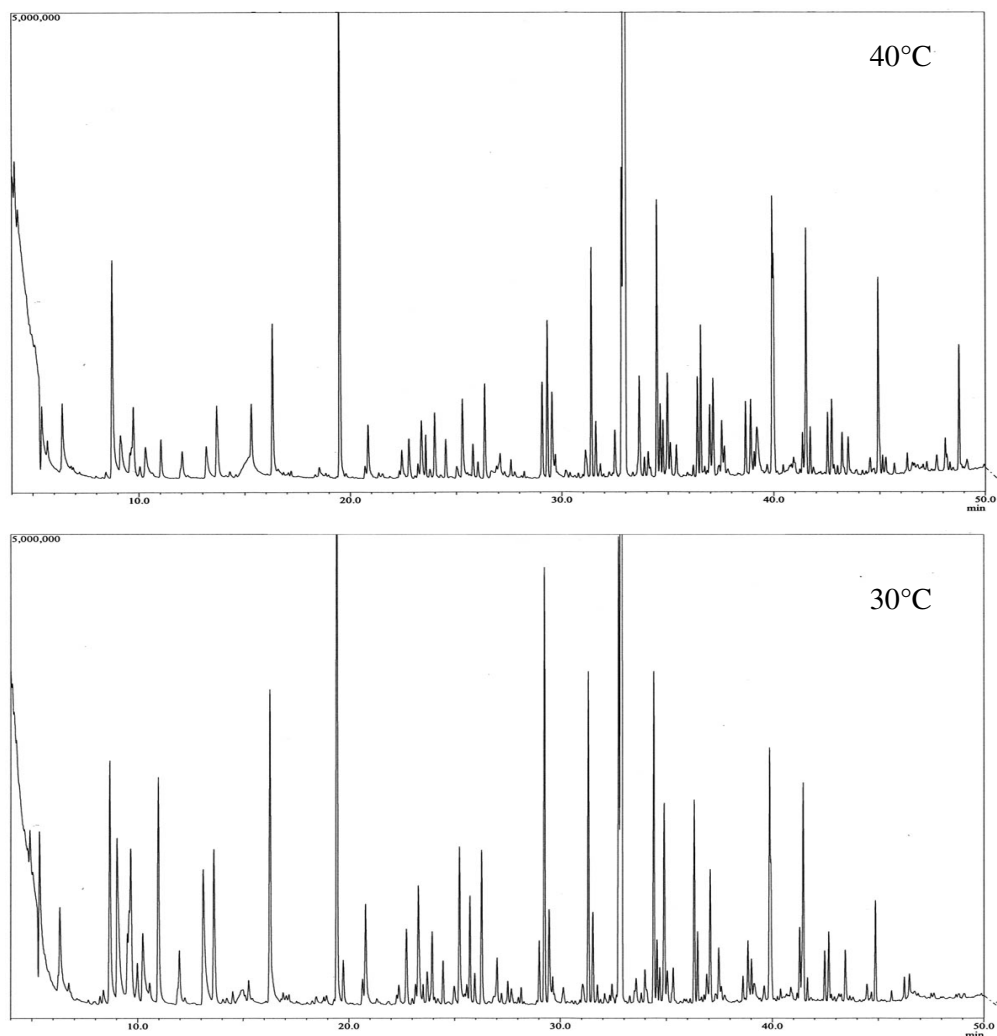


Figura 5.3.3.7.2 Esempio di cromatogramma (TIC) ottenuto dall'analisi GC/MS delle sostanze volatili di un'acciuga campionate via SPME utilizzando due diverse temperature di campionamento (30 e 40°C).

5.4 RISULTATI E DISCUSSIONE

5.4.1 Analisi quantitativa dei lipidi totali

I lipidi presenti nelle alici maturate sotto sale sono stati estratti mediante il metodo Bligh and Dyer (1959). Tale estrazione “a freddo” consente di estrarre il grasso presente senza alterare con il calore la matrice oggetto di studio.

Nella Tabella 5.4.1.1. si riportano i dati analitici relativi alla quantità di lipidi estratti dai campioni di alici sotto sale prelevati in corrispondenza dei diversi tempi di maturazione.

Tabella 5.4.1.1. Percentuale di lipidi (g/100 g muscolo)¹ estratti con il metodo Bligh and Dyer dai campioni di alici a diversi tempi di maturazione.

Tempo di maturazione (giorni)	Lipidi (%)
fresco	2,5 ^a ± 0,53
30	2,0 ^b ± 0,27
60	1,1 ^c ± 0,13
90	1,4 ^d ± 0,29
120	1,5 ^d ± 0,23
150	1,4 ^{c,c} ± 0,29
180	1,2 ^{c,c} ± 0,18
210	1,2 ^{c,c} ± 0,25

¹ valori medi, deviazione standard (n = 3)

² ANOVA lettere diverse sulla colonna indicano differenze significative (p < 0,05) tra i diversi tempi di maturazione;

Come può osservarsi in **Tabella 5.4.1.1.** il contenuto di lipidi delle alici fresche, pescate nel novembre del 2006, è circa 2,5%, confermando l'appartenenza di tale specie alla categoria dei pesci magri (fino al 3%). Il contenuto lipidico riscontrato conferma i dati di Gokoglu *et al.*, (1999) che hanno effettuato uno studio sulla variazione stagionale del contenuto in grasso delle alici. Dal loro studio è emerso che

il contenuto lipidico mostra un massimo nel periodo invernale e un minimo nel periodo estivo. Infatti in questo caso la quantità di lipidi totali è del 2,5% e da precedenti studi, effettuati nel laboratorio Oli e grassi, sulla caratterizzazione dei lipidi di alici, pescate nel periodo estivo, il contenuto totale di lipidi riscontrato era pari allo 0,8 % (Aurola, 2005).

Durante i primi due mesi di maturazione si verifica una diminuzione significativa (ANOVA, $P < 0,05$) della percentuale di lipidi. Tale diminuzione è attribuibile all'azione esercitata dalla pressatura che, anche in seguito ai fenomeni proteolitici e lipolitici che si verificano durante la maturazione del prodotto, determinano un rilascio non solo di acqua ma anche della frazione lipidica del grasso intercellulare con conseguente penetrazione del sale. Baldrati *et al.*, (1975) hanno messo in evidenza che seppure il processo di irrancidimento ossidativo dovesse avere inizio, la diminuzione dei valori di rancidità si manifesta prevalentemente nelle prime fasi della lavorazione, quando i grassi più ossidati, quelli presenti nelle zone tessutali superficiali e nelle cavità ventrali dei pesci, per effetto della penetrazione del sale e della pressatura esercitata (spurgo continuo), fuoriescono e vengono allontanati in seguito alla continua immissione di salamoia pulita.

Dalla **Figura 5.4.1.1.**, che riporta l'evoluzione del contenuto lipidico (g/100 g di muscolo) durante la maturazione, si può osservare come la percentuale di lipidi estratti dai campioni presenti una diminuzione progressiva nei primi due mesi di maturazione per poi mantenersi stabile nei mesi successivi.

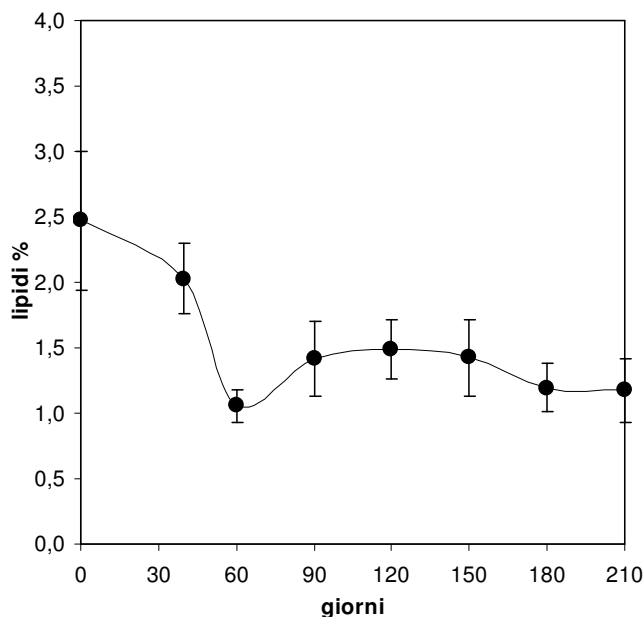


Figura 5.4.1.1. Evoluzione del contenuto lipidico (g/100 g muscolo) durante la maturazione delle alici

Tale osservazione potrebbe trovare ragione nelle attività metaboliche dei microrganismi alofili che alterano la struttura del muscolo (acidificazione, proteolisi, etc.) e nel fatto che dopo due mesi di maturazione lo spurgo delle alici diventa poco significativo.

5.4.2 Composizione delle classi lipidiche e sua evoluzione durante la maturazione

In questo studio gli estratti lipidici sono stati studiati e caratterizzati mediante HPLC-ELSD su colonna di silice al fine di determinare la composizione delle classi lipidiche. Con la metodica messa a punto è possibile separare e quantificare i lipidi neutri, in particolare il colesterolo libero e i trigliceridi, ed i relativi prodotti di idrolisi (digliceridi, monogliceridi ed acidi grassi liberi). Per quanto riguarda i digliceridi, con il metodo utilizzato, è possibile discriminare i due isomeri strutturali 1,2 e 1,3-digliceridi, studiando e valutando così la specificità della lipolisi a carico della frazione trigliceridica.

Nella **Tabella 5.4.2.1** è riportato il valore riscontrato per le classi lipidiche espresso come percentuale su il totale dei lipidi estratti. Il totale delle classi lipidiche rilevate mediante HPLC-LSD rappresentano solo una parte (circa il 33%) dei lipidi presenti nelle alici, in cui sono predominanti altre classi lipidiche polari quali i fosfolipidi.

Tabella 5.4.2.1. Composizione percentuale¹ (% lipidi totali) delle classi lipidiche² dei campioni di alici oggetto di studio a diversi tempi di maturazione³.

Giorni di maturazione	TG	FFA	1,3 DG	1,2 DG	Col	1 MG	Totale
fresco	10,55 ^a ± 0,09	7,37 ^a ± 1,54	0,41 ^a ± 0,38	0,87 ^{a,b,c} ± 0,25	3,74 ^a ± 0,67	0,11 ^a ± 0,03	23,1
30	9,77 ^b ± 0,15	16,73 ^b ± 0,95	1,44 ^{b,c} ± 0,22	0,80 ^{b,c} ± 0,44	2,44 ^{b,c,d} ± 0,14	0,61 ^b ± 0,11	31,8
60	9,69 ^b ± 0,27	17,44 ^{b,c} ± 0,72	1,73 ^{b,d} ± 0,18	1,13 ^{a,d} ± 0,19	2,84 ^{b,c} ± 0,34	0,48 ^c ± 0,05	33,3
90	9,12 ^c ± 0,54	16,83 ^b ± 0,68	1,24 ^c ± 0,29	0,66 ^c ± 0,17	2,39 ^{b,c,d} ± 0,40	0,43 ^c ± 0,08	30,7
120	9,53 ^b ± 0,17	16,92 ^b ± 0,55	1,87 ^d ± 0,14	1,02 ^{a,b} ± 0,04	2,05 ^d ± 0,45	0,29 ^d ± 0,14	31,7
150	9,74 ^b ± 0,24	17,95 ^{b,c} ± 0,42	2,08 ^{d,e} ± 0,24	1,11 ^{a,d} ± 0,13	2,28 ^{c,d} ± 0,27	0,46 ^c ± 0,05	33,6
180	9,71 ^b ± 0,40	18,33 ^c ± 1,14	2,27 ^{e,f} ± 0,30	1,14 ^d ± 0,12	2,54 ^{b,c,d} ± 0,50	0,47 ^c ± 0,06	34,5
210	9,64 ^b ± 0,17	18,47 ^c ± 0,96	2,53 ^f ± 0,30	1,38 ^d ± 0,24	2,98 ^b ± 0,69	0,47 ^c ± 0,08	35,5

¹ media ± deviazione standard (n = 3).

² TG = trigliceridi; AGL = acidi grassi liberi; 1,2 DG = 1,2 digliceridi; 1,3 DG = 1,3 digliceridi; COL = colesterolo; 1 MG = 1 monogliceridi

³ ANOVA a una via: lettere diverse sulla stessa colonna indicano differenze significative (p < 0,05) tra i diversi tempi di maturazione

In **Figura 5.4.2.1.** si riportano due esempi di profili HPLC delle classi lipidiche di un campione di alici fresche **(a)** e di un campione di alici dopo 180 giorni di salagione **(b)**.

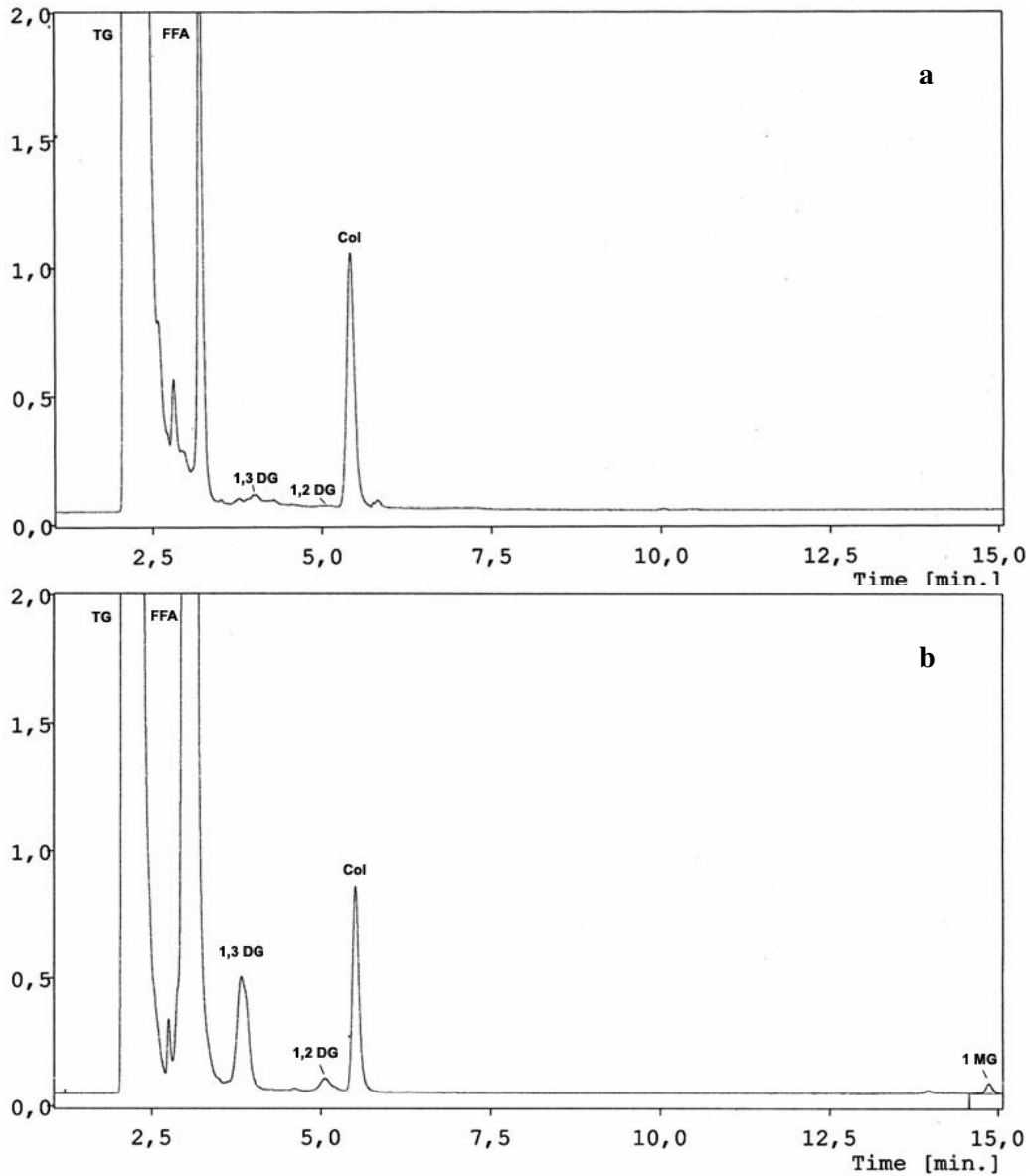


Figura 5.4.2.1. Esempi di profili HPLC delle classi lipidiche di un campione di alici fresche **(a)** e dopo 180 giorni di maturazione **(b)**.

Identificazione dei picchi: TG = trigliceridi; FFA = acidi grassi liberi; 1,2 DG = 1,2 digliceridi; 1,3 DG = 1,3 digliceridi; COL = colesterolo; 1 MG = 1 monogliceridi

Come può osservarsi dalla **tabella 5.4.2.1** durante la maturazione si assiste ad un aumento della percentuale in acidi grassi liberi già dopo 30 giorni di maturazione raggiungendo circa il 19% dei lipidi totali estratti dopo 210 giorni di maturazione. L'aumento degli acidi grassi liberi (**Figura 5.4.2.2**) avviene soprattutto nelle prime fasi del processo di maturazione poiché successivamente l'elevata concentrazione salina raggiunta nel prodotto inibisce l'attività enzimatica delle lipasi (Kolakowska *et al.*, 2003).

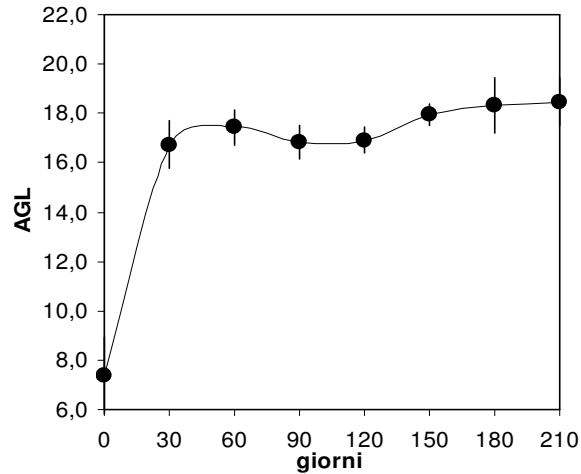


Figura 5.4.2.2. Evoluzione della percentuale di acidi grassi liberi (AGL) nel corso della maturazione.

Si osserva, inoltre, un decremento iniziale dei trigliceridi il cui contenuto rimane pressoché costante nel corso della maturazione (**Figura 5.4.2.3**).

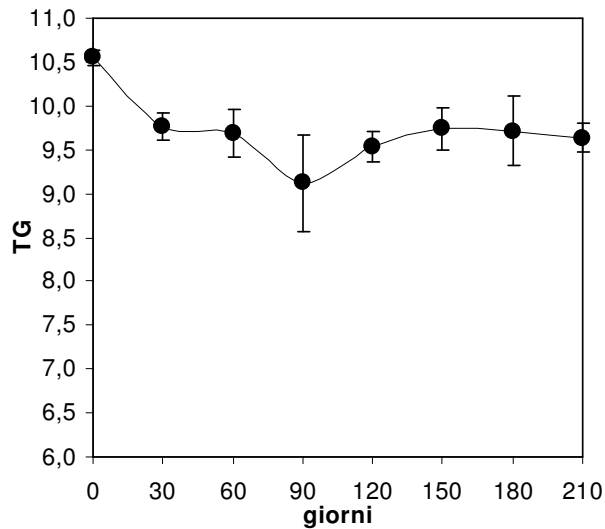


Figura 5.4.2.3. Evoluzione della percentuale di trigliceridi (TG) nel corso della maturazione.

Dall'esame del quadro lipidico si può evincere come la lipolisi sia avvenuta principalmente a carico della frazione polare dei lipidi, ossia dei fosfolipidi, non dosati attraverso la metodica HPLC impiegata. Tale ipotesi, confermata dalla letteratura, è attribuibile all'azione delle fosfolipasi che, nei tessuti dei pesci, agiscono più velocemente delle lipasi durante la lipolisi post-mortem. L'idrolisi enzimatica dei fosfolipidi nel muscolo dei pesci è principalmente sotto il controllo della fosfolipasi A2 che catalizza l'idrolisi del legame estereo in posizione sn-2 dei fosfolipidi, liberando acidi grassi liberi e lisofosfolipidi (Ashton, 2002).

Ciò spiegherebbe anche la ridotta variazione nel contenuto di 1,2 DG, prodotti della lipolisi a carico dei trigliceridi, nel corso della maturazione (**figura 5.4.2.4**).

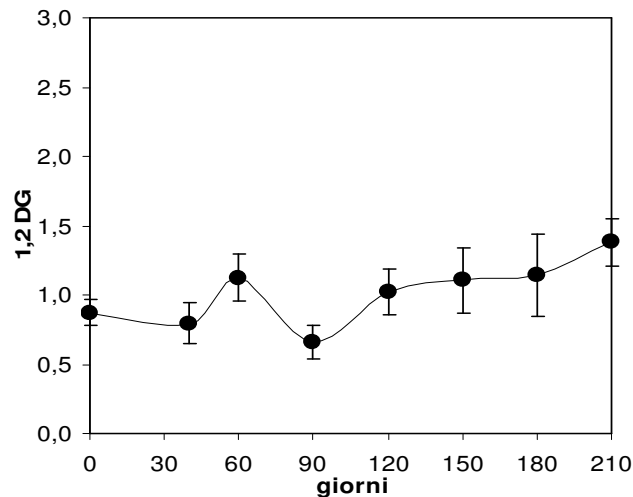


Figura 5.4.2.4. Evoluzione della percentuale di trigliceridi (TG) nel corso della maturazione.

Per quanto riguarda il colesterolo, il cui contenuto diminuisce nei primi 40 giorni per poi mantenersi costante (**Tabella 5.4.2.1**), per poter esprimere un giudizio sulle caratteristiche nutrizionali, i dati analitici sono stati espressi in mg/10 g di prodotto (**Figura 5.4.2.5**). Consumando 10 g di alici sotto sale a fine maturazione si ingerisce una quantità di colesterolo di circa 4 mg, quantità che ovviamente varia in funzione della variabilità dei singoli pesci.

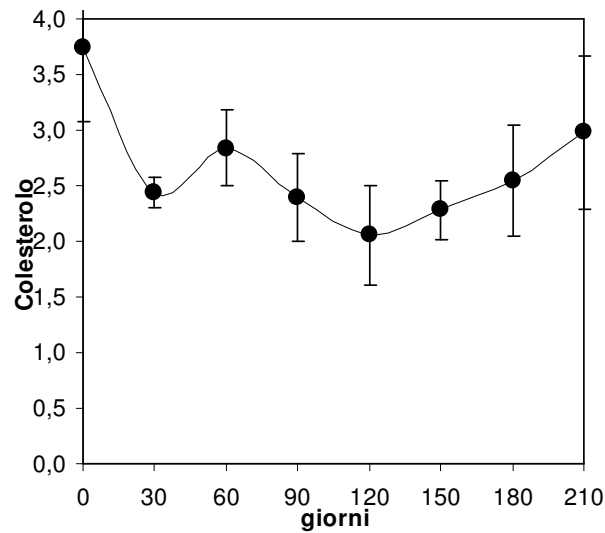


Figura 5.4.2.5. Evoluzione del contenuto di colesterolo (mg/10 di prodotto) nel corso di 210 giorni di maturazione.

5.4.3 Indici di ossidazione

L'ossidazione lipidica è la principale causa della diminuzione della qualità dei prodotti ittici, modificandone l'aroma, l'odore, il colore, la struttura e il valore nutrizionale con la produzione di composti tossici. I principali fattori intrinseci che determinano la velocità e l'ampiezza dello sviluppo di prodotti di ossidazione nei pesci sono:

- ✚ la quantità e la composizione in acidi grassi dei lipidi;
- ✚ la quantità di fattori endogeni antiossidanti (α -tocoferolo, ascorbato) e pro-ossidanti (emoglobina, mioglobina, lipossigenasi).

Fattori esterni sono:

- ✚ la concentrazione di ossigeno;
- ✚ la superficie esposta all'aria;
- ✚ la temperatura di stoccaggio;
- ✚ i processi di lavorazione che possono danneggiare i tessuti. (Ashton, 2002).

Per studiare l'ossidazione della componente lipidica indotta dal processo di maturazione si è proceduto col determinare il livello di ossidazione degli acidi grassi mediante analisi spettrofotometrica, osservando l'assorbimento dei campioni di

estratti lipidici a due diverse lunghezze d'onda: 232 nm (per la valutazione dei perossidieni) e 270 nm (per la valutazione dei trieni coniugati) (Frankel, 1998).

Inoltre, per la valutazione del livello di ossidazione secondaria è stato effettuato il dosaggio spettrofotometrico della malondialdeide (MDA) mediante test dell'acido tiobarbiturico (TBA) (Maraschiello *et al.* 1999).

Nella **Tabella 5.4.3.1.** si riportano i valori degli indici spettrofotometrici e della malondialdeide (MDA), misurata con il TBA *test*, riscontrati nei campioni di alici a diverso tempo di stagionatura.

Tabella 5.4.3.1. Valori degli indici spettrofotometrici e della malondialdeide¹ rilevati nei campioni di alici durante la maturazione².

Giorni di maturazione	K ₂₃₂	K ₂₇₀	MDA µg/g
fresco	7,70 ^{a,b} ± 0,73	1,53 ^{a,b} ± 0,39	0,68 ^a ± 0,12
30	4,88 ^c ± 0,55	1,10 ^c ± 0,18	0,23 ^b ± 0,06
60	6,30 ^d ± 0,53	1,44 ^{b,c} ± 0,15	1,94 ^c ± 0,18
90	6,19 ^d ± 0,37	1,93 ^{a,b} ± 0,03	3,21 ^d ± 0,65
120	6,54 ^{b,d} ± 1,14	2,05 ^{a,d} ± 0,48	3,53 ^d ± 0,15
150	8,90 ^a ± 0,70	3,14 ^e ± 0,22	1,25 ^{e,f} ± 0,41
180	10,29 ^e ± 1,14	3,40 ^e ± 0,46	0,87 ^a ± 0,05
210	7,34 ^{b,d} ± 1,60	2,29 ^{b,d} ± 0,77	1,45 ^f ± 0,29

¹ media ± deviazione standard (n = 3).

² ANOVA a una via: lettere diverse sulla stessa colonna indicano differenze significative (p < 0,05) tra i diversi tempi di maturazione

I valori del K₂₃₂ e del K₂₇₀ subiscono variazioni significative (p < 0,05) nel corso dei primi mesi della maturazione

In **Figura 5.4.3.1 a e b** si riportano l'evoluzione dei valore dei dieni (assorbimento a 232 nm) e trieni (assorbimento a 270 nm) durante il periodo di maturazione.

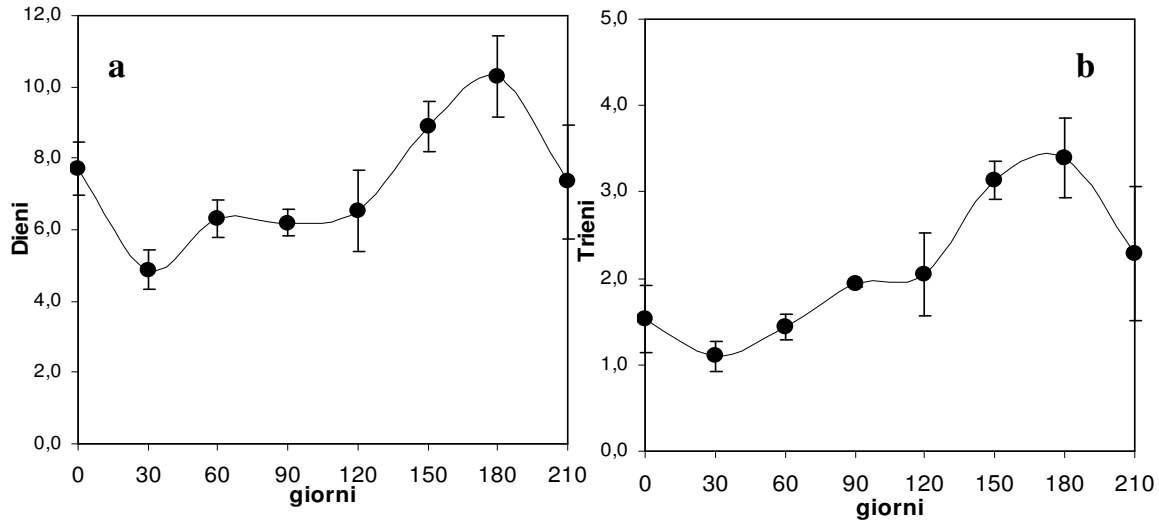


Figura 5.4.3.1 Evoluzione dei dieni (a) e trieni (b) determinati spettrofotometricamente rilevata nei campioni di alici sottoposti a maturazione.

Dopo un lieve decremento si assiste a partire dai 30gg di conservazione ad un appiattimento dei valori fino a 120 gg nel caso dei dieni coniugati (a) mentre a un incremento dei valori dei trieni (b) nei campioni sottoposti al processo di maturazione. In entrambi i casi si osserva un ulteriore incremento dopo i 120 gg di maturazione. L'incremento del valore dei trieni, che si verifica con il trascorrere del tempo di maturazione, è dovuto all'accumularsi dei prodotti secondari di ossidazione generati dalla decomposizione degli idroperossidi.

Per quanto riguarda l'indice relativo alla misura della malondialdeide (MDA) si sono riscontrate differenze significative ($p < 0,05$) durante il periodo di maturazione considerato (tabella 5.4.3.1).

Si assiste, in particolare, ad un aumento del contenuto di MDA (Figura 5.4.3.2) nelle prime fasi di maturazione seguito da un decremento nelle fasi finali.

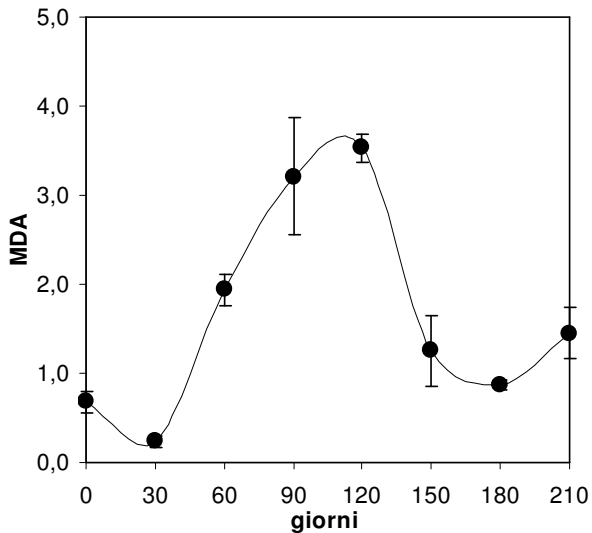


Figura 5.4.3.2 Evoluzione del contenuto della Malondialdeide determinata spettrofotometricamente rilevata nei campioni di alici durante la maturazione.

Tale andamento, riscontrato anche da altri Autori (Karacam e Boran, 1996; Karacam *et al.*, 2002), potrebbe essere spiegato dal fatto che le proteine (miosina), presenti nel muscolo dei pesci, dopo un certo periodo di maturazione si complessano con le aldeidi sottraendole alla rilevazione mediante TBA test e queste interazioni sembrano dipendere dalla struttura delle aldeidi. Infatti da uno studio effettuato da Chopin *et al.* (2007), è stato osservato che l'interazione delle fibre di miosina è significativamente influenzata dalla presenza di aldeidi insature. Tutte le interazioni aldeidi-proteine aumenterebbero con l'aumentare del numero di doppi legami e degli atomi di carbonio che formano le aldeidi (Chopin *et al.*, 2007).

5.4.4 Valutazione mediante Naso Elettronico del flavour che si sviluppa durante la maturazione delle alici sotto sale

Durante il processo di maturazione il *flavour* delle alici subisce modificazioni dovute ai numerosi cambiamenti biochimici che avvengono a carico dei componenti lipidici e proteici. Le alici fresche risultano caratterizzate da composti volatili come gli alcoli e i chetoni a lunga catena che diminuiscono nei primissimi giorni di conservazione mentre aumentano esponenzialmente gli alcoli a corta catena e i composti ammidici. Questi composti sono molto volatili e quindi abbondanti nello spazio di testa dei campioni da analizzare. In più, a causa della loro polarità, emettono segnali sensibili che possono essere rilevati dai sensori del naso elettronico. Per questo motivo lo spazio di testa delle alici sottoposte a conservazione è stato analizzato mediante naso elettronico con la metodica messa a punto e precedentemente descritta.

In **figura 5.4.4.1** si riporta il *biplot* risultante dall'analisi delle componenti principali effettuata sulle risposte dei sensori del naso elettronico dei campioni di acciughe analizzati ai diversi tempi maturazione.

Come è possibile osservare dalla **figura 5.4.4.1** il naso elettronico riesce solo a differenziare le alici fresche e dopo 30 gg di maturazione, rispetto ai campioni sottoposti a differenti tempi di maturazione

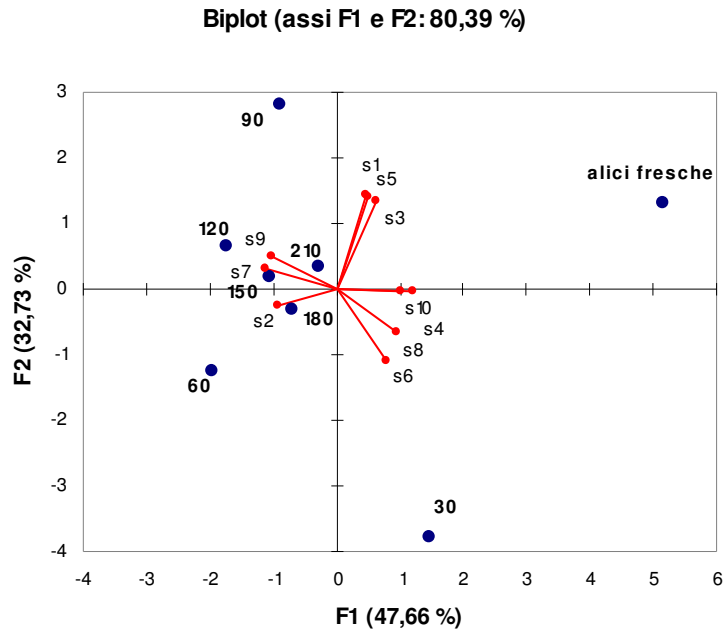


Figura 5.4.4.1 *Biplot* risultante dall'analisi delle componenti principali (varianza spiegata 82%) effettuata sulle risposte dei sensori del naso elettronico dei campioni di acciughe analizzati ai diversi tempi di maturazione

Non si osservano differenze tra le alici a 120, 150, 180 e 210 gg di maturazione, probabilmente perché dopo 4 mesi avevano già raggiunto la maturazione ottimale, rilevata mediante analisi sensoriale, e nei successivi mesi non si sono verificate ulteriori modifiche.

5.4.5 Qualità sensoriale

La valutazione delle caratteristiche sensoriali delle alici sotto sale è stata effettuata sui campioni a partire dal terzo mese di maturazione, infatti da precedenti studi (Buono 2005), occorrono almeno 90 gg affinché il prodotto possa essere ritenuto maturo e commerciabile.

In **Figura 5.4.5.1**, si riportano i profili sensoriali delle alici dopo 3 e 6 mesi di maturazione sotto sale.

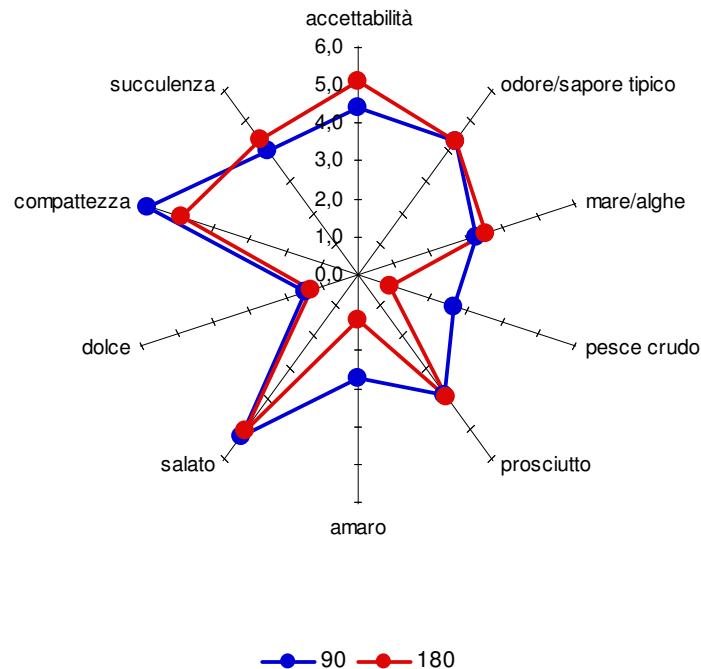


Figura 5.4.5.1. Profili sensoriali delle alici a 3 e 6 mesi di maturazione.

Sono state prese in esame sensazioni olfattive (odore tipico di alici sotto sale, mare, putrido, ecc.), caratteristiche di consistenza (compattezza, gommosità, succulenza), caratteristiche gustative (salato, amaro, dolce, prosciutto, acido, sangue, ecc). Le alici non hanno presentato attributi negativi (rancido, putrido) sia a 3 che a 6 mesi di maturazione.

Per quanto riguarda gli attributi positivi, le alici a partire già dai 90 gg presentano un flavour di “prosciutto”, di “odore tipico” e di “mare/alghe” ben percepito dagli

assaggiatori. Le alici a 180 gg di maturazione sono risultate meno amare e la percezione del sapore di pesce crudo si è ridotta notevolmente.

Infine, è stata richiesta agli assaggiatori la valutazione della gradevolezza complessiva del campione. In relazione a questo ultimo descrittore, le alici ottenute a 150 gg sono risultate preferite dagli assaggiatori (**Figura 5.4.5.2**)

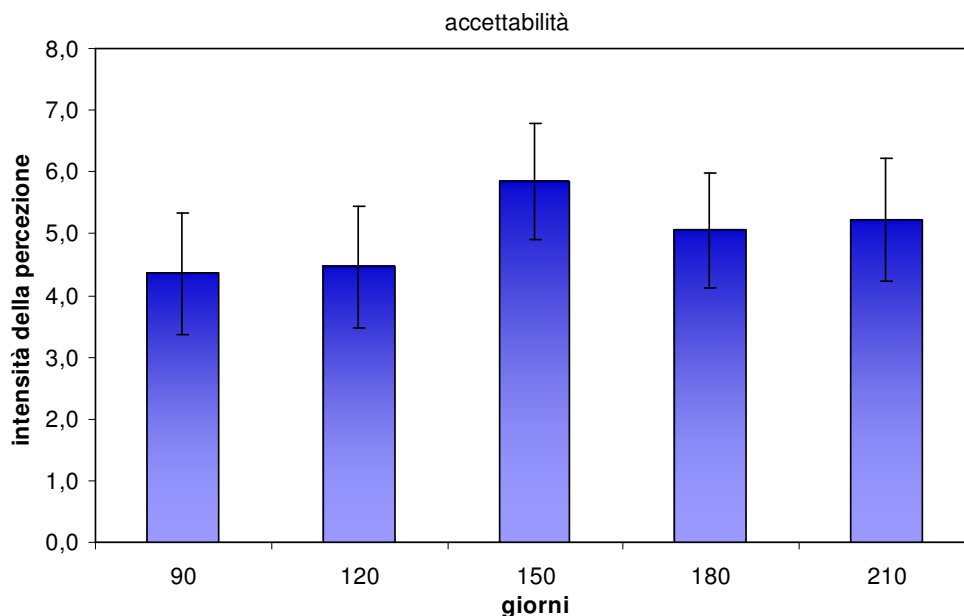


Figura 5.4.5.2. Valutazione della gradevolezza dei campioni di alici ai diversi tempi di maturazione

5.4.6 Analisi dei composti volatili mediante SPME-GC/MS

Sui campioni di alici a diversi tempi di maturazione è stata effettuata l'analisi delle componenti volatili mediante la tecnica SPME al fine di caratterizzare dal punto di vista qualitativo il *flavour* che caratterizza questi prodotti.

Il quadro compositivo delle sostanze volatili rilevate mediante l'analisi SPME-GC/MS è riportato in **Tabella 5.4.6.1**.

In **figura 5.4.6.1** si riporta un esempio di profilo cromatografico relativo a un campione di alice "fresca" (a) e delle acciughe ottenute dopo 90 gg (b) e 210 gg (c) di maturazione.

Tabella 5.4.6.1 Composti volatili presenti nelle alici rilevati mediante analisi SPME GC/MS.

N° Picco	Tempo di ritenzione	Composto	N° Picco	Tempo di ritenzione	Composto
1	4.005	Pentano	51	23.459	Sconosciuto
2	4.109	N-N dimetilammina	52	23.894	Sconosciuto
3	4.290	Esano	53	24.024	Stirene
4	4.674	2-2-dimetilesano	54	24.409	Sconosciuto
5	4.922	Eptano	55	25.184	Ottanale
6	5.369	Carbon disulfide	56	25.701	Sconosciuto
7	5.651	4-Metil-eptano	57	25.921	Ciclopentanolo
8	6.246	Ottano	58	26.243	<i>Trans</i> -2-penten-1-olo
9	6.320	Propanale	59	26.784	Sconosciuto
10	7.561	Sconosciuto	60	26.971	7-Otten-2-one
11	7.653	<i>Trans</i> -2 ottene	61	27.182	6 metil 5-epten-2-one
12	7.808	2 -Piranmetanolo	62	27.387	Sconosciuto
13	8.087	Sconosciuto	63	27.489	1-Esanolo
14	8.271	2-4-dimetil-Eptene	64	27.640	Sconosciuto
15	8.664	Nonano	65	27.638	<i>Trans</i> -3-esenolo
16	8.976	2-Metil-2 propanolo	66	28.244	Sconosciuto
17	9.141	2-Butanone	67	28.868	<i>Cis</i> 3-esenolo
18	9.580	Sconosciuto	68	28.970	Sconosciuto
19	9.586	3-Metil butanale	69	29.213	2-Nonanone
20	9.961	3 Metil 1-4 Eptadiene	70	29.428	Nonanale
21	10.362	Etanolo	71	29.593	Sconosciuto
22	10.544	2,3,5, Trimetil eptano	72	29.681	Sconosciuto
23	10.942	2 Etilfurano	73	30.652	1-3-Dimetil-benzene
24	11.867	Sconosciuto	74	31.077	Sconosciuto
25	11.961	Pentanale	75	31.272	3-Ottenolo
26	12.124	Sconosciuto	76	31.489	Eptanolo
27	13.017	Acetonitrile	77	31.698	Acido propanoico
28	13.441	α -pinene	78	32.093	Sconosciuto
29	13.613	Triclorometano	79	32.394	<i>trans,trans</i> , 2-4-Eptadienale
30	14.215	1-Propanolo	80	32.699	2,5,5, Trimetil-2-esene
31	14.461	Sconosciuto	81	32.802	Pentadecane
32	15.079	Sconosciuto	82	33.548	2-4-Eptadienale
33	15.233	2-3-Pentanedione	83	34.363	3-5-Ottadiene-2-one
34	16.237	Esanale	84	34.861	Benzaldeide
35	17.043	Sconosciuto	85	34.994	2-4-Dimetilcicloesano
36	18.018	Sconosciuto	86	35.284	Ottanolo
37	18.214	Etilbenzene	87	36.275	3-5-Ottadiene-2-one
38	18.576	<i>Trans</i> -2-pentanale	88	36.437	Esadecane
39	18.908	Xilene	89	36.855	2-6-Nonadienale
40	19.381	Penten-3-olo	90	37.022	2-Dodecanone
41	19.695	Sconosciuto	91	37.423	2-Ottenolo
42	20.141	3-Penten-2-olo	92	38.572	Sconosciuto
43	20.379	2,5 Dimetil-esano	93	38.806	Sconosciuto
44	20.616	Sconosciuto	94	39.816	2-7-Octadiene-1-olo
45	20.751	Eptanale	95	41.340	sconosciuto
46	21.299	2 Decen-1-olo	96	42.600	sconosciuto
47	21.630	4 Metil-2-eptanone	97	43.101	sconosciuto
48	22.340	<i>Trans</i> -2-esanale	98	43.374	sconosciuto
49	22.690	Sconosciuto	99	44.802	sconosciuto
50	23.254	Pentanolo	100	47.316	sconosciuto
			101	51.386	sconosciuto

Sono stati rilevati 101 composti corrispondenti alle sostanze volatili presenti nello spazio di testa. L'identificazione è stata effettuata utilizzando le librerie (NIST 27, NIST 147, SZTERP) presenti nel software di acquisizione, con una probabilità di riconoscimento maggiore dell'85-90% ed avvalendosi dei dati presenti in letteratura (Triqui e Reineccius, 1995).

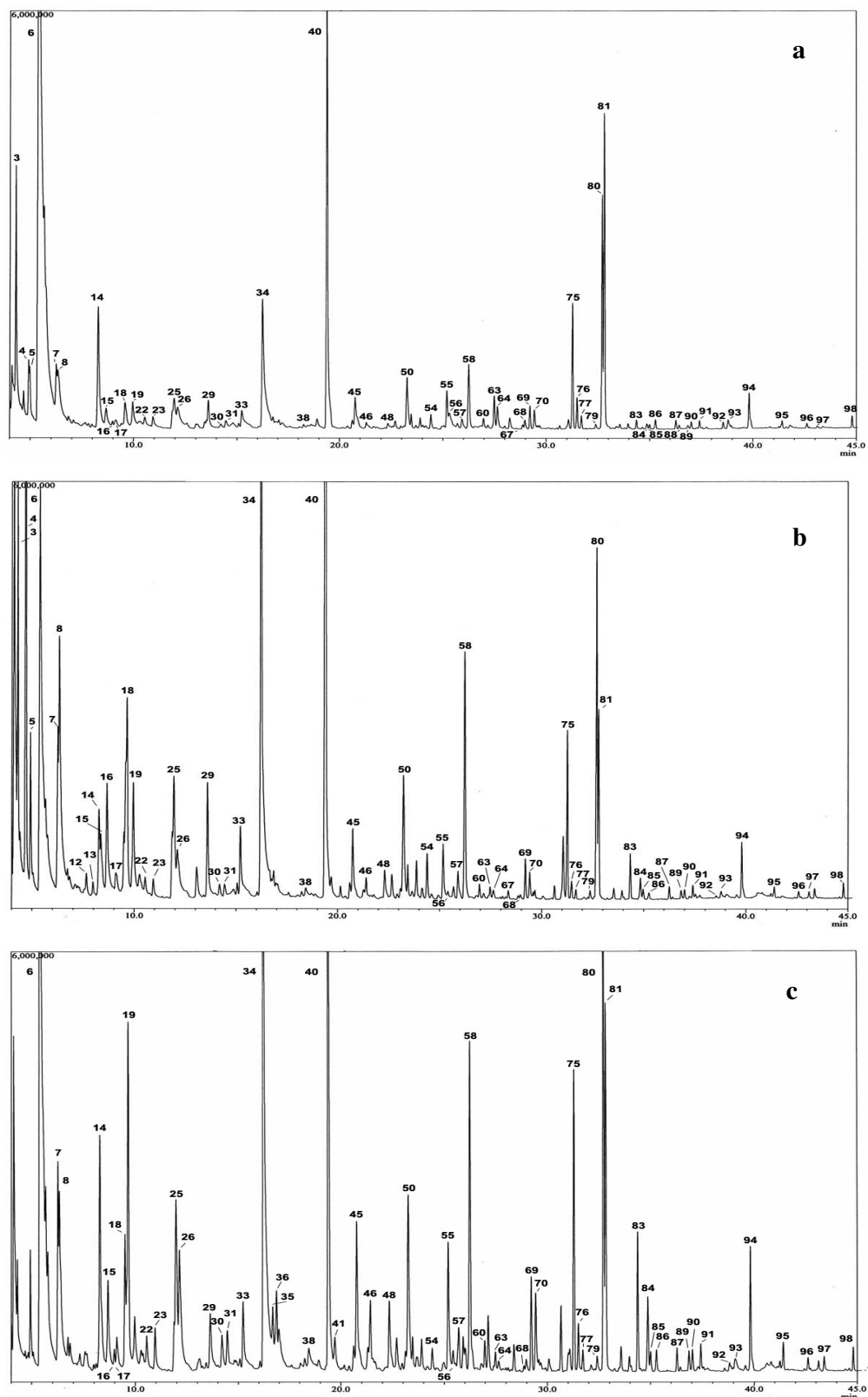


Figura 5.4.6.1 Esempio di cromatogramma (TIC) ottenuto dall’analisi GC/MS delle sostanze volatili di un campione di alice “fresca” (a) e delle acciughe ottenute dopo 90 gg (b) e 210 gg (c) di maturazione. Identificazione dei picchi come da **tabella 5.4.6.1**.

Le identificazioni che davano una probabilità più bassa della certezza sono state valutate come non significative nell'attesa di poter confermare l'identificazione dei composti mediante l'uso di standard specifici.

Sono state riscontrate diverse classi di composti tra cui hanno prevalso gli alcoli e alcune aldeidi riportate in letteratura e caratterizzanti il *flavour* delle alici (Triqui e Reineccius, 1995).

I composti terpenici presenti probabilmente sono da attribuire alla dieta dei pesci, lo stirene è un probabile contaminante dei contentitori (Heath e Reineccius, 1986) utilizzati per il confezionamento delle acciughe.

Dalla **figura 5.4.6.1** appaiono evidenti le modifiche che si verificano a carico della componente volatile durante la maturazione.

In particolare si è osservato un aumento della 3-*metil*-butanale (picco 19), della pentanale (picco 25), dell'esanale (picco 34), del 3-pentenolo (picco 40), dell'eptanale (picco 45), del pentanolo (picco 50), dell'ottanale (picco 55), del *trans*-2 penten-1-olo (picco 58), della nonanale (picco 70), e del 3-ottenolo (picco 75) e di numerosi altri composti.

Per osservare i cambiamenti del *flavour* che si verificano nelle alici durante la conservazione attraverso l'analisi dello spazio di testa mediante SPME l'attenzione è stata focalizzata su alcuni composti che, come precedente discusso per l'olio, hanno mostrato modifiche significative durante la conservazione e quindi potrebbero essere considerati dei buoni marcatori dello stato ossidativo.

Non disponendo di tutti i composti standard necessari alla costruzione delle curve di calibrazione non è stato possibile condurre una misura quantitativa dei composti volatili identificati. Si è pertanto proceduto ad una valutazione semi-quantitativa dei principali composti basata sui valori registrati per le aree assolute dei picchi cromatografici.

In **Figura 5.4.6.2** si riporta l'evoluzione del contenuto di alcune aldeidi (picchi 38, 45, 55, 70) monitorate nel corso della maturazione. Tali composti, come è ben visibile anche dai cromatogrammi (**figura 5.4.6.1**) aumentano nel corso della maturazione delle alici. In particolare è possibile osservare un maggiore incremento tra le alici iniziali e quelle analizzate dopo 90 gg di maturazione, nel periodo

successivo l'incremento è minore, ad eccezione della nonanale che aumenta in maniera lineare in tutto il periodo considerato.

Tale andamento conferma quello osservato anche in precedenti studi (Triqui e Reineccius, 1995).

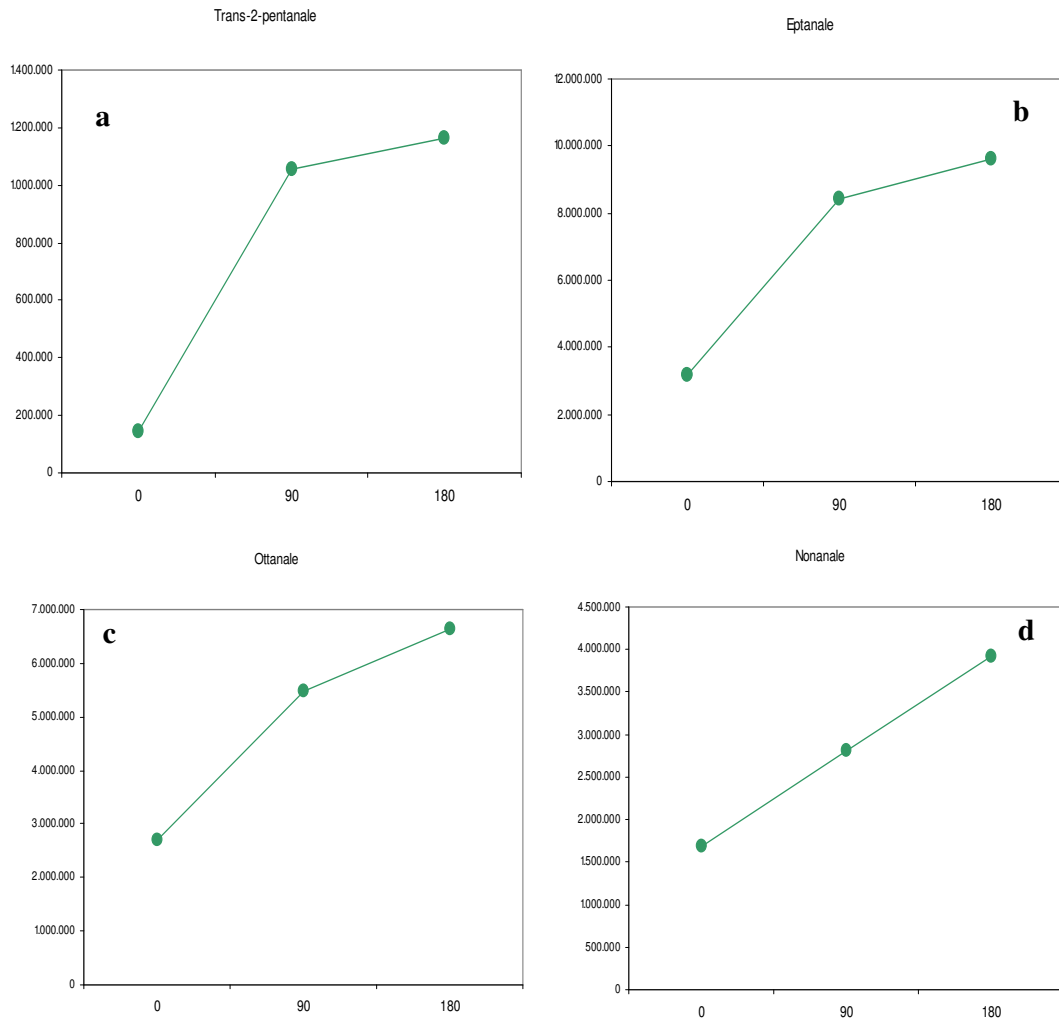


Figura 3.5.5.8. Modificazione della *trans*-2-pentanale (a), dell'eptanale (b), dell'ottanale (c) e della nonanale (d) durante il processo di maturazione delle alici.

Importanti modifiche si sono osservate anche a carico di numerosi composti non ancora identificati e ciò ha evidenziato la necessità di approfondire le conoscenze su tali aspetti e studiare le reazioni che si instaurano tra i prodotti dell'ossidazione lipidica e le sostanze proteiche in una matrice complessa come il muscolo delle alici sotto sale. In particolare l'identificazione di ulteriori composti potrà fornire ulteriori marcatori del processo di maturazione delle alici sotto sale.

5.5 Conclusioni

Sulla base dei risultati ottenuti nel presente capitolo della tesi di dottorato è possibile trarre le seguenti considerazioni conclusive:

- ✓ la metodica messa a punto con il naso elettronico si è mostrata in grado di differenziare le alici fresche e nei primi mesi di maturazione da quelle a un tempo di maturazione superiore a 90 gg. Lo strumento non ha rilevato grosse differenze tra i campioni oltre i 90 gg di maturazione non consentendo un monitoraggio puntuale del processo di maturazione, ma la sola verifica del raggiungimento della maturazione commerciale, solitamente corrispondente a tale tempo (circa 3 mesi).
- ✓ nel corso della maturazione delle alici sotto sale è stato rilevato un intenso fenomeno lipolitico soprattutto nel primo periodo. A tale fenomeno si affianca un'evoluzione del livello di ossidazione.
- ✓ l'analisi del profilo sensoriale ha evidenziato come esistano delle differenze tra i campioni di alici a diverso tempo di maturazione. Durante tutta la maturazione le alici non hanno presentato attributi negativi (rancido, putrido). Per quanto riguarda gli attributi positivi, le alici a partire già dai 90 gg hanno presentato un *flavour* di “prosciutto”, di “odore tipico di alice” e di “mare/alghe” ben percepito dagli assaggiatori. Per quanto riguarda la gradevolezza complessiva dei campioni, le alici ottenute a 150 gg sono risultate preferite.
- ✓ la caratterizzazione qualitativa e semi-quantitativa del profilo aromatico effettuata mediante la tecnica della microestrazione in fase solida (SPME) accoppiata alla gas-massa ha permesso la rilevazione di 101 composti potenzialmente utilizzabili quali marcatori della qualità del prodotto finito. Ulteriori studi saranno necessari per definirne l'applicabilità.

5.6 Bibliografia

Ambrosino M.L., Buono O., Sacchi R. (2004). A preliminary sensory approach to assess tipicity of salted “menaica” anchovies (*Engraulis encrasicolus*) produced in the “Cilento” National Park. *A sense of Identity*, European Conference on Sensory Science of Food and Beverages. Florence, September 26-29, P48.

Ashton, I.P., Unilever R&D, SharnBrook. (2002). Understanding lipid oxidation in fish. H. Allan Bremner. *Safety and Quality Issue in Fish Processing*. CRC Press.

Aurola V. (2005) Tesi di laurea. Evoluzione della frazione lipidica delle alici sotto sale durante la maturazione. Università degli studi di Napoli Federico II.

Baldrati G., Cassarà A., Guidi G., Pirazzoli P., Porretta A. (1975). Maturazione sotto sale di acciughe fresche e congelate. *Industria delle conserve*, 50: 261-266.

Bligh E., Dyer W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.

Buono O. (2004). Tesi di laurea: Qualità sensoriale e nutrizionale delle “alici di menaica” del Cilento. Università degli studi di Napoli Federico II.

Chopin C., Kone M., Serot T. (2007). Study of the interaction of fish myosin with the products of lipid oxidation: the case of aldehydes. *Food chemistry*, 105: 126-132.

Cappelli P., Vannucchi V. (1998). Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazione. Seconda edizione, Zanichelli editore. Bologna.

Fidanza E. (1996). Alimentazione e nutrizione umana. Gnocchi Editore.

Frankel E.N. (1998). Lipid oxidation. The Oily Press, Dundee (Scotland).

Gerghi M. (1990). Analisi dei dati. Ed. E:D.I.S.U.

Giullén M.D., Ruiz A. (2004). Study of the stability of salted and unsalted salmon fillers by ¹H nuclear magnetic resonance. *Food Chemistry*, 86: 297-304.

Gokoglu N., Ozden O., Erkan N., Baygar T., Metin S. (1999). Seasonal variation in fat content of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *International Journal of Food and Technology*, 34: 401-402.

Heath H.B., Reineccius G.A. (1986). Off-Flavors in Foods. *In Flavor Chemistry and Technology*, AVI Publishing: Westport, CT, 112-141.

Ho C.W., Wan Aida W. M., Maskat M.Y., Osman H. (2006). Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass

spectrometry (GC-MS) analysis of aroma compound in palm sugar (*Arenga pinnata*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 822-830.

Josephson D.B., Lindsay R.C., Olafsdottir G. (1986). Measurement of volatile aroma constituents as a means for following sensory deterioration of fresh fish and fishery products. In *Proceedings of an International Symposium on Quality Determinations*, Elsevier Science Publishers, 27-47.

Karakam H., Kutlu S., Kose S. (2002). Effect of salt concentrations and temperature on the quality and shelf-life of brined anchovies. *International Journal of Food and Technology*, 37: 19-28.

Karacam H., Boran M. (1996). Quality changes in frozen whole and gutted anchovies during storage at -18°C. *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 527-531.

Kolakowska A., Olley J., Dunstan G.A. (2003). Fish Lipids in Chemical functional properties of food lipids, eds. By Sikorski Z.E. and Kolahowska, CRC Press.

Maraschiello C., Sarraga C., Regueiro J.A.G. (1999). Glutathione Peroxidase Activity TBARS, and α -Tocopherol in Meat from Chickens Fed Different Diets. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 867-872.

Medina, I., Satué-Gracia, M.T., Frankel, E.N. (1999). Static Headspace Gas Chromatographic Analyses to Determine Oxidation of Fish Muscle Lipids During Thermal Processing. *JAOCS*, vol. 76, no. 2.

Morita K., Kubota K., Aishima T. (2003). Comparison of aroma characteristic of 16 fish species by sensory evaluation and gas chromatographic analysis. *J. Sci. Food Agric*, 83: 289-297.

Orban E. (1996). Controllo igienico-sanitario nelle filiera dei prodotti ittici. La direttiva 91/493 CE. *Industrie alimentari* 35: 532.

Pirati D., Guidi G. (1971). Influenza della temperatura di conservazione sui filetti di acciughe all'olio. *Industria delle conserve*. 46: 103-107.

Pirazzoli P., Baldrati G., Incerti I., Ambroggi F. (1981). Influenza della temperatura sulla maturazione di acciughe sotto sale. *Industria delle Conserve*, 56: 77-81.

Rovellini, P., Cortesi, N., Fedeli, E. (1997). Ossidazione dei lipidi. Nota 1. *La rivista italiana delle sostanze grasse*, 74: 181-188.

Scaffi, L., Sacchi, R. (1993). Grassi visibili e non visibili degli alimenti in Aggiornamenti in nutrizione clinica: 5. A cura di Gentile M.G.. Il pensiero Scientifico Editore, Milano.

Triqui R., Bouchriti N. (2003). Freshness Assessments of Moroccan Sardine (*Sardina pilchardus*): Comparison of Overall Sensory Changes to Instrumentally Determined Volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 7540-7546.

Triqui R., Reineccius G.A. (1995). Flavor Development in the Ripening of Anchovy (*Engraulis encrasicolus L.*). *J. Agric. Food Chem.*, 43: 453-458.

Triqui R., Zouine K. (1999). Sensory and instrumental Assessment of the Ripening Process of Anchovy (*Engraulis encrasicolus L.*). *Lebensm Wiss Technol*, 32: 203-207.

Turchetto, E., Biagi, P. L. (1997). *Manuale degli oli e grassi*. Ed tecn. Nuove.

Viola P. (1997). L'olio d'oliva e la salute. Consiglio Oleicolo Internazionale (C.O.I), Madrid (Spagna).

Warner, K., Eskin, N.A.M. (1995). Methods to assess Qualità and Stability of Oils and Fat-Containing Food. AOLS Press, Champaign (Illinois, USA), cap.9: 156-166.

Vazquez M. J.; Lorenzo R.A, Cela R (2003). The use of an "electronic nose" device to monitor the ripening process of anchovies. *Int. journal of Food Science and Technology* 38: 273-284.

Siti consultati:

www.azzurrodelgolfo.it

www.atlantaparchi.com

www.uniprom.it