

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**

**FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA**

*DIPARTIMENTO DI SCIENZE ZOOTECNICHE ED ISPEZIONE DEGLI  
ALIMENTI*



**TESI DI DOTTORATO**

IN

*Produzione e sanità degli alimenti di Origine Animale*

*XXI CICLO*

***EVOLUZIONE DEL PROFILO ACIDICO IN ALIMENTI DI  
ORIGINE ANIMALE E MESSA A PUNTO DI UN MICROMETODO  
PER LA LORO DETERMINAZIONE IN LATTE E PRODOTTI  
DERIVATI***

**Tutor:**

**Ch.mo** Prof. Aniello Anastasio

**Coordinatore:**

**Ch.ma** Prof.ssa Maria Luisa Cortesi

**Candidato:**

Dott. Raffaele Marrone

Anni Accademici  
2005-2008

## INDICE

<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>Pag. 4</b>
<i>Acidi grassi</i>	<i>pag.7</i>
<i>L'importanza degli acidi grassi polinsaturi per la salute umana</i>	<i>pag.14</i>
<i>Lipidi marini come fonte di <math>\omega</math>-3 e dei suoi effetti benefici per la salute</i>	<i>pag.18</i>
<i>Acidi grassi della serie <math>\omega</math>-3</i>	<i>pag.22</i>
<i>Acidi grassi della serie <math>\omega</math>-6</i>	<i>pag.26</i>
<i>Cla e benefici per la salute umana</i>	<i>pag.28</i>
<i>Determinazione dei Lipidi</i>	<i>pag.32</i>
<i>Estrazione</i>	<i>pag.32</i>
<i>Metilazione</i>	<i>pag.33</i>
<i>Quantificazione degli acidi grassi mediante gascromatografia</i>	<i>pag.35</i>
<b>PARTE SPERIMENTALE.....</b>	<b>Pag.37</b>
<b>1° INDAGINE SPERIMENTALE.....</b>	<b>Pag.39</b>
<b>PROFILO ACIDICO DI FILETTI DI SPIGOLA (<i>Dicentrarchus Labrax</i>) E ORATA (<i>Sparus Aurata</i>) CONFEZIONATI CON DIVERSE TECNOLOGIE</b>	
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>Pag.39</b>
<i>Composizione in acidi grassi di prodotti della pesca</i>	<i>pag.42</i>
<i>Lo spoilage nel pesce</i>	<i>pag.44</i>
<i>Il confezionamento in atmosfera protettiva</i>	<i>pag.46</i>
<i>I gas nel confezionamento in atmosfera protettiva</i>	<i>pag.47</i>
<i>I gas</i>	<i>pag.48</i>
<i>Ossigeno</i>	<i>pag.49</i>
<i>Anidride Carbonica</i>	<i>pag.50</i>
<i>Azoto</i>	<i>pag.52</i>
<i>I materiali di confezionamento più adatti</i>	<i>pag.54</i>
<i>Sistemi di confezionamento innovativi degli alimenti</i>	<i>pag.60</i>
<i>“Steam cooking”</i>	<i>pag.61</i>
<i>”Skin-darfresh”</i>	<i>pag.63</i>
<i>Quality index method (QIM)</i>	<i>pag.65</i>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>Pag.68</b>

<i>Materie prime, preparazione e confezionamento</i>	<i>pag.68</i>
<i>Accertamenti</i>	<i>pag.75</i>
<b>RISULTATI.....</b>	<b>Pag.77</b>
<b>CONSIDERAZIONI.....</b>	<b>Pag.84</b>
<b>2° INDAGINE SPERIMENTALE.....</b>	<b>Pag.86</b>
<b>CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO ACIDICO DI CAMPIONI DI FORMAGGIO PECORINO “CARMASCIANO”</b>	
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>Pag.86</b>
<i>Il formaggio pecorino Carmasciano</i>	<i>pag.91</i>
<b>OBIETTIVI.....</b>	<b>Pag.99</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>Pag.99</b>
<i>Metilazione</i>	<i>pag.104</i>
<i>Analisi gascromatografica</i>	<i>pag.104</i>
<b>RISULTATI.....</b>	<b>Pag.106</b>
<b>3° INDAGINE SPERIMENTALE.....</b>	<b>Pag.113</b>
<b>MESSA A PUNTO DI UN MICROMETODO RAPIDO PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI IN LATTE E FORMAGGIO</b>	
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>Pag.113</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>Pag.114</b>
<i>SVILUPPO DEL MICROMETODO PER IL LATTE</i>	<i>pag.114</i>
<i>Studio del metodo di metilazione</i>	<i>pag.115</i>
<i>Sviluppo del micrometodo e riceca delle migliori condizioni operative</i>	<i>pag.116</i>
<i>Confronto tra il micrometodo e il metdo standard</i>	<i>pag.117</i>
<i>Analisi degli esteri metilici degli acidi grassi</i>	<i>pag.117</i>
<i>Analisi statistica</i>	<i>pag.118</i>
<i>SVILUPPO DEL MICROMETODO PER IL FORMAGGIO</i>	<i>pag.119</i>
<i>Analisi degli esteri metilici degli acidi grassi</i>	<i>pag.119</i>
<i>Analisi statistica</i>	<i>pag.120</i>
<b>RISULTATI.....</b>	<b>Pag.120</b>
<b>MICROMETODO PER IL LATTE.....</b>	<b>Pag.126</b>
<b>MICROMETODO PER IL FORMAGGIO</b>	
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>pag. 129</b>

## INTRODUZIONE

L'alimentazione è un fattore determinante per la prevenzione delle malattie. Per molte persone, i grassi hanno connotazioni negative sulla salute ma essi sono sostanze nutritive essenziali e indispensabili per la vita. A questo proposito molti studi sulla variazione della dieta indicano che i più importanti cambiamenti nell'alimentazione si sono verificati soprattutto nel tipo e nella quantità di acidi grassi essenziali e di antiossidanti assunti (*Mata et al., 2003*). Nel corso degli ultimi quaranta anni lo studio delle relazioni tra grassi alimentari e salute e, più specificamente, tra grassi alimentari e patologia, è stato prevalentemente orientato verso il problema dell'arteriosclerosi, delle malattie cardiovascolari ed in particolare delle cardiopatie coronariche.

Il termine lipide è utilizzato nel senso più ampio del termine per descrivere composti biologici solubili in solventi organici come cloroformio, benzene, etere e alcool e insolubili in acqua (*Hemming e Hawthorne, 2001*). Essi comprendono un vasto gruppo di biomolecole, come acidi grassi e loro derivati, carotenoidi, terpeni, steroidi e acidi

biliari; con le proteine ed i carboidrati costituiscono la frazione nutrizionale prevalente, svolgendo le seguenti funzioni:

1. energetica, permettendo la costituzione di riserve in poco volume (9 Kcal di energia lorda/g);
2. plastica, sono componenti fondamentali delle membrane cellulari in tutti i tessuti;
3. di protezione e sostegno delle strutture anatomiche;
4. di isolamento termico per il mantenimento della temperatura corporea;
5. veicolante vitamine e altre sostanze liposolubili;
6. di appetibilità degli alimenti;
7. estetica, in quanto contribuiscono alla definizione della morfologia dell'organismo.

La classe più comune di lipidi in natura è composta da acidi grassi uniti mediante legami esteri a gruppi idrossilici del glicerolo. Tuttavia, vi sono lipidi che possono contenere diversi composti chimici che determinano la loro insolubilità in acqua e la solubilità in solventi organici (Fig .1).

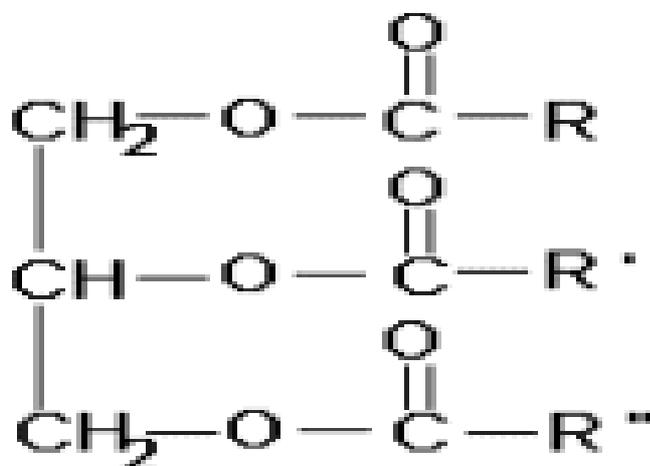


Figura 1. Struttura chimica dei lipidi

Il grasso è un liquido oleoso che abbonda nel tessuto adiposo degli animali o nei semi delle piante. Negli alimenti, il grasso si trova quasi esclusivamente sotto forma di trigliceridi o triacilgliceroli (> 95%). I trigliceridi sono costituiti da tre molecole di acidi grassi che sono esterificati con il gruppo idrossile (-OH) di una molecola di glicerolo (Muriana, 2003). Questi composti sono caratterizzati da un elevato potere e forniscono circa 9 kcal/g (38 kJ) (Mataix e Gil, 2003).

Spesso i trigliceridi sono identificati come "grasso" e "oli" di origine animale o vegetale. A volte, il grasso è visibile per il consumatore (burro o olio, per esempio) ma altre volte non è visibile, sia perché essi sono mescolati con altri componenti alimentari (nel latte) sia perché sono parte di tessuti (Mataix e Gil, 2003).

Altri lipidi alimentari sono quelli complessi (glicerofosfolipidi e sfingolipidi), molecole con funzione strutturale, in quanto fanno parte delle membrane biologiche e modulano la loro attività. Tuttavia i lipidi complessi hanno poca importanza quantitativa e qualitativa in termini di apporto alimentare (*Mataix e Gil, 2003*).

### **Acidi grassi**

Gli acidi grassi sono costituenti tanto dei trigliceridi che dei lipidi complessi e possono esterificare anche il colesterolo, hanno una struttura (di solito lineare) con un gruppo carbossile (HOOC-) ad un estremo e un gruppo metilico (-CH<sub>3</sub>) all'altro estremo; il resto della molecola è una catena di idrocarburi (*Muriana, 2003*). Gli acidi grassi sono composti sintetizzati in natura attraverso la condensazione di unità di malonyl coenzima A per l'azione di un complesso multienzimatico chiamato "acidi grassi sintetasi". Gli acidi grassi di interesse biologico sono gli acidi carbossilici con un numero pari di atomi di carbonio (per lo più tra 4 e 26). Sono composti altamente insolubili in acqua e con un alto

contenuto energetico. È possibile classificarli in quattro gruppi a seconda della lunghezza della catena carboniosa:

- a. Acidi grassi a catena corta (4-6 atomi di carbonio)
- b. Acidi grassi a catena media (8-12 atomi di carbonio)
- c. Acidi grassi a catena lunga (14-18 atomi di carbonio)
- d. Acidi grassi a catena molto lunga (20 o più atomi di carbonio)

Inoltre gli acidi grassi possono essere saturi (atomi di carbonio uniti da un singolo legame), monoinsaturi (caratterizzati da un solo doppio legame) polinsaturi (caratterizzati da più doppi legami) (*Hemming e Hawthorne, 2001*) e possono contenere una varietà di gruppi sostituenti. Negli acidi grassi naturali, la disposizione spaziale dell'idrogeno nei legami semplici è trans (t) mentre nei legami doppi assume quasi sempre una conformazione di tipo cis (c). Questo crea un angolo di circa 30 gradi in questa posizione e quindi un sito di attacco nella molecola.

Anche se molto rari ci sono anche acidi grassi trans con doppi legami. Questi acidi grassi si trovano nel modo naturale nel grasso del latte e

della carne dei ruminanti e si formano per effetto della flora ruminale (*Mataix e Gil, 2003*).

Gli acidi grassi con doppi legami di tipo trans sono rettilinei, come quelli saturi, a differenza di quelli con doppi legami tipo-cis che, come già accennato, presentano un sito di attacco nella molecola. Pertanto gli acidi grassi trans non possono essere sostituiti con il tipo cis dal punto di vista nutrizionale. Essi sono in grado di produrre la stessa quantità di energia, ma non hanno le stesse proprietà biologiche (*Mataix e Gil, 2003*).

Gli acidi grassi naturali hanno un nome comune, oltre al nome sistematico (*Mataix e Gil, 2003 tabella 1*).

<b>ACIDI GRASSI</b>	<b>NUMERO DI ATOMI DI CARBONIO</b>	<b>NUMERO DI DOPPI LEGAMI</b>	<b>PRIMO DOPPIO LEGAME</b>	<b>CODICE</b>
<b>Acidi grassi saturi</b>				
Butirrico	14	0	-	C4:0
Capronico	6	0	-	C6:0
Caprilico	8	0	-	C8:0
Caprinico	10	0	-	C10:0
Laurico	12	0	-	C12:0
Miristico	14	0	-	C14:0
Palmitico	16	0	-	C16:0
Stearico	18	0	-	C18:0
Arachico	20	0	-	C20:0
Behenico	22	0	-	C22:0
Lignocericico	24	0	-	C24:0
<b>Acidi grassi monoinsaturi</b>				
Palmitoleico	16	1	6	C16:1 ?6
Oleico	18	1	9	C18:1 ?9
Cetoleico	22	1	11	C22:1 ?11
Nervonico	24	1	9	C24:1 ?9
<b>Acidi grassi polinsaturi</b>				
Linoleico	18	2	6	C18:2 ?6
$\alpha$ -linolenico	18	3	3	C18:3 ?3
$\gamma$ -linolenico (GLA)	18	3	6	C18:3 ?6
Arachidonico (AA)	20	4	6	C20:4 ?6
Eicoisapentenoico (EPA)	20	5	3	C20:5 ?3
Docosatetrenoico	22	4	6	C22:4 ?6
Docosapentenoico	22	5	3	C22:5 ?3
Docosapentenoico	22	5	6	C22:5 ?6
Docosaesaenoico (DHA)	22	6	3	C22:6 ?3

**Tab. 1 Acidi grassi maggiormente frequenti negli alimenti di consumo abituale**

Così per esempio l'acido grasso saturi a 16 atomi di carbonio, il cui nome sistematico è esadecanoico, è generalmente chiamato acido palmitico o 16: 0 (16 atomi di carbonio e nessun doppio legame). Quando ci sono doppi legami la nomenclatura sistematica tradizionale indica cis oppure trans o la sua posizione a partire dal gruppo carbossilico. Così l'acido linoleico è chiamato in sistematica come 9-cis, 12 cis octadecadienoico (*Mataix e Gil, 2003*).

Tuttavia risulta molto più utile e semplice indicare solo il numero di atomi di carbonio, il numero di doppi legami e la posizione del primo contando a partire dal gruppo metilico (*Jensen, 2002*) con l'aggiunta di  $\omega$  o "n" in modo che quelli con la stessa numerazione  $\omega$  metabolicamente sono collegati l'uno con l'altro (*Mataix Gil, 2003*). Ad esempio l'acido linoleico viene indicato C18:2 o 18:2 n-6. Così viene indicato che vi è un doppio legame in posizione  $\omega$  6, nel carbonio numero 6 a partire dal gruppo metilico. I restanti doppi legami sono situati a partire da questo doppio legame in modo non-coniugato, essendoci sempre un gruppo metilico tra i due. Pertanto, è noto che, che il successivo doppio legame è situato in  $\omega$  9.

Mentre gli acidi grassi saturi sono abbondanti negli animali terrestri, in particolare mammiferi, e nell'olio di provenienza vegetale come quello di cocco o di palma, i monoinsaturi, il cui principale rappresentante è l'acido oleico [(C18:1 (n -9))] sono presenti in tutti i grassi animali e oli vegetali, specialmente l'olio di oliva (*Mata et al, 2003*) e l'olio di colza.

Tra gli acidi grassi polinsaturi gli  $\omega 3$  e  $\omega 6$  hanno una grande importanza; essi variano per la posizione del doppio legame rispetto gruppo al gruppo metilico posto alla fine della molecola dell'acido grasso (*Shahidi, 2000*).

Il principale acido grasso  $\omega 6$  è l'acido linoleico (18:2 n-6) che è abbondante negli oli vegetali di mais, soia e girasole. Gli acidi grassi  $\omega 3$  si trovano in piccole quantità in alcuni oli vegetali e piante, la loro fonte principale sono gli animali marini. L'acido linolenico (18:3 n-3) abbonda nelle piante (nell'olio di colza e soia e in grandi quantità nell'olio di lino); l'acido eicosapentaenoico (EPA, 20 : 5 n-3) e il docosaesaenoico (DHA, 22:6 n-3) sono abbondanti nei pesci, molluschi marini negli oli o grassi di origine sia animale che vegetale (alghe, microalga, ecc). La famiglia dei PUFA  $\omega 3$  deriva dall'acido linolenico mentre la famiglia  $\omega 6$  deriva dall'acido linoleico, questi, a sua volta, producono diverse

sostanze con attività regolatrice e biologica, note generalmente come eicosanoidi.

La via metabolica dei PUFA  $\omega 3$  e  $\omega 6$  utilizza lo stesso insieme di enzimi e possono competere gli uni con gli altri. Se l'assunzione di uno di essi è in eccesso, può interferire con il metabolismo di un altro, il che conduce alla perdita di equilibrio nella produzione di prostaglandine, leucotreni e trombossano (*Leaf, 1987; Nordic Council of ministres, 1989; Vaughn et al, 1994*).

L'acido linoleico e  $\alpha$ -linolenico sono considerati essenziali perché non possono essere sintetizzati dall'organismo e, pertanto, devono essere assunti attraverso la dieta. Sono necessari per la crescita e lo sviluppo così come per il mantenimento di una buona salute.

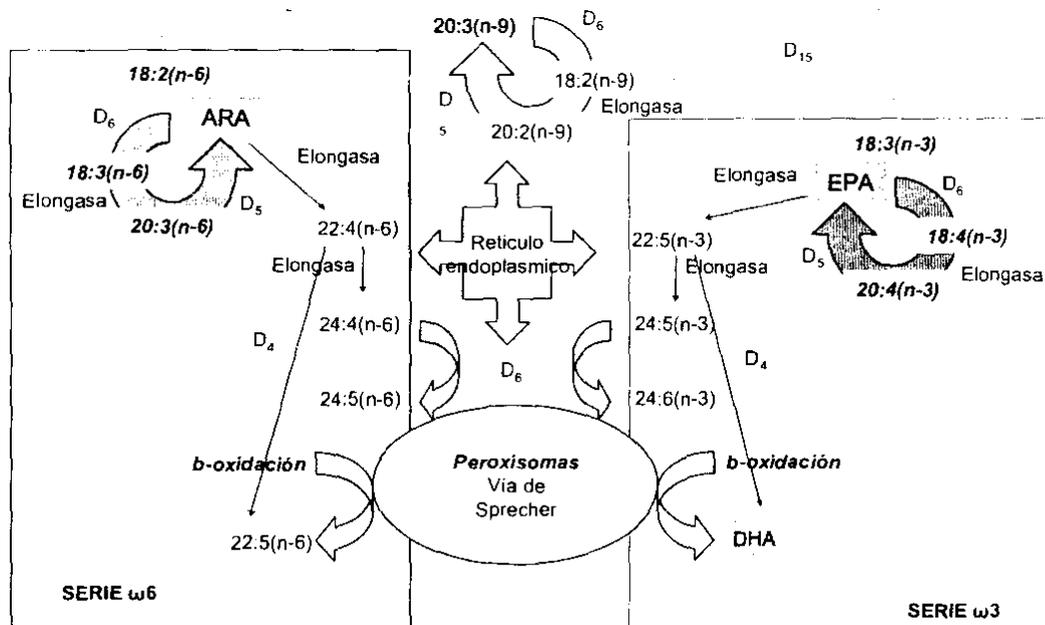


Fig. 2 Meccanismo di formazione degli acidi grassi della serie  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6

## L'importanza degli acidi grassi polinsaturi per la salute umana

Le malattie cardiovascolari sono la principale causa di morte in Europa, negli Stati Uniti e in gran parte dell'Asia. Ci sono diversi fattori di rischio associati al loro sviluppo, tra questi il colesterolo totale, i trigliceridi, l'ipertensione, il diabete e i bassi livelli di colesterolo HDL. Molti di questi fattori di rischio sono influenzati dalla dieta (Carrero *et al.*, 2005). Alcuni studi scientifici hanno dimostrato che la quantità di PUFA nelle membrane delle cellule di individui affetti da morbo di Alzheimer, da

depressione o da schizofrenia sono molto bassi. I principali risultati emersi, nel 1984 dalla relazione della *Committee on Medical Aspects of Food Policy (COMA)* e discussi da *Ulbricht e Wheelock. (1989)*, sono stati:

1. le diete ricche di acido stearico (C18:0), non determinano aumento del colesterolo serico;
2. gli SFA a corta catena (C:10), allo stesso modo, non comportano aumento del colesterolo nel sangue, mentre gli SFA a media catena, laurico (C12:0), miristico (C14:0) e palmitico (C16:0) sono aterogenici come già osservato da *Keys et al. nel 1965*.

Altri studi hanno dimostrato che gli SFA a lunga catena, miristico (C14:0), palmitico (C16:0) e stearico (C18:0) sono anche trombogenici. L'acido miristico è il principale aterogenico poiché ha un potere ipercolesterolemico quattro volte superiore rispetto a quello dell'acido palmitico (*Hegsted, 1965*).

E' stata ampiamente esaminata la correlazione fra gli acidi grassi monoinsaturi e la riduzione della predisposizione all'ossidazione delle LDL. Studi sperimentali sul coniglio mostrano che le lipoproteine a bassa densità ricche di acido oleico, il principale acido grasso dell'olio di oliva,

sono molto resistenti all'ossidazione. I risultati ottenuti suggeriscono che l'assunzione di acidi grassi monoinsaturi può, quindi, associare i vantaggi derivanti dalla riduzione del colesterolo con la diminuzione delle lipoproteine a bassa densità e l'inibizione dell'ossidazione cellulare (*Parthasarathy et al., 1990*).

L'interesse per gli effetti favorevoli degli acidi grassi  $\omega 3$  sullo stato di salute, soprattutto in rapporto alle patologie cardiovascolari, è nato verso la fine degli anni '70, in seguito all'osservazione che nelle popolazioni eschimesi della Groenlandia, che consumano grandi quantità di pesce, particolarmente ricco in tali acidi grassi, l'incidenza della mortalità cardiaca per cause tromboemboliche era molto più bassa rispetto a quella registrata nelle altre popolazioni. Questo fenomeno è denominato "paradosso degli Eschimesi" in quanto le popolazioni della Groenlandia, pur consumando una dieta ricca di grassi animali, presentavano una bassa incidenza di malattie cardiovascolari (*Bang e Dyerberg, 1973*).

Recenti studi clinici hanno mostrato che gli acidi grassi polinsaturi della famiglia  $\omega 6$  determinano principalmente una riduzione della colesterolemia (sia lipoproteine ad alta densità, HDL, sia LDL) per cui svolgono un'importante funzione anti-aterogenica. Gli acidi grassi

polinsaturi della famiglia  $\omega 3$ , invece, hanno un'attività anti-trombogenica particolarmente evidente, in quanto riducono l'aggregazione piastrinica (*Bertoni e Trevisi, 1999*).

L'acido linoleico è il più importante precursore alimentare delle prostaglandine. Una piccola aliquota di questo acido è trasformata nel fegato per allungamento e desaturazione in acido arachidonico ed in parte in acido diomo- $\alpha$ -linoleico (DHHA, C20:3). Il DHHA è il precursore della prostaglandina E1 (PGE1), un agente antiaggregante; mentre l'acido arachidonico (C20:4) è il precursore del trombossano A2 (TXA2), un potente agente aggregante, e della prostaglandina I2 (PGI2), anch'essa caratterizzata da potere antiaggregante, anche se molto meno forte (*Gibney, 1993; Miles e Calder, 1998*). Gli acidi grassi polinsaturi della famiglia  $\omega 3$  agiscono come antiaggreganti attraverso:

1. l'EPA, precursore del trombossano A3 (TXA3), un debole agente aggregante e della prostaglandina I3 (PGI3), un potente antiaggregante. Quindi, una sostituzione nella dieta di acidi grassi polinsaturi  $\omega 6$  con quelli  $\omega 3$ , come precursori di prostaglandine e trombossani, indurrebbe uno squilibrio tra agenti aggreganti/agenti antiaggreganti facendo prevalere questi ultimi;

2. l'inibizione della conversione dell'acido arachidonico in TXA2 nelle piastrine.

Alla luce di tutte queste considerazioni, il solo rapporto acidi grassi polinsaturi/saturi (PUFA/SFA) non viene più considerato un valido indice per la stima dell'aterogenicità e/o della trombogenicità di una dieta o di un alimento, in quanto tale teoria partiva dall'assunto che tutti gli acidi grassi saturi fossero dannosi per la salute umana. Attualmente, come suggerito da *Ulbricht e Southgate (1991)*, vengono, invece, presi in considerazione anche gli acidi grassi monoinsaturi.

E' necessario, quindi, correggere molti pregiudizi riguardo il ruolo dei lipidi alimentari che, per decenni, sono stati considerati dannosi alla salute al punto da arrivare ad escluderli completamente dalle diete destinate a soggetti affetti da patologie cardiovascolari.

### **Lipidi marini come fonte di $\omega$ 3 e dei suoi effetti benefici per la salute**

La caratteristica principale che distingue i lipidi delle specie marine dai lipidi degli animali terrestri è la presenza di PUFA a catena lunga, tra cui:

acido eicosapentaenoico (EPA; C20: 5 n-3), acido docosaesaenoico (DHA; C22: 6 n-3), e in minor quantità , l'acido docosapentaenoico (DPA; C22: 5 n-3) (*Shahidi, 2000*).

I lipidi marini sono prodotti nel fegato di pesci magri come il merluzzo, nella massa corporea magra di pesci come lo sgombro e nel grasso di mammiferi marini come la foca. Diversi studi epidemiologici suggeriscono che il consumo di pesce è associato con una chiara riduzione del rischio di morte da cause cardiovascolari in diverse popolazioni del Mediterraneo, se confrontati con popolazioni che in genere non consumano pesce (*Daviglus et al., 1997; KROMHOUT et al., 1985*).

Studi epidemiologici e nutrizionali indicano che il consumo di PUFA  $\omega$ 3 a catena lunga causano cambiamenti dei fattori omeostatici associati a effetti benefici sulla salute (*Carrero et al., 2005*).

*Illingworth e Ullman (1990)* hanno proposto la teoria che il consumo di lipidi marini porta a riduzioni nei livelli di lipidi nel plasma a causa di una riduzione della sintesi degli acidi grassi e lipoproteine a bassa densità (LDL). *Kromhout (1989)* suggerisce che un elevato consumo di pesce non protegge contro le malattie cardiache in quelle popolazioni in cui il

consumo di grassi saturi è troppo alto. *Nestel (1990)* ha dimostrato che i PUFA  $\omega$ 3 a catena lunga hanno un effetto diretto sul muscolo cardiaco stesso, aumentano il flusso di sangue, diminuiscono le aritmie, migliorano la densità sanguigna, riducono le dimensioni dell'infarto. È stato anche suggerito che l'olio marino può ritardare l'arteriosclerosi grazie al suo effetto sulla funzione piastrinica, sulle interazioni piastrine-endoteliale e sulla risposta infiammatoria (*Shahidi, 2000*).

La maggior parte di questi effetti sono dipendenti, almeno in parte, da alterazioni nella formazione dei eicosanoidi nel corpo umano (*Fischer, 1989*). Gli eicosanoidi (prostaglandine, leucotreni e trombossano) sono sostanze simili agli ormoni, ma a differenza loro, sono prodotte nelle cellule in cui esse operano. (*Dacosta, 1998*). Queste sostanze sono importanti per il loro effetto vasodilatatore e vasocostrittore e di anti-aggregazione piastrinica (*Kinsella, 1987*). Inoltre, alcuni risultati in individui mostrano che una bassa concentrazione plasmatica di DHA diminuisce i livelli del neurotrasmettitore serotonina, e bassi livelli di serotonina sono associati con un comportamento suicida (*Hibbeln, 1998*). Durante lo sviluppo fetale e infantile, i PUFA  $\omega$ 3 hanno un ruolo chiave nello sviluppo del cervello, del sistema nervoso, della retina e della

crescita (*MDM AI et al., 1995; Uauy et al., 1996*). Il DHA è la componente lipidica maggiore nel cervello, è importante anche per la retina, i testicoli e lo sperma, sembra insostituibile per il corretto funzionamento di tessuti e per il loro sviluppo (*Neuringer, 1988; Relazione della British Nutrition Foundation, 1999*).

*Carlson et al. (1986)* hanno dimostrato che i neonati nati prematuri hanno quantità inferiori di DHA nei loro tessuti rispetto a bambini che hanno avuto una gestazione normale. Se si vuole che il neonato abbia un pieno e corretto sviluppo cerebrale e del tessuto nervoso è necessario apportare quantità maggiori di DHA (*Connor, 1991; Crawford, 1993 e Hornstr, 1995*).

Il comitato incaricato dello studio degli acidi grassi insaturi della società britannica di nutrizione (*British Nutrition Foundation, 1992*) ha raccomandato che il 5% dell'energia della dieta provenga da acidi grassi  $\omega$  3. Studi scientifici testimoniano come il rapporto 5:1,  $\omega$  6:  $\omega$  3 è quello migliore per la salute umana (*British Nutrition Foundation 1992b; Nordic Council of Ministres, 1989; Vaughn et al., 1994*). Inizialmente questo rapporto era di circa 1:1, ma è cresciuto fino ad arrivare a 10:1 e oggi potrebbe essere ancora superiore (*Leaf, 1987*).

### **Acidi grassi della serie $\omega$ -3**

Gli acidi grassi della serie  $\omega$ 3 sono normalmente presenti in alimenti marini, alcune piante ed anche in alcuni prodotti animali quali pollo, tacchino ed uova.

Tra di essi in natura troviamo più frequentemente l'acido alfa-linolenico, che è un acido grasso essenziale, in quanto non può essere sintetizzato dall'organismo e pertanto va introdotto con l'alimentazione; è reperibile maggiormente nel mondo vegetale, dove viene elaborato a partire dal linoleico, attraverso una sintesi nelle membrane dei cloroplasti. Una volta giunto nell'organismo può essere metabolizzato ad acidi grassi a più lunga catena e della stessa serie, attraverso l'azione di due enzimi:

la desaturasi, la cui funzione è quella di inserire un doppio legame al posto di uno saturo in punti precisi della catena dell'acido grasso; l'elongasi, la cui funzione è di aggiungere atomi di carbonio ad un acido grasso al fine di allungare la catena.

Questi interventi metabolici cambiano sostanzialmente la struttura dell'acido grasso, attribuendogli inoltre specifiche caratteristiche funzionali e strutturali.

Da alcune di queste trasformazioni risultano l'acido Eicosaepentanoico

(EPA 20:5) e l'acido Docosaesanoico(DHA 22:6), i quali svolgono un ruolo importante nel corretto funzionamento di alcuni organi ed apparati, tra cui il cervello, la retina e le gonadi ed inoltre svolgono un'azione preventiva verso l'aterosclerosi e le malattie cardiovascolari. In natura essi sono presenti nel fitoplancton e sono particolarmente concentrati in alcune specie ittiche, soprattutto in quelle che vivono in acque fredde. Il DHA svolge all'interno dell'organismo una funzione prevalentemente strutturale ed è particolarmente rappresentato nei fosfolipidi dei sinaptosomi cerebrali, nella retina e nei fosfolipidi dei canali intramembranali del sodio.

Le funzioni del DHA e dell'EPA sono schematizzate nella tab.2

Funzione dell' Acido Docosaesanoico (DHA)	Funzioni dell' Acido Eicosapentanoico (EPA)
Sviluppo e maturazione cerebrale	Precursore diretto delle prostaglandine della serie 3
Sviluppo e maturazione dell'apparato riproduttivo	
Sviluppo e maturazione del tessuto retinico	

**Tab. 2 Funzioni del DHA ed EPA**

Oltre quelli suindicati, gli acidi grassi  $\omega$ 3 più comuni sono:

- Acido Stearidonico (18:3)

- Acido Eicoisapentenoico (18:4)

- Acido Docosaesanoico (22:5)

L'assunzione degli acidi grassi della serie  $\omega$ 3 incrementa:

- la produzione dell'EDRF (Endothelial Derived Relaxing Factor)
- l'attività fibrinolitica
- l'aumento delle HDL
- la formazione di prostaglandine PGI<sub>3</sub>
- la produzione di leucotrieni B<sub>5</sub>
- la produzione di interleukina 2

Queste attività contrastano:

1. la produzione di acido arachidonico;
2. l'aggregazione piastrinica;
3. la produzione del PAF (Platelet Activating Factor);
4. la produzione del PDGF (Platelet Derived Growth Factor);
5. la formazione di trombociti;
6. la funzione dei macrofagi;
7. l'incremento delle LDL e delle VLDL;
8. l'incremento dei trigliceridi;
9. l'incremento del fibrinogeno;

10.1'incremento della viscosità ematica.

L'attività funzionale degli  $\omega 3$  sul sistema cardiovascolare viene schematizzata nella tab.3.

RIDUCE	AUMENTA
l'aggregazione piastrinica;	la sopravvivenza piastrinica
la pressione arteriosa;	il tempo di sanguinamento
la risposta ai vaso costrittori	la compliance vascolare arteriosa
l'aritmia cardiaca	la funzione dei beta-recettori cardiaci
la viscosità ematica	il flusso coronarico post ischemico

**Tab. 3 Attività funzionale degli omega-3 sul sistema cardiovascolare.**

## Acidi grassi della serie $\omega$ -6

Tra gli acidi grassi  $\omega$ 6 i più significativi sono:

- Acido linoleico (in oli di semi)
- Acido gamma linolenico (primo intermedio nella conversione dell'acido linoleico in acido arachidonico)
- Acido diomogammalinolenico
- Acido arachidonico (tipico del mondo animale)

L'acido diomogammalinolenico è il precursore delle prostaglandine della serie 1, le cui funzioni sono :

- vasodilatazione e riduzione della pressione arteriosa;
- inibizione della trombosi;
- incremento dei livelli di AMP ciclico;
- attivazione dei gamma linfociti;
- prevenzione del danno epatico da etanolo;
- inibizione di proliferazioni anomale.

L'acido arachidonico svolge un ruolo prevalentemente strutturale ed è presente nei fosfolipidi di membrana; assume un ruolo importante, se

opportunamente bilanciato con l'acido docosaesanoico (DHA), nello sviluppo embrionale e nell'accrescimento del bambino. Dal punto di vista funzionale, esso produce prostaglandine della serie 2, le quali formano intermedi ad attività pro-infiammatoria e parzialmente antiaggregante piastrinica.

Dal punto di vista dietetico è notoriamente di maggiore importanza, in luogo delle singole famiglie di acidi grassi, il rapporto  $\omega 3/\omega 6$ , il quale assume un ruolo fondamentale nella protezione del cuore dalla lipoperossidazione, ed il cui valore non dovrebbe essere inferiore all'unità. Considerando che gli acidi grassi della serie  $\omega 3$  sono presenti prevalentemente nel mondo vegetale, possiamo capire come spesso questo rapporto assuma valori svantaggiosi sia nelle specie ittiche, dove si differenziano specie erbivore e carnivore, che per gli animali terrestri in cui prevalgono gli acidi grassi della serie  $\omega 6$ ,

## **Cla benefici per la salute umana**

Il termine CLA (conjugated linoleic acid) si riferisce ad un gruppo di isomeri posizionali e geometrici dell'acido octadecadienoico o linoleico (C18:2 cis-9, cis-12), caratterizzati dalla presenza di due doppi legami coniugati, diversi dai classici legami metilenici presenti nella struttura dell'acido linoleico. Tali legami coniugati si possono trovare nelle posizioni che vanno da 7,9 a 12,14 e per ogni isomero posizionale sono possibili 4 paia di isomeri geometrici (cis,cis; trans,cis; cis,trans; trans,trans).

Di conseguenza il termine CLA include un totale di 24 isomeri posizionali e geometrici dell'acido linoleico (*Cruz-Hernandes et al., 2004*).

Tali acidi grassi furono individuati per la prima volta da Pariza (1985) in uno studio sulle componenti pro-cancerogene della carne bovina sottoposta a cottura con griglia. Sorprendentemente, a differenza di altri acidi grassi trans noti per essere nocivi per la salute umana, questi acidi grassi dienoici trans, derivati dall'acido linoleico (18:2 n-6), mostravano proprietà anti-cancerogene anziché pro-cancerogene. A tale scoperta, è

seguito un largo numero di ricerche sugli effetti dei CLA sulla salute umana, che prevedevano l'impiego di singoli isomeri ad alto grado di purezza o di miscele di isomeri in diverse proporzioni, sia con prove in vivo (su animali da laboratorio) che in vitro (su colture di cellule umane o animali). Tali studi hanno evidenziato che i CLA influenzano diversi aspetti della salute umana, la carcinogenesi, i disturbi cardiovascolari, l'insulino-resistenza e il diabete, la funzione immunitaria. Possono inoltre modulare l'espressione di importanti geni, o direttamente attivando specifici elementi di risposta per gli acidi grassi o indirettamente attraverso la regolazione dell'espressione genica di specifici fattori di trascrizione coinvolti in molti processi metabolici.

La maggioranza degli studi atti a valutare gli effetti dei CLA sulla salute umana è stata condotta utilizzando prodotti sintetizzati chimicamente, contenenti una miscela di cis e trans isomeri, in diverse proporzioni. Studi più recenti sono invece stati effettuati usando singolarmente il cis-9, trans-11 e il trans-10, cis-12 in forme altamente purificate. I risultati ottenuti in seguito all'utilizzo di miscele sono in contrasto con quelli osservati nel caso dei singoli isomeri e ciò suggerirebbe che i due isomeri abbiano effetti diversi sulla fisiologia dell'organismo e sui meccanismi

cellulari che ne sono alla base. L'isomero trans-10, cis-12 sembra inoltre avere effetti negativi sulla salute, soprattutto a causa dell'aumento dei processi ossidativi a carico dei lipidi e della conseguente formazione di isoprostani (Whale *et al.*, 2004; Tricon *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2006). Tali osservazioni necessitano di ulteriori chiarimenti; in ogni caso è interessante chiedersi perchè nessun effetto negativo venga osservato quando l'isomero meno presente in natura, il trans-10, cis-12, viene somministrato in associazione al più comune isomero, il cis-9, trans-11. Le principali fonti di CLA sono gli alimenti derivati dai ruminanti o di animali con processi fermentativo-digestivi simili a quelli dei ruminanti, come i canguri e i wallaby, come la carne dei ruminanti e i loro prodotti lattiero-caseari. Il latte è il prodotto dei ruminanti più ricco in CLA, il cui contenuto può variare da 5.4 a 7.0 mg/g lipidi in base alla specie animale considerata. I CLA sono totalmente assenti negli oli vegetali. Piccole quantità di CLA (0.1-0.7 mg/g di olio) possono, però, essere prodotte durante il riscaldamento, la decolorazione e la deodorizzazione nei processi di raffinazione degli oli alimentari (Saebo, 2003).

In Italia l'ingestione media di CLA è stata stimata intorno ai 300 mg/giorno, negli Stati Uniti è di 52 e 137 mg/giorno per uomini e donne

rispettivamente, in Gran Bretagna e di circa 400-600 mg/giorno e per uomini e donne tedesche e rispettivamente di 430 e 350 mg/giorno. In genere nelle donne l'ingestione di CLA è minore e ciò è probabilmente dovuto a un più basso consumo di grassi di origine animale (*Parodi, 1997; McGuire et al., 1999; Parodi, 2003*).

Il raggiungimento di un apporto giornaliero di CLA di 3-6 g, cioè il livello al quale sono previsti effetti benefici sulla salute, non è assicurato dall'ingestione degli alimenti naturali non arricchiti. Tale obiettivo sarebbe invece raggiungibile attraverso l'aumento della concentrazione di CLA nel latte e quindi nei prodotti lattiero-caseari, grazie alla manipolazione delle diete destinate agli animali, attraverso l'ingestione di capsule di oli arricchiti con CLA, o semplicemente attraverso l'ingestione di alimenti additivati (cibi funzionali). L'industria alimentare è particolarmente interessata allo sviluppo di tali cibi funzionali arricchiti con diversi acidi grassi bioattivi come i PUFA  $\omega$  3 e  $\omega$  6 e i CLA.

## Determinazione dei Lipidi

### Estrazione

L'analisi del contenuto di acidi grassi negli alimenti è fondamentale per la dieta e la salute umana. Nel documento *AOAC, 1995: IDF 350/2000* sono disponibili metodi per determinare il contenuto di lipidi.

Per l'analisi quantitativa dei lipidi *Folch (1957)* ha dimostrato che il modo più efficace per l'estrazione dai tessuti animali è aggiungere cloroformio:metanolo come solventi. La modifica di questo metodo è stata proposta da *Bligh e Dyer* che utilizzano una miscela di cloroformio, metanolo e acqua (1:2:0.8 v/v/v). I resti insolubili nella soluzione di omogeneizzazione si eliminano attraverso la centrifugazione e si aggiunge un volume di cloroformio e uno di acqua al surnatante per ottenere la separazione delle due fasi. I contaminanti vengono estratti nella fase acquosa, lasciando i lipidi concentrati nella parte inferiore fase organica (*Hemming e Hawthorne, 2001*). *Christie et al. (1984)* fanno riferimento a metodi per l'estrazione dei lipidi totali da diversi tessuti

con cloroformio:metanolo. *Chouinard et al. (1999); Hara e Radin (1978)* e *Peterson et al. (2002)* utilizzano soluzioni di esano:isopropanolo.

## **Metilazione**

Una volta estratti la loro determinazione si effettua attraverso una derivatizzazione, seguita dalla separazione mediante gascromatografia. La derivatizzazione degli acidi grassi esterificati a glicerolo è un primo passo per l'analisi mediante gascromatografia (GC) (*Frédéric e Paul; 2002 ISO-IDF, 2002*). La metilazione degli acidi grassi è la tecnica di derivatizzazione utilizzata più spesso. Gli esteri metilici degli acidi grassi (MEAG) sono i derivati maggiormente utilizzati per l'analisi dei lipidi (*Frédéric e Paul, 2002*).

La metilazione può avvenire in condizione acida o basica. La metilazione catalizzata in ambiente acido è la più frequente per la preparazione dei metilesteri di acidi grassi liberi o esterificati in gliceridi e fosfolipidi. Generalmente si adopera metanolo con aggiunta di trifluoruro di boro ( $\text{BF}_3/\text{metanol}$ ) (*Metcalfe e Schmitz, 1961; Morrison e Smith, 1964*), acido

cloridrico (HCl/metanolo), o acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/metanolo) come catalizzatore a temperature tra 80° e 100 °C per 30, 60 min (*Frédéric e Paul, 2002; Kramer et al, 1997; Yurawecz et al, 1999*). Tuttavia l'uso frequente di acidi forti come reattivi quali il trifluoruro di boro, l'acido cloridrico o l'acido solforico e le condizioni di temperature da moderate ad alte può dare come risultato la presenza di alcuni picchi dovuti ai prodotti di degradazione nel cromatogramma e questo può compromettere la precisione dell'analisi cromatografica (*Christie, 1994*). La metilazione alcalina di acidi grassi è simile all'acida ma precede l'utilizzo di una soluzione potassio:metanolo come reattivo per la sintesi di esteri metilici degli acidi grassi (MEAG) derivati dai gliceridi (*Christie, 1990b; Christopherson e Glass, 1969*). Questa reazione di transesterificazione è effettuata a temperatura moderatamente elevata per 5 - 15 minuti per garantire la completa derivatizzazione. A differenza del metodo acido in letteratura sono riportati svantaggi pratici che derivano dalle condizioni più miti utilizzate nella metilazione basica (*Ulberth, et al., 1995; Kramer, et al., 1997*).

Yamasaki et al. (1999) ha affermato che la metilazione acida si deve utilizzare quando ci sono sono notevoli quantità di acidi grassi liberi nel

prodotto da analizzare e *Jensen (2002)* indica che gli esteri metilici devono essere manipolati con molta attenzione visto la loro altissima volatilità.

### **Quantificazione degli acidi grassi mediante gascromatografia**

Il metodo di elezione per l'analisi dipende dalla natura del campione e dal livello di caratterizzazione degli acidi grassi necessario. Le caratteristiche importanti dei lipidi quando si effettua una separazione cromatografica sono loro polarità, il grado di ionizzazione e in determinate situazioni, la loro capacità di unirsi con elevata affinità ad un altro composto (*Hemming e Hawthorne, 2001*).

Nei tessuti vivi acidi grassi liberi si trovano in piccole quantità e possono essere separati da altri tipi di grassi presenti in soluzioni cloroformio-metanolo per essere analizzati attraverso cromatografia di assorbimento in colonna di silice (gel di silice). L'eluizione si verifica con solventi con maggiore polarità.

Gli esteri metilici degli acidi grassi sono facilmente separabili attraverso gascromatografia utilizzando una fase stazionaria di polietilenglicolo che

è polare. In questo tipo di colonna gli esteri di catena più corta eluiranno prima e per una determinata lunghezza della catena, il tempo di ritenzione aumenta con il numero di doppi legami.

Con le fasi stazionarie non-polari con la stessa lunghezza, eluiscono prima gli esteri metilici con più insaturi. La separazione di acidi grassi può essere migliorata attraverso specifici programmi di temperatura (*Hemming e Hawthorne, 2001*).

## PARTE SPERIMENTALE

Allo scopo di apportare un nostro contributo sulla valorizzazione di alcuni prodotti alimentari attraverso la caratterizzazione della composizione acidica e sul contenuto in CLA sono state effettuate tre prove sperimentali.

La prima indagine ha previsto la determinazione del profilo acidico in filetti di spigola (*Dicentrarchus Labrax*) e orata (*Sparus Aurata*) provenienti da un allevamento off-shore e confezionati con differenti sistemi di packaging.

Con la seconda indagine invece è stata valutata la variazione della componente acidica durante il processo di stagionatura di un formaggio tipico dell'entroterra avellinese ottenuto da latte di pecora: il "Carmasciano".

Infine ulteriore obiettivo di questo lavoro è stato quello di mettere a punto un rapido, semplice e conveniente micrometodo per la determinazione della composizione di acidi grassi nel latte e nel formaggio allo scopo di evitare l'utilizzo di grandi quantità di solventi organici pericolosi, e una serie di passaggi lunghi, laboriosi e costosi

tipici dei metodi attualmente in uso. Tale metodo dopo la messa a punto è stato applicato per la determinazione degli acidi grassi in campioni di latte vaccino prodotto in Galizia (NW Spagna) e in campioni di formaggio “Tetilla” prodotto a partire da latte di vacca e tipico del nord della Spagna.

## **1° INDAGINE SPERIMENTALE**

### **PROFILO ACIDICO DI FILETTI DI SPIGOLA (*Dicentrarchus Labrax*) E ORATA (*Sparus Aurata*) CONFEZIONATI CON DIVERSE TECNOLOGIE.**

#### **INTRODUZIONE**

In una dieta equilibrata i pesci svolgono un ruolo di primaria importanza, soprattutto per il notevole apporto di proteine di elevato valore biologico, per la loro facile digeribilità e per la peculiare composizione lipidica. Le loro caratteristiche organolettiche vengono influenzate da diversi fattori. Si è visto, per esempio, che il colore e l'aroma sono influenzati dalla presenza di determinati microrganismi, da aromi indesiderati presenti nelle diete o da alghe dell'ambiente acquatico. Anche il sistema di allevamento influisce sulle caratteristiche organolettiche.

La loro composizione chimica (Tab. 4) è soggetta a variazioni correlate alle diverse condizioni alimentari ed ambientali (temperatura dell'acqua, salinità) (Tab. 5).

Composizione chimica centesimale	Valori minimi e massimi
Acqua	65%-80%
Proteine	15%-27%
Lipidi	0,50%-30%
Glucidi	0,5%

**Tab. 4** Composizione chimica centesimale dei pesci.

	Estensivo	Intensivo
Umidità	73.21±1.54	69.07±1.98
Proteine(Nx6.25)	20.70±0.52	19.68±0.83
N non proteico	0.35±0.18	1.34±0.23
Lipidi totali	3.78±1.03	8.42±2.45
Colesterolo(mg)	63.50±1.07	67.71±1.69
Ceneri	1.37±0.02	1.28±0.10

**Tab.5** Composizione chimica di filetti di orata proveniente da allevamento intensivo ed estensivo (g/100t. q.) (1)

Tra i costituenti chimici particolare importanza viene attribuita ai lipidi. I pesci vengono classificati in base alla loro composizione lipidica in: pesci grassi, con contenuto lipidico superiore all'8%; pesci semigrassi, con contenuto lipidico compreso tra il 3% e l' 8%; pesci

magri, con contenuto lipidico inferiore al 3%.

La componente lipidica è prevalentemente costituita da acidi grassi poliinsaturi. Anche se tali acidi grassi poliinsaturi rappresentano un fattore limitante la conservazione del pesce, poiché lo predispongono ad una più rapida ossidazione, assumono rilevante importanza dal punto di vista nutrizionale in quanto rappresentano elementi utili sotto il profilo dietetico.

Il contenuto in acidi grassi viene influenzato da fattori quali l'attività riproduttiva, la maturità sessuale, l'età, ed il periodo in cui avviene la pesca. Per esempio si è rilevata una maggiore quantità di grassi ed acidi grassi poliinsaturi nel periodo estivo (luglio) ed un tasso minore nel mese di ottobre e gennaio. Infatti temperature più basse agiscono determinando sia una maggiore presenza di fitoplancton, fonte di acidi grassi poliinsaturi essenziali, che influenzando le attività degli enzimi desaturasi e sintetasi.

Fra gli acidi grassi poliinsaturi sono rilevanti gli acidi grassi della serie  $\omega$ 3, di cui i pesci sono l'unica fonte alimentare significativa.

Dal punto di vista nutrizionale, spigole ed orate di acquacoltura apportano proteine nella stessa quantità e della stessa qualità del pesce di cattura (19-20 g per 100 grammi di parte edibile).

Per le spigole allevate si riscontra un tenore lipidico generalmente più elevato, mentre per le orate la differenza con il selvatico non è sempre significativa. La qualità dei grassi è comunque elevata. Il contenuto in polinsaturi (30-32% del totale degli acidi grassi) ed in particolare degli  $\omega$ 3 totali oscilla, nelle orate e spigole di acquacoltura italiana, tra il 23 e il 25% del totale degli acidi grassi.

### **Composizione in acidi grassi di prodotti della pesca**

La quantità di acidi grassi nei prodotti della pesca dipende principalmente dal contenuto lipidico totale e può essere influenzata da numerosi fattori biologici quali: alimentazione, mobilità, habitat, stagionalità, fase riproduttiva, sesso (*Kolakowska at al. 1988; Kolakowska at al. 1994*).

Gli acidi grassi saturi sono rappresentati essenzialmente dall'acido

palmitico (C16:0) ed in minor misura dall'acido miristico (C14:0) le cui quantità sommate costituiscono circa il 90% degli SFA (Saturated fatty acid).

L'acido stearico C18:0 é ben rappresentato soltanto in pesci che vivono in acque calde mentre é presente in piccole quantità nelle altre specie. Gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) sono dominati dall'acido oleico C18:1 seguito dall'acido palmitoleico (C16:1). Alcune specie contengono notevoli quantità di acido gadoleico (20:1 n9) e cetoleico (22:1n11), si tratta di pesci che si alimentano soprattutto di copepodi.

Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) costituiscono il gruppo piú importante dei lipidi. Nei pesci di solito sono acidi grassi a lunga catena con configurazione  $\omega$ 3. Quantitativamente i piú rappresentati sono l'acido eicosapentanoico 20:5 (n3) (EPA) e l'acido docosaesadienoico 22:6 (n3) (DHA). Generalmente il DHA é piú abbondante dell'EPA (da 2 a 3 volte) fanno, però, eccezione molluschi e crostacei dove la situazione é inversa.

Piccole quantità (1-3%) di acido docosapentanoico 22:5(n3) (DPA) possono trovarsi in filetti di diverse specie quali ad esempio orate e spigole .

Gli acidi 18:3 (n3), 18:4(n3), e 20:4(n3) sono piú rappresentati nei pesci d'acqua dolce, piccole tracce possono essere recuperate anche nelle altre specie soprattutto se d'allevamento.

I polinsaturi  $\omega 6$  sono normalmente meno abbondanti, fa eccezione l'acido arachidonico. Quest'ultimo si ritrova prevalentemente nei pesci d'acqua di mare, che si alimentano con alghe marine, e puó raggiungere valori fino al 14%.

### **Lo spoilage nel pesce**

I prodotti della pesca sono considerati alimenti altamente deperibili, il ph neutro, il valore alto di  $a_w$ , e la presenza di enzimi autolitici li rendono particolarmente suscettibili a rapidi processi di spoilage (*Sivertsvik M et al. 2002*).

Lo spoilage del pesce deriva da due ordini di fattori:

- ✚ chimici (reazione enzimatiche e ossidazione lipidica)

- ✚ microbiologici

In condizioni normali i microrganismi si localizzano esclusivamente a

livello intestinale, sulla pelle e sulla branchie dove si nutrono di sostanze presenti sulla superficie del pesce. La contaminazione delle masse muscolari, di norma sterili, avviene o in seguito a lacerazioni cutanee nelle operazioni di pesca e manipolazione o in seguito alla distruzione della parete intestinale da parte degli enzimi digestivi.

La popolazione microbica é costituita essenzialmente da micorganismi che vivono nell'ambiente acquatico (*Liston 1980; Colby et al. 1993; Ashie et al 1996; Gram & Huss, 1996*) ossia batteri psicotrofi Gram-, aerobi o anaerobi facoltativi, quali ad esempio *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Photobacterium* e *Aeromonas*.

Nel pesce fresco lo spoilage si attua attraverso diverse fasi (*Liston, 1980*):

1. alterazioni legate ai batteri normalmente presenti sul pesce
2. formazione di aminoacidi e composti azotati
3. crescita selettiva di microrganismi (principalmente *Pseudomonas*)  
che induce deaminazione di aminoacidi
4. repressione nella produzione di proteinasi indotta dall'azione di  
*Pseudomonas*

5. reperimento di aminoacidi quale substrato per idrolisi batterica delle proteine
6. produzione di composti azotati ed AGV
7. produzione di composti solforici ( $H_2S$ ,  $CH_3SH$ ) da parte di batteri specifici.

Quando il livello di  $O_2$  è esaurito i microrganismi utilizzano la TMAO come accettore terminale di ioni  $H^+$  che permette la crescita in condizioni di anaerobiosi e si forma la TMA (*Ashie et al 1996*).

### **Il confezionamento in atmosfera protettiva**

Il confezionamento in “atmosfera protettiva” rappresenta indubbiamente una delle tecniche più interessanti nel settore dei prodotti della pesca. Come le altre tecniche, esprime al massimo la sua efficacia se agisce su un substrato in ottime condizioni microbiologiche ed organolettiche.

## I gas nel confezionamento in atmosfera protettiva

Quando un alimento crudo fresco, come le carni o il pesce, vengono posti in un involucro di plastica sufficientemente impermeabile al vapore acqueo ed agli scambi gassosi con l'esterno e poi si provvede a sostituire l'aria residua al suo interno con un'opportuna miscela di gas quali anidride carbonica, ossigeno o azoto, nell'alimento si innescano vari processi:

La flora batterica più tipicamente putrefattiva, formata per lo più da specie Gram negative aerobie (*Pseudomonas* spp, *Alteromonas* spp, *Vibrio* spp, *Shewanella* spp) o aerobie-anaerobie facoltative (enterobatteriacee) viene frenata nel suo sviluppo per la mancanza di O<sub>2</sub> o per la presenza di elevate concentrazioni di anidride carbonica.

La condizione di anaerobiosi seleziona una microflora tendenzialmente anaerobia in cui spiccano soprattutto i batteri lattici (lattobacilli, micrococchi, pediococchi, lattococchi e Stafilococchi)(Stenstrom, 1985). Questi ultimi, per il loro metabolismo intrinseco, sono in grado di frenare ulteriormente lo sviluppo delle specie microbiche più tipicamente putrefattive grazie ad una serie di reazioni metaboliche D'altro canto, si

creano condizioni ambientali favorevoli anche allo sviluppo di patogeni quali *Clostridium* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. I possibili rischi di proliferazione di queste specie batteriche devono essere valutati alla luce degli altri fattori conosciuti (ad es., valore di pH e di  $a_w$  del substrato, temperatura di conservazione dell'alimento, ecc.). Modificando la composizione dell'atmosfera a ridosso delle carni, si favoriscono o frenano varie reazioni chimiche che possono incidere sulle caratteristiche organolettiche del prodotto (fenomeni di lipossidazione dei grassi).

## I gas

I gas che al momento vengono maggiormente impiegati per condizionare gli alimenti in atmosfera protettiva sono essenzialmente tre:

② **Ossigeno**

② **Anidride carbonica**

② **Azoto**

## Ossigeno

L'ossigeno, che è un gas incolore ed inodore. Ha bassa solubilità in acqua (0.040 g/kg a 100 kPa e a 20° C). Viene utilizzato quasi esclusivamente per il confezionamento della carne fresca e di alcuni pesci quali tonno e pesce spada, per fare in modo che vi sia un mantenimento prolungato del colore originario tramite ossigenazione della mioglobina in ossimioglobina. In tali casi si opera in percentuali superiori al 20%.

Eventualmente, l'aggiunta di una quantità ridotta di ossigeno può essere effettuata per impedire la proliferazione dei batteri anaerobi. Chiaramente l'ossigeno è responsabile di reazioni di ossidazione lipidica per cui si deve prestare attenzione nei casi in cui si operi con pesci (sgombri, salmoni, tonni) grassi. Specificamente, gli acidi grassi polinsaturi sono molto instabili per via dei doppi legami e a seguito di ossidazione originano radicali liberi che come è noto, attivano reazioni a catena le quali terminano con la produzione di aldeidi e chetoni che conferiscono sapore sgradevole.

## Anidride carbonica

L' anidride carbonica è un gas incolore dall'odore pungente ad elevate concentrazioni. È l'unico dei tre gas che esplica una vera e propria azione antimicrobica, di tipo batteriostatico e/o battericida, a seconda della sua concentrazione e della flora microbica su cui è chiamata ad agire. È dimostrato che tale effetto antimicrobico:

- raggiunge il massimo quando la CO<sub>2</sub> supera concentrazioni del 40%, poi resta praticamente invariato

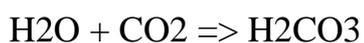
- è inversamente proporzionale alla temperatura di conservazione del prodotto (più è bassa, migliore sono la penetrazione del gas nell'alimento e, quindi, l'effetto battericida che si ottiene).

I microrganismi non sono tutti ugualmente sensibili all'effetto batteriostatico della CO<sub>2</sub>. Gran parte delle muffe, molti lieviti e i batteri aerobi stretti sono molto sensibili e vengono rapidamente inattivati. I batteri aerobi-anaerobi facoltativi (come ad es. le enterobatteriacee) si comportano in modo variabile a seconda della specie (alcune sono più sensibili di altre). Alcuni lieviti ed i batteri anaerobi più o meno stretti

(lattobacilli, micrococchi, lattococchi, streptococchi, stafilococchi, *Clostridium* spp.) non vengono inibiti dall'anidride carbonica, anzi la condizione di anaerobiosi che si crea nella confezione ne favorisce lo sviluppo (se la temperatura ambiente lo permette).

Dal punto di vista chimico-enzimatico l'anidride carbonica ha azione acida che può denaturare gli enzimi che possono dare alterazioni organolettiche. La sua solubilità (e quindi la capacità di dare effetto acido) è influenzata dalla temperatura: infatti in condizioni di refrigerazione si hanno effetti migliori (*Gill & Tan 1980; Ogrydziak & Brown, 1982*). Tali effetti, inoltre, si mantengono nel tempo anche dopo l'apertura della confezione: la solubilità in acqua a 0 °C ed 1 atm è di 3,38 g CO<sub>2</sub>/ Kg H<sub>2</sub>O, mentre a 20°C si riduce a 1,73 g CO<sub>2</sub>/ Kg H<sub>2</sub>O (*Knoche, 1980*). L'anidride carbonica è solubile anche in lipidi ed altri solventi organici.

Com'è noto l'anidride carbonica porta all'acidificazione del prodotto in seguito a tali reazioni:



Sono diversi i meccanismi attraverso i quali la CO<sub>2</sub> inibisce la moltiplicazione batterica (*Parkin & Brown 1982; Daniels et al., 1985; Dixon & Kell 1989; Farber, 1991*):

- Alterazione delle funzioni di membrana (assorbimento nutrienti)
- Inibizione o riduzione attività enzimatica
- Cambiamento pH intracellulare
- Variazione fisico-chimica delle proteine

### **Azoto**

È un gas quasi del tutto inerte che non interagisce con la sostanza organica con cui viene in contatto. Inodore ed insapore, non altera le caratteristiche sensoriali degli alimenti. Viene utilizzato essenzialmente a fini commerciali per mantenere alla confezione un gradevole aspetto rigonfio, evitando quel collabimento della busta che si verifica sempre quando si utilizzano elevate percentuali di anidride carbonica (che in buona parte si dissolve nel substrato, facendo diminuire la pressione all'interno della busta). E' meno denso dell'aria, non infiammabile ed è poco solubile in acqua (0.018 g/Kg a 100 pKa e 20° C). L'azoto é

scarsamente in grado di permeare i film e le pellicole, dunque un'atmosfera ad elevato contenuto di azoto sarà piú stabile nel tempo. Un'importante caratteristica di tale gas è quella di esercitare un' azione inibitrice sugli enzimi proteolitici. Pare sia in grado anche di avere effetti positivi su alcune lipasi e decarbossilasi.

Gas	Solubilità	Peso molecolare (g/mol)	Densità (kg/m <sup>3</sup> )	Calore specifico (J/mol K) a 25 °C	Colore ogiva bombola	N° CEE
CO <sub>2</sub>	0,870	44,01	1,81	37,75	Grigio chiaro	E290
Ar	0,034	39,55	1,64	20,83	Amaranto	E938
He	0,009	4,00	0,16	20,79	Marrone	E939
N <sub>2</sub>	0,016	28,01	1,15	29,14	Nero	E941
N <sub>2</sub> O	0,665	44,01	1,82	38,64	Blu	E942
O <sub>2</sub>	0,031	32,00	1,31	29,43	Bianco	E948

**Tab. 6** Principali caratteristiche tecniche dei piú frequenti gas utilizzati nella conservazione degli alimenti.

## **I materiali di confezionamento più adatti**

I materiali comunemente utilizzati in questo tipo di tecnologie sono pellicole e vaschette multistrati plastiche o metallizzate in quanto, essendo flessibili, si adattano efficientemente al prodotto da confezionare. Le vaschette, in particolare, dovranno essere ricoperte da un film plastico flessibile.

Come già menzionato, il materiale usato per le MAP deve essere ad *alta barriera*, con una permeabilità all'ossigeno e al vapore d'acqua non superiore a  $5 \text{ cm}_3/\text{m}_2 \text{ 24h atm}$  anche in intervalli di temperatura e di tempo elevati. Dunque è importante sia la porosità dei materiali stessi che le condizioni ambientali di temperatura, umidità relativa e pressione atmosferica.

Inoltre il materiale da confezionamento deve avere resistenza alle sollecitazioni meccaniche (stress e punture), anche per quanto riguarda le chiusure che devono essere sempre ermetiche. Deve inoltre essere innocuo per il consumatore. Il rischio nel caso di pellicole trasparenti è rappresentato dal fatto che sono attraversate dalla luce rendendo possibili eventuali ossidazioni lipidiche.

La resistenza del materiale deve essere inoltre estesa alla temperatura, nel senso che la confezione non si deve accartocciare in caso di basse temperature, né deformarsi in caso di alte temperature o di microonde (per i prodotti *ready-to-use* da cuocere direttamente in forno a microonde non si usano mai materiali a basso punto di fusione quali PVC e suoi poliaccoppiati). Si possono accoppiare, per un maggior effetto complessivo, materiali con effetti barriera diversi: in questo caso sono importanti sia i materiali che formano la confezione sia il loro spessore.

Il materiale da confezionamento, nel caso che si tratti di una pellicola trasparente, deve anche essere poco soggetto all' appannamento facendo in modo che le goccioline si aggregino tra loro formando gocce più grandi che non impediscono la diminuzione della visibilità del prodotto. Tale caratteristica è detta *antifog*, ed è importante per prodotti come l' insalata confezionata.

La permeabilità di un materiale ai gas è genericamente causato da fessure e microrotture, pori e capillari microscopici, lacune intermolecolari ed intramolecolari. In particolare, gli ultimi due tipi di fattori di permeabilità sono scarsamente controllabili perché sono tipici della natura molecolare del materiale stesso. Comunque tali spazi possono essere più o meno

ampi a seconda della temperatura e quindi della rigidità dei legami.

Si considera che i gas permeano un materiale tramite assorbimento o dissoluzione, disciogliendosi nella matrice, diffusione attraverso lo spessore per gradiente di concentrazione, desorbimento ed evaporazione in maniera inversa a quanto accade nell' assorbimento.

La permeabilità è influenzata da fattori legati al materiale, alle condizioni ambientali e da altri fattori tecnologici (Figg. 3-4). Per quanto concerne il materiale, è importante la sua struttura atomica ed i suoi gruppi funzionali (l' acqua permea più facilmente materiali dotati di sostituenti idrofili), la densità e quindi lo spazio tra le molecole, la cristallinità (un cristallo perfetto non lascia passare nessun tipo di gas), il peso molecolare, la temperatura di transizione vetrosa ed i cross- legami che rendono la permeabilità più difficile. E' poi importante l' umidità relativa dell' ambiente per i materiali ricchi di gruppi polari, la pressione gassosa totale, la differenza di pressione parziale interne ed esterna (quindi il gradiente del gas), nonché il tipo di gas. Ad esempio materiali come nylon ed etilene- alcol vinilico, che sono ad alta barriera, vengono grandemente influenzati dall' umidità relativa dell' ambiente in quanto sono ricchi di sostituenti idrofili.

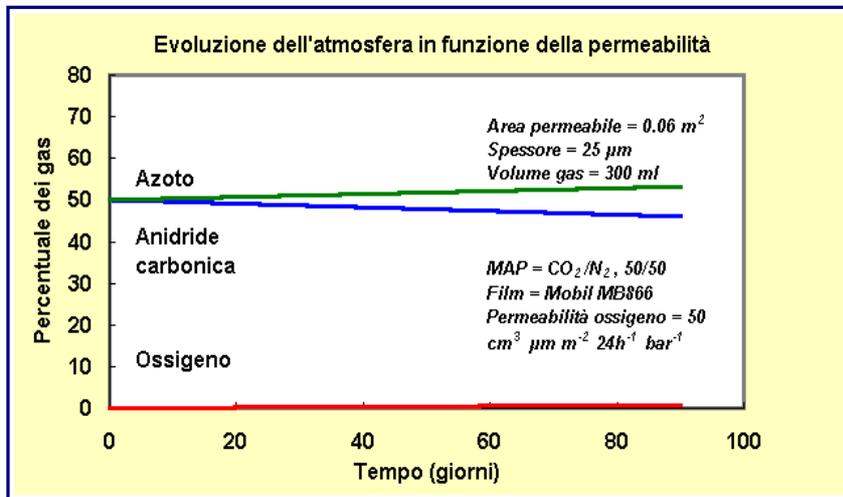


Fig. 3

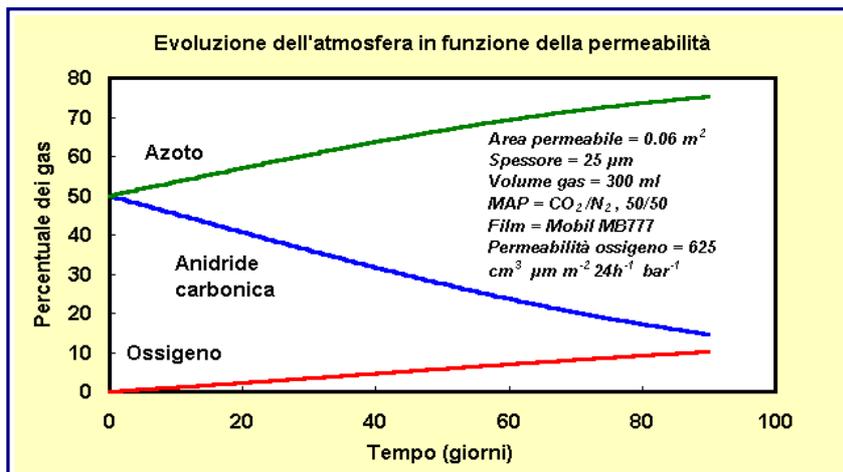


Fig. 4

Si può immaginare come vari la composizione gassosa in una confezione a seconda della maggiore permeabilità dei materiali che la costituiscono: nelle due figure vengono rappresentati i cambiamenti di atmosfera in

funzione delle diverse permeabilità, a parità di spessore, superficie, volume del gas e sua composizione. Chiaramente nel caso del materiale più permeabile, nello stesso intervallo di tempo l'atmosfera varia maggiormente.

Le materie plastiche più comunemente usate hanno una permeabilità ai gas ben definita attraverso esperimenti specifici. In particolare la permeabilità all'ossigeno in  $\text{cm}^3/\text{m}^2$  24h bar riferiti ad un campione di 25  $\mu\text{m}$  di spessore di materia plastica è piuttosto elevata per materiali quali polietilene ad alta (LDPE) e bassa densità (HDPE), polipropilene (PP), cloruro di polivinile (PVC) e polistirene (PS) ed ha un range di 3500-8000. E' molto più bassa invece per un copolimero di etilene vinil alcol (EVOH) con un valore di 1- 2, così come per poliammide aromatica (MXD6), mentre invece il poliacrilonitrile (PAN) ha un valore di 7- 12. I materiali più utilizzati, tenendo conto delle varie caratteristiche relazionate ai costi, sono PE, PP, PS, PVC, PETP e PETP metallizzato, PVDC, PA, EVA, e EVOH. In particolare quest'ultimo è realizzato combinando le prestazioni dell'alcol polivinilico che offre un'elevata barriera ai gas ma poco all'acqua, e del polietilene che invece garantisce un'ottima barriera all'acqua (chiaramente è possibile modulare le

percentuali delle due componenti).

I materiali plastici possono essere combinati tra loro tramite coestrusione oppure per accoppiamento con metallizzati, in maniera tale da poter produrre materiali con il potere di barriera desiderato. Il materiale che si trova a contatto con l' alimento spesso è il polietilene o suoi copolimeri per via del fatto che non dà cessioni ed è facilmente termosaldabile, ma lo stesso polietilene ed etilene vinil acetato essendo a basso potere di barriera non possono mai essere utilizzati da soli. Ad esempio, è frequente la coestrusione della seguente struttura: poliolefine/adesivo/EVOH/adesivo/poliolefine. Le poliolefine interne ed esterne garantiscono la barriera all' acqua mentre lo strato centrale di EVOH impediscono il passaggio di gas ed ossigeno.

Se consideriamo un campione dato da un film con spessore di 20 micron, con 1 m<sup>2</sup> di superficie, nell' arco di 24 ore, a 20 °C e con una differenza di pressione di 1 bar, si ottengono i seguenti valori di barriera:

- 47% di etilene, 20% di RH = 3 - 4 cc di ossigeno;
- 44% di etilene, 20% di RH = 1 cc di ossigeno;
- 38-32% di etilene, 20% di RH = 0,4 – 0,6 cc di ossigeno;
- 27% di etilene, 20% di RH = 0,2 cc di ossigeno.

## Sistemi di confezionamento innovativi degli alimenti



Fig. 5



Fig. 6

In questi ultimi anni il settore ittico si è saputo creare un'immagine di qualità e dinamismo: il consumatore richiede conservabilità prolungata, migliore igiene e garanzie di qualità, maggiore praticità e varietà e, buon ultimo, più informazioni sui prodotti. Le ricadute sul confezionamento sono importanti e gli esperti delle aziende leader segnalano l'efficacia dei processi sottovuoto o in atmosfera protettiva. Nel settore del packaging dei prodotti ittici e non solo si è molto lavorato per rispondere alle aspettative del consumatore, innanzitutto sviluppando materiali sempre più sottili, leggeri e resistenti, che permettono dunque di offrire tutte le necessarie garanzie di protezione e conservazione e al contempo di ridurre fortemente l'impatto sull'ambiente delle confezioni (Figg. 5-6).

Per il mondo dell'industria, il principale vantaggio è la conservabilità prolungata che assicura la qualità dei prodotti e una più agevole gestione degli ordinativi, in un segmento nel quale la capacità di rispondere tempestivamente alla domanda è d'importanza vitale.

Gli ulteriori sviluppi, affermano i marketer delle multinazionali, dipenderanno soprattutto dal posizionamento perseguito dalla grande distribuzione, dalle modalità di commercializzazione e valorizzazione dei marchi e dalla volontà di differenziazione rispetto ad altri settori del mercato alimentare. In aggiunta bisogna considerare che per la produzione di materie plastiche viene utilizzato solo il 4% del petrolio immesso sul mercato e il loro riciclo per incenerimento permette di generare energia; gli alimenti pre-confezionati riducono in misura molto rilevante gli sprechi rispetto a quelli sfusi.

### **“Steam cooking”**

Una particolare tipologia del confezionamento in MAP è rappresentata dallo “*Steam -cooking*”. In essa una vaschetta adatta al microonde (Fig.

7) è dotata di un cuscino di umidità (Fig. 8) per l'efficace cottura a vapore di piatti pronti. L'inserito rigido è inumidito dal preparatore degli alimenti durante il processo d'impacchettatura; in seguito, durante il riscaldamento, il suddetto inserto rilascia l'umidità necessaria alla formazione del vapore.

L'apertura nel film regola la pressione durante il processo di cottura. La pellicola è chiusa da un'etichetta autoadesiva, che deve essere rimossa dal consumatore prima dell'inserimento nel microonde.

Il nuovo sistema Steam-cooking è stato espressamente sviluppato per il confezionamento di piatti pronti. Può essere impiegato per il confezionamento di prodotti ittici, carni avicole e suine creando soluzioni a valore aggiunto e sfruttando il potenziale di crescita del settore piatti pronti. L'unico requisito per l'utilizzo sono i relativi utensili: il diffusore di umidità e il dispositivo per la scanalatura e l'etichettatura.

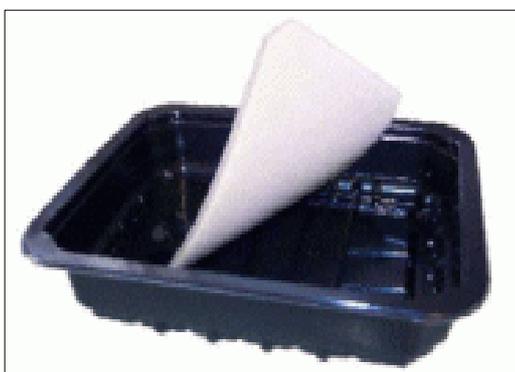


Fig. 7



Fig. 8

## **“Skin-darfresh”**

Per una vasta gamma di prodotti facilmente deperibili, il confezionamento sottovuoto si è rivelato ideale proprio perché garantisce la massima conservabilità e un'efficiente gestione delle scorte.

Alcuni anni fà, in Gran Bretagna la collaborazione tra un produttore di carni di manzo, uno chef rinomato ed una società del settore ha portato allo sviluppo di una nuova confezione sottovuoto il cosiddetto “*skin-darfresh*”.

Il materiale, scelto per garantire la massima conservabilità, è stato abbinato ad una busta esterna di laminato stampata, che veicola un'immagine di alta gamma. Sono stati adottati vassoi colorati per differenziare i tipi di carne, e un'esposizione verticale che ottimizza la presentazione del prodotto e lo sfruttamento dei lineari. La tecnica mostra diversi vantaggi:

- ✓ ermeticità,
- ✓ apertura facilitata,
- ✓ presentazione verticale
- ✓ differenziazione dei marchi.

Anche in Italia si è optato per tale sistema con l'obiettivo di offrire ai consumatori confezioni di vari formati, conferire ai prodotti una presentazione comunque tradizionale e rassicurante, prolungare la conservabilità nonché garantire la flessibilità e la massima automazione delle linee di produzione.

Un'ulteriore evoluzione del sistema skin darfresh è il *Darfresh Double Deck*, un materiale rivoluzionario che coniuga i ben noti vantaggi del confezionamento sottovuoto con un film lidding stampato, con o senza finestratura, che permette di fornire informazioni al consumatore, garantendo al contempo visibilità e protezione dei prodotti (Figg. 9-10). L'apertura facilitata permette di rimuovere entrambi i film con un solo gesto. Per quanto riguarda i consumatori, il sistema *Darfresh Double Deck* è pratico, moderno, fornisce esaurienti informazioni e si presta a un uso pratico e agevole: la confezione viene aperta con maggiore facilità dei vassoi con film estensibile e l'ampia superficie stampata permette di riunire utili informazioni sui prodotti.

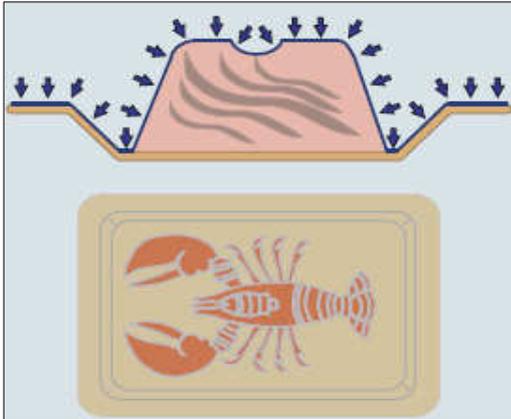


Fig. 9



Fig. 10

## Quality index method (QIM)

Negli ultimi dieci anni l'analisi sensoriale è stata essenziale per determinare la qualità della maggior parte dei prodotti ittici. (*Macagnano A., et al.*).

Le variazioni fisiche, chimiche, biochimiche e microbiologiche che intervengono nel pesce nella fase post-mortem, sono responsabili di una progressiva perdita in termini di qualità e gusto delle caratteristiche di freschezza del pesce. (*Martinsdóttir, 2002*).

Il deterioramento del pesce dipende fundamentalmente dal tempo e dalle temperature di stoccaggio che determinano la moltiplicazione microbica e l'innescio dei fenomeni autolitici, nonché da numerosi altri fattori. Questi cambiamenti sono apprezzabili in termini sensoriali e possono essere valutati attraverso la vista, il tatto, l'olfatto e il gusto.

Nel 1985 i ricercatori del Tasmanian Food Research Unit propongono un metodo descrittivo, veloce e semplice per determinare le qualità di freschezza: il Quality Index Method (QIM) (*Bremner, 1985*). Il QIM è un metodo sistematico e affidabile per valutare la freschezza e la qualità del pesce (*Hyldig and Nielsen, 2004*). Infatti è in grado di valutare quei parametri sensoriali che cambiano significativamente in ogni specie durante la loro degradazione (*Ólafsdóttir et al., 1997, Sveinsdóttir et al., 2003*). Ad ogni attributo è assegnato un punteggio di demerito ( $\leq 3$ ) il cui valore è direttamente proporzionale alla sua influenza nel processo di deterioramento della specie in esame.

Il valore minimo (0) rappresenta il miglior punteggio corrispondente ad un prodotto fresco.

La somma dei punti assegnati ad ogni parametro dà un punteggio totale, il quale rappresenta l'indice di qualità al momento dell'analisi.

Il QIM è costruito in modo che i parametri siano strettamente connessi fra di loro ma anche in modo che ad ognuno di essi non sia attribuito un peso eccessivo così da non sbilanciare il risultato finale.

In questo modo si stabilisce una relazione lineare fra qualità di freschezza espressa dal QIM e tempo di stoccaggio in ghiaccio. Quando il QIM è applicato al prodotto fresco consente di prevedere il termine massimo di stoccaggio.

Negli ultimi anni il quality index method è stato adattato ad un gran numero di specie ittiche, tenendo conto anche della perdita della loro integrità (pesci interi, pesci sviscerati, filetti), quali ad esempio alici, merluzzi, salmone etc..

QIM Eurofish ha pubblicato un manuale (*Martinsdóttir et al., 2001*) tradotto in 11 lingue che contiene gli schemi QIM per valutare dodici specie di pesce ed informazioni sul loro corretto utilizzo.

Il Quality Index Method viene utilizzato in ogni settore ittico, comprese le navi officina, e nell'ispezione del pesce (*Hyldig and Nielsen, 2004*).

Esso rappresenta una nuova e più valida alternativa per valutare le caratteristiche sensoriali di prodotti ittici freschi anche perché richiede una preparazione breve e semplice, è rapido, non distruttivo e può essere utilizzato in ogni impianto di produzione, assicurando la qualità del lavoro.*(Hyldig and Nielsen, 1997).*

## **MATERIALI E METODI**

### **Materie prime, preparazione e confezionamento**

Sono stati utilizzati, in tempi diversi, lotti di spigole e orate (Fig. 12), del peso medio di g 500, tutte provenienti da uno stesso allevamento offshore situato nel golfo di Pozzuoli (Fig. 11) e sottoposte ad un regime alimentare noto e tale da consentire la rintracciabilità.



Fig. 11



Fig. 12

I pesci, che non erano stati alimentati nelle 36 ore precedenti la cattura, sono stati uccisi in acqua e ghiaccio (Fig. 13) (300L/150L) e trasportati, nell'arco di alcune ore, in box di polistirolo (Fig. 14) sotto ghiaccio e con automezzo refrigerato, presso un'industria di lavorazione di prodotti ittici, dove sono stati desquamati, eviscerati manualmente, lavati in acqua potabile e filettati meccanicamente (Figg. 15-16).



**Fig. 13**



**Fig. 14**



**Fig. 15**



**Fig. 16**



**Fig.17**

Alcuni filetti sono stati immediatamente confezionati in MAP ( $\text{CO}_2$  70%, N 25%,  $\text{O}_2$  5%) (MAP A) utilizzando vassoi di polistirolo con fondo forato e con pad assorbente incluso e un Cryovac LID 2050 8 (Figg.17-18).



Fig.18

I rimanenti campioni sono stati trasportati, sempre sotto ghiaccio, in box di polistirolo e con automezzo refrigerato, presso la sede della Sealed Air di Passirana di Rho (MI), dove il mattino successivo sono stati confezionati secondo le ulteriori seguenti modalità:

1. sottovuoto (sistema DARFRESH) (DH), utilizzando una base rigida (RSCO3X25) e un film superiore Cryovac Darfresh TH 300 TOP WEB (Fig. 19).



**Fig.19**

2. MAP (63% CO<sub>2</sub>, 22% N e 15% O<sub>2</sub>), secondo il sistema Steam Cooking (SC), che prevede il Cryovac Steam Coking Tray SCT 1621, contenente un pad assorbente al quale vengono aggiunti 30 ml di acqua all'atto del confezionamento, e un Cryovac Multiflex EOP "M" Lid. (Fig. 20)



**Fig.20**

3. MAP (63% CO<sub>2</sub>, 22% N e 15% O<sub>2</sub>) (MAP B), impiegando un vassoio rigido Cryova UBRT 1621, privo di pad assorbente, e un Cryovac LID 2050 barriera anti-fog (Fig. 21)



**Fig.21**

Subito dopo le confezioni di tutti i lotti sono state trasportate a +3 °C, con automezzo refrigerato, nella Sezione di Ispezione del Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli alimenti della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Napoli "Federico II", dove sono giunte in serata e sono state stoccate, alla stessa temperatura, in frigoriferi dotati di termografo per tutta la durata degli esperimenti.

## Accertamenti

Ad ogni scadenza programmata, e precisamente al 2°, 4°, 6°, 8°, 12°, 14°, 16°, 18°, 22°, 24°, 26° giorno dalla pesca (corrispondenti al 1°, 3°, 5°, 7°, 11°, 13°, 15°, 17°, 23° e 25° giorno dal confezionamento) sono stati effettuati controlli organolettici e la determinazione della composizione in acidi grassi. Parallelamente sono stati effettuati controlli microbiologici, fisico-chimici e reologici i cui risultati sono oggetto di altri lavori (*Tozzi et al. 2006, Murru et al. 2006 e Meomartino et al.2006*). In presenza di un numero maggiore di campioni sono stati effettuati anche ulteriori esami intermedi.

**Valutazione dei caratteri organolettici.** Sono stati esaminati, attraverso panel test di 5 soggetti e l'uso di schede di valutazione QIM per i filetti, l'aspetto generale, il colore, l'odore, la consistenza del prodotto nonché la presenza e le caratteristiche dell' eventuale succo muscolare trasudato. Si è proceduto altresì alla cottura dei filetti in forno a microonde e, qualora ritenuto fattibile, alle prove di assaggio. I giudizi sono l'espressione di un panel test, costituito da almeno sei persone con pregressa esperienza su

prodotti della pesca, che hanno espresso separatamente la loro valutazione sui vari parametri considerati.

**Caratterizzazione del profilo acidico.** I lipidi sono stati saponificati ed esterificati secondo la metodica riportata nel *Regolamento comunitario 796/2002*. In particolare è stato determinato il fattore di risposta di ogni componente mediante una miscela a composizione nota in acidi grassi (Supelco 37 comp. FAME mix 10 mg/ml in CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>). Dal fattore di normalizzazione, è stata calcolata la percentuale corretta di ogni acido grasso del campione. L'analisi quantitativa è stata valutata seguendo la procedura dettata dal metodo ufficiale (*Gazzetta Ufficiale Delle Comunità Europee, 1995*) e applicando le modifiche di Contarini *et al.* 1997. Tutti i dati ottenuti sono stati statisticamente correlati mediante analisi della varianza utilizzando un intervallo di confidenza del 5% (ANOVA).

## RISULTATI

Nella materia prima odore, consistenza, colore e sapore sono stati sempre tipici di un prodotto eccellente per qualità e freschezza. Nelle orate e nelle spigole confezionate le caratteristiche sensoriali sono state giudicate ineccepibili, per tutte le modalità di confezionamento, fino al 10° giorno dalla cattura, anche fino al 12° per le tipologie SC e MAP.

Successivamente i filetti sono stati giudicati dapprima accettabili e poi non più commercializzabili per la graduale comparsa di succo muscolare trasudato, odore acidulo, modificazioni del colore (grigiastro, giallastro) in aree più o meno ampie, diminuzione della consistenza, patina viscosa sulla superficie del filetto.

Il profilo acidico delle orate e delle spigole è mostrato nelle tabelle 7 e 8.

Gli acidi grassi maggiormente rappresentati sono stati l'acido palmitico(C16:0), l'acido miristico (C14:0), l'acido stearico (C18:0), l'acido palmitoleico (16:1), l'acido oleico (C18:1) l'acido linoleico (18:2  $\omega$ 6), l'acido eicosapentanoico (EPA 20:5  $\omega$ 3) e l'acido docosadienoico (C22:6  $\omega$ 3) ed il C22:5  $\omega$ 3 che rappresentano gli acidi grassi

caratteristici dell'orata o della spigola siano esse di mare o di allevamento.

I livelli di acido palmitico (espressi come media percentuale sulla totalità degli acidi grassi) sono stati in media del 18% per le spigole e 16% per le orate. Questo rappresenta senza dubbio l'acido grasso più rappresentato tra tutti quelli saturi: sono diversi, infatti, i riferimenti bibliografici i quali riportano che l'acido palmitico costituisce fino al 70 % degli acidi grassi saturi totali. In generale gli acidi grassi saturi hanno presentato valori sempre inferiori al 30%. I livelli di acido oleico (C18:1) nelle carni di orate sono stati intorno al 16 % in entrambe le specie.

Nonostante l'acido oleico si classifichi, dunque, come il più significativo fra gli acidi grassi monoinsaturi, i valori appaiono piuttosto bassi rispetto alle media riportate per questa specie. Questo fenomeno sembrerebbe dovuto all'influenza stagionale: è vero, infatti, che essendo stata la sperimentazione protratta per un intero anno i livelli di MUFA scendono nel periodo invernale (Mahmut A.G. et al 2004, Grigorakis K et al 2002). per il maggior fabbisogno energetico delle gonadi (sviluppo delle uova). La somma complessiva dei MUFA appare in compenso piuttosto alta per un notevole contributo dato dal C20:1 e dal C22:1 portandosi dunque a

valori medi di 28,71% e 30% rispettivamente per le spigole e le orate. I segni di un'alimentazione ricca di semi vegetali (olio di soia e girasole) si evincono chiaramente dagli elevati contenuti in acido linoleico (18:2  $\omega$ 6) che tende a rimanere inalterato a causa della ridotta attività nei pesci allevati dell'elongasi e della desaturasi (*Owen et al.1975; Yamada et al. 1980*). I valori riscontrati sono del 18% per le spigole e 16% per le orate. Gli acidi grassi polinsaturi risultano essere particolarmente rappresentati nelle carni di pesce con livelli compresi fra 41-43% per entrambe le specie. Ad assumere maggior rilievo sono i livelli di DHA (Figg.19-21) che oscillano da un minimo di 14,87 % fino a 16,08 % per le spigole e da 13% fino a 13,78 per lo orate. I livelli di EPA (Figg. 18-20) variano da 6,66% a 7,14% per le spigole e da 5,88% a 6,32% per le orate (Tab. 9-10). Il rapporto tra  $\omega$  3 ed  $\omega$  6 risulta nella media per pesci di allevamento dato il notevole contributo degli  $\omega$  6 dalla dieta. Dall'analisi statistica di tutti i dati non emergono differenze significative tra le varie tipologie di confezionamento che si dimostrano tutte in grado di mantenere le caratteristiche nutrizionali tipiche di un prodotto di qualità.

	<b>Dar Fresh</b>	<b>MAP A</b>	<b>MAP B</b>	<b>Steam Cooking</b>
<b>C14:0</b>	4,75/0,60	5,02/0,40	4,93/0,27	4,77/0,50
<b>C15:0</b>	0,33/0,17	0,41/0,03	0,42/0,04	0,40/0,07
<b>C16:0</b>	19,13/1,28	19,27/0,66	20,19/0,57	19,70/0,95
<b>C17:0</b>	0,53/0,27	0,59/0,08	0,54/0,18	0,77/0,18
<b>C18:0</b>	3,48/0,32	3,67/0,29	3,95/0,25	3,86/0,35
<b>C20:0</b>	0,23/0,46	0,13/0,07	0,10/0,06	0,15/0,05
<b>C21:0</b>	0,35/0,33	0,44/0,02	0,55/0,44	0,51/0,28
<b>C22:0</b>	0,16/0,21	0,21/0,32	0,13/0,06	0,08/0,08
<b>Σ SFA</b>	<b>28,95</b>	<b>29,22</b>	<b>30,26</b>	<b>30,24</b>
<b>C14:1</b>	0,06/0,02	0,03/0,04	0,04/0,02	0,02/0,02
<b>C16:1</b>	6,08/0,86	7,25/0,24	5,95/0,33	5,87/0,47
<b>C17:1</b>	0,42/0,25	0,58/0,19	0,40/0,07	0,43/0,17
<b>C18:1</b>	16,58/1,23	16,79/0,44	17,25/1,35	18,34/3,40
<b>C20:1</b>	3,40/2,22	1,26/0,76	2,86/2,04	3,67/1,99
<b>C22:1</b>	1,07/0,37	0,93/0,52	1,31/0,47	1,28/0,15
<b>C 24:1</b>	0,28/0,06	0,38/0,06	0,20/0,08	0,27/0,07
<b>Σ MUFA</b>	<b>27,9</b>	<b>26,98</b>	<b>28,01</b>	<b>29,88</b>
<b>C18:2n6</b>	17,71/1,02	17,53/0,93	17,97/0,64	17,31/1,04
<b>C18:3n6</b>	0,43/0,67	0,27/0,03	0,20/0,04	0,21/0,03
<b>C 20:2n6</b>	0,05/0,05	0,08/0,02	0,02/0,02	0,06/0,05
<b>C20:3n6</b>	0,05/0,01	0,07/0,03	0,11/0,19	0,04/0,02
<b>C20:4n6</b>	0,81/0,02	0,86/0,13	0,96/0,15	0,76/0,16
<b>C 22:2n6</b>	0,02/0,01	0,07/0,02	0,13/0,24	0,04/0,02
<b>Σ insaturi n6</b>	<b>18,86</b>	<b>19,45</b>	<b>19,25</b>	<b>18,33</b>
<b>C18:3n3</b>	0,35/0,69	0,29/0,74	0,26/0,23	0,21/0,12
<b>C20:3n3</b>	0,10/0,02	0,09/0,46	0,13/0,11	0,07/0,02
<b>C 20:5n3 EPA</b>	8/1,18	7,10/0,16	7,89/0,53	7,60/0,69
<b>C 22:6n3 DHA</b>	14,12/2,23	14,08/1,97	13,20/1,70	13,59/1,34
<b>Σ insaturi n3</b>	<b>22,52</b>	<b>22,52</b>	<b>21,38</b>	<b>21,46</b>
<b>PUFA</b>	<b>41,47</b>	<b>42,3</b>	<b>40,72</b>	<b>39,88</b>
<b>EPA + DHA</b>	<b>22,12</b>	<b>21,76</b>	<b>21,09</b>	<b>21,18</b>
<b>ω3/ω6</b>	<b>1,2</b>	<b>1,16</b>	<b>1,11</b>	<b>1,17</b>

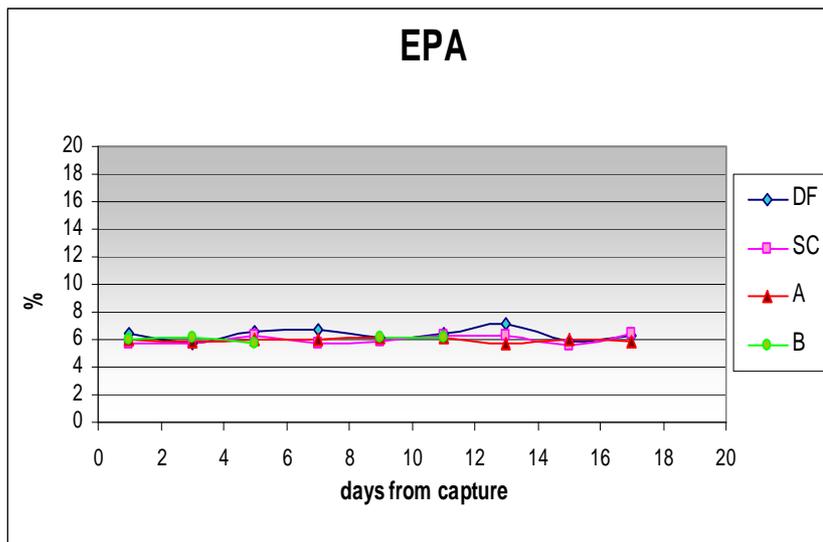
**Tab. 7 Profilo acido dei filetti di spigola (Dicentrarchus Labrax)**

	Dar Fresh	MAP A	MAP B	Steam Cooking
C14:0	5,32±0,55	5,72±0,41	5,89±0,36	5,67±0,27
C15:0	0,33±0,07	0,41±0,03	0,41±0,02	0,34±0,07
C16:0	17,82±1,14	18,27±0,66	17,53±2,65	17,46±1,61
C17:0	0,54±0,08	0,59±0,08	0,60±0,08	0,69±0,52
C18:0	3,71±0,29	3,67±0,29	3,59±0,31	4,09±1,50
C20:0	0,15±0,05	0,11±0,07	0,17±0,01	0,15±0,02
C21:0	0,06±0,04	0,04±0,01	0,03±0,02	0,03±0,01
C22:0	0,09±0,03	0,21±0,32	0,11±0,05	0,11±0,04
Σ SFA	28,03	29,02	28,32	28,51
C14:1	0,07±0,04	0,07±0,01	0,08±0,02	0,10±0,04
C16:1	7,08±0,54	7,25±0,24	7,49±0,26	7,21±0,50
C17:1	0,53±0,19	0,58±0,19	0,52±0,05	0,58±0,19
C18:1	16,92±1,20	16,79±0,44	17,95±0,99	16,95±1,58
C20:1	1,47±0,28	1,81±1,39	1,75±1,12	2,10±1,07
C22:1	1,16±0,50	0,93±0,52	1,17±0,11	1,13±0,10
C 24:1	0,18±0,18	0,38±0,06	0,39±0,05	0,34±0,13
Σ MUFA	27,67	27,22	30,22	28,97
C18:2n6	18,16±0,42	18,38±0,93	18,08±0,89	17,82±0,96
C18:3n6	0,22±0,04	0,24±0,03	0,25±0,03	0,22±0,02
C 20:2n6	0,28±0,10	0,36±0,02	0,32±0,07	0,24±0,11
C20:3n6	0,07±0,05	0,07±0,03	0,11±0,03	0,09±0,02
C20:4n6	0,61±0,15	0,66±0,13	0,61±0,13	0,60±0,21
C 22:2n6	0,04±0,02	0,07±0,02	0,04±0,02	0,04±0,02
Σinsaturi n6	19,05	19,78	19,1	18,79
C18:3n3	0,84±0,67	0,83±0,74	0,77±0,05	0,64±0,66
C20:3n3	0,18±0,09	0,37±0,50	0,17±0,05	0,11±0,04
C 20:5n3	7,14±0,42	6,66±0,16	6,82±0,16	7,03±0,64
C 22:6n3	16,08±2,	14,90±1,97	14,87±0,85	15,73±1,80
Σinsaturi n3	24,73	23,42	23,21	23,51
PUFA	44,4	43,2	41,46	42,52
EPA + DHA	23,21	21,56	21,69	22,76
ω3/ω6	1,30	1,19	1,22	1,25

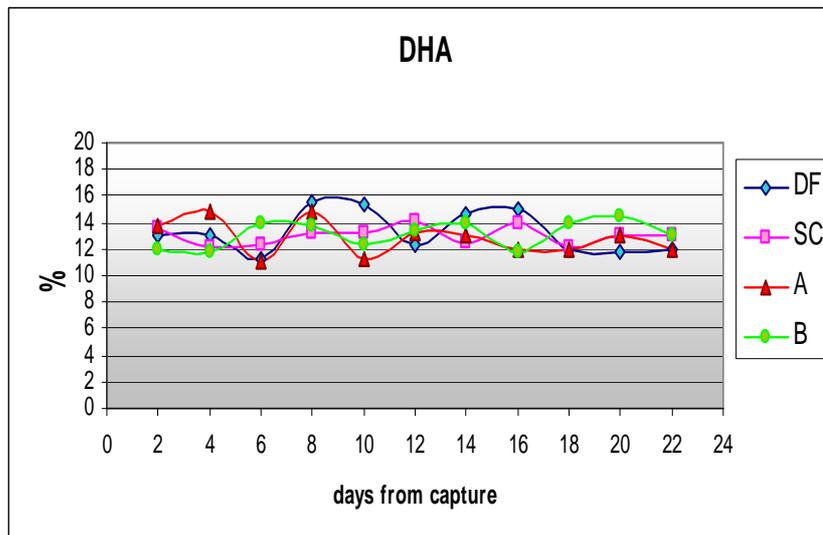
Tab. 8 Profilo acido dei filetti di orata (*Sparus aurata*)

<i>ORATA</i>	<i>DARFRESH</i>	<i>MAP A</i>	<i>MAP B</i>	<i>STEAM COOKING</i>
<i>C16:0 acido palmitico</i>	17,82	18,27	17,53	17,54
<i>C18:1 acido oleico</i>	16,92	16,79	17,95	16,95
<i>C18:2n6 acido linoleico</i>	18,16	18,38	18,08	17,82
<i>C 20:5n3 EPA</i>	7,14	6,66	6,82	7,03
<i>C 22:6n3 DHA</i>	16,08	14,90	14,87	15,73
<i>ω3/ω6</i>	1,3	1,19	1,22	1,25

Tab. 9 Maggiori acidi grassi riscontrati nel profilo acido dei filetti di orata



Figg. 18-19 Andamento dell' EPA (sopra) e del DHA (sotto) nei filetti di orata durante lo stoccaggio nei diversi confezionamenti.



<i>SPIGOLA</i>	<i>DARFRESH</i>	<i>MAP A</i>	<i>MAP B</i>	<i>STEAM COOKING</i>
<i>C16:0 acido palmitico</i>	19,13	18,27	20,19	19,70
<i>C18:1 acido oleico</i>	16,58	16,79	17,25	18,34
<i>C18:2n6 acido linoleico</i>	17,71	18,38	17,97	17,31
<i>C 20:5n3 EPA</i>	8	6,66	7,89	7,60
<i>C 22:6n3 DHA</i>	14,12	14,90	13,20	13,59
<i>ω3/ω6</i>	1,2	1,16	1,11	1,17

Tab. 10 Maggiori acidi grassi riscontrati nel profilo acido dei filetti di spigola.

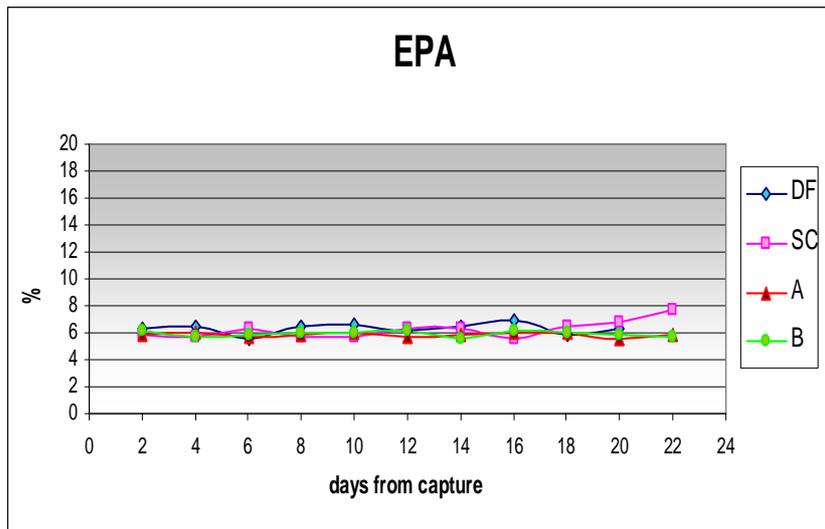
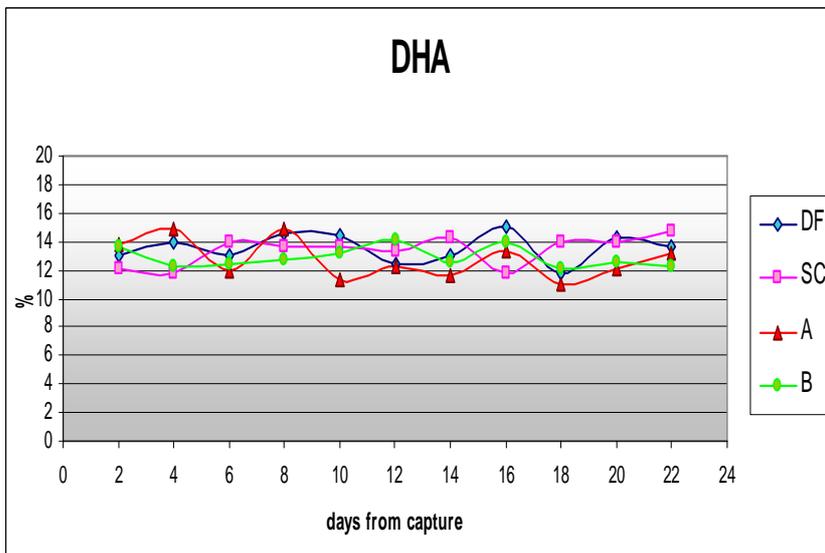


Fig. 20-21 Andamento dell' EPA (sopra) e del DHA (sotto) nei filetti di spigola durante lo stoccaggio nei diversi confezionamenti.



## **CONSIDERAZIONI**

Sebbene tutte le tipologie di confezionamento possano ritenersi valide lo SC si è mostrato più idoneo al mantenimento delle caratteristiche sensoriali maggiormente richieste dal consumatore.

La massiccia immissione sul mercato di prodotti d'acquacoltura, spigola ed orata in particolare per il mercato italiano, ha comportato una saturazione della domanda. La creazione di prodotti ittici preparati e variamente confezionati, arricchiti di valore aggiunto, consente di valorizzare l'allevamento di specie eccedentarie.

Il prolungamento della shelf-life permette inoltre di ottimizzare i criteri logistici nelle varie fasi di produzione consentendo, tra gli altri vantaggi, la riduzione e la centralizzazione dei rifiuti e del peso dei materiali.

Le soluzioni innovative di packaging comportano conseguenti ricadute positive in termini di immagine di qualità e di innovazione per le aziende, in quanto possono essere considerate come attività preliminare per la definizione di marchi specifici, ai quali i produttori tendono in modo crescente. I prodotti preparati rappresentano infine una risposta alle

esigenze del consumatore, che desidera conservabilità prolungata, migliore igiene e garanzie di qualità, maggiore praticità d'uso, maggiori informazioni sui prodotti, agevolazione nell'identificazione di eventuali marchi e soprattutto fidelizzazione del consumatore nei confronti di prodotti di provenienza nota e/o con marchio specifico (brand awareness). Questi sistemi di packaging si sono rivelati ottimi per il mantenimento delle caratteristiche organolettiche, ma anche per la conservazione degli elementi nutrizionali che conferiscono valore aggiunto al prodotto come il contenuto in acidi grassi  $\omega$  3 e  $\omega$  6 che si è mantenuto costante durante tutte le fasi di stoccaggio.

## 2° INDAGINE SPERIMENTALE

### CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO ACIDICO DI CAMPIONI DI FORMAGGIO PECORINO “CARMASCIANO”

#### INTRODUZIONE

Il latte non può essere solo considerato una fonte di nutrienti essenziali, ma grazie alla presenza di molecole bioattive, assume sempre più importanza quale alimento dotato di proprietà ‘*extranutrizionali*’. Tra le molecole bioattive fornite dal latte, gli antiossidanti assumono un ruolo fondamentale non solo a livello “*merceologico*”, ma soprattutto “*fisiologico*”, dal momento che numerosi studi hanno evidenziato una dipendenza di talune malattie da reazioni ossidative (aterosclerosi, malattie neurodegenerative e tumori) e la possibilità di rallentare il decorso delle stesse mediante l'apporto dietetico di antiossidanti (Ghiselli *et al.*,1997).

Ai fini della valutazione della qualità ‘*nutrizionale ed extranutrizionale*’ e della valorizzazione del latte dei “*tipi genetici autoctoni*” (TGA),

assume importanza notevole lo studio della composizione degli acidi grassi, e in particolare di quelli appartenenti alla serie degli  $\omega 3$ . Numerosi sono gli studi che evidenziano come l'alimentazione del TGA sia un fattore determinante per il contenuto di tali molecole bioattive nel latte; di recente *Cattaneo et al.* (2001) hanno dimostrato che un'alimentazione arricchita di oli di pesce comporta non solo una diminuzione della percentuale del grasso nel latte (2,66% vs 3,15%) ma anche una variazione del profilo degli acidi grassi con un incremento dei polinsaturi  $\omega 3$ .

Particolare considerazione come molecole bioattive meritano gli acidi grassi a catena corta e media (C4÷C10); in particolare, l'acido butirrico, presente unicamente nel latte dei ruminanti, è un potente agente antineoplastico. Le proprietà anticancerogene dell'acido butirrico possono essere potenziate in sinergia con altri componenti del latte, quali l'acido retinoico (*Chen e Breitman, 1994*).

Di attuale importanza è un particolare gruppo di acidi grassi denominati CLA ( *conjugated linoleic acid*, miscela di 8 acidi grassi insaturi C18:2, isomeri *cis* e *trans* dell'acido linoleico coniugato, dal quale si distinguono per la peculiare struttura a dieni coniugati).

Tra questi ultimi riveste un ruolo importante l'"acido bovino o rumenico" (isomero C18:2 *cis*-9, *trans*-11), che rappresenta l'80÷90% del CLA presente nel grasso del latte e il 75% di quello della carne; l'acido rumenico, a differenza degli altri isomeri che hanno solo un'origine esogena operata dai batteri ruminali, può avere una duplice origine: (a) *endogena*, a seguito della desaturazione dell'acido vaccenico (C18:1 *trans* 11) a opera dell'enzima 9-desaturasi a livello della ghiandola mammaria; (b) *esogena*, a seguito della bioidrogenazione dell'acido linoleico (C18:2 *cis* 9, *cis* 12), a opera dei batteri ruminali, in particolare del *Butyrivibrio fibrisolvens*.

Il contenuto di questo importante *anticancerogeno naturale* è influenzato dai seguenti fattori: *alimentazione, specie, razza e individuo*.

Da Kelly et al., (1998) è stato dimostrato che i livelli di CLA tendono a raddoppiare, fino a raggiungere valori di 10,9 mg/g di grasso, nel latte di animali alimentati al pascolo o comunque con foraggi verdi, mentre tendono a diminuire in seguito alla somministrazione di concentrati o foraggi affienati, in quanto sembra che la fienagione distrugga qualche componente dell'erba responsabile della sintesi (Campani, 2000).

Studi analoghi, sono stati effettuati, anche, nella specie ovina; *Banni et al. (1996)* hanno evidenziato l'influenza positiva del pascolo sul contenuto in CLA nel latte ovino. *Cabiddu et al., (2001)*, in uno studio condotto su ovini alimentati al pascolo, hanno evidenziato che il tenore medio in CLA tende ad aumentare secondo una proporzionalità diretta nel latte di pecore alimentate con *Lolium rigidum*, in accordo con un analogo studio condotto da *Dhiman (1999)* nei bovini.

Nell'ambito delle produzioni zootecniche è il latte ovino a contenere la quantità più elevata di CLA rispetto a quello bovino e a quello caprino (1,2 % vs 0,7% vs 0,6%).

Marcate differenze per il contenuto in CLA si rilevano tra razze sottoposte a selezione antropica e TGA/TGAA: a esempio, i tipi genetici autoctoni ovini *Garfagnina* e *Massese* producono, rispetto al TG *Sarda*, un latte con un maggiore contenuto in CLA (1,97 e 1,87 g/100 g di grasso, rispettivamente, vs 1,43 g/100 g di grasso).

Inoltre, differenze evidenti nel contenuto in CLA nel latte sono state rilevate, entro il tipo genetico, tra 'individui' sottoposti allo stesso regime alimentare; ciò dipenderebbe principalmente dal polimorfismo del gene codificante l'enzima  $\Delta 9$  desaturasi.

Il contenuto in CLA, oltre che dall'alimentazione, è influenzato dalla stagione di produzione (*Parodi, 1977*) e dall'età dell'animale (*Lal e Narayanan, 1984*); in particolare, i predetti Autori hanno evidenziato che il tenore in CLA tende a aumentare durante l'estate in concomitanza con la ripresa dell'allevamento al pascolo e con il progredire dell'età dell'animale.

Accanto a sostanze “benefiche” nel latte possono essere presenti altri componenti lipidici tra i quali prodotti di ossidazione i cui livelli possono dipendere oltre che dall'alimentazione anche dalla tecnologia di lavorazione e/o di conservazione del latte e dei suoi derivati. Il contenuto dei prodotti di ossidazione del colesterolo nei formaggi per esempio è influenzato dalle modalità di conservazione del prodotto e dalla temperatura di lavorazione della cagliata (*Granelli et al., 1996*). Anche *Fedele et al. (1999)* confermano l'entità del danno ossidativo indotto da quest'ultimo fattore, evidenziando che nei formaggi a pasta cotta, rispetto a quelli a pasta cruda, il contenuto di  $\lambda$ -tocoferolo diminuisce a favore di quello dei sottoprodotti. Tale risultato potrebbe contribuire alla valorizzazione di quei prodotti '*tradizionali*' ottenuti con diagrammi di

lavorazione e/o di flusso che non prevedono il riscaldamento della cagliata, quale a esempio, il formaggio pecorino ‘Laticauda’.

La ‘Laticauda’, razza ovina distribuita nel territorio del Sannio antico, è particolarmente interessante per la qualità dei prodotti che fornisce: latte, carne e loro derivati. Il sistema ‘*tradizionale*’ di allevamento, basato sull’uso del *pascolo*, influenza positivamente e significativamente il contenuto di biomolecole che tendono a raddoppiare nei prodotti di ovini alimentati al “*pascolo*” . Per il pecorino di ‘*Laticauda Sannita*’ la richiesta di DOP è in fase di istruttoria ministeriale.

### **Il formaggio pecorino Carmasciano**

Il latte utilizzato per la produzione del pecorino Carmasciano deriva da pecore provenienti da incroci tra razze laticauda (Fig. 22), comisana e sarda presenti sul territorio compreso tra la valle dell’Ufita, la valle d’Ansanto, la valle dell’Ofanto e l’altopiano del Cornicoso nei comuni di Guardia dei Lombardi e Rocca San Felice.



Fig. 22

Il latte risente sia della ricchezza del pascolo (timo serpillo e santoreggia, graminacee, lupinella, trifoglio), sia della Mefite fenomeno di vulcanesimo minore, le cui emissioni sembra che incidano favorevolmente anche sulle caratteristiche organolettiche di questo formaggio. Il latte della mungitura serale viene lasciato sostare a temperatura ambiente in attesa di essere miscelato con quello della mungitura mattutina. Il latte così miscelato e filtrato viene passato in caldaio o “cacco”. Mediamente vengono lavorati 40 l di latte al giorno, con una resa che varia dal 16 al 22% , secondo la stagione. Il latte in caldaia viene portato ad una temperatura di circa 45°C, ponendo la

caldaia (Fig. 23) a diretto contatto col fuoco di legna da ardere, sorretta da un asse di legno che la tiene ad una giusta distanza dalla fiamma.



Fig. 23

Raggiunta la temperatura di 45°C il riscaldamento viene interrotto e si procede all'aggiunta del caglio (Fig. 24). Il caglio impiegato è in pasta e si ottiene dal contenuto (gemma) degli abomasi (caglioli) di agnelli lattanti.



Fig. 24

La formazione della cagliata avviene dopo 15 min circa dall'aggiunta del caglio. Successivamente a questa fase si procede alla rottura della cagliata con il "ruoto" (Fig. 25) (utensile di legno con la punta arrotondata) fino alle dimensioni di un seme di mais.



Fig. 25

La cagliata così ottenuta viene lavorata sotto siero con le mani fino all'ottenimento di un impasto compatto che viene introdotto nella "fascetta" cestello in vimini (Figg. 26-27). Dopo l'estrazione della cagliata matura e la lavorazione in "fascetta", viene raccolto ciò che rimane sul fondo, il così detto "peluso". Tutto ciò che rimane, a questo punto, è il siero che viene addizionato di latte crudo e riscaldato a 60°C, per far affiorare la ricotta che viene estratta ad una temperatura di 80°-85°C. Dopo il prelievo della ricotta, il formaggio in forma viene immerso per circa 5 min nel siero caldo. Il formaggio così ottenuto è rassodato e pronto alle successive fasi di maturazione (Fig.28)



**Fig. 26**



**Fig. 27**



Fig. 28

A circa 24 ore il formaggio viene cosparso di sale grosso, subendo una salatura per aspersione che dura circa 5 giorni. Terminata la salatura il formaggio viene lavato con vino e “massaggiato” a giorni alterni con olio, vino ed aceto. Sulla crosta si cosparge della polvere di peperoncino per evitare l’attacco di insetti, che altrimenti sarebbero attratti dai forti odori propri del pecorino. Tutta la stagionatura dura da un minimo di 3 mesi ad un massimo di 15 mesi, avviene su assi di legno in locali poco luminosi e con un giusto rapporto temperatura/umidità. Il Carmasciano così ottenuto è un pecorino gradevolmente sapido e piccante, di odore intenso e penetrante. La pasta, con rada occhiatura, è tenera ed elastica

nelle forme più giovani e subisce un notevole aumento di consistenza durante la stagionatura. La crosta, da un colore paglierino tenue, assume gradualmente il tipico colore bruno e un aumento di spessore mentre al suo interno la pasta è giallo paglierino (Fig.29).



Fig. 29

Anche il sapore, dolce e aromatico al termine dei primi tre mesi, diventa decisamente piccante e caratteristico per le forme di maggiore stagionatura che può raggiungere anche i 15 mesi. Il peso di una forma varia da 1,5 a 5 Kg circa (Fig. 30).



**Fig. 30**

## **OBIETTIVI**

Lo scopo di questa indagine è stato caratterizzare da un punto di vista nutrizionale il Pecorino Carmasciano durante il processo di lavorazione e stagionatura attraverso lo studio del profilo acido.

## **MATERIALI E METODI**

Il latte, proveniente da un allevamento di 270 capi composto da differenti razze ovine (razza laticauda e sarda) (Fig. 31) è stato utilizzato per la

produzione di un lotto di *pecorino Carmasciano* secondo la tecnologia tradizionale in uso nella zona di produzione.



Fig. 31

Terminata la lavorazione il prodotto formato posto in fiscelle di plastica (Fig. 32) è stato mantenuto in ambiente controllato, a temperatura di 19°C , salato e a partire dal 3° mese di stagionatura, cosparso di olio e spazzolato ad intervalli di 20gg (Fig. 33).



**Fig. 32**



**Fig. 33**

Parallelamente al monitoraggio delle caratteristiche sensoriali e all'andamento di alcuni parametri chimico-fisici durante l'intero processo

lavorativo dalla coagulazione alla salatura, fino agli ultimi giorni di stagionatura è stata analizzato il profilo acidico. In particolare nei campioni prelevati al 1°, all'17°, al 36°, al 47°, al 82°, al 117°, 147°, 175°, 201° e 229° giorno di stagionatura e di volta portati al laboratorio di Ispezione dove è stata estratta la componente lipidica mediante metodica di Hara Radin. Successivamente i campioni di grasso congelati sono stati trasportati presso il Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos (LHICA) del Dipartimento di Química Analítica, Nutrición y Bromatología della Facoltà di Veterinaria dell'Università di Santiago de Compostela per effettuare l'analisi del contenuto in acidi grassi.



**Fig. 34 Formaggio Carmasciano dopo 17 giorni di stagionatura**



**Fig. 35 Formaggio Carmasciano dopo 57 giorni di stagionatura**



**Fig. 36 Formaggio Carmasciano dopo 153 giorni di stagionatura**

## **Metilazione**

Per l'analisi del profilo acido effettuate in doppio è stata impiegata una transesterificazione con soluzione sulfurico:metanolo ( $H_2SO_4:MeOH$ ) al 2,5% (Watts, J.L., J. Browse. 2002). A 200 mg di grasso estratto sono stati aggiunti 20 ml di soluzione cloroformio:metanolo 2:1 così da ottenere una concentrazione di 10 mg/ml. Da questa soluzione sono stati prelevati 10  $\mu$ l e addizionati 10  $\mu$ l di standard interno C:23 (Sigma, St Louis, USA). Dopo aver portato a secco con gas azoto sono stati aggiunti 500  $\mu$ l di soluzione sulfurico:metanolo al 2,5% e metilato per 1h in un bagno d'acqua coperto ad una temperatura di 80°C.

## **Analisi gascromatografica**

Gli esteri metilici degli acidi grassi così ottenuti sono stati analizzati attraverso l'impiego di un gascromatografo Hewlett-Packard 6890 Series con colonna capillare DB-WAX (30 m x 0.25 mm i.d. e 0.25  $\mu$ m film thick-ness) con rivelatore a fiamma d'idrogeno (FID). Il volume dell'iniezione è stato di 1 $\mu$ l. La temperatura dell'iniettore in modalità

splitless è stata settata a 230°C mentre il detettore a 250 °C. Il gas carrier adoperato è stato l'idrogeno (H) con un flusso di 1.8 ml/m. Inoltre la temperatura del forno è stata impostata a 60°C per 2 minuti, con un incremento 50°C/min fino a 160°C per 2 min, con incrementi successivi di 1,5-2-3-4°C/min fino a 250°C.

## RISULTATI

Le percentuali degli acidi grassi e dei CLAs identificati fino all'undicesimo mese di stagionatura sono di seguito riportate nelle tabelle

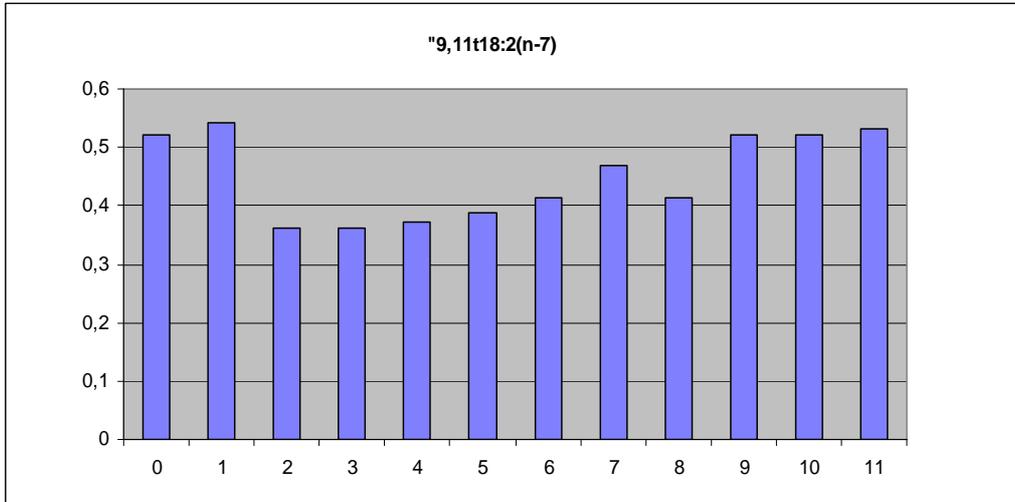
11-12:

	0	1	2	3	4	5
"11:0	0,135912	0,16551	0,077644	0,069244	0,072974	0,044419
"12:0	6,114093	6,226757	5,266438	5,014679	5,156062	4,108752
"13:0	0,121698	0,118813	0,119276	0,114956	0,123679	0,10911
"14:0	13,69466	13,47328	15,24486	15,07971	15,36551	14,34402
"14:1(n-5)	0,327526	0,3212	0,336585	0,198104	0,3748	0,341335
"15:0	1,370121	1,353265	1,449681	1,466755	1,518317	1,459286
"15:1(n-5)	0,029437	0,042509	0	0	0	0
"16:0	31,3334	31,05822	30,50974	31,66435	27,73456	32,09174
"16:1(n-9)	0,335946	0,336782	0,324515	0,333429	0,352159	0,376604
"16:1(n-7)	1,31846	1,31217	1,333133	1,331147	1,403001	1,344265
"16:1 (n-13)t	0,754677	0,748794	0,715797	0,733947	0,764818	0,735588
"16:3(n-6)	0,182174	0,013822	0,035213	0	0,027147	0
"17:0	1,142547	1,146756	1,152336	1,197963	1,246173	1,192805
"17:1(n-9)	0,376969	0,373296	0,348535	0,212213	0,379961	0,393357
"18:0	10,32857	10,30373	10,22071	10,17837	10,64848	10,21148
"18:1(n-9)	0,013859	0,01236	0	0	0	0
"18:1(n-7)	1,450287	1,44549	2,563	2,738319	3,136954	2,811669
"18:2(n-6)	2,76429	2,765989	2,61616	2,572813	2,737183	2,617088
"18:3(n-3)	0,845015	0,8465	0,704072	0,731044	0,760991	0,796208
"9,11t18:2(n-7)	0,521458	0,543216	0,362581	0,362151	0,371417	0,387363
"20:0	0,527263	0,609198	0,452011	0,48893	0,502597	0,530357
"20:1(n-11)	0,148493	0,067742	0,148234	0,136426	0,037687	0,147843
"20:3(n-6)	0,188302	0,222639	0,071812	0	0,025	0
"20:4(n-6)	0,221351	0,2256	0,220531	0,211845	0,214576	0,212806

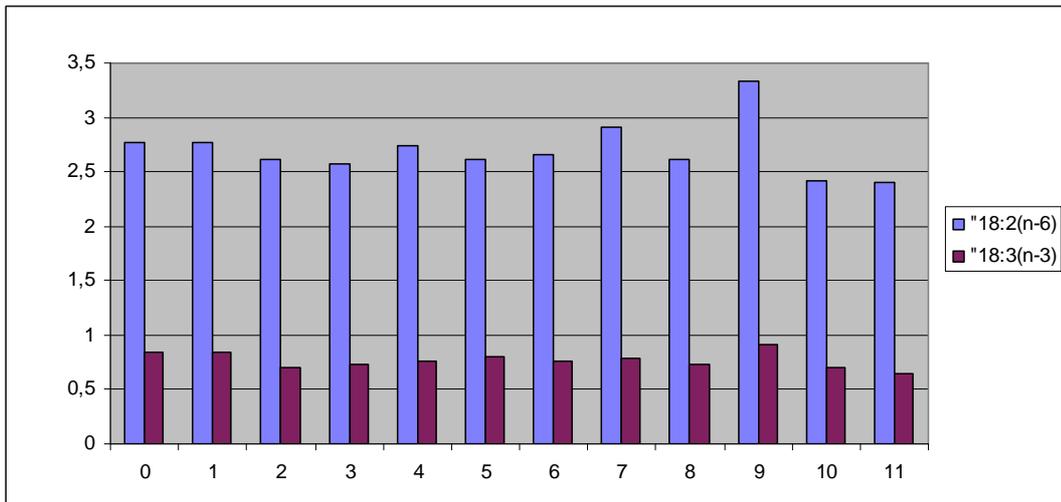
Tab. 11

	6	7	8	9	10	11
"11:0	0,078768	0,085268	0,0736344	0,0852931	0,073234	0,072515
"12:0	5,078952	5,644603	4,91261	6,1533648	4,915081	4,908636
"13:0	0,145846	0,137638	0,1185556	0,1458439	0,106548	0,117872
"14:0	14,61127	16,45026	14,490006	18,513218	14,36169	14,43319
"14:1(n-5)	0,36297	0,399001	0,3566636	0,4465863	0,354363	0,333175
"15:0	1,448056	1,626931	1,4414446	1,8262074	1,42476	1,432995
"15:1(n-5)	0,046219	0	0	0	0,024891	0
"16:0	29,82838	24,2301	32,220527	26,470714	32,01734	32,10963
"16:1(n-9)	0,45714	0,368706	0,3339945	0,4353085	0,314671	0,320582
"16:1(n-7)	1,345224	1,482204	1,3295166	1,6694465	1,27537	1,284597
"16:1 (n-13)t	0,718066	0,821068	0,7168878	0,9153506	0,704309	0,711868
"16:3(n-6)	0	0	0	0	0	0
"17:0	1,186815	1,318982	1,1672607	1,4929385	1,168318	1,165141
"17:1(n-9)	0,409146	0,419441	0,3743552	0,5048465	0,397116	0,358823
"18:0	11,59117	11,22665	9,9487513	13,152798	10,19542	10,13816
"18:1(n-9)	0	0	0	0	23,07085	22,84624
"18:1(n-7)	2,623099	3,199752	2,8683232	1,5946506	2,898008	2,987271
"18:2(n-6)	2,660293	2,902759	2,6170964	3,3328895	2,416489	2,40612
"18:3(n-3)	0,75688	0,793057	0,7321266	0,9201795	0,699578	0,644283
"9,11t18:2(n7)	0,415257	0,469081	0,4152759	0,5208078	0,520599	0,532206
"20:0	0,499017	0,538386	0,4964988	0,6208929	0,508859	0,488214
"20:1(n-11)	0,095121	0,134557	0,0805375	0,1606338	0,115131	0,143163
"20:3(n-6)	0	0,023159	0	0,0223973	0,030123	0
"20:4(n-6)	0,214071	0,194821	0	0	0,185875	0,182901

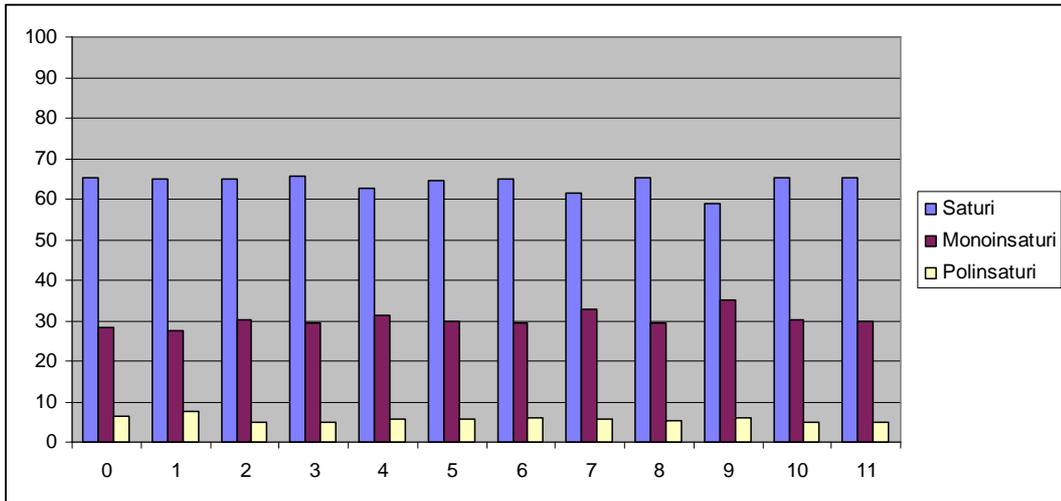
Tab. 12



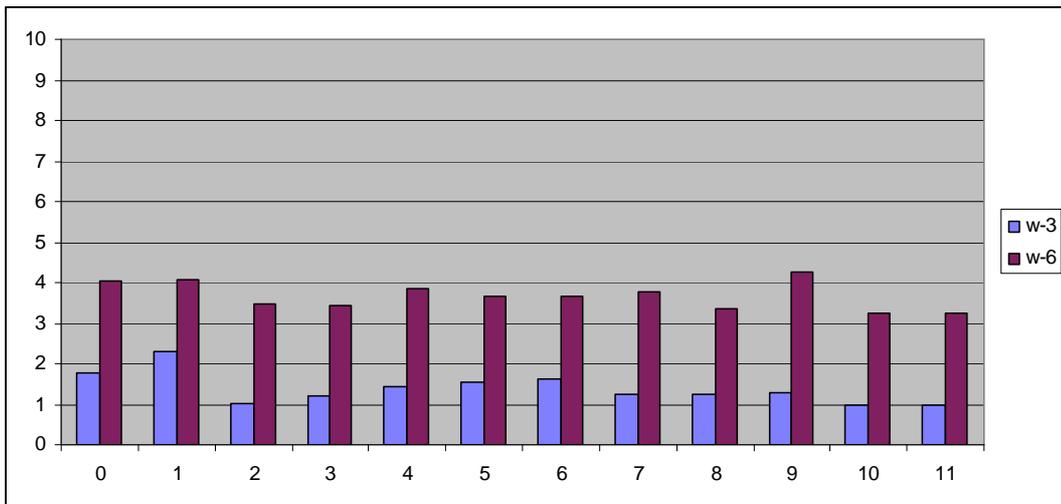
**Fig. 37** Grafico dell'andamento dell'acido rumenico in percentuale totale degli acidi grassi (asse x) durante la stagionatura (asse y)



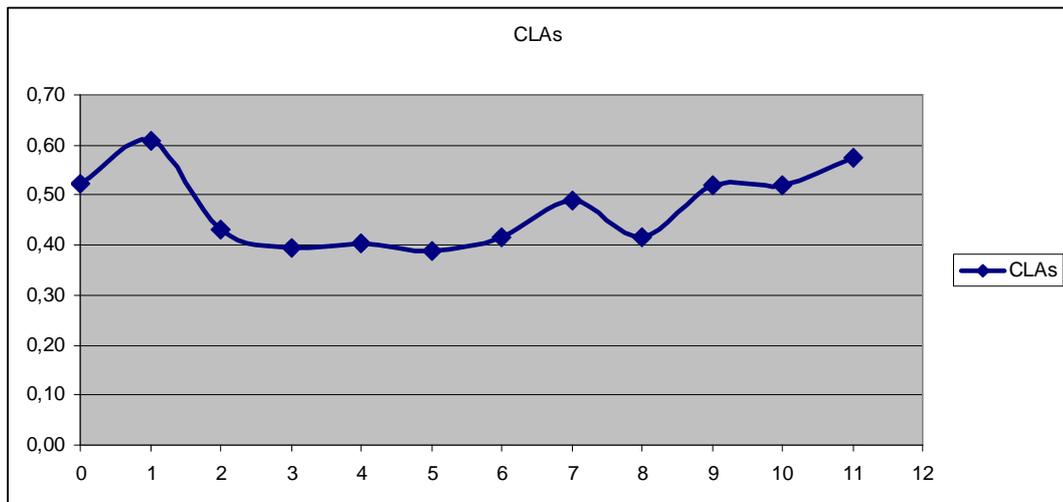
**Fig. 38** Grafico dell'andamento dell'acido linoleico (C 18:2 n6) in relazione all'acido linolenico (C 18:3 n3) in percentuale totale degli acidi grassi (asse x) durante la stagionatura (asse y)



**Fig. 39** Grafico della variazione in percentuale dei SFA, MUFA e PUFA (asse x) durante la stagionatura (asse y)



**Fig. 40** Grafico dell'andamento in percentuale totale degli acidi grassi delle serie omega 3 e omega 6 (asse x) durante la stagionatura (asse y)



**Fig. Grafico dell'andamento in percentuale totale dei CLAs, C:9,11t18:2(n-7) + C:10t,12 18:2(n-6) (asse x) durante la stagionatura (asse y)**

Gli acidi grassi maggiormente rappresentati sono stati l'acido palmitico(C16:0), l'acido miristico (C14:0), l'acido stearico (C18:0) e l'acido laurico (C12:0). Per quanto riguarda gli acidi grassi saturi (C 12:0 laurico C 14:0 miristico C 16:0 palmitico C 18:0 stearico C 20:0 arachidico C 22:0 beenico C 24:0 lignoceric) la percentuale totale si è attestata intorno al 65% con pochissime variazioni durante il processo di maturazione. Tra gli acidi grassi monoinsaturi (C 14:1 ω 5 miristoleico C 16:1 ω 7 palmitoleico C 18:1 ω 9 oleico C 20:1 ω 11 eicosaenoico C 22:1 ω 9 erucico) il più rappresentativo è stato l'acido palmitoleico con una percentuale che si è attestata intorno all'1,5%. Nel gruppo dei PUFA una buona percentuale di ω 3 è stata riscontrata ad inizio processo di

stagionatura (2%) per poi subire una leggera flessione a fine stagionatura nell'undicesimo mese. Il rapporto  $\omega$  3:  $\omega$  6 si è mostrato buono con valori di acidi grassi della serie omega 6 che non hanno mai superato il 4,5% durante tutto il periodo di analisi. Per quanto riguarda i valori di CLA (espressi come media percentuale sulla totalità degli acidi grassi), essi sono stati di circa 0,4-0,5%. Tali livelli confrontati con studi analoghi riportati in letteratura (*Alonso et al., 1999; Gulati et al., 2000; Chilliard et al., 2002*) dimostrano insieme alle alte percentuali degli acidi  $\omega$  3 un elevato valore nutrizionale del prodotto. L'acido rumenico è stato riportato separatamente perchè è il più importante CLA in termini di attività anticancerogena. Infatti è l'unico isomero incorporato nella frazione fosfolipidica dei tessuti, modula l'attività del citocromo P450, riduce l'induzione dell'ornitina decarbossilasi e la proteina chinasi C, conosciuti come indicatori dell'insorgenza del tumore, e probabilmente inibisce la biosintesi della proteina e del nucleotide. La maggior quantità di c-9, t-11-C18:2 presente in questo formaggio può essere dovuta all'attività della microflora contaminante il latte (*Werner S.A. et al, Prandini A. et al*) ed alla prolungata cottura della cagliata. Come riportato da *Lin et al.*, l'agitazione della cagliata durante la cottura facilita la

formazione di CLA grazie all'incorporamento di aria, migliorando l'inizio dell'ossidazione dei lipidi e la produzione dei radicali linoleici. Comunque, l'interazione tra proteine e globuli di grasso aumenta ed attiva le proteine cedendo idrogeno per convertire i radicali acidi linoleici in CLA. L' aumento di acidi grassi saturi, mono e poli insaturi a lunga catena (C18:0, C18:1, C18:2, C18:3) determina una riduzione del rapporto  $C16:0/(C18:1 + C18:2 + C18:3)$ , confermando la maggiore influenza del pascolo sulla composizione del grasso del latte. Durante la stagionatura si è avuta un leggera diminuzione degli acidi grassi  $\omega$ -3 ma un rapporto  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 molto importante ai fini nutrizionali. In conclusione i risultati di questo studio hanno dimostrato che nel formaggio "Carmasciano" si sono riscontrate discrete quantità di CLAs e un buon rapporto  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 che non è variato durante tutto il processo di stagionatura. Questi dati testimoniano l'ottima qualità nutrizionale del formaggio pecorino "Carmasciano" e forniscono un elemento aggiuntivo molto importante ai fini della sua "trasformazione" da produzione di nicchia a prodotto con "denominazione di origine protetta" (DOP).

### **3° INDAGINE SPERIMENTALE**

## **MESSA A PUNTO DI UN MICROMETODO RAPIDO PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI IN LATTE E FORMAGGIO**

### **INTRODUZIONE**

Negli ultimi anni la tendenza a modificare l'alimentazione degli animali con mangimi addizionati in  $\omega$  3 e l'attenzione sempre crescente verso la composizione degli alimenti in acidi grassi ha portato alla necessità di sviluppare metodi di analisi precisi e accurati per determinare la concentrazione di acidi grassi come ad esempio quelli della serie  $\omega$  3 tra cui l'acido linolenico, l'acido eicosapentaenoico (EPA) e il docosaesaenoico (DHA) e del CLA. In particolare la separazione degli isomeri del CLA è un'analisi molto complessa e critica per calcolare le concentrazioni di tutti gli isomeri (*Winkler e Steinhart, 2001*). Obiettivo di questo studio è stato quello di sviluppare un rapido e conveniente

micro metodo per la determinazione quantitativa della composizione in acidi grassi nel latte e nel formaggio.

## **MATERIALI E METODI**

**SVILUPPO DEL MICROMETODO PER IL LATTE:** sono stati analizzati campioni di latte vaccino provenienti da allevamenti situati in Galizia, regione a nord ovest della Spagna. I campioni, pervenuti presso il Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos (LHICA) del Dipartimento di Química Analítica, Nutrición y Bromatología della Facoltà di Veterinaria dell'Università di Santiago de Compostela (USC) situata nel Campus Universitario di Lugo, sono stati omogeneizzati secondo le norme *AOAC 925.20* per effettuare l'analisi del contenuto in acidi grassi.

### *Studio del metodo di metilazione*

In una prima fase è stato studiato il metodo di metilazione migliore per le analisi da effettuare. Per questo studio sono stati metilati campioni di olio di fegato di merluzzo, olio di mais e latte con tre differenti soluzioni di metilazione e a tempi/temperature differenti:

- a)  $\text{BF}_3$ /metanolo (14%) a  $95^\circ\text{C}$  per 10 min. (*Metcalfe and Schmitz, 1961*)
- b) KOH/metanolo (2N) a temperatura ambiente per 12 h (*Frank et col., 2002*)
- c)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /metanolo (2.5%) a  $80^\circ\text{C}$  per 1 ora (*Watts and Browse, 2002*).

Sono stati pesati 50 mg di olio in triplo e disciolti in 20 ml di soluzione cloroformio/metanolo 2:1. Da questa soluzione successivamente sono stati prelevati 125  $\mu\text{l}$  ed è stato aggiunto lo standard interno C:23 (*Sigma, St Louis, USA*).

Dopo aver portato a secco con azoto ( $\text{N}_2$ ) è stato aggiunto 1 ml di soluzione  $\text{BF}_3$ /metanolo (14%),  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /metanolo (2.5%) e KOH/metanolo (2N). Per i campioni di latte le condizioni del micrometodo sono state: 10  $\mu\text{l}$  di latte + 2 ml dei tre solventi a-b-c.

### *Sviluppo del micrometodo e ricerca delle migliori condizioni operative*

Ad una aliquota sufficiente di latte sono stati addizionati 2 ml di soluzione H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/metanolo (2.5%). Questa soluzione è stata poi conservata a 3-4°C a differenti tempi di estrazione. Sono stati analizzati sia il tempo che la temperatura di metilazione. Infine è stato aggiunto 1 ml di esano e centrifugato. Sono stati prelevati 500 microlitri portato a secco sotto un flusso di N<sub>2</sub> e sciolto in esano per la loro iniezione al gascromatografo.

Sono stati valutati gli effetti di differenti parametri:

- a) Quantità del campione: 10 µl, 50 µl e 100 µl di latte.
- b) Tempo di estrazione: i campioni sono stati tenuti in una soluzione H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/metanolo (2.5%) per 1, 3, 12 e 24 ore.
- c) Temperatura di metilazione: le soluzioni ottenute sono state mantenute per un'ora a bagno a 40, 60 e 80°C.
- d) Tempo di metilazione: le soluzioni sono state mantenute per 30 min, 1, 2, 4, 8 12, 14 e 16 ore in un bagno a 60 °C.

### *Confronto tra il micrometodo e il metodo standard*

Il metodo scelto per effettuare l'analisi comparativa è stato il metodo di estrazione da *Bligh EG e Dyer WJ (1959)* e la determinazione della composizione di acidi grassi mediante GC, come descritto nei metodi ufficiali AOCS (*Ce 1b-89*). Questo metodo da noi applicato nelle indagini precedenti oggetto di questa tesi consiste in una preliminare idrolisi alcalina di grassi con una soluzione KOH / metanolo seguita da una transesterificazione acida con una soluzione trifluoruro di boro/metanolo.

### *Analisi degli esteri metilici degli acidi grassi*

Gli esteri metilici degli acidi grassi così ottenuti sono stati analizzati attraverso l'impiego di un gascromatografo Hewlett-Packard 6890 Series con colonna capillare DB-WAX (30 m x 0.25 mm i.d. e 0.25 µm film thickness) con rivelatore a fiamma d'idrogeno (FID). Il contenuto degli esteri metilici è stato determinato mediante aggiunta di un'adeguata quantità di standard C23:0 (*Sigma, St Louis, USA*).

### *Analisi statistica*

I cambiamenti nella composizione degli acidi grassi per gli effetti delle modifiche dei parametri di estrazione e derivatizzazione sono stati statisticamente analizzati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA). Le differenze sono state considerate significative per  $P < 0,05$ . Le analisi dei dati sono state effettuate utilizzando il programma Stat grafica Plus versione 5.0 (*SAS Institute, North Carolina, Stati Uniti d'America*).

### **SVILUPPO DEL MICROMETODO PER IL FORMAGGIO:**

Campioni di formaggio “Tetilla”, un formaggio morbido, cremoso, prodotto in Galizia (Spagna Nord-Ovest) da latte di vacca, sono stati prelevati da un supermercato, trasportati al laboratorio in frigorifero e conservati a 3-4 ° C per le analisi chimiche. Il campione per le analisi è stato prelevato dalla parte centrale del formaggio. Questa porzione è stata omogeneizzata, quindi un'aliquota è stata raccolta in diversi tubi pirex ed è stata aggiunta una soluzione acido solforico:metanolo al 2,5%. Il tubo è stato chiuso e agitato vigorosamente per circa 1 min e conservato a

3-4 ° C per diverse frazioni di tempo. L'aliquota estratta è stata conservata a 60 ° C e 80 ° C in un bagno d'acqua per 1-2-3-4 h.

Quantità di campione (mg)	Quantità di soluzione acido solforico/metanolo (ml)	Tempo di estrazione (h)	Tempo di metilazione (h)	Temperatura di metilazione (°C)
10	7.5	1	1	60
50	15	12	2	80
100	30	24	3	
	45		4	

Tab. 13 Parametri studiati nella messa a punto del micrometodo

### *Analisi degli esteri metilici degli acidi grassi*

Gli esteri metilici degli acidi grassi così ottenuti sono stati analizzati attraverso l'impiego di un gascromatografo Hewlett-Packard 6890 Series con colonna capillare DB-WAX (30 m x 0.25 mm i.d. e 0.25 µm film thick-ness) con rivelatore a fiamma d'idrogeno (FID). Il contenuto degli esteri metilici è stato determinato mediante aggiunta di un'adeguata quantità di standard C23:0 (*Sigma, St Louis, USA*).

### *Analisi statistica*

I cambiamenti nella composizione degli acidi grassi per gli effetti delle modifiche dei parametri di estrazione e derivatizzazione sono stati statisticamente analizzati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA). Le differenze sono state considerate significative per  $P < 0,05$ . Le analisi dei dati sono state effettuate utilizzando il programma Stat grafica Plus versione 5.0 (*SAS Institute, North Carolina, Stati Uniti d'America*).

## **RISULTATI**

**MICROMETODO PER IL LATTE:** Come si evince dal grafico la metilazione con soluzione acido solforico / metanolo al 2,5% ha portato a risultati migliori sia nello studio del profilo acidico degli oli che per l'estrazione diretta e metilazione degli acidi grassi nel latte. Nel caso del latte, utilizzando questo metodo di metilazione si sono ottenuti risultati simili se confrontati con la metilazione con  $\text{BF}_3$ , e significativamente

migliori invece se confrontati ai valori di acidi grassi utilizzando la metilazione con KOH / metanolo.

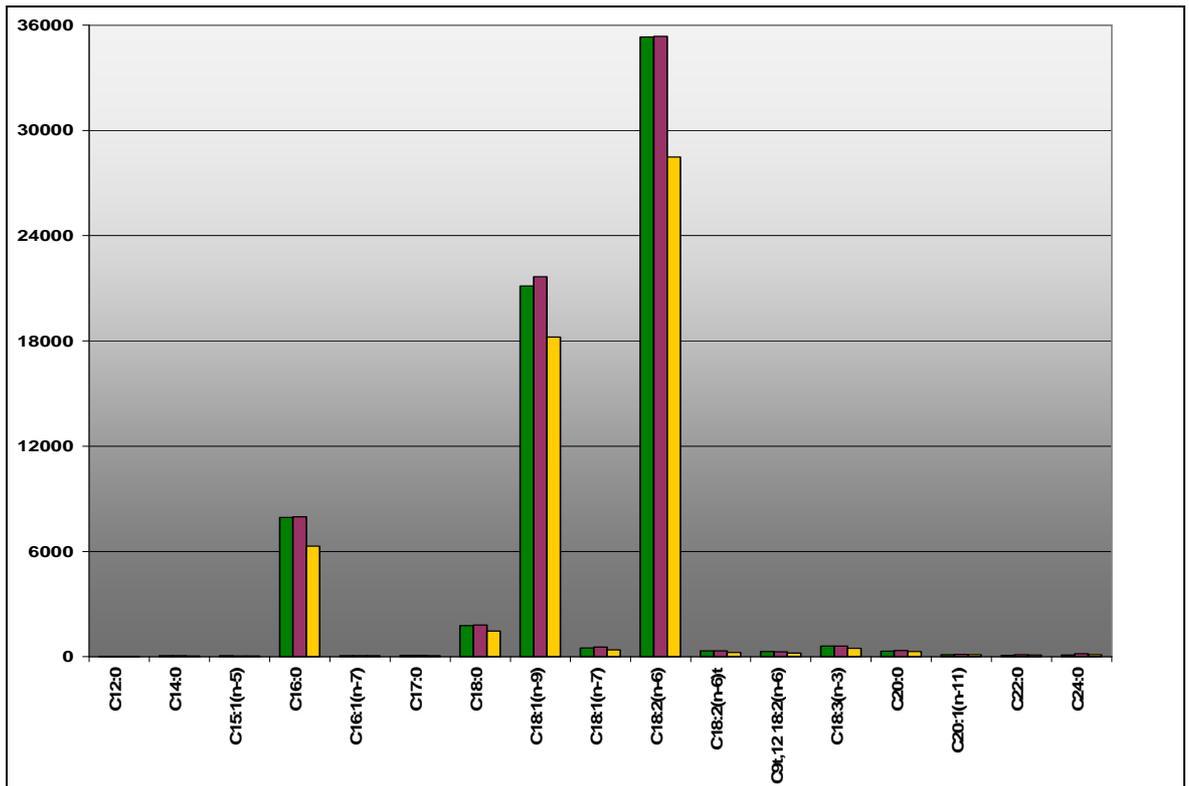


Fig. 41 Grafico della variazione quantitativa dei valori di acidi grassi (mg/100g) in campioni di olio di mais dovuta all'utilizzo di differenti metodi di metilazione (verde: BF<sub>3</sub>/metanolo (14%),rosa: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/metanolo (2.5%) giallo: KOH/metanolo (2N))

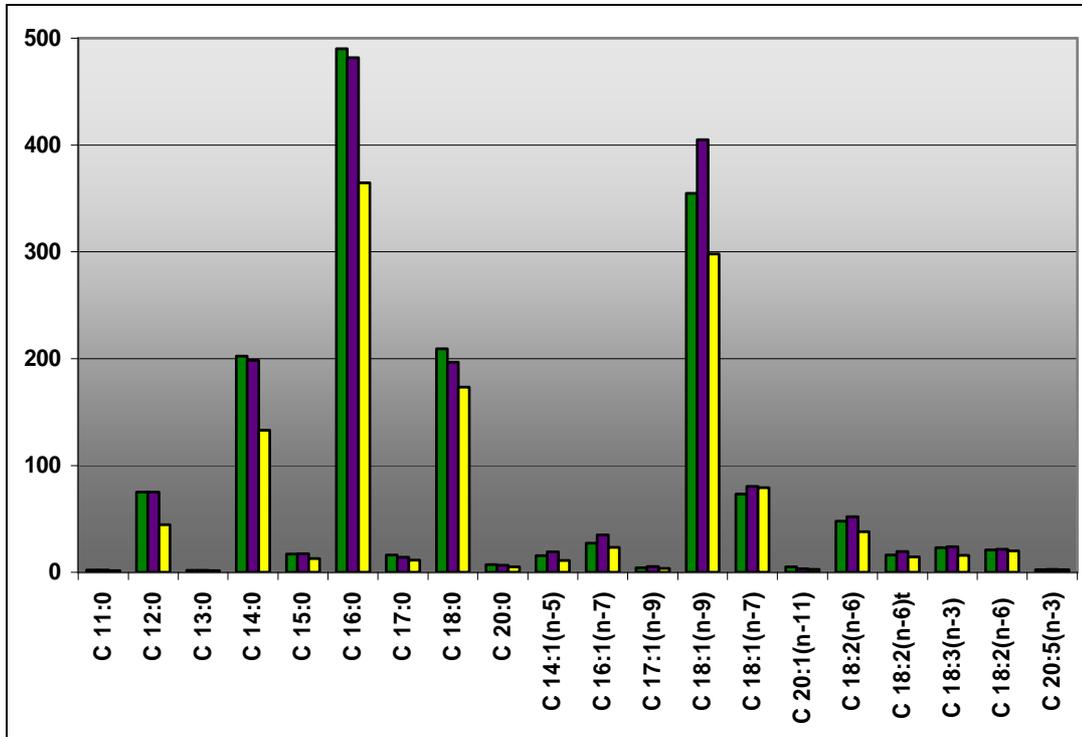


Fig. 42 Grafico della variazione quantitativa dei valori di acidi grassi (mg/100g) in campioni di latte dovuta all'utilizzo di differenti metodi di metilazione (giallo: BF<sub>3</sub>/metanolo (14%),viola: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/metanolo (2.5%) giallo: KOH/metanolo (2N))

I risultati dello studio sulle diverse quantità di campione hanno dimostrato che la quantità di campione migliore è stata 10µl.

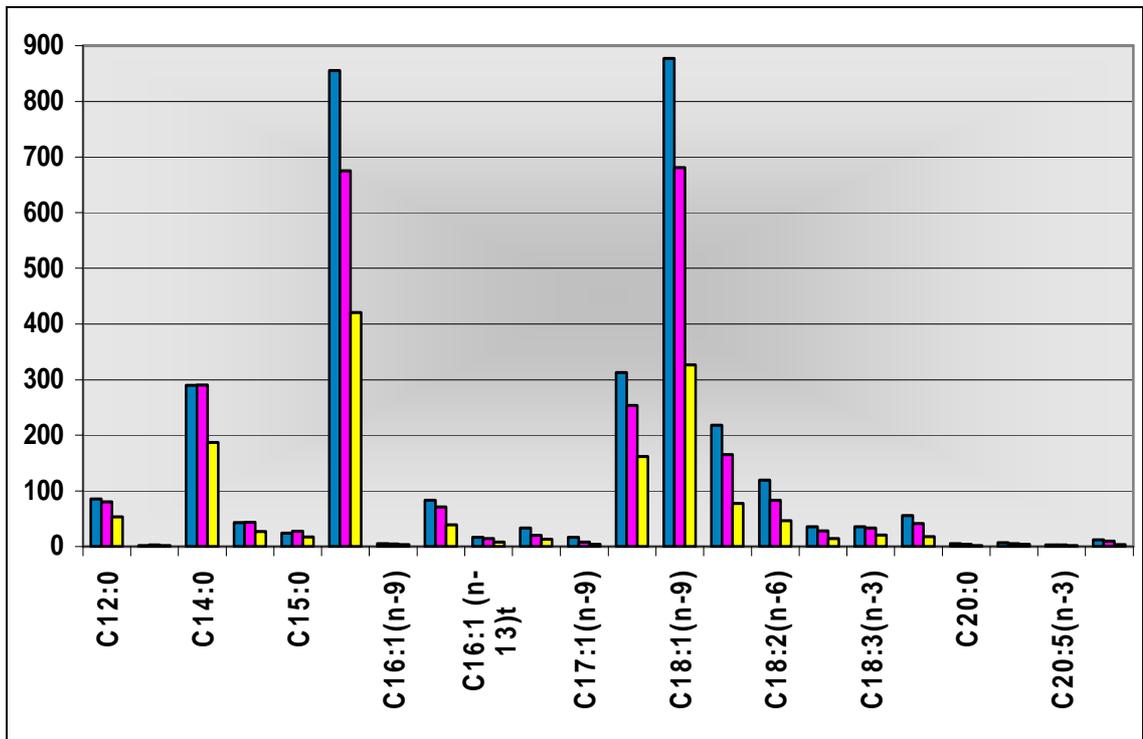


Fig. 43 Grafico della variazione quantitativa dei valori di acidi grassi (mg/100g) in campioni di latte dovuta all'utilizzo di differenti quantità (microlit) di campione (azzurro: 10 µl , rosa: 50 µl giallo: 100 µl) dopo 12 ore di estrazione e metilati per 2 ore a 60 °C.

La derivatizzazione migliore è risultata quella effettuata a 60°C considerando il fatto che utilizza una temperatura meno aggressiva. Non sono state osservate differenze significative tra la derivatizzazione a 60°C e 80°C. Notevoli differenze invece sono state osservate nei valori di acidi grassi quando la derivatizzazione è stata effettuata a 40°C.

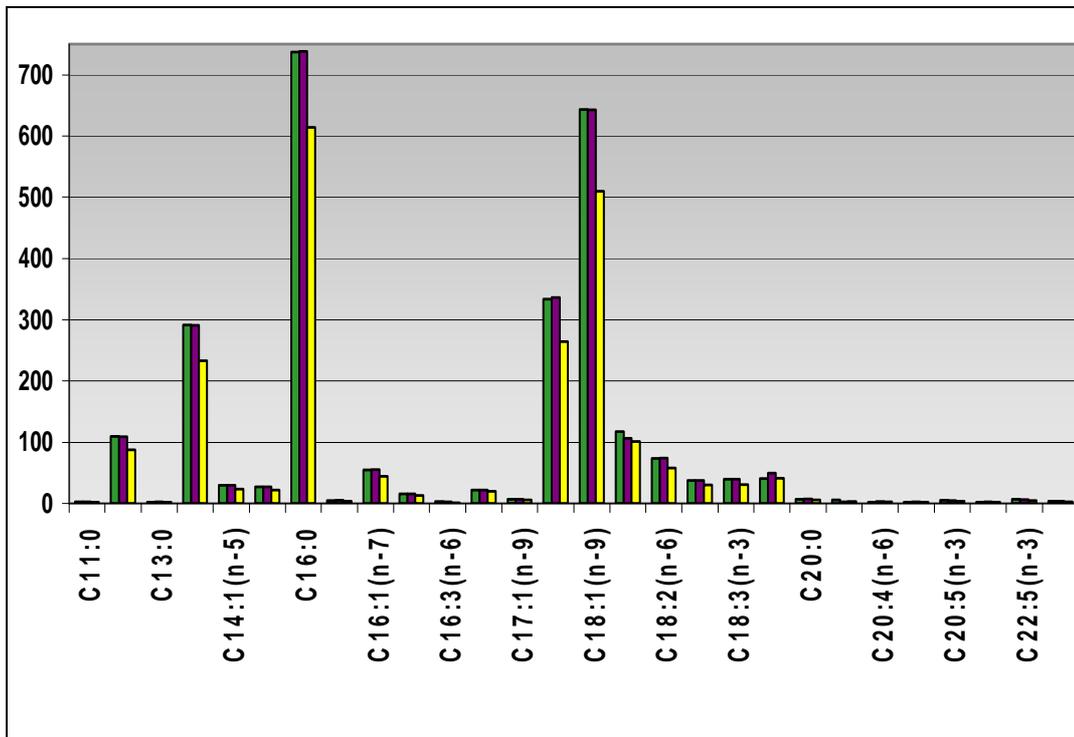


Fig. 44 Grafico della variazione quantitativa dei valori di acidi grassi (mg/100g) in campioni di latte dovuta all'utilizzo di differenti temperature di metilazione con acido solforico/metanolo al 2,5% durata 1 ora (viola: 60°C, verde: 80°C, giallo: 40°C).

Nello studio del tempo di metilazione è stato osservato che la quantità di acidi grassi recuperati è aumentata con un tempo di reazione maggiore di 2 ore. La stessa situazione si è verificata nello studio del tempo di estrazione.

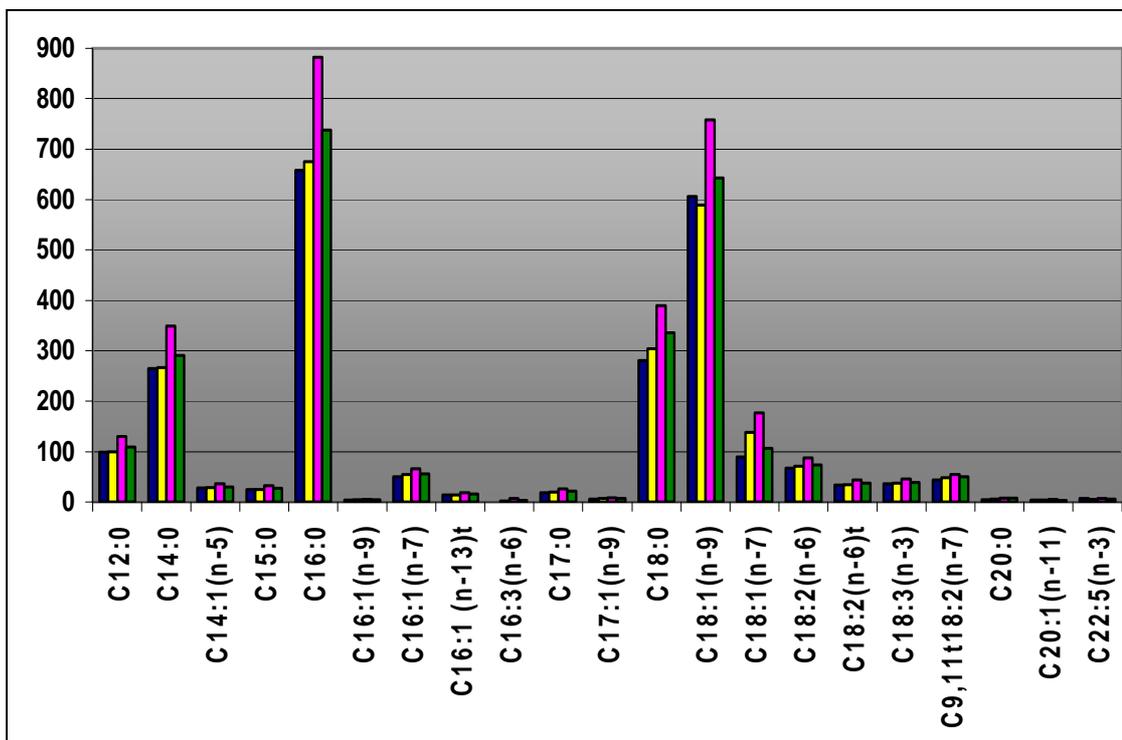


Fig. 45 Grafico della variazione quantitativa dei valori di acidi grassi (mg/100g) in campioni di latte dovuta ai diversi effetti del tempo di estrazione dopo 1,3,12 e 24 ore in soluzione acido solforico/metanolo al 2,5% a 3-4°C (blu: 1 ora di estrazione, giallo: 3 ore, rosa: 12 ore, verde: 24 ore).

I risultati di questo lavoro dimostrano che la quantità di campione, la temperatura di derivatizzazione e tempi di estrazione e derivatizzazione sono importanti parametri per la determinazione della composizione in acidi grassi nel latte.

Dal confronto con il metodo standard che consisteva nell'estrazione della matrice grassa con metodo *Bligh e Dyer* seguita da idrolisi in soluzione di KOH/metanolo e, infine, metilazione in soluzione di BF<sub>3</sub>/metanolo, si

è visto che nel micrometodo studiato la quantità di acidi grassi estratti è stata maggiore.

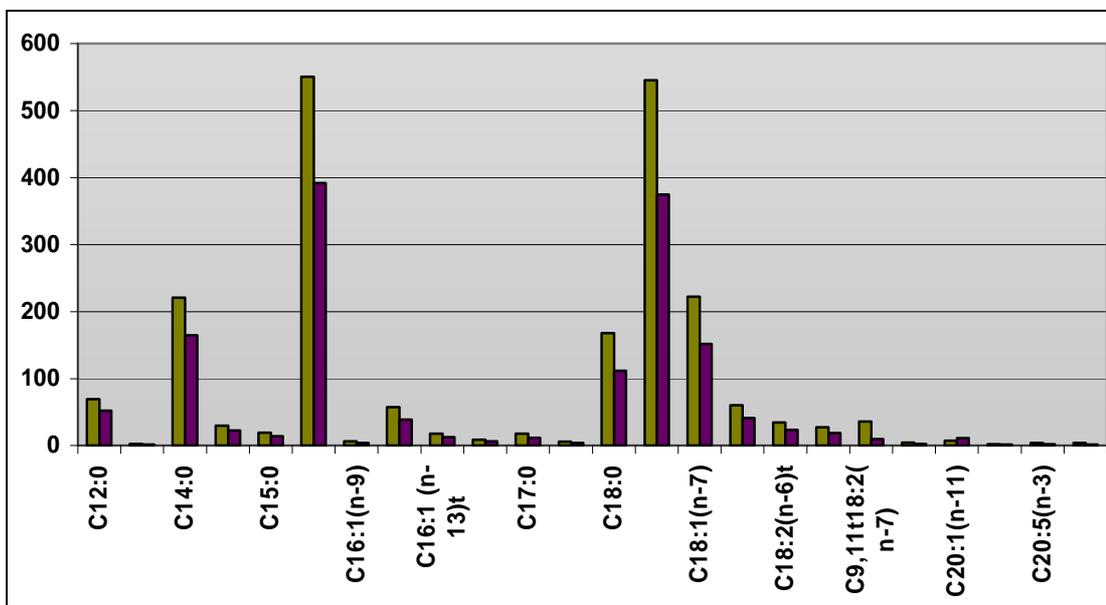
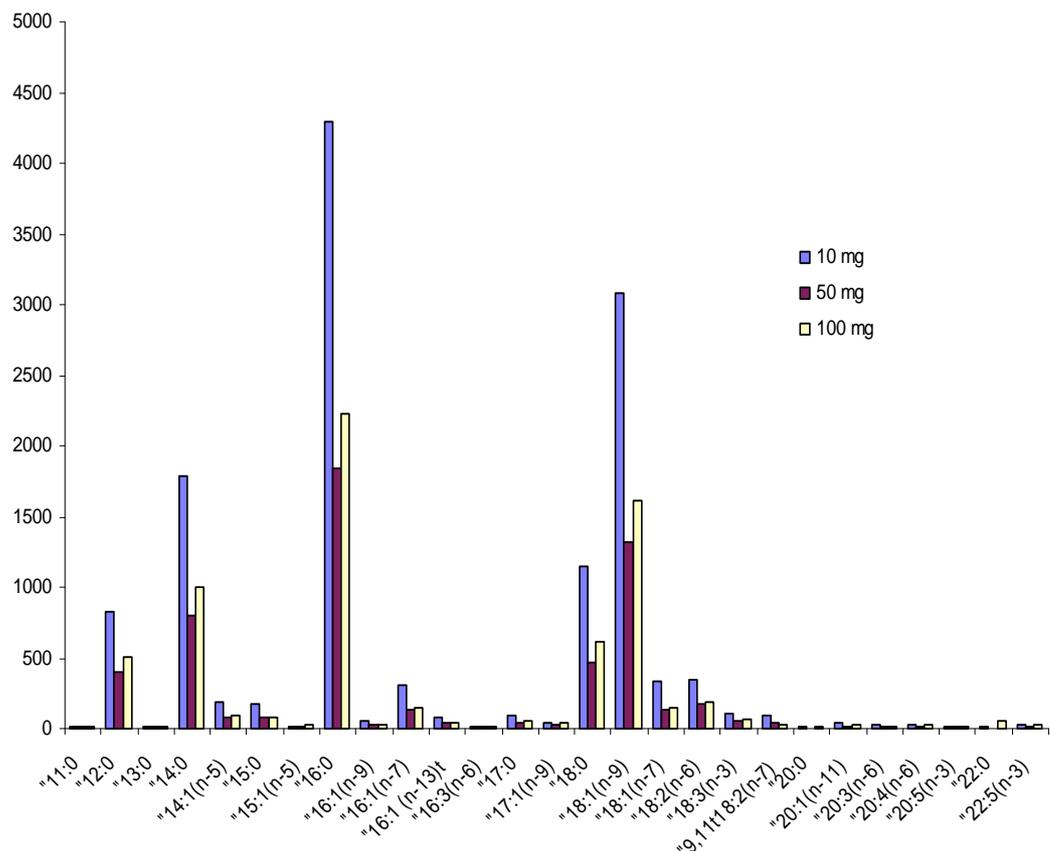
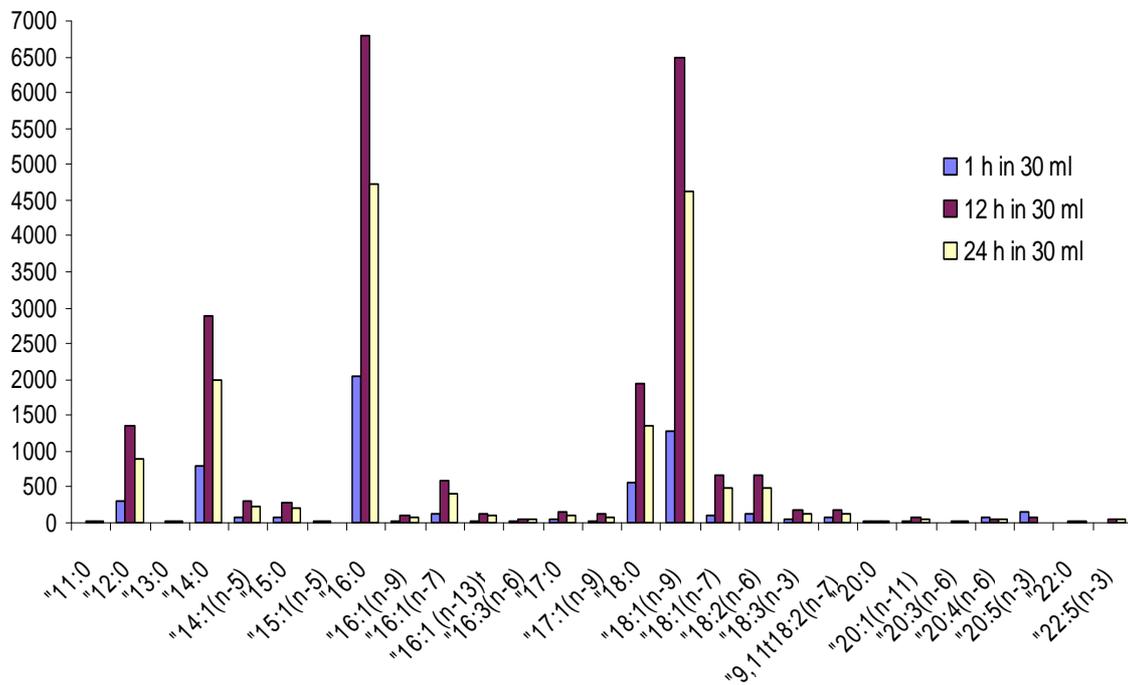


Fig. 46 Confronto dei valori di alcuni acidi grassi (mg/100g) in campioni di latte tra il micrometodo e il metodo standard (marrone: micrometodo, viola: metodo standard)

**MICROMETODO PER IL FORMAGGIO:** Il micrometodo messo a punto è risultato adatto anche per la determinazione quantitativa degli acidi grassi del formaggio. La quantità migliore è risultata 10 mg di formaggio in 30 ml di acido solforico/metanolo al 2,5%, tenuta per 12 ore a 3-4 ° C e le migliori condizioni di metilazione sono state: 2 ore in un bagno d'acqua a 60°C. I risultati hanno indicato che non ci sono differenze statisticamente significative tra il micrometodo e il metodo standard.



**Fig. 47** Grafico della variazione quantitativa dei valori di acidi grassi (mg/100g) in campioni di formaggio dovuta all'utilizzo di differenti quantità (milligrammi) di campione dopo 12 ore di estrazione e metilati per 2 ore a 60 °C.



**Fig. 49** Grafico della variazione quantitativa dei valori di acidi grassi (mg/100g) in campioni di formaggio dovuta al tempo di estrazione (1-12-24h) in 30 ml di soluzione acido solforico/metanolo al 2,5% e metilati per 2 ore a 60 °C.

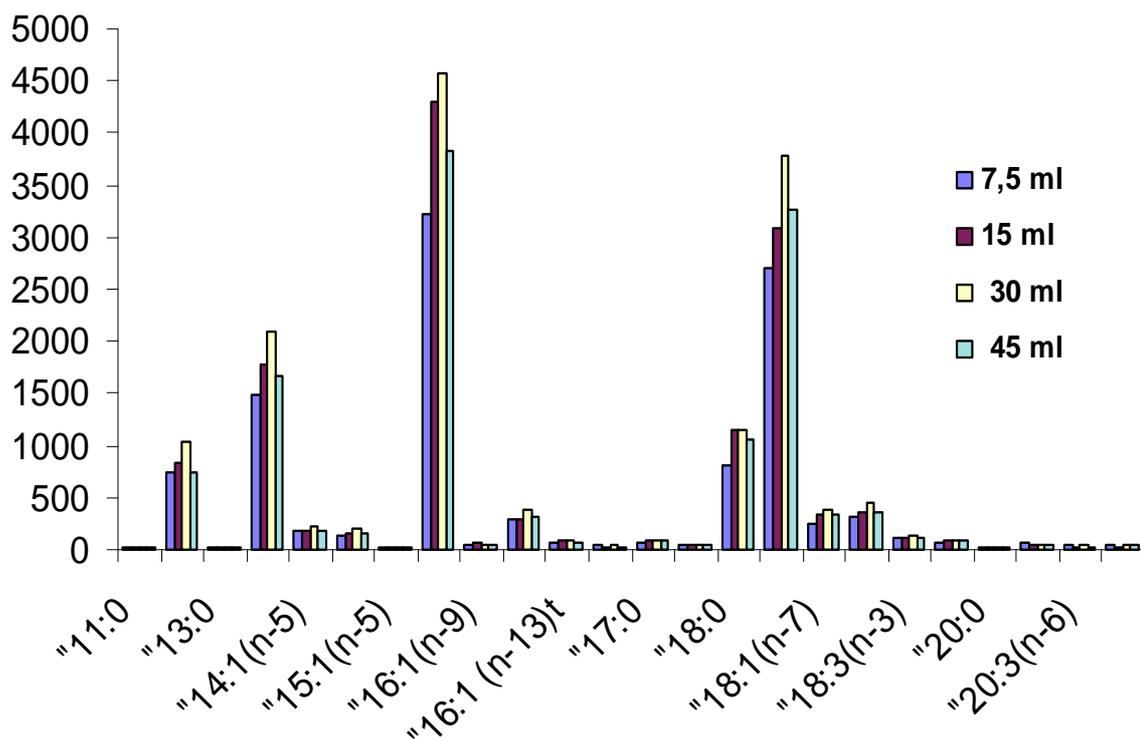


Fig. 48 Grafico della variazione quantitativa dei valori di acidi grassi (mg/100g) in campioni di formaggio dovuta alla quantità (ml) di soluzione acido solforico/metanolo al 2,5%.

Considerato che la maggior parte dei metodi per l'estrazione di acidi grassi richiedono grandi quantità di solventi organici pericolosi e una serie di passaggi lunghi, laboriosi e costosi questo micrometodo per la determinazione della composizione di acidi grassi nel latte e nel formaggio e la sua applicazione per la valutazione del profilo acido in latte e prodotti lattiero caseari può sicuramente, data la sua rapidità, semplicità e convenienza, risultare utile strumento di analisi.

## BIBLIOGRAFIA

A. AbuGhazaleh, D. J. Schingoethe, A. R. Hippen and K. F. Kalscheur. Milk Conjugated Linoleic Acid Response to Fish Oil Supplementation of Diets Differing in Fatty Acid Profiles J. Dairy Sci. 86:944-953 Association of Official Analytical Chemists. 1995.

A. Nudda, M. A. McGuire, G. Battacone, and G. Pulina Seasonal Variation in Conjugated Linoleic Acid and Vaccenic Acid in Milk Fat of Sheep and its Transfer to Cheese and Ricotta J. Dairy Sci. 88:1311–1319.

Ana P. Carvalho AND F. Xavier Malcata Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Chromatographic Analysis of Marine Lipids: Insight J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 5049-5059.

Banni S., Murru E., Angioni E., Carta G., Melis M.P., Conjugated linoleic acid isomers (CLA): good for everything?, Sci. Aliments 22 (2002) 371–380.

Barbara K Herbel, Michelle K McGuire, Mark A McGuire, and Terry D Shultz Safflower oil consumption does not increase plasma conjugated linoleic acid concentrations in humans1. Am J Clin Nutr 1998;67:332–7.

Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 1959 Aug;37(8):911-7.

Braden LM, Carroll KK. Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. Lipids. 1986 Apr;21(4):285-8.

Brody AL (1996) In: Modified atmosphere packaging (Envasado en atm\_sferas modificadas). Acribia SA, Zaragoza, Spain.

Brody AL (ed) (1989) In: Controlled/modified atmosphere/ vacuum packaging of foods. Food and Nutrition Press, Trumbull, CT.

Brun Bellut J., Laurent F., Vignon B., Effetti della alimentazione sulla composizione del latte, Latte 10 (1985) 314–326.

Bugaud C., Buchin S., Coulon J.B., Hauwuy A., Dupont D., Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk, Lait 81 (2001) 401–414.

Bugaud C., Buchin S., Noël Y., Tessier L., Pochet S., Martin B., Chamba J.F., Relationships between Abondance cheese texture, its composition and that of milk produced by cows grazing different types of pastures, *Lait* 81 (2001) 593–607.

C. Cahu , E Salen , and M. de Lorgeril Farmed and wild fish in the prevention of cardiovascular diseases: Assessing possible differences in lipid nutritional values *Nutr Metab Cardiovasc Dis* (2004) 14:3441.

Carlos de Blas Beorlegui .Cambios en el perfil de ácidos grasos en productos animales en relación con la alimentación animal y humana. importancia del ácido linoleico conjugado. 1. RUMIANTES BARCELONA, 22 y 23 de Noviembre de 2004 XX CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA.

Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M., Doreau M., Agabriel J., Givens I., Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids, *Ann. Zootech.* 49 (2000) 181–205.

Christie, W. W. 1984. *Lipid Analysis*. Pergamon Press, London.

Christie, W. W. 1990b. Preparation of Methyl Esters-Part 2. *Lipid Technol.* 2:79-80.

Christie, W. W. 1994a. Why I Dislike Boron Trifluoride-Methanol. *Lipid Technol.* 6 :66-68.

Christie, W. W., R.C Noble, and J.H. Moore. 1970 Determianation of lipid classes by gas chromatographic procedure. *Analyst.* 95:940-945.

Collomb M., Bütikofer U., Spahni M., Jeangros B., Bosset J.O., Composition en acides gras et en glycérides de la matière grasse du lait de vache en zone de montagne et de plaine, *Sci. Aliments* 19 (1999) 97–110.

Colombari G., Zapparoli G.A., Influence on the forage preservation system on acid composition of milk fat, *Sci. Tec. Latt. Casearia* 40 (1989) 299–310.

Connor, W.E.; Neuringer, M.; Reisbick, Essential fatty acids: the importance of n-3 fatty acids in the retina and brain *S. Scandinavian Journal of Nutrition Supplement.*

Daniel Munro, Donald W. Thomas The role of polyunsaturated fatty acids in the expression of torpor by mammals: a review *Zoology* 107 (2004) 29–48.

Dhiman T.R., Anand G.R., Satter L.D., Pariza M.W., Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets, *J. Dairy Sci.* 82 (1999) 2146–2156.

Fellin A., Barcarolo R., Tutta C., Tapparo F., Tapparo M., Experiments of fat addition in cows feeding and changes in milk fat composition, *Sci. Tec. Latt. Casearia* 40 (1989) 288–298.

G. Foxall, S. Leek and S. Maddock Cognitive Antecedents of Consumers' Willingness to Purchase Fish Rich in Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) *Appetite*, 1998, 31, 391–402.

Gerson T., Shortland F.B., Wilson G.F., Reid C.W.S., Origin of glyceride fatty acids in cow milk fat, *J. Dairy Sci.* 51 (1968) 356–361.

Gibbs PA, Davies AR, Hart RJ, Church PN, Slade A. (1993) Improving the safety and quality of meat and meat products by modified atmospheres and assessment by novel methods. FLAIR Project 89055, Final Report

Giuseppe Zeppa, Manuela Giordano, Vincenzo Gerbi, Marco Arlorio Fatty acid composition of Piedmont "Ossolano" Cheese Lait 83 (2003) 167–173.

Grummer R.R., Effect of feed on the composition of milk fat, *J. Dairy Sci.* 74 (1991) 3244–3257.

Ha Y.L., Grimm N.K., Pariza M.W., Newly recognized anticarcinogenic fatty acids:

Henninger M., Ulberth F., Trans fatty acid content of bovine milk fat *Milchwissenschaft* 49 (1994) 555–558.

Hill M.J., Dietary fat and human cancer (A review), *Anticancer Res.* 7 (1987) 281–292.

HO Bang, J Dyerberg and HM Sinclair The composition of the Eskimo food in north western Greenland *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol 33, 2657-2661.

identification and quantification in natural and processed cheeses, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 75–81.

Innocente N., Praturlon D., Corradini C., Fatty acid profile of cheese produced with milk from cows grazing on mountain pastures, *Ital. J. Food Sci.* 14 (2002) 217–224.

ISO, International standard. Animal and vegetable fats and oils. Preparation of methyl esters of fatty acids. ISO 5509:2000(E), International Organisation for Standardisation, Geneve, Switzerland, 2000.

J.G. Bell, D. R. Tocher, F. M. MacDonald and J. R. Sargent Diets Rich in Eicosapentaenoic Acid and  $\gamma$ -Linolenic Acid Affect Phospholipid Fatty Acid Composition and Production of Prostaglandins E1, E2 and E3 in Turbot

(*Scophthalmus maximus*), a Species Deficient in A5 Fatty Acid Desaturase Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids (1995) 53, 279-286.

Jahangiri A., Leifert W.R., McMurchie E.J., Omega-3 polyunsaturated fatty acids: recent aspects in relation to health benefits, Food Australia 54 (2002) 74-77.

Jenkins T.C., Lipid metabolism in the rumen, J. Dairy Sci. 76 (1993) 3851-3863.

Jiang J., Bjoerck L., Fonden R., Emanuelson M., Occurrence of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen, J. Dairy Sci. 79 (1996) 438-445.

K. Raynal-Ljutovaca,, G. Lagriffoul, P. Paccard, I. Guillet, Y. Chilliard Composition of goat and sheep milk products: An update Small Ruminant Research 79 (2008) 57-72.

Kelly M.L., Kolver E.S., Bauman D.E., Amburgh M.E., Muller L.D., Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows, J. Dairy Sci. 81 (1998) 1630-1636.

Kepler C.R., Tove S.B., Biohydrogenation of unsaturated fatty acids, J. Biol. Chem. 242 (1967) 5686-5692.

Kepler C.R., Tucker W.P., Tove S.B., Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. V. Stereospecificity of proton addition and mechanism of action of linoleic acid *\_12-cis, \_11-trans-*isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*, J. Biol. Chem. 246 (1971) 2765-2771.

L. Alonso, J. Fontecha, L. Lozada, M. J. Fraga, and M. Jua' Rez J Fatty Acid Composition of Caprine Milk: Major, Branched-Chain, and Trans Fatty Acids Journal of Dairy Science Vol. 82, No. 5, 1999.

Lin H., Boylston T.D., Chang M.J., Luedecke L.O., Shultz T.D., Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products, J. Dairy Sci. 78 (1995) 2358-2365.

Lin H., Boylston T.D., Luedecke L.O., Shultz T.D., Conjugated linoleic acid content of Cheddar-type cheeses as affected by processing, J. Food Sci. 64 (1999) 874-878.

M. Addis, A. Cabiddu, G. Pinna, M. Decandia, G. Piredda, A. Pirisi, and G. Molle Milk and Cheese Fatty Acid Composition in Sheep Fed Mediterranean Forages with Reference to Conjugated Linoleic Acid *cis-9,trans-11* J. Dairy Sci. 88:3443-3454.

Maria Luisa Cortesi, Università di Napoli Federico II , Facoltà di Medicina Veterinaria, Nuove tecnologie di packaging per l'estensione della shelf life dei

prodotti della pesca alla luce della nuova regolamentazione europea, 5° Salone Internazionale delle Tecnologie e dei Prodotti per la Pesca per il Mediterraneo, Rimini, 5 febbraio 2006.

Maria Luisa Cortesi, Università di Napoli Federico II, Facoltà di Medicina Veterinaria, Ricerca e innovazioni di prodotti e di processi. X Biennale Internazionale del Mare, Napoli, Castel dell'Ovo, 4 maggio 2006.

Martin A., Nutritional recommendations for the French population. The “Apports Nutritionnels Conseillés” (ANCs), *Sci. Aliments* 21 (2001) 309–460.

Murru N., Tozzi M., Barile M., Sosaro D., Aprea G., Confezionamento in atmosfera protettiva di filetti di spigole provenienti da impianto di maricoltura. ATTI XVI Convegno Nazionale Associazione Italiana Veterinari Igienisti, Bari, 22-24 giugno 2006.

N. M. Jeffery, E. A. Newsholme, P. C. Calder Level of polyunsaturated fatty acids and the n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acid ratio in the rat diet alter serum lipid levels and lymphocyte functions Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (1997) 57(2), 149-160.

Nikolaos K. Andrikopoulou\*, Nick Kalogeropoulou, Anastasia Zervaa, Urania Zervaa, Maria Hassapidou, Vassilios M. Kapoulas Evaluation of cholesterol and other nutrient parameters of Greek cheese varieties *Journal of Food Composition and Analysis* 16 (2003) 155–167.

Official Methods of Cheese Analysis. D.M 21.04.1986. Supplemento Ordinario Gazzetta Ufficiale n. 299 del 2.10.1986.

Palmquist D.L., Jenkins T.C., Fat in lactation rations: Review, *J. Dairy Sci.* 63 (1980) 1–14.

Parodi P.W., Conjugated linoleic acid: an anticarcinogenic fatty acid present in milk fat, *Aust. J. Dairy Technol.* 49 (1994) 93–97.

Polan C.E., McNeill J.J., Tove S.B., Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria, *J. Bacteriol.* 88 (1964) 1056–1064.

Prandini A., Geromin D., Conti F., Masoero F., Piva A., Piva G., Survey on the level of conjugated linoleic acid in dairy products, *Ital. J. Food Sci.* 13 (2001) 243–253.

Precht D., Molckentin J., Effect of feeding on conjugated *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid and other isomer of linoleic acid in bovine milk fats, *Nahrung* 41 (1997) 330–335.

Robert G. Ackman The gas chromatograph in practical analyses of common and uncommon fatty acids for the 21st century *Analytica Chimica Acta* 465 (2002) 175–192.

Robert G. Jensen Invited Review: The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000 *J. Dairy Sci.* 85:295–350.

Susan W. Christopherson and R. L. Glass Preparation of Milk Fat Methyl Esters by Alcoholysis in an Essentially Nonalcoholic Solution *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*.

Tozzi M., Murru N., Barile M., Sosaro D., Aprea G., Cortesi M. L. Confezionamento in atmosfera protettiva di filetti di orate provenienti da impianto di maricoltura. *ATTI XVI Convegno Nazionale Associazione Italiana Veterinari Igienisti, Bari, 22-24 giugno 2006.*

W. N. Sawaya, W. J. Safi, A. F. al-shalhat, and M. M. al-mohammad Chemical Composition and Nutritive Value of Goat Milk *Journal of Dairy Science* Vol. 67, No. 8, 1984.

Werner S.A., Luedecke L.O., Shultz T.D., Determination of conjugated linoleic acid content and isomer distribution in three Cheddar-type cheeses: effects of cheese cultures, processing and aging, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1817–1821.

Wolff R.L., Bayard C.C., Fabien R.J., Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on trans-18:1 acids. Application to the study of seasonal variations in French butters, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72 (1995) 1471–1483.

Wu Z., Ohajuruka O.A., Palmquist D.L., Ruminant synthesis. Biohydrogenation and digestibility of fatty acids by dairy cows, *J. Dairy Sci.* 74 (1991) 3025–3034.

Y. Chilliard, A. Ferlay, J. Rouel, and G. Lamberet A Review of Nutritional and Physiological Factors Affecting Goat Milk Lipid Synthesis and Lipolysis *J. Dairy Sci.* 86:1751–1770.

Zegarska Z., Paszczyk B., Borejszo Z., Trans fatty acids in milk fat, *Polish J. Food Nutr. Sci.* 5 (1996) 89–97.