

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DIPARTIMENTO DI SCIENZA DEGLI ALIMENTI



Tesi di Dottorato di Ricerca

Scienze e Tecnologie delle Produzioni
Agro-Alimentari

XVIII ciclo

**Interazioni tra olio extravergine di oliva e matrici
alimentari nei processi di conservazione e cottura**

Tutor
Prof. Raffaele Sacchi

Dottoranda
Dr. ssa Cristina Parisini

Coordinatore
Prof. Salvatore Spagna Musso

Ai miei genitori...

“...non si è mai fatto nulla di grande
senza entusiasmo...”

Ralph W. Emerson

INDICE

INDICE	I
CAPITOLO 1	1
INTERAZIONI TRA OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA E ALIMENTO DURANTE IL PROCESSO DI FRITTURA	1
1.1 INTRODUZIONE	1
1.1.1 TIPOLOGIE DI FRITTURA	2
1.1.2 IL PROCESSO DI FRITTURA	2
<i>Trasferimento di calore durante la deep-frying</i>	3
<i>Trasferimento di massa durante la deep-frying</i>	3
1.1.3 MODIFICAZIONI DELL'OLIO DURANTE LA FRITTURA	4
1.1.4 LA CHIMICA DELLA FRITTURA	5
<i>Idrolisi</i>	5
<i>Ossidazione</i>	6
<i>Polimerizzazione</i>	9
<i>Ciclizzazione</i>	9
1.1.5 FATTORI CHE INFLUENZANO LA STABILITÀ DEGLI OLI VEGETALI ALL'OSSIDAZIONE	9
<i>Effetto della temperatura</i>	9
<i>Attività dell'acqua</i>	10
<i>Gli antiossidanti</i>	10
1.1.6 EFFETTI NUTRIZIONALI E FISIOLGICI DEI GRASSI USATI PER FRIGGERE	12
1.1.7 ALIMENTI PREFRITTI SURGELATI E FRITTURA	14
<i>Il processo di produzione delle patate prefritte/surgelate</i>	14
<i>Fattori che influenzano la qualità delle patate prefritte/surgelate</i>	15
1.2 SCOPI	16
1.3 MATERIALI E METODI	17
1.3.1 CAMPIONAMENTO	17
1.3.2 DISEGNO SPERIMENTALE	18
1.3.3 DETERMINAZIONI ANALITICHE	18
1.3.3.1 Determinazione dell'acidità	18
1.3.3.2 Determinazione del numero di perossidi	19
1.3.3.3 Analisi spettrofotometrica	19
1.3.3.4 Determinazione della composizione acidica dell'olio	20
1.3.3.5 Determinazione degli acidi grassi a corta catena	21
1.3.3.6 Estrazione della componente fenolica dell'olio	22
1.3.3.7 Analisi HPLC/DAD delle sostanze fenoliche	22
1.3.3.8 Estrazione dei lipidi dalle patate (Figura 1.3.3)	23
1.3.3.9 Determinazione della composizione acidica delle patate (vd. § 1.3.3.4)	23
1.3.3.10 Estrazione dei composti fenolici dalle patate (Figura 1.3.4)	23
1.3.3.11 Frazionamento dell'estratto fenolico mediante SPE	24
1.3.3.12 Analisi HPLC/DAD delle sostanze fenoliche estratte dalle patate	25
1.3.3.13 Analisi LC/MS con ionizzazione ES	26
1.3.3.14 Determinazione dell'umidità	26
1.3.3.15 Determinazione del contenuto in lipidi totali	27
1.4 RISULTATI E DISCUSSIONE	28
1.4.1 CONTENUTO IN UMIDITÀ ED IN LIPIDI TOTALI NELLE PATATE PRIMA E DOPO FRITTURA	28
1.4.2 EVOLUZIONE DEL PROFILO LIPIDICO	30
1.4.3 EVOLUZIONE DEGLI ANTIOSSIDANTI FENOLICI NELL'OLIO EXTRA VERGINE DI OLIVA IN FRITTURA	37

1.4.4	INTERAZIONE TRA GLI ANTIOSSIDANTI FENOLICI DELL'OLIO EXTRA-VERGINE E L'ALIMENTO FRITTO	42
1.4.5	IDENTIFICAZIONE MEDIANTE LC/MS DEI COMPOSTI FENOLICI MIGRATI DURANTE LA FRITTURA	46
1.5	CONCLUSIONI	51
	BIBLIOGRAFIA	52
	CAPITOLO 2	55
	INTERAZIONI OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA E ALIMENTO NELLE CONSERVE A BASE DI PRODOTTI ITTICI	55
2.1	INDRODUZIONE	55
2.1.1	IL CONSUMO DI PRODOTTI ITTICI SUL TERRITORIO NAZIONALE	55
2.1.2	IL PESCE AZZURRO	55
	<i>Trachurus trachurus (Linneo, 1758)</i>	56
	<i>Engraulis encrasicolus (Linneo, 1758)</i>	57
2.1.3	LA QUALITÀ NUTRIZIONALE DEI PRODOTTI ITTICI: GLI ACIDI GRASSI ω -3	58
2.1.4	I LIPIDI DEL PESCE: LIPOLISI ED OSSIDAZIONE	59
2.1.5	L'OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA E LA SUA COMPONENTE ANTIOSSIDANTE	61
2.2	SCOPI	65
2.3	MATERIALI E METODI	66
2.3.1	CAMPIONAMENTO	66
	2.3.1.1 <i>Sistema modello</i>	66
	2.3.1.2 <i>Sistema reale</i>	66
2.3.2	DISEGNO SPERIMENTALE	66
2.3.3	DETERMINAZIONI ANALITICHE	67
	2.3.3.1 Estrazione dei lipidi	67
	2.3.3.2 Determinazione della composizione acidica (vd. §1.3.3.4)	67
	2.3.3.3 Identificazione degli acidi grassi mediante GC/MS	67
	2.3.3.4 Determinazione della composizione in classi lipidiche	68
	2.3.3.5 Analisi spettrofotometriche	68
	2.3.3.6 Determinazione del numero di perossidi nel muscolo di pesce	68
	2.3.3.7 Valutazione della per ossidazione lipidica in campioni di pesce mediante TBA test	69
	2.3.3.8 Determinazione dell'emoglobina nel muscolo di pesce	70
2.4	RISULTATI E DISCUSSIONE	71
	2.4.1 EFFETTO DELL'AGGIUNTA DI ANTIOSSIDANTI SULL'OSSIDAZIONE DI MUSCOLO DI SURO (<i>TRACHURUS TRACHURUS L.</i>)	71
2.5	CONCLUSIONI	74
	BIBLIOGRAFIA	75

CAPITOLO 1

INTERAZIONI TRA OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA E ALIMENTO DURANTE IL PROCESSO DI FRITTURA

1.1 INTRODUZIONE

La frittura in immersione di olio (*deep-frying* o *deep fat frying*) è un processo di cottura ampiamente utilizzato sia a livello industriale che a livello domestico per la preparazione di un elevato numero di prodotti (patate, carne, pesce, *snacks*, etc.). L'impiego di tale metodo di preparazione degli alimenti è in continuo aumento nonostante i salutisti spingano verso una riduzione del consumo di olio nella dieta del mondo occidentale (Orthoefer *et al.*, 1996). I grassi conferiscono agli alimenti particolari caratteristiche organolettiche che ne influenzano la palatabilità e rendono l'alimento accettabile dal punto di vista del consumatore (Saguy *et al.*, 1998). I cibi ben fritti sono contraddistinti da un aspetto secco, non unto, da un colore dorato, da un *flavour* gustoso, da una superficie croccante e da un cuore tenero e umido; proprio grazie a queste caratteristiche, nonché alla rapidità di preparazione, che la frittura ha acquistato una certa importanza nell'alimentazione moderna, soprattutto nel caso della ristorazione collettiva (Saguy *et al.*, 1998; Raoult-Wack, and Bricas, 1998).

Il processo di frittura, nonostante la sua apparente semplicità, è abbastanza complesso a causa dell'accoppiamento tra trasferimento di calore e di massa tra l'alimento e il mezzo di frittura. (Vitrac *et al.*, 2000) Il sistema si complica ulteriormente a causa dei cambiamenti continui della composizione dell'alimento e del mezzo di frittura dovuti al progressivo deterioramento dell'olio. Inoltre durante la frittura avvengono ulteriori modificazioni quali la gelatinizzazione dell'amido, la reazione di Maillard, la denaturazione delle proteine e una diminuzione dell'umidità dell'alimento. Tali modificazione si manifestano con un rigonfiamento del prodotto, la formazione di una crosta sottile, la comparsa di un colore dorato, e di un gradevole sentore di fritto. La crosta è la principale responsabile della croccantezza dei un prodotto fritto e gioca un ruolo fondamentale nell'assorbimento di olio.

Durante il riscaldamento o il processo di frittura, inoltre, l'olio subisce una serie di reazioni complesse come autossidazione, polimerizzazione, termossidazione, isomerizzazione, ciclizzazione e idrolisi. Tali modificazioni, oltre ad influire sulla qualità organolettica e nutrizionale dell'alimento, provocano la formazione di composti rivelatisi altamente nocivi per l'organismo, i quali possono inibire la funzionalità di enzimi, distruggere le vitamine, provocare irritazioni gastrointestinali e/o essere potenziali mutageni (Frankel, 1984). È stato osservato che le reazioni chimiche che avvengono durante il processo di frittura sono diverse a seconda che sia presente o meno l'alimento. (Kochhar e Gertz, 2004).

L'entità delle alterazioni che avvengono durante la frittura, infatti, dipende da diversi fattori, alcuni dei quali sono strettamente collegati al processo stesso, come la temperatura e la durata del trattamento, l'impiego di una frittura continua o discontinua, etc.; altri riguardano l'alimento sottoposto al trattamento, quindi la sua composizione (umidità, lipidi, proteine); altri ancora dipendono dall'olio o dal grasso usato per friggere, dalla sua qualità iniziale, dal grado di insaturazione, etc. (Varela, 1985). In particolare, riguardo alla resistenza all'ossidazione dei diversi oli e grassi impiegati, è stato dimostrato che la presenza di quantità cospicue di acidi grassi polinsaturi è strettamente correlata con la velocità delle degradazioni ossidative (Frankel, 1991).

1.1.1 TIPOLOGIE DI FRITTURA

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

- ☞ la **frittura industriale**, utilizzata per prodotti fritti con una *shelf-life* prolungata (*snacks*), è un processo continuo in cui l'alimento viene immerso in olio vegetale di media qualità, nella maggior parte dei casi olio di palma. In questa tipologia di frittura l'olio non viene sostituito frequentemente, ma semplicemente rabboccato.
- ☞ la **frittura da rosticceria** è un processo semi-continuo in cui vengono alternati periodi di lavoro a periodi di "riposo" dell'olio. In questa tipologia di frittura l'olio viene sostituito almeno una volta alla settimana.
- ☞ la **frittura domestica** è un processo discontinuo che prevede l'utilizzazione di minime quantità di olio (1-2 litri), eliminato in genere subito dopo il processo.

1.1.2 IL PROCESSO DI FRITTURA

Il processo di frittura è un'operazione complessa che implica temperature elevate, cambiamenti strutturali significativi sia sulla superficie che nel cuore dell'alimento fritto, e un simultaneo trasferimento di calore e di massa risultante in un flusso in direzioni opposte di vapore acqueo e di olio (Kochhar e Gertz, 2004).

La frittura di un alimento completamente immerso in un bagno di olio avviene solitamente portando il grasso circostante ad una temperatura di circa 180-200°C, in presenza di ossigeno e di vapore acqueo proveniente dall'alimento stesso.

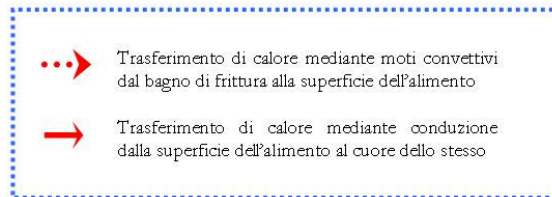
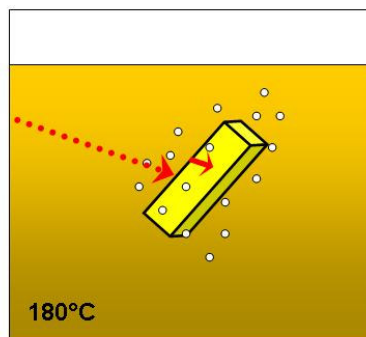
In queste condizioni si osserva un susseguirsi di reazioni, quali:

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

Trasferimento di calore durante la *deep-frying*

Durante il processo di frittura degli alimenti si verifica un trasferimento di energia dalla sorgente di calore all'olio e da questo alla superficie dell'alimento in esso immerso mediante moti convettivi e, infine, dalla superficie dell'alimento al suo interno mediante conduzione. Quest'ultima fase del processo è legata essenzialmente all'azione dell'acqua che, tra i costituenti dell'alimento, è il più efficace conduttore di calore (Orthofer *et al.*, 1996).

L'acqua, inoltre, risulta essere importante in quanto durante la frittura, evaporando, impedisce all'alimento di superare la temperatura di 100°C evitando una possibile carbonizzazione dell'alimento stesso che potrebbe verificarsi alle temperature d'azione del bagno d'olio (Blumenthal, 1991).

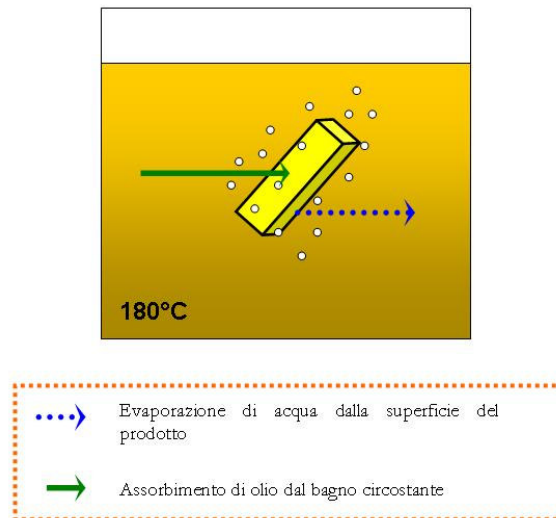


Trasferimento di massa durante la *deep-frying*

L'immersione di un alimento freddo nel bagno di frittura provoca un immediato abbassamento della temperatura di processo dovuto all'evaporazione dell'acqua dalla superficie del prodotto. La formazione di vapore a partire da acqua richiede, infatti, energia termica che viene fornita dall'olio circostante (Blumenthal, 1991).

Contemporaneamente alla continua evaporazione di acqua l'olio caldo aderisce alla superficie dell'alimento e, successivamente, penetra nell'alimento stesso (Saguy *et al.*, 1998).

L'assorbimento di una maggiore o minore quantità di olio da parte dell'alimento dipende da diversi fattori alcuni dei quali sono strettamente legati al processo stesso come la temperatura e la durata della frittura; altri riguardano proprietà dell'alimento quali la forma, la composizione o le modificazioni subite dal prodotto durante il trattamento (Dobarganes *et al.*, 2000).



L'assorbimento di olio può essere descritto da due diversi meccanismi (Saguy e Dana, 2003):

- a) in seguito alla perdita di acqua, sottoforma di vapore, da parte dell'alimento si hanno delle modificazioni della struttura dello stesso con formazione di pori attraverso i quali l'olio viene assorbito. Il massimo assorbimento avviene nei primi 20 secondi di frittura (Moreira *et al.*, 1997);
- b) in seguito alla formazione di vapore a partire dall'acqua presente nell'alimento si crea un gradiente di pressione che evita il completo assorbimento di olio. Durante il raffreddamento la pressione di vapore interna all'alimento diminuisce a causa di un processo di condensazione. Per tale motivo l'olio penetra nell'alimento (Ufheil e Escher, 1996). La profondità di assorbimento è limitata ad 1 mm dalla superficie (Saguy *et al.*, 1997).

Quando la frittura si esegue correttamente, le conseguenze della penetrazione del grasso di frittura nell'alimento sono, infatti, da considerarsi positive. Il tempo d'azione reale del grasso sull'alimento è molto breve; l'aggressione ai componenti termolabili dell'alimento è minore rispetto ad altre tecniche di cottura; lo scambio dell'acqua col grasso, e specialmente la formazione della crosta, aumenta considerevolmente l'appetibilità degli alimenti fritti (Moreiras-Varela *et al.*, 1988).

1.1.3 MODIFICAZIONI DELL'OLIO DURANTE LA FRITTURA

L'olio utilizzato per friggere si modifica con l'uso e se la frittura è prolungata nel tempo giunge a condizioni in cui è estremamente deteriorato. I tipi di reazioni di degradazione che avvengono durante la frittura sono: l'ossidazione, la polimerizzazione e l'idrolisi. Queste reazioni producono diversi cambiamenti fisici e chimici nell'olio: l'aumento della viscosità, la produzione di composti volatili, di composti polari e di acidi grassi liberi, lo sviluppo di colore e la tendenza dell'olio a

formare schiuma. Si verificano anche diminuzioni del numero di iodio, dell'indice di rifrazione e della tensione superficiale (Frankel, 1998).

Alcuni cambiamenti che avvengono nell'olio durante la frittura sono visibili (White, 1991). Il colore dell'olio diventa più scuro, si ha un aumento della viscosità che porta l'olio ad apparire più denso e si osserva un aumento della tendenza a formare fumo. Dal punto di vista sensoriale, cambiano l'odore e il *flavour* sia dell'olio sia degli alimenti fritti.

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

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

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

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

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

1.1.4 LA CHIMICA DELLA FRITTURA

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

- ☹ idrolisi;
- ☹ termossidazione;
- ☹ ciclizzazione;
- ☹ polimerizzazione.

Idrolisi

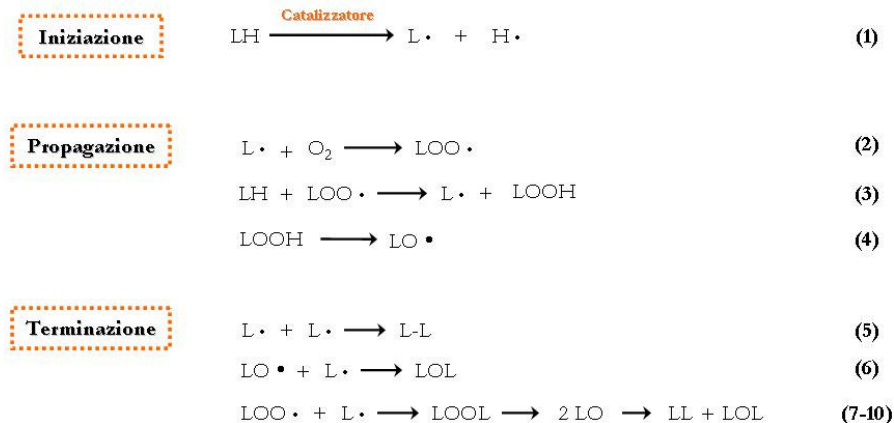
L'alimento, a contatto con l'olio caldo del bagno di frittura, rilascia una certa quantità di acqua sotto forma di vapore. È proprio la presenza del vapore che causa l'idrolisi

del grasso con formazione di digliceridi e acidi grassi liberi. I digliceridi così formati possono ulteriormente essere idrolizzati in monogliceridi e, infine, in glicerolo e acidi grassi liberi (Perkins, 1996). Gli acidi grassi sono a loro volta molto reattivi, si ossidano rapidamente e possono anche promuovere la termossidazione solubilizzando catalizzatori metallici (Frankel, 1998).

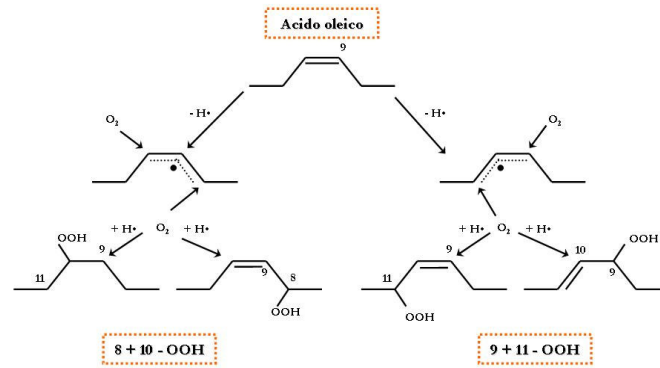
Ossidazione

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

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

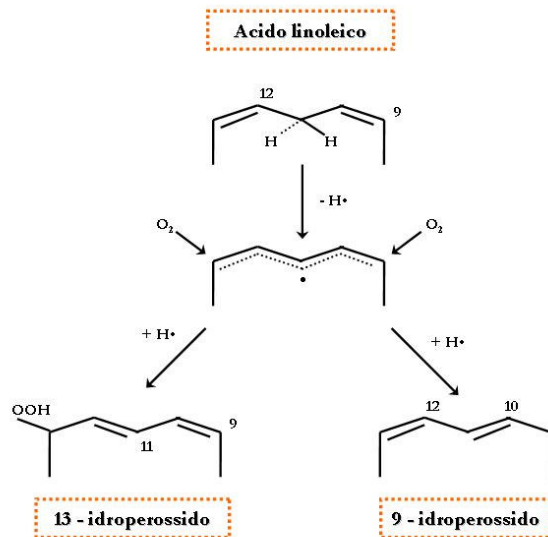


A temperature superiori a 140°C, gli idroperossidi formati nella reazione (3) si decompongono rapidamente in una moltitudine di prodotti volatili e non volatili. Nell'ossidazione degli acidi grassi monoinsaturi (acido oleico) il punto di maggiore reattività è rappresentato dal carbonio in posizione α al doppio legame. L'ossidazione comporta la rottura omolitica del legame C-H sul carbonio in posizione 8 o 11 con formazione di due radicali alilici ibridi:



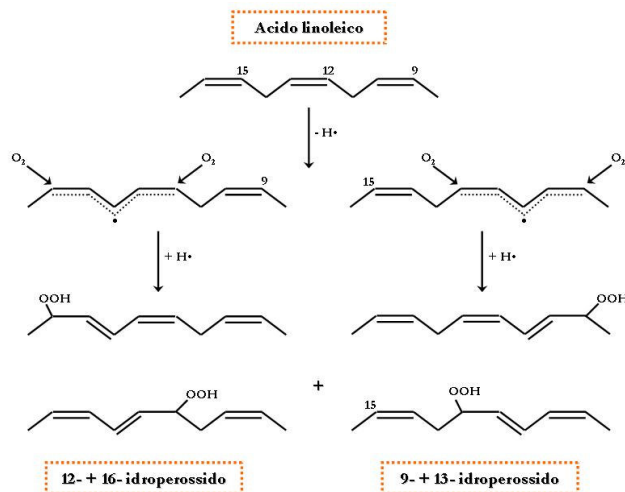
L'attacco dell'ossigeno sugli atomi di carbonio dei radicali delocalizzati dà origine a quattro radicali idroperossidici con configurazione sia *cis* che *trans*, quindi a quattro idroperossidi.

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



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

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



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

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

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

La quantificazione degli acidi grassi a corta catena può essere una misura dell'ossidazione di grassi ed oli vegetali sottoposti a riscaldamento poiché durante la frittura i composti volatili che si formano in seguito all'ossidazione lasciano continuamente l'olio a causa dell'elevata temperatura del processo e dell'influenza del vapore mentre gli acidi grassi a corta catena rimangono legati ai trigliceridi come "markers" degli intermedi di ossidazione (Dobarganes *et al.*, 1986).

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

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

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

Polimerizzazione

Durante il processo di frittura, le alte temperature e la presenza di aria, favoriscono lo sviluppo di reazioni di polimerizzazione originando un gruppo complesso di nuovi composti. Tale reazione contribuisce in maniera significativa alla formazione di composti ad alto peso molecolare soprattutto nella fase di terminazione della reazione radicalica, con formazione di dimeri ossigenati (LOL e LOOL) e dimeri non ossigenati (Dobarganes, 1998).

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

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

Informazioni significative sulle reazioni di polimerizzazione sono limitate alla formazione dei dimeri ottenuti nel primo stadio della polimerizzazione (Dobarganes, 1998).

Ad alte temperature può avvenire anche la polimerizzazione non radicalica con reazioni di Diels-Alder tra acidi grassi con dieni coniugati o tra acidi grassi coniugati e non, per formare dimeri non polari di cicloesene insaturo non sostituito.

Ciclizzazione

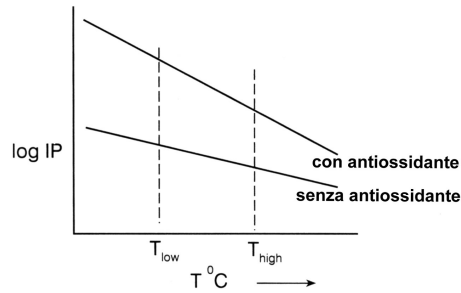
Negli oli sottoposti ad elevate temperature si assiste anche alla formazione di dimeri ciclici in seguito all'addizione intramolecolare di radicali dimerici intermedi ai doppi legami nella stessa molecola (Neff *et al.*, 1988).

1.1.5 FATTORI CHE INFLUENZANO LA STABILITÀ DEGLI OLI VEGETALI ALL'OSSIDAZIONE

Effetto della temperatura

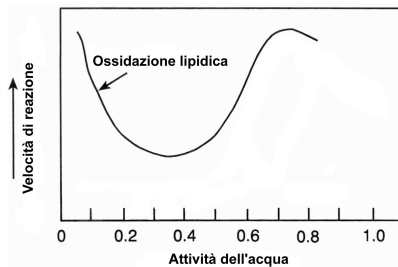
La temperatura è un fattore determinante nella modifica della velocità di ossidazione dei grassi polinsaturi. La velocità del meccanismo radicalico, infatti, aumenta all'aumentare della temperatura influenzando negativamente la *shelf-life* dell'alimento. L'effetto della temperatura durante la frittura viene accentuato, o eventualmente inibito, dalla disponibilità di ossigeno e dalla presenza nell'alimento di antiossidanti naturali. Questi ultimi, infatti, rallentano la velocità di reazione della ossidazione andando ad agire sull'energia di attivazione (Frankel, 1998).

L'effetto degli antiossidanti tende a diminuire con l'aumentare della temperatura come si evince dal grafico della successiva figura in cui si riporta il logaritmo del periodo di induzione in funzione della temperatura.



Attività dell'acqua

L'attività dell'acqua gioca un ruolo molto importante nell'ossidazione dei lipidi nell'alimento. All'aumentare del valore di attività dell'acqua, la velocità di ossidazione subisce un iniziale decremento per poi aumentare, oltre il valore 0,4 (vedi figura).



Diversi meccanismi sono stati proposti per spiegare l'effetto della *water activity* nell'ossidazione lipidica degli alimenti.

All'aumentare della disponibilità di acqua la velocità di reazione diminuirebbe a causa dello stabilirsi di legami idrogeno tra le molecole di acqua e gli idroperossidi che risulterebbero così protetti dalle decomposizioni in radicali. I catalizzatori metallici idratati, inoltre, presenterebbero una ridotta attività pro-ossidante. A valori di *water activity* più elevati, però, sembrerebbe che i catalizzatori metallici si distribuiscano maggiormente nella fase acquosa provocando un aumento della velocità di reazione; questo effetto potrebbe essere dovuto al più intimo contatto con gli idroperossidi presenti in maggior quantità nell'interfaccia olio-acqua (Frankel, 1998).

Gli antiossidanti

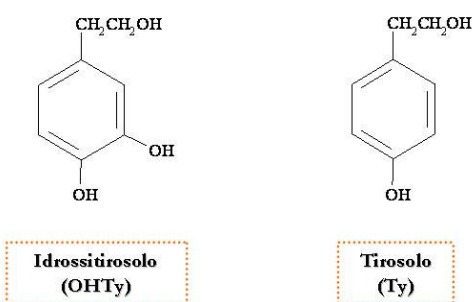
Gli antiossidanti sono molecole in grado di prevenire o ritardare l'ossidazione di un substrato, se presenti in piccola quantità rispetto a quella del substrato stesso (Berra e Rapelli, 1998).

Gli antiossidanti naturali presenti nell'olio d'oliva sono principalmente fenoli e tocoferoli.

I composti fenolici, comunemente indicati anche come "polifenoli", fanno parte della frazione polare ottenuta dall'olio mediante estrazione con metanolo-acqua (Cortesi e Fedeli, 1983).

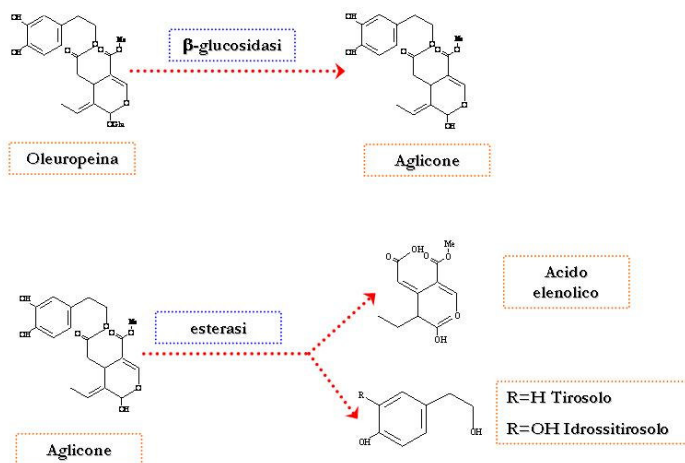
La componente fenolica è costituita da due diverse frazioni.

Nella prima frazione, semplice, che rappresenta solitamente meno del 20% dei polifenoli totali, sono stati identificati acidi fenolici (ac. caffeico, ac. vanillico, ac. siringico, ac. *p*-cumarico, ac. *o*-cumarico, etc.) e fenil-alcoli tra i quali rivestono particolare importanza, il *p*-idrossifeniletanolo (tirosolo) ed il 3,4-diidrossifeniletanolo (idrossitirosolo).

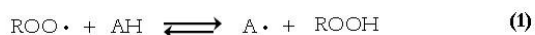


La seconda frazione, idrolizzabile, è formata da strutture complesse che costituiscono oltre l'80% della componente fenolica totale e contengono, a livello molecolare il *p*-idrossifeniletanolo e il 3,4-diidrossifeniletanolo.

Tali composti originano dall'oleuropeina, un glucoside amaro presente nel frutto per effetto di una β -glucosidasi che libera uno zucchero e dà origine agli agliconi liposolubili. Dall'idrolisi enzimatica dell'aglicone dell'oleuropeina, si liberano poi i fenoli semplici (tirosolo, idrossitirosolo), e l'acido elenolico (Montedoro *et al.*, 1993):



Le sostanze fenoliche, in quanto antiossidanti naturali, ed in particolare quelle *orto*-difenoliche, esplicano un'azione protettiva. Essi rompono la catena di reazioni radicaliche (sono detti anche "*chain-breaking antioxidants*") comportandosi da donatori di idrogeno nei confronti dei perossiradicali (ROO^\bullet) formati dagli acidi grassi insaturi (RH) durante la loro ossidazione (Frankel, 1998):



Dove:	ROO^\bullet	radicale perossidico
	AH	antiossidante
	ROOH	idroperossido
	A^\bullet	antiossidante radicalico

I radicali degli antiossidanti di questo tipo (A^\bullet) sono stabilizzati dalla delocalizzazione degli elettroni nella loro struttura. Se presenti in alte concentrazioni, questi antiossidanti possono divenire proossidanti per reversione dell'equilibrio (1).

L'interesse rivolto ai costituenti fenolici dell'olio di oliva è legato anche ad un altro aspetto importante per la qualità e cioè l'influenza da essi esercitata sulle caratteristiche organolettiche. In particolare, i fenoli complessi, contribuiscono, nel loro insieme, alla nota amaro-piccante del *fruttato*, che per un olio di qualità è un attributo estremamente positivo (Solinas, 1990).

1.1.6 EFFETTI NUTRIZIONALI E FISIOLGICI DEI GRASSI USATI PER FRIGGERE

Gli effetti fisiologici e nutrizionali dei grassi e degli oli usati per friggere sono stati oggetto di studi intensivi fin dal 1950 (Nawar, 1998). In generale, le ricerche sono focalizzate a stabilire se i grassi di frittura possano essere dannosi per la salute umana. La risposta in ogni caso non è semplice. Durante la frittura, i grassi e gli oli sono riscaldati ad alte temperature ed all'aria: il risultato è una complessa serie di reazioni che generano un ampio ordine di composti. Dal punto di vista nutrizionale, i prodotti di degradazione non volatili sono quelli più importanti poiché essi rimangono nell'olio, sono assorbiti dall'alimento, e di conseguenza ingeriti. I prodotti non volatili includono polimeri dei trigliceridi, monomeri di trigliceridi contenenti acidi grassi ossidati o ciclici e prodotti di scissione. Il grado di alterazione e il tipo di composti formati dipende principalmente dalle condizioni di riscaldamento (temperatura, tempo e durata), dall'insaturazione dell'olio e dal livello di antiossidanti. Dalla letteratura, sembra che ci sia un accordo generale sui materiali indesiderabili potenzialmente dannosi che possono prodursi durante la frittura, sebbene gli effetti biologici e i livelli di tali materiali formati attualmente sono lontani dall'essere chiari. La valutazione delle conseguenze metaboliche e tossicologiche del consumo dei grassi di frittura non è semplice, soprattutto a causa di due aspetti: la presenza di

moltissimi prodotti di reazione che rendono le valutazioni analitiche dei grassi difficili ed i problemi tipicamente associati agli esperimenti con gli animali, (es. la formulazione di una dieta bilanciata, la scelta del grado di degradazione, la determinazione di un livello appropriato d'apporto di grasso, la durata dell'alimentazione, ed in ultimo l'estrapolazione dei dati ottenuti).

Tra i molti approcci sperimentali usati, un numero considerevole di studi includono diete effettuate interamente con oli, o frazioni isolate da essi (Marquez-Ruiz e Dobarganes, 1996b).

In alternativa, altri studi sono basati su sistemi modello, usando o composti puri alterati ottenuti da sintesi o frazioni ottenute di solito dal metil linoleato soggetto a termossidazione. Alcuni ricercatori hanno usato condizioni estremamente drastiche nel cercare di generare quantità sufficienti di prodotti di degradazione per i loro studi metabolici. E' importante tener conto, comunque, che i composti formati in questo modo potrebbero non rappresentare quelli che si formano nei grassi durante una normale pratica culinaria (Marquez-Ruiz e Dobarganes, 1996b).

Per questi motivi è difficile trasferire sull'uomo i risultati di tali ricerche sperimentali, anche se talune considerazioni sembrano di un certo interesse.

Come si è più volte ripetuto, le maggiori alterazioni chimico-fisiche riguardano gli acidi grassi polinsaturi e sono determinate da fenomeni perossidativi che possono essere limitati dalla presenza di agenti antiossidanti. L'olio di oliva si trova in questo caso, per la sua ricchezza in acido oleico ed in agenti antiossidanti, in una situazione di privilegio in quanto sono necessarie temperature particolarmente intense e prolungate per determinare evidenti alterazioni. Infatti, studi su animali, con diversi tipi di grassi, hanno messo in evidenza come la somministrazione di grassi sia saturi che polinsaturi (burro, strutto, olio di girasole) sottoposti a trattamento termico a 170°C per due ore, abbia provocato la comparsa di un danno epatico, mentre tale danno non si è manifestato con la somministrazione di olio di oliva sottoposto al medesimo trattamento (Varela., 1991). Solo raggiungendo temperature più elevate e protratte per 72 ore è stato possibile provocare un danno epatico anche con l'olio di oliva. I grassi termossidati sembrano interferire anche sul metabolismo lipidico e sull'apparato cardiocircolatorio, pur se i dati riferiti dai diversi Autori non sempre appaiono concordi (Viola, 1997).

In conclusione, i trattamenti termici qualora non vengano effettuati con modalità esasperate, non provocano alterazioni chimico-fisiche tali da essere biologicamente rilevanti. Questo è quanto accade negli usi domestici dove, di norma, la durata del trattamento è limitata ed il grasso non viene riutilizzato.

Diverso è il discorso per quanto concerne le friggitorie dove la durata è abitualmente lunga e più spesso si verifica il reimpiego dell'olio. Il non frequente ricorso, tuttavia al consumo di alimenti acquistati nelle friggitorie limita alquanto la possibile comparsa dei danni che, sperimentalmente, sono stati dimostrati negli animali alimentati quotidianamente con grassi sottoposti a temperature notevolmente elevate e protratte nel tempo. Il miglior comportamento di fronte al deterioramento termossidativo si riscontra comunque da parte dell'olio di oliva, come dimostrato da ricerche condotte sia in *vitro* che in *vivo*, grazie alla sua equilibrata composizione acidica ed alla ricchezza in agenti anti-ossidanti (Viola, 1997).

1.1.7 ALIMENTI PREFRITTI SURGELATI E FRITTURA

Con il termine prefritto si intende un alimento che ha subito una fase di frittura a livello industriale ma che richiede una ulteriore cottura finale prima del consumo. Tradizionalmente, la cottura finale tra le mura domestiche prevedeva un'ulteriore frittura del prodotto. Al giorno d'oggi, a causa del maggior interesse all'aspetto salutistico-nutrizionale degli alimenti, si stanno sviluppando nuove modalità di cottura per gli alimenti prefritti/surgelati, ad esempio la cottura in forno o l'utilizzo delle microonde.

Tra le diverse tipologie di prodotti prefritti, le patate sono le più conosciute ed utilizzate, sia a livello domestico sia nella ristorazione.

Requisiti importanti per ottenere prodotti di buona qualità sono:

- ✓ attenta selezione delle materie prime (patate, olio di frittura);
- ✓ controllo adeguato delle unità operative che compongono l'intero processo di produzione: taglio, *blanching*, essiccamento, frittura, congelamento, confezionamento e conservazione (Keijbets e Steenderen, 2001).

Il processo di produzione delle patate prefritte/surgelate

Le operazioni unitarie per la produzione industriale di patate prefritte/surgelate vengono elencate e descritte brevemente di seguito.

Lavaggio e sbucciatura. In seguito all'arrivo in azienda della materia prima, si procede ad un primo controllo della stessa seguito da una fase di lavaggio al fine di allontanare residui di terra. La fase successiva prevede il distacco della buccia mediante vapore ad una pressione di 14-18 bar, e il conseguente allontanamento della stessa mediante passaggio su rulli meccanici.

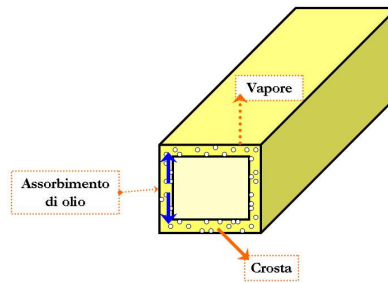
Taglio. I tuberi, così sbucciati, vengono poi tagliati nelle dimensioni desiderate mediante taglierine meccaniche e, in seguito, selezionate in base alle dimensioni attraverso un passaggio su dei rulli rotanti.

Blanching. La scottatura viene effettuata in acqua ad una temperatura di 60-90°C per un periodo che va dai 5 ai 60 minuti. Durante il *blanching*, nelle patate avvengono simultaneamente modificazioni chimiche e fisiche che ne influenzano la successiva palatabilità.

- ✓ riduzione degli zuccheri con conseguente diffusione di glucosio e fruttosio nell'acqua esterna. In questo modo si ha una diminuzione dell'intensità della reazione di Maillard tra zuccheri ridotti ed amminoacidi e una minore intensità della caratteristica colorazione bruna che ne deriva;
- ✓ inattivazione degli enzimi con conseguente riduzione di modificazioni biochimiche durante la conservazione.

Essiccamento. Durante la fase di essiccamento, si ha l'allontanamento dell'acqua sottoforma di vapore mediante l'uso di termo-ventilatori (70-120°C).

Frittura. La frittura industriale viene effettuata trasportando le patate, mediante nastro, in un bagno di olio mantenuto ad alte temperature (140-180°C). In seguito all'evaporazione di acqua causata dalle alte temperature si ha la formazione di una crosta sottile mentre il cuore del prodotto resta morbido.



Assorbimento di olio e formazione della crosta.

Congelamento. Prima di essere imbustate, le patate devono subire un raffreddamento rapido (-18°C) al fine di mantenere intatte le caratteristiche acquistate nelle fasi precedenti.

Confezionamento. Il confezionamento è una fase importante ai fine della *shelf-life* del prodotto poiché viene effettuato in modo da evitarne il deterioramento durante la fase di distribuzione e conservazione (Keijbets e Steenderen, 2001).

Fattori che influenzano la qualità delle patate prefritte/surgelate

La qualità di questi prodotti prefritti e surgelati a livello industriale è strettamente legata ai seguenti attributi:

- ↪ attributi sensoriali (colore, sapore, odore);
- ↪ contenuto in grasso
- ↪ aspetto esterno (lunghezza della patatina, difetti visivi)
- ↪ qualità microbiologica (Keijbets e Steenderen, 2001).

1.2 SCOPI

Il lavoro sperimentale svolto nell'ambito di questa parte di Tesi di Dottorato ha avuto come obiettivi:

- ⚙ valutare l'evoluzione del profilo lipidico dell'alimento fresco e dell'alimento pretrattato nel corso della frittura continua in olio extra vergine di oliva;
- ⚙ studiare le modificazioni delle sostanze fenoliche dell'olio extra vergine di oliva durante la termossidazione effettuata a 180°C in assenza di alimenti e durante la frittura di patate fresche e prefritte;
- ⚙ verificare l'influenza del processo di frittura sulla qualità nutrizionale dell'alimento con particolare riferimento al possibile arricchimento in composti fenolici ad attività antiossidante provenienti dall'olio.

1.3 MATERIALI E METODI

1.3.1 CAMPIONAMENTO

Per valutare l'interazione tra l'olio e l'alimento durante la *deep-frying* sono state realizzate in laboratorio prove di termossidazione e prove di frittura, con patate fresche e con patate surgelate, utilizzando come bagno un olio extravergine di oliva avente le seguenti caratteristiche iniziali:

Acidità (%)	Numero di perossidi (meq O ₂ /kg olio)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK	Panel test	
					Mediana fruttato	Mediana difetto
0,33 ± 0,01	8,61 ± 0,02	1,355 ± 0,00	0,120 ± 0,03	-0,0035 ± 0,00	2,48	0,00

Il disegno sperimentale seguito per le prove di termossidazione e frittura è schematizzato in **Figura 1.3.1**.

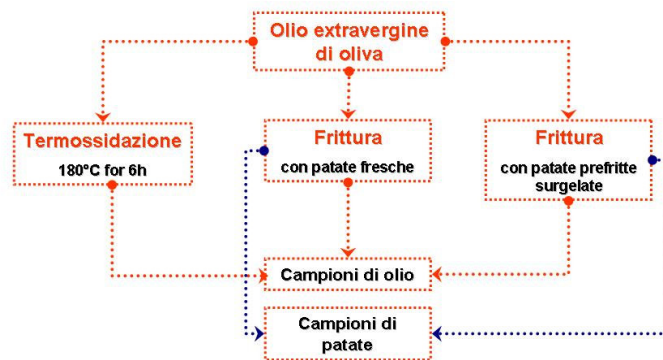


Figura 1.3.1. Disegno sperimentale relativo alle prove di termossidazione e frittura effettuate nel presente lavoro di Tesi.

Per le prove di termossidazione e frittura è stata utilizzata una friggitrice per uso domestico della capacità di 1 litro (Tefal, mod.7113, Milano).

La **prova di termossidazione** è stata effettuata sottoponendo l'olio a riscaldamento continuo a 180°C per 6 ore. I campioni di olio sono stati prelevati ogni 30 minuti, per la prima ora, mentre per le ore successive il prelievo è avvenuto ogni ora.

Per la **prova di frittura con patate fresche** sono state utilizzate patate per friggere della varietà TURBO. Le patate sono state sbucciate e tagliate a fette aventi forma di parallelepipedo dello spessore di 0,5 cm e lunghezza variabile tra i 5 e i 10 cm. Sono state effettuate due frittiture per ora, per sei ore consecutive, per un totale di 12 frittiture immergendo nel bagno d'olio 100 g di patate per ogni ciclo. I campioni di olio e di patate sono stati prelevati a diversi tempi: 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 minuti.

La **prova di frittura con patate surgelate** è stata effettuata utilizzando patate prefritte surgelate OROGEL. Sono state effettuate due frittore l'ora, per sei ore consecutive, per un totale di 12 frittore immergendo nel bagno d'olio 100 g di patate per ogni ciclo. I campioni di olio e di patate sono stati prelevati a diversi tempi: 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360.

Come controllo sono state effettuate prove di termossidazione e frittura nelle stesse condizioni precedenti utilizzando come bagno di frittura olio rettificato.

1.3.2 DISEGNO SPERIMENTALE

Sono stati analizzati campioni di olio e campioni di patate fritte.

Sui campioni di olio, oltre alle determinazioni analitiche relative agli indici di qualità previste dal Regolamento CEE 2568/91 e successive modifiche, sono state estratte e quantificate, mediante HPLC, le sostanze fenoliche ed è stata analizzata la composizione acidica mediante analisi gascromatografica degli esteri metilici degli acidi grassi.

Sui campioni di patate sono stati estratti i lipidi (Bligh e Dyer, 1959) e le sostanze fenoliche (Brenes *et al.*, 1995). L'estratto lipidico è stato utilizzato per effettuare la determinazione degli acidi grassi mediante gascromatografia (HRGC). L'estratto fenolico è stato analizzato mediante HPLC.

Le determinazioni analitiche sono state effettuate in tre repliche. L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata mediante Analisi della Varianza (ANOVA) utilizzando un software Excel STAT Addinsoft version 6.1.

1.3.3 DETERMINAZIONI ANALITICHE

1.3.3.1 Determinazione dell'acidità

Principio del metodo. L'olio vergine di oliva è costituito per il 98-99% da trigliceridi, esteri del glicerolo con acidi grassi a lunga catena (soprattutto C₁₆ e C₁₈); una parte degli acidi grassi, tuttavia, si trova allo stato libero, non sotto forma di esteri, ed è questa frazione che determina l'acidità degli oli. La misura dell'acidità è forse la più antica determinazione utilizzata per la valutazione della qualità dell'olio e per la sua classificazione commerciale. La conoscenza di questo parametro fornisce elementi utili per valutare lo stato di degrado dell'oliva e della struttura dell'olio (trigliceride) a seguito dell'azione di un enzima, la lipasi, che si trova nell'oliva ed esercita la sua attività all'interno del frutto dopo la raccolta, se questo ha subito lesioni cellulari. Tale enzima idrolizza il legame esistente tra l'acido grasso e il glicerolo, producendo acidi grassi liberi che costituiscono l'acidità dell'olio.

La determinazione è stata effettuata tramite titolazione degli acidi grassi liberi mediante una soluzione di idrossido di potassio (KOH) 0,10 N, fino al punto di equilibrio della reazione di neutralizzazione evidenziato dall'indicatore (Regolamento CEE 2568/91 e successive modifiche).

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

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

$$\left(\frac{V \times N \times 282}{P \times 10} \right)$$

dove:

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

N = normalità della soluzione di idrossido di potassio

P = peso (g) del campione prelevato.

1.3.3.2 *Determinazione del numero di perossidi*

Principio del metodo. La determinazione del numero di perossidi misura lo stato di ossidazione degli acidi grassi che costituiscono i trigliceridi e che a contatto dell'ossigeno dell'aria o per azione delle lipossidasi, si trasformano in idroperossidi.

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

La determinazione è stata effettuata mediante titolazione con soluzione di tiosolfato di sodio 0.01 N, fino a scomparsa del colore blu-viola dell'indicatore (Regolamento CEE 2568/91).

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

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

$$\left(\frac{V \times N \times 100}{m} \right)$$

dove:

V = volume (ml) di soluzione di tiosolfato consumato

N = normalità della soluzione di tiosolfato

m = massa del campione.

1.3.3.3 *Analisi spettrofotometrica*

Principio del metodo. Gli acidi grassi dell'olio di oliva sono caratterizzati da un diverso grado di insaturazione. Il doppio legame tra gli atomi di carbonio (R-CH=CH-R') è responsabile dell'ossidazione dell'olio da parte dell'ossigeno (formazione degli idroperossidi), e va incontro a modifiche quando l'olio è sottoposto a reazioni di ossidazione. Una di queste modifiche è la formazione di sistemi di più doppi legami coniugati che comportano una variazione nell'intensità di assorbimento nella regione dell'UV.

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

I valori di tali assorbimenti sono espressi come estinzione specifica $E_{1\% \ 1\text{cm}}$, cioè estinzione di una soluzione della sostanza grassa all'1% in spessore di 1 cm, e sono indicati con K (coefficiente di estinzione).

Procedimento. In un matraccio da 25 ml sono stati pesati accuratamente 0.25 g di olio portando a volume con esano spettrofotometricamente puro in modo da ottenere una soluzione all'1% (peso/volume). Sulla soluzione è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro, contro un bianco costituito dal solvente, alle lunghezze d'onda di 232 e 270 nm e a 262, 268 e 274 per il calcolo del ΔK .

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

Strumentazione. Per l'analisi è stato utilizzato uno spettrofotometro SHIMADZU UV 16 01 (SHIMADZU Italia, Milano).

1.3.3.4 Determinazione della composizione acidica dell'olio

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

Dall'esame del cromatogramma si può risalire alla composizione qualitativa e quantitativa in acidi grassi dell'olio in esame e, quindi, appurarne la genuinità.

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

Per l'analisi sono stati utilizzati:

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

Sono state adottate le seguenti condizioni operative:

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

✓ quantità iniettata: 1 μ l.

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

1.3.3.5 *Determinazione degli acidi grassi a corta catena*

Per determinare la formazione e l'evoluzione di acidi grassi a corta catena, che si formano negli oli a seguito di riscaldamento a temperatura elevata e frittura, si è tenuta presente la metodica proposta da Marquez-Ruiz e Dobarganes (1996a).

Principio del metodo. Il metodo prevede il dosaggio degli acidi grassi a corta catena ($C_{7,0}$ e $C_{8,0}$) originatisi dalla rottura dei radicali alcossido, derivanti dagli idroperossidi allilici, mediante gas-cromatografia dei relativi esteri metilici.

Strumentazione. Per l'analisi sono stati utilizzati:

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

Condizioni operative. L'analisi gascromatografica è stata condotta nelle seguenti condizioni:

- ✓ camera mantenuta inizialmente a 80°C per 9 minuti, incremento termico di 10°C / min fino ad arrivare ad una temperatura di 170°C mantenuta per 12 min e, dopo un ulteriore incremento di 10°C / min, a 220°C per 6 min; temperatura iniettore: 250°C; temperatura F.I.D.: 250°C; gas di trasporto: elio; gas ausiliare: azoto; flusso di elio in colonna pari a 2 ml / min; rapporto di splittaggio 1/70.

Procedimento. In un matraccino da 10 ml sono stati pesati 0,1 g di olio e portati a volume con esano.

Si è effettuata, poi, una transesterificazione a freddo con una soluzione metanolica di KOH 2 N prelevando 1,5 ml di soluzione olio-esano e ponendoli in provetta aggiungendo 0,75 ml di KOH- metanolo.

Dopo aver sottoposto la provetta a vigorosa agitazione, per 60 secondi, e aver atteso la separazione delle fasi, sono stati prelevati 0,9 ml della fase esanica limpida e sono stati aggiunti 100 μ l di una soluzione madre contenente lo standard interno $C_{9,0}$ in concentrazione pari a 500 ppm (in modo da avere una concentrazione dello S.I. nella soluzione finale pari a 50 ppm). Dopo ulteriore agitazione, 2 μ l di campione sono stati iniettati al gas-cromatografo.

Espressione dei risultati. Per il calcolo del contenuto di acidi grassi a corta catena nei campioni in ppm si è utilizzata la seguente proporzione:

$$C_{9,0} \div 50 \text{ ppm} = C_{8,0} \div x$$

Dove:

$C_{9,0}$ = area assoluta dello standard

50 ppm = contenuto di standard $C_{9,0}$ presente nella soluzione

x = contenuto (in ppm) di $C_{8,0}$ nella soluzione iniettata

La quantità x calcolata dalla precedente proporzione si riferisce ad 1 ml di soluzione olio esano transesterificata. In tale volume sono contenuti 10 mg di olio. Per esprimere la quantità di $C_{8:0}$ (mg/10g di olio) in g/Kg (mg /g) occorre quindi dividere per un fattore di 10.

1.3.3.6 Estrazione della componente fenolica dell'olio

Principio del metodo La componente fenolica è costituita da due diverse frazioni: una semplice ed una complessa, idrolizzabile. La prima frazione è rappresentata quasi interamente dal *p*-idrossifeniletanolo (tirosolo) e dal 3,4-diidrossifeniletanolo (idrossitirosolo). La seconda frazione, che è molto più abbondante, è formata da strutture complesse che contengono il tirosolo (aglicone 1 e 2 del tirosolo) e l'idrossitirosolo (aglicone 1 e 2 dell'idrossitirosolo), oltre ad altri composti non identificati.

Le sostanze fenoliche sono state determinate seguendo un metodo messo a punto per la loro estrazione quantitativa dall'olio e sono state analizzate mediante HPLC. Partendo dalla metodica classica di estrazione descritta da Vasquez-Roncero (1978), si sono apportate alcune modifiche allo scopo di minimizzare i volumi di solvente utilizzati.

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

1.3.3.7 Analisi HPLC/DAD delle sostanze fenoliche

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

Le fasi eluenti utilizzate sono state le seguenti:

- A) acqua + acido trifluoroacetico (TFA) al 3%;
- B) metanolo 20% + acetonitrile 80%.

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

È stato utilizzato:

- ✓ un HPLC (SHIMADZU, mod.LC-10ADVP) provvisto di rilevatore UV-Vis DIODE ARRAY (SHIMADZU, mod.SPD-M10AVP) e software di acquisizione Class-VP Chromatography data system vers. 4.6 (Shimadzu Italia, Milano);
- ✓ una colonna a fase inversa (Spherisorb S5 ODS3 250 x 4,6 mm i.d.). Flusso in colonna: 1 ml/min. Quantità iniettata: 20µl.
- ✓ lunghezza d'onda del rilevatore: 279 nm.

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

1.3.3.8 Estrazione dei lipidi dalle patate (Figura 1.3.3)

L'estrazione dei lipidi è stata condotta secondo il metodo riportato da Bligh e Dyer (1959) con leggere modifiche.

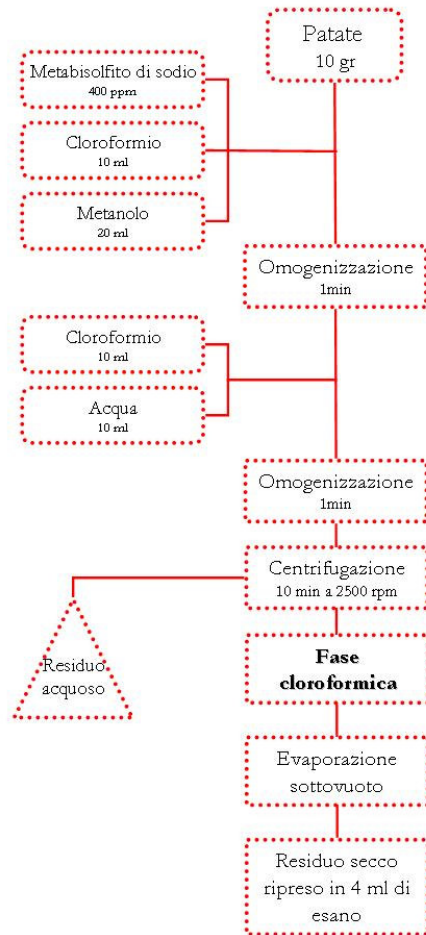


Figura 1.3.3. Diagramma di flusso relativo al metodo di estrazione dei lipidi.

Una quantità pari a 10 g di patate è stata tritata con aggiunta di 400 ppm di antiossidante (metabisolfito di sodio) e miscelata con 10 ml di cloroformio e 20 ml di metanolo. Il tutto è stato omogeneizzato per 1 minuto con un omogeneizzatore ULTRATURRAX (mod. T 25 B, Kilka-Werke - Germany) con l'aggiunta di 10 ml di cloroformio e 10 ml di acqua e centrifugato per 10 minuti a 2500 giri al minuto. Da questo processo si ottiene un sistema di tre fasi: fase acquosa, patata, fase cloroformica. La fase acquosa superficiale è stata eliminata, la fase cloroformica sottostante prelevata e la patata è stata omogeneizzata con l'ulteriore aggiunta di 10 ml di cloroformio, 10 ml di metanolo e 4 ml di acqua. Dopo centrifugazione si è eliminata la fase acquosa superficiale e la fase cloroformica così ottenuta aggiunta a quella separata precedentemente. La fase cloroformica è stata lavata con un uguale volume di cloruro sodico allo 0,5% e centrifugata per 30 minuti a 2500 giri al minuto. La fase acquosa che ne deriva è stata eliminata ed il residuo disidratato con l'aggiunta di solfato di sodio anidro e filtrato. La fase cloroformica ottenuta è stata quindi evaporata sotto vuoto in evaporatore rotante (Rotovapor, mod.VV2000, Heidolph) a 40°C. Il residuo è stato ripreso con 4 ml di esano e conservato in freezer a -20°C fino al momento dell'analisi.

1.3.3.9 Determinazione della composizione acidica delle patate (vd. § 1.3.3.4)

1.3.3.10 Estrazione dei composti fenolici dalle patate (Figura 1.3.4)

E' stato preso come riferimento il metodo proposto da Brenes *et al* (1995). Una quantità di 25 g di patate è stata tritata e miscelata con 30 ml di una soluzione di metanolo/acqua (80:20 v/v), cui sono state aggiunti 400 ppm di metabisolfito di sodio allo scopo di preservare i composti presenti da un'eventuale ossidazione.

La miscela è sottoposta ad omogenizzazione (ULTRATURRAX mod. T 25 B, Kilkawerke - Germany) per una durata di 2 min e successivamente centrifugata per 5

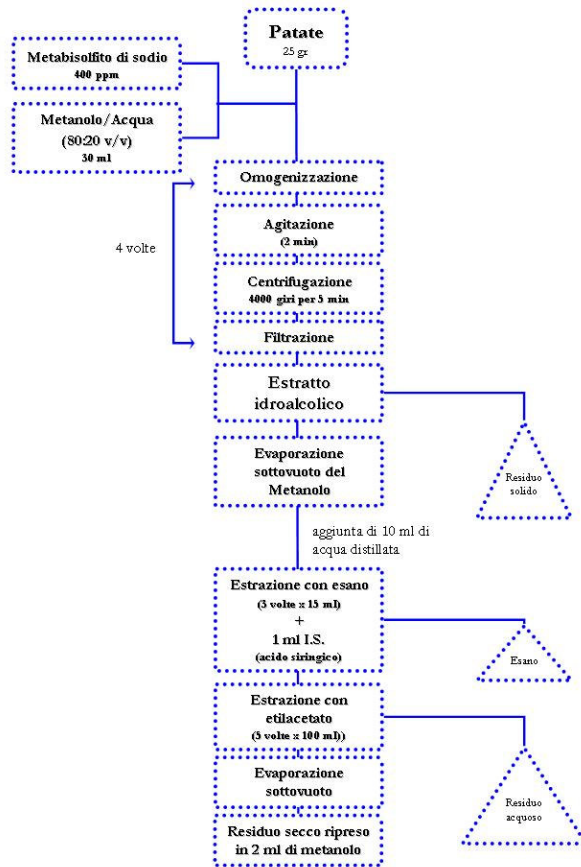


Figura 1.3.4. Diagramma di flusso relativo al metodo di estrazione dei composti fenolici dai campioni di patate.

minuti a 4000 giri/min (centrifuga ALC, mod.PK120) allo scopo di consentire la separazione tra lo sfarinato di patate e la fase metanolica. L'estratto idroalcolico è filtrato e raccolto in un pallone. Sulle patate residue l'operazione viene ripetuta per altre 3 volte utilizzando un volume totale di miscela metanolo/acqua (80/20) pari a 120 ml.

L'estratto idroalcolico totale è sottoposto ad evaporazione sottovuoto con evaporatore rotante (HEIDOLPH, mod.VV2000) alla temperatura di 35°C per il tempo necessario al completo allontanamento del metanolo. Alla fase acquosa residua sono stati aggiunti, quindi, 10 ml di acqua distillata. Allo scopo di eliminare eventuali contaminazioni, la soluzione è lavata per 3 volte con 15 ml di esano per un volume totale di esano pari a 45 ml.

A tale volume, prima della fase di lavaggio, si è provveduto all'aggiunta di 1 ml di standard interno, acido siringico 200

ppm. L'estrazione dei composti dalla soluzione acquosa è effettuata con etilacetato. L'operazione di estrazione è stata ripetuta 5 volte per un volume totale di 100 ml di etilacetato. L'etilacetato è allontanato mediante evaporazione sottovuoto in evaporatore rotante (35°C). Il residuo è ripreso in 2 ml di metanolo. Un'aliquota di tale soluzione è utilizzata per l'analisi HPLC.

1.3.3.11 Frazionamento dell'estratto fenolico mediante SPE

Una quantità pari ad 1 ml di estratto fenolico dalle patate, portato a 300 µl sotto flusso di azoto e riportato a volume con acqua, è stato caricato su una cartuccia per SPE C18 a fase inversa (Chromabond C18 ec, 1000 mg/6 ml, Macherey-Nagel, Düren, Germania) precedentemente condizionata con 5 ml di una miscela acqua/metanolo 95:5 v/v. Il frazionamento è stato realizzato a pressione atmosferica mediante gradiente binario (Tabella 1.3.1). Le fasi eluenti utilizzate sono stete le seguenti: A) metanolo, B) acqua.

Flusso in colonna 0,15 ml/min.

Tabella 1.3.1. Gradiente utilizzato per il frazionamento dell'estratto fenolico ottenuto dai campioni di patate.

Quantità (ml)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
7	5	95
5	10	90
5	15	85
5	20	80
5	25	75
5	30	70
5	35	65
5	50	50
5	100	0

Sono state raccolte frazioni da 1 ml delle quali è stata misurata l'assorbanza a 280 nm al fine di raggrupparle (Allouche *et al.*, 2004). Un'aliquota delle frazioni raggruppate è stata analizzata tramite HPLC.

1.3.3.12 *Analisi HPLC/DAD delle sostanze fenoliche estratte dalle patate*

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

Le fasi eluenti utilizzate sono state le seguenti: **A**) acqua + acido trifluoroacetico (TFA) al 3%; **B**) metanolo 20% + acetonitrile 80%.

E' stato utilizzato un gradiente di eluizione che parte dal 5% di metanolo/acetone nitrile per arrivare in un tempo di 35 min al 60%.

E' stato utilizzato un HPLC (SHIMADZU, mod.LC-10ADVP) provvisto di rivelatore UV-Vis DIODE ARRAY (SHIMADZU, mod.SPD-M10AVP) dotato di una colonna a fase inversa (Spherisorb S5 ODS3 250 x 4,6 mm i.d.). Flusso in colonna : 1 ml/min. Quantità iniettata: 20µl. Lunghezza d'onda del rivelatore: 279 nm.

L'identificazione dei principali picchi è stata effettuata per comparazione con i tempi di ritenzione di standard puri e sulla base degli spettri UV rilevati con il detector DAD (Montedoro *et al.*, 1993; Brenes *et al.*, 2000).

L'analisi quantitativa dei singoli componenti è stata condotta con riferimento ad uno standard interno (Tirosolo) impiegato per la costruzione della retta di calibrazione (Tsimidou *et al.*, 1992).

Per il calcolo del contenuto in ppm dei composti fenolici di interesse nei campioni è stata utilizzata la seguente proporzione:

$$I.S. \div a \text{ ppm} = F \div X$$

Dove:

I.S. = area assoluta dello standard (acido siringico);

a ppm = contenuto di standard presente nella soluzione iniettata (100 ppm);

F = area assoluta del composto fenolico di interesse;

X = contenuto in ppm di composto fenolico di interesse nella soluzione fenolica iniettata.

1.3.3.13 Analisi LC/MS con ionizzazione ES

Principio del metodo. Per la separazione delle sostanze fenoliche, presenti negli estratti di riferimento, si utilizza la cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) abbinata ad un rivelatore specifico per la determinazione della massa delle molecole. Per ottenere ciò è necessaria la ionizzazione *elettrospray* (ES), una tecnica utilizzata per produrre molecole gassose ionizzate da una soluzione liquida; tale metodica consiste nella nebulizzazione della soluzione in un campo elettrico di 4000 V, in modo che al rivelatore arrivino soltanto gli ioni molecolari protonati o deprotonati a seconda della modalità operativa di acquisizione.

L'analisi dei composti presenti negli estratti fenolici è stata effettuata in modalità di acquisizione di ioni negativi ([M-H]⁻) di seguito sono riportati gli altri parametri operativi dello spettrometro di massa (LC-MS 2010EV, Shimadzu, Milano, Italia) sono riportati di seguito:

- ✓ Flusso gas nebulizzante 1.5 ml/min;
- ✓ Detector voltage 1.5kV;
- ✓ Range m/z 60-900;
- ✓ Temperatura Heat Block: 250°C
- ✓ Temperatura CDL (Curved desolvation line) 300°C;
- ✓ Voltaggio CDL + 5V
- ✓ Q-Array DC 0.0 V
- ✓ Q-Array RF 150.0 V

La separazione dell'estratto è stata ottenuta mediante l'impiego di un sistema HPLC (Shimadzu, Milano, Italia) costituito da due pompe LC-10AD VP e da un'interfaccia SCL-10A VP, dotato di una colonna a fase inversa (Discovery HS C18-Supelco) avente le seguenti caratteristiche: 150mm di lunghezza, diametro interno 2,1 mm riempita con particelle di silice di diametro di 5 µm, fase legata octadecilsilano *handcapped*. Flusso in colonna 0,350 ml/min. Quantità iniettata: 20µl.

Le fasi eluenti utilizzate sono le seguenti: A) acqua + acido formico allo 0,25%, B) metanolo + acido formico allo 0,25%.

È stato utilizzato un gradiente di eluizione binario che parte dal 5% dell'eluente B per arrivare in un tempo di 45 minuti al 55% dello stesso.

Gli spettri di massa dei diversi composti sono stati confrontati con quelli ottenuti da standard di composti puri e con quanto riportato in letteratura.

1.3.3.14 Determinazione dell'umidità

La determinazione dell'umidità nelle patate è stata effettuata per via ponderale.

Procedimento. Una quantità di 50 gr di patate è posta in stufa a 105°C per un tempo di circa 24 ore. Si lascia raffreddare il materiale in essiccatore e si pesa, ripetendo essiccazione e pesate fino a raggiungimento di un peso costante.

Espressione dei risultati. L'umidità percentuale è data da:

$$U\% = 100 - \left(\frac{P_1 - P}{g} \times 100 \right)$$

Dove

P = peso della capsula vuota

P_f = peso della capsula con le patate essiccate
 g = peso iniziale delle patate.

1.3.3.15 *Determinazione del contenuto in lipidi totali*

La determinazione del contenuto in lipidi è stata effettuata mediante estrazione con solvente organico della sostanza grassa totale utilizzando un estrattore tipo Soxhlet. (FALC, modWBS2) della capacità di 200 ml.

Procedimento. Le patate macinate e preventivamente essiccate si pongono in un cartoccio da estrazione e si introducono nell'estrattore. Si collega un palloncino da 250 ml, previamente tarato, e si aggiunge la necessaria quantità di solvente (etere di petrolio).

Si procede poi all'estrazione a bagnomaria per un periodo della durata di 12 ore, regolando l'intensità dell'ebollizione in modo da avere almeno 15 sifonamenti all'ora; alla fine di tale periodo si stacca il palloncino contenente l'estratto etero, si distilla il solvente sottovuoto in evaporatore rotante (HEIDOLPH, mod. VV2000) e si completa l'essiccazione della sostanza grassa in stufa termostatica a 105°C. Si lascia raffreddare il campione in essiccatore e si pesa, ripetendo essiccazione e pesate fino a massa costante.

Il contenuto in lipidi, espresso in % sostanza secca, è dato dalla formula:

$$[\% s.s.] = \left(\frac{M_1}{M} \right) \times 100$$

dove:

M_1 = massa della sostanza grassa estratta espressa in grammi.

M = massa del campione prelevato per la determinazione espresso in grammi.

1.4 RISULTATI E DISCUSSIONE

1.4.1 CONTENUTO IN UMIDITÀ ED IN LIPIDI TOTALI NELLE PATATE PRIMA E DOPO FRITTURA

Durante la frittura, a causa dell'elevata temperatura (180°C) del bagno di olio circostante, una frazione dell'acqua contenuta nell'alimento immerso evapora lasciando degli spazi vuoti (canali) all'interno dei quali si posiziona l'olio (Saguy e Dana, 2003). L'*intake* di olio nell'alimento è funzione del contenuto lipidico dello stesso. In presenza di alimenti definiti "magri", cioè con un basso contenuto lipidico, infatti, si verifica il solo assorbimento di olio proveniente dal bagno di frittura. Immergendo un alimento con un medio/elevato contenuto lipidico iniziale, invece, oltre all'ingresso di olio nell'alimento si ha una cessione di grasso dall'alimento al grasso di frittura (Varela, 1991) (**Figura 1.4.1**).

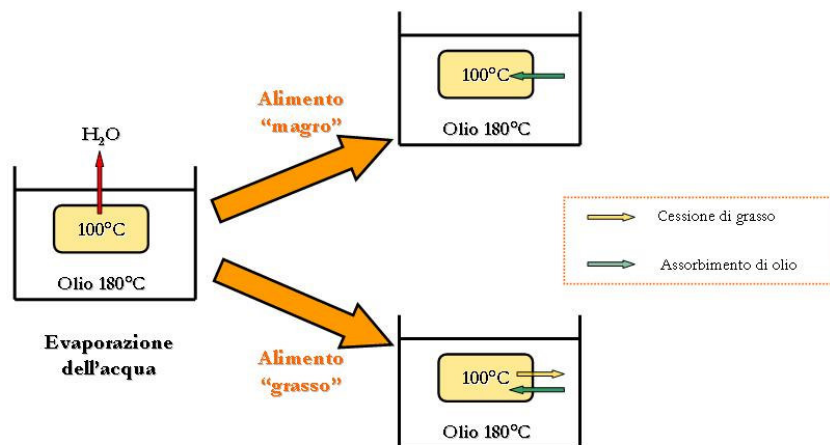


Figura 1.4.1. Schema dello scambio di grassi tra alimento e olio durante il processo di frittura.

Al fine di valutare gli effetti di questo scambio sul profilo nutrizionale dell'alimento, sono stati determinati, ad ogni prelievo effettuato nel corso delle prove di frittura, il contenuto in umidità ed in lipidi totali dalle due tipologie di patata utilizzate.

In **Figura 1.4.2** si riporta, per la patata fresca e per la patata prefritta/surgelata, il contenuto percentuale in umidità prima e dopo il processo di frittura.

È evidente come il contenuto di umidità della patata prefritta/surgelata risulta essere inferiore a quello riscontrato nella patata fresca sia prima che dopo frittura in olio. Tale differenza può essere causata dal trattamento industriale di essiccamento cui viene sottoposta la patata surgelata. Quest'ultima, infatti, mediante passaggio in tunnel termo-ventilati, subisce una perdita del 10-30% di acqua.

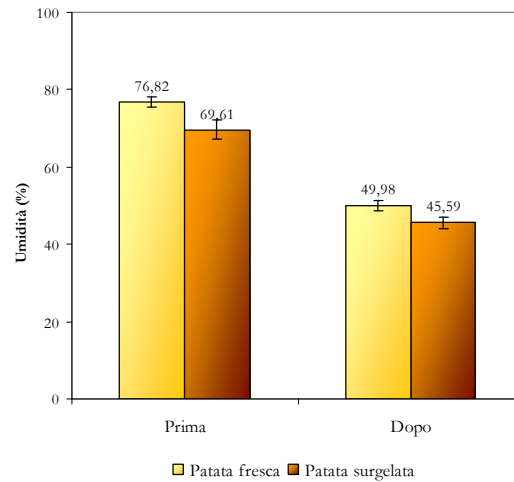


Figura 1.4.2. Valori relativi al contenuto in umidità (%) rilevato nei campioni di patate fresche e prefritte surgelate prima e dopo il processo di frittura.

Relativamente al contenuto in lipidi totali (**Figura 1.4.3**), la patata prefritta/surgelata presenta un contenuto lipidico iniziale nettamente superiore (1,40%) a quello delle patate fresche che è risultato essere solo del 0,08%.

Tale differenza risulta altrettanto evidente dopo il trattamento di frittura. Nella patata fresca, infatti, il contenuto lipidico (4,6%), calcolato come media delle 12 frittiture consecutive, risulta essere significativamente inferiore ($p < 0,05$) a quello misurato nella patata surgelata (9,5%).

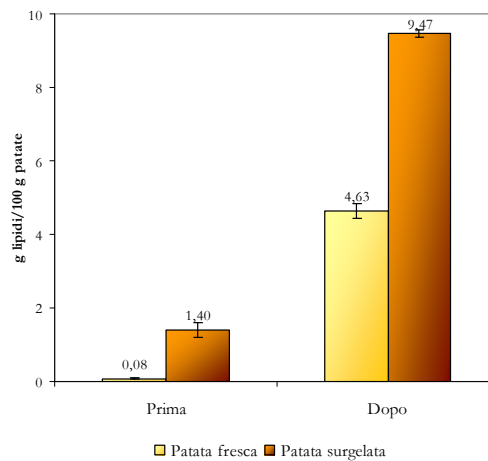


Figura 1.4.3. Valori relativi al contenuto lipidico (g/100 g patate) rilevato nei campioni di patate fresche e prefritte surgelate prima e dopo il trattamento di frittura.

Anche in questo caso, il trattamento di pre-frittura industriale subito dalle patate surgelate, con conseguente formazione di una crosta porosa, ha consentito una maggiore penetrazione di olio nell'alimento nonostante il minore tempo di contatto tra il bagno di frittura e l'alimento in esso immerso.

Da quanto osservato è possibile dedurre, quindi, che un consumo di quantità equivalenti di patate fritte può, in relazione alla materia prima impiegata, modificare, per oltre il 50% l' *intake* di lipidi.

1.4.2 EVOLUZIONE DEL PROFILO LIPIDICO

Un aspetto che si è voluto esaminare in questa prima parte del lavoro di Dottorato è stato quello di valutare l'effetto della presenza dell'alimento sulla degradazione termica dell'olio. Il medesimo tipo di olio extra vergine di oliva è stato sottoposto ad una prova di termossidazione, in assenza di alimento, ed a due prove di frittura con patate fresche e con patate prefritte/surgelate.

In **Tabella 1.4.1** si riporta la composizione in acidi grassi determinata sui campioni di olio prelevati ad intervalli regolari nel corso della prova di termossidazione per sei ore a 180°C.

Tabella 1.4.1. Composizione percentuale in acidi grassi (media \pm dev.st.) rilevata nei campioni di olio prelevati a diversi tempi di termossidazione a 180°C.

Picco	Acidi grassi	Campione ¹					
		0	I	II	III	IV	V
1 C _{12:0}	laurico	nq ²	nq	nq	nq	nq	nq
2 C _{14:0}	miristico	nq	nq	nq	nq	nq	nq
3 C _{16:0}	palmitico	11,52 ^a \pm 0,01	11,42 ^a \pm 0,08	11,55 ^a \pm 1,36	11,46 ^a \pm 2,33	11,39 ^a \pm 0,25	11,49 ^a \pm 3,02
4 C _{16:1} w7	palmitoleico	0,63 ^a \pm 0,00	0,62 ^a \pm 0,01	0,63 ^a \pm 0,20	0,62 ^a \pm 0,01	0,61 ^a \pm 0,03	0,62 ^a \pm 0,20
5 C _{17:0}	eptadecanoico	0,05 ^a \pm 0,00	0,05 ^a \pm 0,00	0,05 ^a \pm 0,01	0,05 ^a \pm 0,00	0,05 ^a \pm 0,00	0,05 ^a \pm 0,00
6 C _{17:1}	eptadecenoico	0,07 ^a \pm 0,00	0,07 ^a \pm 0,01	0,07 ^a \pm 0,03	0,07 ^a \pm 0,03	0,07 ^a \pm 0,01	0,07 ^a \pm 0,01
7 C _{18:0}	stearico	3,04 ^a \pm 0,25	3,03 ^a \pm 0,84	3,07 ^a \pm 0,58	3,08 ^a \pm 0,47	3,08 ^a \pm 0,20	3,08 ^a \pm 0,35
8 C _{18:1} t	elaidinico	nq	nq	0,02 ^b \pm 0,00	0,06 ^b \pm 0,00	0,10 ^c \pm 0,02	0,10 ^c \pm 0,00
9 C _{18:1} w9	oleico	73,66 ^a \pm 0,98	72,13 ^b \pm 0,36	71,89 ^b \pm 1,96	71,90 ^b \pm 0,51	71,54 ^b \pm 0,36	71,19 ^b \pm 0,36
10 C _{18:1} w7	vaccenico	1,70 ^a \pm 0,21	1,68 ^a \pm 0,25	1,66 ^a \pm 0,06	1,53 ^b \pm 0,07	1,56 ^b \pm 0,05	1,45 ^b \pm 0,06
11 C _{18:2} t		nq	nq	nq	nq	nq	nq
12 C _{18:2} t		nq	nq	nq	nq	nq	nq
13 C _{18:2} w6	linoleico	8,67 ^a \pm 1,50	8,70 ^a \pm 0,59	8,63 ^a \pm 0,94	8,48 ^a \pm 1,20	8,46 ^a \pm 2,01	8,44 ^a \pm 0,86
14 C _{20:0}	arachico	0,41 ^a \pm 0,13	0,41 ^a \pm 0,01	0,41 ^a \pm 0,00	0,40 ^a \pm 0,00	0,42 ^a \pm 0,05	0,42 ^a \pm 0,06
15 C _{18:3} w3	linolenico	0,64 ^a \pm 0,05	0,64 ^a \pm 0,08	0,64 ^a \pm 0,02	0,60 ^a \pm 0,10	0,59 ^a \pm 0,10	0,59 ^a \pm 0,08
16 C _{20:1} w11	eicosenoico	0,24 ^a \pm 0,00	0,23 ^a \pm 0,02	0,23 ^a \pm 0,10	0,25 ^a \pm 0,06	0,25 ^a \pm 0,03	0,25 ^a \pm 0,01

lettere differenti sulla stessa riga indicano differenze significative ($p < 0,05$) risultanti da ANOVA ad una via

¹ 0 = olio non termossidato; I = dopo 30 min di termossidazione; II = dopo 1 ora di termossidazione; III = dopo 4 ore di termossidazione; IV = dopo 5 ore di termossidazione; V = dopo 6 ore di termossidazione.

² limite di quantificazione = 0,02%

In **Figura 1.4.4** si riporta il profilo gascromatografico degli esteri metilici degli acidi grassi dell'olio extravergine di oliva iniziale (**a**) e dopo 6 ore di termossidazione a 180°C (**b**).

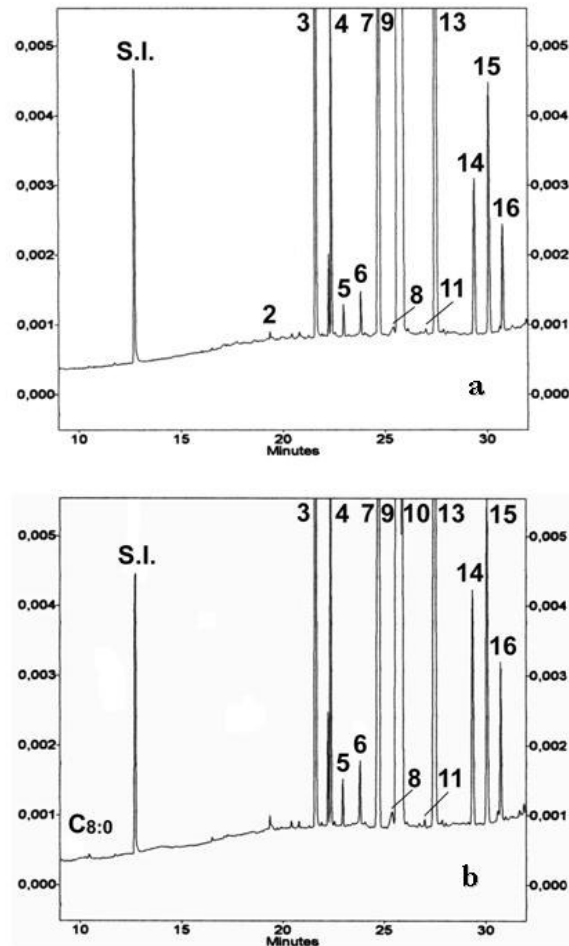


Figura 1.4.4. Profilo gascromatografico della composizione acida dell'olio extra vergine di oliva utilizzato nella prova di termossidazione a 180°C: (a) tempo 0, (b) dopo 6 ore. L'identificazione dei picchi è riportata in **Tabella 1.4.1**.

Risulta evidente come non ci siano modificazioni apprezzabili nella composizione acida dell'olio sottoposto ad un trattamento termico prolungato.

La composizione in acidi grassi determinata sui campioni di olio prelevati ad intervalli regolari durante la prova di frittura con patate fresche e con patate surgelate è riportata in **Tabella 1.4.2** e **Tabella 1.4.3** rispettivamente.

L'esame dei dati permette di affermare che esiste un diverso andamento del profilo lipidico del bagno di olio nel corso della frittura in funzione della tipologia di alimento che viene fritto.

Tabella 1.4.2. Composizione percentuale in acidi grassi (media \pm dev.st.) rilevata nei campioni di olio prelevati a diversi tempi di frittura a 180°C in presenza di patate fresche.

Picco	Acidi grassi	Campione ¹					
		0	I	II	III	IV	V
1 C _{12:0}	laurico	nq ²	nq	nq	nq	nq	nq
2 C _{14:0}	miristico	nq	nq	nq	nq	nq	nq
3 C _{16:0}	palmitico	11,52 ^a \pm 0,01	10,99 ^b \pm 0,01	11,41 ^c \pm 0,02	11,13 ^d \pm 0,03	11,54 ^a \pm 0,00	11,44 ^e \pm 0,04
4 C _{16:1} w7	palmitoleico	0,63 ^a \pm 0,00	0,59 ^b \pm 0,01	0,62 ^a \pm 0,02	0,62 ^a \pm 0,00	0,62 ^a \pm 0,00	0,62 ^a \pm 0,01
5 C _{17:0}	eptadecanoico	0,05 ^a \pm 0,00	0,05 ^a \pm 0,01	0,05 ^a \pm 0,02	0,05 ^a \pm 0,00	0,05 ^a \pm 0,01	0,05 ^a \pm 0,00
6 C _{17:1}	eptadecenoico	0,07 ^a \pm 0,00	0,07 ^a \pm 0,00	0,07 ^a \pm 0,02	0,07 ^a \pm 0,01	0,07 ^a \pm 0,00	0,07 ^a \pm 0,02
7 C _{18:0}	stearico	3,04 ^a \pm 0,25	3,01 ^a \pm 0,01	3,05 ^a \pm 0,10	3,07 ^a \pm 0,20	3,05 ^a \pm 0,12	3,07 ^a \pm 0,00
8 C _{18:1} t	elaidinico	nq	nq	0,04 ^b \pm 0,01	0,02 ^b \pm 0,00	0,11 ^c \pm 0,04	0,05a \pm 0,01
9 C _{18:1} w9	oleico	73,66 ^a \pm 0,98	72,20 ^a \pm 0,03	71,82 ^b \pm 0,10	71,99 ^b \pm 0,00	72,12 ^c \pm 0,00	72,10 ^c \pm 0,01
10 C _{18:1} w7	vaccenico	1,70 ^a \pm 0,21	1,71 ^a \pm 0,12	1,62 ^b \pm 0,03	1,61 ^b \pm 0,01	1,57 ^c \pm 0,00	1,59 ^c \pm 0,10
11 C _{18:2} t		nq	nq	nq	nq	nq	nq
12 C _{18:2} t		nq	nq	nq	nq	nq	nq
13 C _{18:2} w6	linoleico	8,67 ^a \pm 1,50	8,69 ^a \pm 0,25	8,57 ^b \pm 0,18	8,51 ^b \pm 1,21	8,49 ^b \pm 0,17	8,47 ^b \pm 0,01
14 C _{20:0}	arachico	0,41 ^a \pm 0,13	0,41 ^a \pm 0,01	0,42 ^a \pm 0,17	0,42 ^a \pm 0,08	0,41 ^a \pm 0,14	0,42 ^a \pm 0,13
15 C _{18:3} w3	linolenico	0,64 ^a \pm 0,05	0,65 ^a \pm 0,01	0,63 ^a \pm 0,09	0,61 ^b \pm 0,00	0,61 ^b \pm 0,02	0,60 ^b \pm 0,10
16 C _{20:1} w11	eicosenoico	0,24 ^a \pm 0,00	0,26 ^a \pm 0,08	0,24 ^a \pm 0,10	0,25 ^a \pm 0,05	0,24 ^a \pm 0,01	0,24 ^a \pm 0,00

lettere differenti sulla stessa riga indicano differenze significative (p<0,05) risultanti da ANOVA ad una via

¹ 0 = olio non temossidato; I = dopo 30 min di temossidazione; II = dopo 1 ora di temossidazione; III = dopo 4 ore di temossidazione; IV = dopo 5 ore di temossidazione; V = dopo 6 ore di temossidazione.

² limite di quantificazione = 0,02%

Tabella 1.4.3. Composizione percentuale in acidi grassi (media \pm dev.st.) rilevata nei campioni di olio prelevati a diversi tempi di frittura a 180°C in presenza di patate prefritte/surgelate.

Picco	Acidi grassi	Campione ¹					
		0	I	II	III	IV	V
1 C _{12:0}	laurico	nq ²	nq	nq	nq	0,02 ^a \pm 0,00	0,02 ^a \pm 0,00
2 C _{14:0}	miristico	nq	nq	0,03 ^a \pm 0,02	0,043 ^b \pm 0,01	0,062 ^c \pm 0,00	0,07 ^d \pm 0,01
3 C _{16:0}	palmitico	11,52 ^a \pm 0,01	11,20 ^b \pm 0,01	11,58 ^c \pm 0,00	11,76 ^d \pm 0,01	12,37 ^e \pm 0,02	12,41 ^f \pm 0,05
4 C _{16:1} w7	palmitoleico	0,63 ^a \pm 0,00	0,60 ^a \pm 0,03	0,62 ^a \pm 0,01	0,59 ^a \pm 0,02	0,62 ^a \pm 0,02	0,62 ^a \pm 0,00
5 C _{17:0}	eptadecanoico	0,05 ^a \pm 0,00	0,05 ^a \pm 0,02	0,05 ^a \pm 0,01	0,05 ^a \pm 0,02	0,05 ^a \pm 0,00	0,05 ^a \pm 0,00
6 C _{17:1}	eptadecenoico	0,07 ^a \pm 0,00	0,07 ^a \pm 0,02	0,07 ^a \pm 0,01	0,07 ^a \pm 0,00	0,07 ^a \pm 0,01	0,07 ^a \pm 0,01
7 C _{18:0}	stearico	3,04 ^a \pm 0,25	3,03 ^a \pm 0,12	3,05 ^a \pm 0,02	3,11 ^b \pm 0,10	3,06 ^a \pm 0,03	3,08a ^a \pm 0,01
8 C _{18:1} t	elaidinico	nq	nq	nq	0,03 ^a \pm 0,01	0,04 ^a \pm 0,00	0,06 ^b \pm 0,01
9 C _{18:1} w9	oleico	73,66 ^a \pm 0,98	72,16 ^a \pm 0,51	72,23 ^a \pm 0,11	71,70 ^b \pm 0,01	70,66 ^b \pm 0,15	70,47 ^b \pm 0,12
10 C _{18:1} w7	vaccenico	1,70 ^a \pm 0,21	1,53 ^b \pm 0,02	1,51 ^b \pm 0,14	1,61 ^a \pm 0,01	1,56 ^b \pm 0,15	1,52 ^b \pm 0,20
11 C _{18:2} t		nq	nq	nq	nq	0,02 ^a \pm 0,00	0,02 ^a \pm 0,01
12 C _{18:2} t		nq	nq	nq	nq	0,02 ^a \pm 0,01	0,02 ^a \pm 0,00
13 C _{18:2} w6	linoleico	8,67 ^a \pm 1,50	8,63 ^a \pm 0,29	8,65 ^a \pm 1,20	8,53 ^a \pm 0,94	8,44 ^b \pm 0,24	8,40 ^b \pm 0,10
14 C _{20:0}	arachico	0,41 ^a \pm 0,13	0,41 ^a \pm 0,02	0,42 ^a \pm 0,02	0,42 ^a \pm 0,00	0,40 ^a \pm 0,01	0,41 ^a \pm 0,02
15 C _{18:3} w3	linolenico	0,64 ^a \pm 0,05	0,63 ^a \pm 0,00	0,63 ^a \pm 0,02	0,61 ^a \pm 0,04	0,60 ^a \pm 0,01	0,58 ^a \pm 0,00
16 C _{20:1} w11	eicosenoico	0,24 ^a \pm 0,00	0,27 ^a \pm 0,02	0,24 ^a \pm 0,01	0,25 ^a \pm 0,00	0,24 ^a \pm 0,01	0,24 ^a \pm 0,02

lettere differenti sulla stessa riga indicano differenze significative (p<0,05) risultanti da ANOVA ad una via

¹ 0 = olio non temossidato; I = dopo 30 min di temossidazione; II = dopo 1 ora di temossidazione; III = dopo 4 ore di temossidazione; IV = dopo 5 ore di temossidazione; V = dopo 6 ore di temossidazione.

² limite di quantificazione = 0,02%

In particolare, nel caso dell'olio fritto con patata fresca, che si può considerare un alimento magro, non si osservano particolari variazioni rispetto all'olio termossidato. Invece, in presenza di patata surgelata che, fin dall'inizio, a causa del trattamento di prefrittura, risulta arricchita in grassi, si verifica una variazione del profilo lipidico dell'olio. In particolare, si osserva, al termine del processo di frittura (6 ore) una variazione della composizione in acidi grassi consistente nell'aumento dell'acido laurico ($C_{12:0}$) che non era presente in quantità dosabile nell'olio di partenza (**Tabella 1.4.3**) e nell'aumento degli acidi miristico ($C_{14:0}$) e palmitico ($C_{16:0}$). Il contenuto in acido oleico ($C_{18:1}$), inoltre, mentre rimane costante nel caso della frittura con patate fresche così come nel caso della termossidazione (**Tabella 1.4.1**), nel caso della frittura con patate surgelate subisce una diminuzione dal valore iniziale del 73,66% ad un valore finale pari al 70,47%.

La composizione in acidi grassi dei lipidi estratti dalle patate fresche e dalle patate prefritte/surgelate nel corso della frittura per sei ore consecutive a 180 °C è riportata in **Tabella 1.4.4** e **Tabella 1.4.5**.

Tabella 1.4.4. Composizione acidica percentuale (media \pm dev.st.) rilevata negli estratti lipidici dei campioni di patate fresche collezionate a diversi tempi di frittura in olio extravergine di oliva.

Picco	Acidi grassi	Campione ¹					
		0	I	II	VIII	X	XII
1 $C_{12:0}$	laurico	nq ²	nq	nq	nq	nq	nq
2 $C_{14:0}$	miristico	nq	nq	nq	nq	nq	0,1 \pm
3 $C_{16:0}$	palmitico	16,19 ^a \pm 0,01	11,44 ^b \pm 0,03	12,18 ^c \pm 0,05	11,52 ^d \pm 0,01	11,83 ^e \pm 0,12	14,38 ^f \pm 0,02
4 $C_{16:1}$ w7	palmitoleico	0,30 ^a \pm 0,02	0,62 ^b \pm 0,01	0,62 ^b \pm 0,00	0,61 ^b \pm 0,01	0,65 ^c \pm 0,04	0,60 ^b \pm 0,01
5 $C_{17:0}$	eptadecanoico	nq	0,05 ^a \pm 0,00	0,06 ^a \pm 0,01	0,05 ^a \pm 0,02	0,05 ^a \pm 0,00	0,06 ^a \pm 0,00
6 $C_{17:1}$	eptadecenoico	nq	0,07 ^a \pm 0,03	0,08 ^a \pm 0,01	0,07 ^a \pm 0,00	0,07 ^a \pm 0,01	0,06 ^a \pm 0,03
7 $C_{18:0}$	stearico	4,89 ^a \pm 0,12	3,07 ^b \pm 0,02	3,14 ^b \pm 0,09	3,12 ^b \pm 0,12	2,93 ^c \pm 0,05	3,17 ^b \pm 0,03
8 $C_{18:1}$ f	elaidinico	nq	0,05 ^a \pm 0,00	0,05 ^a \pm 0,02	0,04 ^a \pm 0,04	0,05 ^a \pm 0,01	0,07 ^a \pm 0,04
9 $C_{18:1}$ w9	oleico	nq	72,1 ^a \pm 0,02	70,25 ^b \pm 0,20	70,86 ^b \pm 1,02	70,50 ^b \pm 0,05	68,73 ^c \pm 1,05
10 $C_{18:1}$ w7	vaccenico	nq	1,59 ^a \pm 0,02	1,52 ^a \pm 0,20	1,68 ^b \pm 0,01	1,67 ^b \pm 0,05	1,60 ^b \pm 0,08
11 $C_{18:2}$ g		nq	nq	nq	nq	nq	nq
12 $C_{18:2}$ h		nq	nq	nq	nq	nq	nq
13 $C_{18:2}$ w6	linoleico	43,40 ^a \pm 2,08	8,47 ^b \pm 1,04	9,40 ^b \pm 0,59	9,35 ^b \pm 1,21	9,07 ^b \pm 0,25	8,72 ^b \pm 1,26
14 $C_{20:0}$	arachico	0,87 ^a \pm 0,02	0,42 ^b \pm 0,21	0,43 ^b \pm 0,02	0,43 ^b \pm 0,09	0,39 ^c \pm 0,03	0,41 ^b \pm 0,01
15 $C_{18:3}$ w3	linolenico	12,80 ^a \pm 1,26	0,60 ^b \pm 0,08	0,88 ^c \pm 0,01	0,95 ^c \pm 0,12	0,86 ^c \pm 0,21	0,65 ^b \pm 0,03
16 $C_{20:1}$ w11	eicosenoico	nq	0,24 ^a \pm 0,08	0,23 ^a \pm 0,01	0,25 ^a \pm 0,01	0,22 ^a \pm 0,00	0,23 ^a \pm 0,00

lettere differenti sulla stessa riga indicano differenze significative ($p < 0,05$) risultanti da ANOVA ad una via

¹ 0 = patata cruda; I = campione di patate fritte dopo 30 minuti di riscaldamento dell'olio; II = campione di patate fritte dopo 1 ora di riscaldamento dell'olio; VIII = campione di patate fritte dopo 4 ore di riscaldamento dell'olio; X = campione di patate fritte dopo 5 ore di riscaldamento dell'olio; XII = campione di patate fritte dopo 6 ore di riscaldamento dell'olio.

² limite di quantificazione = 0,02%

Tabella 1.4.5. Composizione acidica percentuale (media \pm dev.st.) rilevata negli estratti lipidici dei campioni di patate prefritte/surgelate collezionate a diversi tempi di frittura in olio extravergine di oliva.

Picco	Acidi grassi	Campione ¹					
		0	I	II	VIII	X	XII
1 C _{12:0}	laurico	0,14 \pm 0,01	nq ²	nq	nq	nq	nq
2 C _{14:0}	miristico	0,99 ^a \pm 0,02	0,11 ^b \pm 0,00	0,06 ^c \pm 0,00	0,08 ^c \pm 0,01	0,08 ^c \pm 0,02	0,10 ^b \pm 0,01
3 C _{16:0}	palmitico	44,43 ^a \pm 1,29	17,30 ^b \pm 1,97	13,14 ^c \pm 0,27	12,69 ^c \pm 0,49	12,19 ^c \pm 0,27	14,86 ^c \pm 1,12
4 C _{16:1} W7	palmitoleico	0,15 ^a \pm 0,20	0,55 ^b \pm 0,02	0,63 ^c \pm 0,02	0,63 ^c \pm 0,01	0,60 ^c \pm 0,03	0,60 ^b \pm 0,01
5 C _{17:0}	eptadecanoico	0,09 ^a \pm 0,00	0,05 ^b \pm 0,01	0,05 ^b \pm 0,08	0,05 ^b \pm 0,01	0,05 ^b \pm 0,00	0,05 ^b \pm 0,01
6 C _{17:1}	eptadecenoico	0,02 ^a \pm 0,00	0,06 ^b \pm 0,05	0,06 ^b \pm 0,00	0,06 ^b \pm 0,05	0,07 ^b \pm 0,08	0,06 ^b \pm 0,07
7 C _{18:0}	stearico	4,25 ^a \pm 0,19	3,71 ^b \pm 0,21	3,03 ^c \pm 0,01	3,05 ^c \pm 0,15	3,26 ^b \pm 0,04	3,21 ^b \pm 0,05
8 C _{18:1} I	elaidinico	0,12 ^a \pm 0,00	0,07 ^b \pm 0,04	0,07 ^b 0,00	0,05 ^b \pm 0,03	0,06 ^b \pm 0,01	0,08 ^b \pm 0,03
9 C _{18:1} W9	oleico	37,04 ^a \pm 1,58	65,55 ^b \pm 1,24	69,99 ^c \pm 0,99	70,42 ^c \pm 1,05	70,05 ^c \pm 0,84	67,47 ^b \pm 0,24
10 C _{18:3} W7	vaccenico	0,68 ^a \pm 0,01	1,53 ^b \pm 0,15	1,66 ^b \pm 0,70	1,59 ^b \pm 0,12	1,62 ^b \pm 0,20	1,53 ^b \pm 0,10
11 C _{18:2} I		0,20 ^a \pm 0,05	0,03 ^a \pm 0,00	nq	nq	0,03 ^b \pm 0,02	0,08 ^c \pm 0,00
12 C _{18:2} I'		0,19 ^a \pm 0,00	0,02 ^b \pm 0,01	nq	nq	0,03 ^b \pm 0,00	0,02 ^a \pm 0,00
13 C _{18:2} W6	linoleico	9,28 ^a \pm 1,28	8,60 ^a \pm 0,94	9,07 ^a \pm 1,28	8,99 ^a \pm 0,04	8,93 ^a \pm 0,96	8,82 ^a \pm 1,02
14 C _{20:0}	arachico	0,39 ^a \pm 0,00	0,47 ^b \pm 0,04	0,35 ^a \pm 0,04	0,39 ^a \pm 0,01	0,39 ^a \pm 0,09	0,42 ^b \pm 0,00
15 C _{18:3} W3	linolenico	0,63 ^a \pm 0,05	0,74 ^b \pm 0,00	0,70 ^c \pm 0,01	0,69 ^c \pm 0,01	0,67 ^c \pm 0,02	0,68 ^c \pm 0,00
16 C _{20:1} W11	eicosenoico	0,13 ^a \pm 0,00	0,22 ^b \pm 0,01	0,22 ^b \pm 0,05	0,23 ^b \pm 0,01	0,25 ^b \pm 0,00	0,23 ^b \pm 0,07

lettere differenti sulla stessa riga indicano differenze significative ($p < 0,05$) risultanti da ANOVA ad una via

¹ 0 = patata cruda; I = campione di patate fritte dopo 30 minuti di riscaldamento dell'olio; II = campione di patate fritte dopo 1 ora di riscaldamento dell'olio; VIII = campione di patate fritte dopo 4 ore di riscaldamento dell'olio; X = campione di patate fritte dopo 5 ore di riscaldamento dell'olio; XII = campione di patate fritte dopo 6 ore di riscaldamento dell'olio.

² limite di quantificazione = 0,02%

In **Figura 1.4.5** sono illustrate le modificazioni della composizione lipidica della patata fresca fritta in olio termossidato dopo 6 ore di frittura discontinua.. è evidente come la patata fritta presenta un profilo acidico più complesso rispetto alla stessa patata cruda.

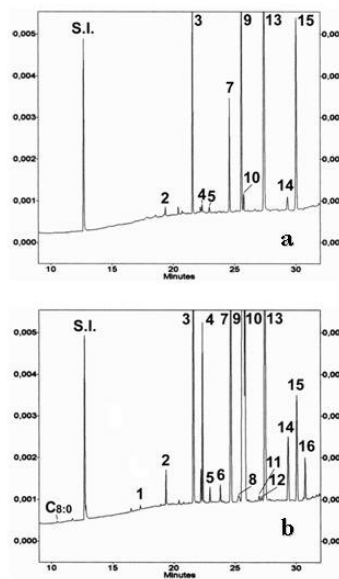


Figura 1.4.5. Profilo gascromatografico della composizione acidica rilevata nell'estratto lipidico di patate fresche cruda (a) e di patate fritte in olio extravergine di oliva (b). L'identificazione dei picchi è riportata in **Tabella 1.4.4.**

La **Figura 1.4.6** illustra, invece, le modificazioni della composizione lipidica riscontrate nella patata surgelata. Si osserva un profilo iniziale (**Figura 1.4.6a**) caratterizzato dalla presenza di cospicue quantità di acido palmitico, un ridotto contenuto di acido oleico e dalla presenza degli acidi laurico e miristico. Tali valori sono da mettere in relazione alla composizione dell'olio di pre-frittura, presumibilmente a base di olio di palma (Capella *et al.*, 1997). Al termine del ciclo di frittura (**Figura 1.4.6b**) il profilo lipidico appare modificato e più simile a quello dell'olio di partenza. È evidente, infatti, la riduzione degli isomeri *trans*, il minore contenuto di acido palmitico ed una maggiore quantità di acido oleico. Tali riscontri possono essere attribuiti allo scambio tra il grasso precedentemente assorbito dalla patata durante la fase di prefrittura industriale e quello del bagno di frittura (Varela, 1991).

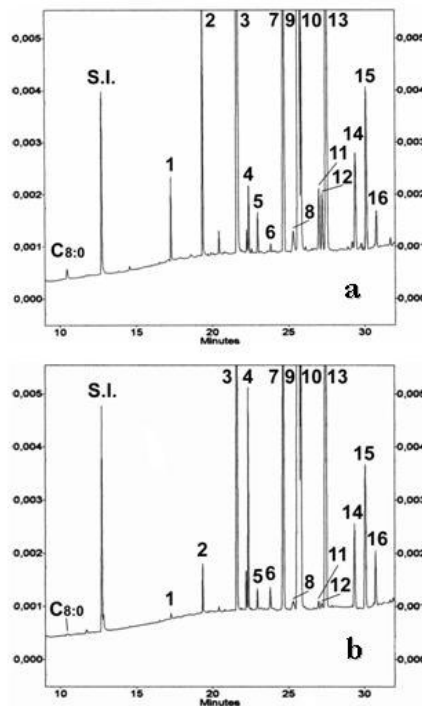
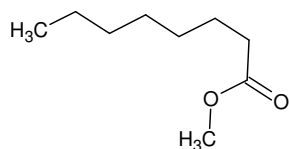


Figura 1.4.6. Profilo gascromatografico della composizione acidica rilevata nell'estratto lipidico di patate prefritte/surgelate crude (a) e delle stesse patate fritte in olio extravergine di oliva (b). L'identificazione dei picchi è riportata in **Tabella 1.4.5**.

Un'ultima considerazione deve essere fatta in merito alla valutazione dell'influenza della presenza di alimenti sull'evoluzione del processo di degradazione dell'olio ad alte temperature. I componenti lipidici polari (acidi grassi liberi, mono- e di-gliceridi) sono presenti in piccole quantità nell'olio e si formano nel corso dell'idrolisi che avviene ad alte temperature (Frankel, 1998). La loro formazione è stata confermata sperimentalmente, in quanto è stata rilevata una concentrazione in acidi grassi liberi nell'olio estratto dalle patate (1%) superiore a quella dell'olio di frittura (0,3%).

Per quantificare il fenomeno di termossidazione, è stato, invece, calcolato il contenuto in metil-ottanoato ($C_{8,0}$) formatosi durante il processo per effetto della scissione β -omolitica degli idroperossidi allilici (Frankel, 1998, Marquez-Ruiz and Dobarganes, 1996a).



Metil-ottanoato $C_{8,0}$

Confrontando i valori di metil-ottanoato ottenuti nella prova di termossidazione con quelli rilevati nel corso della frittura con patate si evince come il trattamento a $180^{\circ}C$ in assenza di alimenti sia più drastico ai fini dell'ossidazione della matrice lipidica (**Tabella 1.4.6**).

Tabella 1.4.6. Contenuto in metil-ottanoato ($C_{8,0}$) espresso in ppm di metil-nonanoato ($C_{9,0}$) riscontrato nei campioni di olio e di patate sottoposti a prove di termossidazione e frittura.

	Tempo di trattamento (min)					
	0	30	60	240	300	360
olio termossidato	nq ¹	nq	nq	0,43 ± 0,01	0,47 ± 0,02	0,57 ± 0,012
olio con patate fresche	nq	nq	nq	nq	nq	0,23 ± 0,01
olio con patate surgelate	nq	nq	nq	nq	0,46 ± 0,04	0,68 ± 0,05
patate fresche	nq	nq	nq	nq	nq	nq
patate surgelate	3,19 ± 0,02	nq	nq	nq	0,31 ± 0,01	0,3 ± 0,02

¹ limite di quantificazione = 0,02%

In **Figura 1.4.7** si riporta l'andamento della formazione di $C_{8,0}$ nel corso della frittura con patate fresche e con patate prefritte/surgelate.

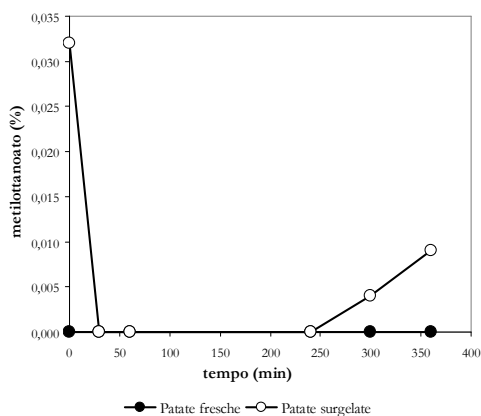


Figura 1.4.7. Andamento della formazione di metil-ottanoato nei campioni di patate fresche e prefritte/surgelate dopo frittura in olio extravergine di oliva.

Risulta evidente come il contenuto di C8:0 sia maggiore nella patata surgelata che non in quella fresca, dopo 6 ore di frittura discontinua in olio extravergine di oliva. Ciò può essere attribuito, in parte, all'azione dell'acqua presente nell'alimento che interviene a modificare il meccanismo di formazione e degradazione degli idroperossidi (Frankel, 1998), in parte, al contenuto di antiossidanti naturalmente presenti nella patata, e soprattutto in quella fresca.

1.4.3 EVOLUZIONE DEGLI ANTIOSSIDANTI FENOLICI NELL'OLIO EXTRA VERGINE DI OLIVA IN FRITTURA

L'evoluzione dei composti fenolici estratti dall'olio nel corso delle prove di termossidazione e frittura è stata seguita mediante HPLC a fase inversa per approfondire il contributo antiossidante di tali sostanze durante i processi termici. In **Figura 1.4.8** si riportano i profili HPLC delle sostanze fenoliche estratte dall'olio prima del riscaldamento (**a**), dopo 2 ore di termossidazione (**b**) ed al termine delle sei ore di trattamento termico (**c**).

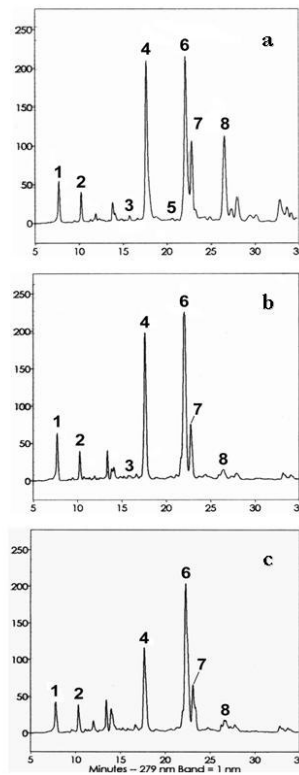


Figura 1.4.8. Profili HPLC dei composti fenolici riscontrati nei campioni di olio sottoposti a termossidazione al tempo 0 (**a**); dopo 2 ore (**b**) e dopo 6 ore (**c**) di riscaldamento continuo a 180°C. L'identificazione dei picchi è riportata in **Tabella 1.4.7**.

In **Tabella 1.4.7** si riportano i dati quantitativi dei composti fenolici individuati nel corso della prova di termossidazione.

Tabella 1.4.7. Composizione fenolica rilevata nei campioni di olio extravergine di olive sottoposti a termossidazione continua per 6 ore a 180°C.

Campioni ¹	Composti fenolici (ppm tirosolo) ²							
	OHTy	Ty	Inc 16	OHTy-DEDA	Inc 21	Ty-EDA	AP	OHTy-EA
0	15 ^a ± 0,01	10 ^a ± 0,00	3 ^a ± 0,00	150 ^a ± 4,09	nq	140 ^a ± 10,01	35 ^a ± 2,00	52 ^a ± 1,23
I	8 ^b ± 0,34	9 ^b ± 0,12	3 ^a ± 0,02	139 ^b ± 7,14	6 ^a ± 0,12	135 ^a ± 9,01	34 ^a ± 4,06	14 ^b ± 0,98
II	14 ^a ± 1,02	13 ^c ± 0,23	3 ^a ± 0,05	110 ^c ± 2,21	nq	123 ^b ± 9,28	33 ^a ± 1,04	12 ^b ± 2,09
III	13 ^a ± 0,94	9 ^b ± 1,29	3 ^a ± 0,10	116 ^c ± 9,01	6 ^a ± 0,07	133 ^a ± 19,09	33 ^a ± 6,64	10 ^b ± 0,03
IV	11 ^a ± 0,00	9 ^b ± 1,01	3 ^a ± 0,30	94 ^d ± 0,48	5 ^a ± 0,09	122 ^b ± 6,99	31 ^a ± 4,12	10 ^b ± 1,01
V	21 ^c ± 2,01	9 ^b ± 0,00	4 ^a ± 0,00	67 ^c ± 1,12	5 ^a ± 0,30	99 ^c ± 2,09	27 ^b ± 2,65	9 ^b ± 0,05
VI	15 ^a ± 0,18	10 ^a ± 1,45	nq	46 ^f ± 0,89	nq	92 ^d ± 2,87	28 ^b ± 3,90	4 ^c ± 0,23

nq = non quantificabile

lettere differenti sulla stessa colonna indicano differenze significative (p<0,05) risultanti da ANOVA ad una via

¹ 0 = olio non termossidato; I = dopo 30 min di termossidazione; II = dopo 1 ora di termossidazione; III = dopo 2 ore di termossidazione; IV = dopo 3 ore di termossidazione; V = dopo 4 ore di termossidazione; VI = dopo 6 ore di termossidazione

² identificazione dei composti; OHTy = idrossitirosolo; Ty = Tirosolo; Inc 16 = composto incognito r.t. 16 min; OHTy-DEDA = forma dialdeidica della decarbosimetil-oleuropeina aglicone; Inc 21 = composto incognito r.t.21 min; Ty-EDA = forma dialdeidica della decarbosimetil-ligstroside aglicone; AP = acetossipinoresinolo; OHTy-EA = oleuropeina aglicone.

È possibile osservare che le maggiori variazioni quantitative si verificano a carico dei composti derivati dell'idrossitirosolo. In particolare, l'oleuropeina aglicone (OHTy-EA), subisce un brusco decremento fin dai primi trenta minuti di riscaldamento (**Tabella 1.4.7**), mentre per l'idrossitirosolo (OHTy) e per la forma dialdeidica della decarbosimetil-oleuropeina aglicone (OHTy-DEDA) tale decremento appare più graduale nel tempo indicando una maggiore resistenza di tali composti alla termossidazione.

I composti derivati del tirosolo si sono rivelati meno influenzati dal trattamento termico e le variazioni osservate sono risultate di minima entità. Questo comportamento è stato verificato in particolare per l'acetossipinoresinolo (PR) che risulta particolarmente stabile al riscaldamento, analogamente a quanto avviene nel corso dell'autossidazione a temperatura ambiente durante la conservazione dell'olio (Brenes *et al.*, 2000).

In **Figura 1.4.9** ed in **Figura 1.4.10** rispettivamente si riportano i profili HPLC delle sostanze fenoliche estratte dai campioni di olio extravergine di oliva prelevati durante la prova di frittura con patate fresche e con patate prefritte/surgelate.

I dati quantitativi relativi ai singoli composti fenolici rilevati nei campioni di olio collezionati durante le prove di frittura con i due diversi alimenti sono riportati in **Tabella 1.4.8** ed in **Tabella 1.4.9**.

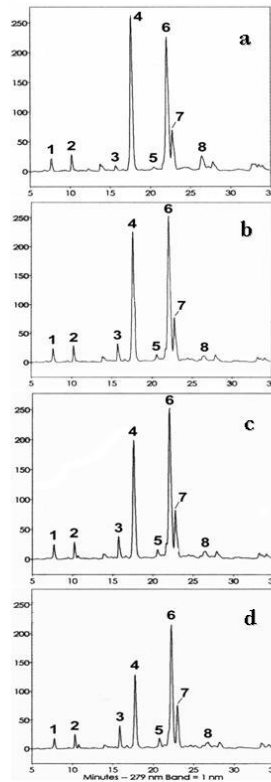


Figura 1.4.9. Profili HPLC dei composti fenolici riscontrati nei campioni di olio sottoposti a frittura in presenza di patate fresche dopo 30 minuti (a); dopo 1 ora (b), dopo 2 ore (c) e dopo 6 ore (d) di frittura discontinue a 180°C. L'identificazione dei picchi è riportata in **Tabella 1.4.8.**

Tabella 1.4.8. Composizione fenolica rilevata nei campioni di olio extravergine di oliva sottoposti a frittura discontinua a 180°C in presenza di patate fresche.

Campioni ¹	Composti fenolici (ppm tirosolo) ²							
	OHTy	Ty	Inc 16	OHTy-DEDA	Inc 21	Ty-EDA	AP	OHTy-EA
0	15 ^a ± 0,01	10 ^a ± 0,00	3 ^a ± 0,00	150 ^a ± 4,09	nq	140 ^a ± 10,01	35 ^a ± 2,00	52 ^a ± 1,23
I	12 ^b ± 0,02	14 ^b ± 0,15	3 ^a ± 0,03	135 ^b ± 2,14	3 ^a ± 0,01	112 ^b ± 12,04	30 ^b ± 1,38	15 ^b ± 0,29
II	11 ^b ± 0,10	14 ^b ± 0,06	7 ^b ± 0,02	115 ^c ± 1,59	6 ^b ± 0,15	120 ^c ± 1,49	31 ^b ± 2,94	9 ^c ± 0,79
III	10 ^b ± 0,06	12 ^c ± 0,12	7 ^b ± 0,01	99 ^d ± 0,98	7 ^c ± 0,03	118 ^c ± 16,14	31 ^b ± 1,94	9 ^c ± 1,40
IV	9 ^c ± 0,06	11 ^c ± 0,08	10 ^c ± 0,00	83 ^c ± 1,45	6 ^b ± 0,10	111 ^b ± 1,08	30 ^b ± 0,93	8 ^c ± 0,17
V	8 ^c ± 0,07	10 ^c ± 0,14	11 ^d ± 0,04	73 ^f ± 0,27	7 ^c ± 0,04	110 ^b ± 10,17	31 ^b ± 2,36	9 ^c ± 0,59
VI	7 ^c ± 0,00	5 ^d ± 0,01	10 ^d ± 0,15	44 ^g ± 1,57	7 ^c ± 0,08	81 ^d ± 2,59	27 ^c ± 1,54	3 ^d ± 0,01

nq = non quantificabile

lettere differenti sulla stessa colonna indicano differenze significative (p<0,05) risultanti da ANOVA ad una via

¹ 0 = olio non fritto; I = dopo 30 min di frittura; II = dopo 1 ora di frittura; III = dopo 2 ore di frittura; IV = dopo 3 ore di frittura; V = dopo 4 ore di frittura; VI = dopo 6 ore di frittura.

² identificazione dei composti; OHTy = idrossitirosolo; Ty = Tirosolo; Inc 16 = composto incognito r.t. 16 min; OHTy-DEDA = forma dialdeidica della decarbossimetil-oleuropeina aglicone; Inc 21 = composto incognito r.t.21 min; Ty-EDA = forma dialdeidica della decarbossimetil-ligstroside aglicone; AP = acetossipinoresinolo; OHTy-EA = oleuropeina aglicone.

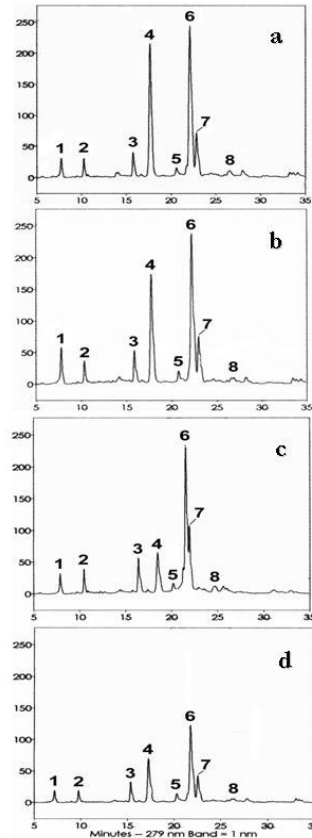


Figura 1.4.10. Profili HPLC dei composti fenolici riscontrati nei campioni di olio sottoposti a frittura in presenza di patate fresche dopo 30 minuti (a); dopo 1 ora (b), dopo 2 ore (c) e dopo 6 ore (d) di frittura discontinue a 180°C. L'identificazione dei picchi è riportata in **Tabella 1.4.9**.

Tabella 1.4.9. Composizione fenolica (media \pm dev.st.) rilevata nei campioni di olio extravergine di oliva sottoposti a frittura discontinua a 180°C in presenza di patate prefritte/surgelate.

Campioni ¹	Composti fenolici (ppm tirosolo) ²							
	OHTy	Ty	Inc 16	OHTy-DEDA	Inc 21	Ty-EDA	AP	OHTy-EA
0	15 ^a \pm 0,01	10 ^a \pm 0,00	3 ^a \pm 0,00	150 ^a \pm 4,09	nq	140 ^a \pm 10,01	35 ^a \pm 2,00	52 ^a \pm 1,23
I	17 ^b \pm 0,02	14 ^b \pm 1,25	20 ^b \pm 3,02	120 ^b \pm 2,09	5 ^a \pm 0,01	135 ^a \pm 8,24	33 ^a \pm 1,96	18 ^b \pm 1,10
II	30 ^c \pm 1,26	19 ^c \pm 1,03	22 ^b \pm 1,08	90 ^c \pm 1,54	6 ^b \pm 0,00	126 ^b \pm 1,29	32 ^b \pm 2,54	nq
III	28 ^c \pm 0,98	17 ^c \pm 0,58	23 ^b \pm 1,95	50 ^d \pm 4,25	3 ^c \pm 0,06	116 ^c \pm 10,08	24 ^b \pm 1,47	3 ^c \pm 0,03
IV	23 ^d \pm 1,20	9 ^a \pm 0,84	17 ^c \pm 0,28	47 ^d \pm 2,07	7 ^b \pm 0,12	102 ^d \pm 12,08	29 ^c \pm 0,29	3 ^c \pm 0,18
V	14 ^a \pm 0,27	11 ^d \pm 1,27	20 ^b \pm 0,84	43 ^e \pm 1,98	8 ^b \pm 1,78	93 ^d \pm 0,88	30 ^b \pm 0,14	3 ^c \pm 0,24
VI	10 ^a \pm 0,21	8 ^c \pm 0,02	18 ^c \pm 0,21	41 ^f \pm 1,28	6 ^b \pm 0,07	79 ^e \pm 1,94	32a \pm 1,88	3 ^c \pm 0,04

nq = non quantificabile

lettere differenti sulla stessa colonna indicano differenze significative ($p < 0,05$) risultanti da ANOVA ad una via

¹ 0 = olio non fritto; I = dopo 30 min di frittura; II = dopo 1 ora di frittura; III = dopo 2 ore di frittura; IV = dopo 3 ore di frittura; V = dopo 4 ore di frittura; VI = dopo 6 ore di frittura.

² identificazione dei composti; OHTy = idrossitirosolo; Ty = Tirosolo; Inc 16 = composto incognito r.t. 16 min; OHTy-DEDA = forma dialcaldica della decarbossimetil-oleuropeina aglicone; Inc 21 = composto incognito r.t. 21 min; Ty-EDA = forma dialcaldica della decarbossimetil-ligstroside aglicone; AP = acetossipinoresinolo; OHTy-EA = oleuropeina aglicone.

Sia nell'olio termossidato che nell'olio fritto in presenza di patate fresche e di patate prefritte/surgelate, si evidenzia la neoformazione di due picchi incogniti con tempo di ritenzione pari a 16 e 21 minuti la cui quantità aumenta progressivamente durante le 6 ore di riscaldamento a 180°C.

Dall'analisi delle **Figure 1.4.9** e **1.4.10** si osserva una maggiore degradazione dell'olio utilizzato per la frittura con patate surgelate rispetto a quello fritto in presenza di patate fresche.

In particolare si assiste ad un abbattimento del contenuto in composti secoidiroidi contenenti idrossitirosolo accompagnato da un aumento di idrossitirosolo libero

Tale riscontro è chiaramente attribuibile al verificarsi di reazioni di idrolisi a carico dei fenoli complessi.

In **Figura 1.4.11** si riporta l'evoluzione dei composti fenolici contenenti idrossitirosolo mentre l'andamento dei composti derivati del tirosolo viene rappresentato in **Figura 1.4.12**.

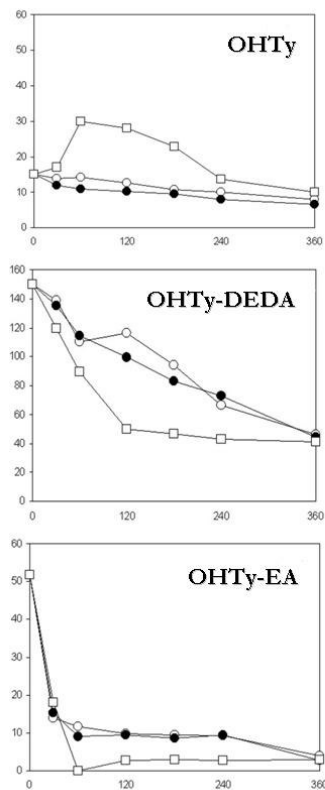


Figura 1.4.11. Evoluzione dei composti fenolici contenenti idrossitirosolo (OHTy) nel corso delle 6 ore di termossidazione (○), di frittura in presenza di patate fresche (●) e di frittura in presenza di patate prefritte/surgelate (□).

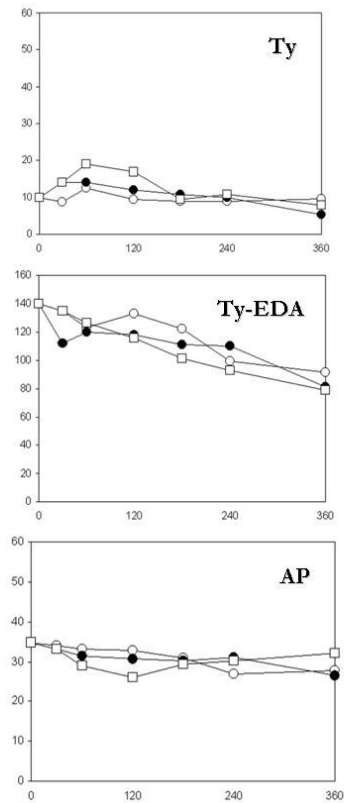


Figura 1.4.12. Evoluzione dei composti fenolici contenenti idrossitiroso (OHTy) nel corso delle 6 ore di termossidazione (○), di frittura in presenza di patate fresche (●) e di frittura in presenza di patate prefritte/surgelate (□).

1.4.4 INTERAZIONE TRA GLI ANTIOSSIDANTI FENOLICI DELL'OLIO EXTRA-VERGINE E L'ALIMENTO FRITTO

Le sostanze fenoliche interagiscono con la matrice alimentare umida ripartendosi ad elevate temperature verso la fase acquosa (Medina *et al.*, 1998, Sacchi *et al.*, 2001).

Lo scambio olio-acqua che avviene durante la frittura e le proprietà chimico-fisiche degli antiossidanti fenolici degli oli extra-vergini, quali l'idrolisi e la ripartizione verso la fase acquosa, fanno ipotizzare che, oltre alla frazione lipidica in senso stretto (trigliceridi e componenti dell'insaponificabile) la matrice amilacea della patata possa assorbire ed interagire con i componenti minori polari presenti nell'olio extra-vergine. Il comportamento delle sostanze fenoliche è stato approfondito applicando una opportuna metodica di estrazione (Brenes *et al.*, 1995) e studiando il profilo fenolico con la metodica HPLC applicata alle analisi della composizione fenolica degli oli (§ 1.3.3.12).

Per verificare la natura dei composti presenti negli estratti idro-metanolici delle patate fritte, è stata effettuata una prova di frittura anche in olio rettificato di oliva in cui non erano presenti sostanze fenoliche, allontanate completamente dal processo di rettificazione (Solinas., 1987).

Nelle **Figure 1.4.13** e **1.4.14** si riportano i profili HPLC delle sostanze fenoliche estratte rispettivamente dalle patate fresche e dalle patate prefritte/surgelate nel corso della frittura. I dati quantitativi di tali composti sono riportati in **Tabella 1.4.10** per le patate fresche ed in **Tabella 1.4.11** per le patate prefritte/surgelate.

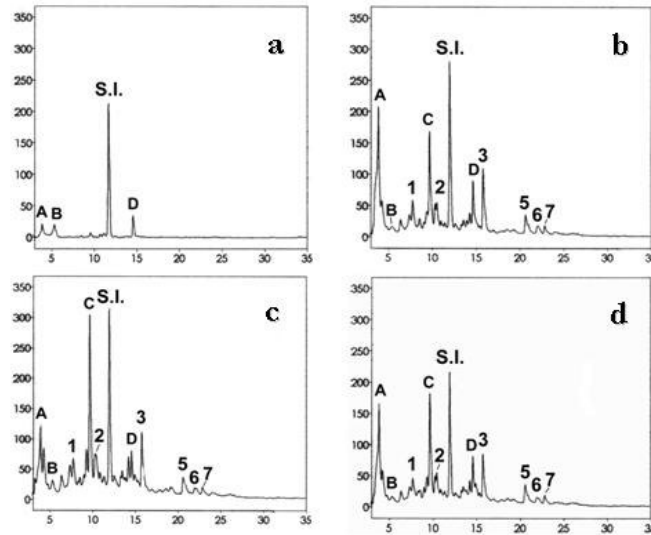


Figura 1.4.13. Profili HPLC delle sostanze fenoliche estratte dai campioni di patate fresche al tempo 0 (a), dopo 2 cicli di frittura (b), dopo 4 cicli di frittura (c) e dopo 12 cicli di frittura (d).

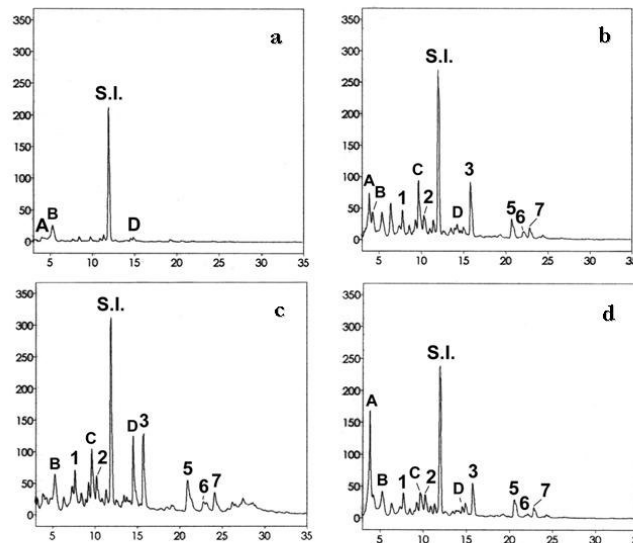


Figura 1.4.14. Profili HPLC delle sostanze fenoliche estratte dai campioni di patate prefritte/surgelate al tempo 0 (a), dopo 2 cicli di frittura (b), dopo 4 cicli di frittura (c) e dopo 12 cicli di frittura (d).

L'estrazione delle sostanze fenoliche dalle patate crude (prima del trattamento di frittura) ha consentito di evidenziare la presenza di alcuni composti non identificati in ambedue i tipi di patata (picchi A, B e D). Nella patata surgelata, tuttavia, solo il composto incognito a tempo di eluizione pari a 5,4 minuti (picco B) è presente in quantità rilevabili.

Tabella 1.4.10. Composizione fenolica (media \pm dev.st.) rilevata nei campioni di patate fresche oggetto di studio.

Composti fenolici ² (ppm acido siringico)	Numero di frittore ¹						
	0	I	II	IV	VI	VIII	XII
Inc 3,9	15 ^a \pm 0,05	150 ^b \pm 5,27	125 ^c \pm 4,98	73 ^d \pm 5,07	99 ^e \pm 7,04	130 ^f \pm 12,08	70 ^d \pm 2,04
Inc 5,4	15 ^a \pm 0,01	60 ^b \pm 2,18	nq	25 ^c \pm 5,01	49 ^d \pm 2,09	nq	23 ^c \pm 3,79
OHTy	nq	30 ^a \pm 1,05	30 ^a \pm 5,04	33 ^a \pm 0,89	41 ^b \pm 0,07	33 ^a \pm 2,08	32 ^a \pm 1,05
Inc 9,7	nq	50 ^a \pm 2,06	67 ^b \pm 2,98	102 ^c \pm 10,42	20 ^d \pm 0,89	90 ^c \pm 5,06	22 ^d \pm 0,57
Ty	nq	12 ^a \pm 0,99	14 ^a \pm 1,59	19 ^b \pm 1,01	19 ^b \pm 1,08	18 ^b \pm 1,51	17 ^b \pm 0,7
Inc 14,6	23 ^a \pm 1,05	50 ^b \pm 5,87	44 ^b \pm 8,12	25 ^a \pm 2,07	30 ^c \pm 2,07	35 ^c \pm 1,09	64 ^d \pm 1,09
Inc 16	nq	50 ^a \pm 2,38	51 ^a \pm 2,09	54 ^a \pm 4,09	59 ^a \pm 4,81	60 ^a \pm 2,95	46 ^b \pm 1,09
Inc 21	nq	13 ^a \pm 1,28	13 ^a \pm 0,79	14 ^a \pm 2,07	15 ^a \pm 4,08	13 ^a \pm 1,084	17 ^a \pm 2,01
Ty-EDA	nq	14 ^a \pm 1,37	12 ^a \pm 1,09	14 ^a \pm 0,86	16 ^a \pm 1,94	16 ^a \pm 1,787	12 ^a \pm 0,84
AP	nq	10 ^a \pm 0,27	13 ^b \pm 1,89	15 ^c \pm 1,09	14 ^c \pm 2,07	17 ^d \pm 2,09	15 ^c \pm 1,08

nq = non quantificabile

lettere differenti sulla stessa riga indicano differenze significative ($p < 0,05$) risultanti da ANOVA ad una via

¹ 0 = patata cruda; I = campione di patate fritte dopo 30 minuti di riscaldamento dell'olio; II = campione di patate fritte dopo 1 ora di riscaldamento dell'olio; IV = campione di patate fritte dopo 2 ore di riscaldamento dell'olio; VI = campione di patate fritte dopo 3 ore di riscaldamento dell'olio; VIII = campione di patate fritte dopo 4 ore di riscaldamento dell'olio; XII = campione di patate fritte dopo 6 ore di riscaldamento dell'olio.

² Identificazione dei composti: Inc 3,9 = composto incognito r.t. 3,9 min; Inc 5,4 = composto incognito r.t. 5,4 min; OHTy = Idrossi-tirosolo; Inc 9,7 = composto r.t. 9,7 min; Ty = Tirosolo; Inc 14,6 = composto incognito r.t. 14,6 min; Inc 16 = composto incognito r.t. 16 min; Inc 21 = composto incognito r.t. 21 min; Ty-EDA = forma dialeideica della decarbossimetil-ligstroside aglicone; AP = acetossipinoresinolo.

Tabella 1.4.11. Composizione fenolica (media \pm dev.st.) rilevata nei campioni di patate prefritte/surgelatee oggetto di studio.

Composti fenolici ² (ppm acido siringico)	Numero di frittore ¹						
	0	I	II	IV	VI	VIII	XII
Inc 3,9	nq	42 ^a \pm 0,15	53 ^b \pm 1,08	18 ^c \pm 0,07	129 ^d \pm 10,28	129 ^d \pm 10,84	115 ^d \pm 8,11
Inc 5,4	20 ^a \pm 1,59	32 ^b \pm 2,07	35 ^b \pm 2,12	37 ^b \pm 3,41	52 ^c \pm 1,84	40 ^d \pm 0,94	45 ^c \pm 1,89
OHTy	nq	25 ^a \pm 1,08	24 ^a \pm 0,96	28 ^b \pm 2,07	20 ^c \pm 0,05	24 ^a \pm 1,92	20 ^c \pm 2,88
Inc 9,7	nq	38 ^a \pm 2,99	49 ^b \pm 5,81	39 ^a \pm 2,02	16 ^c \pm 1,81	18 ^c \pm 2,00	16 ^c \pm 1,95
Ty	nq	22 ^a \pm 1,01	11 ^b \pm 1,89	27 ^c \pm 2,90	16 ^d \pm 2,00	15 ^d \pm 1,01	12 ^b \pm 0,93
Inc 14,6	nq	10 ^a \pm 3,88	7 ^a \pm 0,26	44 ^b \pm 5,22	27 ^c \pm 1,94	10 ^a \pm 1,01	11 ^a \pm 2,08
Inc 16	nq	44 ^a \pm 1,85	43 ^a \pm 2,00	48 ^b \pm 5,54	29 ^c \pm 0,84	35 ^d \pm 0,08	32 ^d \pm 2,08
Inc 21	nq	24 ^a \pm 0,25	14 ^b \pm 1,29	28 ^c \pm 1,01	18 ^d \pm 1,86	22 ^a \pm 2,22	25 ^a \pm 2,81
Ty-EDA	nq	10 ^a \pm 2,00	11 ^a \pm 1,94	10 ^a \pm 0,09	12 ^a \pm 0,02	11 ^a \pm 1,08	13 ^a \pm 1,25
AP	nq	14 ^a \pm 1,55	8 ^b \pm 0,25	12 ^a \pm 1,29	19 ^c \pm 1,12	28 ^d \pm 2,12	26 ^d \pm 0,96

nq = non quantificabile

lettere differenti sulla stessa riga indicano differenze significative ($p < 0,05$) risultanti da ANOVA ad una via

¹ 0 = patata cruda; I = campione di patate fritte dopo 30 minuti di riscaldamento dell'olio; II = campione di patate fritte dopo 1 ora di riscaldamento dell'olio; IV = campione di patate fritte dopo 2 ore di riscaldamento dell'olio; VI = campione di patate fritte dopo 3 ore di riscaldamento dell'olio; VIII = campione di patate fritte dopo 4 ore di riscaldamento dell'olio; XII = campione di patate fritte dopo 6 ore di riscaldamento dell'olio.

² Identificazione dei composti: Inc 3,9 = composto incognito r.t. 3,9 min; Inc 5,4 = composto incognito r.t. 5,4 min; OHTy = Idrossi-tirosolo; Inc 9,7 = composto r.t. 9,7 min; Ty = Tirosolo; Inc 14,6 = composto incognito r.t. 14,6 min; Inc 16 = composto incognito r.t. 16 min; Inc 21 = composto incognito r.t. 21 min; Ty-EDA = forma dialeideica della decarbossimetil-ligstroside aglicone; AP = acetossipinoresinolo.

Fin dai primi prelievi di frittura in olio extra vergine, si osserva come il profilo fenolico delle patate mostri la presenza di composti fenolici assorbiti dall'olio del bagno di frittura quali l'idrossitirosolo (OHTy), il tirosolo (Ty), la forma dialdeidica della decarbossimetil-ligstrosioide aglicone (Ty-EDA) e l'acetossi-pinoresinolo (AP). Tali composti sono presenti in quantità piuttosto simili in ambedue i tipi di patata impiegata. Non si ritrovano invece i composti secoiridoidi contenenti idrossitirosolo quali la forma dialdeidica della decarbossimetil-oleuropeina (OHTy-DEDA) e l'aglicone dell'oleuropeina (OHTy-EA). D'altro canto, proprio tali composti a maggiore attività antiossidante subiscono la maggiore degradazione termica nell'olio dovuta anche alla loro interazione con i radicali liberi nelle reazioni di propagazione dell'ossidazione (§ 1.4.3).

È invece in pieno accordo con i dati riportati in letteratura la presenza dell'idrossitirosolo (Fogliano et al, 1999; Sacchi et al, 2001) e dell'acetossi-pinoresinolo (Brenes et al. 2000).

Accanto ai composti provenienti dall'olio, si rinvencono nei profili HPLC delle patate, anche picchi relativi ai composti di neo-formazione derivanti dalla degradazione dell'olio nel corso delle prove di frittura (picchi 3 e 5).

Nelle patate fritte si rinviene, infine un ultimo composto non identificato (picco C) che non era presente nelle patate crude e nemmeno nell'olio impiegato per le prove di termossidazione e frittura.

Al fine di verificare lo scambio di fenoli tra il bagno di frittura, olio extravergine di oliva, e l'alimento in esse immerso, patate, è stata effettuata una prova di frittura in olio rettificato di oliva (**Figura 1.4.15**).

Il profilo HPLC dell'olio rettificato di partenza (**a**), a causa del processo di

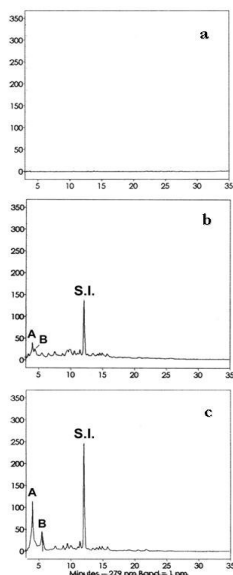


Figura 1.4.15. Profili HPLC della componente fenolica di olio rettificato (**a**), di un campione di patate fresche (**b**) e di patate prefritte/surgelate (**c**) fritte in olio rettificato di oliva.

rettificazione, mostra come l'olio sia del tutto privo di composti fenolici. I profili fenolici delle patate fresche (**b**) e surgelata (**c**) dopo frittura in olio rettificato mostrano una maggiore concentrazione dei picchi A e B, mentre non si evidenzia la presenza del picco C che invece si ritrova nelle patate fritte in olio extra vergine di oliva. Tale composto non può, quindi, essersi formato esclusivamente per effetto della temperatura di frittura ma deriva da componenti presenti nell'olio extra-vergine ed allontanati con la rettificazione.

Ciò che appare comunque con buona chiarezza è che durante la frittura in olio extra vergine si osservano modificazione del profilo fenolico dell'alimento fritto dovute principalmente all'assorbimento di antiossidanti presenti nell'olio, ma anche alla formazione di nuovi composti derivanti dall'interazione olio-alimento.

1.4.5 IDENTIFICAZIONE MEDIANTE LC/MS DEI COMPOSTI FENOLICI MIGRATI DURANTE LA FRITTURA

In **Figura 1.4.16** si riportano i cromatogrammi HPLC-UV relativi agli estratti fenolici di un campione di olio prima del processo di frittura e di una patata fritta nello stesso olio dopo 30 minuti di riscaldamento a 180-200°C.

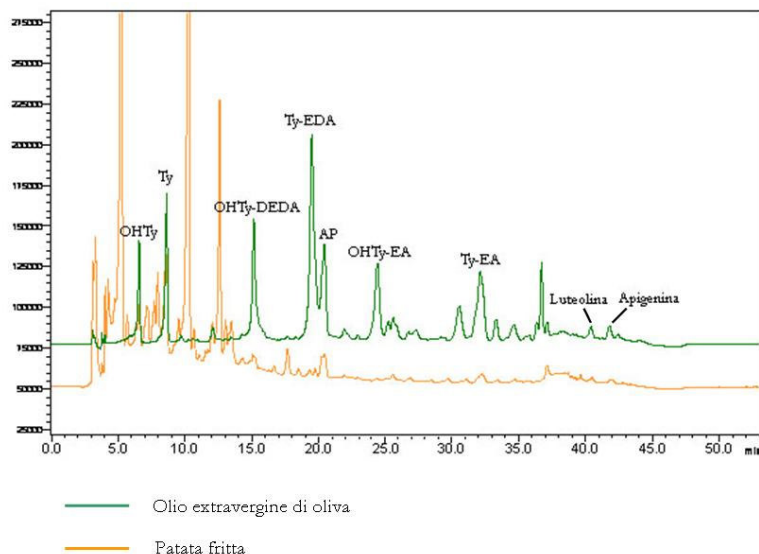


Figura 1.4.16. Profili HPLC di un campione di olio extravergine di oliva prima della frittura a 180°C e di un estratto fenolico di patata fritta nello stesso olio dopo 30 minuti di riscaldamento.

Risulta evidente la migrazione di alcuni composti fenolici dall'olio extravergine alla patata in esso fritta. Confermando quanto riportato nel precedente paragrafo, si nota come dopo soli 30 minuti di frittura in olio extravergine di oliva la patata risulta arricchita di fenoli semplici provenienti dal grasso circostante, quali idrossitirosolo (OHTy) e tirosolo (Ty), nonché biofenoli complessi, quali la forma dialdeidica della decarbossimetil-ligstroside aglicone (Ty-EDA) e l'acetossipinoresinolo (AP).

Il profilo fenolico delle patate risulta però molto complesso dopo la frittura, molto probabilmente a causa di composti di neoformazione originatisi dalle interazioni tra alimento e olio nonché dall'utilizzo di temperature elevate.

Si è cercato, pertanto, mediante spettrometria di massa di confermare la migrazione dei composti fenolici dell'olio e di indagare su gli altri composti presenti nell'estratto idroalcolico ottenuto dalle patate fritte.

Sebbene i composti fenolici diano picchi di minor intensità in tecnica di ionizzazione *elettrospray* (ESI) con modalità di acquisizione in ioni negativi rispetto alla modalità in positivo (Cardoso *et al.*, 2005), per l'analisi dei nostri campioni è stata utilizzata questa tecnica in quanto dava spettri più puliti e le condizioni di analisi messe a punto hanno permesso l'ottenimento di uno ione pseudomolecolare deprotonato [M-H]⁻ per tutti i principali composti di interesse.

Inoltre, per confermare e verificare le informazioni strutturali relative allo ione molecolare deprotonato sono stati modificati i parametri operativi dell'interfaccia ESI in modo da generare una moderata dissociazione-frammentazione indotta dalle collisioni nella regione di trasporto ionico.

Gli spettri dei composti oggetto di studio sono stati inoltre confrontati con quelli di standard puri iniettati nelle stesse condizioni operative, quando disponibili e con quelli riportati in letteratura.

In **Figura 1.4.17** e in **Figura 1.4.18** si riportano rispettivamente i cromatogrammi della corrente ionica totale (TIC) relativi ad un campione di estratto fenolico di olio extravergine di oliva e di patata dopo 30 di frittura.

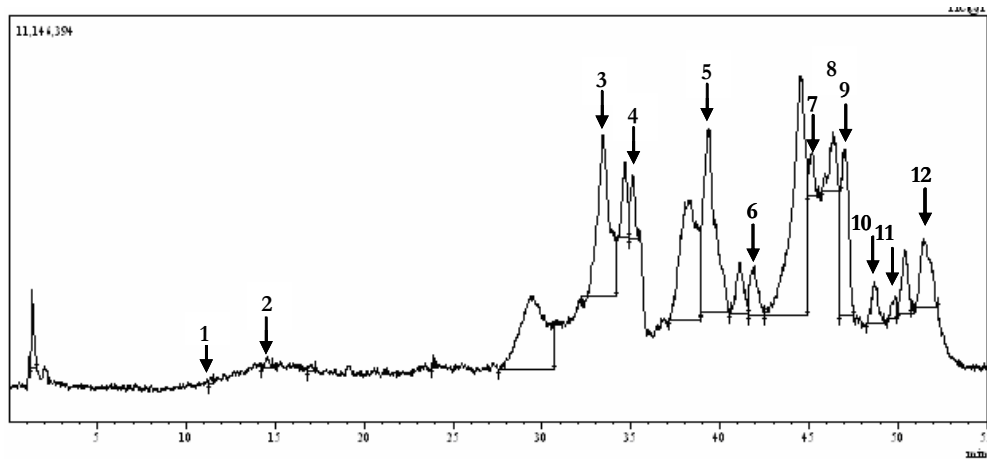


Figura 1.4.17. Cromatogramma relativo alla corrente ionica totale (TIC) di un estratto fenolico di un olio extravergine.

Identificazione dei picchi: 1 idrossitirosolo (OHTy); 2 tirosolo (Ty); 3 forma dialdeidica della decarbossimetil oleuropeina aglicone (OHTY-DEDA); 4 forma dialdeidica dell'oleuropeina aglicone; 5 forma dialdeidica del carbossimetil-ligstroside ossidata; 6 oleuropeina aglicone (OHTy-EA); 7 derivato del ligstroside; 8 luteolina; 9 oleuropeina aglicone; 10 oleuropeina aglicone; 11 ligstroside aglicone; 12 apigenina.

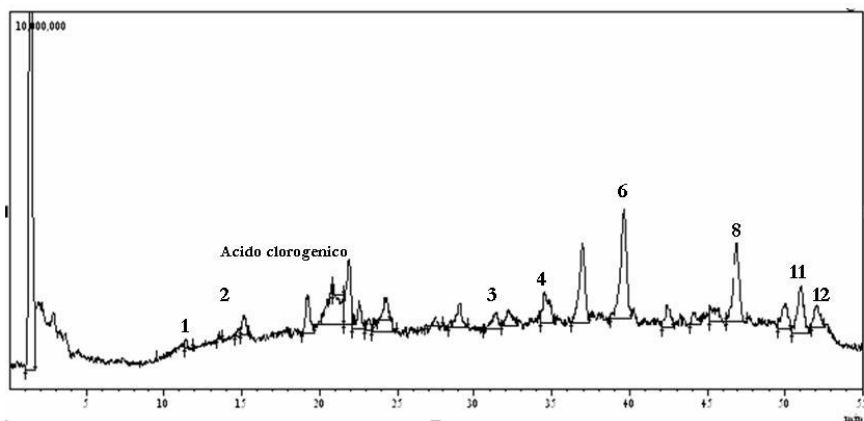
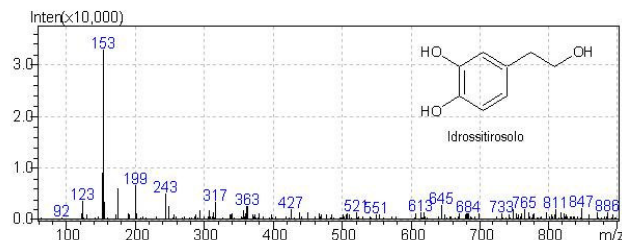


Figura 1.4.18. Cromatogramma relativo alla corrente ionica totale (TIC) di un estratto fenolico da patata fritta in olio extravergine di oliva.

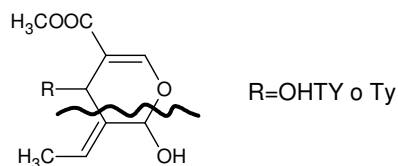
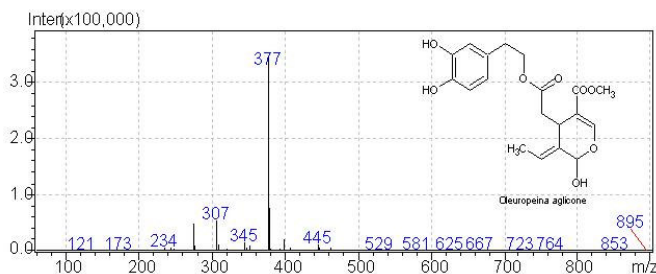
Identificazione dei picchi: vedi **Figura 1.4.17**.

In entrambi gli estratti sono stati ritrovati l'idrossitirosolo (picco n°1), il cui spettro di massa in *full scan mode* è mostrato di seguito, e il tirosolo (picco n°2) a conferma di quanto già rilevato con l'analisi HPLC-UV.

Lo spettro generato dall'idrossitirosolo mostra la molecola deprotonata $[M-H]^-$ a m/z 153 e lo ione frammento a m/z 123 dovuto alla perdita del gruppo CH_2OH (De la Torre-Carbot *et al.*, 2005). Di seguito si riporta lo spettro di massa.

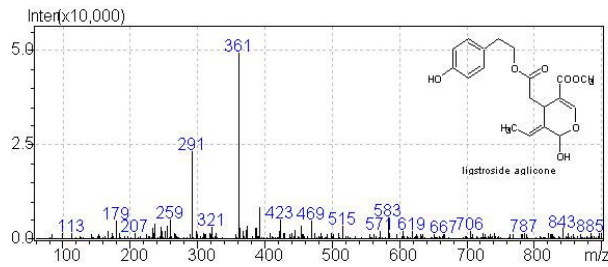


L'aglicone dell'oleuropeina (picco n°4-6-9-10) nelle sue varie forme isomere tautomeriche è stato ritrovato sia nell'estratto dell'olio di partenza che nelle patate nel corso della frittura. Lo spettro generato da questo composto mostra la molecola deprotonata $[M-H]^-$ a m/z 377 e lo ione frammento a m/z 307 dovuto alla perdita del frammento C_4H_6O (Caruso *et al.*, 2000).

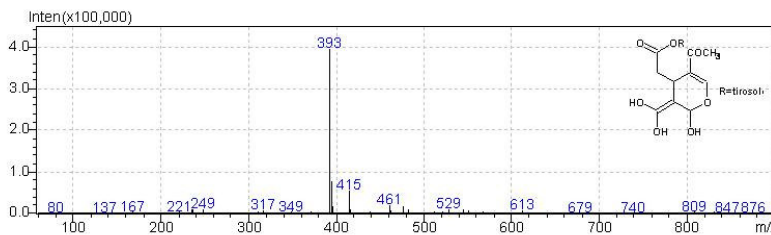


Lo schema relativo alla frammentazione dell'aglicone dell'oleuropeina e del ligstroside con formazione degli ioni a m/z 307 e 291 rispettivamente è mostrato di lato.

Infatti lo spettro generato dall'aglicone del ligstroside (picco n°11), riportato di seguito, mostra oltre alla molecola deprotonata $[M-H]^-$ in corrispondenza dello ione a m/z 361 anche lo ione frammento a m/z 291 dovuto alla perdita del frammento C_4H_6O .

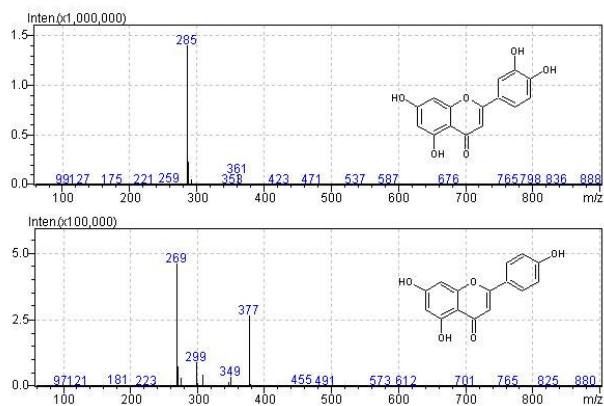


Nell'olio e nelle patate sono stati ritrovati anche altri due derivati del ligstroside con m/z 393 il cui spettro di massa con la relativa possibile formula di struttura riportate in letteratura (De la Torre-Carbot *et al.*, 2005) è mostrato in seguito.



Interessante notare e sottolineare come durante il processo di frittura è avvenuta la migrazione anche dei due flavonoidi ritrovati nell'olio, la luteolina e l'apigenina (picchi 8 e 12 rispettivamente).

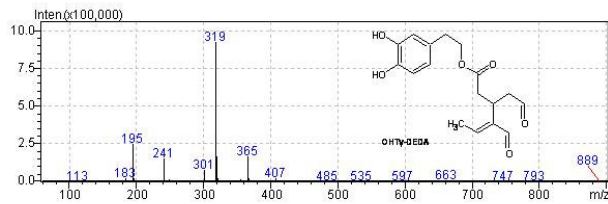
Questi composti sembrano essere molto stabili al trattamento termico e si ritrovano sia nell'olio che nelle patate dopo 6 ore di frittura.



Luteolina

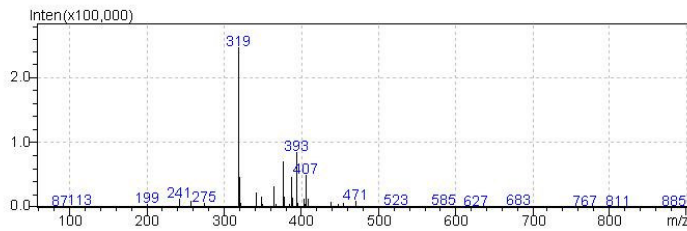
Apigenina

Negli spettri di massa degli estratti idroalcolici dell'olio utilizzato per la frittura è stata ritrovata anche la forma dialdeidica della decarbossimetiloleuropeina aglicone (OHTy-DEDA) il cui spettro di massa è riportato di seguito.



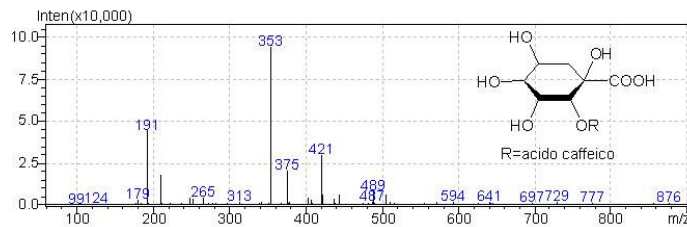
Tale composto non è stato ritrovato negli spettri di massa degli estratti fenolici ottenuti dalle patate sottoposte al processo di frittura.

Nell'olio di partenza e nelle patate è stato invece ritrovato un composto che ha mostrato un intenso ione $[M-H]$ a m/z 319 che potrebbe corrispondere alla forma ossidata del decarsossimetil ligstroside aglicone riportata in letteratura da altri lavori (Rovellini e Cortesi, 2002) ed il cui spettro di massa nella seguente figura.



Nel cromatogramma relativo alla TIC degli estratti fenolici ottenuti dalle patate fritte (**Figura 1.4.18**) sono stati rilevati dei picchi relativi a composti presenti esclusivamente nelle patate e non nell'olio di frittura.

Da una prima analisi è stato possibile identificare l'acido clorogenico che ha mostrato lo spettro in *full scan mode* riportato di seguito.



Oltre allo ione molecolare deprotonato m/z 353 si osservano anche altri ioni frammenti quali la perdita dell'acido chinico $[M-H-162]$ in corrispondenza dello ione a m/z 191 e lo ione corrispondente all'unità di acido caffeico (m/z 179).

1.5 CONCLUSIONI

Sulla base di quanto descritto nel presente capitolo è possibile trarre le seguenti conclusioni:

- ☆ la presenza ed il tipo di alimento sottoposto a frittura può influenzare il processo di degradazione dell'olio ad alte temperature. In funzione della velocità di formazione di acidi grassi a corta catena ($C_{8,10}$) l'olio utilizzato per le prove, ed assorbito dalle patate nel corso della frittura, ha mostrato il seguente ordine di stabilità: olio extra vergine fritto in presenza di patate fresche > olio extra vergine fritto in presenza di patate surgelate > olio extra vergine termossidato;
- ☆ il contenuto fenolico di un olio extravergine sottoposto ad alte temperature per un periodo di tempo prolungato tende a diminuire a causa di un processo idrolitico che risulta più drastico in presenza di alimento rispetto a quanto si verifica nell'olio termossidato in assenza di umidità. L'idrolisi, inoltre, risulta più evidente in presenza di alimento surgelato;
- ☆ friggendo in olio extravergine di oliva si assiste ad un passaggio di composti fenolici dell'olio verso l'alimento, soprattutto fenoli semplici come l'idrossitirosolo ed il tirosolo. Tra i fenoli complessi si è osservato un assorbimento di piccole quantità di acetossipinoresinolo e di Ty-EDA.

BIBLIOGRAFIA

- Allouche N., Fki I., Sayadi S. **2004**. Toward a High Yield Recovery of Antioxidants and Purified Hydroxytyrosol from Olive Mill Wastewaters. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 267-273.
- Berra B., Rapelli S. **1998**. Radicali liberi, antiossidanti e proprietà dei componenti minori dell'olio extravergine di oliva. *Olivo & Olio*. 6: 46-50.
- Bligh E., Dyer W. **1959**. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Blumenthal M. **1991**. A new look at the chemistry and physics of deep-fat frying. *Food technology* 45: 68-71.
- Brenes M., Rejano L., Garcia P., Sánchez H.A., Garrido A. **1995**. Biochemical Changes in Phenolic Compounds during Spanish-Style Green Olive Processing. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2702-2706.
- Brenes M., Hidalgo J.H., Garcia A., Rios J.J., Garcia P., Zamora R., Garrido A. **2000**. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 715-720.
- Capella P., Fedeli E., Bonaga G., Lercker G. **1997**. Manuale degli Oli e dei Grassi. Ed. Tecniche Nuove, Milano.
- Cardoso S.M., Guyot S., Marnet N., Lopes-da Silva J.A., Renard C.MGC, Coimbra M.A. **2005**. Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 85: 21-32.
- Caruso D., Colombo R., Patelli R. Giavarini F., Galli G. **2000**. Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS). *J. Agric. Food Chem.* 48: 1182-1185.
- Christie W.W. **1982**. Lipid Analysis, 2nd Edition. Pergamon Press, Oxford (U.K.).
- Cortesi N., Fedeli E. **1983**. I componenti polari di oli di oliva vergine. Nota I. *Riv. Ital. Sost. Grasse*. 60: 341-351.
- De la Torre-Carbot K., Jauregui O., Gimeno E., Castellote A.I., Lamuela-Raventos R.M., Lopez-Sabater M.C. **2005**. Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4331-4340.
- Dobarganes M.C. **1998**. Formation and analysis of high molecular-weight compounds in frying fats and oils. *OCL* 5: 41-47.
- Dobarganes C., Márquez-Ruiz G., Velasco J. **2000**. Interactions between fat and food during deep-frying. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102: 521-528.
- Fogliano V., Ritieni A., Monti S., Gallo M., Della Medaglia D, Ambrosino M.L. and Sacchi R., **1999**. Antioxidant activity of virgin olive oil phenolic compounds in a micellar system. *J. Sci. Food Technol.* 79: 1803-1808.

- Frankel E.N. **1984**. Lipid oxidation: Mechanism, products and biological significance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 1908-1917.
- Frankel E.N. **1991**. Recent advances in lipid oxidation. *J. Sci. Food Agric.* 54: 495-511.
- Frankel E.N. **1998**. Lipid Oxidation. The Oily Press, Dundee (Scotland).pp 303.
- Fritsch C.W. **1981**. Measurements of frying fat deterioration: A brief review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58: 272-274.
- Jacobson G.A. **1991**. Quality control in deep-fat frying operations. *Food Technology* 45: 72-74.
- Keijbets M.J.H., Steenderen A.B.V. **2001**. The manufacture of pre-fried potato products. In: *Frying: improving quality*. Ed. J.B. Rossel. CRC Press. New York.
- Kochhar S.P., Gertz C. **2004**. New theoretical and practical aspects of the frying process. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106: 722-727.
- Márquez-Ruiz G., Dobarganes C. **1996a**. Short chain fatty acid formation during thermoxidation and frying. *J. Sc. Food Agric.* 70: 120-126.
- Márquez-Ruiz G., Dobarganes C. **1996b**. Nutritional and Physiological effects of used frying fats. In: *Deep Frying, Nutrition and Pratical Applications*, edited by E.G Perkins and M.D.Erickson, American Oil Chemists' Society, Champaign, pp 160-182.
- Medina I., Sacchi R., Biondi L., Aubourg S.P. and Paolillo L. **1998**. Effect of packing media on the oxidation of canned tuna lipids. Antioxidant effectiveness of extra virgin olive oil. *J. Agricul Food Chem.* 46: 1150-1157
- Montedoro G, Servilli M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A. **1993**. Simple and Hydrolyzable compounds in virgin olive oil. *J. Agr. Food Chem.* 41: 2228-2234.
- Moreira R.G., Sun X., Chen Y. **1997**. Factors affecting oil uptake in tortilla chips in deep fat frying. *J. Food Eng.* 31: 485-498.
- Moreiras-Varela O., Ruiz-Roso B., Varela G. **1988**. Effect of frying on the nutritive value of food. In: *Frying of food. Principles, changes, new approaches*. Varela G., Bender A.E., Morton I.D., eds. Chirchester, U.K, Ellis Horwwod. Ltd, pp. 93-103.
- Nawar W. W. **1985**. Flavor Chemistry of Fats and Oils, Ed. D.B. Min and T.H. Smouse, American Oil Chemists' Society, Champaign, pp 93-103.
- Nawar W. W. **1998**. The consumption of fried food: nutritional considerations. *OCL* 5: 58-60.
- Neff W.E, Frankel E.N., Fujimoto K. **1988**. Autoxidative dimerization of methyl linolenate and its monohydroperoxides, hydroperoxy epidioxides and dihydroperoxides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65: 616-623.
- Orthoefer F.T., Cooper D.S. **1996**. Evaluation of used frying oil. In: *Deep Frying, Nutrition and Pratical Applications*, edited by E.G Perkins and M.D.Erickson, American Oil Chemists' Society, Champaign, pp 283-335.
- Orthoefer F.T., Gurkin S., Liu K **1996**. Dynamic of frying. In: *Deep frying, Nutrition and Pratical Applications*. Ed. E.G Perkins and M.D.Erickson, American Oil Chemists' Society, Champaign, pp 223-244.

- Perkins E.G. **1996**. Volatile odor and flavor components formed in deep frying. *In*: Deep Frying, Nutrition and Practical Applications, edited by E.G Perkins and M.D.Erickson, American Oil Chemists' Society, Champaign, pp 42-48.
- Raoult-Wack A.L., Bricas N. **1998**. Vers une évolution des démarches de Recherche et Développement dans le secteur Agro-Alimentaire. Le cas de la friture. *OCL* 5: 47-57.
- Regolamento CEE n. 2568/91 del 11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti. *Gazz. Uff. Com. Europ.* 5/9/91 NL 248/1
- Regolamento CE n.1989/03 del 6 novembre 2003 che modifica il regolamento CEE n. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti *Gazz. Uff. Com. Europ* 13/11/03 L 295/57
- Rovellini P., Cortesi N. **2002**. Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oil: aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products. *Riv. Ital. Sost. Grasse* LXXIX: 1-14.
- Sacchi R., Paduano A., Fiore F., Della Medaglia D., Ambrosino M.L. and Medina I. **2002**. Behaviour of virgin olive oil phenolic antioxidants during the the thermal processing of a Brine-in-Oil Model System, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 50: 2830-2835.
- Saguy I.S., Dana D. 2003. Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. *J. Food Eng.* 56: 143-152.
- Saguy I.S., Gremaud E., Gloria H., Turesky R.J. **1997**. Distribution and quantifying of oil uptake in deep-fat fried product utilizing a radiolabeled ¹⁴C palmitic acid. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4286-4289.
- Saguy S.I., Ufheil G., Livings S. **1998**. Oil uptake in deep-fat frying: review. *OCL* 5: 30-35.
- Solinas, M. **1987**. Analisi HRGC delle sostanze fenoliche di oli vergini di oliva in relazione al grado di maturazione e alla varietà delle olive. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, 64: 255-262.
- Solinas M. **1990**. Caratteristiche degli oli vergini di oliva e marchio di qualità. *L'informatore agrario* 47: 19-25.
- Tsimidou M., Papadopoulos G., Boskou D. **1992**. Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detectin. *Food Chem.* 44: 53-60.
- Varela G. **1985**. Current facts about the frying of foods. *In*: *Frying of foods*, Varela G., Bender AE, Morton ID eds. VCH Chirchester, England, pp. 9-25.
- Varela G. **1991**. La frittura degli alimenti in olio d'oliva. *Consiglio oleicolo Internazionale*. Madrid (Spagna).
- Vasquez-Roncero A. **1978**. Les polyphenols de l'huile d'olive et leur influence sur les caracteristiques de l'huile. *Rev. Français Corp Gras.* 1: 21-26.
- Viola P. **1997**. L'olio di oliva e la salute. *Consiglio oleicolo internazionale*. Madrid (Spagna).
- Vitrac O., Trystram G., Raoult-Wack A.L. **2000**. Deep-fat frying of food: heat and mass transfer, transformations and reactions inside the frying material. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102: 529-538.
- White P.J. **1991**. Methods for measuring changes in deep-fat frying oils. *Food Technology* 45: 75-79.

CAPITOLO 2

INTERAZIONI OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA E ALIMENTO NELLE CONSERVE A BASE DI PRODOTTI ITTICI

2.1 INTRODUZIONE

2.1.1 IL CONSUMO DI PRODOTTI ITTICI SUL TERRITORIO NAZIONALE

I dati presenti nel rapporto annuale del 2004 (Osservatorio Consumi Ittici, ISMEA) per il consumo di prodotti ittici in Italia hanno riportato un aumento di tale valore, rispetto all'anno precedente, dell'1,8% in volume e dell'1,9% in valore. Complessivamente, si può affermare che sono state consumate dalle famiglie italiane 416.411 tonnellate di prodotti ittici, per una spesa di oltre 3.662,6 milioni di euro. Tale valore ha rappresentato, nel 2004, l'8,4% (+0,2% rispetto al 2003) della spesa alimentare complessiva, evidenziando una flessione dell'1,1% rispetto all'anno precedente.

Il Sud Italia si è confermato, anche nel 2004, al primo posto per la quota detenuta di consumi domestici sul totale nazionale. L'incidenza più elevata si è avuta, sia in volume che in valore, nei comparti del pesce fresco (43,3%) e decongelato naturale (40,4%), in quello dei prodotti ittici secchi, salati e affumicati (45,8% in volume e 36,9% in valore) e nel comparto del pesce congelato sfuso (48,6% in volume e 45,7% in valore), ma con un calo dell'incidenza in quantità, in questi ultimi due casi, rispettivamente dell'1,1% e dell'1,7 punti percentuali, rispetto al 2003 (-0,7% e -1,1 punti percentuali in valore) (www.ismea.it).

2.1.2 IL PESCE AZZURRO

Spesso quando si parla di pesce azzurro lo si identifica con l'alice, la sardina e lo sgombrò, sicuramente le specie più abbondanti e pescate in tutti i mari italiani, fanno però parte di tale tipologia di pesci anche specie di dimensioni più grandi, quali il suro, il tonno ed il pescespada. Il pesce azzurro, proprio perché pescato in tutti i mari italiani e quindi vicino ai mercati di vendita, offre la massima garanzia di freschezza ed economicità. Inoltre, è presente nella maggior parte dei mercati italiani quasi tutto l'anno.

Medici e nutrizionisti hanno evidenziato l'importanza del consumo di pesce quale alimento alternativo ad altri cibi proteici come formaggi, uova e carne. Da un punto di vista nutrizionale il pesce azzurro presenta un apporto di proteine di elevata qualità

ed una particolare composizione dei grassi, ricchi di acidi grassi polinsaturi, tra i quali gli acidi grassi ω -3.

***Trachurus trachurus* (Linneo, 1758)**

Il genere *Trachurus*, appartiene alla famiglia dei *Carangidae*, ordine degli *Scombriformi*.

I pesci appartenenti a tale specie presentano una forma del corpo e delle pinne caratteristica. Le pinne dorsali, infatti, si ripiegano all'indietro e restano completamente nascoste in un solco presente sul dorso.

La pelle è coperta di scaglie piccolissime, sottili, lisce e molto caduche. La linea laterale è tutta ricoperta da scudetti ossei sovrapposti ad embrice e armati con una punta nel bordo posteriore. Dalla metà circa della linea laterale le spine aumentano di grandezza man mano che si avvicinano alla coda e formano una specie di carenatura corazzata. Il numero di questi scudetti è variabile tra 69 e 79 e costituisce uno dei due caratteri più evidenti per la distinzione della specie.

La testa è a punta, con bocca ampia, obliqua e con la mandibola lievemente prominente. I denti sono disposti in una sola fila in ambedue le mascelle ed esistono anche sul vomere, sul palatino e sulla lingua. L'occhio è piuttosto grande ed è munito di due palpebre adipose fisse, una anteriore ed una posteriore, che lasciano una apertura centrale dove appare la pupilla. (**Figura 2.1.1**).



Figura 2.1.1. Esempio di *Trachurus trachurus*.

Il colore del dorso è grigio verdastro, i fianchi sono argentei con riflessi violacei metallici mentre il ventre è bianco argenteo.

Il suro è un pesce cosmopolita, si riunisce in gruppi più o meno grandi con abitudini pelagiche. Nei mesi estivi si avvicina alla costa, nuotando a mezz'acqua e in prossimità della superficie, raggruppato in piccoli branchi. Nei mesi invernali, invece, scende a profondità anche superiori a 500 metri riunendosi in branchi più numerosi. In primavera ed estate è attirato di notte dalle luci delle lampare per nutrirsi dello *zooplankton* e degli stadi larvali e giovanili di pesci che si accumulano sotto la luce.

La riproduzione avviene durante tutto l'anno, con maggiore intensità in estate. Gli stadi giovanili si raggruppano, in genere, in gruppetti di 7-10 individui.

È un pesce carnivoro e si alimenta con crostacei planctonici, stadi larvali e giovanili di altri pesci e con individui adulti di sardine ed acciughe. La pesca si esegue generalmente di notte sotto le lampare con reti di circuizione. In inverno si catturano anche con reti a strascico e palangresi di fondo nelle zone della pesca al merluzzo. Può raggiungere i 50 cm di lunghezza (mediamente intorno ai 30 cm).

(<http://free.imd.it>)

***Engraulis encrasicolus* (Linneo, 1758)**

Engraulis encrasicolus (Linneo, 1758), appartenente all'ordine dei Clupeiformi, è conosciuto più comunemente come alici o acciuga e rientra tra le specie pelagiche di piccole dimensioni raggruppate con il nome generico di "pesce azzurro". Raggiunta la maturità sessuale, può avere una lunghezza massima di 20 cm e una media compresa fra i 10 e 15 cm. Presenta un corpo affusolato e slanciato, a sezione trasversale ovale con ventre liscio ed arrotondato, la testa è allungata (circa il 25% della lunghezza totale) con ampie aperture branchiali. Il muso è prominente ed acuto. La bocca, nella parte inferiore della testa, è grande ed oltrepassa il margine posteriore degli occhi. L'unica pinna dorsale è posta a circa metà del corpo in posizione avanzata rispetto alle pinne posteriori. Le pinne pettorali sono sottili ed allungate e sono in posizione ventrale.

La colorazione, tipica delle specie pelagiche, è azzurra con sfumature verdastre sul dorso, argentea sui fianchi e sul ventre. Le pinne sulla coda sono grigio chiaro, le altre biancastre (**Figura 2.1.2**).



Figura 2.1.2. Esempio di *Engraulis encrasicolus*

Engraulis encrasicolus vive in branchi numerosi e si sposta continuamente tra il Mar Mediterraneo, il golfo della Guinea ed il Mar Baltico.

In autunno ed in inverno si rifugiano nelle profondità marine dove l'acqua è più calda (100-200 m), mentre soggiornano vicino alla costa per il resto dell'anno.

L'acciuga è una specie curialina (si adatta bene a differenti salinità) e tollera variazioni comprese tra il 5 ed il 41%, questa caratteristica le permette di penetrare per alimentarsi in lagune, laghi salmastri od estuari.

Si nutre di plancton (piccoli crostacei, larve di molluschi, ecc.) e di litoplancton (plancton vegetale). Infatti, il plancton è un insieme di organismi pelagici che vengono trasportati passivamente dalle correnti nei mari e nei laghi. Il plancton si divide in:

zooplancton o plancton animale;

fitoplancton o plancton vegetale.

A queste categorie appartengono microrganismi quali: alghe, protozoi, larve di diversi animali, minuscoli crostacei ed alcuni vermi. Il plancton costituisce un importante risorsa alimentare per molti organismi dell'ambiente acquatico.

L'acciuga ha sessi separati. La maturità sessuale è raggiunta al termine del primo anno di vita (taglia di circa 9 cm) e la riproduzione avviene da aprile a novembre, sotto costa. Le uova emesse, fino a 40.000 per ogni femmina, sono galleggianti, senza gocce oleose, ellittiche, con diametro di circa 1mm. Queste, dopo due o tre giorni schiudono e, le larve, larghe circa 2 mm, danno avvio alla vita gregaria. La vita massima di questi pesci è di circa 4 anni.

2.1.3 LA QUALITÀ NUTRIZIONALE DEI PRODOTTI ITTICI: GLI ACIDI GRASSI ω -3

Il consumo dei prodotti ittici, ed in particolare del pesce azzurro, ha un ruolo estremamente importante nella dieta, visto il notevole apporto di:

- proteine di elevato valore biologico;
- di sali minerali, tra cui fosforo, iodio, calcio e fluoro;
- di vitamine A, D, E, K, tiamina, riboflavina. (Fidanza, 1996);
- di acidi grassi polinsaturi, in particolare quelli della serie ω -3, dei quali i prodotti ittici sono l'unica fonte alimentare significativa (Orban, 1996).

Diversi studi epidemiologici su popolazioni caratterizzate da una bassa incidenza di malattie cardiovascolari, hanno indicato che diete ricche in oli di pesce possono promuovere cambiamenti positivi in alcune proprietà dei lipidi del sangue implicati nello sviluppo di queste malattie (Cronin e Sullivan, 1990; Mattson e Grundy, 1985).

I grassi dei pesci sono in grado di contrastare più validamente di quelli dei mammiferi l'accumulo di colesterolo nel nostro sistema vascolare e di frenare la formazione di quelle "placche ateromatose" all'interno dei vasi sanguigni che possono ostacolare progressivamente il regolare flusso del sangue.

Quindi i lipidi di origine marina, ricchi di acidi grassi mono (MUFA) e polinsaturi (PUFA), appaiono più utili per il nostro metabolismo che non quelli dei mammiferi, formati essenzialmente da acidi grassi saturi (www.uniprom.it; Fidanza, 1996; Scalfi e Sacchi, 1993).

Gli acidi grassi polinsaturi, contenenti almeno due doppi legami, con lunghezza di catena di 18 o più atomi di carbonio, vengono classificati in famiglie o serie metaboliche, in base alla loro struttura e al loro metabolismo (Galli, 1993; Holman, 1970).

I PUFA, a seconda della distanza del primo doppio legame dal metile terminale, vengono in distinti in tre serie che vengono denominate ω -9, ω -6 ed ω -3.

I mammiferi, pur avendo necessità di disporre di un'adeguata quantità di polinsaturi ω -6 ed ω -3, non sono in grado di operare desaturazioni in queste posizioni (Viola, 1997).

Per tale motivo, i capostipiti di queste serie, l'acido linoleico (ω -6) e l'acido α -linolenico (ω -3), costituiscono la famiglia degli acidi grassi essenziali e devono essere assunti con l'alimentazione.

Gli acidi grassi insaturi possono subire nell'organismo l'allungamento della catena con l'aggiunta di ulteriori insaturazioni ad opera di alcune desaturasi. Tra i substrati delle due serie, oltre che con l'acido oleico (ω -9), esiste una competizione a livello delle desaturasi.

L'acido α -linolenico (ω -3) è il substrato preferenziale ed è convertito negli acidi grassi polinsaturi superiori molto più attivamente dell'acido linoleico (ω -6), a sua volta più efficacemente convertito rispetto all'oleico (ω -9).

In assenza dell'acido linolenico (ω -3) e linoleico (ω -6), l'oleico (ω -9), essendo l'unico substrato per le desaturasi, può essere trasformato negli acidi grassi più insaturi, come l'acido eicosatrienoico (ETA), il cui accumulo può essere quindi considerato come un marker della carenza di acidi grassi essenziali (Galli, 1993).

Gli acidi grassi essenziali a catena lunga svolgono anche una funzione "strutturale". Entrando, infatti, nella composizione dei fosfolipidi di membrana, ne aumentano la

fluidità ed intervenengono nell'attivazione degli enzimi legati alla membrana stessa (Turchetto e Biagi, 1997; Fidanza, 1996).

Tra i PUFA omega-3 ci sono l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesenoico (DHA). Questi acidi grassi, precursori degli eicosanoidi (prostaglandine, trombossani e leucotrieni), svolgono azioni positive sulla regolazione del metabolismo lipidico, azioni antiateromatose e antitrombotiche. Di conseguenza, ad essi sono state assegnati ruoli preventivi nei riguardi di malattie cardiovascolari (contribuiscono ad un "ambiente vascolare meno incline all'occlusione"), dell'ipertensione, del diabete, del cancro, dell'artrite reumatoide, della psoriasi e di altre malattie infiammatorie ed autoimmuni. Inoltre essi sono ritenuti particolarmente importanti in tutte le fasi dell'accrescimento e dello sviluppo della specie umana (Fidanza, 1996).

Le prostaglandine si distinguono in monoenoiche, dienoiche, trienoiche. a seconda degli acidi grassi polinsaturi da cui derivano. Nell'organismo prevalgono le prostaglandine dienoiche derivanti dall'acido arachidonico (20:4 ω -6), quelle monoenoiche derivanti dall'acido γ -linolenico (18:3 ω -6) e che sono molto poco diffuse in natura, mentre quelle trienoiche, derivanti dall'acido eicosapentaenoico (20:5 ω -3), sono proporzionali alla quantità di acidi grassi della serie ω -3 presenti nella dieta.

Le prostaglandine dienoiche risultano avere una maggiore attività biologica nell'attivazione delle cellule che partecipano ai processi trombotici e infiammatori, a differenza delle prostaglandine trienoiche che hanno una minore attività, per cui un aumento della loro formazione (PGI₃, TXA₃, PGE₃) può considerarsi favorevole poiché conduce ad un miglioramento del quadro lipidico (riduzione della trigliceridemia ed aumento delle HDL) e soprattutto ad una riduzione dell'aggregazione piastrinica (Viola, 1997), a causa della loro marcata azione antitrombotica e vasodilatatrice in contrapposizione all'azione delle prostaglandine derivanti dagli acidi grassi polinsaturi ω -6 (acido arachidonico).

Il rapporto tra ω -3 e ω -6 nella dieta è, pertanto, un importante fattore nell'insieme delle influenze dietetiche sullo stato di salute, visto che un appropriato apporto di acidi grassi polinsaturi può contribuire alla prevenzione delle patologie cardiovascolari, dell'ipertensione, delle malattie infiammatorie croniche e dei tumori.

L'apporto dietetico considerato ottimale è quello che vede gli acidi grassi ω -6 e ω -3 in rapporto 4:1 o 6:1, sebbene nell'alimentazione di gran parte della popolazione le quantità di acidi grassi ω -6 sono assai maggiori di quelle indicate, con un rapporto ω -6: ω -3 superiore a 10:1 che può giungere fino a 30:1 laddove sia particolarmente elevato il consumo di oli e margarine di semi e basso il consumo di prodotti ittici, soia, etc. (Scalfi e Sacchi, 1993).

2.1.4 I LIPIDI DEL PESCE: LIPOLISI ED OSSIDAZIONE

I lipidi del pesce costituiscono la componente più variabile, potendo oscillare tra lo 0,5 ed il 22%. I fattori che influenzano la composizione lipidica sono: la specie, l'età, il sesso, il particolare momento del ciclo riproduttivo, l'ambiente, l'alimentazione, l'epoca della cattura.

In base alla percentuale lipidica i pesci si suddividono in:

- **magri** (lipidi < 3%): acciuga, merluzzo, nasello, sogliola, palombo, spigola, trota, luccio;
- **semimagri** (lipidi 3-8%): dentice, sardina, cefalo, triglia;
- **grassi** (lipidi > 8%): anguilla, sgombro, tonno, aringa, salmone.

La frazione saponificabile è data da trigliceridi, fosfolipidi, ed in minor misura cere. L'insaponificabile è costituito da idrocarburi tra i quali abbonda lo squalene, vitamine liposolubili (A e D) e da steroli, soprattutto colesterolo (Cappelli e Vannucchi, 1998). Il grasso, di consistenza fluida per l'alto grado di insaturazione, può avere una dislocazione muscolare, sottocutanea e viscerale (tipica dei pesci grassi), epatica.

Nei pesci possiamo distinguere due tipi di grassi:

- di *deposito*, che sono costituiti essenzialmente da trigliceridi. Sono localizzati soprattutto nella regione della testa, nel sottocute, nella regione ventrale e si accumulano nel peritoneo che avvolge i visceri addominali e nelle gonadi;
- *strutturali*, costituiti, in genere, da lipidi complessi, fosfolipidi e dal colesterolo (www.uniprom.it).

Per quanto concerne gli acidi grassi si può affermare che, a differenza di grassi di origine animale o vegetale, quello di pesce ne contiene una più ampia varietà; presenta un considerevole tasso di acidi grassi a lunga catena (20 e 22 atomi di C) e fra questi, significative quantità di EPA (C_{20:5}) e DHA (C_{22:6}). Questi acidi grassi, presenti anche nel fitoplancton, appartengono alla serie *n-3* che ha come capostipite l'acido α -linolenico. Palmitico ed oleico rappresentano circa il 30% degli acidi grassi, gli *n-3* oscillano tra il 13 ed il 35%, gli *n-6* sono inferiori al 5%. I polinsaturi, nei trigliceridi, occupano preferenzialmente la posizione sn-2 del glicerolo (Cappelli e Vannucchi, 1998).

Da uno studio effettuato da Gokoglu *et al* (1999) sulla variazione stagionale del contenuto di grassi delle alici si è rilevato che il contenuto di grasso mostra un massimo a novembre e un minimo a marzo. Le alici, infatti, consumano buona parte del grasso del loro corpo al momento della "frega", fra marzo ed aprile, per ricostituire le loro riserve nel periodo autunnale. Quindi durante l'inverno le loro carni hanno un contenuto di grassi massimo (7%), mentre in primavera e in estate hanno solo lo 0,5 % di grassi.

Dopo la morte, i pesci vanno rapidamente incontro a numerose alterazioni a causa della labile struttura e della particolare composizione chimica dei tessuti. Infatti, è proprio nella fase iniziale di lavorazione (eviscerazione, filettatura, decapitazione) che, nei pesci destinati all'inscatolamento, potrebbero verificarsi fenomeni di ossidazione lipidica a causa della facile penetrazione dell'ossigeno nei tessuti (Pirati e Guidi, 1971).

L'irrancidimento dei lipidi edibili è un serio problema in molti settori dell'industria alimentare: negli alimenti l'ossidazione dei lipidi non produce solamente difetti a livello sensoriale ma è anche responsabile di uno scadimento delle qualità nutrizionali oltre che della formazione di prodotti secondari nocivi per la salute (Frankel, 1998).

L'ossidazione è un fenomeno a carico dei lipidi insaturi, costituenti fondamentali della struttura delle membrane biologiche e garanti della loro integrità funzionale. È evidente pertanto che l'ossidazione lipidica può causare importanti danni biologici che possono essere messi in relazione con il tipo di dieta, eventualmente non supportata da una adeguata concentrazione di antiossidanti (Rovellini *et al.*, 1997). I fattori che influiscono sull'ossidazione delle sostanze grasse sono: la quantità e disponibilità di ossigeno presente, la presenza di metalli, di enzimi, di attivatori come la luce e apporti energetici in generale. È difficile valutare l'effetto di uno specifico

fattore nel processo di ossidazione in quanto essi operano simultaneamente (Frankel, 1998; Rovellini *et al.*, 1997).

Rispetto agli acidi grassi saturi, i monoinsaturi e i polinsaturi sono maggiormente esposti alle reazioni di ossidazione, per cui tendono più facilmente dei primi ad andare incontro ad ossidazione e poi ad irrancimento. Ciò spiega perché i prodotti della pesca tendono ad irrancire molto più facilmente delle carni di mammiferi, se lasciati all'aria.

L'ossidazione lipidica è spesso riferita ad un significativo numero di composti volatili che possono essere prodotti dagli acidi grassi polinsaturi (PUFA). Gli idroperossidi, formati come prodotti primari dell'autossidazione lipidica, sono rapidamente decomposti a produrre una varietà di composti volatili secondari di basso peso molecolare. Le aldeidi sono i principali prodotti volatili secondari responsabili di odori e aromi che assumono minore importanza durante la conservazione e i trattamenti ai cibi (Medina *et al.*, 1999). Inoltre, si dovrebbe tener conto che i composti di ossidazione primaria non conferiscono odore al cibo e solo i prodotti di ossidazione secondaria sono responsabili della rancidità (Guillén e Ruiz, 2004).

2.1.5 L'OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA E LA SUA COMPONENTE ANTIOSSIDANTE

“Componenti fenolici” o “Polifenoli” è un termine usato in letteratura (Harborne, 1989) per definire quelle sostanze che posseggono un anello benzenico con uno o più gruppi idrossilici e che includono derivati funzionali (esteri, metil esteri, glucosidi, etc.).

In accordo con Harborne la componente fenolica è raggruppata nelle seguenti categorie:

- fenoli, acidi fenolici, acidi fenilacetici;
- acidi cinnammici, cumarinici, isocumarinici, e cromoni;
- lignani;
- dieci gruppi di flavonoidi;
- lignine;
- tannini;
- benzofenoni, xantoni e stilbeni;
- chinoni;
- betacianine.

La maggior parte dei composti fenolici si trova in natura in una forma coniugata, principalmente con una molecola di zucchero.

I composti fenolici sono in relazione alla qualità sensoriale e nutrizionale degli alimenti freschi e trasformati. Le reazioni di imbrunimento enzimatico dei composti fenolici, catalizzate da fenolossidasi, è di vitale importanza nei processi di trasformazione di frutti e vegetali in quanto responsabile del colore e della perdita di nutrienti.

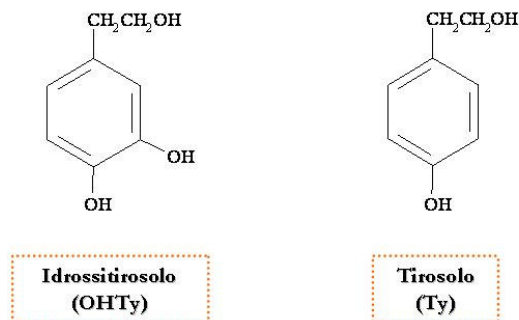
Le modificazioni ossidative dei composti fenolici non sempre sono indesiderate in quanto possono contribuire direttamente alla formazione del *flavour* dei cibi

(Sciancalepore e Longone 1984; Sciancalepore, 1985). L'attività antiossidante dei composti fenolici è di grande interesse nell'industria alimentare (Shahidi *et al.*, 1992). Inoltre il loro ruolo di protezione nelle malattie cardiovascolari, nel cancro e nei processi di invecchiamento è intensivamente studiato sia *in vivo* che *in vitro* (Salami *et al.*, 1995; Visioli *et al.*, 1995; Arrigo e Rondinone, 1995; Berra *et al.*, 1995; Wiseman *et al.*, 1996).

I composti fenolici dell'oliva, comunemente indicati anche come “polifenoli”, fanno parte della frazione polare ottenuta dall'olio mediante estrazione con metanolo-acqua (Cortesi e Fedeli, 1983), e dalle olive e dalle sanse seguendo la metodica di Brenes (1995).

Il termine polifenoli è convenzionale in quanto non tutti sono polioidrossiderivati. La componente fenolica viene distinta in due diverse frazioni, una semplice e una complessa, detta anche idrolizzabile.

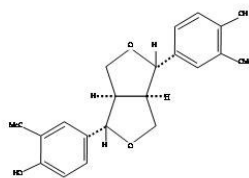
Nella prima frazione, che rappresenta solitamente meno del 20% dei polifenoli totali, sono stati identificati acidi fenolici (acido caffeico, acido vanillico, acido siringico, acido *p*-cumarico, acido *o*-cumarico, etc.) e fenil-alcoli tra i quali rivestono particolare importanza, il *p*-idrossifeniletanolo (tirosolo) ed il 3,4-diidrossifeniletanolo (idrossitirosolo).



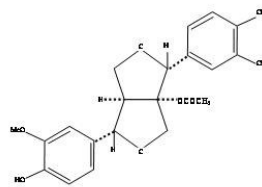
La seconda frazione, idrolizzabile, è formata da strutture complesse che costituiscono oltre l'80% della componente fenolica totale e contengono, a livello molecolare il *p*-idrossifeniletanolo e il 3,4-diidrossifeniletanolo.

Da studi (Brenes *et al.*, 2000), mediante analisi HPLC della frazione fenolica sono stati isolati due nuovi composti fenolici: il pinoresinolo e l'acetossipinoresinolo. Le strutture molecolari proposte per i due composti sono simili; nel pinoresinolo è presente un protone al posto del gruppo acetilico. Tali composti erano stati già isolati dalla resina di piante del genere *Pinus* e dalla *Picea jezoensis*, nel legno di *Tsuga heterophylla* e di *Araucaria angustifolia*, e dalla corteccia di *Fraxinus mandshurica* (Harbone *et al.*, 1989). Anche dalla corteccia di olivo era già stato isolato l'acetossipinoresinolo ed il suo glucoside 1-idrossipinoresinolo (Tsukamoto *et al.*, 1984; 1985).

Si presume che il pinoresinolo fotosinteticamente si formi per riduzione stereospecifica di due molecole di alcol coniferilico (Katayama *et al.*, 1992).



Pinoresinolo

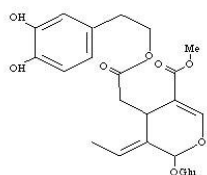


Acetossipinoresinolo

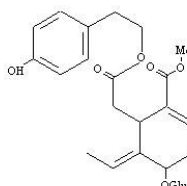
I composti presenti nelle sanse sono risultati diversi da quelli presenti nelle olive e nell'olio di oliva.

Nella drupa, dove i fenoli sono più abbondanti nella porzione immediatamente sottostante la buccia ed in prossimità del nocciolo (Castelli *et al.*, 1999), si trovano principalmente i glucosidi come l'oleuropeina, il verbascoside ed il ligstroside.

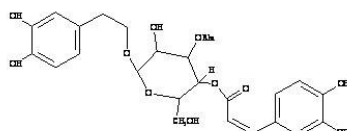
Il principale composto fenolico nell'oliva è l'oleuropeina, un estere eterosidico dell'acido elenolico con il 3,4 diidrossifenil alcool (idrossitirosolo – OHTy). Altri glucosidi trovati sono il ligstroside, che è un estere eterosidico dell'acido elenolico con il 4 idrossifenil alcool (tirosolo – Ty) e il verbascoside un estere eterosidico dell'acido caffeico con OHTy (Boskou, 1996).



oleuropeina



ligstroside



verbascoside

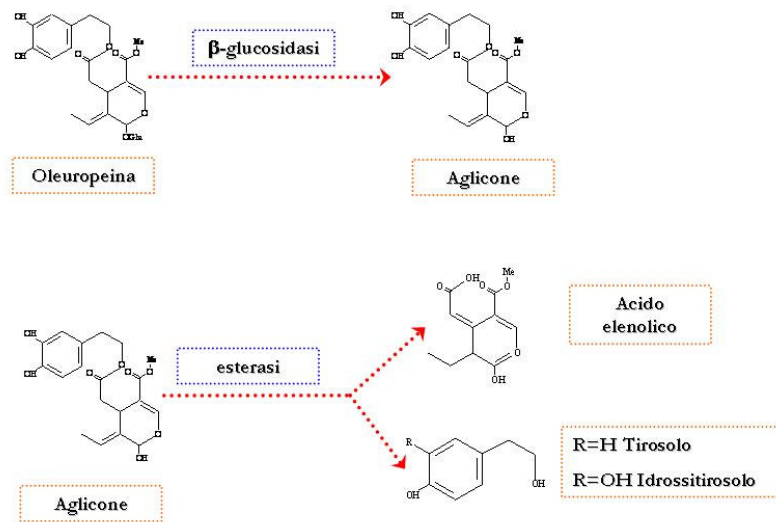
Sono stati anche ritrovati flavoni (luteolina-7-glucoside, apigenina-7-glucoside, luteolina-5-glucoside) e flavonoli (quercetina-3-rutinoside) (Vazquez Roncero *et al.*, 1974; Macheix *et al.*, 1991).

Ricerche sull'evoluzione dei composti fenolici durante l'accrescimento e la maturazione delle olive hanno dato alcune utili informazioni sul destino dei principali glucosidi delle olive, quali oleuropeina e verbascoside.

Il contenuto in oleuropeina può raggiungere il 14% della sostanza secca nel giovane frutto e rimanere abbondante se i frutti vengono raccolti ancora verdi.

Con il progredire della maturazione, o a causa di danni strutturali ai tessuti della polpa, il contenuto di oleuropeina diminuisce per effetto di una β -glucosidasi che

libera lo zucchero e dà origine agli agliconi liposolubili che ritroviamo nei sottoprodotti ed in parte nell'olio: la forma dialdeidica della decarbossimetiloleuropeina aglicone (OHTy-DEDA), la forma dialdeidica della decarbossimetil-ligstoside aglicone (Ty-EDA), l'oleuropeina aglicone(OHTy-EA). Dall'idrolisi enzimatica dell'aglicone dell'oleuropeina, si liberano poi l'acido elenolico e i fenoli semplici (tirosolo, idrossitirosolo), (Montedoro *et al.*, 1993) .



La concentrazione dei composti fenolici nelle olive e nei sottoprodotti è ampiamente influenzata sia dai fattori agronomici sia da quelli tecnologici. I primi sono quelli più strettamente connessi con la qualità della materia prima: la varietà delle olive, lo stato di maturazione, l'ambiente pedoclimatico, le tecniche colturali, lo stato fitosanitario, il sistema di raccolta e di conservazione fino alla lavorazione, infatti, sono tutti parametri che influenzano la quantità di polifenoli nell'olio e nei sottoprodotti (Solinas, 1990). I fattori tecnologici sono quelli da cui dipende il processo di estrazione dell'olio e che possono modificare in modo significativo la composizione e la quantità di alcuni costituenti minori nelle sanse (Di Giovacchino, *et al.*, 1994; Angerosa e Di Giacinto, 1995).

2.2 SCOPI

Il lavoro sperimentale svolto nell'ambito di questa parte di Tesi di Dottorato ha avuto come obiettivi:

messa a punto di nuovi metodi per la valutazione del livello di ossidazione di pescato fresco e/o conservato;

identificazione della composizione acidica di filetti di pesce mediante analisi GC/MS dei 4,4-dimetilosazolino derivat (DMOX);

studio dell'effetto dei composti antiossidanti sull'ossidazione lipidica del muscolo di pesce;

valutazione dell'effetto degli antiossidanti naturali dell'olio extravergine di oliva sull'ossidazione di acidi grassi ω -3.

2.3 MATERIALI E METODI

2.3.1 CAMPIONAMENTO

Parte di tale lavoro sperimentale è stato svolto presso l'*Instituto de Investigaciones Marinas* del CSIC di Vigo, Spagna nell'ambito del all'Azione Integrata 2003 Italia - Spagna dal titolo "miglioramento della qualità dei prodotti ittici trasformati mediante l'uso ottimizzato di antiossidanti naturali ottenuti da oli vergini di oliva".

2.3.1.1 Sistema modello

Una quantità pari ad 1 kg di suro (*Trachurus trachurus*, L) comprato in un mercato ittico nel mese di maggio 2004 è stato filettato, omogeneizzato e suddiviso in tre aliquote di 120 g ognuna e contraddistinte dalle lettere A, B e C.

All'aliquota B è stata aggiunta una quantità pari a 25 ppm di idrossitiroso puro (Sigma-Aldrich) mentre all'aliquota C è stata aggiunta una pari quantità di polifenoli estratti da un olio extravergine di oliva monovarietale, cv. *Coratina* (Bitritto, Bari).

Come controllo è stata utilizzata l'aliquota A priva di antiossidanti aggiunti.

I tre campioni, così preparati, sono stati sottoposti ad uno stress termico accelerato (in stufa a 105°C per 1 ora) ed i campioni sono stati prelevati ogni 15 minuti.

2.3.1.2 Sistema reale

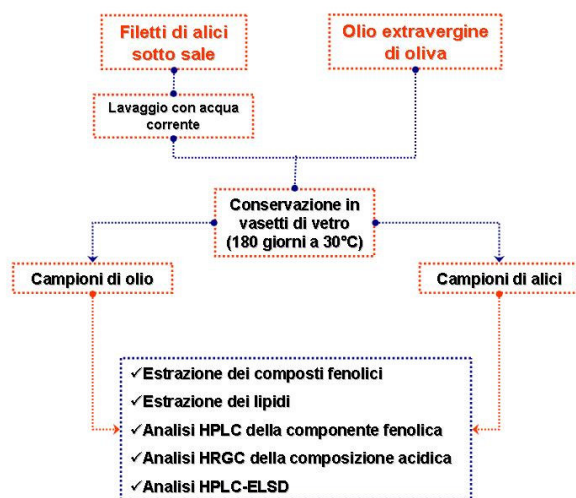
In questa fase del lavoro sperimentale, campioni di alici sotto sale sono state opportunamente lavate con acqua corrente, sfilettate e poste in vasetti di vetro trasparente, della capacità di 50cc, successivamente colmati di olio extravergine di oliva. Come bianco è stato utilizzato olio rettificato di oliva.

I campioni così ottenuti sono stati conservati alla luce e ad una temperatura di 35°C per un periodo di 60 giorni.

2.3.2 DISEGNO SPERIMENTALE

Lo schema del disegno sperimentale seguito in questa sezione è riportato in **Figura 2.3.1**.

Dai campioni di pesce sono stati estratti i lipidi. L'estratto lipidico è stato utilizzato per la determinazione degli acidi grassi mediante HRGC, la determinazione della composizione in classi lipidiche attraverso HPLC e rivelatore *light-scattering* (HPLC-ELSD) e la valutazione dello stato di ossidazione primaria attraverso l'analisi dei perossidi mediante spettrometria nel visibile, dei dieni e dei trieni coniugati mediante spettrofotometria agli UV. La valutazione dello stato di ossidazione secondaria mediante *test* del TBA è stata effettuata sul campione tal quale così come la quantificazione dell'emoglobina.



2.3.3 DETERMINAZIONI ANALITICHE

2.3.3.1 Estrazione dei lipidi

L'estrazione dei lipidi è stata effettuata secondo la metodica di Bligh e Dyer (1959). Una quantità pari a 5 g di campione di alici, preventivamente separate dalla pelle esterna, deliscate e sfilettate, è stata triturrata con l'aggiunta di 0,020g di antiossidante (BHT) e miscelata con 5 ml di cloroformio e 10 ml di metanolo. Si è proceduto poi come riportato nel § 1.3.3.1.

2.3.3.2 Determinazione della composizione acidica (vd. §1.3.3.4)

2.3.3.3 Identificazione degli acidi grassi mediante GC/MS

L'identificazione degli acidi grassi a lunga catena è stata effettuata mediante gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa dei 4,4 dimetilozolinolo derivati degli acidi grassi (Christie, 1994). Tali composti, infatti, mostrano una eccellente capacità cromatografica e producono spettri di massa di facile interpretazione, risultano chiaramente evidenti lo ione molecolare e i frammenti target relativi alle posizioni delle insaturazioni. (Zhang, 1989)

Ad una quantità pari a 4 mg di grasso sono stati aggiunti 500 µl di 2-ammino-2-metilpropanolo (AMP) preventivamente riscaldato a 40°C per facilitarne la fusione. Il tutto viene portato ad una temperatura di 180°C per circa 18 ore. Raffreddato il campione, vi sono stati disciolti 5 ml di diclorometano. Successivamente il campione è stato lavato con acqua distillata e la fase organica filtrata su solfato di sodio anidro al fine di allontanare eventuali residui acquosi. Il solvente è stato evaporato sotto vuoto in evaporatore rotante (Rotovapor, mod.VV2000, Heidolph) a 35°C. Il residuo è stato ripreso con 100 µl di esano. 1 µl di tale soluzione è stata prelevata ed iniettata al GC-MS.

Per l'analisi è stato utilizzato un gascromatografo associato ad uno spettrometro di massa SHIMADZU (mod. QP5050A), *software* di acquisizione GC-MS Solution vers.1.02 (Shimadzu Italia, Milano), dotato di una colonna capillare FAME da 60 m, i.d. 0,25 mm, con fase stazionaria 50 % Cianopropyl-Methyl Phenyl Silicone di 0,25 mm di spessore (Quadrex Corporation, New Heaven, U.S.A.).

Lo spettrometro di massa impiegato è dotato di una sorgente ad impatto elettronico di 70 eV. La temperatura della sorgente è stata di 190°C, la temperatura dell'interfaccia di 230°C, il programma di scansione va da 40 a 450 uma e il tempo di scansione di 0,2 secondi.

Per l'analisi gas-cromatografica sono state adottate le seguenti condizioni operative:

a)camera mantenuta a 180°C per i primi 15 minuti e successivo incremento termico di 10°C/min fino ad una temperatura di 230°C mantenuta per 20 min; b)temperatura iniettore: 270°C; gas di trasporto: elio; gas; flusso di elio in colonna: 0,8 ml/min; rapporto di splittaggio: 1/60;

L'identificazione dei picchi è stata effettuata confrontando gli spettri di massa ottenuti con quelli presenti in letteratura e nelle librerie forniteci con lo strumento.

2.3.3.4 Determinazione della composizione in classi lipidiche

Il profilo compositivo dei lipidi estratti è stato definito attraverso l'analisi HPLC degli estratti su colonna in silice e rivelazione dei picchi mediante *Evaporative Light Scattering Detector* (ELSD) secondo il metodo messo a punto nel Dipartimento di Scienze degli Alimenti di Portici (Savarese, 2004). I campioni sono disciolti (10 mg/ml) in una miscela di solventi composta da isottano/THF (99:1, v/v). Le classi di lipidi sono separate mediante HPLC in fase normale e quantificate mediante ELSD. L'apparato HPLC utilizzato è stato un cromatografo WELLCHROM mod. K 1001 e Solvent organizer mod. K 1500 (Knauer, Germany) provvisto di rivelatore ELSD mod. PL-BLS 1000 (Polymer Laboratories Ltd, UK). La separazione cromatografica è stata effettuata mediante una colonna Luna 5 μ Silica, 250 mm x 4,6 mm (Phenomenex). Flusso di colonna 1,6 ml/min, quantità iniettata 20 μ l. Fasi mobili A: isottano/THF (99:1, v:v); B: isottano/2-propanolo/etilacetato/acido formico-2-propanolo (8:92) (75:15:15:1, v:v). Gradiente: da 100 a 10% A in 8 min; da 10 a 5% A in 3 min; da 5 a 95% A in 1 min; 95% A per 3 min; da 95 a 100% A in 1 min; 100% A per 2 min.

2.3.3.5 Analisi spettrofotometriche

Si è proceduto come riportato nel § 1.3.3.3 ma effettuando anche la lettura a 234 nm in quanto nei lipidi di origine marina, in particolare, l'assorbimento dei dieni coniugati può avvenire alla lunghezza d'onda di intervallo 232-234 nm (Warner ed Eskin, 1995).

2.3.3.6 Determinazione del numero di perossidi nel muscolo di pesce

La determinazione del numero di perossidi (Chapman e McKay, 1949) è stata effettuata sui lipidi ottenuti mediante estrazione a freddo (Bligh e Dyer, 1959).

Procedimento. Ad una aliquota dell'estratto lipidico, dopo evaporazione sotto azoto, sono stati aggiunti in sequenza 200 μ l di esano, 5 ml di etanolo e 100 μ l di Tiocianato di sodio al 30%.

Dopo agitazione per 1 minuto è stata aggiunta una quantità pari a 100 μl di Fe^{2+} sottoforma di $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Dopo 3 minuti di reazione è stata effettuata una lettura spettrofotometrica a 500 nm.

La retta di calibrazione è stata effettuata aggiungendo ad una miscela costituita da 200 μl di esano, 5 ml di etanolo e 100 μl di Tiocianato di sodio al 30% diverse concentrazioni di Fe^{3+} , sottoforma di FeCl_3 , e di HCl al 3,5%.

Sigla	ml FeCl_3	ml HCl 3.5%
1	-	100
2	10	90
3	20	80
4	40	60
5	60	40
6	80	20
7	100	-

2.3.3.7 Valutazione della per ossidazione lipidica in campioni di pesce mediante TBA test

Principio del metodo: La malondialdeide (MDA) è uno dei maggiori prodotti della degradazione degli idroperossidi lipidici, per cui è utilizzata come *marker* del grado di perossidazione.

Il metodo più comune per la misura della MDA negli alimenti e nei campioni biologici è il *test* dell'acido tiobarbiturico (TBA). Esso si basa su una quantificazione spettrofotometrica dei composti rosa che si formano a pH basso ad alte temperature per reazione di condensazione di 1 molecola di MDA con 2 molecole di TBA. Tali composti hanno un massimo assorbimento a 532-535 nm e vengono usualmente indicati con la sigla T-BARS. Il valore dei T-BARS è espresso in equivalenti di malondialdeide, lo standard usato per la costruzione della retta di taratura, in quanto uno dei principali marker dei processi di ossidazione lipidica.

Procedimento: è stato seguito il metodo spettrofotometrico riportato in Maraschilello *et al.*, (1999). A 0,5 g di campione di alici sono stati aggiunti 10 ml di acqua bidistillata ed il tutto è stato omogeneizzato per 1 minuto con un omogeneizzatore ULTRATURRAX mod. T 25 B, (Kilka-Werke, Germany); sono stati in seguito aggiunti 2,5 ml di acido tricloroacetico (TCA) al 25% e il tutto dopo agitazione è stato refrigerato a 4°C per 15 minuti. Sono stati recuperati 3,5 ml di surnatante a cui sono stati aggiunti 1,5 ml di soluzione di TBA allo 0,6%; il tutto è stato posto per 30 minuti in bagnetto a 70°C. Sui campioni, dopo raffreddamento, è stata effettuata la lettura spettrofotometrica a 532 nm, contro un bianco costituito da una soluzione di 2,5 ml di acqua bidistillata, 1 ml di TCA al 25% e 1,5 ml di TBA allo 0,6%. Calcolare la concentrazione di MDA equivalente nel campione, in riferimento alla retta di taratura e considerando le diluizioni che si sono avute nel processo di estrazione.

Per l'analisi è stato utilizzato uno spettrofotometro SHIMADZU UV 16 01 a doppio raggio.

2.3.3.8 Determinazione dell'emoglobina nel muscolo di pesce

L'estrazione e quantificazione dell'emoglobina nel muscolo di pesce è stata effettuata partendo dalla metodica descritta da Brown (1961) alla quale sono state apportate opportune modifiche.

Procedimento. È stata pesata una quantità pari a 3 g di muscolo bianco ai quali si sono aggiunti 10 ml di acqua distillata. Il campione, così trattato, è stato sottoposto ad omogeneizzazione con Ultraturax (mod. T 25B, Kilka-Werke, Germany) per 1 minuto e, in seguito, centrifugato per 10 minuti a 3000 giri al minuto. Il surnatante è stato poi filtrato ed il pH è stato portato ad un valore di 7.0.

Ad 1 ml di estratto è stato aggiunto 1 mg di ditionato sodico ed è stata effettuata una lettura allo spettrofotometro nel visibile (400-500 nm). La curva di calibrazione è stata effettuata utilizzando emoglobina bovina liofilizzata come standard.

2.4 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.4.1 EFFETTO DELL'AGGIUNTA DI ANTIOSSIDANTI SULL'OSSIDAZIONE DI MUSCOLO DI SURO (*TRACHURUS TRACHURUS*L.)

L'ossidazione lipidica è la principale causa della diminuzione della qualità dei prodotti ittici, modificandone l'aroma, l'odore, il colore, la struttura e il valore nutrizionale con la produzione di composti tossici. Comparati con gli altri lipidi alimentari, i lipidi dei pesci sono più suscettibili nei confronti dell'ossidazione a causa del loro elevato grado di insaturazione ed del basso contenuto di antiossidanti (Kolakowska *et al.*, 2003).

Una soluzione per ridurre la produzione di composti volatili e non, responsabili di un declassamento qualitativo dei prodotti ittici, e derivanti dalla degradazione lipidica, è l'utilizzo di sostanze antiossidanti in grado di bloccare la reazione di propagazione radicalica e quindi di inibire in parte l'ossidazione.

L'aggiunta di composti fenoli, estratti da olio extravergine di oliva, direttamente al muscolo di pesce omogeneizzato ha confermato l'effetto protettivo di tali composti sulle modificazioni lipidiche indotte dalle alte temperature.

In **Figura 2.4.1** si riporta l'andamento del numero di perossidi valutato sui campioni durante una prova di ossidazione accelerata in presenza/assenza di antiossidanti.

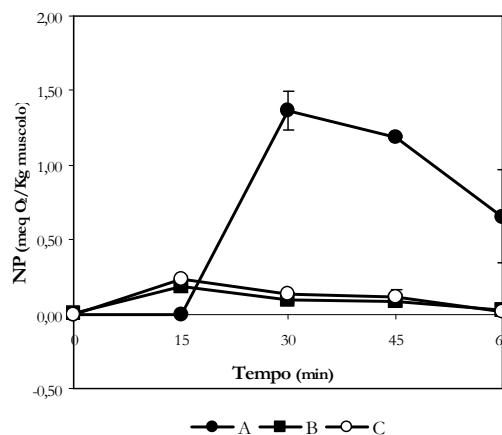


Figura 2.4.1. Evoluzione del numero di perossidi (meq O₂/kg di muscolo) rilevata nei campioni con aggiunta di antiossidanti (B e C) e nel controllo (A).

I dati quantitativi relativi a tale andamento sono riportati in **Tabella 2.4.1**.

È evidente un aumento significativo nel campione di controllo dopo solo 30 minuti di trattamento termico a 105°C, mentre per i due campioni trattati con antiossidanti il valore di NP resta pressoché invariato. Tale comportamento è da attribuire alla attività protettiva che tali composti svolgono nell'ambito dell'ossidazione lipidica. Essi, infatti, si comportano da donatori di idrogeno nei confronti dei perossiradicali

(ROO[•]) formati dagli acidi grassi insaturi (RH) durante la loro ossidazione (Frankel, 1998).

I radicali degli antiossidanti (A[•]) sono delle molecole molto stabili sono grazie alla capacità di delocalizzare gli elettroni nella loro struttura.

Tabella 2.4.1. Numero di perossidi (media \pm dev.st.) espresso in meq O₂/kg di lipidi, rilevato nei campioni di pesce sottoposti a trattamento termico accelerato in presenza/assenza di antiossidanti.

	Perossidi (meqO ₂ /kg muscolo)				
	Fresco	15 min	30 min	45 min	60 min
A ¹	0,00 ^a \pm 0,00	0,00 ^a \pm 0,00	1,37 ^b \pm 0,13	1,19 ^c \pm 0,01	0,65 ^d \pm 0,31
B	0,00 ^a \pm 0,01	0,18 ^b \pm 0,01	0,09 ^b \pm 0,02	0,09 ^b \pm 0,00	0,02 ^a \pm 0,01
C	0,00 ^a \pm 0,01	0,24 ^b \pm 0,02	0,14 ^c \pm 0,01	0,11 ^c \pm 0,06	0,02 ^a \pm 0,01

lettere differenti sulla stessa colonna indicano differenze significative tra i campioni ($p < 0,05$) risultanti da ANOVA ad una via

¹ Decodifica campioni: **A** controllo; **B** aggiunta di idrossitiroso (25 ppm); **C** aggiunta di un estratto fenolico di olio extravergine di oliva (25 ppm).

Per valutare l'effetto dell'aggiunta di antiossidanti sull'ossidazione secondaria degli acidi polinsaturi è stato effettuato il dosaggio spettrofotometrico della malondialdeide (MDA), *marker* della perossidazione lipidica, mediante *test* dell'acido tiobarbiturico (TBA) (Maraschiello *et al.*, 1999).

I valori relativi al contenuto di malondialdeide nei campioni analizzati è riportato in **Tabella 2.4.2.**

Anche in questo caso i campioni con aggiunta di antiossidanti mostrano, durante l'intero trattamento, valori di MDA inferiori rispetto al campione privo di antiossidanti aggiunti (**Figura 2.4.2**). in tutti e tre i casi, però, si assiste ad un aumento iniziale seguito da un decremento. Tale situazione, confermata da altri studi, ci permette di asserire che tale indice non è affidabile nella valutazione dell'ossidazione lipidica nei pesci. Infatti, i prodotti ittici sono ricchi di composti di natura non lipidica che possono interferire in questa analisi, falsandone il risultato. (Savarese, 2004).

Tabella 2.4.2. Contenuto di malondialdeide (mg MDA/kg muscolo) rilevato nei campioni di muscolo di pesce oggetto di studio.

	TBA test (mg MDA/kg muscolo)				
	Fresco	15 min	30 min	45 min	60 min
A ¹	0,00 ^a \pm 0,27	9,04 ^a \pm 0,72	6,50 ^a \pm 0,28	6,64 ^a \pm 0,69	4,41 ^a \pm 1,14
B	0,00 ^a \pm 0,70	7,58 ^b \pm 0,71	4,50 ^b \pm 1,91	1,47 ^b \pm 1,62	1,51 ^b \pm 1,76
C	0,00 ^a \pm 0,27	3,49 ^c \pm 0,56	0,00 ^c \pm 2,73	0,00 ^c \pm 0,01	0,00 ^c \pm 1,56

lettere differenti sulla stessa colonna indicano differenze significative tra i campioni ($p < 0,05$) risultanti da ANOVA ad una via

¹ Decodifica campioni: **A** controllo; **B** aggiunta di idrossitiroso (25 ppm); **C** aggiunta di un estratto fenolico di olio extravergine di oliva (25 ppm).

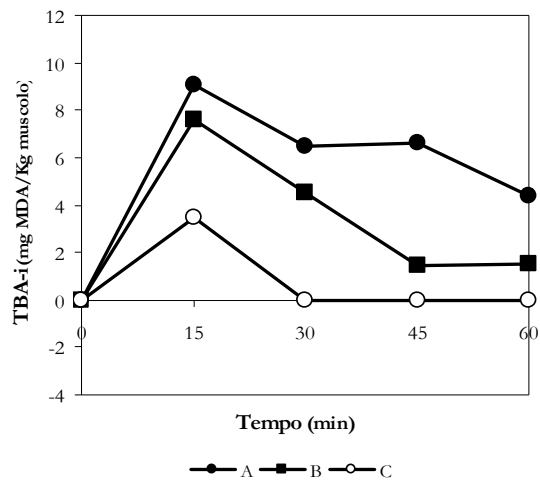


Figura 2.4.2. Evoluzione del contenuto in malondialdeide (mg MDA/kg muscolo) riscontrato nei campioni oggetto di studio.

2.5 CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

- Angerosa F., Di Giacinto L. (1995). Caratteristiche di qualità dell'olio di oliva vergine in relazione ai metodi di frangitura. Nota II. Riv. Ital. Sostanze Grasse, 72: 1-4.
- Arrigo L., Rondinone R. (1995). I micronutrienti e antiossidanti nell'olio d'oliva. Riv. Ital. Sost. Grasse, 72: 11-14.
- Berra B., Caruso D., Cortesi N., Fedeli E., Rasetti M.F., Galli C. (1995). Antioxidant properties of minor polar components of olive oil on the oxidative processes of cholesterol in human LDL. Riv. Ital. Sost. Grasse, 72: 285-288.
- Bligh E., Dyer W. **1959**. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Brenes M., Rejanol L., Garcia P., Sanchez H.A., Garrido A. (1995). Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish style green olive. *Journal Agric. Food Chem.*, 43: 2702-2706.
- Brenes M., Hidalgo J.H., Garcia A., Rios J.J., Garcia P., Zamora R., Garrido A. **2000**. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 715-720.
- Brown, W.D. Chromatography of myoglobin on diethylaminoethyl cellulose columns. *Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236, 2238-2240.
- Cappelli P., Vannucchi V. **1998**. *Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazione*. Seconda edizione, Zanichelli editore, Bologna.
- Chapman, R., Mckay, J. The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *J.A.O.C.S.*, 1949, 26, 1110-1117.
- Cortesi N., Fedeli E. (1983). I composti polari di oli di oliva vergine. Nota I. Riv. It. Sost. Grasse, 60: 341-351.
- Christie, W.W. *Gas Chromatography and Lipids*. The Oily Press. Ayr, Scotland. 1994.
- Cronin D.A., O'Sullivan K. **1990**. Processed Fish Products as Sources of n-3 Polynsaturated Fatty Acids. *Irish J. Food Sci. Technol.* 14: 17-24.
- Di Giovacchino L., Costantini N., Di Febo M. (1994). La centrifugazione della pasta di olive senza acqua di diluizione. Riv. Ital. Sost. Grasse, 71: 555-559.
- Fidanza E. **1996**. *Alimentazione e nutrizione umana*. Idelson Gnocchi Editore, Napoli.
- Frankel E.N. **1998**. *Lipid Oxidation*. The Oily Press, Dundee (Scotland).pp 303.
- Galli C. **1993**. Acidi grassi polinsaturi n-3 (omega-3) e stato di salute nell'uomo. *Giornale italiano di nutrizione clinica e preventiva*, Idelson-Napoli, 89-97.
- Gokoglu, N., Ozden, O., Erkan, N., Baygar, T., Metin, S. **1999**. Seasonal variation in fat content of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *International Journal of Food and Technology.* 34, 401-402.
- Guillén, M.D., Ruiz, A. **2004**. Study of the stability of salted and unsalted salmon fillers by 1H nuclear magnetic resonance. *Food Chemistry.* 86: 297-304.

- Harborne J.B. **1989**. General procedures and measurements of total phenolics. In "Plant phenolics", vol.1, Harborne J.B. (ed). From "Methods in plant biochemistry series", P.M. Dey & Harborne J.B. (eds), p 1, Academic press London.
- Holman RT. 1970. Biochemical activities of and requirement for polyunsaturated fatty acids. *Prog Chem Fats Lipid.*, 6: 607-687.
- Katayama T., Davin L.B., Lewis N.G. (1992). An extraordinary accumulation of (-)-pinoresinolo in cell-free extracts of *Forsythia intermedia*: evidence for enantiospecific reduction of (+)-pinoresinolo. *Phytochemistry*, 31: 3875-3881.
- Kolakowska A., Olley J., Dunstan G.A. (2003). Fish Lipids in Chemical and functional properties of food lipids, eds. By Sikorski Z.E. and Kolahowska, CRC Press.
- Maraschiello, C., Sarraga, C., Regueiro, J.A.G. Glutathione Peroxidase Activity TBARS, and α -Tocopherol in Meat from Chickens Fed Different Diets. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 867-872.
- Mattson F.H., Grundy S.M. **1985**. Comparison of the effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J. Lipid Res.* 26: 194-202.
- Medina, I., Satué-Gracia, M.T., Frankel, E.N. **1999**. Static Headspace Gas Chromatographic Analyses to Determine Oxidation of Fish Muscle Lipids During Thermal Processing. *JAOCS.* 76
- Montedoro G, Servilli M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A. **1993**. Simple and Hydrolyzable compounds in virgin olive oil. *J. Agr. Food Chem.* 41: 2228-2234.
- Orban E. **1996**. Controllo igienico-sanitario nelle filiera dei prodotti ittici. La direttiva 91/493 CE. *Industrie alimentari.* 1996: 525-532.
- Pirati, D., Guidi, G. **1971**. Influenza della temperatura di conservazione sui filetti di acciughe all'olio. *Industria delle conserve.* 46: 103-107.
- Rovellini, P., Cortesi, N., Fedeli, E. **1997**. Ossidazione dei lipidi. Nota 1. *La rivista italiana delle sostanze grasse.* 74: 181-188.
- Salami M., Galli C., De Angelis L., Visioli F. (1995). Formation of F2 isoprostanes in oxidized low density lipoprotein: inhibitory effect of hydroxytyrosol. *Pharmacological research*, 31: 275.
- Savarese M. (2004). Lipid composition and evolution during the ripening of "menaica" salted anchovies. In 9th Workshop on the developments in the italian PhD research in food science and technology, Parma, Parco area delle Scienze 8-10 settembre 2004, Program 2004: 289-294, Centro Grafico Università, Parma.
- Savarese M. 2004. Studio delle frazioni lipidiche ed antiossidanti di oli vegetali e prodotti alimentari. Tesi di Dottorato di Ricerca.
- Scalfi L., Sacchi R. **1993**. Grassi visibili e non visibili degli alimenti in Aggiornamenti in nutrizione clinica: 5. A cura di Gentile M.G.. Il pensiero Scientifico Editore, Milano.
- Sciancalepore V. 1985. Enzymatic browning in five olive varieties. *J. Food Sci.*, 50: 1194-1199.
- Sciancalepore V., Longone V. 1984. Polyphenol oxidase activity and browning in green olives. *J. Agric. Food Chem.* 32: 320-324.
- Shahidi F., Janitha P.K., Wanasundara P.D. **1992**. Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food Sci. Nutr.*, 32: 67-72.

-
- Tsukamoto H., Hisada S., Nishide S. (1984). Lignans from bark of the Olea plants. I Chem. Pharm. Bull., 32: 2730-2735.
- Tsukamoto H., Hisada S., Nishide S. (1985). Lignans from bark of the Olea plants". II, Chem. Pharm. Bull., 33: 1232-1240.
- Viola P. **1997**. L'olio d'oliva e la salute. Consiglio Oleicolo Internazionale (C.O.I), Madrid (Spagna).
- Visioli F., Vinceri F.F., Galli C. (1995). Waste waters from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia*, 51 (1): 32-34.
- Warner K., Eskin N.A.M. (1995). Methods to assess Qualità and Stability of Oils and Fat-Cointaining Food. AOOLS Press, Champaign (Illinois, USA).
- Wiseman S.A., Mathot J.M.M.J, De Fouw L.H., Tijburg L.B.M. (1996). Dietary non-tocopherol antioxidant present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis*, 120: 15-23.
- Zhang J.Y., Yu Q.T., Liu B.N., Huang Z.H. The structures of cyclopentenyl fatty acids in the seed oils of flacortiacee species by GC-MS of 4-4 dimethyloxazoline derivates. *JAOCS*, 66: 242, 1989.

Siti internet:

www.ismea.it

<http://free.imd.it>

www.uniprom.it