



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

FACOLTA' DI ECONODMIA

DIPARTIMENTO DI MANGEMENT

“ALIMENTI E BEVANDE NERVINE: VALORIZZAZIONE  
DELLA FILIERA FAIR TRADE MEDIANTE UN APPROCCIO  
INTEGRATO”

DOTTORATO IN MANAGEMENT, BANKING  
AND COMMODITY SCIENCES

XXXIV CICLO

*Curriculum in Commodity Sciences*

Tutor

Prof. Giuliana Vinci

Dottorando

Dott.ssa Lucia Maddaloni



# INDICE

<i>Riassunto</i> .....	- 6 -
<i>Abstract</i> .....	- 8 -
<i>Introduzione</i> .....	- 10 -
<b>CAPITOLO I- 14 -IL COMMERCIO ECQUO E SOLIDALE</b> .....	<b>- 14 -</b>
1.1. <i>I principi del commercio equo e solidale</i> .....	- 15 -
1.2. <i>La struttura della rete del CEEs</i> .....	- 17 -
<b>CAPITOLO II: MERCATO DEGLI ALIMENTI E BEVANDE NERVINE</b> .....	<b>- 23 -</b>
2.1. <i>Mercato dei prodotti Fair trade</i> .....	- 23 -
2.2. <i>Mercato del cioccolato</i> .....	- 29 -
2.3. <i>Mercato del tè</i> .....	- 35 -
2.4. <i>Mercato del caffè</i> .....	- 40 -
<b>CAPITOLO III: ALIMENTI E BEVANDE NERVINE</b> .....	<b>- 44 -</b>
3.1. <i>Il Cioccolato</i> .....	- 44 -
3.1.1. <i>Processo produttivo del cioccolato</i> .....	- 46 -
3.1.2. <i>Composizione chimica</i> .....	- 52 -
3.2. <i>Il Tè</i> .....	- 62 -
3.2.1. <i>Processo produttivo del tè</i> .....	- 66 -
3.2.2. <i>Composizione chimica</i> .....	- 75 -
3.3. <i>Il Caffè</i> .....	82
3.3.1. <i>Processi produttivo del Caffè</i> .....	85
3.2.3. <i>Composizione chimica</i> .....	95
<b>CAPITOLO IV: CASO STUDIO: DETERMINAZIONE DI COMPOSTI BIOATTIVI COME MARKER DI QUALITA' DEGLI ALIMENTI E BEVANDE NERVINE</b> ....	<b>99</b>
4.1. <i>Composti bioattivi</i> .....	99



5.4.2. Tè .....	168
5.4.3. Caffè.....	169
<b>CAPITOLO VI: LA METODOLOGIA LCA PER LA VALUTAZIONE DEGLI IMPATTI AMBIENTALI.....</b>	<b>173</b>
6.1. Il Life Cycle Assessment .....	173
6.2. Sostenibilità confronto tra l'estrazione convenzionale e "green" .....	175
6.2.1. Definizione dell'obiettivo e dello scopo .....	175
6.2.2. Inventario del ciclo di vita .....	176
6.2.3. Valutazione dell'impatto del ciclo di vita .....	177
6.2.4. Interpretazione dei risultati .....	178
6.2.5. Assunzioni e limitazioni .....	178
6.3. Valutazione dell'impatto del ciclo di vita dei DES.....	179
6.3.1. Analisi incertezza.....	185
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>188</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>192</b>

## RIASSUNTO

Il commercio equo e solidale (CEeS) è una forma di commercio, nata per contrastare il commercio convenzionale, volta alla promozione e alla salvaguardia del benessere dei lavoratori e dell'ambiente. Il CEeS inizialmente nacque per la vendita di prodotti dell'artigianato dei Paesi in Via di Sviluppo (PVS) e successivamente aprì le porte anche alla commercializzazione dei prodotti agro-alimentari di questi Paesi. Tra i prodotti alimentari che sono maggiormente venduti dal CEeS troviamo principalmente gli alimenti e le bevande nervine (cioccolato, tè e caffè), caratterizzate tutte non solo dalla medesima zona pedoclimatica di coltivazione, ma anche da un profilo chimico-nutrizionale simile. Pertanto, nel presente studio è stata effettuata l'analisi dei composti bioattivi (ammine biogene, acidi grassi liberi essenziali e polifenoli), ossia molecole presenti generalmente in piccole concentrazioni negli alimenti che hanno effetti benefici per la salute del consumatore, in campioni di cioccolato fondente, tè verde e nero e caffè macinato e infuso a marchio Fairtrade e non. Questi composti sono stati presi in considerazione per valutare sia la qualità degli alimenti e delle bevande nervine, ma anche per valutare l'influenza delle tecniche di trasformazione e conservazione dell'alimento. Nello studio sono state prese in considerazione otto ammine biogene (serotonina,  $\beta$ -fenilettilammina, cadaverina, putrescina, tiramina, istamina, spermina e spermidina) e sei acidi grassi (a. linolenico, a. miristico, a. linoleico, a. palmitico, a. oleico e a. stearico) analizzati mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con rivelatore UV-Vis e Fluorimetrico. Inoltre, è stato valutato il contenuto di polifenoli totali (TPC), il contenuto di flavonoidi totali (TFC) e l'attività antiradicalica (saggi ABTS e DPPH), mediante saggi spettrofotometrici in tutte le matrici alimentari considerate. Inoltre, sui campioni di cioccolato è stata valutata la possibilità di utilizzare, al posto dei solventi organici convenzionali (metanolo, acqua e soluzioni di metanolo/acqua) adoperati nell'estrazione dei polifenoli, solventi green di nuova generazione: i Deep Eutectic Solvent (DES). Questi solventi sono costituiti da una coppia di molecole donatori di legami idrogeno (Hydrogen Bond Donor; HBD) e accettori di legame idrogeno (Hydrogen Bond Acceptor; HBA). Nello studio sono state prese in considerazione differenti HBD (Betaina e Clorin Clorina) e HBA (Fruttosio e Trietilenglicole) a diversi rapporti molari e percentuali di idratazione (10, 20 e 30 %). Per valutare la resa di estrazione dei differenti solventi convenzionali e DES sono stati effettuati sugli estratti i

saggi spettrofotometrici per la valutazione del contenuto totale di polifenoli e flavonoidi e l'attività antiradicalica (saggi ABTS e DPPH). Inoltre, per valutare l'effettiva sostenibilità delle metodiche green prese in esame, rispetto ai solventi organici convenzionali per l'estrazione dei polifenoli da campioni di cioccolato, è stata applicata la metodologia del Life Cycle Assessment.

L'applicazione di strumenti chemiometrici come l'analisi delle componenti principali (Principal Component Analysis, PCA) e la Cluster Analysis (CA) sul profilo di ammine biogene, di acidi grassi liberi e sui risultati dei saggi spettrofotometrici (TPC, TFC, ABTS e DPPH) ha consentito di evidenziare raggruppamenti all'interno dei campioni esaminati secondo la tipologia di campione e secondo la presenza o meno del marchio Fairtrade. Pertanto, questo studio rappresenta un punto di partenza per valutare la qualità degli alimenti e delle bevande nervine mediante l'analisi dei composti bioattivi in esso presenti. Inoltre, lo studio ha consentito di sviluppare e ottimizzare nuove procedure di estrazione dei composti fenolici da alimenti e bevande nervine mediante metodiche green, che possono essere applicate in sostituzione dei solventi organici convenzionali che sono meno sostenibili a livello ambientale ed economico.

## ABSTRACT

Fair trade (FT) is a form of trade, created to counter conventional trade, aimed at promoting and safeguarding the welfare of workers and the environment. FT initially originated for the sale of handicraft products from Developing Countries (DCs) and later opened its doors to the marketing of agri-food products from these Countries as well. Among the food products that are mostly sold by FT are mainly psychoactive foods and beverages (chocolate, tea and coffee), all of which are characterized not only by the same soil and climate zone of cultivation, but also by a similar chemical-nutritional profile. Therefore, in the present study, the analysis of bioactive compounds (biogenic amines, essential free fatty acids, and polyphenols), i.e., molecules generally present in small concentrations in foods that have beneficial effects on consumer health, in Fairtrade and non-Fairtrade samples of dark chocolate, green and black tea, and ground and infused coffee was conducted. These compounds were considered to assess both the quality of psychoactive food and beverages, but also to evaluate the influence of food processing and conservation techniques. Eight biogenic amines (serotonin,  $\beta$ -phenylethylamine, cadaverine, putrescine, tyramine, histamine, spermine, and spermidine) and six fatty acids (a. linolenic, a. myristic, a. linoleic, a. palmitic, a. oleic, and a. stearic) analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV-Vis and Fluorimetric detector were considered in the study. In addition, total polyphenol content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antiradical activity (ABTS and DPPH assays) were evaluated by spectrophotometric assays in all food matrices considered. In addition, the possibility of using, instead of conventional organic solvents (methanol, water, and methanol/water solutions) used in polyphenol extraction, new generation green solvents: the Deep Eutectic Solvents (DES) was evaluated on the chocolate samples. These solvents consist of a pair of hydrogen bond donor (Hydrogen Bond Donor; HBD) and hydrogen bond acceptor (Hydrogen Bond Acceptor; HBA) molecules. Different HBDs (Betaine and Chlorin Chlorine) and HBAs (Fructose and Triethylene Glycol) at different molar ratios and hydration rates (10, 20 and 30 percent) were considered in the study. Spectrophotometric assays for evaluation of total polyphenol and flavonoid content and antiradical activity (ABTS and DPPH assays) were performed on the extracts to evaluate the extraction yield of different conventional solvents and DES. In addition, the Life Cycle Assessment methodology was applied to assess the real sustainability of the green



methods examined, compared to conventional organic solvents for the extraction of polyphenols from chocolate samples.

The application of chemometric tools such as Principal component analysis (PCA) and Cluster Analysis (CA) on the profile of biogenic amines, free fatty acids, and the results of spectrophotometric assays (TPC, TFC, ABTS and DPPH) allowed us to highlight groupings within the examined samples according to the type of sample and to the presence or absence of the Fairtrade label. Therefore, this study provides a starting point for assessing the quality of nerve foods and beverages by analysing the bioactive compounds in it. In addition, the study made it possible to develop and optimize new procedures for the extraction of phenolic compounds from psychoactive foods and beverages using green methods, which can be applied to replace conventional organic solvents that are less environmentally and economically sustainable.

# INTRODUZIONE

Il commercio equo e solidale (CEeS), anche detto commercio Fair Trade, è una forma di commercio che negli ultimi anni si è affermata sul mercato internazionale grazie all'applicazione di un modello economico "innovativo". Il commercio Fair Trade nacque negli anni Quaranta per tutelare i produttori e gli agricoltori dei Paesi in Via di Sviluppo (PVS), promuovendo una forma di commercio con lo scopo di garantire un prezzo "giusto" della merce e assicurando la tutela dei diritti umani e del territorio. Questa forma di commercio si oppone alle pratiche economiche di massimizzazione del profitto delle grandi multinazionali, basandosi su un sistema commerciale che mette in comunicazione diretta i produttori e i clienti finali, limitando la catena di intermediari. Il commercio equo e solidale si basa su dieci principi che le associazioni Equo-Solidali devono rispettare per commercializzare i loro prodotti con il marchio FairTrade [1]. Tra i prodotti che sono tipicamente commercializzati dal CEeS vi sono prodotti agro-alimentari (es. tè, caffè, cioccolato, riso, canna da zucchero, banane, etc.) e prodotti dell'artigianato (tappeti, palloni, magliette, utensili per la cucina, etc.). Tra i principali prodotti agroalimentari vi sono gli alimenti e le bevande nervine: cacao, tè e caffè. Gli alimenti nervini, accomunati dall'origine extraeuropea, sono definiti tali in quanto ricchi di sostanze toniche e corroboranti che hanno effetti sul sistema nervoso centrale [2]. Cacao, tè e caffè sono tutti alimenti di origine vegetale che sono coltivati nella fascia equatoriale da popolazioni del centro-sud America, africane, asiatiche e orientali. Questi alimenti hanno trovato un largo impiego nei Paesi Industrializzati, raggiungendo notevoli livelli di consumo. Negli ultimi anni gli alimenti nervini sono stati rivalutati dal punto di vista nutrizionale, in quanto caratterizzati da un elevato contenuto di composti bioattivi. Per composti bioattivi si intendono tutte le sostanze che sono comunemente assunte con la dieta ritenute in grado di influire positivamente sulla salute umana, contribuendo alla prevenzione e allo sviluppo di malattie. Tra i più comuni composti bioattivi negli alimenti vi sono le ammine biogene, gli acidi grassi essenziali e i polifenoli [3-4]. Le ammine biogene (AB) sono composti azotati basici con struttura alifatica (putrescina, cadaverina, spermina, spermidina), aromatica (tiramina, feniletilamina) o eterociclica (istamina, triptamina), che si trovano in diversi alimenti. Sono prodotte principalmente dalla decarbossilazione microbica degli aminoacidi, ad eccezione delle poliammine naturali [5]. Le BA di origine endogena si trovano a basse concentrazioni negli alimenti non fermentati (es. frutta,

verdura e latte). Alcune di esse sono specifiche di alcune specie vegetali, dove esercitano funzioni metaboliche essenziali, e quindi possono essere utilizzate come indice chemiotassonomico e possono attestare l'autenticità degli alimenti. Elevate concentrazioni di ammine biogene sono state riscontrate negli alimenti fermentati (es. vino, birra, formaggio, carne e pesce fermentati), dove la contaminazione con la microflora, che presenta attività di decarbossilazione degli amminoacidi, è richiesta dal processo di produzione [6]. Tra le BA è importante annoverare la serotonina, un neurotrasmettitore monoamminico sintetizzato nei neuroni serotoninergici del sistema nervoso centrale, coinvolto principalmente nella regolazione dell'umore. Nel sistema nervoso centrale, la serotonina svolge un ruolo importante nella regolazione dell'umore, del sonno, della temperatura corporea e dell'appetito. Alcuni fattori possono limitare l'accumulo di BA negli alimenti come: la disponibilità di aminoacidi, il pH, la concentrazione di sali e la temperatura. La presenza di ammine biogene in diversi alimenti può essere anche correlata alle condizioni igienico-sanitarie del prodotto iniziale, del processo produttivo e del deterioramento dell'alimento. In questo modo, il loro contenuto negli alimenti è considerato un indicatore della loro qualità. Inoltre, alcune ammine biogene (istamina e tiramina) possono indurre, se ingerite in grande quantità, diverse reazioni fisiologiche negative, generalmente psicoattive o vasoattive. La conoscenza dei loro livelli negli alimenti è quindi di grande importanza per la salute dei consumatori e per la formulazione delle diete [7]. Diversi tipi di intossicazione alimentare sono correlate alla presenza di ammine biogene negli alimenti, tra cui l'avvelenamento da istamina e la tossicità da tiramina [5; 8]. Inoltre, le ammine secondarie come la putrescina e la cadaverina hanno un ruolo importante nelle intossicazioni alimentari, in quanto possono potenziare la tossicità dell'istamina. Alcuni Paesi hanno regolamentato la quantità massima di istamina in alcuni prodotti. La Svizzera è nota per essere l'unico Paese ad avere un limite ufficiale per l'istamina nei vini, con un massimo di 10 mg/L. L'Unione Europea ha aggiornato con il Regolamento (UE) n. 1019/2013 della Commissione il livello massimo di istamina consentito nella salsa di pesce, prodotta dalla fermentazione dei prodotti della pesca, che è stato fissato a 400 mg/kg [9]. La Food and Drug Administration statunitense (FDA) ha stabilito un regolamento per il tonno che considera 50 mg di istamina per 100 g come un'indicazione di un potenziale pericolo per la salute. In generale, un'assunzione superiore a 40 mg di ammine biogene per pasto è stata considerata potenzialmente tossica [10]. Altri composti bioattivi che si possono trovare negli alimenti e/o nelle bevande nervine sono gli acidi grassi, ossia gli acidi

monocarbossilici alifatici derivati o contenuti in forma esterificata in un grasso vegetale o animale, olio o cera. Questi composti sono idrocarburi a catena corta o lunga a seconda del numero di carbonii in esso contenuti e possono essere saturi o insaturi, ossia presentare o meno doppi legami. Quando si trovano non legati ad altre specie chimiche, gli acidi grassi vengono identificati con il nome di acidi grassi liberi (*Free Fatty Acids*, FFA), o acidi grassi non esterificati (*Non Esterified Fatty Acids*, NEFA) [10-11]. Tra gli acidi grassi una classe di composti di fondamentale importanza per l'uomo sono gli acidi grassi essenziali (AGE), che devono essere necessariamente introdotti con la dieta, in quanto l'uomo non è in grado di sintetizzarli. Gli AGE sono due: acido linoleico e acido linolenico. Gli AGE sono fondamentali per la crescita delle membrane cellulari, per la sintesi degli ormoni eicosanoidi, intervengono nell'invecchiamento cellulare e contrastano le malattie cardiovascolari. La determinazione degli acidi grassi negli alimenti è di fondamentale importanza per la valutazione della qualità del prodotto; infatti, la presenza di acidi grassi liberi può indicare un deterioramento dell'alimento o l'applicazione di tecniche di trasformazione o conservazione non adeguata [13]. Anche i polifenoli sono composti bioattivi presenti in grandi quantità negli alimenti e/o bevande nervine. Costituiscono un gruppo eterogeneo di sostanze naturali, considerate come metaboliti secondari presenti in molte specie vegetali [13-14]. In base alla loro struttura chimica possono essere distinti in tre macroclassi: fenoli, flavonoidi e tannini. Questi composti hanno effetti antimicrobici e anticancerogeni e soprattutto un'elevata attività antiossidante (dimostrata in esperimenti in vivo e in vitro) [16]. Recentemente sono stati dimostrati i loro possibili effetti contro le malattie cardiovascolari e i disturbi neurodegenerativi [17]. I composti fenolici sono costituenti tipici degli alimenti e potrebbero essere considerati come "marcatori molecolari" della loro qualità, oltre ad essere già ampiamente studiati per le loro proprietà organolettiche e salutari. I composti fenolici sono stati evidenziati in letteratura come marcatori di qualità e autenticità di alcune categorie di alimenti [18]. Negli ultimi decenni, le ricerche sulla qualità degli alimenti, intesa come qualità organolettico-nutrizionale, ambientale e sociale sono aumentate rapidamente in risposta alla crescente consapevolezza e attenzione dei consumatori.

Pertanto, lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di valutare mediante un approccio integrato gli alimenti nervini (cioccolato, tè e caffè) del commercio convenzionale e Fair Trade. In particolar modo si è valutata la qualità degli alimenti e delle bevande nervine a marchio Fairtrade e no, mediante la determinazione di alcune specie chimiche (es.

ammine biogene, acidi grassi liberi essenziali e polifenoli). I composti scelti sono stati presi in considerazione in quanto permettono di valutare l'origine dell'alimento (area di provenienza o caratteristiche tipiche di un prodotto), le caratteristiche organolettiche, ma anche i processi industriali e commerciali (dalla coltivazione alla vendita). Questi composti sono stati valutati mediante tecniche di analisi convenzionale (es. spettrofotometria UV-Vis e cromatografia liquida ad alte prestazioni; HPLC) e tecniche "green" (es. i solventi eutettici profondi). In relazione all'elevato impatto economico e ambientale dei metodi di analisi dei composti bioattivi esistenti, è pertanto necessario sviluppare nuovi metodi sostenibili. Perciò per valutare l'impatto dei metodi "green" e confrontarlo con quello tradizionale, viene proposta una valutazione del ciclo di vita (LCA). La LCA è una procedura per valutare gli impatti ambientali di ogni fase di un prodotto, processo o servizio nell'arco dell'intera produzione. L'LCA si basa sull'analisi e sulla determinazione di variabili quantitative associate a prodotti, sistemi e servizi, elaborate da equazioni matematiche, composte da dati che descrivono il ciclo di vita e regolamentate dalla norma ISO 14044:2006 [19]. Questa metodologia permette di quantificare l'energia e i materiali utilizzati (input) e i rifiuti rilasciati nell'ambiente (output), al fine di valutare le opportunità tangibili per ridurre l'impatto ambientale [20].

# CAPITOLO I

## IL COMMERCIO ECQUO E SOLIDALE

Il commercio, ossia lo scambio, l'acquisto e/o la vendita di merci, beni (valutari o di consumo, mobili o immobili) e/o di servizi è una delle attività fondamentali su cui si fonda l'economia. Nei secoli il commercio ha subito numerose evoluzioni che hanno fatto seguito ai principali cambiamenti della società, come le rivoluzioni industriali. Queste perturbazioni, interne a ogni singolo Stato, hanno portato alla nascita di un sempre più crescente scambio di merci, beni e servizi tra Paesi, che ha determinato la globalizzazione dei mercati con la nascita di grandi società multinazionali. Pertanto, a partire dagli anni Quaranta si è sviluppato il concetto di Commercio equo e solidale (CEeS) o Fair Trade (FT) per limitare ed ostacolare le grandi multinazionali nelle pratiche di sfruttamento delle risorse e dei lavoratori dei Paesi in via di sviluppo (PVS). L'idea alla base del CEeS era quella di promuovere una forma di commercio che non andasse a creare una disparità economica, sociale e ambientale tra Paesi produttori e Paesi consumatori. Pertanto, il CEeS venne definito nella Carta Internazionale del Commercio Equo e Solidale come una *“partnership commerciale basata sul dialogo, la trasparenza e il rispetto, che cerca una maggiore equità nel commercio internazionale. Contribuisce allo sviluppo sostenibile offrendo migliori condizioni commerciali e garantendo i diritti dei produttori e dei lavoratori emarginati”*[21]. Con Commercio Equo e Solidale (CEeS), si intende quella forma di attività commerciale nella quale l'obiettivo primario non è la massimizzazione del profitto ma la lotta allo sfruttamento e alla povertà legati a cause economiche, politiche o sociali. È, dunque, una forma di commercio internazionale nella quale si cerca di sostenere e favorire la crescita dei produttori del Sud del mondo, organizzati in forma associata (preferibilmente cooperative), e di garantire ai produttori ed ai lavoratori dei PEMES (Paesi Emergenti Meno Sviluppati) un trattamento economico e sociale equo e rispettoso dei diritti umani e dell'ambiente. In questo senso il CEeS si contrappone alle pratiche di commercio convenzionale basate sullo sfruttamento del lavoro e dell'ambiente, che si ritiene siano spesso applicate dalle multinazionali che agiscono esclusivamente nell'ottica della massimizzazione del profitto. Il "manifesto" del commercio equo solidale in Italia è la Carta Italiana dei criteri del commercio equo e

solidale (1999) che, all'art. 1, lo definisce come: “*un approccio alternativo al commercio convenzionale; esso promuove giustizia sociale ed economica, sviluppo sostenibile, rispetto per le persone e per l'ambiente, attraverso il commercio, la crescita della consapevolezza dei consumatori, l'educazione, l'informazione e l'azione politica. Il Commercio Equo e Solidale è una relazione paritaria fra tutti i soggetti coinvolti nella catena di commercializzazione: dai produttori ai consumatori*” [22].

## **1.1. I principi del commercio equo e solidale**

Al fine di promuovere il commercio equo e solidale l'organizzazione internazionale WFTO (World Fair Trade Organization) ha stilato una carta dei principi che devono essere applicati e che vengono controllati dalle associazioni Equo-Solidali (Figura 1.1).

I principi enunciati dalla WFTO sono dieci [21]:

1. *Creare opportunità per produttori con svantaggi economici*: questo principio mira a ridurre la povertà mediante l'applicazione di forme di commercio che vanno a supportare i piccoli produttori, spesso marginalizzati, costituiti da imprese familiari indipendenti, associazioni o cooperative. Ciò consentirebbe di limitare l'insicurezza economica di questi produttori e permetterebbe loro di raggiungere l'autosufficienza e la titolarità.
2. *Trasparenza e responsabilità*: le organizzazioni che fanno parte del commercio equo e solidale devono essere trasparenti nella loro amministrazione e nelle loro relazioni commerciali. Infatti, questo principio fa sì che vengano assunte responsabilità nei confronti degli investitori. Inoltre, viene assicurata l'inclusione degli impiegati, membri e produttori nei processi decisionali.
3. *Pratiche equo-solidali*: le associazioni di commercio equo e solidale non devono approfittare dei produttori marginalizzati e devono essere sensibili a tematiche sociali, economiche e di benessere ambientale. L'equo-solidale riconosce, promuove e protegge l'identità culturale e le competenze tradizionali dei piccoli produttori come stabilito nei loro disegni artigianali, prodotti alimentari e altri servizi ad essi legati.
4. *Pagamento equo*: il pagamento equo viene effettuato quando negoziato in modo reciproco e concordato tra produttori e l'associazione. Il pagamento equo è costituito da:
  - a. Prezzi equi, che vengono concordati liberamente tra compratore e venditore e vengono decisi sulla base di “prezzi trasparenti”.

- b. Salari equi, ossia il datore di lavoro deve pagare il lavoratore con almeno lo stipendio medio locale, ossia la remunerazione che viene ricevuta per una settimana di lavoro, pari a non più di 48 ore, di un lavoratore in un posto specifico, che sia sufficiente affinché sia mantenuto uno standard di vita decoroso, sia per il lavoratore sia per la sua famiglia. Lo standard decoroso di vita viene definito come la possibilità di accedere ai bisogni primari come cibo, acqua, alloggio, educazione, assistenza sanitaria, trasporto, vestiario, etc., compreso provvedere ad eventi inaspettati.
5. *Assicurarsi l'assenza di sfruttamento minorile del lavoro e sfruttamento del lavoro*: le associazioni, aderiscono alla Convenzione Europea sull'Esercizio dei Diritti dei Minori e alle leggi nazionali e locali sullo sfruttamento del lavoro minorili; pertanto, assicurano che i dipendenti e/o i membri che fanno parte del commercio equo di un prodotto non siano sottoposti a sfruttamento.
6. *Impegno alla non discriminazione, all'uguaglianza di genere e alla legittimazione economica delle donne e alla libertà di associazione*: questo principio mira a ridurre la discriminazione nell'assunzione, remunerazione, promozione, terminazione di contratto o pensionamento sulla base di razza, casta, origine nazionale, religione, disabilità, genere, orientamento sessuale, appartenenza a sindacati, affiliazione politica, condizioni quali HIV/AIDS o età. Inoltre, viene incentivata la promozione dell'uguaglianza di genere, che va ad assicurare che donne e uomini abbiano pari diritti a livello lavorativo.
7. *Garanzia di buone condizioni di lavoro*: le associazioni devono garantire un ambiente lavorativo sano e sicuro sia per i dipendenti che per i soci. Le ore di lavoro e le condizioni di lavoro dei lavoratori devono essere conformi con le direttive stabilite dalle leggi nazionali o locali.
8. *Rafforzare la capacità di crescita delle imprese locali*: viene incentivata la crescita d'impatti positivi sul lavoro per i piccoli produttori emergenti attraverso il CEEs. Le associazioni afferenti al CEEs mirano a promuovere le capacità e le competenze dei propri dipendenti e membri, mediante lo sviluppando le attività che aiutino i produttori a migliorare le loro competenze manageriali, capacità produttive e all'accesso ai mercati.
9. *Promuovere il commercio equo*: viene aumentata la consapevolezza dell'obiettivo del CEEs e la necessità di una maggiore giustizia nel commercio mondiale.



Questo principio mira a sostenere gli obiettivi e le attività del CEeS, fornendo ai propri clienti informazioni sui produttori.

*10. Rispetto dell'ambiente:* le associazioni che promuovono i prodotti CEeS massimizzano l'uso di materie prime da fonti gestite in modo sostenibile, spingendo in particolar modo all'acquisto locale delle materie prime o utilizzando tecnologie di produzione che mirano alla riduzione del consumo di energia da fonti fossili al fine di ridurre l'emissione di gas serra. I produttori di materie prime agricole del commercio equo e solidale riducono al minimo il loro impatto ambientale, utilizzando metodi di produzione biologica e a basso uso di pesticidi ove possibile. Gli acquirenti e gli importatori di prodotti del commercio equo e solidale danno la priorità all'acquisto di prodotti realizzati con materie prime provenienti da fonti gestite in modo sostenibile e che hanno il minor impatto complessivo sull'ambiente.



**Figure 1.1.** I dieci principi del commercio equo e solidale

Sull'esempio della Carta Internazionale dei principi del commercio equo e solidale, a livello nazionale venne sancita la Carta Italiana del Commercio Equo e Solidale, la quale fu approvata alla fine degli anni '90. Ciò permise di iniziare un percorso di confronto tra le organizzazioni del CEeS che negli anni si è sviluppato e approfondito. Questa carta rispecchia i principi della Carta Internazionale del CEeS, descritti precedentemente.

## **1.2. La struttura della rete del CEeS**

Il CEeS è sostanzialmente una relazione paritaria tra tutti i soggetti (certificatori, produttori, trader, distributori e consumatori) che sono coinvolti nelle catene di commercializzazione dei prodotti fair trade. A differenza del commercio tradizionale, il commercio CEeS punta su filiere corte di produzione che consentono la riduzione dei

costi del prodotto finito, che eventuali intermediari comporterebbero (Figura 1.2.). Al fine di rispettare i valori di base del CEeS le organizzazioni hanno adottato la Carta dei Criteri, che definisce gli aspetti etici che le organizzazioni afferenti al CEeS devono adottare [23].



**Figura 1.2.** Catena di commercializzazione dei prodotti Fair trade e del commercio convenzionale

I soggetti della rete del CEeS sono [24-25]:

- 1) *I certificatori.* Il CEeS ha avuto la necessità di adottare un “marchio di garanzia” che vada ad attestare ai consumatori che i prodotti e le organizzazioni che gestiscono il loro commercio, siano rispettose dei valori e dei principi che guidano il commercio equo. Vengono pertanto definiti due differenti tipi di certificazione CEeS: la certificazione di prodotto, che viene utilizzata dalla FLO, e la certificazione delle organizzazioni e della catena logistica, che viene adoperata dalla WFTO. La certificazione dei prodotti CEeS viene attestata da un marchio che certifica il rispetto dei principi etici che sono alla base del commercio equo, ponendo particolare attenzione alle tecniche di produzione e/o distribuzione. Il marchio “FairTrade” (Figura 1.3), detenuto dall’organizzazione Fairtrade International (FLO), caratterizza i prodotti CEeS a livello mondiale.



**Figura 1.3.** Marchio di prodotto “*FairTrade*” detenuto dall’organizzazione FLO

Quest’associazione determina gli standard che devono essere rispettati dalle organizzazioni, affinché si possa ottenere la certificazione o la licenza del marchio da ottenere, e inoltre effettua i controlli e le ispezioni al fine di garantire il rispetto e il mantenimento di tali standard previsti dal sistema di certificazione. Il marchio “*Fairtrade*” ad oggi è applicato a un numero limitato di prodotti, che vedono coinvolti principalmente i prodotti agroalimentari (caffè, tea, cacao, banane, canna da zucchero, etc.), anche se possono includere anche prodotti come cotone, piante e fiori, oro e palloni da calcio [24; 26]. Attualmente il marchio di certificazione è presente su circa 35.000 prodotti, principalmente di origine alimentare, distribuiti in circa 140 Paesi. Tuttavia, molte associazioni sostengono che la certificazione di prodotto mediante marchio FairTrade non sia la scelta ottimale in quanto certificando solo il bene e non l’intera organizzazione del CEEs si dà modo anche alle grandi multinazionali di ottenere la certificazione dei propri prodotti (es. il cioccolato Nestlé), che i consumatori potrebbero interpretare come se la stessa azienda sia attenta ai principi del CEEs. Pertanto, l’appartenenza ad organizzazioni afferenti alla WFTO (organizzazione costituita di più di 450 soci, operanti in più di 70 Paesi) ne garantisce credibilità attraverso un sistema di garanzia internazionale. La WFTO certifica (certificazione delle organizzazioni) tutti gli attori coinvolti (produttori, esportatori, importatori, rivenditori, etc.), che devono adottare concretamente e perseguire i principi del CEEs [21]. A livello nazionale le organizzazioni fanno riferimento all’organizzazione “*Equo Garantito*” (precedentemente detta Assemblea Generale Italiana del Commercio Equo e Solidale; AGICES), che non rappresenta solo la denominazione dell’organizzazione ma anche il logo del CEEs italiano (Figura 1.4.), che consente di distinguere le organizzazioni appartenenti [27].



**Figura 1.4.** Marchio dell'organizzazione nazionale Equo Garantito

Il sistema di controllo che viene applicato da Equo Garantito si articola in tre fasi:

- a) *Autovalutazione*, che è caratterizzata dalla compilazione di un modulo da parte dell'organizzazione italiana che si vuole registrare a Equo Garantito in cui si dichiara di aver e voler rispettare i requisiti della Carta del CEeS.
- b) *Verifica interna*, viene effettuata da un gruppo di valutatori formati dall'associazione, che controlla il modulo presentato dall'organizzazione e la documentazione fornita.
- c) *Verifica esterna*, che prevede la valutazione del rispetto dei principi etici del CEeS da parte dell'Istituto per la Certificazione Etica ed Ambientale (ICEA).

La differenza principale che presentano i due tipi di certificazione è che la certificazione di prodotto effettuata da organizzazione FLO prevede la presenza di un vero e proprio marchio che distingue i prodotti fair trade sul mercato, mentre la certificazione delle organizzazioni, operata dalla WFTO, non certifica i prodotti ma controlla il rispetto dei principi del CEeS da parte delle organizzazioni che ne fanno parte. Tuttavia, nel 2016 la WFTO ha presentato il primo marchio internazionale (Figura 1.5) che consente di distinguere le organizzazioni CEeS a tutti i livelli della catena di approvvigionamento. Ad oggi la WFTO ha conferito tale marchio a 50 organizzazioni e oltre 200 hanno presentato la domanda per la verifica dei requisiti. Pertanto, non tutti i prodotti detengono il marchio FLO ma tuttavia questi possono comunque rientrare nella categoria dei prodotti CEeS, se l'organizzazione detiene il marchio WFTO. Inoltre, i prodotti possono detenere entrambe le certificazioni e quindi entrambi i marchi [24].



**Figura 1.5.** Marchio delle organizzazioni appartenenti alla WFTO

- 2) I *produttori*, che fanno parte del CEEs sono composti da piccole organizzazioni, spesso a conduzione familiare o cooperativa, che sono presenti nelle aree del Sud del mondo come Asia, Africa e America Latina. In particolare, sono costituite da piccole realtà che non hanno le capacità e le possibilità di inserirsi all'interno dei mercati internazionali. I prodotti in questione sono per lo più prodotti di artigianato o agricoli. I produttori, grazie alle organizzazioni del CEEs ottengono aiuti che consentono di migliorare l'organizzazione e lo svolgimento dell' lavoro, come l'assistenza per consentire la coltivazione biologica o per il design di oggetti di artigianato. In cambio di questi aiuti per lo sviluppo delle aziende familiari e /o delle cooperative, i produttori devono rispettare i criteri alla base del CEEs, come condizioni di lavoro decorose, sostenibilità ambientale, etc.
- 3) I *trader*, a cui appartengono sia gli importatori sia gli esportatori. I produttori dei prodotti fair trade possono affidarsi a esperti che li aiutano nella vendita e nell'esportazione dei prodotti, finché non riescono ad acquisire le competenze per svolgere autonomamente tale funzione. Gli esportatori, definiti come *“organizzazioni che acquistano dai produttori [...] e vendono prevalentemente ad organizzazioni di commercio equo e solidale (i cosiddetti importatori)”*, devono impegnarsi:
- a. Promuovere e far conoscere i principi CEEs ai produttori e devono lavorare con questi al fine di applicarli;
  - b. Supportare le organizzazioni di produzione attraverso consulenza, formazione, indagini di mercato etc;
  - c. Fornire ai produttori, se questi lo richiedono, un prefinanziamento affinché questi possano acquistare la merce di cui necessitano oppure aiutandoli con altre forme di assistenza (es. microcredito).
  - d. Fornire informazioni su prodotto, produttori e prezzo corrisposto a quest'ultimi;
  - e. Devono garantire dei rapporti continui e duraturi con i produttori.

La maggior parte dei trader è costituita da importatori che hanno come attività prevalente quella di acquistare i prodotti fair trade direttamente dai produttori o dalle organizzazioni di produzione, per poi rivenderle ai distributori.

Gli importatori possono essere: *aziende* che decidono di acquistare prodotti CEEs, come aziende della grande distribuzione organizzata (GDO) che decidono di

commercializzare alcune di questi prodotti o di utilizzarli come materie prime, o le cosiddette “*centrali di importazione*” (Alternative Trade Organizations – ATOs) ossia organizzazioni specializzate nel CEEs che si occupano di trasferire i prodotti dai Paesi di produzione a quelli di consumo. Le ATOs intrattengono direttamente i rapporti con i produttori da cui acquistano i beni da commercializzare nei Paesi di Consumo. Queste organizzazioni prediligono intrattenere rapporti di lunga durata con i produttori cercando di renderli autonomi e indipendenti sul mercato. Inoltre, le ATOs si impegnano a corrispondere un prezzo equo ai produttori, garantendo pertanto un prezzo minimo che copra i costi di produzione e il pagamento di un prezzo extra (premio), che viene versato dalle organizzazioni ai produttori, i quali decidono in autonomia come spenderlo, per esempio per beni e servizi per la comunità, scuole, ambulatori, etc.

4) I *distributori* sono tutte quelle organizzazioni che sono incaricate di vendere i prodotti del commercio equo nei Paesi industrializzati. Per la maggior parte i distributori dei prodotti fair trade sono le “Botteghe del Mondo”, a queste negli ultimi giorni si sono aggiunti negozi e le catene della GDO. Tuttavia, le Botteghe del Mondo rappresentano il fulcro della vendita del CEEs, in quanto non rappresentano solo un punto vendita dei prodotti fair trade, ma hanno anche lo scopo di sensibilizzare ed informare il consumatore sui principi etici adottati dal CEEs e sulle nuove iniziative intraprese nel commercio equo. La Carta dei Criteri del Commercio equo e solidale stabilisce dei vincoli che devono essere rispettati per la vendita dei prodotti nelle Botteghe del Mondo:

- a. Commercializzare prevalentemente prodotti del commercio equo e solidale;
- b. Non intraprendere relazioni commerciali con aziende che violino diritti umani e dei lavoratori, scegliendo i fornitori organizzati in strutture no-profit;
- c. Fornire materiale informativo (es. schede del prezzo trasparente);
- d. Mantenersi informati sui prodotti venduti per assicurarsi che vengano rispettati i criteri del CEEs.

5) i *consumatori* giocano un ruolo fondamentale nel commercio CEEs in quanto consentono, grazie all’acquisto consapevole ed informato di beni fair trade, di contribuire alla riduzione del divario tra Sud e Nord del mondo.

## **CAPITOLO II**

### **MERCATO DEGLI ALIMENTI E BEVANDE NERVINE**

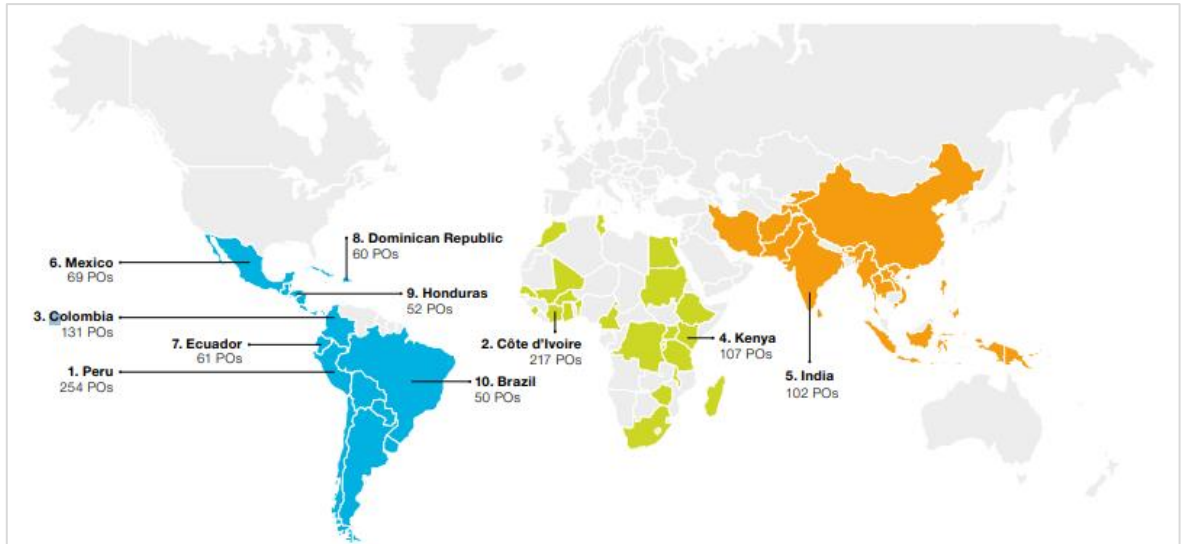
Il mercato mondiale degli alimenti nervini (cioccolato, tè e caffè) è di particolare interesse per l'economia politica internazionale, in quanto vede coinvolti Paesi produttori poveri e sottosviluppati, che sono strettamente legati ai cambiamenti delle condizioni di mercato, che vanno ad influenzare i prezzi di questi prodotti e le loro esportazioni, determinando così un grosso impatto sui redditi, occupazione e condizioni di vita. Inoltre, il mercato di questi prodotti è da sempre il mercato di materie prime più instabile a livello mondiale, che presenta rapide e imprevedibili variazioni dei prezzi a breve termine con conseguente instabilità dei profitti dei Paesi produttori [28-29]. Questi prodotti alimentari hanno la caratteristica comune che la loro produzione è incentrata nelle mani di poche grandi multinazionali, le quali influenzano la definizione dei prezzi di queste materie prime. Pertanto, la tendenza d'acquisto di prodotti nervini di nicchia e di qualità, come quelli a marchio biologico, fair trade o monorigine, rappresenta ad oggi una nuova sfida che il mercato economico si appresta ad affrontare, ma anche un'opportunità di miglioramento della loro produzione e del loro commercio. Ed è proprio a questa "nuova sfida" che i produttori e le industrie di trasformazione di questi prodotti cercano di rispondere. Difatti, la domanda che ad oggi i consumatori pongono è incentrata sempre più su prodotti "innovativi" che allo stesso tempo siano accettabili dal punto di vista economico, sensoriale, salutistico e che rispettino valori etici e ambientali. Il consumo degli alimenti nervini si è andato accrescendo in risposta ai cambiamenti della domanda sul mercato di questi prodotti, tuttavia gli eventi degli ultimi anni, causati dalla pandemia di Covid-19 e dalla più recente guerra in Ucraina, hanno influenzato notevolmente le importazioni ed esportazioni di questi prodotti.

#### **2.1. Mercato dei prodotti Fair trade**

Il commercio dei prodotti Fair Trade è nato per permettere di aumentare le opportunità di sviluppo per i produttori e i lavoratori del Sud del mondo, grazie alla possibilità di consentire l'accesso dei loro prodotti sui mercati mondiali. Pertanto, la creazione di una

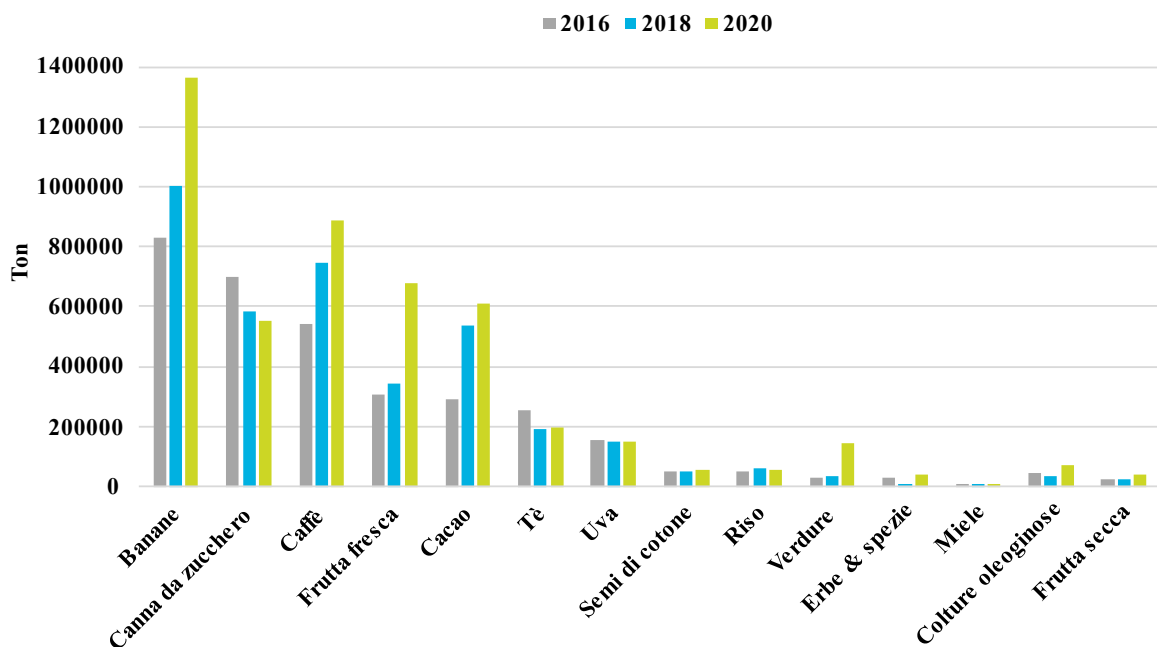
rete sociale che condivide i principi del commercio equo e solidale consente di sensibilizzare i consumatori, permettendo in questo modo di instaurare un rapporto di fiducia tra produttori e consumatori apportando simultaneamente benefici per le comunità del Sud. Ciò ha determinato una crescente consapevolezza nei Paesi del Nord del mondo delle condizioni e delle pratiche ingiuste che sono spesso attuate nel commercio tradizionale. Il sostegno delle organizzazioni del CEEs da parte dei consumatori ha contribuito alla diffusione di questo movimento in tutto il mondo. Il commercio equo e solidale è costituito da circa 1,9 milioni di agricoltori e produttori in tutto il mondo. Nel 2020 il CEEs contava di ben 1.880 organizzazioni di produttori Fairtrade certificati in oltre 71 Paesi. Tra i maggiori prodotti certificati Fairtrade, il più alto numero di organizzazioni di produttori nel 2018 era presente nel commercio di caffè (758 mila produttori), ossia circa il 43% di tutte le organizzazioni nel sistema Fairtrade, seguito da tè (22%), cacao (18%), piante e fiori (4%), cotone (3%), zucchero (3%) e banane (2%). Caffè, tè e cacao sono i prodotti più significativi in termini di numero di agricoltori e lavoratori coinvolti, essi rappresentano l'83% di tutti i lavoratori del sistema Fairtrade. Infatti, i sette principali prodotti del commercio equo e solidale rappresentano il 93% di tutti i lavoratori coinvolti nella produzione di prodotti certificati Fairtrade, di questi il 23% è rappresentato da donne. L'aumento netto delle organizzazioni dal 2017 al 2018 al 4%, è notevolmente inferiore rispetto a quello dell'anno 2015- 2016, che era pari a circa il 13%. Confrontando il 2016 con i livelli del 2012, il numero di organizzazioni di produttori che possiedono la certificazione Fairtrade è aumentato del 24%. Questo si è scomposto in un aumento del 15% delle piccole organizzazioni di piccoli produttori Fairtrade e un 8% aumento delle organizzazioni di lavoratori assunti. L'Africa e il Medio Oriente avevano organizzazioni di produttori in 29 Paesi; Asia e Pacifico in 20 Paesi e in America Latina e nei Caraibi in 24 Paesi. La maggior parte delle organizzazioni di produttori del commercio equo e solidale si trova in America Latina e nei Caraibi (824 organizzazioni di produttori), che rappresentano il 52% di tutte le organizzazioni di produttori Fairtrade in tutto il mondo, seguite da Africa e Medio Oriente ossia il 36% (597 organizzazioni di produttori) e Asia e Pacifico ossia il 16% (268 organizzazioni di produttori) (Figura 2.1) [2; 26].





**Figura 2.1.** Paesi produttori di prodotti certificati Fairtrade per numero di organizzazioni di produttori nel 2018 [30]

In Figura 2.2. sono riportate le quantità (tonnellate) di prodotti certificati nel 2020. Tra gli alimenti maggiormente prodotti vi sono le banane con 1,3 milioni di tonnellate prodotte nel 2020, a cui fa seguito il caffè (889589 ton), frutta fresca (677339 ton), il cacao (609047 ton), la canna da zucchero (550647 ton) e il tè (196712 ton) [21].



**Figura 2.2.** Produzione di alimenti del commercio equo e solidale nel 2020.

Le variazioni (Tabella 2.1.) della produzione dei prodotti Fairtrade, che sono avvenute dal 2016 al 2020, sono dovuti a una combinazione di fattori, compresi i cambiamenti nelle certificazioni delle organizzazioni di produttori così come i cambiamenti nel numero di agricoltori nel sistema CEES. Inoltre, c'è stata una crescita significativa nella produzione certificata Fairtrade di alcuni prodotti, prodotti in minore quantità, in particolare verdure, riso, semi oleosi e oleaginose, frutta secca, noci, frutta fresca e succhi di frutta. Nel caso delle verdure, l'aumento rispetto all'anno precedente è dovuto principalmente alla crescita dei produttori in Messico. Per il riso, l'aumento è dovuto principalmente alla crescita dei produttori certificati in Thailandia e in India. A livello mondiale la produzione di alimenti certificati Fairtrade consuma 2,3 milioni di ettari. In Figura 2.3. è riportata la quantità di ettari adoperata per la produzione delle colture coinvolte nel commercio equo e solidale. Tra i prodotti Fairtrade quelli che usano una maggiore quantità di terreno sono il cacao (1178644 ha), il caffè (961774 ha), la canna da zucchero (149738 ha) e il tè (136453 ha). Nel 2018 il terreno adoperato per la produzione di cacao e piante e fiori ha visto un aumento dell'11%, per il cotone da semina del 10% e per il tè del 3% [31].

**Tabella 2.5.** Produzione (tonnellate) di prodotti a marchio Fairtrade e relativa variazione percentuale

<i>Prodotti</i>	<i>2016</i>	<i>2018</i>	<i>2020</i>	<i>Variazione % rispetto all'anno 2016</i>	<i>Variazione % rispetto all'anno 2018</i>
<i>Banane</i>	830951	1005041	1365076	64%	36%
<i>Canna da zucchero</i>	701521	584878	550647	-22%	-6%
<i>Caffè</i>	541254	745516	889589	64%	19%
<i>Frutta fresca</i>	309089	342572	677339	119%	98%
<i>Cacao</i>	291917	536556	609047	109%	14%
<i>Tè</i>	253870	189765	196712	-23%	4%
<i>Uva</i>	155100	147456	148746	-4%	1%
<i>Semi di cotone</i>	48047	48838	54840	14%	12%
<i>Riso</i>	50053	58925	53972	8%	-8%
<i>Verdure</i>	28132	32397	143085	409%	342%
<i>Erbe &amp; spezie</i>	30299	6876	38992	29%	467%
<i>Miele</i>	7551	6399	10450	38%	63%
<i>Colture oleaginose</i>	46312	32580	72272	56%	122%
<i>Frutta secca</i>	23104	23338	40630	76%	74%








Mentre, per quanto riguarda le banane, zucchero di canna e caffè si è vista una diminuzione del terreno adoperato per queste colture. Inoltre, bisogna tenere in considerazione che spesso i produttori coltivano più di un prodotto certificato Fairtrade, che può essere piantati insieme sullo stesso terreno [24].



**Figura 2.3.** Area di coltivazione (ha) dei prodotti Fairtrade nel 2018 [30]

Affinché i produttori possano beneficiare nel modo più efficace dal commercio equo e solidale, hanno bisogno di vendere una parte dei loro prodotti certificati a condizioni eque e solidali. I volumi di vendita dei produttori a condizioni Fairtrade sono indicati nella Figura 2.4. Negli ultimi anni, la pandemia da Covid-19 e i crescenti effetti del cambiamento climatico stanno evidenziando sempre più le disuguaglianze sistematiche che esistono nel commercio globale. Gli avvenimenti degli ultimi anni hanno portato i produttori ad affrontare nuove sfide logistiche e di trasporto, sia nel Paese di produzione sia per il trasporto in Paesi importatori. Il prodotto certificato Fairtrade maggiormente venduto sono le banane, che hanno visto raggiungere l'apice delle vendite nel 2019, mentre negli ultimi anni si è vista una considerevole crescita della vendita di banane biologiche a marchio Fairtrade (63% del totale di banane vendute con il CEEs). Le guerre dei prezzi in alcuni mercati, in particolar modo dovute alle perturbazioni legate al COVID-19, hanno portato alla diminuzione dell'approvvigionamento, distribuzione e

consumo di questi prodotti a marchio CEES. I principali mercati per le banane Fairtrade nel 2020 sono stati Regno Unito, Germania, Francia, Svizzera e Paesi Bassi [21; 27].

PRODUCT	VOLUME	UNIT <sup>1</sup>	CONVENTIONAL	ORGANIC	FAIRTRADE PREMIUM EARNED
 Bananas	738,874	MT	37%	63%	€35.84 million
 Cocoa (Cocoa bean)	175,412	MT	78%	22%	€37.09 million
 Coffee (Green bean)	226,338	MT	34%	66%	€86.31 million
 Cotton (Cotton lint)	11,759	MT	44%	56%	€1.66 million
 Flowers and Plants	943,859	1,000 items	100%		€7.25 million
 Sugar (Cane sugar)	120,230	MT	72%	28%	€6.81 million
 Tea ( <i>Camellia sinensis</i> )	8,341	MT	60%	40%	€4.40 million

**Figura 2.4.** Volumi di vendita dei 7 principali prodotti venduti dai produttori a marchio Fairtrade nel 2020

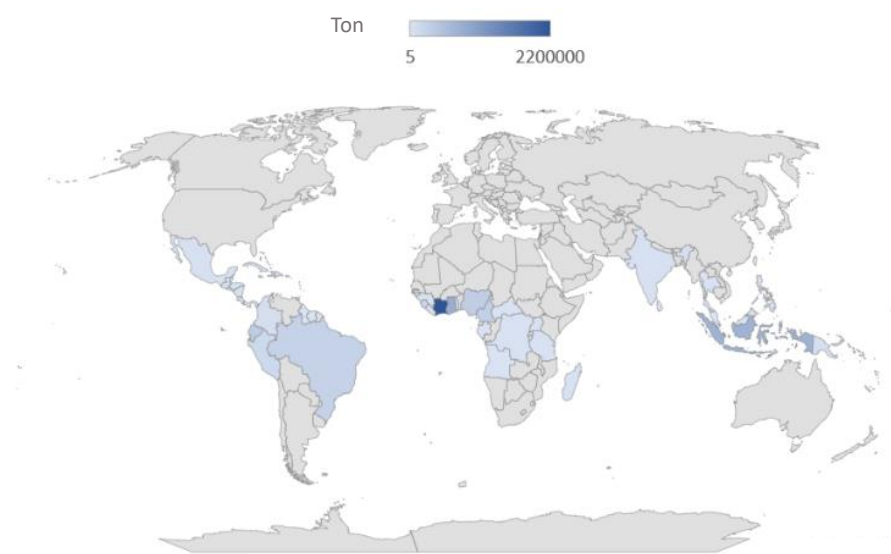
Altro prodotto altamente venduto con certificazione Fairtrade è il cacao, che ha avuto un forte anno nei mercati dei consumatori anche se, paradossalmente, le vendite dei produttori sono diminuite del 30% nel 2020. Dopo molti anni di scorte apparentemente elevate di cacao Fairtrade nella catena di approvvigionamento, la situazione si è invertita, in parte a causa dell'indebolimento della domanda durante la pandemia e in parte come risultato del nuovo prezzo minimo definito per i prodotti Fairtrade. Alcuni partner commerciali hanno smesso di acquistare a condizioni Fairtrade e altri hanno ridotto le loro scorte. Italia, Stati Uniti, Austria e Belgio sono esempi di mercati con una forte crescita nelle vendite di prodotti finiti di cacao nel 2020, che vanno dal 26 al 37% di crescita. Il terzo prodotto Fairtrade per volume di vendita a livello mondiale è il caffè. Le vendite di questo prodotto sono rimaste stabili nonostante le perturbazioni legate alla situazione pandemica mondiale. Tuttavia, le restrizioni di questo periodo legate all'uso dei mezzi di trasporto ne ha limitato il consumo e la vendita nei Paesi consumatori, colpendo gravemente la domanda (riduzione di circa il 90% di caffè Fairtrade nel 2020), anche se in qualche modo è stato compensato dalle vendite nei supermercati. Ad oggi, le vendite di caffè Fairtrade "fuori casa" si stanno lentamente riprendendo. I mercati principali per il caffè Fairtrade nel 2020 sono stati Germania, Regno Unito, Stati Uniti, Canada e Francia [2; 26; 30].

Anche se il settore della moda ha subito una massiccia battuta d'arresto a causa della pandemia, le vendite di cotone dei produttori Fairtrade sono cresciute di circa 11% nel 2020. Dopo la pandemia, la sostenibilità dovrebbe essere un argomento importante per la

moda e tutto il settore tessile. Tre quarti di tutto il cotone Fairtrade proviene dall'India nel 2020. Durante il periodo pandemico, i maggiori mercati per il cotone Fairtrade sono stati Germania e Francia. Stiamo anche assistendo a una costante espansione delle vendite di cotone Fairtrade nei mercati della Norvegia e Austria, indicando un crescente interesse per il cotone equo e solidale. Come prodotti freschi, i fiori e le piante Fairtrade devono essere esportati e venduti sul mercato abbastanza rapidamente. Nel 2020, le vendite dei produttori sono rimaste quasi stabili, diminuendo solo del 2%, nonostante le enormi sfide logistiche dovute alle restrizioni della pandemia. I produttori di fiori del commercio equo e solidale hanno mostrato resilienza durante un periodo molto difficile nella primavera del 2020, quando le esportazioni si sono fermate. I principali mercati per i fiori e le piante Fairtrade nel 2020 sono stati Germania, Regno Unito, Svizzera, Svezia e Finlandia, mentre la crescita più significativa è stata registrata in Germania, Austria, Svezia e Francia. Altro prodotto rilevante come volume di vendita è lo zucchero di canna, che registra una diminuzione delle vendite rispetto all'anno precedente. Ad aggravare le sfide legate alla pandemia, gli eventi meteorologici legati al clima hanno colpito duramente i produttori di zucchero in America centrale e le Fiji sono state devastate dal ciclone tropicale Yasa a dicembre. Nonostante ciò, le vendite al dettaglio di zucchero Fairtrade sono cresciute nel 2020, probabilmente riflettendo la preparazione di pasti in casa e il consumo durante la chiusura delle attività ristorative durante la pandemia. Il Regno Unito, gli Stati Uniti e la Germania sono in cima alla lista delle vendite. Le vendite di tè dei produttori sono cresciute del tre per cento nel 2020, uno sviluppo positivo che riflette l'aumento del consumo e degli acquisti di tè Fairtrade durante i periodi di chiusura. In molte regioni di produzione, le chiusure e i requisiti di salute e sicurezza sul posto di lavoro hanno avuto un impatto sulla stagione del raccolto. Anche se non tutti i mercati hanno visto una crescita nel 2020, i maggiori mercati per il tè Fairtrade sono stati il Regno Unito, Norvegia, Svizzera, Germania e Paesi Bassi [2], [21].

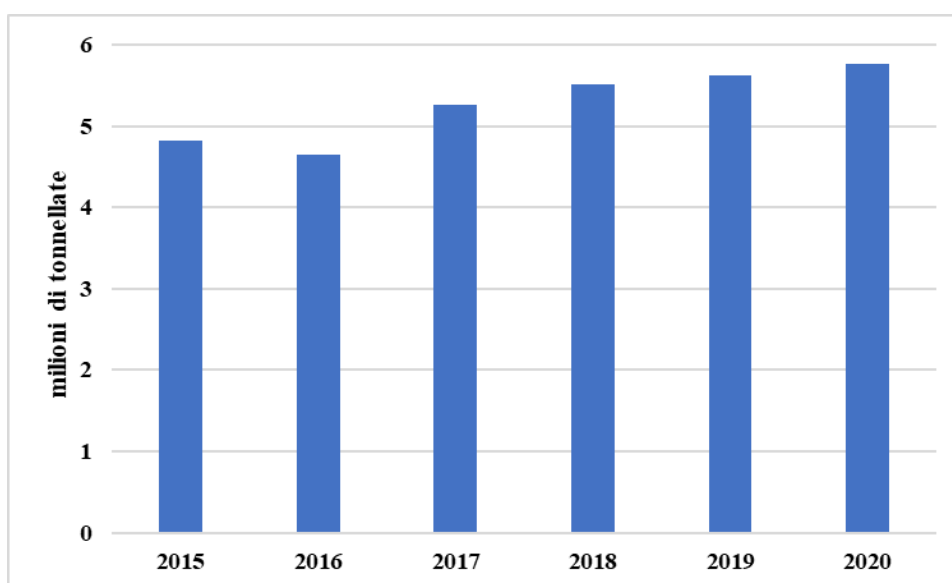
## **2.2. Mercato del cioccolato**

Il cacao viene prodotto nei Paesi che si trovano nelle regioni tropicali, in particolar modo nella fascia territoriale che si distribuisce intorno all'equatore; pertanto, questi territori prendono il nome di "cintura del cacao" e di cui fanno parte alcuni Paesi dell'Africa, America Latina e del Sud-Est Asiatico (Figura 2.5.). Questi Paesi sono caratterizzati tutti da condizioni pedoclimatiche ottimali di crescita della pianta del cacao: clima caldo e umido, con abbondanti piogge [32].



**Figura 2.5.** Principali Paesi produttori di cacao nel mondo

La produzione mondiale di fave di cacao nel 2020 è stata pari a circa 5,7 milioni di tonnellate. Dal 2015 al 2020 (Figura 2.6.) vi è stato un incremento di circa il 20% della produzione di cacao. Il 68% della produzione di cacao viene prodotta in Africa, a cui fa seguito il Sud America (17%), l'Asia (14%) e l'Oceania (1%).



**Figure 2.6.** Produzione mondiale di cacao dal 2015 al 2020

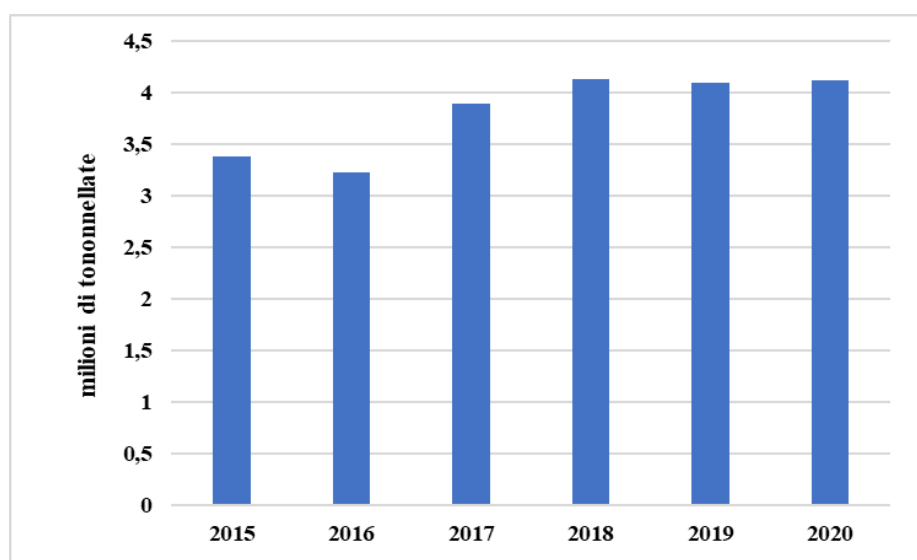
Nel 2020 i principali Paesi produttori di fave di cacao sono la Costa d'avorio che rappresenta circa il 38,2% della produzione mondiale, Ghana (13,9%), Indonesia (12,8%), Nigeria (5,9%), Ecuador (5,7%), Cameroon (5,0%), Brasile (4,5%), Sierra

Leone (3,35%), Perù (2,8%), Repubblica Dominicana (1,3%) e Colombia (1,1%) [31], [33]. Nella Tabella 2.2. sono riportate le tonnellate di fave di cacao prodotte dal 2015 al 2020 dai principali Paesi produttori.

**Tabella 2.2.** Tonnellate di fave di cacao prodotte dal 2015 al 2020

Paesi	Anno					
	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Costa D'Avorio	1796000	1634000	2034000	2113189	2235043	2200000
Ghana	858720	858720	969300	904700	811700	800000
Indonesia	593331	656817	590684	767280	774195	739483
Nigeria	302066	298029	325000	340000	348448	340163
Ecuador	180192	177551	205955	235182	283680	327903
Cameroon	310000	211000	246200	249900	280000	290000
Brasile	278299	213871	235809	239318	259451	269731
Sierra Leone	12000	47705	48903	50150	14648	193156
Perù	92592	107922	121814	134676	141775	160289
Repubblica Dominicana	75500	81246	86599	85991	76113	77681
Colombia	54798	56785	89282	97978	102154	63416

A livello mondiale, nel 2020, l'export di fave di cacao ammonta a circa 4,1 milioni di tonnellate (Figure 2.7.) [33-34]. In Tabella 2.3. sono riportate le tonnellate di fave di cacao esportate dagli 11 principali Paesi produttori.



**Figura 2.7.** Tonnellate di fave di cacao esportate a livello mondiale dal 2015 al 2020.

Il mercato delle esportazioni è prevalentemente rappresentato dalla Costa D'Avorio, con circa 1,6 milioni di tonnellate esportate nel 2020 e rappresenta circa il 39,7% dell'export

di fave di cacao, a cui fa seguito il Ghana (12,6%), Ecuador (7,9%), Cameroon (7,6%), Nigeria (5,3%) e Indonesia (5,1%). I Paesi del continente africano sono preponderanti nella determinazione dei flussi di esportazione, anche se i loro scambi prevedono il commercio prevalentemente di fave di cacao grezze [35].

**Tabella 2.3.** Esportazione di fave di cacao dal 2015 al 2020 per gli 11 principali Paesi produttori.

Paesi	Anno					
	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Costa d'Avorio	1285988	1055636	1510082	1525594	1621749	1636378
Ghana	572624	581375	573334	843641	643643	520470
Indonesia	39622	28329	24112	27827	30835	210634
Nigeria	200000	227495	292872	294661	300472	216676
Ecuador	236072	227214	284546	294063	270943	323399
Cameroon	237380	263746	221667	218792	311537	312912
Brasile	6831	389	754	616	491	633
Sierra Leone	16000	11707	37240	14745	16176	20082
Peru	59132	61888	58238	61970	59857	53685
Repubblica Dominicana	79597	73712	53975	73890	67853	64685
Colombia	13744	10449	11876	7056	9116	11148

Le fave di cacao una volta raccolte e messe in sacchi vengono vedute ai Paesi industrializzati, dove sono lavorate, per generare prodotti semilavorati (cacao, burro di cacao e liquor) che saranno a loro volta oggetto di transazione, fino a raggiungere le industrie e le ditte artigianali che li trasformeranno in prodotti finiti, a contenuto più o meno ricco di cacao. Il mercato del cacao, inteso come derrata di base non lavorata, ammonta a circa 2,1 miliardi di dollari, mentre quello dei prodotti alimentari finali, contenenti più o meno cioccolata, sarebbe di ben 130 miliardi [35].

A livello mondiale nel 2020 sono state importate 3,9 milioni di tonnellate e il principale Paese importatore di fave di cacao non lavorate è rappresentato dai Paesi Bassi, che detiene circa il 26% delle importazioni globali (987900 tonnellate importate nel 2020). Gli altri Paesi importatori di questa materia prima non lavorata sono Germania (11,41%), Malesia (9,93%), Stati Uniti (9,73%), Belgio (7,21%), Indonesia (5,13%) e Francia (4,12%). L'Italia a livello mondiale è l'undicesimo Paese per quantità di fave importate, che ammonta a circa 99550 tonnellate nel 2020 [33].



Nella Tabella 2.4. viene riportata la variazione della quantità di fave di cacao grezze importate dai principali Paesi dal 2015 al 2020. Dai dati riportati si evidenzia una significativa polarizzazione, anche a livello geografico: da una parte vede coinvolto il continente africano, che rappresenta il grosso della produzione, mentre dall'altra parte pochi Paesi effettuano la trasformazione e la valorizzazione della materia prima in prodotti semilavorati e pronti al consumo. I Paesi Bassi e la Costa d'Avorio sono stati i due maggiori Paesi trasformatori di fave di cacao in tutto il mondo [33; 35].

**Tabella 2.4.** Quantità (ton) di fave di cacao importate dai principali Paesi trasformatori (2015-2020)

Paesi	Anno					
	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Paesi Bassi	369457	860596	993345	1157150	1080267	987900
Germania	397420	435525	448744	469618	469488	441883
Malesia	222134	213841	311519	345489	351493	384682
Stati Uniti	478999	421198	470258	415272	375536	377074
Belgio	245587	304482	320274	233636	280930	279495
Indonesia	53372	61016	246084	239377	243318	198838
Francia	133344	148844	142091	155910	156765	159488
Turchia	84888	86985	103371	97610	107483	137470
Gran Bretagna	57769	41891	105452	113525	101353	116462
Canada	68346	60102	69288	100442	91020	104470
Italia	96461	93667	100242	98406	99160	99550
Spagna	105782	110659	123663	99990	101667	97535
Singapore	81919	86457	83955	90006	90797	85392

. Nell'anno fiscale 2020/21, la Costa d'Avorio ha lavorato circa 620.000 tonnellate di fave di cacao. Il mercato globale della lavorazione del cacao è stato valutato a circa 12,4 miliardi di dollari nel 2020 e si prevede che raggiungerà i 14,6 miliardi di dollari entro il 2027. Solo in Europa nel 2021 sono state lavorate quasi 1,46 milioni di tonnellate di fave di cacao. Nella campagna 2021-2022, l'Africa ha rappresentato circa il 21% di tutti i Paesi che effettuavano la trasformazione delle fave di cacao nel mondo, mentre l'Europa rappresentava la quota maggiore, con circa il 36% di fave di cacao trasformate. In Tabella 2.5. sono riportati, per area geografica, i dati di import ed export dei prodotti semilavorati delle fave di cacao e del prodotto finito per l'anno 2020. I primi quattro Paesi responsabili della produzione mondiale di cioccolato sono Germania, Belgio, Italia e Polonia. Questi

quattro Paesi rappresentano oltre il 40% delle esportazioni totali di cioccolato del mondo. È interessante notare che nessuno dei principali produttori di cioccolato è esso stesso una delle principali fonti di cacao, né i principali Paesi produttori di fave di cacao sono anche importanti centri di produzione di cioccolato. A livello mondiale la Germania è il primo Paese esportatore di cioccolato nel 2020, con un valore di mercato pari a 4,96 miliardi di dollari e rappresenta il 17% delle esportazioni mondiali di cioccolato. Altro Paese europeo che si è distinto sul mercato mondiale per l'esportazione di cioccolato sono i Paesi Bassi, i quali, grazie anche all'enorme tradizione cioccolatiera, hanno rappresentato l'11% della quota di esportazione di questo prodotto sul mercato mondiale, corrispondente a un valore di 3,1 miliardi di dollari. Ai Paesi Bassi fanno seguito l'Italia, che ha esportato cioccolato per un valore di 2,1 miliardi di dollari (7% esportazioni mondiali di cioccolato nel 2020) e la Polonia che rappresenta circa il 7% delle esportazioni mondiali di cioccolato, per un valore di 2 miliardi di dollari [31; 33].

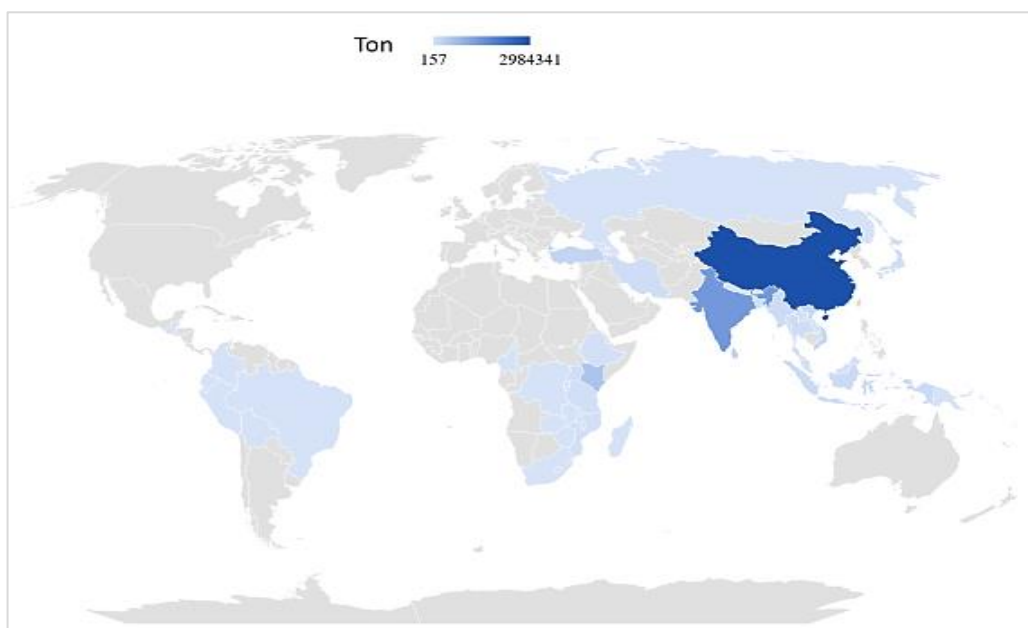
**Tabella 2.5.** Importazione di prodotti semilavorati derivati dalla macinazione delle fave di cacao e del prodotto finito nelle differenti aree Geografiche per l'anno 2020.

<b>Import (ton)</b>								
<b>Aree geografiche</b>	<b>Burro di cacao</b>	<b>%</b>	<b>Liquor</b>	<b>%</b>	<b>Polvere di cacao</b>	<b>%</b>	<b>Cioccolato</b>	<b>%</b>
Africa	7679	0,79	8894	1,03	63035	4,99	170302	2,76
Nord America	126482	12,98	104886	12,09	179304	14,18	845163	13,70
Centro America	466	0,05	1186	0,14	22828	1,81	80285	1,30
Sud America	14149	1,45	12330	1,42	87007	6,88	90094	1,46
Asia	96854	9,94	99111	11,43	353007	27,92	1138367	18,45
<i>Europa</i>	705565	72,42	621958	71,70	537572	42,52	3722513	60,34
Oceania	22896	2,35	18431	2,12	19929	1,58	112230	1,82
<b>Mondo</b>	<b>974301</b>		<b>867454</b>		<b>1338295</b>	-	<b>6169730</b>	-
<b>Export (ton)</b>								
<b>Aree geografiche</b>	<b>Burro di cacao</b>	<b>%</b>	<b>Liquor</b>	<b>%</b>	<b>Polvere di cacao</b>	<b>%</b>	<b>Cioccolato</b>	<b>%</b>
Africa	172586	17,29	377755	43,14	262406	19,61	106482	1,69
Nord America	29813	2,99	22573	2,58	40744	3,04	672711	10,70
Centro America	572	0,06	45	0,01	651	0,05	208966	3,32
Sud America	45491	4,56	30037	3,43	43594	3,26	61237	0,97
Asia	303440	30,40	39176	4,47	403776	30,17	681978	10,84
<i>Europa</i>	445383	44,61	405930	46,36	586638	43,83	4493683	71,46
Oceania	58	0,01	21	0,00	344	0,03	61546	0,98
<b>Mondo</b>	<b>998304</b>	-	<b>875647</b>	-	<b>1264213</b>	-	<b>6288641</b>	-

Tuttavia, gli avvenimenti degli ultimi anni, come la pandemia da Covid-19 e la più recente guerra in Ucraina, hanno comportato variazioni sull'andamento del mercato mondiale di cacao e dei suoi prodotti derivati. I due principali Paesi coinvolti nella guerra, Federazione Russa e l'Ucraina, svolgono un ruolo cardine nell'economia mondiale in quanto entrambi sono i principali esportatori di materie prime (petrolio greggio, gas naturale, diversi minerali metallici, ecc.) e sono attori importanti nel settore agricolo mondiale (grano, fertilizzanti, olio alimentare, ecc.). L'arresto o addirittura la riduzione delle esportazioni di una di queste materie alimenterà l'inflazione su scala globale che si sommerà all'inflazione risultante dalle interruzioni della catena di approvvigionamento ancora causate dalla pandemia di COVID-19. Tuttavia, ad oggi, è ancora difficile valutare l'impatto economico e finanziario del conflitto, in quanto non si sa quanto durerà, quando le attuali sanzioni saranno revocate e se verranno imposte altre sanzioni. Questi tragici eventi e le loro ricadute economiche globali avranno un impatto anche sul mercato mondiale del cacao. Infatti, i principali trasformatori di cacao e marchi di cioccolato hanno attività in questi due Paesi, e pertanto sarà difficile prevedere l'impatto sul funzionamento delle strutture industriali, i potenziali danni e, naturalmente, la sicurezza del personale di queste società. Pertanto, si prevede che l'importazione di fave di cacao e semilavorati di cacao in Ucraina (40.000 tonnellate in semilavorati di cacao nel 2020/21) e nella Federazione Russa (165.000 tonnellate in semilavorati di cacao) diminuirà nel resto del biennio 2021-2022. In Ucraina, il conflitto sta compromettendo la sicurezza di qualsiasi attività economica. Inoltre, l'interruzione dell'alimentazione e vari problemi logistici rendono ancora più impegnativo qualsiasi processo di produzione. Nella Federazione Russa il deprezzamento del rublo da un lato e le sanzioni applicate ad alcune parti del sistema bancario russo dall'altro potrebbero ridurre la domanda di cacao, in quanto il pagamento dei contratti di importazione sarebbe difficile; e creare grandi legami incerti per i trasformatori di cacao e le aziende produttrici di cioccolato. Quindi si prevede che il conflitto avrà ricadute economiche su tutta la produzione di fave di cacao e dei suoi prodotti finiti [36].

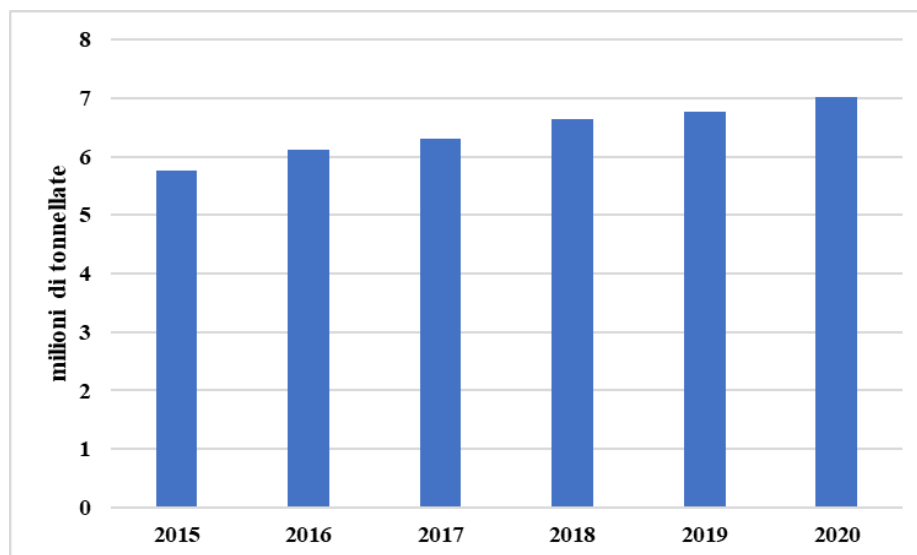
### **2.3. Mercato del tè**

Il tè, così come gli altri alimenti nervini, viene prodotto principalmente in zone tropicali. La pianta è quindi largamente coltivata in ambienti tropicali, caratterizzati da stagioni di piogge torrenziali. I principali Paesi produttori di tè si concentrano nel continente Asiatico, Africano e in America Latina (Figura 2.8).



**Figura 2.8.** Principali Paesi produttori di tè al mondo (2020)

Il mercato del tè è caratterizzato principalmente dal tè nero che detiene una quota importante del mercato. Tuttavia, la crescita del mercato del tè, negli ultimi anni stima sia dovuta alla maggiore domanda di tè verde e a base di erbe o aromatizzato dovuto alla maggiore consapevolezza dei benefici per la salute associati al loro consumo. La produzione di tè è molto sensibile ai cambiamenti delle condizioni climatiche, poiché il tè può essere prodotto solo in condizioni agro-ecologiche ben definite. A livello mondiale la produzione di tè nel 2020 ammontava a circa 7,0 milioni di tonnellate con un valore di 207,1 miliardi di dollari. Dal 2015 ad oggi la produzione di tè ha visto un incremento della prodizione di circa il 22% (Figura 2.9.). Tra i Paesi che produttori che hanno inciso notevolmente sulla produzione mondiale di tè nel 2020, sono stati Cina, che rappresenta oltre il 40% della produzione mondiale di questo alimento, India (20,28%), Kenya (8,11%), Argentina (4,77%), Sri Lanka (3,96%), Turchia (3,63%), Vietnam (3,42%) e Indonesia (1,97%) [33; 37].



**Figura 2.9.** Produzione di tè a livello mondiale dal 2015-2020

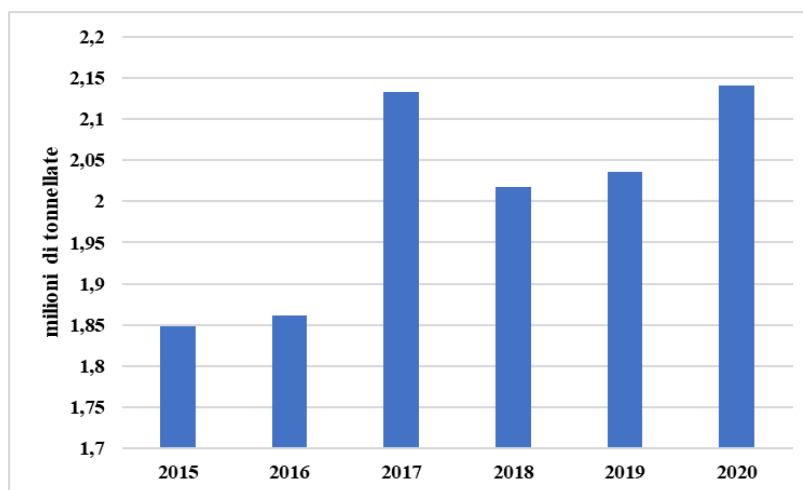
Nella Tabella 2.6. sono riportate le tonnellate di tè prodotte dal 2015 al 2020 dai principali Paesi produttori.

**Tabella 2.6.** Tonnellate di tè prodotte per Paese dal 2015-2020

Paesi	Anno					
	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<b>Cina</b>	2291405	2326018	2473843	2625138	2791837	2984341
<b>India</b>	1233140	1250490	1325050	1338630	1390080	1424662
<b>Kenya</b>	399100	473000	439857	492990	458850	569500
<b>Argentina</b>	82492	382618	366159	369613	375115	335225
<b>Sri Lanka</b>	317967	292574	307720	303840	300120	278489
<b>Turchia</b>	239028	243000	234000	270000	261000	255183
<b>Viet Nam</b>	236000	240000	260000	270000	234052	240493
<b>Indonesia</b>	132615	144015	146251	140237	128724	138323
<b>Myanmar</b>	100150	102404	104746	143571	132494	126486
<b>Tailandia</b>	49054	65101	78425	93084	96537	97697
<b>Bangladesh</b>	66101	64500	81850	78150	90685	89931
<b>Iran</b>	196957	121771	100580	99245	90832	84683

La pandemia di COVID-19 ha avuto un impatto diretto e sfavorevole sul mercato del tè a livello globale. I lockdown globali per frenare e contenere la pandemia hanno influenzato negativamente i canali di distribuzione, comportando una riduzione della disponibilità dei prodotti finali sul mercato. L'industria del tè è un'industria ad "alta intensità di lavoro", ossia che necessita più manodopera coinvolta nel processo di coltivazione e lavorazione del tè. Le forti restrizioni del periodo pandemico hanno

coinciso con i periodi di raccolta delle foglie di tè, influenzandone non solo la produzione, ma anche la qualità del prodotto finito. A livello mondiale nel 2020 sono state esportate circa 2,1 milioni di tonnellate di tè, per un valore di circa 8,1 miliardi di dollari. Il principale esportatore di tè è il Kenya che con 5,6 milioni di tonnellate esportate nel 2020 rappresenta il 26,89% del mercato delle esportazioni di tè (Figura 2.10) [33; 38].

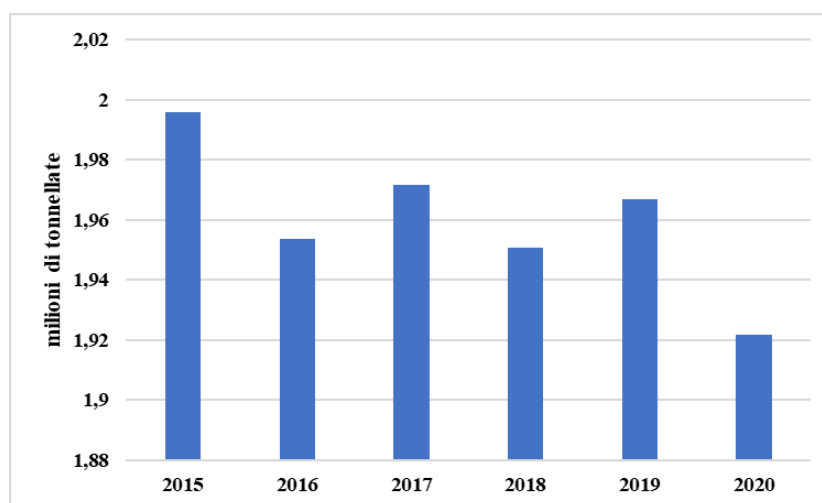


**Figura 2.10.** Tonnellate di tè esportate nel 2020 a livello mondiale

Altri grandi Paesi esportatori di tè a livello mondiale sono la Cina (16,90%), lo Sri Lanka (13,32%), l'India (9,83%), Viet Nam (5,91%) e l'Uganda (3,39%). In Tabella 2.7. sono riportate le tonnellate di tè esportato dal 2015 al 2020 per i 10 principale Paesi esportatori. Nel 2020, le importazioni di tè sono state pari a 1,9 milioni di tonnellate per un valore di 6,8 miliardi di dollari (Figura 2.11).

**Tabella 2.7.** Tonnellate di tè esportato dal 2015 al 2020

Paesi	Anno					
	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<b>Kenya</b>	298529	302532	467024	500591	475997	575509
<b>Cina</b>	331751	336618	367585	380992	385783	361800
<b>Sri Lanka</b>	304835	286760	286863	164709	169515	285087
<b>India</b>	235132	230456	261419	262423	258050	210486
<b>Viet Nam</b>	125185	136362	146441	77234	134931	126450
<b>Uganda</b>	53319	56286	59207	70101	69095	72454
<b>Argentina</b>	76029	78177	74921	72619	75322	65978
<b>Emirati Arabi</b>	30301	31878	54613	67492	65799	57720
<b>Malawi</b>	38785	43656	41273	42263	46944	46923
<b>Indonesia</b>	61915	51317	51353	49030	42046	45265



**Figura 2.11.** Import di tè (tonnellate) a livello mondiale dal 2015 al 2020

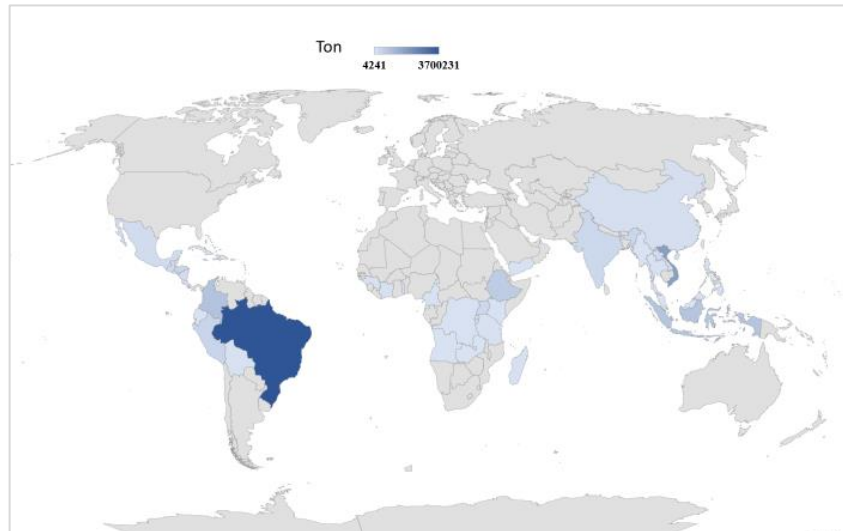
Il Pakistan è stato il principale Paese importatore di tè al mondo (254406 tonnellate importate nel 2020), con importazioni per un valore di circa 590 milioni di dollari. La Russia si è collocata al secondo posto per quantità di tè importato (151441 tonnellate nel 2020), rappresentando circa l'8% del mercato delle importazioni (Tabella 2.8). Tuttavia, il mercato del tè potrà subire delle forti ripercussioni legate alla più recente guerra in Ucraina. Tra gli altri stati maggiori importatori di tè vi sono l'Inghilterra (6,76%), gli Stati Uniti (5,59%) e la Cina (4,83%). La Cina, pur essendo il maggiore produttore di tè, nel biennio 2018-2020 ha aumentato la quota di importazione di tè per far fronte alla forte domanda interna e alle perdite del raccolto di quegli anni legate alle forti restrizioni per limitare la diffusione del Covid-19 [33; 39].

**Tabella 2.8.** Tonnellate di tè importato dal 2015 al 2020 per i principali Paesi importatori

Paesi	Anno					
	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<b>Pakistan</b>	164642	184902	183496	204428	206324	254406
<b>Russia</b>	173065	164398	168785	163802	150348	151441
<b>Inghilterra</b>	133503	126282	125810	125692	123021	129865
<b>Stati Uniti</b>	129708	131066	126299	119357	117997	107414
<b>Cina</b>	66473	63269	76553	86967	99529	92740
<b>Egitto</b>	87950	88500	96842	114972	108858	74695
<b>Marocco</b>	64442	67314	72532	75778	83353	71535
<b>Iran</b>	70248	56428	58146	48343	75761	63286
<b>Iraq</b>	37030	39002	47798	16386	19460	54930
<b>Polonia</b>	34785	35476	37367	36213	37867	42356

## 2.4. Mercato del caffè

Il caffè è oggi una delle bevande più popolari al mondo. Le bevande di caffè calde e fredde possono essere prodotte da una varietà di chicchi ed essere servite in molte forme, come espresso, cappuccino, americano, etc. Due dei principali tipi di caffè in grani includono Arabica e Robusta. I Paesi produttori, così come per gli altri alimenti nervini, si concentrano per lo più nella fascia equatoriale (Figura 2.12.).



**Figura 2.12.** Principali Paesi produttori di caffè nel 2020

A livello mondiale la produzione ammonta a circa 10,7 milioni di tonnellate per un valore di 102,02 miliardi di dollari nel 2020. Il principale Paese produttore di caffè verde è il Brasile, la cui produzione ammonta a 3,7 milioni di tonnellate di caffè (2020), corrispondenti al 34,67% della produzione mondiale. Oltre al Brasile, tra i principali Paesi produttori di caffè verde si annoverano: Viet Nam (16,50%), Colombia (7,80%), Indonesia (7,24%), Etiopia (5,47%) e Perù (3,52%) (Tabella 2.9) [33]. La pandemia di Covid-19 ha messo ulteriore pressione sul settore del caffè che è vulnerabile alle fluttuazioni dei prezzi, ai bassi livelli di produttività, agli effetti del cambiamento climatico e ai danni causati da parassiti e malattie. Inoltre, i governi imponendo misure restrittive che hanno limitato la “socialità”, hanno determinato un grosso impatto sui *caffè*, *micro-torrefattori*, ristoranti e altri punti vendita fuori casa. Il mercato mondiale del caffè è guidato da molteplici fattori, alcuni dei quali sono la crescente domanda di prodotti di caffè certificati, l'accettazione di sistemi di caffè monodose da parte dei consumatori e l'innovazione costante guidata dai principali attori del mercato del caffè.



Nelle economie sviluppate, alcuni consumatori sono tenuti a passare dal caffè istantaneo a opzioni più premium per motivi di qualità e sapore [40].

**Tabella 2.9.** Produzione di caffè verde per i principali Paesi produttori

Paesi	Anno					
	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<b>Brasile</b>	2647504	3024466	2684508	3552729	3011745	3700231
<b>Viet Nam</b>	1452999	1460800	1542398	1616307	1686765	1763476
<b>Colombia</b>	827750	818243	851640	813420	885120	833400
<b>Indonesia</b>	639412	639305	717962	756051	741657	773409
<b>Etiopia</b>	457014	469091	449230	494574	482561	584790
<b>Perù</b>	251938	277760	337330	369622	363320	376725
<b>Honduras</b>	332747	366542	477580	478831	472497	364552
<b>India</b>	327000	348000	312000	316000	319500	298000
<b>Uganda</b>	229149	243061	302063	284225	312601	290668
<b>Guatemala</b>	225653	236145	224000	240400	216400	225000

Il caffè istantaneo una volta era considerato un prodotto di fascia alta, ma ha cominciato a perdere la sua base di consumatori più giovani, che sta cambiando le dinamiche del mercato. Le esportazioni mondiali di caffè verde sono cresciute dal 2021 al 2022 del 4%, raggiungendo i 13,16 milioni di sacchi, che equivalgono a 60 kg caduno. A marzo 2022, le esportazioni di Arabica sono state pari a 80,9 milioni di sacchi rispetto agli 82,67 milioni di sacchi dello scorso anno; mentre le esportazioni di Robusta sono state di 48,9 milioni di sacchi rispetto a 47,81 milioni di sacchi del 2021. In Tabella 2.10 sono riportate le tonnellate di caffè verde e caffè torrefatto importate ed esportate a livello mondiale dal 2015 al 2020 [40-41].

**Tabella 2.10.** Import ed export (tonnellate) di caffè verde e caffè torrefatto

Import (ton)							
Prodotti	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Variazione% (2015-2020)
<b>Caffè verde</b>	6957245	7293459	7204365	7528265	7805916	7487462	+6%
<b>Caffè torrefatto</b>	1020595	1113469	1173848	1206599	1270655	1261109	+16%
Export (ton)							
Prodotti	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Variazione% (2015-2020)
<b>Caffè verde</b>	7187701	7499256	7348183	7489065	7948821	7718744	+7%
<b>Caffè torrefatto</b>	1075436	1158700	1168627	1207254	1275971	1274182	+19%

Più del 50% del mercato dell'export di caffè verde è detenuto dai tre principali Paesi produttori: Brasile (30,74%), Viet Nam (15,95%) e Colombia (9,00%) (Tabella 2.11). Le importazioni di caffè verde hanno riguardato in particolar modo i principali Paesi trasformatori (Tabella 2.12). Infatti, nel 2020 il mercato delle importazioni di caffè verde è detenuto da Stati Uniti (19,07%), Germania (14,96%) e Italia (7,57%) [33].

Come per tutti gli alimenti nervini, i processi di trasformazione del caffè vengono effettuati in Paesi differenti da quelli in cui viene prodotta la materia prima. L'export a livello mondiale del caffè torrefatto ammontava a 1,3 milioni di tonnellate nel 2020 e tra i maggiori esportatori a livello mondiale del prodotto trasformato vi sono Germania (19,28%), Italia (18,80%) e Paesi Bassi (7,77%) (Tabella 2.13).

**Tabella 2.11.** Export (tonnellate) di caffè verde dal 2015 al 2020

Paesi	Anno					
	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<b>Brasile</b>	2005034	1823886	1647811	1827000	2230872	2372633
<b>Viet Nam</b>	1280202	1700998	1459345	1613486	1409810	1231314
<b>Colombia</b>	713060	734689	712542	712696	753366	694928
<b>Indonesia</b>	499651	412529	448955	277475	326050	375671
<b>Honduras</b>	285228	309924	430743	429741	411806	363400
<b>Germania</b>	310834	335643	348495	361666	356233	340060
<b>Uganda</b>	219336	210584	286998	252166	276836	329373
<b>Belgio</b>	189803	188781	211168	216219	231946	241340
<b>Etiopia</b>	234218	159712	194175	111254	238372	230246
<b>Perù</b>	175201	239343	245735	261256	232039	213236

**Tabella 2.12.** Import (tonnellate) di caffè verde dal 2015 al 2020

Paesi	Anno					
	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<b>USA</b>	1462570	1518126	1531321	1493440	1592249	1427849
<b>Germania</b>	1077757	1140989	1098833	1124983	1135347	1120426
<b>Italia</b>	533180	580274	569916	606995	615972	566783
<b>Giappone</b>	435261	435140	406330	401144	436546	391611
<b>Spagna</b>	278654	287504	273842	289358	305035	317417
<b>Belgio</b>	287383	288740	276473	281344	307542	314423
<b>Francia</b>	218429	209884	204873	227463	230018	234313
<b>Svizzera</b>	148404	151644	156288	167538	175318	191822
<b>Russia</b>	137566	150932	165410	168540	185616	198323
<b>Paesi Bassi</b>	159254	166334	190214	202696	206382	189184

Il mercato delle importazioni di caffè torrefatto equivale a 1261109 tonnellate di caffè importate a livello mondiale nel 2020. Inoltre, le importazioni del prodotto trasformato

hanno visto un incremento di circa il 19% dal 2015 al 2020. Tra i Paesi che importano maggiori quantità ritroviamo Francia, che rappresenta l'11,98% del mercato, Stati Uniti (7,71%) e Germania (7,45%) (Tabella 2.14) [33; 41].

**Tabella 2.13.** Export (tonnellate) caffè torrefatto dal 2015 al 2020

	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>
<b>Germania</b>	203776	215472	221406	227276	236144	245626
<b>Italia</b>	175986	198570	209036	220590	257575	239579
<b>Paesi bassi</b>	67635	67044	90518	101706	101580	98949
<b>Svizzera</b>	60431	65815	70552	75150	82293	95858
<b>USA</b>	89725	88927	86317	84720	84725	79771
<b>Polonia</b>	79197	62233	58052	62914	61963	61676
<b>Francia</b>	26445	29696	41920	47948	52886	58030
<b>Canda</b>	40853	48499	50062	48186	47446	43412
<b>Belgio</b>	62153	64381	41060	36366	35953	35887
<b>Inghilterra</b>	19631	22895	25035	24951	26901	28626

**Tabella 2.14.** Import (tonnellate) di caffè torrefatto dal 2015 al 2020 per i principali Paesi importatori

<b>Paesi</b>	<b>Anno</b>					
	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>
<b>Francia</b>	125885	131937	147340	161971	176786	151048
<b>Stati Uniti</b>	75795	85187	93020	88381	102483	97226
<b>Germania</b>	77955	77746	79292	82152	85824	93904
<b>Paesi Bassi</b>	56378	58573	69945	73960	70765	72196
<b>Canada</b>	68658	64960	61934	61407	68449	67418
<b>Inghilterra</b>	35765	41110	50676	54591	59527	66789
<b>Polonia</b>	37075	43721	42895	50298	56949	59132
<b>Austria</b>	49383	47900	46996	46064	48132	46994
<b>Romania</b>	24939	29637	31255	34187	34399	39428
<b>Cecoslovacchia</b>	54216	44022	32991	43848	34512	33691

## CAPITOLO III

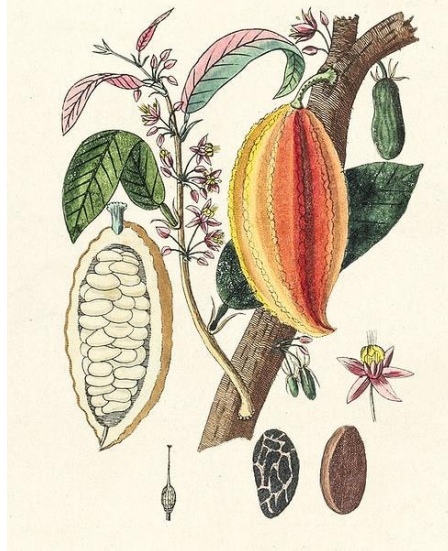
### ALIMENTI E BEVANDE NERVINE

Gli alimenti e le bevande nervine sono “*alimenti accessori*”, di origine vegetale, che hanno effetti sul sistema nervoso centrale e periferico. Il nome di questa classe di alimenti è determinato dalle proprietà di alcuni composti chimici, che vengono definiti per l'appunto nervini, come la caffeina, teobromina, teina, taurina, efedrina, sinefrina, etc. Le principali proprietà che vengono attribuitegli sono le proprietà toniche, capaci di agire stimolando il sistema nervoso centrale e quello periferico migliorando così l'efficienza fisica e psichica. Tali effetti sono strettamente legati alla dose, alla frequenza di assunzione ed alla sensibilità individuale. Nella categoria degli alimenti nervini vengono tradizionalmente inseriti il tè, il caffè, il cacao, bevande a base di cola e tutti i prodotti alimentari che li contengono [43].

#### 3.1. Il Cioccolato

Il cioccolato è un alimento ottenuto dai semi dell'albero di cacao (*Theobroma cacao*). La pianta del cacao era già nota nel XVI secolo alle popolazioni dell'America Centrale (Toltechi, Maya ed Aztechi), che utilizzavano il frutto per preparare una bevanda dal gusto amaro chiamata *xocolatl*: “Nettare degli Dei”, nonché antenato dell'attuale cioccolato. Solo nel XVII il cacao si diffuse in tutto il mondo per il suo sapore, che veniva esaltato mediante l'aggiunta di spezie (vaniglia, cannella, chiodi di garofano, etc.), miele e zucchero [44]. La pianta di cacao (*Theobroma cacao*) è un arbusto originario dell'Amazzonia e diffuso nei territori equatoriali del Sud America, dell'Africa Centrale (Costa D'Avorio, Ghana, Brasile, Cameroon, Ecuador) e dell'Indonesia. La pianta di cacao (Figura 3.1.) raggiunge in media un'altezza compresa tra i 4-8 metri, che cresce all'ombra di altri alberi per proteggersi da eventi climatici, come vento e forti piogge. I fattori ambientali, temperatura, umidità ed in particolare l'intensità luminosa influenzano lo sviluppo verticale della pianta, per questo la sua coltivazione è possibile in un ristretto e particolare areale del mondo. La sua produzione, infatti, è possibile solo nella fascia compresa tra il 23° parallelo Nord e il 20° parallelo Sud detta anche “cintura del cacao” e in un intervallo di altitudine tra 0 e 500

m sul livello del mare. Le temperature sono comprese tra 20-30°C, le precipitazioni sono di circa 1500-3000 mm/anno, il grado di umidità è elevato e costante (oltre l'80%, ottimale 85%)[45].



**Figura 3.1.** Pianta del cacao

*Theobroma cacao* è caratterizzata da una radice principale attorno a cui si sviluppano numerose radici secondarie e superficiali, che favoriscono l'assorbimento di nutrienti e di acqua dal suolo; pertanto, risulta molto sensibile alla siccità. La pianta di cacao richiede terreni profondi dotati di buona permeabilità (non molto argillosi), con buona capacità di ritenzione idrica come i terreni alluvionali, cristallini o vulcanici [46].

Esistono ventidue *varietà* appartenenti al genere *Theobroma* (*T. gileri*, *T. bernoulli*, *T. chocoense*, *T. sylvestrisis*, etc.), tra questi *Theobroma cacao* è quella coltivata su larga scala, mentre tra le *cultivar* quelle maggiormente coltivate sono *Criollo*, *Forastero* e *Trinitario*, che influenzano, insieme alle condizioni ambientali e alle tecniche di coltivazione alla resa dei raccolti, alla resistenza della pianta ai patogeni, al sapore/aroma e alla qualità delle fave di cacao [47]. La pianta del cacao sviluppa i propri fiori lungo il tronco e rami principali (pianta cauliflora); i piccoli fiori si trovano riuniti insieme in infiorescenze delle “*cuscini floreali*”. Solo circa il 5-10% dei fiori, che per la maggior parte sono ermafroditi, si impollinano e di questi solo una minima parte, che va dallo 0.5-5% originerà frutti che giungono alla maturazione. I frutti, che nello stadio iniziale vengono detti “*chireles*”, mentre al momento della raccolta sono definiti “*cabosse*” o “*cabossidi*” [15]. La maturazione dei frutti dura generalmente dai 4 ai 7 mesi a seconda

della cultivar considerata. Ciascun frutto caratterizzato da una forma sferica e appuntita, superficie liscia o rugosa, può raggiungere dimensioni fino a circa 25 cm. Altra caratteristica delle cabossidi è che possono variare il colore da verde all'arancione, al giallo e al viola in funzione della cultivar in considerata (Tabella 3.1.). La produzione di frutti comincia tra il primo e il quinto anno della messa a dimora della pianta e varia anche questa dalla varietà considerata e dalle condizioni pedoclimatiche di coltivazione. All'interno delle cabossidi sono presenti dai 20 ai 60 semi, che vengono anche detti "fave di cacao". Le fave si trovano disposte in file regolari e sono ricoperte da una polpa mucillaginosa di colore bianco rosato ricca di acqua e zuccheri, in particolar modo, saccarosio, glucosio e fruttosio. Le fave presentano un sapore acidulo determinato dal pH, che si trova intorno a 3-4, e dalla fermentazione del saccarosio che porta alla formazione di glucosio, fruttosio e acido citrico. Dalla fava di cacao verranno estratte le materie prime per la produzione di cacao e cioccolato: burro di cacao e liquor.

**Tabella 3.1** Differenze morfologiche tra le tre principali varietà di cacao

<b>Varietà</b>	<b>CRIOLLO</b>	<b>FORASTERO</b>	<b>TRINITARIO</b>
<b>Colore cabosside</b>	Rosso	Verde	Variabile
<b>Consistenza</b>	Morbida	Dura	Prevalentemente dura
<b>Numero medio di semi per frutto</b>	20-30	30	30
<b>Colore dei cotiledoni</b>	Bianco, avorio o leggermente viola	Viola in varie gradazioni	Variabile

La fava è costituita da due tipi di cellule: le cellule di riserva, che rappresentano circa il 90% del volume del seme e contengono amido, lipidi, proteine ed enzimi; e le cellule primarie, che rappresentano circa 11-13% del volume totale, contengono principalmente composti secondari responsabili del colore dei cotiledoni, quali tannini, antociani, proantocianidine e metilixantine (caffaina e teobromina) [48].

### **3.1.1. Processo produttivo del cioccolato**

La produzione di cioccolato è caratterizzata da un lungo e complesso processo che a partire dalla materia prima, ossia le fave di cacao, comprende diversi step, tra questi le

due fasi principali possono essere raggruppate in: *trattamento*, che avviene principalmente nei luoghi di coltivazione della pianta di cacao e la *trasformazione* dei semi, che viene svolta o in loco o in Paesi importatori. Le pratiche agricole influiscono notevolmente sulla composizione e sul sapore dei semi di cacao secchi fermentati e conseguentemente sul prodotto finito; in particolar modo, risultano essere determinanti: il tempo di raccolta, lo stoccaggio, il grado di maturazione e la separazione dei baccelli, la manipolazione, l'imballaggio e il trasporto delle fave, le variazioni stagionali e le condizioni atmosferiche [15; 48]. Nella Figura 3.2. viene mostrato il processo di produzione e trasformazione del cacao.

### ***Trattamento***

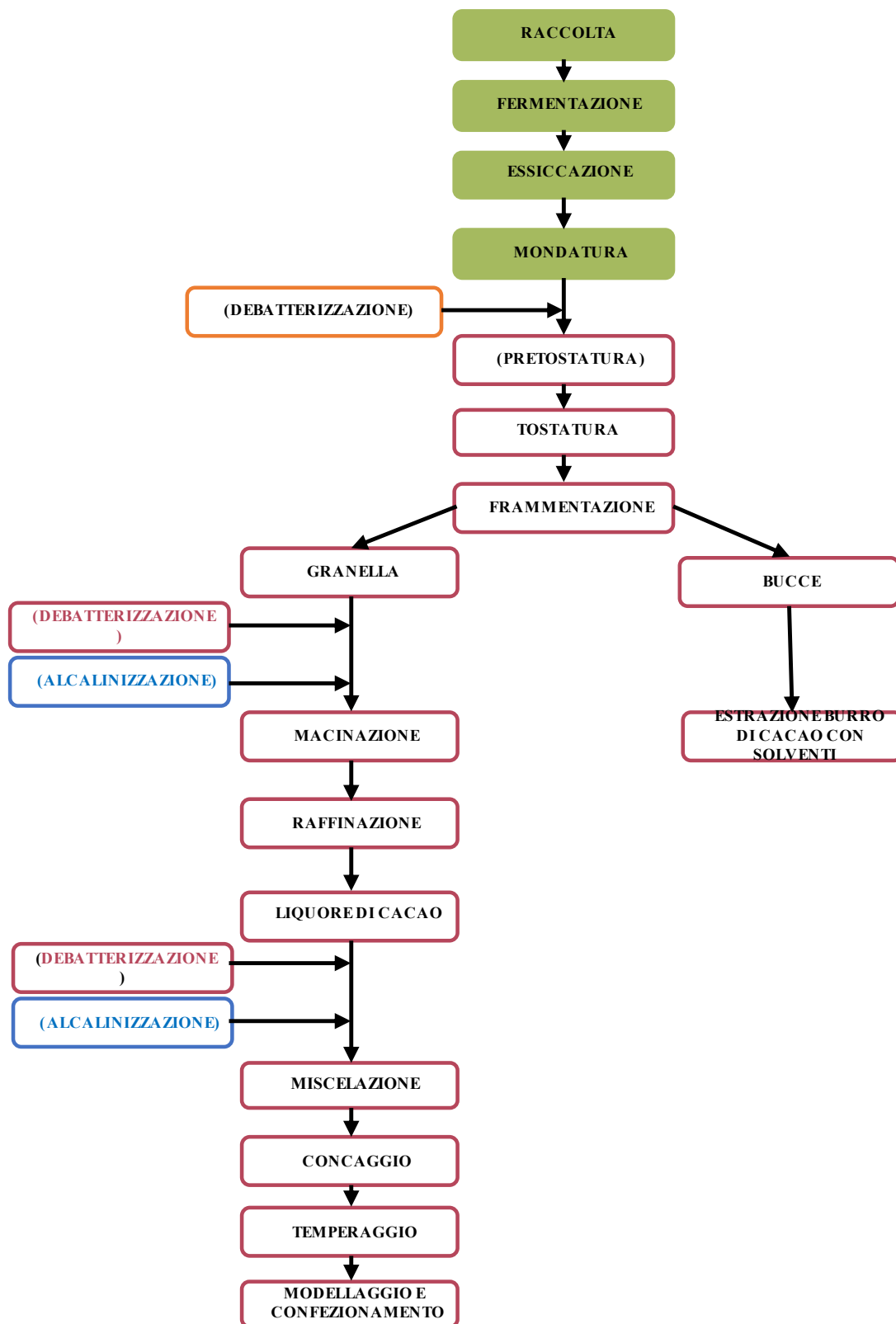
Le fasi iniziali del processo di produzione del cioccolato, essenziali per la determinazione delle caratteristiche qualitative del prodotto finito avvengono per lo più nei Paesi coltivatori della pianta di cacao, per la maggior parte Paesi in via di sviluppo che sono localizzati in Africa, America centrale ed America del sud. Il trattamento delle fave di cacao si articola in cinque step [31; 46; 49]:

- **Fase 1: raccolta.** La fase di raccolta avviene dopo circa sei mesi dalla formazione del frutto, tempo necessario affinché le carbossidi maturino. Questa fase è fondamentale al fine di garantire la corretta fermentazione delle fave di cacao. Infatti, semi che provengono da frutti troppo maturi possono germinare e causare una contaminazione interna, favorita dalla rottura della membrana sottile del seme. Al contrario, una raccolta troppo prematura comporterebbe la lavorazione dei frutti con un ridotto contenuto di zuccheri nella polpa e la presenza di cotiledoni astringenti e acidi, che indurrebbero ad una fermentazione incompleta e insufficiente.
- **Fase 2: selezione e rottura del frutto.** Risulta necessario un periodo di attesa tra la raccolta del frutto e la sua selezione/rottura, affinché si verifichino alcuni fenomeni biochimici, tra cui la liberazione del glucosio e del fruttosio (ad opera delle invertasi) a partire dal saccarosio contenuto nella polpa. Questi zuccheri saranno fondamentali per il processo successivo di fermentazione.
- **Fase 3: fermentazione delle fave di cacao.** La fase della fermentazione determina cambiamenti chimico/fisici che contribuiscono alla determinazione del sapore, del flavour e del colore della fava. Queste trasformazioni si completeranno nelle fasi di trasformazione successive, in particolar modo durante i processi di

tostatura. La fermentazione è una fase fondamentale in quanto consente di separare la polpa mucillaginosa dalle fave di cacao. I cambiamenti chimici che avvengono durante questo step consentono di ridurre il sapore amaro e a promuovere lo sviluppo di aromi caratteristici, che sono influenzati dalla presenza di differenti specie microbiche presenti nella polpa mucillaginosa della cabosside. Oltre a ciò, la fermentazione è influenzata anche da fattori ambientali, quali temperatura, pH della polpa mucillaginosa e della stessa fava di cacao, tempo e microrganismi deputati alla fermentazione. La fase di fermentazione viene effettuata direttamente sul suolo, oppure inserendo le fave in ceste, vassoi o scatole di legno. Al fine di facilitare la suddivisione delle fave di cacao prima della fermentazione vengono adagiate su foglie di banano, bambù, fibre vegetali o legno. Il processo di fermentazione è strettamente correlato al tempo-temperatura a cui sono sottoposte le fave durante questo step. La fermentazione termina quando la temperatura si stabilizza e i semi assumono il colore rosso-marrone intenso e il sapore d'aceto, dovuto alla formazione di acido acetico durante il processo.

- **Fase 4: Essiccazione delle fave.** Le fave di cacao, dopo la fermentazione, vengono essiccate al sole o con evaporatori artificiali che, oltre ad eliminare l'acqua, vanno ad incidere sui cambiamenti chimici a cui le fave di cacao erano già state sottoposte durante la fermentazione. Questa fase è necessaria sia per ridurre il tasso di umidità (dal 40-50% al 6-8%) delle fave di cacao sia per interrompere l'attività enzimatica dei processi fermentativi e prevenire la proliferazione di funghi.
- **Fase 5: Imballaggio e conservazione.** Ultima fase del processo di trattamento delle fave di cacao è la preparazione di grossi sacchi di juta dal peso che va tra i 60-65 Kg ciascuno. A questo punto, le fave di cacao imballate possono essere sottoposte a trattamenti fitosanitari post-raccolta per prevenire lo sviluppo di muffe, parassiti e insetti. Ad oggi, si sono andate affinando tecniche che consentono la conservazione delle fave di cacao senza l'utilizzo di sostanze potenzialmente tossiche.





**Figura 3.2.** Processo di produzione e trasformazione delle fave di cacao

## ***Trasformazione***

Alle fasi di trattamento seguono le fasi di trasformazione, ossia tutti quei processi che consentono la creazione del prodotto finito, il cioccolato e dei suoi derivati. Prima del processo di lavorazione industriale, le fave di cacao grezzo vengono pulite a fondo con setacci, spazzole meccaniche e aspiratori al fine di eliminare i residui di legno, sabbia e polveri, mentre le particelle metalliche vengono trattenute da apposite calamite. La prima fase di trasformazione delle fave di cacao prevede la tostatura dei semi grezzi che sono portati ad una temperatura che può variare tra i 110 e 160 °C, per un periodo di tempo che va tra i 15 e i 60 minuti. Il binomio tempo-temperatura nella fase di tostatura è una delle procedure che può influenzare maggiormente i cambiamenti chimico-fisici che si verificano nelle fave di cacao, e che possono quindi andare incidere sulla qualità finale del prodotto. In questa fase, i precursori degli aromi, che si sono sviluppati durante la fermentazione, si trasformano in nuovi composti aromatici amplificando il flavour delle fave di cacao. Pertanto, per ottenere fave di qualità, la tostatura deve avvenire con tempi e temperature bassi al fine di sviluppare una maggiore ricchezza aromatica. Questa fase consente anche di ridurre ulteriormente l'umidità del prodotto e inoltre consente di sterilizzare le fave e di facilitarne la decorticazione. Quest'ultimo step consente di privare della pellicola esterna (*cascara*) le fave di cacao rendendole adatte per la macinazione. La fase di macinazione, che avviene mediante l'azione di macchine dette *mélangeur*" (composte da due macine in granito su cui viene pressato il cacao) o attraverso il "mulino a coltelli" (stesso principio di funzionamento delle prime, sostituito solo dalle lame), consente di sminuzzare le fave di cacao ottenendo una pasta grossolana, che viene definita "*pasta di cacao*". La fase di macinazione consente la rottura delle cellule e la fuoriuscita del burro di cacao che, sotto azione delle presse a caldo (400-500 bar, 90-100°C), viene "spremuta" e separata dalla massa di cacao. A seconda del prodotto finito che si vuole ottenere la pasta di cacao può essere trattata con sostanze alcaline (alcalinizzazione) per la produzione di cacao in polvere oppure addizionato con saccarosio, burro di cacao, emulsionanti e aromi per la produzione di cioccolato [15; 46].

La fase di alcalinizzazione, detta "*Dutching*" o "Olandese", è caratterizzata dall'aggiunta di sostanze alcaline (MgOH, NaOH, KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al *liquor*, alla granella o ai cotiledoni ed eventualmente neutralizzate con acido tartarico. Questo processo consente di migliorare la bagnabilità, la dispersibilità della polvere in soluzione acquosa, sia il

colore che il sapore. In questa fase, il burro di cacao liquefatto viene separato dalla pasta di cacao, successivamente viene filtrato e reintrodotta in diverse percentuali nei vari derivati, in base al tenore richiesto dal tipo di prodotto e in relazione alla normativa. Il cioccolato da *tavolettame* viene prodotto a partire dal liquor non alcalinizzato, che viene miscelato con l'aggiunta di saccarosio, burro di cacao, aromi, emulsionanti ed eventuali ingredienti (latte, nocciola, mandorle, caffè, etc.). Questa fase viene effettuata mediante un miscelatore costituito da due cilindri che ruotano e amalgamano la miscela, che presenta granulometria pari a circa cento micron. La scelta delle materie prime viene effettuata sulla base del prodotto finale desiderato e segue specifiche indicazioni definite dalla Direttiva 73/241/CEE (Tabella 3.2.) [51].

Successivamente alla fase di miscelazione il prodotto viene “*raffinato*”, ossia la massa di cacao viene passata attraverso dei rulli refrigerati ad acqua, mediante questo processo il cioccolato assume una texture pastosa, con particelle di dimensioni pari a 30-40 µm. Il processo di raffinazione consente di rendere il cioccolato scioglievole e piacevole al palato. Successivamente, segue la fase di concaggio che consente di migliorare ulteriormente la texture del prodotto. Questo processo viene effettuato mediante un macchinario, la conca piana, che miscela ulteriormente il liquor. Le condizioni di tempo e temperatura a cui viene effettuato il concaggio, di fatti temperature maggiori riducono il tempo di processamento, tuttavia comportando una maggiore perdita dei composti responsabili del flavour del cioccolato.

**Tabella 3.2.** Denominazione del cioccolato definita dalla direttiva europea 73/241/CE

DENOMINAZIONE DEL PRODOTTO	INGREDIENTI
<b>Cioccolato</b>	La parte secca complessiva derivante dal cacao deve essere almeno il 35%, il cacao magro almeno il 14% e il burro di cacao almeno il 18%.
<b>Cioccolato fondente</b>	Contiene solo pasta di cacao, burro di cacao, zucchero, vaniglia e, a volte, lecitina (un emulsionante) in quantitativi variabili. La percentuale di cacao deve essere almeno del 45% e il burro di cacao il 28%.
<b>Cioccolato extrafondente</b>	Contiene solo pasta di cacao, burro di cacao, zucchero, vaniglia e, a volte, lecitina (un emulsionante) in quantitativi variabili. La percentuale di cacao può superare il 70%.
<b>Cioccolato al latte</b>	Contiene almeno il 25% di sostanza secca totale di cacao, il 14% di sostanza secca totale di latte e il 25% di materie grasse.
<b>Cioccolato alle nocciole gianduia</b>	Contiene almeno il 32% di sostanza secca totale di cacao e una parte di nocciole finemente macinate che varia tra il 20-40%.
<b>Cioccolato bianco</b>	Contiene almeno il 20% di burro di cacao e non meno del 14% di sostanza secca di origine del latte.

Successivamente viene effettuato il temperaggio, questa fase è finalizzata a solidificare il cioccolato, conferendo al prodotto finito un aspetto lucido, omogeneo, senza grumi e con una maggiore *shelf-life*. Questo processo, effettuato mediante macchine definite “temperatrici” sottopone la cioccolata a diversi sbalzi termici, facendo oscillare la massa di cioccolato tra i 40 °C iniziali e i 18-28 °C e fino al raggiungimento di circa 32 °C. Il burro di cacao, ingrediente fondamentale nella preparazione del cioccolato, ha la capacità di cristallizzare in sei diverse forme (polimorfismo), ognuna delle quali è determinante per la shelf-life, la palatabilità e le caratteristiche reologiche del prodotto finale. Pertanto, lo scopo del temperaggio, in cui è previsto un iniziale raffreddamento fino a 18-28 °C, in cui avviene la cristallizzazione di alcune molecole polimorfe, e un successivo riscaldamento della massa fino a 32 °C, in cui si ha la fusione delle forme cristalline meno sensibili, ha lo scopo di consentire che il burro di cacao cristallizzi nella forma  $\beta$ , caratterizzata da cristalli di piccole dimensioni e alte temperature di fusione (melting point: 34 °C) [51]. La massa di cioccolato viene successivamente versata in stampi, disposti su nastri vibranti al fine di eliminare la formazione di eventuali bolle, e lasciato raffreddare a 10°C. Anche per quest’ultimo step occorre prestare attenzione alla temperatura, infatti improvvisi sbalzi termici potrebbero facilitare la comparsa di una “fioritura” bianca all’esterno della massa, derivante da inadeguate condizioni di cristallizzazione del burro di cacao che, riaffiorando in superficie, conferisce alla tavoletta aspetto simile all’ammuffimento. Sebbene non dannoso per la salute del consumatore, questo fenomeno, anche conosciuto come “*fat bloom*” o “affioramento del grasso” compromette la palatabilità e la qualità del cioccolato. Una volta che il prodotto si è solidificato, il cioccolato è pronto per essere confezionato in carta di alluminio e chiuso in una scatola ermetica al fine di limitarne l’assorbimento di odori provenienti dall’ambiente in cui viene posto, distribuito e venduto, facendo attenzione alle condizioni ottimali di conservazione: 15-18 °C, tasso di umidità massimo del 65% e in assenza di esposizione alla luce [15; 52].

### **3.1.2. Composizione chimica**

Il cioccolato è caratterizzato da oltre 300 composti differenti. L’analisi della sua composizione chimica fornisce informazioni sui trattamenti tecnologici che il prodotto ha subito lungo le fasi di trasformazione della materia prima. Il cioccolato è composto principalmente da: acqua, lipidi, proteine, carboidrati, fibre, sali minerali e composti minori (metilxantine, amminoacidi, polifenoli etc.). La composizione chimica del

prodotto finito che si considera può variare notevolmente a seconda dei tenori in grasso e zuccheri [53]. In Tabella 3.3. sono riportati i principali componenti di alcuni tipi di cioccolato.

### ***Lipidi***

Il cioccolato dal punto di vista chimico fisico viene definito come una sospensione di particelle di zucchero, cacao e/o componenti solidi del latte disciolti in una fase grassa [53-54].

La frazione lipidica rappresenta una delle componenti principali sia della materia prima (fave di cacao) sia del prodotto finito (cioccolato). Durante la formazione e la maturazione delle fave di cacao vengono sintetizzati i triacilgliceroli (TAG) che sono poi accumulati all'interno dei "corpi lipidici". Il Burro di cacao (BC) rappresenta circa il 45-53% del peso delle fave di cacao e il 4-8% della buccia, si presenta come una massa di colore giallo pallido con densità di 0,957-0,980 che fonde intorno ai 35 °C. Questo grasso vegetale è rappresentato da circa il 97-98% dai TAG, costituito principalmente da acidi grassi (AG) che vanno da C14 a C20. È particolarmente ricco in acido palmitico (C16) che rappresenta circa il 25% degli AG totali, stearico (C18) che rappresenta il 37% degli AG e oleico (C18:1). Di solito la posizione degli acidi grassi all'interno dei TAG è ben definita, infatti l'acido oleico si trova esterificato per lo più in posizione centrale del glicerolo; di conseguenza i TAG che sono maggiormente rappresentativi delle fave di cacao e di conseguenza del cioccolato sono [49]:

- POP; palmitico-oleico-palmitico
- POS; palmitico-oleico-stearico
- SOS; stearico-oleico-stearico.

Nella lavorazione del cioccolato possono essere utilizzati grassi definiti "sucedanei" o "sostitutivi" del burro di cacao, questi sono grassi vegetali con caratteristiche chimico-fisiche simili a quelle del BC, vengono classificati in tre categorie:

- **CBE** (Cocoa Butter Equivalents), lipidi privi di acido laurico che possono essere aggiunti al burro senza alterarne le proprietà chimico-fisiche;
- **CBR** (Cocoa Butter Replacers), lipidi privi di acido laurico ma con struttura dei TAG completamente differente;
- **CBS** (Cocoa Butter Substitutes) lipidi contenenti acido laurico, chimicamente, utilizzabili solo per sostituzione completa del burro di cacao.

- Tali lipidi possono essere utilizzati in aggiunta (e non sostituzione) alle percentuali minime consentite di burro di cacao, fino ad un massimo del 5% [55]. Il **BC** così composto viene utilizzato insieme alla massa di cacao e allo zucchero per la produzione di cioccolato, in cui rappresenta circa il 30-40% del peso totale o nell'industria dolciaria. Il BC viene estratto a partire dal liquor, massa o granella di cacao mediante presse a caldo, solventi organici o CO<sub>2</sub> supercritica. Quest'ultima tecnica permette di ottenere un BC con caratteristiche reologiche costanti e riproducibili, migliorando la qualità e la resa del BC estratto dalle fave o dalle bucce di cacao.

**Tabella 3.3.** Composizione chimica di alcuni tipi di cioccolato per 100g di parte edibile [56]

Composizione		Unità di misura	Cacao in polvere	Cioccolato bianco	Cioccolato al latte	Cioccolato fondente (70-85%)
<b>Composizione generale</b>	<i>Acqua</i>	g	3	1.3	1.5	1.37
	<i>Proteine</i>	g	19.6	5.87	7.65	7.79
	<i>Grassi</i>	g	13.7	32.1	29.7	42.6
	<i>Ceneri</i>	g	5.8	1.5	1.78	2.32
	<i>Carboidrati</i>	g	57,9	59.2	59.4	45.9
	<i>Fibre</i>	g	37	0.2	3.4	10.9
<b>Minerali ed elementi in tracce</b>	<i>Sodio</i>	mg	21	-	79	20
	<i>Calcio</i>	mg	128	199	189	73
	<i>Potassio</i>	mg	1520	286	372	715
	<i>Ferro</i>	mg	13.9	0.24	2.35	11.9
	<i>Magnesio</i>	mg	499	12	63	228
	<i>Manganese</i>	mg	3.84	0.008	0.471	1.95
	<i>Rame</i>	mg	3.79	0.06	0.491	1.77
	<i>Zinco</i>	mg	-	0.74	2.3	3.31
	<i>Selenio</i>	µg	14.3	4.5	4.5	6.8
	<i>Fosforo</i>	mg	734	176	208	308
<b>Vitamine</b>	<i>Vitamina C</i>	µg	-	0.5	-	-
	<i>Tiamina</i>	µg	78	63	112	34
	<i>Riboflavina</i>	µg	241	282	298	78
	<i>Niacina</i>	mg	2.18	0.745	0.386	1.05
	<i>Acido Pantotenico</i>	µg	254	608	472	418
	<i>Vitamin B6</i>	µg	118	56	36	38
	<i>Folati (Tot)</i>	µg	32	7	12	-
	<i>Vitamina E</i>	mg	0.1	0.96	0.51	0.59
	<i>Vitamina B12</i>	µg	-	0.56	0.75	0.28
	<i>Vitamina K</i>	µg	2.5	9.1	5.7	7.3

### ***Proteine***

La frazione proteica rappresenta la seconda componente dopo quella lipidica, costituendo circa il 10-15% del peso secco di semi e delle bucce di cacao. La composizione proteica all'interno delle fave e conseguentemente all'interno del cioccolato varia notevolmente a seconda del grado di maturazione a cui sono state raccolti i frutti. Circa il 60% dell'azoto totale è rappresentato da proteine mentre lo 0,3% è rappresentato da amminoacidi liberi,  $\text{NH}_3$  derivante dalla fermentazione del seme (<0,03%) e dalle metilxantine, come teobromina e caffeina [57].

Nelle fave di cacao la porzione proteica è rappresentata principalmente da enzimi, come amilasi, galattosidasi, fruttosidasi, pectinosidasi, etc. L'attività di alcuni di questi si riduce fortemente in seguito alla fermentazione. Conseguentemente alla fase di essiccazione delle fave di cacao avviene una completa inattivazione degli enzimi presenti nei semi, che viene poi eliminata completamente nella fase di tostatura. All'interno delle fave di cacao le proteine predominanti sono le albumine (52%), globuline (43%), gluteline (5%) e prolamine (tracce) [57-58].

### ***Carboidrati***

Le fave di cacao sono caratterizzate dalla presenza di monosaccaridi, oligosaccaridi e polisaccaridi. Tra i monosaccaridi il glucosio e il fruttosio sono quelli più rappresentati, dal 3-6% del peso secco della fava di cacao a seconda della varietà considerata. Con la fermentazione, all'interno delle fave gli zuccheri maggiormente presenti sono fruttosio e saccarosio, seguiti da glucosio e stachiosio. La percentuale di questi zuccheri nel composto finito dipende dai microrganismi fermentativi e dalle varietà di cacao prese in considerazione [50]. Durante la fase di tostatura i due monosaccaridi, glucosio e fruttosio, scompaiono quasi completamente in quanto, insieme agli amminoacidi liberi presenti nella materia prima, vanno a innescare la reazione di Maillard, risultando di fondamentale importanza per la formazione di precursori dell'aroma e per la generazione di melanoidine, composti responsabili del colore marrone delle fave di cacao. Invece, altri zuccheri non riducenti (saccarosio, raffiniosio, stachiosio e verbascosio) non diminuiscono. Tra i polisaccaridi presenti all'interno delle fave di cacao quelli maggiormente rappresentati sono la cellulosa (9%) e l'amido (3-7%). La frazione fibrosa



comprende anche galattani, pentosani, poligalatturonidi ed è concentrata principalmente nella buccia [49; 59].

La fase della tostatura determina un riarrangiamento della frazione glucidica e proteica nel prodotto finito, comportando la un significativo aumento della “*lignina di Klason*”, questa frazione è rappresentata da lignina e da complessi proteine/tannini [51].

### ***Micronutrienti***

Le vitamine presenti nel cacao sono idrosolubili e liposolubili. Tra le vitamine idrosolubili ricordiamo la tiamina (vitamina B1), la riboflavina (vitamina B2), la niacina (vitamina B3 o PP), l'acido pantotenico (vitamina B5), il piridossalfosfato (vitamina B6) e l'acido ascorbico (vitamina C); tra le liposolubili la vitamina E, con spiccate capacità antiossidanti, e la vitamina A [50]. La presenza di oligoelementi nel cacao è significativa nel determinare gli effetti antidepressivi potenziali del cioccolato: in particolare il potassio è il più abbondante seguito dal magnesio che riveste un ruolo importante, specie in associazione con la 2-feniletilammina. Anche il ferro è presente in discreta quantità, soprattutto nel cacao in polvere. Sono ben rappresentati anche rame e manganese. La quantità di rame nel cacao aumenta con i tempi di stoccaggio e con la fermentazione dei semi, mentre il contenuto di magnesio e potassio si riduce [60]. Il cacao, nonostante non sia un alimento particolarmente allergizzante, risulta ricco di nickel, metallo in grado di scatenare allergia in individui predisposti [15]. Gli acidi organici rappresentano l'1,2%-1,6% del cacao fermentato e vengono prodotti principalmente a partire dagli zuccheri durante il processo di fermentazione. Nel seme giunto a maturazione ottimale, gli acidi predominanti sono acido citrico e acido ossalico, piccole quantità di acido malico, acetico e formico. La loro presenza riduce il pH intorno a valori compresi tra 4.5-5.5, favorendo così le reazioni enzimatiche fondamentali per il processamento delle fave di cacao. Inoltre, le successive fasi di essiccazione e di tostatura riducono il contenuto degli acidi volatili (come gli acidi acetico, 2-metilpropanoico, 3-metilbutanoico ed esanoico), nonché requisito fondamentale per lo sviluppo del piacevole aroma che caratterizza il prodotto finito [61]. Nel caso in cui si verificasse un'essiccazione rapida, questi acidi volatili permarrrebbero nella fava, determinando un *off-flavor* per il cacao e i suoi derivati (Beckett, 2009).

### ***Composti bioattivi***

I composti bioattivi contenuti all'interno del cacao e del cioccolato fanno sì che questo alimento rientri nella categoria degli "alimenti nervini", ossia quegli alimenti che hanno la capacità di agire sul sistema nervoso centrale. Tra queste sostanze il cioccolato contiene:

- gli *alcaloidi purinici* come la caffeina, la teobromina e teofillina, rappresentano circa il 4% della composizione totale della fava di cacao e la loro composizione varia in base alla varietà genotipica del cacao. La teobromina, da cui deriva il nome *Theobroma*, è l'alcaloide maggiormente presente (2-3%), mentre la caffeina è presente in quantità pari a circa lo 0,2% mentre la teofillina è presente in tracce. La loro presenza conferisce al cacao il tipico sapore astringente e la palatabilità caratteristica. Inoltre, il processo di lavorazione e trasformazione delle fave di cacao può incidere sulla composizione e degli alcaloidi purinici nel prodotto finito, infatti le fasi che incidono maggiormente sono: la fermentazione, in cui si ha la diffusione delle metilxantine nella buccia; la tostatura, in cui la caffeina e la teobromina formano degli addotti con le pirazine contribuendo al sapore astringente della fava di cacao e la fase di alcalinizzazione e concaggio in cui la concentrazione di metilxantine decresce fino al 20%. Infine, il contenuto di metilxantine varia anche in base alla tipologia di cioccolato (fondente, al latte, gianduia, etc.). Dallo studio di Calderón-Garcidueñas et al. (2013) [62] è emerso che il cioccolato fondente sia costituito da una quantità maggiore di metilxantine (5-7 mg/g di teobromina e 0,625-0,875 mg/g di caffeina) rispetto a quello al latte (1 mg/g di teobromina e 0,056 mg/g di caffeina).
- le *ammine biogene* (AB) sono molecole basiche che si originano dalla decarbossilazione microbica degli amminoacidi liberi e delle proteine presenti all'interno degli alimenti. I microrganismi presenti negli alimenti in grado di produrre ammine biogene sono rappresentati principalmente dalle *Enterobacteriaceae*. Tra le AB quelle che si ritrovano principalmente negli alimenti fermentati e in un avanzato stato di degradazione sono: tiramina, triptamina, istamina e 2-feniletilamina. Altre ammine biogene come le poliamine spermina, spermidina, putrescina e cadaverina possono potenziare sinergicamente gli effetti delle monoamine. L'assunzione di adeguate quantità di AB con gli alimenti o l'assunzione simultanea con farmaci può comportare l'inibizione degli

enzimi deputati al loro catabolismo (monoamminossidasi, MAO; diaminossidasi, DAO) provocando conseguentemente rossore al viso, mal di testa, brusche variazioni della pressione sanguigna, fino a morte per shock cardiocircolatorio [63-64]. Il cacao, pertanto, come tutti gli alimenti fermentati può contenere monoammine in particolare 2-fenilettilamina, tiramina e triptamina. Nella fase di tostatura del cacao si può osservare un aumento significativo della concentrazione delle AB, probabilmente determinato dalla decarbossilazione termica degli amminoacidi liberi [43]. La 2-fenilettilamina, rappresenta circa il 46% delle AB totali nelle fave di cacao e conseguentemente nel cioccolato, è un'ammina -che ha struttura simile alle amfetamine con cui condivide in parte gli effetti neurofarmacologici, legandosi agli stessi recettori neuronali. Questa AB può facilitare gli effetti della dopamina e della noradrenalina, favorendo la veglia e ritardando gli effetti della fatica; quindi, agisce sul sistema nervoso centrale (SNC) come le catecolamine. Inoltre, all'interno del cioccolato si è riscontrata una buona presenza di serotonina, Ab con funzione di neurotrasmettitore e vasocostrittore svolge numerose funzioni fisiologiche come modulazione dello stress, umore e appetito, regolazione della contrazione muscolare e della pressione sanguigna. La serotonina contribuisce alla bio-attività del cacao e del cioccolato in sinergia con le altre ammine biogene [65-66].

- *Anandamide* è un lipide endogeno in grado di legarsi al recettore dei cannabinoidi CB1, produrre effetti euforizzanti e migliorare le funzioni cognitive quali l'apprendimento e la memoria [67].
- *Tetraidroisochinoline* sono costituite da salsolinolo e salsolina, alcaloidi dopaminergici che hanno un effetto di inibizione delle monoamminossidasi (MAO), della tiroxina idrossilasi e del rilascio dell'endorfina con effetto antidepressivo e di dipendenza "psicologica" [53].
- *Tetraidro- $\beta$ -carboline (TH $\beta$ C)* sono alcaloidi indolici naturali, prodotti da indolamine e aldeidi e/o  $\alpha$ -chetoacidi, i cui precursori sono L-triptofano, serotonina e triptamina. Le TH $\beta$ C, identificate in condizioni fisiologiche nei tessuti e nei fluidi umani, potrebbero avere un ruolo come neuro-modulatori con funzione di inibizione delle monoamminossidasi (MAO), di riconoscimento dei recettori benzodiazepinici e di modulazione di up-take e rilascio di serotonina. Grazie alla loro capacità di modulare, le MAO potrebbero interagire con l'azione di alcune

ammine biogene presenti nel cioccolato, in particolare la 2-feniletilamina ( $\beta$ -Pea) [53; 67].

- *Clovamide* e *deossiclovamide* sono molecole presenti nel liquor di cacao, con una struttura chimica simile all'acido rosmarinico e con una spiccata attività antiossidante. Quest'ultima è paragonabile a quella dell'acido ascorbico e dell' $\alpha$ -tocoferolo e, in relazione agli altri composti con capacità antiossidante, quella della clovamide risulta essere più persistente nel tempo e con una maggiore attività.

### ***Fattori antinutrizionali***

Alcuni composti chimici del cacao, definiti “minori”, presentano una valenza antinutrizionale ossia che interferisce con l'assorbimento dei nutrienti e in alcuni casi, anche tossicologica. Questi fattori sono in parte degradati nella fase di fermentazione e di essiccamento e, in modo rilevante, dai trattamenti termici a cui le fave di cacao sono sottoposte per essere trasformate in cioccolato e derivati. I maggiori fattori antinutrizionali che si sono evidenziati nel cacao e conseguentemente nel cioccolato sono:

- *polifenoli*, sono molecole ad azione bivalente sia positiva, in quanto correlata alla loro capacità antiossidante, antiradicalica, antimicrobica e antifungina, sia potenzialmente negativa, poiché essi limitano la biodisponibilità di proteine ed enzimi (in particolare per l'azione precipitante dei tannini) e interferiscono con l'assorbimento del ferro ed altri micronutrienti. Nelle fave di cacao i polifenoli si ritrovano principalmente nei tessuti dei cotiledoni, Le fave di cacao non fermentate sono costituite per il 12-18% (rispetto al peso secco) da polifenoli. Le tre principali classi sono: le catechine (o *flavan 3-oli*) (37%), le antocianine (4%) e le pro-cianidine (58%). Le catechine (rappresentanti circa il 29-38% dei polifenoli totali) sono: epicatechina, catechina, epigallocatechina, galocatechina; le antocianine sono invece costituite dalle leucoantocianine L1, L2, L3, L4, 3-alfa-L-cianidina arabonoside. Infine, le proantocianidine sono presenti, nei semi di cacao, sotto forma di dimeri, trimeri e oligomeri di flavan-3,4-dioli [49; 68; 69]. Altri polifenoli presenti in minori quantità sono: i flavoni (apigenina, luteolina, kaempferolo) e acidi fenolici (acido caffeico, acido clorogenico, acido cumarico e ferulico) [70]. Durante le fasi di trasformazione delle fave di cacao, i polifenoli sono coinvolti in complesse reazioni chimiche che risultano essere fondamentali per la formazione dell'aroma e del colore marrone delle fave di cacao [71]. Tuttavia, la lavorazione delle fave di cacao e la loro trasformazione in cioccolato, può comportare una riduzione notevole del contenuto in

polifenoli nel prodotto finito [72; 73]. In particolar modo la fermentazione può ridurre del 90% la concentrazione di catechine. Propriamente le antocianine vengono convertite in pseudo-basi incolori, le catechine subiscono un'oligomerizzazione non enzimatica e le proantocianidine vengono convertite in forme più complesse. In generale, queste reazioni riducono il sapore astringente e amaro della fava e ne accentuano il tipico colore marrone. Oltre a ciò, la presenza di lieviti, batteri lattici (LAB), batteri acetici (AAB) durante la fermentazione, influenza positivamente il contenuto di polifenoli e lo sviluppo di precursori dell'aroma; mentre, la presenza di spore e muffe aerobiche ha un effetto negativo per la qualità e quantità di polifenoli e per le generali caratteristiche organolettiche del cioccolato [71; 74]. Altra fase del processo di trasformazione che incide sul contenuto finale di polifenoli è l'essiccazione, in cui il contenuto in polifenoli decresce significativamente in relazione all'imbrunimento enzimatico, determinato dall'azione della polifenolossidasi (PPO); e la tostatura che operando ad elevate temperature degrada parte delle molecole termolabili. L'alcalinizzazione causa una progressiva riduzione sia del contenuto totale dei polifenoli (circa 64%) che della loro attività antiossidante [75]. Un alto grado di alcalinizzazione induce ad una pronunciata diminuzione di epicatechine (fino al 98%), catechine (fino all'80%) e altri composti fenolici; tali cambiamenti possono essere correlati alle reazioni di ossidazione e polimerizzazione dipendenti dalle condizioni di pH alcalino, previste dal processo [71; 74]. Mentre, nella fase di concaggio si assiste ad una progressiva perdita dei polifenoli volatili (fino all'80%), che evaporano assieme all'acqua e agli acidi grassi a catena corta (SCFAs). Inoltre, l'ossidazione dei tannini e la formazione di complessi molecolari tra polifenoli, amminoacidi, peptidi e proteine risultano essere determinanti per il colore ed il flavor finali del cioccolato [68; 72].

- *acido fitico* è un composto antinutrizionale in grado di limitare l'assorbimento a livello intestinale dei cationi come  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , complessandoli in sali insolubili. Sia i tannini che l'acido fitico diminuiscono con i trattamenti termici e con l'aumentare dei tempi di tostatura delle fave [75].

- *acido ossalico* è un fattore in grado di limitare l'assunzione di micro o macro-elementi (come il calcio), formando ossalati insolubili. Il cacao in polvere ne contiene una discreta quantità, variabile dallo 0,3% allo 0,5%. Alimenti che presentano buone concentrazioni di ossalati possono inibire l'assorbimento di calcio [76].

- *acido clorogenico* identifica una classe di composti fenolici acidi il cui maggior rappresentante è l'acido 5-caffeoil-chinico. La quantità totale di acido clorogenico nella

fava di cacao varia dagli 8,8 ai 17,5 mg/kg in relazione alla varietà e risulta essere sensibilmente ridotta dai trattamenti termici di tostatura. L'azione anti-nutrizionale è dovuta alla reazione dei chinoni – che si formano dall'acido clorogenico per opera della polifenolossidasi – con le proteine; si verifica quindi una progressiva diminuzione della biodisponibilità di amminoacidi (come lisina, cisteina e metionina) e l'inibizione di diversi enzimi, tra cui alcuni determinanti per la digestione [77].

- *acido caffeico* libero (in parte derivante dall'idrolisi dell'acido clorogenico) è un fattore antinutrizionale in grado di limitare l'azione e la biodisponibilità della vitamina B<sub>1</sub> (tiamina) [78].

- *inibitore della tripsina* questo composto è una proteina che ha una forte analogia con la tripsin-inibitore della soia. Questa proteina è un inibitore della tripsina tipo Kuniz, che è attivo su tripsina, chimotripsina e su  $\alpha$ -amilasi. Questo composto si pensa venga sintetizzato per difendere le cabossidi di cacao dai patogeni. L'attività di questa proteina persiste anche in fave torrefatte, tuttavia la quantità di inibitore della tripsina assunta con il cioccolato e derivati non è comunque significativa per determinare effetti nocivi sull'uomo [60-79].

### **3.2. Il Tè**

Il tè (tea o thè) è una bevanda largamente bevuta e diffusa a livello mondiale, viene considerato un *non nutritive dietary component* nonostante alcuni suoi derivati possano apportare calorie, come nel caso dei tè dolcificati o addizionati di altri ingredienti [80]. Questo alimento viene tradizionalmente consumato come infuso, ossia una bevanda ottenuta facendo macerare in acqua bollente erbe o spezie, procedimento finalizzato a estrarre da queste ultimi principi attivi, medicinali e aromatici; o decotto, è una bevanda a base di sostanze vegetali bollite in acqua. Ad oggi è diffuso anche sotto forma di bevanda fredda, in bottiglia, Tetrapak o altre tipologie di confezione. Il tè viene coltivato e utilizzato in Cina fin dall'antichità, prima di raggiungere l'occidente, il tè ha rivestito nel tempo diversi significati, identificandosi in materiale cerimoniale e medicamentosa. L'invenzione della bevanda del tè venne fatta risalire al primo imperatore cinese Shen Nung nel 2737 a.C., pertanto il tè viene considerato una delle bevande più antiche dell'umanità. La cultura del tè si diffuse poi dalla Cina al Tibet, alla Corea e al Giappone soprattutto per opera dei monaci buddisti zen. In Europa la diffusione del tè avvenne intorno al 1500, ma è solo nel XVII che grazie alle grandi compagnie di navigazione inglesi e olandesi che questo alimento si fece largo sulle tavole europee e del mondo. La

caratteristica che contraddistingue il tè dagli altri alimenti nervini, in particolare caffè e cacao, è il suo alto consumo negli stessi Paesi produttori [15; 81]. La pianta del tè è un arbusto sempre verde; a livello botanico è conosciuto come *Camelia sinensis* o *Thea sinensis* appartenente alla famiglia delle Teaceae (Figura 3.3). Inizialmente si pensava che i differenti tipi di tè presenti in commercio, come il tè verde, nero e bianco, provenissero da specie differenti.



**Figura 3.3.** Pianta del tè (*Camelia sinensis*)

Tuttavia, i differenti tipi di tè derivano dalla differente lavorazione delle foglie della pianta *Camelia sinensis*. Ad oggi viene riconosciuta una sola specie botanica di tè a cui appartengono due differenti varietà [74]:

1. ***Sinensis*** caratterizzata da foglie piccole e coltivata in zone a basse temperature come la Cina, Giappone e il Tibet;
2. ***Assamica*** caratterizzata da foglie più grandi e coltivata in zone con climi più temperati come il nord est dell'India.

Da queste due varietà mediante adeguati incroci sono stati ottenuti ibridi e sottovarietà dalle caratteristiche peculiari. Le condizioni pedoclimatiche per la crescita della pianta del tè sono climi umidi; infatti, le piantagioni di tè si trovano generalmente nelle regioni tropicali e sub-tropicali. Se la crescita delle piante di tè avviene in modo spontaneo, la pianta può raggiungere i 15 m di altezza, tuttavia le piante coltivate vengono mantenute ad altezze che vanno da 1 a 1,5 m al fine di facilitarne la raccolta di foglie e germogli. Dopo la germogliazione delle piantine e la loro messa a terra, il primo raccolto si effettua circa dopo 4-5 anni e la loro vita produttiva raggiunge circa i 60 anni. La pianta di tè essendo una sempre verde non prevede periodo in cui non avviene la raccolta delle foglie e dei germogli. Tuttavia, la raccolta avviene a intervalli di 9-10 giorni quando i nuovi germogli cominciano a crescere e dura per circa 8-9 mesi l'anno. Le foglie del tè si

presentano lanceolate o ellittiche e sono ricoperte da peluria se giovani; mentre i germogli e le gemme sono ricoperti da una lanugine bianca chiamata *Pakho* [82-83]. La pianta presenta fiori bianchi che spesso si trovano isolati o in gruppi di massimo 2-3 fiori e sono formati da 5 petali ovali. Il tè presenta particolari *crus* che vengono classificate sulla base delle componenti organolettiche ed alle tipologie di produzione caratteristiche. Infatti, ogni Paese produttore possiede le sue specifiche *crus*, che derivano dai così detti “giardini del tè”. Spesso, sulla base delle diverse tipologie di lavorazione delle foglie di tè e delle tempistiche di lavorazione (raccolta, fermentazione, stop della fermentazione ed essiccazione), capita che lo stesso “giardino del tè” possa portare alla produzione di *cru* con caratteristiche diverse sulla base della stagione dell’anno [84]. In Tabella 3.4. sono riportate le *cru* di particolare pregio per Paese.

**Tabella 3.4.** Tipi di *cru* di pregio per Paese produttore

PAESE	CRUS
<b>Cina</b>	Yin Zhen (tè bianco); Pi Lo Chun, Lung Ching (tè verdi); Keeman, Jiangxi Imperial (tè neri); Lapsang Souchong (tè nero affumicato).
<b>Formosa (Taiwan)</b>	GunPowder Zhu Cha (tè verde con fogli appallottolati); Oolong Imperial, Grand Pouchong (tè semifermentati); Tarry Souchong (tè nero affumicato)
<b>India</b>	Darjeeling First flush, Second flush, Autumnal (tè neri); Assam First flush, Second flush (tè neri), Trovancore, Tarrai (tè neri)
<b>Giappone</b>	Gyokuro, Hojika, Sencha Honayama (tè verdi); Matcha Uji (tè verde in polvere)
<b>Ceylon (Sri Lanka)</b>	Berubeula, Allen valley (FOP, tè neri); Pettiagalla, Nuwara Eliya (OP, tè neri); Dyaaba (FP, tè nero); Uva Highlands (BOP, tè neri)
<b>Kenya</b>	Mariny (GFOP, tè nero)
<b>Turchia</b>	Rizè (OP, BOP, tè nero)
<b>Ecuador</b>	Aproandes (BOP, tè nero)

### **Classificazione**

Il tè prima di essere commercializzato viene classificato in relazione alla diversificazione della matrice che viene scambiata a livello mondiale. Diversi sono i parametri che vengono utilizzati per la classificazione merceologica, i principali sono riportati in Tabella 3.5. La classificazione delle foglie del tè viene fatta da esperti che le valutano in base all'aspetto e al tipo. Le due classi principali sono *leaf* (foglia intera) e *broken* (foglia spezzata) suddivise poi per sottocategorie. Generalmente, questa classificazione viene utilizzata per lo più per il tè nero. Rispetto all’origine i tè più pregiati provengono dalla



regione del Darjeeling (Himalaia) e dalle alture dello Sri Lanka. Il tè commerciale è venduto in miscele la cui preparazione viene effettuata da *tea tester o blenders* esperti che bilanciano le diverse caratteristiche e gli aromi delle diverse varietà e *cru*. Una volta classificato, il tè viene commercializzato in tutto il mondo. Per rendere il tè facilmente trasportabile questo subisce un processo di pressatura ottenendo così il “tè pressato”. Si dà alle foglie una forma a panetto solido, si cuociono prima a vapore e poi si pressano dandogli la forma a mattonella e in fine si lasciano essiccare. Quelle attualmente in commercio sono formate da tè in polvere messo sotto pressa idraulica a formare lastre del peso di circa 1 kg. Ci sono inoltre piccoli panetti a sette strati, tè in palline, a forma di nido e a tazza [84-85].

**Tabella 3.5.** Classificazione merceologica delle foglie di tè

<b>Classificazione Merceologica</b>	<b>Sottocategorie</b>	<b>Descrizione</b>
<b>Dimensione e stato di conservazione delle foglie (leaf)</b>	Flowery Orange Pekoe (FOP)	Queste foglie sono sottili, nerborute e presentano delle punte. Le foglie, o i boccioli, si presentano dorate o argentate hanno la caratteristica di contenere meno sostanze concianti e si scuriscono durante la fermentazione.
	Orange pekoe (OP)	La foglia è lunga e nerboruta, più grande del FOP. Le origini di questa classificazione si sono perse, ma il termine “Orange” viene dall’olandese “Oranje”, che vuol dire “regale”
	Pekoe (P) e Flowery Pekoe (FP)	Preparato con la terza foglia, queste foglie sono più corte e grossolane di quelle dell’OP, spesso sono più aperte e male arrotolate.
<b>Rottura/taglio delle foglie (broken)</b>	Broken Orange Pekoe (FBOP)	Sono pezzi di foglia spesso provenienti dalla lavorazione di tè FOP e OP; viene usato spesso per miscele.
	Broken Pekoe (BP)	Foglie leggermente più grandi del precedente e di qualità inferiore, viene usato per miscele.
	Broken Pekoe Souchong (BPS)	Foglie grandi di qualità scadente, usato solo per miscele.
<b>Uso di foglie di piccole dimensioni</b>	Orange Fannings (OF)	Tè realizzato con frammenti molto piccoli (1,5 mm) di foglie delle classificazioni precedenti. Questo tè è adoperato per lo più nelle miscele in bustina.
	Broken Orange Pekoe Fannings (BOPF)	
	Pekoe Fannings (PF)	
	Broken Pekoe Fannings (BPF)	
<b>Uso di polvere compressa o sfusa (dust)</b>	Red Dust o Pekoe Dust (RD)	Tè realizzati con frammenti inferiori al millimetro, pertanto, prendono l’addizione di “polvere”. Questi tè sono sati per bustine. Questo tipo di tè non viene commercializzato in Europa.
	Fine Dust (FD)	
	Golden Dust (GD)	
	Super Fine Dust (SFD)	

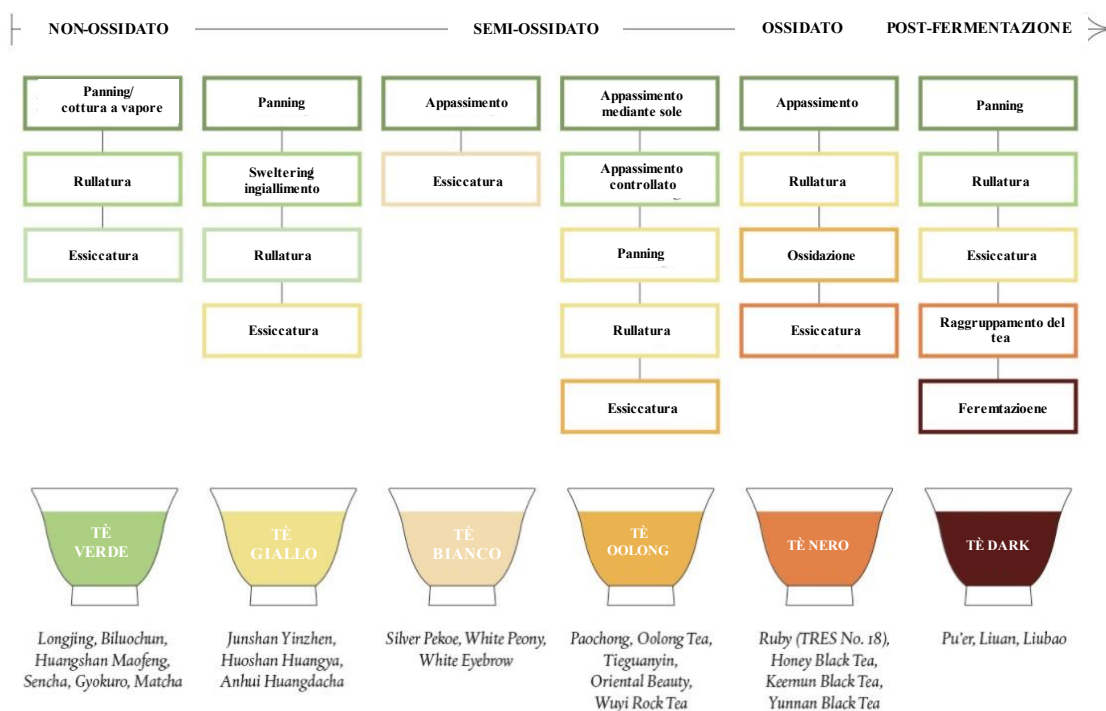
### 3.2.1. Processo produttivo del tè

Le fasi di produzione del tè variano sulla base del tipo di tè che si vuole ottenere. Infatti, esistono differenti tipologie di tè che vengono classificate in: tè nero, tè verde, tè Oolong o tè blu, tè giallo, tè bianco e tè dark (Figura 3.4) [86].



**Figure 3.4.** Immagini delle differenti categorie di tè (in alto, foglie secche; in basso, infusione di tè): (A) tè verde, (B) tè giallo, (C) tè bianco, (D) tè Oolong, (E) tè nero e (F) tè dark [86]

Ognuna delle tipologie di tè presenta caratteristiche di produzione specifiche, che ne determinano le peculiari componenti aromatiche e di composizione chimica (Figura 3.5). La lavorazione del tè si differenzia notevolmente da quella degli altri alimenti nervini, come cacao e caffè, in quanto la fase di essiccazione avviene prima della fermentazione [87].



**Figura 3.5.** Processo di produzione dei principali tipi di tè

Seppure ogni tipo di tè presenta specifiche fasi di produzione, alcune di esse sono comuni per tutti i tipi di tè [81; 83; 88-89]:

- **Raccolta:** le foglie di tè e i germogli, che comprendono una gemma terminale e due foglie giovani, sono raccolti dai cespugli di *Camellia sinensis* due volte l'anno, durante l'inizio della primavera e all'inizio dell'estate o in tarda primavera. In autunno o in inverno la raccolta di germogli di tè è molto meno comune, anche se si può effettuare ugualmente quando il clima lo permette. La raccolta viene fatta a mano quando è necessario un tè di qualità superiore o quando i costi della manodopera non sono proibitivi. A seconda dell'abilità del raccoglitore, la raccolta a mano viene eseguita tirando il germoglio con uno strappo netto. Tuttavia, i germogli e le foglie di tè possono anche essere raccolti a macchina, anche se questa procedura provocherà una maggiore rottura sia delle foglie che dei germogli, riducendone la qualità. Tuttavia, è stato anche dimostrato che la raccolta a macchina in periodi di raccolta correttamente temporizzati può produrre buone foglie per la produzione di tè di alta qualità.
- **Appassimento:** Le foglie di tè inizieranno ad appassire subito dopo la raccolta, con un graduale inizio di ossidazione enzimatica. L'appassimento è usato per rimuovere l'acqua in eccesso dalle foglie e fa sì che inizi in modo molto leggero

l'ossidazione. Questa fase può avvenire ponendo le foglie sotto il sole o lasciandole in una stanza fresca e ventilata per estrarne l'umidità. Le condizioni appropriate per l'appassimento, come la temperatura e l'umidità relativa, non sono facilmente definite in letteratura poiché possono variare a seconda del clima, della regione di produzione e del tipo di processo usato. In questa fase, le foglie perdono circa più di un quarto del loro peso in acqua. Questa fase del processo è anche importante nel promuovere l'idrolizzare le proteine della foglia in aminoacidi liberi e aumentare la disponibilità di caffeina libera, questa trasformazione chimica va ad incidere sul gusto e aroma del tè.

- *Disruption*: questa fase è conosciuta nell'industria occidentale del tè come *interruzione* o *macerazione* fogliare, i tè sono schiacciati o strappati per promuovere e accelerare l'ossidazione. Le foglie possono essere leggermente ammaccate sui loro bordi scuotendo e schiacciandole in un vassoio di bambù o roteando le foglie all'interno di cesti. Una più ampia *disruption* delle foglie può essere fatta impastando, rotolando, strappando e schiacciando le foglie e i germogli mediante l'uso di macchinari. Questa procedura consente di rompere le strutture cellulari della foglia permettendo così la liberazione degli enzimi ossidativi che entrano in contatto con vari substrati, il che permette l'inizio dell'ossidazione. Questo processo rilascia anche alcuni dei succhi della foglia, che possono aiutare l'ossidazione e cambiare il profilo del gusto del tè.
- *Ossidazione*: nell'industria del tè il processo di ossidazione viene talvolta indicato erroneamente come fermentazione. Per i tè che richiedono l'ossidazione (tè bianco, tè Oolong, tè nero e tè dark), le foglie vengono lasciate da sole in una stanza a clima controllato. Questa fase può essere accompagnata da macchinari che agitando le foglie le fanno areare. In questo processo la clorofilla nelle foglie viene enzimaticamente scomposta, e i tannini vengono rilasciati e trasformati; tutte queste trasformazioni che avvengono all'interno della foglia di tè consentono di determinarne l'aroma e il colore. Il produttore di tè può scegliere quando fermare l'ossidazione, questo dipende dalle qualità desiderate nel tè finale e dalle condizioni climatiche (calore e umidità) della stanza in cui le foglie di tè sono messe a ossidare. Lo stato di ossidazione dei tè varia a seconda del tipo che si vuole ottenere, per esempio per i tè Oolong leggeri il grado di ossidazione può andare dal 5-40%, nei tè Oolong più scuri varia tra il 60% e 70%, mentre nei tè neri l'ossidazione raggiunge il 100%. A seconda del tipo di tè desiderato, la sotto

o la sovra-ossidazione può portare alla formazione di aromi non desiderati, come quelli di erba.

- *Fissazione/kill-green*: Il kill-green o shāqīng (殺青) è la fase che consente di fermare l'ossidazione delle foglie di tè ad un livello desiderato a seconda del prodotto finito che si vuole ottenere. Questo processo è realizzato riscaldando moderatamente le foglie di tè, disattivando così gli enzimi ossidativi e rimuovendo i profumi indesiderati nelle foglie, senza danneggiare il sapore del tè. Tradizionalmente, le foglie di tè sono passate all'interno di un wok o al vapore, ma ad oggi si sono sviluppati nuovi progressi tecnologici come il *kill-green* costituito da *cottura* o *panning* in un tamburo rotante. In alcuni tè bianchi e alcuni tè neri come i neri “*crush, tear, curl*” (CTC), il kill-green è fatto contemporaneamente all'essiccazione.
- *Swelting/ingiallimento*: è un processo che viene effettuato solo per i tè gialli. Le foglie di tè calde e umide dopo la fase *kill-green* sono leggermente riscaldate in un contenitore chiuso, che causa il viraggio di colore delle foglie precedentemente verdi, che virano ad un colore più giallo. Le foglie così ottenute producono una bevanda che ha una caratteristica tonalità giallo-verde dovuta alle trasformazioni della clorofilla della foglia.
- *Arrotolamento/modellatura*: in questa fase le foglie di tè umide vengono arrotolate formando delle strisce rugose, questo passaggio viene fatto a mano o utilizzando una macchina che avvolge le foglie di tè su sé stesse. Questa fase consente di sprigionare gli oli essenziali e i succhi all'interno delle foglie, che consente di migliorare ulteriormente il gusto del tè. Alle strisce di tè così ottenute possono quindi essere trasformate in altre forme, come essere arrotolate in spirali, impastate o legate in forme sferiche o coniche o date altre forme elaborate. In molti tipi di tè Oolong, le strisce arrotolate di foglie di tè vengono poi arrotolate in sfere o mezzefere e questo è tipicamente fatto mettendo le foglie umide in grandi sacchi di tela, che vengono poi impastati a mano o a macchina. Il tè può anche essere pressato in mattoni attraverso l'uso di pietre pesanti o presse.
- *Essiccazione*: questa fase viene fatta per ultimare la fase di trasformazione del tè. Questo può essere fatto in numerosi modi, tra cui il *panning*, l'esposizione al sole, l'essiccazione all'aria o la cottura. La cottura è di solito la più comune.

L'essiccazione del tè è responsabile della formazione di molti nuovi composti del sapore e aroma nei tè, in particolar modo per i tè verdi.

- *Invecchiamento/stagionatura*: questa fase del processo produttivo del tè non sempre è richiesto. Tuttavia, alcuni tè necessitano di un ulteriore invecchiamento, fermentazione o cottura per raggiungere il loro potenziale di consumo. Per esempio, un tè verde puerh, prima di essere trasformato in un tè post-fermentato, è spesso amaro e aspro nel gusto, ma diventa dolce e morbido attraverso la fermentazione per invecchiamento o umidità. Inoltre, l'Oolong può beneficiare dell'invecchiamento se cotto su carbone. I tè aromatizzati sono prodotti in questa fase spruzzando il tè con aromi e sapori o conservandoli con i loro aromi.
- *Selezione*: questa fase del tè può aiutare a rimuovere le impurità fisiche, come gambi e semi. L'uso di attrezzature di smistamento per migliorare l'efficienza della produzione di tè è molto comune negli impianti di lavorazione del tè, soprattutto nella lavorazione del tè nero. Un selezionatore di colore può anche essere utilizzato per classificare i gradi del prodotto finale in base al colore e alla forma.

### ***Tè nero***

Per ottenere il tè nero, anche detto tè rosso, le foglie, raccolte al giusto punto di maturazione, vengono appassite in camere apposite così da ridurre l'umidità di circa il 55-65%. Questo procedimento è importante poiché evita che le foglie, appassite ma non essiccate, si rompano durante le successive fasi di lavorazione. A questo punto, le foglie vengono arrotolate; questo passaggio è fondamentale poiché porta alla rottura delle pareti e delle membrane cellulari in modo tale da far fuoriuscire gli oli essenziali e i sistemi enzimatici, questi ultimi responsabili dell'ossidazione dei composti precursori dell'aroma del tè [16; 90].

La fase successiva è rappresentata dalla fase di essiccazione (4-18 ore) che determina una riduzione del 50% del loro peso. Le foglie, a questo punto vengono trattate, con molta cura, con dei rulli che contribuisce alla distribuzione dei sistemi enzimatici nello strato delle cellule epiteliali. Questa fase è seguita da una vera e propria macerazione in rulli sottopressione al fine di mettere a contatto gli enzimi con il substrato. A questo punto segue la fase più delicata, la fermentazione. Le foglie sono disposte in strati sottili (5-7 cm) su lastre di cemento, vetro o alluminio, ad una temperatura di 28°C in ambienti umidi per 1-3 ore. Modificando il grado di umidità nella fase di fermentazione, si possono ottenere tè neri dal colore e dall'aroma diversi. Ottenuto il grado di fermentazione

ottimale, per il tè nero, questa viene bloccata termicamente. A questo punto, le foglie arrotolate e fermentate assumono un colore rosso-rame e, dopo un'ulteriore essiccazione (cottura a fiamma a 87-93°C per 20-30 minuti, per portare l'umidità al 3%) assumono il tipico colore bruno-nero. Quest'ultima essiccazione/cottura fissa il colore e l'aroma finale del tè nero. In alcune grandi aziende produttive (India e Sri Lanka) si utilizzano sistemi automatizzati che velocizzano le fasi prima della fermentazione. Molti cru (varietà) di tè cinesi vengono affumicati, processo che consente di ottenere particolari aromi e profumi caratteristici di questa classe di prodotti [81].

Terminate le varie fasi di lavorazione, il tè viene impacchettato e commercializzato, ma prima miscelato a prodotti di altre aziende o persino di altre zone produttrici. Infatti, per garantire la costanza di aroma e qualità si ricorre al blending; in quanto i tè di una singola piantagione possono subire variazioni di gusto e qualità da un anno all'altro a seconda delle condizioni della stagione e talvolta anche del processo produttivo. La miscelazione del tè è un'arte effettuata da esperti miscelatori, tea blenders, che assaggiano centinaia di tè al giorno alla ricerca delle componenti necessarie per formare una particolare miscela (i tipi di tè per la miscela possono variare da 15 a 35). La miscelazione avviene all'interno di grandi recipienti, successivamente il tè viene confezionato in bustine, sacchetti o barattoli. Le fasi relative al confezionamento e commercializzazione sono uguali per tutti i tipi di tè [84; 89].

### ***Tè verde***

Per la produzione del tè verde, al contrario del tè nero, i fenomeni fermentativi e ossidativi sono fattori avversi che devono essere evitati. Più giovani e fresche sono le foglie utilizzate e migliore sarà la qualità del tè ottenuto. Le foglie una volta appassite vengono direttamente cotte a vapore (in padella o a fiamma) per inattivare gli enzimi responsabili della fermentazione. A questo punto si possono ottenere tè verde cinese o giapponese in base a 2 diversi metodi di preparazione. Nel giapponese, le foglie sono trattate con vapore fluente a 95°C, poi raffreddate ed essiccate, successivamente arrotolate a temperatura tra i 75-80°C. Nel tè giapponese in polvere le foglie vengono successivamente sminuzzate, riessiccate e polverizzate[91; 92].

Nel cinese, invece, il tè viene messo in un impianto di torrefazione (senza fumo), in seguito le foglie vengono arrotolate ed essiccate. Come per il tè nero, terminate le varie fasi di lavorazione il tè viene impacchettato e commercializzato [81; 90].

### ***Tè Oolong***

Il tè Oolong, anche detto tè blu, è un tipo di tè semiossidato. In questo tipo di tè le foglie vengono istantaneamente fatte appassire al sole e successivamente agitate in ceste affinché i bordi si frantumino. Mentre la foglia lasciata ad appassire ingiallisce, i bordi diventano rossastri grazie alla reazione con l'ossigeno delle sostanze chimiche rilasciate dalle foglie durante l'ossidazione. La fase successiva prevede di trattare le foglie con il calore (fase di fissazione) e poi vengono arrotolate, questa procedura cambia sulla base del tipo di Oolong che si vuole ottenere ed essiccate. Si possono ottenere tè Oolong con caratteristiche molto diverse, questo avviene in base al grado di ossidazione delle foglie, al tipo di manipolazione a cui sono sottoposte dopo il trattamento termico e alla tostatura finale che subiscono. Il grado di ossidazione dei tè Oolong varia dal 10% all'80%. Tra i più noti tè Oolong vi sono: Da Hong Pao, Shui Jin Gui, Tieluohan, Bai Jiguan, Huangjin Gui e Pouchong [86; 93].

### ***Tè bianco***

Il tè bianco, è un tipo di tè parzialmente ossidato, è una specialità di alto valore economico non largamente consumata e conosciuta in Occidente, in particolar modo in Cina nella provincia del Fujian. Si prepara raccogliendo i germogli e le prime foglie, che prima di essere leggermente lavorate vengono lasciate essiccare alla luce naturale del sole, così da prevenirne l'ossidazione [37; 86].

### ***Tè giallo***

Il tè giallo anche detto yellow tea è un tipo di tè che viene prodotto mediante un metodo di lavorazione che risulta molto simile a quello del tè verde, con l'aggiunta della fase di ingiallimento delle foglie. Per la produzione di tè giallo, le foglie vengono sottoposte a processo di "stabilizzazione", ossia un trattamento termico che prevede un rapido riscaldamento che può essere ottenuto con calore secco (tostatura) oppure calore umido (vaporizzazione), in questo modo si vanno ad inibire gli enzimi responsabili dell'ossidazione. Successivamente, le foglie trattate con calore, vengono lasciate riposare con il calore e l'umidità residue, processo noto come "*postfermentazione*". Il tè giallo è un tè leggermente postfermentato, che presenta un grado di ossidazione molto basso che lo avvicina nelle qualità nutrizionali ed organolettiche al tè verde. Il tè giallo è una varietà piuttosto rara e costosa, prodotta solo in alcune aree della Cina [94-95].



### ***Tè dark***

Il tè dark o tè post-fermentato o tè fermentato è un tipo di tè che subisce i processi di ossidazione da diversi mesi a molti anni. In questo tipo di tè i processi di ossidazione prolungati in cui le foglie sono sottoposte a umidità e all'ossigeno per lunghi periodi di tempo portano a endo-ossidazione, che avviene ad opera degli enzimi presenti all'interno delle foglie di tè, ed eso-ossidazione che avviene ad opera di microrganismi. La fermentazione prolungata porta pertanto a scurire le foglie che assumono il caratteristico colore nero. I vari tipi di tè fermentati sono anche indicati come tè dark, da non confondere con il tè nero. Il tè fermentato più famoso è il Pu-erh prodotto nella provincia dello Yunnan in Cina [96-97]. L'ossidazione prolungata delle foglie di tè ne altera le caratteristiche chimico-fisiche, influenzando sulle qualità organolettiche del tè che se ne ricava. La fase di ossidazione, infatti, agisce sull'odore del tè e in genere ne addolcisce il gusto, riducendo l'astringenza e l'amarezza e migliorando la sensazione in bocca e il retrogusto. Inoltre, i processi di ossidativi che avvengono ad opera di microrganismi, in particolar modo muffe (*Aspergillus niger*, *Aspergillus iuchuensis*, etc.), presenti sulle foglie al momento della raccolta, possono produrre metaboliti che migliorano le caratteristiche chimico/nutrizionali del tè, con benefici per la salute. Seppure, è noto che i tè sono consumati principalmente come infusi e decotti, alcuni tipi di tè dark vengono consumati come alimenti. Nello specifico, nello Stato Shan, in Myanmar, il *lahpet* è una forma di tè fermentato che viene consumato come verdura, e simili tè in salamoia vengono consumati anche nel nord della Thailandia e nel sud dello Yunnan [92; 96].

### ***Altri tipi di tè***

In commercio sono ad oggi presenti anche tè aromatizzati, ossia tè rielaborati che nella maggior parte dei casi hanno come base un tè verde, un tè nero o un tè Oolong, a cui vengono aggiunti dei fiori o frutti essiccati che vanno a conferire il piacevole profumo e aroma. Questi tipi di tè sono prodotti in tamburi rotanti, mediante dispersione dell'essenza o dell'olio essenziale aromatico. In alcuni casi vi è l'ulteriore aggiunta di scorze di frutti, petali di fiori. etc. In Cina si adoperano tre differenti metodi per designare i tè aromatizzati: o con il nome del fiore che è stato aggiunto, o aggiungendo il prefisso Hua, che significa "fiore", al nome del tè aromatizzato, o con il nome del frutto usato per aromatizzare il tè. In Europa, i *blenders* usano solitamente il nome del frutto, fiore o

spezie aggiunti al tè grezzo o un nome commerciale. Alcuni esempi di tè aromatizzati sono [98-100]:

- *tè al gelsomino*: viene prodotto in Cina, soprattutto nella provincia del Fujian e Taiwan. I fiori di gelsomino vengono posizionati accanto al tè durante le fasi di lavorazione, il tè impiegherà 4 ore affinché assorba il profumo. Frequentemente, l'operazione viene ripetuta 2 o 3 volte per le varietà di minor pregio allargando e poi riammucchiando il tè; mentre nel caso delle varietà superiori si arriva fino a 7. A questo punto le foglie vengono riscaldate un'altra volta per eliminare l'umidità dai fiori e del tè. In questa fase i fiori di gelsomino possono essere allontanati oppure mescolati alle foglie di tè per conferirgli un aspetto più gradevole.

-*tè alla litchi*: il Litchi Hongcha è un tè nero aromatizzato al succo di litchi, detto anche prugna cinese, che gli conferisce un gusto aspro, quasi citrico.

-*tè all'orchidea*: prodotto con tè verde della provincia di Guangdong e viene aromatizzato con i fiori del *Chloanthus spicatus* e dà un tè rosso brillante molto aromatico.

-*Rose Congou*: il Meigui Hongcha è un tè nero a foglia grande aromatizzato con petali di rosa. Si ottiene un tè leggermente dorato dal gusto delicato e dolce e dall'aroma profumato.

Oltre a questi vi sono numerose nuove varietà di tè aromatizzati, fra cui forse i più comuni sono quelli a base di ribes nero, ciliegia, agrumi, zenzero, scorza di limone, mango, menta, scorza d'arancia, frutto della passione e frutti di bosco. In Europa l'uso di aromi di sintesi per la produzione di tè aromatizzati è vietato. Il più celebre fra i tè aromatizzati è la miscela "Early Grey" al bergamotto (*Citrus medica*) molto utilizzato anche in Italia. Altri tè aromatizzati sono la "miscela alla russa", aromatizzata agli agrumi ed il tè al Gelsomino, preparato aggiungendo fiori al gelsomino. Un altro tipo di tè, immesso sul mercato negli anni '80, per soddisfare quella fascia di consumatori che non desiderano assumere la teina, è il decaffeinato. Per poter eliminare la caffeina dalle foglie del tè si utilizza un metodo chiamato decaffeinizzazione, che consiste nel bagnare le foglie fermentate con una soluzione di acqua deionizzata e cloruro di metilene, che può essere sostituito da biossido di carbonio o acetato etilico. Successivamente, l'estrazione della caffeina avviene tramite soxhlet, procedimento semplice ed economico, che consente la totale evaporazione del cloruro di metilene, in due stadi: nel primo legato all'alcaloide e nel secondo in assenza, così da ottenere la caffeina in forma solida. La caffeina così ottenuta viene utilizzata oltre che dall'industria farmaceutica anche dall'industria alimentare per la produzione di bevande, come la pepsì e la cola, in cui sono presenti

questi composti. Un'altra tipologia di tè è il tè solubile; la bevanda si ottiene mettendo in infusione le foglie, ad una temperatura e tempo prestabilito, che poi verranno rimosse. Successivamente la bevanda viene trattata in modo da ottenere un prodotto solido. Il trattamento avviene attraverso tre procedimenti diversi: per evaporazione dell'acqua con trattamento termico, per concentrazione a freddo, in cui l'infuso viene parzialmente congelato e le particelle separate, per filtrazione attraverso membrane che fanno passare l'acqua trattenendo le particelle solide del tè. A questo punto la sostanza solida viene essiccata e poi impacchettata in imballaggi resistenti all'umidità. Agli inizi degli anni 90 l'industria del tè americana lanciò sul mercato il primo tè pronto da bere. Da allora diversi produttori hanno dato vita a bibite a base di tè, gassate o meno, addizionate o meno con limone, lampone o pesca, zuccherate e vendute direttamente in bottiglie o in lattine [84;101].

### **3.2.2. Composizione chimica**

La composizione chimica media delle foglie di *Camelia Sinensis* può variare in funzione alla tecnologia di trasformazione a cui le foglie sono sottoposte. In Tabella 3.6. sono riportata la composizione chimica delle foglie dei principali tè presenti in commercio. Le caratteristiche sensoriali (gusto, aroma e corpo della bevanda) e le proprietà funzionali dei tè sono influenzate dalla quantità di metilxantine (caffeina e teobromina), aminoacidi (teanina) e zuccheri riducenti (glucosio, fruttosio, etc.) nella loro composizione. Inoltre, i flavan-3-oli, caratterizzati principalmente da epicatechine, catechine e loro derivati rappresentano in media il 60% dei composti bioattivi nei tè. Questi metaboliti secondari dei tè sono ampiamente riconosciuti per le loro proprietà antiossidanti, antitumorali e antinfiammatorie. In Tabella 3.7 sono riportati i principali metaboliti secondari presenti nelle foglie delle sei classi principali di tè [102].

**Tabella 3.6.** Composizione chimica percentuale (%) dei principali tè in commercio

Composizione Chimica (%)	Categorie di Tè						Ref
	Tè Bianco	Tè Giallo	Tè Verde	Tè Oolong	Tè Nero	Tè Dark	
<b>Carboidrati</b>	81.83-82.22	80.49-82.35	86.87-88.44	75.31-77.13	78.97-83.26	63.51-82.39	[91]
<b>Proteine</b>	3.60-7.96	5.45-9.34	3.84-4.46	4.71-5.30	3.42-5.23	5.05-11.73	
<b>Acqua</b>	5.24-8.89	ni	3.23-6.60	ni	5.02-7.23	ni	
<b>Composti Volatili</b>	2.47-3.01	ni	2.41-2.67	ni	2.67-2.90	ni	[103]
<b>Ceneri</b>	4.01-5.57	ni	5.06-6.09	ni	5.37-6.10	ni	
<b>Polifenoli Totali</b>	5.06-9.74	7.49-12.89	10.14-15.39	7.26-11.43	1.36-3.59	0.93-2.43	
<b>Caffeina</b>	3.43-4.31	2.98-3.80	2.56-3.96	1.71-2.85	3.09-4.31	1.97-3.63	[88;104]
<b>Teanina</b>	0.72-1.82	1.04-1.70	0.91-1.57	0.17-0.38	0.65-1.09	0.03-0.09	

\*ni=non sono presenti in letteratura studi che riportino la composizione delle foglie dei tè gialli, Oolong e dark per i valori di ceneri, acqua e composti volatili

**Tabella 3.7.** Metaboliti secondari presneti nelle foglie dei principali tè in commercio (mg/g) [81; 105]

METABOLITI SECONDARI	CLASSI DI TÈ						
	TÈ BIANCO	TÈ GIALLO	TÈ VERDE	TÈ OOLONG	TÈ NERO	TÈ DARK	
POLIFENOLI	Acido Gallico	2.09-2.71	1.97-3.16	0.64-2.97	0.29-3.05	2.21-6.37	13.38-18.06
	Acido Ellagico	2.30-2.35	2.39-9.79	2.33-7.77	2-10-2.29	2.11-4.57	2.31-2.72
	Acido Clorogenico	nd	0.26-0.35	0.07-0.51	0.24-0.30	0.18-0.41	0.35
	Ferulic Acid	-	-	3.33-7.14	-	4.74-8.20	-
	Catechina	1.02-6.23	0-95-1.40	1.13-6.42	0.85	0.33	nd
	Epicatechina	0.83-11.16	1.96-3.03	3.18-14.21	2.45-9.19	0.45-1.33	1.10-8.28
	Epigallocatechina	6.69-14.71	6.18-6.52	6.21-21.02	16.22-73.97	0.91	2.90-16.76
	Epigallocatechina Gallate	2.11-50.3	35.59-52.23	90.64-95.50	10.34-34.74	1.34-2.15	16.95-22.51
	Epicatechina Gallate	2.67-14.32	8.10-13.20	6.71-22.64	3.08-7.57	1.12-2.62	61.17
	Catechine Tot.	78.15-86.07	67.36-82.78	106.02-145.54	70.31-136.88	3.95-38.69	20.95-152.63
	Flavonoidi Tot.	28.30-33.7	17.30	1.16-29.9	15.07	6.36-62.10	3.02-20.15
Polifenoli Tot.	32.53-75.7	39.55-220.08	12.36-252.65	31.33-150.10	11.33-101.29	11.95-147.11	
AMMINOACIDI	Teanina	7.53-11.91	9.49	2.63-14.23	1.70-8.38	1.43-11.00	1.83-11.49
	Acido Aminobutirrico	0.11-1.67	0.27	0.02-1.12	0.35	0.06-0.79	0.03
	Aminoacidi Liberi Tot.	29.64	21.59	26.05	21.85	13.38	4.29
METILXANTINE	Teobromina	0.40	0.40	3.95-8.39	0.28	0.70-4.43	1.84-15.57
	Caffeina	19.28-27.54	24.49-39	2.64-42.20	12.36-31.66	4.05-39.55	8.94-125.86

## *Lipidi*

Le foglie fresche di tè sono composte dal 6-7% di lipidi, principalmente glicerofosfolipidi. In seguito alla fase di appassimento, in cui iniziano i processi ossidativi, la composizione lipidica cambia e si ha una predominanza di glicerolipidi. Questi lipidi rappresentano circa il 50% della porzione lipidica totale delle foglie, inoltre questi lipidi sono per lo più composti da acido linoleico (LA, C 18:2), acido grasso a diciotto atomi di carbonio capostipite degli acidi grassi omega-6. I lipidi del tè sono composti inoltre dal 15% di fosfolipidi, al cui glicerolo sono legati principalmente acido oleico (C 18:1), linoleico (LA; C18:2) e palmitico (C16:1). Il 35% dei lipidi è rappresentato da trigliceridi, in cui la porzione della molecola di glicerolo si trova principalmente legata ai seguenti acidi grassi: laurici (C12:0), miristico (C14:0), palmitico, stearico (C 18:0), oleico e linoleico. Le fasi di appassimento ed essiccazione della foglia comportano la liberazione dei lipidi di struttura e non dalle cellule vegetali con conseguente ossidazione della frazione lipidica che ne determina un significativo decremento nel prodotto finito. Tra i lipidi neutri, trigliceridi e steroli, gli acidi grassi maggiormente rappresentati sono linoleico, in alcune varietà il palmitico, seguito da linolenico, palmitico, stearico, oleico, laurico e miristico. La frazione insaponificabile è composta principalmente da triterpeni, i cui maggiormente rappresentati sono butirrospermo, lupeolo e  $\beta$ -amirina; mentre gli steroli sono caratterizzati principalmente da stigmasterolo. All'interno della frazione insaponificabile si ritrovano anche alcuni pigmenti, tra cui la clorofilla e i carotenoidi, che sono composti importanti in quanto intervengono nella formazione dell'aroma [106].

Le clorofille durante le fasi di lavorazione delle foglie di tè subiscono cambiamenti chimici ad opera di enzimi che durante l'ossidazione le trasformano in clorofillidi e feoforbidi (molecole che danno il colore marrone) e successivamente in feofitine (che conferiscono il colore nero alle foglie di tè). Anche i carotenoidi, così come le clorofille, durante il processo di ossidazione si modificano riducendo la loro concentrazione nel prodotto finito. Nel tè verde e nel tè nero i carotenoidi rappresentano circa il 3% della materia secca [106-107].

I principali carotenoidi del tè sono: zeaxantina, licopene, luteina,  $\beta$ -carotene, neoxantina, violaxantina,  $\beta$ -zeacarotene,  $\beta$ -criptoxantina. Dalla neoxantina durante la fase di trasformazione delle foglie di tè si forma il  $\beta$ -damascene, una molecola volatile caratteristica dell'aroma del tè [94; 108].

## ***Carboidrati***

All'interno delle foglie di tè i carboidrati si ritrovano sotto forma di polisaccaridi, principalmente pectine, cellulose e emicellulose. Questi composti fanno parte della struttura cellulare delle foglie di tè e rappresentano circa il 26% del peso secco. Tuttavia, il contenuto in polisaccaridi non si ritrova all'interno di infusi o decotti. Altri zuccheri presenti nelle foglie di tè sono i monosaccaridi e disaccaridi, in particolare modo quelli più rappresentati all'interno delle foglie di tè sono glucosio, fruttosio, saccarosio, arabinosio, ribosio, ramnosio e galattoio. Spesso i monosaccaridi del tè si trovano in forma legata con altre molecole, e si ritrovano nel prodotto finito sotto forma di glucosidi [102; 108].

## ***Proteine***

Il peso secco delle foglie di tè prima della fermentazione è rappresentato dal 15% di proteine. Queste sono composte principalmente da enzimi, alcuni fondamentali per i processi di ossidazione e per la sintesi delle molecole implicate nell'aroma e nel gusto del prodotto finito. Gli enzimi sono attivi nelle prime fasi di lavorazione delle foglie di tè (appassimento, asciugatura e arrotolamento). Tenzialmente l'attività enzimatica decresce successivamente alla fase di ossidazione, probabilmente l'inattivazione è dovuta sia al trattamento con colore nella fase di essiccazione ma anche all'interazione degli enzimi con i composti derivati dalla degradazione dei composti fenolici, come o-chinoni. I principali enzimi presenti nelle foglie di tè sono: *polifenolossidasi*, fondamentale per la formazione dell'aroma; *5-deidrosikimato reduttasi*, fondamentale per la sintesi di composti fenolici; *fenilalanina ammonio liasi*, fondamentale nella sintesi di catechina; *proteasi*, coinvolta nella degradazione delle proteine; *lipossigenasi* e *idroperossido liasi*, fondamentali per la formazione dell'aroma; *clorofillasi*, degradano le clorofille; *transaminasi*, coinvolte nella formazione dell'aroma e *pectinasi*, coinvolte nella degradazione delle pectine [102].

Tra i composti azotati, nelle foglie di tè l'1% del peso secco è rappresentato da amminoacidi, tra questi si ritrova anche 5-N-etilglutamina, che viene detta anche teanina, questo amminoacido può attraversare la barriera ematoencefalica, agendo sul sistema nervoso centrale e contribuendo al rilascio di dopamina. Inoltre, si è ipotizzato che la teanina vada a potenziare gli effetti della caffeina [109-110].

### ***Micronutrienti***

Il tè contiene buone quantità di minerali circa il 4-5% del peso secco delle foglie. Il minerale presente con le più alte concentrazioni risulta essere il potassio (K), circa l'1,2-2,5%, seguito da calcio (Ca<sup>+</sup>), manganese (Mg) e magnesio (Mn). Oltre a questi minerali all'interno delle foglie del tè si può trovare circa lo 0,2% di alluminio (Al), questo in quanto risulta uno dei contaminanti che entra in contatto con il prodotto lungo tutte le fasi della filiera produttiva. Inoltre, la contaminazione da metalli, come l'alluminio, è dovuta anche alla capacità della pianta di tè di assorbire questi composti metallici dal terreno e di accumularli tollerandoli, al contrario della maggioranza delle specie vegetali per le quali rappresenta un fattore limitante della crescita. L'alluminio sembrerebbe, se presente in buona quantità nel terreno di coltivazione, andare a stimolare la crescita della pianta del tè migliorando anche l'assorbimento di fosforo e di altri elementi essenziali. [102; 111].

Il tè inoltre contiene buone quantità di vitamina B1, B2 e B6, pantetonato, vitamina K e nicotinammide. La presenza di carotenoidi, tra cui il  $\beta$ -carotene, fa sì che questo alimento risulti essere una buona fonte di vitamina A [102].

### ***Composti bioattivi***

All'interno delle foglie di tè i composti bioattivi maggiormente rappresentati sono:

- *Metilxantine*: questi composti fanno parte degli alcaloidi purinici, questo tipo di composti organici a carattere basico conferito da uno o più atomi di azoto, sono sintetizzati a partire dagli amminoacidi liberi o dai prodotti della loro decarbossilazione. Gli alcaloidi molto spesso hanno la proprietà di esercitare importanti azioni farmacologiche sull'uomo: numerosi hanno un effetto sul sistema nervoso centrale sia come depressivi sia come eccitanti, altri su quello vegetativo (colinergici e anticolinergici), sulla muscolatura liscia (spasmolitici), sui vasi e sul cuore (ipo- e ipertensivi), sui reni (diuretici), sugli apparati gastrointestinale e respiratorio ed infine possono avere azione antibiotica, antifungina ed antitumorale. Le metilxantine presenti all'interno delle foglie del tè differiscono tra di loro per il numero e/o la posizione di un solo gruppo metilico, quelle maggiormente rappresentate sono caffeina, teofilina e teobromina. La concentrazione di questi composti nel prodotto finito varia in base ai processi di trasformazione a cui le foglie di tè sono sottoposte. In media il tè nero contiene



prevalentemente caffeina (2,5-5% del peso secco delle foglie), teobromina (0,07-0,20%) e teofillina (0,002-0,015%)[112].

- *Ammine biogene*: nelle piante di tè le ammine biogene spermidina, spermina e putrescina agiscono come fattori di crescita. La loro concentrazione nelle differenti foglie di tè varia a seconda del grado di ossidazione che subiscono. Le AB che si ritrovano maggiormente nelle foglie di tè verdi e nei tè che subiscono una fase di ossidazione ridotta sono spermina con concentrazioni pari a 28-89 µg/g, spermidina (20-35 µg/g) e putrescina (7-26 µg/g). Nelle foglie di tè Oolong e tè neri invece è stata riscontrata una maggiore presenza di putrescina e spermidina. Inoltre, nelle foglie dei tè neri è stata riscontrata anche una buona quantità di spermina (<10 µg/g) [113]. Invece, nei tè dark, ossia i tè post-fermentati, le ammine maggiormente presenti sono metilammina, etilammina, triptamina, putrescina, cadaverina e tiramina. La concentrazione delle ammine biogene varia notevolmente all'interno degli infusi o decotti di tè. Le ammine che sono state ritrovate, a differenti concentrazioni nei differenti tipi di tè, sono in prevalenza tiramina, cadaverina, istamina, putrescina, spermina e spermidina [43].

### ***Composti antinutrizionali***

Come per il cioccolato anche il tè contiene molecole che sono considerate fattori antinutrizionali. Fra i composti antinutrizionali del tè vi sono:

- *Polifenoli*: come anche per gli altri alimenti nervini i polifenoli rappresentano un'importante classe di composti sia dal punto di vista nutrizionale, sia perché sono coinvolti nella formazione del colore e dell'aroma dei tè. I polifenoli rappresentano circa il 35% del peso secco delle foglie di tè. Di questa classe di composti, i *flavanoli* sono quelli più rappresentati (80%), seguiti da proantocianidine, acidi fenolici, *flavonoli* e flavoni. I processi ossidativi incidono notevolmente sulla composizione quali-quantitativa dei polifenoli all'interno delle foglie di tè. Le modificazioni più importanti avvengono a carico dei flavonoli, che danno origine a composti colorati, come le teoflavine e tearubigine, che conferiscono il colore giallo-rosso al tè, e composti aromatici. Nei tè verdi e gialli, il colore dell'estratto è dovuto principalmente a flavonoli e flavoni, in quanto l'attività della polifenolossidasi viene bloccata interrompendo l'ossidazione. Tra i flavanoli, quelle più rappresentate sono le catechine (20-30%

del peso secco del tè), le principali sono: epigallocatechina gallato (EGCG), epigallocatechine (EGC), epicatechine gallato (ECG), epigallocatechine (EC), gallocatechine (GC) e (+)-catechina [114], [115]. Questi composti sono composti non-colorati, che conferiscono al tè un sapore amaro e astringente. Mentre, tra i flavonoli quelli principali sono la quercitina, il kampferolo e la miricetina, queste possono rappresentare il 2-3% sostanze che vengono cedute durante la fase d'infusione. Sono presenti sotto forma di glucosidi, la cui parte glucidica è costituita da glucosio, ramnosio, galattosio, arabinosio e fruttosio. L'ossidazione delle catechine porta alla formazione di flavonoli che conferiscono colore e aroma, tra questi abbiamo: teflavina, determina il colore arancio-rosso agli infusi di tè, e le tearubigine, che conferisce ai tè colore rosso-marrone. Il contenuto delle teaflavine è influenzato notevolmente dalla durata del processo di ossidazione e dalla temperatura usata per l'essiccazione. Tra la classe dei polifenoli rientrano anche i tannini, composti che presentano nella loro struttura chimica numerosi gruppi ossidrilici o di altra natura (per esempio carbossilici), che permettono di formare complessi stabili con le proteine e/o con altre macromolecole (amido, cellulosa, etc.). Questi polifenoli conferiscono al prodotto sapore astringente ed amaro, inoltre se assunti in alte concentrazioni chelano il calcio riducendone la sua biodisponibilità [108; 115].

- *Acido ossalico*: rappresenta circa il 2% del peso secco delle foglie di tè. La sua concentrazione varia in base al tipo di tè, tendenzialmente il tè nero contiene concentrazioni maggiori, da 1,4 a 6,6 mg/g, rispetto ai tè verdi (1,3-1,4 mg/g) e semifermentati [76; 116].

### **3.3. Il Caffè**

Il caffè è una pianta originaria dell'Africa, il nome caffè si pensa derivi dal territorio di Kaffa in Etiopia sud-occidentale. Tuttavia, questa parola, si fa spesso risalire al termine turco "*kahve*" che a sua volta venne preso in prestito dall'arabo *qahwah*, termine che derivava dal verbo *quahiv* ossia "*manicare di fame*", in riferimento alle caratteristiche afferite alla bevanda di caffè di soppressore della fame. Numerose sono le leggende legate alla scoperta e all'introduzione del caffè nelle abitudini delle popolazioni. Tuttavia, la scoperta e il consumo del caffè è stata fatta risalire alla metà del XV secolo in Arabia, più in particolare nello Yemen. In questi territori, il caffè veniva fatto tostare e preparato in modo del tutto simile alla produzione odierna. Si pensa che il caffè abbia raggiunto le

coste dell'Arabia, grazie ai copiosi scambi commerciali effettuati dai somali attraverso il Mar Rosso. Nel XVI secolo il caffè raggiunse il resto del Medio Oriente, la Persia, la Turchia e l'Africa settentrionale e da questi territori che poi si diffuse anche in Italia e nel resto d'Europa. La diffusione del caffè in Sud America avvenne ad opera del francese Gabriel de Clieu, che portò per la prima volta la pianta di caffè sulle coste francesi di Martinica nei Caraibi, da cui prosperò ottimamente in questi territori grazie alle condizioni pedo-climatiche favorevoli alla sua crescita [117-118]. Il caffè è una pianta tropicale dicotiledone appartenente alla famiglia delle *Rubiacee*, genere *Coffea*. Per le particolari esigenze climatiche il caffè è coltivato solo in una regione di 5000 km lungo la fascia equatoriale. La produzione è concentrata essenzialmente nelle aree (Figura 2.2) comprese tra il tropico del Cancro e il tropico del Capricorno, in un clima quindi caldo umido, in totale comprendente un'ottantina di nazioni in America Centro-Meridionale, Africa ed Asia, ad altitudini variabili da 300 a 2000 m. È una pianta arborea che raggiunge mediamente altezze tra i 10 e 15 metri (Figura 3.6). Il ciclo di sviluppo della pianta di caffè è caratterizzato da tre fasi: una prima fase che oscilla tra i 4 e i 7 anni, che riguarda la crescita della pianta fino al suo completo sviluppo. Una seconda fase, dai 7 sino ai 20-25 anni, in cui la pianta è pienamente produttiva. L'ultima fase in cui la pianta di caffè rimane in vita ma riduce fortemente sino ad annullare la fase di produzione. In genere la pianta di caffè produce un raccolto all'anno, ad eccezione di alcune zone dell'equatore che essendo caratterizzate da due stagioni delle piogge permettono un raccolto doppio [119-120].



**Figura 3.6.** Pianta del caffè

Il frutto è una drupa così composta: esocarpo (buccia) liscio e resistente, di colore verde che maturando diventa, secondo la varietà, rossa o gialla; mesocarpo (polpa) carnoso e zuccherino, di color giallastro; endocarpo (involucro del seme) fibroso e pergamenaceo, di colore verde-grigio. L'endocarpo circonda i semi che sono in numero di due, talvolta uno o tre-quattro, posti con le facce ventrali, attraversate da un solco mediano, parallele e adiacenti, mentre rivolgono all'esterno la faccia dorsale che è concava [121-122].

Il caffè viene coltivato attraverso due tecniche agronomiche: piantagioni in ombra applicate alla policoltura tradizionale e quelle al sole della monocoltura intensiva. Nelle piantagioni in ombra della policoltura tradizionale, il caffè viene solitamente coltivato in piantagioni in ombra. È una coltivazione semi-intensiva, effettuata da coltivatori locali in piccoli e medi appezzamenti di terreno. Solitamente tale produzione viene praticata in zone collinari e montuose dove si possono trovare differenti condizioni climatiche (ecodiversità) che favoriscono la coesistenza di specie diverse di piante (biodiversità). Ritroviamo queste zone nell'America Centrale e del Sud, ad esclusione del Brasile. La produzione delle piantagioni in ombra è solo 1/3 rispetto a quelle non in ombra. Nelle piantagioni al sole della monocoltura intensiva, la coltivazione di caffè viene effettuata al sole dai grandi proprietari che automatizzano, per quanto è possibile, le varie fasi di lavorazione della pianta. Si tratta di una coltivazione intensiva che offre una maggiore redditività per ettaro coltivato anche se può presentare un sapore meno intenso rispetto a quello coltivato in ombra. Attualmente gran parte della produzione mondiale è di carattere intensivo, basata su grandi estensioni di caffè al sole [123-124].

Esistono numerose specie di caffè, appartenenti alla flora spontanea africana o ottenute mediante mutazioni e/o ibridazioni interspecifiche. Tuttavia, dal punto di vista economico-commerciale solo due specie hanno un ruolo di rilievo la *Coffea Arabica*, originaria dell'Etiopia, e la *Coffea Canephora*, meglio conosciuta come *Coffea Robusta*, originaria del Congo, Angola e Uganda. Le specie d'importanza minore da punto di vista commerciale sono coltivate ed utilizzate prevalentemente nelle zone d'origine, tra queste vi sono: *Coffea Liberica*, originaria dalla Liberia; *Coffea Stenophylla*, coltivata in Sierra Leone e Costa d'Avorio; *Coffea Excelsa*, consumata nell'Africa Occidentale; *Coffea Mauritania* coltivata in Madagascar; ed alcune specie di origine asiatica come la *Coffea Bengalensis* e *Coffea Fragrans*, che generalmente sono chiamate "Caffè del Bengala". L'Arabica cresce soprattutto in America Latina, in Africa Centrale e Orientale e in alcune zone dell'India. Questa specie è tipicamente preferita dai consumatori in ragione del suo sapore delicato, la varietà "Moka" è quella maggiormente rinomata. La specie *Coffea*

arabica comprende diverse varietà, tra cui: la Caturra, la Catuai la Maragogype e la Bourbon. È la specie più commercializzata (arrivando a coprire fino ai rappresenta i 3/5 della produzione mondiale), viene coltivata ad altezze comprese tra gli 800 m e i 2000 m di altitudine e contiene circa la metà della caffeina rispetto alla Robusta (1,5% contro il 3%). Per questo motivo è più sensibile ai cambiamenti climatici che stanno provocando la comparsa e la permanenza di nuovi parassiti e malattie [124].

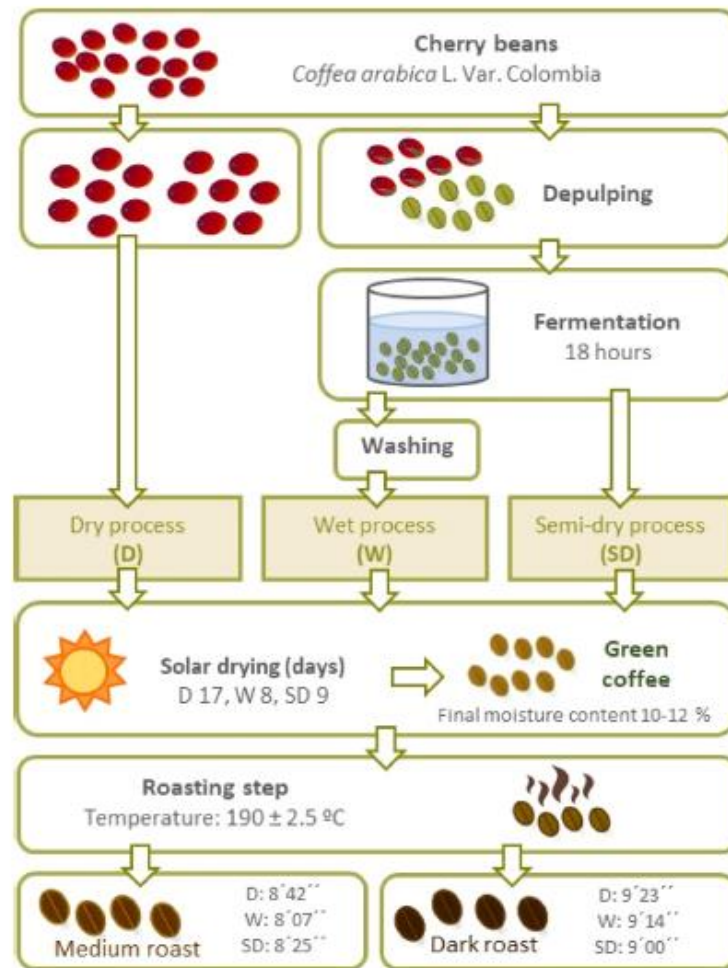
La specie Robusta cresce nella regione occidentale dell’Africa, nel Sud-Est Asiatico e in alcune zone del Brasile. La specie Coffea robusta prospera invece in pianura, è più resistente alle malattie e ai parassiti e di conseguenza ha una produzione che è circa il doppio di quella dell’Arabica, ma il profilo aromatico è nettamente inferiore: la Robusta, infatti, è molto più amara ma viene utilizzata perché contribuisce al corpo e alla pienezza del caffè in tazza. Confrontandola con l’Arabica presenta un sapore maggiormente amaro e un maggior grado di acidità. Inoltre, è più resistente alle malattie e ha un tasso di sopravvivenza maggiore, infatti, riesce a crescere anche in condizioni climatiche non ottimali. Altra caratteristica di questa varietà è di avere un costo di produzione e di impianto inferiore all’Arabica [119; 124].

### **3.3.1. Processi di trasformazione del Caffè**

Come per il cacao anche i processi di trasformazione del caffè (torrefazione, liofilizzazione, decaffeinizzazione, etc.) avvengono principalmente nei Paesi importatori, mentre nei Paesi produttori avvengono solo le fasi iniziali di trattamento dei chicchi di caffè. I processi di trasformazione che portano alla produzione del caffè torrefatto sono costituiti da numerose fasi che incidono in modo più o meno significativo sulle caratteristiche del prodotto finito. I processi di lavorazione e trasformazione del caffè possono essere divisi in: *pre-roasting* o *pre-tostatura* e *torrefazione* o *roasting* [119; 125].

#### ***Pre-roasting***

In Figura 3.7 sono riportati i principali processi di lavorazione post-raccolta della drupa di caffè.



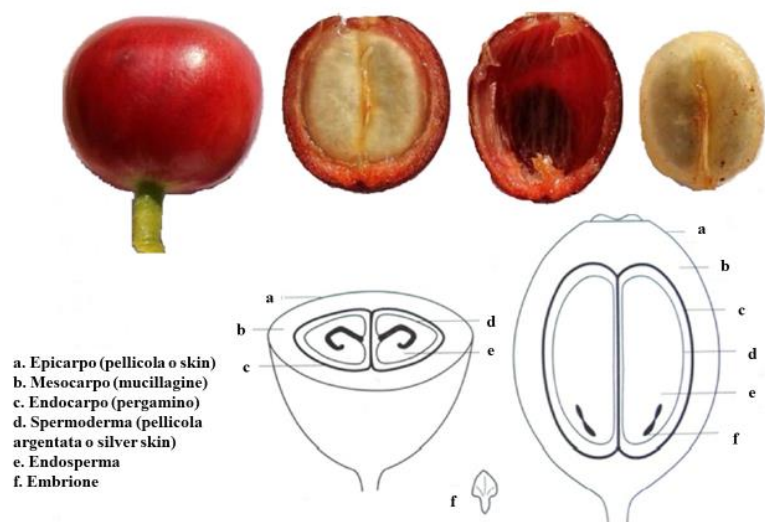
**Figure 3.7.** Principali processi di lavorazione post-raccolta delle drupe di caffè [125]

I processi pre-roasting prevedono le seguenti fasi [125-126]:

- 1- *Raccolata*. Questa fase, che diverge a seconda dell'area di coltivazione della pianta di caffè, va da ottobre a febbraio, ad eccezione del Brasile in cui viene effettuata intorno a maggio-luglio. Il caffè può essere raccolto mediante due metodi: manuale o meccanico. Nella raccolta manuale, viene prestata maggiore attenzione nell'evitare la rottura della pianta al fine di preservarla per il raccolto successivo. Questa fase può essere effettuata mediante due tecniche di raccolta differenti: il *picking* e lo *stripping*. La prima tecnica, che richiede più tempo e manodopera, consiste nel raccogliere la drupa una ad una, selezionando in modo manuale i frutti più maturi e pertanto richiedendo più turni di raccolta man mano che i frutti vanno a maturazione. La seconda tecnica, più rapida ed economica, che può essere affiancata da attrezzi (es. pettini), viene effettuata quando la maggior parte dei frutti hanno raggiunto la maturazione strappando le drupe

indistintamente dal grado di maturazione. Alla fase di stripping, segue una fase di pulitura, in cui vengono tolte foglie, rami, etc. Invece, il metodo di raccolta meccanica, economico e rapido, prevede l'applicazione di raccoglitori meccanici o spazzole vibranti, che scuotono la pianta e le drupe cadute vengono raccolte direttamente da terra o mediante l'uso di teli precedentemente posti sotto le piante. Questo metodo di raccolta, anche detto raccolta completa in quanto viene effettuato in un unico passaggio, viene attuato quando i frutti hanno raggiunto la piena maturazione. La tecnica di raccolta meccanica viene per lo più adoperata nelle grandi piantagioni e su terreni pianeggianti. L'alta qualità di un caffè commerciale può essere raggiunta solo quando tutti (o quasi) i frutti vengono raccolti in una perfetta fase di maturazione. Tuttavia, questo aumenta notevolmente i costi del processo, quindi, in una raccolta normale, i frutti perfettamente maturi (che dovrebbero essere la grande maggioranza) vengono solitamente mescolati con alcuni frutti eccessivamente maturi o, invece, immaturi [126].

- 2- *Decorticazione o sbucciatura*. Questa fase di lavorazione post-raccolta mira a separare il seme (chicco di caffè) dalle restanti parti del frutto, al fine di garantirne una corretta conservazione e di acquisire caratteristiche aromatiche indesiderate. La drupa del caffè è composta da cinque strati di materiale protettivo, che devono essere rimossi al fine di liberare i semi del caffè (Figura 3.8.) Dall'esterno verso l'interno, si trova l'epicarpo (esocarpo o skin), uno strato monocellulare ricoperto di cera che a maturazione può raggiungere differenti colorazioni rossa, gialla o rosa a seconda della varietà di caffè; mesocarpo (polpa o mucillagine), composto da una polpa mucillaginosa; endocarpo (pergamino) un sottile rivestimento polisaccaridico; spermoderma (pellicola argentea o silver skin) un sottile tegumento che riveste i semi e in fine l'endosperma o semi di forma ellittica. A seconda del Paese di produzione la fase di decorticazione può essere effettuata con metodi differenti. Ogniuno di questi presenta svantaggi e vantaggi che possono influenzare la qualità del prodotto finito; tuttavia, la scelta del metodo non è basata sulla qualità che si vuole ottenere ma piuttosto dalle caratteristiche del territorio in cui vengono effettuate le fasi di lavorazione (es. disponibilità d'acqua) [40; 128].



**Figura 3.8.** Struttura generale della drupa di caffè [128]

La fase di decorticazione può avvenire mediante differenti tecniche [119; 129-130]:

- \* **Metodo a secco** (dry method o metodo naturale) è il metodo più antico, economico e semplice. I chicchi di caffè che si ottengono con il metodo di lavorazione a secco vengono solitamente chiamati “caffè non lavato” o “caffè naturale”. Questo processo viene utilizzato per la maggior parte dei caffè Arabica brasiliani, etiopi e haitiani e per il caffè Robusta nella maggior parte del mondo. In generale, in questa tecnica, i chicchi eccessivamente maturi e immaturi non vengono separati da quelli perfettamente maturi e, quindi, andranno tutti a comporre il lotto finale. In questo metodo di lavorazione, per ottenere i chicchi di caffè verde, la ciliegia raccolta viene essiccata al sole o in un altro essiccatore meccanico e in seguito viene effettuata la separazione delle parti esterne della drupa essiccate. Questo, insieme ad un'adeguata miscelazione lungo il processo, dovrebbe evitare la decomposizione della polpa (dovuta all'alto contenuto di acqua e zuccheri) che potrebbe dare origine ai chicchi di caffè con difetti come “chicchi fermentati” o “chicchi neri”. Il metodo a secco è un tipo lavorazione che richiede tempo, poiché deve essere essiccata l'intera drupa di caffè. Questo tipo di lavorazione dei chicchi di caffè ha, tuttavia, un alto rischio di fermentazione secondaria a causa della mucillagine, che è molto igroscopica ossia in grado di trattenere acqua, la quale rimanendo a contatto con i chicchi di caffè ne può causare la fermentazione. Le drupe sono sparse su uno strato sottile (5-10 cm) e



rastrellate regolarmente per mantenere una temperatura uniforme, dallo strato superiore a quello inferiore. La fase di essiccazione può durare da 10 giorni a 3 settimane. Tuttavia, la posizione geografica e le stagioni influenzano il processo di essiccazione. Tendenzialmente, nelle grandi piantagioni di caffè e nelle regioni in cui le piogge sono frequenti durante il periodo di appassimento dei frutti, l'essiccatore meccanico viene utilizzato per accelerare il processo di essiccazione. Questo step è la fase più critica in questo metodo di lavorazione delle drupe di caffè poiché influisce sulla qualità finale del prodotto. Infatti, frutti troppo secchi hanno caratteristiche fragili e producono molti difetti (es. fratture del chicco) durante la decorticazione; tuttavia, dall'altro lato, i frutti sotto-essiccati sono altamente esposti a deterioramenti a causa della crescita di funghi e batteri. Durante questo processo i chicchi di caffè si staccano dal pergamino (endocarpo) e dopo 3-4 settimane, a seconda delle condizioni di essiccazione, i frutti sono pronti per essere decorticati (umidità inferiore al 12%). Tuttavia, la frutta secca può riposare (es. in silos) per alcuni mesi prima della decorticazione, e in questo caso la qualità del prodotto finale può essere migliorata.

- \* **Metodo umido** (wet method o caffè lavato) questo metodo è una tecnica più sofisticata rispetto al metodo a secco. Il metodo umido si basa sulla rimozione della polpa (mesocarpo) della drupa e successiva fermentazione dei chicchi. Sebbene questo processo richieda acqua in abbondanza e attrezzature tecniche specifiche, generalmente consente di ottenere caffè di qualità superiore con un valore economico maggiore. Tendenzialmente questo metodo viene applicato principalmente per la varietà Arabica al fine di ottenere caffè con caratteristiche organolettiche superiori. I frutti per essere lavorati con questa tecnica devono presentarsi in un perfetto stato di maturazione; pertanto, occorre effettuare un'accurata selezione delle drupe che spesso predilige metodi di raccolta manuali o con macchinari che permettano la separazione dei chicchi maturi. Le vasche di selezione e lavaggio dei chicchi sono disposte in modo non uniforme in modo da poter separare i frutti per gravità, in quanto i frutti più maturi presentano una densità leggermente superiore all'acqua e tendono a depositarsi, mentre i frutti verdi o quelli eccessivamente maturi di solito galleggiano. Pertanto, con questa disposizione delle vasche è possibile separarli e solo quelli maturi procederanno nelle fasi successive di lavorazione, decorticazione. Quest'ultima fase consente di rimuovere l'epicarpo e il mesocarpo della drupa; tuttavia, al termine di questo

processo il seme è ancora ricoperto dall'endocarpo (silver skin). Lo strato mucillaginoso che ricopre l'endocarpo facilita la decorticazione riducendo il numero di semi rotti e la forza da applicare. Tuttavia, la sua tendenza a trattenere l'acqua e le caratteristiche scivolose possono compromettere le fasi successive. Questa mucillagine, composta principalmente da pectine, può essere eliminata per fermentazione, un processo che coinvolge un complesso gruppo di reazioni chimiche e biologiche. In questa fase il caffè rimane a riposo per consentire il naturale svolgimento dei processi enzimatici e di altro genere, provocando la degradazione delle mucillagini. Durante questo processo la temperatura aumenta spesso, a causa della fermentazione alcolica dello zucchero della polpa rimasto, che è favorevole all'azione enzimatica delle pectinasi. Il tempo ideale di fermentazione è tra le 24 e le 72 h. In caso contrario, il colore dei chicchi può risentirne (chicchi fermentati). Oltre all'azione naturale delle pectinasi, possono essere aggiunti anche enzimi commerciali o agenti chimici per aumentare l'efficienza del processo. Tuttavia, non è ancora una procedura molto comune.

- \* **Metodo semisecco** (semidry method o semiwashed) questa tecnica prevede la combinazione del metodo secco e del metodo umido. Il metodo semidry prevede il lavaggio e la selezione dei frutti in vasche di fluttuazione, a cui fa seguito la decorticazione. Tra i due passaggi di questo metodo non avviene la fase di fermentazione. Successivamente, il frutto di caffè ricoperto dalla mucillagine a cui è stata tolta la polpa viene direttamente essiccato. Questa metodica viene principalmente usata nei Paesi del Centrafrica e in Brasile e porta alla produzione di “caffè decorticato naturale”. Come per il metodo umido anche nel metodo semi-lavato vi è un processo aggiuntivo che consente di eliminare l'endocarpo o pergamino che rimane adeso ai chicchi di caffè.
- \* **Metodo meccanico**, questo metodo che sta prendendo piede negli ultimi anni prevede l'eliminazione delle mucillagini mediante attrito (azione meccanica) in sostituzione dell'acqua. Macchine e attrezzature basate su questo principio sono apparse sul mercato, consentendo l'uso di un metodo che consente contemporaneamente di risparmiare costi e acqua. Queste macchine, che venivano già adoperate in regioni che utilizzavano il metodo a secco per la scarsità d'acqua, ricevono i frutti dalla fase di lavaggio e dalla selezione e in sequenza vanno a rimuovere la polpa, le mucillagini e lavano i chicchi di caffè rimuovendo l'endocarpo, rendendo i semi pronti per essere essiccati e lavorati.

Lungo tutte le fasi di decorticazione delle drupe di caffè vengono generati numerosi sottoprodotti: ogni 100 Kg di frutti maturi sono costituiti da 39 Kg di polpa, 22 Kg di mucillagini e 39 kg di pergamino.

3- *Fermentazione* è una tappa del metodo umido che prevede la fermentazione delle mucillagini che rimangono adese al chicco di caffè dopo l'eliminazione della polpa. La fermentazione avviene ad opera di microrganismi naturalmente presenti sulle drupe. La durata della fermentazione varia tra 24 e 100 ore a seconda del grado di maturazione del frutto di caffè, al clima e alla varietà [130].

### ***Torrefazione***

Il processo di tostatura è ciò che produce il caratteristico sapore del caffè facendo cambiare gusto ai chicchi di caffè verde. I chicchi non tostati contengono livelli di acidi, proteine, zuccheri e caffeina simili se non superiori a quelli che hanno subito i processi di tostatura, ma mancano del sapore dei chicchi di caffè tostati a causa delle reazioni di Maillard e di altre reazioni chimiche che si verificano durante la tostatura [41].

La tostatura dei chicchi crudi viene solitamente effettuata nei Paesi consumatori. Dopo il ricevimento e la conferma della loro qualità, che viene valutata mediante prove sensoriali, ma anche dalla dimensione dei semi, dalla loro forma e colore, i chicchi vengono conservati fino alla tostatura. All'apertura dei sacchi, il caffè viene solitamente sottoposto a una nuova fase di pulizia per rimuovere eventuali chicchi, sassolini o pezzi di metallo difettosi o immaturi, ad esempio utilizzando rispettivamente un sistema di setacci e un metal detector. La fase di torrefazione o tostatura rappresenta il primo step del processo di trasformazione dei chicchi di caffè, che porta alla trasformazione dei chicchi verdi in caffè tostato. Il processo di tostatura è ciò che produce il caratteristico sapore del caffè facendo cambiare gusto ai chicchi di caffè verde [129].

I chicchi non tostati contengono livelli di acidi, proteine, zuccheri e caffeina simili se non superiori a quelli tostati, ma mancano del sapore e aroma dei chicchi di caffè tostati a causa della reazione di Maillard e di altre reazioni chimiche (es. proteolisi) che si verificano durante la tostatura. I fattori che influenzano la torrefazione dei chicchi di caffè sono principalmente il calore adoperato, il tempo di tostatura e il metodo di raffreddamento dei semi di caffè. Generalmente le macchine industriali che vengono adoperate sono fornite di un sistema di pale che consente di garantire la miscelazione e una distribuzione omogenea del calore a tutti i chicchi di caffè. Questa procedura può essere effettuata mediante tre tecniche [131]:






- **Tostatura a conduzione:** in questo tipo di torrefazione metodo il calore viene fornito al caffè per contatto diretto tra il chicco e le pareti metalliche della macchina (o cilindro metallico) che vengono riscaldate da una fonte di calore sottostante. Questo metodo era per lo più diffuso in passato, in quanto non garantisce un controllo uniforme del processo di tostatura del prodotto, difatti questo metodo può portare a difetti del chicco causati da una distribuzione non uniforme del calore all'interno del chicco con un maggiore rischio di bruciature esterne (*scorching*) o nel caso in cui il tempo di contatto tra il chicco e la fonte di calore sia troppo prolungato determinerà a una tostatura poco accentuata (*underdevelopment*) che conferisce al caffè un gusto amaro erbaceo. Il fenomeno di *scorching* può inoltre causare la separazione all'interno della macchia di piccoli pezzi dei grani di caffè (*tips*) che durante l'estrazione dal macchinario possono bruciarsi e conferire al prodotto finito sapore aspro/amaro. Ad oggi questo metodo di tostatura dei chicchi è quasi del tutto in disuso.
- **Tostatura a convezione:** questo metodo prevede la torrefazione dei chicchi mediante il riscaldamento per convezione, ossia tramite aria calda che viene immessa all'interno del macchinario. Questa tecnica consente di garantire una tostatura più uniforme del chicco e assicura il corretto avvenimento delle reazioni chimiche deputate alla formazione dell'aroma. Inoltre, la tostatura a convezione consente di ottenere profili di tostatura differenti, grazie alla possibilità di regolare la temperatura (da 190 °C a 220 °C) e tempo (da 3 a 20 min) a cui sono tostati i chicchi. Ad oggi è il metodo più utilizzato per la torrefazione dei chicchi di caffè.
- **Tostatura ibrida:** questo metodo prevede l'utilizzo di gas come combustibile per il riscaldamento della camera di tostatura, rendendo possibile di migliorare il controllo della temperatura a cui sono sottoposti i chicchi di caffè. Inoltre, i macchinari prevedono l'utilizzo di cilindri perforati e non chiusi che consentono il passaggio dell'aria dalla parte posteriore. Pertanto, il chicco di caffè durante il processo di torrefazione entrerà in contatto con due fonti di calore: l'aria e le pareti del macchinario. In questo modo si può ridurre la conduzione di calore dalle pareti e aumentare il contatto tra l'aria che andrà ad agire in modo più uniforme sul chicco di caffè. Questo macchinario ha migliorato la tecnica di tostatura a conduzione.

Nella fase di tostatura, la silverskin (il sottile tegumento che riveste il chicco) si stacca e può essere separata dal prodotto finale mediante un flusso d'aria; lo sperdoderma

rappresenta il principale sottoprodotto dell'industria della tostatura del caffè (circa 4 tonnellate di caffè portano alla produzione di 30 kg di silverskin) [89-90].

La torrefazione dei chicchi può essere condotta a differenti condizioni di tempo e temperatura che portano alla formazione di differenti tipologie di caffè con differenti caratteristiche di gusto e aroma (Tabelle 3.8). La maggior parte dei torrefattori utilizza una combinazione di temperatura, aroma, colore e suono per monitorare il processo di tostatura. Ci sono due eventi chiamati "crack" che i torrefattori ascoltano durante il processo di tostatura del caffè. A circa 196 °C, il caffè emetterà uno scoppietto, questo primo suono viene indicato come "*first crack*", segnando l'inizio di una tostatura molto leggera (*light roast*), in questo step della tostatura una grande quantità di umidità del caffè evapora e i chicchi inizieranno ad aumentare di dimensioni. Quando il caffè raggiunge circa 225 °C, emette una "*second crack*", questo suono segna che la struttura del caffè che diventa fragile e si frattura, mentre il chicco continua a gonfiarsi e ingrandirsi a causa della pressione interna. A queste temperature i lipidi presenti all'interno del seme del caffè si liquefanno a causa del calore e della pressione accumulati e migrano verso l'esterno del chicco, rendendo il seme lucido. Il rivestimento oleoso è più diffuso con gradi di tostatura più elevati [81; 94].

**Tabella 3.8.** Gradi di tostatura del caffè

<b>CAFFÈ NON TOSTATO</b>			
	<p><b>CAFFÈ VERDE</b> T: 22° °C</p> <p>Cicchi di caffè come arrivano alla torrefazione. I chicchi possono essere conservati per circa 12-18 mesi in un ambiente a temperatura controllata.</p>		<p><b>FASE DI ESSICCAZIONE</b> T: 165 °C</p> <p>Durante la fase di essiccazione i chicchi subiscono un processo endotermico fino all'evaporazione del loro contenuto di umidità, nota come fase di ingiallimento.</p>
<b>TOSTATURA LEGGERA</b>			
	<p><b>CINNAMON ROAST</b> T: 196 °C</p> <p>Livello di tostatura molto leggero che fa seguito al "first crack". La dolcezza è sottosviluppata, con un aroma di grano tostato, sapori erbacei e una forte acidità del chicco.</p>		<p><b>NEW ENGLAND ROAST</b> T: 205 °C</p> <p>Marrone chiaro moderato, ma ancora con una colorazione a chiazze. Una tostatura preferita da alcuni torrefattori specializzati, mette in evidenza le caratteristiche dell'origine così come l'acidità complessiva del chicco.</p>
<b>TOSTATURA MEDIA</b>			
	<p><b>AMERICAN ROAST</b> T: 210 °C</p> <p>Chicchi di colore marrone medio-chiaro. L'acidità è leggermente smorzata, ma le caratteristiche aromatiche della varietà di caffè sono conservate.</p>		<p><b>CITY ROAST</b> T: 219 °C</p> <p>Il chicco di caffè assume un colore marrone medio. Buono per percepire le caratteristiche dell'origine, anche se cominciano a sentirsi le note aromatiche della tostatura.</p>
<b>DARK ROAST</b>			
	<p><b>FULL CITY ROAST</b> T: 225 °C</p> <p>Chicco con colorazione tra il marrone e il nero, che presenta sulla superficie poche macchie oleose. Inizio del "second crack", il corpo dell'aroma è completamente sviluppato</p>		<p><b>VIENNA ROAST</b> T: 230 °C</p> <p>Marrone-nero moderato, con un leggero straro oleoso, sapore agrodolce con note di caramello e acidità ridotta (metà del secondo crack). Le caratteristiche aromatiche della varietà di caffè sono smorzate dalle note di tostatura.</p>
	<p><b>FRENCH ROAST</b> T: 240 °C</p> <p>Chicco di colore marrone scuro, che si presenta lucido con profonde sfumature aromatiche di caramello e acidità attenuata (fine del second crack).</p>		<p><b>ITALIAN ROAST</b> T: 245 °C</p> <p>Chicco quasi nero lucido, i toni bruciati diventano più accentuati e l'acidità quasi eliminata.</p>

### 3.2.3. Composizione chimica

La composizione chimica del caffè è altamente complessa e varia sulla base del grado di torrefazione dei chicchi di caffè. Ciò dipende anche dalla specie e dalla varietà di tè verde, inoltre sugli aspetti di qualità del caffè dipendono notevolmente i metodi adoperati per la coltivazione, stoccaggio e trasformazione delle drupe di caffè. Inoltre, i metodi di lavorazione nella fase di raccolta e dei processi industriali del caffè verde, così come i metodi adoperati dai consumatori per la preparazione della bevanda di caffè contribuiscono a modificare la concentrazione di alcuni composti all'interno del prodotto finito. In Tabella 3.9 è riportata la composizione media delle due principali specie di caffè, Arabica e Robusta, nei chicchi di caffè verde e caffè torrefatto. Per un ottimale conservazione del caffè prima della torrefazione il contenuto di acqua nei chicchi varia tra 8-12 %, mentre l'umidità nel caffè tostato scende fino a circa 1.3% [132].

**Tabella 3.9.** Composizione chimica percentuale (%) nelle due principali specie di caffè, Arabica e Robusta.

COMPOSIZIONE GENERALE	ARABICA		ROBUSTA	
	VERDE	TORREFATTO	VERDE	TORREFATTO
Acqua	8.0-10.2	1.3-3.43	8.0-10.2	1.3-3.43
Carboidrati	50.0-55.0	24.0-39.0	42.0-54.0	0-3.5
Lipidi	12.0-18.0	14.5-20.0	9.0-13.0	11.0-16.0
Proteine	11.0-13.0	13.0-15.0	11.0-13.0	13.0-15.0
Acidi grassi	12.0-18.0	14.5-20.0	9.0-13.0	11.0-16.0
Minerali	3.0-4.2	3.5-4.5	4.0-4.5	4.6-5.6

#### *Lipidi*

I chicchi di caffè della specie Arabica hanno un contenuto di lipidi che varia dal 15 al 18%, mentre la specie Robusta presenta un contenuto in lipidi pari a circa l'8-12%. La frazione lipidica del caffè non risente in modo particolare del processo di tostatura. I lipidi sono costituiti da circa l'80% da triacilgliceroli (TAG), a cui seguono gli esteri diterpenici (15%), esteri triterpenici (1,8%), steroli (0,3%) e diterpeni (0,1%). In piccola parte nella frazione lipidica si ritrovano le cere, per lo più costituite da acidi grassi a lunga catena (es. arachidico (C20:0), beinico (C22:0), linoleico (C18:2)). La maggior parte degli acidi grassi che costituiscono i TAG sono acidi grassi saturi, palmitico (C16:0) e stearico (C18:0), e insaturi, oleico (C18:1) e linoleico (C18:2). Il processo di torrefazione

modifica i trigliceridi, andando ad aumentare la concentrazione degli acidi grassi liberi, in quanto si rompono i legami tra il glicerolo e i rispettivi acidi grassi [40].

Gli steroli, la cui composizione non viene modificata dal processo di torrefazione, principali che si ritrovano nei chicchi di caffè sono sitosterolo (53%), stigmasterolo (21%), campesterolo (115) e cycloartenolo (8%). Inoltre, la composizione sterolica nel prodotto finito serve a evidenziare la proporzione di caffè arabica e robusta presente nei blends. Fra i diterpeni quelli maggiormente presenti sono il cafestolo, 16-O-metilcafestolo, presente solo nella specie robusta, e il kaveolo, che rappresenta il 60-70% dei diterpeni nella specie arabica. La concentrazione di questi lipidi durante i processi di torrefazione si riduce notevolmente in quanto rilasciano i loro derivati volatili disidratati, contribuendo alla formazione dell'aroma del prodotto finito [82; 97].

### ***Carboidrati***

I carboidrati rappresentano circa il 50% del peso secco del caffè; nello specifico la specie arabica presenta una concentrazione maggiore di glucidi rispetto alla robusta. Il caffè verde è principalmente composto da oligosaccaridi e polisaccaridi, che costituiscono i carboidrati solubili del citoplasma cellulare delle cellule del chicco di caffè, e da carboidrati insolubili (emicellulose e olocellulose) che costituiscono la parete cellulare. Il caffè torrefatto presenta una più alta concentrazione di monosaccaridi (glucosio, mannosio, arabinosio, ribosio, etc.) in quanto il processo termico rompe i polisaccaridi. La loro concentrazione si riduce notevolmente, in quanto insieme agli amminoacidi liberi presenti nei chicchi di caffè, gli zuccheri riducenti prendono parte alla reazione di Maillard, contribuendo alla formazione della tipica colorazione marrone e del caratteristico aroma del chicco [134].

### ***Proteine***

La concentrazione delle proteine nei chicchi di caffè verde delle due principali specie in commercio, Arabica e Robusta, sono all'incirca simili, variando dal 8 al 12 % mentre gli amminoacidi liberi rappresentano circa l'0.2% e 0.8%. Il processo di torrefazione comporta la degradazione delle proteine e la perdita degli amminici. Il contenuto amminoacidico delle proteine si riduce dal 20 al 40% proporzionalmente all'intensità con cui viene effettuata la torrefazione. A livello qualitativo alcuni amminoacidi vengono degradati in quanto sensibili al calore, come arginina, cisteina, serina e treonina. Pertanto, nel caffè torrefatto si ritrovano concentrazioni molto basse di amminoacidi liberi e le



proteine in tracce, in quanto vengono quasi del tutto degradate nel processo di torrefazione [96-97; 99].

### ***Micronutrienti***

I minerali rappresentano dal 3 al 5% della parte secca dei chicchi di caffè verde. La maggior parte dei minerali presenti nel chicco di caffè verde, essendo idrosolubili, si ritrovano anche nella bevanda. I principali minerali presenti nel caffè verde sono potassio (1.3-2%), magnesio (0.16-0.31%), solfati (0.13%), calcio (0.04-0.07%) e fosfati (0.13-0.22%). La concentrazione del fosforo aumenta con la torrefazione questo sembra dovuto alla liberazione di altri composti, come i fitati. Oltre a questi composti nelle ceneri si identificano anche metalli pesanti che possono provenire dalla presenza nel suolo o dai macchinari utilizzati per la torrefazione. Tra i micronutrienti, il caffè presenta buone concentrazioni di nicotinammide, che aumenta sensibilmente in seguito all'idrolisi della trigonellina (acido N-metilnicotinico) durante la torrefazione. Questo ultimo composto rappresenta circa l'1% del peso secco dei chicchi di caffè verde e durante i processi di torrefazione viene decomposta in acido nicotinico e suoi esteri (pidina, 3-metilpiridina e pirroli). Alcune delle vitamine, in particolar modo vitamina B1, B2, B6, acido pantotenico, si riducono notevolmente con il processo di torrefazione. Fra gli acidi organici presenti all'interno dei chicchi di caffè si ritrovano principalmente acido acetico, formico, lattico, tartarico, piruvico e citrico [137-138].

### ***Composti bioattivi***

Il caffè è ricco di molte sostanze bioattive e il suo consumo è stato associato a molti effetti benefici. Questi includono, ma non solo, la riduzione del rischio di carcinoma epatocellulare, effetto antiproliferativo contro alcune forme di cancro umano, potenziale terapeutico contro la malattia di Alzheimer e la capacità antiossidante [138].

Tra i principali composti bioattivi presenti nel caffè vi sono:

- le *metilxantine* o *alcaloidi purinici* sono delle molecole, diffuse nel regno vegetale, presenti negli alimenti e nelle bevande nervine. La metilxantina maggiormente presente nel caffè è la caffeina, la sua concentrazione varia a seconda della varietà di caffè presa in considerazione e del grado di tostatura. Il contenuto di caffeina nei caffè verdi varia tra lo 0,9–1,4% per il caffè Arabica e 1,5–2,6% per il caffè Robusta. Il contenuto nel caffè tostato è solitamente superiore a quello del corrispondente caffè verde, fino al 10% nelle tostature più

scure, dovuto alla perdita fisica di peso di altri componenti presenti nei chicchi. Piccole quantità di altri alcaloidi sono state identificate e quantificate nel caffè tostato, ad esempio teobromina allo 0,009–0,037% e teofillina allo 0,00–0,013%. Tracce di paraxantina, teacrina e liberina sono state rilevate nei chicchi di caffè verde acerbi [139].

- Le ammine biogene (BAs) si possono formare nel caffè in seguito ai processi di trasformazione che subisce il chicco. In particolar modo, la fermentazione e il processo di torrefazione comportano la decarbossilazione microbica e/o termica degli amminoacidi con formazione delle rispettive BAs [140]. Nel caffè verde si sono riscontrate una maggiore quantità di poliammine totali (0,3-0,4 mg/Kg), la loro bassa concentrazione si pensi non sia dovuta ai processi fermentativi ma alla attività metabolica delle cellule. Le ammine maggiormente presenti sono la serotonina e la putrescina, seguite da spermina e spermidina. Nei caffè torrefatti, la putrescina e la spermina vengono degradate dai processi termici, mentre per quanto riguarda la serotonina e la spermidina si osserva una sensibile riduzione della loro concentrazione. Pertanto, i differenti gradi di tostatura influenzano notevolmente il contenuto di ammine biogene nel prodotto finito [141].

### ***Composti antinutrizionali***

Tra i composti antinutrizionali, come per il cacao e il tè, nel caffè sono presenti:

- *polifenoli* maggiormente rappresentati nel caffè sono acido clorogenico e gli acidi fenolici, di cui il caffè è la principale fonte a livello nutrizionale. La loro concentrazione varia a seconda del grado di torrefazione dei chicchi di caffè. Nel caffè verde la concentrazione di acido clorogenico (acidi caffeoilchinici) varia dal 6 al 10% in relazione alla specie e alla varietà considerata. Durante i processi di torrefazione, l'acido clorogenico per idrolisi forma acido caffeico e acido chinico. Oltre a questi due composti, sono presenti nel caffè torrefatto acido ferulico e cumarico. Pertanto, il processo di torrefazione degrada fino al 70-75% di acido clorogenico consentendo il rilascio degli acidi corrispondenti [115].
- *Acido ossalico*, è presente principalmente nel caffè verde a concentrazioni inferiori allo 0,2%, mentre per quanto riguarda il caffè torrefatto l'acido ossalico è presente in tracce [142].

## CAPITOLO IV

# CASO STUDIO: DETERMINAZIONE DI COMPOSTI BIOATTIVI COME MARKER DI QUALITA' DEGLI ALIMENTI E BEVANDE NERVINE

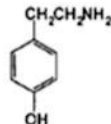
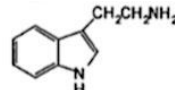

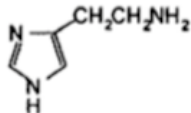

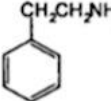
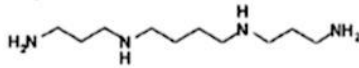
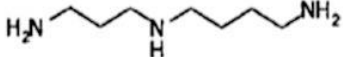
### 4.1. Composti bioattivi

I composti bioattivi sono molecole presenti spesso in piccole quantità all'interno degli alimenti e la loro assunzione con la dieta può apportare benefici per la salute (attività antiossidante, antipertensiva, neuroprotettiva, cardioprotettiva, anti-infiammatoria, etc.) [143]. A differenza dei macronutrienti e micronutrienti essenziali, come lipidi, proteine, carboidrati, minerali e vitamine, questi composti non sono essenziali per la salute e l'organismo può svolgere le sue funzioni vitali anche in assenza di un loro apporto giornaliero.

#### *Le ammine biogene*

Le ammine biogene (BAs, biogenic amines) sono basi organiche, a basso peso molecolare. Presentano attività biologica e si formano negli alimenti per decarbossilazione microbica o termica dei corrispondenti amminoacidi o per transaminazione o amminazione di aldeidi e chetoni, mediante transaminasi amminoacidiche [26; 101]. Le ammine che si ritrovano negli alimenti possono essere distinte in due classi: le ammine biogene e le poliammine naturali. A loro volta le BAs possono essere suddivise in base alla loro struttura chimica: Ammine alifatiche (putrescine, cadaverina, spermina e spermidina), Ammine aromatiche (tiramina e feniletilamina) ed Eterocicliche (istamina e triptamina). Inoltre, le Bas sono anche classificate sulla base del numero di gruppi amminici presenti all'interno della loro struttura chimica: monoammine (tiramina, serotonina e feniletilamina), diammine (putrescina, triptamina e cadaverina) o poliammine (spermina e spermidina) [145]. In Tabella 4.1 sono riportate alcune BAs, i loro precursori amminoacidici e la struttura chimica.

**Tabella 4.1.** Ammine biogene e loro struttura chimica

Ammine Biogene	Abbreviazioni	Amminoacido precursore	Formula molecola	Struttura
Tiramina	TYR	Tirosina	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	
Triptamina	TRP	Triptofano	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	
Putrescina	PUT	Ornitina	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	
Istamina	HIS	Istidina	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub>	
Cadaverina	CAD	Lisina	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	
Feniletilamina	β-PEA	Fenilalanina	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N	
Spermina	SPM	Metionina	C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub>	
Spermidina	SPD	Metionina	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	

Gli alimenti che hanno una maggiore probabilità di presentare alte concentrazioni di BAs sono quelli che mostrano una composizione altamente proteica, tra cui si annoverano principalmente pesce e prodotti ittici, carne e latticini. Studi hanno evidenziato come anche in alimenti fermentati, come birra, sidro, vino, cioccolato, tè e caffè vi sia la possibilità che si formino ammine biogene [146-147]. L'accumulo di BAs all'interno degli alimenti richiede la disponibilità di precursori, ossia amminoacidi liberi, che si ritrovano come tali nel prodotto o che possono essere liberati attraverso meccanismi di proteolisi. Oltre alla disponibilità di precursori amminoacidi, l'accumulo di Bas negli alimenti richiede la presenza di microrganismi, con la capacità di decarbossilare gli amminoacidi, e di condizioni ottimali per la loro crescita e attività decarbossilasica [113].

La temperatura di conservazione del prodotto alimentare è il fattore più importante che contribuisce alla formazione delle BAs. Altri fattori che possono influenzare la crescita dei microrganismi e di conseguenza la concentrazione delle ammine biogene negli alimenti sono pH, attività dell'acqua, concentrazione di sale (NaCl) e additivi [145]. Le ammine biogene prendono parte a processi fisiologici nell'uomo e negli animali, svolgendo alcune delle normali funzioni dell'organismo (es. neurotrasmettitori, mediatori chimici dell'infiammazione, metabolismo cellulare, etc.) (Tabella 4.2.) [113].

**Tabella 4.2.** Effetti fisiologici delle ammine biogene

<b>Ammine biogene</b>	<b>Effetti fisiologici</b>
Istamina	Rilascio di noradrenalina e adrenalina Processi Allergici Stimolazione della muscolatura liscia di intestino, utero e tratto respiratorio Controllo della secrezione gastrica Stimolazione di neuroni sensoriali e notori
Tiramina	Vasocostrizione periferica Incremento della portata cardiaca Controllo della salivazione e lacrimazione Aumento della glicemia Rilascio noradrenalina Emicrania
Putrescina e Cadaverina	Bradycardia Ipotensione Trisma Paralisi Potenziamento della tossicità di altre ammine biogene
Triptamina	Aumento della pressione sanguigna Emicrania Nausea Schizofrenia
$\beta$ -feniletilammina	Aumento della portata cardiaca Ipotensione Bradycardia Rilascio noradrenalina Emicrania
Spermina e Spermidina	Ipotensione Bradycardia Potenziamento degli effetti tossici delle altre ammine biogene
Serotonina	Regolazione ritmo cardiaco Regolazione dell'appetito Regolazione del tratto gastro intestinale Controllo pressione sanguinea Attività vasocostrittrice e trombogena

Il consumo di alimenti contenenti elevate concentrazioni di BAs può comportare tuttavia effetti tossici più o meno gravi sull'organismo del consumatore. Una delle problematiche maggiori, che viene ricondotta alla contaminazione di ammine biogene negli alimenti, è la cosiddetta "Sindrome sgombroide" (Scombrotossin Fish Poisoning, SFP), anche detta "Histamine Poisoning", ovvero "intossicazione da istamina", generalmente associata

all'ingestione di pesce contaminato da ammine biogene. Il livello tossicologico delle ammine biogene è molto difficile da stabilire poiché dipende dalle caratteristiche individuali e dalla presenza simultanea di più ammine nell'alimento [104-105]. Pertanto, per alcune Bas è stata definita la concentrazione soglia negli alimenti al fine di limitare le intossicazioni alimentari legate alla loro assunzione. Sulla base delle raccomandazioni riportate nel Codex Alimentarius, la Commissione Europea ha posto l'attenzione in modo specifico ai prodotti alimentari a più alto rischio di contaminazione da ammine biogene. Questi regolamenti sono volti a limitare la quantità di BAs negli alimenti, in modo da proteggere la salute dei consumatori. A livello europeo ed extraeuropeo, i limiti massimi di concentrazione accettabili sono stati definiti solo per l'istamina nel pesce e nei prodotti ittici, mentre in altri alimenti ci sono solo limiti proposti e/o limiti raccomandati (Tabella 4.3.). Il limite per le altre BAs o altri prodotti alimentari non è presente in nessuna legislazione nazionale [113].

**Tabella 4.3.** Concentrazioni limite per l'istamina in differenti Paesi

<b>Regolamento</b>	<b>Prodotto alimentare</b>	<b>Limite (mg/Kg)</b>
<b>Reg. (EC) no. 1019/2013 (modify Reg. (EC) no. 2073/2005)</b>	Pesce ((Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryphenidae, Pomatomidae, and Scomberesocidae)	100-200
	Pesci che hanno subito processi di trasformazione	200-400
<b>USFDA</b>	Pesce e prodotti ittici	500
<b>FSANZ</b>	Pesci di differenti specie	100
<b>Codex Alimentarius</b>	Pesce e prodotti ittici t (Clupeidae, Scrombridae, Scromberesocidae, Pomatomidae, and Coryphaenidae families)	100

In condizioni fisiologiche le ammine possono essere metabolizzate da tre enzimi differenti (la diamminossidasi, DAO; la monammiosidasi, MAO; l'istamina-N-metiltransferasi, HMT), presenti nel tratto gastro-intestinale dei mammiferi, che hanno la capacità di ossidare i gruppi amminici delle BAs [149]. Questo sistema è in grado di degradare concentrazioni di ammine che vengono assunte con il normale consumo di cibo. Tuttavia, l'assunzione di alcune BAs, come la serotonina e la  $\beta$ -feniletilamina, può avere effetti benefici sull'organismo (effetti psicoattivi, proprietà vasocostrittive, etc.) [150].

### ***Gli acidi grassi essenziali***

Gli acidi grassi (AG) sono la componente che contraddistingue i differenti tipi di lipidi., dai trigliceridi ai lipidi complessi. Questi composti sono caratterizzati dalla presenza di una lunga catena carboniosa, che viene definita catena alifatica, che presenta un gruppo carbossilico (-COOH) ad un'estremità e nell'altro estremo un gruppo metilico (-CH<sub>3</sub>). Gli acidi grassi sono composti sintetizzati in natura attraverso la condensazione di unità di malonil-coenzima A per l'azione di un complesso multienzimatico chiamato "*acido grassi sintetasi*". Gli AG di interesse biologico sono gli acidi carbossilici con un numero pari di atomi di carbonio (per lo più tra 4 e 26). Sulla base della lunghezza della catena carboniosa gli AG possono essere classificati in: *acidi grassi a corta catena*, che presentano un numero di carboni nella catena alifatica inferiore a 14, e *acidi grassi a media e lunga catena*, con numero di carboni superiore a 14 [12].

La catena carboniosa si può presentare in forma lineare, ramificata o ciclica a seconda del numero di doppi legami in essa contenuti. La presenza di doppi legami all'interno della catena alifatica condiziona le caratteristiche chimico-fisiche del composto, in particolar modo la temperatura di fusione, l'insolubilità in acqua, etc.

A seconda del numero di doppi legami, gli AG vengono classificati in:

- *Acidi grassi saturi*, se non presentano doppi legami;
- *Acidi grassi monoinsaturi*; se presentano un solo doppio legame;
- *Acidi grassi polinsaturi*, se presentano due o più doppi legami.

Negli acidi grassi naturali, la disposizione spaziale dell'idrogeno nei legami semplici è *trans* (*t*), mentre nei legami doppi assume quasi sempre una conformazione di tipo *cis* (*c*), questo crea un angolo di circa 30 gradi in questa posizione che ne consente l'attacco enzimatico. Gli acidi grassi con doppi legami di tipo *trans* sono lineari, come quelli saturi, a differenza di quelli con doppi legami tipo *cis*; pertanto, gli acidi grassi *trans* dal punto di vista nutrizionale possono sostituire gli acidi grassi del tipo *cis* e, in quanto essi sono in grado di produrre la stessa quantità di energia, ma non hanno le stesse proprietà biologiche [151].

In Tabella 4.4. sono riportati i principali AG, il numero di atomi di carbonio, i doppi legame e la nomenclatura. Tra gli acidi grassi polinsaturi, quelli della serie omega-3 ( $\omega$ -3) e omega-6 ( $\omega$ -6), ossia quegli AG che presentano doppi legami tra il terzo e il sesto carbonio terminale della catena alifatica hanno una grande rilevanza dal punto di vista nutrizionale. Il principale AG polinsaturo della serie  $\omega$ -6 presente negli alimenti è l'acido

linoleico (LA), che si ritrova in particolar modo negli oli vegetali. Mentre tra gli AG della serie  $\omega$ -3 quello più abbondante è l'acido alfa linolenico (ALA), l'acido ecosapentanoico (EPA) e il decosapentanoico (DHA), presenti principalmente nei pesci e prodotti ittici. Gli acidi grassi  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 vengono definiti acidi grassi essenziali, ossia una classe di AG che l'uomo deve assumere con la dieta in quanto non è in grado di sintetizzarli. Bisogna mantenere un rapporto ottimale tra  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 di 1:5 e l'apporto consigliato con la dieta deve essere pari a circa 0,1% delle calorie totali giornaliere. Gli acidi grassi essenziali sono necessari per la formazione di membrane cellulari, il corretto sviluppo e funzionamento del cervello e del sistema nervoso [108; 110].



**Tabella 4.4.** Principali acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi negli alimenti

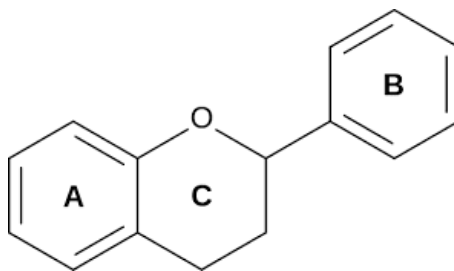
Nome Comune	Nome IUPAC	Struttura
<b>Acidi Grassi Saturi</b>		
Acido Butirrico	Acido Butanoico	C 4:0
Acido Caproico	Acido Esanoico	C 6:0
Acido Caprilico	Acido Ottanoico	C 8:0
Acido Caprico	Acido Decanoico	C 10:0
Acido Laurico	Acido Dodecanoico	C 12:0
Acido Miristico	Acido Tetradecanoico	C 14:0
Acido Palmitico	Acido Esadecanoico	C 16:0
Acido Stearico	Acido Ottadecanoico	C 18:0
Acido Arachidico	Acido Icosanoico	C 20:0
Acido Beenico	Acido Docosanoico	C 22:0
Acido Lignocericico	Acido Tetracosanoico	C 24:0
<b>Acidi Grassi Monoinsaturi (MUFA)</b>		
Acido Lauroleico	Acido (Z)-Dodeca-9-Enoico	C 12:1 N-3
Acido Miristoleico	Acido (Z)-Tetradeca-9-Enoico	C 14:1 N-5
Acido Palmitoleico	Acido (Z)-Esadeca-9-Enoico	C 16:1 N-7
Acido Oleico	Acido (Z)-Octadeca-9-Enoico	C 18:1 N-9
<b>Acidi Grassi Polinsaturi (PUFA)</b>		
Acido Linoleico	Acido (9z,12z)-Octadeca-9,12-Dienoico	18:2n-6
Acido Alfa-Linolenico	Acido (9z,12z,15z)-Octadeca-9,12,15-Trienoico	18:3n-3
Acido Gamma-Linolenico	Acido (6z,9z,12z)-Octadeca-6,9,12-Trienoico	18:3n-6
Acido Stearidonico	Acido (6z,9z,12z,15z)-Octadeca-6,9,12,15-Tetraenoico	18:4n-3
Acido Arachidonico	Acido (5z,8z,11z,14z)-Icosa-5,8,11,14-Tetraenoico	20:4n-6
Acido Eicosapentaenoico	Acido (5z,8z,11z,14z,17z)-Icosa-5,8,11,14,17-Pentaenoico	20:5n-3
Acido Docosapentaenoico	Acido (7z,10z,13z,16z,19z)-Docosa-7,10,13,16,19-Pentaenoico	22:5n-3
Acido Docosaesaenoico	Acido (4z,7z,10z,13z,16z,19z)-Docosa-4,7,10,13,16,19-Esaenoico	22:6n-3

All'interno degli alimenti spesso gli AG si trovano legati a una molecola di glicerolo, formando così esteri del glicerolo anche detti trigliceridi o tiacilgliceroli. Al posto dei gruppi ossidrilici della molecola di glicerolo sono presenti le catene alifatiche di tre differenti AG. La concentrazione di AG liberi, ossia gli AG che si idrolizzano dal trigliceride, viene presa in considerazione per valutare lo stato di conservazione degli alimenti. La presenza di acidi grassi liberi (*Free Fatty Acid*, FFA), aumenta l'acidità dell'alimento. Questo fenomeno, definito inacidimento, è favorito dall'umidità e dall'azione combinata della luce e dell'enzima lipasi; inoltre, i processi di inacidimento degli alimenti possono portare alla formazione di *off-flavours*. Un ulteriore fenomeno che avviene a carico degli AG è l'irrancimento chetonico, un processo di natura enzimatica

che provoca la  $\beta$ -ossidazione dell'AG con formazione del  $\beta$ -chetoacido corrispondente, che a sua volta subisce decarbossilazione, portando alla formazione di un metilchetone [152]. L'ultimo processo di deterioramento alimentare a carico dei lipidi è l'irrancidimento ossidativo, dovuto in questo caso all'azione della luce, del calore o di ambienti fortemente ossidanti. L'irrancidimento ossidativo prevede una prima fase di iniziazione in cui si ha la formazione di radicali, una fase di propagazione e una fase finale di terminazione in cui i radicali si bloccano in forme chimiche stabili. Si tratta di un processo favorito negli acidi grassi insaturi o polinsaturi in quanto la presenza di doppi legami stabilizza il radicale e favorisce pertanto l'iniziazione e la propagazione. Risulta pertanto importante la copresenza nell'alimento delle specie antiossidanti, in grado di intervenire soprattutto nella fase di iniziazione radicalica rallentandola, in modo da prevenire il processo di irrancidimento ossidativo [108-110].

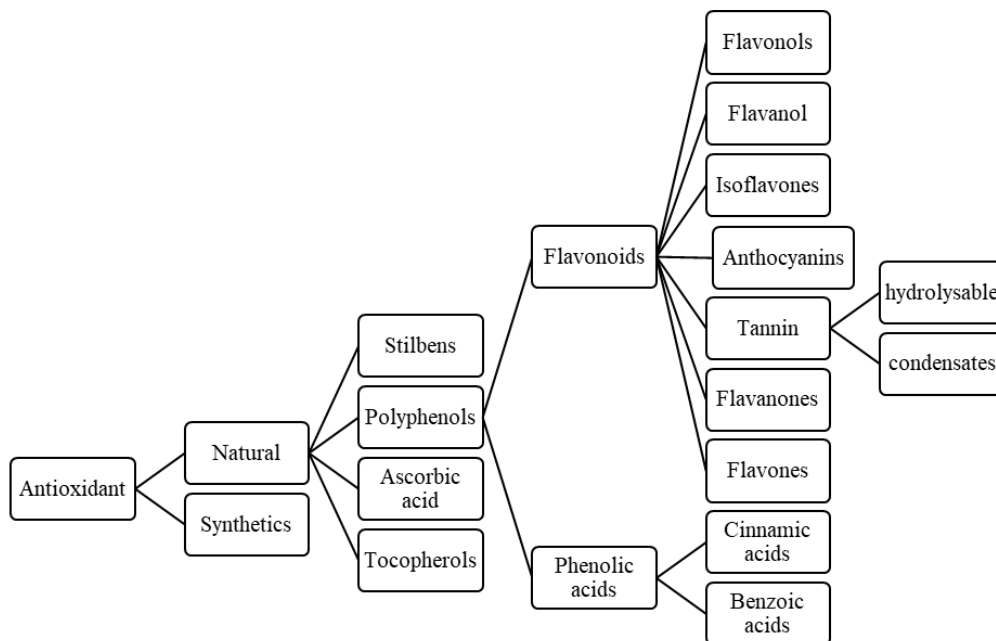
### ***I polifenoli***

I polifenoli, molecole ad alto peso molecolare, sono una grande famiglia di composti organici presenti in natura caratterizzati da molteplici unità fenoliche, ossia contenti diversi gruppi ossidrilici su una struttura centrale aromatica (Figura 4.1.). Questi composti sono presenti principalmente alimenti di origine vegetale.



**Figura 4.1.** Struttura generale dei polifenoli

All'interno dei polifenoli si possono distinguere due classi principali: i *flavonoidi*, al cui interno sono presenti flavonoli, flavanoli, isoflavoni, antocianine, tannini, flavononi e flavoni, e *acidi fenolici*, costituiti da acidi cinnamici e acidi benzoici (Figura 4.2) [100; 108].



**Figure 4.2.** Schema riassuntivo dei differenti tipi di polifenoli

Il processo produttivo degli alimenti influenza notevolmente la composizione dei polifenoli nel prodotto finito. Infatti, questi composti tendono a degradarsi con l'esposizione alla luce, alle temperature o per la coesistenza di enzimi negli alimenti. Inoltre, i polifenoli possono essere ossidati, con formazione di chinoni, in cui i gruppi ossidrilici (-OH) sono trasformati in gruppi carbonilici (-C=O), queste trasformazioni possono portare ad alterazioni sensoriali all'interno dell'alimento. Questi composti sono importati per l'organismo umano in quanto gli vengono attribuite differenti proprietà benefiche, tra cui capacità antiossidanti e antinfiammatorie, capacità antibatteriche, citotossiche, etc. [90].

## 4.2. Metodi analitici per la determinazione dei composti bioattivi

La determinazione dei composti bioattivi è importante per la valutazione degli attributi relativi alla sicurezza e alla qualità dei prodotti freschi e trasformati. Pertanto, la determinazione delle BAs viene effettuata per la loro potenziale tossicità e poiché possono questi composti possono essere presi in considerazione come indicatori di qualità alimentare (Biogenic Amines Quality Index; BAQI e Biogenic Amines Index; BAI)[153-154]. Infatti, alcune delle principali applicazioni dell'analisi delle BAs sono: il controllo di qualità delle materie prime, dei prodotti intermedi e dei prodotti finiti, il monitoraggio

dei processi di fermentazione, il controllo del processo di trasformazione degli alimenti e il controllo dello stoccaggio e della modalità di conservazione [155].

Negli anni si sono sviluppate varie metodiche analitiche per l'analisi quali-quantitativa delle BAs negli alimenti. Prima di effettuare la determinazione strumentale il campione deve essere trattato, con tecniche differenti a seconda della matrice presa in esame. Tutti i metodi analitici possono essere suddivisi in tre fasi, sulla base della complessità dell'alimento preso in esame. La prima fase del metodo analitico, indispensabile per l'analisi delle BAs, detta "*clean-up*", prevede l'estrazione dalla matrice dei composti d'interesse, la loro purificazione e, dove sia necessario, la concentrazione dell'estratto. Questa tappa è considerata la fase critica del processo di estrazione poiché va ad incidere negativamente sul recupero analitico delle BAs. L'estrazione deve essere più selettiva possibile in modo da ridurre gli interferenti che vengono co-estratti [156]. L'estrazione delle ammine biogene da matrici solide viene effettuata con metodo di estrazione liquido-liquido (LLE, liquid-liquid extraction). Questa fase è anticipata dall'omogeneizzazione della matrice d'interesse in presenza di un acido. I solventi acidi più usati sono acido tricloroacetico (TCA), acido perclorico e acido cloridrico. Possono essere usati per l'estrazione anche il metanolo e altri solventi organici [157]. La fase che segue è quella di purificazione, che ha la funzione di ridurre gli interferenti che vengono co-estratti e arricchire la concentrazione dell'estratto stesso. Questa tappa del processo di estrazione può essere effettuata mediante due processi: la ripartizione liquido-liquido (LLE) o la ripartizione solido-liquido (SPE, solid phase extraction). Mediante la metodica LLE si vanno ad eliminare gli interferenti con l'aggiunta di diverse miscele di solventi organici. Lo svantaggio è l'utilizzo elevato di solventi organici, la formazione eventuale di emulsioni e la difficile automatizzazione del processo. La tecnica SPE, che generalmente viene preferita alla LLE, è caratterizzata dalla presenza di cartucce che contengono specifici solidi adsorbenti, che consentono di trattenere gli interferenti o gli analiti d'interesse e di concentrare l'estratto. La SPE presenta diversi vantaggi, tra cui la ridotta manipolazione del campione e il ridotto consumo di solventi organici [109-110]. A seconda del tipo di rivelatore, che viene scelto per l'analisi, comporta una diversa manipolazione del campione. Nel caso in cui vengano utilizzati rivelatori spettrofotometrici, per aumentare la sensibilità della rivelazione, è previsto il processo di derivatizzazione, in quanto non tutte le ammine hanno gruppi cromofori, che ne consentano l'individuazione [111-112]. Le reazioni di derivatizzazione avvengono tra i gruppi amminici delle ammine biogene e i reagenti marcatori. Questa reazione può essere

eseguita prima (metodi pre-colonna) o dopo (metodi post-colonna) l'analisi cromatografica. I metodi pre-colonna, sebbene siano maggiormente usati, sono solitamente più suscettibili alle varie componenti della matrice, rispetto ai metodi post-colonna. I più comuni derivatizzanti sono il dansil-cloruro (DNSCl), il dabsil-cloruro (DABSCl) e l'O-ftaldeide (OPA). Tra i vari agenti di derivatizzazione, il dansil-cloruro è uno dei più usati, in quanto ha la capacità di reagire con tutte le ammine presenti nel campione formando derivati stabili [113-115]. La dansilazione pur offrendo prodotti stabili, richiede però tempi lunghi di reazione e necessita inoltre del riscaldamento dei campioni. L'O-ftaldeide (OPA) è un altro noto agente derivatizzante applicato nell'analisi delle ammine biogene. L'OPA reagisce rapidamente con le Bas a temperatura ambiente, potando alla formazione di un prodotto fluorescente, rilevabile mediante spettroscopia. Inoltre, tale reagente può essere utilizzato come derivatizzazione sia pre-colonna e sia post-colonna. Altro agente derivatizzante ampiamente utilizzato è il benzoil-cloruro, che fornisce prodotti di reazione stabili con una procedura di derivatizzazione di breve durata. Tale composto presenta numerosi vantaggi, ad esempio non specifico per un dato composto ed è relativamente poco costoso. Tuttavia, essendo un reagente non specifico, potrebbe combinarsi con altri composti presenti nella matrice alimentare, come fenoli, alcoli alifatici e alcuni zuccheri; il DNS-Cl si comporta allo stesso modo [116-117]. In seguito al processo di derivatizzazione si procede con l'analisi strumentale del campione. I metodi di separazione mediante cromatografia liquida sono tra i più popolari e tra i più utilizzati per la determinazione, selettiva e sensibile, delle BAs negli alimenti. Tra i diversi metodi analitici cromatografici, che sono stati sviluppati per l'analisi di BAs negli alimenti, si elencano: la cromatografia su strato sottile (TLC), la gas cromatografia (GC), l'elettroforesi capillare (CE), la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e la cromatografia liquida ad ultra-alte prestazioni (UHPLC). Tutti i processi di separazione sono seguiti dalla rilevazione delle BAs; le metodiche più utilizzate prevedono l'utilizzo della spettroscopia ad ultravioletto (UV) o a fluorescenza (FL), non sono però le uniche modalità impiegate per la rilevazione delle ammine, infatti, possono essere utilizzate anche: lo spettrometro di massa (MS), il rivelatore a conducibilità termica (TCD) e il rivelatore conduttimetrico [157]. La tecnica più utilizzata per la determinazione delle ammine biogene in diversi tipi di alimenti è la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) con colonna C-18 in fase inversa-Inoltre, questa metodica è stata indicata dal regolamento (UE) n° 1019 del 23 ottobre del 2013 come metodo standard per le analisi delle BAs nel pesce e nei

prodotti ittici trasformati e fermentati [165]. La seconda metodica analitica più usata è la gas cromatografia (GC), generalmente accoppiata allo spettrometro di massa (MS). In questa modalità di analisi le BAs vengono estratte in metanolo alcalino ed iniettate in colonna senza la necessità di derivatizzare i composti. Solitamente questa tecnica viene adottata per effettuare l'analisi di BAs volatili e termostabili. Recentemente sono stati raggiunti buoni risultati nell'analisi delle BAs mediante UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography), simile per funzionamento all'HPLC. Tale tecnica risulta avere una maggiore sensibilità, maggiore risoluzione e, rispetto alla HPLC richiede un minor tempo di analisi. Lo svantaggio di tale metodica sono i costi della strumentazione [109; 117].

Per quanto riguarda la determinazione degli acidi grassi liberi questi vengono estratti dalla matrice alimentare mediante tecniche di estrazione liquido-liquido (LLE) o estrazione in fase solida. Per l'estrazione ad oggi son adoperati differenti tipi di solventi organici: cloroformio, esano, eptano, etere di petrolio o miscele cloroformio/metanolo. Ad oggi per l'estrazione di FFA si preferisce adoperare tecniche che prevedono un minor utilizzo di solventi organici, come l'estrazione con microonde o con fluidi supercritici, in quanto sono metodiche più vantaggiose poiché consentono di essere rapide e meno impattanti dal punto di vista ambientale. Spesso, al fine di determinare la concentrazione totale di FFA negli alimenti prima della procedura di estrazione vengono adoperate delle lipasi che consentono di rompere il legame estere tra l'AG e il glicerolo, liberando così tutti gli AG presenti nel campione esaminato. La determinazione del contenuto di FFA è un'analisi importante per valutare la qualità della materia prima e la sua degradazione durante lo stoccaggio e per tutta la durata di conservazione di diverse matrici alimentari. Inoltre, il processo di ossidazione può conferire qualità e attributi sensoriali differenti agli alimenti [152].

Per la determinazione degli alimenti esistono ad oggi differenti metodi, tra questi abbiamo la titolazione, la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), l'elettroforesi capillare (CE) e l'analisi mediante gascromatografia (GC). Ad oggi i metodi cromatografici sono quelli maggiormente adoperati, in particolar modo si prediligono i metodi gascromatografici. Alle tecniche GC vengono accoppiati principalmente due tipi differenti di rivelatori: ovvero il rivelatore a spettrometria di massa (MS) e il rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). Quest'ultimo rivelatore è uno dei rivelatori maggiormente e comunemente utilizzato come rivelatore per rilevare i FFA. Il FID è il rivelatore che si ritiene più appropriato rispetto ad altri rivelatori per via della sua sensibilità e risoluzione

e perché affidabile e relativamente facile da usare. Tuttavia, altri composti, oltre ai FFA, possono essere rilevati utilizzando questo tipo di rivelatore. Invece, i rivelatori di spettrometria di massa (MS) tendono a degradare termicamente i campioni prima che possano essere rilevati. Tuttavia, seppure la determinazione tramite GC-FID consenta una migliore accuratezza dei risultati, i campioni con questa procedura di rivelazione devono essere esterificati, in quanto la gascromatografia consente la rivelazione di analiti volatili. Altro metodo di determinazione dei FFA altamente adoperato è la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), in quanto ha una migliore selettività ed è in grado di rilevare un maggior numero di analiti. Tuttavia, questa metodica di analisi è altamente costosa e prevede una procedura lunga nella preparazione dei campioni in quanto, al fine di rilevare gli acidi grassi liberi, questi devono essere derivatizzati, con differenti tipi derivatizzanti (ioduro di metile, 2-idrazinochinolina, 2-(4-nitro) fenil-1-H-fenantrene imidazolo, etc.) [105; 119-120].

Le procedure di determinazione dei polifenoli all'interno di matrici alimentari avvengono in seguito ad estrazione e purificazione degli analiti d'interesse. L'estrazione dei polifenoli può essere eseguita utilizzando un solvente polare come acqua, acqua calda, metanolo, metanolo/acido formico, metanolo/acqua/acido acetico o formico. Questa procedura può essere eseguita mediante l'estrazione liquido-liquido (LLE) o mediante cromatografia in controcorrente (contro-current chromatography, CCC). Altro tipo di estrazione che viene applicata per la determinazione dei polifenoli è l'estrazione in fase solida (*Solid Phase Extraction*, SPE), che viene effettuata principalmente su cartucce assorbenti C18. Altre tecniche, di più moderna applicazione, sono l'estrazione ad ultrasuoni, l'estrazione assistita da microonde, l'estrazione mediante CO<sub>2</sub> supercritica, l'estrazione mediante liquidi pressurizzati, etc. [95; 121-122].

Le condizioni di estrazione (temperatura, tempo di estrazione, rapporto tra solvente e materia prima, solvente e concentrazioni) devono essere ottimizzate per ogni matrice alimentare considerate. Nel caso in cui un campione contiene basse quantità di polifenoli, può essere concentrato mediante ultrafiltrazione. Per una prima determinazione complessiva delle concentrazioni di polifenoli nella matrice alimentare e per lo studio della capacità antiossidanti, vengono applicati saggi spettrofotometrici basati sulla variazione dell'assorbanza dei polifenoli dopo essere entrati a contatto con reattivi ossidanti. Per determinare sia qualitativamente che quantitativamente le singole specie si ricorre invece alla cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) o, in alcuni casi, all'elettroforesi capillare, tecniche basate sulla separazione delle molecole in virtù della

loro interazione con una fase stazionaria o con un campo elettrico. In questo caso, è fondamentale una fase di pretrattamento e purificazione, volto ad eliminare possibili interferenti, come teobromina e caffeina. A tale scopo, possono essere utilizzate resine adsorbenti specifiche o colonne semi-preparative da applicare prima della colonna HPLC. La tecnica di *clean-up* più utilizzata, tuttavia, prevede l'utilizzo di cartucce SPE (*Solid-Phase Extraction*) che, attraverso l'impiego di una fibra e di piccole quantità di solvente, sono in grado di trattenere gli interferenti e di purificare e concentrare l'analita nel campione. Sebbene i polifenoli possano essere separati anche mediante gascromatografia (GC), l'HPLC è preferibile poiché facilmente accoppiabile con un maggior numero di rivelatori. L'eluizione può essere condotta in modalità isocratica o a gradiente, utilizzando un solvente acquoso con uno organico, come metanolo (MeOH), tetraidrofurano (THF) o acetonitrile (ACN). Quest'ultimo solvente risulta essere il migliore dal punto di vista della risoluzione. La rivelazione viene effettuata tramite detector UV, poiché in polifenoli assorbono in questa regione spettrale, oppure tramite DAD (*Diod Array Detector*) che, con una sensibilità ed una selettività confrontabili con quelle del detector UV, consente di monitorare contemporaneamente più lunghezze d'onda [122-123].

### **4.3. Set up sperimentale**

#### **4.3.1. Materiali e metodi**

Per lo sviluppo di questo lavoro sperimentale, sono stati adoperati gli standard di otto ammine biogene (putrescina, PUT; cadaverina, CAD; istamina, HIS; tiramina, TIR; spermina, SPM; spermidina, SPD e serotonina, SER), di sei acidi grassi (linolenico, C18:3; miristico, C14:0; linoleico, C18:2; palmitico, C16:1; oleico, C18:1 e stearico, C18:0), acido gallico, rutina, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Eriochrome Black T (MB 11) e ammonio clorico (NH<sub>4</sub>Cl), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). I componenti precedentemente elencati sono stati forniti dalla Supelco (Bellefonte, PA, USA). Per la derivatizzazione delle ammine biogene è stata adoperato il Danisl-Cloruro (DNS-Cl), bicarbonato di sodio (NaHCO<sub>3</sub>), idrossido di ammonio (NH<sub>4</sub>OH) e idrossido di sodio (NaOH). Mentre, per la derivatizzazione degli acidi grassi sono stati utilizzati trietilammina (C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N), bromoacetofenone (4-(Br)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COCH<sub>3</sub>) e acido acetico glaciale (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>). Per la determinazione dei saggi spettrofotometrici sono stati adoperati il reattivo di Folin-Ciocalteu, carbonato di sodio (CNa<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 2,2-Diphenyl-1-



picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (ABTS), Nitrito di sodio (NaNO<sub>2</sub>) e Cloruro di alluminio (AlCl<sub>3</sub>). Oltre a questi composti, sono stati adoperati i seguenti solventi: acetone (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O), acido perclorico (HClO<sub>4</sub>), acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN), metanolo (CH<sub>3</sub>OH) e acqua bidistillata (d-H<sub>2</sub>O). Per la preparazione dei solventi eutettici profondi (DES) sono stati utilizzati colina cloridrato (ChCl), betaina, trietilenglicole e  $\alpha$ -D-glucosio, acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

I seguenti strumenti sono stati adoperati per la preparazione dei campioni:

- Bilancia analitica Sartorius mod. 1712;
- Frantumatore IKA A10 basic;
- Agitatore magnetico Inter Continental mod. 7216;
- Bagno termostatico ad acqua e ultrasuoni Bandelin Sonorex RK 100H;
- Centrifuga refrigerata NEYA 10R mod.17031;
- Filtri per siringa Whatman 0.45  $\mu$ m (PTFE), Sigma Aldrich
- Stufa G-Therm AG-System

Per la determinazione delle ammine biogene e degli acidi grasso nei campioni di cioccolato è stata effettuata mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), (Shimadzu, Kyoto, Japan). Lo strumento è costituito da una pompa binaria LC-10 ATVP con rivelatore a visibile e ad ultravioletti (SPD-10AVP) adoperato per gli acidi grassi e rivelatore fluorimetrico (RF-10° XL) adoperato per le ammine biogene. I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il software Class-VP (Shimadzu, Kyoto, Japan). Per l'analisi delle ammine biogene è stata utilizzata la colonna Superlcosil LC-18 (250x4.6 mm; 5  $\mu$ m) con pre-colonna Supelguard LC-18 (Supelco). Mentre per gli acidi grassi è stata adoperata Supelcosil LC-18 (15cmx4,6mm; 3 $\mu$ m) con precolonna Supelguard LC-18 (Supelco). Per le analisi spettrofotometriche dei polifenoli è stato applicato lo spettrofotometro 6705 UV-VIS, Jenway.

#### **4.3.2. Campionamento e preparazione dei campioni**

##### *Cioccolato*

I campioni di cioccolato sono stati scelti sulla base della percentuale di cacao in essa contenuta, in particolar modo sono stati presi in considerazione campioni con percentuali di cacao uguali e superiori al 50%. Inoltre, sono stati acquistati cioccolati fondenti a differenti percentuali di cacao a marchio flirtare. I 24 campioni di cioccolato fondente

sono stati acquistati presso rivenditori locali, supermercati e discount. Inoltre, sono stati scelti sulla base di differenti prezzi di vendita e sul tipo di marca. In Tabella 4.5 sono riportate le composizioni nutrizionali dei campioni di cioccolato fondente analizzato. Una volta acquistati, i campioni sono stati conservati a -18 °C. Prima delle analisi i campioni sono stati sminuzzati e frantumati, in seguito sono stati setacciati con un setaccio con fori di 2 mm. A seguire, la frazione ottenuta dal setacciamento è stata ulteriormente setacciata con setaccio di 0,7 mm. Alla fine della fase di separazione granulometrica del campione, sono state conservate la parte di campione di cioccolato con dimensioni comprese tra 0,7 mm e 2 mm (granella) e la frazione inferiore a 0,7 mm (polvere). Una volta campionati e preparati i campioni, questi sono stati conservati a -18 °C al buio fino al momento delle analisi.

**Tabella 4.5.** Caratteristiche dei campioni di cioccolato presi in esame

Campioni	% cacao	Composizione nutrizionale (g/100g prodotto)						
		Grassi totali	Ag. saturi	Carboidrati	Zuccheri Semplici	Proteine	Sale	
Convenzionale	CM50-1	50	29.4	17.7	50.7	48.4	6.1	0.01
	CM50-3	50	30.1	18.8	51.1	47.8	5.6	0.01
	CM60-1	60	36.6	21.7	45	38.6	7.7	0.05
	CM60-2	60	45	28	40	37	5.6	0.01
	CM60-3	60	34	22	39	36	7.9	0.05
	CM70-1	70	40	24	31	27	8.6	0.03
	CM70-3	70	40	24	31	27	8.6	0.03
	CM85-1	85	51	31	16	12	9.6	0.03
	CM85-2	85	46	28	19	11	12.5	0.02
	CM85-3	85	56	35	18	13	8.5	0.02
Fair trade	CM99-1	99	51	31	8	1	15	0.06
	CM99-2	99	54	32	16	1.5	11	0.01
	CM100	100	54	32	5.5	0.3	11.9	0.02
	FT50-1	50	31.8	19.1	49.6	47.1	5.4	0.01
	FT50-2	50	32	22	50	49	6	0.01
	FT50-3	50	32	20	50	48	6	0.01
	FT70-1	70	42	25	36	29	9.1	0.05
	FT70-2	70	45	27	33	25	8.9	0.05
	FT70-3	70	44	28	32	24	9	0.04
	FT70-4	70	41	24	37	28	9	0.03
	FT70-5	70	42	25	35	31	8.9	0.04
	FT85-1	85	46.8	28.2	21.4	12.9	10.8	0.03
	FT85-2	85	45.25	30.1	22.05	11.58	11.4	0.02
	FT85-3	85	48.04	29.87	21.20	12.7	10.3	0.03

## Tè

Sono state analizzate 20 bustine di tè commerciale di due varietà (verde e nero) acquistati da rivenditori locali. Per ogni varietà di tè sono stati acquistati dieci campioni di tre marche diverse. I campioni sono stati conservati al buio a  $T = 15-20^{\circ}\text{C}$  fino al giorno dell'analisi. Dai campioni acquistati sono stati ottenuti i rispettivi infusi come segue: le bustine di tè commerciali, di peso compreso tra 1,5 e 2 g, sono state aperte e per ogni aliquota sono stati pesati 2 g di campione. Il campione è stato poi posto in un pallone di vetro con 200 mL di acqua per l'infusione. Nello studio sono stati considerati tre differenti tipi di acqua: acqua di rubinetto (TW) con alta durezza ( $33,5^{\circ}\text{F}$ ), acqua distillata (DW) e acqua minerale naturale (NMW), a bassa durezza ( $13,3^{\circ}\text{F}$ ). Prima di procedere all'estrazione acquosa dei campioni di tè, la durezza dell'acqua è stata misurata come segue: 50 mL di campione sono stati posti in una beuta, a cui sono stati aggiunti 4 mL di  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3/\text{EDTA}$  e 0,2 g di MB11. La soluzione è stata poi titolata sotto agitazione con una soluzione 0,01 M di EDTA. I risultati sono stati calcolati come segue:

$$\text{Durezza } (^{\circ}\text{F}) = V_3 \times M \times 10V_4$$

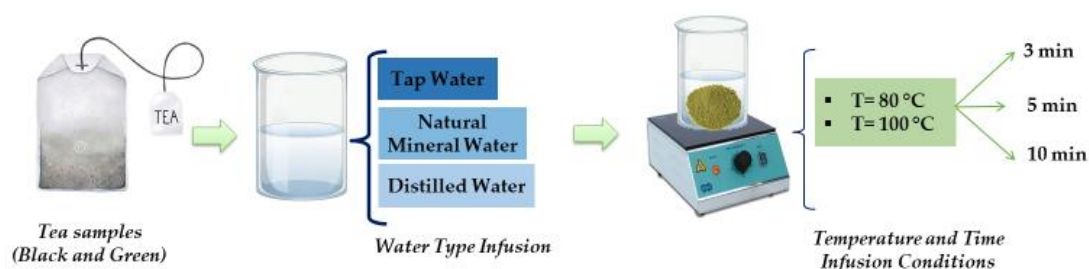
dove  $V_3$  è il volume (mL) utilizzato per la titolazione,  $M$  è la molarità dell'EDTA,  $V_4$  è il volume (mL) del campione testato. In Tabella 4.6 sono riportate le caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua.

**Tabella 4.6.** Caratteristiche fisicochimiche dell'acqua minerale naturale, di rubinetto e distillata

Parametri	Unità	NMW	TP	DW
Conduttività elettrica at $20^{\circ}\text{C}$	$\mu\text{S}/\text{cm}$	668	571	6.8
pH	-	7.06	7.50	7.00
Residuo fisso	mg/L	440	408	<1
Durezza	$^{\circ}\text{F}$	13.3	33.5	<0.01
Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ )	mg/L	124	104.0	-
Magnesio ( $\text{Mg}^{+}$ )	mg/L	29.4	18.70	-
Sodio ( $\text{Na}^{+}$ )	mg/L	4.0	4.1	-
Potassio ( $\text{K}^{+}$ )	mg/L	1.2	0.97	-
Bicarbonato ( $\text{HCO}_3^{-}$ )	mg/L	498	399	-
Solfati ( $\text{SO}_4^{2-}$ )	mg/L	17.2	16.60	-
Cloruro ( $\text{Cl}^{-}$ )	mg/L	6.6	6.5	-
Nitrati ( $\text{NO}_3^{-}$ )	mg/L	2	2.99	-
Nitriti ( $\text{NO}_2^{-}$ )	mg/L	<0.002	<0.01	-

L'estrazione dei composti fenolici dai diversi campioni di tè è stata eseguita per diversi tempi di infusione (3, 5, 10 minuti) e a diversi rapporti di temperatura ( $80^{\circ}\text{C}$  e  $100^{\circ}\text{C}$ ),

rispettivamente (Figura 4.3.). Queste condizioni di tempo e temperatura sono state scelte per replicare le normali condizioni di preparazione casalinga della bevanda.



**Figura 4.3.** Condizioni sperimentali per l'estrazione dei composti fenolici dai campioni di tè

### *Caffè*

In questo studio sono stati analizzati otto campioni di caffè: 2 caffè macinati per l'uso domestico, 2 caffè macinati per uso ristorativo, 2 caffè in capsule e 2 caffè in cialde. I campioni sono stati acquistati presso rivenditori locali nella città di Roma, in Italia. Le confezioni di caffè sono state aperte prima di effettuare l'analisi per evitare e limitare danni ossidativi. Per ogni tipo di caffè l'estratto, ossia la bevanda, è stata ottenuta in triplicato. Per le analisi sono stati utilizzati differenti metodi di estrazione: macchina per caffè moka (modello Bialetti, Italia), macchina per capsule (modello Krups Nespresso INISSIA XN100, Italia), macchina per cialde (modello De'Longhi Dedicata EC685.W, Italia) e macchina per caffè espresso professionale (modello Faema Hot steam, Italia). Per ogni tipo di estrazione è stata utilizzata la quantità di caffè necessaria per la specifica macchina, come indicato di seguito, con una quantità nota di acqua demineralizzata. Le condizioni di estrazione sono riportate in Tabella 4.7.

**Tabella 4.7.** Condizioni di estrazione per le diverse tecniche di infusione del caffè

Condizioni Di Estrazione	Peso polvere di caffè (g)	Volume di acqua (mL)	Pressione (Pa)	Tempo (s)	Temperatura (°C)
Moka	5	25	$10 \times 10^5$	300	95
Espresso Professionale	7	25	$18 \times 10^5$	25	96
Espresso Cialde	7.5	20	$18 \times 10^5$	30	90
Espresso Capsule	5.5	20	$15 \times 10^5$	30	90

Per la preparazione del caffè espresso mediante il metodo tradizionale è stata utilizzata la macchina per caffè professionale dopo aver pesato 7g di caffè in polvere per uso ristorativo, ossia la quantità necessaria per il portafiltro della macchina, il caffè è stato pressato nello stampo. Mentre, la moka monoporzione è stata preparata pesando 5g di caffè macinato per uso domestico senza pressare la polvere nel filtro e 25 mL di acqua, relativi al volume della caldaia della macchina. L'estrazione del caffè in capsule è stata effettuata ponendo la capsula, contenente quantità ponderate di caffè macinato e sigillato in atmosfera protettiva ( $5\pm 0.5$  g), nell'apposita macchina con sistema a capsule compatibile. Ogni capsula è stata usata una sola volta e poi smaltita. Per il caffè a cialde è stato adoperato un'altra macchina specifica per questo prodotto, le cialde sono costituite da caffè confezionato ( $7\pm 0.5$  g) e sigillato ermeticamente tra due fogli di carta da filtro. In entrambi i metodi il volume di acqua adoperato era di circa 20 mL. I campioni ottenuti mediante i differenti metodi di estrazione sono stati conservati a temperature refrigerate ( $T= 4\pm 2$  °C) fino al momento delle analisi.

### **4.3.3. Determinazione delle ammine biogene**

#### ***Cioccolato***

L'estrazione delle ammine biogene in campioni di cioccolato fondente a differenti percentuali di cacao (50%, 60%, 70%, 85% e 100%) sono state effettuate secondo il metodo descritto da Maddaloni et al. (2020) [171], con alcune modifiche. A 2,5 g di cioccolato sono stati aggiunti 7 mL di  $\text{HClO}_4$  a 0,6M. La miscela è stata lasciata a riposo per mezzora, prima di essere sottoposta ad agitazione magnetica a 300 rpm per 10 minuti. Successivamente, sono stati aggiunti 2 mL di soluzione e i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti a temperatura refrigerata ( $T=4\pm 1$  °C). Terminata la centrifuga il surnatante è stato prelevato e collezionato in un matraccio tarato da 20 mL. Sul corpo di fondo successivamente è stata effettuata nuovamente l'estrazione con la procedura di estrazione descritta precedentemente. Il surnatante è stato prelevato e mescolato con quello collezionato precedentemente. L'estratto ottenuto è stato filtrato con filtri per siringa FPTE 0,45  $\mu\text{m}$  e portato a volume con  $\text{HClO}_4$  a 0,6M.

#### ***Caffè***

L'estrazione delle ammine biogene nei campioni di caffè macinato in polvere è stata effettuata secondo il metodo descritto da Maddaloni et al. (2021) [172] con alcune

modifiche. 1 g di caffè macinato è stato pesato e posto in una provetta da centrifuga, successivamente sono stati aggiunti 10 mL di HCO<sub>4</sub> 0.6M omogenato in un bagno ad ultrasuoni per 10 min a 400 Hz a temperatura ambiente, poi centrifugato il surnatante e posto in una vaial ambrata. Mentre, per i campioni di caffè infuso l'estrazione è avvenuta secondo il metodo Vinci et al. 2021 [150], con alcune modifiche. 1 mL di campione è stato prelevato e posto in un matraccio ambrato da 10 mL successivamente è stato acidificato aggiungendo 0.6 mL di HClO<sub>4</sub> 10.3M per ottenere una concentrazione finale di 0.6M e portato a volume con H<sub>2</sub>O distillata. Gli estratti così ottenuti sono stati conservati a temperature di 4±2 °C.

### ***Preparazione soluzioni standard delle ammine biogene***

Al fine di identificare e quantificare le BAs presenti nei campioni reali sono state costruite delle rette di taratura attraverso l'analisi cromatografica di soluzioni standard a diversa concentrazione. Tali standard sono stati realizzati a partire da soluzioni madre a 1000 mg/L per ogni singola BAs. Da ciascuna di esse è stata prelevata un'aliquota per preparare un mix a 100 mg/L, successivamente utilizzato per preparare, per diluizione, le diverse soluzioni standard, con concentrazione compresa tra 0,1 e 25 mg/L.

### ***Derivatizzazione delle ammine biogene***

La fase di estrazione e purificazione del campione è seguita dalla reazione di derivatizzazione fase necessaria affinché le BAs possano essere rilevate in cromatografia liquida, per consentire la successiva analisi qualitativa e quantitativa degli analiti, in quanto la maggior parte non contiene un gruppo cromoforo che ne consente la rilevazione in fluorimetria. In questo studio come derivatizzante è stato utilizzato il DNS-Cl, che reagisce con numerosi composti, tra cui ammine primarie e secondarie, fenoli, alcoli alifatici e zuccheri (61). La reazione di derivatizzazione avviene a pH basico, per cui in seguito all'estrazione delle BAs dai campioni, ad 1 mL di estratto acido sono aggiunti 200 µL NaOH a 2N e 300 µL di soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub>. Successivamente vengono aggiunti 2 mL di DNS-Cl a concentrazione di 2mg/mL in acetone. Siccome il derivatizzante è un reattivo fotosensibile, il campione con i reattivi sono posti al buio per un'ora a 45 °C, favorendo in questo modo la reazione tra gli analiti di interesse e il derivatizzante. Successivamente, le soluzioni sono portate a volume di 5 mL con acetonitrile e successivamente filtrato con filtri per siringa FPTE 0,45 µm, prima di essere

iniettato in HPLC. Allo stesso modo sono state derivatizzate le soluzioni standard delle ammine biogene e il bianco, costituito dal solvente estraente (HCO<sub>4</sub>).

### ***Condizioni cromatografiche***

Le ammine biogene sono state rilevate mediante HPLC-FD in fase inversa e la loro separazione e la loro rilevazione è stata effettuata seguendo il metodo standardizzato definito dall'ISO 19343:2017, con alcune modifiche. Gli analiti sono stati eluiti mediante colonna Supelcosil LC-10 (250x4.6 mm; 5 µm) in fase inversa con pre-colonna Supelguard LC-18 (Supelco), accoppiata a rilevatore fluorimetrico ( $\lambda_{eccitazione}= 320$  nm;  $\lambda_{emissione}= 523$  nm). Il flusso è stato impostato a 1,2 mL/min, mentre la temperatura della colonna è stata posta a 30 °C. In Tabella 4.8. viene riportato il metodo utilizzato per le analisi delle BAs nei campioni di cioccolato fondente.

**Tabella 4.8.** Metodo strumentale per l'analisi cromatografica delle BAs

<b>Gradiente di eluizione</b>		
<b>Tempo</b>	<b>% Acetonitrile</b>	<b>% Acqua</b>
<b>0.03</b>	50	50
<b>3.00</b>	50	50
<b>18.00</b>	100	0
<b>21.00</b>	100	0
<b>25.00</b>	50	50
<b>30.00</b>	50	50

### **4.3.4. Determinazione degli acidi grassi liberi**

L'estrazione degli acidi grassi liberi è stata effettuata seguendo il metodo descritto da [151] con alcune modifiche. Su 0,1g di granella (frazione granulometrica di dimensioni tra 0,7 e 2 mm) di campioni di cioccolato fondente sono stati aggiunti 4 mL di n-esano. Successivamente, il campione è stato posto in un bagno ad ultrasuoni per 5 minuti a 30 °C e in seguito sono stati centrifugati a temperatura ambiente a 3000 rpm per 10 minuti. Successivamente, il surnatante è stato prelevato e collezionato in una vial, precedentemente pesata. Sul corpo di fondo è stata effettuata una seconda estrazione aggiungendo 2m di esano seguendo le procedure precedentemente descritte. I due estratti sono stati riuniti e portati a secco sotto flusso di Azoto (N<sub>2</sub>) e successivamente pesato per valutare l'effettiva quantità di frazione organica estratta.

### ***Preparazione di soluzioni standard degli acidi grassi***

Le rette di taratura degli acidi grassi presi in esame sono state effettuate mediante l'uso di soluzioni standard. Sono state preparate soluzioni madre a differenti concentrazioni per ogni singolo acido grasso analizzato: acido linolenico (5 mg/mL), acido miristico (2 mg/mL), acido linoleico (20 mg/mL), acido palmitico (2 mg/mL), acido oleico (20 mg/mL) e acido stearico (2 mg/mL) in esano. Da ciascuna di queste soluzioni madre sono state prelevate differenti aliquote per preparare i mix delle soluzioni standard, a differenti concentrazioni (Tabella 4.9.).

**Tabella 4.9.** Concentrazione dei differenti mix degli standard degli acidi grassi

<b>MIX</b>	<b>Concentrazioni (mg/mL)</b>					
	Ac. Linolenico	Ac. Miristico	Ac. Linoleico	Ac. Palmitico	Ac. Oleico	Ac. Stearico
<b>1</b>	0,04	0,2	0,4	0,4	1	1
<b>2</b>	0,02	0,08	0,2	0,2	0,5	0,8
<b>3</b>	0,01	0,04	0,1	0,1	0,3	0,3
<b>4</b>	0,005	0,02	0,05	0,08	0,1	0,2
<b>5</b>	0,002	0,005	0,012	0,05	0,08	0,1

### ***Derivatizzazione degli acidi grassi***

L'estratto organico portato a secco è stato ripreso con 2 mL di n-esano e filtrato con filtri per siringa a PTFE 0,45 µm. Successivamente, sono stati prelevati a 50 µL di campione a cui vengono aggiunti 50 µL di trietilammina (25 mg/mL in acetone) e 50 µL di bromoacetofenone (20 mg/mL in acetone). Il campione con i reattivi viene posto in stufa a 100 °C per 15 minuti, poi viene raffreddato e poi viene aggiunto 80 µL di acido acetico glaciale (10 mg/mL in acetone). Successivamente, viene posto nuovamente in stufa a 100 °C per 15 minuti. Dopo di che, il campione è stato raffreddato e portato a secco sotto flusso di N<sub>2</sub>. L'estratto portato a secco viene poi recuperato in 250 µL di una soluzione di acetonitrile/acqua (70:30, v/v) ed è stato sonicato nel bagno ad ultrasuoni per 15 minuti. Allo stesso modo sono state derivatizzate le soluzioni standard e il bianco, costituito dal solvente estraente (n-esano).

### ***Condizioni cromatografiche***

Per la separazione cromatografica degli acidi grassi è stata effettuata una separazione mediante colonna Supelcosil LC-18 (15cmx4,6mm; 3µm) in fase inversa, con precolonna



Supelguard LC-18 (Supelco). Il flusso della fase mobile è stato impostato a 0,8 mL/min e la temperatura della colonna è stata impostata a 43 °C. Gli acidi grassi sono stati rilevati mediante rivelatore UV-Vis ( $\lambda = 242$  nm). In Tabella 4.10 sono riportate le condizioni di eluizione degli acidi grassi.

**Tabella 4.11.** Metodo strumentale per l'analisi cromatografica degli acidi grassi

Gradiente di eluizione		
Tempo (min)	% Acetonitrile	%Acqua
0.03	70	30
7.00	75	25
20.00	80	20
25.00	100	0
30.00	100	0
32.00	70	30

### 4.3.5. Determinazione dei polifenoli

#### *Estrazione convenzionale*

##### **Cioccolato**

L'estrazione dei polifenoli mediante il metodo convenzionale è stata effettuata secondo il metodo descritto da Vinci et al. (2021). In seguito all'estrazione dei grassi, sul corpo di fondo dei differenti campioni di cioccolato, privato della frazione organica, sono stati aggiunti 5 mL di una soluzione di MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40, v/v). I campioni sono stati posti in un bagno ad ultrasuoni a temperatura di 30 °C per 5 minuti, successivamente sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante ottenuto è stato collezionato in un matraccio ambrato da 10 mL. L'estrazione è stata ripetuta sul corpo di fondo seguendo la procedura precedentemente descritta. Gli estratti dei campioni con percentuale di cacao superiore al 70% sono stati filtrati prima di effettuare i saggi spettrofotometrici.

##### **Tè**

Gli infusi di tè ottenuti mediante l'uso di differenti tipi di acqua e differenti rapporti di tempo-temperatura di infusione sono stati conservati a temperatura di  $4 \pm 2$  °C e i saggi spettrofotometrici sono stati effettuati direttamente sugli infusi di tè verde e tè nero.

## **Caffè**

I campioni di caffè ottenuti dall'estrazione mediante moka, macchina per cialde, macchina per capsule e macchina per il caffè espresso professionale sono stati estratti prelevando 1 mL di infuso di caffè e successivamente portato a volume in un matraccio da 50 mL con una soluzione di MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v). Inoltre, sono stati estratti i polifenoli dal caffè macinato con cui si sono ottenuti gli infusi mediante le differenti tecniche di estrazione. La procedura seguita è la seguente: sono stati pesati 0.1 g di polvere di caffè a cui sono stati aggiunti 5 mL di MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v). Le soluzioni sono state centrifugate a 3000 rpm per 10 min a temperatura ambiente e il surnatante è stato collezionato in un matraccio tarato da 10 mL. Sul corpo di fondo è stata effettuata una seconda estrazione come descritto precedentemente. Le estrazioni sono state eseguite il giorno in cui sono stati preparati gli infusi e tutti gli estratti sono stati conservati a temperature di  $4 \pm 2$  °C.

### ***Estrazione con i Deep eutectic solvent (DES)***

Al fine di ridurre l'impatto ambientale legato alla produzione di rifiuti tossici per la preparazione degli estratti idroalcolici per le analisi dei polifenoli, nuovi metodi di estrazione sono stati studiati negli anni [130-132]. Tra i metodi "green", ossia metodi chimici a basso impatto ambientale e non nocivi per la salute umana, si annoverano i Deep Eutectic Solvent (DES) o solventi eutettici profondi. Questi composti sono solventi che hanno caratteristiche analoghe ai Liquidi Ionici (Ionic Liquid, IL), la differenza principale tra DES e i IL sta nella natura del materiale di sintesi del solvente. Inoltre, i DES offrono numerosi vantaggi rispetto ai IL, in quanto sono solventi economici, inerti, facili da sintetizzare e la maggior parte di questi solventi sono biodegradabili [176]. I DES sono un mix di un sale di alogenuro o di un altro composto che agisce da accettore di legami idrogeno (HBA) e di un donatore di legami idrogeno (HBD). L'interazione tra HBA e HBD è dovuta alla formazione di legami idrogeno, forze di Van der Waals e legami deboli; la delocalizzazione della carica lungo tali legami è responsabile dell'abbattimento del punto di fusione della miscela rispetto a quello dei singoli componenti [177]. I DES presentano natura dipolare, stabilità termica e elevate capacità solvente. I HBD possono essere differenti molecole appartenenti a classi diverse: carboidrati, ammine, acidi, alcool, etc. I DES che sono maggiormente usati sono formati da Choline Chloride (ChCl), ossia gli HBA, ossia un sale di ammonio quaternario. Altro

HBA usato è la Betaina, più economica e meno tossica della ChCl. Recentemente, sono stati definiti NaDES (Natural Deep Eutectic Solvent) tutti quei DES che costituiti da molecole presenti in natura. Questi composti sono definiti “natural” in quanto giocano un ruolo importante nel trasporto, stoccaggio o solubilizzazione di metaboliti non solubili all’interno delle cellule o organismi. In generale, DES e NaDES condividono proprietà fisico-chimiche molto simili (forte capacità di dissolvere molecole protidiche, bassa pressione di vapore, etc.) [178], [179]. Questi liquidi possono essere preparati in tre modi diversi variando alcuni parametri (tempo di riscaldamento, temperatura, contenuto di acqua, etc.) a seconda della natura degli HBA e HBD scelti [133; 137]:

- *Metodo di riscaldamento e agitazione (Heating and stirring method)*: i componenti sono posti in un pallone chiusa e vengono riscaldati, a seconda della coppia DES tra 60-110 °C, sotto agitazione magnetica fino alla formazione di un liquido trasparente (tra i 15 min e 1 ora). Il riscaldamento non è raccomandato quando gli acidi carbossilici sono usati come HBD in combinazione con ChCl, per evitare la formazione di impurità come esteri tra ChCl e l'acido; invece, la macinazione dei componenti DES in un mortaio con un pestello a temperatura ambiente è preferibile per formare la fase liquida.
- *Metodo di evaporazione (Evaporating method)*: i componenti sono disciolti in acqua ed evaporati a 50 °C con Rotavapor. Il liquido ottenuto viene messo in un essiccatore con gel di silice fino a raggiunge un peso costante.
- *Metodo di liofilizzazione (Freeze-drying method)*: Basato sulla liofilizzazione di una miscela delle soluzioni acquose dei singoli componenti della coppia DES, questo metodo è il meno usato dei tre.

La viscosità è un parametro importante nella considerazione di un solvente per l'estrazione, in quanto favorisce il trasferimento di massa, la lavorazione, la manipolazione, etc. del campione. Anche se la fluidità della miscela può essere controllata in base alla natura delle molecole di partenza, dimensione delle molecole, del rapporto molare tra HBA e HBD, del contenuto di acqua e della temperatura, la maggior parte dei DES presenta una viscosità superiore a quella di molti solventi convenzionali, ma simile a quella dell'IL (>100 cP a temperatura ambiente) [138-140]. I DES sono stati preparati sulla base di studi precedenti che hanno analizzato l'estrazione di polifenoli da matrici alimentari [38; 128; 132]. In questo studio, due diversi HBA, Betaina (Bet) e Cloruro di Colina (ChCl), e due diversi HBD, Trietilenglicole (Teg) e Fruttosio (Fru),

sono stati considerati in determinati rapporti molari e a diversi percentuali di acqua (Tabella 4.12.).

**Tabella 4.12.** Composizione dei differenti DES

Sigla	HBA	HBD	Idratazione (%)	HBA: HBD Rapporto molare
DES-1			10	
DES-2	Coline Cloride	Triethylene glicole	20	ChCl:Teg (1:2)
DES-3			30	
DES-4			10	
DES-5	Betaina	Fruttosio	20	ChCl:Fru (1:1)
DES-6			30	
DES-7			10	
DES-8	Betaina	Triethylene glicole	20	Bet:Teg (1:2)
DES-9			30	
DES-10			10	
DES-11	Betaina	Fruttosio	20	Bet:Fru (1:1)
DES-12			30	

Il DES è stato preparato con il metodo del *riscaldamento e agitazione* [184]: l'HBD e l'HBA, nel rispettivo rapporto molare e contenuto di idratazione, sono stati posti in un pallone tappato a fondo piatto e riscaldati a 80°C per 15 minuti sotto agitazione costante (500 rpm), fino alla formazione di un liquido trasparente omogeneo. Le miscele sono state lasciate raffreddare a temperatura ambiente e quindi utilizzate per l'analisi. L'estrazione è stata effettuata su 0,1 g di campione di cioccolato fondente al 70% a cui sono stati aggiunti 10 mL dei differenti DES. Il campione è stato posto in un bagno ad ultrasuoni a differenti tempi (30, 40 e 50 minuti) e temperature (60, 70 e 80 °C) e lasciato sonicare. Successivamente, il campione è stato posto in centrifuga per 10 minuti a temperatura ambiente a 3000 rpm. Il surnatante è stato prelevato e collezionato in una vial ambrata. Gli estratti sono stati conservati a temperatura refrigerate prima di effettuare i saggi spettrofotometrici. L'estrazione dei composti fenolici con i DES è stata confrontata con l'estrazione con solventi convenzionali: MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40, v/v), MeOH e H<sub>2</sub>O. La procedura di estrazione convenzionale è stata effettuata sul campione di cioccolato fondente al 70%. Al fine di poter confrontare i risultati tra gli estratti convenzionali e DES, la procedura di estrazione con i solventi organici ha seguito la procedura di estrazione dei DES. L'estrazione è stata effettuata come segue: sono stati pesati 0,1g di campione a cui sono stati aggiunti 10 mL di solvente organico, il campione è stato posto in un bagno ad ultrasuoni alle condizioni di tempo e temperatura a cui sono stati effettuati gli estratti con i DES. Successivamente il campione è stato centrifugato a 3000 rpm per

10 min a temperatura ambiente e il surnatante è stato collezionato e conservato in vial ambrate a temperature refrigerate prima di effettuare i saggi.

### ***Saggi spettrofotometrici***

I composti fenolici contengono uno o più anelli aromatici con uno o più gruppi ossidrilici. Lo stato di ossidazione dell'anello piranico centrale e le sostituzioni o inclusioni nelle strutture di base forniscono una gamma complessa e diversificata di sostanze fenoliche. La spettroscopia UV-vis è una metodica rapida e semplice per l'analisi dei composti fenolici poiché lo spettro UV-vis è attribuito alle transizioni elettroniche che avvengono all'interno dei gruppi ossidrilici contenuti nei polifenoli. Il verificarsi delle transizioni è quindi caratteristico delle diverse classi di composti. Al fine di valutare il contenuto di polifenoli nei campioni di cioccolato sono stati effettuati differenti saggi spettrofotometrici quali-quantitativi.

### ***Contenuto di polifenoli totali***

Il contenuto dei polifenoli totali (TPC) è stato valutato sia per gli estratti idroalcolici dei campioni di cioccolato e caffè, sugli infusi di tè verde e nero, sia per gli estratti di cioccolato ottenuti con i DES, in accordo con la metodica descritta da Ciano et al. (2022) [151] con alcune modifiche. 0,5 mL di estratto fenolico è stato mescolato con 0,25 mL di reagente di Folin Ciocalteu in un matraccio volumetrico ambrato da 10 mL. Dopo 3 minuti, sono stati aggiunti 0,5 mL di soluzione acquosa di carbonato di sodio (7,5 % w/v) e il matraccio è stato tenuto al buio per 30 minuti. Successivamente, è stato portato a volume con acqua distillata. L'assorbanza dei campioni è stata letta a 750 nm. I risultati sono stati espressi come milligrammi di equivalenti di acido gallico per grammo di cioccolato (mg GAE/ g). Per il bianco, è stato utilizzato il solvente corrispondente a quello usato per l'estrazione del campione.

### ***Contenuto in flavonoidi totali***

In tutti gli estratti ottenuti con i DES e negli estratti di cioccolato, caffè e tè è stato valutato il contenuto totale di flavonoidi (TFC). Il TFC è stato determinato secondo il metodo descritto da Abdel-Naeem et al (2021) [185] con alcune modifiche. A 0,5 mL di estratto, sono stati aggiunti 2 mL di acqua distillata e 150 µL di NaNO<sub>2</sub> (5% w/v) in un matraccio volumetrico da 5 mL. La soluzione è stata mescolata ed è stata incubata al buio per 5 minuti, poi sono stati aggiunti 150 µL di AlCl<sub>3</sub> (10% w/v) e la soluzione è stata rimessa

al buio per 5 minuti. Successivamente, 2 mL di NaOH (1M) sono stati aggiunti alla soluzione e lasciata al buio per altri 15 minuti e poi portati ad un volume di 5 mL. L'assorbanza degli estratti è stata letta a 510 nm. I risultati TFC sono stati espressi come milligrammi di rutina equivalenti (Rut) per grammo di estratto (mg Rut/g). Come il saggio TPC, il bianco TFC corrisponde al DES o al solvente convenzionale utilizzato per l'estrazione dei polifenoli dai campioni di cioccolato.

### ***Saggi della capacità antiradicalica: ABTS e DPPH***

L'attività antiossidante degli estratti di cioccolato, tè e caffè e degli estratti di cioccolato ottenuti con i DES è stata valutata mediante l'uso di due reattivi differenti: l'ABTS e il DPPH [67; 109]. Per quanto riguarda l'attività scavenging del radicale ABTS nei campioni è stata valutata misurando la diminuzione di assorbanza a 734 nm. Una soluzione di 7 mM di ABTS è stata preparata sciogliendo 0,19 g di polvere ABTS in 50 mL di acqua distillata, mentre la soluzione PBS è stata preparata sciogliendo 0,38 g di polvere PBS in 10 mL di d-H<sub>2</sub>O. 25 mL di ABTS 7 mM e 0,4 mL di PBS (1,9 mg/mL) sono stati inseriti in un matraccio ambrato. La soluzione è stata tenuta al buio per 16 ore a temperatura ambiente per attivare il reattivo. 3,6 mL del reattivo è stato aggiunto a 0,4 mL di estratto fenolico, il campione con il reattivo è stato posto al buio per 15 minuti e successivamente effettuata la lettura allo spettrofotometro UV-Vis. L'attività di scavenging dei campioni di cioccolato è stata valutata per entrambi i tipi di estratti anche mediante saggio DPPH. Una soluzione di DPPH 2,5 ng/mL è stata preparata sciogliendo 125 mg di polvere standard in 50 mL di metanolo. Ad 1 mL di estratto idroalcolico o DES è stato aggiunto 1,5 mL di soluzione di DPPH (2,5 ng/mL) e tenuto al buio per 30 minuti a temperatura ambiente. L'assorbanza ( $\lambda=517$  nm) è stata poi misurata rispetto al metanolo utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis. I risultati sono stati calcolati utilizzando il tasso di inibizione (I%) del catione radicale per entrambi i saggi, secondo la seguente equazione:

$$I\% = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0}$$

Dove A<sub>0</sub> è l'assorbanza del controllo (bianco) e A<sub>1</sub> è l'assorbanza del radicale DPPH o ABTS nell'estratto.

#### 4.4. Analisi statistica

I dati sono stati ottenuti dall'analisi di tre repliche e sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard. La normalità della distribuzione dei dati è stata verificata mediante il test di Shapiro-Wilk, l'omogeneità delle varianze con il test di Levene e la significatività delle differenze tra gli estratti è stata testata con l'analisi della varianza a una via (ANOVA). L'ipotesi nulla che tutti i mezzi siano uguali è stata rifiutata quando la differenza tra i mezzi era  $p < 0,05$ . Dopo l'ANOVA, sono stati eseguiti test di confronto multiplo per le variabili statisticamente significative, utilizzando il test post-hoc di Dann (si è ipotizzata l'omogeneità della varianza) al livello di  $p < 0,05$ .

Inoltre, su tutti i dati ottenuti per i differenti campioni di cioccolato fondente è stato calcolato il coefficiente di correlazione  $r$  di Person, al fine di valutare la forza della correlazione tra le variabili indagate. Le correlazioni sono state considerate statisticamente significative per valori di  $p$  inferiori a 0.05.

Successivamente alla caratterizzazione dei campioni di cioccolato fondente a differenti percentuali di cacao è stata effettuato un'analisi multivariata per interpretare i risultati dell'analisi effettuate mediante l'analisi delle componenti principali (PCA) e cluster analysis (CA). I dati sono stati pretrattati (autoscaling) per escludere la varianza legata alla differente unità di misura delle analisi effettuate. Le analisi sono state effettuate mediante l'uso del software CAT.

# CAPITOLO V

## RISULTATI E DISCUSSIONI

Al fine di ottenere condizioni ottimali per la determinazione dei composti bioattivi nei campioni di cioccolato fondente, sono state effettuate differenti prove, prendendo in considerazione differenti parametri, per ottimizzare sia la fase estrattiva sia la determinazione strumentale. L'efficacia dei metodi di estrazione è stata valutata mediante prove di recupero mentre per la valutazione strumentale è stato considerato il *Limit of Detection* (LOD), il *Limit of Quantification* (LOQ) e la *Relative Standard Deviation* percentuale (RSD%). I dati ottenuti dalle analisi sono stati poi analizzati mediante analisi statistica univariata e multivariata.

### 5.1. Ammine biogene

#### 5.1.1. Ottimizzazione dell'estrazione delle ammine biogene

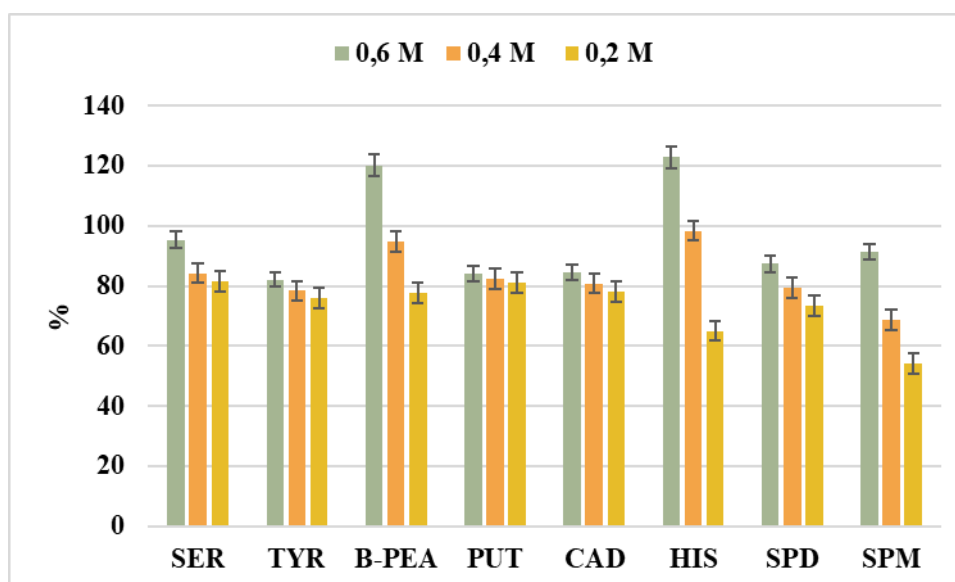
Le fasi di estrazione degli analiti dalla matrice alimentare e la successiva fase di purificazione degli estratti rappresentano fasi molto delicate nel trattamento dei campioni. Pertanto, la validità dei processi di estrazione è stata valutata tramite prove di recupero, i cui valori se prossimi al 100% indicano la corretta ottimizzazione del metodo. In questo studio, l'ottimizzazione del metodo di estrazione è stata effettuata mediante prove in acido perclorico (HClO<sub>4</sub>) a differenti molarità (0,2; 0,4 e 0,6 M). L'efficacia dell'estrazione è stata verificata mediante l'aggiunta di soluzioni standard, a tre differenti concentrazioni, delle otto ammine biogene al campione e procedendo successivamente alle fasi di estrazione, derivatizzazione e determinazione strumentale (HPLC-RF). I risultati ottenuti da prove in triplo sono stati elaborati sulla base dei rapporti tra area del picco della BAs e area della BAs nella soluzione standard, sia nel campione con aggiunta sia nel campione tal quale. Il calcolo del recupero è stato effettuato con la seguente formula:



$$R\% = \left( \frac{(C_{agg} - C_{std})}{C_{std}} \right) * 100$$

Dove  $C_{std}$  è la concentrazione della BAs nella soluzione standard e  $C_{agg}$  è la concentrazione della BAs nel campione dopo l'aggiunta, calcolata interpolando l'area del picco cromatografico nella retta di taratura. I risultati dei recuperi ottenuti a differenti molarità di  $HClO_4$  sono riportati in Figura 5.1.

Dai risultati ottenuti, si è evidenziato che l'estrazione delle BAs con  $HClO_4$  0,6M presentava valori di recupero maggiori e prossimi al 100%, pertanto per le analisi delle BAs nei campioni di cioccolato e del caffè è stata applicato come solvente estraente  $HClO_4$  0.6M.



**Figura 5.1.** Recupero percentuale e deviazione standard (n=3) delle BAs nei campioni di cioccolato fondente in funzione della concentrazione di  $HClO_4$  0,2; 0,4 e 0,6 M.

### 5.1.2. Ottimizzazione e performance dell'analisi cromatografica delle BAs

Per la valutazione cromatografica delle BAs il metodo applicato e le sue performance sono descritti di seguito. L'ottimizzazione delle condizioni cromatografiche è stata effettuata applicando differenti gradienti di eluizione, si è visto che aumentando la percentuale di acetonitrile (ACN) i picchi delle BAs venivano traslati verso destra migliorandone la separazione. Lo shifting verso destra ha provocato una variazione di alcuni tempi di ritenzione, ma non un allungamento della durata complessiva dell'analisi cromatografica né un allargamento dei picchi che potesse inficiare la quantificazione. Le

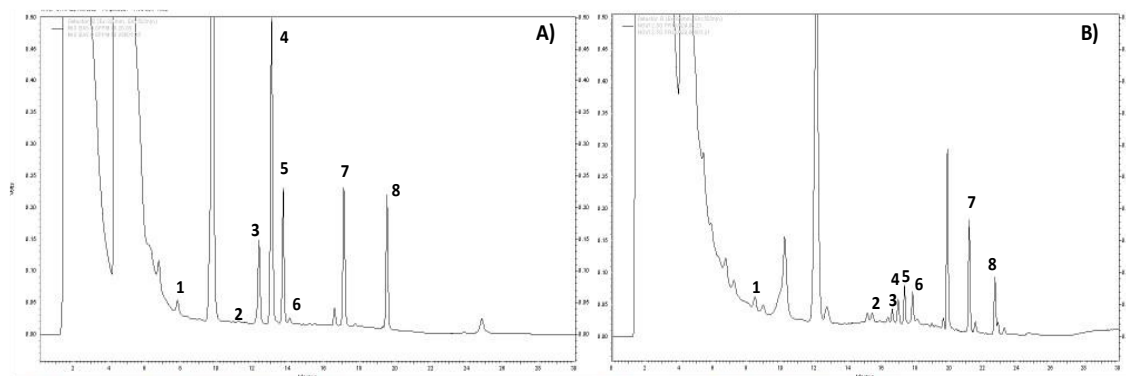
rette di taratura delle otto ammine biogene sono state effettuate mediante l'analisi in triplicato delle soluzioni standard a differenti concentrazioni (0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,5 - 2 - 2,5 mg/L) e per ognuna è stato valutato il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ). Per ogni ammina biogena inoltre è stato calcolato il LOD e il LOQ che sono espressi come la concentrazione di analita in grado di dare una risposta, rispettivamente, di 3 o 10 volte maggiore del rumore di fondo. Inoltre, l'RSD% Intraday è stata valutata misurando per tre iniezioni ripetute le aree dei picchi relativi alla soluzione standard di concentrazione 1,5 mg/L. Nella Tabella 5.1. sono riportate le rette di taratura e le performance del metodo cromatografico per la determinazione delle BAs nei campioni di cioccolato fondente e di caffè.

**Tabella 5.1.** Rette di calibrazione e performance del metodo cromatografico

Ammine Biogene	Range di concentrazione (mg/L)	Eq. Rette di calibrazione	$R^2$	LOD	LOQ	RSD%
<b>B-PEA</b>	0,1-2,5	$y=262846x - 18317$	0,996	0,030	0,090	1,20
<b>SER</b>	0,2-5	$y= 131738x - 13534$	0,996	0,078	0,236	0,06
<b>TYR</b>	0,1-2,5	$y= 1e+06x + 85232$	0,999	0,059	0,180	0,74
<b>PUT</b>	0,1-1,5	$y= 4e+06x - 123541$	0,998	0,020	0,059	0,62
<b>CAD</b>	0,1-2,5	$y=2e+06x - 206910$	0,995	0,039	0,118	0,56
<b>HIS</b>	0,1-2,5	$y= 129767x + 14869$	0,983	0,060	0,182	3,15
<b>SPD</b>	0,1-2,5	$y= 2e+06x + 28638$	0,999	0,039	0,118	0,16
<b>SPM</b>	0,1-2,5	$y= 2e+06x - 56967$	0,998	0,039	0,118	1,34

### 5.1.3. Quantificazione delle ammine biogene nel cioccolato

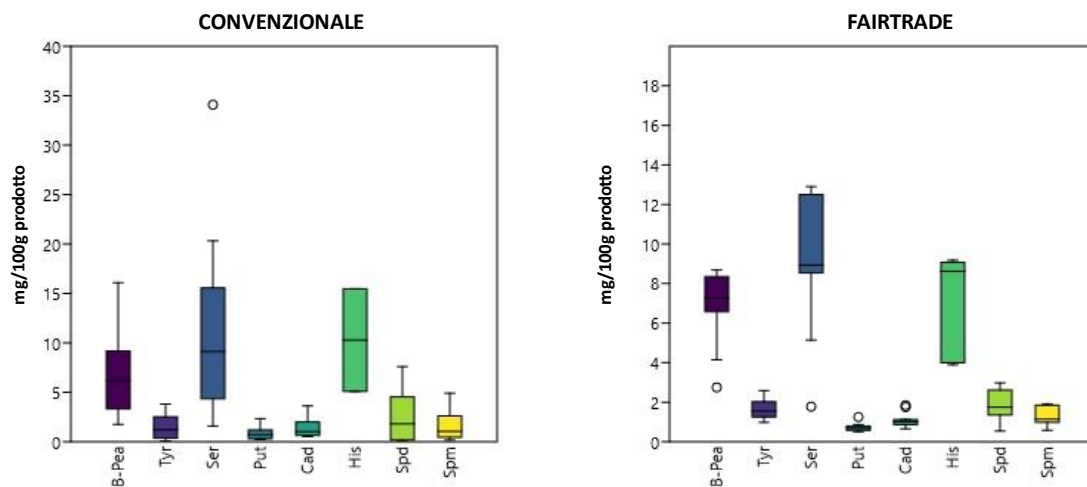
In questo studio è stata valutata la concentrazione di otto ammine biogene in 24 campioni di cioccolato fondente a differenti percentuali di cacao (50%, 60%, 70%, 85%, 99% e 100%.) con e senza certificazione Fairtrade. Per ogni percentuale di cacao sono stati scelti differenti marchi con fasce di prezzo differenti. In Figura 5.2. è riportato il cromatogramma di una soluzione standard (2 mg/kg) di ammine biogene (A) e il cromatogramma di un campione di cioccolato al 50% di cacao (B).



**Figura 5.2.** Cromatogrammi: A) soluzione standard a 0,8 mg/Kg e B) campione cioccolato fondente a 85% cacao. Profilo cromatografico:  $\beta$ -pea (1); Ser (2); Tyr (3); Put (4); Cad (5); His (6); Spd (7); Spm (8).

Le differenti concentrazioni di BAs nei campioni potrebbero essere dovute ai differenti trattamenti che il prodotto subisce lungo la filiera. In particolar modo, il processo di fermentazione delle fave di cacao verdi si pensa svolga un ruolo nella produzione di BAs dovuto alla decarbossilazione microbica delle proteine, che porta alla liberazione di amminoacidi. La quantità di amminoacidi liberi rilasciata nella fase di fermentazione varia considerevolmente sulla base dei microrganismi coinvolti, della durata della fase di fermentazione, dell'aerazione delle fave e del pH a cui i microrganismi sono messi a reagire. Una volta che gli amminoacidi liberi vengono rilasciati, possono subire l'attività decarbossilasi da parte di alcuni enzimi batterici per formare BAs. In Tabella 5.2. sono riportate le concentrazioni delle BAs, la loro quantità totale e il Biogenic Amines Quality Index (BAQI) nei campioni convenzionali, ossia senza certificazione fair-trade, e nei campioni Fairtrade. I campioni non presentano un andamento comune nella concentrazione di BAs; tuttavia, si osserva un aumento della concentrazione delle ammine biogene nei campioni a più alto contenuto di cacao. Infatti, le concentrazioni totali di BAs variano da un minimo di 3.79 mg/ 100g di prodotto nel campione convenzionale CV85-2 a un massimo di 70.50 mg/ 100g di prodotto nel campione CV100, senza mai raggiungere concentrazioni pericolose per la salute del consumatore. Questo è confermato dall'indice di qualità BAQI, che tiene conto della concentrazione nel campione di cinque ammine biogene (HIS, CAD, PUT, SPD e SPM). Il prodotto viene reputato sicuro quando l'indice BAQI è inferiore al valore di 10 [186]. Tra i campioni senza certificazione Fairtrade, la concentrazione totale di BAs cresce al crescere della percentuale di cacao, mantenendo una forte variabilità tra i campioni. Mentre per quanto riguarda il cioccolato Fairtrade la concentrazione totale delle BAs diminuisce al crescere

delle percentuali di cacao. In Figura 5.3. sono riportati i valori medi delle concentrazioni delle BAS nei campioni di cioccolato convenzionale e Fairtrade.



**Figura 5.3.** Box Plot dei campioni di cioccolato fondente convenzionale e con certificazione Fairtrade.

**Tabella 5.2.** Concentrazione (mg/ 100g di campione) con la relativa deviazione standard (n=3) e indice di qualità delle ammine biogene (BQAI)

Campioni	Ammine Biogene (mg/100 g di campione)										
	B-Pea	Tyr	Ser	Put	Cad	His	Spd	Spm	Tot BAs	BAQI	
Convenzionali	CV50-1	5.81±1.15	1.21±0.74	4.19±1.05	0.71±0.14	1.03±0.14	nd	1.15±0.71	0.73±0.31	14.83	0.61
	CV50-2	5.01±0.89	0.54±0.25	4.84±0.87	0.44±0.13	0.76±0.35	nd	1.13±0.59	0.73±0.32	13.45	0.42
	CV60-1	6.85±1.02	2.44±0.33	13.70±2.44	1.54±0.35	2.22±0.55	nd	4.34±1.25	2.62±0.84	33.91	0.46
	CV60-2	8.46±2.14	2.53±0.14	9.89±1.85	1.08±0.38	1.78±0.36	nd	4.54±1.08	2.35±0.25	30.90	0.35
	CV60-3	10.91±1.59	2.49±0.54	14.38±3.07	0.85±0.33	1.62±0.78	nd	1.83±0.74	1.47±0.32	33.55	0.57
	CP70-1	1.92±0.52	0.32±0.08	1.58±0.86	0.26±0.12	0.62±0.24	nd	0.07±0.01	0.25±0.09	5.02	0.67
	CV70-3	6.22±1.23	0.76±0.11	8.37±0.98	0.58±0.14	0.99±0.47	5.10±2.11	1.81±0.89	1.04±0.94	24.87	1.73
	CV85-1	3.68±0.98	0.08±0.02	5.18±1.25	0.27±0.09	0.55±0.14	nd	0.04±0.01	0.17±0.05	9.96	0.68
	CV85-2	1.76±0.87	0.38±0.17	nd	0.23±0.05	0.52±0.07	nd	0.27±0.05	0.63±0.17	3.79	0.39
	CV85-3	9.75±2.06	2.29±0.44	20.32±5.74	1.31±0.77	2.63±0.41	nd	2.95±0.96	1.71±0.14	40.96	0.70
	CV99-1	2.96±0.84	0.26±0.09	1.68±0.85	0.32±0.08	0.64±0.14	nd	0.04±0.02	0.17±0.07	6.07	0.79
	CV99-2	8.59±0.97	2.74±0.39	15.96±3.74	0.85±0.13	1.35±0.58	15.46±5.14	6.04±0.068	4.91±0.74	55.90	1.48
	CV100	16.08±5.14	3.82±0.87	34.09±6.24	2.34±0.74	3.62±0.36	nd	7.59±2.28	2.98±0.38	70.50	0.52
Fairtrade	FT50-1	8.68±2.10	1.31±0.85	8.94±2.74	0.68±0.21	1.03±0.57	4.04±1.02	1.53±0.74	1.08±0.85	27.29	1.59
	FT50-2	6.58±2.78	2.25±0.64	9.54±1.72	0.66±0.16	0.99±0.25	3.89±1.35	1.35±0.38	0.98±0.23	24.24	1.66
	FT50-3	8.63±1.74	1.38±0.73	8.87±3.82	0.58±0.21	1.12±0.68	3.98±1.71	1.42±0.42	1.02±0.38	27.00	1.65
	FT70-1	7.45±2.65	2.02±0.38	12.70±1.83	0.72±0.13	1.11±0.14	9.18±1.14	2.61±1.03	1.65±0.25	37.44	2.09
	FT70-2	8.28±2.74	1.56±0.14	11.56±1.11	0.87±0.07	1.85±0.37	8.52±2.85	2.98±0.84	1.91±0.34	37.53	1.91
	FT70-3	6.85±1.22	2.58±0.88	11.78±2.78	0.54±0.09	0.76±0.47	8.71±3.05	2.14±0.36	1.14±0.37	34.50	2.34
	FT70-4	7.27±1.74	1.98±0.65	12.91±3.28	0.68±0.28	0.98±0.33	8.98±2.25	2.85±0.72	1.54±0.38	37.18	1.97
	FT70-5	7.03±1.25	1.86±0.44	12.53±2.97	0.79±0.18	1.02±0.12	9.11±1.25	2.42±0.84	1.87±0.57	36.60	2.06
	FT85-1	4.14±0.78	1.11±0.25	5.14±1.78	0.50±0.09	1.75±0.78	nd	1.74±0.28	0.98±0.36	15.36	0.60
	FT85-2	2.75±0.92	2.15±0.98	8.54±0.99	1.25±0.88	0.87±0.28	nd	0.98±0.31	0.58±0.19	17.12	0.83
FT85-3	8.35±3.21	0.98±0.54	1.78±0.35	0.68±0.31	0.65±0.25	nd	0.54±0.14	1.85±0.39	14.83	0.39	

\*nd: non detectable

Tale variabilità può essere spiegata considerando che i livelli e le distribuzioni delle BA sono influenzati da molti parametri che riguardano sia le condizioni igieniche delle materie prime che il processo produttivo, nonché le tecniche di conservazione e il confezionamento del prodotto facendo una diretta sovrapposizione dei dati derivanti provenienti da diversi studi generalmente difficili da realizzare [187]. Inoltre, tra i campioni convenzionali e Fairtrade, si è evidenziata una differenza di tipi di BAs presenti. Considerando i profili delle BAs nei campioni senza certificazione, i dati ottenuti hanno mostrato chiaramente che le BAs presenti in tutti i campioni a concentrazioni più elevate sono  $\beta$ -PEA (1.76–10.08 mg/100g prodotto), SER (nd–34.09 mg/100g prodotto), SPD (0.04–6.04 mg/100g prodotto), mentre SPM (0.25–4.91 mg/100g prodotto), TYR (0.26–3.82 mg/100g prodotto), PUT (0.23–2.34 mg/100g prodotto) e CAD (0.52–3.62 mg/100g prodotto) erano presenti più raramente e a concentrazioni variabili. Per quanto riguarda l’HIS, ammina biogena reputata responsabile delle intossicazioni alimentari causate dall’ingestione di composti contaminati, è stata determinata solo in un campione al 70% di cacao ( $5.10 \pm 2.11$  mg/100g prodotto) e in un campione al 99% di cacao ( $15.46 \pm 5.14$  mg/100g prodotto). Mentre per quanto riguarda i campioni Fairtrade le ammine biogene maggiormente presenti sono  $\beta$ -PEA (2.75–8.68 mg/100g prodotto), SER (1.78–12.91 mg/100g prodotto) e HIS (nd–9.18 mg/100g prodotto), mentre quelle a più bassa concentrazione sono TYR (0.98–2.25 mg/100g prodotto), PUT (0.54–1.25 mg/100g prodotto), CAD (0.65–1.85 mg/100g prodotto), SPD (0.54–2.98 mg/100g prodotto) e SPM (0.58–1.91 mg/100g prodotto). Dai risultati ottenuti possiamo dire che le otto BAs esaminate potrebbero essere considerate come possibili parametri discriminatori tra il cioccolato convenzionale e del commercio equo e solidale. In quanto tendenzialmente i fairtrade contengono quantità totali di BAs molto inferiori rispetto ai loro omologhi convenzionali. Queste differenze sono correlate alla qualità della materia prima (fave di cacao) che è influenzata dalle modalità di gestione dell'azienda agricola, infestazioni e altre malattie. A questo proposito, la foresta primaria è considerata l'ambiente ideale per la produzione di cacao; tuttavia, in particolare per il cacao prodotto in modo convenzionale, viene spesso tagliato attraverso la pratica del taglio e della bruciatura. Poiché i terreni forestali non sono più disponibili, è necessario creare nuove piantagioni di cacao su terreni agricoli. In alcuni casi, il cacao viene coltivato in monoculture in condizioni in gran parte non ombreggiate, anche se è risaputo che le piante di cacao in realtà crescono meglio all'ombra. Un tale sistema di produzione aumenta la perdita di fertilità e biodiversità del suolo portando infine a una scarsa crescita e all'invecchiamento

premature delle piante di cacao. Molti parametri di lavorazione possono anche avere effetti importanti sulla qualità del cacao come: cattiva manipolazione, cattiva fermentazione, essiccazione inadeguata e quindi alto contenuto di umidità, in grado di rendere il prodotto vulnerabile alla crescita di muffe e batteri, scarsa e prolungata conservazione, che porta al grasso degrado e infestazione da parassiti. Tutti questi aspetti supportano fortemente l'aumento delle concentrazioni di BA [188]. Al contrario, i prodotti Fairtrade richiedono un'applicazione rigorosa degli standard prescritti con regimi di certificazione e ispezione rigorosi. La produzione Fairtrade di cacao richiede requisiti simili a quelli dell'agricoltura biologica. In particolar modo pone l'attenzione sulla sostenibilità ambientale dei metodi agricoli (es. assenza di pesticidi e fertilizzanti sintetici, nonché altri trattamenti innaturali post-raccolta per fave di cacao, materiali di imballaggio e magazzini), sull'implementazione dei sistemi di tracciabilità (es. buona etichettatura, tenuta di registri, etc.). Inoltre, la coltivazione di cacao Fairtrade seguono tecniche agronomiche tradizionali, coltivando le piante di cacao all'ombra di altre piante della foresta pluviale. Pertanto, si potrebbe ipotizzare che le regole dettate dai sistemi del commercio equo e solidale possano limitare l'accumulo di BA nei cioccolati fondenti a marchio Fairtrade [144-145].

#### **5.1.4. Quantificazione delle ammine biogene nel caffè**

Le concentrazioni delle ammine biogene nei campioni di caffè analizzati nello studio sono riportate in Tabella 5.3. Le differenze di concentrazioni di AB nei campioni macinati e nei rispettivi infusi potrebbero essere associate ad alcuni fattori coinvolti nei meccanismi di estrazione (rapporto acqua/caffè, temperatura, pressione, tempo di erogazione, ecc.), ma anche alla dimensione delle particelle del caffè macinato [141; 189].

Durante la fase di estrazione del caffè, l'acqua entrando in contatto con il caffè macinato estrae i composti solubili in esso contenuti. Inoltre, mediante la pressione generata dall'acqua sul campione i composti meno solubili o fisicamente legati vengono estratti mediante meccanismi fisici. Altro aspetto da tenere conto è la temperatura di estrazione, che può portare alla degradazione dei composti termolabili e aiutare all'emulsione dei grassi nell'estratto finale. Pertanto, per rendere i dati il più confrontabili possibile, abbiamo eliminato l'effetto di granulazione scegliendo polveri di caffè con lo stesso grado di macinazione. Inoltre, sono stati selezionati parametri di estrazione simili, tenendo sempre presenti le peculiarità di ogni tecnica di preparazione del caffè infuso.

**Tabella 5.3.** Ammine biogene ( $\mu\text{g/g}$ ) nei campioni di caffè macinato e di caffè infuso

CAMPIONI	Ammine Biogene ( $\mu\text{g/g}$ )								Tot BAs	BAQI	
	Ser	B-Pea	Put	His	Cad	Tyr	Spd	Spm			
CAFFÈ MACINATO	Bar 1	71.77 $\pm$ 1.02	8.97 $\pm$ 0.23	0.33 $\pm$ 0.07	2.78 $\pm$ 0.23	nd	nd	0.72 $\pm$ 0.09	0.74 $\pm$ 0.12	84.59	1.26
	Bar 2	75.50 $\pm$ 1.21	11.93 $\pm$ 0.33	0.35 $\pm$ 0.04	2.32 $\pm$ 0.20	nd	nd	0.51 $\pm$ 0.07	0.67 $\pm$ 0.17	90.77	1.22
	Capsula 1	63.46 $\pm$ 0.76	3.26 $\pm$ 0.12	0.52 $\pm$ 0.13	3.62 $\pm$ 0.14	nd	nd	0.19 $\pm$ 0.03	0.78 $\pm$ 0.11	71.85	2.10
	Capsula 2	57.87 $\pm$ 0.84	3.65 $\pm$ 0.17	0.45 $\pm$ 0.11	4.19 $\pm$ 0.17	nd	nd	0.10 $\pm$ 0.01	0.74 $\pm$ 0.13	67.01	2.52
	Moka 1	82.61 $\pm$ 1.32	5.81 $\pm$ 0.36	0.43 $\pm$ 0.06	7.30 $\pm$ 0.51	nd	nd	0.29 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.03	96.83	4.60
	Moka 2	84.24 $\pm$ 0.91	5.35 $\pm$ 0.36	0.42 $\pm$ 0.01	5.78 $\pm$ 0.32	nd	nd	0.21 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.05	96.38	3.89
	Cialda 1	62.13 $\pm$ 0.53	2.75 $\pm$ 0.25	0.40 $\pm$ 0.03	2.22 $\pm$ 0.13	nd	nd	0.34 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.07	67.88	1.89
	Cialda 2	72.47 $\pm$ 1.32	2.22 $\pm$ 0.12	0.35 $\pm$ 0.02	3.20 $\pm$ 0.21	nd	nd	0.33 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.08	81.15	1.87
CAFFÈ INFUSO	Bar 1	14.38 $\pm$ 0.56	0.52 $\pm$ 0.08	0.18 $\pm$ 0.02	8.29 $\pm$ 0.58	nd	nd	0.14 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.11	23.60	6.81
	Bar 2	12.75 $\pm$ 0.41	0.52 $\pm$ 0.05	0.16 $\pm$ 0.03	7.97 $\pm$ 0.74	nd	nd	0.12 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.09	21.61	6.76
	Capsula 1	14.42 $\pm$ 0.65	0.41 $\pm$ 0.31	nd	0.77 $\pm$ 0.21	nd	nd	0.11 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.08	16.02	0.54
	Capsula 2	19.95 $\pm$ 0.25	0.48 $\pm$ 0.11	nd	0.85 $\pm$ 0.26	nd	nd	0.06 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.14	21.75	0.57
	Moka 1	33.46 $\pm$ 0.84	0.51 $\pm$ 0.08	nd	14.66 $\pm$ 0.54	nd	nd	0.04 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.06	48.92	11.38
	Moka 2	31.82 $\pm$ 0.67	0.44 $\pm$ 0.05	nd	20.57 $\pm$ 0.86	nd	nd	0.07 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.09	53.15	15.50
	Cialda 1	21.38 $\pm$ 0.35	0.85 $\pm$ 0.14	nd	0.37 $\pm$ 0.36	nd	nd	0.03 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.04	22.83	0.30
	Cialda 2	18.46 $\pm$ 0.62	0.31 $\pm$ 0.04	nd	0.22 $\pm$ 0.05	nd	nd	0.14 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.06	19.28	0.17

\*nd = non detectable



La quantità di ammine biogene totali nei campioni di caffè macinato varia tra 67.01 µg/g nel campione 2 di caffè macinato in capsula e 96.83 µg/g nel campione 1 di caffè macinato per la moka, tali concentrazioni sono in linea con i risultati presenti in letteratura [190-191]. Queste differenze di concentrazione del contenuto di BA nei campioni di caffè macinato potrebbero essere correlate alle differenti tecniche agronomiche e ai differenti processi di trasformazione che i chicchi di caffè subiscono lungo la filiera. Inoltre, si è evidenziato come la presenza di elevate concentrazioni di BA negli alimenti possa essere correlata anche alle modalità di conservazione del prodotto e alla shelf-life [190]. Di tutte le ammine biogene prese in considerazione nello studio, solo la Cad e la Put non sono state trovate nei campioni esaminati. Nei campioni di caffè macinato la BAs presente a più alte concentrazioni è la Ser (62.13-84.24 µg/g), a cui fa seguito la β-Pea (2.22-11.93 µg/g) e His (2.22-7.30 µg/g), con un ampio grado di variabilità a seconda del campione. Dai dati ottenuti si è evidenziato che negli infusi di caffè, ottenuti con le differenti metodiche di estrazione, il profilo delle ammine biogene rispecchiava i campioni di caffè macinato, tranne per la Put che è stata ritrovata solamente nel campione ottenuto con la macchina professionale per espresso (Bar 1 e 2). In tutti gli infusi di caffè vi è stata una riduzione del contenuto delle ammine biogene che varia a seconda del campione tra il 50 e il 77%. Questo probabilmente dovuto al fatto che le BAs ad alte temperature tendono a degradarsi; pertanto, il processo di estrazione può influenzare la concentrazione di ammine nell'estratto finale. Il contenuto totale delle ammine biogene per le differenti tecniche di estrazione varia tra 16.02 e 5.15 µg/g. Anche negli infusi di caffè l'ammina maggiormente rappresentata è la serotonina (12.75-33.46 µg/g), a cui segue l'istamina (0.22-20.57 µg/g). Per quanto riguarda l'istamina la concentrazione negli infusi ottenuti con la macchina professionale per espresso e con la moka risulta maggiore rispetto al caffè macinato probabilmente dovuto al tempo/temperatura e alla pressione di estrazione [190]. Tuttavia, dall'indice di qualità delle ammine biogene (BAQI) si è evidenziato che le concentrazioni di BAs non rappresentano un rischio per la salute del consumatore. Inoltre, il contenuto di istamina presente nei caffè infusi risulta inferiore a livelli di allerta definiti dal regolamento (UE) 2073/2005 [192].

## 5.2. Acidi Grassi Liberi

### 5.2.1 Ottimizzazione dell'estrazione degli acidi grassi liberi

Anche per la determinazione degli acidi grassi liberi (*free fatty acid*, FFA) la procedura di estrazione è stata ottimizzata e sono stati valutati i metodi di recupero (R%) dei sei FFA presi in esame. Il recupero è stato effettuato mediante l'aggiunta di soluzioni standard degli acidi grassi a differenti concentrazioni nei campioni. Il campione con l'aggiunta ha seguito poi la procedura di estrazione del campione, la derivatizzazione e la determinazione strumentale con HPLC-UV ( $\lambda=254$  nm). Il calcolo dei recuperi è stato effettuato seguendo la formula descritta nel paragrafo 4.1.1. Dai risultati ottenuti si è evidenziata che il metodo presenta buone capacità di recupero per tutti i FFA analizzati (Tabella 5.4.).

**Tabella 5.4.** Recuperi degli acidi grassi liberi e deviazione standard

	<b>C18:3</b> (linolenico)	<b>C14:0</b> (miristico)	<b>C18:2</b> (linoleico)	<b>C16:0</b> (palmitico)	<b>C18:1</b> (oleico)	<b>C18:0</b> (stearico)
<b>R%</b>	70±1,03	88±4,85	76±1,83	105±2,91	91±4,57	113±3,80

### 5.2.2 Ottimizzazione e Performance dell'analisi cromatografica degli acidi grassi liberi

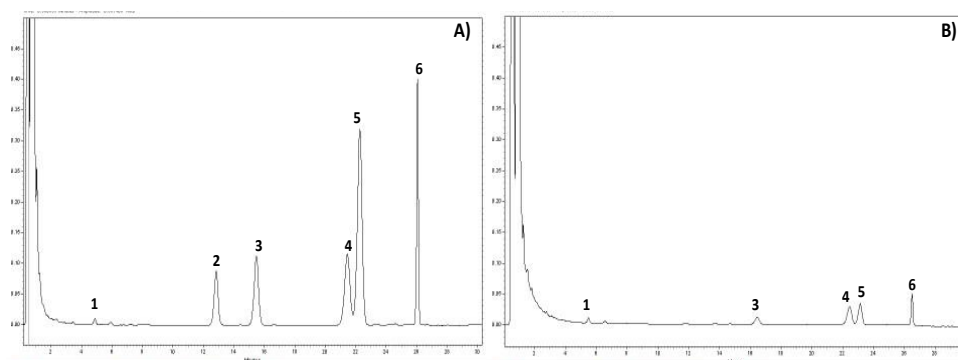
La determinazione strumentale è stata ottimizzata sulla base del metodo cromatografico descritto da Ciano et al. (2020) [151]. Il metodo isocratico di eluizione degli analiti è stato modificato impostando un'eluizione a gradiente che prevedeva una più bassa percentuale di acetonitrile (70%) e un flusso più basso (0,8 ml/min). Questo ha consentito di ridurre la durata dell'analisi sia migliorare la separazione dei picchi. Per quanto riguarda le performance del metodo cromatografico sono state preparate le soluzioni standard di acidi grassi a differenti concentrazioni, seguendo le concentrazioni dei singoli FFA riportate in letteratura [12; 109; 146]. In Tabella 5.5. sono riportate le rette di calibrazione per i singoli FFA, il LOD, LOQ e RSD% intraday, misurato su 3 iniezioni del seguente mix: acido linolenico (0,04 mg/ml); acido miristico (0,2 mg/ml); acido linoleico (0,4 mg/ml); acido palmitico (0,4 mg/ml); acido oleico (1 mg/ml) e acido stearico (1 mg/ml).

**Tabella 5.5.** Rette di calibrazione e performance del metodo cromatografico

FFA	Range di concentrazione (mg/ml)	Eq. Rette di calibrazione	R <sup>2</sup>	LOD	LOQ	RSD%
C18:3	0,002-0,04	$y = 3E+06x + 43282$	0,957	0,036	0,109	2,75
C14:0	0,005-0,2	$y = 2E+07x - 2108$	0,998	0,005	0,016	0,89
C18:2	0,01-0,4	$y = 1E+07x - 169758$	0,959	0,011	0,033	0,32
C16:0	0,05-0,4	$y = 3E+07x - 1E+06$	0,996	0,004	0,011	1,18
C18:1	0,08-1	$y = 1E+07x - 69164$	0,998	0,011	0,033	0,35
C18:0	0,1-1	$y = 2E+07x - 327226$	0,996	0,005	0,016	2,96

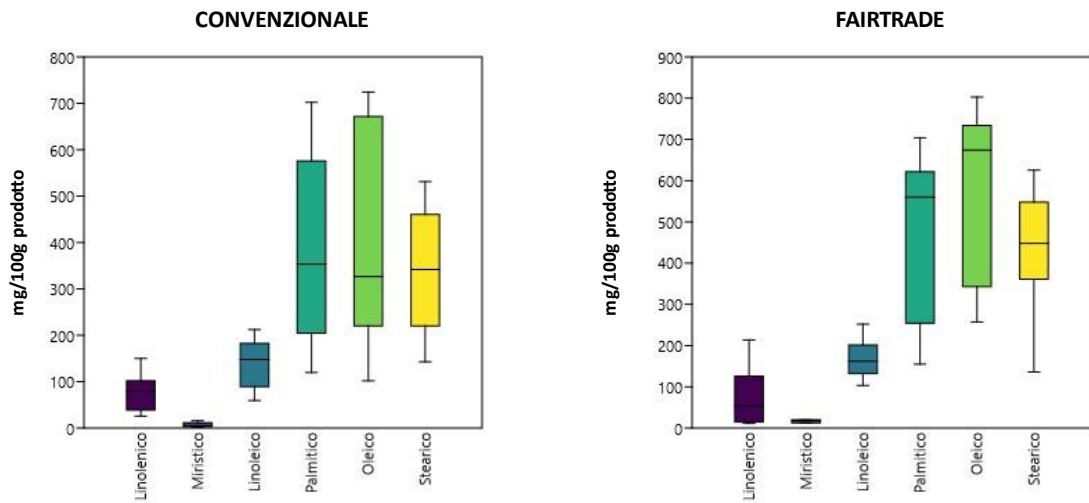
### 5.2.3. Determinazione quantitativa degli acidi grassi liberi

Nello studio è stato valutato il profilo di sei acidi grassi liberi (C18:3; C14:0; C18:2; C16:0; C18:1 e C18:0) in 24 campioni di cioccolato fondente a differenti concentrazioni di cacao, convenzionale e con certificazione Fairtrade. In Figura 5.4. sono riportati i cromatogrammi della soluzione standard (A) e di un campione di cioccolato all'85% di cacao (B). Il contenuto di acidi grassi nel cioccolato fondente dipende dalle condizioni di crescita delle fave di cacao e dei processi di trasformazione. Nel burro di cacao, ingrediente che rappresenta circa il 18-30% del prodotto finito, gli acidi grassi sono organizzati come triacilgliceroli (TAG), la maggior parte dei quali sono 2-oleilgliceridi (O) dell'acido palmitico (P) e dell'acido stearico (S). Questa struttura (POP, POS, SOS) caratteristica dei TAG, presenti nel cacao e nei prodotti da esso derivato, influenza direttamente il modo in cui il cioccolato si comporta nel processo di produzione e le caratteristiche del prodotto finale (es. consistenza, viscosità, comportamento alla fusione, sapore e gusto).



**Figura 5.4.** Cromatogrammi: A) soluzione standard e B) campione cioccolato fondente a 85% cacao. Profilo cromatografico: A. linolenico (1); A. miristico (2); A. linoleico (3); A. Palmitico (4); A. Oleico (5); A. Stearico (6).

Tuttavia, i processi di lavorazione del burro di cacao e una cattiva conservazione del prodotto finito possono portare all'idrolisi dei trigliceridi con liberazione degli acidi grassi. La concentrazione di FFA nel cacao e nei suoi derivati misura l'irrancidimento lipidico a indicare una cattiva gestione della materia prima e dei suoi sottoprodotti lungo la filiera di lavorazione. Per tutelare il consumatore e le industrie manifatturiere a livello Europe viene vietata la vendita del burro di cacao che contiene più del 1.75% di FFA [54]. In Tabella 5.5. sono riportate la media delle concentrazioni degli acidi grassi liberi determinati e la % media di ogni singolo acido grasso rispetto al totale degli acidi grassi presi in esame nello studio. Per tutti i tipi di campioni analizzati nello studio non si è evidenziata una differenza nella concentrazione totale di acidi grassi liberi, questa varia tra 465.46 e 2115.10 mg /100 g di prodotto, questo sta a significare che il contenuto di FFA è influenzato da numerosi fattori (es. temperatura, metodo di conservazione, etc.) e che non dipende direttamente dalla percentuale di cacao utilizzata nella formulazione del cioccolato fondente. Nello studio, gli acidi grassi liberi che sono stati ritrovati in tutti i campioni analizzati, a concentrazioni variabili, sono: acido palmitico (C16:0), acido stearico (C18:0), acido oleico (C18:1) e acido linoleico (C18:2). Mentre, l'acido miristico (C14:0) e l'acido linolenico (C18:3) sono stati determinati solo in alcuni campioni di cioccolato fondente sia convenzionale che Fairtrade. Per tutti i campioni, i FFA maggiormente rappresentati sono l'acido palmitico (19.38-33.80%), l'acido stearico (16.39-40.05%) e l'acido oleico (19.93-42.95%). L'acido stearico e acido oleico sono i due FFA maggiormente rappresentati e ciò rispecchia la composizione generica dei TAG del burro di cacao [55; 189]. In Figura 5.5. sono riportati i valori medi di concentrazione per i campioni di cioccolato fondente convenzionale e con certificazione Fairtrade. Non si nota una particolare variazione del contenuto di acidi grassi liberi tra i campioni di cioccolato fondente certificato e no, questo ad indicare che la formazione dei FFA non viene influenzata solo dalle pratiche agronomiche applicate per la produzione di fave di cacao ma per lo più dalle modalità di conservazione e trasformazione del prodotto [195].



**Figura 5.5.** Box plot del contenuto di acidi grassi liberi nei campioni di cioccolato convenzionale e a marchio Fairtrade

**Tabella 5.5.** Contenuto medio di acidi grassi nei campioni di cioccolato fondente convenzionale e non espressa come mg di FFA per 100g di prodotto ( $\pm$  deviazione standard, n=3) e la percentuale relativa del contenuto totale di FFA quantificati

Campioni	Linolenico		Miristico		Linoleico		Palmitico		Oleico		Stearico		Tot FFA (mg/100g prodotto)
	mg/100g prodotto	%	mg/100g prodotto	%	mg/100g prodotto	%	mg/100g prodotto	%	mg/100g prodotto	%	mg/100g prodotto	%	
<b>CM50-1</b>	92.23 $\pm$ 1.02	5.19	nd		131.74 $\pm$ 2.47	7.41	511.43 $\pm$ 5.06	28.76	511.43 $\pm$ 2.47	28.76	531.43 $\pm$ 3.14	29.88	1778.28
<b>CM50-2</b>	150.16 $\pm$ 2.06	13.58	4.28 $\pm$ 0.05	0.39	111.76 $\pm$ 3.56	10.11	236.76 $\pm$ 2.03	21.41	261.22 $\pm$ 1.23	23.62	341.60 $\pm$ 2.12	30.89	1105.79
<b>CPL60-1</b>	nd	-	4.83 $\pm$ 0.09	0.40	166.54 $\pm$ 3.14	13.92	307.50 $\pm$ 3.08	25.69	238.55 $\pm$ 1.04	19.93	479.36 $\pm$ 3.20	40.05	1196.77
<b>CM60-2</b>	69.76 $\pm$ 1.23	4.46	nd	-	161.05 $\pm$ 3.21	10.29	449.90 $\pm$ 2.54	28.76	552.78 $\pm$ 2.74	35.33	331.07 $\pm$ 1.99	21.16	1564.57
<b>CM60-3</b>	105.16 $\pm$ 3.05	4.97	nd	-	212.42 $\pm$ 4.02	10.04	636.75 $\pm$ 4.62	30.11	724.14 $\pm$ 3.62	34.24	436.62 $\pm$ 2.47	20.64	2115.10
<b>CM70-1</b>	76.58 $\pm$ 2.59	6.94	nd	-	147.60 $\pm$ 1.28	13.38	353.47 $\pm$ 3.21	32.04	326.35 $\pm$ 2.51	29.58	199.17 $\pm$ 1.23	18.05	1103.16
<b>CM70-2</b>	81.18 $\pm$ 2.12	9.30	nd	-	82.57 $\pm$ 0.87	9.46	250.92 $\pm$ 1.25	28.74	315.36 $\pm$ 1.10	36.12	143.08 $\pm$ 1.21	16.39	873.12
<b>CM85-1</b>	nd	-	nd	-	163.00 $\pm$ 1.25	8.34	653.67 $\pm$ 3.89	33.44	696.19 $\pm$ 1.98	35.62	441.61 $\pm$ 2.03	22.59	1954.47
<b>CM85-2</b>	nd	-	nd	-	198.50 $\pm$ 1.32	9.55	702.35 $\pm$ 5.47	33.80	687.41 $\pm$ 2.83	33.08	489.63 $\pm$ 1.89	23.56	2077.89
<b>CM85-3</b>	nd	-	nd	-	203.57 $\pm$ 2.25	11.28	514.47 $\pm$ 3.25	28.51	655.52 $\pm$ 3.25	36.33	430.87 $\pm$ 2.04	23.88	1804.43
<b>CM99-1</b>	nd	-	1.75 $\pm$ 0.01	0.38	59.36 $\pm$ 1.03	12.75	119.64 $\pm$ 1.15	25.70	101.90 $\pm$ 1.23	21.89	182.81 $\pm$ 2.15	39.28	465.46
<b>CM99-2</b>	28.39 $\pm$ 0.24	3.74	15.82 $\pm$ 0.21	2.09	83.87 $\pm$ 0.78	11.05	172.53 $\pm$ 2.38	22.74	201.44 $\pm$ 1.85	26.55	256.67 $\pm$ 1.41	33.83	758.72
<b>CM100</b>	25.78 $\pm$ 0.35	3.67	7.68 $\pm$ 0.23	1.09	94.52 $\pm$ 1.35	13.45	168.48 $\pm$ 2.14	23.98	165.28 $\pm$ 2.35	23.53	240.79 $\pm$ 2.15	34.27	702.52
<b>FT50-1</b>	nd	-	19.52 $\pm$ 0.12	1.86	103.09 $\pm$ 1.28	9.83	254.38 $\pm$ 1.85	24.27	287.07 $\pm$ 2.25	27.39	384.17 $\pm$ 1.13	36.65	1048.23
<b>FT50-2</b>	nd	-	12.57 $\pm$ 0.14	1.57	152.33 $\pm$ 2.45	19.07	154.82 $\pm$ 1.25	19.38	343.03 $\pm$ 2.01	42.95	135.93 $\pm$ 1.26	17.02	798.68
<b>FT50-3</b>	nd	-	18.75 $\pm$ 0.74	2.22	112.15 $\pm$ 1.11	13.26	198.76 $\pm$ 1.36	23.50	257.49 $\pm$ 1.32	30.44	258.75 $\pm$ 1.85	30.59	845.90
<b>FT70-1</b>	nd	-	nd	-	180.64 $\pm$ 1.32	9.77	560.03 $\pm$ 3.08	30.29	694.63 $\pm$ 3.08	37.57	413.77 $\pm$ 3.03	22.38	1849.06
<b>FT70-2</b>	213.47 $\pm$ 3.58	9.08	nd	-	251.84 $\pm$ 3.06	10.71	704.09 $\pm$ 5.07	29.95	733.66 $\pm$ 4.57	31.21	448.03 $\pm$ 2.62	19.06	2351.09
<b>FT70-3</b>	54.25 $\pm$ 0.54	3.34	nd	-	161.85 $\pm$ 1.23	9.98	518.02 $\pm$ 3.24	31.93	526.98 $\pm$ 2.06	32.48	361.18 $\pm$ 1.94	22.26	1622.28
<b>FT70-4</b>	69.25 $\pm$ 0.85	3.15	nd	-	201.46 $\pm$ 3.15	9.17	621.48 $\pm$ 5.14	28.29	802.64 $\pm$ 3.27	36.53	502.35 $\pm$ 2.42	22.86	2197.18

Campioni	Linolenico		Miristico		Linoleico		Palmitico		Oleico		Stearico		Tot FFA (mg/100g prodotto)
	mg/100g prodotto	%	mg/100g prodotto	%	mg/100g prodotto	%	mg/100g prodotto	%	mg/100g prodotto	%	mg/100g prodotto	%	
<b>FT70-5</b>	125.79 ± 3.25	6.14	nd	-	132.16 ± 1.28	6.45	420.14 ± 2.07	20.50	745.63 ± 3.54	36.39	625.55 ± 3.21	30.53	2049.27
<b>FT85-1</b>	11.25 ± 0.24	0.55	nd	-	148.72 ± 1.37	7.22	678.93 ± 3.64	32.94	674.26 ± 3.54	32.72	547.83 ± 2.64	26.58	2060.99
<b>FT85-2</b>	25.43 ± 0.36	1.28	nd	-	187.24 ± 2.08	9.40	578.93 ± 2.62	29.07	701.25 ± 3.99	35.21	498.76 ± 2.14	25.04	1991.61
<b>FT85-3</b>	14.71 ± 0.15	0.72	nd	-	203.25 ± 2.85	9.94	621.46 ± 3.66	30.38	604.58 ± 4.25	29.56	601.48 ± 2.51	29.41	2045.48

## 5.3. Polifenoli

### 5.3.1. Determinazione del contenuto di polifenoli in campioni di cioccolato fondente

Per valutare il contenuto di polifenoli nei campioni di cioccolato fondente certificato e non a differenti concentrazioni di cacao sono stati condotti saggi spettrofotometrici, che hanno consentito di determinare il contenuto totale di alcune classi di composti fenolici e la loro capacità antiossidante.

#### *Contenuto totale di polifenoli*

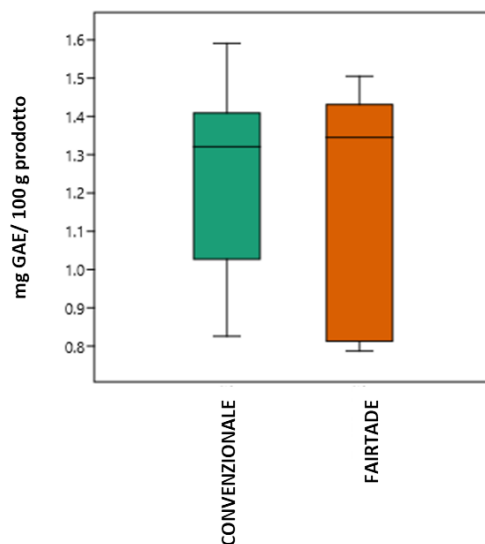
Prima di effettuare l'analisi del contenuto totale dei polifenoli nei campioni di cioccolato in esame, per il saggio TPC è stata costruita la retta di taratura mediante l'analisi di concentrazioni note, comprese tra 1 e 100 mg/ml, di acido gallico in MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v) [151].

Le soluzioni, che hanno seguito la procedura del saggio Folin-Ciocaltau, sono state analizzate a 750 nm. Da queste analisi è stata così ottenuta la seguente retta di taratura ( $R^2=0.9997$ ):

$$y = 0.0069 x - 0.0231$$

Le concentrazioni dei polifenoli totali determinate per i campioni d'interesse sono state espresse come mg di acido gallico per g di prodotto (mg GAE/100 g di prodotto). In Figura 5.6 sono riportati i valori medi ottenuti per i campioni convenzionali e a marchio Fairtrade. La concentrazione media del contenuto totale di polifenoli non varia molto tra i campioni convenzionali (1.200 g GAE/ 100 g di prodotto) e Fairtrade (1.181 g GAE/ 100 g di prodotto). Dai risultati si è evidenziato che la concentrazione in polifenoli totale varia per i campioni convenzionali sulla base della concentrazione di cacao (8.26-15.91 mg GAE/g). Mentre, per quanto riguarda i campioni Fairtrade non si è evidenziata una differenza nel contenuto di polifenoli per le differenti concentrazioni di cacao (Tabella 5.6.).





**Figura 5.6.** Box Plot dati del contenuto Totale tra i campioni caonvenzionali (CM) e Fairtrade (FT)

Le differenze nel contenuto in TPC dei campioni di cioccolato fondente dipendono principalmente dal tipo di cacao adoperato per la loro formulazione [196].

Di Mattia et al. (2014) [197] hanno evidenziato come il rapporto tra tempo e temperatura nelle fasi di concaggio e temperaggio del cioccolato fondente possa influire notevolmente sulla concentrazione dei polifenoli nei prodotti finiti. Difatti un maggior controllo delle temperature in queste fasi consente di limitarne la perdita. Pertanto, un più alto contenuto di polifenoli a parità di percentuali di cacao potrebbe indicare non solo una maggiore qualità della materia prima, ma anche l'applicazione di procedure di lavorazione che operano a basse temperature preservando così il contenuto di polifenoli nel prodotto.

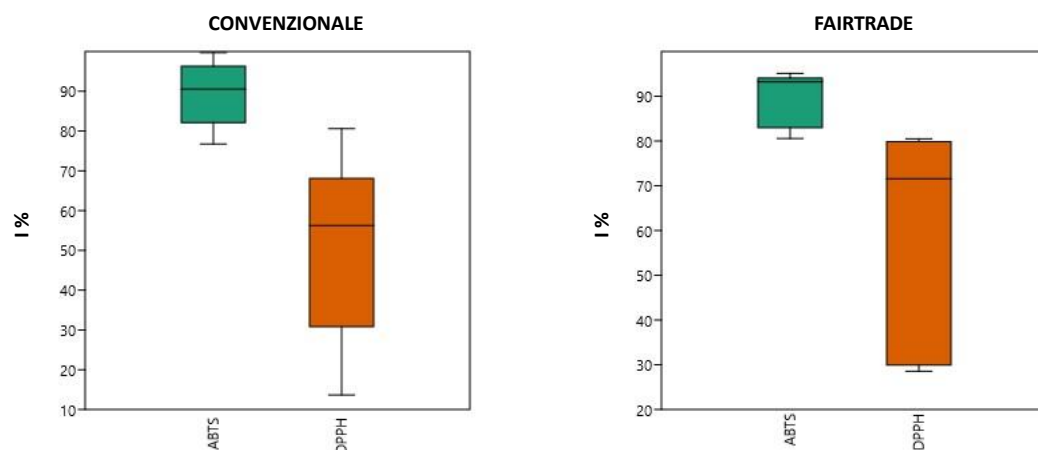
**Tabella 5.6.** Concentrazioni del contenuto totali di polifenoli (mg GAE/ 100g prodotto)  $\pm$  deviazione standard (n=3)

<b>CAMPIONI DI CIOCCOLATO</b>	<b>TPC (mg GAE/100g di prodotto)</b>
<b>CM50-1</b>	0.883 $\pm$ 0.123
<b>CM50-2</b>	0.860 $\pm$ 0.214
<b>CPL60-1</b>	1.200 $\pm$ 0.389
<b>CM60-2</b>	0.826 $\pm$ 0.098
<b>CM60-3</b>	1.321 $\pm$ 0.358
<b>CM70-1</b>	1.556 $\pm$ 0.367
<b>CONVENZIONALE CM70-2</b>	1.199 $\pm$ 0.214
<b>CM85-1</b>	1.341 $\pm$ 0.174
<b>CM85-2</b>	1.338 $\pm$ 0.197
<b>CM85-3</b>	1.171 $\pm$ 0.087
<b>CM99-1</b>	1.333 $\pm$ 0.261
<b>CM99-2</b>	1.477 $\pm$ 0.136
<b>CM100</b>	1.591 $\pm$ 0.096
<b>FT50-1</b>	0.813 $\pm$ 0.167
<b>FT50-2</b>	0.798 $\pm$ 0.091
<b>FT50-3</b>	0.787 $\pm$ 0.067
<b>FT70-1</b>	1.387 $\pm$ 0.241
<b>FT70-2</b>	1.505 $\pm$ 0.326
<b>FAIRTRADE FT70-3</b>	1.485 $\pm$ 0.125
<b>FT70-4</b>	1.345 $\pm$ 0.103
<b>FT70-5</b>	1.401 $\pm$ 0.108
<b>FT85-1</b>	0.983 $\pm$ 0.089
<b>FT85-2</b>	1.431 $\pm$ 0.247
<b>FT85-3</b>	1.074 $\pm$ 0.079

### ***Saggi antiossidanti DPPH e ABTS***

Per comprendere al meglio la capacità antiossidante dei campioni di cioccolato in esame sono stati studiati due saggi: il saggio DPPH e il saggio ABTS. Questi due saggi misurano la capacità di scavenging dei radicali liberi dei campioni in esame, implicando una reazione di trasferimento di elettroni dai polifenoli presenti nei campioni a radicali ABTS o DPPH [198]. Inoltre, i composti radicalici possono ossidare i polifenoli in misura diversa, a seconda delle loro proprietà termodinamiche e della reattività dei gruppi idrossilici presenti nelle molecole [199]. Pertanto, l'uso di un solo metodo non è adatto per valutare la capacità antiossidante totale del campione. In Figura 5.7. sono riportati le

percentuali di inibizione per i due saggi ABTS e DPPH per i campioni convenzionali e no. Dai risultati si evidenzia una maggiore capacità antiossidante degli estratti di cioccolato fondente ottenuti con il saggio ABTS rispetto a quella ottenuta con il saggio DPPH. La differenza tra questi due saggi potrebbe essere correlata al fatto che il radicale DPPH reagisce solo con gli antiossidanti lipofili, mentre il radicale ABTS reagisce sia con gli antiossidanti idrofili che con quelli lipofili; pertanto, diversi tipi di composti fenolici rispondono in modo diverso in questi due saggi. Il radicale DPPH non reagisce con gli acidi fenolici e, pertanto, la capacità antiossidante determinata con i metodi DPPH e ABTS possono essere parzialmente diverse. Inoltre, il cioccolato è una matrice molto complessa costituita da vari componenti, diversi dai polifenoli, che potrebbero influenzare l'attività antiossidante finale dei campioni [53].



**Figura 5.7.** Box Plot dei saggi ABTS e DPPH per i campioni convenzionali e Fairtrade espressa come percentuale di inibizione del radicale

Dai dati ottenuti si evidenzia una maggiore attività di scavenging per il radicale ABTS in tutti i campioni di cioccolato con variazioni della percentuale di inibizione tra il 76.75 e il 99.70 % per i campioni di cioccolato fondente convenzionale, mentre tra l'80.54 e il 95.11 % per i campioni di cioccolato Fairtrade. Per quanto riguarda il saggio DPPH, i campioni di cioccolato fondente hanno evidenziato una maggiore capacità di scavenging a più alte concentrazioni di cacao sia per i campioni convenzionali sia per quelli fairtrade (Tabella 5.7.). Queste differenze, che seguono principalmente la percentuale di cacao dei campioni in esame, possono non solo essere spiegate da fattori pedoclimatici, come la natura del terreno, le condizioni di coltivazione e fermentazione e le cultivar, ma anche in quanto i polifenoli sono immagazzinati nella sostanza solida non grassa del cacao.

Infatti, i campioni di cioccolato con un contenuto di cacao più elevato sono considerati fonti migliori di composti, in quanto hanno una maggiore capacità antiossidante [68].

**Tabella 5.7.** Percentuale di inibizione ( $\pm$  Deviazione standard; n=3) per i saggi ABTS e DPPH nei campioni di cioccolato fondente convenzionale e Fairtrade

<b>CAMPIONI DI CIOCCOLATO</b>		<b>ABTS</b>	<b>DPPH</b>
<b>CONVENZIONALE</b>	<b>CM50-1</b>	91.55 $\pm$ 1.11	30.21 $\pm$ 0.87
	<b>CM50-2</b>	89.35 $\pm$ 0.45	27.72 $\pm$ 0.94
	<b>CPL60-1</b>	81.91 $\pm$ 1.87	13.65 $\pm$ 0.35
	<b>CM60-2</b>	87.15 $\pm$ 2.42	31.45 $\pm$ 0.96
	<b>CM60-3</b>	90.55 $\pm$ 1.05	48.42 $\pm$ 0.35
	<b>CM70-1</b>	93.63 $\pm$ 1.36	43.24 $\pm$ 0.14
	<b>CM70-2</b>	92.25 $\pm$ 1.08	56.29 $\pm$ 0.87
	<b>CM85-1</b>	99.27 $\pm$ 0.36	65.41 $\pm$ 0.75
	<b>CM85-2</b>	76.75 $\pm$ 0.69	64.84 $\pm$ 0.74
	<b>CM85-3</b>	80.66 $\pm$ 1.24	73.71 $\pm$ 0.84
	<b>CM99-1</b>	99.07 $\pm$ 0.58	56.55 $\pm$ 0.78
	<b>CM99-2</b>	99.78 $\pm$ 0.17	80.69 $\pm$ 0.37
	<b>CM100</b>	82.35 $\pm$ 0.74	70.83 $\pm$ 0.53
<b>FAIRTRADE</b>	<b>FT50-1</b>	83.25 $\pm$ 0.77	28.54 $\pm$ 0.41
	<b>FT50-2</b>	82.78 $\pm$ 0.27	30.14 $\pm$ 0.24
	<b>FT50-3</b>	82.99 $\pm$ 1.03	31.54 $\pm$ 0.74
	<b>FT70-1</b>	93.81 $\pm$ 1.32	68.95 $\pm$ 0.62
	<b>FT70-2</b>	95.11 $\pm$ 1.07	64.76 $\pm$ 0.83
	<b>FT70-3</b>	93.41 $\pm$ 0.42	75.06 $\pm$ 0.32
	<b>FT70-4</b>	93.21 $\pm$ 0.74	74.24 $\pm$ 0.64
	<b>FT70-5</b>	94.05 $\pm$ 1.24	71.58 $\pm$ 0.34
	<b>FT85-1</b>	80.57 $\pm$ 1.23	80.54 $\pm$ 0.74
	<b>FT85-2</b>	85.24 $\pm$ 0.37	79.85 $\pm$ 0.41
	<b>FT85-3</b>	94.86 $\pm$ 1.47	80.12 $\pm$ 0.86

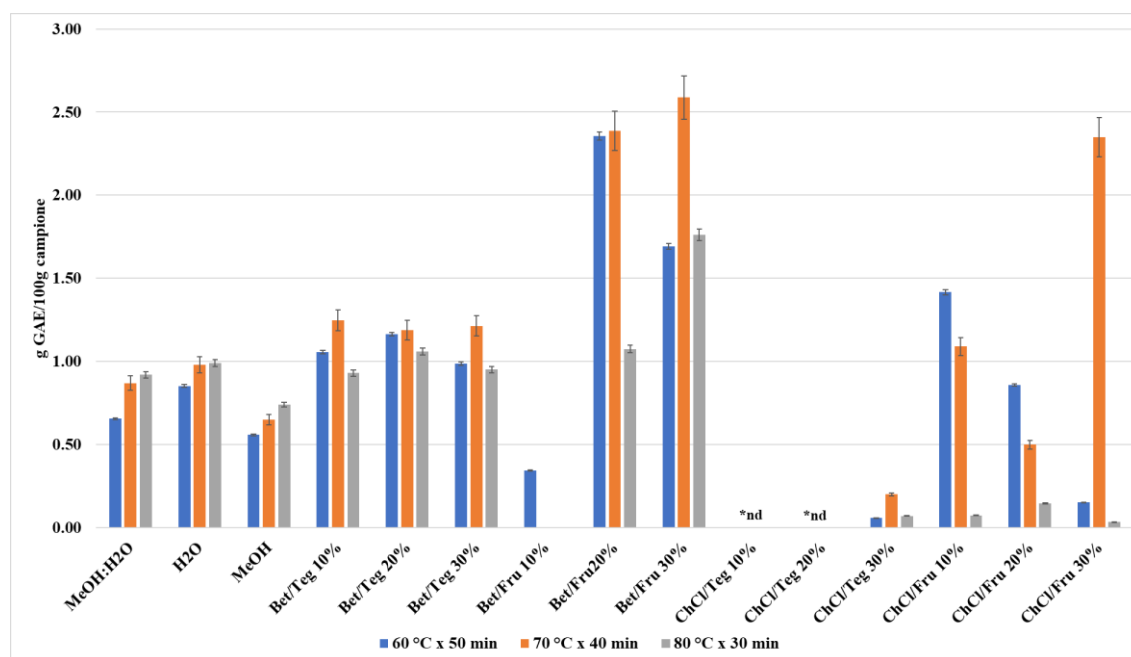
### **5.3.2. Studio dei DES per l'estrazione dei polifenoli dal cioccolato fondente**

In questo studio è stata valutata la possibilità di poter applicare differenti coppie DES, ossia solventi green di nuova generazione, come alternativa ai solventi organici volatili comunemente applicati nell'estrazione dei polifenoli da matrici alimentari. In particolare sono state valutate quattro coppie HBA-HBD a differenti percentuali di idratazione (10%, 20% e 30%) e tre solventi convenzionali, ovvero la soluzione di MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v), H<sub>2</sub>O, riconosciuto a livello mondiale come solvente green, e MeOH, per valutare la differente capacità di estrazione dei composti fenolici da campioni di cioccolato. Il cioccolato fondente al 70% è stato considerato come benchmark, in quanto presenta una percentuale intermedia di cacao tra tutti i cioccolati fondenti presenti in commercio. Come accettori di legami idrogeno (HBA) sono stati scelti la Colin Clorina (ChCl) e la Betaina (Bet), mentre come donatori di legami idrogeno sono stati presi in considerazione il Fruttosio (Fru) e la Trietilenglicole (Teg) a differenti rapporti molari. Inoltre, sono state studiate differenti idratazioni delle coppie DES al fine di valutare il ruolo della polarità dei solventi nell'aumentare l'efficienza di estrazione dei composti fenolici. Differenti condizioni, temperatura di estrazione (T) e tempo di estrazione (t), sono state impiegate per l'estrazione dei composti fenolici nel cioccolato. L'estrazione solido-liquido è stata eseguita sul cioccolato fondente utilizzando tre solventi convenzionali e sei differenti coppie DES. Le prestazioni dei solventi proposti sono state valutate mediante saggi spettrofotometrici (TPC, TFC, ABTS e DPPH).

#### ***Contenuto di polifenoli totali***

L'applicazione di differenti tipi di HBD e HBA usati per la preparazione del solvente DES determina una variazione nella resa estrattiva di polifenoli dal campione di cioccolato fondente al 70%. Quattro differenti coppie HBA-HBD, a differenti percentuali di acqua (10-30%), sono state applicate per l'estrazione dei polifenoli dal cioccolato fondente applicando l'estrazione solido-liquida (10 mg/ mL) assistita da ultrasuoni. L'efficienza di estrazione dei solventi green è stata valutata in termini di contenuto totale di polifenoli (TPC) tramite il metodo di Folin-Ciocalteu e l'analisi spettrofotometrica a 750 nm e confrontata con tre solventi convenzionali (MeOH:H<sub>2</sub>O, MeOH e H<sub>2</sub>O). In Figura 5.8. sono riportati il contenuto in polifenoli totali ottenuto con i solventi proposti

a differenti condizioni di estrazione. In generale le coppie DES esaminate nello studio hanno mostrato una maggiore capacità di estrazione rispetto ai solventi convenzionali (MeOH, H<sub>2</sub>O e MeOH:H<sub>2</sub>O) eccetto per le coppie Bet/Fru 10%, ChCl/Teg 10% e ChCl/Teg 20%. La resa maggiore (2.59±0.15 g/100g prodotto) si è ottenuta per il DES costituito da Betaina e Fruttosio al 30% di idratazione. Infatti, l'estrazione mediante questo solvente green è di circa 3 volte maggiore rispetto all'estrazione convenzionale con MeOH:H<sub>2</sub>O, 60:40 v/v (Tabella 5.8.).



**Figura 5.8.** Contenuto in polifenoli totali del cioccolato estratto con i solventi proposti nello studio a differenti condizioni di tempo e temperatura. \*nd= not detectable

Dai dati ottenuti si è evidenziato che le coppie DES con la migliore capacità di estrazione dei polifenoli totali nel cioccolato fondente sono i DES aventi come HBA la Betaina. Invece, le coppie DES formate dalla Clorin Clorina e Trietilen glicole hanno dato interferenze con il saggio di Folin-Ciocalteu, questo fenomeno è stato evidenziato anche in altri studi [152-153] che hanno riportato come la scelta della coppia HBA-HBD possa interferire nella reazione di legame tra il reattivo e il solvente estraente. Inoltre, dallo studio si è evidenziato che operando a temperature di 70°C la resa estrattiva dei polifenoli totali aumentava, ciò probabilmente dovuto al fatto che le alte temperature influenzano la viscosità e la tensione superficiale del DES migliorando l'interazione tra il solvente green e le molecole target [202].

**Tabella 5.8.** TPC (g GAE/100g di campione)  $\pm$  Deviazione standard (n=3) per le differenti condizioni di estrazione e per i diversi solventi presi in esame

SOLVENTI		CONDIZIONI DI ESTRAZIONE			
		60 °C x 50 min	70 °C x 40 min	80 °C x 30 min	
CONVENZIONALE	MeOH:H2O	0.66 $\pm$ 0.07	0.87 $\pm$ 0.06	0.92 $\pm$ 0.18	
	H2O	0.85 $\pm$ 0.12	0.98 $\pm$ 0.14	0.99 $\pm$ 0.26	
	MeOH	0.56 $\pm$ 0.09	0.65 $\pm$ 0.03	0.74 $\pm$ 0.18	
GREEN	Bet/Teg	10%	1.06 $\pm$ 0.06	1.25 $\pm$ 0.18	0.93 $\pm$ 0.16
		20%	1.16 $\pm$ 0.08	1.19 $\pm$ 0.09	1.06 $\pm$ 0.05
		30%	0.99 $\pm$ 0.13	1.21 $\pm$ 0.11	0.95 $\pm$ 0.14
	Bet/Fru	10%	0.34 $\pm$ 0.02	nd	nd
		20%	2.36 $\pm$ 0.15	2.39 $\pm$ 0.21	1.08 $\pm$ 0.08
		30%	1.69 $\pm$ 0.11	2.59 $\pm$ 0.23	1.76 $\pm$ 0.05
	ChCl/Teg	10%	nd	nd	nd
		20%	nd	nd	nd
		30%	0.06 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.01
	ChCl/Fru	10%	1.42 $\pm$ 0.17	1.09 $\pm$ 0.04	0.07 $\pm$ 0.02
		20%	0.86 $\pm$ 0.13	0.50 $\pm$ 0.10	0.15 $\pm$ 0.03
		30%	0.15 $\pm$ 0.02	2.35 $\pm$ 0.21	0.03 $\pm$ 0.01

\*nd=non detectable

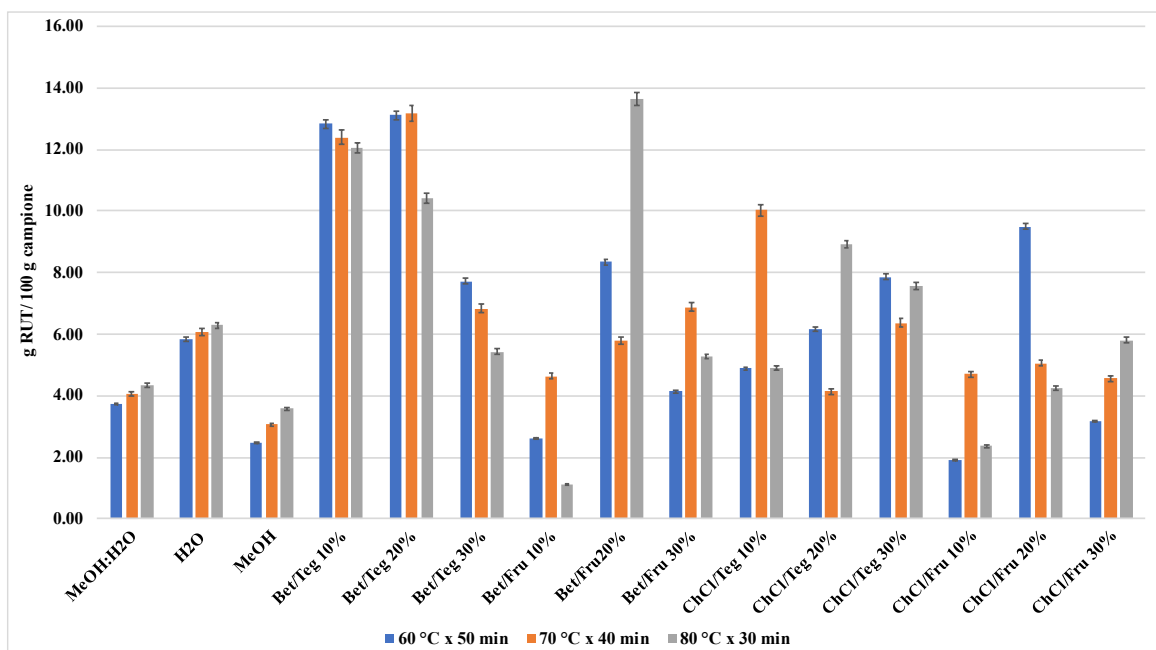
La resa del TPC si è poi ridotta a temperature di estrazione più elevate, probabilmente dovuto alla degradazione termica dei composti fenolici [203]. Si è evidenziato inoltre che la resa di estrazione dei polifenoli dal cioccolato fondente al 70% variava in funzione del contenuto d'acqua. Infatti, i DES che contenevano un volume di acqua pari al 30% hanno mostrato una maggiore capacità estrattiva nei confronti dei polifenoli, in particolar modo la coppia Bet/Teg al 30%. Questo probabilmente poiché la viscosità del DES e la sua polarità viene influenzata dal contenuto d'acqua in esso presente, giocando un ruolo di rilievo nell'estrazione di queste molecole dalle matrici alimentari [184].

### *Contenuto totale di flavonoidi*

Per valutare la differente interazione dei solventi DES con i composti fenolici, è stato effettuato il saggio dei flavonoidi totali (TFC), mediante il metodo del Cloruro di Alluminio e successiva rivelazione a 510 nm. Questo saggio spettrofotometrico ha consentito di mettere in evidenza come le differenti coppie DES presentassero una differente interazione con le molecole appartenenti alla classe dei flavonoidi. In Figura 5.9. sono riportati i risultati del contenuto totale di flavonoidi per le differenti coppie DES e per i solventi convenzionali alle diverse condizioni di estrazione. Dallo studio è emerso



che le coppie DES esaminate hanno estratto i flavonoidi dal campione di cioccolato fondente al 70% con differenti rese. Si è evidenziato che la coppia HBA-HBD composta da Betaina e Trietilen glicole al 10% e al 20% di idratazione ha la migliore resa di estrazione dei flavonoidi per tutte e tre le condizioni di estrazione, superiore di circa 3.5 volte quella dell'estrazione convenzionale con MeOH:H<sub>2</sub>O al 60:40 v/v (Tabella 5.9.). Inoltre, si è visto che la resa estrattiva varia sulla base del contenuto di idratazione del DES, questo poiché probabilmente la presenza di acqua influenza la viscosità e la formazione di legami idrogeno tra HBA e HBD interagendo in modo differente con le molecole target [204].



**Figura 5.9.** Contenuto di flavonoidi totali per le differenti coppie DES

Per quanto riguarda le tre condizioni di estrazione adottate nello studio (60°C x 50 min; 70 °C x 40 min e 80 °C x 30 min), hanno portato a rese differenti tra le coppie DES in esame e l'aumento della resa estrattiva dei flavonoidi dal cioccolato fondente al 70% non segue l'incremento della temperatura di estrazione o del tempo di estrazione. La resa migliore si è ottenuta alle condizioni di 80 °C per 30 min con il DES formato da Betaina e Trietilen glicole idratato al 20% (13.64 ± 1.34 g RUT/100g campione). Questo risultato ha messo in evidenza l'importanza di selezionare la giusta coppia HBA-HBD per estrarre i composti target dalle matrici alimentari; infatti, in letteratura si è evidenziato come adoperando il Trietilen glicole come HBD e variando l'HBA tra Betaina e Clorin Clorina

si otteneva una differente interazione tra i composti fenolici polari e non polari, incidendo sulla resa estrattiva dei TFC [184].

**Tabella 5.9..** Concentrazioni TFC (g Rut/100g di campione)  $\pm$  deviazione standard (n=3) per le differenti condizioni di estrazione e i differenti solventi

SOLVENTI		CONDIZIONI DI ESTRAZIONE			
		60 °C x 50 min	70 °C x 40 min	80 °C x 30 min	
CONVENZIONALE	MeOH:H <sub>2</sub> O	3.73 $\pm$ 0.43	4.07 $\pm$ 0.22	4.35 $\pm$ 0.26	
	H <sub>2</sub> O	5.83 $\pm$ 0.62	6.08 $\pm$ 0.62	6.29 $\pm$ 0.44	
	MeOH	2.47 $\pm$ 0.35	3.05 $\pm$ 0.41	3.57 $\pm$ 0.12	
GREEN	10%	12.83 $\pm$ 1.09	12.40 $\pm$ 1.21	12.05 $\pm$ 0.98	
	Bet/Teg	20%	13.12 $\pm$ 1.25	13.64 $\pm$ 1.23	10.43 $\pm$ 1.14
		30%	7.73 $\pm$ 0.45	6.82 $\pm$ 0.97	5.43 $\pm$ 0.34
		10%	2.63 $\pm$ 0.32	4.63 $\pm$ 0.65	1.13 $\pm$ 0.22
	Bet/Fru	20%	8.35 $\pm$ 0.74	5.79 $\pm$ 0.52	13.18 $\pm$ 1.11
		30%	4.14 $\pm$ 0.23	6.88 $\pm$ 0.67	5.26 $\pm$ 0.36
		10%	4.88 $\pm$ 0.39	10.03 $\pm$ 1.03	4.92 $\pm$ 0.13
	ChCl/Teg	20%	6.18 $\pm$ 0.84	4.14 $\pm$ 0.56	8.92 $\pm$ 0.47
		30%	7.87 $\pm$ 0.93	6.37 $\pm$ 0.63	7.57 $\pm$ 0.68
		10%	1.90 $\pm$ 0.23	4.70 $\pm$ 0.21	2.35 $\pm$ 0.17
	ChCl/Fru	20%	9.50 $\pm$ 1.05	5.05 $\pm$ 0.33	4.25 $\pm$ 0.21
		30%	3.17 $\pm$ 0.37	4.55 $\pm$ 0.25	5.81 $\pm$ 0.13

### **Capacità antiossidante: DPPH e ABTS**

Oltre alla determinazione del contenuto totale dei polifenoli e del contenuto di flavonoidi totale è stata studiato la capacità estraente dei differenti DES sui composti antiossidanti, mediante i saggi DPPH e ABTS.

Per il saggio ABTS i risultati hanno evidenziato una differente resa nell'estrazione dei composti antiossidanti tra i vari solventi DES (Tabella 5.10.). In particolar modo, la più alta capacità antiradicalica è stata determinata negli estratti di cioccolato fondente al 70% ottenuto con le coppie HBA-HBD formate da ChCl/Teg (91.33% to 97.40% di inibizione del radicale ABTS). Per questo solvente non sono state evidenziate variazioni notevoli nella percentuale di inibizione tra le differenti percentuali di idratazione del DES né per quanto riguarda le tre condizioni a cui è stata condotta l'estrazione. Inoltre, anche la coppia Bet/Teg ha mostrato buone capacità antiradicaliche, tra il 90.42 e il 94.66% di inibizione del radicale ABTS, per l'idratazione al 30%, mostrando capacità simili di estrazione con il solvente convenzionale MeOH:H<sub>2</sub>O. Dai dati inoltre si evince che le

formazione dei solventi eutettici profondi influisce sulle capacità estrattive dei composti antiossidanti [156-157].

**Tabella 5.10.** Risultati espressi in % di inibizione  $\pm$  Deviazione standard (n=3) il saggio ABTS per i differenti solventi analizzanti

SOLVENTI		CONDIZIONI DI ESTRAZIONE			
		60 °C x 50 min	70 °C x 40 min	80 °C x 30 min	
CONVENZIONALE	MeOH:H <sub>2</sub> O	99.76 $\pm$ 0.12	98.76 $\pm$ 0.41	98.54 $\pm$ 0.36	
	H <sub>2</sub> O	81.16 $\pm$ 0.34	83.16 $\pm$ 0.33	86.16 $\pm$ 0.14	
	MeOH	40.77 $\pm$ 0.34	43.77 $\pm$ 0.11	45.77 $\pm$ 0.09	
GREEN	Bet/Teg	10%	70.80 $\pm$ 0.31	76.13 $\pm$ 0.27	76.56 $\pm$ 0.28
		20%	75.45 $\pm$ 0.46	75.55 $\pm$ 0.39	76.21 $\pm$ 0.11
		30%	90.42 $\pm$ 0.32	94.66 $\pm$ 0.33	94.25 $\pm$ 0.51
	Bet/Fru	10%	3.48 $\pm$ 0.31	nd	nd
		20%	58.95 $\pm$ 0.21	64.08 $\pm$ 0.12	65.54 $\pm$ 0.36
		30%	79.75 $\pm$ 0.33	85.52 $\pm$ 0.24	65.96 $\pm$ 0.33
	ChCl/Teg	10%	96.49 $\pm$ 0.32	95.79 $\pm$ 0.14	95.20 $\pm$ 0.25
		20%	93.98 $\pm$ 0.41	92.17 $\pm$ 0.033	91.33 $\pm$ 0.36
		30%	97.40 $\pm$ 0.38	95.79 $\pm$ 0.21	96.28 $\pm$ 0.23
	ChCl/Fru	10%	nd	10.05 $\pm$ 0.09	63.23 $\pm$ 0.11
		20%	17.64 $\pm$ 0.12	54.14 $\pm$ 0.36	84.23 $\pm$ 0.07
		30%	75.68 $\pm$ 0.23	83.96 $\pm$ 0.07	86.36 $\pm$ 0.40

Per quanto riguarda, invece, l'attività antiradicalica degli estratti per il radicale DPPH, sono state evidenziate differenze tra le estrazioni con i solventi convenzionali e i DES (Tabella 5.11.). Tuttavia, gli estratti ottenuti con i DES hanno mostrato una minore capacità antiradicalica rispetto a solventi convenzionali MeOH:H<sub>2</sub>O e MeOH. Tra le coppie DES quelle che hanno evidenziato una maggiore percentuale di inibizione del radicale DPPH sono stati i solventi ChCl/Fru al 10% (67.78%) e ChCl/Fru al 30% (61.74%) ChCl/Teg al 30% (51.00%) e Bet/Teg al 30% (42.00%). La condizione di estrazione, che ha portato a un miglior risultato nella capacità antiradicalica degli estratti con i DES, è 60°C per 50 min. Inoltre, per alcune coppie DES a differenti percentuali di idratazione non è stato possibile determinare la capacità antiossidante in quanto, i componenti della coppia DES (HBA-HBD) possono a loro volta interagire con il reattivo del saggio portando alla formazione di precipitati che alterano la lettura dei dati [152-153].

I differenti risultati tra i saggi ABTS e DPPH sono in parte dovuti alle molecole target a cui i reattivi si legano, rispettivamente l'ABTS con antiossidanti idrofilici e lipofili

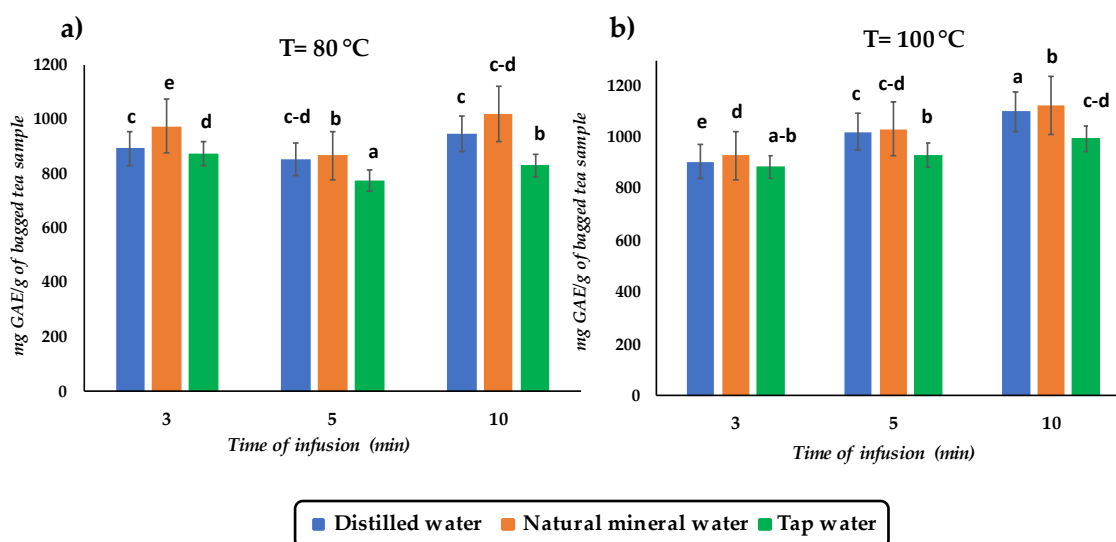
mentre DPPH con solo con i lipofili. Inoltre, il radicale DPPH non reagisce con gli acidi fenolici e pertanto la capacità antiradicalica tra ABTS e DPPH è parzialmente differente [68]. Inoltre, le differenze di capacità antiradicalica nei due saggi potrebbero essere attribuite, non solo alla capacità estrattiva delle molecole target da parte dei solventi DES, ma anche della interferenza tra i reattivi e altre molecole presenti nei campioni di cioccolato che vengono coestratte dalla matrice in esame, come metilxantine e pigmenti [69].

**Tabella 5.11.** Risultati espressi in % di inibizione  $\pm$  Deviazione standard (n=3) il saggio DPPH per i differenti solventi analizzanti

SOLVENTI		CONDIZIONI DI ESTRAZIONE			
		60 °C x 50 min	70 °C x 40 min	80 °C x 30 min	
CONVENZIONALE	MeOH:H <sub>2</sub> O	73.99 $\pm$ 0.18	83.99 $\pm$ 0.34	93.99 $\pm$ 0.58	
	H <sub>2</sub> O	11.53 $\pm$ 0.07	15.53 $\pm$ 0.08	31.53 $\pm$ 0.27	
	MeOH	67.13 $\pm$ 0.23	77.13 $\pm$ 0.53	87.13 $\pm$ 0.38	
GREEN	Bet/Teg	10%	nd	nd	nd
		20%	nd	nd	nd
		30%	42.02 $\pm$ 0.16	37.80 $\pm$ 0.09	35.40 $\pm$ 0.08
	Bet/Fru	10%	nd	nd	nd
		20%	nd	nd	nd
		30%	nd	nd	nd
	ChCl/Teg	10%	21.40 $\pm$ 0.08	21.00 $\pm$ 0.08	23.01 $\pm$ 0.07
		20%	25.50 $\pm$ 0.05	31.80 $\pm$ 0.22	26.30 $\pm$ 0.14
		30%	51.00 $\pm$ 0.12	24.10 $\pm$ 0.22	19.40 $\pm$ 0.09
	ChCl/Fru	10%	67.78 $\pm$ 0.35	60.72 $\pm$ 0.24	46.16 $\pm$ 0.11
		20%	nd	nd	nd
		30%	61.74 $\pm$ 0.38	45.81 $\pm$ 0.12	nd

### 5.3.3. Determinazione dei polifenoli nei campioni di tè

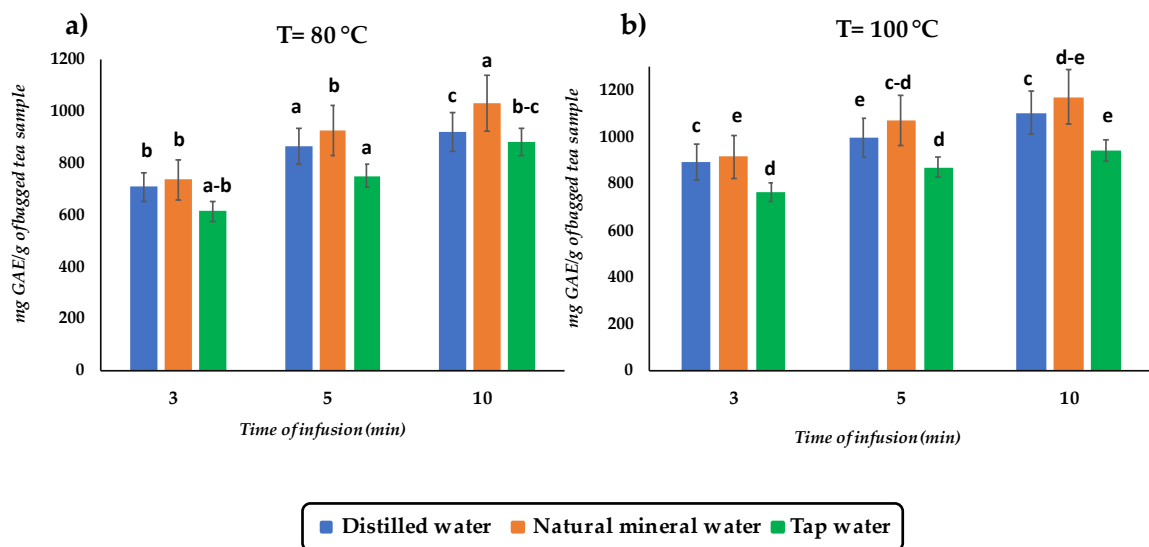
Lo studio ha preso in considerazione il contenuto di polifenoli nei campioni degli infusi di tè verde e nero in diversi tipi di acqua (acqua di rubinetto, acqua minerale naturale e acqua distillata). Il saggio Folin-Ciocalteu è stato ampiamente utilizzato per la determinazione del contenuto totale di polifenoli (TPC) in diverse matrici alimentari, compreso il tè. Tuttavia, nessuno studio ha considerato contemporaneamente diverse temperature di infusione (80 °C e 100 °C), diversi tempi di infusione (3, 5 e 10 minuti) e diversi tipi di acqua (distillata, di rubinetto e minerale naturale). La Figura 5.11. mostra il contenuto fenolico totale (TPC) dell'infuso di tè verde considerando le diverse condizioni di tempo/temperatura e i diversi tipi di acqua utilizzati per l'infusione. È stato riscontrato un chiaro aumento del TPC con un tempo di infusione più lungo per ogni tipo di acqua analizzata. Inoltre, è stato osservato un aumento della TPC nei campioni di tè verde estratti a T = 100 °C per 10 minuti (Figura 3b). Tra i tipi di acqua, è emerso che la NMW per tutti e tre i tempi di infusione (3, 5 e 10 min) ha prodotto valori di TPC più elevati (916,12-1169,81 mg GAE/g).



**Figure 5.11.** Contenuto di polifenoli totali (TPC) in campioni di tè verde (mg GAE/g). (a) estrazione a T = 80 °C per differenti tempi di infusione e tipi di acqua; (b) estrazione a T = 100 °C per differenti tempi di infusione e tipi di acqua. Le barre di errore indicano  $\pm$  deviazione standard (n=3). Le stesse lettere indicano una differenza significativa in accordo con il test ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Per i campioni di tè nero (Figura 5.12), il TPC è inferiore a quello dei campioni di tè verde. Tuttavia, anche l'infuso di tè nero mostra la stessa tendenza del tè verde, con un

contenuto di polifenoli totali più elevato per gli infusi estratti a una temperatura di 100 °C (Figura 5.12 b) rispetto a quelli estratti a una temperatura di circa 80 °C (Figura 5.12 a). Inoltre, anche per il tè nero, la NMW estrae più polifenoli dell'acqua di rubinetto e dell'acqua distillata. Il TPC dei tè verdi rispetto ai tè neri potrebbe derivare dai loro processi di produzione. Secondo Astill et al. [207], durante la produzione del tè verde, i polifenoli primari (cioè le catechine) rimangono relativamente intatti durante il processo. Ciò potrebbe essere attribuito alla disattivazione degli enzimi che possono catalizzare la polimerizzazione ossidativa delle catechine attraverso il trattamento termico (tostatura in padella o cottura a vapore) subito dopo la raccolta. Al contrario, la produzione di tè nero prevede una fase di rottura della foglia per favorire l'ossidazione enzimatica delle catechine, diminuendo così il contenuto di polifenoli.

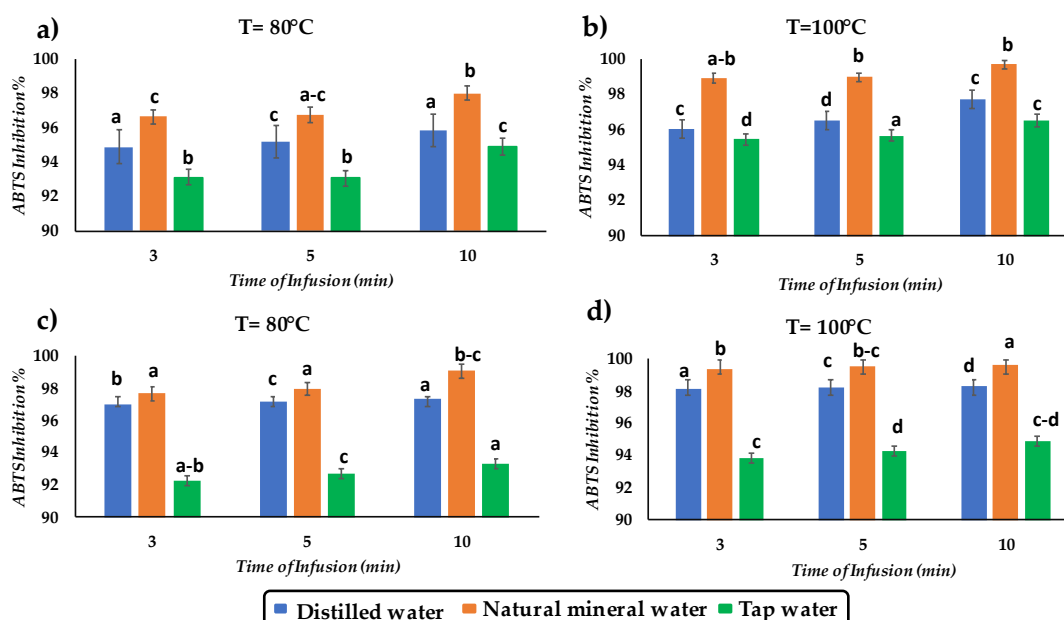


**Figure 5.12.** Contenuto di polifenoli totale (TPC) nei campioni di tè nero (mg GAE/g). (a) estrazione a T = 80 °C per differenti tempi di infusioni e tipi di acqua (b) estrazione a T = 100 °C per differenti tempi di infusioni e tipi di acqua. Le barre di errore indicano  $\pm$  deviazione standard (n=3). Le stesse lettere indicano una differenza significativa in accordo con il test ANOVA ( $p < 0,05$ ).

I parametri che influenzano maggiormente la concentrazione di TPC sono il tempo di infusione e il tipo di acqua utilizzata per la preparazione dell'infuso. Infatti, l'aumento della temperatura da 80 °C a 100 °C è accompagnato da un leggero aumento della TPC. Il tempo di infusione è il parametro che influenza maggiormente l'estrazione dei polifenoli, secondo quanto riportato in letteratura [96-97]. Per le confezioni commerciali di tè, il tempo di infusione raccomandato è di 2-3 minuti; ciò è consigliato perché un'eccessiva concentrazione di polifenoli potrebbe influenzare il gusto del prodotto [70],

[210]. Pertanto, i risultati hanno mostrato che le migliori condizioni di estrazione per i composti antiossidanti nel tè sono l'utilizzo di NMW con un tempo di estrazione di 10 minuti a 100 °C (1126,62 mg GAE/g). Queste procedure di infusione potrebbero essere applicate alle preparazioni casalinghe per mantenere intatti i suoi principi attivi, rafforzando così gli effetti benefici del suo consumo [207].

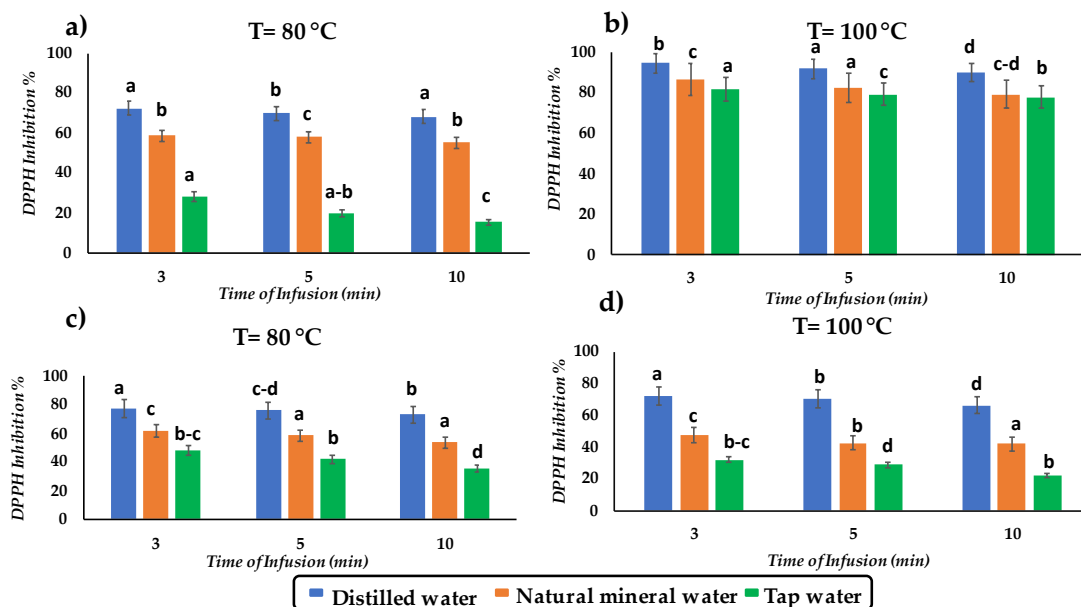
Inoltre, è stata valutata la capacità di scavenging dei radicali ABTS e DPPH di diversi infusi di tè verde e nero ottenuti con diverse acque (DW, NMW e TW) a diversi tempi/temperature di macerazione. Nell'infuso di tè verde, l'attività ABTS più elevata si osserva nei campioni preparati con NMW a 100 °C per 10 minuti (99,73, I%), mentre la più bassa si registra a 80 °C per 3 minuti con TW (93,10, I%). La tendenza riscontrata nel tè verde si osserva anche per gli infusi di tè nero (Figura 5.13.).



**Figura 5.13.** Attività di scavenging del radicale ABTS di infuso di tè verde, a T = 80 °C (a) e a T = 100 °C (b); e di campioni di tè nero, a T = 80 °C (c) e a T = 100 °C (d); in acqua distillata; in acqua minerale naturale e in acqua di rubinetto. Le barre di errore sono  $\pm$  deviazione standard. Le stesse lettere indicano una differenza significativa secondo il test ANOVA ( $p < 0,05$ ).

I polifenoli del tè verde (non fermentato) e dell'infuso di tè nero (fermentato) sono entrambi efficaci nello scavenging del radicale ABTS, ma le differenze nelle attività di scavenging possono essere dovute alla diminuzione delle concentrazioni di polifenoli durante il processo di fermentazione [211], [212]. Inoltre, la temperatura dell'acqua non influisce negativamente sulla capacità antiossidante, probabilmente partendo dal presupposto che la struttura chimica dei polifenoli mantiene l'efficienza anche a

temperature elevate. Inoltre, la maggiore attività antiossidante può essere correlata al contenuto totale di polifenoli degli infusi di tè. Infatti, per questo test è stata riscontrata un'attività antiossidante più elevata anche negli infusi di tè preparati con NMW[212]. I risultati mostrano che l'attività DPPH aumenta con l'aumentare della temperatura di infusione e diminuisce con l'aumentare del tempo di infusione (Figura 5.14.). L'attività DPPH più elevata negli infusi di tè verde è stata ottenuta a 100 °C per 3 minuti (95,01, I%), mentre nei tè neri la massima attività antiossidante è stata ottenuta a 80° per 3 minuti (77,29, I%). Inoltre, è stato osservato che la DW è l'acqua con la maggiore capacità di estrazione dei polifenoli sia per i tè verdi che per quelli neri; ciò è probabilmente dovuto all'assenza di sali di calcio e magnesio in essa disciolti [116].



**Figure 5.14.** Attività di scavenging del radicale DPPH degli infuse di tè verde (a,b) a T = 80 °C (a) e a T = 100 °C (b); e dei campioni di tè nero (c,d) a T = 80 °C (c) e a T = 100 °C (d); in acqua distillata, acqua minerale naturale e acqua di rubinetto. Le barre di errore sono ± deviazione standard. Le stesse lettere indicano una differenza significativa secondo il test ANOVA (p < 0,05).

Tra le diverse infusioni di tè ottenute con tre diversi tipi di acqua, si osserva una riduzione dell'attività antiossidante probabilmente legata alla concentrazione di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Inoltre, durante l'analisi dei campioni ottenuti con acqua di rubinetto (33,8 °F) si osserva un precipitato, probabilmente perché durante la fase di infusione gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  interagiscono con i polifenoli formando un complesso polifenolo/calcio che si deposita sul fondo. Un'aliquota di infuso di tè è stata sottoposta a centrifugazione e poi analizzata.



Questa procedura ha rivelato una capacità antiossidante superiore a quella ottenuta senza centrifugazione, confermando la possibile interazione tra ioni calcio e polifenoli [212]. Inoltre, l'aumento dell'attività antiossidante può essere dovuto al contenuto totale di polifenoli e può essere correlato al tempo di macerazione, alle dimensioni delle foglie e alla porosità delle bustine di tè [213]. Tuttavia, i risultati del saggio DPPH differiscono da quelli del saggio ABTS; ciò è probabilmente legato al diverso tipo di reagenti utilizzati. Il reagente DPPH è un radicale azotato stabile che interagisce con i radicali perossidici coinvolti nella perossidazione dei lipidi, mentre l'ABTS reagisce con composti idrofili e lipofili. Pertanto, la reattività del DPPH è limitata alla frazione lipofila [214].

### 5.3.4. Determinazione di polifenoli nei campioni di caffè

#### *Contenuto totale di polifenoli*

Il saggio Folin-Ciocalteu è stato usato per determinare il contenuto dei polifenoli nel caffè macinato e nei rispettivi infusi ottenuti dai differenti processi di estrazione (moka, espresso professionale, espresso in cialde ed espresso in capsule). Le concentrazioni dei polifenoli totali, espresse come mg di acido gallico per g di caffè macinato, sono riportate in Tabella 5.12.

**Tabella 5.12.** Concentrazioni TPC (mg GAE/g caffè macinato) per i caffè macinati e gli infusi da essi ottenuti

CAMPIONI	TPC (mg GAE/g caffè macinato)	
	Caffè Macinato	Caffè Infuso
Bar 1	25.37 ± 0.52	1.51 ± 0.26
Bar 2	23.33 ± 0.61	1.72 ± 0.21
Cialda 1	22.96 ± 0.38	1.46 ± 0.02
Cialda 2	23.87 ± 0.71	1.49 ± 0.05
Moka 1	23.03 ± 0.23	2.71 ± 0.25
Moka 2	24.06 ± 0.41	3.52 ± 0.08
Capsula 1	29.61 ± 0.26	1.30 ± 0.06
Capsule 2	28.46 ± 0.53	1.44 ± 0.07

Il più alto contenuto di polifenoli è stato ritrovato nei preparati per caffè in capsule (28.46-29.61 mg GAE/g caffè in polvere), questa tendenza però non si è mantenuta in seguito ai processi d'infusione. Infatti, gli infusi di caffè che hanno presentato una concentrazione maggiore di polifenoli totali nell'estratto finale sono i campioni ottenuti con la moka

(2.71-3.52 mg GAE/g caffè macinato) e con la macchina professionale da bar (1.51-1.72 mg GAE/g caffè in polvere). Questo è probabilmente dovuto al maggiore tempo di contatto tra l'acqua e il caffè macinato e alle più alte temperature di estrazione. In letteratura si è evidenziato come fattore limitante l'estrazione dei composti fenolici dal caffè per tutti i tipi di estrazione il rapporto tra il volume di acqua e la quantità di caffè adoperata, inoltre altro fattore che potrebbe influenzare l'estrazione dei polifenoli dal caffè nei differenti metodi di estrazione sono la temperatura, il tempo di contatto tra l'acqua e il caffè macinato, la pressione e la dimensione della polvere [189; 197-198].

### ***Saggi antiossidanti DPPH e ABTS***

Per valutare l'attività antiossidante dei campioni di caffè presi in esame sono stati effettuati due saggi antiradicali: ABTS e DPPH. Il saggio ABTS ha evidenziato come per i campioni di caffè in polvere e per gli estratti da essi ottenuti il processo di estrazione non abbia influenzato l'attività antiradicalica del caffè (Tabella 5.13). Il saggio ABTS è caratterizzato da un'elevata attività antiradicalica sia per il caffè macinato (96-99 %) sia per gli infusi di caffè (97-99%), in accordo con studi di letteratura [197; 199]. Per quanto riguarda il saggio DPPH i risultati ottenuti hanno evidenziato una differenza di inibizione del radicale tra i campioni di caffè macinato e i rispettivi infusi (Tabella 5.13).

**Tabella 5.13.** Percentuale di inibizione (I%) dei campioni di caffè in polvere e infusi per i saggi ABTS e DPPH

CAMPIONI	ABTS		DPPH	
	Caffè Macinato	Caffè Infuso	Caffè Macinato	Caffè Infuso
<b>Bar 1</b>	99.03 ± 0.21	97.63 ± 0.11	61.09 ± 0.23	27.03 ± 0.12
<b>Bar2</b>	99.12 ± 0.23	97.71 ± 0.13	60.89 ± 0.11	27.42 ± 0.18
<b>Cialda 1</b>	97.59 ± 0.11	99.35 ± 0.21	48.76 ± 0.15	7.84 ± 0.06
<b>Cialda 2</b>	96.31 ± 0.22	99.42 ± 0.25	49.04 ± 0.13	9.06 ± 0.09
<b>Moka 1</b>	99.88 ± 0.25	99.62 ± 0.13	64.65 ± 0.18	16.01 ± 0.25
<b>Moka 2</b>	99.96 ± 0.27	99.73 ± 0.17	64.82 ± 0.16	14.78 ± 0.17
<b>Capsula 1</b>	98.23 ± 0.19	97.68 ± 0.15	54.75 ± 0.09	24.23 ± 0.24
<b>Capsula 2</b>	98.52 ± 0.17	97.76 ± 0.14	55.21 ± 0.05	22.04 ± 0.15

Tra i caffè macinati i campioni per la moka sono risultati con una più alta capacità antiossidante pari a circa il 65% di inibizione del radicale DPPH per entrambi i campioni, a cui fanno seguito i caffè macinati per l'infusione professionale (60.89-61.09 %). Tuttavia, gli estratti ottenuti con le differenti metodiche di infusione hanno evidenziato una minore capacità di scavenging verso il radicale DPPH, probabilmente dovuto

all'influenza dei fattori di estrazione sui composti antiossidanti [200; 201]. Inoltre, dai risultati ottenuti si è evidenziata una differenza dell'attività antiradicalica verso i due radicali ABTS e DPPH, questo probabilmente dovuto alle differenti molecole target dei due reattivi [198].

### ***Contenuto totale di flavonoidi***

I risultati del contenuto totale di flavonoidi sono riportati in Tabella 5.14. Nei caffè macinati il TFC varia tra  $82.33 \pm 0.84$  e  $113 \pm 1.05$ . I campioni con un più alto contenuto di TFC sono risultati il caffè macinato per capsule ( $99.40$ - $113.69$  mg RUT/ g di caffè macinato) e il caffè macinato per moka ( $93.64$ - $97.67$  mg RUT/g di caffè macinato). Successivamente all'infusione vi è stata una riduzione del contenuto di flavonoidi totali in tutti i campioni di caffè infuso. Tuttavia, il miglior metodo di preparazione del caffè infuso è risultato l'uso della moka ( $8.55$ - $8.60$  mg RUT/g di caffè macinato). I risultati ottenuti dalle infusioni sono risultate in accordo con i dati presenti in letteratura [213; 217]. Inoltre, la variabilità nella concentrazione di flavonoidi nei campioni di caffè infuso può essere legata al tempo, alla temperatura di estrazione e al rapporto tra acqua e caffè macinato, come evidenziato da Uslu (2021) [216].

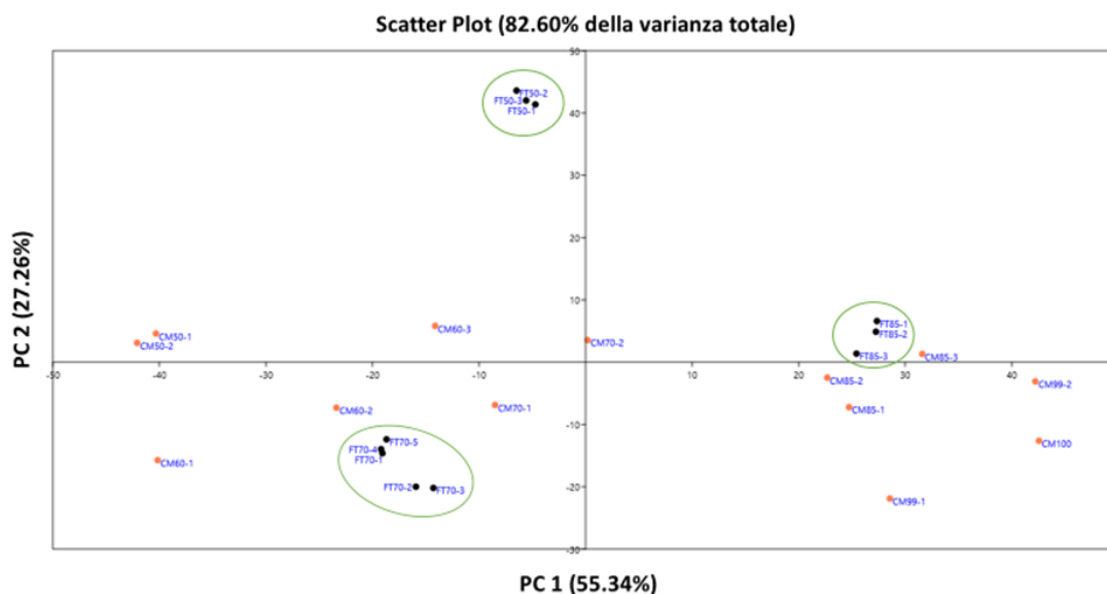
**Tabella 5.14.** Contenuto totale di flavonoidi (mg RUT/ g di caffè macinato) per i campioni di caffè macinato e dei rispettivi infusi

CAMPIONI	TFC	
	Caffè Macinato	Caffè Infuso
<b>Bar 1</b>	$86.78 \pm 0.42$	$5.13 \pm 0.21$
<b>Bar2</b>	$79.90 \pm 0.56$	$4.77 \pm 0.36$
<b>Cialda 1</b>	$82.33 \pm 0.84$	$4.39 \pm 0.25$
<b>Cialda 2</b>	$90.02 \pm 0.72$	$5.01 \pm 0.14$
<b>Moka 1</b>	$93.64 \pm 0.63$	$8.55 \pm 0.24$
<b>Moka 2</b>	$97.67 \pm 0.82$	$8.60 \pm 0.31$
<b>Capsula 1</b>	$113.69 \pm 1.05$	$4.41 \pm 0.09$
<b>Capsula 2</b>	$99.40 \pm 0.94$	$3.94 \pm 0.11$

## 5.4. Analisi statistica

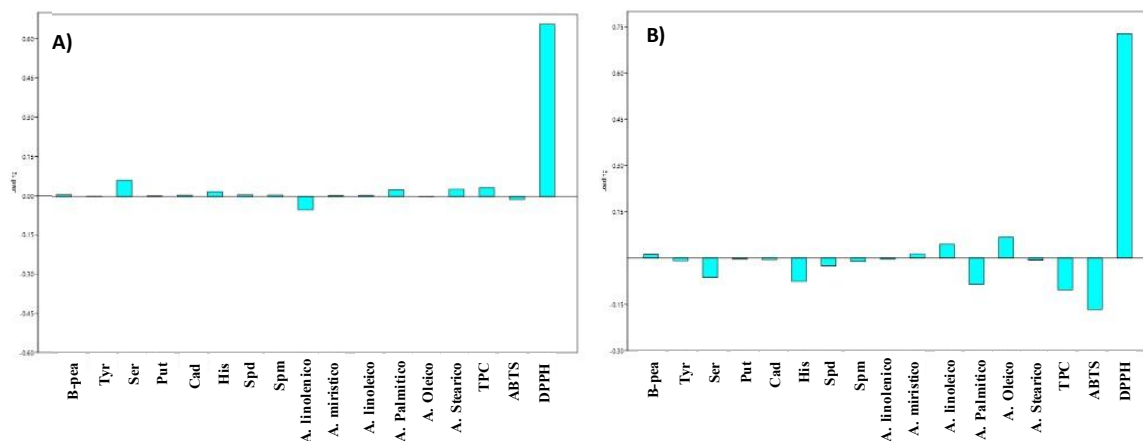
### 5.4.1. Cioccolato

Sui dati ottenuti dai campioni di cioccolato a differenti percentuali di cacao è stata effettuata l'analisi della correlazione di Person (Tabella 5.15). Dai risultati delle analisi della correlazione di Person si è evidenziato che la maggior parte delle ammine sono correlate positivamente tra di loro ( $r > 0.560$ ,  $p < 0.05$ ). Tra queste quelle che presentano una più alta correlazione sono Ser-His ( $r = 0.976$ ,  $p < 0.05$ ) e His-Spd ( $r = 0.941$ ,  $p < 0.05$ ). Inoltre, i valori ottenuti per l'acido miristico sono correlati negativamente con l'acido linolenico ( $r = -0.807$ ,  $p < 0.05$ ), così come anche tra l'acido stearico e l'acido oleico ( $r = -0.797$ ,  $p < 0.05$ ). Il contenuto in polifenoli totali e il saggio ABTS sono risultati correlati alla concentrazione nei campioni di istamina, rispettivamente con  $r$  pari a 0.809 e 0.895 ( $p < 0.05$ ). Mentre il saggio DPPH è risultato correlato positivamente all'acido miristico ( $r = 0.845$ ,  $p < 0.05$ ). Inoltre, sui dati utilizzati per l'analisi della correlazione è stata effettuata anche l'analisi delle componenti principali (PCA) e la cluster analysis (CA) al fine di esplorare i dati e di evidenziare eventuali raggruppamenti tra i campioni. I dati analitici riportati nei paragrafi precedenti sono stati organizzati in forma di matrice e sottoposti ad elaborazioni multivariate. Le righe della matrice (n. 24) rappresentavano i differenti campioni, nel nostro caso i campioni di cioccolato a differenti percentuali di cacao, e le colonne (n. 17) rappresentavano i dati ottenuti dalle analisi di laboratorio (ammine biogene, acidi grassi liberi, TPC, ABTS e DPPH assay). Le prestazioni della PCA e la selezione del numero ottimale di componenti principali sono state valutate mediante una procedura interna di convalida incrociata. La modellazione PCA ha fornito l'82.6% della varianza totale spiegata considerando le prime due componenti principali (PC). La componente principale uno (PC1) rappresenta il 55.34% della varianza, mentre la componente principale due (PC2) rappresenta il 27.26%. Dal grafico degli scatter plot (Figura 5.15) si può notare come il modello distingue i campioni a differenti percentuali di cacao separandoli tra campioni contenenti più del 70% di cacao nel primo e secondo quadrante del piano cartesiano e campioni con percentuale di cacao inferiore al 70% nel terzo e quarto quadrante. Inoltre, si può osservare che i campioni a marchio Fairtrade vengono divisi in base alla percentuale di cacao in essa contenuta ma mantengono una correlazione maggiore rispetto ai campioni senza certificazione.



**Figura 5.15.** Scatter plot delle due componenti principali (PC1 vs PC2) per i campioni di cioccolato fondente a differenti percentuali di cacao a marchio Fair Trade e no.

Dai grafici dei loadings (Figura 5.16) viene mostrato come le variabili prese in esame influiscano sulla distinzione dei diversi campioni di cioccolato esaminati. In particolare modo, sulla PC1 pesa maggiormente la variabile del saggio DPPH seguita dalla concentrazione di serotonina. Infatti, i campioni che sono correlati positivamente alla PC1 sono tutti i campioni con percentuali di cacao maggiori dell'70% che presentavano una percentuale di inibizione del radicale DPPH maggiore del 56%. Mentre, le variabili correlate positivamente alla PC2 sono la % di inibizione del DPPH, seguito dall'acido linoleico e l'acido oleico. Inoltre, questa componente è correlata negativamente dal saggio ABTS e dal TPC, a cui segue il contenuto di acido palmitico, di istamina e di serotonina.

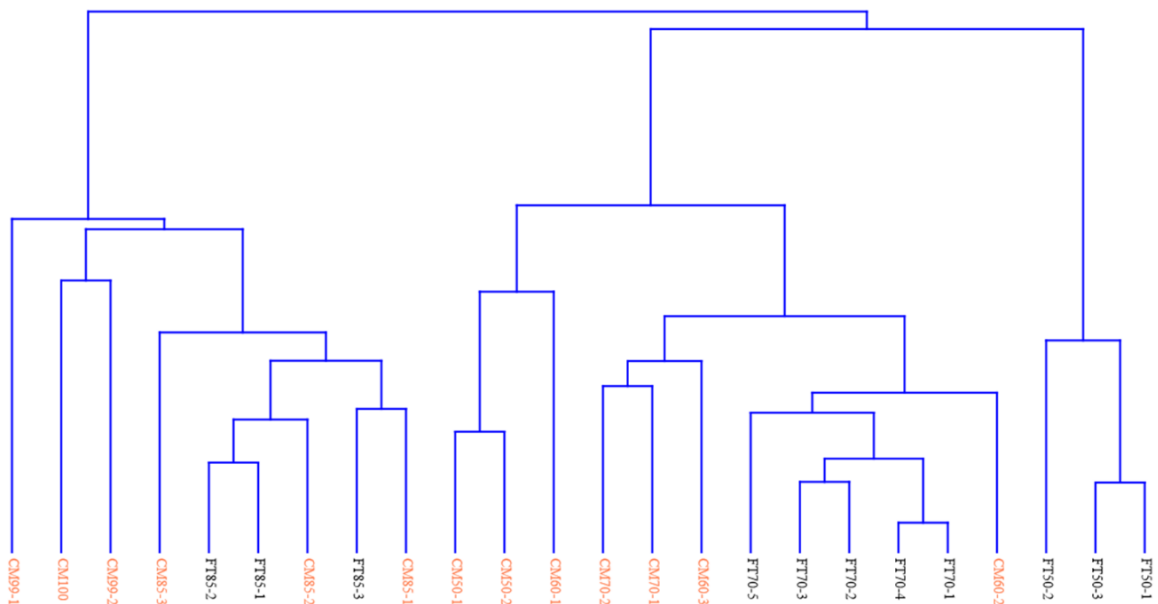


**Figura 5.16.** Loading plot della componente principale 1 (A) e della componente principale 2 (B)

**Tabella 5.15.** Coefficiente di correlazione (r) tra le ammine biogene, gli acidi grassi liberi, il TPC e i saggi antiossidanti (ABTS e DPPH)

	B-Pea	Tyr	Ser	Put	Cad	His	Spd	Spm	Linolenico	Miristico	Linoleico	Palmitico	Oleico	Stearico	TPC	ABTS	DPPH
B-Pea		0,759	<b>0,827</b>	0,721	0,748	0,192	0,742	0,637	-0,106	0,362	0,175	-0,347	-0,093	0,165	0,010	-0,121	0,082
Tyr			<b>0,853</b>	<b>0,823</b>	0,723	<b>0,839</b>	<b>0,852</b>	0,731	-0,413	0,223	0,099	-0,226	-0,033	0,143	0,256	-0,177	-0,093
Ser				<b>0,841</b>	<b>0,838</b>	<b>0,976</b>	<b>0,847</b>	0,621	-0,117	0,136	0,168	-0,246	-0,044	0,119	0,370	-0,334	0,070
Put					<b>0,873</b>	0,613	0,799	0,582	-0,261	-0,116	0,224	-0,278	-0,223	0,285	0,187	-0,347	0,007
Cad						0,298	<b>0,800</b>	0,560	-0,131	-0,093	0,213	-0,164	-0,210	0,192	0,118	-0,409	0,032
His							<b>0,941</b>	<b>0,884</b>	-0,579	0,368	-0,392	0,134	-0,317	0,221	<b>0,809</b>	<b>0,895</b>	-0,291
Spd								<b>0,879</b>	-0,124	0,115	0,162	-0,329	-0,230	0,252	0,231	-0,116	-0,089
Spm									-0,194	0,300	0,096	-0,330	-0,203	0,269	0,192	0,071	-0,005
Linolenico										<b>-0,807</b>	0,145	-0,398	-0,249	-0,194	-0,124	0,246	-0,554
Miristico											0,029	-0,299	0,556	-0,358	-0,227	-0,101	<b>0,845</b>
Linoleico												-0,427	-0,103	0,010	-0,108	-0,245	0,218
Palmitico													0,193	-0,444	0,313	0,067	-0,104
Oleico														<b>-0,797</b>	-0,059	-0,044	0,130
Stearico															-0,115	-0,062	0,072
TPC																0,395	-0,172
ABTS																	-0,289
DPPH																	

Al fine di confermare l'analisi delle componenti principali è stata effettuata la cluster analysis, che mira a trovare le similarità tra campioni sulla base del profilo dei composti bioattivi investigati nello studio (Figura 5.17). Dall'analisi si evince che al primo livello del dendrogramma si vengono a formare due clusters: il primo comprende i campioni con percentuali di cacao maggiori del 70% e il secondo costituito da tutti i campioni con percentuali di cacao inferiori al 70%. Il primo cluster è diviso a sua volta in due parti che mettono in evidenza la distinzione tra i campioni contenenti l'85% di cacao e quelli contenenti il 99-100% di cacao. Il secondo cluster invece si divide ulteriormente in due evidenziando la netta differenza tra i campioni Fairtrade al 50% di cacao rispetto a tutti gli altri campioni analizzati. Pertanto, si può concludere che l'analisi multivariata delle componenti principali e la cluster analysis hanno messo in evidenza una differenziazione tra i campioni a differenti percentuali di cacao e che seppure con un numero ridotto di campioni si evidenziano differenze tra i cioccolati fondenti a marchio Fairtrade e non a marchio.



**Figura 5.17.** Cluster analysis: i campioni evidenziati in arancione sono i campioni convenzionali (senza-certificazione Fairtrade) mentre i campioni in nero sono i campioni di cioccolato certificati Fairtrade

## 5.4.2. Tè

Sui dati ottenuti per le analisi dei campioni di tè verde e dei tè nero è stata valutata l'analisi della correlazione di Pearson, per valutare se esistesse una correlazione tra il contenuto di polifenoli totali (TPC), i saggi antiossidanti (ABTS e DPPH) e le condizioni di infusione quali tempo e temperatura (Tabella 5.16.). I dati hanno evidenziato che per quanto riguarda i campioni di tè verde il contenuto di polifenoli totali è correlato positivamente alla temperatura di estrazione ( $r=0.701$ ,  $p<0.005$ ) e al tempo d'infusione ( $r=0.556$ ,  $p<0.005$ ). Mentre il saggio DPPH è risultato correlato positivamente alla temperatura d'infusione ( $r=0.755$ ,  $p<0.005$ ) e al contenuto di polifenoli totali ( $r=0.612$ ,  $p<0.005$ ).

**Tabella 5.16.** Coefficienti di correlazione di Pearson (r) per i campioni di tè verde

	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>TPC</b>	<b>DPPH</b>	<b>ABTS</b>
Temperatura		0.001	<b>0.701</b>	<b>0.755</b>	0.340
Tempo			<b>0.556</b>	-0.099	0.343
TPC				<b>0.612</b>	0.419
DPPH					0.469
ABTS					

Per i campioni di tè nero si visto che, come per i campioni di tè verde, il TPC è risultato correlato positivamente alla temperatura e al tempo. Così come anche il DPPH è risultato correlato positivamente al contenuto di TPC ( $r=0.602$ ,  $p<0.005$ ) (Tabella 5.17).

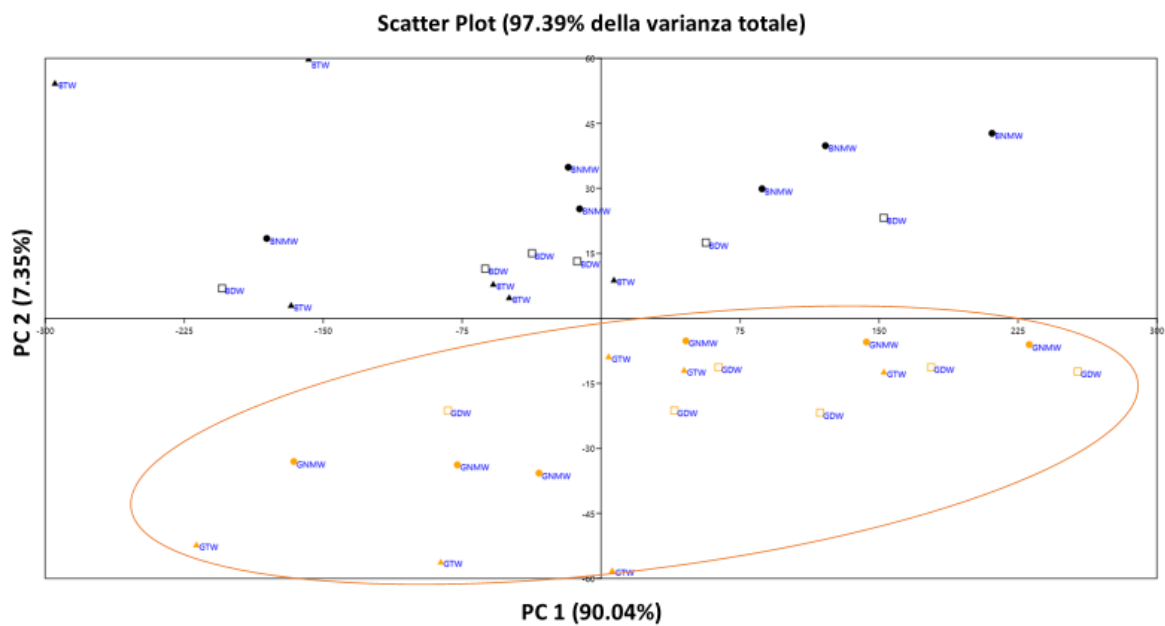
**Tabella 5.17.** Coefficienti di correlazione di Pearson (r) per i campioni di tè verde

	<b>Temperatura</b>	<b>tempo</b>	<b>TPC</b>	<b>DPPH</b>	<b>ABTS</b>
Temperatura		0.003	<b>0.507</b>	0.112	-0.174
Tempo			<b>0.641</b>	0.109	0.221
TPC				<b>0.602</b>	0.271
DPPH					<b>0.679</b>
ABTS					

Successivamente all'analisi della correlazione di Pearson (r) sulle variabili analizzate è stata effettuata un'indagine esplorativa dei dati mediante PCA (Figura 5.18.). Dall'analisi delle componenti principali è risultato che le prime due componenti descrivono circa il 97.39% della varianza. Dal grafico degli scatter plot (Figura 5.18.) si può notare come il modello evidenzia due raggruppamenti: campioni di tè verde e campioni di tè nero.



Infatti, i campioni di tè verde sono correlati negativamente alla PC2, su cui pesa principalmente il saggio DPPH, mentre i campioni di tè nero sono correlati positivamente alla PC2 e su di essi pesa maggiormente il saggio ABTS. Tuttavia, da quest'analisi esplorativa non si è evidenziata una netta distinzione tra gli infusi di tè con i differenti tipi di acqua, ad indicare che il contenuto di polifenoli varia principalmente tra i differenti tipi di tè.



**Figura 5.18.** Scatter Plot delle componenti PC1 vs PC2 dei campioni di tè verde e tè nero

### 5.4.3. Caffè

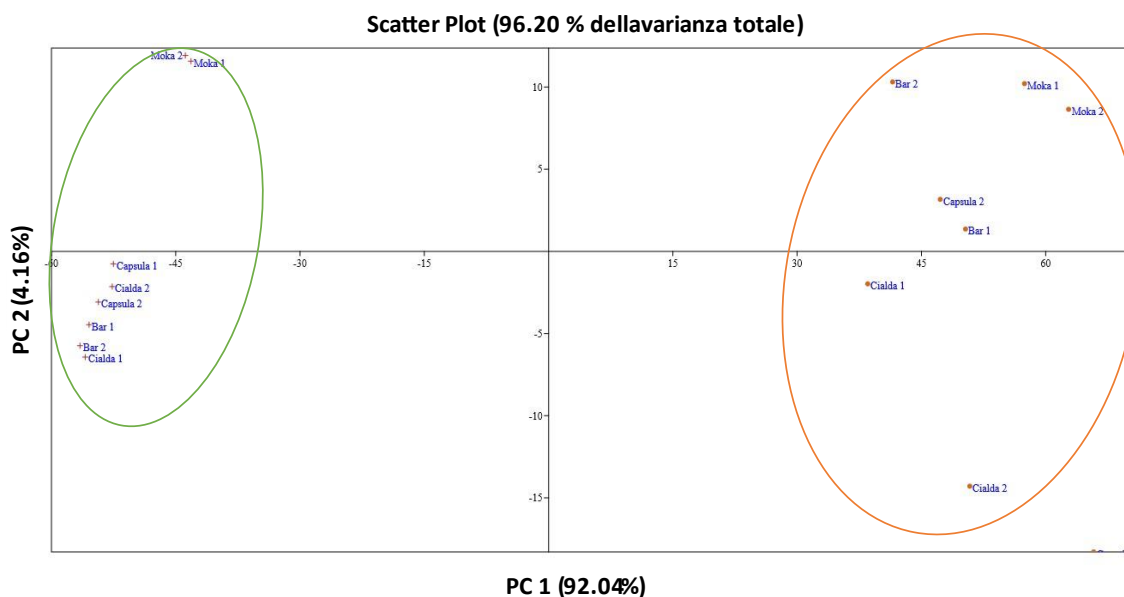
I dati ottenuti dalle analisi delle ammine biogene e dei saggi spettrofotometrici per la determinazione dei polifenoli sono stati analizzati mediante analisi univariata e multivariata. È stata valutata la correlazione di Pearson tra le otto ammine biogene analizzate e i saggi spettrofotometrici (TPC; TFC; ABTS e DPPH) (Tabella 5.18). Dai risultati ottenuti si è evidenziato che esiste una forte correlazione positiva ( $r > 0.900$ ;  $p > 0.05$ ) tra il contenuto totale di polifenoli, il contenuto totale di flavonoidi e il saggio antiossidante DPPH. Per quanto riguarda la concentrazione di ammine biogene, l'analisi ha evidenziato che la serotonina, la  $\beta$ -fenilettilammina e la putrescina sono correlate positivamente ( $r > 0.678$ ;  $p < 0.05$ ) al contenuto totale di polifenoli, al contenuto totale di flavonoidi e alla attività scavenging verso il radicale DPPH. Mentre la spermidina è correlata positivamente ( $r > 0.607$ ;  $p < 0.05$ ) al saggio antiossidante DPPH. Inoltre, la  $\beta$ -Pea

è risultata correlata positivamente alla Ser ( $r=0.809$ ;  $p>0.05$ ), mentre la Put e la Spd sono risultate correlate positivamente sia alla serotonina sia alla  $\beta$ -Pea ( $r>0.667$ ;  $p>0.05$ ).

**Tabella 5.18.** Correlazione di Pearson ( $p<0.05$ ) tra i saggi spettrofotometrici (TPC, TFC, DPPH e ABTS) e le ammine biogene determinate nei campioni

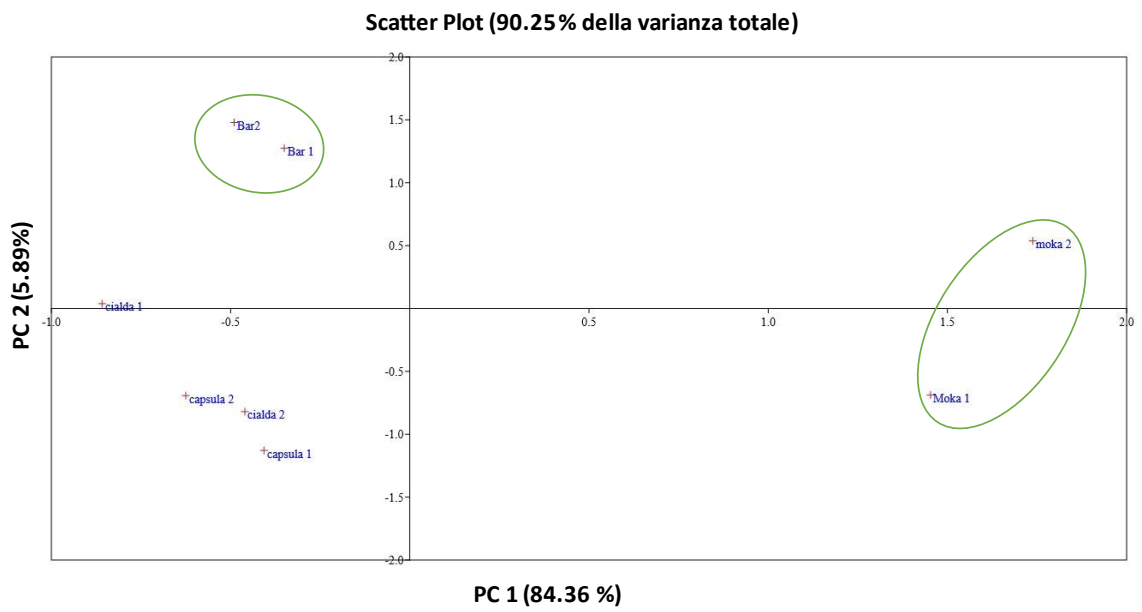
	ABTS	DPPH	TPC	TFC	Ser	B-Pea	Put	His	Spd
ABTS		0.163	0.187	0.195	0.414	0.448	0.034	0.087	0.465
DPPH			<b>0.878</b>	<b>0.904</b>	<b>0.900</b>	<b>0.810</b>	<b>0.906</b>	-0.272	<b>0.607</b>
TPC				<b>0.990</b>	<b>0.925</b>	<b>0.678</b>	<b>0.912</b>	-0.213	0.555
TFC					<b>0.933</b>	<b>0.713</b>	<b>0.927</b>	-0.228	0.542
Ser						<b>0.809</b>	<b>0.847</b>	-0.090	<b>0.667</b>
B-Pea							<b>0.649</b>	-0.232	<b>0.879</b>
Put								-0.195	0.444
His									-0.247

Inoltre, sui dati ottenuti dalle analisi dei saggi spettrofotometrici e del contenuto di ammine biogene è stata effettuata un'analisi esplorativa mediante Principal Component Analysis (PCA). In primo luogo, è stata effettuata la PCA considerando tutti i risultati ottenuti dalle analisi (Figura 5.19.). Considerando questa prima indagine esplorativa, si è evidenziato che le prime due componenti principali spiegano circa il 96% della varianza dei dati. Inoltre, dallo Scatter Plot tra la Principal Component 1 (PC1) e la Principal Component (PC2) si sono formati due raggruppamenti lungo l'asse delle ascisse (PC1) tra i campioni di caffè macinato e di caffè infuso. Dall'analisi dei Loadings si è evidenziato che le variabili che pesano positivamente sulla componente principale 1 sono il contenuto totale di polifenoli e il contenuto totale di flavonoidi, seguiti dalla serotonina. Mentre, le variabili che pesano positivamente sulla PC2 sono la concentrazione di serotonina e la concentrazione di istamina a cui fa seguito la  $\beta$ -fenilettilammina. Invece le variabili che pesano negativamente sulla PC2 sono il TFC e il TPC. Dal grafico degli Scatter, inoltre, si evidenzia una separazione lungo la componente PC2 per i campioni di caffè infuso ottenuto con la Moka; pertanto, per valutare meglio come le variabili influissero sui campioni di caffè infuso è stata effettuata l'analisi delle componenti principali solo per questi campioni. La varianza totale spiegata dalle due componenti principali in questa seconda analisi della PCA è pari a circa il 90%.



**Figura 5.19.** Sactter Plot delle componenti principali (PC1 vs PC2) dei campioni di caffè macinato (cerchiato in arancione) e caffè infuso (cerchiato in verde).

Dalla Figura 5.20. si è potuto evidenziare che i campioni di caffè infuso si separano secondo la procedura di estrazione. Infatti, i campioni di caffè estratti con la macchina per espresso professionale (Bar 1 e Bar 2) si posizionano nel terzo quadrante, mentre i campioni di caffè estratti con la moka si posizionano nel 1 e 2 quadrante in posizione opposta rispetto agli altri campioni. Ciò sta ad indicare che sui campioni di caffè ottenuto con la macchina per espresso professionale sono correlati positivamente alla PC2, su cui pesa prevalentemente l'istamina, mentre per i campioni ottenuti con la moka sono correlati positivamente alla componente principale 1 su cui pesa per lo più la concentrazione di serotonina e istamina. Pertanto, si può concludere che l'analisi multivariata delle componenti principali ha messo in evidenza una differenza tra i campioni di caffè di caffè macinati e infusi e che seppure con un numero ridotto di campioni si evidenziano raggruppamenti tra i campioni di caffè infuso per le variabili studiate.



**Figura 5.20.** Sactter Plot delle componenti principali (PC1 vs PC2) dei campioni di caffè infuso.

# CAPITOLO VI

## LA METODOLOGIA LCA PER LA VALUTAZIONE DEGLI IMPATTI AMBIENTALI

### 6.1. Il Life Cycle Assessment

Secondo lo standard ISO 14040:2006 la valutazione del ciclo di vita è definita come: una tecnica per determinare i potenziali aspetti ed impatti ambientali associati ad un prodotto, servizio o processo con una definizione degli input e degli output del sistema di valutazione dei potenziali impatti associati a tali input e output del sistema [221]. La metodica del Life Cycle Assessment (LCA) è uno strumento analitico e sistematico che consente di valutare il potenziale impatto ambientale, sociale ed economico di un prodotto, processo o servizio lungo il suo intero ciclo di vita. In Figura 6.1 sono riportate in modo schematico le fasi del ciclo di vita. La metodologia LCA spazia dalle fasi di estrazione delle materie prime che costituiscono il prodotto, alla sua produzione e distribuzione, uso e rifiuti restituendo gli impatti ambientali legati a queste fasi.

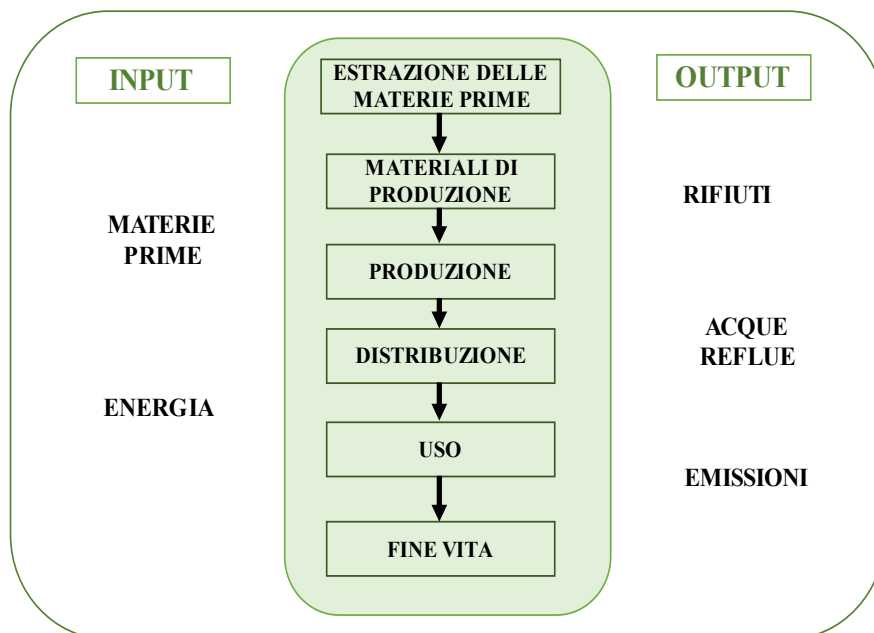
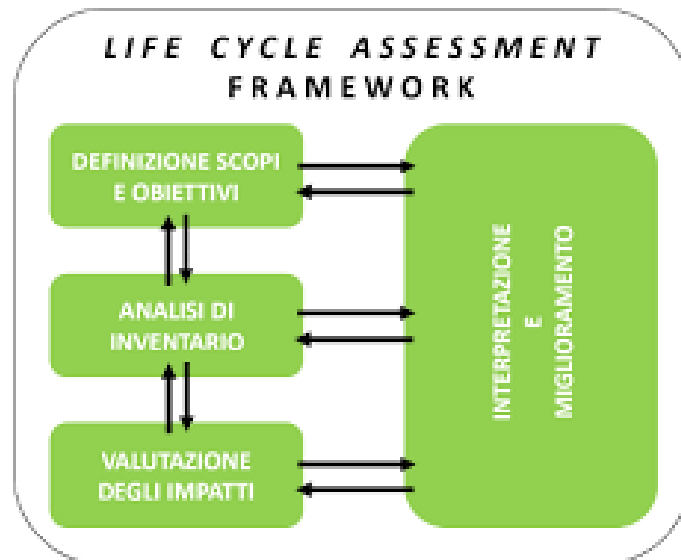


Figura 6.1. Fasi del ciclo di vita

La metodologia LCA consta di quattro fasi: 1) Definizione dell'obiettivo e dello scopo; 2) redazione e analisi d'inventario del ciclo di vita (LCI); 3) Valutazione dell'impatto del ciclo di vita (LCIA); 4) Interpretazione dei risultati e analisi di miglioramento (Figura 6.2.).



**Figura 6.2.** Rappresentazione schematica dei dati d'inventario

La prima fase di uno studio LCA consiste nella definizione degli obiettivi e dello scopo dello studio andando a indicarne l'unità funzionale e i confini del sistema esaminati (gate to gate, cradle to gate o cradle to grave). Per unità funzionale si intende l'unità a cui tutti i dati dello studio in ingresso vengono riferiti e a cui i dati in uscita sono normalizzati. Pertanto, l'unità funzionale deve essere chiaramente definita e misurabile. Mentre i confini di sistema definiscono le unità del processo che devono essere incluse nel sistema da analizzare, questi devono essere scelti sulla base dell'obiettivi dello studio. Nel caso di mancanza di dati o di risorse si possono escludere delle fasi del processo che devono essere chiaramente indicate e giustificate. La seconda fase è la fase del life cycle inventory (LCI) in cui vengono riportati tutti i flussi di energia e di materia del sistema/prodotto in esame normalizzati all'unità funzionale. I dati di inventario sono espressi in unità fisiche (unità di massa o di energia) e comprendono l'utilizzo di risorse e di energia e tutte le emissioni ad essi corrispondenti in aria, acqua e suolo associati al sistema da analizzare. La qualità dei dati raccolti ed usati nella fase di inventario è propedeutica alla qualità finale dello studio LCA. I dati misurati direttamente dall'autore presso siti industriali sono definiti dati primari (primary data) mentre quelli ricavabili da letteratura e da banche dati

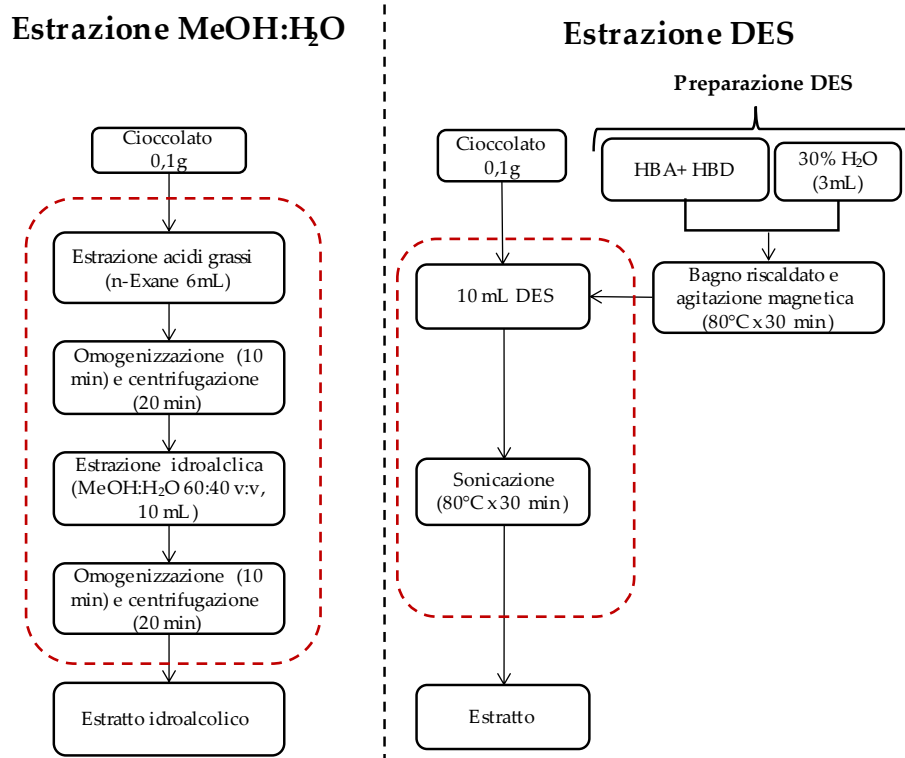
sono definiti secondari (secondary data). La terza fase definita Life cycle impact assessment (LCIA) prevede la valutazione degli impatti ambientali del sistema trasformando i dati d'inventario in un contributo specifico per i differenti indicatori di impatto ambientali presi in considerazione. L'ultima fase è l'interpretazione dei risultati che ha lo scopo di riassumere, descrivere e valutare la qualità dei dati del LCI e/o del LCIA del sistema in analisi [95-96].

## **6.2. Sostenibilità confronto tra l'estrazione convenzionale e "green"**

La metodologia del Life Cycle Assessment (LCA) è stata utilizzata secondo i seguenti standard delle norme ISO 14040:2006 e ISO 14044:2006. Il software SimaPro 9.2 è stato utilizzato per la valutazione degli impatti dei processi di estrazione dei polifenoli, DES e convenzionale [94; 97].

### **6.2.1. Definizione dell'obiettivo e dello scopo**

L'obiettivo è stato quello di valutare e confrontare le implicazioni ambientali di due metodologie di estrazione dei polifenoli, convenzionale e green. In particolare modo sono state prese in considerazione per l'estrazione convenzionale l'uso di una soluzione di MeOH: H<sub>2</sub>O, 60:40 v/v mentre per la metodica green sono state considerate quattro differenti coppie HBA-HBD per la sintesi dei DES al 30 % di idratazione (Bet/Fru, Bet/Teg, ChCl/Fru e ChCl/Teg). Le analisi di estrazione dei polifenoli sono state condotte in campioni di cioccolato fondente al 70%. Nello specifico, sono stati fissati due obiettivi: (1) inquadrare e determinare le condizioni ottimali per minimizzare gli impatti ambientali dei processi di estrazione analizzati; (2) valutare la capacità dei solventi DES nel ridurre le conseguenze ambientali rispetto alle estrazioni convenzionali. L'analisi mediante LCA è stata condotta considerando una singola procedura di estrazione per entrambi i metodi. L'approccio dello studio LCA è stato *gate-to-gate*, in quanto sono stati trascurati i processi a monte e a valle delle fasi di estrazioni dei polifenoli. Questo approccio inoltre è stato scelto in quanto non era possibile conoscere dettagliatamente il percorso di sintesi industriale di tutti i solventi considerati e sia perché non si conosce il processo di smaltimento che viene applicato ai rifiuti alla fine della procedura di estrazione. I confini del sistema sono mostrati nella Figura 6.3.



**Figura 6.3.** Confini del sistema dei metodi di estrazione presi in esame

Come unità funzionale (UF) è stata scelta la procedura di una singola analisi di estrazione per entrambi i metodi, convenzionale e no. Una singola analisi è stata utilizzata come UF perché lo studio mira a valutare l'impatto ambientale dell'intera procedura di estrazione senza considerare il contenuto totale di polifenoli nell'estratto finale.

### 6.2.2. Inventario del ciclo di vita

Il Life Cycle Inventory (LCI), ossia l'inventario del ciclo di vita, è stato calcolato usando sia dati primari (sperimentali) sia dati secondari presenti nei database del software SimaPro 9.2. Il consumo di elettricità, la durata del processo e le quantità di solventi (esano, metanolo, acqua distillata, Bet/Glu, Bet/Teg, ChCl/Glu e ChCl/Teg) sono stati raccolti sperimentalmente durante ogni procedura di estrazione. Successivamente, gli input sono stati modellati utilizzando dati generici inclusi nel database Ecoinvent v.3.8.; Agribalized e ELDP. I dati di inventario sono riportati in Tabella 6.1.

Le quantità di acqua e di reagenti adoperate variano sulla base del tipo di estrazione (convenzionale e green) e a seconda della coppia HBA-HBD che forma il DES e dello specifico rapporto molare preso in considerazione. Per valutare il consumo di elettricità per ogni strumento adoperato nell'analisi è stata applicata la seguente formula:



$$E = Pt$$

Dove,  $E$  è l'energia elettrica (kWh) consumata dallo strumento;  $P$  è la potenza (W) dello strumento e  $t$  è il tempo di utilizzo dello strumento per singola analisi [4].

**Tabella 6.1.** Dati d'inventario per i metosi di estrazione DES e convenzionale

Condizioni Estrazione		MeOH:H <sub>2</sub> O	Bet/Fru (1:1)	Bet/Teg (1:2)	ChCl/Fru (1:1)	ChCl/Teg (1:2)
Temperature (°C)		30	80	80	80	80
Strumentazione	Bagno ad ultrasuoni (min)	20	30	30	30	30
	Centrifuga (min)	40	10	10	10	10
Durata dell'estrazione (min)		60	30	30	30	30
Solventi	H <sub>2</sub> O (kg)	0,0040	0,0030	0,0030	0,0030	0,0030
	MeOH (kg)	0,0047	/	/	/	/
	n-esano (kg)	0,0040	/	/	/	/
	Glu (kg)	/	0,0035	/	0,0035	/
	Bet (kg)	/	0,0023	0,0020	/	/
	Teg (kg)	/	/	0,0049	/	0,0047
	CHCl (kg)	/	/	/	0,0027	0,0022
Pipette Paster di vetro (kg)		0,00873 (n. 3)	0,0029 (n. 1)	0,0029 (n. 1)	0,0029 (n. 1)	0,0029 (n. 1)
Consumo di elettricità	Bagno ad ultrasuoni (kWh)	0,00664	0,04	0,04	0,04	0,04
	centrifuga (kWh)	0,4995	0,04995	0,04995	0,04995	0,04995
	omogeneizzatore (kWh)	0,0664	/	/	/	/
Elettricità Totale (kWh)		0,57254	0,08995	0,08995	0,08995	0,08995

### 6.2.3. Valutazione dell'impatto del ciclo di vita

La Valutazione dell'impatto del ciclo di vita (Life Cycle Impact Assessment, LCIA) fornisce informazioni per interpretare le prestazioni ambientali dei metodi di estrazione presi in esame. È stato utilizzato il metodo ReCiPe 2016 Midpoint (H) V1.01, e sono state considerate le seguenti categorie di impatto: Riscaldamento globale (GW); Riduzione dell'ozono stratosferico (SOD); Radiazioni ionizzanti (IR); Formazione di ozono, Salute umana (OFHH); Formazione di polveri sottili (FPMP); Formazione di ozono, Ecosistemi terrestri (OFTE); Acidificazione terrestre (TA); Eutrofizzazione delle acque dolci (FE); eutrofizzazione marina (ME); ecotossicità terrestre (TE); ecotossicità dell'acqua dolce (FEC); ecotossicità marina (MEC); tossicità cancerogena umana (HCT); tossicità non cancerogena umana (HNCT); uso del suolo (LU); scarsità delle risorse minerali (MRS); scarsità delle risorse fossili (FRS); consumo di acqua (WC). Inoltre, per meglio analizzare i dati e valutare le differenze tra le differenti procedure di estrazione dei polifenoli è stata

effettuata un'indagine esplorativa mediante analisi multivariata. Sui risultati ottenuti, per ogni metodo di estrazione e per ogni categoria d'impatto, è stata applicata la Principal Component Analysis (PCA). Questa metodica ha consentito di ridurre il numero delle variabili analizzate e valutare la relazione tra le categorie d'impatto e le metodiche di estrazione dei polifenoli [224].

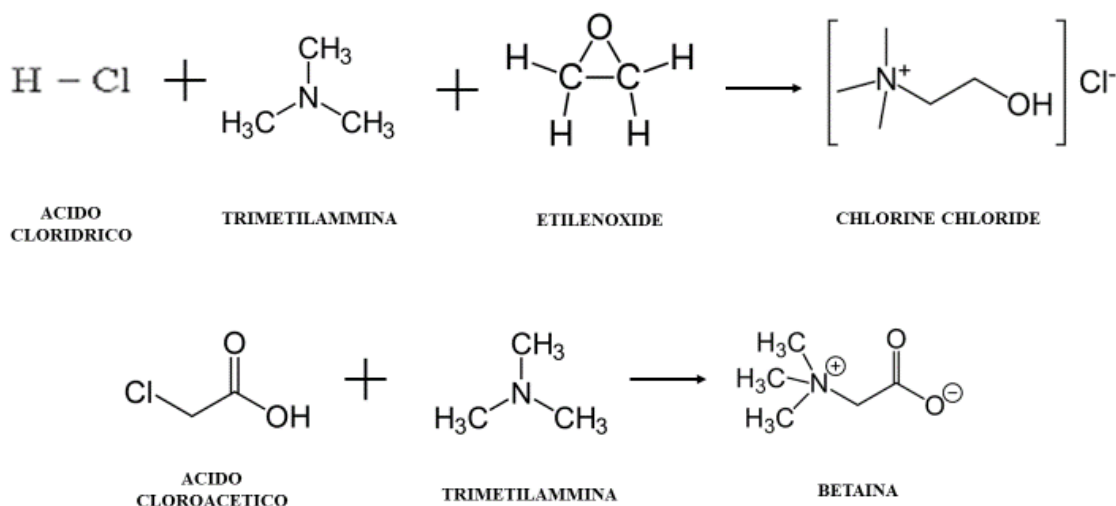
#### **6.2.4. Interpretazione dei risultati**

Per meglio comprendere la robustezza dei dati di input adoperati nell'analisi LCA dei differenti metodi di estrazione è stata effettuata un'analisi dell'incertezza (ISO 14044:2006) per il metodo di estrazione convenzionale e per i metodi di estrazione green (ChCl/Teg; ChCl/Fru; Bet/Teg e Bet/Fru). In particolar modo è stata effettuata un'analisi dell'incertezza dei parametri relativi ai dati di inventario per ogni metodo studiato. L'incertezza di base, legata alla variabilità dei flussi elementari ed intermedi, e qualitativa, legata alla selezione dei diversi set dei dati di input, è stata caratterizzata per ogni metodo di estrazione. L'incertezza di base è stata valutata sui valori predefiniti nel Database Ecoinvent ipotizzando una distribuzione log-normale. Le analisi di incertezza dei parametri sono state condotte utilizzando simulazioni Monte Carlo a coppie presenti nel software SimaPro 9.2. L'analisi a coppie garantisce un'analisi correlata tra i due processi messi a confronto, e perciò i valori selezionati in ciascuna simulazione per i parametri comuni all'interno e tra la coppia analizzata saranno gli stessi. Il risultato dell'analisi è una distribuzione di frequenza cumulativa degli indicatori di confronto di tutte le simulazioni. Da questa viene evidenziata la frazione di simulazioni in cui l'impatto modellato di una categoria d'impatto supera l'altra. Le differenze tra due categorie di impatto sono state ottenute per il valore soglia del 95%. L'analisi a coppie per un determinato insieme di condizioni è stata condotta utilizzando mille simulazioni per ogni confronto. Questi confronti sono stati effettuati tra il metodo di estrazione convenzionale e i quattro diversi tipi di estrazione "green" dei polifenoli.

#### **6.2.5. Assunzioni e limitazioni**

In questo studio LCA sono state effettate delle ipotesi per ogni tipo di solvente preso in esame. A tal proposito, nello studio non sono state prese in considerazione le procedure di sintesi dei solventi sia per quanto riguarda la procedura convenzionale di estrazione sia per quelle green. Lo studio non ha preso in considerazione né il trasporto dei materiali né

il loro smaltimento. Inoltre, per quanto riguarda i composti Clorin Clorina e Betaina non sono presenti nelle banche dati del Software SimaPro 9.2, pertanto si è risaliti alla loro sintesi mediante le formule riportate in Figura 6.4. e sono stati considerati come input del processo solo la massa di reagenti che prendono parte alla reazione, senza tener conto dell'energia, del trasporto delle materie prime e di tutti gli altri input che rientrano nella loro produzione [100-101].



**Figura 6.4.** Sintesi della Clorina Clorina e della Betaina

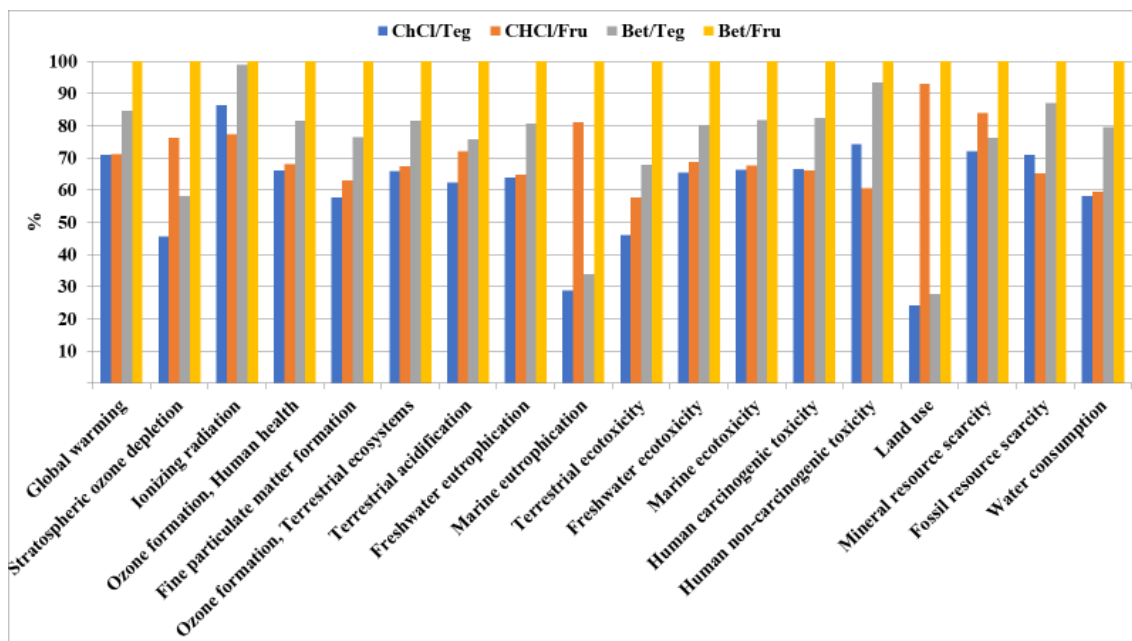
Per quanto riguarda il fruttosio è stato considerato quello prodotto per uso alimentare in quanto non sono presenti nel software dati relativi alla produzione chimico-industriale. Inoltre, sui database la produzione di fruttosio fa riferimento alla produzione di glucosio alimentare. Inoltre, per le pipette Pasteur in vetro usa e getta, non essendo presenti nel software, è stato considerato in input il “*glass tube borosilicate*”. La scelta dei materiali è stata effettuata in accordo con la loro area geografica. Dove possibile è stato scelto di applicare l'input con l'abbreviazione RER o IT, rappresentando rispettivamente la produzione in Europa o in Italia. Dove non è stato possibile, è stata scelta la dicitura GLO, ossia “globale”.

### 6.3. Valutazione dell'impatto del ciclo di vita dei DES

Negli ultimi anni l'applicazione dei solventi DES è stata ampiamente studiata per l'estrazione dei composti bioattivi da matrici alimentari in quanto considerati solventi “green” che apportano numerosi vantaggi nella loro applicazione [226]. Questi composti sono classificati come solventi verdi in quanto atossici e biodegradabili, ma ad oggi non

è stato ancora effettuata un'analisi completa del loro reale impatto a livello ambientale [176]. In letteratura è presente un solo studio che ha valutato l'impatto ambientale della metodica di estrazione dei polifenoli con una singola coppia DES (Clorin cloride – etilen glicole) a confronto con l'estrazione convenzionale in etanolo [98; 102]. In questo studio sono stati presi in considerazione, per la valutazione degli impatti ambientali mediante la metodologia LCA, quattro differenti coppie DES, a specifici rapporti molati, contenenti il 30% di acqua. I solventi green applicati nell'estrazione dei polifenoli dal cioccolato fondente al 70% sono stati confrontati con solventi organici (MeOH:H<sub>2</sub>O, 60:40 v/v) convenzionalmente applicati nell'estrazione dei polifenoli da queste matrici alimentari. La valutazione degli impatti ambientali è stata effettuata su scala laboratoriale. Dai risultati ottenuti (Tabella 6.2.) si evidenzia come l'estrazione con il solvente convenzionale sia quella che ha un maggiore peso per quasi tutte le categorie d'impatto. L'unica eccezione ricade sulla categoria d'impatto "*Marine Eutrophication*" per la quale il processo di estrazione mediante le coppie Bet/Fru e ChCl/Fru hanno un impatto maggiore dell'estrazione convenzionale del +116% e +74%, rispettivamente.

Dai dati si evince che l'estrazione dei polifenoli dalla matrice di cioccolato mediante l'utilizzo dei solventi green riduce l'impatto ambientale su tutte le categorie d'impatto considerato. In particolar modo, le procedure di estrazione che vedono coinvolti i solventi ChCl/Teg e ChCl/Fru sono i metodi che hanno una riduzione per le categorie d'impatto "Stratospheric Ozone Depletion", "Ionizing Radiation", "Human Non-Carcinogenic Toxicity" e "Land Use" pari a circa -80% rispetto alla procedura di estrazione convenzionale. In Figura 6.5. sono riportati gli impatti ambientali per le differenti estrazioni con i solventi eutettici profondi. Dai risultati si evidenzia come la procedura d'estrazione con la coppia DES Bet/Fru è quella che incide maggiormente in tutte le categorie d'impatto, questo potrebbe essere dovuto in parte al processo produttivo del fruttosio, che viene considerato come materia prima alimentare e non come composto di sintesi. Pertanto, in questo caso la produzione di fruttosio può andare ad incidere maggiormente sulle categorie d'impatto che sono legate principalmente alle produzioni agro-alimentari, come "Land use", "Water consumption", "Marine eutrophication", etc.



**Figura 6.5.** Risultati degli impatti ambientali per le estrazioni green con le differenti coppie DES

Per meglio comprendere i dati dello studio e la loro relazione con le diverse categorie di impatto, è stata applicata l'analisi delle componenti principali (PCA). L'analisi è stata condotta confrontando i dati ottenuti dal calcolo degli impatti per le differenti procedure di estrazione dei polifenoli, convenzionale e green. La Tabella 6.3. mostra i carichi delle variabili della Componente Principale (PCA) applicata al set di dati per tutte le procedure di estrazione analizzate. Dai risultati dell'analisi delle componenti principali si è evidenziato che le prime tre componenti spiegavano più del 95% della varianza spiegata. La PC1 (90% della varianza) presenta una forte correlazione positiva per tutte le categorie d'impatto, tranne per la categoria "Marine eutrophication". Mentre la PC2, che spiega circa 8% della varianza è correlata negativamente alle categorie d'impatto "Global warming", "Ionizing radiation", "human non-carcinogenic toxicity" e "Fossil resource scarcity".

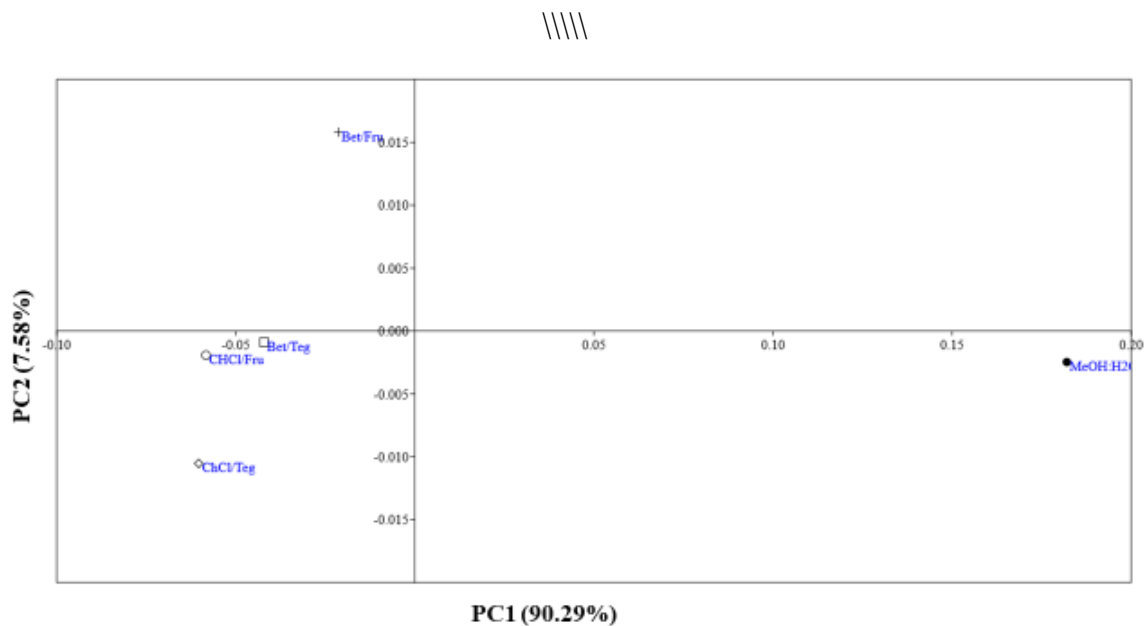
**Tabella 6.2.** Risultati degli impatti per l'estrazione convenzionale e le estrazioni green

Categoria D'impatto	Unità	MeOH:H <sub>2</sub> O	ChCl/Teg	ChCl/Fru	Bet/Teg	Bet/Fru	Δ% <sub>1-2</sub>	Δ% <sub>1-3</sub>	Δ% <sub>1-4</sub>	Δ% <sub>1-5</sub>
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)				
Global Warming	kg CO <sub>2</sub> eq	2.52E-01	5.54E-02	5.57E-02	6.61E-02	7.82E-02	-78%	-78%	-74%	-69%
Stratospheric Ozone Depletion	kg CFC11 eq	1.55E-07	2.72E-08	4.56E-08	3.48E-08	5.97E-08	<b>-82%</b>	-71%	-78%	-61%
Ionizing Radiation	kBq Co-60 eq	2.64E-02	5.27E-03	4.72E-03	6.04E-03	6.10E-03	<b>-80%</b>	<b>-82%</b>	-77%	-77%
Ozone Formation, Human Health	kg NO <sub>x</sub> eq	4.77E-04	1.16E-04	1.19E-04	1.43E-04	1.75E-04	-76%	-75%	-70%	-63%
Fine Particulate Matter Formation	kg PM <sub>2.5</sub> eq	2.67E-04	6.13E-05	6.69E-05	8.12E-05	1.06E-04	-77%	-75%	-70%	-60%
Ozone Formation, Terrestrial Ecosystems	kg NO <sub>x</sub> eq	4.87E-04	1.19E-04	1.22E-04	1.48E-04	1.81E-04	-75%	-75%	-70%	-63%
Terrestrial Acidification	kg SO <sub>2</sub> eq	7.82E-04	1.71E-04	1.98E-04	2.08E-04	2.75E-04	-78%	-75%	-73%	-65%
Freshwater Eutrophication	kg P eq	5.42E-05	1.38E-05	1.39E-05	1.74E-05	2.15E-05	-75%	-74%	-68%	-60%
Marine Eutrophication	kg N eq	4.05E-06	2.52E-06	7.08E-06	2.96E-06	8.73E-06	-38%	<b>75%</b>	-27%	<b>116%</b>
Terrestrial Ecotoxicity	kg 1,4-DCB	1.38E-01	3.38E-02	4.24E-02	4.99E-02	7.34E-02	-76%	-69%	-64%	-47%
Freshwater Ecotoxicity	kg 1,4-DCB	1.96E-03	5.13E-04	5.39E-04	6.30E-04	7.84E-04	-74%	-73%	-68%	-60%
Marine Ecotoxicity	kg 1,4-DCB	2.74E-03	7.11E-04	7.26E-04	8.77E-04	1.07E-03	-74%	-73%	-68%	-61%
Human Carcinogenic Toxicity	kg 1,4-DCB	3.86E-03	1.06E-03	1.06E-03	1.32E-03	1.60E-03	-72%	-73%	-66%	-59%
Human Non-Carcinogenic Toxicity	kg 1,4-DCB	9.25E-02	2.20E-02	1.79E-02	2.77E-02	2.96E-02	-76%	<b>-81%</b>	-70%	-68%
Land Use	m <sup>2</sup> a crop eq	4.22E-03	8.03E-04	3.09E-03	9.24E-04	3.32E-03	<b>-81%</b>	-27%	-78%	-21%
Mineral Resource Scarcity	kg Cu eq	7.30E-05	2.50E-05	2.91E-05	2.65E-05	3.47E-05	-66%	-60%	-64%	-52%
Fossil Resource Scarcity	kg oil eq	8.23E-02	2.03E-02	1.87E-02	2.50E-02	2.86E-02	-75%	-77%	-70%	-65%
Water Consumption	m <sup>3</sup>	3.35E-03	7.24E-04	7.41E-04	9.89E-04	1.24E-03	-78%	-78%	-70%	-63%

**Tabella 6.3.** Carico delle componenti principali per le categorie d'impatto a livello “*midpoint*”

<b>Categorie d'impatto</b>	<b>PC 1</b>	<b>PC 2</b>	<b>PC 3</b>
Global warming	0.82156	<b>-0.36312</b>	-0.3885
Stratospheric ozone depletion	5.00E-07	4.21E-07	-2.96E-06
Ionizing radiation	0.09029	<b>-0.10412</b>	-0.01132
Ozone formation, Human health	0.001489	3.26E-05	-1.01E-05
Fine particulate matter formation	0.000833	0.00046	4.14E-05
Ozone formation, Terrestrial ecosystems	0.001516	0.000109	0.000204
Terrestrial acidification	0.002497	0.000139	-0.00465
Freshwater eutrophication	0.000166	5.02E-05	0.000122
Marine eutrophication	<b>-3.25E-06</b>	0.00023	-0.00064
Terrestrial ecotoxicity	0.39968	0.91067	0.012636
Freshwater ecotoxicity	0.005924	0.001507	-0.00086
Marine ecotoxicity	0.008345	0.001325	0.002326
Human carcinogenic toxicity	0.011492	0.00376	0.01095
Human non-carcinogenic toxicity	0.29884	<b>-0.13748</b>	0.77703
Land use	0.010142	0.072368	-0.36591
Mineral resource scarcity	0.000194	6.92E-05	-0.00085
Fossil resource scarcity	0.25955	<b>-0.06168</b>	0.33295
Water consumption	0.010729	0.003795	0.010242

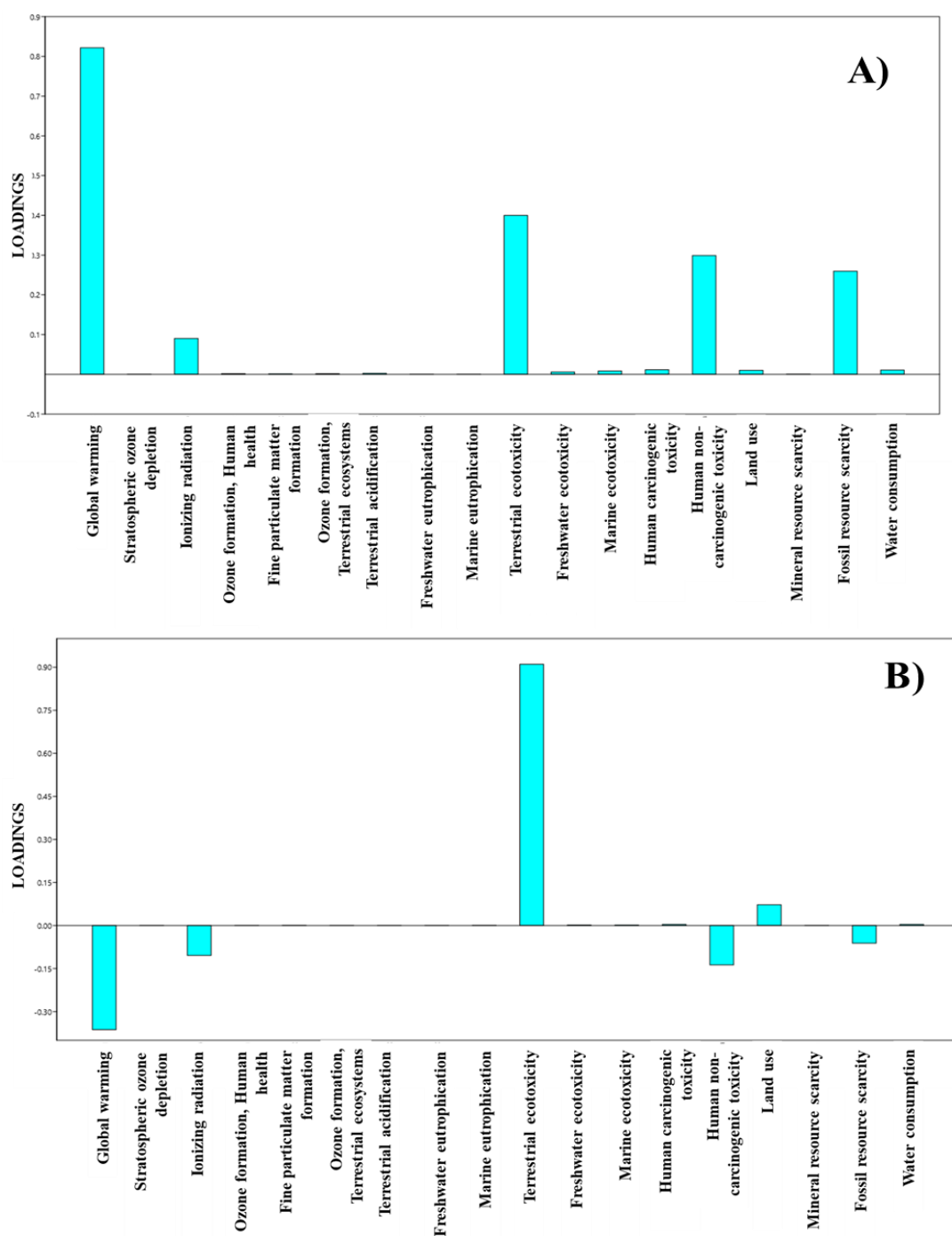
Per comprendere meglio l'analisi statistica multivariata applicata sugli impatti delle procedure di estrazione dei polifenoli mediante metodiche convenzionali e green è stato riportato il grafico che mette in relazione i punteggi tra le componenti PC1 e PC2 (Figura 6.6.).



**Figura 6.6.** Scatter plots delle prime due componenti principali (PC1 vs PC2)

Dallo “scatter plots” si vede come le procedure di estrazione dei polifenoli che applicano metodi green, in questo caso i Solventi Eutettici Profondi (DES), sono tutte in posizione opposta alla procedura di estrazione convenzionale; questo ad indicare che vi è una correlazione positiva tra le procedure di estrazione con le differenti coppie DES, ossia che il profilo degli impatti ambientali di questi metodi sono simili. Su questi metodi pesa negativamente la componente principale 1 (PC1) la quale è principalmente correlata alle categorie d’impatto “Global warming”, “Ionizing radiation”, “Terrestrial ecotoxicity”, “Human non-carcinogenic toxicity” e “Fossil resource scarcity” (Figura 6.7. A). Tuttavia, tra le procedure di estrazione green, quella che si differenzia di più rispetto alle altre analizzate è la metodologia che applica il solvente DES formato dalla coppia Bet/Fru, poiché questo metodo di estrazione presenta correlazione positiva con la “Principal Component 2” (PC2) su cui pesano maggiormente le categorie d’impatto “Terrestrial Ecotoxicity” e “Land Use” (Figura 6.7 B). Al contrario, il metodo convenzionale si colloca sul quadrante opposto (correlazione negativa) a quello delle procedure di estrazione con i DES, ad indicare che presenta notevoli differenze negli impatti ambientali rispetto alle procedure green. Tuttavia, andrebbe ampliato il numero di unità statistiche, ossia di studi di procedure di estrazione convenzionale e green, al fine di fornire una descrizione statistica degli impatti legati alle procedure di estrazione dei polifenoli dal cioccolato fondente in maniera più dettagliata.





**Figura 6.7.** Loadings plot per la componente principale 1 (A) e per la componente principale 2 (B)

### 6.3.1. Analisi incertezza

La metodologia di analisi LCA è spesso affetta da incertezza dovuta ai dati che vengono raccolti per costruire il “Life Cycle inventory” (LCI) ed alle scelte soggettive, assunzioni e considerazioni, che l’operatore effettua nelle fasi di progettazione e valutazione degli

impatti. Pertanto, tale grado di incertezza è stato valutato mediante il metodo Monte Carlo. L'incertezza è stata stimata assegnando ai valori predefiniti forniti dal Database Ecoinvent una distribuzione log-normale. La Figura 6.8. mostra la percentuale di eventi per cui l'impatto è maggiore confrontando il metodo di estrazione convenzionale (MeOH/H<sub>2</sub>O, 60:40 v/v) e i metodi green (ChCl/Teg, ChCl/Fru, Bet/Teg e Bet/Fru). Le barre indicano la percentuale di casi in cui uno dei due metodi di estrazione ha generato un impatto più elevato rispetto a quello confrontato, per ciascuna categoria d'impatto studiata. Dai risultati ottenuti si è osservato che tutte i metodi green hanno mostrato impatti inferiori per quasi tutte le 18 categorie analizzate. In particolar modo, per quanto riguarda la categoria d'impatto "*Water consumption*" si è evidenziato che tra le metodologie convenzionali e green non vi era una differenza nella riduzione degli impatti per questa categoria. Nel confronto tra la metodologia convenzionale e le tecniche di estrazione con ChCl/Fru e Bet/Fru, per la categoria "*Marine eutrophication*" gli impatti sono stati più elevati per l'estrazione con MeOH/H<sub>2</sub>O, vicino al 100% dei casi dopo 1000 cicli. Invece per quanto riguarda la categoria d'impatto "*Land Use*" è stata la categoria con maggiore incidenza per le tecniche di estrazione con ChCl/Fru e Bet/Fru. Dall'analisi dell'incertezza si evince che l'estrazione dei polifenoli mediante metodo convenzionale è stato lo scenario con il più alto impatto in quasi tutte le categorie studiate.



**Figura 6.8.** Risultati dell'analisi Montecarlo per il confronto tra le tecniche di estrazione convenzionale e le tecniche green

## CONCLUSIONI

Negli ultimi anni il mercato degli alimenti e delle bevande nervine sono diventati sempre più diversificati in risposta ai cambiamenti strutturali della domanda dei consumatori, legati principalmente alle loro preoccupazioni per la salute, per la conservazione dell'ambiente e del benessere socioeconomico dei piccoli produttori. A tal proposito, negli ultimi anni sono state intraprese numerose iniziative nel contesto della promozione di processi produttivi più sostenibili e pratiche commerciali socialmente responsabili. Oltre al segmento di mercato convenzionale e di "massa", sono emersi pertanto segmenti di mercato con una più alta attenzione all'ambiente e agli aspetti sociali, come il commercio FairTrade. Questa forma di commercio garantisce al produttore e ai suoi dipendenti un prezzo giusto anche a tutela del territorio, incentivando pratiche agronomiche che limitano e tutelano le risorse naturali. Tuttavia, nonostante l'importante contributo da parte del settore degli alimenti e delle bevande nervine alle economie nazionali, vi sono numerosi problemi legati alla produzione e al commercio di questi prodotti, in particolar modo in relazione alla loro coltivazione e commercio convenzionali. Infatti, questo settore è caratterizzato da una produzione di piccole dimensioni e da investimenti bassi o inadeguati. Inoltre, la mancanza di un'adeguata formazione degli agricoltori e di buone pratiche agricole influisce negativamente sulla qualità dei raccolti. Ne consegue che le materie prime di cacao, tè e caffè sono spesso caratterizzate da una grande eterogeneità per quanto riguarda la qualità. Pertanto, la valutazione affidabile della qualità è di grande importanza sia per i produttori che per gli acquirenti. Sebbene la valutazione degli aspetti di qualità di queste merci sia generalmente legata alla valutazione delle caratteristiche sensoriali, è possibile considerare alcuni composti chimici (marker di qualità), che sono prodotti durante la coltivazione, la lavorazione e/o il deterioramento microbico della materia prima. A tal proposito, il presente studio ha preso in considerazione la possibilità di valutare la qualità degli alimenti e delle bevande nervine a marchio FairTrade e non, mediante l'analisi di composti bioattivi (ammine biogene, acidi grassi e polifenoli). Per quanto riguarda il cioccolato è stato valutato il contenuto di ammine biogene e acidi grassi liberi essenziali, mediante l'applicazione della cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), in differenti campioni di cioccolato a differenti percentuali di cacao. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il contenuto di ammine biogene non presenta un andamento comune tra i campioni FairTrade e non,

probabilmente ciò dovuto ai processi di trasformazione che i prodotti subiscono lungo tutta la filiera. Il contenuto totale di BAs nei campioni varia da un minimo di 3.79 mg/100g di prodotto a 70.50 mg/100g di prodotto, senza mai raggiungere concentrazioni pericolose per la salute dei consumatori. Le BAs che si sono ritrovate a più alte concentrazioni sono la  $\beta$ -Pea, Ser e His sia per i campioni convenzionali sia a marchio FairTrade. Il contenuto di acidi grassi liberi varia tra 465.64 e 2115.10 mg/100g prodotto e si è evidenziato che la concentrazione totale di acidi grassi liberi non varia in funzione del contenuto di cacao, ma che è influenzata da numerosi fattori, tra cui la temperatura e le condizioni di conservazione del prodotto. Gli acidi grassi liberi maggiormente presenti sono acido palmitico (19.38-33.80%), acido stearico (16.39-40.05%) e acido oleico (19.93-42.95%). Le concentrazioni di acidi grassi ottenute rispecchiano la composizione generica dei triacilgliceroli presenti nel burro di cacao. Inoltre, sono stati effettuati i saggi spettrofotometrici (TPC, ABTS e DPPH) per la valutazione del contenuto di polifenoli del cioccolato a differenti percentuali di cacao. Dai risultati ottenuti si è evidenziato che il contenuto totale di polifenoli non varia molto tra i campioni di cioccolato fondente convenzionale (1.200 gGAE/100g prodotto) e FairTrade (1.181 gGAE/100g prodotto). Mentre quanto riguarda l'attività antiradicalica dei campioni di cioccolato i risultati hanno evidenziato una differenza tra i saggi ABTS e DPPH. L'attività di scavenging maggiore è stata evidenziata verso il radicale ABTS sia per i campioni convenzionali (76.75-95.11%) e FairTrade (80.54-95.11%). Mentre il saggio DPPH ha evidenziato una maggiore % di inibizione a più alte percentuali di cacao. Dai risultati ottenuti per i campioni di cioccolato si può evincere che i composti bioattivi esaminati potrebbero essere considerati come possibili parametri discriminatori tra il cioccolato convenzionale e del commercio equo e solidale. Questi risultati sono stati confermati dall'analisi multivariata (PCA), che ha evidenziato che le BAs possono rappresentare una classe di composti discriminanti tra le diverse classi di prodotti. Inoltre, è stata valutata la capacità di estrazione dei polifenoli da campioni di cioccolato mediante l'uso di solventi green (Deep Eutectic Solvent) a confronto con le tecniche di estrazione convenzionale, come MeOH, H<sub>2</sub>O e soluzione di MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40, v/v), in termini di TPC, TFC e attività antiossidante (saggio ABTS e DPPH). I risultati ottenuti hanno evidenziato che le coppie DES studiate presentano un maggiore resa di estrazione del contenuto totale di polifenoli e di flavonoidi rispetto alle tecniche convenzionali. In particolar modo le coppie DES con la migliore resa per il TPC sono risultate Bet/Teg al 20% e al 30% di idratazione, mentre per il TFC sono state ottenute con le coppie Bet/Teg al 10% e al 20% di idratazione. Per quanto riguarda i saggi antiossidanti le coppie che hanno mostrato una maggiore capacità di scavenging verso il

radicale ABTS sono i DES idratati al 30%. Mentre, per il saggio DPPH le coppie che hanno mostrato una maggiore inibizione del radicale sono i DES con ottenuti con la Clorin Clorina. Inoltre, è stato valutato l'impatto ambientale dell'applicazione delle tecniche green per l'estrazione dei polifenoli da campioni di cioccolato mediante la metodologia del Life Cycle Assessment (LCA). Questa metodologia consente di quantificare gli impatti ambientali in relazione all'uso di energia e materie prime (input) e della produzione di rifiuti ed emissioni in aria, acqua e suolo (output) al fine valutare la sostenibilità di un prodotto, processo o servizio. Nello studio le tecniche di estrazione con i solventi green al 30% di idratazione sono state confrontate con la tecnica di estrazione convenzionale in MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40, v/v). Dai risultati ottenuti si è evidenziato che l'estrazione con i solventi eutettici profondi (DES) hanno un ridotto impatto ambientale per tutte le 18 categorie d'impatto analizzate (ReCiPe 2016 Midpoint). Questo a conferma che l'uso dei DES come solventi di estrazione dei polifenoli dal cioccolato, può essere una valida alternativa ai solventi convenzionali non solo in termini di resa di estrazione ma anche di sostenibilità ambientale.

Lo studio ha inoltre preso in esame l'influenza sull'estrazione dei polifenoli, in matrici di tè verde e nero, di diversi tipi di acqua (di rubinetto, distillata e minerale naturale) con diversa durezza, diversi tempi di infusione (3, 5, 10 minuti) e temperature (80 °C e 100 °C). Le variabili ottimali per l'infusione sono state ottenute a T = 100 °C per 10 minuti, sia per i campioni di tè verde (916.12-1169.81 mg GAE/g) che di tè nero (932.03-1126.62 mg GAE/g) in acqua minerale naturale. Pertanto, le variabili ottimali di infusione (tempo, temperatura e tipi di acqua) potrebbero essere considerate per la preparazione di tè domestici e industriali, per ottenere infusi con un più alto contenuto di polifenoli e ottenere un maggior beneficio per la salute. Inoltre, dai dati ottenuti dalle analisi del contenuto di polifenoli e dei saggi antiossidanti è stata effettuata un'analisi esplorativa mediante Principal Component Analysis (PCA) che consentito di differenziare i tè neri dai tè verdi sulla base del contenuto di polifenoli totali e della loro attività antiradicalica.

Lo studio ha inoltre preso in considerazione l'analisi del caffè macinato e dei rispettivi infusi ottenuti con differenti tecniche di estrazione (macchina per espresso professionale, macchina per espresso in cialde, macchina per espresso in capsule e la moka). Sui campioni è stato valutato il contenuto di otto ammine biogene, il contenuto totale di polifenoli e flavonoidi e l'attività antiradicalica (saggio DPPH e ABTS). Dai risultati ottenuti si è evidenziato che i caffè macinati presentano un più alto contenuto di ammine biogene (67.01-96.83 µg/g di caffè in polvere) rispetto agli infusi ottenuti con il medesimo caffè macinato (16.02-53.92 µg/g di caffè in polvere). La serotonina è l'ammina maggiormente presente sia nei campioni

di caffè macinato (62.13-84.24  $\mu\text{g/g}$  di caffè in polvere) sia nei campioni di caffè infuso (12.75-33.46  $\mu\text{g/g}$  di caffè in polvere). Le altre ammine che sono state ritrovate nei campioni di caffè macinati e nei rispettivi infusi a differenti concentrazioni sono la  $\beta$ -Pea, l'Put, l'His, la Spd e Spm. Il contenuto di ammine biogene ritrovato nei campioni di caffè non rappresenta un rischio per la salute del consumatore. Inoltre, sui campioni di caffè macinato e infuso sono stati effettuati i saggi spettrofotometrici (TPC, TFC, ABTS e DPPH). Si è evidenziato che il contenuto totale di polifenoli era maggiore nei caffè macinati (22.96-29.61 mg GAE/g caffè macinato) e si riduceva tra l'80 e il 90%, a seconda del campione considerato, nei caffè infusi. La stessa tendenza è stata riscontrata per il saggio TFC; infatti, i campioni macinati presentano un contenuto di flavonoidi circa 15 volte superiore a quello presente nei campioni di caffè infuso. Per quanto riguarda l'attività di scavenging dei campioni di caffè è risultata una differenza tra il saggio ABTS e DPPH. Infatti, l'ABTS presentava valori superiori al 96% sia per i campioni di caffè macinato sia per i campioni di caffè infuso; mentre l'inibizione del radicale DPPH variava tra i campioni di caffè macinato (48.76-64.82 %) e i rispettivi infusi (7.84-27.42 %). I risultati hanno evidenziato che i processi di estrazione riducono tutti sia il contenuto di ammine biogene nella bevanda, ma anche il contenuto totale di polifenoli e di flavonoidi. Inoltre, mediante l'analisi multivariata si è potuto evidenziare che le variabili prese in esame consentono di raggruppare i campioni in caffè macinati e caffè infusi.

## BIBLIO.GRAFIA

- [1] M. C. Renard, “Fair trade: Quality, market and conventions,” *J. Rural Stud.*, 2003, doi: 10.1016/S0743-0167(02)00051-7.
- [2] D. Durevall, “Fairtrade and Market Efficiency: Fairtrade-Labeled Coffee in the Swedish Coffee Market”, doi: 10.3390/economies8020030.
- [3] Y. Wang *et al.*, “Impact of Six Typical Processing Methods on the Chemical Composition of Tea Leaves Using a Single *Camellia sinensis* Cultivar, Longjing 43,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 67, no. 19, pp. 5423–5436, May 2019, doi: 10.1021/acs.jafc.8b05140.
- [4] M. D. Murugan, L. H. Tee, and K. S. Oh, “Evaluation of the environment impact of extraction of bioactive compounds from *Darcydodes rostrata* using Deep Eutectic Solvent (DES) using Life Cycle Assessment (LCA),” in *Journal of Physics: Conference Series*, Dec. 2021, vol. 2120, no. 1. doi: 10.1088/1742-6596/2120/1/012005.
- [5] M. H. Silla Santos, “Biogenic amines: Their importance in foods,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 29, no. 2–3, pp. 213–231, 1996, doi: 10.1016/0168-1605(95)00032-1.
- [6] M. Á. Medina, J. L. Urdiales, C. Rodríguez-Caso, F. J. Ramírez, and F. Sánchez-Jiménez, “Biogenic amines and polyamines: Similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications,” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2003. doi: 10.1080/713609209.
- [7] A. R. Shalaby, “Significance of biogenic amines to food safety and human health,” *Food Res. Int.*, 1996, doi: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X.
- [8] D. M. Linares *et al.*, “Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products,” *Frontiers in Microbiology*. 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00180.
- [9] Commission Regulation, “Commission Regulation (EU) No 1019/2013, of 23 October 2013, amending Annex I to Regulation (EC) No 2073/2005 as regards histamine in fishery products,” 2013.



- [10] I. Al Bulushi, S. Poole, H. C. Deeth, and G. A. Dykes, “Biogenic amines in fish: Roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation-A review,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2009, doi: 10.1080/10408390802067514.
- [11] S. Milewski, K. Zbek, Z. Antoszkiewicz, Z. Tański, and A. Sobczak, “Impact of production season on the chemical composition and health properties of goat milk and rennet cheese,” *Emirates J. Food Agric.*, vol. 30, no. 2, pp. 107–114, 2018, doi: 10.9755/ejfa.2018.v30.i2.1602.
- [12] L. Pastrana *et al.*, “Functional Foods,” in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry*, 2017. doi: 10.1016/B978-0-444-63666-9.00007-8.
- [13] Philip C. Calder, “Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health,” *J. Parenter. Enter. Nutr.*, vol. 39, no. 1, pp. 18S-32S, 2015, doi: 10.1177/0148607115595980.
- [14] J. E. O’Connell and P. F. Fox, “Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: A review,” *International Dairy Journal*. 2001. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00033-4.
- [15] M. Reshi, “Chocolate Processing,” *Ijabr*, 2019.
- [16] M. Da Silva Pinto, “Tea: A new perspective on health benefits,” *Food Res. Int.*, vol. 53, no. 2, pp. 558–567, 2013, doi: 10.1016/j.foodres.2013.01.038.
- [17] K. Howell *et al.*, “The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review,” *Front. Nutr. | www.frontiersin.org*, vol. 1, p. 87, 2018, doi: 10.3389/fnut.2018.00087.
- [18] K. B. P. and S. Ibrahim Rizvi, “Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2, no. 5, pp. 270–278, 2009, [Online]. Available: [www.landesbioscience.com/journals/oximed/article/9498](http://www.landesbioscience.com/journals/oximed/article/9498)
- [19] ISO 14044:2006, “ISO 14044:2006 - Environmental management — Life cycle assessment — Requirements and guidelines,” *Environmental management — Life cycle assessment — Requirements and Guidelines*, vol. Geneva. p. ISO, 2006.
- [20] B. Notarnicola, S. Sala, A. Anton, S. J. McLaren, E. Saouter, and U. Sonesson, “The role of life cycle assessment in supporting sustainable agri-food systems: A review of

- the challenges,” *J. Clean. Prod.*, vol. 140, pp. 399–409, 2017, doi: 10.1016/j.jclepro.2016.06.071.
- [21] Fairtrade Foundation, “Fairtrade-Annual-Report-and-Financial-Statements-2020,” 2020.
- [22] Equo Garantito, “Carta Italiana dei Criteri del Commercio Equo e Solidale,” pp. 4–7, 2012.
- [23] F. Italia, “Fairtrade: uno strumento per raggiungere gli obiettivi di sviluppo sostenibile delle nazioni unite,” 2014.
- [24] A. C. Ribeiro-Duthie, F. Gale, and H. Murphy-Gregory, “Fair trade and staple foods: A systematic review,” *J. Clean. Prod.*, vol. 279, p. 123586, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.JCLEPRO.2020.123586.
- [25] Stefano Chirico, “Cooperative sociali e commercio equo e solidale: i confini dell’attività,” *Coop. Consorzi*, vol. 10, 2007.
- [26] N. G. Marconi, N. H. Hooker, and N. DiMarcello, “What’s in a Name? The Impact of Fair Trade Claims on Product Price,” *Agribusiness*, 2017, doi: 10.1002/agr.21486.
- [27] W. F. Organization, “FairTrade Annual Report 2017,” 2017.
- [28] R. Dragusanu, D. Giovannucci, and N. Nunn, “The economics of fair trade,” *J. Econ. Perspect.*, 2014, doi: 10.1257/jep.28.3.217.
- [29] A. Le Mare, “The Impact of Fair Trade on Social and Economic Development: A Review of the Literature,” *Geogr. Compass*, vol. 2, no. 6, pp. 1922–1942, 2008, doi: 10.1111/j.1749-8198.2008.00171.x.
- [30] F. International, “Monitoring the scope and benefits of FairTrade - Monitoring Report 12th edition,” 2021. [Online]. Available: [www.fairtrade.net](http://www.fairtrade.net)
- [31] M. Del Prete and A. Samoggia, “Chocolate Consumption and Purchasing Behaviour Review: Research Issues and Insights for Future Research,” *sustainability*, vol. 12, p. 5586, 2020, doi: 10.3390/su12145586.
- [32] T. E. Burdick *et al.*, “Effect of weather on Cocoa production,” *Prehosp. Disaster Med.*, 2014, doi: 10.1016/j.jemermed.2008.08.028.
- [33] FAO, “FAOSTAT, Food and Agriculture data.” 2022.

- [34] S. Trestini and F. Carlotta, “Il mercato del cacao e la produzione di cioccolato: le prospettive commerciali e gli aspetti normativi,” 2014.
- [35] F. M. Santucci, “Economia e mercato del cacao e cioccolata,” in *Atti dei Georgofili*, 2018, pp. 263–282.
- [36] ICCO, “Cocoa Market report - February 2022,” 2022.
- [37] A. Hicks, “Current status and future development of global tea production and tea products,” *Au J*, 2009.
- [38] C. L. Vivek Voora, Steffany Bermúdez, “Global Market Report: Tea,” 2019.
- [39] K. Karwowska, M. Skotnicka, and M. Śmiechowska, “Tea Production and its Forecasts, and the Possibility of Tea Cultivation in the Context of Environmental Requirements in China,” *Sci. J. Warasw Univ. Life Sci. - SGGW*, vol. 19, no. 1, pp. 180–191, 2019, doi: 10.22630/prs.2019.19.1.17.
- [40] F. Bastian *et al.*, “From Plantation to Cup: Changes in Bioactive Compounds during Coffee Processing,” vol. 10, pp. 2827–2854, 2021, doi: 10.3390/foods10112827.
- [41] S. I. Mussatto, E. M. S. Machado, S. Martins, and J. A. Teixeira, “Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues,” *Food and Bioprocess Technology*. 2011. doi: 10.1007/s11947-011-0565-z.
- [42] I. coffee Organization, “Coffee Market report - April 2022,” 2022.
- [43] D. Restuccia, M. R. Loizzo, and U. G. Spizzirri, “Quality and safety issues related with the presence of biogenic amines in coffee, tea, and cocoa-based beverages,” in *Caffeinated and Cocoa Based Beverages: Volume 8. The Science of Beverages*, Elsevier, 2019, pp. 47–88. doi: 10.1016/B978-0-12-815864-7.00002-7.
- [44] R. R. Watson, V. R. Preedy, and S. Zibadi, *Chocolate in health and nutrition*. 2013. doi: 10.1007/978-1-61779-803-0.
- [45] J. O. Lawal and B. Omonona, “The effects of rainfall and other weather parameters on cocoa production in Nigeria,” *Comun. Sci.*, vol. 5, pp. 518–523, Dec. 2014.
- [46] M. Perez, A. Lopez-Yerena, and A. Vallverdú-Queralt, “Traceability, authenticity and sustainability of cocoa and chocolate products: a challenge for the chocolate industry,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 62, no. 2. Taylor and

- Francis Ltd., pp. 475–489, 2021. doi: 10.1080/10408398.2020.1819769.
- [47] E. O. Afoakwa, *Chocolate Science and Technology*. 2010. doi: 10.1002/9781444319880.
- [48] B. de N. do Carmo Brito, R. Campos Chisté, R. da Silva Pena, M. B. Abreu Gloria, and A. Santos Lopes, “Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation,” *Food Chem.*, vol. 228, pp. 484–490, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.004>.
- [49] G. M. Mustiga *et al.*, “Identification of Climate and Genetic Factors That Control Fat Content and Fatty Acid Composition of Theobroma cacao L. Beans,” *Front. Plant Sci.*, vol. 10, no. October, pp. 1–20, 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.01159.
- [50] V. Bariši *et al.*, “molecules The Chemistry behind Chocolate Production,” 2019, doi: 10.3390/molecules24173163.
- [51] S. Simoes, E. Lelaj, and D. Rousseau, “The presence of crystalline sugar limits the influence of emulsifiers on cocoa butter crystallization,” *Food Chem.*, vol. 346, no. December 2020, 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128848.
- [52] A. Di Castelnuovo, R. Di Giuseppe, L. Iacoviello, and G. De Gaetano, “Consumption of cocoa, tea and coffee and risk of cardiovascular disease,” *European Journal of Internal Medicine*. 2012. doi: 10.1016/j.ejim.2011.07.014.
- [53] F. Ramos-Escudero *et al.*, “Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.),” *LWT*, vol. 147, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.111629.
- [54] M. Oliva-Cruz, P. L. Mori-Culqui, A. C. Caetano, M. Goñas, N. C. Vilca-Valqui, and S. G. Chavez, “Total Fat Content and Fatty Acid Profile of Fine-Aroma Cocoa From Northeastern Peru,” *Front. Nutr.*, vol. 8, no. July, pp. 1–9, 2021, doi: 10.3389/fnut.2021.677000.
- [55] D. 2000/36/CE, “DIRETTIVA 2000/36/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 23 giugno 2000 relativa ai prodotti di cacao e di cioccolato destinati all'alimentazione umana”.
- [56] USDA, “USDA (U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE), FoodData Central. (2022) <https://fdc.nal.usda.gov/>,” 2022.

- [57] H. M. Rawel, G. Huschek, S. T. Sagu, and T. Homann, "Cocoa Bean Proteins-Characterization, Changes and Modifications due to Ripening and Post-Harvest Processing," 2019, doi: 10.3390/nu11020428.
- [58] A. Bertazzo, S. Comai, I. Brunato, M. Zancato, and C. V. L. Costa, "The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in Theobroma cacao beans," *Food Chem.*, vol. 124, no. 1, pp. 93–96, 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.05.110.
- [59] R. J. Redgwell, V. Trovato, and D. Curti, "Cocoa bean carbohydrates: Roasting-induced changes and polymer interactions," *Food Chem.*, vol. 80, no. 4, pp. 511–516, 2003, doi: 10.1016/S0308-8146(02)00320-5.
- [60] E. Ohene Afoakwa, J. Quao, J. Takrama, A. Simpson Budu, and F. Kwesi Saalia, "Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation," p. 2011, doi: 10.1007/s13197-011-0446-5.
- [61] S. T. Beckett, *INDUSTRIAL CHOCOLATE MANUFACTURE AND USE Fourth Edition*. 2009. [Online]. Available: [www.wiley.com/wiley-blackwell](http://www.wiley.com/wiley-blackwell).
- [62] L. Calderón-Garcidueñas *et al.*, "Flavonol-rich dark cocoa significantly decreases plasma endothelin-1 and improves cognition in urban children," 2013, doi: 10.3389/fphar.2013.00104.
- [63] P. Kalač, "Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005-mid 2013," *Food Chem.*, vol. 161, pp. 27–39, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.102.
- [64] M. Schirone, P. Visciano, R. Tofalo, and G. Suzzi, "Histamine food poisoning," in *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2017. doi: 10.1007/164\_2016\_54.
- [65] T. Lavizzari, M. Teresa Veciana-Nogués, S. Bover-Cid, A. Mariné-Font, and M. Carmen Vidal-Carou, "Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1129, no. 1, pp. 67–72, 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.06.090.
- [66] P. Pastore, G. Favaro, D. Badocco, A. Tapparò, S. Cavalli, and G. Saccani,

- “Determination of biogenic amines in chocolate by ion chromatographic separation and pulsed integrated amperometric detection with implemented wave-form at Au disposable electrode,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1098, no. 1–2, pp. 111–115, 2005, doi: 10.1016/j.chroma.2005.08.065.
- [67] R. Indiarso, E. Subroto, N. Sukri, and M. Djali, “Cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans processing technology: A review of flavonoid changes,” *Asian Journal of Plant Sciences*, vol. 20, no. 4. Asian Network for Scientific Information, pp. 684–693, 2021. doi: 10.3923/ajps.2021.684.693.
- [68] L. Godočíková *et al.*, “Antioxidant activities and volatile flavor components of selected single-origin and blend chocolates,” *Molecules*, vol. 25, no. 16, Aug. 2020, doi: 10.3390/molecules25163648.
- [69] E. O. Pierre, N. Nicolas, F. ois D. Pierre, L. O. Martine, and O. N. Denis, “Heritability of polyphenols, anthocyanins and antioxidant capacity of Cameroonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans,” *African J. Biotechnol.*, vol. 14, no. 36, pp. 2672–2682, Sep. 2015, doi: 10.5897/ajb2015.14715.
- [70] B. Urbańska, D. Derewiaka, A. Lenart, and J. Kowalska, “Changes in the composition and content of polyphenols in chocolate resulting from pre-treatment method of cocoa beans and technological process,” *European Food Research and Technology*, vol. 245, no. 10. Springer Verlag, pp. 2101–2112, Oct. 01, 2019. doi: 10.1007/s00217-019-03333-w.
- [71] A. C. Aprotosoie, S. V. Luca, and A. Miron, “Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview,” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 15, pp. 73–91, 2016, doi: 10.1111/1541-4337.12180.
- [72] J. Wollgast and E. Anklam, “Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification,” *Food Res. Int.*, vol. 33, no. 6, pp. 423–447, 2000, doi: 10.1016/S0963-9969(00)00068-5.
- [73] B. Urbá and J. Kowalska, “Comparison of the Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Chocolate Obtained from Roasted and Unroasted Cocoa Beans from Different Regions of the World”, doi: 10.3390/antiox8080283.
- [74] H. Cheng, K. Wei, and L. Wang, “The Impact of Variety, Environment and

- Agricultural Practices on Catechins and Caffeine in Plucked Tea Leaves,” *Process. Impact Act. Components Food*, vol. 4, no. December, pp. 597–603, 2015, doi: 10.1016/B978-0-12-404699-3.00072-X.
- [75] A. Mohammed and E. Anany, “Nutritional composition, antinutritional factors, bioactive compounds and antioxidant activity of guava seeds (*Psidium Myrtaceae*) as affected by roasting processes,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 4, pp. 2175–2183, 2015, doi: 10.1007/s13197-013-1242-1.
- [76] L. Macdougall, S. Taheri, and P. Crofton, “Biochemical risk factors for stone formation in a Scottish paediatric hospital population,” *Ann Clin Biochem*, vol. 47, pp. 125–130, 2010, doi: 10.1258/acb.2009.009146.
- [77] C.-C. Huang, Y.-T. Tung, W.-C. Huang, Y.-M. Chen, Y.-J. Hsu, and M.-C. Hsu, “Beneficial effects of cocoa, coffee, green tea, and garcinia complex supplement on diet induced obesity in rats,” 2016, doi: 10.1186/s12906-016-1077-1.
- [78] A. A. Nagoor Gunny, T. W. Xiang, and M. H. Che Mat, “Deep Eutectic Solvent for extraction of natural antioxidant from a medicinal plant, *Coleus aromaticus*,” in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Dec. 2020, vol. 932, no. 1. doi: 10.1088/1757-899X/932/1/012033.
- [79] J. Oracz and E. Nebesny, “Influence of roasting conditions on the biogenic amine content in cocoa beans of different *Theobroma cacao* cultivars,” *Food Res. Int.*, 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2013.10.032.
- [80] C. in diet and Health, *Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk*. 1989.
- [81] D. Gonçalves Bortolini, C. Windson Isidoro Haminiuk, A. Cristina Pedro, I. de Andrade Arruda Fernandes, and G. Maria Maciel, “Processing, chemical signature and food industry applications of *Camellia sinensis* teas: An overview,” *Food Chem. X*, vol. 12, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.fochx.2021.100160.
- [82] Y. Wang *et al.*, “Fermentation process enhanced production and bioactivities of oolong tea polysaccharides,” *Food Res. Int.*, vol. 46, no. 1, pp. 158–166, 2012, doi: 10.1016/j.foodres.2011.11.027.
- [83] Z. Chen, Z. Wang, H. Yuan, and N. He, “From Tea Leaves to Factories: A Review of

- Research Progress in L-Theanine Biosynthesis and Production,” *Cite This J. Agric. Food Chem*, vol. 69, pp. 1187–1196, 2021, doi: 10.1021/acs.jafc.0c06694.
- [84] Z. Chen, Z. Wang, H. Yuan, and N. He, “From Tea Leaves to Factories: A Review of Research Progress in L-Theanine Biosynthesis and Production,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 69, no. 4. American Chemical Society, pp. 1187–1196, Feb. 03, 2021. doi: 10.1021/acs.jafc.0c06694.
- [85] K. Wang, E. G. R. Davies, and J. Liu, “Integrated water resources management and modeling: A case study of Bow river basin, Canada,” *J. Clean. Prod.*, vol. 240, p. 118242, 2019, doi: 10.1016/j.jclepro.2019.118242.
- [86] Y. Wang *et al.*, “Impact of Six Typical Processing Methods on the Chemical Composition of Tea Leaves Using a Single *Camellia sinensis* Cultivar, Longjing 43,” 2018, doi: 10.1021/acs.jafc.8b05140.
- [87] J. Xu, M. Wang, J. Zhao, Y. Wang, Q. Tang, and I. A. Khan, “Yellow tea (*Camellia sinensis* L.), a promising Chinese tea: Processing, chemical constituents and health benefits,” *Food Res. Int.*, vol. 107, no. September 2017, pp. 567–577, 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2018.01.063.
- [88] J. Xu, M. Wang, J. Zhao, Y. H. Wang, Q. Tang, and I. A. Khan, “Yellow tea (*Camellia sinensis* L.), a promising Chinese tea: Processing, chemical constituents and health benefits,” *Food Research International*, vol. 107. Elsevier Ltd, pp. 567–577, May 01, 2018. doi: 10.1016/j.foodres.2018.01.063.
- [89] T. Sharmilan, I. Premarathne, I. Wanniarachchi, S. Kumari, and D. Wanniarachchi, “Review Article Electronic Nose Technologies in Monitoring Black Tea Manufacturing Process,” 2020, doi: 10.1155/2020/3073104.
- [90] C. Cabrera, R. Artacho, and R. Giménez, “Beneficial Effects of Green Tea—A Review,” *J. Am. Coll. Nutr.*, 2006, doi: 10.1080/07315724.2006.10719518.
- [91] H. Guo *et al.*, “Structural characteristics of crude polysaccharides from 12 selected chinese teas, and their antioxidant and anti-diabetic activities,” *Antioxidants*, vol. 10, no. 10, Oct. 2021, doi: 10.3390/antiox10101562.
- [92] T. Yi *et al.*, “Comparison of ten major constituents in seven types of processed tea using HPLC-DAD-MS followed by principal component and hierarchical cluster



- analysis,” *Lwt*, vol. 62, no. 1, pp. 194–201, 2015, doi: 10.1016/j.lwt.2015.01.003.
- [93] E. Sheibani, S. E. Duncan, D. D. Kuhn, A. M. Dietrich, J. J. Newkirk, and S. F. O’Keefe, “Changes in flavor volatile composition of oolong tea after panning during tea processing,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 4, no. 3, pp. 456–468, May 2016, doi: 10.1002/fsn3.307.
- [94] Q. Zhang *et al.*, “Characterization of three different classes of non-fermented teas using untargeted metabolomics,” *Food Res. Int.*, vol. 121, pp. 697–704, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.foodres.2018.12.042.
- [95] X. Guo, C. T. Ho, W. Schwab, and X. Wan, “Effect of the roasting degree on flavor quality of large-leaf yellow tea,” *Food Chem.*, vol. 347, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129016.
- [96] H. peng Lv, Y. jun Zhang, Z. Lin, and Y. rong Liang, “Processing and chemical constituents of Pu-erh tea: A review,” *Food Res. Int.*, vol. 53, no. 2, pp. 608–618, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.foodres.2013.02.043.
- [97] N. Y. Shen, S. Y. Zheng, and X. Q. Wang, “Determination of Biogenic Amines in Pu-erh Tea with Precolumn Derivatization by High-Performance Liquid Chromatography,” *Food Anal. Methods*, vol. 10, no. 6, pp. 1690–1698, 2017, doi: 10.1007/s12161-016-0724-y.
- [98] G. Donadini and M. D. Fumi, “An investigation on the appropriateness of chocolate to match tea and coffee,” *Food Res. Int.*, 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2014.05.038.
- [99] M. Jeszka-Skowron, M. Krawczyk, and A. Zgoła-Grześkowiak, “Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 40, pp. 70–77, 2015, doi: 10.1016/j.jfca.2014.12.015.
- [100] A. Pękal, M. Biesaga, and K. Pyrzynska, “Trace metals and flavonoids in different types of tea,” *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 22, no. 4, pp. 925–930, 2013, doi: 10.1007/s10068-013-0165-y.
- [101] K. C. (Ken C. . Willson and M. N. (Michael N. . Clifford, *Tea : cultivation to consumption*. Chapman & Hall, 1992.
- [102] D. Chen, G. Chen, Y. Sun, X. Zeng, and H. Ye, “Physiological genetics, chemical

- composition, health benefits and toxicology of tea (*Camellia sinensis* L.) flower: A review,” *Food Res. Int.*, vol. 137, no. July, p. 109584, 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109584.
- [103] G. Zaguła, B. Saletnik, and C. Puchalski, “STUDY OF NUTRITIONAL VALUE OF DRIED TEA LEAVES AND INFUSIONS OF BLACK, GREEN AND WHITE TEAS FROM CHINESE PLANTATIONS,” *Rocz. Państwowego Zakładu Hig.*, vol. 68, no. 3, pp. 237–245, 2017, [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/319682455>
- [104] M. Reto, M. Eduardo Figueira, H. Mota Filipe, and C. M. M Almeida, “Chemical Composition of Green Tea (*Camellia sinensis*) Infusions Commercialized in Portugal,” 2007, doi: 10.1007/s11130-007-0054-8.
- [105] G. Vinci, F. D’ascenzo, L. Maddaloni, S. A. Prencipe, and M. Tiradritti, “The Influence of Green and Black Tea Infusion Parameters on Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays,” *Beverages*, vol. 8, no. 2, pp. 1–13, 2022, doi: 10.3390/beverages8020018.
- [106] Y. Wang, D. Sun, H. Chen, L. Qian, and P. Xu, “Fatty acid composition and antioxidant activity of tea (*Camellia sinensis* L.) seed oil extracted by optimized supercritical carbon dioxide,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 11, pp. 7708–7719, 2011, doi: 10.3390/ijms12117708.
- [107] S. Ercisli, E. Orhan, O. Ozdemir, M. Sengul, and N. Gungor, “Seasonal variation of total phenolic, antioxidant activity, plant nutritional elements, and fatty acids in tea leaves (*Camellia sinensis* var. *sinensis* clone Derepazari 7) grown in Turkey,” *Pharm. Biol.*, vol. 46, no. 10–11, pp. 683–687, 2008, doi: 10.1080/13880200802215818.
- [108] L. Zhang, C. T. Ho, J. Zhou, J. S. Santos, L. Armstrong, and D. Granato, “Chemistry and Biological Activities of Processed *Camellia sinensis* Teas: A Comprehensive Review,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 18, no. 5, pp. 1474–1495, 2019, doi: 10.1111/1541-4337.12479.
- [109] J. P. Ele-Ekouna, C. Pau-Roblot, B. Courtois, and J. Courtois, “Chemical characterization of pectin from green tea (*Camellia sinensis*),” *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 3, pp. 1232–1239, 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.09.028.
- [110] M. Adnan, A. Ahmad, A. Ahmed, N. Khalid, I. Hayat, and I. Ahmed, “Chemical

- composition and sensory evaluation of tea (*Camellia sinensis*) commercialized in Pakistan,” *Pakistan J. Bot.*, vol. 45, no. 3, pp. 901–907, 2013.
- [111] T. Karak *et al.*, “Micronutrients (B, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, and Zn) content in made tea (*Camellia sinensis* L.) and tea infusion with health prospect: A critical review,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 14, pp. 2996–3034, Sep. 2017, doi: 10.1080/10408398.2015.1083534.
- [112] M. B. Hicks, Y. H. P. Hsieh, and L. N. Bell, “Tea preparation and its influence on methylxanthine concentration,” *Food Res. Int.*, vol. 29, no. 3–4, pp. 325–330, Apr. 1996, doi: 10.1016/0963-9969(96)00038-5.
- [113] G. Vinci and L. Maddaloni, “Biogenic amines in alcohol-free beverages,” *Beverages*, vol. 6, no. 1, 2020, doi: 10.3390/beverages6010017.
- [114] M. D. McAlpine and W. E. Ward, “Influence of steep time on polyphenol content and antioxidant capacity of black, green, rooibos, and herbal teas,” *Beverages*, vol. 2, no. 3, 2016, doi: 10.3390/beverages2030017.
- [115] P. Liczbiński and B. Bukowska, “Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest in vitro investigations,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 175, 2022, doi: 10.1016/j.indcrop.2021.114265.
- [116] N. Lotfi Yagin, R. Mahdavi, and Z. Nikniaz, “Oxalate content of different drinkable dilutions of tea infusions after different brewing times,” *Heal. Promot. Perspect.*, vol. 2, no. 2, pp. 218–22, 2012, doi: 10.5681/hpp.2012.026.
- [117] S. I. Mussatto, E. M. S. Machado, S. Martins, and J. A. Teixeira, “Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues,” *Food and Bioprocess Technology*, vol. 4, no. 5, pp. 661–672, Jul. 2011. doi: 10.1007/s11947-011-0565-z.
- [118] R. J. Clarke and O. G. Vitzthum, *Coffee: Recent Developments*. 2008. doi: 10.1002/9780470690499.
- [119] M. Haile and W. H. Kang, *The Harvest and Post-Harvest Management Practices’ Impact on Coffee Quality in Coffee production and research*. 2019. [Online]. Available: [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
- [120] S. Deshpande, S. Singh, A. Panneerselvam, and V. D. Rajeswari, “Nutrients in

- caffeinated beverages-an overview,” in *Caffeinated and Cocoa Based Beverages: Volume 8. The Science of Beverages*, 2019. doi: 10.1016/B978-0-12-815864-7.00011-8.
- [121] Y. Pham, K. Reardon-Smith, S. Mushtaq, and G. Cockfield, “The impact of climate change and variability on coffee production: a systematic review,” *Clim. Chang.*, no. 156, pp. 609–630, 2019, doi: 10.1007/s10584-019-02538-y.
- [122] J. Avelino *et al.*, “Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota,” *J. Sci. Food Agric. J Sci Food Agric*, vol. 85, pp. 1869–1876, 2005, doi: 10.1002/jsfa.2188.
- [123] K. Król, M. Gantner, A. Tatarak, and E. Hallmann, “The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 246, no. 1, pp. 33–39, Jan. 2020, doi: 10.1007/s00217-019-03388-9.
- [124] H. Van Der Vossen *et al.*, “Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review,” *Euphytica*, vol. 204, pp. 243–256, 2015, doi: 10.1007/s10681-015-1398-z.
- [125] R. C. Alves, F. Rodrigues, M. Antónia Nunes, A. F. Vinha, and M. B. P. P. Oliveira, “State of the art in coffee processing by-products,” in *Handbook of Coffee Processing By-Products: Sustainable Applications*, Elsevier Inc., 2017, pp. 1–26. doi: 10.1016/B978-0-12-811290-8.00001-3.
- [126] L. T. Alexsandro, P. M. F. Herculano, B. Rita, and B. R. Rodrigo, “Yield, maturation, and beverage quality of arabica coffee progenies under selection in Rondonia state, Brazil,” *African J. Agric. Res.*, vol. 9, no. 38, pp. 2854–2861, 2014, doi: 10.5897/ajar2014.8969.
- [127] É. M. dos Santos *et al.*, “Coffee by-products in topical formulations: A review,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 111, no. March, pp. 280–291, 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.02.064.
- [128] S. S. Arya, R. Venkatram, P. R. More, and P. Vijayan, “The wastes of coffee bean processing for utilization in food: a review,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 59, no. 2, pp. 429–444, 2022, doi: 10.1007/s13197-021-05032-5.
- [129] M. Muzaiifa, D. Hasni, Febriani, A. Patria, and A. Abubakar, “Chemical composition

- of green and roasted coffee bean of Gayo arabica civet coffee (kopi luwak),” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 425, no. 1, 2020, doi: 10.1088/1755-1315/425/1/012001.
- [130] M. Haile and W. H. Kang, “The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality,” 2019, doi: 10.1155/2019/4836709.
- [131] N. Z. Rao, M. Fuller, and M. D. Grim, “Physiochemical characteristics of hot and cold brew coffee chemistry: The effects of roast level and brewing temperature on compound extraction,” *Foods*, vol. 9, no. 7, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3390/foods9070902.
- [132] N. C. Bicho, F. C. Lidon, J. C. Ramalho, and A. E. Leitão, “Quality assessment of Arabica and Robusta green and roasted coffees - A review,” *Emirates J. Food Agric.*, vol. 25, no. 12, pp. 945–950, 2013, doi: 10.9755/ejfa.v25i12.17290.
- [133] F. Wei and M. Tanokura, “Chemical Changes in the Components of Coffee Beans during Roasting,” in *Coffee in Health and Disease Prevention*, Elsevier Inc., 2015, pp. 83–91. doi: 10.1016/B978-0-12-409517-5.00010-3.
- [134] W. N. L. E. R. R. and H. T., “Effect of bean maturity and roasting temperature on chemical content of robusta coffee,” *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, no. 830, p. 022019, 2020, doi: 10.1088/1757-899X/830/2/022019.
- [135] R. K. Kipkorir, P. Muliro, and S. Muhoho, “Effects of coffee processing technologies on physico-chemical properties and sensory qualities of coffee,” *African J. Food Sci.*, vol. 9, no. 4, pp. 230–236, Apr. 2015, doi: 10.5897/ajfs2014.1221.
- [136] A. M. Covre, F. L. Partelli, R. Bonomo, and I. Gontijo, “Micronutrients in the fruits and leaves of irrigated and non-irrigated coffee plants,” *J. Plant Nutr.*, vol. 41, no. 9, pp. 1119–1129, 2018, doi: 10.1080/01904167.2018.1431665.
- [137] D. Dubberstein, F. L. Partelli, M. C. Espindula, and J. R. M. Dias, “Concentration and accumulation of micronutrients in robust coffee,” *Acta Sci. - Agron.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–8, 2019, doi: 10.4025/actasciagron.v41i1.42685.
- [138] A. A. Nuhu, “Bioactive Micronutrients in Coffee: Recent Analytical Approaches for Characterization and Quantification,” *ISRN Nutr.*, p. 384230, 2014, doi: 10.1155/2014/384230.

- [139] I. M. on the evaluation of carcinogenic risks to Human, *Coffee, Tea, Mate, Methylxantines and Methylglyoxal*, vol. 51. 1991.
- [140] D. Restuccia, U. G. Spizzirri, O. I. Parisi, G. Cirillo, and N. Picci, “Brewing effect on levels of biogenic amines in different coffee samples as determined by LC-UV,” *Food Chem.*, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.134.
- [141] S. Casal *et al.*, “Free and conjugated biogenic amines in green and roasted coffee beans,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 20, pp. 6188–6192, 2004, doi: 10.1021/jf049509u.
- [142] F. Haghghatdoost, R. Sadeghian, and · Behnood Abbasi, “The Associations Between Tea and Coffee Drinking and Risk of Calcium-Oxalate Renal Stones,” *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 76, pp. 516–522, 2021, doi: 10.1007/s11130-021-00933-4.
- [143] E. Gil-Martín, T. Forbes-Hernández, A. Romero, D. Cianciosi, F. Giampieri, and M. Battino, “Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products,” *Food Chem.*, vol. 378, 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131918.
- [144] S. Koral, B. Tufan, A. Ščavničar, D. Kočar, M. Ž. Pompe, and S. Köse, “Investigation of the contents of biogenic amines and some food safety parameters of various commercially salted fish products,” *Food Control*, 2013, doi: 10.1016/j.foodcont.2013.01.043.
- [145] D. Doeun, M. Davaatseren, and M. S. Chung, “Biogenic amines in foods,” *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 26, no. 6, pp. 1463–1474, 2017, doi: 10.1007/s10068-017-0239-3.
- [146] S. Bodmer, C. Imark, and M. Kneubühl, “Biogenic amines in foods: Histamine and food processing,” *Inflammation Research*. 1999. doi: 10.1007/s000110050463.
- [147] M. B. Gomes, B. A. D. Pires, S. A. P. Fracalanza, and V. A. Marin, “The risk of biogenic amines in food,” *Cienc. e Saude Coletiva*, 2014, doi: 10.1590/1413-81232014194.18672012.
- [148] J. M. Hungerford, “Scombroid poisoning: A review,” *Toxicon*, 2010, doi: 10.1016/j.toxicon.2010.02.006.
- [149] EFSA, “Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods,” *EFSA J.*, vol. 9, no. 10, p. 2393, 2011, doi:

10.2903/j.efsa.2011.2393.

- [150] G. Vinci, L. Maddaloni, S. A. Prencipe, and R. Ruggieri, “Natural contaminants in wines: Determination of biogenic amines by chromatographic techniques,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 18, no. 19, 2021, doi: 10.3390/ijerph181910159.
- [151] S. Ciano, L. Maddaloni, M. Rapa, and A. M. Tarola, “Organic hempseed oil from the retail market: chemical profiling and multivariate analysis for label information assessment,” *Br. Food J.*, 2022, doi: 10.1108/BFJ-08-2021-0924.
- [152] S. Nurulain, N. A. Aziz, M. S. Najib, M. R. Salim, and H. Manap, “A review of free fatty acid determination methods for palm cooking oil,” *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 1921, no. 1, 2021, doi: 10.1088/1742-6596/1921/1/012055.
- [153] W. Cheng, D. W. Sun, and J. H. Cheng, “Pork biogenic amine index (BAI) determination based on chemometric analysis of hyperspectral imaging data,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 73, pp. 13–19, 2016, doi: 10.1016/j.lwt.2016.05.031.
- [154] F. Özogul and Y. Özogul, “Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging,” *Food Chem.*, vol. 99, no. 3, pp. 574–578, 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.08.029.
- [155] C. Ruiz-Capillas and A. M. Herrero, “Impact of biogenic amines on food quality and safety,” *Foods*. 2019. doi: 10.3390/foods8020062.
- [156] U. G. Spizzirri, N. Picci, and D. Restuccia, “Extraction efficiency of different solvents and LC-UV determination of biogenic amines in tea leaves and infusions,” *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/8715287.
- [157] A. Önal, “A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods,” *Food Chemistry*. 2007. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.08.028.
- [158] C. Ruiz-Capillas, A. M. Herrero, and F. Jiménez-Colmenero, “Determination of biogenic amines,” in *Flow Injection Analysis of Food Additives*, 2015. doi: 10.1201/b19644.
- [159] E. Mazzucco, F. Gosetti, M. Bobba, E. Marengo, E. Robotti, and M. C. Gennaro, “High-performance liquid chromatography-ultraviolet detection method for the simultaneous determination of typical biogenic amines and precursor amino acids.

- applications in food chemistry,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 1, pp. 127–134, 2010, doi: 10.1021/jf9030053.
- [160] U. G. Spizzirri, N. Picci, and D. Restuccia, “Extraction efficiency of different solvents and LC-UV determination of biogenic amines in tea leaves and infusions,” *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/8715287.
- [161] G. L. La Torre, M. Saitta, A. Giorgia Potorti, G. Di Bella, and G. Dugo, “High performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for sensitive determination of bioactive amines in donkey milk,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 32, pp. 5215–5224, 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2010.06.022.
- [162] A. A. Tameem, B. Saad, A. Makahleh, A. Salhin, and M. I. Saleh, “A 4-hydroxy-N'-[(E)-(2-hydroxyphenyl)methylidene]benzohydrazide-based sorbent material for the extraction-HPLC determination of biogenic amines in food samples,” *Talanta*, vol. 82, no. 4, pp. 1385–1391, 2010, doi: 10.1016/j.talanta.2010.07.004.
- [163] G. Vinci and M. L. Antonelli, “Biogenic amines: Quality index of freshness in red and white meat,” *Food Control*, 2002, doi: 10.1016/S0956-7135(02)00031-2.
- [164] M. A. Munir and K. H. Badri, “The Importance of Derivatizing Reagent in Chromatography Applications for Biogenic Amine Detection in Food and Beverages,” *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2020. Hindawi Limited, 2020. doi: 10.1155/2020/5814389.
- [165] G. Duflos, G. Inglebert, C. Himber, S. Degremont, B. Lombard, and A. Brisabois, “Validation of standard method EN ISO 19343 for the detection and quantification of histamine in fish and fishery products using high-performance liquid chromatography,” *Int. J. Food Microbiol.*, 2019, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.023.
- [166] H. Park, W.-Y. Song, H. Cha, and T.-Y. Kim, “Development of an optimized sample preparation method for quantification of free fatty acids in food using liquid chromatography-mass spectrometry,” *Sci. Reports* /, vol. 11, p. 5947, 123AD, doi: 10.1038/s41598-021-85288-1.
- [167] S. S. A. Mahesar, S. T. H. Sherazi, Abdul Rauf Khaskheli, Aftab A. Kandhro, “Analytical Approaches for free fatty acids assessment in oils and fats,” *R. Soc.*



*Chem.*, pp. 23–73, 2016, [Online]. Available: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-02429-4\\_7](http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-02429-4_7)

- [168] N. Zheng *et al.*, “Optimization of extraction process and the antioxidant activity of phenolics from *sanghuangporus baumii*,” *Molecules*, vol. 26, no. 13, Jul. 2021, doi: 10.3390/molecules26133850.
- [169] A. Oreopoulou *et al.*, “Polyphenol extraction by different techniques for valorisation of non-compliant portuguese sweet cherries towards a novel antioxidant extract,” *Sustain.*, vol. 12, no. 14, pp. 243–259, 2020, doi: 10.3390/su12145556.
- [170] Q. Luo *et al.*, “Green extraction of antioxidant polyphenols from green tea (*Camellia sinensis*),” *Antioxidants*, vol. 9, no. 9, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/antiox9090785.
- [171] L. Maddaloni *et al.*, “An electrochemical sensor for monitoring biogenic amines in anchovies as quality and safety index,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 347, 2021, doi: 10.1016/j.snb.2021.130648.
- [172] L. Maddaloni *et al.*, “An electrochemical sensor for monitoring biogenic amines in anchovies as quality and safety index,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 347, p. 130648, Nov. 2021, doi: 10.1016/J.SNB.2021.130648.
- [173] F. Z. I. M. Hassani, S. Amzazi, and I. Lavandera, “The versatile applications of DES and their influence on oxidoreductase-mediated transformations,” *Molecules*, vol. 24, no. 11. MDPI AG, Jun. 11, 2019. doi: 10.3390/molecules24112190.
- [174] S. Trombino *et al.*, “Deep Eutectic Solvents for Improving the Solubilization and Delivery of Dapsone,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14020333.
- [175] K. Mulia, E. Krisanti, Nasruddin, and E. Libriandy, “Betaine-based deep eutectic solvents with diol, acid and amine hydrogen bond donors for carbon dioxide absorption,” in *Journal of Physics: Conference Series*, Nov. 2019, vol. 1295, no. 1. doi: 10.1088/1742-6596/1295/1/012039.
- [176] L. Benvenuti, A. A. F. Zielinski, and S. R. S. Ferreira, “Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES?,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 90, no. June, pp. 133–146, 2019, doi: 10.1016/j.tifs.2019.06.003.
- [177] H. Qin, X. Hu, J. Wang, H. Cheng, L. Chen, and Z. Qi, “Overview of acidic deep

- eutectic solvents on synthesis, properties and applications,” *Green Energy Environ.*, vol. 5, no. 1, pp. 8–21, 2020, doi: 10.1016/j.gee.2019.03.002.
- [178] B. Socas-Rodríguez, M. V. Torres-Cornejo, G. Álvarez-Rivera, and J. A. Mendiola, “Deep eutectic solvents for the extraction of bioactive compounds from natural sources and agricultural by-products,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 11, no. 11. MDPI AG, Jun. 01, 2021. doi: 10.3390/app11114897.
- [179] B. Pavlić *et al.*, “Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) Extraction Improves Polyphenol Yield and Antioxidant Activity of Wild Thyme (*Thymus serpyllum* L.) Extracts,” *Molecules*, vol. 27, no. 5, Mar. 2022, doi: 10.3390/molecules27051508.
- [180] L. Duan, L. L. Dou, L. Guo, P. Li, and E. H. Liu, “Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products,” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 4, no. 4, pp. 2405–2411, 2016, doi: 10.1021/acssuschemeng.6b00091.
- [181] M. Ivanović *et al.*, “Extraction of Bioactive Metabolites from *Achillea millefolium* L. with Choline Chloride Based Natural Deep Eutectic Solvents: A Study of the Antioxidant and Antimicrobial Activity,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.3390/antiox11040724.
- [182] S. P. Ijardar, V. Singh, and R. L. Gardas, “Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents,” *Molecules*, vol. 27, no. 4. MDPI, Feb. 01, 2022. doi: 10.3390/molecules27041368.
- [183] Y. Cui, C. Li, J. Yin, S. Li, Y. Jia, and M. Bao, “Design, synthesis and properties of acidic deep eutectic solvents based on choline chloride,” *J. Mol. Liq.*, vol. 236, pp. 338–343, 2017, doi: 10.1016/j.molliq.2017.04.052.
- [184] M. Ruesgas-Ramo, M. Cruz Figueroa-Espinoza, and E. Durand, “Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities,” 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.7b01054.
- [185] H. H. S. Abdel-Naeem, K. I. Sallam, and N. M. L. Malak, “Improvement of the microbial quality, antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents, and shelf life of smoked herring (*Clupea harengus*) during frozen storage by using chitosan edible coating,” *Food Control*, vol. 130, no. May, 2021, doi: 10.1016/j.foodcont.2021.108317.

- [186] L. Gobbi, S. Ciano, M. Rapa, and R. Ruggieri, “Biogenic Amines Determination in ‘Plant Milks,’” *Beverages*, 2019, doi: 10.3390/beverages5020040.
- [187] D. Restuccia, U. G. Spizzirri, M. De Luca, O. I. Parisi, and N. Picci, “Biogenic amines as quality marker in organic and fair-trade cocoa-based products,” *Sustain.*, 2016, doi: 10.3390/su8090856.
- [188] D. Restuccia, U. G. Spizzirri, F. Puoci, and N. Picci, “Determination of biogenic amine profiles in conventional and organic cocoa-based products,” *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, vol. 32, no. 7, pp. 1156–1163, 2015, doi: 10.1080/19440049.2015.1036322.
- [189] N. Cordoba, M. Fernandez-aldueña, F. L. Moreno, and Y. Ruiz, “Coffee extraction: A review of parameters and their influence on the physicochemical characteristics and flavour of coffee brews,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 96, pp. 45–60, 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2019.12.004.
- [190] D. Restuccia, U. G. Spizzirri, O. I. Parisi, G. Cirillo, and N. Picci, “Brewing effect on levels of biogenic amines in different coffee samples as determined by LC-UV,” *Food Chem.*, vol. 175, pp. 143–150, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.134.
- [191] Ö. Özdekan, “Evaluation of bioactive amine and mineral levels in Turkish coffee,” *Food Res. Int.*, vol. 61, pp. 167–175, 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2013.12.027.
- [192] E. Commission, “COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs,” *Off. J. Eur. Union*, 2005, doi: 10.1109/MACE.2010.5536537.
- [193] M. Torres-Moreno, E. Torrecasana, J. Salas-Salvadó, and C. Blanch, “Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions,” *Food Chem.*, vol. 166, pp. 125–132, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.141.
- [194] F. Ramos-Escudero *et al.*, “Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.),” *LWT*, vol. 147, p. 111629, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.LWT.2021.111629.
- [195] T. F. Soares, M. Beatriz, and P. P. Oliveira, “Cocoa By-Products: Characterization of Bioactive Compounds and Beneficial Health Effects,” *Molecules*, vol. 27, no. 1625,

2022, doi: 10.3390/molecules27051625.

- [196] M. Gil, D. Uribe, V. Gallego, C. Bedoya, and S. Arango-Varela, “Traceability of polyphenols in cocoa during the postharvest and industrialization processes and their biological antioxidant potential,” *Heliyon*, vol. 7, no. 8, p. e07738, 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07738.
- [197] C. Di Mattia, M. Martuscelli, G. Sacchetti, B. Beheydt, D. Mastrocola, and P. Pittia, “Effect of different conching processes on procyanidin content and antioxidant properties of chocolate,” *Food Res. Int.*, vol. 63, pp. 367–372, Sep. 2014, doi: 10.1016/J.FOODRES.2014.04.009.
- [198] N. N. Batista, D. P. de Andrade, C. L. Ramos, D. R. Dias, and R. F. Schwan, “Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR,” *Food Res. Int.*, vol. 90, pp. 313–319, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.FOODRES.2016.10.028.
- [199] J. M. Brčanovi *et al.*, “Cyclic Voltammetric Determination of Antioxidant Capacity of Cocoa Powder, Dark Chocolate and Milk Chocolate Samples: Correlation with Spectrophotometric Assays and Individual Phenolic Compounds”.
- [200] L. Percevault, E. Limanton, P. Nicolas, L. Paquin, and C. Lagrost, “Electrochemical Determination and Antioxidant Capacity Modulation of Polyphenols in Deep Eutectic Solvents,” 2020, doi: 10.1021/acssuschemeng.0c07023.
- [201] S. Chanioti and C. Tzia, “Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques,” *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 48, pp. 228–239, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.ifset.2018.07.001.
- [202] J. Z. Chu *et al.*, “Efficient extraction and antioxidant activity of polyphenols from *Antrodia cinnamomea*,” *BMC Biotechnol.*, vol. 22, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12896-022-00739-5.
- [203] I. Volf, I. Ignat, M. Neamtu, and V. I. Popa, “Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols,” *Chem. Pap.*, vol. 68, no. 1, pp. 121–129, 2014, doi: 10.2478/s11696-013-0417-6.
- [204] V. L. and N. A. Panzella L, Moccia F, Nasti R, Marzorati S, “Bioactive Phenolic Compounds From Agri-Food Wastes: An Update on Green and Sustainable

- Extraction Methodologies,” *Front. Nutr.*, vol. 7, pp. 1–24, 2020, doi: 10.3389/fnut.2020.00060.
- [205] O. Zannou, H. Pashazadeh, S. A. Ibrahim, I. Koca, and C. M. Galanakis, “Green and highly extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from kinkeliba (*Combretum micranthum* G. Don) by natural deep eutectic solvents (NADESs) using maceration, ultrasound-assisted extraction and homogenate-assisted extraction,” *Arab. J. Chem.*, vol. 15, no. 5, May 2022, doi: 10.1016/j.arabjc.2022.103752.
- [206] O. Zannou and I. Koca, “Greener extraction of anthocyanins and antioxidant activity from blackberry (*Rubus* spp) using natural deep eutectic solvents,” *LWT*, vol. 158, p. 113184, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.LWT.2022.113184.
- [207] C. Astill, M. R. Birch, C. Dacombe, P. G. Humphrey, and P. T. Martin, “Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 11, pp. 5340–5347, 2001, doi: 10.1021/jf010759+.
- [208] A. Das, A. Kalita, U. Raychaiudhuri, and R. Chakraborty, “Synergistic effect of herbal plant extract (*Hibiscus sabdariffa*) in maintain the antioxidant activity of decaffeinated green tea from various parts of Assam,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 56, no. 11, pp. 5009–5016, 2019, doi: 10.1007/s13197-019-03973-6.
- [209] A. Del Caro, G. Vinci, L. Maddaloni, S. Antonia Prencipe, and M. Tiradritti, “The Influence of Green and Black Tea Infusion Parameters on Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays,” 2022, doi: 10.3390/beverages.
- [210] B. Urbańska and J. Kowalska, “Comparison of the total polyphenol content and antioxidant activity of chocolate obtained from roasted and unroasted cocoa beans from different regions of the world,” *Antioxidants*, vol. 8, no. 8, 2019, doi: 10.3390/antiox8080283.
- [211] P. A. Kilmartin and C. F. Hsu, “Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry,” *Food Chem.*, vol. 82, no. 4, pp. 501–512, 2003, doi: 10.1016/S0308-8146(03)00066-9.
- [212] J. Wyrostek and R. Kowalski, “The effect of water mineralization on the extraction of active compounds from selected herbs and on the antioxidant properties of the obtained brews,” *Foods*, vol. 10, no. 6, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3390/foods10061227.

- [213] B. Zargar *et al.*, “Effect of different processing parameters on antioxidant activity of tea,” *Food Meas.*, vol. 12, pp. 527–534, 2018, doi: 10.1007/s11694-017-9664-5.
- [214] R. L. Prior, X. Wu, and K. Schaich, “Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 10, pp. 4290–4302, 2005, doi: 10.1021/jf0502698.
- [215] N. Caporaso, A. Genovese, M. D. Canela, A. Civitella, and R. Sacchi, “Neapolitan coffee brew chemical analysis in comparison to espresso , moka and American brews,” *FRIN*, vol. 61, pp. 152–160, 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2014.01.020.
- [216] N. Uslu, “The influence of decoction and infusion methods and times on antioxidant activity , caffeine content and phenolic compounds of coffee brews,” *Eur. Food Res. Technol.*, no. 0123456789, 2022, doi: 10.1007/s00217-022-04027-6.
- [217] A. Muzykiewicz-Szymá Nska *et al.*, “The Effect of Brewing Process Parameters on Antioxidant Activity and Caffeine Content in Infusions of Roasted and Unroasted Arabica Coffee Beans Originated from Different Countries,” *Molecules*, vol. 26, p. 3681, 2021, doi: 10.3390/molecules26123681.
- [218] P. Saling, “The BASF Eco- Efficiency Analysis,” pp. 12–18, 2016, [Online]. Available: <https://www.basf.com/global/en/who-we-are/sustainability/we-drive-sustainable-solutions/quantifying-sustainability/eco-efficiency-analysis.html>
- [219] S. Jung, S. Gu, S. H. Lee, and Y. Jeong, “Effect of roasting degree on the antioxidant properties of espresso and drip coffee extracted from coffea arabica cv. Java,” *Appl. Sci.*, vol. 11, no. 15, 2021, doi: 10.3390/app11157025.
- [220] A. Muzykiewicz-Szymá Nska *et al.*, “The Effect of Brewing Process Parameters on Antioxidant Activity and Caffeine Content in Infusions of Roasted and Unroasted Arabica Coffee Beans Originated from Different Countries,” *molecules*, vol. 26, p. 3681, 2021, doi: 10.3390/molecules26123681.
- [221] ISO, “14040: Environmental management–life cycle assessment—Principles and framework,” *Int. Organ. Stand.*, 2006.
- [222] G. W. Sonnemann, A. Solgaard, K. Saur, H. A. Udo de Haes, K. Christiansen, and A. A. Jensen, “Life cycle management: UNEP-workshop sharing experiences on LCM,” *Int. J. Life Cycle Assess.*, 2001, doi: 10.1007/BF02978862.

- [223] I. De Marco, S. Riemma, and R. Iannone, “Uncertainty of input parameters and sensitivity analysis in life cycle assessment: An Italian processed tomato product,” *J. Clean. Prod.*, vol. 177, pp. 315–325, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2017.12.258.
- [224] Y. S. Park, G. Egilmez, and M. Kucukvar, “A Novel Life Cycle-based Principal Component Analysis Framework for Eco-efficiency Analysis: Case of the United States Manufacturing and Transportation Nexus,” *J. Clean. Prod.*, vol. 92, pp. 327–342, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.jclepro.2014.12.057.
- [225] Q. Abbas and L. Binder, “Synthesis and Characterization of Choline Chloride Based Binary Mixtures,” *ECS Trans.*, vol. 33, no. 7, pp. 49–59, 2010, doi: 10.1149/1.3484761.
- [226] P. Vauchel *et al.*, “Comparative LCA of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from chicory grounds under different operational conditions,” *J. Clean. Prod.*, vol. 196, pp. 1116–1123, 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.06.042.

- [1] F. N. Tubiello *et al.*, “Pre- and post-production processes increasingly dominate greenhouse gas emissions from agri-food systems,” *earth Syst. Sci.*, vol. 14, pp. 1795–1809, 2022.
- [2] Fairtrade Foundation, “Fairtrade-Annual-Report-and-Financial-Statements-2020,” 2020.
- [3] Equo Garantito, “Carta Italiana dei Criteri del Commercio Equo e Solidale,” pp. 4–7, 2012.
- [4] F. Italia, “Fairtrade: uno strumento per raggiungere gli obiettivi di sviluppo sostenibile delle nazioni unite,” 2014.
- [5] A. C. Ribeiro-Duthie, F. Gale, and H. Murphy-Gregory, “Fair trade and staple foods: A systematic review,” *J. Clean. Prod.*, vol. 279, p. 123586, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.JCLEPRO.2020.123586.
- [6] Stefano Chirico, “Cooperative sociali e commercio equo e solidale: i confini dell’attività,” *Coop. Consorzi*, vol. 10, 2007.
- [7] N. G. Marconi, N. H. Hooker, and N. DiMarcello, “What’s in a Name? The Impact of Fair Trade Claims on Product Price,” *Agribusiness*, 2017, doi: 10.1002/agr.21486.
- [8] W. F. Organization, “FairTrade Annual Report 2017,” 2017.
- [9] R. Dragusanu, D. Giovannucci, and N. Nunn, “The economics of fair trade,” *J. Econ. Perspect.*, 2014, doi: 10.1257/jep.28.3.217.
- [10] A. Le Mare, “The Impact of Fair Trade on Social and Economic Development: A Review of the Literature,” *Geogr. Compass*, vol. 2, no. 6, pp. 1922–1942, 2008, doi: 10.1111/j.1749-8198.2008.00171.x.
- [11] D. Durevall, “Fairtrade and Market Efficiency: Fairtrade-Labeled Coffee in the Swedish Coffee Market”, doi: 10.3390/economies8020030.
- [12] F. International, “Monitoring the scope and benefits of FairTrade - Monitoring Report 12th edition,” 2021. [Online]. Available: [www.fairtrade.net](http://www.fairtrade.net)
- [13] M. Del Prete and A. Samoggia, “Chocolate Consumption and Purchasing Behaviour Review: Research Issues and Insights for Future Research,” *sustainability*, vol. 12, p. 5586, 2020, doi: 10.3390/su12145586.



- [14] T. E. Burdick *et al.*, “Effect of weather on Cocoa production,” *Prehosp. Disaster Med.*, 2014, doi: 10.1016/j.jemermed.2008.08.028.
- [15] FAO, “FAOSTAT, Food and Agriculture data.” 2022.
- [16] S. Trestini and F. Carlotta, “Il mercato del cacao e la produzione di cioccolato: le prospettive commerciali e gli aspetti normativi,” 2014.
- [17] F. M. Santucci, “Economia e mercato del cacao e cioccolata,” in *Atti dei Georgofili*, 2018, pp. 263–282.
- [18] ICCO, “Cocoa Market report - February 2022,” 2022.
- [19] A. Hicks, “Current status and future development of global tea production and tea products,” *Au J*, 2009.
- [20] C. L. Vivek Voora, Steffany Bermúdez, “Global Market Report: Tea,” 2019.
- [21] K. Karwowska, M. Skotnicka, and M. Śmiechowska, “Tea Production and its Forecasts, and the Possibility of Tea Cultivation in the Context of Environmental Requirements in China,” *Sci. J. Warasw Univ. Life Sci. - SGGW*, vol. 19, no. 1, pp. 180–191, 2019, doi: 10.22630/prs.2019.19.1.17.
- [22] F. Bastian *et al.*, “From Plantation to Cup: Changes in Bioactive Compounds during Coffee Processing,” vol. 10, pp. 2827–2854, 2021, doi: 10.3390/foods10112827.
- [23] S. I. Mussatto, E. M. S. Machado, S. Martins, and J. A. Teixeira, “Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues,” *Food and Bioprocess Technology*. 2011. doi: 10.1007/s11947-011-0565-z.
- [24] I. coffee Organization, “Coffee Market report - April 2022,” 2022.
- [25] D. Restuccia, M. R. Loizzo, and U. G. Spizzirri, “Quality and safety issues related with the presence of biogenic amines in coffee, tea, and cocoa-based beverages,” in *Caffeinated and Cocoa Based Beverages: Volume 8. The Science of Beverages*, Elsevier, 2019, pp. 47–88. doi: 10.1016/B978-0-12-815864-7.00002-7.
- [26] R. R. Watson, V. R. Preedy, and S. Zibadi, *Chocolate in health and nutrition*. 2013. doi: 10.1007/978-1-61779-803-0.
- [27] J. O. Lawal and B. Omonona, “The effects of rainfall and other weather parameters on cocoa production in Nigeria,” *Comun. Sci.*, vol. 5, pp. 518–523, Dec. 2014.

- [28] M. Perez, A. Lopez-Yerena, and A. Vallverdú-Queralt, “Traceability, authenticity and sustainability of cocoa and chocolate products: a challenge for the chocolate industry,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 62, no. 2. Taylor and Francis Ltd., pp. 475–489, 2021. doi: 10.1080/10408398.2020.1819769.
- [29] E. O. Afoakwa, *Chocolate Science and Technology*. 2010. doi: 10.1002/9781444319880.
- [30] M. Reshi, “Chocolate Processing,” *Ijabr*, 2019.
- [31] B. de N. do Carmo Brito, R. Campos Chisté, R. da Silva Pena, M. B. Abreu Gloria, and A. Santos Lopes, “Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation,” *Food Chem.*, vol. 228, pp. 484–490, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.004>.
- [32] G. M. Mustiga *et al.*, “Identification of Climate and Genetic Factors That Control Fat Content and Fatty Acid Composition of *Theobroma cacao* L. Beans,” *Front. Plant Sci.*, vol. 10, no. October, pp. 1–20, 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.01159.
- [33] V. Bariši *et al.*, “molecules The Chemistry behind Chocolate Production,” 2019, doi: 10.3390/molecules24173163.
- [34] S. Simoes, E. Lelaj, and D. Rousseau, “The presence of crystalline sugar limits the influence of emulsifiers on cocoa butter crystallization,” *Food Chem.*, vol. 346, no. December 2020, 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128848.
- [35] A. Di Castelnuovo, R. Di Giuseppe, L. Iacoviello, and G. De Gaetano, “Consumption of cocoa, tea and coffee and risk of cardiovascular disease,” *European Journal of Internal Medicine*. 2012. doi: 10.1016/j.ejim.2011.07.014.
- [36] F. Ramos-Escudero *et al.*, “Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.),” *LWT*, vol. 147, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.111629.
- [37] M. Oliva-Cruz, P. L. Mori-Culqui, A. C. Caetano, M. Goñas, N. C. Vilca-Valqui, and S. G. Chavez, “Total Fat Content and Fatty Acid Profile of Fine-Aroma Cocoa From Northeastern Peru,” *Front. Nutr.*, vol. 8, no. July, pp. 1–9, 2021, doi: 10.3389/fnut.2021.677000.
- [38] D. 2000/36/CE, “DIRETTIVA 2000/36/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E

DEL CONSIGLIO del 23 giugno 2000 relativa ai prodotti di cacao e di cioccolato destinati all'alimentazione umana”.

- [39] USDA, “USDA (U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE), FoodData Central. (2022) <https://fdc.nal.usda.gov/>,” 2022.
- [40] H. M. Rawel, G. Huschek, S. T. Sagu, and T. Homann, “Cocoa Bean Proteins-Characterization, Changes and Modifications due to Ripening and Post-Harvest Processing,” 2019, doi: 10.3390/nu11020428.
- [41] A. Bertazzo, S. Comai, I. Brunato, M. Zancato, and C. V. L. Costa, “The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in Theobroma cacao beans,” *Food Chem.*, vol. 124, no. 1, pp. 93–96, 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.05.110.
- [42] R. J. Redgwell, V. Trovato, and D. Curti, “Cocoa bean carbohydrates: Roasting-induced changes and polymer interactions,” *Food Chem.*, vol. 80, no. 4, pp. 511–516, 2003, doi: 10.1016/S0308-8146(02)00320-5.
- [43] E. Ohene Afoakwa, J. Quao, J. Takrama, A. Simpson Budu, and F. Kwesi Saalia, “Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation,” p. 2011, doi: 10.1007/s13197-011-0446-5.
- [44] S. T. Beckett, *INDUSTRIAL CHOCOLATE MANUFACTURE AND USE Fourth Edition*. 2009. [Online]. Available: [www.wiley.com/wiley-blackwell](http://www.wiley.com/wiley-blackwell).
- [45] L. Calderón-Garcidueñas *et al.*, “Flavonol-rich dark cocoa significantly decreases plasma endothelin-1 and improves cognition in urban children,” 2013, doi: 10.3389/fphar.2013.00104.
- [46] P. Kalač, “Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005-mid 2013,” *Food Chem.*, vol. 161, pp. 27–39, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.102.
- [47] M. Schirone, P. Visciano, R. Tofalo, and G. Suzzi, “Histamine food poisoning,” in *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2017. doi: 10.1007/164\_2016\_54.
- [48] T. Lavizzari, M. Teresa Veciana-Nogués, S. Bover-Cid, A. Mariné-Font, and M. Carmen Vidal-Carou, “Improved method for the determination of biogenic amines

- and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1129, no. 1, pp. 67–72, 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.06.090.
- [49] P. Pastore, G. Favaro, D. Badocco, A. Tapparò, S. Cavalli, and G. Saccani, “Determination of biogenic amines in chocolate by ion chromatographic separation and pulsed integrated amperometric detection with implemented wave-form at Au disposable electrode,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1098, no. 1–2, pp. 111–115, 2005, doi: 10.1016/j.chroma.2005.08.065.
- [50] R. Indiarso, E. Subroto, N. Sukri, and M. Djali, “Cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans processing technology: A review of flavonoid changes,” *Asian Journal of Plant Sciences*, vol. 20, no. 4. Asian Network for Scientific Information, pp. 684–693, 2021. doi: 10.3923/ajps.2021.684.693.
- [51] L. Godočíková *et al.*, “Antioxidant activities and volatile flavor components of selected single-origin and blend chocolates,” *Molecules*, vol. 25, no. 16, Aug. 2020, doi: 10.3390/molecules25163648.
- [52] E. O. Pierre, N. Nicolas, F. ois D. Pierre, L. O. Martine, and O. N. Denis, “Heritability of polyphenols, anthocyanins and antioxidant capacity of Cameroonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans,” *African J. Biotechnol.*, vol. 14, no. 36, pp. 2672–2682, Sep. 2015, doi: 10.5897/ajb2015.14715.
- [53] B. Urbańska, D. Derewiaka, A. Lenart, and J. Kowalska, “Changes in the composition and content of polyphenols in chocolate resulting from pre-treatment method of cocoa beans and technological process,” *European Food Research and Technology*, vol. 245, no. 10. Springer Verlag, pp. 2101–2112, Oct. 01, 2019. doi: 10.1007/s00217-019-03333-w.
- [54] A. C. Aprotosoie, S. V. Luca, and A. Miron, “Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview,” *ComprehensiveReviews inFoodScienceandFoodSafety*, vol. 15, pp. 73–91, 2016, doi: 10.1111/1541-4337.12180.
- [55] J. Wollgast and E. Anklam, “Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification,” *Food Res. Int.*, vol. 33, no. 6, pp. 423–447, 2000, doi: 10.1016/S0963-9969(00)00068-5.

- [56] B. Urbá and J. Kowalska, “Comparison of the Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Chocolate Obtained from Roasted and Unroasted Cocoa Beans from Different Regions of the World”, doi: 10.3390/antiox8080283.
- [57] H. Cheng, K. Wei, and L. Wang, “The Impact of Variety, Environment and Agricultural Practices on Catechins and Caffeine in Plucked Tea Leaves,” *Process. Impact Act. Components Food*, vol. 4, no. December, pp. 597–603, 2015, doi: 10.1016/B978-0-12-404699-3.00072-X.
- [58] A. Mohammed and E. Anany, “Nutritional composition, antinutritional factors, bioactive compounds and antioxidant activity of guava seeds (*Psidium Myrtaceae*) as affected by roasting processes,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 4, pp. 2175–2183, 2015, doi: 10.1007/s13197-013-1242-1.
- [59] L. Macdougall, S. Taheri, and P. Crofton, “Biochemical risk factors for stone formation in a Scottish paediatric hospital population,” *Ann Clin Biochem*, vol. 47, pp. 125–130, 2010, doi: 10.1258/acb.2009.009146.
- [60] C.-C. Huang, Y.-T. Tung, W.-C. Huang, Y.-M. Chen, Y.-J. Hsu, and M.-C. Hsu, “Beneficial effects of cocoa, coffee, green tea, and garcinia complex supplement on diet induced obesity in rats,” 2016, doi: 10.1186/s12906-016-1077-1.
- [61] A. A. Nagoor Gunny, T. W. Xiang, and M. H. Che Mat, “Deep Eutectic Solvent for extraction of natural antioxidant from a medicinal plant, *Coleus aromaticus*,” in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Dec. 2020, vol. 932, no. 1. doi: 10.1088/1757-899X/932/1/012033.
- [62] J. Oracz and E. Nebesny, “Influence of roasting conditions on the biogenic amine content in cocoa beans of different *Theobroma cacao* cultivars,” *Food Res. Int.*, 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2013.10.032.
- [63] C. in diet and Health, *Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk*. 1989.
- [64] D. Gonçalves Bortolini, C. Windson Isidoro Haminiuk, A. Cristina Pedro, I. de Andrade Arruda Fernandes, and G. Maria Maciel, “Processing, chemical signature and food industry applications of *Camellia sinensis* teas: An overview,” *Food Chem. X*, vol. 12, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.fochx.2021.100160.

- [65] Y. Wang *et al.*, “Fermentation process enhanced production and bioactivities of oolong tea polysaccharides,” *Food Res. Int.*, vol. 46, no. 1, pp. 158–166, 2012, doi: 10.1016/j.foodres.2011.11.027.
- [66] Z. Chen, Z. Wang, H. Yuan, and N. He, “From Tea Leaves to Factories: A Review of Research Progress in L-Theanine Biosynthesis and Production,” *Cite This J. Agric. Food Chem*, vol. 69, pp. 1187–1196, 2021, doi: 10.1021/acs.jafc.0c06694.
- [67] Z. Chen, Z. Wang, H. Yuan, and N. He, “From Tea Leaves to Factories: A Review of Research Progress in L-Theanine Biosynthesis and Production,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 69, no. 4. American Chemical Society, pp. 1187–1196, Feb. 03, 2021. doi: 10.1021/acs.jafc.0c06694.
- [68] K. Wang, E. G. R. Davies, and J. Liu, “Integrated water resources management and modeling: A case study of Bow river basin, Canada,” *J. Clean. Prod.*, vol. 240, p. 118242, 2019, doi: 10.1016/j.jclepro.2019.118242.
- [69] Y. Wang *et al.*, “Impact of Six Typical Processing Methods on the Chemical Composition of Tea Leaves Using a Single *Camellia sinensis* Cultivar, Longjing 43,” 2018, doi: 10.1021/acs.jafc.8b05140.
- [70] J. Xu, M. Wang, J. Zhao, Y. Wang, Q. Tang, and I. A. Khan, “Yellow tea (*Camellia sinensis* L.), a promising Chinese tea : Processing , chemical constituents and health benefits,” *Food Res. Int.*, vol. 107, no. September 2017, pp. 567–577, 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2018.01.063.
- [71] J. Xu, M. Wang, J. Zhao, Y. H. Wang, Q. Tang, and I. A. Khan, “Yellow tea (*Camellia sinensis* L.), a promising Chinese tea: Processing, chemical constituents and health benefits,” *Food Research International*, vol. 107. Elsevier Ltd, pp. 567–577, May 01, 2018. doi: 10.1016/j.foodres.2018.01.063.
- [72] T. Sharmilan, I. Premarathne, I. Wanniarachchi, S. Kumari, and D. Wanniarachchi, “Review Article Electronic Nose Technologies in Monitoring Black Tea Manufacturing Process,” 2020, doi: 10.1155/2020/3073104.
- [73] M. Da Silva Pinto, “Tea: A new perspective on health benefits,” *Food Res. Int.*, vol. 53, no. 2, pp. 558–567, 2013, doi: 10.1016/j.foodres.2013.01.038.
- [74] C. Cabrera, R. Artacho, and R. Giménez, “Beneficial Effects of Green Tea—A

- Review,” *J. Am. Coll. Nutr.*, 2006, doi: 10.1080/07315724.2006.10719518.
- [75] H. Guo *et al.*, “Structural characteristics of crude polysaccharides from 12 selected chinese teas, and their antioxidant and anti-diabetic activities,” *Antioxidants*, vol. 10, no. 10, Oct. 2021, doi: 10.3390/antiox10101562.
- [76] T. Yi *et al.*, “Comparison of ten major constituents in seven types of processed tea using HPLC-DAD-MS followed by principal component and hierarchical cluster analysis,” *Lwt*, vol. 62, no. 1, pp. 194–201, 2015, doi: 10.1016/j.lwt.2015.01.003.
- [77] E. Sheibani, S. E. Duncan, D. D. Kuhn, A. M. Dietrich, J. J. Newkirk, and S. F. O’Keefe, “Changes in flavor volatile composition of oolong tea after panning during tea processing,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 4, no. 3, pp. 456–468, May 2016, doi: 10.1002/fsn3.307.
- [78] Q. Zhang *et al.*, “Characterization of three different classes of non-fermented teas using untargeted metabolomics,” *Food Res. Int.*, vol. 121, pp. 697–704, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.foodres.2018.12.042.
- [79] X. Guo, C. T. Ho, W. Schwab, and X. Wan, “Effect of the roasting degree on flavor quality of large-leaf yellow tea,” *Food Chem.*, vol. 347, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129016.
- [80] H. peng Lv, Y. jun Zhang, Z. Lin, and Y. rong Liang, “Processing and chemical constituents of Pu-erh tea: A review,” *Food Res. Int.*, vol. 53, no. 2, pp. 608–618, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.foodres.2013.02.043.
- [81] N. Y. Shen, S. Y. Zheng, and X. Q. Wang, “Determination of Biogenic Amines in Pu-erh Tea with Precolumn Derivatization by High-Performance Liquid Chromatography,” *Food Anal. Methods*, vol. 10, no. 6, pp. 1690–1698, 2017, doi: 10.1007/s12161-016-0724-y.
- [82] G. Donadini and M. D. Fumi, “An investigation on the appropriateness of chocolate to match tea and coffee,” *Food Res. Int.*, 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2014.05.038.
- [83] M. Jeszka-Skowron, M. Krawczyk, and A. Zgoła-Grześkowiak, “Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 40, pp. 70–77, 2015, doi: 10.1016/j.jfca.2014.12.015.

- [84] A. Pękal, M. Biesaga, and K. Pyrzynska, “Trace metals and flavonoids in different types of tea,” *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 22, no. 4, pp. 925–930, 2013, doi: 10.1007/s10068-013-0165-y.
- [85] K. C. (Ken C. . Willson and M. N. (Michael N. . Clifford, *Tea : cultivation to consumption*. Chapman & Hall, 1992.
- [86] D. Chen, G. Chen, Y. Sun, X. Zeng, and H. Ye, “Physiological genetics, chemical composition, health benefits and toxicology of tea (*Camellia sinensis* L.) flower: A review,” *Food Res. Int.*, vol. 137, no. July, p. 109584, 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109584.
- [87] G. Zagula, B. Saletnik, and C. Puchalski, “STUDY OF NUTRITIONAL VALUE OF DRIED TEA LEAVES AND INFUSIONS OF BLACK, GREEN AND WHITE TEAS FROM CHINESE PLANTATIONS,” *Rocz. Państwowego Zakładu Hig.*, vol. 68, no. 3, pp. 237–245, 2017, [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/319682455>
- [88] M. Reto, M. Eduardo Figueira, H. Mota Filipe, and C. M. M Almeida, “Chemical Composition of Green Tea (*Camellia sinensis*) Infusions Commercialized in Portugal,” 2007, doi: 10.1007/s11130-007-0054-8.
- [89] G. Vinci, F. D’ascenzo, L. Maddaloni, S. A. Prencipe, and M. Tiradritti, “The Influence of Green and Black Tea Infusion Parameters on Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays,” *Beverages*, vol. 8, no. 2, pp. 1–13, 2022, doi: 10.3390/beverages8020018.
- [90] Y. Wang, D. Sun, H. Chen, L. Qian, and P. Xu, “Fatty acid composition and antioxidant activity of tea (*Camellia sinensis* L.) seed oil extracted by optimized supercritical carbon dioxide,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 11, pp. 7708–7719, 2011, doi: 10.3390/ijms12117708.
- [91] S. Ercisli, E. Orhan, O. Ozdemir, M. Sengul, and N. Gungor, “Seasonal variation of total phenolic, antioxidant activity, plant nutritional elements, and fatty acids in tea leaves (*Camellia sinensis* var. *sinensis* clone Derepazari 7) grown in Turkey,” *Pharm. Biol.*, vol. 46, no. 10–11, pp. 683–687, 2008, doi: 10.1080/13880200802215818.
- [92] L. Zhang, C. T. Ho, J. Zhou, J. S. Santos, L. Armstrong, and D. Granato, “Chemistry and Biological Activities of Processed *Camellia sinensis* Teas: A Comprehensive



- Review,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 18, no. 5, pp. 1474–1495, 2019, doi: 10.1111/1541-4337.12479.
- [93] J. P. Ele-Ekouna, C. Pau-Roblot, B. Courtois, and J. Courtois, “Chemical characterization of pectin from green tea (*Camellia sinensis*),” *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 3, pp. 1232–1239, 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.09.028.
- [94] M. Adnan, A. Ahmad, A. Ahmed, N. Khalid, I. Hayat, and I. Ahmed, “Chemical composition and sensory evaluation of tea (*Camellia sinensis*) commercialized in Pakistan,” *Pakistan J. Bot.*, vol. 45, no. 3, pp. 901–907, 2013.
- [95] T. Karak *et al.*, “Micronutrients (B, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, and Zn) content in made tea (*Camellia sinensis* L.) and tea infusion with health prospect: A critical review,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 14, pp. 2996–3034, Sep. 2017, doi: 10.1080/10408398.2015.1083534.
- [96] M. B. Hicks, Y. H. P. Hsieh, and L. N. Bell, “Tea preparation and its influence on methylxanthine concentration,” *Food Res. Int.*, vol. 29, no. 3–4, pp. 325–330, Apr. 1996, doi: 10.1016/0963-9969(96)00038-5.
- [97] G. Vinci and L. Maddaloni, “Biogenic amines in alcohol-free beverages,” *Beverages*, vol. 6, no. 1, 2020, doi: 10.3390/beverages6010017.
- [98] M. D. McAlpine and W. E. Ward, “Influence of steep time on polyphenol content and antioxidant capacity of black, green, rooibos, and herbal teas,” *Beverages*, vol. 2, no. 3, 2016, doi: 10.3390/beverages2030017.
- [99] P. Liczbiński and B. Bukowska, “Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest in vitro investigations,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 175, 2022, doi: 10.1016/j.indcrop.2021.114265.
- [100] N. Lotfi Yagin, R. Mahdavi, and Z. Nikniaz, “Oxalate content of different drinkable dilutions of tea infusions after different brewing times,” *Heal. Promot. Perspect.*, vol. 2, no. 2, pp. 218–22, 2012, doi: 10.5681/hpp.2012.026.
- [101] S. I. Mussatto, E. M. S. Machado, S. Martins, and J. A. Teixeira, “Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues,” *Food and Bioprocess Technology*, vol. 4, no. 5, pp. 661–672, Jul. 2011. doi: 10.1007/s11947-011-0565-z.

- [102] R. J. Clarke and O. G. Vitzthum, *Coffee: Recent Developments*. 2008. doi: 10.1002/9780470690499.
- [103] M. Haile and W. H. Kang, *The Harvest and Post-Harvest Management Practices' Impact on Coffee Quality in Coffee production and research*. 2019. [Online]. Available: [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
- [104] S. Deshpande, S. Singh, A. Panneerselvam, and V. D. Rajeswari, "Nutrients in caffeinated beverages-an overview," in *Caffeinated and Cocoa Based Beverages: Volume 8. The Science of Beverages*, 2019. doi: 10.1016/B978-0-12-815864-7.00011-8.
- [105] Y. Pham, K. Reardon-Smith, S. Mushtaq, and G. Cockfield, "The impact of climate change and variability on coffee production: a systematic review," *Clim. Chang.*, no. 156, pp. 609–630, 2019, doi: 10.1007/s10584-019-02538-y.
- [106] J. Avelino *et al.*, "Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota," *J. Sci. Food Agric. J Sci Food Agric*, vol. 85, pp. 1869–1876, 2005, doi: 10.1002/jsfa.2188.
- [107] K. Król, M. Gantner, A. Tatarak, and E. Hallmann, "The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 246, no. 1, pp. 33–39, Jan. 2020, doi: 10.1007/s00217-019-03388-9.
- [108] H. Van Der Vossen *et al.*, "Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review," *Euphytica*, vol. 204, pp. 243–256, 2015, doi: 10.1007/s10681-015-1398-z.
- [109] R. C. Alves, F. Rodrigues, M. Antónia Nunes, A. F. Vinha, and M. B. P. P. Oliveira, "State of the art in coffee processing by-products," in *Handbook of Coffee Processing By-Products: Sustainable Applications*, Elsevier Inc., 2017, pp. 1–26. doi: 10.1016/B978-0-12-811290-8.00001-3.
- [110] L. T. Alexandro, P. M. F. Herculano, B. Rita, and B. R. Rodrigo, "Yield, maturation, and beverage quality of arabica coffee progenies under selection in Rondonia state, Brazil," *African J. Agric. Res.*, vol. 9, no. 38, pp. 2854–2861, 2014, doi: 10.5897/ajar2014.8969.
- [111] É. M. dos Santos *et al.*, "Coffee by-products in topical formulations: A review,"

- Trends Food Sci. Technol.*, vol. 111, no. March, pp. 280–291, 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.02.064.
- [112] S. S. Arya, R. Venkatram, P. R. More, and P. Vijayan, “The wastes of coffee bean processing for utilization in food: a review,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 59, no. 2, pp. 429–444, 2022, doi: 10.1007/s13197-021-05032-5.
- [113] M. Muzaifa, D. Hasni, Febriani, A. Patria, and A. Abubakar, “Chemical composition of green and roasted coffee bean of Gayo arabica civet coffee (kopi luwak),” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 425, no. 1, 2020, doi: 10.1088/1755-1315/425/1/012001.
- [114] M. Haile and W. H. Kang, “The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality,” 2019, doi: 10.1155/2019/4836709.
- [115] N. Z. Rao, M. Fuller, and M. D. Grim, “Physiochemical characteristics of hot and cold brew coffee chemistry: The effects of roast level and brewing temperature on compound extraction,” *Foods*, vol. 9, no. 7, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3390/foods9070902.
- [116] N. C. Bicho, F. C. Lidon, J. C. Ramalho, and A. E. Leitão, “Quality assessment of Arabica and Robusta green and roasted coffees - A review,” *Emirates J. Food Agric.*, vol. 25, no. 12, pp. 945–950, 2013, doi: 10.9755/ejfa.v25i12.17290.
- [117] F. Wei and M. Tanokura, “Chemical Changes in the Components of Coffee Beans during Roasting,” in *Coffee in Health and Disease Prevention*, Elsevier Inc., 2015, pp. 83–91. doi: 10.1016/B978-0-12-409517-5.00010-3.
- [118] W. N. L. E. R. R. and H. T., “Effect of bean maturity and roasting temperature on chemical content of robusta coffee,” *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, no. 830, p. 022019, 2020, doi: 10.1088/1757-899X/830/2/022019.
- [119] R. K. Kipkorir, P. Muliro, and S. Muhoho, “Effects of coffee processing technologies on physico-chemical properties and sensory qualities of coffee,” *African J. Food Sci.*, vol. 9, no. 4, pp. 230–236, Apr. 2015, doi: 10.5897/ajfs2014.1221.
- [120] A. M. Covre, F. L. Partelli, R. Bonomo, and I. Gontijo, “Micronutrients in the fruits and leaves of irrigated and non-irrigated coffee plants,” *J. Plant Nutr.*, vol. 41, no. 9, pp. 1119–1129, 2018, doi: 10.1080/01904167.2018.1431665.

- [121] D. Dubberstein, F. L. Partelli, M. C. Espindula, and J. R. M. Dias, “Concentration and accumulation of micronutrients in robust coffee,” *Acta Sci. - Agron.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–8, 2019, doi: 10.4025/actasciagron.v41i1.42685.
- [122] A. A. Nuhu, “Bioactive Micronutrients in Coffee: Recent Analytical Approaches for Characterization and Quantification,” *ISRN Nutr.*, p. 384230, 2014, doi: 10.1155/2014/384230.
- [123] I. M. on the evaluation of carcinogenic risks to Human, *Coffeee, Tea, Mate, Methylxantines and Methylglyoxal*, vol. 51. 1991.
- [124] D. Restuccia, U. G. Spizzirri, O. I. Parisi, G. Cirillo, and N. Picci, “Brewing effect on levels of biogenic amines in different coffee samples as determined by LC-UV,” *Food Chem.*, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.134.
- [125] S. Casal *et al.*, “Free and conjugated biogenic amines in green and roasted coffee beans,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 20, pp. 6188–6192, 2004, doi: 10.1021/jf049509u.
- [126] F. Haghghatdoost, R. Sadeghian, and · Behnood Abbasi, “The Associations Between Tea and Coffee Drinking and Risk of Calcium-Oxalate Renal Stones,” *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 76, pp. 516–522, 2021, doi: 10.1007/s11130-021-00933-4.
- [127] E. Gil-Martín, T. Forbes-Hernández, A. Romero, D. Cianciosi, F. Giampieri, and M. Battino, “Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products,” *Food Chem.*, vol. 378, 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131918.
- [128] S. Koral, B. Tufan, A. Ščavničar, D. Kočar, M. Ž. Pompe, and S. Köse, “Investigation of the contents of biogenic amines and some food safety parameters of various commercially salted fish products,” *Food Control*, 2013, doi: 10.1016/j.foodcont.2013.01.043.
- [129] D. Doeun, M. Davaatseren, and M. S. Chung, “Biogenic amines in foods,” *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 26, no. 6, pp. 1463–1474, 2017, doi: 10.1007/s10068-017-0239-3.
- [130] S. Bodmer, C. Imark, and M. Kneubühl, “Biogenic amines in foods: Histamine and food processing,” *Inflammation Research*. 1999. doi: 10.1007/s000110050463.
- [131] M. B. Gomes, B. A. D. Pires, S. A. P. Fracalanza, and V. A. Marin, “The risk of

- biogenic amines in food,” *Cienc. e Saude Coletiva*, 2014, doi: 10.1590/1413-81232014194.18672012.
- [132] J. M. Hungerford, “Scombroid poisoning: A review,” *Toxicon*, 2010, doi: 10.1016/j.toxicon.2010.02.006.
- [133] EFSA, “Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods,” *EFSA J.*, vol. 9, no. 10, p. 2393, 2011, doi: 10.2903/j.efsa.2011.2393.
- [134] G. Vinci, L. Maddaloni, S. A. Prencipe, and R. Ruggieri, “Natural contaminants in wines: Determination of biogenic amines by chromatographic techniques,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 18, no. 19, 2021, doi: 10.3390/ijerph181910159.
- [135] L. Pastrana *et al.*, “Functional Foods,” in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry*, 2017. doi: 10.1016/B978-0-444-63666-9.00007-8.
- [136] S. Ciano, L. Maddaloni, M. Rapa, and A. M. Tarola, “Organic hempseed oil from the retail market: chemical profiling and multivariate analysis for label information assessment,” *Br. Food J.*, 2022, doi: 10.1108/BFJ-08-2021-0924.
- [137] S. Nurulain, N. A. Aziz, M. S. Najib, M. R. Salim, and H. Manap, “A review of free fatty acid determination methods for palm cooking oil,” *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 1921, no. 1, 2021, doi: 10.1088/1742-6596/1921/1/012055.
- [138] W. Cheng, D. W. Sun, and J. H. Cheng, “Pork biogenic amine index (BAI) determination based on chemometric analysis of hyperspectral imaging data,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 73, pp. 13–19, 2016, doi: 10.1016/j.lwt.2016.05.031.
- [139] F. Özogul and Y. Özogul, “Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging,” *Food Chem.*, vol. 99, no. 3, pp. 574–578, 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.08.029.
- [140] C. Ruiz-Capillas and A. M. Herrero, “Impact of biogenic amines on food quality and safety,” *Foods*. 2019. doi: 10.3390/foods8020062.
- [141] U. G. Spizzirri, N. Picci, and D. Restuccia, “Extraction efficiency of different solvents and LC-UV determination of biogenic amines in tea leaves and infusions,” *J. Anal.*

- Methods Chem.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/8715287.
- [142] A. Önal, “A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods,” *Food Chemistry*. 2007. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.08.028.
- [143] C. Ruiz-Capillas, A. M. Herrero, and F. Jiménez-Colmenero, “Determination of biogenic amines,” in *Flow Injection Analysis of Food Additives*, 2015. doi: 10.1201/b19644.
- [144] E. Mazzucco, F. Gosetti, M. Bobba, E. Marengo, E. Robotti, and M. C. Gennaro, “High-performance liquid chromatography-ultraviolet detection method for the simultaneous determination of typical biogenic amines and precursor amino acids. applications in food chemistry,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 1, pp. 127–134, 2010, doi: 10.1021/jf9030053.
- [145] U. G. Spizzirri, N. Picci, and D. Restuccia, “Extraction efficiency of different solvents and LC-UV determination of biogenic amines in tea leaves and infusions,” *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/8715287.
- [146] G. L. La Torre, M. Saitta, A. Giorgia Potorti, G. Di Bella, and G. Dugo, “High performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for sensitive determination of bioactive amines in donkey milk,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 32, pp. 5215–5224, 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2010.06.022.
- [147] A. A. Tameem, B. Saad, A. Makahleh, A. Salhin, and M. I. Saleh, “A 4-hydroxy-N'-[(E)-(2-hydroxyphenyl)methylidene]benzohydrazide-based sorbent material for the extraction-HPLC determination of biogenic amines in food samples,” *Talanta*, vol. 82, no. 4, pp. 1385–1391, 2010, doi: 10.1016/j.talanta.2010.07.004.
- [148] G. Vinci and M. L. Antonelli, “Biogenic amines: Quality index of freshness in red and white meat,” *Food Control*, 2002, doi: 10.1016/S0956-7135(02)00031-2.
- [149] M. A. Munir and K. H. Badri, “The Importance of Derivatizing Reagent in Chromatography Applications for Biogenic Amine Detection in Food and Beverages,” *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2020. Hindawi Limited, 2020. doi: 10.1155/2020/5814389.
- [150] G. Duflos, G. Inglebert, C. Himber, S. Degremont, B. Lombard, and A. Brisabois,

- “Validation of standard method EN ISO 19343 for the detection and quantification of histamine in fish and fishery products using high-performance liquid chromatography,” *Int. J. Food Microbiol.*, 2019, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.023.
- [151] H. Park, W.-Y. Song, H. Cha, and T.-Y. Kim, “Development of an optimized sample preparation method for quantification of free fatty acids in food using liquid chromatography-mass spectrometry,” *Sci. Reports* /, vol. 11, p. 5947, 123AD, doi: 10.1038/s41598-021-85288-1.
- [152] S. S. A. Mahesar, S. T. H. Sherazi, Abdul Rauf Khaskheli, Aftab A. Kandhro, “Analytical Approaches for free fatty acids assessment in oils and fats,” *R. Soc. Chem.*, pp. 23–73, 2016, [Online]. Available: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-02429-4\\_7](http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-02429-4_7)
- [153] N. Zheng *et al.*, “Optimization of extraction process and the antioxidant activity of phenolics from sanghuangporus baumii,” *Molecules*, vol. 26, no. 13, Jul. 2021, doi: 10.3390/molecules26133850.
- [154] A. Oreopoulou *et al.*, “Polyphenol extraction by different techniques for valorisation of non-compliant portuguese sweet cherries towards a novel antioxidant extract,” *Sustain.*, vol. 12, no. 14, pp. 243–259, 2020, doi: 10.3390/su12145556.
- [155] Q. Luo *et al.*, “Green extraction of antioxidant polyphenols from green tea (*Camellia sinensis*),” *Antioxidants*, vol. 9, no. 9, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/antiox9090785.
- [156] L. Maddaloni *et al.*, “An electrochemical sensor for monitoring biogenic amines in anchovies as quality and safety index,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 347, 2021, doi: 10.1016/j.snb.2021.130648.
- [157] L. Maddaloni *et al.*, “An electrochemical sensor for monitoring biogenic amines in anchovies as quality and safety index,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 347, p. 130648, Nov. 2021, doi: 10.1016/J.SNB.2021.130648.
- [158] F. Z. I. M. Hassani, S. Amzazi, and I. Lavandera, “The versatile applications of DES and their influence on oxidoreductase-mediated transformations,” *Molecules*, vol. 24, no. 11. MDPI AG, Jun. 11, 2019. doi: 10.3390/molecules24112190.
- [159] S. Trombino *et al.*, “Deep Eutectic Solvents for Improving the Solubilization and

- Delivery of Dapsone,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14020333.
- [160] K. Mulia, E. Krisanti, Nasruddin, and E. Libriandy, “Betaine-based deep eutectic solvents with diol, acid and amine hydrogen bond donors for carbon dioxide absorption,” in *Journal of Physics: Conference Series*, Nov. 2019, vol. 1295, no. 1. doi: 10.1088/1742-6596/1295/1/012039.
- [161] L. Benvenuti, A. A. F. Zielinski, and S. R. S. Ferreira, “Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES?,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 90, no. June, pp. 133–146, 2019, doi: 10.1016/j.tifs.2019.06.003.
- [162] H. Qin, X. Hu, J. Wang, H. Cheng, L. Chen, and Z. Qi, “Overview of acidic deep eutectic solvents on synthesis, properties and applications,” *Green Energy Environ.*, vol. 5, no. 1, pp. 8–21, 2020, doi: 10.1016/j.gee.2019.03.002.
- [163] B. Socas-Rodríguez, M. V. Torres-Cornejo, G. Álvarez-Rivera, and J. A. Mendiola, “Deep eutectic solvents for the extraction of bioactive compounds from natural sources and agricultural by-products,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 11, no. 11. MDPI AG, Jun. 01, 2021. doi: 10.3390/app11114897.
- [164] B. Pavlić *et al.*, “Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) Extraction Improves Polyphenol Yield and Antioxidant Activity of Wild Thyme (*Thymus serpyllum* L.) Extracts,” *Molecules*, vol. 27, no. 5, Mar. 2022, doi: 10.3390/molecules27051508.
- [165] L. Duan, L. L. Dou, L. Guo, P. Li, and E. H. Liu, “Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products,” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 4, no. 4, pp. 2405–2411, 2016, doi: 10.1021/acssuschemeng.6b00091.
- [166] M. Ivanović *et al.*, “Extraction of Bioactive Metabolites from *Achillea millefolium* L. with Choline Chloride Based Natural Deep Eutectic Solvents: A Study of the Antioxidant and Antimicrobial Activity,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.3390/antiox11040724.
- [167] S. P. Ijardar, V. Singh, and R. L. Gardas, “Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents,” *Molecules*, vol. 27, no. 4. MDPI, Feb. 01, 2022. doi: 10.3390/molecules27041368.
- [168] Y. Cui, C. Li, J. Yin, S. Li, Y. Jia, and M. Bao, “Design, synthesis and properties of



- acidic deep eutectic solvents based on choline chloride,” *J. Mol. Liq.*, vol. 236, pp. 338–343, 2017, doi: 10.1016/j.molliq.2017.04.052.
- [169] M. Ruesgas-Ramo, M. Cruz Figueroa-Espinoza, and E. Durand, “Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities,” 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.7b01054.
- [170] H. H. S. Abdel-Naeem, K. I. Sallam, and N. M. L. Malak, “Improvement of the microbial quality, antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents, and shelf life of smoked herring (*Clupea harengus*) during frozen storage by using chitosan edible coating,” *Food Control*, vol. 130, no. May, 2021, doi: 10.1016/j.foodcont.2021.108317.
- [171] L. Gobbi, S. Ciano, M. Rapa, and R. Ruggieri, “Biogenic Amines Determination in ‘Plant Milks,’” *Beverages*, 2019, doi: 10.3390/beverages5020040.
- [172] D. Restuccia, U. G. Spizzirri, M. De Luca, O. I. Parisi, and N. Picci, “Biogenic amines as quality marker in organic and fair-trade cocoa-based products,” *Sustain.*, 2016, doi: 10.3390/su8090856.
- [173] D. Restuccia, U. G. Spizzirri, F. Puoci, and N. Picci, “Determination of biogenic amine profiles in conventional and organic cocoa-based products,” *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, vol. 32, no. 7, pp. 1156–1163, 2015, doi: 10.1080/19440049.2015.1036322.
- [174] N. Cordoba, M. Fernandez-aldueña, F. L. Moreno, and Y. Ruiz, “Coffee extraction: A review of parameters and their influence on the physicochemical characteristics and flavour of coffee brews,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 96, pp. 45–60, 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2019.12.004.
- [175] D. Restuccia, U. G. Spizzirri, O. I. Parisi, G. Cirillo, and N. Picci, “Brewing effect on levels of biogenic amines in different coffee samples as determined by LC-UV,” *Food Chem.*, vol. 175, pp. 143–150, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.134.
- [176] Ö. Özdekan, “Evaluation of bioactive amine and mineral levels in Turkish coffee,” *Food Res. Int.*, vol. 61, pp. 167–175, 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2013.12.027.
- [177] E. Commission, “COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs,” *Off. J. Eur. Union*, 2005,

doi: 10.1109/MACE.2010.5536537.

- [178] M. Torres-Moreno, E. Torrecasana, J. Salas-Salvadó, and C. Blanch, “Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions,” *Food Chem.*, vol. 166, pp. 125–132, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.141.
- [179] F. Ramos-Escudero *et al.*, “Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.),” *LWT*, vol. 147, p. 111629, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.LWT.2021.111629.
- [180] T. F. Soares, M. Beatriz, and P. P. Oliveira, “Cocoa By-Products: Characterization of Bioactive Compounds and Beneficial Health Effects,” *Molecules*, vol. 27, no. 1625, 2022, doi: 10.3390/molecules27051625.
- [181] M. Gil, D. Uribe, V. Gallego, C. Bedoya, and S. Arango-Varela, “Traceability of polyphenols in cocoa during the postharvest and industrialization processes and their biological antioxidant potential,” *Heliyon*, vol. 7, no. 8, p. e07738, 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07738.
- [182] C. Di Mattia, M. Martuscelli, G. Sacchetti, B. Beheydt, D. Mastrocola, and P. Pittia, “Effect of different conching processes on procyanidin content and antioxidant properties of chocolate,” *Food Res. Int.*, vol. 63, pp. 367–372, Sep. 2014, doi: 10.1016/J.FOODRES.2014.04.009.
- [183] N. N. Batista, D. P. de Andrade, C. L. Ramos, D. R. Dias, and R. F. Schwan, “Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR,” *Food Res. Int.*, vol. 90, pp. 313–319, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.FOODRES.2016.10.028.
- [184] J. M. Brčanovi *et al.*, “Cyclic Voltammetric Determination of Antioxidant Capacity of Cocoa Powder, Dark Chocolate and Milk Chocolate Samples: Correlation with Spectrophotometric Assays and Individual Phenolic Compounds”.
- [185] L. Percevault, E. Limanton, P. Nicolas, L. Paquin, and C. Lagrost, “Electrochemical Determination and Antioxidant Capacity Modulation of Polyphenols in Deep Eutectic Solvents,” 2020, doi: 10.1021/acssuschemeng.0c07023.
- [186] S. Chanioti and C. Tzia, “Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques,” *Innov.*

- Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 48, pp. 228–239, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.ifset.2018.07.001.
- [187] J. Z. Chu *et al.*, “Efficient extraction and antioxidant activity of polyphenols from *Antrodia cinnamomea*,” *BMC Biotechnol.*, vol. 22, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12896-022-00739-5.
- [188] I. Volf, I. Ignat, M. Neamtu, and V. I. Popa, “Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols,” *Chem. Pap.*, vol. 68, no. 1, pp. 121–129, 2014, doi: 10.2478/s11696-013-0417-6.
- [189] V. L. and N. A. Panzella L, Moccia F, Nasti R, Marzorati S, “Bioactive Phenolic Compounds From Agri-Food Wastes: An Update on Green and Sustainable Extraction Methodologies,” *Front. Nutr.*, vol. 7, pp. 1–24, 2020, doi: 10.3389/fnut.2020.00060.
- [190] O. Zannou, H. Pashazadeh, S. A. Ibrahim, I. Koca, and C. M. Galanakis, “Green and highly extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from kinkeliba (*Combretum micranthum* G. Don) by natural deep eutectic solvents (NADESs) using maceration, ultrasound-assisted extraction and homogenate-assisted extraction,” *Arab. J. Chem.*, vol. 15, no. 5, May 2022, doi: 10.1016/j.arabjc.2022.103752.
- [191] O. Zannou and I. Koca, “Greener extraction of anthocyanins and antioxidant activity from blackberry (*Rubus* spp) using natural deep eutectic solvents,” *LWT*, vol. 158, p. 113184, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.LWT.2022.113184.
- [192] C. Astill, M. R. Birch, C. Dacombe, P. G. Humphrey, and P. T. Martin, “Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 11, pp. 5340–5347, 2001, doi: 10.1021/jf010759+.
- [193] A. Das, A. Kalita, U. Raychaidhuri, and R. Chakraborty, “Synergistic effect of herbal plant extract (*Hibiscus sabdariffa*) in maintain the antioxidant activity of decaffeinated green tea from various parts of Assam,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 56, no. 11, pp. 5009–5016, 2019, doi: 10.1007/s13197-019-03973-6.
- [194] A. Del Caro, G. Vinci, L. Maddaloni, S. Antonia Prencipe, and M. Tiradritti, “The Influence of Green and Black Tea Infusion Parameters on Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays,” 2022, doi: 10.3390/beverages.

- [195] B. Urbańska and J. Kowalska, “Comparison of the total polyphenol content and antioxidant activity of chocolate obtained from roasted and unroasted cocoa beans from different regions of the world,” *Antioxidants*, vol. 8, no. 8, 2019, doi: 10.3390/antiox8080283.
- [196] P. A. Kilmartin and C. F. Hsu, “Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry,” *Food Chem.*, vol. 82, no. 4, pp. 501–512, 2003, doi: 10.1016/S0308-8146(03)00066-9.
- [197] J. Wyrostek and R. Kowalski, “The effect of water mineralization on the extraction of active compounds from selected herbs and on the antioxidant properties of the obtained brews,” *Foods*, vol. 10, no. 6, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3390/foods10061227.
- [198] B. Zargar *et al.*, “Effect of different processing parameters on antioxidant activity of tea,” *Food Meas.*, vol. 12, pp. 527–534, 2018, doi: 10.1007/s11694-017-9664-5.
- [199] R. L. Prior, X. Wu, and K. Schaich, “Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 10, pp. 4290–4302, 2005, doi: 10.1021/jf0502698.
- [200] N. Caporaso, A. Genovese, M. D. Canela, A. Civitella, and R. Sacchi, “Neapolitan coffee brew chemical analysis in comparison to espresso , moka and American brews,” *FRIN*, vol. 61, pp. 152–160, 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2014.01.020.
- [201] N. Uslu, “The influence of decoction and infusion methods and times on antioxidant activity , caffeine content and phenolic compounds of coffee brews,” *Eur. Food Res. Technol.*, no. 0123456789, 2022, doi: 10.1007/s00217-022-04027-6.
- [202] A. Muzykiewicz-Szymá Nska *et al.*, “The Effect of Brewing Process Parameters on Antioxidant Activity and Caffeine Content in Infusions of Roasted and Unroasted Arabica Coffee Beans Originated from Different Countries,” *Molecules*, vol. 26, p. 3681, 2021, doi: 10.3390/molecules26123681.
- [203] P. Saling, “The BASF Eco- Efficiency Analysis,” pp. 12–18, 2016, [Online]. Available: <https://www.basf.com/global/en/who-we-are/sustainability/we-drive-sustainable-solutions/quantifying-sustainability/eco-efficiency-analysis.html>
- [204] S. Jung, S. Gu, S. H. Lee, and Y. Jeong, “Effect of roasting degree on the antioxidant properties of espresso and drip coffee extracted from coffea arabica cv. Java,” *Appl.*

*Sci.*, vol. 11, no. 15, 2021, doi: 10.3390/app11157025.

- [205] A. Muzykiewicz-Szymá Nska *et al.*, “The Effect of Brewing Process Parameters on Antioxidant Activity and Caffeine Content in Infusions of Roasted and Unroasted Arabica Coffee Beans Originated from Different Countries,” *molecules*, vol. 26, p. 3681, 2021, doi: 10.3390/molecules26123681.
- [206] ISO, “14040: Environmental management—life cycle assessment—Principles and framework,” *Int. Organ. Stand.*, 2006.
- [207] G. W. Sonnemann, A. Solgaard, K. Saur, H. A. Udo de Haes, K. Christiansen, and A. A. Jensen, “Life cycle management: UNEP-workshop sharing experiences on LCM,” *Int. J. Life Cycle Assess.*, 2001, doi: 10.1007/BF02978862.
- [208] I. De Marco, S. Riemma, and R. Iannone, “Uncertainty of input parameters and sensitivity analysis in life cycle assessment: An Italian processed tomato product,” *J. Clean. Prod.*, vol. 177, pp. 315–325, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2017.12.258.
- [209] ISO 14044:2006, “ISO 14044:2006 - Environmental management — Life cycle assessment — Requirements and guidelines,” *Environmental management — Life cycle assessment — Requirements and Guidelines*, vol. Geneva. p. ISO, 2006.
- [210] M. D. Murugan, L. H. Tee, and K. S. Oh, “Evaluation of the environment impact of extraction of bioactive compounds from *Darcyodes rostrata* using Deep Eutectic Solvent (DES) using Life Cycle Assessment (LCA),” in *Journal of Physics: Conference Series*, Dec. 2021, vol. 2120, no. 1. doi: 10.1088/1742-6596/2120/1/012005.
- [211] Y. S. Park, G. Egilmez, and M. Kucukvar, “A Novel Life Cycle-based Principal Component Analysis Framework for Eco-efficiency Analysis: Case of the United States Manufacturing and Transportation Nexus,” *J. Clean. Prod.*, vol. 92, pp. 327–342, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.jclepro.2014.12.057.
- [212] Q. Abbas and L. Binder, “Synthesis and Characterization of Choline Chloride Based Binary Mixtures,” *ECS Trans.*, vol. 33, no. 7, pp. 49–59, 2010, doi: 10.1149/1.3484761.
- [213] P. Vauchel *et al.*, “Comparative LCA of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from chicory grounds under different operational conditions,” *J. Clean. Prod.*, vol.

196, pp. 1116–1123, 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.06.042.



## **RINGRAZIAMENTI**

Vorrei dedicare quest'ultima parte dell'elaborato per ringraziare tutte le persone che in me hanno sempre creduto e sostenuto sia nei momenti di difficoltà sia in quelli felici e spensierati che hanno caratterizzato questo bellissimo percorso. Vorrei che questi ringraziamenti siano un punto di arrivo da una parte, ma anche un punto di inizio, perché credo che non si finisca mai di crescere e spero di raggiungere nuovi traguardi importanti nella mia vita, facendo bagaglio di tutti i loro preziosi insegnamenti.

Vorrei ringraziare nel modo più caro e sincero la mia tutor, Prof.ssa Giuliana Vinci, che con la sua dedizione, pazienza e sostegno è stata per me una guida fondamentale per la realizzazione di questo percorso. Un grazie speciale per i Suoi spassionati insegnamenti di Vita, che hanno accompagnato e caratterizzato numerosi momenti lungo questi quattro anni, consentendomi di riflettere e mettermi sempre in discussione. Grazie ancora di più per il supporto morale oltre che professionale.

Desidero, inoltre, ringraziare il Preside Fabrizio D'Ascenzo, la Prof.ssa Laura Gobbi e il Prof. Roberto Ruggieri per i consigli sinceri e il supporto donati in questi anni.

Un ringraziamento di cuore va a Voi cari colleghi Sabrina e Marco per così tanti motivi che mi è impossibile ricordarli ed elencarli tutti. Grazie per il vostro instancabile sostegno.

Al fine di questa esperienza, unica nel suo genere, sarà vivo in me il ricordo di aver conosciuto e collaborato con persone davvero speciali.