



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Facoltà di Economia

Dipartimento di Management

**DOTTORATO IN MANAGEMENT, BANKING
AND COMMODITY SCIENCES**

XXXV CICLO

Curriculum: Commodity Sciences

**Valorizzazione delle produzioni agroalimentari
mediante lo studio di markers molecolari:
caratterizzazione di differenti prodotti alimentari
attraverso la valutazione del flavour e dei composti
bioattivi presenti**

Tutor

Prof. Maurizio Boccacci Mariani

Dottoranda

Dott.ssa Greta Livi

Indice

| | |
|--|----|
| CAPITOLO 1 | 1 |
| Introduzione | 1 |
| 1.1. Il settore agroalimentare | 2 |
| 1.1.1. Export e import del settore agroalimentare | 5 |
| 1.1.1.1. L'impatto della pandemia | 6 |
| 1.2. Le richieste dei consumatori: l'accettabilità dei prodotti alimentari | 7 |
| 1.3. L'alimentazione sostenibile | 8 |
| 1.4. Qualità alimentare | 10 |
| 1.4.1. Sicurezza alimentare | 12 |
| 1.4.2. Valutazione della qualità oggettiva attraverso i markers molecolari | 13 |
| CAPITOLO 2 | 15 |
| Metodologie sperimentali | 15 |
| 2.1. Tecniche estrattive | 16 |
| 2.1.1. Microestrazione in fase solida dello spazio di testa (HS-SPME) | 17 |
| 2.1.2. Estrattore accelerato con solvente (ASE) | 20 |
| 2.2. Tecniche cromatografiche di analisi | 24 |
| 2.2.1. Gascromatografia | 25 |
| 2.2.1.1. Accoppiamento GC-MS | 28 |
| 2.2.2. Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) | 31 |
| 2.2.2.1. Accoppiamento HPLC-UV-Vis | 34 |
| 2.2.2.2. Accoppiamento HPLC-ELSD | 35 |
| 2.3. Tecniche chemiometriche e analisi multivariata dei dati analitici | 36 |
| 2.3.1. Il disegno sperimentale | 37 |
| 2.3.1.1. Disegno sperimentare FC-CCD | 39 |
| 2.3.2. L'analisi esplorativa | 41 |
| 2.3.3. L'analisi predittiva: regressione e classificazione | 44 |
| 2.3.4. Data fusion | 47 |
| CAPITOLO 3 | 49 |
| PARTE I | 49 |
| CARATTERIZZAZIONE DELLA PASTA INTEGRALE DI GRANO DURO | 49 |
| I. L'importanza della componente aromatica e antiossidante nella pasta di grano duro | 51 |
| 1.1. La pasta integrale | 51 |
| 1.2. La composizione del chicco di grano | 53 |

| | | |
|--|--|-----|
| 1.3. | I composti fitochimici presenti nel grano duro..... | 55 |
| 1.3.1. | I carotenoidi | 57 |
| 1.3.1.1. | La luteina..... | 58 |
| 1.3.1.2. | I carotenoidi come indicatori di qualità del grano duro e della pasta: colore ed effetti benefici | 60 |
| 1.4. | Processo di produzione della pasta secca | 63 |
| 1.4.1. | La Trafilatura | 65 |
| 1.4.2. | L'essiccazione..... | 66 |
| 1.5. | Dati di mercato e legislazione..... | 67 |
| II. | Scopo del lavoro e stato dell'arte | 69 |
| 2.1. | Determinazione dei carotenoidi in campioni di pasta..... | 69 |
| 2.2. | Determinazione della componente aromatica in campioni di pasta | 71 |
| III. | Parte sperimentale | 72 |
| 3.1. | Materiali e Metodi | 72 |
| 3.1.1. | Selezione dei campioni | 72 |
| 3.1.2. | Preparazione dei campioni e materiali utilizzati | 73 |
| 3.1.3. | Ottimizzazione dell'analisi ASE/HPLC-UV-Vis dei carotenoidi..... | 74 |
| 3.1.4. | Ottimizzazione dell'analisi HS-SPME/GC-MS dei composti volatili..... | 75 |
| 3.2. | Risultati e discussione..... | 76 |
| 3.2.1. | Disegno sperimentale FC-CCD | 76 |
| 3.2.1.1. | Analisi preliminare del primo set di campioni analizzato..... | 81 |
| 3.2.2. | Analisi statistica dei dati provenienti dall'analisi HPLC-UV-Vis del secondo set di campioni | 83 |
| 3.2.2.1. | Semola..... | 84 |
| 3.2.2.2. | Essiccazione e trafilatura..... | 86 |
| 3.2.3. | Analisi statistica del secondo set di campioni per la caratterizzazione del flavour | 87 |
| 3.2.3.1. | Semola..... | 88 |
| 3.2.3.2. | Essiccazione e trafilatura..... | 90 |
| 3.2.4. | Approccio Multiblock..... | 91 |
| PARTE II | | 95 |
| CARATTERIZZAZIONE DI PRODOTTI ALIMENTARI INNOVATIVI: I FIORI EDIBILI | | 95 |
| I. | L'impiego dei fiori come alimento: nuova tendenza in crescita..... | 97 |
| 1.1. | Origine, tipologie e composizione dei fiori edibili..... | 97 |
| 1.2. | Proprietà benefiche dei fiori edibili: i flavonoidi | 99 |
| 1.3. | La componente aromatica e l'impatto sui consumatori..... | 101 |
| 1.4. | Dati di mercato e legislazione..... | 102 |

| | | |
|---|--|-----|
| II. | Scopo del lavoro e stato dell'arte | 104 |
| III. | Parte sperimentale | 106 |
| | 3.1 Materiali e Metodi | 106 |
| | 3.1.1 Selezione dei campioni | 106 |
| | 3.1.2. Preparazione dei campioni e materiali utilizzati..... | 107 |
| | 3.1.3. Ottimizzazione dell'analisi ASE/HPLC-UV-Vis per lo studio dei flavonoidi nei fiori edibili | 107 |
| | 3.1.4. Ottimizzazione dell'analisi HS-SPME/GC-MS per l'analisi del flavour dei fiori edibili | 108 |
| | 3.2. Risultati e discussione..... | 109 |
| | 3.2.1 Analisi qualitativa preliminare | 109 |
| | 3.2.2. Classificazione PLS/DA per l'analisi della componente aromatica | 110 |
| | 3.2.3. Classificazione PLS-DA per l'analisi dei flavonoidi..... | 114 |
| PARTE III | | 118 |
| LEG4LIFE: Legumes for Sustainable Food System and Healthy | | 119 |
| I. | Valorizzazione della produzione e del consumo di prodotti a base di legumi..... | 121 |
| | 1.1. Le fave come fonti proteiche per i prodotti agroalimentari | 121 |
| | 1.2. Flavour dei prodotti a base vegetale | 123 |
| | 1.2.1. I precursori dei composti volatili e la formazione degli off-flavours | 124 |
| | 1.2.2. L'influenza del processo di estrusione sul flavour..... | 125 |
| | 1.3. Tecniche per migliorare l'accettabilità sensoriale e nutrizionale dei prodotti ricchi di proteine e delle alternative alla carne: fermentazione e idrolisi enzimatica | 126 |
| II. | Scopo del lavoro e stato dell'arte | 128 |
| III. | Parte sperimentale | 129 |
| | 3.1 Materiali e Metodi | 129 |
| | 3.1.1. Preparazione dei campioni..... | 129 |
| | 3.1.1.1. Set di campioni di fave fermentati ed estrusi (1° set)..... | 129 |
| | 3.1.1.2. Set di campioni di fave trattati enzimaticamente ed estrusi (2° set)..... | 130 |
| | 3.1.2. Preparazione dei campioni e materiali utilizzati..... | 132 |
| | 3.1.3. Ottimizzazione dell'analisi ASE/HPLC-ELSD degli acidi grassi..... | 133 |
| | 3.1.4. Ottimizzazione dell'analisi HS-SPME/GC-MS dei composti volatili..... | 134 |
| | 3.2. Risultati e discussione..... | 134 |
| | 3.2.1. Risultati del primo set di campioni | 134 |
| | 3.2.2. Risultati del secondo set di campioni..... | 140 |
| Conclusioni e prospettive future | | 147 |
| Sitografia..... | | 150 |

Bibliografia 151

CAPITOLO 1

Introduzione



1.1. Il settore agroalimentare

Il settore trainante dell'intera economia nazionale è rappresentato da quello agroalimentare. Il settore agroalimentare racchiude tutti i settori dell'economia implicati nella distribuzione e nella produzione dei prodotti agroalimentari di un Paese. I principali sistemi economici che prendono parte al settore sono l'agricoltura, le industrie che producono i mezzi tecnici per l'agricoltura, le industrie di trasformazione alimentare, e la distribuzione alimentare [S1]. Secondo Coldiretti, nel 2021 l'intera filiera agroalimentare italiana dalla produzione fino alla distribuzione contava circa 3,6 milioni di occupati, vantava un valore di filiera superiore ai 538 miliardi, con 740.000 aziende agricole, 70.000 industrie alimentari, più di 330.000 settori di ristorazione e 230.000 punti vendita al dettaglio.

L'ambiente istituzionale e socio-culturale rappresentano due elementi che influenzano la struttura del settore agroalimentare ed il comportamento delle diverse imprese che vi operano. In passato solo il settore agricolo contribuiva a rispondere ai bisogni alimentari; solo successivamente anche grazie al contributo delle innovazioni tecnologiche, si sono sviluppati i ruoli dell'industria e della distribuzione. L'evoluzione del comparto alimentare si può suddividere in diverse fasi: una fase originaria in cui la produzione e il consumo alimentare erano su base locale; successivamente durante la fase di apertura commerciale (15° e 16° secolo) pian piano sono aumentati gli scambi sia a livello nazionale che internazionale; una fase di pre-industrializzazione (16° e 17° secolo) con la nascita della prima forma pre-moderna del settore della distribuzione alimentare tramite il progressivo sviluppo dei trasporti; una fase di allargamento degli scambi (17°, 18° e 19° secolo) su base prevalentemente regionale grazie all'affermarsi del rapporto città-campagna; una fase che ha visto la nascita della moderna industria alimentare caratterizzata dalla diffusione delle tecniche industriali di trasformazione e conservazione degli alimenti, dall'industrializzazione dell'agricoltura con l'introduzione della meccanizzazione e della chimica e da un crescente aumento degli scambi internazionali (prima metà del 20° secolo); una fase di terziarizzazione e internazionalizzazione (anni 80', 90'); e infine la fase attuale di transizione caratterizzata da una serie di fenomeni in contraddizione, come la ricerca della differenziazione e del basso costo, la globalizzazione dei consumi e la difesa dei prodotti tipici, la concentrazione della GDO e l'e-commerce, l'industrializzazione del settore agricolo (insieme alla chimica e alla biotecnologia) e lo sviluppo dell'agricoltura biologica (fine anni 90' ad oggi).

In Italia, un paese caratterizzato da grandi diversità territoriali, culture, storie e tradizioni, il settore agroalimentare rappresenta un'eccellenza a livello mondiale che primeggia sul piano della qualità, della sicurezza alimentare, dell'innovazione tecnologica, della sostenibilità, della biodiversità e del rispetto della tradizione. Il settore agroalimentare nel 2020 è valso in Italia il 4,3% del PIL, con l'industria alimentare che ha contribuito per il 2,1%, e il settore primario per il 2,2%. Il comparto agroalimentare italiano deve la sua importanza sia a livello domestico, sia perché funge da elemento di traino del Made in Italy per l'economia all'estero. Basti pensare che nel 2020 l'export è stato di 45 miliardi, più del 50% in più dal 2008 [S2].

L'eccellenza rappresentata dal settore agroalimentare italiano si deve a differenti fattori quali la qualità dei prodotti, la trasparenza in etichetta e dei processi produttivi, la collaborazione solida tra agricoltura e industria e il raccolto sui mercati mondiali delle eccellenze alimentari che ne esaltano l'ottima reputazione in termini di qualità, sicurezza, sostenibilità e tradizione. Esistono tre etichettature per gli alimenti riconosciute nel sistema delle Indicazioni Geografiche dell'Unione Europea:

- DOP (Denominazione d'Origine Protetta): le caratteristiche di un alimento risiedono esclusivamente in una zona di produzione circoscritta.
- IGP (Indicazione Geografica Protetta): l'alimento possiede almeno una caratteristica legata ad un territorio delimitato, sebbene alcuni step della produzione possano avvenire presso altre zone.
- STG (Specialità Tradizionale Garantita): l'alimento non ha alcuna relazione con una zona di produzione specifica, ma possiede caratteristiche che lo distinguono nettamente da prodotti analoghi.

Come si osserva dalla Figura 1, l'Italia rappresenta il primo Paese europeo per valore aggiunto nell'agricoltura e il terzo per valore della produzione nell'anno 2020.

La Figura 2 mostra che l'Italia rappresenta il Paese europeo con il maggior numero di prodotti agroalimentari a denominazione di origine e a indicazione geografica protetta riconosciuti dall'UE: 314 prodotti alimentari e 526 vini. I settori con il maggior numero di riconoscimenti sono i cereali, vini, oli extravergine di olive, formaggi, e carni fresche. Le regioni con più DOP e IGP sono Emilia-Romagna e Veneto.

D'altra parte, l'Italia rappresenta anche uno dei Paesi più colpiti dal fenomeno della contraffazione e dell'imitazione alimentare; per questo motivo sono necessarie normative e strumenti di controllo sempre più rigidi che possano eliminare questa problematica (Magagnoli, 2013). "Italian Sounding", ad esempio, è un termine utilizzato per indicare la commercializzazione da parte di alcune aziende di prodotti che portano nomi di marchi italiani ma che in realtà non sono prodotti in Italia: queste aziende vendono alimenti che con immagini o nomi evocano l'Italia su mercati internazionali spacciandoli per italiani. L'Italian Sounding, sottrae all'export italiano 60 miliardi di euro all'anno. Per fronteggiare questa problematica è fondamentale potenziare i controlli e continuare a investire sul marchio Made in Italy a livello globale.

Negli ultimi anni il settore agroalimentare ha subito delle difficoltà sia dovute alla pandemia Covid-19 che ha coinvolto l'intero Pianeta sia a causa della guerra in Ucraina. Il 2021, sebbene sia stato un anno caratterizzato da un generale clima di ripresa dalla emergenza sanitaria, ha segnato tuttavia un duro colpo all'economia agricola a causa dei fattori climatici avversi e dell'aumento dei costi di produzione. Nonostante ciò, i segnali positivi dei dati di occupazione e dei redditi agricoli hanno sollevato il comparto agroalimentare con una crescita in volume del 2,4%. Nel 2022 la guerra in Ucraina ha determinato ulteriori disagi generati dall'inasprimento dei rincari delle materie prime energetiche e dalle nuove difficoltà di approvvigionamento delle imprese. Questa circostanza ha indotto la necessità di attuare interventi di emergenza sia per supportare

l'Unione Europea ad uscire dalla crisi pandemica, sia per superare gli effetti socioeconomici determinati dalla guerra.

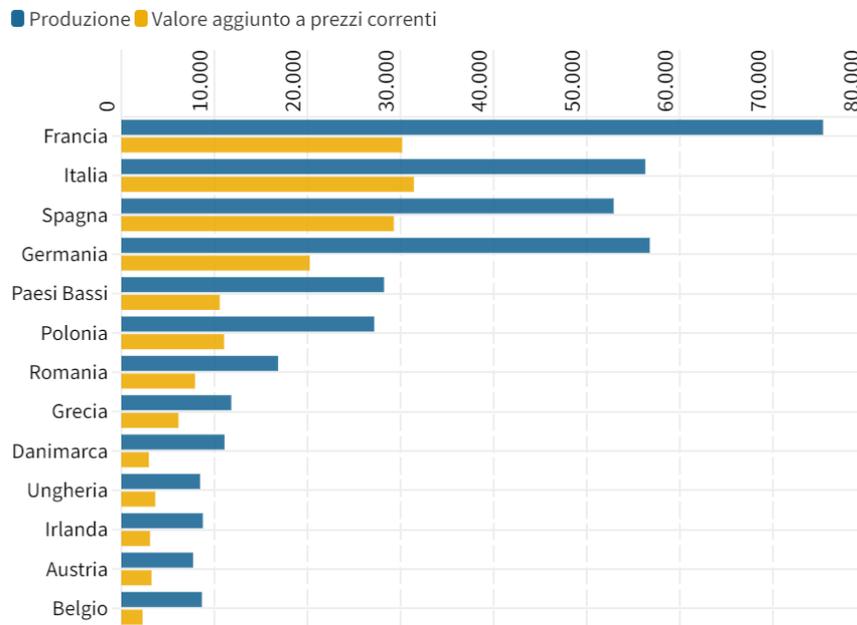


Figura 1: Lista dei Paesi Europei elencati per produzione e valore aggiunto nel 2020 (i dati sono espressi in milioni di euro) [S2].

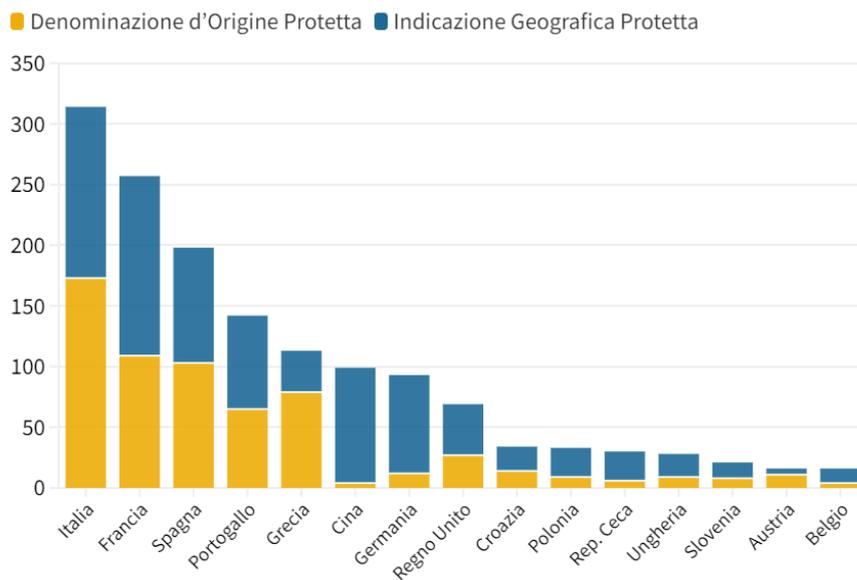


Figura 2: Elenco dei 15 Paesi con più alimenti certificati (PDO e PGI) dal sistema dell'Unione Europea, a Giugno 2022 [S2].

1.1.1. Export e import del settore agroalimentare

Il 2021 è stato un anno record sia per le importazioni che per le esportazioni agroalimentari italiane, con importazioni di 48,28 miliardi di euro (+13,6%) ed esportazioni di 50 miliardi di euro (+11,3%) [S3]. La crescita più rapida delle importazioni rispetto alle esportazioni ha frenato la tendenza al rialzo della bilancia agroalimentare, passata da un deficit di più di 6,5 miliardi di euro nel 2014 a +2,86 miliardi nel 2020. La crescita in valore degli scambi agroalimentari in Italia del 2021 rispetto al 2020 ha interessato gran parte dei principali prodotti e mercati. Le uniche eccezioni sono stati due importanti prodotti Made in Italy, le conserve di pomodoro (+0,2% in valore e -7,7% in quantità) e la pasta (con il -6,2% in valore e -12,6% in quantità) dopo il netto aumento del 2020; tuttavia il valore di export di questi due prodotti alimentari nel 2021 è stato comunque maggiore rispetto a quello registrato nel 2019. Dal punto di vista delle importazioni, l'aumento del valore degli acquisti ha interessato tutti i principali prodotti, soprattutto quelli ittici, come i crostacei e i molluschi congelati (+40,7% in valore), tra i più colpiti nel 2020 dagli effetti del lockdown (a causa delle chiusure dei canali dell'Horeca). Con tassi rispettivamente del 57,7% e del 13,2%, l'Unione Europea e il Nord America sono tra i principali mercati di riferimento per le esportazioni agroalimentari italiane. Oltre all'UE, che rappresenta il 68% delle importazioni italiane, Asia e Sud America sono i maggiori mercati di approvvigionamento dell'Italia. Gli incrementi netti di valore dei traffici agroalimentari riguardano la quasi totalità dei principali partner commerciali dell'Italia, inclusi i clienti Germania (+7,1%), Francia (+8,3%) e Stati Uniti (+14,2%), oltre ai fornitori Francia (+11,5%) e Spagna (+12%). Gli effetti della Brexit sugli scambi agroalimentari che hanno segnato il 2021, hanno provocato un dimezzamento rispetto al 2020 delle importazioni dell'Italia dal Regno Unito e una decisamente inferiore crescita delle esportazioni (+1,6%) rispetto a quella verso altri mercati. Anche la crisi russo-ucraina ha particolare influenza sugli scambi tra i due paesi. L'import agroalimentare dell'Italia dall'Ucraina nel mese di marzo 2022 ha mostrato una riduzione del 13% rispetto all'anno precedente: per esempio sono diminuite le importazioni dei principali prodotti come olio di girasole (-40,5%), pannelli di girasole e frumento tenero (-70%) e mais (-5,4%). L'export agroalimentare dell'Italia verso la Russia è diminuito negli stessi mesi riducendosi del 35% e colpendo diversi prodotti alimentari, tra cui il caffè torrefatto (-81,8% in quantità) e gli spumanti DOP (-46,4%) [S3]. La filiera agroalimentare rappresenta un primato per molti prodotti Made in Italy [S4], come le conserve di pomodoro (43% vengono vendute a livello mondiale), la pasta che rappresenta il 30% sull'export mondiale, l'olio d'oliva il 21%, il vino il 20%, i salumi il 14% e i formaggi l'11%. Le regioni italiane che vendono di più all'estero sono rappresentate da Emilia-Romagna, con 4 miliardi di export, Veneto e Lombardia, con 3,4 miliardi, Piemonte, con 3 miliardi, Campania con 2 miliardi, Toscana con 1,26 miliardi e il Trentino-Alto Adige, con 1,16 miliardi.

L'Italia rappresenta il quinto paese al mondo in quanto ad esportazioni [S4], dopo gli Stati Uniti, Germania, Paesi Bassi e Francia. L'industria alimentare, anche in un periodo complesso come l'ultimo decennio è continuata a crescere vantando un rialzo del 19%, grazie alle esportazioni volate di oltre l'80%.

1.1.1.1. L'impatto della pandemia

L'economia nazionale e internazionale ha risentito notevolmente della crisi della pandemia da Covid-19. In Italia il settore agroalimentare, anche senza mai interrompere l'attività produttiva, ha dovuto affrontare diverse problematiche gestionali e organizzative a causa delle misure che sono state necessarie per contenere il più possibile l'epidemia; sui numeri del settore gravano indubbiamente le chiusure forzate delle imprese di ristorazione e la limitazione del commercio internazionale. Secondo un rapporto di Unione italiana Food, 6 imprese su 10 denunciano un calo di produzione e fatturato e svelano una particolare preoccupazione per gli effetti a lungo termine del blocco dell'economia [S5]. Tuttavia, la filiera agroalimentare in Italia si è distinta anche durante la pandemia, tenendo alto il nome del Bel Paese. Secondo i dati Istat Coeweb l'export food e beverage nei primi sei mesi del 2020 è stato pari a 22 miliardi di euro, in crescita del 3,5% rispetto allo stesso periodo dell'anno precedente [S6]. Secondo i dati Istat Coeweb [S7] i prodotti da forno erano i prodotti maggiormente richiesti con un valore di 2,3 miliardi di euro e una crescita del 15,6%. Le maggiori vendite hanno anche interessato frutta e ortaggi lavorati e conservati, con un valore di 1,9 miliardi e un rialzo del 6%, e i prodotti delle industrie lattiero-casearie con 1,8 miliardi di export (+0,8%). Ciononostante, la chiusura di bar e ristoranti ha ridotto l'esportazione di alcuni prodotti, come ad esempio il vino che nei primi sette mesi del 2020 ha subito un calo dell'export del 4%. A livello internazionale i maggiori mercati di esportazione sono stati Giappone (+16,9%), Cina (+13,7%) e Oceania (+8%); tuttavia alti valori di esportazione di prodotti alimentari italiani hanno interessato anche i mercati di riferimento quali Germania (+6,7%), Svizzera (+5,7%), Stati Uniti e Francia (+4,2%). I settori colpiti maggiormente dalla pandemia sono state le attività secondarie di supporto agriturismo, commercializzazione, contoterzismo con un -20,3%, il settore florovivaistico (-8,4%) e i servizi di supporto all'agricoltura (-4,1%).

Per quanto riguarda l'Europa in generale, la filiera agroalimentare è riuscita complessivamente ad affrontare le conseguenze economiche della pandemia, sebbene è stata costretta a fronteggiare delle sfide legate alla carenza di manodopera per le restrizioni alla circolazione, all'incremento della domanda dei generi alimentari (a causa della corsa agli acquisti da parte dei consumatori), al rallentamento della produzione dei generi alimentari a causa dei focolai negli stabilimenti, e ai ritardi nella fornitura dei generi alimentari. I lavoratori del primario hanno subito perdite importanti, ad esempio gli agricoltori che si sono trovati davanti chiusure improvvise dei canali commerciali (come la ristorazione) e interruzioni della catena di approvvigionamento che hanno portato ad eccedenze produttive poi necessariamente smaltite. Durante la pandemia il settore dei servizi di ristorazione è stato fortemente colpito: bar, mense e ristoranti hanno chiuso i locali per molti mesi e sono stati soggetti a restrizioni che ne limitavano l'apertura. Sebbene i venditori al dettaglio del settore alimentare siano stati autorizzati a rimanere aperti, i tradizionali modelli commerciali sono passati sempre più al commercio elettronico attuando inoltre strategie di approvvigionamento locali. Mentre alcuni settori hanno visto diminuire la propria produzione, per altri è stato il contrario. Nel 2020 il valore della produzione del settore agricolo è diminuito del 1,4% (sebbene sia aumentato del 2,9% rispetto alla media del periodo 2015-2019) e i redditi agricoli del 7,9% rispetto all'anno precedente. Perdite più o meno importanti le hanno subite

anche la produzione di alimenti e bevande (con una perdita del -9% nel secondo trimestre del 2020 rispetto all'anno precedente) e il settore dei servizi di ristorazione (con perdite del 60-90% rispetto al 2019). Al contrario, le vendite al dettaglio e le vendite online di generi alimentari sono aumentate, queste ultime registrando la crescita più grande durante i primi mesi della pandemia (+45%). Anche le preferenze dei consumatori sono state influenzate dall'avvento della pandemia da Covid-19: i consumatori hanno dimostrato un crescente interesse nei prodotti più salutari e nell'acquisto di generi alimentari online o nei minimarket. I prezzi sono diventati una variabile determinante per le fasce a basso reddito nelle scelte alimentari, a scapito di alternative più salutari. Secondo uno studio recente (Montanari et al., 2021), nel 2020 nonostante la pandemia, la produzione, gli scambi e i prezzi in tutti i settori alimentari sono rimasti stabili. Secondo l'indice dei prezzi alimentari della FAO, nel mondo si è persino registrata una tendenza all'aumento; tuttavia, alcuni settori hanno risentito maggiormente della crisi. Per quanto riguarda il settore vitivinicolo, i valori della produzione dell'UE e delle esportazioni verso paesi terzi sono diminuiti rispettivamente del 5% e del 2% nel 2020, rispetto alla media 2015-2019. Fortemente dipendente dai servizi di ristorazione per la vendita di vini premium, questo settore ha dovuto fronteggiare sfide significative durante la pandemia, anche a causa della mancanza di sostegno finanziario supplementare e degli ostacoli agli scambi. L'industria della carne bovina è stata particolarmente condizionata dalla chiusura dei ristoranti: nell'anno 2020, la produzione dell'UE e il commercio intra-UE di questi prodotti sono diminuiti rispettivamente del 6% e del 7% rispetto alla media 2015-2019. Durante la pandemia il consumo di zucchero è diminuito, determinando livelli di produzione inferiori (-12% rispetto alla media 2015-2019) e contribuendo ad una perdita di valore del -44% rispetto alla media 2015-2019. Infine, un altro settore da citare è l'industria florovivaistica dei prodotti ornamentali che ha subito perdite economiche pari a circa 4,12 miliardi di EUR solo nella prima ondata.

Al fine di attenuare gli effetti negativi della pandemia, l'Unione Europea ha adottato delle strategie come, ad esempio, le cosiddette “corsie verdi”¹ per il sistema di trasporto e lo sviluppo di orientamenti comuni relativi alla manodopera del settore agroalimentare, come per esempio i lavoratori stagionali.

1.2. Le richieste dei consumatori: l'accettabilità dei prodotti alimentari

L'innovazione tecnologica, la crescita demografica e dei redditi e l'urbanizzazione hanno trasformato gli stili di vita e le abitudini alimentari dei consumatori, recando nuove sfide e opportunità a tutti gli attori della filiera agroalimentare. Negli ultimi decenni sono cambiate le aspettative dei consumatori nei confronti degli alimenti: le loro aspettative, correlate sempre più all'etica, alla salute e al rispetto dell'ambiente, sono diventate maggiormente selettive dal punto di vista della produzione, della trasformazione e del trasporto. I consumatori desiderano che i prodotti alimentari soddisfino le loro aspettative e garantiscano allo stesso tempo convenienza, qualità, salubrità, servizi e varietà. Fattori che influenzano le scelte dei consumatori sono anche correlati al

¹Con “corsie verdi” (o “green lanes”) vengono definite tutte le frontiere interne che fanno parte delle reti di trasporto transeuropee (TEN-T) con il ruolo di consentire la libera circolazione delle merci, comprese i beni essenziali come i prodotti alimentari e le forniture mediche in maniera che arrivino a destinazione rapidamente e senza ritardi.

fatto che i prodotti devono rispettare il benessere animale, la sostenibilità ambientale e gli standard di lavoro. Sia i consumatori sia la società nel suo complesso sono sempre più attenti agli agricoltori, ai distributori, ai governi e ai trasformatori per quanto riguarda sia i processi produttivi che i prodotti che vengono immessi al consumo. Le industrie alimentari intendono prevedere le future tendenze dei consumatori e le emergenti opportunità di mercato. I governi intendono assicurare l'accesso a cibi salubri e sicuri e al contempo un sistema agroalimentare efficiente; per questo motivo le imprese agroalimentari sono chiamate a rispondere. Il collegamento principale tra filiera di produzione e consumatori sono i distributori dei prodotti alimentari che rappresentano quindi i responsabili dell'interpretazione della domanda dei consumatori alla filiera in un mercato sempre più competitivo. Le esigenze dei consumatori diventano sempre più complesse, di conseguenza lanciare i prodotti sul mercato diventa sempre più impegnativo. I consumatori hanno iniziato a richiedere prodotti a basso contenuto calorico, senza additivi, non OGM, freschi e non si tratta solamente di una moda passeggera; i compratori diventano sempre più coscienti e durante l'acquisto dei prodotti si orientano sul benessere, sulla salute e sui problemi sociali (Guido et al., 2009). Questa tendenza dei consumatori vincola le aziende alimentari a bandire definizioni vaghe e fuorvianti. Di conseguenza è necessaria la produzione di etichette che siano al contempo chiare e complete e che soddisfino le richieste dei consumatori di prodotti privi di coloranti, sostanze chimiche aggiunte e ingredienti non necessari. Le etichette e gli imballaggi hanno un importante ruolo nel soddisfare le normative in materia di produzione alimentare e sono in generale divise in due parti: etichettatura e sicurezza alimentare. L'etichettatura consiste nell'aiutare i consumatori a prendere decisioni consapevoli e informate evitando il consumo di ingredienti potenzialmente dannosi (come gli allergeni); la sicurezza alimentare possiede normative definite per impedire la produzione di alimenti contaminati. Le aziende alimentari e delle bevande sono quindi continuamente sotto sfida poiché ciò che oggi rappresenta qualcosa di attuale e corretto non è detto che lo sia un domani. Tuttavia, nonostante i cambiamenti dei gusti dei consumatori e delle normative, è necessario fornire in maniera costante etichette che siano chiare, conformi e convincenti.

1.3. L'alimentazione sostenibile

L'alimentazione sostenibile è un tema attuale di estrema importanza e correlato a molti argomenti del presente lavoro di tesi. Soprattutto in un'epoca caratterizzata da grandi consumi, l'alimentazione sostenibile è fondamentale e può risolvere molte problematiche presenti a livello mondiale. Da una parte esistono gli alimenti sostenibili, dall'altra sussiste la possibilità di ridurre con soli piccoli sforzi l'impatto devastante che ha l'alimentazione globale sulla terra. Al giorno d'oggi esistono parti del mondo che vivono una ricchezza alimentare ai limiti della realtà dove si combatte contro la malnutrizione a causa del sovrasfruttamento delle risorse disponibili. E lo stile alimentare ha un impatto distruttivo sui polmoni del pianeta e degli oceani. Davanti a questi problemi è possibile escogitare delle soluzioni ma con il contributo di tutti, attraverso l'alimentazione sostenibile.

Sviluppo sostenibile e alimentazione sostenibile sono due questioni strettamente collegate tra loro. A partire dal concetto di sviluppo sostenibile (ovvero “lo sviluppo in grado di soddisfare i bisogni delle generazioni attuali senza compromettere la possibilità che le generazioni future riescano a soddisfare i propri” (Brundtland, 1987)), per quel che riguarda gli aspetti ambientali, l'alimentazione sostenibile rappresenta lo stile alimentare che riduce al minimo il consumo di acqua, suolo ed energia, limita l'uso di additivi e pesticidi, riduce gli allevamenti e la pesca intensivi e frena le emissioni di anidride carbonica. Scegliere l'alimentazione sostenibile vuol dire sì nutrirsi di alimenti biologici e sani ma anche fare passi avanti nella conservazione dell'ecosistema e della biodiversità. Solo 300 anni fa il concetto di sostenibilità alimentare rappresentava un paradosso poiché in quell'epoca gli alimenti erano prodotti seguendo la natura e i sistemi agricoli impiegati rispettavano l'ecosistema. Al giorno d'oggi, invece, con l'aumento della popolazione mondiale e con la crescente richiesta di elevate quantità di alimenti anche al di fuori della loro stagionalità, si sono affermati modelli che non rispettano il Pianeta. Al giorno d'oggi un'alimentazione sostenibile rappresenta il primo passo per garantire al Pianeta il benessere che merita. Rappresenta una scelta consapevole che parte da quello che ognuno porta sulla propria tavola ed è fondamentale anche per la nostra salute poiché noi “siamo quello che mangiamo” (dal filosofo tedesco Ludwig Feuerbach).

I principi dell'alimentazione sostenibile possono essere spiegati attraverso i seguenti concetti:

- Territorio: favorire i prodotti agroalimentari del territorio al fine di diminuire l'emissione di anidride carbonica attraverso la limitazione dei trasporti.
- Stagionalità: promuovere i prodotti di stagione che offrono più nutrienti, più sapore e meno emissione di anidride carbonica rispetto a prodotti che invece derivano da coltivazioni forzate.
- Biodiversità: “sfruttare” il più possibile tutto ciò che un territorio può offrire, ovvero inserire una varietà e diversità di ingredienti nella dieta consumati tutti nella stessa quantità senza stressare l'ecosistema.
- Riduzione degli sprechi: ridurre gli sprechi e le perdite alimentari.
- Riduzione di allevamenti e pesca intensivi: la pesca e gli allevamenti intensivi provocano un aumento delle emissioni di gas serra, e un consumo eccessivo di acqua originando centinaia di tonnellate di rifiuti che il Pianeta non è più in grado di sostenere. In tal senso l'alimentazione sostenibile appoggia i pescatori e gli allevatori locali nonché il consumo di vegetali limitando l'impiego di carne e pesce.

La sostenibilità alimentare promuove l'agricoltura e l'allevamento BIO ovvero le tecniche di coltivazione e di allevamento che rispettano i cicli naturali e limitano l'utilizzo di additivi, fertilizzanti, OGM (Organismi Geneticamente Modificati) e pesticidi. Attraverso il settore biologico certificato che è in crescita, viene promossa un'alimentazione in grado di assicurare il consumo di prodotti naturali dal punto di vista nutrizionale ed etico, garantendo la possibilità di consumare meno e con più qualità. Si opta per soluzioni che allo stesso tempo proteggano suolo e risorse idriche evitando sistemi che distruggano l'ambiente, producano basse emissioni di azoto e carbonio e siano attenti alla conservazione della biodiversità. L'impiego di pesticidi e fertilizzanti causa l'uccisione di insetti efficaci per alcune colture e la diminuzione dei naturali nutrienti dei cibi. In Italia stanno crescendo sempre di più il numero di coltivazioni biologiche. Nel concetto

di sostenibilità alimentare anche l'allevamento biologico rappresenta un obiettivo importante, e può essere conseguito attraverso il divieto di allevamento di razze ottenute da manipolazione genetica e attraverso l'allevamento del bestiame con uno spazio sufficiente, all'aria aperta e nutrito con foraggio biologico. Tramite la sostenibilità alimentare sta nascendo una cultura alimentare differente in cui la strada che gli alimenti percorrono (dal produttore al consumatore) sta progressivamente diminuendo: questa nuova cultura alimentare è fondata sulla riduzione degli sprechi e sulla selezione attenta dei prodotti biologici e di chi li fornisce. Il mercato guarda sempre di più a soluzioni che siano a km 0, riducendo i costi di trasporto, stoccaggio e conservazione e al contempo valorizzando il lavoro delle produzioni locali.

1.4. Qualità alimentare

La crescente richiesta di prodotti sani, sicuri, nutrienti e ottenuti nel rispetto dell'ambiente e nel benessere degli animali da parte dei consumatori, ha fatto sì che la qualità alimentare ha subito un'evoluzione nel tempo.

La qualità di un prodotto alimentare è definita dalla norma UNI EN ISO 8402 (1995) come "l'insieme delle proprietà e caratteristiche di un prodotto che gli conferiscono l'attitudine a soddisfare bisogni espressi o impliciti". In realtà la definizione di qualità dei prodotti agroalimentari non è e non può essere univoca. A seconda che sia di natura oggettiva (che dipende dall'alimento) o di natura soggettiva (che dipende dalle aspettative e dai gusti del consumatore) la qualità alimentare è caratterizzata da aspetti differenti. Al fine di valutare la qualità di un prodotto alimentare si deve considerare sia la qualità oggettiva che utilizza metodi obiettivi basati su test scientifici dalle quali la percezione umana è esclusa, sia la qualità soggettiva in cui la valutazione della qualità si basa sull'opinione dei consumatori, racchiudendo gli organi sensoriali, le preferenze personali e il contributo della percezione. Da un lato è necessario quindi considerare le caratteristiche oggettive e misurabili degli alimenti, dall'altro si deve tener conto anche della qualità soggettiva caratterizzata da fattori non sempre misurabili ma che consentono ad uno specifico prodotto alimentare di essere percepito come di qualità superiore rispetto ad altri. Le caratteristiche soggettive di qualità possono, da un lato, rappresentare un'opportunità per il marketing agroalimentare, e dall'altro, possono portare il consumatore, sempre più attento e consapevole, a pagare un premium price per un prodotto di qualità maggiore. Spesso però questi attributi soggettivi rappresentano un ostacolo per le aziende poiché non facili da identificare e valutare.

In ogni fase della filiera esistono dei fattori che contribuiscono a determinare la qualità di un alimento. I principali fattori sono (Terreri, 2020):

- **Origine:** rappresenta un aspetto implicito dell'alimento e l'espressione della tipicità di alcuni prodotti legati alla conservazione delle produzioni autoctone e delle lavorazioni tramandate da generazioni e alla territorialità, portando alcuni prodotti ad essere riconosciuti con Marchi di Qualità ufficialmente accreditati. L'Italia detiene la leadership europea nei prodotti a Denominazione di Origine Protetta (DOP) e Indicazione Geografica Protetta (IGP), a dimostrazione dell'elevata qualità dei nostri prodotti e, soprattutto, del forte legame che lega le eccellenze agroalimentari italiane al proprio territorio

d'origine. Questi riconoscimenti consentono di valorizzare la produzione agricola e i produttori, salvaguardando allo stesso tempo i nomi dei prodotti contro le imitazioni e l'uso improprio e assistendo i consumatori nel riconoscere e selezionare la qualità.

- **Nutrizione:** un altro aspetto importante per la qualità di un alimento sono le sue proprietà nutritive, determinate dal contenuto in macro e micronutrienti nonché dalle sue capacità di apportare benefici alla salute.
- **Igienicità:** un alimento non deve presentare rischi per la salute, né contaminazione chimica e microbica. Quindi un alimento deve rispettare requisiti d'igiene minimi stabiliti dalla legge. Tutto questo risponde al concetto di sicurezza alimentare che deve essere garantita lungo tutte le fasi della filiera. Lo strumento per garantire l'igiene, adottato obbligatoriamente da tutti gli operatori del sistema alimentare, è rappresentato dal sistema HACCP.
- **Qualità merceologica:** la conformità delle caratteristiche tecnologiche e commerciali di un determinato prodotto agli standard stabiliti per la sua categoria di riferimento determina la qualità merceologica. Per il consumatore la shelf-life di un prodotto alimentare è fondamentale perché fornisce informazioni sulla sua conservazione.
- **Ambiente:** è la qualità relativa alla sostenibilità ambientale e all'ecocompatibilità delle tecniche agricole e di produzione. Secondo la FAO (l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura), una dieta che garantisca la massima sostenibilità ambientale deve avere un basso impatto ambientale ed essere nutrizionalmente adeguata, pur rimanendo economicamente sostenibile, facilmente accessibile e culturalmente accettabile.
- **Eticità:** L'etica alimentare implica affrontare un bisogno universale di cibo nutriente. L'agricoltura e l'allevamento intensivo, che rappresentano letteralmente la negazione delle condizioni biologiche di vita, sono le attività umane più dannose per l'ambiente. Anche il trattamento dei lavoratori agricoli e il loro equo compenso, così come la salute e il benessere degli animali da allevamento, rappresentano tutte questioni che rientrano nella qualità etica.
- **Qualità organolettica:** è la qualità determinata dalla valutazione da parte del consumatore di specifiche caratteristiche alimentari come l'aspetto, il gusto, l'aroma e la consistenza percepite dagli organi di senso (qualità sensoriale). Si tratta di valutazioni soggettive fortemente influenzate da fattori psicologici, sociali e culturali.

Spesso il concetto di qualità e superiorità di prodotto viene abusato, attraverso l'associazione di espressioni del tipo "prodotto artigianale" o "di qualità superiore" a elementi come l'origine delle materie prime o a fasi secondarie del processo che in realtà non hanno nessuna incidenza reale sulla qualità del prodotto finito. E ciò va a discapito della corretta tutela dei consumatori e dei produttori più onesti. Nel settore alimentare non si può parlare di una qualità "migliore" e di una "peggiore" ma di qualità diverse tra loro. Gli strumenti a disposizione per l'identificazione della qualità nel settore agroalimentare (ad esempio, DOC, DOP, STG, BIO IGP, ecc.) non consentono necessariamente di ottenere una graduatoria tra i prodotti differenti. Inoltre, la

qualità di un prodotto non può essere considerata stabile nel tempo: a causa della soggettività della percezione e della valutazione, un prodotto può aumentare o diminuire il suo apprezzamento anche senza variare le sue caratteristiche. Soddisfare la domanda di qualità rappresenta un quesito complesso poiché è correlato da molti fattori di tipo chimico-fisico, tecnologico, nutrizionale, sanitario, sensoriale difficili da poter definire in maniera univoca e variabili nel tempo.

1.4.1. Sicurezza alimentare

Un prerequisito della qualità è rappresentato dalla sicurezza alimentare. La sicurezza alimentare (Food Security) rappresenta la possibilità di assicurare alle persone in maniera regolare alimenti e acqua al fine di soddisfare il fabbisogno energetico di cui l'organismo necessita per vivere in condizioni igieniche adeguate. La definizione comunemente accettata è stata proposta in occasione del vertice mondiale sull'alimentazione (World Food Summit) nel 1996 a Roma dalla FAO (Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura) secondo la quale la sicurezza alimentare vuole "assicurare a tutte le persone e in ogni momento una quantità di cibo sufficiente, sicuro e nutriente per soddisfare le loro esigenze dietetiche e le preferenze alimentari per una vita attiva e sana". Questa definizione proposta della FAO (accolta anche da altre agenzie internazionali come l'ONU) voleva trovare delle soluzioni alle conseguenze negative delle politiche agricole per l'autosufficienza alimentare che erano state portate avanti nei trent'anni precedenti, quali i danni ambientali dovuti all'estensione dell'agricoltura di piantagioni di tipo industriale a scapito dell'agricoltura familiare di sussistenza, la diffusione di fertilizzanti e pesticidi, e le difficoltà agricole dei paesi più poveri. In realtà si devono tenere conto due aspetti della sicurezza alimentare: il concetto di "food security" ovvero la sicurezza degli approvvigionamenti, cioè la disponibilità di alimenti in quantità adeguata a soddisfare i bisogni basilari; e "food safety" ovvero l'assenza di possibili effetti negativi sulla salute umana. Uno dei cambiamenti maggiori nella politica agroalimentare dell'UE negli ultimi decenni è rappresentato proprio da questi due termini: si è passati in poco tempo dall'attenzione sulla quantità di cibo disponibile alla qualità intesa nel senso di sicurezza sanitaria. Negli obiettivi della PAC (Politica Agricola Comune) del Trattato di Roma del 1957 si leggeva "garantire la sicurezza degli approvvigionamenti"; nella ridefinizione nella stesura di Agenda 2000 si legge "la salute, in particolare la sicurezza degli alimenti, costituisce la principale preoccupazione". La sicurezza degli alimenti è regolamentata da norme europee specifiche che interessano tutta la filiera in maniera completa, dalla produzione alla commercializzazione. Importante è il Regolamento (Ce) n. 178/2002, che rappresenta una vera e propria "legge quadro" in materia, e traccia i principi generali di una nuova legislazione alimentare, istituendo l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (European Food Safety Agency: EFSA) e definendo procedure in materia di sicurezza degli alimenti. Una delle innovazioni del Regolamento è nell'imposizione della "rintracciabilità" degli alimenti durante tutti gli step della filiera alimentare, consentendo, nei casi di emergenza, ritiri dal mercato di lotti specifici di prodotti, evitando così interventi drastici e distruttivi. Il Regolamento 178/2002 ha permesso anche la nascita di uno strumento di scambio delle informazioni riguardante le misure adottate in risposta all'individuazione di un rischio connesso con alimenti o mangimi a

tutte le autorità preposte al controllo degli stessi nei diversi Paesi attraverso la creazione di un “Sistema di allerta rapido per alimenti e mangimi” (Rapid Alert System for Food and Feed: RASFF).

La sicurezza alimentare può essere ottenuta attraverso controlli integrati, interventi basati sull’analisi del rischio, responsabilità degli operatori, rintracciabilità del prodotto lungo la filiera, partecipazione attiva del consumatore alla catena. Per documentare l’igienicità dei processi esiste il sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points), ovvero un sistema di autocontrollo delle aziende del settore alimentare che ha lo scopo di monitorare e intervenire in caso di non conformità e prevenire i rischi per la salute dei consumatori.

Grande attenzione alla sicurezza alimentare deriva anche dai cambiamenti che si sono verificati nel tempo all’interno del settore agroalimentare. In pochi decenni la distanza tra produttore e consumatore è progressivamente aumentata portando a variazioni significative nel sistema informale di garanzie che in passato invece era maggiormente garantito. Quindi nel tempo c’è stata una crescente distanza tra personale e consumatori; l’acquisto dei prodotti avviene maggiormente all’interno di punti vendita dalla GDO. Mentre in passato gli elementi di garanzia offerti da un prodotto erano più legati a rapporti personali, oggi sono stati sostituiti dai diversi tipi di marchio e dalle informazioni portate in etichetta. Da questa maggiore spersonalizzazione e anche la maggiore globalizzazione ne è derivata una percezione diversa dei rischi e una maggiore difficoltà dei controlli. Spesso l’opinione pubblica esprime confusione sulla qualità dei prodotti importati o di origine sconosciuta, e manifesta profonda preoccupazione quando percepisce incertezza su alcuni aspetti qualitativi di prodotti alimentari che utilizzano, anche se solo parzialmente, materie prime agricole di origine lontana.

1.4.2. Valutazione della qualità oggettiva attraverso i markers molecolari

Al fine di garantire che un prodotto artigianale o di qualità superiore rispetti realmente le caratteristiche evocate dalla sua definizione, è necessario introdurre strumenti specifici che abbiano lo scopo di tutelare congiuntamente sia i consumatori che i produttori. Per valutare la qualità di un prodotto alimentare si utilizzano dei parametri strumentalmente misurabili che valorizzino il prodotto e lo tutelino sul mercato.

I parametri di qualità che vengono misurati tramite procedure standard sono definiti “indicatori convenzionali” e sono rappresentati ad esempio dal colore, dalle proprietà in texture, ecc., ovvero da tutti quei fattori provenienti dalla percezione dei consumatori (qualità percepita). Tuttavia, oltre a questi parametri è possibile ottenere ulteriori informazioni sulle caratteristiche e la “storia” di un prodotto alimentare mediante lo studio di markers molecolari che sono considerati degli indicatori innovativi e possono essere suddivisi in due categorie:

- I markers di prodotto: composti chimici caratteristici di un determinato prodotto o di un ingrediente e che possono essere assunti come traccianti nell’alimento finito.

- I markers di processo: molecole di neo-formazione derivanti da reazioni indotte dal processo oppure molecole naturalmente presenti nell'alimento e modificate durante la lavorazione.

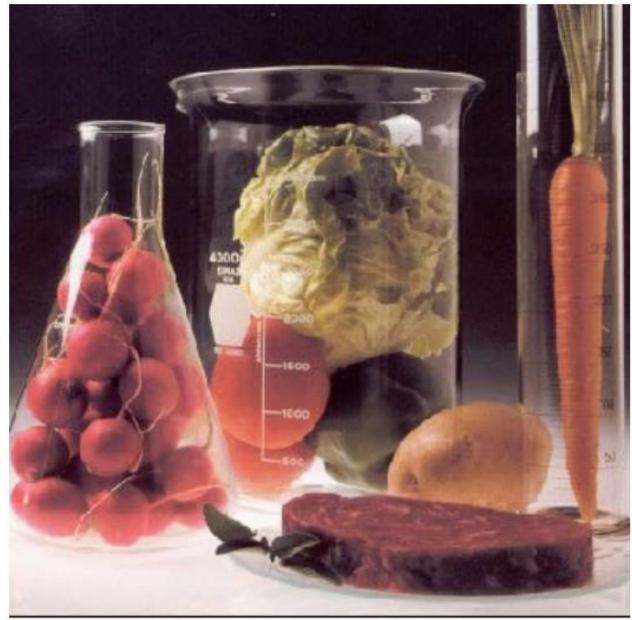
Da una valutazione attenta degli indicatori convenzionali si vede come i controlli eseguiti di routine dai produttori siano principalmente incentrati su fattori correlabili alla "qualità percepita", ovvero quella richiesta dal consumatore. Questi controlli trascurano completamente gli aspetti nutrizionali e tecnologici che contribuiscono in maniera significativa alla qualità totale di un prodotto alimentare. Tali aspetti nutrizionali e tecnologici sono fondamentali poiché, benché non percepiti in maniera diretta al momento del consumo, rappresentano un valore aggiunto che servirebbe a differenziare ad esempio i prodotti premium price da quelli a basso costo, o un prodotto con proprietà nutrizionali superiori rispetto ad un altro. Il flavour, ovvero la combinazione di sapore e aroma, è un altro parametro sensoriale che gli indicatori convenzionali non tengono conto ma che rappresenta un'importante proprietà che ha un grande impatto sulle preferenze del consumatore.

Quindi i markers molecolari di prodotto e/o processo sono necessari per la valutazione della qualità totale. Mediante la misura di questi indicatori è possibile definire diverse classi merceologiche, valutare la genuinità, la salubrità e la shelf life dei prodotti, nonché accertare la corretta denominazione di molti alimenti (es. imitazione fraudolenta di prodotti a marchio D.O.P. o I.G.P.), e infine monitorare e descrivere i processi ed i meccanismi di reazione che avvengono durante i trattamenti tecnologici.

In letteratura sono da tempo noti differenti markers molecolari impiegati per descrivere i processi produttivi, come ad esempio i prodotti che derivano da reazioni chimiche come la reazione di Maillard (Mesias-Garcia et al., 2010), l'ossidazione lipidica (Pignoli et al., 2009), i composti di neo-formazione che generano il flavour e gli aromi (Moreno et al., 2005), le sostanze che provengono dai trattamenti microbiologici come le fermentazioni (De Clippeleer, 2013) e i prodotti che causano una diminuzione del valore nutrizionale (Erbersdobler & Somoza, 2007). I markers molecolari sono utili quindi per discriminare differenti prodotti presenti sul mercato, proprio grazie alle loro uniche caratteristiche di formazione, chimiche, biologiche e biochimiche. Possiedono un compito importante sia nel valutare la qualità e la sicurezza dei prodotti alimentari, sia per tenere sotto controllo la shelf-life dei prodotti, e sia per descrivere i meccanismi di reazione che avvengono durante i trattamenti tecnologici e termici che provocano alterazioni della qualità nutrizionale e organolettica dei prodotti finiti.

CAPITOLO 2

Metodologie sperimentali



Nel presente lavoro di tesi sono state adoperate differenti metodologie sperimentali per gli studi condotti, a seconda delle matrici utilizzate e degli analiti di interesse. Inizialmente ciascuna tipologia di matrice alimentare è stata studiata in bibliografia per avere un quadro definito del suo stato dell'arte. I campioni sono stati sottoposti al più adeguato trattamento e perciò preparati e conservati in maniera più conforme possibile per minimizzare la degradazione o la variazione degli analiti di interesse. Successivamente i campioni sono stati sottoposti a tecniche di estrazione e analisi. I dati ottenuti dalle analisi sono stati in seguito elaborati tramite dei modelli statistici e chemiometrici al fine di poter ottenere i risultati desiderati. In particolare, le analisi sono state condotte tramite strumentazione HS-SPME/GC-MS per studiare i composti volatili caratterizzanti le differenti matrici merceologiche (il c.d. *flavour*); ASE/HPLC-DAD per lo studio di molecole più grandi come p.e. gli antiossidanti o gli acidi grassi. L'analisi chimica è importante per poter identificare e quantificare gli analiti di interesse in una matrice alimentare. Ma i risultati di un'analisi sono altamente influenzati da come i campioni vengono preventivamente trattati. È necessaria, infatti, una adeguata preparazione dei campioni e un'estrazione ottimale al fine di ottenere rese analitiche dalla matrice le più alte possibili e poter condurre successivamente un'analisi qualitativa e/o quantitativa. L'elaborazione dei dati tramite modelli statistici è fondamentale poiché permette la lettura e il processamento dei risultati ottenuti. Nel presente capitolo verranno spiegati i concetti teorici dei metodi chimici e chemiometrici impiegati.

2.1. Tecniche estrattive

Le tecniche di estrazione svolgono un ruolo importante nella chimica analitica e merceologica. Esse vengono largamente utilizzate nell'analisi degli alimenti poiché permettono la purificazione e l'estrazione dei composti d'interesse dalle matrici di partenza. Le tecniche estrattive sono numerose e la scelta della tecnica più adatta dipende dal problema analitico che si vuole affrontare. Sebbene lo sviluppo delle tecniche strumentali sia in continua crescita, i metodi tradizionali sono tuttora utilizzati in molti laboratori. La chimica degli alimenti prevede la ricerca di informazioni e dati sperimentali attraverso l'esecuzione di esperimenti accuratamente eseguiti e i progressi nelle tecniche strumentali migliorano sicuramente la qualità di tali informazioni. La fase di estrazione in un esperimento analitico rappresenta una fase cruciale dell'intera procedura di analisi, sebbene solo negli ultimi decenni è stato riconosciuto il suo ruolo nel generare informazioni analitiche di qualità. L'estrazione chimica ha il compito di isolare gli analiti oggetto di studio dai restanti componenti del campione, potenzialmente interferenti, portando tali sostanze ad avere una "forma" adatta per l'analisi. Le tecniche moderne di estrazione per l'analisi cromatografica utilizzano processi di trasferimento di massa che possono essere: per principio di partizione in cui gli analiti sono rimossi dai campioni mediante dissoluzione in un solvente, attraverso l'adsorbimento dove gli analiti sono legati o trattenuti sulla superficie solida e infine tramite volatilizzazione dove i composti volatili vengono vaporizzati e separati dalla matrice e dai composti interferenti (De Oliveira et al., 2006). Negli ultimi anni, sono state implementate nuove procedure al fine di sostituire le classiche tecniche di estrazione con tecniche innovative come l'estrazione Soxhlet automatizzata, l'estrazione a microonde, l'estrazione con sonicazione, e l'estrazione con fluido supercritico. Ciascuna delle

tecniche menzionate permette la riduzione del volume del solvente di estrazione richiesto e del tempo di preparazione dei campioni. Nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate due tecniche estrattive ciascuna adoperata a seconda dello studio in considerazione: l'estrattore ASE che coinvolge l'utilizzo di solventi e l'HS-SPME una tecnica solvent-free per l'analisi dei composti volatili.

2.1.1. Microestrazione in fase solida dello spazio di testa (HS-SPME)

La microestrazione in fase solida (SPME) è una tecnica di estrazione inventata nel 1989 da Pawliszyn e i suoi collaboratori all'Università di Waterloo in Canada. L'SPME è nata per rispondere alla crescente esigenza di metodi analitici affidabili e rapidi ed è stata per la prima volta utilizzata per applicazioni di analisi alimentari e ambientali, e solo successivamente impiegata anche in altri campi della chimica analitica. Viene oggi utilizzata di routine in accoppiamento con la gascromatografia per l'analisi di numerose sostanze, in particolare per l'estrazione di composti organici volatili e semivolatili in campioni alimentari, ambientali e biologici. Ha acquisito una crescente popolarità proprio grazie alla sua semplicità, efficienza, velocità, sensibilità e al fatto di non richiedere l'uso di solventi. I primi lavori scientifici adoperavano fibre ottiche di silice fusa rivestite con fasi stazionarie polimeriche. Queste fibre venivano immerse in campioni acquosi e successivamente introdotte nell'iniettore del GC. Tali fasi stazionarie però richiedevano l'apertura dell'iniettore con una conseguente perdita di pressione che danneggiava l'intera analisi (Risticovic et al., 2009). Con l'incorporazione della fibra all'interno di un ago di una siringa (holder), la tecnica SPME ha subito un cambiamento radicale: la Figura 3 mostra lo schema della prima versione commerciale del dispositivo SPME introdotto da Supelco nel 1993, nonché il primo dispositivo più simile a quelli odierni. Attraverso l'SPME si può eseguire in un unico passaggio il campionamento, l'estrazione e la concentrazione di un campione. L'estrazione degli analiti avviene su uno strato polimerico assorbente di una fibra di silice fusa solida; dopo un tempo definito viene raggiunto l'equilibrio e la quantità di analiti estratta è costante, massimizzata e proporzionale alla concentrazione di analiti nel campione. Successivamente avviene il desorbimento durante il quale la fibra SPME e gli analiti assorbiti sono trasferiti in un sistema di iniezione che desorbe gli analiti nella fase gassosa (elio) di un gas cromatografo. Secondo i principi teorici dell'SPME, per un certo periodo di tempo una piccola quantità di fase estratta sulla fibra associata con un supporto solido è posta in contatto con la matrice del campione. Se il periodo di tempo è sufficientemente lungo, si stabilisce un equilibrio di concentrazione tra la fase di estrazione e la matrice del campione. Dopo che l'equilibrio viene raggiunto, la quantità di analiti è massimizzata, ovvero se viene esposta la fibra per un tempo più lungo non vengono accumulati più analiti (Pawliszyn, 2000). Assumendo che il volume del campione sia molto maggiore del volume dello strato SPME, la quantità di analita nello strato SPME all'equilibrio ($M_{i,SPME}$) può essere approssimata dalla seguente equazione:

$$M_{i,SPME} \approx K_{i,SPME} V_{SPME} C_i$$

Dove $K_{i,SPME}$ è la costante di distribuzione aggregata dell'analita tra lo strato assorbente SPME e il campione, V_{SPME} è il volume dello strato SPME, e C_i è la concentrazione dell'analita nel campione prima di eseguire il campionamento SPME (Majors, 2013).

Nel processo di campionamento SPME (Figura 4), un volume noto di campione viene posto all'interno di una vial chiusa ermeticamente con un tappo a corona (ad esempio una ghiera di alluminio) dotato di setto (ad esempio in PTFE/silicone). A questo punto si susseguono i vari step. Durante l'iniziale fase di incubazione, dopo che il campione è stato trasferito nella vial, si instaura un equilibrio dinamico tra la fase liquida e la fase gassosa del campione (spazio di testa) e gli analiti si distribuiscono tra le due fasi a contatto. Dopo un certo tempo avviene la fase di estrazione, ovvero la microestrazione in spazio di testa (HS-SPME) che viene effettuata esponendo la fibra alla fase vapore in equilibrio con la soluzione, sulla base del principio di ripartizione. Una volta raggiunto l'equilibrio tra le concentrazioni di analita nella soluzione e nella fibra, l'estrazione è finita. Infine, si passa alla fase di desorbimento termico nell'iniettore del gascromatografo. Nel momento in cui la fibra viene posta a contatto con il campione, avviene la partizione tra la matrice e la fase stazionaria. Ciò può avvenire in due modalità: spazio di testa (HS-SPME) o immersione diretta (DI-SPME). Nel caso della tecnica di estrazione spazio di testa (HS-SPME), utilizzata in questo studio, la fibra viene esposta nella fase vapore del campione che può essere gassoso, liquido o solido. Solitamente i campioni vengono sottoposti ad agitazione al fine di limitare il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio. L'agitazione può avvenire tramite una barra di agitazione per i campioni liquidi o attraverso sonicazione per quelli solidi.

L'equazione della massa dell'analita assorbita dalla fibra all'equilibrio nel caso di HS-SPME è (Pawliszyn, 2012):

$$n = K_{fs} V_f C_0 V_s / K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s$$

dove n è la massa dell'analita assorbita dal rivestimento, C_0 è la concentrazione iniziale dell'analita nella matrice, K_{fs} è la costante di distribuzione fibra/spazio di testa, K_{hs} rappresenta la costante di distribuzione spazio di testa/campione, e V_f , V_h e V_s sono rispettivamente i volumi del rivestimento, dello spazio di testa e della matrice. Terminato il tempo di estrazione, la fibra viene ritirata nell'ago, l'ago viene rimosso dal setto e quindi inserito nella porta di iniezione del sistema GC/MS. A questo punto gli analiti vengono desorbiti termicamente e quindi trasferiti alla colonna capillare del GC attraverso un gas di trasporto. La temperatura di desorbimento rappresenta un fattore importante e deve essere sufficientemente calda affinché gli analiti lascino rapidamente la fibra SPME, poiché un desorbimento troppo lento potrebbe portare all'allargamento e alla riduzione del picco. Al contrario, una temperatura di desorbimento troppo alta può indurre decomposizione termica e introdurre alcuni contaminanti nella colonna provenienti dal setto o dalla fibra stessa. La scelta del tipo di fibra influenza l'efficacia dell'analisi: il tipo di fibra (polimero) viene scelto in base all'affinità verso gli analiti di interesse, ai parametri di estrazione e desorbimento e ai valori di temperatura e tempo. Le condizioni operative prevedono la considerazione di specifici parametri della fibra per SPME. Ad esempio, la scelta della fibra è una variabile importante e dipende dagli analiti di interesse e dalla matrice in esame. Fibre costituite da rivestimenti formati da un unico polimero si adeguano maggiormente ad estrarre composti apolari

(p.e. PDMS, apolare), mentre rivestimenti polari (p.e. PA), sono adatti per l'estrazione di composti polari (acidi carbossilici, alcoli e fenoli). Quando si ha a che fare con matrici più complesse le fibre maggiormente utilizzate sono quelle multifasiche (es. DVB-CAR-PDMS): attraverso questa tipologia di rivestimenti è possibile ottenere tempi di estrazione ridotti, in un range di concentrazioni più ampio. Anche lo spessore della fibra è una variabile da considerare: film più sottili risultano migliori per la preconcentrazione di sostanze con alti punti di ebollizione, sebbene i film più spessi permettano l'estrazione di più composti. Anche la scelta dei valori di tempo e temperatura di estrazione è importante: un tempo maggiore favorisce l'occupazione di molti siti polimerici sulla fibra da parte degli analiti ma di contro nel momento in cui tutti i siti sono occupati, non ha effetto sull'efficienza della preconcentrazione del campione. Per quanto riguarda invece la temperatura di estrazione, un aumento della temperatura facilita il trasporto degli analiti dalla soluzione allo spazio di testa; al contrario temperature troppo elevate possono causare un prematuro desorbimento degli analiti. Rispetto alle altre tecniche di estrazione, la tecnica SPME possiede molteplici vantaggi, come il fatto di essere solvent-free, a differenza invece dei metodi di estrazione con solvente che invece sono vincolati all'esecuzione di molte estrazioni con la conseguenza di perdita di campione. Altri vantaggi di questa tecnica sono anche i tempi di preparazione ridotti, i bassi costi di smaltimento e i limiti di rilevazione migliori. Un altro vantaggio è la versatilità di questa tecnica ovvero l'ampia applicabilità a differenti tipi di analiti e matrici; all'inizio era stata usata per l'analisi degli inquinanti delle acque ma man mano è stata impiegata per tanti tipi di campioni come per lo studio del flavour degli alimenti (Boccacci Mariani et al., 2014a; Giannetti et al., 2014; Giannetti et al., 2017; Giannetti et al., 2021; Morris, 2018; Diez-Simon et al., 2019). Inoltre, l'SPME possiede dei vantaggi anche per i campioni: sono sufficienti quantità ridotte di campione, grazie alla preparazione automatizzata semplice e veloce.

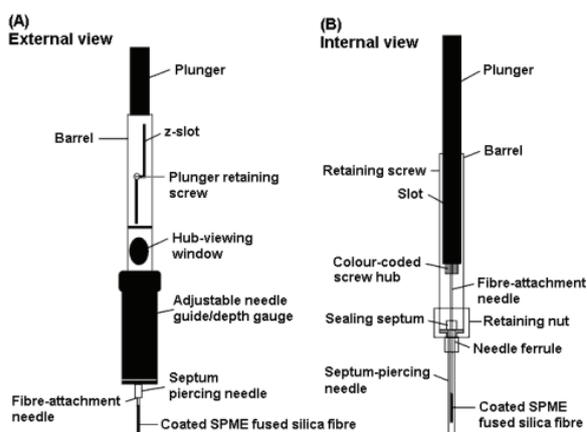


Figura 3: Schema della prima versione commerciale del dispositivo SPME introdotto da Supelco nel 1993 (Kusch, 2017).

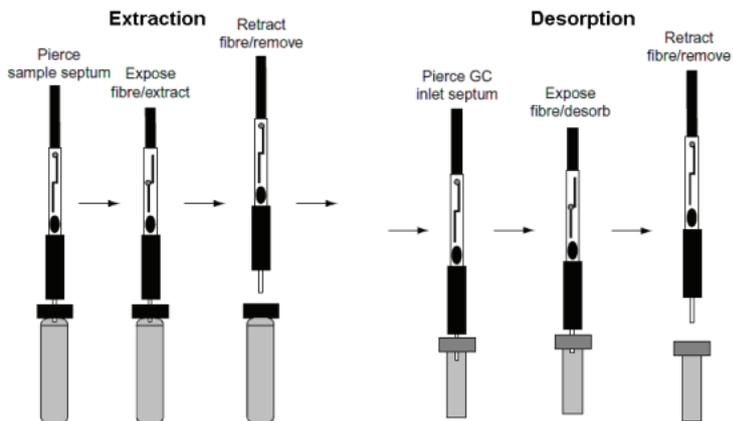


Figura 4: Schema di una tipica estrazione SPME e desorbimento termico nell'iniettore del GC (Kusch, 2017).

2.1.2. Estrattore accelerato con solvente (ASE)

L'estrazione di campioni solidi e semisolidi tramite solventi liquidi è una pratica comune nei laboratori analitici. L'ASE (*Accelerated Solvent Extraction*) è una tecnica di estrazione automatizzata tramite l'utilizzo di uno o più solventi descritta per la prima volta nel 1995 (Ezzell et al., 1995) e negli anni si è sempre più diffusa ed è stata rapidamente accettata come alternativa ai tradizionali metodi di estrazione. L'invenzione dell'ASE nasce da anni di studi al fine di ottenere metodologie sempre più riproducibili e robuste. L'ASE nasce dalla volontà di minimizzare il più possibile i lunghi tempi di estrazione e l'impiego e l'esposizione umana di solventi, proprio in conseguenza delle preoccupazioni dovute all'utilizzo delle grandi quantità di solventi richieste dalle tecniche di estrazione tradizionali e all'aumento dei costi di acquisto e smaltimento. A differenza delle estrazioni liquido-liquido (LL), l'ASE impiega alte pressioni e temperature, ragione per cui l'estrazione risulta più efficiente. Le alte temperature impiegate aumentano la velocità di diffusione dei solventi (portando quindi gli analiti a muoversi più velocemente dalla matrice del campione al solvente), la loro capacità di solubilizzare gli analiti, e diminuiscono la viscosità del solvente facilitando la sua penetrazione nei pori della matrice. Infine, grazie alle temperature elevate, la rottura delle interazioni soluto-matrice (legami idrogeno, dipolo, di Van der Waals, ecc.) e quindi la rimozione degli analiti dalla matrice avviene più facilmente. Tuttavia, la temperatura da sola non è sufficiente poiché gran parte dei solventi organici utilizzati nelle estrazioni hanno temperature di ebollizione relativamente basse. È necessaria quindi una pressione sufficientemente elevata durante l'estrazione in grado di diminuire la tensione superficiale del solvente, cosicché si possono impiegare le temperature al di sopra dei punti di ebollizione. In questa maniera il solvente pressurizzato sarà maggiormente forzato all'interno dei pori della matrice del campione e a contatto con gli analiti. Quindi la combinazione di temperature e pressioni elevate porta all'ottenimento di estrazioni al contempo rapide e complete. Nel meccanismo di estrazione tradizionale Soxhlet, prima di entrare in contatto con il campione, il solvente passa attraverso un condensatore di raffreddamento, con la conseguenza di tempi lunghi di estrazione (da 6 a 48 ore). Un

ulteriore aumento di temperatura oltre il punto di ebollizione del solvente in questi sistemi non è possibile poiché, lavorando a pressione atmosferica, si avrebbe una perdita del solvente. Dunque, il processo di estrazione migliorerebbe aumentando la temperatura in maniera continua attraverso l'utilizzo di una pressione tale da mantenere il solvente nello stato liquido oltre il suo punto di ebollizione. Questo è il principio sul quale si basa l'ASE: l'incremento dell'efficienza di estrazione è dovuta alle alte temperature e pressioni. Grazie all'aumento dell'efficienza di estrazione, la quantità di solvente e il tempo necessari per completare l'estrazione diminuiscono: 10 g di campione possono essere estratti in circa 12 min utilizzando 12-15 mL di solvente. Se la massa del campione aumenta, la quantità di solvente necessaria aumenterà in maniera proporzionale, ma il tempo di estrazione totale rimane invariato. Queste caratteristiche rendono l'ASE una tecnica automatizzabile. I campioni vengono posti in celle di acciaio inossidabile (da volumi di 11, 22, o 33 mL) e gli estratti ottenuti sono raccolti in vials da 40 o 60 mL. Dopo l'estrazione, la matrice rimane nella cella, mentre gli estratti sono pronti per la successiva analisi. Sia le fasi di preparazione dei campioni sia i trattamenti post estrazione rimangono gli stessi degli altri metodi tradizionali, poiché gli estratti generati dall'ASE avranno all'incirca la stessa composizione delle altre tecniche di estrazione. Diversi fattori possono influenzare un'estrazione effettuata con l'ASE, e a seconda delle matrici e degli analiti in esame, esistono differenti procedure da seguire. Le variabili da tenere in considerazione sono:

- Il pretrattamento dei campioni: i campioni con elevato contenuto di acqua devono subire un pretrattamento prima dell'estrazione, al fine di rimuovere totalmente o la maggior parte dell'acqua presente. Questo pretrattamento può essere eseguito tramite essiccazione all'aria, liofilizzazione, essiccazione al forno, essiccazione a microonde, oppure attraverso un meccanismo di dispersione, miscelando il campione con terra diatomacea (Diatomaceous Earth, DE) o con sabbia Ottawa. Se viene effettuata l'essiccazione termica è necessario prendere delle precauzioni poiché si rischia di perdere gran parte dei composti volatili; in quel caso viene preferita la tecnica di dispersione per limitare il contenuto di acqua.
- Step di miscelazione/ dispersione: a prescindere che i campioni siano stati pretrattati o meno per rimuovere l'umidità, questi devono necessariamente essere miscelati con agenti dispersivi (terra diatomacea o sabbia Ottawa). La dispersione dei campioni con questi materiali inerti previene la loro compattazione nella cella di estrazione, aumenta la superficie di estrazione, e permette al solvente di penetrare in maniera più efficiente all'interno del campione. Questa fase porta al miglioramento della precisione e dell'efficienza di estrazione.
- Scelta della cella di estrazione: le dimensioni della cella di estrazione devono essere almeno il doppio della massa del campione. Altri fattori da dover tenere in considerazione nella scelta della cella sono il rigonfiamento del campione e il rapporto dell'agente essiccante/campione. Infatti, se il campione tende a rigonfiarsi eccessivamente durante

l'estrazione, è necessario utilizzare una cella più grande e lasciare un volume vuoto all'interno della cella. L'utilizzo di una cella più grande è necessario anche se il campione è molto bagnato o se viene adoperata una quantità elevata di agente dispersivo.

- Scelta del filtro: è importante porre un filtro nella parte inferiore della cella di estrazione. Difatti posizionare un filtro alla fine della cella impedisce alle particelle fini del campione di rimanere intrappolate nella parte in basso della cella, o di lasciare la cella durante l'estrazione e causare danni alla valvola statica. I filtri maggiormente utilizzati sono di cellulosa; tuttavia, quando il solvente è acquoso e la temperatura di estrazione scelta è al di sopra dei 100°C, i filtri di cellulosa sono sostituiti da filtri in fibra di vetro. Se il campione contiene particelle molto fini, c'è il rischio che queste particelle possano passare e arrivare nella vial di estrazione: in tal caso è necessario l'utilizzo di più di un filtro (in fibra di vetro o cellulosa).
- Scelta del solvente: nella maggior parte dei casi, i solventi che vengono utilizzati nelle tecniche di estrazione convenzionali, possono essere usati anche nel sistema ASE. L'ASE è compatibile con gran parte dei solventi liquidi con l'eccezione di acidi minerali (HCl, H₂SO₄ e HNO₃) e basi forti (KOH e NaOH). L'impiego di acidi minerali nell'ASE danneggia i tubi e le celle in acciaio inossidabile portando a danni prematuri e permanenti dello strumento; le basi forti distruggono le componenti della pompa dell'ASE. D'altra parte, è consentito l'utilizzo di tamponi, acidi e basi deboli: se ad esempio sono richieste delle condizioni di estrazione acide, acidi deboli come l'acido acetico possono essere usati nel range di 1-10% (v/v) miscelati con acqua o solventi polari. La scelta dei solventi deve essere effettuata in base alla polarità degli analiti da estrarre: la polarità del solvente di estrazione deve essere simile a quella degli analiti di interesse. Il solvente non deve solo essere in grado di estrarre gli analiti, ma anche di lasciare la matrice intatta. Per esempio, quando viene impiegato un solvente estremamente polare per estrarre un analita moderatamente polare, il solvente potrebbe rimuovere dalla matrice non solo l'analita di interesse, ma la maggior parte dei composti presenti nel campione. L'estratto risultante potrebbe contenere composti co-estraibili che richiederebbero lunghe procedure di pretrattamento dei campioni o addirittura causare danni allo strumento. Al fine di evitare questa problematica è quindi necessario un solvente di estrazione che sia meno polare oppure l'impiego di una miscela di solventi: miscele di solventi con diverse polarità possono essere usate per estrarre più analiti differenti presenti nello stesso campione.
- Trattamento post-estrazione: per ottenere dei risultati affidabili, spesso sono necessari dei trattamenti post-estrazione. Se la temperatura di estrazione superasse i 100 °C, l'acqua presente nei campioni più bagnati potrebbe apparire anche nell'estratto finale (seppure dopo il pretrattamento con le sabbie). Se il solvente di estrazione impiegato è l'acetone, ad esempio, l'acqua sarà miscibile con l'acetone, e fino allo step di evaporazione, non sarà visibile. Se viene però utilizzato l'esano come solvente di estrazione, l'estratto presenterà

due fasi distinte: una di acqua e una di esano. La rimozione dello strato di acqua dagli estratti, è possibile attraverso l'aggiunta di solfato di sodio direttamente nell'estratto dopo il processo di estrazione, e quindi miscelare e decantare il solvente in una vial pulita.

Il principio di funzionamento dell'ASE comprende principalmente 6 step:

- 1) Riempimento della cella del campione con il solvente di estrazione: la pompa è accesa e la valvola statica è chiusa. Il solvente viene pompato nella cella del campione fino a che la pressione raggiunge i 1500 psi. Dopodiché la valvola statica si apre occasionalmente per mantenere la pressione costante.
- 2) Riscaldamento della cella: la cella viene riscaldata fino al valore scelto di temperatura per un periodo di tempo iniziale (heat-up time).
- 3) Estrazione statica: la cella viene riempita con il solvente per un certo periodo di tempo (static time, tempo statico) e la temperatura di estrazione raggiunta viene mantenuta costante. Il tempo statico rappresenta il tempo durante il quale gli analiti e il solvente si trovano a contatto.
- 4) Risciacquo con solvente fresco: la valvola statica si apre e l'estratto ottenuto viene immesso all'interno di una vial di raccolta; una certa quantità di solvente fresco viene pompato attraverso la cella per il risciacquo.
- 5) Eliminazione del solvente dal sistema: il gas (N_2) elimina il solvente rimasto nella cella.
- 6) Fase di depressurizzazione: attraverso l'apertura di una valvola la pressione residua viene rilasciata dalla cella.

Le fasi di estrazione statica e risciacquo possono essere ripetute più volte (da 1 a 5) a seconda dei cicli necessari per ottenere un'estrazione completa e ottimale.

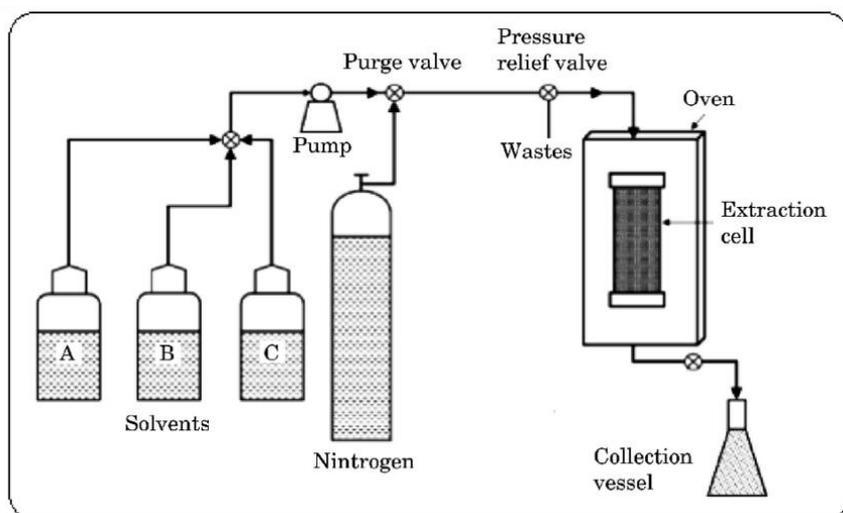


Figura 5: Rappresentazione schematica del sistema ASE (*Accelerated Solvent Extraction*) [S8].



Figura 6: Rappresentazione dell'estrattore ASE utilizzato.

2.2 Tecniche cromatografiche di analisi

Le metodologie di analisi impiegate nel presente lavoro di tesi sono le tecniche cromatografiche GC e HPLC.

La cromatografia è una tecnica di separazione di diversi componenti di una miscela in esame. Fu introdotta per la prima volta nel 1906 dal russo Tswett che separò vari pigmenti di una soluzione di clorofille utilizzando una colonna impaccata di carbonato di calcio: attraverso l'eluente etere di petrolio, si osservarono degli strati di colori differenti (da cui il nome *cromos* ovvero colore). La tecnica cromatografica consiste nello sfruttare la differente attitudine che ha ogni molecola o ione nel distribuirsi tra due fasi: una fase mobile e una stazionaria. La fase stazionaria è immobilizzata e può essere costituita da un solido o un liquido supportato opportunamente; la fase mobile o eluente viene fatta scorrere sopra la fase stazionaria ed è costituita da un fluido (gas o liquido) che contiene le componenti da separare. In questa maniera una specie chimica depositata sulla fase stazionaria e immessa nella corrente di fase mobile, si distribuirà tra le due fasi in maniera proporzionale alla diversa affinità che ha per esse. Una sostanza si distribuisce tra le due fasi a seconda delle sue proprietà chimico-fisiche. Se si indicano con C_m e C_s le concentrazioni della sostanza rispettivamente nella fase mobile e stazionaria, e supponendo che le condizioni sperimentali siano tali da poter raggiungere equilibri successivi, si può definire la costante di equilibrio K ovvero il coefficiente di distribuzione con l'equazione: $K=C_s/C_m$. Dal valore del coefficiente di distribuzione dipenderà il tempo di ritenzione della sostanza, ovvero il tempo che occorre al soluto per percorrere l'intera fase stazionaria. Il tempo che una sostanza trascorre all'interno della colonna dipende infatti dal valore di C_s rispetto a C_m : un'elevata concentrazione nella fase stazionaria, rispetto a quella nella fase mobile, indicherà una maggiore affinità per la prima. Per questo motivo, la fase mobile incontrerà difficoltà nel trascinare alcune sostanze con sé, mentre altri composti più affini all'eluente ma meno alla fase stazionaria verranno più facilmente dislocate e trasportate verso la fine della colonna, separandosi sempre di più dalle sostanze trattenute maggiormente.

I meccanismi sui quali si basa la separazione cromatografica sono:

- 1) Adsorbimento: la fase stazionaria è un solido, la fase mobile può essere o un liquido (in questo caso si parla di cromatografia liquido-solido (LSC)) o un gas (cromatografia gas-solido (GSC)). Sulla fase stazionaria solida si trovano dei siti attivi che sono in grado di stabilire dei legami secondari (dipolo-dipolo, Van der Waals, ponte di idrogeno) con le molecole da separare. Le molecole contenenti dei gruppi polari sono quelle che vengono fissate più facilmente; se la temperatura aumenta, avviene un'agitazione termica che influisce in maniera negativa sull'adsorbimento.
- 2) Ripartizione: in questo caso la fase stazionaria è un liquido, e la fase mobile può essere o un gas (cromatografia gas-liquido GLC) o un liquido (cromatografia liquido-liquido LLC). Durante il meccanismo di ripartizione, avviene la solubilizzazione delle sostanze da analizzare che si ripartiscono tra le due fasi immiscibili tra loro; la costante K prende in questo caso il nome di coefficiente di ripartizione e la legge $K=C_s/C_m$ prende il nome di legge di Nerst.
- 3) Scambio ionico: la fase stazionaria è costituita da molecole che possiedono dei gruppi attivi dotati di cariche elettriche positive o negative; questi gruppi scambiano i propri controioni con la soluzione attraverso un meccanismo di competizione tra gli ioni della fase stazionaria e quelli con la stessa carica contenuti nella fase mobile.
- 4) Esclusione: nel meccanismo di esclusione le particelle più piccole vengono rallentate, entrano nei pori e vengono trattenute attraverso una fase solida porosa o un gel con pori di opportune dimensioni.

I metodi cromatografici si possono classificare in base al fatto che la fase mobile può essere o un gas (gascromatografia o cromatografia gassosa) o un liquido (cromatografia liquida). La gascromatografia è limitata solo all'uso della colonna, mentre la cromatografia liquida può essere realizzata sia su colonna, ma anche su carta e su strato sottile.

Di seguito verranno descritte le principali caratteristiche dei due tipi di cromatografia impiegate in questo lavoro di tesi: la gascromatografia (GC) e la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), che rappresentano le tecniche cromatografiche maggiormente utilizzate nella chimica analitica moderna.

2.2.1. Gascromatografia

La Gascromatografia nasce nel 1941 da Martin e Synge (Martin & Synge, 1941) che posero l'attenzione sul fatto che la fase mobile non doveva necessariamente essere un liquido, ma un vapore, soprattutto nelle separazioni di sostanze volatili. Notarono che facendo fluire nella colonna un gas su un gel impregnato con un solvente non volatile, le separazioni erano più veloci, i tempi di analisi minori e le colonne più efficienti. Successivamente nel 1951 Martin e James portarono il concetto in pratica attraverso il loro articolo in cui descrissero il primo gas cromatografo. Dimostrarono la tecnica mediante uno studio sulla separazione e sulla determinazione quantitativa di dodici componenti di una miscela di acidi grassi C1-C5. L'importanza della gascromatografia è stata quindi riconosciuta dai laboratori petrolchimici interessati alla separazione delle

miscele complesse di idrocarburi. Sin dall'introduzione in commercio dei primi GC, nel 1954, la strumentazione gascromatografica ha avuto una continua evoluzione.

La gascromatografia è una tecnica cromatografica basata sulla ripartizione dei composti chimici d'interesse (analiti) vaporizzati ed eluiti attraverso una colonna capillare (fase stazionaria) con l'aiuto di un carrier gas (fase mobile), con il quale non ci sono interazioni chimiche significative. La miscela in esame deve essere in grado di passare alla fase vapore alla temperatura di lavoro, questa è una condizione indispensabile per un'analisi gascromatografica. I composti analizzati nella gascromatografia sono generalmente sostanze volatili, termicamente stabili, non polari, o che possono esser resi tali da opportune reazioni. A seconda della fase stazionaria, si parla di gas solido cromatografia (GSC) e gas liquido cromatografia (GLC). Un gascromatografo si compone di diverse parti (Figura 7): bombola di gas; regolatore di pressione; sistema di controllo del flusso; iniettore; colonna; zona a temperatura controllata (forno); rivelatore; sistema di elaborazione dei dati. Secondo il meccanismo di funzionamento di un GC, il campione in esame viene introdotto nel gascromatografo e quindi trasportato da un flusso di gas inerte (come He, H₂, N₂) attraverso l'iniettore. Dopo essere stato iniettato, il campione entra e attraversa la colonna che è posta in un forno termostato e costituita da un tubo capillare in silice (nel caso di una colonna capillare), lungo diversi metri, sulle cui pareti interne è depositato un sottile strato di fase stazionaria. Il tipo di colonna varia in base alle sostanze da dover analizzare: la fase stazionaria dovrà possedere un certo grado di affinità con gli analiti in esame. Dopo un certo tempo, i componenti separati fuoriescono tramite il flusso di gas inerte dall'estremità opposta della colonna, ove è posto il rivelatore (detector) in grado di registrare il segnale. Le colonne impiegate in gascromatografia possono essere di due tipi: colonne capillari e colonne impaccate. Mentre in passato venivano utilizzate maggiormente le colonne impaccate, oggi queste sono state quasi totalmente sostituite con le colonne capillari che sono invece maggiormente efficienti e permettono di ottenere analisi in tempi ridotti. Il materiale con cui sono fatte le colonne impaccate è generalmente in acciaio inossidabile e sono impaccate con la fase stazionaria su un supporto inerte di terre diatomee, rivestito con uno strato sottile di film liquido. La lunghezza delle colonne impaccate è generalmente di 1, 2, o 4 metri con un diametro esterno da 1/4" o 1/8" (pollici). Le colonne impaccate possono essere anche di vetro, utilizzate generalmente per analizzare campioni bio-medici e pesticidi che, se posti in contatto con l'acciaio inossidabile, potrebbero subire degradazione. Le colonne capillari (chiamate "tubolari aperte a parete rivestita" o semplicemente colonne WCOT (*wall coated open tubular*)) sono invece costituite da silice fusa e possiedono una superficie interna rivestita da uno strato sottile di film liquido. A differenza delle colonne impaccate, le colonne capillari sono aperte e per tale motivo esse generano una resistenza al flusso molto bassa: questa caratteristica permette l'impiego di colonne capillari con lunghezze elevate, fino a 100 metri. Anche l'iniettore è una componente fondamentale di un gascromatografo poiché ha lo scopo di far entrare il campione nel sistema, vaporizzarlo, mescolarlo con il carrier gas e portarlo in testa alla colonna. L'iniezione può avvenire in modi differenti (Rouessac & Rouessac, 2007), ad esempio nella modalità split/splitless: queste procedure hanno i vantaggi di poter ottenere delle analisi dei componenti dei campioni su un largo range di concentrazione, senza la necessità di lunghe pre-concentrazioni. Con le alte temperature il campione viene vaporizzato, e una valvola viene

controllata in maniera da modificare la quantità di campione da iniettare. Quando si applica la modalità split, la valvola rimane aperta consentendo di dividere il campione, e permettendo solo a una parte del campione di entrare in colonna. Questa modalità viene impiegata e risulta utile quando la concentrazione dei componenti del campione in esame può sovraccaricare la colonna e rischia quindi di determinare una perdita di risoluzione e quindi un allargamento dei picchi. Tuttavia, questa procedura risulta non ottimale per le analisi quantitative. La modalità di splitless, invece, viene adoperata nei casi in cui i componenti da analizzare sono presenti in tracce: in questa modalità la valvola di split durante l'iniezione viene chiusa ed aperta in maniera programmata, al fine di consentire alla maggior parte del campione di raggiungere la colonna. Attraverso questa modalità è possibile ottenere un miglioramento della separazione degli analiti sia volatili che poco volatili e della risoluzione dei picchi dei composti in tracce. Un'altra modalità simile a quella split/splitless è il PTV (*Programmable Temperature Vaporizer*, vaporizzatore a temperatura programmata); in questo caso si può iniettare il campione a una temperatura relativamente bassa ("a freddo"). Per tale motivo non essendoci alcuna vaporizzazione selettiva del campione, riducendosi il rischio di degrado termico (presente invece nell'iniezione a caldo poiché le sostanze vengono trasferite all'ingresso proprio al loro punto di ebollizione) e potendo introdurre un volume riproducibile di campione, si possono evitare gli inconvenienti che si rischiano invece di incontrare nell'iniezione a caldo. Appena avvenuta l'iniezione, il PTV viene riscaldato per il trasferimento degli analiti vaporizzati nella colonna e a quel punto l'introduzione può avvenire in modalità split, splitless o splitsolvent. I vantaggi del PTV risiedono nel fatto che tramite questa modalità si può ottenere un'alta riproducibilità e precisione, specialmente nelle analisi di miscele contenenti sostanze con differenti pesi molecolari, polarità e punti di ebollizione. Infine, esiste la modalità on column, impiegata per l'analisi di composti termicamente labili o di composti ad alto punto di ebollizione. Infatti, a differenza delle precedenti, la procedura on column non è una tecnica di vaporizzazione: in questo caso il campione viene direttamente iniettato a freddo in colonna ("cold on-column" o COC), attraverso l'utilizzo di una micro-siringa. Il rivelatore monitorizza e registra il processo cromatografico sotto forma di cromatogramma: il segnale generato dal rivelatore è proporzionale alla quantità di ciascun analita, e in questa maniera è possibile ottenere un'analisi quantitativa. Ogni rivelatore dovrebbe possedere una sensibilità adeguata, riproducibilità della risposta, tempi di risposta brevi, temperatura di esercizio che arriva fino a 400 °C, elevata affidabilità, facilità d'utilizzo, risposta selettiva nei confronti di più categorie di soluto, e non distruttività del campione. Non esiste un rivelatore in grado di soddisfare tutti questi requisiti; tuttavia, sono stati sviluppati e successivamente migliorati rivelatori con elevata efficienza. In totale più di 60 rivelatori sono stati utilizzati in GC. I rivelatori più diffusi sono lo spettrometro di massa (MS, *Mass Spectrometry*) e il rivelatore a termococonduttività (TCD, *Thermal Conductivity Detector*). Ma sono conosciuti anche altri rivelatori per il GC come il rivelatore a cattura di elettroni (ECD), il rivelatore NPD (noto anche come TSD, *Thermionic Specific Detector*) e il rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID), utilizzati per lo più per sostanze specifiche come le sostanze alogenate o le sostanze azotate e fosforate.

Nel presente lavoro di tesi verranno approfonditi i concetti teorici dello spettrometro di massa poiché è il rivelatore impiegato nei lavori effettuati, nonché uno dei più diffusi e importanti utilizzati per la gascromatografia.

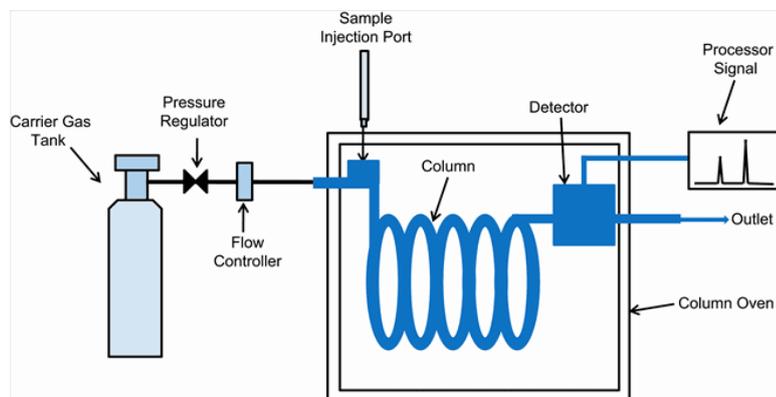
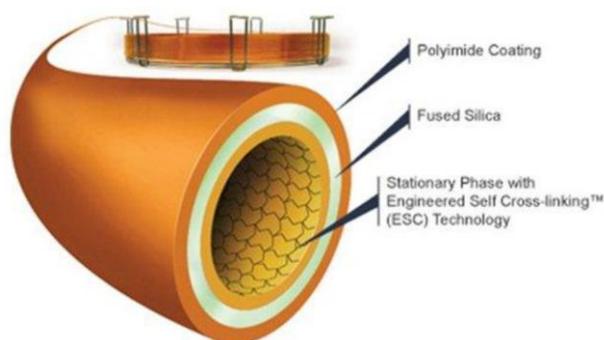


Figura 7: Schema delle componenti di un gascromatografo.

STRUTTURA DI UNA COLONNA CAPILLARE



Iniettore split / splitless

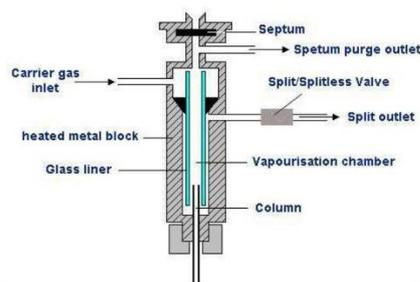


Figura 8: Struttura di una colonna capillare per GC. Figura 9: Rappresentazione di un iniettore split/splitless.

2.2.1.1. Accoppiamento GC-MS

La spettroscopia MS nacque come tecnica analitica nel 1913 quando J.J. Thompson usò uno spettrometro di massa per separare gli isotopi di alcuni atomi. Attraverso lo spettrometro si poterono identificare sin da subito composti incogniti. In particolare, inizialmente è stata ampiamente usata per la caratterizzazione dei derivati del petrolio e probabilmente si sarebbe sviluppata anche in maniera più evidente se, nel 1952, non fosse stata introdotta la gascromatografia. Ma nel 1959 per la prima volta la MS fu accoppiata alla GC ad opera di Gohlke. La spettrometria di massa è un rivelatore in grado di fornire enormi quantità di informazioni; sebbene richieda solo microgrammi di campione, questo rivelatore fornisce informazioni sia sull'analisi qualitativa (composizione elementare, peso molecolare e struttura) degli analiti di interesse sia sull'analisi quantitativa. Lo spettrometro di massa è il rivelatore ideale per la gascromatografia, poiché permette di analizzare in tempo reale i picchi singoli che fuoriescono dalla colonna, effettuando l'analisi qualitativa e quantitativa mediante il

confronto di spettri memorizzati nella banca dati. Innanzitutto, gli analiti devono essere ionizzati per poter essere attratti e respinti dai campi elettrici o magnetici del sistema. Esistono varie tecniche di ionizzazione: l'impatto elettronico (EI), la ionizzazione chimica (CI), la ionizzazione chimica negativa (NCI) e il bombardamento atomico veloce (FAB). L'EI rappresenta la tecnica più antica ma anche più semplice e diffusa. Nell'EI la sorgente di ionizzazione viene riscaldata e messa sottovuoto in maniera tale che i campioni siano facilmente vaporizzati e quindi ionizzati. Questo tipo di ionizzazione è ottenuto attraverso l'impatto di un raggio di elettroni ad alta energia, che sono stati estratti da un filamento di tungsteno da un voltaggio del collettore di 70 eV. Questi elettroni ad alta energia collidono quindi con le molecole neutre di analita causandone la ionizzazione e quindi la frammentazione (attraverso in genere la perdita di un elettrone), e producendo quasi esclusivamente ioni positivi. Avvenuta la ionizzazione, le particelle cariche vengono attratte e respinte da lenti presenti nell'analizzatore di massa; a questo punto i campi elettrici o magnetici separano gli ioni in base ai loro valori massa-carica (m/z). Gli analizzatori di massa sono: i quadrupoli, le trappole ioniche, il settore magnetico a focalizzazione singola (*single focusing magnetic sector*), il settore magnetico a doppia focalizzazione (*double focusing magnetic sector*) e il tempo di volo (*time of flight*, TOF). L'analizzatore di massa a quadrupolo (impiegato nel presente lavoro di tesi) rappresenta uno dei più utilizzati (Figura 11). Questo tipo di analizzatore è composto da quattro sbarre iperboliche poste ad angolo retto l'una rispetto all'altra a cui viene applicato un voltaggio DC e una radiofrequenza; sbarre adiacenti possiedono voltaggi opposti e i segni del voltaggio possono essere invertiti. A seconda del combinarsi del potenziale di corrente e della radiofrequenza, solo alcuni ioni con un certo valore massa/carica passano attraverso le sbarre e raggiungono il rivelatore; il resto degli ioni collideranno contro le sbarre e saranno annullati. I vantaggi del quadrupolo sono il costo moderato, la semplicità, le dimensioni ridotte e la velocità di scansione che lo rende ideale per i sistemi GC-MS. Gli svantaggi è che in confronto agli spettrometri a doppia focalizzazione (i più costosi) hanno bassa risoluzione e sono limitati a circa 2000 Dalton. Dopo la separazione, gli ioni devono essere conteggiati per generare lo spettro di massa. Gli ioni, provenienti dall'analizzatore, collidono contro la superficie del semi-conduttore e generano una cascata di elettroni. Questi elettroni vengono poi accelerati da una differenza di potenziale verso un'altra parte dell'area del semi-conduttore, dove viene prodotta una cascata di elettroni più ampia. Questo processo viene ripetuto più volte fino a che il segnale originario debole non viene amplificato di circa 1 milione di volte. Il requisito fondamentale per evitare la perdita di specie cariche per collisione con altri ioni, molecole o superfici è che il MS deve essere sottovuoto. Lo spettro di massa risultante riporta in grafico l'abbondanza degli ioni in funzione del rapporto m/z , i cui rapporti sono unici per ciascun composto (in condizioni controllate). I dati provenienti dalle analisi possono poi essere elaborati in due modalità: in TIC (*Total Ion Current*) ovvero viene misurata in ogni istante della corsa cromatografica la corrente ionica totale generata dagli ioni che si formano in quell'istante; oppure in SIM (*Single Ion Monitoring*), caratteristici di un particolare composto, attraverso cui viene invece misurato il segnale a rapporto m/z fisso, e il segnale ottenuto indica la presenza soltanto dei soluti dai quali si genera un frammento avente quel valore di m/z .

L'accoppiamento GC-MS permette di unire i vantaggi di entrambe le tecniche: da una parte la velocità di analisi e l'elevato potere di risoluzione del GC, dall'altra la capacità di identificazione e quantificazione fino a livelli di ultra tracce dello MS.

Schema a blocchi di uno spettrometro di massa

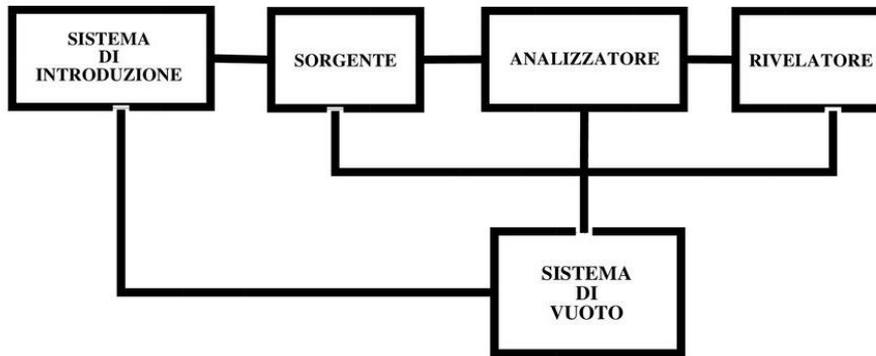


Figura 10: Schema a blocchi di uno spettrometro di massa.

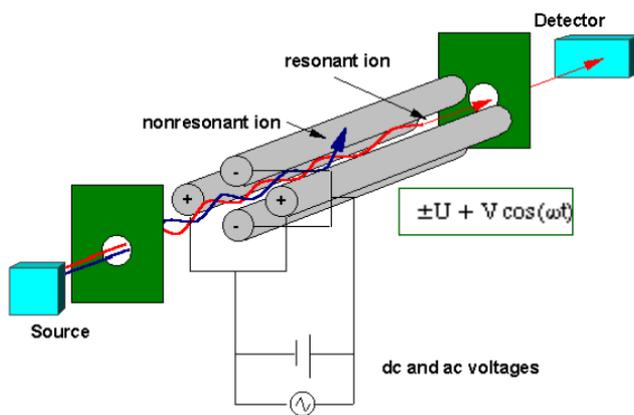


Figura 11: Analizzatore a quadrupolo.



Figura 12: Strumentazione analitica HS-SPME/GC-MS utilizzata.

2.2.2. Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

L'HPLC (cromatografia liquida ad alte prestazioni, *High-Performance Liquid Chromatography*) rappresenta la versione strumentale della cromatografia liquida su colonna. La cromatografia liquida, a differenza della gascromatografia, permette di analizzare molecole non volatili e termicamente instabili. La fase mobile è un liquido e la fase stazionaria è posta all'interno di una colonna di lunghezza che varia tra 3 e 50 cm e di diametro interno (ID) di pochi mm, ed è costituita da particelle porose eventualmente rivestite da un liquido. Le tecniche HPLC possono essere suddivise in base alla polarità delle fasi, al meccanismo di separazione, e alle caratteristiche della fase stazionaria. In base alla polarità delle fasi, le tecniche si dividono in due categorie:

- cromatografia a fasi normali (NPC): quando la fase stazionaria è polare e la fase mobile è apolare;
- cromatografia a fasi inverse (RPC): quando la fase stazionaria è apolare e la fase mobile è polare.

I componenti di uno strumento HPLC sono:

- Contenitori dei solventi. La fase mobile è solitamente contenuta in uno o più contenitori in vetro o acciaio. Generalmente sono presenti dei dispositivi che hanno la funzione di degassare i solventi per eliminare eventuali particelle indissolte. Durante la preparazione delle fasi mobili e la sostituzione delle stesse, possono prodursi delle scorie e bolle, che se entrassero in colonna potrebbero danneggiare il sistema di pompaggio e causare uno slargamento delle bande. Per evitare che ciò accada, il sistema è provvisto di un sistema di degassaggio che può essere una pompa a vuoto, un sistema di distillazione, un sistema per il riscaldamento e per l'agitazione della soluzione oppure un sistema di degassaggio tramite gas inerte, in cui un gas non solubile nel solvente da degassare (generalmente elio) viene fatto gorgogliare all'interno del contenitore. Se l'eluizione viene fatta impiegando solo un solvente allora si chiama isocratica; se invece si utilizzano più solventi di diversa polarità allora l'eluizione sarà in

gradiente e i solventi saranno mescolati in proporzioni prestabilite. Con l'eluizione in gradiente si aumenta l'efficienza della separazione (così come la variazione della temperatura in GC). Gli apparecchi più moderni hanno valvole proporzionali, che introducono i liquidi in colonna con rapporti che variano in maniera continua.

- Sistema di pompaggio. Le pompe HPLC devono rispettare certi requisiti: devono generare pressioni maggiori di 6000 psi, non produrre una pressione pulsatile in uscita, avere una velocità di flusso nel range di 0.1-10 ml/min senza variare di più dello 0.5%, ed essere resistenti alla corrosione verso una larga varietà di solventi. Esistono due tipi di pompe meccaniche: pompe a siringa e pompe a pistone. Le pompe a siringa producono una velocità di flusso facilmente controllabile e un flusso senza pulsazione. Le più utilizzate sono le pompe a pistone, costituite da una camera cilindrica che viene riempita e svuotata dal movimento del pistone. Dal pompaggio si produce un flusso pulsatile che deve essere poi linearizzato. I vantaggi delle pompe a pistone sono la capacità di generare alte pressioni in uscita (superiori a 10000 psi), rapida adattabilità al cambiamento dei gradienti nel corso dell'analisi, un piccolo volume interno, hanno un flusso costante nel tempo e sono molto poco sensibili sia alla pressione in testa alla colonna sia alla viscosità dei solventi. Infine, esistono anche le pompe pneumatiche che consistono in un contenitore di solvente collassabile su sé stesso presente in un recipiente riempito di gas compresso che spinge le pareti del contenitore e forza il solvente in colonna. I vantaggi di queste pompe è che sono economiche, semplici e generano un flusso lineare e costante; gli svantaggi risiedono nel fatto che non sono adatte per le analisi in gradiente e che la velocità del flusso è fortemente influenzata dalla viscosità dei solventi.
- Sistema di iniezione del campione. Gli iniettori hanno la funzione di portare il campione iniettato in forma liquida dalla pressione atmosferica alla pressione presente in testa alla colonna. In particolare, gli iniettori a valvola permettono di introdurre il campione in maniera riproducibile e senza significative interruzioni del flusso; questo avviene grazie al loop, ovvero un tubo capillare con volume tarato montato su un disco metallico. L'introduzione del campione nel sistema avviene in due fasi: la fase di caricamento (load) durante la quale il campione viene inserito nel *loop* (non in serie al circuito di fase mobile) che viene riempito con la siringa fino a quando il campione iniettato inizia ad uscire dallo scarico; poi c'è la fase di iniezione in cui la valvola viene ruotata in posizione *inject*, in maniera tale che i collegamenti tra i circuiti cambiano e portano il loop in serie con il circuito della fase mobile e il campione viene immesso in colonna. I volumi del loop variano tra 1 μ L e 1 mL.
- Precolonna. Spesso in testa alla colonna viene applicata una colonna di guardia che serve a rimuovere dai solventi eventuali contaminanti e particelle indissolte. Queste precolonne vengono solitamente utilizzate per allungare la vita della colonna. Nella cromatografia liquido-liquido le colonne di guardia hanno anche la funzione di saturare la fase mobile con la fase stazionaria in maniera tale che la perdita di fase stazionaria dalla colonna sia minima. La grandezza della precolonna è maggiore rispetto alla colonna usata per minimizzare la caduta di pressione agli estremi sebbene la sua composizione sia simile.

- **Colonna.** Solitamente le colonne HPLC sono costituite in acciaio inossidabile levigato. Tuttavia, quando sono impiegate pressioni inferiori a 600 psi, a volte vengono utilizzate colonne in vetro ricoperto di metallo. Le lunghezze delle colonne HPLC possono essere di 5, 10, 26 15 e 25 cm e i diametri interni possono variare dai 20-100 μm delle nano-bore a > 4.6 mm delle wide-bore; le più impiegate e diffuse sono le colonne analitiche o normal-bore, con un diametro interno tra 3 e 4.6 mm. Per impaccare una colonna HPLC i materiali utilizzati sono la silice (il più comune) preparata per agglomerazione di particelle di diametro inferiore al micron sotto condizioni che portano a particelle più grandi con diametri altamente uniformi. I riempimenti impiegati per le colonne cromatografiche possono essere di diverse tipologie: riempimenti a particelle porose, pellicolari, a perfusione, e le fasi monolitiche che invece non sono costituite da particelle. Le colonne possono venire impaccate anche con altri materiali come resine a scambio ionico, polimeri microporosi e particelle di albumina.
- **Termostato della colonna.** Talvolta è necessario controllare la temperatura della colonna durante un'analisi, per avere una maggiore riproducibilità della corsa cromatografica (tempi di ritenzione). Gli strumenti moderni possiedono dei riscaldatori di colonne che possono mantenere una temperatura in un range che varia da qualche decina di gradi a 150 °C.
- **Detector.** I rivelatori HPLC devono rispettare dei requisiti e possedere caratteristiche come una sensibilità adeguata, una buona riproducibilità, una risposta lineare per più ordini di grandezza, un tempo di risposta breve, una elevata affidabilità, facilità d'utilizzo, specificità, e rivelazione non distruttiva. I rivelatori più utilizzati nei laboratori sono: assorbanza UV/Vis (UV/Vis), fluorescenza (Fl), indice di rifrazione (RI), spettrometro di massa (MS) e a fotodiodi (DAD). Nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati il rivelatore ad assorbimento UV/Vis e il rivelatore a diffusione di luce evaporativa (ELSD).

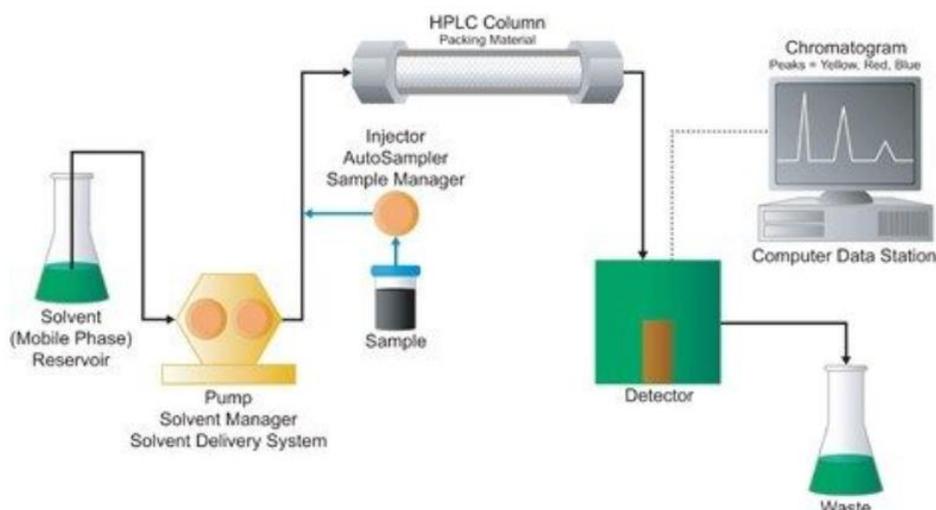


Figura 13: Rappresentazione schematica di un sistema HPLC.

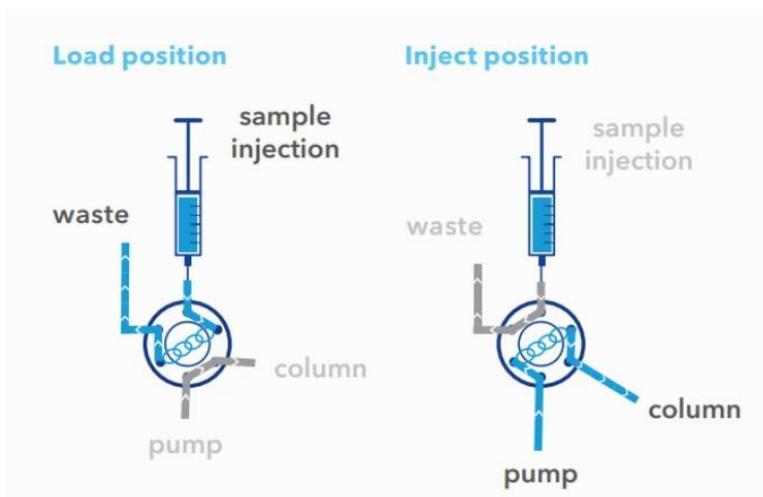


Figura 14: Sistema di iniezione di un HPLC: posizioni di *load* e *inject* [S9].

2.2.2.1. Accoppiamento HPLC-UV-Vis

Il rivelatore UV-Vis è stato impiegato nel presente lavoro di tesi per l'analisi dei carotenoidi. Il rivelatore UV è uno dei più diffusi e utilizzati in accoppiamento con l'HPLC, permettendo di rivelare fino ai ng di campione. Molti analiti adatti per essere analizzati in HPLC assorbono nell'UV e gran parte dei solventi, inclusi quelli usati nella cromatografia a fasi inverse, sono trasparenti nell'UV. Il range di lunghezze d'onda può essere facilmente espanso anche nella regione del visibile per rilevare gli analiti colorati. Il rivelatore UV-Vis è molto più robusto di altri detector. Il principio su cui si basa il rivelatore ad assorbanza è la legge di Lambert-Beer:

$$A = a b c = \text{Log } I_0/I$$

Dove A rappresenta l'assorbanza, I_0 è l'intensità della luce incidente, I è l'intensità emergente dopo che è passata attraverso la soluzione d'interesse e il rapporto I_0/I è la trasmittanza.

Il rivelatore UV-Vis si basa sull'assorbimento selettivo da parte delle molecole del campione di una radiazione che viene irradiata mediante una lampada. Per una corretta rivelazione si sceglie la λ di interesse corrispondente al massimo d'assorbimento per i composti in esame. Un rivelatore UV/Vis è composto da diverse parti: lampada, monocromatore per selezionare la lunghezza d'onda da inviare ad una cella a flusso, cella, e due fotodiodi per la misura dell'intensità della radiazione del raggio campione e del riferimento. Generalmente viene utilizzata una lampada a deuterio che ha uno spettro continuo da poco meno di 190 nm fino a 360 nm. La radiazione si estende anche fino ai 600 nm ma l'energia è bassa e discontinua nel campo del visibile. Nel mercato esistono strumenti che utilizzano la lampada al deuterio anche per il visibile, ma per esigenze eccessive questo approccio non è raccomandato. Infatti, una lampada al deuterio ha un tempo di vita che va dalle 2000 alle 5000 ore e un prezzo elevato. Quindi per la parte del visibile è raccomandato l'impiego di una lampada di tungsteno-alogeno. Queste lampade emettono in maniera continua da 340 nm fino ai 2000 nm (regione dell'infrarosso) e sono più economiche. Inizialmente venivano usati come monocromatori dei prismi: erano economici e coprivano l'intero range di lunghezze d'onda dall'UV all'IR. Tuttavia, a causa della dispersione

non lineare che porta a una scarsa risoluzione della lunghezza d'onda nel visibile, questi monocromatori sono stati sostituiti da apposite griglie la cui dispersione è invece lineare, indipendente dalla temperatura e la risoluzione è maggiore. I vantaggi del rivelatore UV-Vis sono l'economicità, l'alta versatilità, la selettività e l'elevata sensibilità.



Figura15: Rappresentazione dello strumento HPLC/UV-Vis utilizzato.

2.2.2.2. Accoppiamento HPLC-ELSD

Il rivelatore ELSD è stato utilizzato nel presente lavoro di tesi per l'analisi dei lipidi. Il rivelatore ELSD si è diffuso a partire dagli anni '80 e trova applicazione in tutti i campi della cromatografia liquida. I rivelatori ELSD sono in grado di identificare composti che non possono essere individuati dall'UV come ad esempio i carboidrati. I suoi vantaggi sono l'universalità per i soluti altobollenti, l'elevata sensibilità e la compatibilità con i gradienti: per questo motivo viene migliorata la separazione di diverse classi di composti. Un altro vantaggio è che l'ELSD rivela sostanze non otticamente attive che invece non possono essere rivelate con uno spettrofotometro, un rivelatore di indice di rifrazione o un rivelatore di fluorescenza. Lo svantaggio di questo rivelatore è che il rapporto segnale / rumore è spesso meno favorevole rispetto ad altri tipi di rivelatori. Il principio di funzionamento si basa sulla luce diffusa dalle particelle di analita e si divide in tre fasi: nebulizzazione, evaporazione e rivelazione (Dreux, La Fosse, & Morin-Allory, 1996; Yong, & Dolan, 2004). L'eluato passa attraverso un nebulizzatore e viene quindi trasformato in aerosol fine da un flusso di azoto o aria. Le goccioline vengono portate in un tubo riscaldato (*drift tube*): qui avviene l'evaporazione della fase mobile e si formano particelle di soluto non volatili. Le microparticelle di analita private del solvente entrano nella cella ottica del rivelatore e diffondono il raggio luminoso emesso da un filamento al tungsteno. La diffusione viene raccolta da fibre ottiche e rivelata da un fotomoltiplicatore, dando luogo ad un segnale proporzionale alla concentrazione dell'analita (Megoulas, & Koupparis, 2004). È comunemente usato per l'analisi di carboidrati, lipidi e polimeri, ma ha una vasta applicabilità anche in altri ambiti, come nel settore farmaceutico.

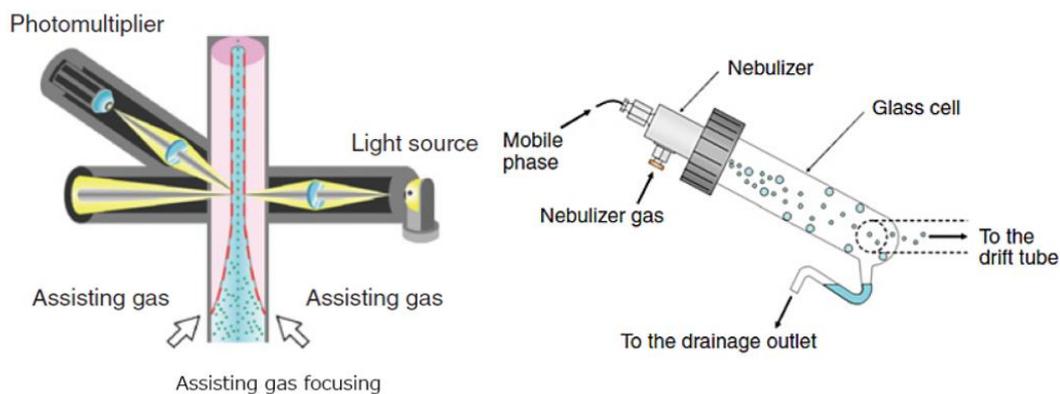


Figura16: Rappresentazione del funzionamento di un rivelatore ELSD [S9].

2.3. Tecniche chemiometriche e analisi multivariata dei dati analitici

Nel settore alimentare e merceologico, la complessità del sistema da affrontare aumenta in maniera progressiva nelle modalità di produzione degli alimenti, nelle aspettative dei consumatori, insieme ai target degli obiettivi e bisogni delle autorità di regolamentazione e delle società. La produzione e il consumo alimentare sono connessi a sfide ambientali, socioeconomiche e agli atteggiamenti verso salute, sicurezza e nutrizione. Tra le aree emergenti del settore alimentare ci sono lo studio e la realizzazione di alimenti funzionali, l'utilizzo delle nanotecnologie, la valutazione dell'autenticità degli alimenti, compresa la provenienza e la produzione biologica, e il monitoraggio e il miglioramento della qualità dei processi di lavorazione degli alimenti. Dal punto di vista della caratterizzazione degli alimenti e della trasformazione alimentare ciò implica la necessità di estrarre quante più informazioni possibili e ottenere modelli in grado di ricavare le relazioni che legano il profilo compositivo e le condizioni di lavorazione alle proprietà finali degli alimenti come la salubrità, la percezione del consumatore, il legame con il territorio. È importante inoltre valutare l'influenza del processo di produzione sulla qualità dei prodotti finali. A questo proposito, l'atteggiamento della ricerca non può essere puramente "deduttivo": l'ipotesi guidata dalla teoria potrebbe essere non solo inefficiente, ma anche difficile da formulare. È necessario quindi assumere un atteggiamento induttivo basato sui dati, con un'ipotesi minima a priori come primo step per progredire con una valutazione ottimale. Al fine di risolvere i quesiti provenienti dal campo della merceologia e dell'alimentare, che sono degli ambiti che racchiudono aspetti complessi e interdisciplinari, è necessario possedere delle informazioni che siano quanto più complete; tali informazioni saranno quasi inevitabilmente di natura multivariata. Risulta quindi necessaria una pianificazione sperimentale all'avanguardia e una successiva analisi avanzata dei dati. A questo riguardo la l'analisi chemiometrica fornisce gli strumenti necessari per l'indagine dei problemi legati all'alimentazione. La chemiometria rappresenta l'utilizzo di metodi matematici e statistici applicati all'analisi chimica: lo scopo generale è quello di estrarre quante più possibili informazioni chimiche dai risultati. La chemiometria come disciplina emerge agli inizi degli anni 70 e si trova in un punto di congiunzione tra due fenomeni favorevoli: da un lato l'emergere di strumentazioni analitiche che fornivano sempre più dati, dall'altro la maggiore disponibilità di strumenti

informatici. Il vero impatto della chemiometria sta nella necessità di considerare più variabili alla volta, cosa che invece non accade nell'analisi univariata. Nel caso di dati multivariati, ovvero nel caso di dati in cui si hanno più informazioni sullo stesso campione, l'impiego di questi strumenti diventa necessario e permette di allargare il quadro dei risultati che si possono ottenere. Con l'analisi univariata oltre al maggior tempo impiegato, si rischia anche di perdere l'informazione più ricca ovvero quella relativa alle interazioni delle variabili. Difatti, a differenza dell'analisi multivariata, in quella univariata non vengono quindi prese in considerazione le interazioni tra le grandezze che vengono misurate.

Nel presente lavoro di tesi l'impiego della chemiometria e dell'analisi multivariata è stato fondamentale sia per pianificare gli esperimenti (attraverso l'utilizzo dell'*Experimental Design*) in maniera da ottimizzare un metodo di estrazione di composti d'interesse da una data matrice, sia per l'elaborazione successiva dei dati (tramite l'analisi esplorativa e l'analisi predittiva) e quindi ottenere la massima informazione dai risultati ottenuti.

2.3.1. Il disegno sperimentale

Il disegno sperimentale permette di progettare gli esperimenti in maniera razionale. Il primo lavoro sul disegno sperimentale è stato eseguito da Fisher e risale a circa 80 anni fa (Fisher, 1935). Il disegno sperimentale trova applicazione nel momento in cui si vuole studiare più di una variabile alla volta e si contrappone all'approccio "OVAT" ovvero "one variable at time". Infatti, se si utilizza l'approccio OVAT non viene garantita l'ottimizzazione reale di ciò che si sta cercando, poiché questo tipo di approccio sarebbe valido solamente se i fattori da ottimizzare sono totalmente indipendenti tra loro (e questa è una situazione che si verifica raramente): difatti studiando una variabile alla volta, le interazioni tra le variabili vengono perse. Nell'approccio OVAT gli unici punti in cui qualcosa è conosciuto sono i punti dove gli esperimenti vengono eseguiti; di contro, il disegno sperimentale, esplorando in maniera sistematica l'intero dominio sperimentale, permette di ottenere un modello matematico mediante il quale il valore della risposta nel dominio sperimentale può essere predetto con una precisione tale che, a patto che la variabilità sperimentale sia conosciuta, può essere stimata anche prima di eseguire gli esperimenti e ciò dipende solamente dalla disposizione dei punti nello spazio e dal modello postulato. In questa maniera si passa da una conoscenza locale (propria dell'approccio OVAT) a una conoscenza globale del disegno sperimentale. Quindi i vantaggi del disegno sperimentale rispetto alla tecnica OVAT è che il primo tiene conto delle interazioni tra le variabili, fornisce una conoscenza globale, la qualità dell'informazione è maggiore, e il numero degli esperimenti richiesti è minore. La qualità dei risultati dipende dalla distribuzione degli esperimenti nel dominio sperimentale. La distribuzione ottimale degli esperimenti dipende dal modello che viene postulato. Dati il modello e i limiti sperimentali, il disegno sperimentale permette di rivelare il set di esperimenti che forniscono la massima informazione possibile. Per realizzare un disegno sperimentale si devono seguire questi step: dapprima si deve definire lo scopo dell'esecuzione degli esperimenti, poi si devono rivelare tutti i fattori che possono avere un effetto, è necessario successivamente

pianificare gli esperimenti, eseguire gli esperimenti e infine analizzare e trasformare i dati degli esperimenti in informazione. Esistono diversi tipi di disegno sperimentale a seconda dello scopo, del numero massimo di esperimenti e dei limiti del dominio sperimentale.

I disegni più semplici sono i cosiddetti 2^k *Factorial Design*. Gli esperimenti da eseguire sono uguali a 2^k dove k rappresenta il numero di variabili in esame ognuna delle quali ha due livelli (1 e -1). Le variabili possono essere sia qualitative che quantitative. Se $k=3$, gli esperimenti da eseguire saranno 8 (2^3): la matrice sperimentale avrà 8 righe (ciascuna riga rappresenta un esperimento) e 3 colonne (ciascuna colonna rappresenta una variabile). La matrice sperimentale si costruisce come descritto in Tabella 1: nella prima colonna 1 e -1 si alternano ad ogni riga; nella seconda colonna 1 e -1 si alternano ogni due righe e nella terza ogni quattro righe.

Tabella 1: Matrice sperimentale di un disegno fattoriale a due livelli e tre variabili (2^3)

| ESPERIMENTI | X1 | X2 | X3 |
|-------------|----|----|----|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 1 | -1 | -1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 |
| 4 | 1 | 1 | -1 |
| 5 | -1 | -1 | 1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 |
| 7 | -1 | 1 | 1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 |

Dal punto di vista geometrico, un disegno fattoriale con $k=3$ è rappresentato da un cubo e ogni esperimento dagli angoli di un cubo.

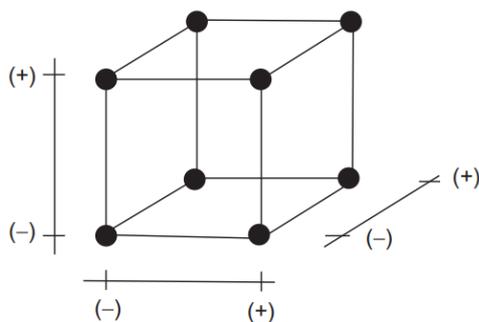


Figura 317: Rappresentazione geometrica di un Disegno Fattoriale 2^3 (Marini, 2013).

A differenza di ciò che accade utilizzando l'approccio OVAT dove mentre la variabile 1 viene modificata, le altre due variabili vengono mantenute costanti, nel disegno sperimentale fattoriale, mentre la variabile 1 viene modificata, le altre variabili hanno valori differenti. Quindi grazie al disegno sperimentale è possibile stimare le interazioni che esistono tra le variabili. Il modello matematico risultante di un disegno fattoriale per 8 esperimenti è:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3$$

con 8 esperimenti è perciò possibile stimare un termine costante, tre termini lineari, tre interazioni a due termini e un'interazione a tre termini. Importante è eseguire gli esperimenti in modalità random, casuale, per evitare la possibilità di eventuali effetti sistematici. Successivamente si devono valutare gli effetti dei fattori sulla risposta, calcolando i coefficienti e costruendo una matrice del modello. La matrice del modello avrà tante righe quanti sono gli esperimenti e tante colonne quanti sono i coefficienti: la prima colonna (b_0) è una colonna di 1, le colonne corrispondenti ai termini lineari sono le stesse della matrice sperimentale, le colonne delle interazioni sono ottenute punto per punto dal prodotto delle colonne dei termini lineari delle variabili coinvolte nell'interazione (ad esempio la colonna b_{13} dell'interazione tra le variabili 1 e 3 si ottiene moltiplicando punto per punto la colonna b_1 per la colonna b_3). I coefficienti del modello si calcolano moltiplicando punto per punto la colonna della risposta per la colonna del coefficiente da stimare, e si prende la media dei risultati. Il limite del disegno fattoriale 2^k , dato che ogni variabile ha due livelli, è rappresentato dal fatto che può essere usato per stimare solo modelli lineari e di interazione. Quando invece è necessario studiare anche dipendenze quadratiche tra i fattori e la risposta, allora due livelli non sono più sufficienti per esaminare i fattori poiché non sarebbe possibile valutare la curvatura della superficie di risposta. In quel caso è necessario ricorrere a disegni fattoriali multilivello, ad esempio, il Disegno di Box-Behnken, il Disegno di Doehlert e i Central Composite Design. Il disegno sperimentale impiegato nel presente lavoro di tesi è il *Face Centred-Central Composite Design* (FC-CCD).

2.3.1.1. Disegno sperimentare FC-CCD

In questo lavoro di tesi, come già menzionato precedentemente, è stato utilizzato un disegno FC-CCD (Box et al., 1978; Marini, 2013) per ottimizzare gli esperimenti da eseguire. Questo tipo di disegno viene utilizzato quando le variabili hanno un carattere quadratico e per questo motivo è necessario un modello che contenga dei termini quadratici (e non si può utilizzare un disegno fattoriale poiché avendo ciascuna variabile solo 2 livelli, non è adatto per la stima di termini quadratici). Il Central Composite Design rappresenta un disegno ad alta efficienza, e con questo termine si indica il rapporto tra il numero di esperimenti richiesti per stimare univocamente i parametri del modello e il numero di esperimenti previsti dal disegno. La matrice del modello si costruisce in questo modo: avendo k variabili, i primi 2^k esperimenti sono gli stessi di un disegno fattoriale. I successivi 2^k esperimenti sono ottenuti mantenendo tutte le variabili tranne una al loro livello centrale e questa

altra variabile al valore -1 o $+1$. Gli ultimi n esperimenti sono effettuati con tutte le variabili al loro valore centrale. Aumentando il numero di punti centrali (fino a 3) è possibile ottenere un miglioramento delle caratteristiche matematiche del modello (una migliore previsione nella regione attorno al centro); è necessario comunque valutare se effettivamente c'è un miglioramento significativo tale da giustificare un aumento del lavoro sperimentale. In Figura 18 viene rappresentato il Face-Centered Design in maniera grafica con tre variabili. Il grafico si estende su un dominio cubico composto da un disegno fattoriale (rappresentato dai punti ai vertici del cubo) e da un disegno a stella: il nome "Face-Centered" proviene dal fatto che la posizione delle punte delle stelle corrisponde al centro delle facce del cubo.

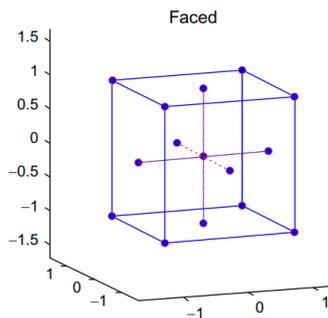


Figura18: Rappresentazione grafica di un disegno *Face-Centred* a tre fattori (Marini, 2013).

Il Face Centered Design rappresenta un caso speciale di Central Composite Design, nome che indica i disegni composti da un Factorial Design e uno Star Design. La matrice sperimentale di un disegno FC-CCD per tre fattori è rappresentata nella Tabella 2.

Tabella 2: Matrice sperimentale di un disegno FC-CCD a tre fattori.

| ESPERIMENTI | X1 | X2 | X3 |
|-------------|----|----|----|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | -1 | -1 | 1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 |
| 4 | -1 | 1 | 1 |
| 5 | 1 | -1 | -1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 |
| 7 | 1 | 1 | -1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | -1 | 0 | 0 |
| 10 | 1 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | -1 | 0 |
| 12 | 0 | 1 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | -1 |
| 14 | 0 | 0 | 1 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |

2.3.2. L'analisi esplorativa

L'analisi esplorativa dei dati è diffusa nell'ambito delle scienze e della statistica poiché rappresenta un approccio operativo dei dati per migliorare l'accessibilità e la conoscenza dei risultati. Il focus dell'analisi esplorativa risiede proprio nel suo nome: esplorazione dei dati analitici. "Esplorazione" significa voler concentrare il proprio interesse esclusivamente sulla matrice di dati e voler caratterizzare quali siano le similarità o dissimilarità tra i campioni e le correlazioni tra le variabili per ottenere un quadro generale che spieghi quali variabili misurate possano spiegare in maniera migliore le differenze che si osservano tra i campioni. L'analisi esplorativa ha lo scopo di rivelare informazioni nascoste e sconosciute dei dati in una forma tale che l'analista ne possa ottenere una rappresentazione di facile comprensione, diretta e immediata. La percezione della realtà risiede in ciò che uno crede di vedere. Elementi obbligati di questa analisi sono i grafici che portano l'abilità del cervello umano ad ottenere un'interpretazione affidabile e diretta di differenze, similarità e correlazioni, attraverso un'immagine piuttosto che una serie di numeri. Un altro assioma dell'analisi esplorativa risiede nel fatto che il focus dell'attenzione è proiettato sui dati, piuttosto che sulle

ipotesi. In senso figurato quindi non è l'analista a 'porre' domande ai dati, ma sono i dati stessi a parlare, evidenziando la loro natura, le relazioni che li caratterizzano, l'informazione che risiede al di sotto di ciò che è stato valutato su di loro, o anche la totale assenza di tutto ciò. Nella chimica analitica e alimentare, l'analisi strumentale può fornire un migliaio di variabili per ciascun campione e tantissimi dati: in questi casi è necessario utilizzare l'analisi multivariata ovvero la valutazione dell'effetto simultaneo di tutte le variabili che caratterizzano un set di campioni. L'utilizzo di strumenti grafici è limitato agli spazi bidimensionali (2D) e tridimensionali (3D): quindi quando si hanno tantissime variabili e dimensioni che sono maggiori di tre, questi grafici non sono sufficienti. Si deve quindi passare all'analisi esplorativa dei dati multivariati. In questi casi sono necessari i metodi di analisi multivariata, in particolare quelli basati sulla proiezione di variabili latenti che rappresentano uno strumento che permette di combinare l'analisi delle correlazioni tra le variabili e delle somiglianze/differenze dei campioni, la riduzione dello spazio delle variabili in dimensioni inferiori e la possibilità di avere a disposizione dei grafici facili da leggere e interpretare.

L'analisi esplorativa ha come metodo di elezione l'Analisi delle Componenti Principali (PCA). L'Analisi delle Componenti Principali rappresenta una tecnica di decomposizione/proiezione bilineare capace di condensare grandi quantità di dati in pochi parametri chiamati componenti principali (PCs) o fattori/variabili latenti, che hanno lo scopo di catturare le similarità e le differenze tra campioni e variabili di dati provenienti dalle analisi strumentali. Tramite la PCA si costruisce quindi un nuovo spazio su cui rappresentare i campioni: si ridefiniscono gli assi utilizzando le componenti principali al posto delle variabili originali. In questa maniera impiegando i nuovi assi (quindi le componenti principali) è possibile rappresentare la vera natura multivariata dei dati in un numero relativamente piccolo di dimensioni e usare questa rappresentazione per identificare la struttura dei dati stessi. Il passaggio da tante variabili alle componenti principali avviene mediante una trasformazione lineare sotto i vincoli di preservare la varianza esistente nei dati e sotto l'imposizione di ortogonalità delle variabili latenti. Il termine "variabili latenti" deriva dal fatto che i sistemi studiati sono considerati "indirettamente osservabili" ovvero i fenomeni responsabili della variabilità dei dati sono nascosti e non direttamente misurabili e osservabili. Una volta che vengono ottenute le variabili latenti possono essere rappresentate in grafico a dispersione in un piano Euclideo. Caratteristica unica della PCA è che consente una visione simultanea sia dello spazio dei campioni che delle variabili.

La PCA decompone la matrice dei dati in questo modo:

$$X_{(I,J)} = T_A * V_A + E_{(I,J)}$$

Dove A è il numero di componenti, gli scores dei vettori $T=[t_1, t_2, \dots, t_A]$ forniscono le coordinate dei campioni nello spazio delle componenti principali, i vettori loadings $V=[v_1, v_2, \dots, v_A]$ rappresentano il peso con cui ogni variabile originale contribuisce alle componenti principali, E è la matrice residua (o rumore o errore) ovvero i dati residui non spiegati dal modello. E ha le stesse dimensioni della matrice X ed è spesso utilizzato come strumento diagnostico per l'identificazione di campioni o variabili anomali. Da un punto di vista geometrico, la PCA è una proiezione ortogonale di X nel sistema di coordinate attraversato dai vettori dei loadings V. La PCA opera una riduzione delle dimensioni dal numero di variabili J in X a A variabili sottostanti. I loadings

rappresentano il peso di ciascuna delle variabili originali nel determinare la direzione di ciascuna componente principale o quali delle variabili originali varia maggiormente per i campioni con diversi valori di scores su ciascuna componente. Lo scopo della PCA è descrivere le distanze fra i punti, ovvero la variabilità, utilizzando il minor numero di dimensioni possibili: questo viene ottenuto costruendo degli assi che si allineano coi dati. La prima componente principale spiega la massima percentuale della variabilità presente nei dati: viene calcolata in modo da descrivere una quantità della variabilità originale che è maggiore di quella spiegata da ciascuna delle variabili misurate presa singolarmente. Quindi la prima PC rappresenta la direzione lungo la quale viene registrata la massima dispersione dei dati. La variabilità spiegata viene calcolata tramite la varianza che rappresenta l'indice di dispersione dei dati lungo una certa direzione. Le componenti successive alla prima spiegano una sempre minore percentuale della variabilità originaria: le ultime descriveranno principalmente le informazioni irrilevanti ovvero il "rumore". Ogni campione viene descritto da nuove coordinate (scores) rispetto allo spazio delle PC. Dal punto di vista matematico le componenti principali sono costruite come combinazioni lineari delle variabili originali:

$$t_{i1} = p_{11}x_{i1} + p_{21}x_{i2} + \dots + p_{m1}x_{im} = x_i p_1$$

$$t_{i2} = p_{12}x_{i1} + p_{22}x_{i2} + \dots + p_{m2}x_{im} = x_i p_2$$

dove t_{i1} e t_{i2} sono rispettivamente le coordinate del campione i -esimo sulla prima e seconda componente principale; x_i rappresenta il vettore riga che corrisponde alle misure eseguite sul campione i -esimo; p_{kl} sono i coefficienti delle combinazioni lineari organizzati nei vettori colonna p_1 , p_2 , ecc. Queste equazioni possono essere riunite in un'unica rappresentazione in forma di matrice:

$$T = X P$$

$$n \times f \quad n \times m \quad m \times f$$

dove T è la matrice degli scores: ogni riga di T rappresenta le coordinate di un campione lungo tutte le componenti principali e ogni colonna di T rappresenta le coordinate di tutti i campioni lungo una particolare componente principale. P è la matrice dei loadings e contiene i coefficienti delle combinazioni lineari che descrivono le componenti principali in termini delle variabili sperimentali. Il contributo di ciascuna variabile alla PC è il coseno dell'angolo tra le due: perciò se una PC punta nella stessa direzione di una variabile, l'angolo tra le due è 0° ed il coseno è 1 ; se punta in direzione opposta l'angolo è 180° e il coseno è -1 ; se è perpendicolare ad una variabile l'angolo che si forma è 90° ed il coseno è 0 . Questi coseni rappresentano i loadings che sono nella matrice P e possono quindi variare tra -1 e 1 . Le componenti principali vengono costruite in maniera da essere ortonormali: per tale motivo la somma dei quadrati dei loadings corrispondenti a ciascuna componente principale è unitaria. La PCA consente di ottenere rappresentazioni grafiche efficaci sia dei soli oggetti (scores plot) sia delle sole variabili (loadings plot), sia di oggetti e variabili contemporaneamente (biplot).

2.3.3. L'analisi predittiva: regressione e classificazione

L'analisi esplorativa rappresenta una tecnica quasi obbligatoria per eseguire una corretta analisi multivariata dei dati, il cui scopo in generale è osservare le possibili differenziazioni tra i campioni. In molti casi è necessario prevedere una o più proprietà del sistema in esame; tali proprietà possono essere sia di natura qualitativa (classificazione) sia quantitativa (calibrazione o regressione). Le tecniche chemiometriche che consentono di prevedere tali proprietà prendono il nome di metodi di classificazione. Nei metodi di classificazione le differenze e le divisioni in gruppi fornite dall'analisi esplorativa sono scontate e conosciute a priori. La caratteristica dei metodi di classificazione è quella di partire dal presupposto di avere dei campioni raggruppati in più gruppi o classi che si differenziano per una o più proprietà. Lo scopo non è semplicemente esplorativo ovvero osservare se a partire dai dati misurati esistono gruppi differenti di campioni; ma lo scopo è che a partire dal presupposto che i campioni possono essere raggruppati in categorie, allora i dati sperimentali raccolti permettono in maniera accurata di poter predire in quale classe i campioni incogniti fanno parte. La classificazione è l'insieme di operazioni matematico-statistiche che permettono di definire un criterio (basato sui dati sperimentali) che permette di assegnare un oggetto a una o più categorie. Una classe rappresenta un insieme di campioni con caratteristiche comuni ovvero campioni simili tra loro rispetto a una proprietà che interessa definire; le classi devono essere definite a priori. Un'altra caratteristica dei metodi predittivi è che per avere delle stime affidabili dei modelli, è necessario avere un certo numero minimo di campioni per poter costruire il modello stesso; cosa che non è necessariamente richiesta per l'analisi esplorativa.

Esistono diversi metodi di classificazione che possono essere suddivisi in due gruppi principali: i metodi discriminanti e i metodi di modellamento di classe. I metodi discriminanti hanno lo scopo di costruire un modello in grado di assegnare un campione ad una sola delle classi rappresentate nel training set ovvero nell'insieme di campioni usati per la costruzione del modello di classificazione. Si tratta quindi di una classificazione univoca. I metodi di modellamento di classe invece si concentrano solamente su una classe e quindi i dati vengono analizzati per una classe alla volta. Inoltre, sulla base della distribuzione dei campioni nello spazio, cercano di stabilire quale sia la regione attorno alla distribuzione dei campioni entro cui sia ragionevole trovare un campione che proviene da quella categoria. Uno dei problemi dei metodi discriminanti è che in queste tecniche le superfici si possono estendere fino all'infinito. A differenza di questi, i metodi di modellamento di classe definiscono invece una superficie chiusa. Quindi ci sono due differenze principali rispetto ai metodi discriminanti: la prima è che poiché ogni classe la modello separatamente dalle altre cade l'univocità. Infatti, potrebbero sussistere casi in cui gli spazi associati ad una categoria o ad un'altra siano parzialmente sovrapposti: in quella zona quindi le variabili misurate, non permettono di discernere in maniera univoca se quel campione appartenga ad una classe rispetto all'altra. L'altra differenza è che i metodi di modellamento di classe non sono esaustivi: proprio perché ogni modello di classe rappresenta una porzione chiusa dello spazio, se un campione cade molto lontano da tutti gli altri, non è sufficiente che sia più vicino ad una certa classe per classificarlo in quella categoria; piuttosto quel campione non apparterrà a nessuna classe misurata. Quindi i metodi di modellamento di classe si adattano maggiormente ai casi di tracciabilità e

identità alimentare dove il numero delle classi potenziali è molto alto e dove la classe di interesse è una (o due al massimo): una sola è la classe di interesse; l'altra è "il resto del mondo". Quindi i metodi di modellamento di classe richiedono un numero di campioni molto più alto rispetto ai metodi discriminanti. Per poter costruire un modello di classificazione è necessario avere a disposizione dei campioni di origine nota; quindi, dei campioni per i quali si conosce la risposta che si desidera modellare, altrimenti non si è in grado di ottenere un modello di classificazione con un'accuratezza sufficiente. Questi campioni prendono il nome di "training set". A partire dai campioni del training set si costruisce la regola di classificazione ovvero nel caso del metodo modellante si tracciano dei confini attorno alla classe di interesse; nel caso del metodo discriminante, invece, si tracciano i confini tra coppie di classi adiacenti. Una volta costruito il modello predittivo, è essenziale validarlo, ovvero al fine di esaminarlo si deve applicare il modello a dei campioni noti per i quali si conosce la classe di appartenenza: si prende un insieme di campioni di origine nota e si tratta come se i campioni fossero incogniti così da poter valutare l'operosità del modello costruito. Questo step viene chiamato fase di validazione ed è fondamentale perché permette di verificare l'applicabilità e l'affidabilità del modello su campioni nuovi. Un esempio di modellamento di classe è rappresentato dalla tecnica SIMCA (*Soft Independent Models of Class Analogy*); un esempio di classificazione discriminante invece è rappresentato dalla PLS-DA (*Partial Least Squares-Discriminant Analysis*) utilizzata nel presente lavoro di tesi.

La PLS-DA (Sjöström et al., 1986; Ståhle & Wold, 1987) rappresenta una tipologia di classificazione molto diffusa. È un modello discriminante poiché va a discriminare i campioni in esame: vengono individuate le differenze che esistono per la creazione delle classi, e lo spazio delle variabili viene suddiviso in tante regioni quante sono le classi. Il metodo PLS-DA consente di impiegare un metodo di regressione per risolvere un problema di classificazione. Il modello di regressione si presenta come:

$$Y = XB + E_y$$

dove X è la matrice dei dati, B è la matrice dei coefficienti di regressione, E è la matrice degli errori, e la Y è la matrice delle risposte.

Per poter utilizzare il modello di regressione nell'ambito della classificazione, si introduce una matrice di risposta Y che codifica l'appartenenza di ciascun campione ad una determinata classe: per ciascun individuo, la corrispondente riga della matrice Y avrà valore 1 nella posizione collegata alla classe di appartenenza, mentre le altre posizioni riporteranno valore pari a zero. Si costruisce quindi una matrice Y delle risposte che ha per colonne il numero delle classi e per righe il numero dei campioni. L'informazione della matrice "vera" Y delle risposte viene codificata in una matrice binaria Y dummy, costituita da N righe (N uguale al numero di campioni) e G colonne (G pari al numero di classi). Essa viene poi relazionata ad X che rappresenta la matrice che racchiude tutti i dati sperimentali. B ed E sono rispettivamente le matrici corrispondenti ai coefficienti di regressione (ottenuti con il criterio della massima covarianza) ed ai residui. Il metodo sfrutta l'algoritmo PLS, per questo motivo è necessario determinare il numero di variabili latenti (LV) ottimali per la costruzione del modello: per fare questo viene generalmente utilizzata la cross validation, che permette di valutare l'errore totale di classificazione (si sceglie, chiaramente, il numero di LV corrispondente all'errore

minimo). Nel caso più semplice in cui sono presenti solamente due classi ($G = 2$) si assegna il valore 0 ad una categoria ed 1 all'altra (in alternativa -1 e +1 se si preferisce utilizzare il codice bipolare). Quindi viene impiegato l'algoritmo PLS per il calcolo del modello di regressione della precedente equazione: X e Y sono espresse attraverso blocchi con un numero ridotto di variabili latenti, cosicché gli scores abbiano massima covarianza. In termini matematici:

$$X = TP^T + E_X$$

$$Y = UQ^T + E_Y$$

$$U = TC$$

dove T e U sono rispettivamente gli scores di X e Y ; P e Q rappresentano i rispettivi loadings. La terza equazione descrive la relazione lineare tra gli scores di X e Y . Per poter nello stesso tempo sia garantire la massima covarianza di T e U , sia poter ottenere la matrice degli scores T a partire dalla matrice X , si deve introdurre la matrice dei pesi R tale che:

$$T = XR$$

Dalle equazioni precedenti si ottiene la matrice B dei coefficienti di regressione:

$$B = RCQ^T$$

La matrice B pone direttamente in relazione X e Y , per tale motivo permette di interpretare il modello in termini delle variabili misurate e allo stesso tempo consente di ottenere in maniera diretta i valori di risposta predetta per nuovi campioni incogniti:

$$\hat{y}_{\text{new}} = x_{\text{new}} B$$

È bene ricordare che trattandosi di un metodo di regressione, la risposta dell'algoritmo PLS è caratterizzata da valori che rientrano nell'insieme dei numeri reali (e che quindi non sono più binari). Quindi mentre il valore vero della Y per i campioni utilizzati per la costruzione del modello può essere 0 o 1, la Y predetta (\hat{y}) può assumere qualsiasi valore reale, in quanto risultato di una regressione. Per questo motivo è necessario una regola di classificazione che permetta di assegnare ciascun campione ad una delle classi in esame sulla base del valore di queste predizioni, ovvero determinare un valore di soglia, compreso tra 0 ed 1, in modo tale da predire se uno specifico campione si avvicini di più all'assegnazione ad una classe piuttosto che all'altra.

In questo caso, considerando sempre l'esempio di campioni divisibili univocamente in due classi, si avrà che gli individui con $y > y_{\text{soglia}}$ verranno collocati nella prima classe mentre quelli con $y < y_{\text{soglia}}$ nella seconda. Non esiste una risposta corretta ovvero la divisione potrebbe variare da situazione a situazione, quindi, è fondamentale prestare attenzione sull'ottimizzazione del valore limite. Spesso, questa soglia, per la simmetria del problema, viene fissata a 0.5, ma può assumere anche valori diversi, ad esempio, quando si vuole privilegiare una classe rispetto ad un'altra oppure nei casi in cui la distribuzione dei campioni possa non essere uniforme. Quando si ha una situazione in cui le classi sono più di due (G classi) è necessario codificare

l'informazione della Y vera in una matrice Y Dummy in cui si hanno G dimensioni pari a 0 eccetto che per la colonna che corrisponde alla classe di appartenenza del campione in questione, dove invece si ha il valore 1 (ad esempio nel caso di 3 classi, il vettore binario di risposta della matrice dummy avrà tutti 0 escluso il valore 1 in posizione 3 se l'individuo appartiene a tale categoria). In questi casi la classificazione può essere effettuata in maniera tale da assegnare il campione alla classe corrispondente al valore di Y predetta più alto, oppure, applicando ai valori di Y predetta l'analisi discriminante lineare (LDA).

2.3.4. Data fusion

L'elaborazione multiblock viene utilizzata quando si devono analizzare campioni caratterizzati da matrici complesse. Tramite il data fusion è possibile integrare i risultati che provengono da più metodi analitici. Lo scopo delle tecniche data fusion è quello di fondere due blocchi separati di dati. Nel presente lavoro di tesi si sono integrati i risultati provenienti dalla gascromatografia con quelli provenienti dall'analisi HPLC al fine di ottenere la massima informazione dai dati a disposizione. I vantaggi di questi approcci multiblock risiedono nel fatto che viene incrementata sia l'affidabilità del modello che la sua accuratezza nella predizione (nel caso di una classificazione). Questi approcci si suddividono in tre categorie a seconda del livello sul quale la fusione avviene: *low level*, *mid level* e *high level* (Marini, 2016). Nel *low level data fusion* due matrici di dati ottenute da due metodologie strumentali differenti vengono concatenate. Per evitare che un blocco contribuisca maggiormente rispetto all'altro, è necessario tenere in considerazione il peso di ciascuna variabile. Si utilizza quindi il Block Scaling ovvero un auto-scaling che viene eseguito a livello della matrice di dati (e non delle singole variabili). Un approccio che è possibile eseguire è dividere ogni blocco per la norma di Frobenius che rappresenta la somma dei quadrati degli elementi delle matrici e considera la varianza totale del blocco di dati. Nel *low fusion level*, come risultato dalla concatenazione dei due blocchi si ottiene una matrice con un numero di colonne quante sono le variabili e un numero di righe quanti sono i campioni. I vantaggi di questo metodo è la semplicità d'uso (poiché se i campioni sono gli stessi basterà semplicemente concatenare le righe le quali hanno la stessa direzione), e l'interpretazione diretta della matrice finale dato che le variabili di partenza non vengono modificate. Il limite di questa tecnica si ha nei casi in cui i dati sono altamente multivariati e, quindi, esiste l'elevata probabilità di racchiudere informazioni non rilevanti. Questo caso può accadere principalmente quando il numero di campioni è molto basso rispetto al numero di variabili e la varianza è sbilanciata a favore di queste ultime. Difatti se i dati si fondono, il numero di campioni rimane lo stesso ma il numero delle variabili raddoppia e questo porta ad un aumento di informazione spuria. Questi limiti del *low level* in parte vengono risolti dal data fusion *mid-level*. Nel *mid level* si fondono le *features* (nella PLS-DA corrispondono agli scores lungo le variabili latenti) dei modelli relativi ai singoli blocchi di dati affinché si crei un modello nuovo a partire da essi (si uniscono quindi gli scores dei modelli precedentemente ottimizzati). Varianti del *mid level* sono i metodi sequenziali o paralleli ed ortogonalizzati che vengono considerati metodi innovativi, come ad esempio la SO-PLS ed il POPLS. Il metodo SO-PLS estrae in maniera sequenziale le componenti, ad esempio PLS, effettuando dapprima un modello del primo blocco e poi del secondo, dopo che ha rimosso da esso tramite l'ortogonalizzazione la parte di variabilità spiegata dal blocco precedente, ovvero l'informazione ridondante

tra le due matrici al fine di estrarre contributi nuovi (Mishra et al., 2021). L'*high level* consiste nel calcolare separatamente i modelli di regressione o classificazione. Nelle tecniche *high level*, solo in seguito vengono riuniti i risultati al fine di ottenere un'identificazione finale tramite tecniche Bayesiane. Il vantaggio principale di questi metodi risiede nel fatto che i modelli sono trattati individualmente e quindi gli errori che sono presenti non avranno influenza nel risultato finale in quantità paragonabile a quanto invece accade con gli altri approcci, dove invece le informazioni si mescolano sin dall'inizio (Borràs et al., 2015; Marini, 2016).

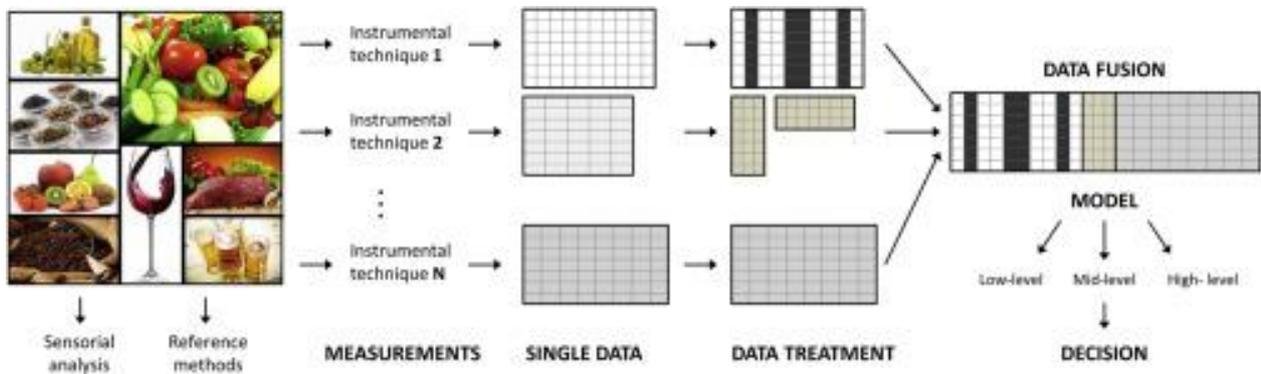


Figura19: Rappresentazione grafica delle metodologie di *Data Fusion* (Borràs et al., 2015).

CAPITOLO 3

PARTE I

CARATTERIZZAZIONE DELLA PASTA INTEGRALE DI GRANO DURO



La pasta fa da protagonista in questo lavoro di tesi e nella ricerca svolta. La pasta rappresenta anche la principale protagonista del Made in Italy e un alimento cardine della dieta mediterranea. Il suo successo è dovuto alle sue caratteristiche uniche apprezzate dai consumatori di tutte le età: eccellenti proprietà nutrizionali, elevata digeribilità, lunga conservabilità, versatilità in termini di dimensioni e forme diverse, facilità di preparazione, convenienza e caratteristiche di texture. La pasta è una fonte di carboidrati ed energia, a basso contenuto di grassi e basso valore glicemico: 100g di pasta contengono circa 31 g di carboidrati, 26.01g di amido, 1.8 g di fibre, 5.8g di proteine, 0.93 g di grassi e 158 kcal (Melini et al., 2020). Rispetto ad altri prodotti a base di amido, la pasta mostra maggiori effetti fisiologici benefici, derivati dalla bassa risposta glicemica e insulinemica postprandiale, e può inoltre essere veicolo di sostanze nutraceutiche. I differenti tipi di pasta presenti sul mercato possono essere suddivisi in:

- Pasta secca: rappresenta la tipologia preferita dagli italiani, per la sua caratteristica di tenuta in cottura. Mantenendo all'ebollizione la pasta secca per circa 15 minuti in acqua salata, essa non deve rompersi, o rilasciare amido in acqua. La pasta secca all'uovo deve necessariamente essere di grano duro e la quantità di uova non deve essere inferiore a 200 g/kg di semola.
- Pasta fresca: questa tipologia di pasta ha un contenuto di umidità fino al 30% (e non inferiore al 20%), da questo si deve il suo nome "fresca", di conseguenza la data di scadenza è ravvicinata. Essa può essere prodotta anche con grano tenero e addizionata con conservanti, antiossidanti, emulsionanti.
- Pasta speciale: un tipo di pasta prodotta solo con grano duro e altri ingredienti alimentari (necessariamente riportati in etichetta), mescolati all'impasto o come ripieno.
- Pasta dietetica: racchiude una varietà di prodotti come:
 - ❖ Pasta gluten-free: consumati maggiormente dai celiaci;
 - ❖ Pasta proteica: viene aggiunto glutine e proteine varie all'impasto;
 - ❖ Pasta integrale: pasta con elevato contenuto di fibre vegetali, poche calorie, ma con lo svantaggio di tenere meno la cottura: alcune hanno un sapore amaro e sgradevole di crusca e una consistenza "granulosa"; altre sono molto simili alle paste tradizionali.

Secondo la Legge Italiana n. 580 del 1967, modificata dal DPR 187/01, la pasta secca è prodotta esclusivamente con semola di grano duro e acqua. Secondo Coldiretti, la pasta secca rappresenta circa il 90% dei volumi d'acquisto del comparto e ricopre il segmento di riferimento per l'industria dei pastifici per fatturato, produzione e numero di addetti. Il grano rappresenta la base per una varietà di alimenti in molti paesi sviluppati, e il valore nutrizionale di questo cereale possiede il potenziale di migliorare la salute delle popolazioni industrializzate. Sebbene il grano duro sia relativamente il raccolto minore nel mondo, è il maggiore raccolto per molte aree del bacino del Mediterraneo e costituisce la materia prima per differenti prodotti finiti come la pasta e il couscous consumati in tutto il mondo. Il grano duro (*Triticum turgidum L. ssp. Durum*) è un cereale che cresce nel mondo in 17 ettari con 37 milioni di tonnellate prodotti annualmente durante l'ultimo decennio, con variazione da 32 milioni a 42 milioni di tonnellate causate maggiormente da siccità e stress da caldo (dati FAO 2017). Globalmente il grano duro rappresenta solo l'8% dell'intera area

coltivata con il grano e il 5% della produzione mondiale di grano. I principali paesi produttori del grano duro sono Europa, Canada, Turchia, USA, Algeria, Kazakhstan, e Messico, mentre i paesi che ne producono di meno sono Siria, Marocco, Tunisia, India, Australia, Argentina e Cile, oltre ad altri. I maggiori produttori in EU sono Italia, Francia, Grecia, e Spagna. Il contenuto di proteine e il colore giallo sono le caratteristiche principali utilizzate per valutare la qualità del grano. Esse rappresentano un'importanza dal punto di vista commerciale, nutrizionale e tecnologico sia del grano che dei prodotti finiti.

Nel corso del tempo, l'attenzione sempre maggiore verso alimenti funzionali ha spinto anche l'industria della pasta ad immettere sul mercato prodotti con aggiunta di nutrienti e/o sostanze bioattive. La pasta è un alimento largamente consumato con una lunga shelf-life, è stato, pertanto, oggetto negli anni di numerose strategie di innovazione, fungendo da vettore di vitamine, minerali, acidi grassi polinsaturi, estratti vegetali composti e fibre. Le più recenti funzionalizzazioni della pasta includono una varietà di ingredienti, incluso l'impiego di cereali alternativi o pseudo-cereali, o l'utilizzo di legumi di differenti tipologie (come fagioli, piselli, lenticchie, ecc.). Oltre a ridurre l'indice glicemico, aumentare il contenuto proteico e migliorare il profilo di amminoacidi e acidi grassi, un grande beneficio della funzionalizzazione della pasta è quello di migliorare la capacità antiossidante del prodotto finale. Numerosi studi dimostrano che un'alimentazione inappropriata rappresenta un fattore di rischio per l'insorgenza di diverse patologie. Altre ricerche dimostrano che molti prodotti alimentari sono associati alla prevenzione di malattie e alla promozione di consumi salutistici. Per esempio, la celiachia, che rappresenta un disturbo alimentare particolarmente diffuso al giorno d'oggi, provocata dal consumo di cereali ricchi di glutine, ha indirizzato l'industria alimentare verso la produzione di prodotti gluten-free con l'impiego (anche nel settore della pasta) di cereali privi di glutine come riso, mais, miglio, amaranto, quinoa o grano saraceno. Indagini di mercato mostrano che tali prodotti sono consumati anche da una fetta di consumatori ai quali la celiachia non è stata diagnosticata, solo per la falsa convinzione che si tratti di prodotti con particolari peculiarità benefiche (facciano bene o facciano dimagrire) o per la scelta di inseguire mode, piuttosto che da una reale qualità nutrizionale e di sicurezza scientificamente provata. Tuttavia, questo mostra una tendenza sempre più diffusa dei consumatori a ricercare, anche in campo alimentare, prodotti attenti al benessere e alla salute.

I. L'importanza della componente aromatica e antiossidante nella pasta di grano duro

1.1. La pasta integrale

L'*italianità* è un valore aggiunto della pasta, per la quale studi dimostrano che i consumatori sono disposti a pagare anche prezzi più alti. Ciò è in linea con il fenomeno della domanda globale di prodotti alimentari italiani. Negli anni, il mercato della pasta sta cambiando poiché le richieste dei consumatori si stanno differenziando con un crescente interesse verso prodotti con caratteristiche specifiche. I consumatori attenti al benessere e ad un'alimentazione corretta sono in aumento, ed i segmenti salutisti, p.e. pasta biologica, integrale, di kamut, di farro fino a quelle a base di legumi (ceci, lenticchie, ecc.), mostrano un trend in crescita. L'aumento di

consapevolezza del legame esistente tra alimentazione e salute deriva sicuramente dai numerosi studi oramai ampiamente diffusi, da una maggiore scolarizzazione, e da iniziative pubbliche per la promozione di uno stile di vita sano; tutti fattori che hanno comportato una trasformazione delle abitudini alimentari dei consumatori e delle scelte al momento dell'acquisto. In questo panorama, la pasta integrale in tempi recenti ha riscosso particolare successo nazionale e internazionale come conseguenza di una crescente richiesta da parte dei consumatori di prodotti alimentari funzionali che contribuiscono al benessere della salute umana attraverso una composizione nutrizionale bilanciata. È un prodotto di trasformazione del grano duro, ottenuto dalla macinazione del chicco completo di grano, compresi germe e crusca, ovvero le due frazioni non considerate invece nel caso della produzione di pasta di semola tradizionale ("raffinata"). Secondo la legislazione italiana, la pasta integrale deve possedere un livello minimo di proteine pari all'11%, un contenuto di ceneri tra 1,4 e 1,8%, e un grado di acidità non superiore a 6; tuttavia non esiste nessuna indicazione per quanto riguarda il contenuto in fibra (maggiormente concentrata nella crusca) e lipidi (rappresentano fino al 15% del germe). Le aziende, quindi, hanno la possibilità di produrre la pasta integrale o a partire da uno sfarinato proveniente dall'intero chicco di grano (inclusi crusca e germe) oppure da uno sfarinato integrale derivato ricomponendo la semola raffinata con una certa quantità di crusca, al fine di rispettare il contenuto in ceneri definito per legge. Questi due modi di ottenere la pasta integrale soddisfano entrambi i requisiti imposti dalla legge, ma portano a prodotti con diverse proprietà nutrizionali. La pasta integrale ottenuta con tutte le frazioni del chicco diventa un'eccellente fonte di composti fitochimici e minerali. Confrontando la pasta integrale con quella di grano duro, a parità di calorie, la prima possiede un indice glicemico più contenuto e un indice di sazietà superiore, grazie al contenuto di composti fitochimici (*phytochemicals*), caratteristiche che apportano benefici per la salute umana. Le proprietà benefiche dell'integrale si devono proprio a queste sostanze che si trovano principalmente nel germe e nella crusca; sostanze, quindi, presenti in quantità molto minore nella pasta tradizionale di grano duro. Secondo studi clinici ed epidemiologici il consumo di prodotti integrali potrebbe ridurre il rischio di insorgenza di malattie croniche e cardiache, come alcuni tumori, diabete di tipo 2, e può aiutare a mantenere il peso corporeo abbassando ulteriormente la risposta glicemica. Sebbene la pasta integrale possieda aspetti positivi dal punto di vista nutrizionale, dal punto di vista organolettico la pasta integrale è spesso associata ad un decadimento della qualità sensoriale del prodotto prima e dopo la cottura (Rakshesh et al., 2015). Oltre al colore più scuro, la pasta integrale è caratterizzata anche da un sapore più amaro e durante la conservazione potrebbe dare origine a sapori e odori sgradevoli. I produttori di pasta integrale sono quindi chiamati a rispondere a un prodotto che possiede sì elevate proprietà nutrizionali, senza trascurare però l'accettabilità del prodotto e per tali motivi porre l'attenzione su tutti gli aspetti merceologici, compresi la materia prima e il processo tecnologico. Secondo il Consorzio HEALTHGRAIN (2014), i cereali integrali vengono definiti come "*the intact, ground, cracked or flaked kernel after the removal of inedible parts such as the hull and husk. The principal anatomical components—the starchy endosperm, germ and bran—are present in the same relative proportions as they exist in the intact kernel*". Mentre esiste la definizione di cereale integrale, non esiste una definizione unica di pasta integrale, ma ogni paese adotta una sua definizione. In Germania e in Italia la pasta integrale è la pasta dove il 100% della componente del grano nel prodotto finale

è il grano intero; in Danimarca la pasta che contiene una % di grano intero uguale o maggiore del 60% su base di sostanza secca è classificata come pasta integrale; in Francia e in Olanda non ci sono né regolamenti né linee guida per la definizione di pasta integrale. Gli alimenti ad alto contenuto di grano integrale non sono universalmente apprezzati dai consumatori; quindi, i produttori hanno bisogno di usare gli ingredienti di grano integrale ad un livello tale da ottenere prodotti con buone qualità sensoriali. Dall'altra parte, il contenuto di ingredienti integrali usati per la preparazione del prodotto, devono essere adeguati a garantire benefici nutrizionali ai consumatori. Il *Dietary Guidelines for Americans and Healthy People 2010* ha raccomandato il consumo di almeno 3 porzioni di integrale (ciascuno equivalente a tre volte) al giorno. Come mostrato dalla loro inclusione nel *Food Guide Pyramid and US Dietary Guidelines (National Research Council, 1989)*, i cereali integrali rappresentano dei componenti importanti della dieta alimentare.

1.2. La composizione del chicco di grano

La semola di grano duro è definita come “il prodotto granulare a spigolo vivo ottenuto dalla macinazione e conseguente abburattamento del grano duro, liberato dalle sostanze estranee e dalle impurità” (Decreto Legislativo 187/2001). Il chicco o cariosside del grano è caratterizzato da una forma ovoidale (larga 3-4mm e lunga da 6 a 8mm) la cui faccia dorsale è convessa e quella ventrale è attraversata da un solco longitudinale.

La cariosside del grano racchiude principalmente tre parti:

- Crusca (o pericarpo): involucro esterno del chicco che comprende spermoderma, perisperma e una parte che racchiude a sua volta vari strati (epicarpo, cellule intermedie, cellule incrociate e cellule tubolari). I composti maggiori che costituiscono la crusca sono fibre, sali minerali e sostanze antiossidanti.
- L'endosperma interno: frazione della cariosside che comprende lo strato aleuronico, composto da cellule monostratificate ricche in enzimi, lipidi, proteine, sali minerali, vitamine e piccole quantità di sostanze antiossidanti. Nella parte centrale c'è l'endosperma amilifero caratterizzato da cellule contenenti proteine (8-18%) e granuli di amido (60-70%).
- Il germe (o embrione): frazione del chicco di grano separato dall'endosperma da un rivestimento esterno denominato scutello nelle cui cellule si depositano, durante la maturazione, le sostanze nutritive necessarie al momento della germinazione. Il germe possiede un elevato contenuto di lipidi e proteine.

Fattori come le specie di appartenenza, il clima, il terreno, i trattamenti e lo stato di conservazione influenzano la composizione chimica del chicco di grano. Il 72% del peso della cariosside è rappresentato dai glucidi che sono caratterizzati dall'amido (60-68%), pentosani (6,5%), cellulosa e lignina (2,5%) e zuccheri riducenti (1,5%). Il 12% del chicco è costituito dalle proteine che si distinguono in albumine e globuline (ad alto valore biologico) e prolamine (glutenine e gliadine, presenti nell'endosperma) a seconda della loro solubilità. I

lipidi si localizzano quasi esclusivamente nella parte del germe e sono rappresentati da gliceridi esterificati ad acidi grassi saturi (13%) e insaturi (80-84%). Nella parte esterna del chicco si trovano i sali minerali, ovvero fosfato di magnesio e potassio, sali di calcio, ferro, zinco. Anche le vitamine sono presenti nel chicco: nello strato aleuronico si trovano vitamine principalmente del gruppo B (come niacina e piridossina), nello scutello la tiamina e nell'embrione la vitamina E. I trattamenti di macinazione, setacciatura e allontanamento delle frazioni esterne del chicco, comportano una perdita di vitamine nelle farine. Secondo le Linee Guida per una Sana Alimentazione Italiana pubblicati dall'Istituto Nazionale per la Ricerca degli Alimenti e la Nutrizione (INRAN, 2003), i cereali devono essere assunti in maniera tale da conferire almeno il 45% delle calorie apportate giornalmente. Sebbene le relazioni fra struttura e funzione dell'endosperma siano state a lungo studiate, minore interesse è stato rivolto alle frazioni di germe e crusca nonostante contribuiscano a circa il 20% del peso della frazione finale dopo la molitura tradizionale. Questo è strano ancor di più perché germe e crusca forniscono la maggior parte dei composti biologicamente attivi e quindi la maggior parte del valore nutrizionale e salutistico dovuto all'elevato contenuto di vitamine, minerali, amminoacidi essenziali, fibre e sostanze antiossidanti. Il minore interesse di queste due frazioni deriva dal fatto che queste due parti rappresentano solamente una piccola percentuale del totale valore economico del frumento molito, rispetto invece all'endosperma che rappresenta circa il 90% del valore (Fulcher & Duke, 2002).

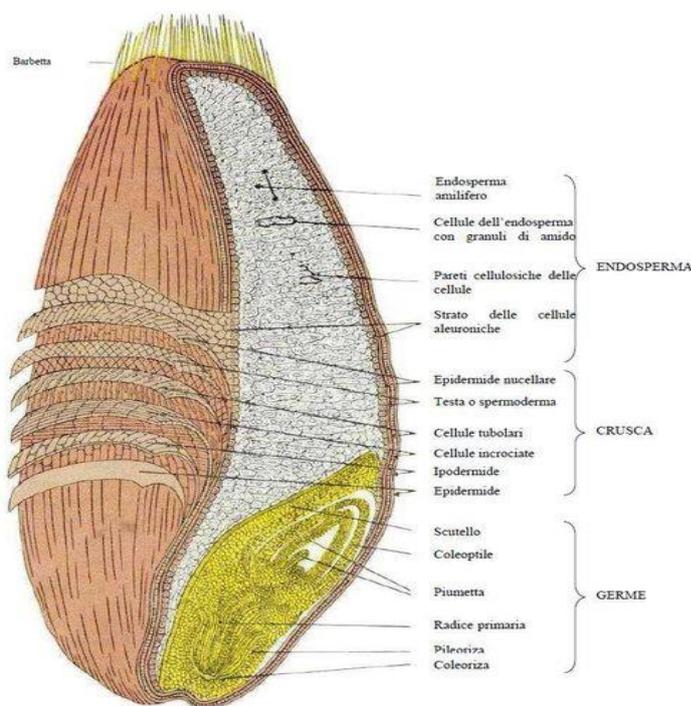


Figura 20: Struttura della cariosside del grano.

1.3. I composti fitochimici presenti nel grano duro

I composti antiossidanti presenti nei cereali possono essere suddivisi in antiossidanti idrofili (p.e. i composti fenolici) e antiossidanti lipofili (p.e. tocoli e carotenoidi) (Adom & Liu, 2002). Oltre a carotenoidi, fenoli e tocoli, i cereali possiedono anche i lignani, ovvero antiossidanti con azione anticancerogena e i fitosteroli, che hanno la funzione di abbassare il livello di colesterolo ematico e limitare il rischio di patologie croniche. Anche altri antiossidanti incluso l'acido fitico e il selenio sono presenti in quantità significative nel grano. La crusca rappresenta la maggiore fonte di acidi fenolici, fibre, e minerali; il germe contiene vitamine, minerali, grassi, e qualche proteina. Quindi, il grano integrale e i prodotti integrali (ottenuti mediante la macinazione del chicco intero di grano) contengono più vitamine, minerali, antiossidanti naturali e fibre rispetto ai prodotti raffinati. La maggior parte dei *phytochemicals* dei cereali integrali con benefici per la salute sono presenti nella frazione crusca/germe. Nella farina integrale, la frazione di crusca/germe contribuisce all'83% del contenuto fenolico totale, 79% del contenuto totale dei flavonoidi, 78% della zeaxantina totale, 51% della luteina totale, e 42% della beta-cryptoxantina totale (Adom et al., 2005). La frazione della crusca/germe del grano integrale può quindi impartire maggiori benefici salutari quando consumati come parte di una dieta. I cereali integrali possiedono *phytochemicals* unici, complementari a quelli nella frutta e verdura quando consumati insieme. Ad esempio, l'acido ferulico e i diferulati si trovano principalmente nei cereali, ma non sono presenti in quantità significative in qualche frutta e verdura. Gli acidi fenolici sono la forma più presente dei composti fenolici nei cereali e sono localizzati in misura maggiore nella frazione germe/crusca: il contenuto di acidi fenolici nei cereali è alto (possono arrivare a 800 mg/kg), mentre i flavonoidi sono presenti in piccole quantità. Tra gli acidi fenolici, l'acido ferulico è il principale composto fenolico nel frumento presente in concentrazioni 50-70 volte maggiori nella porzione crusca/germe rispetto all'endosperma (Adom & Liu, 2002; Carcea et al., 2002), seguito da altri acidi come l'acido caffeico, p-cumarico, siringico e vanillico. Gli acidi fenolici possono essere presenti in forma di fenoli liberi solubili, solubili coniugati e insolubili legati. Gran parte dei composti fenolici si trova nella forma legata; questi rappresentano i principali responsabili dell'attività antiossidante totale della granella (90%) (Adom & Liu, 2002) rispetto invece ai fenoli liberi e coniugati i quali contribuiscono in misura minore (meno dello 0,6% e 7%, rispettivamente) (Liu, 2007). Nel mais e nel frumento il rapporto tra acido ferulico in forma libera, solubile-coniugata e legata è di 0,1:1:100 (Liu, 2007). I flavonoidi nei cereali, presenti maggiormente nel germe e nella crusca, non sono generalmente molto abbondanti. I flavonoidi si suddividono in antocianine, flavanoli e flavonoli, e la maggior parte si trova in forma legata. Per quanto riguarda gli antiossidanti lipofili come i tococromanoli o tocoli (noti anche come vitamina E), il loro contenuto è elevato nel frumento, e rappresentano gli antiossidanti con attività antitumorale e ipocolesterolemica. I tococromanoli racchiudono una famiglia di composti strutturalmente simili (vitameri) tra loro, otto dei quali si trovano in natura. Questi otto isomeri si suddividono in due categorie: tocoferoli e tocotrienoli; sono costituiti da un anello biciclico sostituito (cromano), e da una lunga catena isoprenoide a sedici atomi di carbonio (fitile) che è saturata nel caso dei tocoferoli e presenta tre doppi legami non coniugati nel caso dei tocotrienoli. I tocotrienoli sono gli isomeri maggiormente presenti nei cereali rappresentando più del 50% del contenuto totale di tocoli in avena, grano, orzo e riso, dove i tocoferoli e il β -tocotrienolo sono principalmente presenti nella frazione

germe, mentre gli altri tocotrienoli sono localizzati nell'endosperma, nel pericarpo e nello strato aleuronico (Tiwari & Cummins, 2009). La presenza dei tocoli nel grano duro riguarda gli isomeri α e β dei tocoferoli e tocotrienoli e il β -tocotrienolo risulta essere il composto principale fra i tocoli (in media circa 30 mg/Kg) (Panfili et al., 2003). Infine, tra gli antiossidanti lipofili ci sono i carotenoidi, composti con proprietà antiossidante oggetto di studio del presente lavoro di tesi. Nel paragrafo 1.3.1 verrà approfondita la loro importanza e il loro contenuto nella pasta.

| Composti | Principale Localizzazione | Funzione |
|--|---|---|
| Composti fenolici [acidi fenolici e derivati flavonoidi lignani lignina | Endosperma e pericarpo | Ipocolesterolemica Antitumorale Antidiabetica Riduzione del rischio di malattie cardiovascolari e degenerative |
| Tocoli [tocoferoli tocotrienoli | Germe Strato aleuronico e sub-aleuronico | |
| Carotenoidi [caroteni xantofille | | |
| Fibre solubili insolubili | | Attività prebiotica Miglioramento peristalsi |

Figura 21: Sostanze antiossidanti presenti nel grano duro.

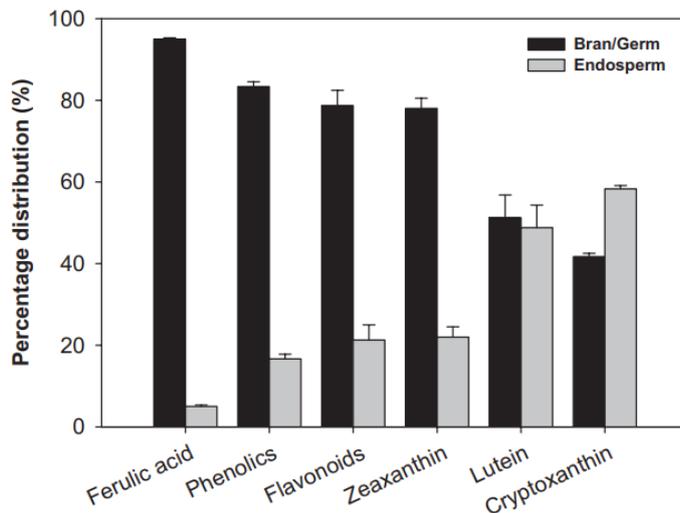


Figura 22: Distribuzione percentuale dei composti fitochimici nelle diverse parti del chicco di grano (Liu, 2007).

1.3.1. I carotenoidi

Tra le sostanze antiossidanti lipofile, particolare interesse l'hanno ricevuto i carotenoidi, un gruppo di pigmenti giallo-arancio identificati in più di 600 piante, microrganismi e animali, studiati per la prima volta alla fine degli anni '80 da Bendich e Olson che hanno caratterizzato oltre 750 carotenoidi (Bendich & Olson, 1989). I carotenoidi possono essere suddivisi in due categorie: i caroteni (con attività di provitamina A) e le xantofille (composti idrolizzati senza attività di provitamina A). I caroteni (come alfa e beta carotene e licopene) sono idrocarburi tetraterpenoidi lineari che possono essere ciclizzati a una o entrambe le estremità della molecola, mentre le xantofille (come beta-criptoxantina, luteina, e zeaxantina) sono derivati ossigenati dei caroteni. Altri carotenoidi presenti in natura sono i carotenoidi incolori fitoene e fitofluene che possono fornire salute e benefici cosmetici. I carotenoidi presenti nelle diete umane tipicamente contengono uno scheletro di C40 di unità di isoprene (tetraterpenoidi); tuttavia esistono anche gli apocarotenoidi che possiedono un numero minore di carboni. La struttura può essere ciclizzata a una o entrambe le estremità, avere vari livelli di idrogenazione, o possedere gruppi funzionali contenenti ossigeno. Licopene e betacarotene sono esempi di carotenoidi acicclizzati e ciclizzati, rispettivamente. I carotenoidi sono comunemente presenti in natura nella loro forma trans. Una caratteristica strutturale dei carotenoidi è la lunga serie di doppi legami coniugati che formano la parte centrale delle molecole: questa peculiarità dà a loro la reattività chimica, la forma, e le proprietà di assorbimento della luce. La struttura ciclica base di questi composti può essere modificata da reazioni di idrogenazione, deidrogenazione, ciclizzazione e ossidazione. I carotenoidi possono andare incontro a degradazione e isomerizzazione in seguito ad esposizione a calore, luce, ossigeno, e acidi. A causa della loro sensibilità a questi fattori, in fase di analisi sono necessarie particolari precauzioni al fine di minimizzare possibili perdite. Britton e Khachik (2009), hanno classificato i carotenoidi in base alla loro concentrazione in un alimento suddividendoli in quattro gruppi: basso (0-0.1 mg/100g), moderato (0.1-0.5 mg/100g), alto (0.5-2 mg/100g) e molto alto (> 2 mg/100g). Tra i cereali, il mais possiede un contenuto di carotenoidi (11.14 ug/g DW) fino a trenta volte superiore rispetto a quello presente in avena, grano o orzo (0.36, 1.50-3.05, e 1.50 ug/g DW) (Panfili et al., 2004); se assunti in proporzioni elevate nella dieta i prodotti a base di cereali rappresentano delle fonti di carotenoidi. Ad esempio, il pane e la pasta possiedono contenuti di luteina e zeaxantina in un range tra 4.5 a 6.3 e 0.08 a 0.12 ug/g DW, rispettivamente (Hidalgo et al., 2010). Il livello di questi composti è ancora maggiore qualora la pasta venga preparata con uova: 6.56 ug/g DW per la luteina e 1.61 ug/g DW per la zeaxantina con un contenuto totale di carotenoidi di 8.50 ug/g DW (Fратиanni et al., 2012). La luteina rappresenta il carotenoide maggiormente presente nel grano duro ed è ugualmente distribuita lungo la cariosside: aleurone, endosperma e germe contengono rispettivamente 0.425, 0.557, e 2.157 mg / kg di luteina. La luteina costituisce circa l'86-94% dei carotenoidi totali presenti nel grano, seguita da quantità minori (3%-5%) di zeaxantina, luteina esterificata, isomeri di luteina e zeaxantina, e i caroteni beta-criptoxantina, betacarotene e alphacarotene (Panfili et al., 2004; Fratianni et al., 2005). Secondo uno studio di Brandolini et al., (2015) i carotenoidi presenti nella cariosside hanno una concentrazione di 6.2 ± 0.13 mg/kg (sostanza secca). I carotenoidi sono isoprenoidi ampiamente distribuiti in natura e sono sintetizzati da batteri, qualche fungo e organismi fotosintetici (cianobatteri, alghe e piante). La maggior parte delle specie animali non sono

in grado di biosintetizzare i carotenoidi; dunque, questi composti devono necessariamente essere incorporati nelle diete e quindi modificati strutturalmente. Tuttavia, alcuni animali invertebrati come insetti e acari emitteri e ditteri riescono a sintetizzare i carotenoidi. Già a partire dal 1980, era diffuso l'interesse dei carotenoidi come possibili composti benefici e la maggior parte di questi veniva consumato nei pasti a base di vegetali. Considerando gli alimenti abituali presenti nella dieta quotidiana, l'uomo ha accesso a circa 50 carotenoidi. Le fonti maggiori di carotenoidi sono rappresentate da frutta e verdura (Britton & Khachick, 2009). I livelli dei carotenoidi presenti nei diversi prodotti alimentari dipendono da vari fattori come le condizioni climatiche, il genotipo, i fattori agronomici, il processo produttivo, la cottura e le tecniche di conservazione. Ad esempio, è stato dimostrato che il cambiamento climatico può avere un impatto positivo nei livelli di carotenoidi con attività di provitamina A delle piantagioni, possibilmente in relazione ai cambiamenti negli indici dell'UV-B del sole (Dzomeku et al., 2020). I carotenoidi hanno un'ampia gamma di applicazioni in diversi settori. Sono utilizzati nell'industria alimentare e farmaceutica sia in termini di aroma e sapore che di colore (ad esempio in prodotti come formaggi, caramelle, succhi di frutta e pasta). Vengono utilizzati anche per la fortificazione degli alimenti, in linea con il crescente interesse per il miglioramento della salute attraverso il consumo di prodotti naturali, nonché come coloranti negli alimenti. I carotenoidi possono essere aggiunti alla pasta come additivo, aggiungendo frutta e verdura (colorata) ad alto contenuto di sostanze fitochimiche. Queste sostanze sono essenziali per la fotosintesi e la vita in atmosfera di ossigeno, possiedono funzioni importanti nelle piante: provvedono alla pigmentazione essenziale per la fotosintesi, riproduzione e protezione. Tuttavia, le funzioni fisiologiche e metaboliche dei carotenoidi rimangono poco conosciute, a causa della loro diversità strutturale e del fatto che i singoli carotenoidi sono naturalmente presenti in diversi isomeri cis-trans che possono influenzare la loro biochimica.

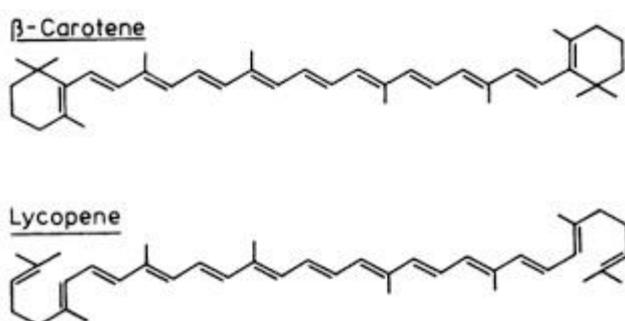


Figura 23: Esempio di carotenoidi ciclici e aciclici (beta-carotene e il suo isomero aciclico licopene).

1.3.1.1. La luteina

La luteina è il carotenoide maggiormente presente nel grano duro e per tale motivo in questo paragrafo verrà descritta in maniera più approfondita. Come già detto precedentemente, la luteina rientra nella classe delle xantofille ed è presente in una varietà di alimenti (cereali, broccoli, lattuga, spinaci, tuorlo d'uovo, ecc.). La

struttura chimica della luteina è rappresentata da una lunga catena caratterizzata da nove doppi legami alternati a legami singoli alle cui estremità sono posti due gruppi ossidrilici. La coniugazione che caratterizza la struttura chimica della luteina è responsabile del colore giallo/arancio della luteina e dell'assorbimento alla luce (Kijlstra, et al., 2012). La luteina viene assorbita dall'uomo nel tratto gastrointestinale tramite gli eritrociti dove poi avviene il passaggio nel fegato attraverso i chilomicroni e infine viene trasportata all'interno dell'organismo nel sangue tramite i principali carriers dei carotenoidi rappresentati da lipoproteine ad alta e bassa densità (*High Density Lipoproteins, HDL, Low Density Lipoproteins, LDL*) (Granado et al., 2003). I fattori che influenzano la biodisponibilità della luteina sono variabili e differiscono in ogni individuo (età, peso, sesso, ecc.) ma dipendono anche dal tipo di matrice alimentare. Ad esempio, secondo uno studio quando la luteina si trova in forma esterificata, a parità di concentrazione viene assorbita il 20% in meno rispetto a quando invece si trova nella sua forma libera poiché in tal caso deve essere preventivamente de-esterificata tramite enzimi appropriati (Kijlstra, et al., 2012). Essendo una xantofilla la luteina non può essere convertita in vitamina A dall'uomo; tuttavia, possiede delle proprietà benefiche esplicando le sue azioni antiossidanti prevenendo e riducendo il rischio di molte malattie cardiache e tumori. Principalmente le attività benefiche della luteina avvengono nella regione maculare dell'occhio, poiché a differenza dei caroteni, la luteina tende ad essere trasportata in questa regione del corpo accumulandosi principalmente nella retina. La macula rappresenta una regione al centro della retina responsabile della vista con la funzione di convertire gli stimoli che riceve in impulsi elettrici che trasmette successivamente al nervo ottico. Nella macula la luteina esplica le sue funzioni protettive difendendo la retina nei confronti della cataratta (opacizzazione del cristallino, la lente trasparente che permette di mettere a fuoco le immagini) e contro i danni provocati dalla luce solare. I pigmenti della macula che svolgono azione protettiva sono costituiti da tre (isomeri) xantofille che devono essere assunte tramite la dieta alimentare poiché non possono essere sintetizzate dal corpo umano: luteina, zeaxantina e meso-zeaxantina. Secondo la letteratura, un ridotto apporto di luteina può portare a un deficit del pigmento maculare (*Macular Telangiectasia*), seguito da una progressiva perdita della vista. Infatti, la luteina ha la capacità di proteggere la retina dai processi causati dalla luce blu, tramite l'assorbimento delle radiazioni e i meccanismi antiossidanti. La luce blu, o "luce visibile ad alta energia" (*High Energy Visible Light, HEV*), ha una lunghezza d'onda di 400-450 nm ed è una luce dannosa che distrugge la macula e causa il cosiddetto "aging" (*Age-Related Macular Degradation, AMD*). La luteina è considerata un filtro in grado di assorbire la luce nella regione più dannosa per le cellule dei fotorecettori, che ha un picco a 445 nm nello spettro visibile (Alves-Rodrigues & Shao, 2004). È stato calcolato che questo effetto della luteina riduce la quantità totale di luce blu che raggiunge la retina di circa il 40% (Roberts et al., 2009).

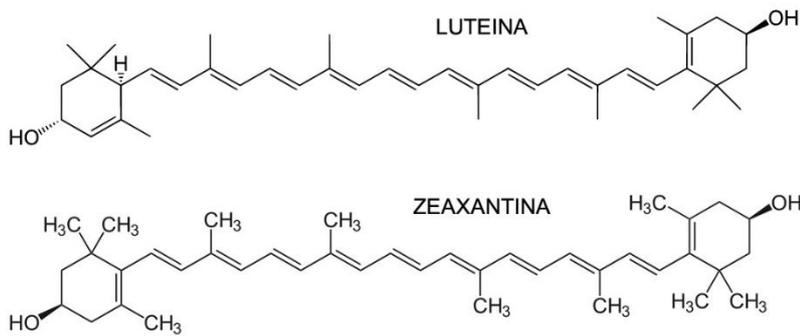


Figura 24: Struttura chimica della luteina e della zeaxantina.

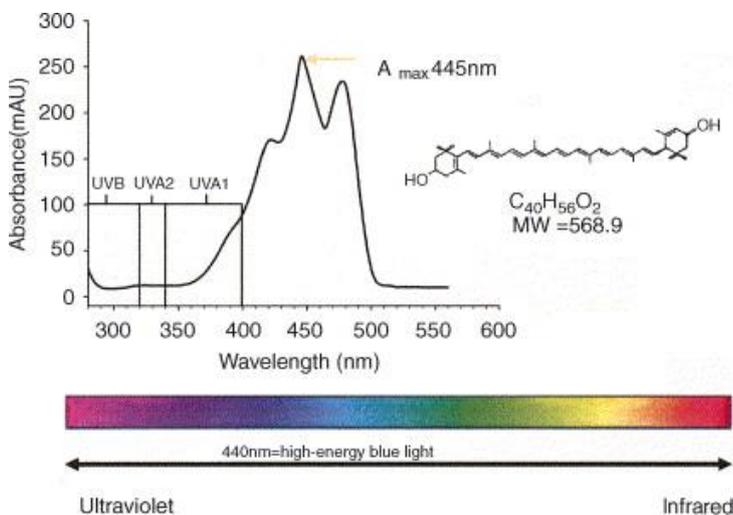


Figura 25: Spettro di assorbimento della luteina (Alves-Rodrigues & Shao, 2004).

1.3.1.2. I carotenoidi come indicatori di qualità del grano duro e della pasta: colore ed effetti benefici

I carotenoidi sono importanti per i loro effetti benefici e le loro proprietà antiossidanti, oltre che per la forte colorazione che conferiscono a molti alimenti, come la pasta, e perciò possono essere considerati come indicatori della qualità dei prodotti che li contengono. Sia la biosintesi dei carotenoidi nel grano che la degradazione dei carotenoidi durante il processo di lavorazione della pasta (causata da enzimi ossidativi che portano a un possibile cambiamento di colore e all'imbrunimento) sono dei fattori che possono influenzare il grado di giallo del grano duro e della pasta. I carotenoidi sono responsabili del caratteristico colore arancione, giallo e rosso di molti alimenti; in uno studio Britton e Khachik hanno classificato i carotenoidi in relazione al colore che conferiscono al tessuto delle piante (Britton, & Khachik. 2009):

- 1) Colore rosso: alto contenuto di licopene (come nei pomodori);

- 2) Colore arancione: alto contenuto di betacarotene o dei suoi derivati idrossilici beta-criptoxantina e zeaxantina;
- 3) Colore giallo/arancione: simile al precedente ma contenente anche l'alfa-carotene e la luteina;
- 4) Colore giallo: alto contenuto di epossidi di carotenoidi;
- 5) Colore giallo, arancione o rosso: carotenoidi che sembrano essere unici o caratteristici di un determinato prodotto (ad esempio la crocetina nello zafferano).

I carotenoidi danno alla semola di grano duro e ai prodotti finali il tipico colore giallo, e per questo motivo sono stati impiegati come indicatori della qualità del colore di questi alimenti. La luteina, in particolare, contribuisce in maniera significativa al colore giallo dell'endosperma e dei prodotti del grano. Il caratteristico colore giallo brillante della pasta è molto apprezzato dai consumatori e negli anni è cresciuto l'interesse per favorire l'incremento del contenuto di luteina nelle nuove varietà di grano duro. In effetti, i consumatori preferiscono visivamente i colori chiari, dal giallo chiaro all'ambra, ai colori scuri (ad esempio, marrone o crema). Diversi fattori influenzano l'ingiallimento della semola, tra cui la composizione chimica e l'origine del pigmento, la varietà e le condizioni di coltivazione. Nel 1935, Markley e Bailey studiarono alcuni estratti di grano e notarono che la maggior parte dei carotenoidi presenti nei chicchi erano xantofille (Markley & Bailey, 1935a,b). Questo lavoro fu confermato da un altro studio che dimostrò che i chicchi di grano duro contenevano grandi quantità di xantofille e piccole quantità di carotene (Munsey, 1938). Nel 1940 Zechmeister e Cholnoky hanno confermato questi lavori avvalorando la predominanza delle xantofille nella farina di grano e l'assenza del betacarotene (Zechmeister & Cholnoky, 1940). Nel 1968, Lepage e Sims hanno studiato e analizzato estratti di grano duro e hanno scoperto che il contenuto di luteina libera nei campioni era pari all'84,8% di pigmento giallo, i monoesteri e gli esteri della luteina contribuivano rispettivamente al 9,8% e 5,3% (Lepage e Sims, 1968); uno studio di Wildfeuer e Acker ha dimostrato che il contenuto di carotenoidi del grano duro era in media di 5,3 mg/kg, di cui solo l'1% era carotene (Wildfeuer & Acker, 1968). Gran parte degli studi condotti a partire dal 1912 hanno dimostrato che oltre il 90% dei carotenoidi presenti nel grano duro è costituito da luteina ed esteri della luteina e solo l'1% dei carotenoidi è costituito da beta-carotene; perciò, la luteina è il carotenoide che maggiormente contribuisce a dare il colore al grano e ai prodotti finiti.

Un'altra importante peculiarità dei carotenoidi che li rendono fondamentali all'interno degli alimenti è la loro capacità di apportare benefici per la salute umana. Sin dai tempi più antichi l'uomo e i suoi antenati si nutrivano di foglie verdi ricche di betacarotene e luteina. Gli effetti benefici dei carotenoidi sono dovuti soprattutto alle loro proprietà antiossidanti. Inoltre, alcuni carotenoidi come il betacarotene, la betacriptoxantina e altri carotenoidi con almeno un anello non ossigenato beta-ionone hanno attività di provitamina A e possono quindi fungere da fonti di vitamina A. Questo aspetto è fondamentale poiché la carenza di vitamina A rappresenta una delle più diffuse cause di morte dei bambini nei paesi del terzo mondo (Africa e Asia Meridionale). I carotenoidi agiscono come antiossidanti in molteplici sistemi biologici reagendo con i radicali liberi e formando prodotti radicali meno reattivi. La sovrapproduzione di ossidanti può causare danni ossidativi a grandi biomolecole come lipidi, DNA e proteine, portando ad un aumento del rischio di malattie dannose per

l'uomo. In tale contesto gli antiossidanti hanno la funzione di ridurre questo danno ossidativo alle molecole. Grazie alla catena polienica ricca di elettroni pi-greco delocalizzati verso le estremità, i carotenoidi sono caratterizzati da un'alta reattività con l'ossigeno e altri agenti ossidanti e radicali liberi; questa reattività permette alle specie elettrofile di formare legami alle estremità della catena. In totale si possono contare sette meccanismi benefici per la salute umana: scavenging dei radicali liberi, quenching dell'ossigeno singoletto, protezione della pelle dalla luce blu, miglioramento delle difese immunitarie, variazione del metabolismo di carcinogeni, aumento della differenziazione cellulare mediante i retinoidi e infine inibizione della proliferazione cellulare. L'azione antiossidante nei confronti degli ossidanti (inclusi i radicali liberi HO· e HOO·) avviene nelle membrane che i carotenoidi, essendo liposolubili, riescono a penetrare e viene esplicata attraverso la formazione di prodotti innocui. Il quenching avviene invece tramite un trasferimento di energia tra l'ossigeno nello stato di singoletto ed il carotenoide che passerà ad uno stato di tripletto "smorzando" l'ossigeno in maniera direttamente proporzionale al numero di doppi legami coniugati presenti nella catena principale. Quindi l'ossigeno che precedentemente era nel suo stato eccitato torna allo stato fondamentale, mentre la molecola di carotenoide che ha acquisito energia la disperde nell'ambiente circostante attraverso il rilascio di calore. Il beta-carotene avendo dei livelli energetici simili all'ossigeno per quanto riguarda gli stati di tripletto, produrrà un quenching ancora più efficace. Tuttavia, sotto alcune condizioni, i carotenoidi si possono comportare come molecole pro-ossidanti, ovvero sostanze in grado di portare ad uno stress ossidativo in seguito all'interazione con alcune specie chimiche.

Altre azioni benefiche sono caratteristiche proprio della luteina e la zeaxantina (come già approfondito nel paragrafo luteina) poiché si accumulano nell'area centrale della retina dell'occhio (la macula lutea) e nel cervello. La luteina e altri carotenoidi sono importanti anche nella dieta del bambino in quanto sono secreti con il latte materno (Sommerburg et al., 2000). I carotenoidi apportano benefici anche alla salute mentale, metabolica, durante la gravidanza e la prima infanzia, e forniscono anche benefici cosmetici. In uno studio è stato discusso anche il ruolo della luteina e della zeaxantina nella prevenzione del morbo di Alzheimer. (Kiko et al., 2012).

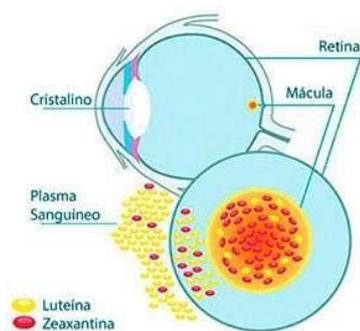


Figura 26: Funzioni protettive di luteina e zeaxantina all'interno dell'occhio umano.

1.4. Processo di produzione della pasta secca

Secondo il D.P.R n. 187 del 2001, la pasta integrale, (così come quella di semola di grano duro), è definita come il prodotto ottenuto dalla trafilazione, laminazione e conseguente essiccamento di un impasto preparato esclusivamente con semola integrale di grano duro ed acqua. Con il decreto del 26 luglio 2017 la normativa nazionale è stata implementata con l'obbligo dei produttori di indicare l'origine del grano utilizzato per la produzione di paste di semola sia UE che non UE in etichetta, a tutela del Made in Italy e della qualità del prodotto finale. La semola di grano duro viene ottenuta mediante macinazione e setacciatura ripetute della semola con conseguente aumento della resa del prodotto granulare di endosperma e piccole quantità di crusca in polvere.

Le fasi principali del processo di produzione della pasta comprendono:

- Selezione della semola. Questa fase prevede la selezione delle semole nel rispetto degli standard di qualità valutando sia le caratteristiche tecnologiche (glutine, proteine, indice di giallo), sia quelle fisiche (impurità presenti e peso specifico). Per la pasta di grano duro raffinata le semole utilizzate sono quelle che derivano dal cuore del chicco di grano, prive di frazione cruscale, di colore giallo uniforme, e con un alto contenuto proteico. Le semole integrali sono invece composte sia dall'endosperma che dalla crusca (chicco del grano duro non decorticato). Questa fase della lavorazione della pasta è importante poiché influisce sulla qualità del prodotto finale.
- Macinazione del frumento e preparazione. Durante la fase di macinazione, il grano passa attraverso dei laminatoi in grado di rompere i chicchi di grano e "spogliarli" degli strati esterni. Dopodiché il grano macinato passa attraverso dei buratti, che hanno la funzione di allontanare la crusca, il cruschetto e il tritello; queste parti non vengono invece separate nel caso della semola integrale. Infine, un cilindro di rimacina affina gli sfarinati così ottenuti ricavando la semola.
- Impasto e gramolatura. Nella fase di impasto la semola viene miscelata con acqua tiepida, pura e poco dura in apposite vasche impastatrici al fine di ottenere un impasto formando il glutine e idratando l'amido. Il diametro delle particelle caratteristico della semola macinata (gramolatura) influisce sulla struttura finale dell'impasto: una semola a gramolatura grossa (> 450-500 micron) dà all'impasto un aspetto compatto e omogeneo valorizzando al meglio le qualità tecnologiche del grano.
- Trafilazione o (estrusione). L'impasto viene estruso attraverso una trafilatrice che può essere in teflon o in bronzo.
- Essiccazione. È la fase più critica e delicata di tutto il processo produttivo e per tale motivo verrà discussa in maniera dettagliata più avanti.
- Raffreddamento. Il raffreddatore rappresenta l'elemento finale dell'essiccatoio che ha il compito di riportare a temperatura ambiente la pasta precedentemente essiccata.

- Confezionamento. L'ultima fase del processo produttivo è il confezionamento della pasta in sacchetti di plastica o astucci di cartone, in maniera da presentare il prodotto finito al consumatore con l'apposita etichetta informativa e di preservarlo da eventuali contaminazioni da agenti esterni.

La semola di grano duro rappresenta un tipo di semola che conferisce al prodotto finito buone proprietà come sapore, colore, composizione e proprietà reologiche uniche; al prodotto cotto la semola conferisce caratteristiche importanti legate alla sua qualità e quantità proteica. Le caratteristiche chimico/fisiche e la qualità sensoriale della pasta possono cambiare notevolmente durante la lavorazione della semola: questi cambiamenti si verificano in ogni fase della produzione e portano allo sviluppo di varietà di pasta con caratteristiche differenti. Per tutelare la sua identità storica, la legge italiana n. 580 del 1967, modificata dal DPR 187/2001, definisce come materie prime per la pasta secca solo la semola di grano duro e l'acqua. Le normative nazionali stabiliscono requisiti molto dettagliati per le caratteristiche qualitative delle materie prime utilizzate, ma non ci sono restrizioni sulla scelta delle tecnologie di produzione per la lavorazione della pasta (Law No, 580 of 4 July 1967). Tuttavia, le condizioni del processo di produzione della pasta hanno un'influenza significativa sulla composizione della semola, minacciando la competizione tra amido e proteine durante la cottura e influenzando il profilo aromatico e nutrizionale del prodotto finale (Anese et al., 1999; Resmini & Pellegrino, 1994; Sensidoni et al., 1996). Il panorama italiano è diversificato e comprende sia piccoli produttori artigianali, sia grandi pastifici; ciascuno dei quali realizza prodotti di classe diversa, considerando l'utilizzo di grano biologico o meno e l'applicazione di metodi tradizionali (temperatura di essiccazione più bassa e trafila al bronzo) o industriali (alta temperatura di essiccazione e trafila in teflon). Attraverso l'applicazione di standard di qualità più elevati si ottiene come risultato sia l'aumento del costo di produzione sia l'aumento dei prezzi della pasta. Oggigiorno esistono numerose tipologie di pasta secca ed i fattori che possono condizionare la qualità del prodotto sono tantissimi: la quantità di acqua, il tipo di farina, l'essiccazione, ecc. In particolare, le caratteristiche della pasta sono altamente influenzate dalle condizioni di produzione sia durante la fase di estrusione (Pagani et al., 1989) sia di essiccazione (D'Egidio et al., 1990; Pagani, et al., 1996; Resmini & Pagani, 1983). In Italia vengono riportate in etichetta delle informazioni riguardanti alcuni parametri di produzione e delle materie prime come la temperatura di essiccazione (bassa o alta), il tempo di essiccazione (breve o lungo), il tipo di trafilatura (bronzo o teflon) e l'origine della semola (biologica e non). Tuttavia, alcune informazioni non sono subordinate a normative quindi queste classificazioni sono solo indicative del processo reale.

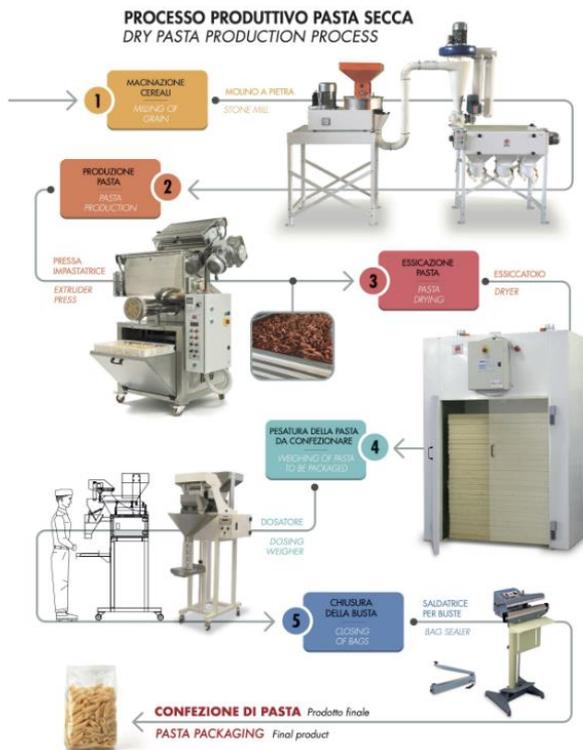


Figura 27: Intero processo produttivo della pasta secca.

1.4.1. La Trafilatura

La trafilatura è un processo durante il quale l’impasto viene trafilato, in maniera da indurre delle trasformazioni per estrusione (compressione attraverso un disco denominato “trafila” caratterizzato da sette sagome e dei fori) che permettono di conferire la forma desiderata alla pasta. L’impasto formato nell’impastatrice viene spinto e forzato attraverso una trafile le cui caratteristiche influiscono fortemente sulla struttura e sull’aspetto della superficie della pasta. Le trafile adoperate per l’estrusione della pasta sono importanti: conferiscono al prodotto la forma e le dimensioni finali e devono essere realizzate con materiali duri poiché devono sostenere pressioni fino a 10 mPa durante il processo di modellazione della pasta. Nelle trafile vengono applicati dei fori (attraverso cui si modella l’impasto) dove sono inserite delle anime che sono le superfici di estrusione attive. Il materiale che costituisce le anime deve avere elevata resistenza alla temperatura, alla pressione, agli urti, all’usura, bassa aderenza con l’impasto, non deve ossidarsi a contatto con l’aria, e non deve reagire con l’impasto, né cedere a questo colore, gusto, odore. Secondo uno studio (Pagani et al., 1989) le caratteristiche di cottura della pasta sono influenzate dal tipo di estrusione. L’estrusione è una fase del processo produttivo che è legato anche alle preferenze dei consumatori che hanno l’esigenza di scegliere un prodotto con particolari caratteristiche fisiche come colore uniforme, assenza di macchie, fratture, uniformità di forme e dimensioni: è noto come alcune di queste peculiarità siano legate al tipo di trafile utilizzata (Ogawa et al., 2012). Il materiale della trafile oltre ad influire sulla superficie della pasta, condiziona anche l’interno del prodotto.

Le trafile possono essere essenzialmente, di due tipologie: in bronzo e in teflon. Le trafile con materiale in teflon conferiscono al prodotto un aspetto uniforme, liscio e giallo brillante; quelle in bronzo danno al prodotto una superficie ruvida e una maggiore porosità (Lucisano et al., 2008). Questa maggiore rugosità rende la trafilatura in bronzo più adatta a trattenere meglio la salsa nel prodotto cotto (Pagani et al., 2007), caratteristica altamente apprezzata dal mercato italiano. La trafilatura in bronzo è quella tradizionale, mentre a livello industriale viene spesso adottata la trafilatura in teflon che è meno costosa in termini di manutenzione ma porta ad una qualità nettamente inferiore. Il bronzo ha lo svantaggio di una più rapida usura dalla parte della trafilatura che si trova a contatto con l'impasto e di una resa produttiva minore della pressa che sono le ragioni principali che favoriscono l'uso del teflon negli impianti ad alta velocità. La pasta estrusa con trafilatura in bronzo ha maggiore porosità, minore densità, minore resistenza alla rottura e maggiore coefficiente di diffusione effettivo dell'acqua durante l'essiccazione rispetto a quella preparata utilizzando la trafilatura in teflon (Lucisano et al., 2008; Mercier et al., 2011). Infatti, la trafilatura in bronzo consente un vantaggioso accoppiamento con l'essiccazione lenta in quanto è stato dimostrato che il tempo richiesto per l'essiccamento è minore in confronto alle altre tecniche (Mercier et al., 2011). La rugosità del prodotto possiede però lo svantaggio di facilitare l'attacco degli insetti. Infatti, gli insetti si aggrappano più facilmente al prodotto, di conseguenza ne rosicchiano la superficie e praticano dei piccoli fori in cui depongono le uova, aiutati dalla ridotta resistenza meccanica del materiale estruso in bronzo (Pagani et al., 2007).

1.4.2. L'essiccazione

La fase di essiccazione rappresenta lo step più critico dell'intero processo produttivo della pasta. Durante l'essiccamento il contenuto di acqua viene ridotto a circa il 30-33% fino ad un massimo di umidità pari al 12,5% come imposto dalla legge, con il fine di migliorare la conservazione del prodotto finito nel tempo (caratteristica distintiva della pasta secca). Nel corso dell'essiccazione le caratteristiche organolettiche della pasta subiscono modificazioni. Lo step di essiccazione può essere di due tipi: LT-Lt (*Low Temperature-Long time*) o HT/VHT-St (*High/Very High Temperature-Short time*). I valori di temperatura sono < 60 °C per essiccazione a basse temperature (LT), 70–80 °C per essiccazione ad alte temperature (HT), e fino a 110 °C per essiccazioni ad altissima temperatura (VHT). Anche i tempi di essiccazione cambiano a seconda che venga adoperata una tecnica o l'altra: sono oltre 20 ore per i trattamenti di essiccazione prolungata (LT-Lt), circa 7–10 ore per processi di breve durata (HT-St) e fino a 1–2 ore per i trattamenti di breve durata (VHT-St). In Italia, l'essiccazione tradizionale a basse temperature e lunghi tempi viene utilizzata principalmente dai piccoli produttori per produrre alimenti in forme regionali e tradizionali. Molti produttori nel corso degli anni hanno iniziato a produrre pasta con metodi HT/VHT-St sostituendola al tradizionale metodo di lavorazione della pasta a bassa temperatura, e questa scelta è derivata principalmente dagli aspetti positivi in termini di economicità del processo grazie ai tempi brevi, ad una maggiore igienicità con minore contaminazione microbica, alla riduzione delle dimensioni degli essiccatoi, alla costante qualità del prodotto, oltre ai miglioramenti della qualità in fase di cottura dal punto di vista della resistenza grazie alla diminuzione del

quantitativo di acqua assorbibile. D'altra parte, alcuni studi hanno dimostrato l'influenza negativa dell'utilizzo delle alte temperature sul valore nutrizionale e organolettico degli alimenti. Difatti l'elevato stress termico può indurre a una perdita in aminoacidi essenziali con riduzione del valore nutritivo (Boccacci et al., 2014b) e formazione di sottoprodotti della reazione di Maillard con conseguente imbrunimento del colore e appiattimento del sapore. Le reazioni di Maillard sono una serie di fenomeni complessi che si verificano in condizioni di alta temperatura e bassa attività dell'acqua a causa dell'interazione tra zuccheri riducenti (gruppi carbonilici) e proteine (gruppi NH₂); i sottoprodotti della reazione di Maillard hanno un colore marrone (per questo motivo questa reazione è nota come imbrunimento non enzimatico) e hanno un aroma caratteristico, come quello del pane appena sfornato o, se il processo è più intenso, della frutta secca tostata, del cacao o del caffè. A causa di questo fenomeno, si possono verificare quindi delle trasformazioni nella componente aromatica dei prodotti finiti: i prodotti della reazione di Maillard causano all'alimento caratteristiche di colore alterato (tra giallo scuro e marrone) e gusto di "abbrustolito" (Tamanna & Mahmood, 2015). Le fasi iniziali della reazione di Maillard possono influire sul valore nutrizionale delle proteine della pasta, diminuendo la quantità di lisina e metionina nutrizionalmente disponibili e possono indurre un eccessivo imbrunimento derivante dalla formazione di composti colorati e perdita di carotenoidi (Hidalgo et al., 2010). Nelle fasi avanzate della reazione di Maillard si possono formare sostanze aromatiche dagli zuccheri liberi (Resmini & Pellegrino 1994) e possono avvenire trasformazioni nella composizione del flavour derivate dall'ossidazione lipidica (Sayaslan et al., 2000) e dalla degradazione di Strecker (Hayashi et al., 1990). L'utilizzo di temperature ≤65 °C, invece, limitano questi danni termici e consentono una migliore conservazione delle caratteristiche del prodotto finale (Acquistucci, 2000; De Noni & Pagani 2010; Petitot et al., 2009; Stuknyte et al., 2014).

1.5. Dati di mercato e legislazione

La pasta rappresenta il prodotto Made in Italy per eccellenza e l'Italia ne è un punto di riferimento per consumo, export e produzione: la pasta produce il 3,5% del fatturato nazionale dell'industria alimentare, con una produzione di 3.505.649 tonnellate di prodotto da molteplici formati, per un valore totale di 5.035 milioni di euro, di cui il 56,5% (1,93 milioni) è destinato alle esportazioni e il 43,5% (1,43 milioni) è destinato al consumo interno. In Italia sono circa 200mila le aziende agricole che fanno parte della filiera del grano (distribuite principalmente in Puglia-Basilicata con il 30% della produzione, Sicilia con il 22% e l'area Emilia-Romagna-Marche che vale circa il 15%), per una superficie totale di 1,28 milioni di ettari. I dati della produzione pastaia italiana interessano 120 imprese, 7500 addetti, per un valore generato pari a 4,8 miliardi di euro. L'Italia rappresenta un primato della pasta anche nel mercato estero, con il 67% della produzione europea e un quarto di quella mondiale di pasta secca: a livello mondiale un piatto di pasta su quattro è italiano e a livello europeo tre su quattro [S10]. Infatti, gran parte della pasta prodotta in Italia finisce all'estero, in particolare in Francia, Germania, Regno Unito, Usa e Giappone, che da soli assorbono il 61% dell'export italiano (circa 995 milioni di euro all'anno). L'Italia conserva il primato nel mondo nella produzione della pasta con 3,5 milioni di tonnellate, seguita da Stati Uniti che ne contano 2 milioni, Brasile 1,1 milioni, Russia 1 milione e infine Turchia 850 mila. Anche durante la pandemia da Covid-19 il settore pastario è stato uno di quelli che non ha risentito

tropo degli effetti della crisi, essendo la pasta il prodotto più esportato e facendo registrare un balzo del 16%. Gli Stati Uniti durante la pandemia hanno registrato un consumo di pasta del +40%, seguiti da Gran Bretagna (+19%), Germania (+16%) e Francia (+4,3%). Secondo i dati dell'IPO (*International Pasta Organisation*), negli ultimi venti anni, i paesi dove si consuma più di 1 kg pro capite di pasta all'anno sono quasi raddoppiati passando da 30 a 53. Infatti, in Italia il consumo pro-capite è di 23,5 chilogrammi, contro i 17 kg della Tunisia, che si classifica seconda, seguita da Venezuela (12 kg) e Grecia (11 kg). Inoltre, la produzione della pasta calcola anche un ridotto impatto ambientale, registrando negli ultimi dieci anni una riduzione dei consumi idrici del 20% e delle emissioni di CO2 pari al 21%, nonché un recupero del 95% del totale dei rifiuti [S11]. Poiché la pasta Made in Italy si distingue per qualità e innovazione, in media il 10% del fatturato viene investito per riprodurre impianti più moderni e captare tendenze e cambiamenti di alimentazione e stile di vita. La pasta, grazie alla varietà di tipologie di prodotto, versatilità e al suo facile adattamento alle differenti culture, rappresenta un alimento prodotto e consumato in tutto il mondo. Una buona percentuale dei consumatori al giorno d'oggi, incline ad un approccio etico al cibo, consuma sempre più pasta per il suo packaging riciclabile e la sua bassa impronta ecologica. Negli ultimi anni il mercato della pasta sta cambiando poiché le richieste dei consumatori si stanno differenziando con un crescente interesse per prodotti con caratteristiche specifiche: p.e. a basso contenuto di carboidrati, altamente proteici. Sempre più diffusa è quindi la tendenza a condurre uno stile di vita sano e salutistico ponendo particolare attenzione agli aspetti nutrizionali dell'alimentazione. Per questo motivo, anche quello dei prodotti integrali rappresenta un settore in continua espansione. Infatti, secondo una ricerca realizzata da Doxa per Aidepi (Associazione delle Industrie del Dolce e della Pasta Italiane) il 53% degli italiani sceglie la pasta integrale sia per il suo gusto sia per i suoi effetti benefici sulla salute umana, essendo un prodotto ricco di sali minerali e fibre e ridotto indice glicemico. In particolare, sempre secondo la stessa ricerca, il 25% degli italiani mangia pasta integrale pensando che faccia bene alla salute. Secondo i numeri Iri (Istituto per la Ricostruzione Industriale) del 2017, le tipologie di pasta integrale, a base di farro e kamut, hanno ottenuto tassi di crescita di circa il 20%, sebbene nei volumi sia ancora secondario rispetto alla pasta di semola tradizionale che rappresenta il 90% del mercato.

Gli ultimi mesi segnati sia dalla pandemia da COVID-19 sia dalla guerra in Ucraina hanno avuto degli effetti sul mercato della pasta. Dalla classifica dell'Unione nazionale consumatori relativa ai prodotti alimentari che nei mesi che vanno da gennaio 2021 a gennaio 2022 hanno registrato il maggiore aumento dei prezzi, al quarto posto c'è la pasta. L'incremento dei prezzi (avvenuto principalmente dalla seconda metà del 2021) è dovuto alla crescita del prezzo del grano duro causato dalla diminuzione delle scorte mondiali e allo stesso tempo all'incremento dei costi di energia e dei materiali di confezionamento. L'attuale guerra e la conseguente instabilità politica tra Russia ed Europa causeranno sicuramente effetti negativi sui prezzi che si vedranno solo nel prossimo futuro, poiché i prodotti ora disponibili provengono dalla semola ottenuta da raccolti precedenti che hanno subito i rincari del 2021. Secondo i dati riportati da Altroconsumo, la pasta di semola venduta a 1,22 euro/kg nel gennaio 2019, si è alzata a 1,49 euro/kg a gennaio 2022, registrando un aumento pari al 22% (solo nel 2021 c'è stato un aumento del 14%). Tuttavia, gli italiani continueranno a consumare pasta dato che nonostante tutto si tratta di un alimento complessivamente economico.

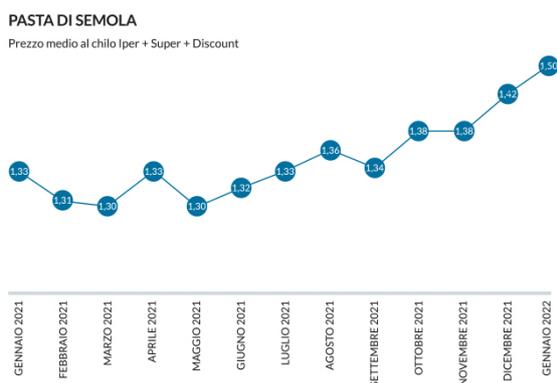


Figura 28: Prezzi medi della pasta di semola da gennaio 2021 a gennaio 2022 (Elaborazione Altroconsumo su dati IRI Infoscan) [S12].

II. Scopo del lavoro e stato dell'arte

2.1. Determinazione dei carotenoidi in campioni di pasta

Nel corso degli anni i carotenoidi nei cereali e nella pasta non hanno ricevuto la stessa attenzione mostrata nei confronti delle stesse sostanze presenti in frutta e verdura. Diversi lavori sono già stati eseguiti sull'indagine dei carotenoidi in diverse matrici alimentari (Oliver & Palou, 2000), nei cereali e in diverse varietà di grano (Paznocht et al., 2018; Adom et al., 2003; Humphries et al., 2004; Moore et al., 2005; Panfili et al., 2004; Fu et al., 2017; Ziegler et al., 2015; Hentschel et al., 2002), nella pasta (Laus et al., 2017; Humphries & Khachick, 2003) e sugli effetti dei processi di produzione della pasta sui carotenoidi (Ficco et al., 2016; Fratianni et al., 2012; Hidalgo et al., 2010). La preparazione del campione e l'estrazione dei carotenoidi dalla matrice rappresentano un passaggio critico prima dell'analisi quali-quantitativa. Infatti, i carotenoidi sono sostanze molto sensibili alla luce, al calore, all'aria e alle superfici attive; per questo motivo, durante l'analisi, potrebbero verificarsi reazioni di degradazione, formazione di stereoisomeri, riarrangiamenti strutturali e altre reazioni chimico-fisiche. Di conseguenza, è necessario eseguire una rapida manipolazione dei campioni. La procedura di estrazione più utilizzata per l'estrazione dei carotenoidi da grano e pasta è la tradizionale estrazione liquido-liquido. La selezione del solvente è un fattore importante per ottenere una migliore resa di estrazione; la combinazione ottimale di solventi dipende dalla polarità dei carotenoidi d'interesse e dalla complessità della matrice in esame. Diversi solventi e miscele di solventi sono stati utilizzati nel corso degli anni per l'estrazione di questi composti da pasta e grano, ad esempio, miscele di metanolo / tetraidrofurano (1: 1 v / v) (Adom et al., 2003; Adom et al., 2005; Moore et al., 2005; Hentschel et al., 2002), tetraidrofurano (THF) con carbonato di sodio (Na_2CO_3) (Humphries et al., 2004), n-esano / acetato di etile (9: 1 v / v) (Panfili et al., 2004; Laus et al., 2017; Fratianni et al., 2012; Hidalgo et al., 2010), acetone (Ziegler et al., 2015) e etanolo / acetone / esano (1: 1: 2, v / v / v) (Paznocht et al., 2018). Tuttavia, ci sono molte altre procedure che consentono l'estrazione di queste sostanze, come l'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE), l'estrazione assistita da microonde (MAE), l'estrazione enzimaticamente assistita (EAE), l'estrazione con fluidi

supercritici (SFE) e l'estrazione con solvente accelerato (ASE), nota anche come estrazione liquida pressurizzata (PLE) (Mandić et al., 2021). L'ASE è la tecnica utilizzata in questo lavoro di ricerca ed è stata precedentemente impiegata per l'estrazione dei carotenoidi in altri studi: in matrici come prezzemolo, concentrato di pomodoro, bevande, miscele di budini, cereali per la colazione, biscotti e salsicce (Breithaupt, 2004), carote (Saha et al., 2015; Breithaupt, 2004), tè verde (Heo et al., 2014), cachi, pesche e albicocche (Zaghdoudi et al., 2015) e paprika (Kim et al., 2016). Tuttavia, non è ancora stata utilizzata per l'estrazione dei carotenoidi dalla pasta. Questa tecnica, rispetto alle estrazioni convenzionali con solventi, presenta molti vantaggi come citato in precedenza, ad esempio consente di effettuare le estrazioni in tempi brevi, di limitare e sostituire l'uso di solventi organici non polari con solventi green e di ottenere alte rese.

I trattamenti tecnologici impiegati per la produzione della pasta possono influenzare la composizione originale del chicco, modificando il contenuto delle sostanze fitochimiche presenti e quindi dei carotenoidi (Ficco et al., 2014). Diversi studi hanno riguardato l'analisi dei carotenoidi nella pasta (Laus et al., 2017; Humphries & Khachick, 2003) e l'influenza delle tecniche di lavorazione sui carotenoidi (Ficco et al., 2016; Fratianni et al., 2012; Hidalgo et al., 2010). Ad esempio, perdite significative di betacarotene si possono verificare durante la macinazione del grano, che consiste nell'apertura del chicco e nel recupero dell'endosperma; al contrario, durante questa fase la maggior parte della luteina viene conservata (Borrelli et al., 2008). Durante l'impasto inizia l'ossidazione dei carotenoidi; nella fase di trafilazione avviene una ulteriore diminuzione del contenuto totale di carotenoidi che si verifica maggiormente nei laboratori in cui il processo di estrusione non avviene sottovuoto e quindi è presente una certa quantità di ossigeno che ossida le sostanze presenti (Hidalgo et al., 2010). Il processo di essiccazione, che rappresenta la fase finale della produzione della pasta, sembra non determinare perdite significative di carotenoidi. Tuttavia, l'effetto della temperatura su queste molecole durante l'essiccazione può essere significativo poiché provoca due azioni opposte che aumentano i carotenoidi biodisponibili. Come risultato dell'aumento della temperatura, la concentrazione diminuisce, ma anche la matrice si rompe, rilasciando carotenoidi precedentemente legati. In un processo di essiccazione tradizionale che avviene a basse temperature per un periodo di tempo più lungo, si perdono più carotenoidi rispetto alla rapida essiccazione industriale. Lo stesso avviene durante la fresatura ovvero il processo fisico che riduce la dimensione delle particelle (Maiani et al., 2009). In uno studio è stata investigata la perdita di carotenoidi durante la produzione di pasta, mostrando una diminuzione di carotenoidi del 49% alla fine del processo di produzione (Hidalgo et al., 2010). Durante la cottura della pasta non vi è alcuna eccessiva perdita di caroteni o xantofille nemmeno alle alte temperature, e non è documentata neppure alcuna diminuzione dell'efficienza della capacità antiossidante (Oduro-Obeng et al., 2021).

L'obiettivo di questa prima parte del lavoro di tesi è stato quello di studiare e valutare il ruolo dei carotenoidi, in particolare della luteina, come discriminante di campioni di pasta convenzionale e integrale. La prima parte dello studio ha riguardato l'ottimizzazione del metodo di estrazione ASE per la determinazione dei carotenoidi nella pasta attraverso lo sviluppo di un disegno sperimentale (*Central Composite Design*, CCD); e nella seconda parte, l'analisi di un set di campioni di entrambe le tipologie di pasta (integrale e raffinata) utilizzando

i parametri ottimali ottenuti con il CCD. Ulteriore scopo della ricerca è stato quello di indagare l'influenza dei differenti metodi di essiccazione utilizzati per la produzione dei campioni, e riportati in etichetta, sul contenuto totale di carotenoidi, al fine di valutare un'eventuale discriminazione tra i campioni derivante dal processo produttivo e non solo dalla materia prima utilizzata. I campioni di pasta precedentemente estratti con l'ASE sono stati successivamente analizzati tramite un sistema HPLC-UV-Vis. Infine, i dati ottenuti sono stati elaborati tramite modelli chemiometrici di analisi multivariata.

2.2.Determinazione della componente aromatica in campioni di pasta

L'ampia diffusione della pasta nel mondo nel corso dei secoli ha portato questo alimento ad essere sempre più apprezzato e, conseguentemente, integrato nella dieta quotidiana di moltissime persone. Il motivo di questa grande considerazione è da ricercare nell'ottimo rapporto qualità/prezzo di tale prodotto, il quale riesce ad unire un'elevata accessibilità dal punto di vista economico a proprietà nutrizionali e organolettiche uniche. Oltre ai benefici per la salute, la pasta deve la sua importanza anche al suo caratteristico flavour, ovvero la combinazione di sapore e aroma, che rappresenta una proprietà sensoriale con un elevato impatto sulle preferenze del consumatore. Anche questa caratteristica potrebbe essere opportunamente utilizzata per discriminare i vari prodotti disponibili sul mercato, in modo da valorizzare quelli che in cottura conservano maggiormente il tipico flavour di grano maturo nel rispetto della tradizione italiana. Il flavour della pasta, caratterizzato da un'enorme quantità di componenti volatili, è influenzato sia dalle materie prime sia dai processi tecnologici e per tali motivi si differenzia tra le varie tipologie di pasta. Molti studi sono stati condotti relativamente agli effetti dei processi tecnologici sulla pasta.

In un lavoro è stato sviluppato un metodo rapido e non distruttivo in grado di discriminare diversi campioni di pasta in base ai parametri di produzione come i processi industriali (essiccazione ad alta temperatura e tempi brevi, trafilazione al teflon) e tradizionali (bassa temperatura con tempi lunghi di essiccazione e trafilazione al bronzo), nonché l'utilizzo o meno di grano biologico. Uno spettrofotometro iperspettrale VIS-NIR è stato utilizzato per acquisire immagini della pasta e i dati sono stati poi valutati statisticamente utilizzando il metodo di classificazione SIMCA. Secondo i risultati di questo studio, la differenza tra i vari campioni di pasta è determinata sia dalla materia prima (biologica e non biologica) che dal tipo di metodo utilizzato (essiccazione breve o lunga, trafilazione al bronzo o teflon) (Menesatti et al., 2014). In uno studio pubblicato dal nostro gruppo di ricerca nel 2014 (Bocacci Mariani et al., 2014a), è stato sviluppato un metodo HS-SPME / GC-MS per l'analisi della frazione volatile della pasta secca al fine di individuare composti utili per differenziare i vari campioni di pasta ed utilizzabili come marcatori di qualità del prodotto finito. I parametri di estrazione HS-SPME ottimizzati in questo studio erano il tipo di rivestimento della fibra e gli effetti della temperatura, della durata del campionamento e del peso del campione. Successivamente, la fattibilità del metodo ottimizzato è stata confermata da un altro lavoro (Giannetti et al., 2014), che ha analizzato un ampio numero di campioni di pasta di due classi: pasta prodotta con il trattamento di essiccazione LT-Lt (prodotti tradizionali) e pasta prodotta utilizzando la procedura di essiccazione HT / VHT-St (prodotti industriali). I risultati dell'analisi

statistica (*Principal Component Analysis*) hanno evidenziato una separazione tra i due gruppi di campioni di pasta investigati. In un recente lavoro (Giannetti et al., 2021), un metodo di microestrazione in fase solida dello spazio di testa è stato ottimizzato attraverso un disegno sperimentale FC-CCD (*Face Centered – Central Composite Design*). La temperatura di estrazione, il tempo di estrazione e il peso del campione sono stati i fattori oggetto di indagine. I valori ottimali sono stati determinati come: 10,5 g di campione ed estrazione a 75 °C per 38 minuti. Utilizzando questi valori ottenuti dal disegno sperimentale, 52 campioni di pasta secca sono stati successivamente analizzati e classificati tramite PLS-DA. Il modello di classificazione risultante ha previsto correttamente oltre l'80% dei campioni, indicando come l'essiccazione abbia un impatto significativo sull'aroma della pasta. Da questi risultati, confermati da altri lavori in letteratura, è possibile caratterizzare campioni di pasta in base alle condizioni di essiccazione utilizzate per la produzione (Pasqualone et al., 2014).

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare la pasta corta di grano duro in modo tale da evidenziare, mediante modelli chemiometrici di classificazione, le differenze riscontrabili tra le diverse lavorazioni della semola in termini di flavour. Il fine è provare che sia diversi processi di lavorazione (essiccazione e trafilatura) sia diverse tipologie di pasta (integrale e convenzionale) hanno un impatto diretto sulla composizione e sulla qualità nutrizionale e organolettica del prodotto finito. A tal fine sono stati analizzati campioni di pasta con differenti caratteristiche: semola di grano duro raffinata e integrale, processo di essiccazione LT-Lt e HT-St, trafilatura al bronzo e al teflon. Lo studio si è focalizzato sulla caratterizzazione del flavour tramite analisi HS-SPME/GC-MS e PLS-DA con lo scopo di utilizzare proprio l'aroma come "impronta digitale" per la distinzione di differenze nel ciclo produttivo di tale alimento.

Infine, i risultati ottenuti sia dalle analisi ASE/HPLC-UV-Vis dei carotenoidi, sia dalle analisi del flavour tramite HS-SPME/GC-MS sono stati impiegati per effettuare un'analisi multiblock, ossia una metodologia in grado di combinare i dati di differenti procedure di analisi con l'obiettivo di ricavare più informazioni possibili e ottenere eventuali miglioramenti delle singole classificazioni.

III. Parte sperimentale

3.1. Materiali e Metodi

3.1.1. Selezione dei campioni

Tutti i campioni in esame erano costituiti da pasta secca di tipo corto, prodotta in Italia e venduta da marchi noti sul mercato (marchi leader, marchi comuni, private label). La prima parte del lavoro incentrata sull'ottimizzazione del disegno sperimentale e sulla classificazione preliminare dei campioni in base al tipo di semola (integrale e convenzionale), ha incluso un set composto da 50 campioni (25 normali e 25 integrali). La selezione di questo primo set è stata effettuata sulla base della dichiarazione riportata sulla confezione (pasta integrale e pasta di semola), sul prezzo di vendita (indicativamente tra € 0,50 e € 5) e su alcune caratteristiche proprie della pasta, come il colore, la dimensione, e la trafilatura. Prima dell'analisi HPLC, ogni campione è stato trasferito in un sacchetto di plastica e conservato a temperatura ambiente. Nella seconda parte del lavoro

si è deciso di estendere il set di campioni per studiare, oltre ai carotenoidi, anche la componente aromatica tramite analisi HS-SPME/GC-MS. Questi altri campioni in esame, di pasta di formato corto sono stati acquistati presso supermercati e negozi di specialità alimentari artigianali e regionali. I campioni sono stati collezionati in base al tipo di grano (ad esempio, grano duro e pasta integrale), alle indicazioni sull'etichetta del produttore (ad esempio, "essiccazione a bassa temperatura", "trafilato al bronzo") e al prezzo di vendita (circa 0,50-5 € / Kg). Il set di campioni comprendeva 96 tipi di pasta corta 64 dei quali erano a base di grano duro e 32 a base di semola integrale. Prima dell'analisi, i campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente nelle loro confezioni originali.

3.1.2. Preparazione dei campioni e materiali utilizzati

Prima di procedere con l'estrazione e la successiva analisi dei carotenoidi, 50 g di pasta sono stati macinati prima manualmente con un mortaio e in misura maggiore con un mulino IKA A10 Basic per 10 secondi. 5 g del campione macinato sono stati poi inseriti all'interno della cella in acciaio inossidabile da 22 mL dell'ASE, utilizzando una carta da filtro per intrappolare il campione da estrarre. Al fine di ridurre al minimo il consumo di solvente, sono state inserite delle palline di vetro all'interno della cella.

I materiali e i solventi utilizzati per le estrazioni e le successive analisi dei carotenoidi sono riportati di seguito:

- Mulino IKA A10 Basic;
- Dionex ASE 150 - Thermo Fisher Scientific;
- Cella in acciaio inossidabile da 22 ml per ASE;
- Vials di raccolta da 60 ml con tappo a setto in Teflon;
- Bombola di gas N₂ per ASE (Rivoira);
- Rotavapor BUCHI RII Thermo Fisher Scientific;
- HPLC Ultimate 3000 Thermo Fisher Scientific Dionex dotato di SR 3000 Solvent Rack ed Iniettore manuale esterno. Colonna LC Kinetex C18 (5 µm 250 x 4,6 mm I.D) con pre-colonna. Detector UV-Vis a lunghezza d'onda fissa. Software Chromeleon 7;
- Acetone per HPLC, purezza ≥ 99,9% (Sigma-Aldrich);
- Esano per HPLC, purezza ≥ 95% (Sigma-Aldrich);
- Etanolo anidro per HPLC, purezza ≥ 99,9% (Sigma-Aldrich);
- Acqua HPLC Plus, purezza ≥ 99,9% (Sigma-Aldrich);
- Acetonitrile, purezza ≥ 99,9% (Sigma-Aldrich);
- Acido Formico, purezza ≥ 95% (Sigma-Aldrich);
- Standard della luteina per analisi HPLC-UV (Extrasynthese, Francia).

Nell'analisi della componente aromatica, la preparazione dei campioni si differenzia rispetto alla precedente procedura visto che il flavour, essendo composto da sostanze molto volatili, è necessario eseguire la

preparazione dei campioni in maniera rapida al fine di limitare il più possibile la perdita di tali composti. 15 g di pasta vengono macinati inizialmente con un mortaio; successivamente i campioni vengono macinati utilizzando il molino IKA A10 Basic per ottenere una polvere più fine ed omogenea. Rispetto al medesimo step previsto per l'analisi HPLC, il tempo di macinazione in questo caso è stato prolungato da 10 a 30 secondi (al fine di ottenere una polvere ancora più fine e ottenere un migliore sviluppo superficiale). Inoltre, la macinazione tramite il mulino è stata effettuata a freddo per limitare la perdita dei composti d'interesse. Dopo lo step di macinazione, 10.50 g dei campioni macinati sono stati inseriti nella apposita vial di vetro, la quale è stata poi chiusa con un tappo di alluminio e setto in PTFE/silicone. Anche quest'ultimo step della preparazione dei campioni deve essere eseguito il più rapidamente possibile poiché, essendo le particelle di spessore estremamente ridotto e i composti estremamente volatili, si rischierebbe la perdita di buona parte del campione.

Per l'analisi dei composti volatili sono stati impiegati:

- Gascromatografo (Trace 1300 Thermo Fisher Scientific) munito di Autocampionatore (Triplus Autosampler Thermo Fisher Scientific);
- Fibra Supelco trifasica (Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane, DVB/CAR/PDMS, 50/30 mm, Stable Flex (2 cm) di Merck, kGaA, Darmstadt, Germania);
- Colonna capillare GC Agilent VF-WAXms (30 m x 0.25 mm ID, Santa Clara, USA);
- Spettrometro di massa (ISQ 7000 Single Quadrupole, Thermo Fisher Scientific);
- Software Chromeleon 7;
- Vials Chromacol in vetro da 20 ml per GC (setto in PTFE/silicone e ghiera in alluminio);
- Bombola di gas He per gas carrier GC-MS (Linde).

3.1.3. Ottimizzazione dell'analisi ASE/HPLC-UV-Vis dei carotenoidi

Le estrazioni dei carotenoidi sono state eseguite mediante un estrattore Dionex ASE 150 (Accelerated solvent Extractor, Thermo Fisher Scientific), dotato di un'unità di controllo del solvente, celle in acciaio inossidabile di 22 mL di volume e flaconi da 60 mL per la raccolta degli estratti. Seguendo il disegno sperimentale, le estrazioni sono state effettuate utilizzando tre diverse temperature (40, 70, 100°C), tre diversi tempi statici (2, 4, 6 min) e tre miscele di solvente di estrazione: etanolo/acetone/esano (33:17:50); etanolo / acetone / esano (21:29:50); etanolo / acetone / esano (25:25:50). La pressione di estrazione è stata mantenuta costante a 1500 psi con un volume di lavaggio del 60% e tre cicli statici. Come già detto precedentemente, 5 g di campione sono stati inseriti chiusi all'interno di carta da filtro in celle di estrazione in acciaio inossidabile da 22 mL dove sono state poi aggiunte delle palline di vetro inerti per riempire gli spazi vuoti. Una volta che la temperatura ha raggiunto il valore impostato, la cella viene caricata nello strumento e quindi riempita con il solvente fino ad una pressione di 1500 psi. Si applica quindi un tempo di riscaldamento iniziale di tre minuti. Successivamente, si effettua un'estrazione statica con tutte le valvole del sistema chiuse; la cella viene risciacquata con il 60% del volume utilizzando il solvente di estrazione. Il solvente è stato poi spurgato con

azoto e al termine dell'estrazione il sistema è stato depressurizzato. Gli estratti sono stati conservati a 4 °C in frigorifero, al riparo dalla luce per le successive analisi. Per l'evaporazione con solvente è stato utilizzato un sistema di evaporazione Rotavapor (R II Büchi®). Successivamente gli estratti sono recuperati e disciolti in 1 mL di etanolo prima dell'analisi.

Le analisi dei carotenoidi sono state eseguite mediante HPLC (Thermo Scientific DionexUltiMate 3000 Series, SR-3000 Solvent Rack) dotato di campionatore manuale (loop da 25 µL), sistema di pompaggio quaternario (TYPE) con miscelazione a bassa pressione, rivelatore UV, vano colonna termostato. La separazione cromatografica è stata effettuata a 25 °C con una colonna Kinetex® C18 LC (5 µm, 250 x 4,6 mm ID) in gradiente utilizzando rispettivamente acqua/acetonitrile (90:10)% e acetonitrile come eluenti A e B. Sia l'eluente A che l'eluente B contenevano lo 0,1% di acido formico. Il gradiente di eluizione era: inizio (75:25) A/B, 2 minuti (75:25), 12 minuti 100% B, 22 minuti 100% B, da 25 a 30 minuti (75:25) A/B. Il tempo totale dell'analisi è stato di 30 minuti con una velocità di flusso di 1 mL/min. Prima di ogni serie di analisi HPLC, è stato iniettato un bianco di etanolo/acqua (80:20) % e dopo le iniezioni la colonna è stata risciacquata con acetonitrile / acqua (70:30) per 30 minuti. Il rilevamento dei carotenoidi è stato effettuato utilizzando un rivelatore UV ad una lunghezza d'onda di 450 nm. Il software "Chromleon" è stato utilizzato per acquisire e valutare i dati.

3.1.4. Ottimizzazione dell'analisi HS-SPME/GC-MS dei composti volatili

L'analisi HS-SPME/GC-MS è stata eseguita secondo la metodologia già ottimizzata da Giannetti et al., 2021. In breve, i campioni dopo essere stati accuratamente macinati, vengono posti (10,5 g) in una fiala di vetro da 20 ml per autocampionatore (Chromacol), successivamente chiusa ermeticamente con setto (in PTFE/silicone) e ghiera di alluminio. L'estrazione in spazio di testa (HS-SPME) è stata eseguita con un autocampionatore (Triplus Autosampler, Thermo Scientific) con una fibra trifasica 50/30 Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) Stable Flex (2 cm) di Merck (kGaA, Darmstadt, Germania). La fiala contenente il campione macinato (posta in uno slot dell'autocampionatore) è stata automaticamente spostata all'interno del forno preriscaldato a 75 °C per la fase di incubazione di 20 minuti. Dopo la fase di incubazione la fibra è stata esposta nello spazio di testa della fiala per 38 minuti alla stessa temperatura. Quindi la siringa si sposta in automatico verso l'iniettore del GC (Trace 1300 Gas Chromatograph, Thermo Scientific) per il desorbimento termico di 5 minuti. L'iniettore è del tipo split/splitless con modalità splitless, flusso 50 ml/min per 5 minuti a 260 °C. La colonna capillare VF-WAXms (30 m 0,25 mm ID, 0,25 mm) di Agilent Technologies (Santa Clara, USA) è stata utilizzata per la separazione cromatografica utilizzando l'elio come gas di trasporto (ad una portata di 1 mL/min). La rampa di temperatura del forno era: nei primi 5 minuti 40°C, successivamente 6°C/min fino al raggiungimento di 150°C, infine 15°C fino a 230°C per 3 minuti. Il GC è stato accoppiato a uno spettrometro di massa (ISQ 7000 Single Quadrupole, Thermo Fisher Scientific). Il rilevamento è stato effettuato utilizzando la ionizzazione a impatto elettronico

(EI) a 70 eV in modalità di acquisizione full scan nel range d'intervallo 35-350 a.m.u. Sia la sorgente ionica che la transfer line sono state mantenute alla temperatura di 250 °C. Durante le analisi le vials contenenti i campioni sono state intervallate da vials vuote utilizzate come bianchi per controllare eventuali contaminazioni nel sistema.

3.2. Risultati e discussione

3.2.1. Disegno sperimentale FC-CCD

Gli esperimenti eseguiti utilizzando il disegno sperimentale sono stati realizzati al fine di comprendere l'effetto di diversi parametri sull'efficienza estrattiva della luteina e dei carotenoidi. Le variabili che maggiormente influenzano l'efficienza di estrazione tramite strumentazione ASE sono la temperatura, il tempo statico, la miscela di solventi, la composizione chimica e le caratteristiche fisiche del campione. Per quanto riguarda i solventi, in letteratura si trovano alcuni lavori in cui viene impiegata una miscela di etanolo / acetone / esano in diverse proporzioni per estrarre i carotenoidi: Saha et al., (2015) hanno usato la miscela di etanolo / acetone / esano 2: 1: 3 (v / v / v) poiché è risultata efficiente secondo l'approccio di Hildebrand alla solubilità, mentre Paznocht et al., (2018) hanno utilizzato etanolo / acetone / esano 1: 2: 1 (v / v / v) come miscela di solventi. La scelta ottimale dei solventi è stata fatta proprio sulla base di questi due lavori, utilizzando la miscela etanolo / acetone / esano e variando le percentuali di etanolo. Dunque, il primo passo di questo studio ha riguardato lo sviluppo di un disegno sperimentale al fine di ottimizzare tre parametri ASE sul recupero degli analiti: temperatura, tempo statico e solvente di estrazione. Un disegno sperimentale FC - CCD a tre fattori che comprende i 15 esperimenti è stato quindi costruito e riportato in Tabella 3. In base a diversi lavori riportati in letteratura sono stati scelti i valori limite del dominio sperimentale: per la temperatura 40 ° C e 100 ° C, per il tempo statico di estrazione 2 e 6 minuti e per il solvente una miscela di differenti proporzioni costituita da etanolo / acetone / esano in rapporti di 25:25:50 % e 33:17:50 %. Gli esperimenti sono stati eseguiti in duplicato, per la valutazione della precisione di ogni misurazione. Inoltre, tutti gli esperimenti, compresa ciascuna replica, sono stati effettuati in ordine casuale al fine di evitare effetti di mascheramento e correlazioni spurie. I 30 estratti preparati secondo il disegno sperimentale sono stati analizzati in HPLC/UV-Vis e successivamente importati in Matlab, allineati utilizzando l'algoritmo iCoshift ed elaborati. iCoshift è una procedura di allineamento che utilizza una funzione di correzione lineare a segmenti. Inizialmente vengono definiti diversi intervalli (sia manualmente che in modalità automatica); quindi iCoshift allinea il segnale campione rispetto a un segnale identificato come target: questa procedura viene eseguita massimizzando la correlazione incrociata tra intervalli definiti dall'utente. A differenza delle procedure di *warping*, iCoshift è veloce, permette di ottenere una migliore qualità dell'allineamento, invarianza della forma del picco e consente di impiegare riferimenti perfettamente sagomati (Tomasi et al., 2011).

Per definire le risposte del disegno sperimentale, sono stati seguiti due differenti approcci: un approccio targeted in cui sono state valutate le aree dei picchi di luteina (il composto di interesse) e l'approccio untargeted in cui è stato analizzato l'intero profilo cromatografico attraverso l'analisi delle componenti principali.

Per l'approccio targeted sono state riportate le aree dei picchi di luteina per tutti i 30 esperimenti e quindi applicata una regressione lineare multipla ai dati per la valutazione della significatività dei coefficienti del modello:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$$

È stata in seguito costruita una matrice del modello, composta da una colonna con tutti i valori 1 per la stima del termine b_0 , le colonne x_1 , x_2 , x_3 per stimare le interazioni lineari, le colonne x_1x_2 , x_1x_3 , x_2x_3 per stimare le interazioni binarie e infine le colonne x_1^2 , x_2^2 , x_3^2 per stimare i termini quadratici.

In questa maniera viene ottenuta la matrice del modello sulla quale si calcola la regressione lineare:

$$\hat{y} = X_{\text{model}} * b$$

dove, b rappresenta il vettore dei coefficienti di regressione che ha la funzione di stimare l'effetto dei fattori e delle interazioni. Nel diagramma della Figura 29 sono rappresentati i parametri del modello di regressione con il rispettivo intervallo di confidenza, designando quali effetti sono significativi: il primo e il secondo fattore sono significativi come termini lineari, mentre il primo e il terzo fattore come termini quadratici e di interazione. In particolare, la risposta è stata massimizzata, ottenendo la più grande area del picco della luteina. Il secondo fattore (x_2) è facilmente ottimizzabile, ha un coefficiente positivo (aumentando x_2 aumenta la risposta), perciò è stato fissato al valore +1. Quindi è stato necessario costruire la superficie di risposta per le variabili x_1 e x_3 partendo da un modello ridotto:

$$Y = b_0 + b_2 + b_1x_1 + b_3x_3 + b_{13}x_1x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{33}x_3^2$$

Dove, impostato x_2 al valore +1, b_2 diventa un termine costante (insieme al termine noto b_0). La superficie di risposta è mostrata nella Figura 30. La zona gialla coincidente con il punto in alto nella superficie corrisponde alla condizione dalla quale si ottiene la risposta migliore. La risposta migliore si ottiene per valori alti di temperatura e tempo statico e per valori intermedi della composizione della miscela di solventi. In termini numerici, la condizione di estrazione ottimale è risultata essere: temperatura = 100 ° C, tempo statico = 6 min e miscela di etanolo / acetone / esano (27,6: 22,4: 50)%.

Come già accennato, i risultati ottenuti dai 30 esperimenti sono stati analizzati anche in un approccio untargeted che prende in considerazione l'intero profilo cromatografico. I profili cromatografici sono stati allineati utilizzando l'algoritmo iCoshift e sono stati elaborati attraverso l'analisi dei componenti principali (PCA) per valutare l'effetto di ciascun fattore sul recupero complessivo degli analiti. Per spiegare le differenze tra gli esperimenti è stato necessario considerare i loadings della prima componente principale (PC1) (Figura 31 a): come si può notare, i loadings lungo PC1 sono positivi per l'intero profilo cromatografico; di conseguenza, gli scores corrispondenti lungo la prima componente principale (Figura 31 b) possono essere considerati come un indice del recupero complessivo degli analiti. In base a queste considerazioni, gli scores su PC1 del modello costruito sui cromatogrammi sono stati utilizzati come variabile di risposta per il disegno sperimentale. È stato costruito un modello della superficie di risposta per determinare con precisione le condizioni ottimali di

temperatura, tempo statico e miscela di solventi. Questo modello ha correlato le condizioni sperimentali (fattori, interazioni binarie e termini quadratici) alla variabile scelta come risposta (scores su PC1). Per fare ciò, è stata costruita la matrice del modello dell'experimental design così da ottenere il diagramma in Figura 32. Dalla figura, i fattori x1 e x2 sono significativi come termini lineari, x1 e x3 come termini quadratici e anche l'interazione tra x1 e x3 è significativa; l'interazione tra x2 e x3 è debole, ma è ancora presente. La superficie di risposta mostrata in Figura 33 è stata ottenuta fissando una delle variabili al livello intermedio e modellando solo la dipendenza della risposta y e delle altre due.

In conclusione, si è visto come la condizione ottimale ottenuta con l'approccio untargeted coincidesse con la condizione ottimale ottenuta nell'approccio targeted. Per validare il modello ottenuto, la condizione ottimale trovata è stata applicata allo stesso campione di pasta corta convenzionale utilizzato per l'esecuzione degli esperimenti del disegno.

Tabella 3: Matrice degli esperimenti del disegno FC-CCD.

| Experiment nr. | Temperature | | Static time | | Solvent mixture ethanol/acetone/hexane | | Response Lutein Area, mAU*min | |
|-------------------|-------------|------|-------------|-------|---|----------|----------------------------------|--------|
| | Coded | Real | Coded | Real | Coded | Real (%) | Repl.1 | Repl.2 |
| | | (°C) | | (min) | | | | |
| 1 | -1 | 40 | -1 | 2 | -1 | 25/25/50 | 0.7825 | 1.1667 |
| 2 | -1 | 40 | -1 | 2 | 1 | 33/17/50 | 1.6172 | 1.4872 |
| 3 | -1 | 40 | 1 | 6 | -1 | 25/25/50 | 1.9493 | 1.6508 |
| 4 | -1 | 40 | 1 | 6 | 1 | 33/17/50 | 1.8377 | 1.7323 |
| 5 | 1 | 100 | -1 | 2 | -1 | 25/25/50 | 4.4235 | 3.2622 |
| 6 | 1 | 100 | -1 | 2 | 1 | 33/17/50 | 2.6463 | 2.3010 |
| 7 | 1 | 100 | 1 | 6 | -1 | 25/25/50 | 4.3451 | 3.6535 |
| 8 | 1 | 100 | 1 | 6 | 1 | 33/17/50 | 3.0438 | 2.0438 |
| 9 | -1 | 40 | 0 | 4 | 0 | 29/21/50 | 1.6884 | 2.2894 |
| 10 | 1 | 100 | 0 | 4 | 0 | 29/21/50 | 3.9629 | 4.8194 |
| 11 | 0 | 70 | -1 | 2 | 0 | 29/21/50 | 2.6452 | 2.5823 |
| 12 | 0 | 70 | 1 | 6 | 0 | 29/21/50 | 3.6570 | 3.1640 |
| 13 | 0 | 70 | 0 | 4 | -1 | 25/25/50 | 1.5623 | 1.5150 |
| 14 | 0 | 70 | 0 | 4 | 1 | 33/17/50 | 2.6450 | 2.8322 |
| 15 | 0 | 70 | 0 | 4 | 0 | 29/21/50 | 2.6052 | 2.2521 |

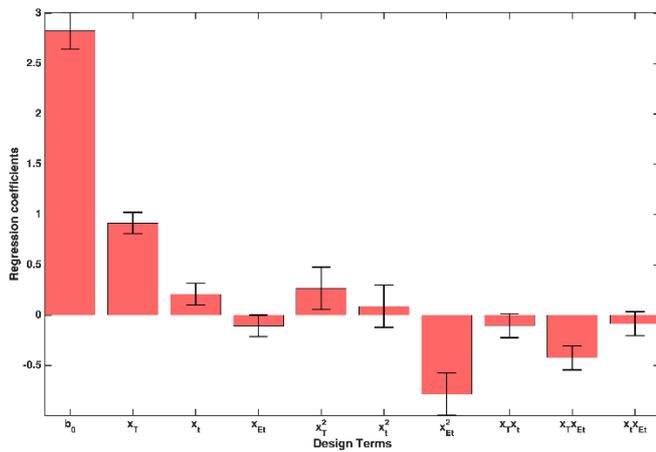


Figura 29: Valutazione dei risultati del disegno sperimentale: coefficienti di regressione del modello che mettono in relazione i fattori controllati e le loro interazioni con l'area del picco di luteina insieme ai loro intervalli di confidenza al 95%.

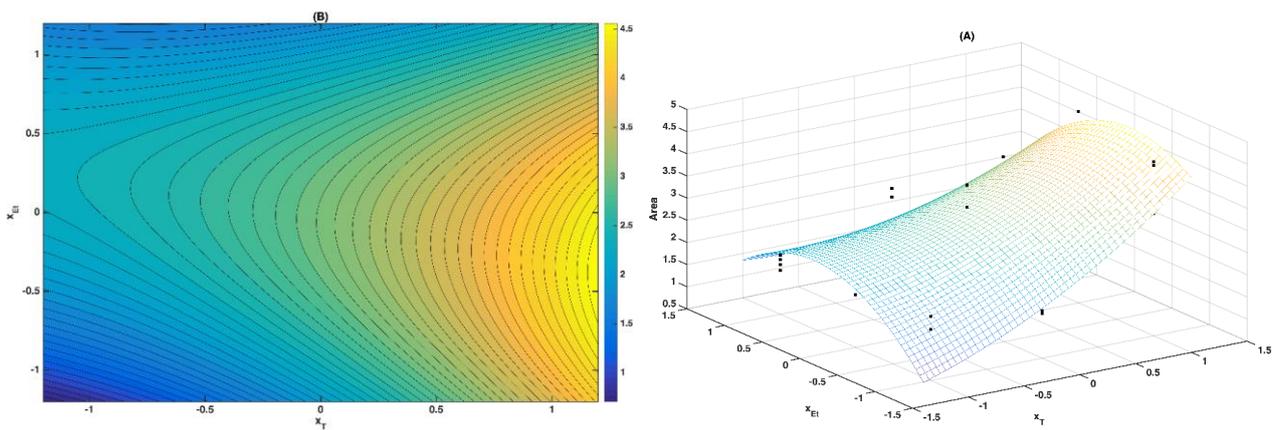


Figura 30: Ottimizzazione delle condizioni di estrazione basate sull'approccio targeted. Superfici di risposta marginale che illustrano la dipendenza della risposta (area del picco di luteina) in funzione della temperatura di estrazione ASE e la % di etanolo nella miscela di estrazione. a) grafico3D della superficie di risposta, in cui i quadrati neri corrispondono ai risultati dei 30 esperimenti; b) grafico 2D.

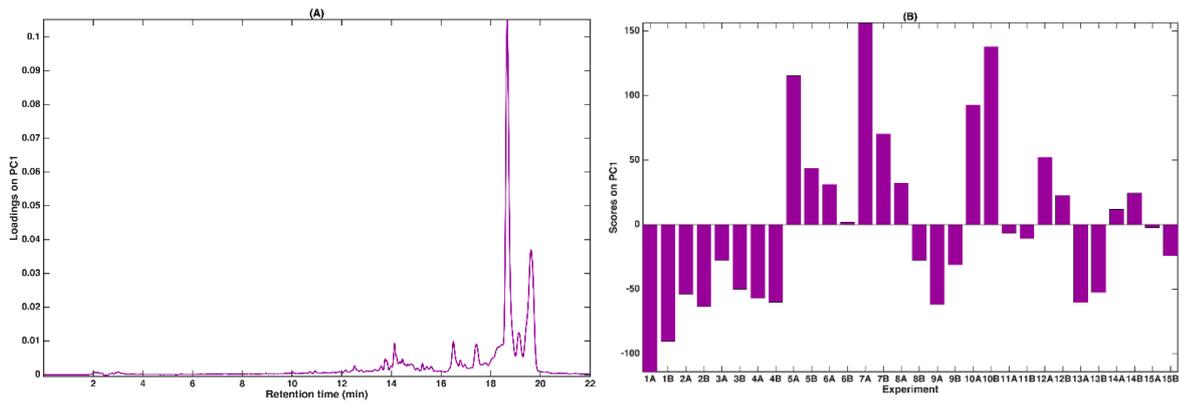


Figura 31: Ottimizzazione delle condizioni di estrazione basata sull'approccio untargeted. Risultati della PCA dei profili cromatografici HPLC registrati sui 30 esperimenti effettuati. Rappresentazione dei loadings (a) e degli scores (b) lungo la prima componente principale.

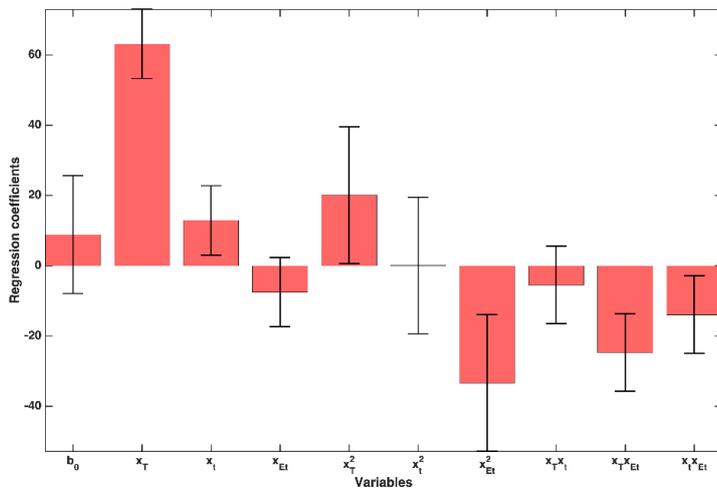


Figura 32: Valutazione dei risultati del DoE attraverso l'approccio untargeted: coefficienti di regressione del modello che mettono in relazione i fattori controllati e le loro interazioni con gli scores lungo PC1 insieme ai loro intervalli di confidenza del 95%.

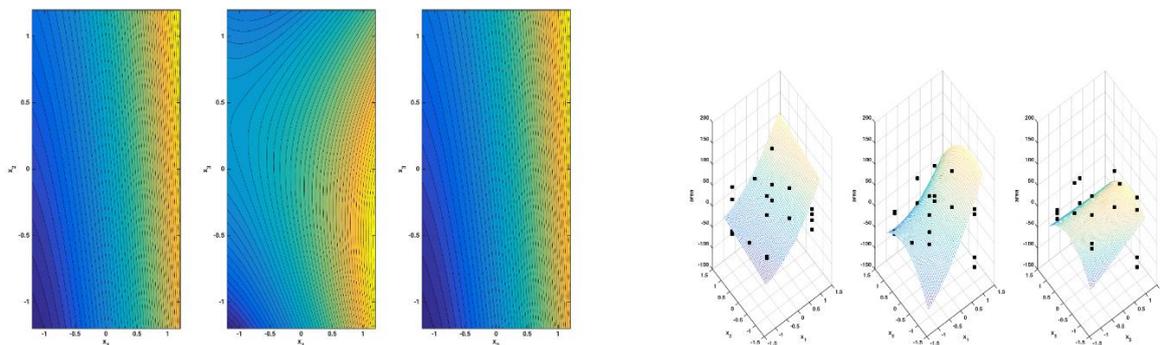


Figura 33: Ottimizzazione dell'estrazione basate sull'approccio untargeted: superficie di risposta sottoforma di grafico 2D (a) e 3D (b).

3.2.1.1. Analisi preliminare del primo set di campioni analizzato

Successivamente in questa prima parte, sono stati classificati 50 campioni di pasta convenzionale e integrale per verificare se i profili cromatografici in generale, o la luteina in particolare, potessero essere utilizzati come marcatori discriminanti tra i due tipi di pasta: ai dati cromatografici è stato applicato un modello di classificazione PLS-DA. Per l'identificazione della luteina, è stato utilizzato uno standard di luteina in etanolo e iniettato in HPLC.

Prima di procedere alla costruzione del modello di classificazione, i 50 profili cromatografici dei campioni di pasta sono stati pretrattati. I TIC (*Total Ion Chromatogram*) sono stati importati nel software Matlab e allineati utilizzando l'algoritmo iCoshift. Sui dati pretrattati è stato quindi costruito un modello di classificazione PLS-DA al fine di discriminare le due tipologie di pasta (convenzionale e integrale). Innanzitutto, per la validazione del modello è stato utilizzato un set di campioni esterno e, considerando il numero limitato di campioni a disposizione, è stata utilizzata una procedura di *Repeated Double Cross Validation*, che prevede l'impiego di due loops di cross-validation: il loop esterno che corrisponde ai campioni per la validazione del modello e il loop interno per ottimizzare i parametri del modello. Il termine "ripetuto" deriva dal fatto che la procedura viene ripetuta più volte (in questo caso 50), in maniera tale che i risultati non dipendano dalla suddivisione specifica dei campioni all'interno dei diversi gruppi di cancellazione. La scelta di volta in volta del numero ottimale di variabili latenti del modello è stata eseguita sulla base dell'errore di classificazione minore nel loop interno di double cross validation. Sono state quindi selezionate quattro variabili latenti sulla base del criterio dell'errore minimo di classificazione. Utilizzare la LDA per eseguire la classificazione a partire dalla Y predetta di PLS, suggerisce che plottando l'unica variabile canonica, ovvero la variabile lungo la quale la capacità discriminante è massima che può essere calcolata dai dati, potrebbe esserci una chiara separazione tra le due classi. Se LDA viene applicato ai valori di Y predetta, questa variabile canonica è direttamente proporzionale alla Y predetta. Al fine di valutare la separazione tra le classi in maniera non ottimistica e allo stesso tempo considerare la double cross-validation, nella Figura 34 sono mostrati gli scores calcolati per i

campioni del loop esterno lungo la variabile canonica considerata. Inoltre, per ogni campione è stato possibile calcolare l'intervallo di confidenza per questi scores, poiché la procedura è stata ripetuta 50 volte. La classe 1 (pasta integrale) possiede tutti gli scores negativi (o Y predette negative) e la classe 2 (pasta convenzionale) ha tutti gli scores positivi (o Y predette positive). I risultati della double cross validation suggeriscono che il modello di classificazione funziona correttamente e consente, in media, di classificare correttamente oltre il 95% dei campioni. Nel dettaglio, è stata ottenuta una sensibilità del $98,6 \pm 1,9\%$ per la classe convenzionale, e $95,3 \pm 3,3\%$ per la classe integrale. In media la sensibilità è stata del $97,0 \pm 1,8\%$. Osservando le variabili per spiegare il modello, dal diagramma degli scores sull'unica variabile canonica (Figura 34), è possibile vedere come la separazione tra le classi sia stabile e coerente lungo le diverse iterazioni della procedura. A questo punto, i pesi sono associati agli scores per l'interpretazione; i pesi di questa variabile canonica, direttamente proporzionali ai coefficienti di regressione della PLS, indicano quali parti del profilo cromatografico discriminano le due classi. Inoltre, avendo adoperato una double cross validation, è anche possibile vedere quali variabili hanno un peso statisticamente diverso da zero nella definizione del modello (Figura 35A). Le variabili con un peso vicino allo zero o con un intervallo di confidenza che incrocia lo zero, non sono significative, mentre le altre sono significative. Mentre le variabili che contribuiscono con coefficienti positivi sono più alte nei campioni di pasta convenzionali, quelle con coefficienti negativi sono più alte nei campioni di pasta integrale. Nella Figura 35B è anche possibile osservare il contributo della luteina nella discriminazione dei due tipi di pasta. Poiché il suo profilo ha coefficienti negativi, la luteina risulta essere più alta nei campioni di pasta integrale.

I risultati ottenuti dalle analisi di questo primo set di campioni hanno mostrato che è possibile discriminare la pasta integrale da quella comune sulla base della presenza di carotenoidi. La pasta integrale dovrebbe contenere più carotenoidi in quanto la crusca è inclusa anche all'interno della cariosside durante la macinazione dei chicchi di grano. Questa procedura potrebbe contribuire a dare un valore aggiunto alla pasta dal punto di vista nutrizionale grazie alla maggiore presenza di carotenoidi. Prima di confermare i dati attraverso l'analisi chemiometrica, i profili cromatografici sono stati valutati anche qualitativamente e di fatto sono state riscontrate differenze tra i due tipi di pasta.

Per approfondire e confermare questi risultati preliminari, si è deciso di allargare il set di campioni e diversificare ancora di più i tipi di pasta e i parametri associati.

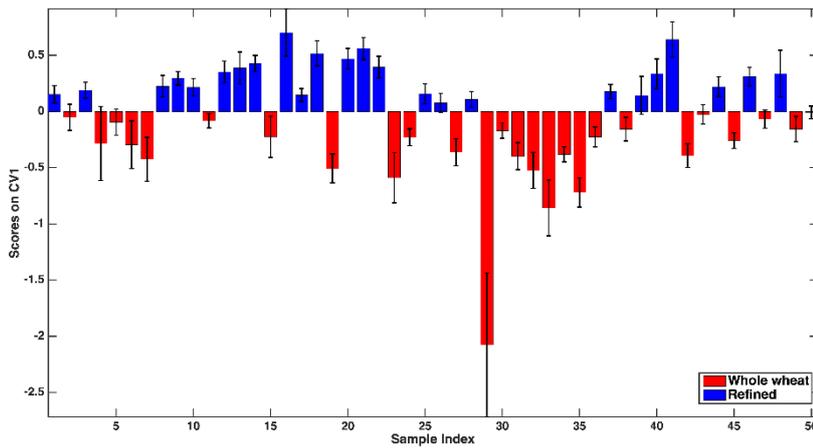


Figura 34: Modello PLS-DA: scores dei campioni con i loro intervalli di confidenza lungo l'unica variabile canonica dopo la double cross-validation.

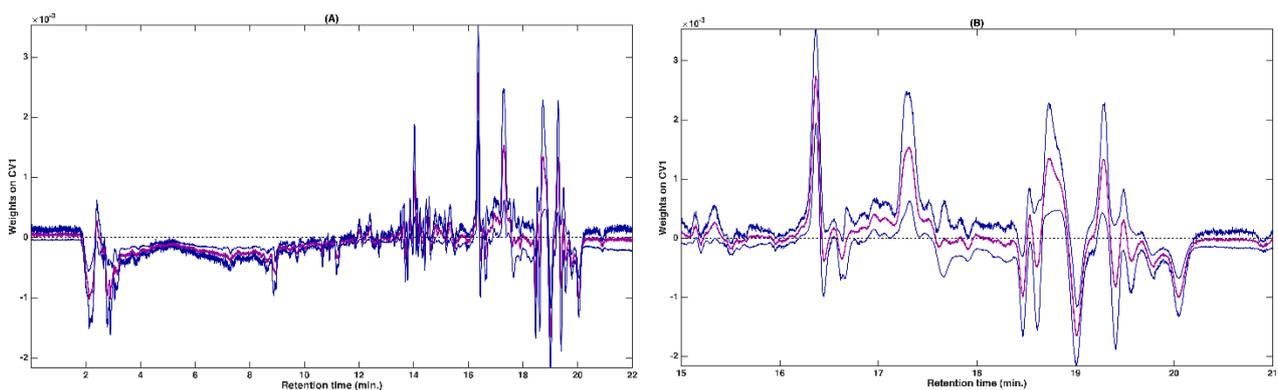


Figura 35: Pesì delle variabili lungo l'unica variabile canonica del modello PLS-DA, insieme ai loro intervalli di confidenza.

3.2.2. Analisi statistica dei dati provenienti dall'analisi HPLC-UV-Vis del secondo set di campioni

Il set di campioni è stato quindi allargato al fine di poter ottenere più informazioni per discriminare le tipologie di pasta in termini di contenuto di carotenoidi. Inoltre, altro obiettivo di questo secondo set di campioni è stato caratterizzare la pasta anche in base alle tecnologie di lavorazione (essiccazione e trafilatura), oltre che al tipo di semola (convenzionale e integrale).

I campioni sono stati analizzati tramite HPLC/UV-Vis con lo scopo di ottenere informazioni sul contenuto dei carotenoidi nella pasta, in particolare della luteina, per verificare se quest'ultima potesse essere utile come marcatore di riferimento per discriminare i campioni presenti sul mercato. Infatti, sebbene sia stata identificata

la luteina tramite uno standard in etanolo con un picco corrispondente a un tempo di ritenzione di 18,51 min, è stato deciso che la classificazione con un approccio untargeted sarebbe stata preferibile poiché, esaminando l'intero cromatogramma era possibile ottenere il maggior numero di informazioni. In effetti, i picchi cromatografici sono risultati essere nient'altro che i carotenoidi contenuti nella pasta, ma in concentrazioni nettamente inferiori rispetto alla luteina, con un'assorbanza a 450 nm e tempi di ritenzione simili. Innanzitutto, tutti i 96 cromatogrammi sono stati importati in forma grezza nel software Matlab. La Figura 36 mostra i profili cromatografici sovrapposti dei 96 campioni di pasta analizzati; come si può notare, si osserva un leggero disallineamento dei picchi. Anche se minimi, si è deciso di utilizzare l'algoritmo iCoshift per eliminare eventuali shift che potessero degradare la qualità del modello costruito. L'allineamento eseguito sull'intero cromatogramma con il segnale medio di tutti i campioni come segnale target è stato sufficiente per eliminare gli shift dei tempi di ritenzione e far coincidere i picchi dei composti d'interesse.

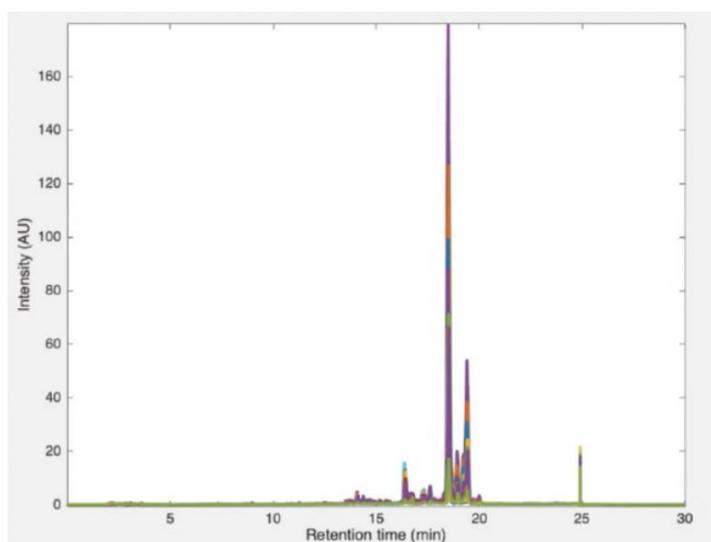


Figura 36: Profilo cromatografico dei carotenoidi (cromatogrammi di tutti i campioni analizzati in HPLC-UV-Vis).

3.2.2.1. Semola

In primo luogo, è stata esaminata la tipologia di semola di grano duro caratterizzante il prodotto ed è stata considerata solo la porzione del cromatogramma da 1,7 min a 24,85 min, non essendoci picchi utili nella porzione esclusa. L'algoritmo scelto è stato PLS-DA, che ha utilizzato l'analisi discriminante lineare (LDA) applicata ai valori di Y predetta per determinare la soglia di classificazione. Il numero massimo di variabili latenti per la ricerca della complessità ottimale è stato fissato a 20 per poter poi scegliere il numero ideale per la costruzione del modello sulla base dell'errore minimo in cross-validation. La Figura 37 presenta due grafici, con il lato sinistro che mostra l'errore quadratico medio RMSE (anche se questo non è il numero ideale da considerare nel caso dei modelli di classificazione) e il lato destro che mostra l'errore di classificazione in percentuale. In quest'ultimo caso, la curva rossa rappresenta la media degli errori che si verificano in entrambe

le classi e la curva blu è l'errore di classificazione totale. Poiché i due errori sono praticamente identici, si può ipotizzare che, nonostante la disparità nel numero di campioni tra le due categorie (come già notato, 64 per la pasta convenzionale e 32 per quella integrale), le due classi siano predette in modo equivalente. Il valore minimo dell'errore relativo coincide quando il numero di variabili latenti è 10 e 11 (viene adottato il numero più basso, quindi 10), corrispondente a 0,01042 (1%). I risultati di questa prima cross-validation dimostrano che tale classificazione è possibile. Per la costruzione di un modello che potesse essere validato su campioni esterni, sono stati costruiti un training set (60 campioni, di cui 40 convenzionali e 20 integrali) e un test set (36 campioni, di cui 24 convenzionali e 12 integrali). In questo caso, l'errore di classificazione in cross validation per il modello creato dal training set, ancora con 10 variabili latenti, è leggermente maggiore, pari a 0,01667 (1,7%). Nel grafico in Figura 38 le due classi per le prime due componenti principali sono mostrate separatamente. I punti vuoti sono i campioni del test set, quelli pieni sono i campioni del training set, i rossi sono i campioni convenzionali, i blu sono integrali. Il fatto che l'intervallo di variazione sia lo stesso dimostra che la selezione tra training e test è rappresentativa. Il modello ottenuto nel training set è stato poi applicato ai dati residui presenti nel test set per valutare quantitativamente la sua capacità predittiva: la pasta integrale è stata classificata nella classe 2 e la pasta normale nella classe 1.

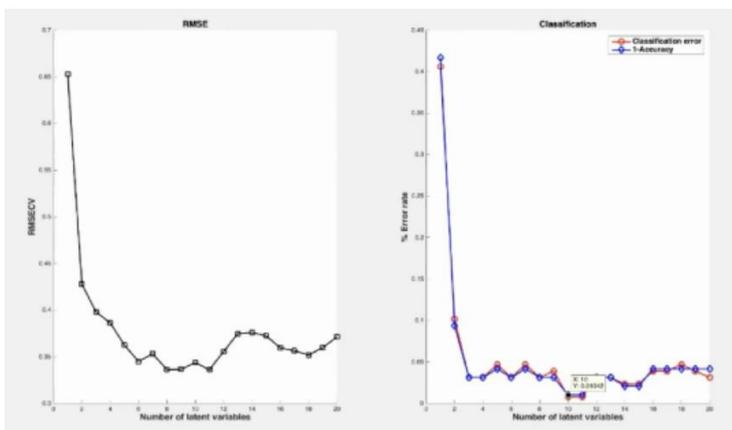


Figura 37: Rappresentazione dell'errore quadratico medio (a sinistra) e dell'errore di classificazione (a destra) in cross validation.

Table 4: Rappresentazione dei risultati in HPLC della classificazione in base al tipo di semola.

| Classe | Sensibilità (%) | % di corretta classificazione | Accuratezza |
|---------------|-----------------|-------------------------------|-------------|
| Convenzionali | 100 % | 100 % | 100 % |
| Integrali | 100 % | | |

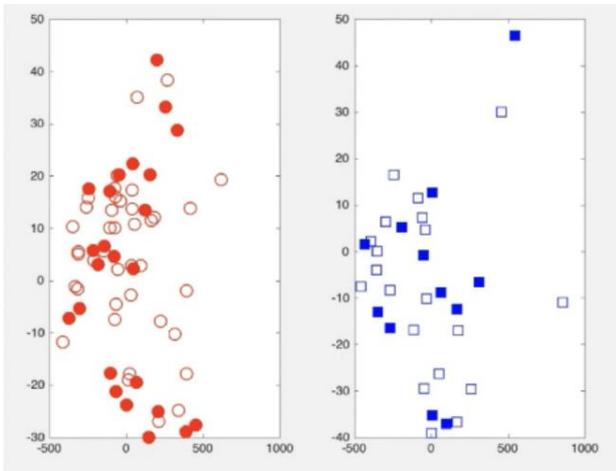


Figura 38: Rappresentazione delle prime due componenti principali: ripartizione dei campioni convenzionali (rossi) e integrali (blu) nel training set (punti pieni) e nel test set (punti vuoti).

3.2.2.2. Essiccazione e trafilatura

In questa sezione viene descritta la classificazione dei fattori del ciclo produttivo che possono influenzare il contenuto di carotenoidi nella matrice, ovvero l'essiccazione (lenta o veloce) e la trafilatura (bronzo e teflon). L'essiccazione può essere eseguita ad alta temperatura e tempi brevi o a bassa temperatura e tempi maggiori, come spiegato precedentemente. Se si considerano insieme la pasta integrale e quella normale, solo 26 campioni su 96 corrispondevano a LT-Lt (classe 1) e 70 a HT-St (classe 2). Anche in questo caso, con 30 campioni (10 LT-Lt e 20 HT-St) nell'insieme di test e 66 campioni (16 LT-Lt e 50 HT-St) nell'insieme di training, viene utilizzato l'algoritmo Duplex: per l'HPLC, il modello PLS-DA con 8 variabili latenti (errore di classificazione minimo) non porta a buoni risultati, poiché la sensibilità è pari al 50% per la classe 1 (LT-Lt) e 70% per la classe 2 (HT-St). Tali valori possono essere spiegati dal fatto che i campioni integrali e normali vengono prelevati indistintamente. Pertanto, la stessa classificazione si applicherà solo ai prodotti ottenuti da semole raffinate. Nel frattempo, 48 campioni di pasta ottenuta mediante trafilazione al bronzo (come riportato in etichetta) (classe 1) e 48 campioni di pasta lavorata con teflon (classe 2) sono stati analizzati per il modello. È stato utilizzato il Duplex con 36 campioni (18 di bronzo, 18 di teflon) nel test set e 60 campioni (30 di bronzo, 30 di teflon) nel training set. Le otto variabili latenti sono state utilizzate per calcolare il modello PLS-DA ottimale, ottenendo una sensibilità del 55% per la classe 1 (bronzo) e del 39% per la classe 2 (teflon). Due potrebbero essere le possibili ragioni per cui i risultati dell'analisi in cromatografia liquida non portano a un modello accurato: o l'essiccazione e la trafilatura non influenzano significativamente il contenuto di carotenoidi nella pasta oppure i campioni analizzati non erano sufficienti e/o rappresentativi. I dati di letteratura sulla trafilatura sono scarsi, ma la letteratura sull'essiccazione e il suo effetto sui carotenoidi è piena di risultati

contrastanti. È stato osservato che la bassa termostabilità dei carotenoidi porta a reazioni contraddittorie: a temperature troppo elevate si potrebbe verificare la distruzione dei carotenoidi e, al contempo, la liberazione in seguito alla rottura della matrice. Come accennato in precedenza, per evitare il fattore di confondimento associato alle diverse semole, i test sono stati condotti anche considerando solo la pasta convenzionale, ma, nonostante ciò, la situazione non è migliorata sia per quanto riguarda l'essiccazione (la sensibilità è stata di circa il 50% nella classe 1 e del 73% nella classe 2) sia per quanto riguarda la trafilatura.

Tabella 5: Rappresentazione dei risultati in HPLC della classificazione in base alla fase di essiccazione.

| Classe | Sensibilità (%) | % di corretta classificazione | Accuratezza |
|--------|-----------------|-------------------------------|-------------|
| LT-Lt | 50 % | 60 % | 63,3 % |
| HT-St | 70 % | | |

Tabella 6: Rappresentazione dei risultati in HPLC della classificazione in base al tipo di trafilatura.

| Classe | Sensibilità (%) | % di corretta classificazione | Accuratezza |
|--------|-----------------|-------------------------------|-------------|
| Bronzo | 55 % | 47 % | 47 % |
| Teflon | 39 % | | |

3.2.3. Analisi statistica del secondo set di campioni per la caratterizzazione del flavour

Il secondo set di campioni, come già precedentemente accennato, è stato analizzato anche tramite HS-SPME/GC-MS per poter caratterizzare la pasta di grano duro in base alla componente aromatica (flavour).

I composti aromatici tipici del flavour della pasta normale e di quella integrale possono differire notevolmente a causa delle differenze negli ingredienti. Nelle stesse condizioni di processo, l'intensa attività dell'amilasi combinata con la presenza di amido danneggiato, tipica di uno sfarinato integrale ha la capacità di generare zuccheri riducenti e una reazione di Maillard più forte. Il processo di essiccazione della pasta è quindi probabilmente la fase più importante del processo produttivo, perché influisce sulla consistenza, sul colore, sul sapore e sul valore nutrizionale del prodotto finito. Le fasi iniziali di elaborazione dei dati per l'analisi degli aromi mediante GC-MS sono state eseguite allo stesso modo dell'analisi HPLC-UV. In pratica, 96 cromatogrammi grezzi sono stati importati in MatLab ed è stata costruita una matrice di dati. A causa dei

problemi di allineamento già riscontrati, è stato utilizzato l'algoritmo iCoshift per correggere gli shift dei tempi di ritenzione e far coincidere i massimi dei diversi picchi.

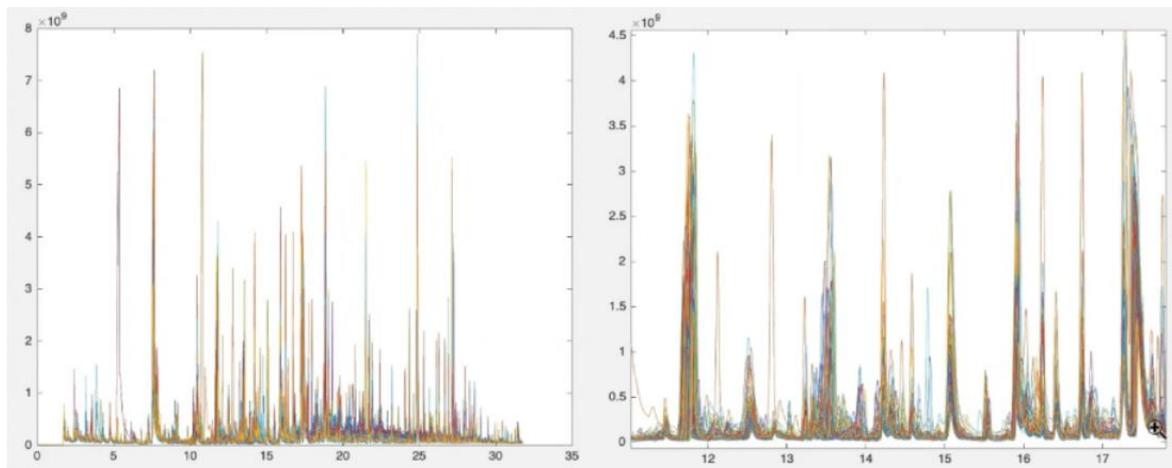


Figura 39: Profilo cromatografico della componente aromatica tramite analisi HS-SPME/GC-MS prima (a sinistra) e dopo (a destra in zoom) l'allineamento con iCoshift.

3.2.3.1. Semola

Il primo modello di classificazione è stato calcolato per discriminare la classe 1 (semola di grano duro convenzionale) e la classe 2 (semola di grano duro integrale). Per la costruzione del training e test set, sono state mantenute le stesse suddivisioni dei campioni utilizzate per l'analisi HPLC. La cross validation ha valutato la complessità ottimale del modello PLS-DA e ha determinato otto variabili latenti corrispondenti al minimo errore di classificazione (Figura 40); i dati GC-MS hanno mostrato una sensibilità (ovvero percentuale di corretta classificazione) pari al 92% (0,9167) per la classe 1 (pasta normale), e del 75% (0,7500) per la classe 2 (pasta integrale). Questo risultato peggiore è dovuto sicuramente al fatto che nella gascromatografia le fonti di variabilità sono maggiori sia a causa dei parametri dello strumento (ad esempio, il campionamento dello spazio di testa) sia per la presenza di un maggior numero di analiti nell'aroma estratto. Per risolvere questo problema, è stata eseguita la normalizzazione probabilistica del quoziente (PQN) (*Probabilistic Quotient Normalization, PQN*) al fine di eliminare parte della variabilità spuria tra i campioni. Il risultato è stato un aumento dell'accuratezza di circa il 95% e un aumento dei valori di sensibilità per le classi 1 e 2 rispettivamente di 100% e 83%. Questo risultato è supportato da dati di letteratura che affermano che la pasta di grano duro integrale contiene più composti volatili rispetto alla pasta raffinata. In effetti, l'esclusione di crusca e germe è un fattore che facilita la classificazione chemiometrica.

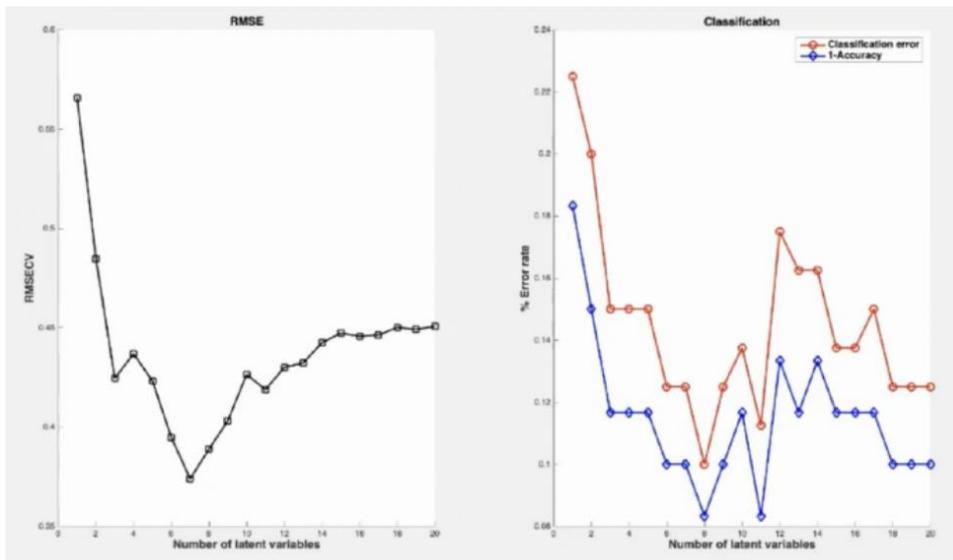


Figura 40: Rappresentazione dell'errore quadratico medio (a sinistra) e dell'errore di classificazione (a destra) in cross validation dopo aver applicato l'algoritmo Duplex.

Tabella 7: Rappresentazione dei risultati in GC-MS della classificazione in base al tipo di semola.

| Classe | Sensibilità (%) | % di corretta classificazione | Accuratezza |
|---------------|-----------------|-------------------------------|-------------|
| Convenzionali | 100 % | 91,5 % | 94,4 % |
| Integrali | 83 % | | |

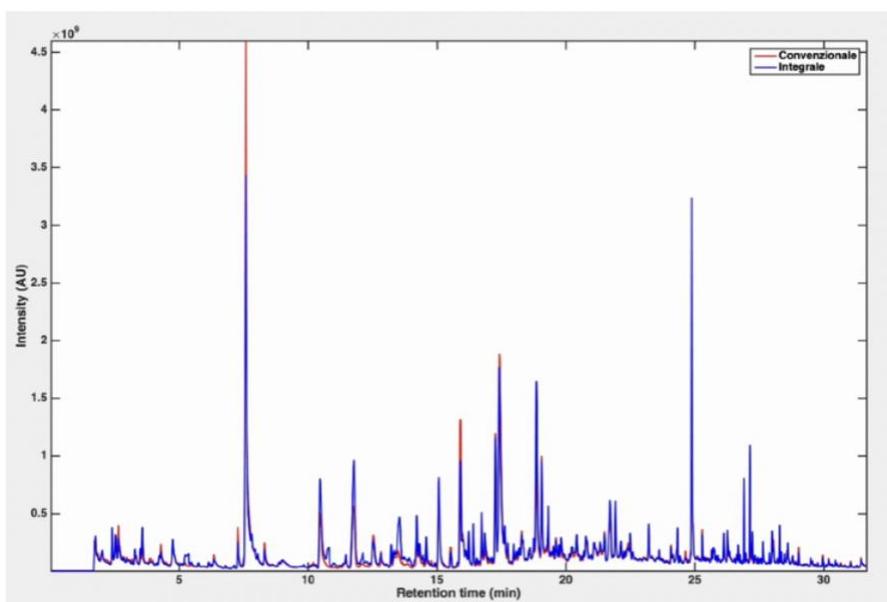


Figura 41: Confronto tra i profili cromatografici dei campioni di pasta convenzionale (in rosso) e integrale (in blu).

3.2.3.2. Essiccazione e trafilatura

La classificazione dei dati GC-MS, tra trafilatura al bronzo/teflon ed essiccazione ad alta/bassa temperatura è stata ancora effettuata indipendentemente dal tipo di semola, cioè considerando indistintamente la pasta normale e quella integrale. Rispetto all'HPLC, dove il raggruppamento non si è verificato in modo ottimale, la situazione ora è ancora più diseguale: la sensibilità dei campioni LT-Lt è scesa al 30% e quella dei campioni HT-St è aumentata al 95%. Questo squilibrio potrebbe essere un fattore che influisce sulla correttezza del modello predittivo dovuto al diverso numero di campioni a essiccazione lenta e rapida. D'altra parte, la percentuale di corretta classificazione per quanto riguarda la trafilazione è stata pari al 61% per la classe 1 dei campioni lavorati al bronzo e al 66% per la classe 2 dei campioni trafilati al teflon. È emerso che anche se la pasta integrale viene separata da quella normale e si sposta la concentrazione solo su quest'ultima, si ottengono valori di sensibilità e accuratezza comparabili. Non ci sono differenze significative per l'essiccazione con o senza normalizzazione (20% di sensibilità per LT-Lt e 100% per HT-St); per la trafilatura, invece (senza includere la normalizzazione attraverso PQN), l'accuratezza arriva al 75% (sensibilità uguale al 73% per la classe 1, e 77% per la classe 2). Poiché il segnale gascromatografico è caratterizzato da un numero di composti più elevato rispetto all'HPLC, un problema potrebbe essere insito nell'allineamento iniziale eseguito. Di conseguenza si è deciso di riapplicare iCoshift in modo "più fine", ovvero considerando alcune aree del grafico per migliorare la sovrapposizione dei picchi. Ciononostante, non si è registrato un miglioramento significativo nell'accuratezza di nessuna delle previsioni, in particolare la differenza tra essiccazione lenta e rapida è peggiorata. In alcuni studi in letteratura la classificazione riguardo l'essiccazione restituisce dei risultati più che accettabili; ciò è dovuto al fatto che i prodotti della reazione di Maillard vengono rilasciati durante la lavorazione a temperature superiori a 80/100°C (HT-St e VHT-St) rispetto a temperature inferiori a 60°C (LT-Lt). Tuttavia, in questo studio il numero di campioni tra le due classi era troppo sbilanciato per essere rappresentativo di alcune sottocategorie e per ricavare una discriminazione che portasse a un'accuratezza comparabile o almeno accettabile (c'erano solo sette campioni integrali a essiccazione lenta). Un'altra possibilità è che le differenze nelle caratteristiche tra i campioni selezionati per la categoria di essiccazione lenta fossero troppo pronunciate per trovare informazioni discriminatorie sufficienti per l'essiccazione rapida; in realtà, il campionamento riguardava la pasta integrale e convenzionale e non la semola trasformata. Inoltre, l'elemento più confuso della lavorazione è l'etichettatura. I produttori non utilizzano sempre la stessa dicitura per indicare un certo tipo di essiccazione e, inoltre, spesso inseriscono informazioni fuorvianti sulla temperatura utilizzata (ad esempio "essiccazione lentissima", "essiccazione lenta", "temperatura controllata", "bassissima temperatura"). La trafilatura porta a valori di sensibilità migliori ed effettivamente più accettabili. Tuttavia, è discutibile che si possa davvero distinguere tra trafilatura in bronzo e teflon, poiché questa fase del processo potrebbe non influenzare affatto la composizione interna della pasta.

Tabella 8: Rappresentazione dei risultati in GC-MS della classificazione in base alla tipologia di essiccazione.

| Classe | Sensibilità (%) | % di corretta classificazione | Accuratezza |
|--------|-----------------|-------------------------------|-------------|
| LT-Lt | 30 % | 62,5 % | 73,3 % |
| HT-St | 95 % | | |

Tabella 9: Rappresentazione dei risultati in GC-MS della classificazione in base alla tipologia di trafilatura.

| Classe | Sensibilità (%) | % di corretta classificazione | Accuratezza |
|--------|-----------------|-------------------------------|-------------|
| Bronzo | 61 % | 63,5 % | 63,5 % |
| Teflon | 66 % | | |

3.2.4. Approccio Multiblock

Per ottenere il maggior numero possibile di informazioni dall'analisi e, in particolare, per scovare possibili miglioramenti nei risultati della classificazione, si è deciso di utilizzare un approccio multiblock combinando i dati GC-MS con quelli HPLC-UV. In primo luogo, è stata tentata una low level data fusion, semplicemente concatenando le due matrici di dati ed eseguendo contemporaneamente il block scaling come fase di elaborazione preliminare per bilanciare i pesi che i due blocchi attribuiscono al modello finale (la matrice GC è ricca di variabili, e senza tale operazione, potrebbe influenzare maggiormente la predizione in modo sia positivo che negativo). I risultati della cross validation hanno mostrato che per quanto riguarda la variabile semola, l'errore minimo di classificazione corrispondente alle quattro variabili latenti è stato del 5% e il modello PLS-DA risultante consente di ottenere una sensibilità pari al 100% per la classe 1 (normale) e al 67% per la classe 2 (integrale) per la previsione sul set di test esterno. Quando i dati vengono normalizzati, i risultati sono ancora migliori, poiché si ottiene un'accuratezza del 100% con un errore di classificazione pari a zero per entrambe le categorie. Si tratta di un risultato molto buono, essendo il metodo low level data fusion il più sensibile alle fonti di variabilità spuria tra tutti i metodi disponibili per il data fusion. Sono stati effettuati tentativi di low level data fusion anche per le altre due variabili: essiccazione e trafilatura. Nel primo caso, la sensibilità delle classi LT-Lt e HT-St è stata del 40% e 100% rispettivamente (50% e 70% senza normalizzazione), con un'accuratezza dell'80% e una percentuale di corretta classificazione media del 70%.

Per quanto riguarda la variabile trafilatura, la sensibilità era pari al 55% per la classe 1 bronzo (55% anche con la normalizzazione) e al 67% per la classe 2 teflon (38% con la normalizzazione).

Successivamente è stato applicato il mid level data fusion ai dati con l'obiettivo di unire le caratteristiche estratte dai singoli modelli, cioè le componenti PLS-DA (evitando la classificazione relativa alla semola integrale/convenzionale, che fornisce buoni risultati con il low level). Questa fusione di dati produce risultati ancora peggiori di quelli ottenuti con il low level per entrambe le variabili essiccazione e trafilatura. Tuttavia, l'errore è pari a zero sul training set, mentre in precedenza gli errori sui set di training e test erano comparabili. Con la cross validation l'accuratezza è del 100% per le quattro variabili latenti e il problema rimane la predizione. Osservando il grafico dei campioni dell'essiccazione collocati nell'insieme di training (punti vuoti) e nell'insieme di test (punti pieni) nel mid level (Figura 43), si può notare che le due classi sono chiaramente separate, e al contempo i campioni scelti per l'insieme di test sono molto distanti dai corrispondenti campioni di training. Nel caso della fusione dei dati, per verificare se l'inaccuratezza della classificazione potesse essere legata all'inefficiente separazione dei campioni tra training e test ed eventualmente per cercare di migliorare questo problema, si è deciso di operare una nuova selezione dei due sotto set applicando l'algoritmo Duplex alla matrice ottenuta concatenando gli scores lungo le prime componenti principali calcolati individualmente per i dati HPLC e GC, prima della fusione mid level. Pertanto, l'algoritmo Duplex viene utilizzato solo dopo aver unito gli scores. È interessante notare che l'errore di classificazione aumenta per l'essiccazione e la suddivisione in LT-Lt e HT-St produce un'accuratezza insufficiente, pari solo al 50%. Anche in questo caso, le paste mal classificate sono invariabilmente caratterizzate da un'essiccazione a bassa temperatura o hanno definizioni ambigue. Si conferma quindi la difficoltà di distinguere accuratamente i campioni essiccati a bassa temperatura dai campioni essiccati ad alta temperatura nell'insieme dei dati raccolti. Allo stesso tempo, i risultati ottenuti con il data fusion mostrano che il problema non è il basso contenuto informativo dei profili strumentali collezionati (in quanto i campioni di training consentono un'elevata capacità predittiva anche nella fase di cross validation), ma piuttosto l'elevata eterogeneità dei campioni di pasta raccolti, rispetto al numero totale di campioni analizzati. Inoltre, come già detto, ciò può essere in parte spiegato dal fatto che i diversi produttori di pasta definiscono la "lenta essiccazione" in maniera differente gli uni dagli altri.

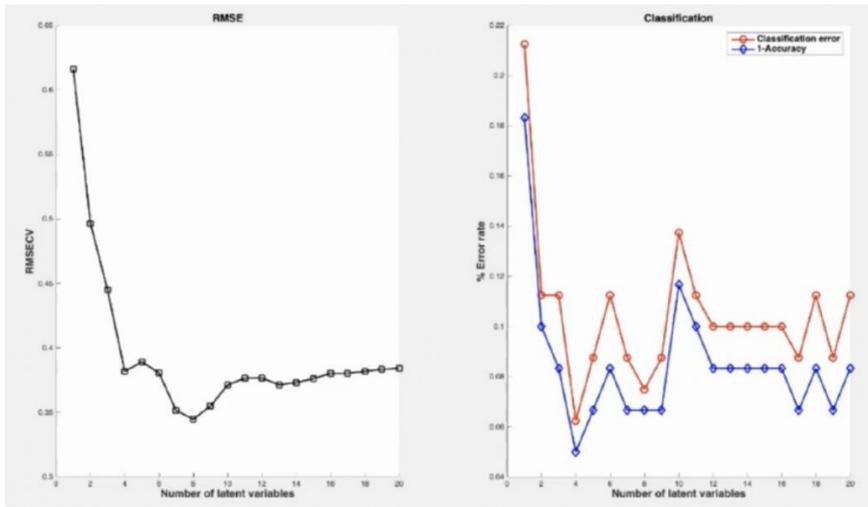


Figura 42: Grafico dell'errore quadratico medio (a sinistra) e dell'errore di classificazione (a destra) in cross validation sui campioni del training set.

Tabella 10: Risultati della classificazione in base al tipo di semola utilizzando il data fusion low level.

| Classe | Sensibilità (%) | % di corretta classificazione | Accuratezza |
|---------------|-----------------|-------------------------------|-------------|
| Convenzionali | 100 % | 100 % | 100 % |
| Integrali | 100 % | | |

Tabella 11: Risultati della classificazione in base alla fase di essiccazione utilizzando il data fusion low level.

| Classe | Sensibilità (%) | % di corretta classificazione | Accuratezza |
|--------|-----------------|-------------------------------|-------------|
| LT-Lt | 40 % | 70 % | 80 % |
| HT-St | 100 % | | |

Tabella 12: Risultati della classificazione sulla base della trafilatura utilizzando il data fusion low level.

| Classe | Sensibilità (%) | % di corretta classificazione | Accuratezza |
|--------|-----------------|-------------------------------|-------------|
| Bronzo | 55,5 % | 61,1 % | 61,1 % |
| Teflon | 66,7 % | | |

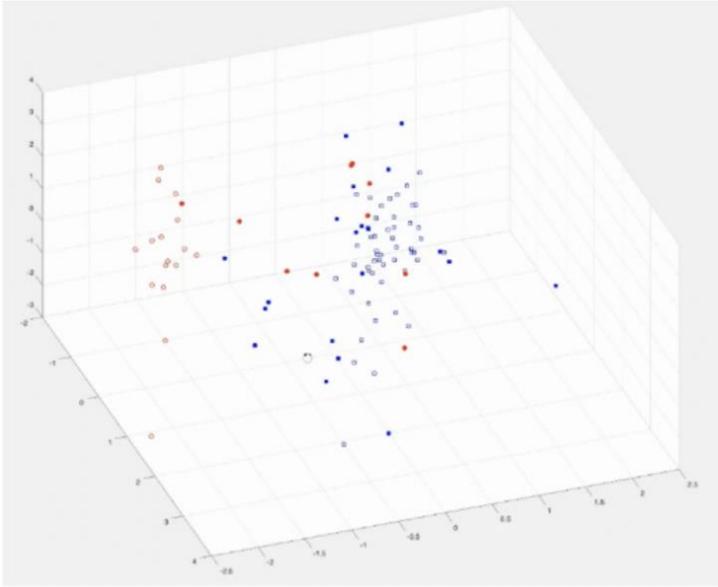


Figura 43: Rappresentazione tridimensionale della ripartizione dei campioni LT-Lt (in rosso) e HT-St (in blu) tra training set (punti vuoti) e test set (punti pieni).

PARTE II

CARATTERIZZAZIONE DI PRODOTTI ALIMENTARI INNOVATIVI: I FIORI EDIBILI



La ricerca di uno stile di vita più sano e il cambiamento delle abitudini alimentari, hanno portato all'introduzione sul mercato di prodotti alimentari alternativi. Sia la qualità degli alimenti che gli aspetti estetici contribuiscono a rispondere alle nuove esigenze dei consumatori. L'attrazione e il fascino dei singoli piatti possono essere esaltati dall'utilizzo dei fiori commestibili. I fiori edibili sono prodotti e consumati in diverse parti del mondo, grazie alla loro capacità di migliorare l'aspetto, il sapore e i valori nutrizionali dei piatti (Mlcek & Rop 2011; Husti et al., 2013); essi, infatti, possono conferire ai pasti gusto, aroma, estetica e colore allo stesso tempo. Secondo Lu et al. 2016, i fiori commestibili possono essere definiti come fiori non tossici e innocui che mostrano benefici per la salute umana al momento del consumo (Lu et al., 2016). L'utilizzo di fiori come alimento rappresenta un'antica tradizione diffusa a livello globale che ha recentemente guadagnato nuova popolarità soprattutto nella ristorazione moderna grazie all'interesse di agricoltori e chef professionisti nel ricercare ricette antiche realizzate con ingredienti non comuni e pregiati e allo stesso tempo sani e funzionali. Inoltre, i consumatori sono sempre più alla ricerca di nuovi sapori e consistenze e alla rivalorizzazione di stili di vita precedenti. La recente diffusione dei fiori edibili nella moderna ristorazione è dimostrata dall'aumento consistente di pubblicazioni come il numero di libri di articoli e di riviste culinarie, nonché di programmi televisivi riguardanti questi prodotti (Rop et al., 2012; Bacher & Jun, 2013; Brown, 2012; Barash, 1997; Carter, 2013; [S13]; Bourne, 2015). Sono, inoltre, presenti diversi siti web che forniscono informazioni utili e dettagliate riguardo la coltivazione, la conservazione e gli usi culinari dei fiori edibili. Allo scopo di incentivare il consumo e la produzione dei fiori come alimento sono stati proposti numerosi progetti come, per esempio "The Herbs of Brussels" in Belgio con il fine di promuovere la coltivazione sulla base del rispetto dell'ambiente [S14]; o la campagna "Sicurezza alimentare: fiori commestibili" della Thai Health Promotion Foundation per supportare una gamma di piatti e bevande contenenti fiori commestibili (Wongwattanasathien, et al., 2010); oppure il progetto francese di innovazione "l'Essai fleurs comestibles: Transfert et communication", di Astredhor Méditerranée CREAT che mira ad incentivare programmi di formazione e sessioni di degustazione di fiori commestibili (Beros, 2017); o ancora il piano "Stark's Berkeley Open Source Food" in California con lo scopo di mappare le strade di East Bay dove crescono i fiori commestibili e testare e valutare il loro valore nutrizionale e tossicologico (Bansal, 2017). Inoltre, alcuni mercati di prodotti biologici o gourmet hanno iniziato a vendere confezioni di fiori freschi commestibili, suscitando ancora una volta l'interesse dei consumatori verso questa nuova tendenza culinaria.

Il consumo di fiori come alimento è presente in varie culture su scala mondiale, sia come componente della cucina tradizionale, sia della medicina alternativa, che nel settore ornamentale. I fiori commestibili sono ritenuti prodotti creativi e innovativi da utilizzare freschi come guarnizione di piatti o come ingredienti in insalate, zuppe, antipasti, dessert, gelatine e bevande (Barash, 1997; Kelley et al., 2003). Tuttavia, possono anche essere consumati secchi (ad esempio come infusi), in cocktail (in cubetti di ghiaccio), in polvere (Chen & Wei, 2017), cristallizzati, o come schiume nella gastronomia molecolare. Alcune specie di fiori vengono anche farciti o utilizzati in piatti saltati in padella.

Nel corso degli anni diverse tipologie di fiori sono entrate nel mercato dell'orticoltura e sono state selezionate nuove varietà caratterizzate dall'aroma gradevole, sapori e colori unici (contribuendo quindi alle proprietà sensoriali dei pasti) nonché dai benefici per la salute umana. I fiori commestibili sono generalmente confezionati in mazzi, scatole, e possono essere venduti direttamente dai produttori agricoli o attraverso punti vendita specializzati. Le motivazioni per cui l'interesse dei fiori commestibili è in continuo aumento sono da ricercare in svariati contesti. Da un lato, la globalizzazione ha contribuito a migliorare la consapevolezza dei consumatori e alla riscoperta di stili alimentari tradizionali in cui i fiori commestibili hanno svolto un ruolo importante; dall'altro, le nuove tecnologie di trasformazione alimentare, i nuovi metodi di distribuzione e conservazione degli alimenti hanno permesso il ritorno ad antiche abitudini alimentari. La crescente domanda è associata agli sforzi dei produttori di ampliare la loro offerta e introdurre nuove tipologie di materie prime. In questo scenario, i fiori rappresentano un segmento importante per espandere il mercato alimentare, grazie alle loro caratteristiche organolettiche e nutrizionali, nonché alla presenza di composti bioattivi benefici per la salute umana. I fattori socio-culturali coinvolti nel consumo di fiori commestibili sono stati oggetto di diversi studi volti a divulgare ed espandere questo nuovo settore e ad incoraggiare l'utilizzo locale di fiori al fine di preservare le tradizioni in via di estinzione. D'altra parte, con la crescente richiesta di alimenti sani e naturali, le proprietà nutrizionali, i benefici farmacologici, la composizione chimica e la facilità nella preparazione dei fiori commestibili sono sempre più oggetto di studio. Tuttavia, alcune informazioni chiave, come il profilo tossicologico e sensoriale, sono necessarie per incoraggiare il consumo di fiori commestibili, così come la realizzazione di linee guida per una corretta gestione (coltivazione, manipolazione e preparazione) dei fiori per la commercializzazione. Le informazioni scientifiche e tecniche sulle caratteristiche nutrizionali, terapeutiche e chimiche dei fiori commestibili devono essere necessariamente riviste e discusse, con l'obiettivo di rafforzare le conoscenze e, di conseguenza, le abitudini di consumo e la ricerca sui loro benefici nella dieta umana.

I. L'impiego dei fiori come alimento: nuova tendenza in crescita

1.1. Origine, tipologie e composizione dei fiori edibili

La parte edibile dei fiori è costituita principalmente dai petali e dagli organi riproduttivi, come carpelli e stami (Mlcek & Rop 2011). I carboidrati sono i principali costituenti dei fiori commestibili, seguiti da altri componenti con attività biologiche come proteine, vitamine, minerali e composti antiossidanti (Pires et al., 2019; Lu et al., 2016; Fernandes et al., 2017; Grzeszczuk et al., 2018; Takahashi et al., 2020). Dunque, i fiori edibili sono ricchi di carboidrati e proteine ma poveri di lipidi. Diversi rapporti scientifici evidenziano le loro proprietà nutrizionali e salutari (Pires et al., 2019; Loizzo et al., 2016; Nowicka & Wojdylo, 2019). Infatti, anche se i fiori commestibili sono solitamente composti dal 70 al 95% di acqua (Pires et al., 2019), polline, nettare e petali possono rappresentare una vera fonte di metaboliti primari, vitamine e minerali come calcio, ferro, potassio, magnesio, fosforo e zinco (Pinakin et al., 2020). I fiori commestibili sono anche ricchi di sostanze antiossidanti utili a prevenire diverse malattie (Lu et al., 2016; Pires et al., 2019). Dal punto di vista nutrizionale, il fiore può essere suddiviso in tre componenti principali: polline, nettare e petali, ognuno dei

quali svolge un ruolo nell'alimentazione umana. Il polline, sebbene presente in quantità ridotte, rappresenta una fonte di proteine, amminoacidi e carboidrati, lipidi saturi e insaturi, carotenoidi e flavonoidi. Il suo gusto, tuttavia, solitamente non è saporito o distintivo. Il nettare è un liquido dolciastro che contiene una miscela di zuccheri (fruttosio, glucosio e saccarosio), amminoacidi (principalmente prolina), proteine, lipidi, acidi organici, sostanze fenoliche, alcaloidi e terpenoidi. I petali, infine, sono ricchi di vitamine (i fiori gialli in particolare rappresentano un'ottima fonte di vitamina A), minerali e antiossidanti.

Per secoli i fiori commestibili sono stati parte integrante dell'alimentazione umana ed erano già citati nella letteratura antica con la prima menzione nel 140 a.C. Venivano impiegati in tutto il mondo, dall'antica Grecia e Roma, alla Francia medievale, l'Europa, l'Inghilterra Vittoriana e il Medio Oriente; in Cina e in Giappone i fiori commestibili vengono consumati da migliaia di anni. In particolare, nell'antica Roma e Grecia e anche in Cina, i fiori erano adoperati come medicina alternativa o come componenti della cucina tradizionale, insieme al consumo di frutta, semi, foglie e radici. I vittoriani utilizzavano le viole per decorare le torte; italiani e spagnoli usavano fiori di zucca ripieni; i francesi adoperavano i petali di garofano nella preparazione del liquore verde "Chartreuse"; gli egiziani conservavano violette cristallizzate; e i palazzi imperiali cinesi servivano vino prodotto con crisantemi. Le rose sono state adoperate nell'antica Roma per dare sapore e dolcezza a bevande, insalate, omelette e dessert. Inoltre, i fiori erano usati come decorazioni in alimenti preparati per la nobiltà, specialmente per feste e banchetti. Alcuni fiori commestibili autoctoni si trovano naturalmente o sono esistiti per molti anni in aree specifiche; ad esempio, le viole del pensiero (*Viola × wittrockiana* Gams) e i fiordalisi (*Centaurea cyanus* L.) sono originari dell'Europa; il carciofo (*C. cardunculus*), il papavero (*Papaver rhoeas* L.), il garofano (*Dianthus caryophyllus* L.) e il loto (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) erano coltivati dai Greci. Al giorno d'oggi l'utilizzo dei fiori commestibili coinvolge diverse decine di infiorescenze che si differenziano per tipologia, forma, colore e aroma, e vengono impiegati a livello globale per migliorare l'aspetto, il colore e il valore nutritivo dei pasti.

Anche se non esistono ancora elenchi ufficiali emessi da alcuna organizzazione internazionale, Lim in un suo articolo ha elencato oltre 80 specie di fiori commestibili appartenenti a circa 32 famiglie (Lim, 2014). Due anni dopo, Lu e i suoi collaboratori riportarono ben 97 famiglie, 100 generi e 180 specie, specificando che il numero di fiori commestibili varia nei diversi paesi (Lu et al., 2016). Esempi di fiori commestibili sono rosa (*Rosa* spp.), calendula (*Calendula officinalis*), zafferano (*Crocus*), viola (*Viola odorata*), dente di leone (*Taraxacum officinale*), sambuco impanato (*Sambucus nigra*), crisantemo (*Chrysanthemum coronarium*), daylily (*Hemerocallis fulva*), lillà (*Syringa vulgaris*), menta (*Mentha* spp.), nasturzio (*Tropaeolum majus*), viola del pensiero (*Viola wittrockiana*) e tulipano (*Tulipa* spp.), che sono stati utilizzati frequentemente o stanno diventando sempre più popolari.



Figura 44: Alcuni esempi di fiori edibili.

1.2. Proprietà benefiche dei fiori edibili: i flavonoidi

I fiori commestibili sono apprezzati dai consumatori anche per le loro proprietà benefiche ed è dimostrato che possiedono effetti antitumorali, antinfiammatori, antidiabetici (Nguyen et al, 2019; Li et al., 2014), antiallergici e ipoglicemizzanti, in quanto contengono sostanze fitochimiche come acidi fenolici, flavonoidi e acidi organici. Altri benefici legati ai fiori includono il sollievo dalla colite ulcerosa (Meurer et al, 2019) e la protezione dei globuli rossi dal danno ossidativo (Yang et al, 2019a). Tra tutte le proprietà, l'attività antiossidante dei fiori commestibili può essere attribuita principalmente alla presenza di flavonoidi, acidi fenolici, antociani e alcaloidi. Gli acidi fenolici comprendono due sottogruppi: l'acido idrossibenzoico e l'acido idrossicinnamico. Gli acidi idrossibenzoici nei fiori sono rappresentati dagli acidi vanillinico, clorogenico, protocatechico e siringico e gli acidi idrossicinnamici dagli acidi ferulico, caffeico e p-cumarico. Tuttavia, gli acidi carnosico e rosmarinico sono specifici nel *Rosmarinus officinalis* (Baño et al., 2003), l'acido litospermico in *Ocimum basilicum* (Javanmardi et al., 2002)

I flavonoidi sono i polifenoli più comuni apportati con la dieta umana e rappresentano circa due terzi dell'assunzione totale. Come altre sostanze fitochimiche, sono prodotti del metabolismo secondario delle piante e sono molecole idrosolubili che si accumulano nei vacuoli cellulari. I flavonoidi (oltre 4.000 in natura) comprendono sostanze incolori come i flavonoli, e pigmenti colorati come le antocianine, i flobafeni polimerici

e le proantocianidine. La struttura di base è rappresentata da uno scheletro difenilpropano, cioè un anello piranico (anello eterociclico contenente ossigeno) costituito da due anelli benzenici (indicati con A e B in Figura 45) collegati a catena da tre atomi di carbonio, che formano l'anello eterociclico contenente ossigeno (indicato con C). Nella maggior parte dei casi, l'anello B è collegato all'anello C in posizione 2, ma può essere collegato anche nelle posizioni 3 o 4. Questa caratteristica strutturale dell'anello B, così come i modelli di glicosilazione e idrossilazione dei tre anelli, fa sì che i flavonoidi siano il gruppo più ampio e diversificato di sostanze fitochimiche. Sono classificati in diverse sottoclassi a seconda del numero di carboni dell'anello C a cui è attaccato l'anello B, del grado di insaturazione e dell'ossidazione dell'anello C. In base alle caratteristiche strutturali dell'anello C, sono classificati in più sottogruppi: isoflavoni con l'anello B attaccato alla terza posizione dell'anello C, neoflavonoidi con l'anello B attaccato alla quarta posizione, flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, catechine e antociani con l'anello B attaccato alla seconda posizione. Infine, i flavonoidi con un anello C aperto sono chiamati calconi. Tra i flavonoidi presenti nei fiori edibili, i più importanti sono gli antociani, responsabili del colore rosso e blu dei fiori. Le antocianine più comuni nei fiori commestibili sono le cianidine, le delphinidine, le pelargonidine, le malvinidine, le peonidine e le petunidine. Il gruppo dei flavonoidi comprende anche flavonoli come quercetina, kaempferolo, miricetina e rutina, flavoni come apigenina e luteolina e flavan-3-oli come catechina ed epicatechina. Secondo alcuni studi epidemiologici, esiste una relazione inversa tra il rischio di incorrere in malattie croniche (malattie cardiovascolari, diabete, asma, osteoporosi, tumori) e l'assunzione di flavonoidi (Firenzuoli et al., 2004). La proprietà più importante dei flavonoidi è sicuramente l'attività antiossidante: tra questi, le catechine e i flavoni rappresentano le classi più potenti per la protezione dell'organismo dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le cellule e i tessuti degli organismi viventi sono costantemente a rischio dai danni causati dai radicali liberi e dalle specie reattive dell'ossigeno prodotte durante il normale metabolismo dell'ossigeno o da fattori esterni. I gruppi idrossilici funzionali dei flavonoidi hanno effetti antiossidanti distruggendo i radicali liberi e chelando gli ioni metallici. La quercetina, il kaempferolo, la morina, la miricetina e la rutina, che agiscono come antiossidanti, hanno mostrato effetti antinfiammatori, antiallergenici, antivirali e antitumorali. Si ritiene inoltre che svolgano un ruolo preventivo nella cataratta, nelle malattie del fegato, e nelle malattie cardiache. L'attività di scavenging dei flavonoidi può essere riportata nel seguente ordine: miricetina > quercetina > ramnetina > morina > diosmetina > naringenina > apigenina > catechina > 5,7-diidrossi-3',4',5'-trimetossiflavone > robinson > campferolo > flavone (Tapas et al., 2008).

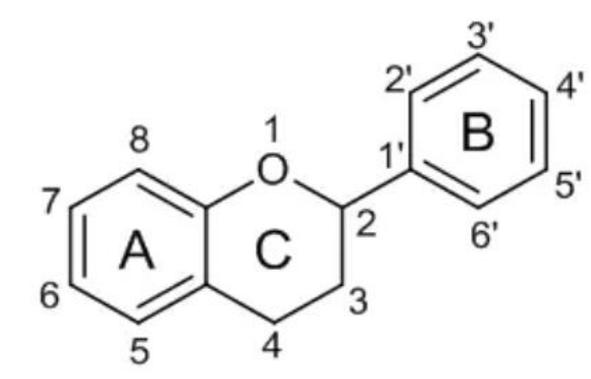


Figura 45: Scheletro base della struttura dei flavonoidi.

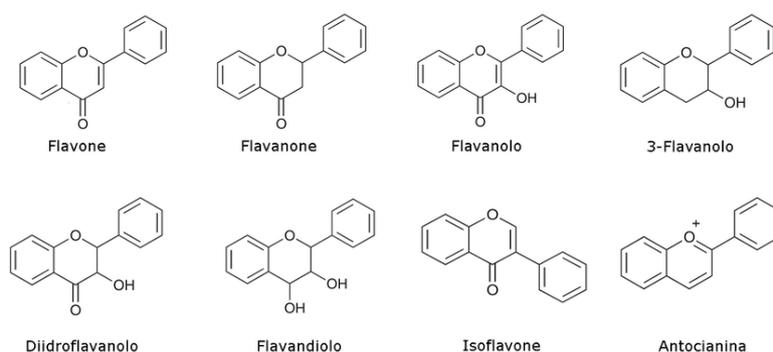


Figura 46: Struttura chimica delle principali classi di flavonoidi.

1.3. La componente aromatica e l'impatto sui consumatori

Come già riportato, i fiori commestibili sono consumati in tutto il mondo grazie alla loro capacità di migliorare l'aspetto estetico, il colore, l'aroma, il gusto e il valore nutrizionale degli alimenti. Il loro impiego negli alimenti è fortemente influenzato dalle percezioni dei consumatori ed è spesso legato alle tradizioni culturali. Negli ultimi anni si è registrato un significativo aumento dell'interesse per la ricerca delle proprietà nutrizionali e nutraceutiche dei fiori commestibili. Preoccupati degli effetti negativi sulla salute delle sostanze sintetiche, i consumatori prediligono sempre più i prodotti contenenti ingredienti naturali. Le caratteristiche sensoriali percepite dai nostri sensi (aspetto attraente, dimensioni, forma, gusto, odore, colore, ecc.) indicano i criteri di qualità dei fiori commestibili. Le ragioni del consumo di questi prodotti includono la curiosità percettiva (definita da una particolare motivazione sensoriale a provare qualcosa di nuovo), il profumo dei fiori e il desiderio di uno stile di vita sano, e possono essere viste come una strategia di marketing da parte dell'industria alimentare per catturare questo segmento di mercato, sostenendo al contempo la produzione locale di supporto biologico su piccola scala. Il colore è l'elemento più attraente per i consumatori; tuttavia, durante il consumo dei fiori, i consumatori prestano attenzione anche ad altri elementi sensoriali come il gusto, l'aroma e la

consistenza. Pertanto, i fiori commestibili sono un ingrediente valido e potenziale che può essere introdotto in una dieta equilibrata grazie alla piacevole esperienza sensoriale combinata con i benefici per la salute.

La valutazione della componente aromatica dei fiori edibili è estremamente importante perché influenza fortemente l'atteggiamento dei consumatori verso l'assunzione di questi prodotti. I fiori commestibili sono caratterizzati da una complessità di aromi che non possono essere rappresentati da un solo componente. L'aroma dei fiori deriva principalmente dall'interazione di molti componenti volatili, solitamente costituiti da terpeni, esteri, alcoli, composti carbonilici e alcani (Deng et al., 2004; Movafeghi et al., 2010; Mazza & Cottrell, 1999). Tuttavia, altre sostanze non volatili come i composti fenolici, gli zuccheri e gli acidi organici possono influenzare la volatilità dei composti aromatici e le loro proprietà sensoriali (Oliveira et al., 2014). Alcuni componenti volatili sono benefici per la salute umana. Ad esempio, si ritiene che il cariofillene contenuto nei chiodi di garofano abbia principalmente proprietà antinfiammatorie (Lyra et al., 2008). Il terpenoide ciclico β -ionone è uno dei componenti aromatici della viola (Cooper, et al. 2003). Questa sostanza inibisce la crescita delle cellule maligne (Gomes-Carneiro et al., 2006; Mo & Elson, 2004) e l'apoptosi nelle cellule di adenocarcinoma gastrico umano (Liu et al., 2004). Ogni fiore possiede un colore e un aroma che lo distingue dagli altri: *Antirrhinum majus* (giallo, amaro), *Centaurea cyanus* (blu, sapore di erbe), *Chrysanthemum frutescens* (giallo-arancio, leggermente amaro), *Dianthus caryophyllus* (rosa scuro, leggermente amaro), *Fuchsia x hybrida* (rosa, dolce), *Rosa odorata* (rossa, dolce e aromatica) e *Tropaeolum majus* (petali giallo-viola, sapore dolce). Esistono anche fiori di un solo colore, come *Begonia boliviensis* (arancio-rossastro con un leggero aroma di limone), *Chrysanthemum parthenium* (giallo-biancastro con un aroma leggermente amaro o molto amaro) e *Tagetes patula* (arancione, sapore simile al chiodo di garofano) (Rop et al., 2012).

Sono stati condotti numerosi studi relativamente alle preferenze dei consumatori. I consumatori apprezzano il gusto, la consistenza e l'aspetto dei fiori commestibili, e preferiscono i fiori gialli, arancioni e blu (Kelly et al., 2001 a,b). In un sondaggio condotto da Benvenuti et al., (2016), i consumatori hanno valutato le caratteristiche dei fiori commestibili come l'amarrezza, l'aroma, la delicatezza, e la dolcezza. I risultati hanno mostrato che diversi fiori, tra cui *A. houstonianum*, *B. semperflorens*, *V. vittrockiana* e *T. majus*, sono stati preferiti per le loro buone qualità (Benvenuti et al., 2016) e che diversi attributi dei fiori commestibili possono influenzare gli acquirenti al momento dell'acquisto. Le caratteristiche sensoriali, l'aspetto, i parametri di confezionamento e il prezzo sono i fattori maggiormente influenzanti al momento dell'acquisto di questi prodotti. I fiori sono comunemente associati a diete gourmet, ma anche gli attributi personali degli acquirenti, come l'istruzione, il sesso e la classe socioeconomica, possono influenzarne l'accettazione (Rodrigues et al., 2017).

1.4. Dati di mercato e legislazione

Non esistono elenchi ufficiali di fiori commestibili e non commestibili pubblicati dall'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO), dall'Organizzazione mondiale della sanità (OMS), dalla Food and Drug Administration (FDA), dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) o dal

Codex Alimentarius. In particolare, le normative alimentari europee non includono i fiori come prodotto per il consumo umano. Pertanto, le nuove tipologie di fiori che vengono utilizzate come alimenti e/o ingredienti alimentari sono soggette al Regolamento (CE) n. 258/97 (Regulation (EC) No. 258/97) sui nuovi alimenti e nuovi ingredienti. I regolamenti europei (Regolamento (UE) n. 405/2017 (Regulation (EC) No 405/2017) e 600/2010 (Regulation (EU) N° 600/2010)) stabiliscono limiti massimi per i residui di pesticidi nei fiori commestibili senza specificare le specie. Per i paesi al di fuori dell'Europa, potrebbero esserci leggi specifiche su questi prodotti, ma finora sono disponibili pochissime informazioni. Il mercato dei fiori commestibili, utilizzati principalmente ancora per scopi decorativi, si sta gradualmente espandendo in tutti i continenti. Europa, Medio Oriente e Africa sono stati i mercati più grandi nel 2017 (Technavio, 2018). Le ragioni di questa espansione e dell'aumento della domanda di fiori edibili sono legate alla crescente richiesta di prodotti alimentari attraenti e saporiti e in particolare alle proprietà nutritive e nutraceutiche di questi fiori. Anche l'aumento della domanda di alimenti che potenziano il sistema immunitario durante la pandemia da COVID-19 può aver svolto un ruolo in questo contesto. La produzione dei fiori commestibili è stagionale a seconda delle diverse varietà e tipologie. Alcuni fiori possono essere raccolti in diversi mesi, mentre altri hanno un periodo di produzione più breve. A livello mondiale, l'Asia è stata il maggior produttore di cavolfiori e broccoli (non necessariamente considerati fiori commestibili) (76,6%), mentre l'Europa ha rappresentato solo l'11,9% tra il 2000 e il 2014. Per altre specie di fiori, solo pochi produttori hanno rapporti annuali con dati sulla produzione o sulle vendite (Figura 47). Poco si sa sull'esportazione di fiori commestibili. Alcuni siti web affermano che l'Etiopia esporta il 7% di fiori commestibili, l'Ecuador esporta solo circa l'1% di rose commestibili, e in Asia i principali produttori sono Cina e India, che rappresentano quasi l'80% della produzione totale (FAO, 2019). Inoltre, solo alcuni coltivatori di fiori commestibili segnalano i paesi di vendita di tali prodotti. Aquila Flowers in Kenya, ad esempio, riporta come mercato principale l'Europa e come mercati minori il Sudafrica e l'Australia; BloomBites rifornisce principalmente la Scandinavia e Nevado Roses esporta il 70% e il 30% di rose commestibili rispettivamente negli Stati Uniti e in Europa; Ortofrutticola Magliozzi esporta i suoi prodotti in Francia e Inghilterra (Fernandes et al., 2020).

| Continents | City/Countries | Company | Production/sales |
|---------------|-----------------------|----------------------------------|--|
| Asia | China | Chinese statistics | Production of edible flowers for food and medicine represented 8% in 2013 |
| North America | Missouri/USA | Ozark Exotica | Produced 3,600 edible flowers per week |
| | San Diego/Mexico | Sweetfields' | Produced 30 different varieties of fresh flowers and is able to crystallize 1,200 flowers in an hour |
| South America | Cerqueiro/Brazil | DRO Ervas e Flores | Produced 35 kilos per day in 2010 |
| | São Paulo/Brazil | Grupo Pão de Açúcar | Sold 300 trays from 7 to 18 grams each month |
| | Belo Horizonte/Brazil | Farmer Vista Bonita | Sold 12 thousand brands per year, with an average of 20 units each |
| | Morungabaand/Brazil | Santo Onofre Farmer | Produced 3000 units of flowers per week |
| European | Malaga/Spain | Sabor & Salud | Produced 70 species of edible flowers, about 20,000 flowers a week (80,000 monthly) |
| | Balaguer/Spain | Pàmies Horticoles | Produced 4,000 kilograms in 2002 |
| | Nice/France | AUDA | Edible flowers selling is increasing, but it represents only 5% of their activity |
| Australia | Daylesford/Australia | Heston Blumenthal's The Fat Duck | Sold 1500 punnets of flowers to Melbourne wholesale markets every week |

Figura 47: Rapporti annuali di alcuni produttori sulla produzione o la vendita di fiori edibili (Fernandes et al., 2020).

II. Scopo del lavoro e stato dell'arte

I fiori commestibili sono particolarmente attraenti per il loro caratteristico aroma, che può essere studiato attraverso lo sviluppo di metodi analitici innovativi e selettivi come l'HS-SPME/GC-MS. Uno degli aspetti principali che interessa i produttori, consumatori e ristoratori, infatti, è proprio lo studio della componente volatile. La gascromatografia combinata con la spettrometria di massa è la tecnica più comunemente utilizzata per l'analisi dei composti aromatici che caratterizzano il flavour dei prodotti alimentari. A seconda del problema analitico e della matrice in questione, prima dell'analisi sono necessari appropriate tecniche di estrazione e preparazione del campione. I metodi tradizionali come l'idrodistillazione e lo spazio di testa si sono rivelati le principali tecniche utilizzate per studiare le specie vegetali in linea con le linee guida volte a ridurre l'uso di solventi organici (Belliardo et al., 2006; Mejri et al., 2010). Tradizionalmente, i componenti volatili vengono analizzati attraverso gli oli essenziali floreali (Ye, 2013). Tuttavia, in alcuni studi recenti, i composti volatili sono stati analizzati direttamente nei fiori freschi utilizzando il metodo della microestrazione in fase solida (SPME) (Ye, 2013; Deng et al., 2004; Fernando & Grun, 2001; Movafeghi et al., 2010; Rout et al., 2012; Fernandes et al., 2019b; Marchioni et al., 2021; Negro et al., 2021). Ciò consente di percepire più chiaramente i veri volatili del fiore, evitando l'interferenza dei composti di nuova formazione provenienti dalle particolari condizioni di estrazione o dall'azione enzimatica. L'estrazione di sostanze chimiche volatili all'interno dello spazio di testa o in un volume confinato di aria che circonda il fiore, insieme all'impiego della microestrazione in fase solida (SPME), ha dimostrato di essere l'approccio più utilizzato per le specie vegetali (Boiteux et al., 2018), rappresentando una metodologia allo stesso tempo semplice, rapida ed efficiente (Longo et al., 2019). In effetti, questo approccio, che si basa sull'assorbimento-adsorbimento degli analiti su una fibra rivestita, ha guadagnato favore in una varietà di applicazioni della chimica analitica e merceologica, tra cui l'analisi degli alimenti e del flavour. Sono stati condotti numerosi studi con la tecnica HS-SPME/GC-MS per investigare il flavour dei fiori edibili. Hussain et al., (2019) hanno usato la GC-MS per studiare l'aroma dei boccioli di rosa francesi, fiori di gelsomino e fiori di osmanto e hanno dimostrato che i fiori di gelsomino contenevano più sostanze volatili rispetto agli altri due. Marchioni, et al., (2021) hanno studiato l'effetto di diversi trattamenti sulle proprietà nutraceutiche e sul flavour dei fiori commestibili. I fiori sono stati analizzati sia freschi che liofilizzati utilizzando l'HS-SPME/GC-MS: tutti i campioni sono risultati dominati da composti monoterpenici ossigenati. Insieme al p-mentone, il pulegone rappresentava uno dei componenti dominanti in tutti i campioni in esame. Najar et al., (2019) hanno esaminato i composti volatili rilasciati dai fiori commestibili di due specie di Agastache (*A. aurantiaca* (A.Gray) Lint & Epling e *A. mexicana* (Kunth) Lint & Epling) e due ibridi (Agastache "Arcado Pink" e Agastache "Blue Boa") estraendo i composti volatili sia nei loro oli essenziali, sia applicando la tecnica di microestrazione in fase solida. Con l'eccezione della specie *A.* "Arcado Pink", i monoterpeni ossigenati costituivano la classe principale (> l'85%) dei composti organici volatili (COV) in ciascun campione di *A. aurantiaca*, *A.* "Blue Boa" e *A. mexicana*. Il pulegone anche in questo caso era la sostanza più abbondante in *A. aurantiaca* (76,7%) e *A.* "Blue Boa" (82,4%), mentre l'acetato di

geranile (37,5%) era il più abbondante in *A. messicano*, seguito da geraniolo (16%) e geraniale (17%). Fernandes et al. (2019b) hanno investigato i principali composti volatili, le sostanze bioattive e le proprietà sensoriali di cinque fiori commestibili: borragine (*Borage officinalis*), calendula (*Calendula arvensis*), cosmo (*Cosmos bipinnatus*), Johnny Jump up (*Viola tricolor*) e viole del pensiero (*Viola wittrockiana*). I composti volatili identificati tramite SPME/GC-MS sono stati in totale 117. In particolare, gli esteri erano i composti più abbondanti nella borragine, i sesquiterpeni nella calendula e i terpeni nel cosmo, Johnny Jump up e viole del pensiero. I risultati hanno anche rivelato la presenza di alcuni specifici volatili e sostanze bioattive che influenzano particolarmente la percezione sensoriale dei fiori. Negro et al., (2021) hanno esaminato i composti organici, i composti fenolici e l'attività antiossidante dei gerani (*Pelargonium sp.*) durante tre fasi di crescita. Le analisi dei volatili sono state effettuate utilizzando SPME/GC-MS ed i risultati hanno dimostrato che la produzione dei composti volatili diminuisce durante la crescita dei fiori.

Come già visto in alcuni lavori, anche le sostanze antiossidanti presenti nei fiori suscitano l'interesse di molte ricerche scientifiche. In particolare, nel presente lavoro di tesi, tra tutti i composti bioattivi sono stati studiati i flavonoidi che rappresentano i composti fitochimici più abbondanti nei fiori (in particolare i flavonoidi quercetina, kaempferolo, miricetina, isoramnetina), che trasformano questi prodotti in alimenti naturalmente funzionali. L'estrazione liquida di questi composti è stata effettuata principalmente con solventi organici quali etanolo e metanolo. Dopo l'estrazione, i campioni vengono generalmente analizzati tramite cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (colonne C18 o C30 non polari) in combinazione con la spettrometria di massa o la spettrofotometria UV/visibile come rivelatori (Loizzo et al., 2016; Zhao et al., 2021; Negro et al., 2021; Deng et al., 2007). Oltre alla tradizionale estrazione liquida, l'estrazione accelerata con solvente (ASE) è una procedura ampiamente utilizzata per l'analisi delle matrici vegetali e delle piante grazie alla sua elevata velocità di estrazione, al basso consumo di solvente e all'elevata efficienza di estrazione. In un lavoro di ricerca è stato ottimizzato un metodo di estrazione ASE/HPLC per quantificare sei flavonoidi presenti nei fiori edibili "Bawanghua" (Yi et al., 2012); in un altro sono stati paragonati quattro procedimenti estrattivi ASE per lo studio dei fenoli e dell'attività antiossidante nei fiori di cactus del Marocco, risultando l'acetone (80% in acqua) alla temperatura di 80°C il miglior solvente per l'estrazione dei polifenoli, cianidrine e flavonoidi (Benayada et al., 2014).

Lo scopo di questa seconda parte sperimentale del presente lavoro di tesi è stato quello di caratterizzare il profilo aromatico e il contenuto di flavonoidi di diverse tipologie di fiori commestibili, al fine di poter ampliare l'insieme degli strumenti oggettivi a disposizione dei consumatori e degli chef per effettuare scelte consapevoli. La prima fase del progetto ha riguardato lo sviluppo di un metodo HS-SPME/GC-MS per valutare la componente volatile e di un metodo ASE/HPLC-UV per determinare il profilo dei flavonoidi. Nel secondo step i dati di ciascuna analisi sono stati sottoposti ad elaborazione chemiometrica: è stata effettuata una classificazione PLS/DA al fine di discriminare le diverse tipologie di fiore in esame.

III. Parte sperimentale

3.1 Materiali e Metodi

3.1.1 Selezione dei campioni

I campioni in esame erano fiori commestibili biologici reperiti dall'Azienda Agricola Carmazzi (situata in Toscana presso Torre del Lago Puccini) in una varietà di colori e proprietà organolettiche. Le tipologie di campioni, in totale 4, differivano tra loro per le proprietà visive e sensoriali:

- 1) Anthirrinum (Bocca di Leone o Bocca di Lupo): colori misti pastello; sapore inizialmente amaro che cambia durante la masticazione ricordando la frutta estiva.
- 2) Dianthus (Garofano Cinese): colore che varia dal rosso al rosa e al bianco; sapore speziato e zuccherino.
- 3) Begonia: colore rosa e rosso; sapore acidulo e frizzante che ricorda quello degli agrumi. A causa della sua bassa conservabilità non è stato possibile utilizzarla per l'analisi dei flavonoidi.
- 4) Violetta: colori misti di larga varietà; sapore dolce e delicato, grazie al quale sono largamente utilizzati in pasticceria.

Per quanto riguarda lo studio della componente aromatica il set di campioni era costituito da 85 campioni, 20 per ogni tipologia di fiore tranne la violetta, per la quale ne sono stati analizzati 25. Per l'analisi dei flavonoidi i campioni analizzati erano 45 in totale (la begonia come già menzionato non è stata presa in considerazione per la sua bassa conservabilità) e dunque 15 per ciascuna tipologia di fiore. I campioni sono stati ricevuti due giorni dopo il raccolto, spediti in vaschette e conservati in frigorifero fino all'analisi (shelf life massima di 10 giorni come riportato in etichetta).



Figura 48: Rappresentazione dei campioni analizzati: a) Dianthus; b) Violenze; c) Anthirrinum; d) Begonie.

3.1.2. Preparazione dei campioni e materiali utilizzati

Gli strumenti utilizzati per lo studio dei fiori edibili possono considerarsi gli stessi di quelli utilizzati per lo studio della pasta nella sezione 3.1.2, Parte I, Capitolo 3.

I solventi utilizzati per l'analisi dei flavonoidi sono riportati di seguito:

- Acetonitrile per HPLC, purezza $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich)
- Acido formico, purezza $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich)
- Acqua HPLC Plus, purezza $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich)
- Etanolo anidro per HPLC, purezza $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich)
- Isopropanolo per HPLC, purezza $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich)
- Metanolo per HPLC, purezza $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich)

La preparazione dei campioni differisce a seconda che si voglia studiare la componente antiossidante o volatile.

Per l'analisi dei profili aromatici, la preparazione dei campioni è stata rapida, in quanto i fiori sono stati analizzati freschi, tal quali senza alcun tipo di pretrattamento. Fondamentale è stato analizzare i fiori immediatamente, minimizzando il più possibile il loro periodo di conservazione in frigorifero (massimo 3 giorni dopo il loro arrivo).

Per l'analisi del profilo dei flavonoidi, la preparazione dei campioni ha necessitato di un trattamento più laborioso. Prima di sottoporre i campioni all'estrazione, ciascuna tipologia di fiore è stata separatamente essiccata in stufa a 40 °C per circa 8 ore. Successivamente i campioni essiccati sono stati macinati tramite un mulino IKA A10 basic per ottenere una polvere fine. 0,5 g di campione macinato è stato poi posizionato su carta da filtro in maniera da intrappolare il campione ed evitare danni allo strumento. Il campione nella carta da filtro è stato successivamente posto nella cella di estrazione ASE da 22 mL, riempita con palline di vetro inerti al fine di limitare sprechi del solvente di estrazione.

3.1.3. Ottimizzazione dell'analisi ASE/HPLC-UV-Vis per lo studio dei flavonoidi nei fiori edibili

Dopo aver posto 0,5g di campione all'interno della cella, l'estrazione accelerata con solvente per l'analisi dei flavonoidi nei fiori edibili (Dionex ASE 150, Dionex Ultimate 3000 HPLC, Thermo Fisher Scientific) è stata effettuata settando i seguenti parametri: un singolo ciclo statico di 15 minuti, una temperatura di 120 °C ed etanolo come solvente di estrazione. La pressione è stata mantenuta costante a 1000 psi con un volume di

lavaggio al 40%. Dopo il raggiungimento della temperatura a 120 °C, la cella è caricata all'interno dell'ASE dove è riempita con il solvente di estrazione fino alla pressione di 1000 psi. Successivamente è stato applicato un tempo di pre-riscaldamento di tre minuti, e attraverso la chiusura di tutte le valvole del sistema, è avvenuta l'estrazione in un tempo statico impostato a 15 minuti. La cella è stata poi risciacquata con il 40% del volume impiegando il solvente di estrazione successivamente spurgato con azoto. Una volta terminato il ciclo di estrazione, il sistema viene depressurizzato.

Gli estratti ottenuti sono stati in seguito filtrati su filtro in cellulosa tramite pompa da vuoto per eliminare eventuali residui solidi ed evaporati con sistema di evaporazione rotante (BUCHI Rotavapor RII Thermo Fisher Scientific) settato alla temperatura di 40°C. L'estratto portato a secco è stato, infine, ripreso con 6 mL di metanolo e immediatamente analizzato.

Per la separazione cromatografica dei composti d'interesse è stato utilizzato un cromatografo liquido ad alta prestazione (Thermo Scientific DionexUltiMate 3000 Series, SR-3000 Solvent Rack) accoppiato a un rivelatore UV-Vis a lunghezza d'onda fissa. La colonna adoperata è stata una Kinetex® C18 LC (5 µm 250 x 4,6 mm ID) posta in una camera termostata a 40 °C; la fase mobile costituita da acqua con lo 0,1% di acido formico (solvente A) e acetonitrile (solvente B). I solventi sono stati sottoposti a degassaggio per eliminare eventuali bolle d'aria che interferiscono con l'analisi cromatografica. Prima di ogni serie di analisi HPLC, lo strumento è stato condizionato per almeno 30 minuti con la miscela di fase mobile iniziale e successivamente è stato iniettato un bianco di etanolo per controllare l'eventuale presenza di picchi interferenti. I pistoni venivano lavati meccanicamente dal sistema attraverso una pompa peristaltica utilizzando una soluzione di acqua / isopropanolo (80:20)_{v/v}.

Le due fasi sono state miscelate da una pompa a bassa pressione al fine di creare il gradiente per la separazione cromatografica. Il gradiente di eluizione è stato programmato come segue: 85% di fase A e 15% di fase B per 5 minuti; 75% A e 25% B per 13 minuti; 60% A e 40% B per i successivi 19 minuti; da 20 a 30 minuti, il sistema veniva riportato alle condizioni iniziali. La durata della corsa cromatografica era di 30 minuti con un volume di iniezione di 25 µl e un flusso di 0,5 mL/min. Dopo le iniezioni la colonna veniva lavata con acetonitrile / acqua (75:25)_{v/v} per 30 minuti al fine di allontanare eventuali sostanze rimaste adese alla fase stazionaria.

La lunghezza d'onda dell'UV è stata impostata a 280 nm e i dati sono stati successivamente raccolti ed elaborati tramite il software Chromeleon 7.

3.1.4. Ottimizzazione dell'analisi HS-SPME/GC-MS per l'analisi del flavour dei fiori edibili

Come già anticipato, le analisi per la caratterizzazione della componente aromatica sono state di gran lunga più veloci rispetto all'analisi dei flavonoidi, soprattutto per quanto riguarda le fasi di preparazione ed estrazione dei campioni. 1,5 g di campione di fiori freschi sono stati posti nella fiala di vetro da 20 ml per autocampionatore (Chromacol) chiusa ermeticamente con tappo a corona in alluminio dotato di setto in

PTFE/silicone. L'estrazione HS-SPME degli analiti è stata effettuata tramite un autocampionatore (Triplus Autosampler, Thermo Scientific) con una fibra trifasica 50/30 Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) Stable Flex (2 cm) di Merck (kGaA, Darmstadt, Germania). La fiala contenente il campione è stata posizionata in uno slot dell'autocampionatore e automaticamente spostata all'interno del forno preriscaldato a 40 °C per 5 minuti. Dopo lo step di incubazione, la fibra è stata esposta nello spazio di testa per 10 minuti alla stessa temperatura. Alla fase di estrazione è seguito il desorbimento degli analiti dove la siringa viene automaticamente spostata nel setto in silicone dell'iniettore del GC (Trace 1300 Gas Chromatograph, Thermo Scientific) ad una profondità di 35 mm e un tempo di desorbimento pari a 5 minuti. Per l'iniezione in GC è stata scelta la modalità splitless di 5 minuti con split flow pari a 50 ml/min a una temperatura di 220 °C. Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna capillare VF-WAXms (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 mm) di Agilent Technologies (Santa Clara, USA) utilizzando l'elio come gas di trasporto (portata di 1 mL/min). Un gradiente di temperatura è stato programmato come segue: a 60 °C per 1 min, successivamente a 3 °C/min fino a 230 °C per 5 min. Il rivelatore utilizzato era uno spettrometro di massa (ISQ 7000 Single Quadrupole, Thermo Fisher Scientific) e il rilevamento è stato effettuato utilizzando un singolo quadrupolo in modalità di acquisizione a scansione completa (full scan) in un intervallo di 45-450 amu. Sia la sorgente ionica che la transfer line sono state mantenute a 250 °C. Durante le analisi le vials contenenti i campioni sono state intervallate da vials vuote utilizzate come bianchi di processo per monitorare eventuali contaminazioni nel sistema. I dati ottenuti sono stati raccolti tramite il software Chromeleon 7 e analizzati comparando i risultati degli spettri dei campioni alla banca dati NIST.

3.2. Risultati e discussione

3.2.1 Analisi qualitativa preliminare

La fase iniziale di questo studio si è incentrata sullo sviluppo di un metodo HS-SPME/GC-MS per l'indagine del flavour e di un metodo ASE/HPLC-UV per la determinazione del contenuto di flavonoidi al fine di caratterizzare diverse tipologie di fiori presenti sul mercato. Ciascun campione in esame si distingue dagli altri sulla base dei propri aromi e colori: l'Antirrhinum, con la sua miscela di colori pastello, dà un sapore amaro; il Dianthus, con la sua miscela di fiori rossi, rosa e bianchi, dà una sensazione dolce e speziata; la violetta dà un aroma delicato e dolce; e le begonie hanno un sapore frizzante e acidulo e colori rossi e rosa. Dall'analisi qualitativa preliminare, ottenuta confrontando i profili cromatografici dei componenti volatili e bioattivi dei campioni analizzati, sono stati ottenuti buoni risultati. La Figura 49 mostra il confronto dei profili aromatici dei campioni di Antirrhinum e Dianthus. Alcuni composti caratteristici come il cariofillene, il glicole etilenico, l'eugenolo, l'isoledene, il linalolo e il longipinene sono stati rilevati nei fiori Dianthus, ma non sono stati trovati negli altri gruppi (ad eccezione del cariofillene, che è anche un componente della violetta). Le sostanze acetanisole, bergamotene, eremofilene, isocitronelle sono stati trovati solo in Antirrhinum. I campioni di viole erano invece caratterizzati da allocimene, farnesene, humulene, limonene, mentatriene, mircene e ocimene. I

composti sono stati identificati per confronto con gli spettri di massa disponibili nella libreria. In questa fase dello studio, l'analisi qualitativa è stata condotta senza l'utilizzo di standard e presentata come "presunta identificazione dei composti" (Sumner et al., 2007). La Figura 50 mostra, invece, il confronto dei profili cromatografici dei flavonoidi dei fiori Antirrhinum e Dianthus, evidenziando anche in questo caso differenze significative tra le due tipologie di campione.

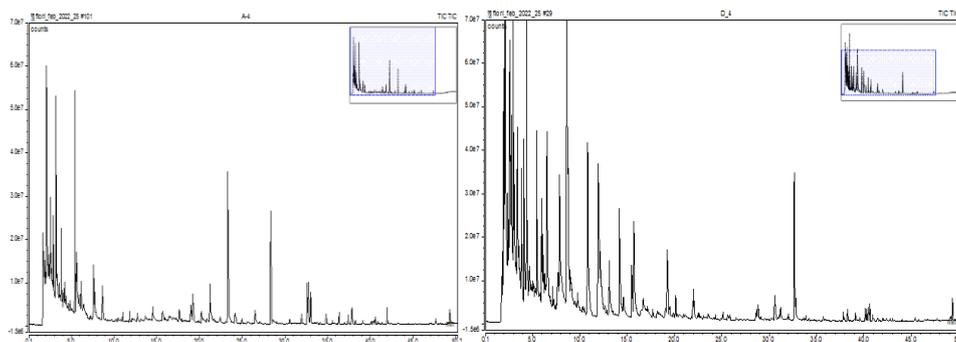


Figura 49: Profili aromatici HS-SPME/GC-MS dei fiori Antirrhinum (a sinistra) e Dianthus (a destra). I cromatogrammi sono riportati nella stessa scala degli assi x e y.



Figura 50: Profili dei flavonoidi ottenuti dalle analisi HPLC-UV dei fiori Antirrhinum (a sinistra) e Dianthus (a destra). I cromatogrammi sono riportati nella stessa scala degli assi x e y.

3.2.2. Classificazione PLS/DA per l'analisi della componente aromatica

Per effettuare la discriminazione in base al profilo aromatico dei diversi campioni di fiori edibili in esame è stato costruito un modello di classificazione PLS-DA. Prima della costruzione del modello chemiometrico, i dati sono stati sottoposti a pretrattamento opportuno in modo da ottenere modelli multivariati più precisi e ottimali.

Gli 85 cromatogrammi ottenuti sono stati importati nel software Matlab in forma grezza e per intero, ovvero per l'intera corsa cromatografica da 0 a 30 minuti. Per il pretrattamento dei dati è stato applicato il metodo di allineamento iCoshift che ha permesso di rilevare gli shift dei cromatogrammi rispetto a un cromatogramma preso come riferimento rappresentato dalla media di tutti i cromatogrammi. Grazie ad iCoshift, il

cromatogramma target viene shiftato in maniera da trovare la massima correlazione per aggiustare le differenze nello spostamento dei tempi di ritenzione che possono causare invarianza nei dati e una qualità minore dei modelli costruiti. iCoshift rappresenta una tecnica di allineamento particolarmente efficiente rispetto ad altri metodi (come p.e. i metodi di Correlation Optimized Warping, COW), poiché può essere effettuata anche solo per un intervallo del segnale misurato anziché per l'intero profilo cromatografico. Dalla Figura 51 si osserva come attraverso l'allineamento eseguito tramite l'algoritmo iCoshift su tutto il cromatogramma sono stati eliminati gli shift nei tempi di ritenzione.

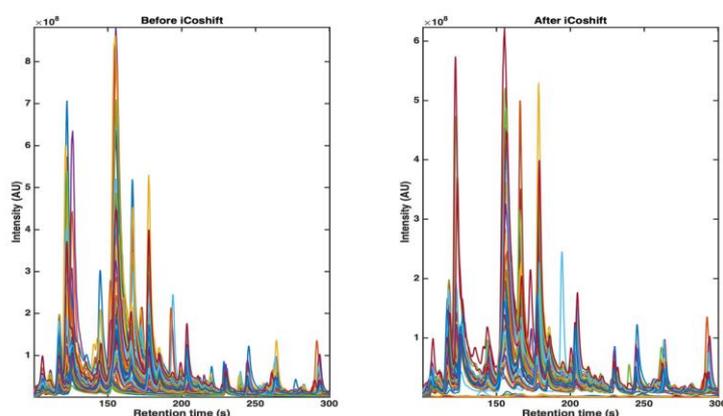


Figura 51: Cromatogrammi GC-MS sovrapposti prima dell'allineamento con iCoshift (a sinistra) e dopo (a destra).

Le classi scelte in totale erano 4 come il numero delle tipologie dei campioni e sono state nominate con le lettere A (Anthrinum), B (Begonia), D (Dianthus) e V (Viole). Per le classi A, B e D sono stati analizzati 20 campioni per ciascuna categoria; per la classe delle viole (V) ne sono stati analizzati 25.

Innanzitutto, è stata effettuata un'analisi esplorativa dei dati tramite PCA al fine di poter osservare eventuali differenze tra i campioni.

Per costruire e validare i modelli chemiometrici di classificazione, il set di campioni è stato suddiviso in training set e test set; la selezione è avvenuta tramite l'algoritmo Duplex che rappresenta una tecnica che consente l'ottenimento di una rappresentatività uguale per entrambi i set: i campioni saranno distribuiti in maniera paragonabile. In particolare, con l'algoritmo Duplex prima vengono selezionati i due campioni più dissimili nel training set; poi i due campioni più dissimili nell'insieme di test e infine vengono aggiunti al training set e al test set, a turno, uno alla volta i campioni più dissimili da quelli già selezionati.

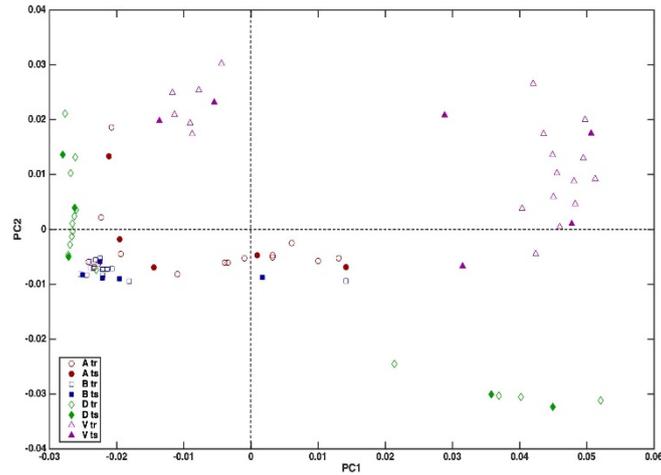


Figura 52: Grafico degli scores dei campioni GC-MS sulle prime due componenti principali (separazione tra i campioni del training set e test set).

Nel grafico in Figura 52 degli scores sulle prime due componenti principali estratte dai dati a seguito del mean centering è riportata la suddivisione dei campioni tra training set (simboli vuoti) e test set (simboli pieni). A seguito dell'applicazione del Duplex si prosegue con la classificazione. Il modello di classificazione viene costruito sui campioni di training e validato sui campioni del test set.

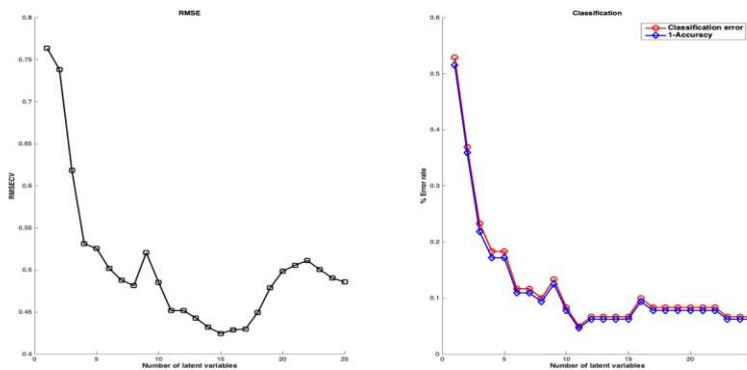


Figura 53: Grafici del numero di variabili ottimali in cross-validation

In primis si deve scegliere il numero ottimale di variabili latenti sulla base dei risultati in cross-validation (8 gruppi di cancellazione), riportati in Figura 53. L'errore di classificazione minore si ottiene quando il numero di variabili latenti è pari a 11. Pertanto, la complessità del modello è stata scelta per costruire il modello di classificazione finale. In cross-validation, il modello ottimale con 11 variabili latenti fornisce un'accuratezza del 95,31%, il che significa che nel complesso questa percentuale dei campioni è stata classificata correttamente. L'errore di classificazione è stato pari al 5%. Mentre l'errore di classificazione medio rappresenta la media degli errori di classificazione di ciascuna classe, l'errore di classificazione totale

costituisce l'errore di classificazione complessivo, ovvero il rapporto tra il numero di campioni classificati male e il numero totale di campioni. Quando vi è uno squilibrio enorme del numero dei campioni presenti nelle classi, la differenza tra i due errori è più pronunciata; al contrario questa differenza è minima quando il numero dei campioni nelle classi è simile.

La percentuale di corretta classificazione di ciascuna classe individuale è data dalla sensibilità ed è risultata essere: 100% per B e V; 93,3% per A; 86,7% per D. Dai valori ottenuti è possibile dimostrare che le classi B e V sono specifiche al 100%, ovvero non ci sono campioni delle altre classi che vengono classificati come B o V; mentre, le altre classi (A e D) (presentano una sensibilità minore, ma comunque maggiore dell'80% e quindi anch'esse sono caratterizzate da un'alta specificità. Considerando tutti i campioni del training set per costruire il modello finale che verrà in seguito validato, i risultati ottenuti sono comparabili, con una % di corretta classificazione media pari al 98,3%, una % di corretta classificazione totale del 98,4% e una sensibilità del 100% per tutte le classi tranne per la classe D (in cui un campione è stato erroneamente predetto come B). Il modello è stato quindi applicato ai 21 campioni del test set: per tutte le classi è stata ottenuta una classificazione corretta del 100%.

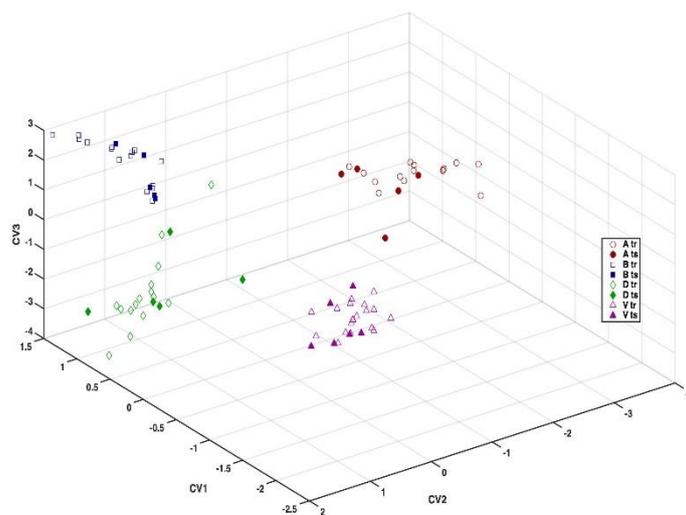


Figura 54: Rappresentazione dei campioni nello spazio sulle tre variabili canoniche del modello.

In Figura 54 vengono rappresentati i campioni nello spazio delle uniche tre variabili canoniche del modello discriminante e si osserva una chiara separazione tra le classi. Le variabili canoniche rappresentano le direzioni di massima separazione tra le classi e il numero calcolabile è $n-1$ (con n pari al numero di classi). In questo studio le tre variabili canoniche riescono a spiegare l'intera capacità discriminante del modello.

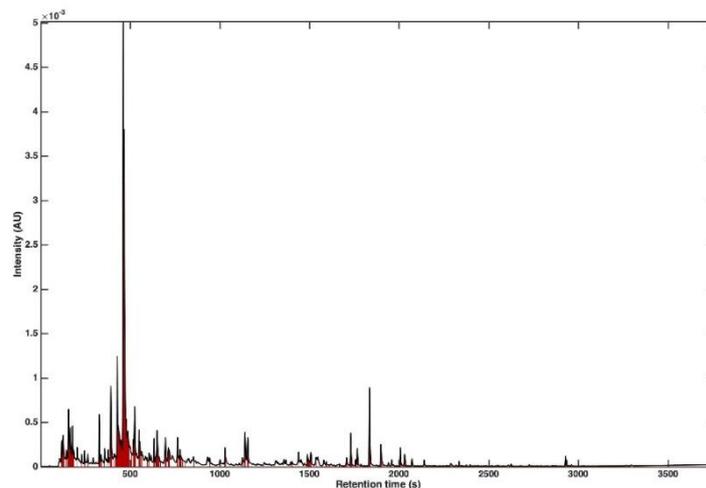


Figura 55: Grafico dei VIP (Variable Importance in Projection) sui dati GC-MS.

Il valore degli indici di VIP (Variable Importance in Projection) permette di osservare quali delle variabili abbiano la maggiore influenza sul risultato. Questi indici sono calcolati in modo che la media di tutte le variabili del modello PLS sia pari a 1. Pertanto, tutte le variabili con un indice VIP superiore a 1 contribuiscono in modo significativo al modello.

Il grafico (Figura 55) mostra che molti composti contribuiscono alla differenziazione. Le aree indicate in rosso sono quelle che contribuiscono maggiormente al modello. Il modello è ragionevole perché tutte le variabili scelte sono rilevanti dal punto di vista chimico.

3.2.3. Classificazione PLS-DA per l'analisi dei flavonoidi

Il pretrattamento dei dati ottenuti dalle analisi HPLC-UV per lo studio dei flavonoidi nei fiori edibili è stato effettuato con le stesse modalità dei dati GC-MS.

I 45 cromatogrammi in forma grezza sono stati importati in MatLab e successivamente elaborati. Anche in questo caso è stato applicato l'algoritmo iCoshift per correggere il lieve disallineamento dei tempi di ritenzione dei picchi cromatografici (Figura 56).

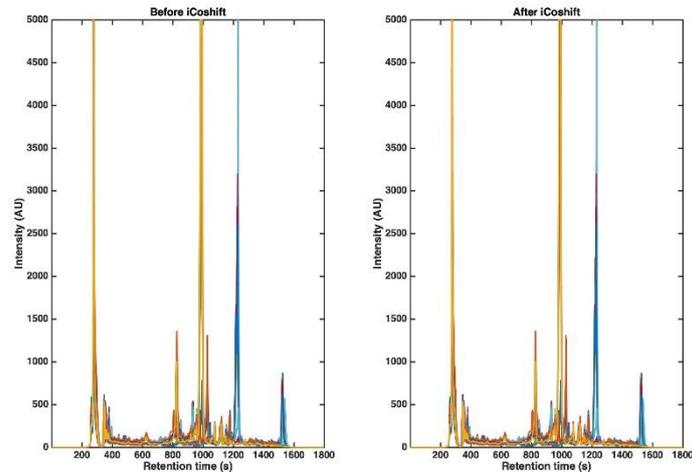


Figura 56: Profili cromatografici sovrapposti HPC-UV dei flavonoidi nei campioni di fiori edibili prima (a sinistra) e dopo (a destra) l'applicazione di iCoshift.

Per quanto riguarda lo studio dei flavonoidi nei fiori, le classi totali sono 3, denominate con le lettere A (anthirrinum), D (dianthus), V (viole), ognuna delle quali include 15 campioni analizzati.

Anche in questo caso sono stati selezionati i campioni da inserire nei due set (training set e test set); la scelta è stata effettuata attraverso l'algoritmo Duplex in maniera separata per ciascuna classe a partire dagli scores della PCA. Rispetto al totale delle analisi GC-MS, in questo caso il numero di misure è minore; perciò, è stato creato un training set composto da 12 campioni e un test set da 3 campioni per ogni classe. La Figura 57 mostra la distribuzione dei campioni nei due set di dati, e si osserva come siano entrambi rappresentativi.

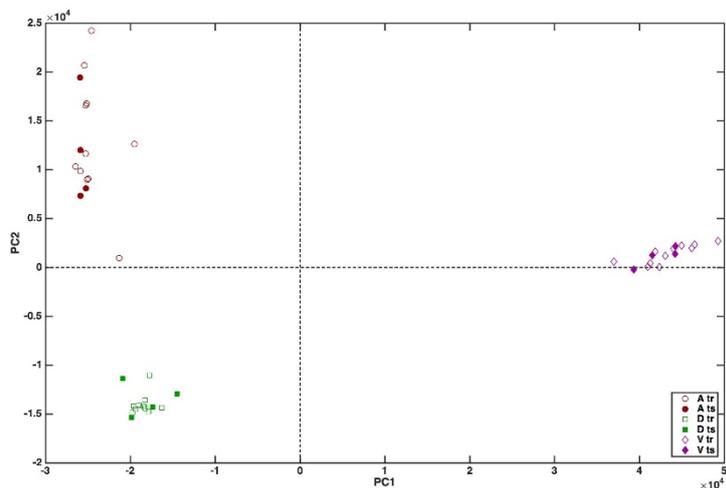


Figura 57: Grafico degli scores dei campioni HPLC-UV sulle prime due componenti principali (separazione tra i campioni del training set e test set).

Quindi si procede con la costruzione del modello di classificazione PLS-DA attraverso i campioni del training set. Viene innanzitutto scelto il numero ottimale di variabili latenti per costruire il modello: si seleziona il numero di variabili che corrisponde al minimo errore di classificazione in cross-validation con 8 gruppi di cancellazione. La Figura 58 mostra i grafici delle figure di merito in cross-validation all'aumentare del numero di variabili latenti; per la costruzione del modello finale di classificazione sono state scelte due variabili latenti con le quali si ottiene proprio il 100% di corretta classificazione.

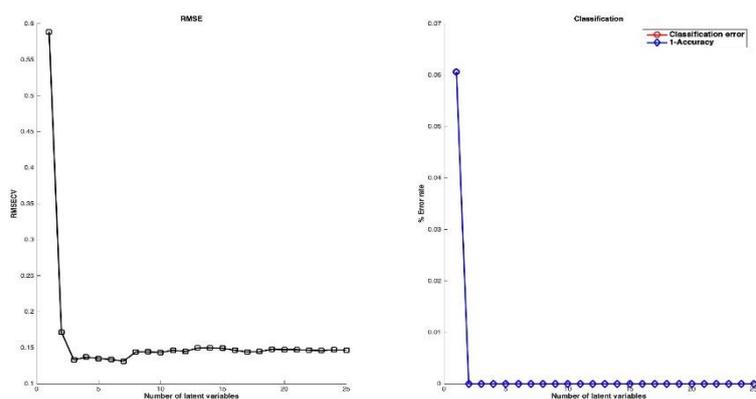


Figura 58: Grafici del numero di variabili ottimali in cross-validation.

Attraverso il modello ottimale è stato possibile classificare correttamente tutti i campioni sia in fase di training che di cross-validation. Successivamente il modello è stato applicato ai campioni del test set dove è stato ottenuto il 100% di corretta classificazione. In questa maniera è stato dimostrato che ogni tipologia di fiore possiede un profilo distinto di flavonoidi.

La Figura 59 rappresenta la proiezione dei campioni del training set e test set lungo le due variabili canoniche calcolabili a partire dal modello discriminante: come si può notare, sussiste una separazione perfetta tra le differenti classi di fiori.

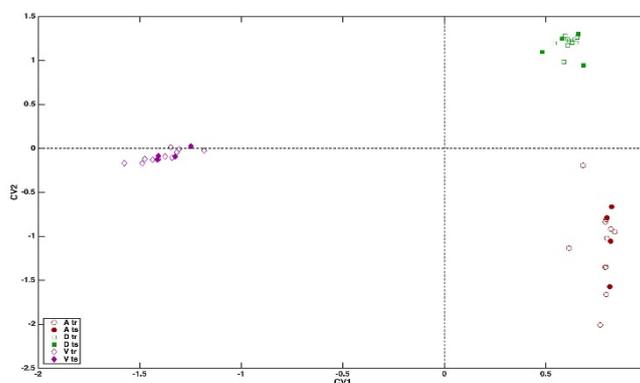


Figura 59: Proiezione dei campioni HPLC-UV di training e di test lungo le due variabili canoniche.

La classe delle viole (V) presenta degli scores negativi sulla prima variabile canonica e per questo si differenzia dalle altre classi che invece hanno scores positivi. La classe Dianthus (D) si differenzia dalla classe Anthirrinum (A) poiché possiede scores positivi sulla seconda variabile canonica, mentre quest'ultima ha scores negativi.

Chimicamente queste differenze possono essere interpretate osservando i pesi delle diverse variabili nella definizione delle variabili canoniche (Figura 60). Andando quindi ad osservare questi pesi, al fine di definire le direzioni di massima discriminazione, si può vedere che la classe delle viole V, che ha scores negativi sulla prima componente, è caratterizzata da una concentrazione più elevata delle specie che corrispondono ai picchi con pesi negativi; al contrario, le altre due classi presentano segnali più elevati delle variabili che hanno pesi positivi lungo CV1. In maniera analoga, le classi A e D possono essere discriminate tra loro esaminando in questo caso i pesi lungo CV2: mentre la classe D possiede valori più intensi dei picchi con i pesi positivi, la classe A ha maggiore quantità dei picchi con pesi negativi. In questa maniera è possibile comprendere quali sostanze chimiche siano maggiormente presenti in una classe rispetto ad un'altra.

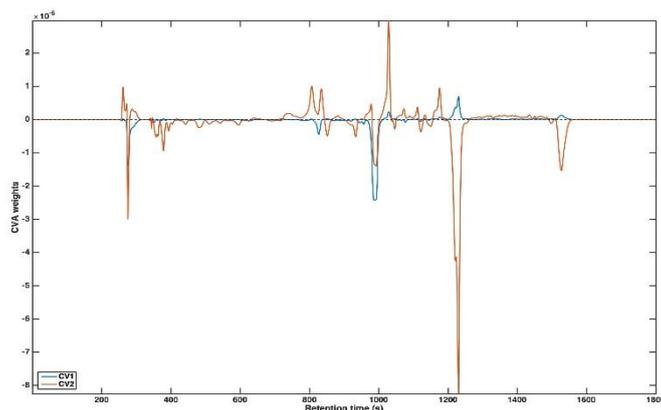


Figura 60: Grafico dei pesi delle variabili sperimentali nella definizione delle due variabili canoniche del modello.

Infine, anche nel caso dell'analisi dei flavonoidi sono stati calcolati i VIP per misurare un indice complessivo d'importanza delle variabili (Figura 61). Mentre nell'analisi dei composti volatili GC-MS gran parte dei composti che compongono il flavour contribuisce complessivamente alla differenziazione, nell'analisi HPLC sembra che la discriminazione tra le varietà sia ascrivibile ad un numero più piccolo di composti, che si trovano in aree ben precise del cromatogramma.

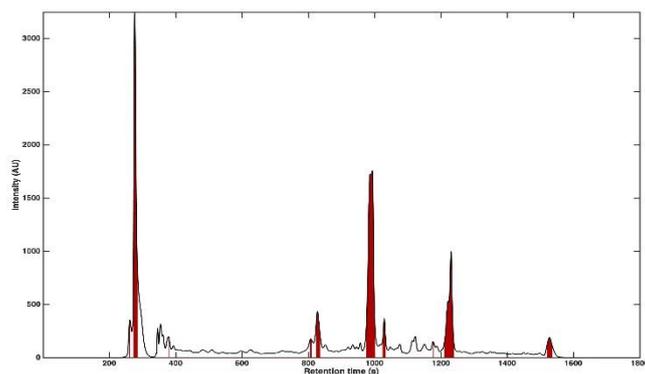


Figura 61: Grafico dei VIP (Variable Importance in Projection) sui dati HPLC-UV.

I risultati provenienti dalle analisi della componente aromatica e bioattiva hanno evidenziato delle differenze significative tra le varietà indagate con l'identificazione di composti specifici che caratterizzano una classe rispetto all'altra. Questo primo passo della ricerca, che verrà in futuro approfondito con un set più ampio di campioni, permetterà la futura caratterizzazione di altre tipologie dei fiori commestibili sia dal punto di vista aromatico che della componente bioattiva. L'analisi multivariata e i modelli di classificazione ottenuti potrebbero rappresentare un approccio oggettivo per consentire la scelta di un prodotto rispetto ad un altro disponibile sul mercato e identificare composti aromatici e flavonoidi che potrebbero essere utilizzati come markers di prodotto.

PARTE III

LEG4LIFE: Legumes for Sustainable Food System and Healthy



In tutto il mondo stiamo assistendo a numerose trasformazioni nella produzione e nel consumo di alimenti, che devono costantemente affrontare sfide ambientali e sociali, come il cambiamento climatico, l'economia circolare, la perdita di biodiversità e l'aumento di malattie dannose per la salute umana. A tal fine è necessario aumentare la produzione alimentare per nutrire una popolazione in crescita, riducendo al contempo l'impatto ambientale della produzione alimentare. Sono necessarie soluzioni globali che considerino contemporaneamente l'impatto della produzione e del consumo di cibo sul benessere umano, sociale e ambientale e sulla sostenibilità economica. In questa terza e ultima parte della tesi verranno trattati i temi e il lavoro svolto del progetto Leg4Life, progetto a cui ho avuto la possibilità di partecipare durante il mio periodo di ricerca presso il *Department of Food and Nutrition* dell'Università di Helsinki in Finlandia. Il progetto Leg4Life (*Legumes for Sustainable Food System and Healthy Life*) affronta le sfide discusse pocanzi con lo scopo di aumentare la coltivazione e il consumo di legumi in Finlandia incentivando il loro impiego negli alimenti e nei mangimi. Leg4Life nasce come progetto congiunto tra l'Università di Helsinki, l'Istituto finlandese per la salute e il benessere (THL) e l'Istituto delle risorse naturali della Finlandia (Luke). I legumi rappresentano i protagonisti nella risoluzione di molti problemi ambientali e sociali; sono adatti per ridurre l'utilizzo di fertilizzanti azotati sintetici in agricoltura e il consumo di proteine di origine animale nella dieta. I legumi possono quindi essere utilizzati per migliorare al contempo ambiente e salute umana senza danneggiare l'economia. Nonostante la lunga storia della coltivazione dei legumi, i benefici e le conseguenze positive attese su scala globale, l'uso e il consumo di legumi sono ancora limitati. Questa limitazione è dovuta a molti fattori come i bassi costi che hanno i fertilizzanti azotati a base di combustibili fossili, la scarsa consapevolezza degli agricoltori e produttori alimentari, il disagio intestinale causato dai legumi, il sapore spento e talvolta amaro, e la scarsità di adeguati metodi di lavorazione. Davanti a queste problematiche si colloca il progetto Leg4Life con lo scopo di sviluppare soluzioni alternative che possano sostituire/integrare l'alimentazione di origine animale, creare nuovi metodi di coltivazione e di lavorazione dei legumi in grado di dare origine a prodotti a base di legumi al contempo buoni, salutari e facili da utilizzare. Leg4Life collabora con una serie di stakeholder, tra cui la produzione primaria, l'industria alimentare e dei mangimi, l'ambiente, la salute pubblica, le politiche agricole e ambientali e i gruppi di consumatori. Questo progetto mira ad incrementare l'impiego dei legumi per realizzare una trasformazione sociale globale verso un sistema più sano e una produzione e consumo di alimenti a impatto climatico zero. I sistemi alimentari basati sull'uso massiccio di legumi hanno il potenziale per apportare cambiamenti significativi all'agricoltura, al ciclo dei nutrienti, alle abitudini alimentari, alla salute pubblica e all'impatto della produzione e del consumo di cibo sull'ambiente. I vantaggi che si possono ricavare dall'aumento delle produzioni e del consumo di alimenti a base di legumi sono numerosi. Le moderne pratiche agricole si affidano molto spesso a fertilizzanti azotati sintetici che possono dare origine a monoculture, indebolimento della biodiversità e della struttura del suolo. Al contrario i legumi sono in grado di fissare l'azoto nel terreno senza inquinare l'atmosfera; l'utilizzo diffuso dei legumi, quindi, può indurre l'aumento dell'apporto proteico delle persone riducendo allo stesso tempo l'impatto ambientale dell'agricoltura. D'altra parte, l'impiego dei legumi nella dieta umana non sempre ha dei riscontri positivi dal punto di vista organolettico. Spesso i legumi possiedono un odore e sapore quasi sgradevoli, amari,

“di fagiolo” non sempre gradito da una gran parte dei consumatori. Inoltre, la presenza di sostanze che riducono l’assorbimento dei nutrienti (acido fitico e inibitori enzimatici) causano un particolare disagio intestinale. Tra questi ci sono anche gli oligosaccaridi raffinosi presenti nei legumi che sono responsabili di flatulenza intestinale in quanto indigeribili e inassorbibili per l’uomo; anche la presenza di sostanze tossiche come le proteine lectina, vicina e convicina possono portare a effetti negativi sulla salute umana se non consumate in quantità adeguate. È necessario quindi che i produttori e i ricercatori rispondano a questi problemi e sviluppino dei metodi di lavorazione adeguati all’ottenimento di prodotti a base di legumi che siano allo stesso tempo sicuri, sani, di alta qualità, di facile preparazione e caratterizzati da odore e sapore gradevoli. In aggiunta, una dieta a base di legumi che vada a sostituire il consumo di carne rossa lavorata è legata a una diminuzione del rischio di contrarre malattie cardiovascolari, diabete di tipo 2 e tumore al colon. I legumi, infatti, contengono elevate quantità di fibre, minerali, proteine e vitamine (tra cui i folati).

L’accettazione da parte dei consumatori e il sostegno dell’intero sistema di approvvigionamento alimentare sono fattori chiave nella transizione verso un’alimentazione a base vegetale che includa più legumi. Le attuali tendenze dei consumatori, come la consapevolezza ambientale e il crescente interesse per uno stile di vita sano, stanno stimolando un aumento del consumo di questi alimenti. Allo stesso tempo, gli atteggiamenti, le abitudini e le norme che influenzano le scelte alimentari quotidiane stanno cambiando lentamente e potrebbero rappresentare un ostacolo all’incremento del consumo di prodotti a base di legumi.

I. **Valorizzazione della produzione e del consumo di prodotti a base di legumi**

1.1. Le fave come fonti proteiche per i prodotti agroalimentari

Le fave, la tipologia di legume oggetto di questo studio, sono una promettente alternativa alla carne per diversi motivi.

Nel 1991 le fave (*Vicia faba* L.) coprivano quasi $3,2 \times 10^6$ ettari di terreno in tutto il mondo (FAO, 1992) e 340.000 ettari nella sola Europa nel 1994 (UNIP, 1996). Il loro impiego più diffuso è quello alimentare, soprattutto nei Paesi in via di sviluppo (principalmente in Asia e Africa). Il maggior produttore è la Cina, con una superficie di coltivazione annuale di circa 2×10^6 ettari. L’origine geografica delle fave è stata ipotizzata nel Vicino Oriente e la sottospecie *V. faba paucijuga*, oggi ampiamente distribuita dall’Afghanistan all’India, rappresenta una forma primitiva della fava. È noto che questo tipo di legume sia stato coltivato fin dall’inizio del Neolitico e Cubero (1974) ha suggerito che l’evoluzione della specie è stata accompagnata da un’espansione della coltivazione attraverso la selezione di diverse dimensioni e forme dei semi. Le tipologie di fave contraddistinte da semi di grandi dimensioni (*Vicia faba major*) si sono evolute nei Paesi mediterranei e in Cina. La specie si è poi espansa in Messico e in Sud America nel XVI secolo. La specie caratterizzata da semi di piccole dimensioni (*Vicia faba minor*) è originaria dell’Etiopia e successivamente si è diffusa nel nord Europa. Infine, la tipologia di fave con semi a grandezza media (*Vicia faba equina*) si è sviluppata in Medio

Oriente e nel Nord Africa (soprattutto in Egitto). Ad oggi i principali produttori di fave sono rappresentati da Australia, Cina, Etiopia, Francia, Marocco e Sudan (Rawal e Navarro 2019).

La pianta di fave (*Vicia faba L.*) appartenente all'ordine delle *Leguminosae* nella famiglia delle *Papilionaceae*, rappresenta una coltura di stagione che produce baccelli da 15-18cm. È proprio l'aspetto appiattito dei semi che ha conferito a questo legume il suo nome comune: fava. Tuttavia, nonostante le somiglianze, le fave variano notevolmente nel colore (esistono anche fave di colore bianco, violaceo e nero) e nelle dimensioni (da 5 cm a 25 cm di lunghezza). Le piante di fave riescono a raggiungere altezze fino a 150 cm. Le fave maturano all'interno dei baccelli spessi e cerosi, e le radici delle piante arrivano in profondità nel terreno: le ramificazioni laterali delle radici ospitano dei tubercoli che contengono il *Rhizobium Leguminosarum*, ovvero un batterio in grado di fissare l'azoto nel terreno.

La popolarità di questo legume è dovuta al suo alto valore nutrizionale e al suo contributo alla sostenibilità ambientale. Le ragioni della sua diffusione sono molteplici, tra cui l'assorbimento dei nutrienti da parte delle fave e la fissazione dell'azoto nel terreno. Infatti, le fave forniscono azoto al terreno e contribuiscono alla sostenibilità ambientale grazie all'uso diffuso di fertilizzanti *green* che non utilizzano combustibili fossili. Inoltre, le fave come anche altri tipi di legumi, consentono di migliorare la fertilità del suolo, la sua struttura, proteggono il suolo dall'erosione e aumentano la diversità biologica (Jensen & Hauggaard-Nielsen 2003; Köpke & Nemecek 2010). Oltre a essere adatte come sostituto della carne in termini di impatto ambientale (Köpke & Nemecek 2010), le fave apportano benefici anche alla salute umana. L'elevato contenuto proteico (fino al 35%) e il profilo amminoacidico equilibrato rendono questo legume un ottimo candidato per sostituire le proteine della carne nella dieta (Sahile et al., 2009, Verni et al., 2017, Mattila et al., 2018). Le fave sono povere degli amminoacidi cisteina e metionina, ma ricche di lisina, e questa caratteristica può essere utilizzata per bilanciare il profilo amminoacidico dei cereali a basso contenuto di lisina. Le fave sono anche ricche di sostanze con proprietà antiossidanti come i composti fenolici benefici per la salute. L'intera pianta di fave (comprese foglie, gambo, baccello e semi) contiene la sostanza levodopa, utilizzata in medicina per la cura della malattia di Parkinson. È stata dimostrata, infatti, una correlazione tra il consumo di fave e il miglioramento delle prestazioni motorie dei pazienti con la malattia di Parkinson (Rabey et al. 1992; Randhir e Shetty 2004).

Queste considerazioni ambientali e salutistiche rendono le fave un'ottima alternativa alla carne. Le fave possono essere utilizzate nella lavorazione di molteplici prodotti alimentari attraverso diversi processi tecnologici. A tale scopo le fave possono essere trasformate in:

- Farina: ottenuta attraverso la macinazione dei semi di fave;
- Concentrato proteico: ricavato attraverso la separazione delle proteine e dei componenti indesiderati delle farine tramite macinazione e l'utilizzo di un classificatore ad aria. Possiedono un contenuto proteico che varia tra il 60 e 75%;

- **Isolato proteico:** prodotti attraverso l'aggiunta di solventi acidi/alcalini alla farina fino al raggiungimento del punto isoelettrico delle proteine. Le proteine sono poi recuperate mediante centrifugazione e processate tramite liofilizzazione. Hanno un contenuto proteico del 95%.

La qualità dei concentrati proteici e degli isolati proteici dipende dai parametri di processo utilizzati (Sharan et al. 2021). Grazie al maggior contenuto proteico e a una quantità più elevata di amminoacidi essenziali e non essenziali, gli isolati proteici sono di qualità nutrizionale e tecnologica superiore rispetto ai concentrati proteici (Bhatty & Chistison 1984; Fernández-Quintela et al., 1997); a ragion di ciò gli isolati proteici sono più costosi da produrre. Tuttavia, il processo di lavorazione dei concentrati proteici produce meno rifiuti e utilizza minori quantità di sostanze chimiche; i concentrati proteici sono anche più versatili, contengono più nutrienti e richiedono meno operazioni per la loro produzione rispetto agli isolati proteici. Entrambi i concentrati proteici e gli isolati proteici permettono di sviluppare prodotti alimentari innovativi.

1.2. Flavour dei prodotti a base vegetale

Quando si offrono ai consumatori prodotti alimentari innovativi come la carne di origine vegetale, è necessario considerare una serie di fattori. I consumatori preferiscono le proteine di origine vegetale alla carne coltivata e alle proteine derivate da insetti, in quanto i prodotti a base vegetale sono già affermati e presenti sul mercato (Gómez-Luciano et al., 2019). Le reazioni dei consumatori alle alternative alla carne sono influenzate da una serie di fattori come il genere (Michel et al. 2021), la frequenza di consumo (Hoek et al., 2013), la familiarità del prodotto e l'appeal sensoriale (Hoek et al., 2011), nonché da alcuni aspetti come la tipologia di pasto che accompagna la carne alternativa (Rozin & Tuorila 1993; Elzerman et al., 2011; Michel et al., 2021).

I fattori che influenzano maggiormente la scelta e l'accettabilità delle alternative di carne a base vegetale per i consumatori sono il flavour e la consistenza. La carne di legumi è caratterizzata da un sapore amaro e da un odore "simile a quello dei fagioli"; pertanto, affinché le carni vegetali possano avere successo sul mercato, è necessario migliorarne il gusto e le proprietà organolettiche.

Il flavour, un aspetto complesso della qualità alimentare, rappresenta una percezione multisensoriale di odore, gusto e chemestesi che viene avvertita durante il consumo. Il flavour nelle carni a base vegetale rappresenta un fattore cruciale per la loro accettabilità da parte dei consumatori (altre variabili come l'etica ambientale, i benefici per la salute e il benessere animale sono meno influenti) (Szejda et al., 2020). I prodotti vegetali hanno un aroma caratteristico perché possono sintetizzare, accumulare e rilasciare diversi composti aromatici attivi. Questi composti aromatici possono essere prodotti dalle piante come meccanismo di difesa o da precursori dell'aroma (proteine, lipidi e carboidrati) durante la raccolta, la lavorazione e la conservazione. È quindi necessario comprendere i precursori e la composizione chimica dei prodotti vegetali per ottenere informazioni utili sulle sostanze volatili e non volatili che si generano in condizioni specifiche e che influiscono sull'accettabilità da parte dei consumatori. Tuttavia, è necessario considerare anche fattori come la varietà, le condizioni di coltivazione, la conservazione e la lavorazione post-raccolta che influiscono sulla composizione

(Singh, 2017). Inoltre, il profilo chimico e sensoriale dei concentrati e degli isolati proteici differisce da quello della farina e dipende fortemente dal metodo di separazione delle proteine utilizzato. Il concentrato o l'isolato proteico che ne deriva contiene solitamente una quantità di amido, grassi, ceneri e fibre significativamente inferiore rispetto alla farina originale (Cruz et al., 2020). Una larga varietà di composti aromatici è contenuta nelle materie prime vegetali e queste sostanze vengono normalmente prodotte come metaboliti secondari. Il profilo di questi composti è unico per ogni prodotto sebbene vari in base a fattori genetici, condizioni ambientali e pratiche agricole. A causa del numero elevato di composti, è molto difficile identificare tutte le sostanze che contribuiscono all'aroma. Inoltre, la percezione del sapore è influenzata anche dalle proprietà chimiche e fisiche della matrice e dalla presenza di altre sostanze.

1.2.1. I precursori dei composti volatili e la formazione degli off-flavours

Le alternative a base vegetale sono spesso percepite come poco appetibili e quasi con una sensazione di secchezza in bocca; in questi prodotti è comune riscontrare gli off-flavours ovvero aromi indesiderati come il sapore “di fagioli” e il retrogusto amaro (Mittermeier-Kleßinger et al., 2021; Sha & Xiong, 2020). Gli off-flavours nei prodotti a base vegetale possono essere intrinseci al materiale vegetale o derivanti dalla lavorazione e dalla conservazione (ad esempio, la degradazione ossidativa degli acidi grassi insaturi nei lipidi legati alle proteine). Queste sostanze interferiscono con l'accettabilità del consumatore e la ostacolano. Tuttavia, negli anni si stanno compiendo degli sforzi per ridurre al minimo il sapore sgradevole nei prodotti alternativi a base vegetale, ma i progressi sono ancora limitati.

Diverse classi di composti volatili sono state identificate nei legumi: tra questi ci sono alcani, alcheni, alchini, acidi carbossilici, aldeidi, chetoni, alcoli, esteri, lattoni, furani, composti aromatici, acetati, terpeni e composti amminici. Tra tutti, gli alcoli e le aldeidi sono i composti volatili più abbondanti nei legumi.

Il flavour non è un concetto singolo, ma una definizione che include sia il sapore che l'aroma. Il flavour è caratterizzato da una serie di composti volatili che svolgono un ruolo nel generare e modellare il sapore degli alimenti. I composti volatili presenti nelle fave possono provenire dalle materie prime o dai processi termomeccanici (ad esempio, l'estrusione) necessari per ottenere il prodotto finale. I precursori dei composti volatili derivati dalle materie prime sono i carboidrati, i lipidi e le proteine, che possono andare incontro a reazioni per formare queste sostanze. Nei componenti proteici vegetali, i lipidi sono la principale fonte di formazione di questi composti (compresi gli “off-flavours”). Infatti, i lipidi possono subire ossidazione (auto-ossidazione o ossidazione enzimatica) per poi produrre composti volatili caratterizzanti il flavour. Gli acidi grassi insaturi si auto-ossidano in presenza di ossigeno, liberando sostanze volatili come l'esanale, l'1-esanolo, il 2-pentilfurano e l'1-octene-3-olo che causano particolari odori sgradevoli (Frankel 1985). L'ossidazione dei lipidi può avvenire anche ad opera degli enzimi lipasi, lipossigenasi (LOX) e idroperossido liasi (HPL). L'enzima LOX è responsabile dell'idrolisi dei triacilgliceroli per formare acidi grassi liberi. Questi vengono

ossidati dalla LOX per formare idroperossidi. La decomposizione degli idroperossidi da parte della HPL porta alla formazione dei composti volatili.

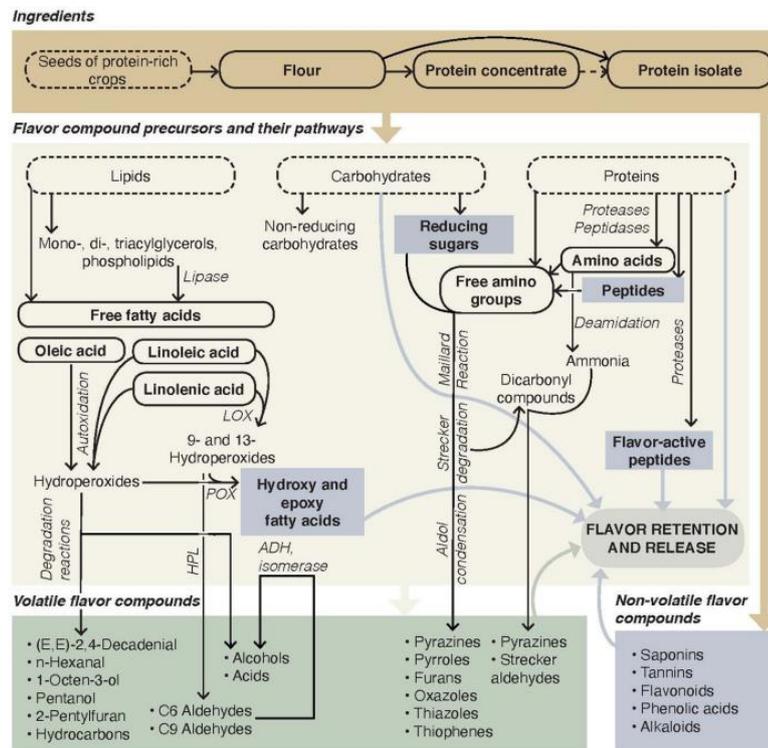


Figura 62: Le principali vie di formazione dei composti del flavour nelle alternative vegetali della carne (Wang et al., 2021).

1.2.2. L'influenza del processo di estrusione sul flavour

Una delle fasi nel processo di lavorazione delle carni a base vegetale è l'estrusione. L'estrusione è un processo termo-meccanico che ha lo scopo di modellare una matrice alimentare per ottenere la struttura finale desiderata e di produrre alternative di carne a base vegetale che siano al contempo sostenibili e in grado di ricreare tutte le proprietà sensoriali della carne al fine di soddisfare le aspettative dei consumatori.

In realtà per ottenere la giusta consistenza fibrosa, tipica della carne sono state sviluppate diverse tecniche, tra cui la stampa in 3D, la filatura, e l'estrusione stessa (Dekkers et al., 2018; Sha & Xiong, 2020). L'estrusione ad alta umidità (High Moisture Extrusion HME) è la tecnica predominante utilizzata per la lavorazione strutturale delle proteine vegetali e che viene eseguita in condizioni di elevata temperatura (tra 140 e 180 °C) ed elevata umidità (>50%). A differenza dell'estrusione a bassa umidità (contenuto di acqua < 40 %), l'HME è caratterizzata dall'impiego di un estrusore collegato a un impianto di raffreddamento e un contenuto di umidità fino all'80% (Osen e Schweiggert-Weisz 2016). Questo processo porta alla reticolazione delle proteine

vegetali e alla formazione di una struttura fibrosa a strati. Tuttavia, la rete fibrosa formata dalle proteine vegetali denaturate non è esattamente come la struttura della matrice interstiziale delle fibre muscolari, necessaria per il legame con l'acqua (Sha & Xiong, 2020).

Le fave, come anche i legumi in generale, dopo aver subito il processo di estrusione possono successivamente essere trasformate in carne vegetale. Oltre a originarsi nelle materie prime, i composti volatili possono formarsi attraverso la lavorazione della carne vegetale e in particolar modo durante l'estrusione attraverso cui possono avvenire la reazione di Maillard e altre reazioni termicamente indotte (Rackis et al. 1979). La reazione di Maillard si verifica durante i processi ad alta temperatura quando gli amminoacidi e gli zuccheri riducenti reagiscono per formare diversi composti volatili (ad esempio, pirazine, pirroli, furani, furanoni, ecc.) (Van Boekel 2006). Altre reazioni termicamente indotte responsabili della formazione dei composti volatili includono la degradazione della tiamina (Dwivedi & Arnold 1973), dei carotenoidi (Ames & Macleod 1984), degli acidi fenolici (Rackis et al. 1979) e degli amminoacidi aromatici. Inoltre, durante il trattamento termico, il flavour può essere influenzato dall'ossidazione dei lipidi indotta dal calore e dalla deaminazione degli amminoacidi.

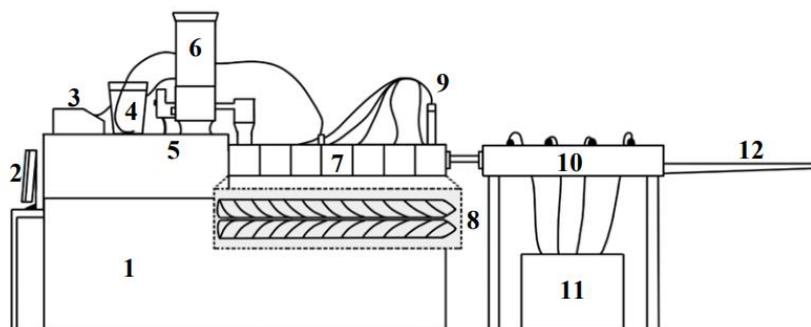


Figura 63: Rappresentazione schematica di un estrusore ad alta umidità (HME): 1) estrusore; 2) hardware; 3) pompa dell'acqua; 4) serbatoio di acqua; 5) motore; 6) serbatoio della farina; 7) barile; 8) viti doppie; 9) sensore; 10) impianto di raffreddamento; 11) sistema di raffreddamento ad acqua; 12) piattaforma di raccolta.

1.3. Tecniche per migliorare l'accettabilità sensoriale e nutrizionale dei prodotti ricchi di proteine e delle alternative alla carne: fermentazione e idrolisi enzimatica

Per migliorare l'accettabilità dei prodotti a base vegetali è necessario prevenire, ridurre o mascherare la formazione degli off-flavours caratteristici dei prodotti finiti. Off-flavours volatili sono tipicamente gli odori caratteristici di fagioli e piselli (composti volatili); gli off-flavours non volatili sono invece il gusto amaro e metallico. Pertanto, per rimuovere gli off-flavours è necessario eliminare sia i precursori che i composti coinvolti nella loro formazione, e allo stesso tempo, limitare il più possibile le modifiche delle proprietà funzionali dei concentrati e degli isolati proteici. Tuttavia, ad oggi, ci sono ancora poche informazioni sulla rimozione degli off-flavours nelle proteine vegetali. Poiché le proteine vegetali dipendono in larga misura dalle

varietà, uno degli approcci più semplici e tradizionali è quello di utilizzare cultivar a basso contenuto di composti e precursori off-flavor o di enzimi che supportano lo sviluppo di aromi sgradevoli. Altri metodi che permettono di migliorare l'accettabilità dei prodotti a base vegetale attraverso la rimozione degli off-flavours sono: l'impiego di additivi aromatizzanti, l'estrazione con solvente, il trattamento termico, l'interazione molecolare e l'intrappolamento fisico, l'idrolisi enzimatica e la fermentazione. I composti off-flavours sono molteplici e diversi e mostrano differenti affinità di legame con le proteine vegetali; per tale ragione è difficile rimuovere completamente tutte queste sostanze utilizzando le tecniche attuali. Nello studio affrontato nel presente lavoro di tesi sono stati analizzati campioni sottoposti a fermentazione e idrolisi enzimatica al fine di migliorare l'accettabilità dei prodotti finiti.

L'idrolisi enzimatica delle proteine vegetali è stata adoperata per ridurre l'allergenicità (Sun, 2011), migliorare le proprietà funzionali dei prodotti (ad esempio, l'emulsionabilità, la gelificazione, la schiumosità e la capacità di assorbimento dell'acqua) e produrre precursori di sapore della carne vegetale per migliorarne il gusto. Tuttavia, si sa poco sull'uso dell'idrolisi enzimatica per rimuovere gli aromi sgradevoli dalle proteine vegetali. In effetti, la ricerca su questo processo si è concentrata sull'ottimizzazione del processo di idrolisi per modificare la funzionalità tecnica della proteina senza alterare i composti off-flavours. Sia le condizioni di idrolisi che le proteasi che vengono utilizzate influenzano l'effetto dell'idrolisi proteolitica sulle proprietà aromatiche delle proteine vegetali. L'amarrezza è generalmente correlata all'idrofobicità media del peptide: in particolare al numero dei residui di amminoacidi idrofobici come fenilalanina, isoleucina, leucina, prolina, tirosina, e triptofano e alla lunghezza della catena (Damodaran & Arora, 2013; Saha & Hayashi, 2001). Strategie che prevedono di rimuovere il senso di amarrezza si sono indirizzate verso l'uso di esopeptidasi ed endopeptidasi in grado di idrolizzare i legami peptidici amari rilasciando i residui di amminoacidi idrofobici N-terminali dalle proteine. Alcuni lavori hanno applicato l'idrolisi enzimatica su isolati proteici di lupini, piselli e soia per rimuovere l'amarrezza utilizzando gli enzimi flavourzyme, papaina, protamex, chimotripsina, corolase, tripsina e neutrase (Arteaga et al., 2020; Humiski & Aluko, 2007; Meinlschmidt et al., 2016b; Schlegel et al., 2019; Yoo & Chang, 2016). La durata dell'idrolisi è un fattore fondamentale poiché se viene impiegato un tempo di idrolisi troppo lungo, l'impiego di questi enzimi porta ad un incremento dell'amarrezza. Va inoltre precisato che l'intensità percepita di altri aromi off-flavours come il sapore di fagiolo e l'astringenza può essere influenzata dai trattamenti enzimatici (Schlegel et al., 2019; Song et al., 2009).

Come già precisato, in questo lavoro di tesi sono stati analizzati anche dei campioni di fave fermentati. La fermentazione in laboratorio con i batteri dell'acido lattico (LAB, *Lactic Acid Bacteria*) e i lieviti rappresenta il metodo più comune per migliorare il profilo aromatico e ridurre la formazione di sapori sgradevoli negli ingredienti proteici vegetali. Gli studi si sono focalizzati sul mascheramento o sulla riduzione degli off-flavour in proteine isolate di soia, piselli e lupini e prodotti correlati. Le proprietà aromatiche delle proteine dei legumi fermentati dipendono principalmente dagli starters usati, dalle loro attività metaboliche (ad esempio, la sintesi di composti aromatici e / o precursori) e dal rilascio o dall'attivazione di enzimi specifici che degradano composti off-flavor mirati. I ceppi LAB appartenenti al genere *Lactobacillus* rappresentano delle importanti

fonti di esopeptidasi e sono stati impiegati come starters deamarizzanti nella fermentazione delle proteine vegetali (Saha & Hayashi, 2001). Alcune ricerche hanno studiato l'effetto della fermentazione delle proteine di soia con batteri dell'acido lattico da soli (p.e., i *Lactobacillus helveticus*) o in combinazione con i lieviti (p.e., i *Saccharomyces*). I risultati hanno mostrato un'effettiva riduzione del gusto amaro e la formazione di un piacevole sapore fruttato (Meinlschmidt et al., 2016a, c; Tangyu et al., 2019). La conversione di alcoli e aldeidi nei corrispondenti acidi attraverso l'attività enzimatica (alcol deidrogenasi e aldeide deidrogenasi) hanno portato alla diminuzione del sapore sgradevole di fagiolo. L'esecuzione di una fermentazione è caratterizzata da diversi fattori; per questo motivo, al fine di ottenere una fermentazione quanto più adatta è necessario ottimizzare le condizioni di fermentazione per eliminare la formazione degli off-flavours.

II. Scopo del lavoro e stato dell'arte

Il flavour rappresenta quindi un aspetto fondamentale per l'accettabilità e la diffusione nel mercato delle alternative di carne a base vegetale. Le percezioni sensoriali indesiderate ovvero i cosiddetti "off-flavours" sono associate alle proteine presenti nelle piante. In letteratura si trovano dei lavori inerenti allo studio del flavour e dei suoi precursori nelle proteine vegetali e nei prodotti connessi a queste. Già nel 1979 Rackis e i suoi collaboratori (Rackis et al., 1979) avevano affrontato i problemi legati al flavour delle proteine vegetali. Da quel momento sono state prodotte molte alternative vegetali di carne, ma il sapore non apprezzato rimane un problema fondamentale da affrontare. In un lavoro (Lampi et al., 2020) è stato investigato il ruolo degli enzimi modificanti i lipidi nelle fave nel causare off-flavours durante la lavorazione. I risultati hanno mostrato che le fave esibivano alte attività di enzimi lipase e lipoxygenase (LOX) e la lipoxygenase nelle fave preferiva come substrato gli acidi grassi liberi sui triacilgliceroli, e insieme ad altri enzimi, LOX formava prodotti volatili specifici. Per quanto riguarda gli studi effettuati sui precursori del flavour, in uno studio (Yang et al., 2019b) è stata esaminata la formazione di acidi grassi epossidici e idrossilici in campioni di avena come possibili fonti di composti off-flavours. Dai risultati è emerso che il contenuto di acidi grassi epossidici e idrossilici aumentava durante la conservazione e che la formazione di questi composti era legata a quella dei prodotti volatili dell'ossidazione lipidica. In un altro lavoro (Wang et al., 2018) sono state analizzate le fave in relazione alle applicazioni alimentari, nello specifico alla cottura. I lavori che si trovano in letteratura sono maggiormente focalizzati sullo studio della componente volatile di campioni di farine di fave (Oomah et al., 2014; Akkad et al., 2021) e il numero di studi che utilizzano isolati e concentrati proteici è scarso. In uno studio recente (Tuccillo et al., 2022) è stata investigata la componente volatile sia nei campioni di fave tal quali sia nei corrispondenti estrusi al fine di capire come la loro composizione possa influenzare la percezione sensoriale. I risultati hanno dimostrato che l'estrusione HME porta alla formazione di diversi composti volatili nei campioni, nonché all'inattivazione di enzimi di degradazione dei lipidi. Inoltre, nello stesso lavoro è stato dimostrato che dal punto di vista sensoriale i concentrati proteici possedevano un gusto e retrogusto più forti (rispettivamente 7 e 6 su una scala di intensità 0-10), una sensazione di amaro (6-7) e di odore e sapore di

piselli (rispettivamente 6 e 5), mentre gli isolati proteici delle fave avevano un certo sapore e odore di cereali (4), off-flavour (2) e off-odor (3).

Questa ultima parte della tesi è stata condotta durante la mia permanenza all'estero, grazie al progetto promosso presso l'Università di Helsinki. Lo scopo del lavoro è stato quello di caratterizzare il flavour di diversi campioni (concentrati proteici) di fave per poter studiare come i processi sia di estrusione (necessario per la lavorazione di carni vegetali) sia di fermentazione e trattamenti enzimatici (necessari per il miglioramento del sapore di tali prodotti) possano influenzare la componente chimica dei prodotti a base di fave. In particolare, è stata studiata la stabilità dei lipidi nelle fave analizzando la formazione di prodotti di idrolisi ovvero di acidi grassi liberi (*Free Fatty Acid*, FFA) tramite ASE/HPLC-ELSD e dei prodotti di ossidazione lipidica (componente volatile) con HS-SPME/GC-MS.

III. Parte sperimentale

3.1 Materiali e Metodi

3.1.1. Preparazione dei campioni

I campioni analizzati erano parte di due gruppi, quindi sono stati esaminati due set a seconda del processo utilizzato (fermentazione o trattamento enzimatico).

3.1.1.1. Set di campioni di fave fermentati ed estrusi (1° set)

Il primo set in esame (concentrati proteici di fave P60) era costituito da un gruppo di 5 campioni di fave (di controllo e fermentate), e da un secondo gruppo costituito dagli stessi campioni (escluso uno) dopo il processo di estrusione; in totale sono stati analizzati 9 campioni (con tre repliche ciascuno). I concentrati proteici di fave sono stati acquistati presso negozi specializzati. I campioni contenevano il 63,9 % di proteine (sostanza secca), 9,5% di umidità, 8% di amido, 6,4% di ceneri e 3,2% di grassi. I campioni estrusi contenevano glutine acquistato presso l'azienda Lantmännen Agro Oy (Finlandia) con l'86,7% di proteine, 10,6% di amido, 6,5% di umidità, 5% di grassi e 0,67 % di ceneri.

In alcuni campioni è stato aggiunto il destrano utilizzato in campo alimentare come addensante, sostituendo gli idrocolloidi normalmente adoperati. I destrani sono polimeri ramificati del glucosio prodotti dai lattobacilli (o altri batteri fermentanti) a partire dal saccarosio tramite l'enzima destransaccarasi. In questo caso il destrano è stato prodotto in una soluzione acquosa usando un estratto enzimatico.

Dopo la fermentazione gli stessi campioni sono stati sottoposti al processo di estrusione. L'estrusione dei campioni è stata effettuata tramite il processo HME (*High Moisture Extrusion*) utilizzando un estrusore a doppia vite su scala di laboratorio (Process 11 Parallel twin-screw extruder, Thermo Scientific, Germany) dotato di uno stampo di raffreddamento lungo ($H \times W \times L$, $5 \times 20 \times 250$ mm).

Il nome di ciascun campione è stato abbreviato per questioni di semplicità durante la descrizione dei risultati.

1° gruppo di campioni (sottoposti a fermentazione):

- 1) Impasto di controllo (concentrati proteici di fave miscelati con acqua): Control slurry;
- 2) Impasto contenente destrano: Enzymatic dextran;
- 3) Impasto fermentato per 11, 4 ore a 23 °C in cui il 10% (del peso della farina) dei concentrati proteici di fave (*faba bean protein concentrate*, FPC) è stato sostituito da saccarosio (ovvero il substrato per la sintesi del destrano): 11.4h dextran Pos;
- 4) Impasto fermentato 11, 4 ore a 23 °C ma senza l'aggiunta di saccarosio: 11.4h dextran Neg;
- 5) Impasto fermentato per 24 ore a 25 °C in cui il 10 % del peso della farina di FPC è stato sostituito da saccarosio: 24h dextran Pos.

2° gruppo di campioni (sottoposti a estrusione):

- 1) Impasto di controllo successivamente estruso: Control slurry Ext;
- 2) Impasto contenente destrano successivamente estruso: Enzymatic dextran Ext;
- 3) Impasto fermentato per 11,4 ore a 23 °C contenente destrano successivamente estruso: 11.4h dextran Pos Ext;
- 4) Impasto fermentato 11 ore a 23 °C senza l'aggiunta di destrano successivamente estruso: 11.4h dextran Neg Ext.

3.1.1.2. Set di campioni di fave trattati enzimaticamente ed estrusi (2° set)

Il secondo set di campioni comprendeva concentrati proteici di fave ma questa volta trattati enzimaticamente.

In particolare, sono stati analizzati i campioni risultati da 15 esperimenti condotti in base al Disegno Sperimentale Box Behnken (un tipo di disegno utilizzato con modelli quadratici completi) e a tal proposito sono state considerate tre variabili del trattamento enzimatico: il tempo di incubazione (2 h, 5 h, 8 h), il dosaggio enzimatico (5000 nkatal, 10 000 nkatal, 15 000 nkatal) e il contenuto di acqua (65%, 70%, 75%).

Inoltre, il set di campioni conteneva i corrispondenti campioni di controllo di ciascun tempo di incubazione e ciascun contenuto di acqua (in totale 9 campioni di controllo analizzati).

In Tabella 13 sono riportati gli esperimenti condotti secondo il disegno sperimentale di Box Behnken:

Tabella 13: Matrice sperimentale del disegno Box Behnken.

| Campioni FPC (dopo il trattamento enzimatico) | Tempo (h) | Dosaggio (nkatal) | Contenuto di acqua (%) |
|---|-----------|-------------------|------------------------|
| 1 | 2 | 5000 | 70 |
| 2 | 2 | 15000 | 70 |
| 3 | 2 | 10000 | 65 |
| 4 | 2 | 10000 | 75 |
| 5 | 5 | 5000 | 65 |
| 6 | 5 | 5000 | 75 |
| 7 | 5 | 15000 | 65 |
| 8 | 5 | 15000 | 75 |
| 9 | 8 | 5000 | 70 |
| 10 | 8 | 15000 | 70 |
| 11 | 8 | 10000 | 65 |
| 12 | 8 | 10000 | 75 |
| 13 | 5 | 10000 | 70 |
| 14 | 5 | 10000 | 70 |
| 15 | 5 | 10000 | 70 |
| Campioni di controllo | | | |
| 16 | 2 | / | 65 |
| 17 | 2 | / | 70 |
| 18 | 5 | / | 70 |
| 19 | 2 | / | 75 |
| 20 | 5 | / | 75 |
| 21 | 8 | / | 65 |
| 22 | 8 | / | 70 |
| 23 | 8 | / | 75 |
| 24 | 5 | / | 65 |

In aggiunta ai precedenti campioni, sono stati analizzati anche 4 campioni estrusi a partire da 2 campioni di controllo e 2 campioni trattati enzimaticamente (dosaggio enzimatico 7000nkatal e incubazione 5h), con diverso contenuto di acqua (60% e 62,5%). Al fine di migliorarne la struttura, a questi campioni sono state aggiunte quantità adeguate di isolato proteico di piselli (*Pea Protein Isolate*, PPI) e concentrato di crusca di avena (*Oat Bran Concentrate*, OBC).

Sono stati quindi analizzati 28 campioni totali ciascuno con tre repliche.

3.1.2. Preparazione dei campioni e materiali utilizzati

Prima di iniziare l'estrazione e la successiva analisi degli acidi grassi, ciascun campione di entrambi i set per poter essere estratto attraverso l'estrattore accelerato con solvente, è stato liofilizzato per eliminare la maggior parte dell'acqua all'interno e macinato in polvere utilizzando un GRINDOMIX GM 200 (Retsch GmbH; Haan, Germania). Circa 1 g di ciascun campione è stato inserito all'interno della cella in acciaio inossidabile da 22 mL dell'ASE. Al fine di prevenire la compattazione dei campioni nella cella di estrazione, aumentare la superficie di estrazione, rimuovere l'umidità e permettere al solvente di penetrare in maniera più efficiente all'interno del campione, è stata aggiunta la sabbia Ottawa. In realtà la sabbia è stata dapprima miscelata con il campione all'interno della cella e infine aggiunta per riempire la cella ed eliminare gli spazi rimasti vuoti. Infine, è stato aggiunto 1 ml di etanolo.

I materiali e i solventi utilizzati per le estrazioni e le successive analisi degli acidi grassi sono riportati di seguito:

- Dionex ASE-350; Thermo Fisher Scientific, USA;
- Cella in acciaio inossidabile da 22 ml per ASE;
- Cerchi di cellulosa (P/N 049458) per la cella del campione ASE;
- Vials di raccolta da 60 ml con tappo a setto in Teflon;
- Sabbia Ottawa (P/N S23-3, Fisher Scientific OY, Vantaa, Finland)
- HPLC (Waters Alliance 2690 Separations Module) dotato di autocampionatore accoppiato a un rivelatore evaporativo a luce diffusa ELSD (Evaporative Light Scattering Detector, Waters 2420 ELSD, Waters; Milford, MA, USA). Software Empower 3;
- Colonna LiChrosorb diol (3 x100 mm, 5 µm particles, VDS Optilab Chromatographie Technik GmbH; Berlin, Germany);
- Eptano per HPLC, purezza $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich);
- Etanolo anidro per HPLC, purezza $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich);
- Acido acetico per HPLC;
- Standard di acido oleico (Nu-Check-Prep, Elysian, MN, USA).

Per quanto riguarda invece l'analisi della componente volatile, anche questa volta è risultata molto più semplice e rapida rispetto all'esecuzione delle analisi degli FFA. Difatti essendo il gascromatografo dotato di un autocampionatore ha consentito di effettuare analisi completamente automatizzate. 2g di campione fresco (precedentemente conservato in freezer a -4 °C) sono stati posti in una fiala di vetro sigillata con un tappo di alluminio e setto in PTFE/silicone.

I materiali utilizzati per l'analisi dei composti volatili sono di seguito riportati:

- HS-SPME (combiPAL, CTC Analytics, USA);

- Gascromatografo GC (HP 6890 series, Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) accoppiato a uno spettrometro di massa MS (Agilent 5973 Network, Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE, USA); Software ChemStation Agilent;
- Vials Chromacol in vetro da 20 ml per GC (setto in PTFE/silicone e ghiera in alluminio);
- Colonna capillare SPB-624 (30 m × 0.25 mm i.d. × 1.4 μm);
- Fibra di 1cm di divinilbenzene/carboxene/polidimetilsilossano (DVB/CAR/PDMS) 50/30-μm SPME (Sigma-Aldrich).

Tutti i campioni (sia per le analisi in GC-MS sia per quelle in HPLC) sono stati preparati e analizzati in tre repliche.

3.1.3. Ottimizzazione dell'analisi ASE/HPLC-ELSD degli acidi grassi

L'estrazione degli acidi grassi liberi (*Free Fatty Acids*, FFA) è stata eseguita mediante estrattore di solvente accelerato (Dionex ASE-350; Thermo Fisher Scientific, USA) apportando modifiche a quanto riportato in Tuccillo et al., (2022). L'ASE era dotato di un'unità di controllo del solvente, celle in acciaio inossidabile da 22 mL di volume e vial di raccolta degli estratti da 60 mL. I parametri di estrazione erano i seguenti: temperatura, 125 °C; pressione, 1500 psi; tempo di preriscaldamento, 5 min; tempo di riscaldamento, 6 min; tempo statico, 11 min; volume di lavaggio, 60%; tempo di risciacquo, 60 sec; cicli statici, 1. 1 g di ciascun campione liofilizzato è stato inserito all'interno delle celle per l'estrazione, in cui è stato precedentemente posizionato un cerchio di cellulosa (P/N 049458). La sabbia Ottawa (P/N S23-3, Fisher Scientific OY, Vantaa, Finland) è stata dapprima miscelata insieme al campione nella cella e poi aggiunta per riempire il volume rimanente. Infine, è stato aggiunto 1 ml di etanolo. L'etanolo è stato utilizzato come solvente di estrazione. Dopo l'estrazione, gli estratti sono stati trasferiti in un pallone da evaporazione e per ottenere un recupero totale è stata risciacquata la vial di raccolta tre volte con etanolo. Gli estratti sono stati quindi evaporati a 37 °C utilizzando un evaporatore rotante e ridisciolti in 10 ml di eptano. Al fine di minimizzare l'umidità all'interno dei campioni da analizzare è stato aggiunto solfato di sodio. Gli estratti in eptano sono stati poi filtrati e inseriti in vials per l'autocampionatore HPLC.

Gli acidi grassi liberi (FFAs) sono stati analizzati utilizzando una tecnica HPLC in fase normale (NP) (Waters Alliance 2690 Separations Module) accoppiata a un rivelatore ELSD (Waters 2420 ELSD, Waters; Milford, MA, USA). Gli FFAs sono stati separati utilizzando una colonna di diolo LiChrosorb (3 x100 mm, 5 μm particles, VDS Optilab Chromatographie Technik GmbH; Berlin, Germany) con un'eluizione a gradiente utilizzando i solventi A (0,1 % di acido acetico in eptano) e B (0,1 % di acido acetico e 3 % di 2-propanolo in eptano). Il gradiente era: 0–5 min (97:3), 5–15 min (da 97:3 a 0:100), 15–35 min (0:100), 35–40 min (da 0:100 a 97:3), 40–50 min (97:3). Gli FFAs sono stati quantificati utilizzando una retta di calibrazione con standard

esterno di acido oleico (Nu-Check-Prep, Elysian, MN, USA). Le integrazioni e l'elaborazione dei risultati delle analisi sono state eseguite con il software Empower 3.

3.1.4. Ottimizzazione dell'analisi HS-SPME/GC-MS dei composti volatili

Per l'estrazione e l'analisi dei composti volatili è stata utilizzata una *gascromatografia* accoppiata a spettrometria di massa con tecnica di *microestrazione* in fase solida dello spazio di testa (HS-SPME/GC-MS) come descritto in Lampi et al., (2020). 2 g di ciascun campione sono stati pesati e inseriti all'interno delle vial per SPME da 20 ml. Sono stati immediatamente posizionati sul vassoio HS-SPME, che era stato precedentemente raffreddato a 4°C. La vial contenente il campione è stata spostata automaticamente all'interno del forno per un tempo di incubazione pari a 20 minuti a 50°C. Dopodiché la fibra è stata esposta nello spazio di testa per un tempo di estrazione di 30 minuti alla stessa temperatura. Durante l'incubazione e l'estrazione i campioni erano sottoposti ad agitazione (250 rpm) per facilitare il trasferimento degli analiti nello spazio di testa. Dopo la fase di estrazione la fibra è stata trasferita nel setto di silicone del GC per il desorbimento (10 minuti a 250 °C). L'iniezione è stata effettuata in modalità splitless e il gas di trasporto utilizzato era l'elio (velocità di flusso pari a 0,7 mL/min). La rampa di temperatura del forno è stata la seguente: nei primi 5 min 40°C; a seguire 5 °C/min fino al raggiungimento di 200°C; infine 10 min a 200°C. La spettrometria di massa è stata eseguita in modalità di ionizzazione elettronica (EI) a 70eV, con la temperatura della sorgente ionica impostata a 230 °C e la temperatura del quadrupolo a 150 °C. L'intervallo di scansione m/z è stato di 40-300 amu. L'analisi dei composti volatili è stata effettuata confrontando i loro spettri MS (TIC da 40 a 300 m/z) con i database Wiley 7N (Wiley Registry™ of Mass Spectral Data, 7th Edition). I risultati sono stati elaborati come aree del picco ($counts \times s \times 10^5$) dei campioni triplicati. I picchi sono stati integrati manualmente e quelli considerati come contaminanti e la cui identificazione non era chiara sono stati esclusi dall'elaborazione.

3.2. Risultati e discussione

3.2.1. Risultati del primo set di campioni

Dopo l'analisi degli FFA, i dati sono stati elaborati e processati tramite il software Empower 3. I picchi sono stati integrati manualmente ed è stata costruita una retta di calibrazione per la quantificazione degli acidi grassi. La retta di calibrazione è stata realizzata utilizzando soluzioni di standard esterno di acido oleico (3,987 mg/ml in eptano). Gli acidi grassi liberi sono stati separati come due picchi (Figura 64). Il primo picco (FFA1) comprendeva l'acido palmitico (16:0) e l'acido oleico (18:1) e il secondo (FFA2) l'acido linoleico (18:2) e l'acido α -linolenico (18:3).

I risultati dell'analisi quantitativa degli FFAs del primo set di campioni sono riportati in Tabella 14. Gli FFAs sono stati identificati in tutti i campioni analizzati. Come si può osservare dalla Tabella 14, nel campione

“control slurry” il contenuto degli acidi grassi liberi totali è risultato pari a 1.1 mg/g, composto dall’81% di acido palmitico (16:0) e oleico (18:1) e solo dal 19% di acido linoleico (18:2) e α -linolenico (18:3). Il campione “enzymatic dextran” aveva un contenuto di FFAs totale di 1.3 mg/g, leggermente maggiore rispetto a quello di controllo. Tutti i campioni che erano stati sottoposti a fermentazione mostravano dei livelli di FFAs di gran lunga più elevati rispetto ai due precedenti (campioni non fermentati) con un range tra 1.8 e 2.3 mg/g e inoltre la composizione degli acidi grassi era alterata e consisteva del 49–56% di FFA1 (acidi palmitico e oleico) e del 44–51% di FFA2 (acidi linoleico e α -linolenico). L’acido linoleico rappresentava l’acido grasso più abbondante presente nei campioni di fave fermentati, seguito dall’acido oleico. Il contenuto di FFA totali è risultato maggiore dopo 24 ore dall’inizio della fermentazione; inoltre, in “11.4h dextran Pos” il contenuto degli FFA totali era minore rispetto a quello in “11.4h dextran Neg” dimostrando che la presenza di destrano riduce la quantità degli acidi grassi. Il contenuto e la composizione degli acidi grassi nei campioni estrusi erano simili tra loro in tutti i campioni (1,8-2,0 mg/g) e il principale acido grasso rilevato era l’acido linoleico.

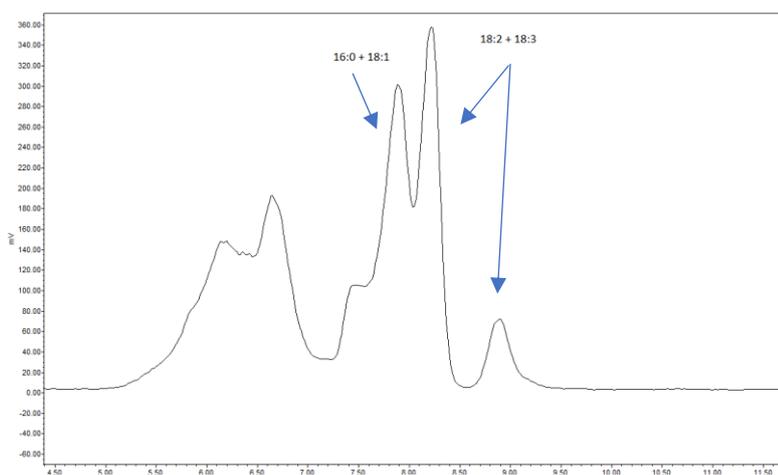


Figura 64: FFAs identificati nei campioni: acido palmitico (16:0) acido oleico (18:1) acido linoleico (18:2) e acido α -linolenico (18:3).

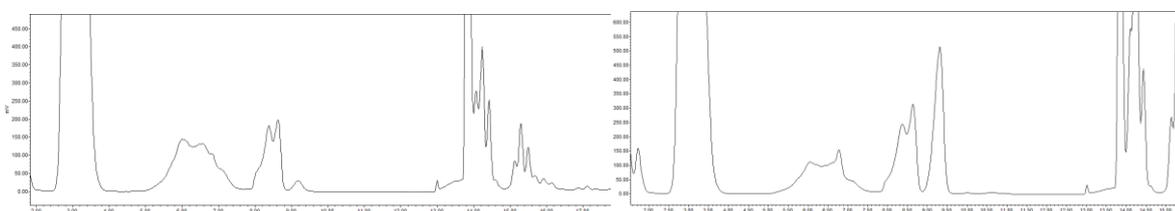


Figura 65: Confronto tra i profili cromatografici degli FFAs del campione “control slurry” (a sinistra) e “24 h dextran Pos” (a destra).

Tabella 14: Risultati delle analisi dei FFAs sul 1° set di campioni di concentrati proteici di fave.

| Campioni | FFA1 (16:0+18:1) (mg/g) | FFA2 (18:2+18:3) (mg/g) | FFA totali (mg/g) |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| 1° Gruppo (campioni di controllo e fermentati) | | | |
| Control slurry | 0,90 ± 0,037 | 0,21 ± 0,014 | 1,11 ± 0,05 |
| Enzymatic dextran | 0,82 ± 0,033 | 0,49 ± 0,003 | 1,31 ± 0,032 |
| 11.4h dextran Pos | 1,00 ± 0,034 | 0,78 ± 0,021 | 1,78 ± 0,052 |
| 11.4h dextran Neg | 1,11 ± 0,03 | 1,06 ± 0,088 | 2,17 ± 0,104 |
| 24h dextran Pos | 1,12 ± 0,102 | 1,16 ± 0,057 | 2,28 ± 0,13 |
| 2° Gruppo (campioni estrusi) | | | |
| control extrudate | 0,72 ± 0,068 | 1,16 ± 0,057 | 1,88 ± 0,119 |
| enzymatic dextran extrudate | 0,77 ± 0,058 | 1,19 ± 0,057 | 1,96 ± 0,106 |
| 11.4h dextran Pos Ext | 0,75 ± 0,115 | 1,01 ± 0,034 | 1,77 ± 0,147 |
| 11.4h dextran Neg Ext | 0,74 ± 0,141 | 1,21 ± 0,0536 | 1,95 ± 0,188 |

Per quanto riguarda la componente volatile, dopo le analisi i dati sono stati elaborati mediante software ChemStation. Ciascun picco è stato integrato manualmente per l'identificazione dei composti che è stata eseguita confrontando i loro spettri MS con la libreria Wiley 7N (Wiley Registry™ of Mass Spectral Data, 7th Edition).

Come si osserva dal confronto in Figura 66, già visibilmente si possono cogliere significative differenze tra i campioni prima e dopo la fermentazione: dopo 24 ore dall'inizio della fermentazione i campioni sono caratterizzati da un profilo cromatografico più ricco.

Nella Tabella 15 sono riportati tutti i composti volatili identificati con i rispettivi tempi di ritenzione (rt), nomi, possibile origine e descrizione sensoriale. Tra i composti trovati molti derivano dalla fermentazione, come l'etanolo, 2,3-butanedione, l'etilacetato, l'acido acetico, il pentanale, l'acido isovalerico e il limonene. Alcuni

dei volatili sono invece i prodotti dell'ossidazione lipidica, tra i più importanti ci sono l'esanale, il 2-esenale, l'eptanale, il 2-pentilfurano e il nonanale.

In totale tra i campioni di controllo, fermentati ed estrusi sono stati trovati 34 composti volatili appartenenti alle categorie: acidi organici, alcani, alcoli, aldeidi, chetoni, composti aromatici, esteri e terpeni. La maggior parte dei composti identificati erano alcoli e aldeidi, seguiti da alcani e composti aromatici. Come si può osservare dalla Tabella 16, il numero maggiore di sostanze è stato rilevato nei campioni di fave estrusi (22-24 composti), seguiti da quelli fermentati (16 composti) e infine dai due di controllo (10-12 composti). Le sostanze etil acetato, isoamyl isovalerate, acido acetico e acido isovalerico sono stati trovati nei campioni fermentati, ma non in quelli di controllo. Alcune sostanze erano caratterizzanti i campioni facenti parte del gruppo di fermentazione come l'alcol isobutilico, il 3-esen-1-olo, il 2-esenale, l'acetato di isoamile, l'estere etilico dell'acido esanoico, il 3-idrossi-2-butanone e il 2,3-butanedione; altri composti come il 2- e 3-metil-butanale, la benzaldeide, il 2-etilfurano, il 2-butilfurano, il 2-eptanone, l'ottano, il trimetil-2,3,5-eptano, il trimetil-2,3,4-esano, il 3-metil-decano, il 5-metil-undecano, e il docosano erano invece presenti solo nei campioni estrusi.

Il campione "control slurry" aveva i più alti livelli di esanale (aree di picco di 257×10^5), seguito dall'*1-esanolo* (50×10^5), mentre i livelli più bassi di esanale sono stati osservati nei campioni di fave dopo il processo di fermentazione. I livelli più elevati del composto 1-esanolo sono stati osservati dopo la fermentazione del primo gruppo di campioni; al contrario durante l'estrusione il contenuto di questo composto è diminuito. Tra tutti, i campioni, "24h dextran Pos", "11.4h dextran Pos" e "11.4h dextran Neg" possedevano i livelli più elevati di 1-esanolo, etanolo e acetato di etile. In particolare, l'acetato di etile non era presente nei campioni di controllo ma solo in quelli fermentati; i livelli maggiori di questa sostanza sono stati rilevati nel campione sottoposto a 24 ore di fermentazione. Inoltre, il campione "24h dextran Pos" aveva i più alti livelli di acidi acetico e isovalerico e 2,3-butandione (quest'ultimo identificato solo in questo campione). I livelli degli acidi acetico e isovalerico sono aumentati dopo l'estrusione in tutti i campioni. I composti altamente caratterizzanti il profilo volatile degli estrusi erano il 2-pentilfurano e l'esanale. Il nonanale, prodotto dell'ossidazione lipidica, era maggiormente presente nei campioni di controllo; difatti nei campioni "11.4h dextran Neg" e "24h dextran Pos" (del primo gruppo) non è stata rilevata questa sostanza; dopo l'estrusione i livelli di nonanale sono aumentati in tutti i campioni. Il comportamento dell'esanale durante l'estrusione dipendeva dal campione (diminuisce nei campioni di controllo, mentre aumenta in quelli fermentati); per il 2-pentilfurano, invece, è stato osservato un aumento significativo dopo l'estrusione in tutti i campioni.

Tabella 15: Composti volatili identificati nei campioni del 1° set di concentrati proteici di fave; le possibili origini e le descrizioni degli aromi provengono dalla fonte (Pétel et al., 2017).

| rt | Compound name | Possible origins | Odour description |
|-------|---|---------------------------------|---|
| 3.59 | Ethanol | Fermentation | Alcohol |
| 4.52 | Iso butyl alcohol | Fermentation | Ethereal, winy, alcohol |
| 6.41 | 2,3-Butanedione | Fermentation | Creamy, buttery |
| 6.70 | Ethyl Acetate | Fermentation | Ethereal, Fruity, Sweet, Grass, Green |
| 8.35 | Butanal, 3-methyl | Fermentation, Maillard reaction | Ethereal, Aldehydic, Chocolate, Peach, Fatty, Sour, Roasted Bread, Fruity, Fermented, Corn flakes |
| 8.60 | Butanal, 2-methyl | Fermentation, Maillard reaction | Musty, Cocoa, Coffee, Nut, Malty, Fruity, Sweet, Roasted |
| 8.61 | Acetic acid | Fermentation | Vinegar, sour 2-butanone |
| 9.21 | Furan, 2-ethyl | | Sweet, Burnt, Earthy Malty |
| 9.84 | Pentanal | Fermentation | Fermented, Bread, Fruity, Nutty, Berry |
| 12.95 | 1-pentanol | Fermentation, lipid oxidation | Oil, Sweet, Balsamine, Chemical mint |
| 11.77 | 2-butanone,3-hydroxy- | Lipid oxidation/fermentation | Sweet, creamy buttery, |
| 12.03 | 1-Butanol, 3-methyl- | Lipid oxidation/fermentation | Alcohol, fermented, fruity, whiskey |
| 12.14 | Octane | | |
| 13.91 | Hexanal | Lipid oxidation | Green, fatty, grassy |
| 15.48 | Ethylbenzene | | |
| 16.30 | 2-butylfuran | | |
| 16.34 | 2-hexenal | Lipid oxidation | Green, fatty |
| 16.46 | 3-hexen-1-ol, (Z) | | Green, leaf |
| 16.77 | 1-hexanol | Lipid oxidation/fermentation | Oily, alcohol, green |
| 17.03 | Iso-VALERIC ACID | Fermentation | Pungent cheesy, sweaty smell (foot) |
| 17.22 | 2-heptanone | | Fruity, Spicy, Sweet, Grass, Coconut, Woody, Cinamon, Soap |
| 17.51 | N-HEPTANAL | Lipid oxidation | Fatty, green, grassy |
| 19.45 | Hexane,2,3,4-trimethyl- | | |
| 19.63 | Heptane 3,3,5-trimethyl- | | |
| 19.88 | Furan,2-pentyl- | Lipid oxidation | Green, earthy, beany |
| 20.40 | Hexanoic acid, ethyl ester | | |
| 20.42 | DELTA.3-Carene | | |
| 20.47 | Benzaldehyde | Lipid oxidation/fermentation | Almond, burnt sugar |
| 21.12 | dl-Limonene | Fermentation | Citrus, lemon |
| 22.94 | Decane 3-methyl | | |
| 23.92 | Butanoic acid, 3-methyl-, 3-methylbutyl ester | | |
| 23.93 | Undecanoic acid, 5-methyl- | | |
| 24.51 | Nonanal | Lipid oxidation | Rose, citrus, orange |
| 31.70 | Docosane | | |

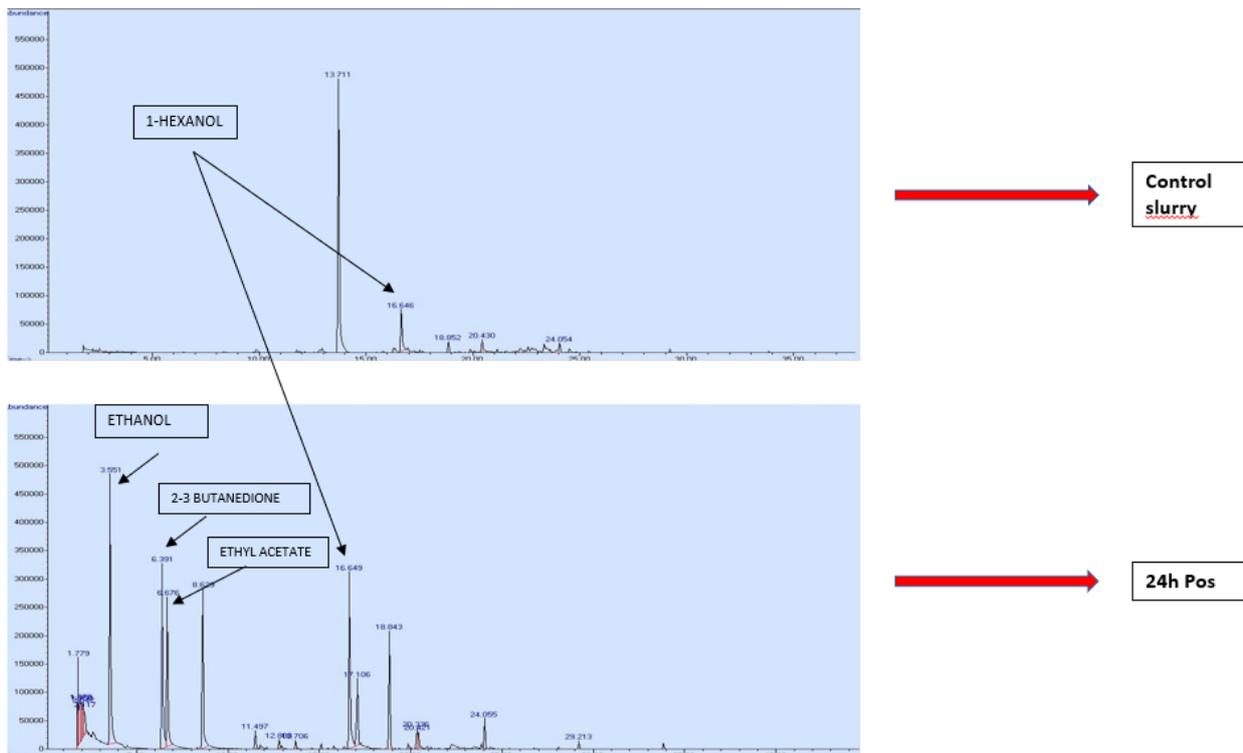


Figura 66: Confronto tra i profili aromatici dei due campioni “control slurry” (in alto) e “24 dextran Pos” (in basso).

Tabella 16: Aree dei picchi (10^5) dei composti volatili nei campioni di concentrati proteici di fave prima e dopo la fermentazione e l'estrusione (nd: *not detected*).

| | Gruppo di campioni fermentati | | | | | Gruppo di campioni estrusi | | | |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Control slurry | Enzymatic dextran | 11.4h dextran Pos | 11.4h dextran Neg | 24h dextran Pos | Control slurry Ext | Enzymatic dextran Ext | 11.4h dextran Pos Ext | 11.4h dextran Neg Ext |
| Acetic acid | nd | nd | 17.3 ± 7.4 | 35.8 ± 5.9 | 142.6 ± 21.4 | 0.6 ± 0.2 | 1.5 ± 0.2 | 72.2 ± 23.9 | 65.0 ± 10.1 |
| Isovaleric acid | nd | nd | 7.9 ± 1.6 | 9.8 ± 0.3 | 67.7 ± 3.2 | 2.7 ± 1.5 | 2.9 ± 1.2 | 15.9 ± 4.4 | 16.9 ± 1.9 |
| Ethanol | nd | 23.7 ± 3.4 | 62.6 ± 18.5 | 48.9 ± 4.1 | 211.5 ± 8.7 | nd | 22.0 ± 5.8 | 8.4 ± 2.3 | 12.2 ± 2.2 |
| Isobutyl alcohol | nd | nd | 2.5 ± 0.4 | 2.9 ± 0.3 | nd | nd | nd | nd | nd |
| 3-Methyl-1-butanol | 2.0 ± 0.9 | 1.9 ± 0.4 | 3.7 ± 1.7 | 4.6 ± 0.7 | 1.9 ± 0.1 | nd | 0.4 ± 0.1 | nd | 1.1 ± 0.5 |
| 1-Pentanol | 3.0 ± 0.7 | 2.0 ± 0.1 | 4.3 ± 0.3 | 2.8 ± 0.1 | 1.8 ± 0.3 | 4.9 ± 1.5 | 1.9 ± 0.5 | 1.7 ± 0.4 | 1.9 ± 0.5 |
| 1-Hexanol | 49.5 ± 13.8 | 83.0 ± 12.3 | 236.8 ± 75.2 | 206.7 ± 17.1 | 154.6 ± 17.3 | 6.5 ± 2.4 | 3.4 ± 2.4 | 21.7 ± 3.9 | 34.1 ± 3.8 |
| 3-Hexen-1-ol | 4.4 ± 0.4 | 8.6 ± 1.0 | 6.8 ± 1.7 | 6.2 ± 0.5 | 1.8 ± 0.2 | nd | nd | nd | nd |
| 2-Methyl-butanol | nd | nd | nd | nd | nd | 1.2 ± 0.7 | 0.8 ± 0.3 | nd | nd |
| 3-Methyl-butanol | nd | nd | nd | nd | nd | 2.2 ± 1.2 | 2.0 ± 1.1 | 7.7 ± 3.6 | 5.7 ± 1.1 |
| Pentanal | 1.5 ± 0.4 | nd | nd | nd | nd | 6.7 ± 1.9 | 3.5 ± 0.4 | 2.5 ± 0.3 | 3.9 ± 0.2 |
| Heptanal | 1.6 ± 0.3 | nd | nd | nd | nd | 15.6 ± 3.9 | 12.8 ± 4.2 | 13.5 ± 3.0 | 15.4 ± 2.0 |
| Hexanal | 275.3 ± 54.4 | 112.9 ± 20.1 | 35.4 ± 5.5 | 15.8 ± 3.8 | 7.6 ± 1.4 | 143.2 ± 35.7 | 89.6 ± 8.2 | 98.0 ± 20.7 | 113.9 ± 14.2 |
| 2-Hexenal | 3.9 ± 0.5 | 3.2 ± 0.8 | 1.6 ± 0.4 | 0.7 ± 0.3 | nd | nd | nd | nd | nd |
| Nonanal | 3.3 ± 1.2 | 1.5 ± 0.3 | 0.5 ± 0.04 | nd | nd | 7.6 ± 2.0 | 7.2 ± 2.4 | 8.4 ± 0.4 | 7.7 ± 1.1 |
| Octane | nd | nd | nd | nd | nd | 6.5 ± 2.3 | 3.9 ± 1.0 | 3.3 ± 0.5 | 3.9 ± 0.7 |
| Trimethyl-2,3,5-heptane | nd | nd | nd | nd | nd | 3.2 ± 1.2 | 1.7 ± 0.2 | 3.5 ± 0.7 | 4.0 ± 0.8 |
| Trimethyl-2,3,4-hexane | nd | nd | nd | nd | nd | 1.7 ± 0.6 | 1.2 ± 0.3 | 2.0 ± 0.7 | 1.9 ± 0.4 |
| 3-Methyl-decane | nd | nd | nd | nd | nd | 7.2 ± 2.8 | 3.8 ± 0.6 | 10.5 ± 3.6 | 9.0 ± 2.4 |
| 5-Methyl-undecane | nd | nd | nd | nd | nd | 16.2 ± 4.3 | 10.4 ± 2.1 | 31.6 ± 9.8 | 28.4 ± 5.5 |
| Docosane | nd | nd | nd | nd | nd | 0.6 ± 0.1 | 0.5 ± 0.3 | 0.8 ± 0.2 | 0.6 ± 0.1 |
| Ethylbenzene | nd | nd | 0.9 ± 0.2 | 1.1 ± 0.2 | nd | 7.5 ± 5.1 | nd | nd | 0.9 ± 0.1 |
| Benzaldehyde | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 9.3 ± 2.4 | 11.1 ± 0.3 |
| 2-Ethylfuran | nd | nd | nd | nd | nd | 1.0 ± 0.8 | nd | 3.9 ± 0.6 | 4.5 ± 1.1 |
| 2-Butylfuran | nd | nd | nd | nd | nd | 3.0 ± 0.8 | 1.8 ± 0.2 | 2.7 ± 0.3 | 2.8 ± 0.3 |
| 2-Pentylfuran | 2.7 ± 1.1 | 0.7 ± 0.2 | 1.9 ± 0.6 | 2.7 ± 0.1 | 4.1 ± 0.3 | 172.1 ± 31.4 | 143.2 ± 38.1 | 183.4 ± 20.5 | 212.8 ± 14.3 |
| Ethyl acetate | nd | nd | 78.8 ± 18.1 | 76.2 ± 6.1 | 128.2 ± 16.6 | nd | nd | 2.8 ± 1.3 | 6.4 ± 2.0 |
| Isoamyl isovalerate | nd | nd | 1.8 ± 0.3 | 4.0 ± 0.3 | 2.5 ± 0.3 | nd | nd | nd | nd |
| Hexanoic acid ethyl ester | nd | nd | nd | nd | 11.3 ± 1.1 | nd | nd | nd | nd |
| 3-Hydroxy-2-butanone | nd | nd | nd | nd | 16.4 ± 2.2 | nd | nd | nd | nd |
| 2,3-Butanedione | nd | nd | nd | nd | 161.7 ± 20.8 | nd | nd | nd | nd |
| 2-Heptanone | nd | nd | nd | nd | nd | 4.8 ± 1.6 | 3.6 ± 1.7 | 4.9 ± 1.9 | 7.5 ± 1.0 |
| Delta-3-carene | 8.4 ± 0.5 | 4.0 ± 0.9 | 7.8 ± 1.5 | 13.9 ± 0.9 | 12.1 ± 0.7 | 13.5 ± 3.0 | 5.0 ± 1.0 | nd | nd |
| D-limonene | 2.3 ± 0.7 | nd | nd | 1.7 ± 0.1 | 0.8 ± 0.1 | 5.8 ± 1.2 | nd | nd | nd |

3.2.2. Risultati del secondo set di campioni

Anche in questo caso, come per il set precedente, i dati per la quantificazione degli acidi grassi sono stati elaborati con il software Empower 3. I picchi sono stati integrati manualmente per costruire una curva di calibrazione al fine di determinare quantitativamente il contenuto di acidi grassi in ciascun campione. Per costruire la curva di calibrazione è stata utilizzata una soluzione di standard esterno di acido oleico (3,987 mg/ml in eptano). Gli acidi grassi liberi sono stati separati come due picchi (Fig.). Il primo picco (FFA1) era costituito da acido palmitico (16:0) e acido oleico (18:1) e il secondo picco (FFA2) era costituito da acido linoleico (18:2) e acido α -linolenico (18:3). In tutti i campioni sono stati rilevati gli FFAs. Dai risultati delle analisi condotte si può osservare come le tre variabili del trattamento enzimatico prese in considerazione nel disegno sperimentale siano importanti per ottenere elevati livelli di FFAs e come queste influiscano ognuna in maniera diversa negli esperimenti. Nella Tabella 17 sono riportati i risultati dei 9 campioni di controllo (prima del trattamento enzimatico) dei concentrati proteici di fave analizzati. Come si può osservare anche dal grafico a barre in Figura 67, il più alto contenuto totale di FFAs è presente nel campione che è stato sottoposto a un tempo di incubazione di 8 ore e un contenuto di acqua del 65 % (2.10 ± 0.06) seguito dal campione con lo stesso contenuto di acqua (65%) e un tempo di incubazione pari a 5 minuti (2.03 ± 0.17). Sembra quindi che minore è il contenuto di acqua e maggiore sono i livelli di FFAs totali. Il campione con il contenuto di FFAs totale più basso (1.19 ± 0.53) è stato quello esposto al minore tempo di incubazione (pari a 2 ore) e un contenuto di acqua intermedio (70%). I più alti livelli di acido palmitico (16:0) e oleico (18:1) si trovano nel campione caratterizzato da un tempo di incubazione di 5 ore e un contenuto di acqua più alto pari a 75% (1.08 ± 0.16); i livelli maggiori degli acidi linoleico (18:2) e α -linolenico (18:3) si trovano nel campione con tempo di 8 ore e contenuto di acqua 65% (1.06 ± 0.03), campione caratterizzato comunque anche da un alto livello di FFA1 (1.04 ± 0.03).

Tabella 17: Risultati degli FFAs dei campioni di controllo appartenenti al 2° set.

| Campioni di controllo | di | Tempo (h) | Contenuto di acqua (%) | FFA1 (16:0+18:1) (mg/g) | FFA2 (18.2+18:3) (mg/g) | FFA totali (mg/g) |
|-----------------------|----|-----------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| 16 | | 2 | 65 | 0.82 ± 0.04 | 1.01 ± 0.03 | 1.83 ± 0.01 |
| 17 | | 2 | 70 | 0.56 ± 0.24 | 0.63 ± 0.29 | 1.19 ± 0.53 |
| 18 | | 5 | 70 | 0.78 ± 0.08 | 0.81 ± 0.08 | 1.65 ± 0.06 |
| 19 | | 2 | 75 | 0.86 ± 0.03 | 0.85 ± 0.01 | 1.71 ± 0.02 |
| 20 | | 5 | 75 | 1.08 ± 0.16 | 0.90 ± 0.01 | 1.98 ± 0.15 |
| 21 | | 8 | 65 | 1.04 ± 0.03 | 1.06 ± 0.03 | 2.10 ± 0.06 |
| 22 | | 8 | 70 | 0.91 ± 0.09 | 0.91 ± 0.05 | 1.82 ± 0.14 |
| 23 | | 8 | 75 | 0.73 ± 0.16 | 1.01 ± 0.09 | 1.74 ± 0.07 |
| 24 | | 5 | 65 | 1.01 ± 0.07 | 1.02 ± 0.11 | 2.03 ± 0.17 |

| | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|

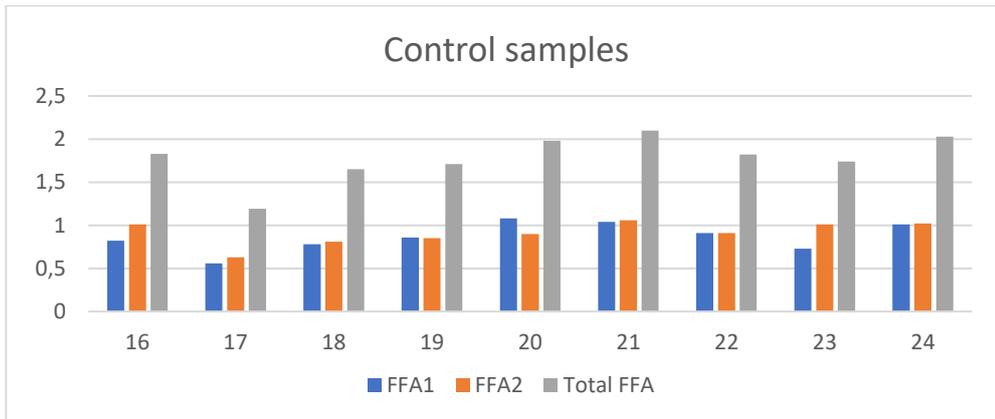


Figura 67: Grafico a barre dei risultati degli FFAs dei campioni di controllo (2° set).

Vediamo ora quali sono i 15 risultati dei FFAs ottenuti nei campioni di concentrati proteici di fave dopo il trattamento enzimatico risultanti dal disegno sperimentale. Come si può osservare dalla Tabella 18 e dal grafico a barre (Figura 68), il contenuto maggiore degli acidi grassi liberi totali è stato osservato nell'esperimento n. 3 (2.22 ± 0.17) che prevedeva un tempo di incubazione pari a 2 ore, un contenuto di acqua di 65% e un dosaggio enzimatico di 10000 nkatal. Lo stesso esperimento ha previsto anche il maggior contenuto di FFA2, mentre i livelli di FFA1 più elevati si trovano nel campione n. 1 (0.97 ± 0.03) con un tempo di incubazione di 2 ore, basso dosaggio enzimatico e contenuto di acqua intermedio. Anche in questo caso, come nei campioni di controllo, i livelli maggiori di FFA totale si riscontrano nell'esperimento che ha previsto un contenuto di acqua minore. D'altra parte, i livelli di FFA totale più bassi sono stati trovati nel campione n.2 (0.90 ± 0.4) il cui tempo di incubazione era di 2 ore e il contenuto di acqua del 70%, valori corrispondenti a quelli del campione di controllo con il più basso livello di FFA totale. Quindi i risultati dimostrano che un tempo di incubazione troppo piccolo e allo stesso tempo un livello di acqua intermedio portano a contenuti di FFAs bassi. Per quanto riguarda la variabile dosaggio, si può dire che una dose minore dell'enzima durante il trattamento porta a maggiori livelli di FFAs, al contrario una dose maggiore può recare minori quantità di acidi grassi nei campioni.

Tabella 18: Risultati degli FFAs dei campioni dopo il trattamento con enzima appartenenti al 2° set.

| Campioni trattati enzimaticamente | Tempo (h) | Dosaggio (nkatal) | Contenuto di acqua (%) | FFA1 (16:0+18:1) (mg/g) | FFA2 (18.2+18:3) (mg/g) | Total FFA (mg/g) |
|-----------------------------------|-----------|-------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|
| 1 | 2 | 5000 | 70 | 0.97 ± 0.03 | 0.92 ± 0.01 | 1.89 ± 0.04 |
| 2 | 2 | 15000 | 70 | 0.42 ± 0.13 | 0.48 ± 0.27 | 0.90 ± 0.4 |
| 3 | 2 | 10000 | 65 | 0.92 ± 0.13 | 1.30 ± 0.05 | 2.22 ± 0.17 |
| 4 | 2 | 10000 | 75 | 0.64 ± 0.21 | 0.65 ± 0.19 | 1.29 ± 0.4 |
| 5 | 5 | 5000 | 65 | 0.85 ± 0.1 | 0.82 ± 0.02 | 1.67 ± 0.11 |
| 6 | 5 | 5000 | 75 | 0.85 ± 0.04 | 0.76 ± 0.02 | 1.61 ± 0.05 |
| 7 | 5 | 15000 | 65 | 0.77 ± 0.02 | 0.85 ± 0.01 | 1.62 ± 0.03 |
| 8 | 5 | 15000 | 75 | 0.77 ± 0.07 | 0.68 ± 0.04 | 1.46 ± 0.1 |
| 9 | 8 | 5000 | 70 | 0.81 ± 0.06 | 0.78 ± 0.03 | 1.59 ± 0.08 |
| 10 | 8 | 15000 | 70 | 0.79 ± 0.04 | 0.76 ± 0.02 | 1.55 ± 0.03 |
| 11 | 8 | 10000 | 65 | 0.81 ± 0.16 | 0.66 ± 0.4 | 1.48 ± 0.5 |
| 12 | 8 | 10000 | 75 | 0.80 ± 0.02 | 0.73 ± 0.03 | 1.53 ± 0.04 |
| 13 | 5 | 10000 | 70 | 0.79 ± 0.05 | 0.78 ± 0.03 | 1.57 ± 0.03 |
| 14 | 5 | 10000 | 70 | 0.64 ± 0.16 | 0.81 ± 0.01 | 1.45 ± 0.17 |
| 15 | 5 | 10000 | 70 | 0.73 ± 0.05 | 0.77 ± 0.02 | 1.50 ± 0.03 |

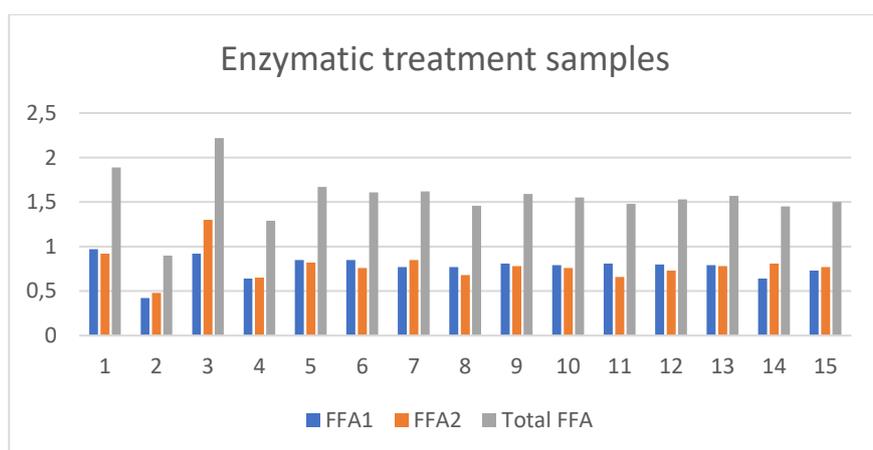


Figura 68: Grafico a barre dei risultati degli FFAs dei campioni dopo il trattamento con enzima (2° set).

Si possono infine osservare i risultati delle analisi degli acidi grassi nei campioni dopo l'estrusione. A tal fine sono stati analizzati solo 4 campioni estrusi (2 di controllo e 2 trattati enzimaticamente) ciascuno dei quali differiva nel contenuto di acqua (60% e 62,5%).

Come si osserva dai risultati in Tabella 19, il contenuto degli acidi grassi dopo l'estrusione dipende dal contenuto di acqua e a tal fine sono necessarie ulteriori prove per poter avere dei risultati soddisfacenti. Comunque, in tutti i campioni i livelli degli acidi linoleico (18:2) e α -linolenico (18:3) erano maggiori rispetto a quelli degli acidi palmitico (16:0) e oleico (18:1).

Tabella 19: Risultati degli FFAs dei campioni appartenenti al 2° set dopo il processo di estrusione.

| Campioni estrusi | FFA1 (mg/g) | FFA2 (mg/g) | Total FFA (mg/g) |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 62,5% 1 | 0.99 \pm 0.360 | 1.72 \pm 0.007 | 2.71 \pm 0.356 |
| 60% 2 | 1.13 \pm 0.04 | 1.60 \pm 0.011 | 2.73 \pm 0.05 |
| Extruded samples | | | |
| 62,5% 3 | 1.22 \pm 0.054 | 1.77 \pm 0.019 | 2.99 \pm 0.035 |
| 60% 4 | 0.64 \pm 0.360 | 0.84 \pm 0.63 | 1.48 \pm 0.985 |

Per i componenti volatili, i dati sono stati processati anche in questo caso con il software ChemStation. Ogni picco è stato integrato manualmente per l'identificazione delle sostanze confrontando gli spettri MS con la libreria Wiley 7N (Wiley Registry™ of Mass Spectral Data, 7th Edition).

In Tabella 20 sono riportate le sostanze volatili rilevate nei campioni. In totale sono stati identificati 31 composti volatili appartenenti alle classi: acidi organici, alcani, alcoli, aldeidi, chetoni, composti aromatici, esteri e terpeni. Come si può osservare nella Tabella 20, da questa prima analisi preliminare, tutte le sostanze presenti nei campioni di controllo erano anche presenti dopo il trattamento enzimatico. Quindi non sussiste un cambiamento significativo nel flavour prima e dopo il trattamento con enzima. In particolar modo si possono osservare in questi campioni composti come il 2-pentil furano, l'1-octen-3-olo, l'1-esanolo e l'esanale responsabili degli odori sgradevoli e degli off-flavours. I composti esanale, 2-esenale, l'eptanale, il 2-pentilfurano e il nonanale sono i prodotti dell'ossidazione lipidica e sono presenti in tutte le tipologie di campione (ad eccezione del 2-esenale non presente in quelli estrusi). I campioni dopo l'estrusione erano caratterizzati da un maggior numero di composti volatili rispetto a prima del processo di estrusione. Solo i composti 2-esenale e l'1,3, bis (1,1-dimetiletil-) benzene sono stati identificati nei campioni di controllo e in quelli trattati con enzima ma non sono stati rilevati dopo l'estrusione. I campioni dopo l'estrusione erano caratterizzati da un maggior numero di sostanze, tra cui i composti del naftalene, il cis-2-decalone, probabilmente derivanti dal macchinario di estrusione utilizzato.

Tabella 20: Composti volatili con relativi tempi di ritenzione identificati in tutti i campioni del 2° set analizzato (C: campione di controllo; ET: campione trattato enzimaticamente; E: campione estruso).

| Rt (min) | Nome dei composti volatili | Tipologia di campione |
|----------|-------------------------------------|-----------------------|
| 3,544 | Ethanol | E |
| 6,355 | Butanal | E |
| 8,343 | butanal,3-methyl- | E |
| 8.605 | butanal,2-methyl | E |
| 9.198 | furan,2-ethyl | E |
| 9.722 | 1-penten-3-ol | C,ET,E |
| 9.855 | pentanal | C,ET,E |
| 12.054 | 1-butanol,3-methyl- | C,ET,E |
| 12.468 | octane | C,ET,E |
| 13.212 | 1-pentanol | C,ET,E |
| 14.042 | hexanal | C,ET,E |
| 15.857 | Nonane | E |
| 16.292 | 2-butylfuran | E |
| 16.412 | 2-hexenal | C,ET |
| 16.488 | 3-hexen-1-ol | C,ET,E |
| 16.797 | 1-hexanol | C,ET,E |
| 17.027 | iso-VALERIC ACID | E |
| 17.362 | 2-heptanone | E |
| 17.621 | Heptanal | C,ET,E |
| 19.530 | decane | C,ET,E |
| 19.943 | furan,2-pentyl- | C,ET,E |
| 20.486 | 1-octen-3-ol | C,ET |
| 21.893 | decane,3-methyl | E |
| 22.215 | naphthalene,decahydro- | E |
| 22.815 | Undecane | E |
| 23.793 | naphtalene,decahydro,cis | E |
| 24.064 | naphtalene,decahydro-2-methyl | E |
| 24.534 | Nonanal | C,ET,E |
| 24.658 | 1-methyldecahydronaphtalene | E |
| 24.866 | cis-2-decalone | E |
| 28.413 | benzene,1,3-bis(1,1-dimethylethyl)- | C,ET |

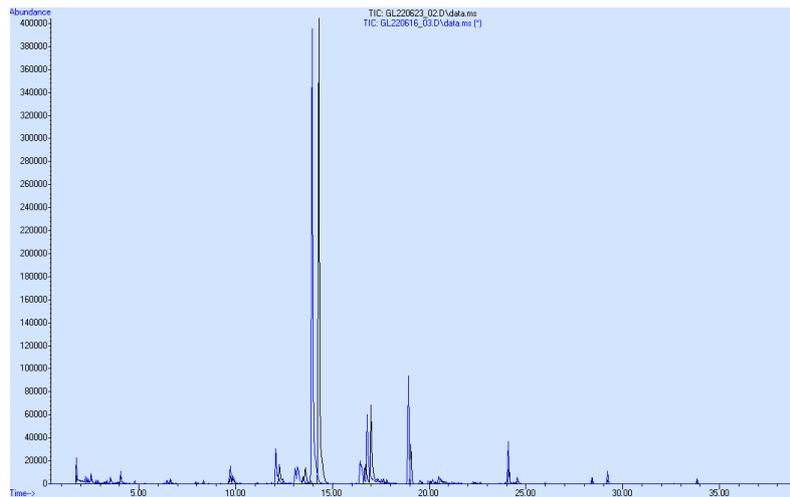


Figura 69: Sovrapposizione dei cromatogrammi dei campioni n. 2 (dopo il trattamento enzimatico) e 17 (prima del trattamento enzimatico): come si può osservare le differenze tra i due profili sono minime.

Per poter osservare come i campioni si suddividono in gruppi sulla base dei composti volatili che li caratterizzano, è stata effettuata un'analisi delle componenti principali al fine di poter individuare le differenze e le similarità tra i campioni e quali variabili potessero spiegare tali differenze (Figura 70).

Nello score plot si può osservare una separazione tra gruppi di campioni con una percentuale di varianza spiegata pari a 73,7% (62,3% sulla prima componente e 11,4% sulla seconda componente principale). Il biplot mostra come i composti identificati possano caratterizzare i campioni di fave in esame. Si può a tal fine osservare un raggruppamento dei due gruppi di campioni di controllo e trattati enzimaticamente, caratterizzati entrambi dagli stessi componenti volatili; tuttavia, si ottiene una separazione tra il gruppo di queste due classi e il gruppo dei campioni estrusi. I campioni dopo l'estrusione sono maggiormente associati alle sostanze appartenenti alla classe degli alcani e dei composti aromatici (come il nonano, l'ottano, il decaidronaftalene, il 2-butilfurano, il 2-etilfurano); al contrario i campioni di fave di controllo e quelli sottoposti a trattamento enzimatico sono maggiormente correlati agli alcoli (ad esempio 1-butanolo, 1-esanolo, 3-esen-1-olo e 1-penten-3-olo).

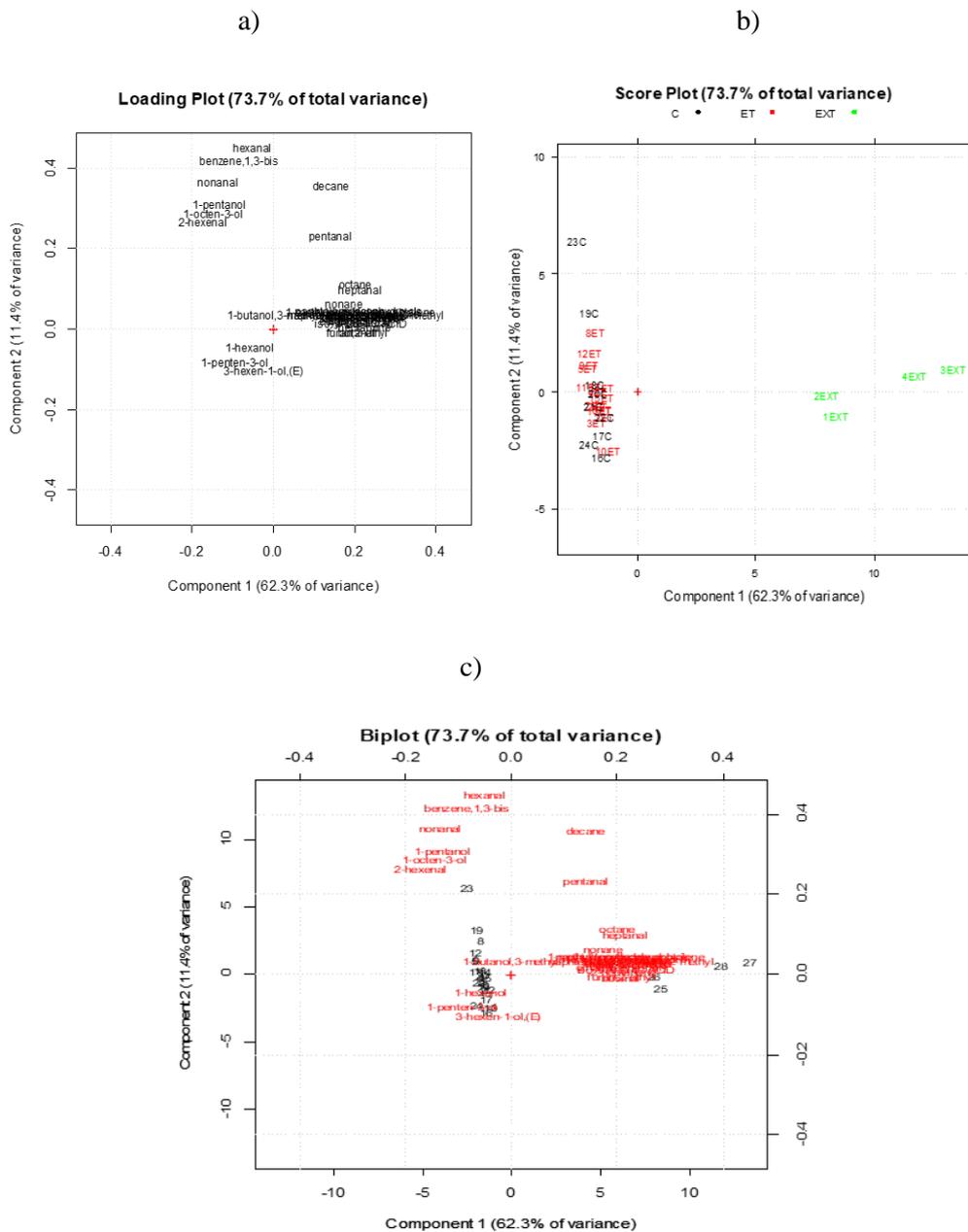


Figura 70: Analisi delle Componenti Principali dei 28 campioni appartenenti al 2° set esaminato. Varianza totale spiegata: 73,7%; varianza spiegata dalla prima componente principale: 11,4%; varianza spiegata dalla seconda componente principale: 11,4%. A) Loading plot; b) Score plot; c) Biplot.

Conclusioni e prospettive future

L'importanza di studiare le proprietà e le tecniche di trasformazione dei prodotti alimentari rappresenta una tematica legata non solo al campo alimentare ma anche ad altri ambiti (chimico, merceologico, forense, biotecnologico, ecc.). Questo interesse è legato alle responsabilità delle industrie e della ricerca alimentare: in primo luogo proteggere e mantenere l'immagine dei propri prodotti a livello globale, e in secondo luogo innovare i processi e i prodotti finali in linea con le esigenze del mercato e dei consumatori. Le sfide del Made in Italy sono rappresentate proprio da tradizione, qualità e innovazione con il compito di promuovere e proteggere le Denominazioni di Origine, valorizzare le produzioni tradizionali, puntare sui fattori tecnologici che influenzano la qualità del prodotto e stabilizzare il rapporto qualità/prezzo. Inoltre, oggi più che mai, l'industria agroalimentare è uno dei settori con il maggiore impatto sociale e ambientale e deve tenere conto del suo importante ruolo nello sviluppo sostenibile dell'intero pianeta. Oggi la sostenibilità alimentare e ambientale sono due dei principali obiettivi della pianificazione dello sviluppo e sono considerati essenziali in piani come l'Agenda 2030 di Sviluppo Sostenibile delle Nazioni Unite e le strategie agroalimentari dell'Unione Europea inserite nel Green Deal Europeo. Alimentazione sostenibile non significa solo garantire la sicurezza alimentare a tutte le persone del pianeta, ma anche promuovere soluzioni ecologiche, ridurre la nostra impronta ambientale e le emissioni di carbonio.

L'obiettivo principale del presente lavoro di tesi è stato quello di valorizzare differenti prodotti presenti sul mercato, dalla pasta alle carni vegetali, fino a prodotti altamente innovativi come i fiori commestibili, per soddisfare le esigenze dei produttori e le aspettative dei consumatori. Lo scopo è stato ottimizzare e studiare metodologie di analisi chimica e statistica per discriminare questi prodotti sul mercato e individuare marcatori che possano essere applicati al controllo di qualità, sicurezza e frodi alimentari. Da un lato, è stato studiato il flavour di questi composti in termini di aspettative e di accettabilità da parte dei consumatori, ovvero dal punto di vista organolettico; dall'altro, sono state studiate anche le proprietà antiossidanti e nutrizionali di questi alimenti in modo che i consumatori, sempre più attenti al benessere, possano effettuare scelte consapevoli.

I dati raccolti nel presente lavoro di tesi sono stati pubblicati in tre articoli su riviste nazionali per la divulgazione dei risultati nella chimica alimentare e nelle tecnologie di produzione dell'industria alimentare. Altri cinque lavori sono in fase di stesura e pubblicazione. Di seguito sono riportate le conclusioni per ciascuna delle tre parti della tesi.

Nella prima parte l'obiettivo era quello di studiare e valutare il ruolo dei carotenoidi e dei composti volatili caratterizzanti il flavour in campioni di pasta convenzionale e integrale. Attraverso l'ottimizzazione di un metodo di estrazione ASE per i carotenoidi, è stato possibile esaminare i livelli di queste sostanze in entrambe le tipologie di pasta. Nella sezione finale di questa prima parte è stata inoltre studiata anche l'influenza dei

differenti trattamenti di lavorazione della pasta sul contenuto dei carotenoidi e sul flavour. I carotenoidi sono stati analizzati mediante ASE/HPLC-UV-Vis; le sostanze volatili tramite strumentazione HS-SPME/GC-MS. I dati ottenuti sono stati elaborati tramite metodi chemiometrici di analisi multivariata (PLS-DA). Al fine di ottenere il maggior numero possibile di informazioni dall'analisi e scovare possibili miglioramenti nei risultati della classificazione, è stato utilizzato un approccio multiblock combinando i dati GC-MS con quelli HPLC-UV. La classificazione basata sulla tipologia di semola (grano raffinato vs. grano integrale) dei 96 campioni di pasta analizzati ha mostrato un'eccellente capacità predittiva del modello del 100%. Considerando il gran numero di studi scientifici che dimostrano ampiamente gli effetti benefici dei carotenoidi sulla salute, è lecito concludere che il consumo di pasta integrale ha un effetto positivo sull'apporto di antiossidanti all'organismo. Lo stesso si può dire del contenuto di luteina e dei composti volatili della pasta integrale, determinando una capacità antiossidante e anche un profilo di volatili nettamente superiore del prodotto integrale rispetto a quello raffinato, a cui si accompagna una minore perdita di componenti nutrizionali dovuta all'utilizzo del germe e della crusca durante la macinazione. La luteina, presente in quantità significativamente elevata, può fungere da marcatore della quantità totale di carotenoidi nella pasta. Considerando i numerosi fattori che influiscono sul contenuto di carotenoidi e della componente volatile nel prodotto finale, sarà particolarmente interessante approfondire i vari aspetti legati alla materia prima (tipo di coltura, genotipo, condizioni ambientali) e al processo produttivo (fasi meccaniche, essiccazione, ecc.) per capire meglio se la quantità totale di queste sostanze può essere conservata durante l'intero ciclo di produzione e conservazione della pasta.

Nella seconda parte della tesi è stato preso in esame un altro tipo di matrice alimentare che rappresenta un prodotto innovativo e protagonista di piatti originali e ricercati: i fiori commestibili. L'obiettivo di questa seconda sezione della tesi è stato quello di caratterizzare il contenuto nutrizionale e il flavour dei fiori edibili per fornire un approccio oggettivo che permettesse di discriminare una tipologia di prodotto rispetto ad un'altra tenendo conto delle caratteristiche di ogni varietà presente sul mercato. Nella prima fase della ricerca sono stati sviluppati i metodi HS-SPME/GC-MS e ASE/HPLC-UV per valutare la componente volatile e il contenuto di flavonoidi dei fiori commestibili. I profili cromatografici ottenuti sono stati poi utilizzati per l'analisi statistica multivariata al fine di costruire modelli di classificazione adatti per la corretta discriminazione. Un modello di classificazione PLS/DA è stato costruito sulla base dei dati gascromatografici e ha mostrato risultati eccellenti: il 100% dei campioni analizzati è stato assegnato alla classe corretta. Dal punto di vista chimico, l'analisi dei parametri del modello ha mostrato che l'identificazione è ascrivibile proprio alle sostanze che costituiscono la componente aromatica, poiché la maggior parte dei picchi ha contribuito in modo significativo al modello. Per i risultati delle analisi HPLC/UV dei flavonoidi nei fiori, è stata osservata una discriminazione ancora più netta, ma in questo caso sono state considerate solo tre delle quattro varietà, ciascuna con un numero inferiore di campioni. A questo proposito, l'analisi dei parametri del modello ha mostrato che la discriminazione consisteva in un minor numero di sostanze presenti in aree ben definite dei cromatogrammi. Nel complesso, i risultati ottenuti sono stati molto soddisfacenti, ma va sottolineato che non sono stati ottenuti su un numero molto elevato di campioni; pertanto, in futuro sarà necessario considerare un

numero maggiore di campioni. Va inoltre evidenziato che, sebbene il metodo proposto sia stato sviluppato per quattro varietà di fiori, può essere esteso anche per discriminare e autenticare altre tipologie di fiori edibili.

Infine, la terza e ultima parte della tesi è stata svolta durante il mio periodo di ricerca all'estero, presso l'Università di Helsinki sotto la supervisione della Professoressa Anna-Maija Lampi. La ricerca è parte di un progetto promosso dalla stessa Università di Helsinki in collaborazione con altre istituzioni che ha l'obiettivo di promuovere e incentivare la coltivazione, la produzione e il consumo di legumi (e dei prodotti a base di legumi) che hanno un impatto positivo sia sull'alimentazione in quanto forniscono un adeguato apporto proteico, sia sulla salute del pianeta grazie al fatto che la coltivazione di legumi porta a un ridotto impatto ambientale. All'interno di questo grande progetto, il mio scopo è stato quello di caratterizzare il flavour di diversi campioni di fave, al fine di indagare come i processi di estrusione (necessari per la lavorazione della carne vegetale) e di fermentazione/trattamento enzimatico (necessari per migliorare il sapore di tali prodotti) influenzino la composizione chimica dei prodotti stessi. In particolare, è stata esaminata la stabilità dei lipidi analizzando la formazione degli acidi grassi liberi mediante l'ottimizzazione di un metodo ASE/HPLC-ELSD e l'analisi dei prodotti di ossidazione dei lipidi (composti volatili) tramite HS-SPME/GC-MS. Per quanto riguarda lo studio degli acidi grassi, i risultati hanno mostrato che dopo la fermentazione il contenuto di questi composti era maggiore (nello specifico degli acidi oleico e linoleico) rispetto a quelli presenti nei campioni non fermentati. Relativamente ai campioni di fave sottoposti invece a trattamenti enzimatici, si può concludere che durante il trattamento, un basso dosaggio di enzima e del contenuto di acqua portano all'ottenimento della quantità ottimale (maggiore) di acidi grassi nei campioni. Dopo il processo di estrusione i livelli degli FFAs variano in base al tipo di campione e dei processi eseguiti, per questo motivo tale aspetto deve essere maggiormente approfondito. Riguardo allo studio della componente volatile, infine, si può concludere che nel primo set di campioni sono stati identificati molti composti volatili caratterizzanti le matrici in esame: alcune sostanze provenivano proprio dalla fermentazione apportando un miglioramento nel flavour, altre erano i prodotti dell'ossidazione lipidica; alcuni composti off-flavour come il 2-pentilfurano, erano presenti maggiormente nei campioni dopo l'estrusione. Il numero maggiore di sostanze è stato rilevato nei campioni di fave estrusi, seguiti da quelli fermentati e infine dai campioni di controllo. Per il secondo set di campioni non ci sono state invece differenze significative del contenuto aromatico prima e dopo il trattamento enzimatico; tuttavia, dopo essere stati sottoposti al processo di estrusione, i campioni di fave erano caratterizzati da una componente volatile più ricca e varia, sebbene molti composti provenissero dai materiali del macchinario utilizzato per l'estrusione.

Sitografia

[S1]: <http://hdl.handle.net/10579/9619>

[S2]: [https://italiaindati.com/agroalimentare-in-italia/#:~:text=Ne1%202020%20il%20settore%20agroalimentare,%2C9%25%20nel%202019\).](https://italiaindati.com/agroalimentare-in-italia/#:~:text=Ne1%202020%20il%20settore%20agroalimentare,%2C9%25%20nel%202019).)

[S3]: <https://www.crea.gov.it/-/commercio-con-l-estero-2021-anno-record-per-l-agroalimentare-italiano-con-l-export-che-supera-i-50-miliardi-di-euro>

[S4]: <https://www.nomisma.it/presentazione-rapporto-industria-alimentare-italiana-oltre-il-covid-19/>

[S5]: <https://www.affaritaliani.it/economia/coronavirus-union-e-italiana-food-anche-alimentare-soffrefuturo-incerto-670025.html>

[S6]: <http://www.coeweb.istat.it/>

[S7]: http://www.coeweb.istat.it/dizionari/class_merci_segue.asp?livello=AT3

[S8]: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-model-of-accelerated-solvent-extraction_fig6_310614780

[S9]: https://www.shimadzu.it/liquid-chromatography/elsdiii/features#anchor_0

[S10]: <https://distribuzionemoderna.info/trend/la-pasta-italiana-genera-il-35-percent-del-fatturato-nazionale-dellindustria-alimentare>

[S11]: https://www.allianz-trade.com/it_IT/news-e-approfondimenti/studi-economici/studi-di-settore/settore-della-pasta.html

[S12]: [https://ilfattoalimentare.it/aumento-dei-prezzi-la-pasta-registra-un-incremento-del-14-nellultimo-anno-ma-resta-un-piatto-conveniente.html#:~:text=Secondo%20Altroconsumo%20la%20pasta%20di,14%25%20\(**\).](https://ilfattoalimentare.it/aumento-dei-prezzi-la-pasta-registra-un-incremento-del-14-nellultimo-anno-ma-resta-un-piatto-conveniente.html#:~:text=Secondo%20Altroconsumo%20la%20pasta%20di,14%25%20(**).)

[S13]: <http://www.deliciousmagazine.co.uk/collections/cooking-with-edible-flowers/>

[S14]: <http://boomcafeassociatif.org/les-herbes-de-bruxelles/>

Bibliografía

- Acquistucci, R. Influence of Maillard Reaction on protein modification and colour development in pasta. Comparison of different drying conditions, *LWT. Food Science and Technology*, 33, 48–52 (2000).
- Adom, K.K., Liu, R.H. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182–6187 (2002).
- Adom, K.K., Sorrells, M.E., Liu, R.H. Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Wheat Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7825–7834 (2003).
- Adom, K.K., Sorrells, M., Liu, R.H. Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 2297–2306 (2005).
- Akkad, R., Kharraz, E., Han, J., House, J.D., Curtis, J.M. The effect of short-term storage temperature on the key headspace volatile compounds observed in Canadian faba bean flour. *Food Science and Technology International*, 28(2), 135–143 (2021).
- Alves-Rodrigues, A., Shao, A. The science behind lutein. *Toxicology Letters*, 150, 57–83 (2004).
- Ames, J.M., Macleod, G. Volatile components of an unflavored textured soy protein. *Journal of Food Science*, 49, 1552–1565 (1984).
- Anese, M., Nicoli, C., Massini, R., Lerici, C.R. Effects of drying processing on the Maillard reaction in pasta. *Food Research International*, 32, 193–199 (1999).
- Arteaga, G. V., Guardia, A. M., Muranyi, I., Eisner, P., Schweiggert Weisz, U. Effect of enzymatic hydrolysis on molecular weight distribution, techno-functional properties and sensory perception of pea protein isolates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 65, 102449 (2020).
- Bacher, M., Jun, M. *Cooking with Flowers: Sweet and Savory Recipes with Rose Petals, Lilacs, Lavender, and Other Edible Flowers*. Quirk Books, 5–188 (2013).
- Baño, M.J.D., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Río, J.A.D., Ortuño, A., Quirin, K., Gerard, D. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers,

stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (15), 4247–4253 (2003).

Bansal, D. G. Is Picking Edible Weeds off the Streets the Next Foodie Trend? Bay Area News Group. Retrieved from <http://www.mercurynews.com/2017/07/16/is-picking-edible-weeds-off-thestreets-the-next-foodie-trend/>.

Barash, C. W. *Edible Flowers: Desserts & Drinks*. Paperback (pp. 1-96). Fulcrum Publishing. 155591389X (1997).

Belliardo, F., Bicchi C., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., Sgorbini B. Headspace–Solid-Phase Microextraction in the Analysis of the Volatile Fraction of Aromatic and Medicinal Plants. *Journal of Chromatographic Science*, 44, 416–429 (2006).

Benayada, Z., Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., Gomez-Cordoves, C., Es-Safi, N.E. Phenolic composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from Moroccan *Opuntia ficus-indica* flowers obtained by different extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 62, 412-420 (2014).

Bendich, A., Olson, J. A. Biological actions of carotenoids. *FASEB Journal*, 3, 1927–1932 (1989).

Benvenuti, S., Bortolotti, E., Maggini, R. Antioxidant power, anthocyanin content and organoleptic performance of edible flowers. *Scientia Horticulturae*, 199, 170–177 (2016).

Beros, M. 13 Fiches Sur Les Fleurs Innovantes Et Les Fleurs Comestibles. INRA Science & Impact. Retrieved from <https://www.hortidoc.net/Actualites/Fiches-Creat>.

Bhatty, R.S., Christison, G.I. Composition and nutritional quality of pea (*Pisum sativum* L.), faba bean (*Vicia faba* L. spp. minor) and lentil (*Lens culinaris* Medik.) meals, protein concentrates and isolates. *Plant Foods for Human Nutrition*, 34, 41-51 (1984).

Boccacci Mariani, M., Giannetti, V., Testani, E. HS-SPME/GC-MS method to characterise the flavour of Italian pasta: potential application to assess the quality of the products. *Food Analytical Methods*, 7, 64-72 (2014a).

Boccacci Mariani, M., Mannino, P., Giannetti, V., Testani, E. Furosine and flavour compounds in durum wheat pasta produced under different manufacturing conditions: Multivariate chemometric characterization. *LWT-Food Science and Technology*, 56, 15-20 (2014b).

- Boiteux, J., Monardez, C., Fernández, M., de los, Á., Espino, M., Pizzuolo, P., Silva, M.F. Larrea divaricata volatilome and antimicrobial activity against *Monilinia fructicola*. *Microchemical Journal*, 142, 1–8 (2018).
- Borràs, E., Ferré, J., Boqué, R., Mestres, M., Acena, L., Busto, O. Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment - A review. *Analytica Chimica Acta*, 891, 1-14 (2015).
- Borrelli, G.M., De Leonardis, A.M., Platani, C., Troccoli, A. Distribution along durum wheat kernel of the components involved in semolina colour. *Journal of Cereal Science*, 48, 494–502 (2008).
- Bourne, V. *Edible Flowers: Recipes Ideas & How to Grow*. Retrieved from <http://www.saga.co.uk/magazine/home-garden/gardening/advice-tips/garden-produce/edible-flowers> (2015).
- Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S. *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building*. New York: John Wiley & Sons (1978).
- Brandolini, A., Hidalgo, A., Gabriele, S., Heun, M. Chemical composition of wild and feral diploid wheats and their bearing on domesticated wheats. *Journal of Cereal Science*, 63, 122–127 (2015).
- Breithaupt, D.E. Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction. *Food Chemistry*, 86, 449–456 (2004).
- Britton, G., Khachik, F. Carotenoids in food. In *Carotenoids*, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander (Eds.), Basel, Boston, Berlin: Birkhauser Verlag, vol. 5 (2009).
- Brown, K. *Edible Flowers: 25 Recipes and an A-Z Pictorial Directory of Culinary Flora. From Garden to Kitchen: How to Grow and Cook Edible Flowers, in 400 Beautiful Photographs*. Hardcover, 16, 1–168 (2012).
- Brundtland, G.H. What is Sustainable Development. *Our Common Future*, pp. 8-9 (1987).
- Carcea, M., Bruschi, G., Salvatorelli, S., Schiavoni, E., Perenzin, M., Vaccino, P. Agrotecnica biologica o convenzionale e qualità chimico-nutrizionale del grano tenero e duro. *Tecnica Molitoria*, 53(10), 1002-1012 (2002).
- Carter, N. Test Kitchen Tips: Edible Flowers. Retrieved from <http://articles.latimes.com/2013/feb/07/news/la-dd-test-kitchen-tips-edible-flowers-20130206> (2013).
- Chen, N. H., Wei, S. Factors influencing consumers' attitudes towards the consumption of edible flowers. *Food Quality and Preference*, 56, 93–100 (2017).
- Cooper, C. M., Davies, N. W., Menary, R. C. C-27 apocarotenoids in the flowers of *Boronia megastima* (Nees). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2384-2389 (2003).

- Cruz, A., Aguilar, M., Valencia del Toro, G. Nutritional and functional properties of protein concentrate and protein isolates of foods. In M-V. Antonio (Ed.), *Science within food: Up-to-date advances on research and educational ideas*. Formatex Research Center (2020).
- Cubero, J.I. On the evolution of *Vicia faba* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 45, 47-51 (1974).
- Damodaran, S., Arora, A. Off-flavor precursors in soy protein isolate and novel strategies for their removal. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 327–346 (2013).
- D'Egidio, M.G., Mariani, B.M., Nardi, S., Novaro, P., Cubadda, R. Chemical and technological variables and their relationships: A predictive equation for pasta cooking quality. *Cereal Chemistry*, 67, 275–281 (1990).
- De Clippeleer, J. Flavour stability of pale lager beer. Chemical-analytical characterisation of critical factors related to wort production and hopping. ISBN: 978-90-8826-278-4, (2013).
- De Noni, I., Pagani, M.A. Cooking properties and heat damage of dried pasta as influenced by raw material characteristics and processing conditions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 465–472 (2010).
- De Oliveira, A. M., Pivato Biajoli, A.F., Vasconcelos Fidélis C. H., Gomes da Costa Silva, R., Augusto, F. Extraction and pre-concentration techniques for chromatographic analysis. In: *Trends in Sample Preparation*, Arruda, M. A. Z., (Ed.), New York: Nova Science Publishers 1-23 (2006).
- Dekkers, B. L., Boom, R. M., van der Goot, A. J. Structuring processes for meat analogues. *Trends in Food Science and Technology*, 81, 25–36 (2018).
- Deng, C., Song, G., Hu, Y. Rapid determination of volatile compounds emitted from *Chimonanthus praecox* flowers by HSSPME-GC-MS. *Z. Naturforsch B Chem Sci*, 59:636–640 (2004).
- Deng, C., Liu, N., Gao, M., Zhang, X. Recent developments in sample preparation techniques for chromatography analysis of traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A*, 1153, 90–96 (2007).
- Diez-Simon, C., Mumm, R., Hall, R.D. Mass spectrometry-based metabolomics of volatiles as a new tool for understanding aroma and flavour chemistry in processed food products. (Review Article) *Metabolomics*, 15-41 (2019).
- Dreux, M., La Fosse, M., Morin-Allory, L. *LC GC International*, 9, 148 (1996).
- Dwivedi, B.K., Arnold, R.G. Chemistry of thiamine degradation on food products and model systems. Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21, 54-60 (1973).

- Dzomeku, B. M., Wald, J.P., Wunsche, J.N., Nohr, D., Biesalski, H.K. Climate Change Enhanced Carotenoid Pro-Vitamin A Levels of Selected Plantain Cultivars. *Plants*, 9(4), 541 (2020).
- Elzerman, J.E., Hoek, A.C., Van Boekel, M.A., Luning, P.A. Consumer acceptance and appropriateness of meat substitutes in a meal context. *Food Quality and Preference*, 22, 233-240 (2011).
- Erbersdobler, H.F., Somoza, V. Forty years of furfural. Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(4), 423-430 (2007).
- Ezzell, J. L., Richter, B. E., Felix, W. D., Black, S. R., Meikle, J. E. *LC-GC*, 15, 390 (1995).
- FAO, 1992. *Production Year Book*, Vol. 42. FAO, Rome.
- FAO, 2019. FAOSTAT [WWW Document]. Crop. Livest. Prod. URL <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.
- Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J.A., Saraiva, J.A., Ramalhosa, E. Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60, 38–50 (2017).
- Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J. A., Pereira, E. L., Saraiva, J. A., Ramalhosa, E. Physicochemical, antioxidant and microbial properties of crystallized pansies (*Viola × wittrockiana*) during storage. *Food Science and Technology International*, 25(6), 472-479 (2019a).
- Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J.A., Malheiro, R., Rodrigues, N., Saraiva, J.A., Ramalhosa, E. Borage, calendula, cosmos, Johnny Jump up, and pansy flowers: volatiles, bioactive compounds, and sensory perception. *European Food Research and Technology*, 245, 593–606 (2019b).
- Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J.A., Saraiva, J.A., Ramalhosa, E. An Overview on the Market of Edible Flowers. *Food Reviews International*, 36(3), 258-275 (2020).
- Fernández-Quintela, A., Macarulla, M.T., Del Barrio, A.S., Martínez, J.A. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51, 331-341 (1997).
- Fernando, L.N., Grun, I.U. Headspace–SPME analysis of volatiles of the ridge gourd (*Luffa acutangula*) and bitter gourd (*Momordica charantia*) flowers. *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 289–293 (2001).
- Ficco, D.B.M., Mastrangelo, A.M., Trono, D., Borrelli, G.M., De Vita, P., Fares, C., Beleggia, R., Platani C., Papa, R. The colours of durum wheat: a review. *Crop and Pasture Science*, 65, 1-15 (2014).

Ficco, D.B.M., De Simone, V., De Leonardis, A.M., Giovanniello, V., Del Nobile, M.A., Padalino, L., Lecce, L., Borrelli, G.M., De Vita, P. Use of purple durum wheat to produce naturally functional fresh and dry pasta. *Food Chemistry*, 205, 187–195 (2016).

Firenzuoli, F., Gori, L., Crupi, A., Neri, D. Flavonoidi: rischi o opportunità terapeutiche? *Recenti Progressi in Medicina*, 95, 345-351 (2004).

Fisher, R.A. *The design of experiments*. New York: Haffner Press (1935).

Frankel, E. N. Chemistry of autoxidation: Mechanism, products and flavor significance. In D. B. Min & T.H. Smouse (Eds.), *Flavor chemistry of fats and oils*, AOCS, 1-37 (1985).

Fратиани, A., Irano, M., Panfili, G., Acquistucci, R. Estimation of colour of durum wheat comparison of WSB, HPLC, and reflectance colourimeter measurements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2373–2378 (2005).

Fратиани, A., Di Criscio, T., Mignogna, R., Panfili, G. Carotenoids, tocopherols and retinols evolution during egg pasta-making processes. *Food Chemistry*, 131(2), 590–5 (2012).

Fu, B.X., Chiremba, C., Pozniak, C.J., Wang, K., Nam, S. Total Phenolic and Yellow Pigment Contents and Antioxidant Activities of Durum Wheat Milling Fractions. *Antioxidants*, 6, 78 (2017).

Fulcher, R.G., Rooney Duke, T.K. *Whole-grain foods in health and disease*. Eagan Press, St Paul, Minnesota (2002).

Giannetti, V., Boccacci Mariani, M., Mannino, P., Testani, E. Furosine and flavour compounds in durum wheat pasta produced under different manufacturing conditions: Multivariate chemometric characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 56, 15-20 (2014).

Giannetti, V., Boccacci Mariani, M., Mannino, P., Marini, F. Volatile fraction analysis by HSSPME/GC-MS and chemometric modeling for traceability of apples cultivated in the Northeast Italy. *Food Control*, 78, 215–222 (2017).

Giannetti, V., Boccacci Mariani, M., Marini, F., Biancolillo, A. Effects of thermal treatments on durum wheat pasta flavour during production process: A modelling approach to provide added-value to pasta dried at low temperatures. *Talanta*, 225, 121955 (2021).

Gomes-Carneiro, M. R., Dias, D. M. M., Paumgarten, F. J. R. Study of the mutagenicity and antimutagenicity of β -Ionone in the Salmonella/microsome assay. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 522-527 (2006).

- Gómez-Luciano, C.A., de Aguiar, L.K., Vriesekoop, F., Urbano, B. Consumers' willingness to purchase three alternatives to meat proteins in the United Kingdom, Spain, Brazil and the Dominican Republic. *Food Quality and Preference*, 78, 103732 (2019).
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *British Journal of Nutrition*, 90, 487–502 (2003).
- Grzeszczuk, M., Stefaniak, A., Meller, E., Wysocka, G. Mineral composition of some edible flowers. *Journal of Elementology*, 23, 151–162 (2018).
- Guido, G., Tedeschi, P., Prete, M.I., Franceschini, L., Buffa, C. Il consumo etico dei prodotti alimentari biologici: il ruolo delle norme morali in "ECONOMIA AGRO-ALIMENTARE" 3, pp 53-77 (2009).
- Hayashi, T., Ishii, H., Shinoara, A. Novel model experiment of cooking flavor research on crab leg meat. *Food Reviews International*, 6, 521–536 (1990).
- Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M.G., Bhom, V., Bitsch, R. Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6663–6668 (2002).
- Heo, J-Y., Kim, S., Kang, J-H., Moon, B. Determination of Lutein from Green Tea and Green Tea By-Products Using Accelerated Solvent Extraction and UPLC. *Journal of Food Science*, 79, C816-C821 (2014).
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C. Carotenoids evolution during pasta, bread and water biscuit preparation from wheat flours. *Food Chemistry*, 121(3), 746–751 (2010).
- Hoek, A.C., Luning, P.A., Weijzen, P., Engels, W., Kok, F.J., de Graaf, C. Replacement of meat by meat substitutes. A survey on person- and product-related factors in consumer acceptance. *Appetite*, 56, 662-673 (2011).
- Hoek, A.C., Elzerman, J.E., Hageman, R., Kok, F.J., Luning, P.A., de Graaf, C. Are meat substitutes liked better over time? A repeated in-home use test with meat substitutes or meat in meals. *Food Quality and Preference*, 28, 253-263 (2013).
- Humiski, L. M., Aluko, R. E. Physicochemical and bitterness properties of enzymatic pea protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 72(8), S605–611 (2007).
- Humphries, J.M., Khachik, F. Distribution of Lutein, Zeaxanthin, and Related Geometrical Isomers in Fruit, Vegetables, Wheat, and Pasta Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1322–1327 (2003).
- Humphries, J.M., Graham, R.D., Mares, D.J. Application of reflectance colour measurement to the estimation of carotene and lutein content in wheat and triticale. *Journal of Cereal Science*, 40, 151–159 (2004).

- Hussain, N., Ishak, I., Mohd Harith, N., Leong Pau Kuan G. Comparison of bioactive compounds and sensory evaluation on edible flowers tea infusion. *Italian Journal of Food Science*, 31, 264-273 (2019).
- Husti, A., Cantor, M., Buta, E., Hort, D. Current trends of using ornamental plants in culinary arts. *ProEnvironment*, 6, 52–58 (2013).
- Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H.P., Vivanco, J.M. Chemical characterization of Basil (*Ocinum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50(21), 5878-5883 (2002).
- Jensen, E.S., Hauggaard-Nielsen, H. How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil*, 252, 177-186 (2003).
- Kelley, K. M., Cameron, A. C., Biernbaum, A. J., Poff, K. L. Effect of storage temperature on the quality of edible flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 341–34 (2003).
- Kellner, R., Widmer, H.M. *Analytical Chemistry, A modern approach to analytical science*. Founding Eds., 2nd ed. Wiley, Germany. Cap. 25.4-24.6 (2004).
- Kelly, K. M., Behe, B. K., Biernbaum, J. A., Poff, K. L. Consumer and professional chef perceptions of three edible-flower species. *HortScience*, 36, 162–166 (2001a).
- Kelly, K. M., Behe, B. K., Biernbaum, J. A., Poff, K. L. Consumer preference for edible flower color, container size, and price. *HortScience*, 36, 801–804 (2001b).
- Kijlstra, A., Tian, Y., Kelly E.R., Berendschot, T. T. J. M. Lutein: More than just a filter for blue light. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31, 303-315 (2012).
- Kiko, T., Nakagawa, K., Tsuduki, T., Suzuki, T., Arai, H., Miyazawa, T. Significance of lutein in red blood cells of Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, 28, 593–600 (2012).
- Kim, J-S., An, C.G., Park, J-S., Lim, Y.P., Kim, S. Carotenoid profiling from 27 types of paprika (*Capsicum annum* L.) with different colors, shapes, and cultivation methods. *Food Chemistry*, 201, 64–71 (2016).
- Köpke, U., Nemecek, T. Ecological services of faba bean. *Field Crops Research*, 115, 217-233 (2010).
- Kusch, P. The application of headspace: solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) for the characterization of polymers. In: Warren, (Eds.), *Gas Chromatography*, Nova Science Publishers, Inc., Chapter 3 (2017).
- Lampi, A. M., Yang, Z., Mustonen, O., & Piironen, V. Potential of faba bean lipase and lipoxygenase to promote formation of volatile lipid oxidation products in food models. *Food chemistry*, 311, 125982 (2020).

Laus, M.N., Soccio, M., Alfarano, M., Pasqualone, A., Lenucci, M.S., Di Miceli, G., Pastore, D. Different effectiveness of two pastas supplemented with either lipophilic or hydrophilic/phenolic antioxidants in affecting serum as evaluated by the novel Antioxidant/Oxidant Balance approach. *Food Chemistry*, 221, 278–288 (2017).

Law No, 580 of 4 July 1967. Disciplina per la lavorazione e commercio dei cereali, degli sfarinati, del pane e delle paste alimentari. OJ No. 189 of 29/07/67. Amended by DPR (Decree of the President of the Italian Republic) No. 187 of 9 February 2001. Regolamento per la revisione della normativa sulla produzione e commercializzazione di sfarinati e paste alimentari. OJ No. vol. 117, 22/05/2001.

Lepage, M., Sims, R. P. A. Carotenoids of wheat flour: Their identification and composition. *Cereal Chemistry*, 45, 600- 604 (1968).

Li, A.N., Li, S., Li, H.B., Xu, D.P., Xu, X.R., Chen, F. Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers, *Journal of Functional Foods*, 6, 319–330 (2014).

Lim, T.K. *Lavandula angustifolia*. In *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants: Volume 8, Flowers*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 156–185 (2014).

Liu, J. R., Chen, B. Q., Yang, B. F., Dong, H. W., Sun, C. H., Wang, Q., Song, Q., Song, Y-Q. Apoptosis of human gastric adenocarcinoma cells induced by β -ionone. *World Journal of Gastroenterology*, 10, 348-351 (2004).

Liu, R.H. Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46, 207–219 (2007).

Loizzo, M.R., Pugliese, A., Bonesi, M., Tenuta, M.C., Menichini, F., Xiao, J., Tundis, R. Edible flowers: A rich source of phytochemicals with antioxidant and hypoglycemic properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 2467–2474 (2016).

Longo, V., Forleo, A., Provenzano, S.P., Coppola, L., Zara, V., Ferramosca, A., Siciliano, P., Capone, S. HS-SPME-GC-MS metabolomics approach for sperm quality evaluation by semen volatile organic compounds (VOCs) analysis. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 5, 015006 (2019).

Lu, B., Li, M., Yin, R. Phytochemical content, health benefits, and toxicology of common edible flowers: A review (2000–2015). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, S130–S148 (2016).

Lucisano, M., Pagani, M.A., Mariotti, M., Locatelli D.P. Influence of die material on pasta characteristics. *Food Research International*, 41, 646–652 (2008).

Lyra, C. C. G. V., Vieira, R. F., de Oliveira, C. B. A., Santos, S. C., Seraphin, J. C., Ferri, P. H. Infrapetric variability in the essential oil composition of *Lychnophora ericoides*. *Journal of the Brasil Chemical Society*, 19, 842-848 (2008).

Magagnoli, S. Italian sounding e contraffazione nell'agroalimentare. *Parma economica*, 24-30 (2013).

Maiani, G., Periago Castón, M.J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I.G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., Schlemmer, U. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, S194 – S218 (2009).

Majors, R. E. *Sample Preparation Fundamentals for Chromatography*. Agilent Technologies Inc.: Wilmington, DE, USA, 137-138 (2013).

Mandić, A.I., Meléndez-Martínez, A.J., Bantis, F., Böhm, V., Borge, G.I.A., Brnčić, M., Bysted, A., Pilar Cano, M., Graça Dias, M., Elgersma, A., Fikselová, M., García-Alonso, J., Giuffrida, D., Gonçalves, V.S.S., Hornero-Méndez, D., Kljak, K., Lavelli, V., Manganaris, G.A., Mapelli-Brahm, P., Marounek, M., Olmedilla-Alonso, B., Jesús Periago-Castón, M., Pintea, A., Sheehan, J.J., Tumbas Šaponjac, V., Valšíková-Frey, M., Van Meulebroek, L., O'Brien, N. A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: status quo, applications, patents, and research needs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (2021).

Marchioni, I., Dimita, R., Gioè, G., Pistelli, L., Ruffoni B., Pistelli, L., Najar, B. The Effects of Post-Harvest Treatments on the Quality of *Agastache aurantiaca* Edible Flowers. *Horticulturae*, 7, 83 (2021).

Marini, F. *Chemometrics in Food Chemistry, Data Handling in Science and Technology*, 1st Edition, Vol. 28 (2013).

Marini, F. *Data Fusion Strategies for Food Authentication*. Proceedings of the 2nd IMEKO FOODS Conference (2016).

Markley, M. C., Bailey, C. H. The nature of the pigments of the gasoline extract of wheat. *Cereal Chemistry*, 33-39 (1935a).

Markley, M. C., Bailey, C. H. The pigments of the dilute alcohol or acetone extract of whole wheat meal. *Cereal Chemistry*, 12, 40-48 (1935b).

Martin, A. J. P., Synge, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochemical Journal*, 35, 1358-1368 (1941).

Mattila, P., Mäkinen, S., Euroola, M., Jalava, T., Pihlava, J., Hellström, J., Pihlanto, A. Nutritional value of commercial protein-rich plant products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73, 108-115 (2018).

Mazza, G., Cottrell, T. Volatile components of roots, stems, leaves, and flowers of Echinacea Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3081–3085 (1999).

- Megoulas, N. C., Koupparis, M. A. Enhancement of evaporative light scattering detection in high-performance liquid chromatographic determination of neomycin based on highly volatile mobile phase, high-molecular-mass ionpairing reagents and controlled peak shape. *Journal of Chromatography A*, 1057, 125-131 (2004).
- Meinlschmidt, P., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P. Soy protein hydrolysates fermentation: effect of debittering and degradation of major soy allergens. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 202–212 (2016a).
- Meinlschmidt, P., Sussmann, D., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P. Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. *Food Science and Nutrition*, 4(1), 11–23 (2016b).
- Mejri, J., Abderrabba M., Mejri., M. Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L: Influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts, 32, 671-673 (2010).
- Melini, V., Melini, F., Acquistucci, R. Phenolic compounds and bioaccessibility thereof in functional pasta: Review. *Antioxidants*, 9, 343 (2020).
- Menesatti P., Antonucci F., Pallottino F., Bucarelli F.M., Costa, C. Spectrophotometric Qualification of Italian Pasta Produced by Traditional or Industrial Production Parameters. *Food Bioprocess Technology*, 7, 1364–1370 (2014).
- Mercier, S., Des Marchais, L-P., Villeneuvea, S., Foisy, M. Effect of die material on engineering properties of dried pasta. *Procedia Food Science* 1, 557 – 562 (2011).
- Mesias-Garcia, M., Guerra-Hernandez, E., Garcia-Villanova, B. Determination of furan precursors and some thermal damage markers in baby foods: ascorbic acid, dehydroascorbic acid, hydroxymethylfurfural and furfural. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6027-6032 (2010).
- Meurer, M. C., Mees, M., Mariano, L. N. B., Boeing, T., Somensi, L. B., Mariott, M., de Souza, P. Hydroalcoholic extract of *Tagetes erecta* L. flowers, rich in the carotenoid lutein, attenuates inflammatory cytokine secretion and improves the oxidative stress in an animal model of ulcerative colitis. *Nutrition Research*, 66, 95–106 (2019).
- Michel, F., Hartmann, C., Siegrist, M. Consumers' associations, perceptions and acceptance of meat and plant-based meat alternatives. *Food Quality and Preference*, 87, 104063 (2021).
- Mishra, P., Roger, J.M., Jouan-Rimbaud-Bouveresse, D., Biancolillo, A., Marini F., Nordon, A., Rutledge, D.N. Recent trends in multi-block data analysis in chemometrics for multi-source data integration. *Trends in Analytical Chemistry*, 137, 116206, Elsevier (2021).
- Mittermeier-Kleßinger, V. K., Hofmann, T., Dawid, C. Mitigating off-flavors of plant-based proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(32), 9202–9207 (2021).

Mlcek, J., Rop, O. Fresh edible flowers of ornamental plants—A new source of nutraceutical foods. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 561–569 (2011).

Mo, H., Elson, C. E. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Experimental Biology and Medicine*, 2229, 567-585 (2004).

Montanari, F., Ferreira, I., Lofstrom, F., Varallo, C., Volpe, S., Smith, E., Kirova, M., Wion, A., Kubota, U., Albuquerque, J.D. Research for Agri Committee – Preliminary impacts of the COVID-19 pandemic on European agriculture: a sector-based analysis of food systems and market resilience. European Parliament, Policy Department for Structural and Cohesion Policies, Brussels (2021).

Moore, J., Hao, Z., Zhou, K., Luther, M., Costa, J., Yu, L.L. Carotenoid, Tocopherol, Phenolic Acid, and Antioxidant Properties of Maryland-Grown Soft Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6649–6657 (2005).

Moreno, J.A., Zea, L., Moyano, L., Medina, M. Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. *Food Control*, 16(4), 333-338 (2005).

Morris, B. Flavour and aroma analysis by solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography. *Chemistry in New Zealand*, 83(3) (2018).

Movafeghi, A., Djozan, D., Torbati, S. Solid-phase microextraction of volatile organic compounds released from leaves and flowers of *Artemisia fragrans*, followed by GC and GC/MS analysis. *Natural Product Research*, 24, 1235–1242 (2010).

Munsey, V. E. Application of the neutral wedge photometer to the measurement of carotenoid pigments in flour and macaroni products. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 21, 331-351 (1938).

Najar B., Marchioni, I., Ruffoni, B., Copetta, A., Pistelli, L., Pistelli, L. Volatilomic Analysis of Four Edible Flowers from Agastache Genus. *Molecules*, 24, 4480 (2019).

National Research Council, Food and Nutrition Board, Recommended Dietary Allowance, 10th ed. National Academy Press, Washington DC (1989).

Negro, C., Dimita, R., Min Allah, S., Miceli, A., Luvisi, A., Blando, F., De Bellis, L., Accogli, R. Phytochemicals and Volatiles in Developing Pelargonium ‘Endsleigh’ Flowers. *Horticulturae*, 7, 419 (2021).
Nguyen, C., Baskaran, K., Pupulin, A., Ruvinov, I., Zaitoon, O., Grewal, S., Pandey, S. Hibiscus flower extract selectively induces apoptosis in breast cancer cells and positively interacts with common chemotherapeutics. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 98 (2019).

Nowicka, P., Wojdyło, A. Anti-hyperglycemic and anticholinergic effects of natural antioxidant contents in edible flowers. *Antioxidants*, 8, 308 (2019).

- Oduro-Obeng, H., Fu, B.X., Beta, T. Influence of cooking duration on carotenoids, physical properties and in vitro antioxidant capacity of pasta prepared from three Canadian durum wheat cultivars. *Food Chemistry*, 363, 130016 (2021).
- Ogawa, T., Kobayashi, T., Adachi, S. Prediction of pasta drying process based on a thermogravimetric analysis. *Journal of Food Engineering*, 111, 129–134 (2012).
- Oliveira, L.L., Carvalho, M.V., Melo, L. Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. *Revista Ceres*, 61, 764–779 (2014).
- Oliver, J., & Palou, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*, 881, 543–555 (2000).
- Oomah, B.D., Razafindrainibe, M., Drover, J.C. Headspace volatile components of Canadian grown low-tannin faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 473-481 (2014).
- Osen, R., Schweiggert-Weisz, U. High-moisture extrusion: meat analogues. Reference module in food science, 1-7, Elsevier (2016).
- Pagani, M. A., Resmini, P., Dalbon, G. Influence of the extrusion process on characteristics and structure of pasta. *Food Microstructure*, 8, 173–182 (1989).
- Pagani, M. A., De Noni, I., Resmini, P., Pellegrino, L. Filiera produttiva e danno termico della pasta alimentare secca. *Tecnica Molitoria*, 47, 345– 361 (1996).
- Pagani, M. A., Lucisano, M., Mariotti, M. Traditional Italian products from wheat and other starchy flours. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of food products manufacturing: principles, bakery, beverages, cereals, cheese, confectionary, fats, fruits, and functional foods*, 327–388 (2007).
- Panfili G., Fratianni A., Irano M. Normal-phase high performance liquid chromatography method for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6373-6377 (2003).
- Panfili, G., Fratianni, A., Irano, M. Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (21), 6373–7 (2004).
- Pasqualone, A., Paradiso, V.M., Summo, C., Caponio, F., Gomes, T. Influence of drying conditions on volatile compounds of pasta. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 719–731 (2014).
- Pawliszyn, J. Theory of solid-phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, 38(7), 270-278 (2000).

Pawliszyn, J. Theory of solid-phase microextraction. In: *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Pawliszyn, J., (Ed.), Elsevier: Amsterdam, 13-59 (2012).

Paznocht, L., Kotíková, Z., Šulc, M., Lachman, J., Orsák, M., Eliášová, M., Martinek, P. Free and esterified carotenoids in pigmented wheat, tritordeum and barley grains. *Food Chemistry*, 240, 670–678 (2018).

Pétel, C., Bernard, O., Carole, P. Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 105–123 (2017).

Petitot, M., Barron, C., Larré, C., Morel, M.H., Micard, V. Modification of pasta structure induced by high drying temperatures. Effects on the *in vitro* digestibility of protein and starch fractions and the potential allergenicity of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 116, 401–412 (2009).

Pignoli, G., Bou, R., Rodriguez-Estrada, M.T., Decker, E.A. Suitability of saturated aldehydes as lipid oxidation markers in washed turkey meat. *Meat Science*, 83(3), 412-416 (2009).

Pinakin, D. J., Kumar, V., Suri, S., Sharma, R., Kaushal, M. Nutraceutical potential of tree flowers: A comprehensive review on biochemical profile, health benefits, and utilization. *Food Research International*, 127, 108724 (2020).

Pires, T.C., Barros, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C. Edible flowers: Emerging components in the diet. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 244–258 (2019).

Rabey, J.M., Vered, Y., Shabtai, H., Graff, E., Korczyn, A.D. Improvement of parkinsonian features correlate with high plasma levodopa values after broad bean (*Vicia faba*) consumption. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 55, 725-727 (1992).

Rackis, J.J., Sessa, D.J., Honig, D.H. Flavor problems of vegetable food proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56, 262- 271 (1979).

Rakhesh, N., Fellows, C.M., Sissons, M. Evaluation of the technological and sensory properties of durum wheat spaghetti enriched with different dietary fibres. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 2-11 (2015).

Randhir, R., Shetty, K. Microwave-induced stimulation of L-DOPA, phenolics and antioxidant activity in fava bean (*Vicia faba*) for Parkinson's diet. *Process Biochemistry*, 39, 1775-1784 (2004).

Rawal, V., Navarro, D.K. The global economy of pulses. *Food and Agriculture organization of the United Nations* (Ed.), Rome, 109-117 (2019).

Regulation (EC) No. 258/97 of the European Parliament and of the Council concerning novel foods and novel food ingredients. Jan 27, 1997, pp. 7.

Regulation (EC) No 405/2017 of the European Parliament and of the Council of 8 March 2017 on amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for sulfoxaflor in or on certain products.

Regulation (EU) N° 600/2010 of 8 July 2010 amending Annex I to Regulation (EC) No 396/ 2005 of the European Parliament and of the Council as regards additions and modification of the examples of related varieties or other products to which the same MRL applies.

Resmini, P., Pagani, M. A. Ultrastructure studies of pasta. A Review. *Food Microstructure*, 2, 1–12 (1983).

Resmini, P., Pellegrino, L. Occurrence of protein-bound lysylpyrrolaldehyde in dried pasta. *Cereal Chemistry*, 71, 254–262 (1994).

Risticovic, S., Niri, V.H., Vuckovic, D., Pawliszyn, J. Recent developments in solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(3), 781-795 (2009).

Roberts, L., Green, J., Lewis, B. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. *Clinics in Dermatology*, 27, 195–201 (2009).

Rodrigues, H., Cielo, D. P., Gómez-Corona, C., Silveira, A. A. S., Marchesan, T. A., Galmarini, M. V., Richards, N. S. P. S. Eating flowers? Exploring attitudes and consumers' representation of edible flowers. *Food Research International*, 100, 227–234 (2017).

Rop, O., Mlcek, J., Jurikova, T., Neugebauerova, J., Vabkova, J. Edible flowers—A New Promising Source of Mineral Elements in Human Nutrition. *Molecules*, 17(6), 6672–6683 (2012).

Rouessac, F., Rouessac, A. *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*. 2nd ed., Wiley (2007).

Rout, P.K., Rao, Y.R., Naik, S. Analysis of floral volatiles by using headspace-solid phase microextraction: a review. *Asian Journal of Chemistry*, 24, 945–956 (2012).

Rozin, P., Tuorila, H. Simultaneous and temporal contextual influences on food acceptance. *Food Quality and Preference*, 4, 11-20 (1993).

Saha, B. C., Hayashi, K. Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnology Advances*, 19(5), 355–370 (2001).

Saha, S., Walia, S., Kundu, A., Sharma, K., Paul, R.K. Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 177, 369–375 (2015).

Sahile, S., Fininsa, C., Sakhula, P.K., Ahmed, S. Evaluation of pathogenic isolates in Ethiopia for the control of chocolate spot in faba bean. *African Crop Science Journal*, 17, 187-197 (2009).

Sayaslan, A., Chung, O.K., Seib, P.A., Seitz, L.M. Volatile compounds in five starches. *Cereal Chemistry*, 77, 248–253 (2000).

- Schlegel, K., Sontheimer, K., Hickisch, A., Wani, A. A., Eisner, P., Schweiggert-Weisz, U. Enzymatic hydrolysis of lupin protein isolates-Changes in the molecular weight distribution, technofunctional characteristics, and sensory attributes. *Food Science and Nutrition*, 7(8), 2747–2759 (2019).
- Sensidoni, A., Peressini, D., Pollini, C.M., Munari, M. Effect of mechanical stress and reducing sugar content of semolina on pasta damage during drying. *Italian Food and Beverage Technology*, 7, 9–14 (1996).
- Sha, L., Xiong, Y. L. Plant protein-based alternatives of reconstructed meat: science, technology, and challenges. *Trends in Food Science and Technology*, 102, 51–61 (2020).
- Sharan, S., Zanghelini, G., Zotzel, J., Bonerz, D., Aschoff, J., Saint-Eve, A., Maillard, M. Fava bean (*Vicia faba* L.) for food applications: From seed to ingredient processing and its effect on functional properties, antinutritional factors, flavor, and color. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20, 401-428 (2021).
- Singh, N. Pulses: an overview. *Journal of Food Science and Technology*, 54(4), 853–857 (2017).
- Sjöström, M., Wold, S., Söderström, B. PLS discriminant plots. In E.S. Gelsema, L. N. Kanal (Eds.), *Pattern Recognition in Practice*, 461-470, Elsevier (1986).
- Sommerburg, O., Meissner, K., Nelle, M., Lenhartz, H., Leichsenring, M. Carotenoid supply in breast-fed and formula-fed neonates. *European Journal of Pediatrics*, 159, 86–90 (2000).
- Song, D., Chang, S. K. C., Ibrahim, S. A. Descriptive sensory characteristics of no-flatulence pinto bean. *Journal of Food Quality*, 32(6), 775–792 (2009).
- Stähle, L., & Wold, S. Partial least squares analysis with cross-validation for the two class problem: a Monte Carlo study. *Journal of Chemometrics*, 1, 185–196 (1987).
- Stuknyte, M., Cattaneo, S., Pagani, M.A., Micard, A.M.V., Hogenboom, J., De Noni, I. Spaghetti from durum wheat: effect of drying conditions on heat damage, ultrastructure and in vitro digestibility. *Food Chemistry*, 149, 40–46 (2014).
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3, 211–221 (2007).
- Sun, X. D. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 2447–2459 (2011).
- Szejda, K., Urbanovich, T., Wilks, M. Accelerating consumer adoption of plant-based meat: An evidence based guide for effective practice. *The Good Food Institute* (2020).
- Takahashi, J.A., Rezende, F.A.G.G., Moura, M.A.F., Dominguet, L.C.B., Sande, D. Edible flowers: Bioactive profile and its potential to be used in food development. *Food Research International*, 129, 108868 (2020).

- Tamanna, N., Mahmood, N. Food Processing and Maillard Reaction Products: Effect on Human Health and Nutrition. *International Journal of Food Science*, Volume 2015, 6 pages (2015).
- Tangyu, M., Muller, J., Bolten, C. J., Wittmann, C. Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(23- 24), 9263–9275 (2019).
- Tapas, A.R., Sakarkar, D.M., Kakde, R.B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 1089-1099 (2008).
- Technavio. Global Packaged Edible Flower Market 2018-2022 [WWW Document]. URL https://www.technavio.com/report/global-packaged-edible-flower-marketanalysis-share-2018?utm_source=t9&utm_medium=bw_wk39&utm_campaign=businesswire (2018).
- Terreri, M. La qualità alimentare. BioPass Abruzzo a.p.s. (2020).
- Tiwari, U., Cummins, E. Nutritional importance and effect of processing on tocols in cereals. *Trends in Food & Technology*, 20, 511-520 (2009).
- Tomasi, G., Savorani, F., Engelsens, S.B. Icoshift: an effective tool for the alignment of chromatographic data. *Journal of Chromatography A*, 1218, 7832–7840 (2011).
- Tuccillo, F., Kantanen, K., Wang, Y., Diaz, M. R. J., Pulkkinen, M., Edelman, M., Knaapila, A., Jouppila, K., Piironen, V., Lampi, A-M., Sandell, M., Katina, K. The flavor of faba bean ingredients and extrudates: Chemical and sensory properties. *Food Research International*, 162 (2022).
- UNIP, 1996. Statistiques plantes riches en profines. In: ed. UNIP, 7th Ed. UNIP, 77.
- Van Boekel, M.A. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*, 24, 230-233 (2006).
- Verni, M., Wang, C., Montemurro, M., De Angelis, M., Katina, K., Rizzello, C.G., Coda, R. Exploring the microbiota of faba bean: Functional characterization of lactic acid bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2461 (2017).
- Wang, Y., Sorvali, P., Laitila, A., Maina, N.H., Coda, R., Katina, K. Dextran produced in situ as a tool to improve the quality of wheat-faba bean composite bread. *Food Hydrocolloids*, 84, 396-405 (2018).
- Wang, Y., Tuccillo, F., Lampi, A-M., Knaapila, A., Pulkkinen, M., Kariluoto, S., Coda, R., Edelman, M., Jouppila, K., Sandell, M., Piironen, V., Katina, K. Flavor challenges in extruded plant-based meat alternatives: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(3), 2898-2929 (2021).
- Wildfeuer, I., Acker, L. *Über die Bestimmung von Carotinoiden in Teigwaren und deren Rohstoffen*. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel-untersuchung un Hygiene, 59, 392-400 (1968).
- Wongwattanasathien, O., Kangsadalampai, K., Tongyonk, L. Antimutagenicity of Some Flowers Grown in Thailand. *Food Chem. Toxicology*, 48(4), 1045–1051 (2010).

- Yang, P. F., Yang, Y. N., Feng, Z. M., Jiang, J. S., Zhang, P. C. Six new compounds from the flowers of *Chrysanthemum morifolium* and their biological activities. *Bioorganic Chemistry*, 82, 139–144 (2019a).
- Yang, Z., Piironen, V., Lampi, A.-M. Epoxy and hydroxy fatty acids as non-volatile lipid oxidation products in oat. *Food Chemistry*, 295, 82–93 (2019b).
- Ye, Q. Characterization of volatile constituents of *Magnolia denudata* Desr flowers by gas chromatography-mass spectrometry with headspace solid-phase microextraction. *Chemistry - An Asian Journal*, 25, 6199–6202 (2013).
- Yi, Y., Zhang, Q-W., Li, S-L., Wang, Y., Ye, W-C., Zhao, J., Wang, Y-T. Simultaneous quantification of major flavonoids in “Bawanghua”, the edible flower of *Hylocereus undatus* using pressurised liquid extraction and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 135, 528-533 (2012).
- Yong, C. S., Dolan, J. W. *LC GC Europe*, 17, 192 (2004).
- Yoo, S. H., Chang, Y. H. Volatile compound, physicochemical, and antioxidant properties of beany flavor-removed soy Protein Isolate hydrolyzates obtained from combined high temperature pre-treatment and enzymatic hydrolysis. *Preventive Nutrition and Food Science*, 21(4), 338–347 (2016).
- Zaghdoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., Ayadi-Trabelsi, M., Kalthoum-cherif, J., Vanderesse, R., Frochot, C., Guiavarc’h, Y. Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Food Chemistry*, 184, 131–139 (2015).
- Zechmeister, L., Cholnoky, L. Carotenoids of Hungarian wheat flour. *Journal of Biological Chemistry*, 135, 31-36 (1940).
- Zhao, M., Fan, J., Liu, Q., Luo, H., Tang, Q., Zhao, C.J., Zhang, X. Phytochemical profiles of edible flowers of medicinal plants of *Dendrobium officinale* and *Dendrobium devonianum*. *Food Science & Nutrition*, 9, 6575–6586 (2021).
- Ziegler, J.U., Schweiggert, R.M., Carle, R. A method for the simultaneous extraction and quantitation of lipophilic antioxidants in *Triticum* sp. by HPLC-DAD/FLD-MSn; *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 94–102 (2015).

