

Analisi e certificazione degli alimenti



Alessandro Bagno

Dipartimento di Chimica Organica, Università di Padova

<http://www.chfi.unipd.it/home/a.bagno>

alessandro.bagno@unipd.it

Presentazione

Il corso intende coprire gli aspetti principali dell'analisi dei prodotti alimentari, con particolare riferimento alle problematiche di più recente interesse per i consumatori. Il corso si articolerà come segue:

- Breve panoramica generale e storica sulla problematica della qualità degli alimenti
- Il ruolo della produzione industriale nel garantire la qualità
- Metodi analitici generali per la determinazione dei componenti nutrizionali essenziali degli alimenti
- Moderne metodiche per la ricerca di adulterazioni legate all'origine, alla qualità chimico-biologica, ed al trattamento subito dall'alimento durante la lavorazione
- Additivi alimentari e sostanze aromatiche, e loro impiego
- Contaminanti: origine, presenza e analisi
- Proprietà generali e problematiche analitiche delle principali categorie di alimenti: oli e grassi, con particolare riferimento all'olio di oliva; cereali; frutta e verdura; caffè; miele; vino; latte e derivati; carne, pesce, pollame e uova; acqua potabile
- Indicatori chimici, fisici e biologici del processo di lavorazione
- Tecniche isotopiche basate su metodi spettroscopici, in particolare di risonanza magnetica nucleare, per la determinazione dell'origine biologica

Sommario

Bibliografia

Siti web interessanti

Considerazioni generali

Qualità degli alimenti

Valore nutritivo

Sicurezza

Agenti tossici naturali e residui chimici

Contaminanti degli alimenti

Adulterazione degli alimenti

Storia e definizioni

Compiti della chimica degli alimenti

Analisi e certificazione

Esempio: tipiche adulterazioni di bevande alcoliche

Il ruolo dell'industria

Diagramma di flusso per la produzione di ovoprodotti

Metodi per l'analisi degli alimenti

Metodi tradizionali

Preparazione dei campioni

Umidità

Ceneri e sostanze minerali

Acidità titolabile e pH

Sostanze azotate e proteine grezze

Grassi

Carboidrati

Fibre grezze e fibre dietetiche

Sostanze estranee

Metodi moderni

Sensori

Tecniche immunologiche

Il test LAL (Limulus Amebocyte Lysate)

Sonde DNA

Additivi alimentari

Vitamine, sali minerali

Sostanze aromatiche

Esaltatori di sapidità

Sostituti dello zucchero ed edulcoranti

Coloranti

Conservanti

Contaminanti

Elementi in tracce

Piombo

Mercurio

Cadmio

Pesticidi

Insetticidi

Erbicidi

- Funghicidi
- Antibiotici
- Idrocarburi aromatici policiclici
- Nitrosammine
- Tossine batteriche
- Micotossine
 - Struttura di alcune micotossine

Oli e grassi

- Sostanze saponificabili
 - Saponificazione
 - Acidi grassi
- Sostanze non saponificabili
 - Principali sostanze non saponificabili
- Contaminanti ed adulteranti
 - La "sindrome dell'olio tossico" in Spagna
- Miscele di grassi
 - Analisi degli acidi grassi
 - Composizione media di vari tipi di grassi
 - Analisi degli acidi grassi: derivatizzazione
 - Acidi grassi in posizione 2
 - Analisi della frazione non saponificabile
 - Analisi della frazione non saponificabile per via GC
 - Composizione sterolica percentuale degli oli vegetali
- Deterioramento dei grassi
 - Autoossidazione dell'acido oleico
 - Spettro UV e prodotti di ossidazione
- Cambiamenti dovuti al riscaldamento
- Olio di oliva: aspetti specifici
 - Classificazione degli oli di oliva
 - Categorie
 - Componenti principali
 - Composizione in acidi grassi dell'olio di oliva
 - Composizione in steroli e idrocarburi dell'olio di oliva
 - Composizione sterolica percentuale degli oli vegetali
 - Parametri analitici legati alla genuinità degli oli vergini
 - Analisi dell'olio di oliva tramite spettroscopia NMR
 - Spettro ^1H NMR dell'olio di oliva
 - Spettro ^{13}C NMR dell'olio di oliva
 - Effetto dello stress termico sull'olio di oliva

Cereali

- Miscele tra varietà e specie diverse
- Qualità nella lavorazione
- Qualità microbiologica
- Infestazione da insetti

Frutta e verdura

- Succhi di frutta e verdura
 - Succhi misti
 - Contaminazione microbiologica

Caffè

- Miscele di caffè
- Origine geografica

Surrogati del caffè

Miele

Qualità del miele

- Adulterazione del miele
- Miele da api nutrite con zucchero
- Origine botanica e geografica
- Contaminanti del miele

Vino

Componenti del mosto; cenni su produzione e fermentazione

Miglioramento

Composizione e problemi analitici

- Estratto
- Carboidrati
- Etanolo e altri alcoli
- Acidi organici
- Fenoli, antocianine e composti azotati
- Sostanze aromatiche

Latte e derivati

Adulterazione con latte di altra specie

- Latte di pecora, capra e vacca
- Latte di vacca e di bufala
- Latte di soia

Altri tipi di adulterazione

- Miscelazione con grassi vegetali
- Diluizione con acqua

Qualità microbiologica dei latticini

Carne, pesce, pollame e uova

Identificazione della specie

Indicatori di igiene e freschezza

Contaminanti

- Contaminazione chimica
- Contaminazione microbiologica

Additivi e adulteranti

Uova

- Qualità delle uova
- Adulterazione delle uova

Acqua potabile

Acque minerali

Indicatori del processo di lavorazione

Trattamento termico

- Sterilizzazione

Cibi freschi e decongelati

Irradiazione degli alimenti

- Test basati sui cambiamenti nella flora batterica
- Test basati sulla presenza di sostanze derivanti dalla radiolisi

Metodi isotopici nell'analisi degli alimenti

Metodi isotopici basati sul rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^2\text{H}/^1\text{H}$

Analisi tramite spettrometria di massa

Analisi tramite spettroscopia NMR

Esempi

Distinzione di carboidrati di varia origine biologica tramite NMR del deuterio
Adulterazione del succo di arancia con zucchero di altra origine
Zuccheri estranei nel vino e bevande alcoliche
Aromi naturali e sintetici
Aroma di lampone: il "raspberry ketone"
Oli e grassi

Bibliografia

H.-D. Belitz, W. Grosch: *Food Chemistry*
Springer, Berlin, 1999.

Testo generale di chimica degli alimenti, molto vasto e completo.

R. S. Singhal, P. R. Kulkarni, D. V. Rege: *Handbook of Indices of Food Quality and Authenticity*

Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, 1997.

Testo sulle problematiche analitiche più moderne.

H. Egan, R. S. Kirk, R. Sawyer: *Pearson's Chemical Analysis of Foods*, 8th Ed.

Churchill Livingstone, Edinburgh, 1981.

Testo analitico generale.

F. Tateo: *Analisi dei prodotti alimentari*

Chiriotti, Pinerolo, 1978.

Testo analitico classico, rivolto principalmente al personale tecnico.

M. J. Dennis: *Recent Developments in Food Authentication*

Analyst **1998**, 123, 151R.

Una rassegna recente sulle problematiche analitiche moderne.

R. Sacchi, F. Addeo, L. Paolillo: *¹H and ¹³C NMR of Virgin Olive Oil*

Magn. Reson. Chem. **1997**, 35, S133.

Rassegna dei metodi NMR per la caratterizzazione dell'olio d'oliva.

C. Guillou, F. Reniero: *Isotopic methods for the control of food products and beverages*

Techn. Doc. IAEA, in corso di stampa.

Rassegna dei metodi isotopici per l'analisi e caratterizzazione degli alimenti.

H. This: *Molecular Gastronomy*

Angew. Chem. Intl. Ed. Engl. **2002**, 41, 83.

Un breve saggio sui fattori chimico-fisici che presumibilmente influenzano la gastronomia.

Siti web interessanti

<http://ihcp.jrc.cec.eu.int/> Institute for Health and Consumer Protection, Joint Research Centre of the EU, Ispra

<http://www.fao.org> FAO

<http://www.who.int> WHO

<http://www.fda.org> US Food and Drug Administration

<http://www.ismaa.it> Istituto Agrario S. Michele all'Adige (ISMAA), TN

Analisi e certificazione degli alimenti

Considerazioni generali

Alimenti: materiali che, nelle loro forme naturali o variamente preparate, vengono consumate per la *nutrizione* e il *piacere*.

La distinzione tra "nutrizione" e "piacere" non è né banale né arbitraria, ma introduce due importanti proprietà degli alimenti: il valore *nutritivo* e quello *edonistico*.

Il valore nutritivo è relativamente semplice da quantificare, dato che le sostanze nutrienti principali sono in numero limitato, e sono tutte conosciute assieme ai loro effetti.

Al contrario, la definizione del valore edonistico di un alimento è più difficile perché una tale definizione deve rendere conto delle proprietà visive, olfattive, gustatorie e tattili, e tali proprietà possono essere influenzate da un gran numero di sostanze, che possono anche essere in parte sconosciute.

Per di più, oltre a questi valori, gli alimenti vengono valutati anche in base a proprietà determinate dalle modalità di preparazione.

Infine, ovviamente, gli alimenti debbono essere privi di sostanze nocive o tossiche.

Qualità degli alimenti

Le preferenze dei consumatori sono note da sempre, ma possono variare sostanzialmente a seconda dell'origine geografica, di motivazione etnico-religiose, ed economiche. Queste preferenze possono variare anche nel tempo in conseguenza di cambiamenti socio-economici. Vengono quindi a crearsi delle preferenze per alimenti di una data regione, marca o tipo. Ciò nonostante, la tendenza generale del consumatore rimane fissata su alimenti sicuri e genuini. Dal punto di vista dei produttori, il concetto di "qualità" implica una serie di attributi importanti nel definire il successo commerciale di un prodotto alimentare. L'obiettivo dell'industria è di produrre alimenti di qualità uniforme tramite processi standardizzati.

Valore nutritivo

Come già accennato, i vari aspetti della nutrizione umana sono sempre meglio conosciuti; inoltre, la consapevolezza dei consumatori è crescente, a causa della vasta disseminazione di tali conoscenze. Ne risulta una domanda crescente di riportare informazioni nutrizionali sull'etichetta del prodotto (contenuto di proteine, carboidrati, grassi, vitamine, sali minerali). Più di recente, è stato posto l'accento non soltanto sul *contenuto*, ma anche sulla *biodisponibilità* e sul *valore biologico*.

Per *biodisponibilità* si intende la frazione di una sostanza nutriente effettivamente utilizzabile dall'organismo. Ad esempio, molti sali minerali sono scarsamente assorbiti se somministrati in forma inorganica (ferro negli spinaci), mentre lo sono in forma di complessi con leganti organici (ferro-emoglobina nelle carni).

Il *valore biologico* si riferisce non al potere nutritivo in quanto tale, ma alla presenza di determinati componenti. Ad esempio, il valore nutritivo dei grassi può essere valutato, oltre al loro potere energetico, sulla base del contenuto di acidi grassi essenziali (acido linoleico, linolenico, arachidonico, acidi grassi poliinsaturi).

Sicurezza

Durante l'ultima metà del XIX secolo, i progressi in chimica organica resero disponibili una quantità di sostanze sintetiche, la cui utilità venne provata in vari campi, ad esempio la saccarina ed i coloranti azoici.

Allo stesso tempo, si accertò che l'eziologia di certe malattie era di origine batterica, e furono quindi introdotti vari agenti antimicrobici per la conservazione delle derrate (ad es. il creosoto, l'acido bórico, l'acido salicilico). Tuttavia, le implicazioni tossicologiche collegate al loro uso emersero solo gradualmente e con ritardo. Da questo riconoscimento sorsero le prime regolamentazioni sull'uso di tali additivi.

I progressi in microbiologia resero possibile la connessione tra agenti patogeni e malattie, così da evidenziare il rapporto causale tra certe intossicazioni o malattie vere e proprie e agenti patogeni contenuti nei generi alimentari (ad es. *Salmonella*, botulismo, micotossine). L'analisi costante della presenza di microorganismi negli alimenti è una necessità.

Agenti tossici naturali e residui chimici

È accertata l'esistenza di agenti tossici o antinutrizionali negli alimenti, soprattutto di origine vegetale. Sono noti inibitori di proteasi, emoagglutinine, macromolecole leganti per le vitamine e i sali minerali, glicosidi in grado di generare cianuro, estrogeni.

Vi è inoltre una vasta gamma di sostanze in uso nella pratica agricola e di allevamento, che possono rimanere nei cibi in concentrazioni dannose:

- Fertilizzanti (un uso eccessivo di nitrati può portare ad un aumento del livello di nitrati nelle verdure (→ nitrosammine)
- Erbicidi, insetticidi, fungicidi, rodenticidi e inibitori di germogliamento in agricoltura ed immagazzinamento
- Anabolizzanti e antibiotici nell'allevamento.

È necessario tenere sotto controllo questi parametri, i cui valori ammissibili sono generalmente regolati per legge.

Contaminanti degli alimenti

Durante il tragitto dalla lavorazione delle materie prime al consumatore, gli alimenti sono esposti ad una varietà di pericoli che possono portare alla "contaminazione", nel senso più vasto del termine, da

- materiale estraneo (polvere, sporcizia, erbacce)
- derivante da danni meccanici (es. frutta e verdura)
- cambiamenti chimico-fisici provocati o accelerati da luce, calore, ioni metallici
- contaminazione o deperimento (microorganismi, insetti, roditori)
- cambiamenti biochimici (endogeni, o dovuti agli agenti menzionati)

Adulterazione degli alimenti

Tutti i prodotti commerciali possono essere contraffatti, ma l'impatto sul consumatore è particolarmente ovvio e marcato nel caso degli alimenti.

La legislazione deve garantire che l'alimento venga correttamente descritto, e tende a:

- Proteggere i consumatori dalla vendita di un prodotto inferiore tramite una falsa descrizione
- Proteggere i produttori onesti da una concorrenza sleale
- Evitare il deterioramento della qualità globale provocato dal livellamento in basso
- Mantenere la fiducia dei consumatori

Tempi antichi: adulterazione grossolana (annacquamento del latte,...), nessuna protezione del consumatore. Queste adulterazioni sono sempre più rare, sebbene il controllo sia ancora necessario.

Ora:

- L'industria ormai produce alimenti confezionati secondo standard definiti
- I metodi di analisi sono sofisticati, quindi le frodi grossolane (contaminazione con sostanze normalmente assenti dal prodotto) vengono facilmente smascherate. "Frodi" recenti come la *Spanish toxic oil syndrome*, *vino al metanolo* sono evidenziate immediatamente
- I metodi vengono usati dalle industrie stesse per far fronte al crescente grado di consapevolezza dei consumatori
- Il valore nutrizionale degli alimenti è generalmente garantito
- Particolare attenzione alle qualità "edonistiche" in senso lato (origine geografica, genuinità, assenza di contaminazioni...)

L'adulterazione o frode odierna

- È rivolta ad alimenti di alto valore commerciale (olio d'oliva, vini, ...)
- Generalmente non comporta l'aggiunta di sostanze nocive (ad es. aggiunta di zucchero ai vini)
- È molto più sofisticata: pensata per frodare criteri quali l'origine controllata, la presenza di additivi "naturali" o "artificiali"... fino alla presenza di organismi geneticamente modificati.

Storia e definizioni

Medio Evo: primi esempi di adulterazione riportati...

...Inizio del XVIII secolo: Controllo su certi alimenti (birra, vino, alcolici, tè) *al solo scopo fiscale*

1861: Uso del microscopio per certificare l'autenticità del caffè (a quel tempo estremamente costoso)

1875: Sale of Food and Drugs Act (UK)

Un alimento viene considerato adulterato se:

1. Contiene ingredienti che lo rendono pericoloso per la salute del consumatore
2. Contiene sostanze che ne aumentano il peso o il volume, a meno che queste non siano necessarie alla preparazione e vengano dichiarate al momento della vendita
3. Un costituente importante è stato rimosso in tutto o in parte senza che questo venga dichiarato al momento della vendita
4. È una imitazione, o viene venduto sotto il nome, di un altro alimento.

1931: Food and Drug Administration (FDA) (USA)

1962: Codex Alimentarius Commission (FAO) ... Unione Europea

La legislazione vigente differisce a Paese a Paese. Tuttavia, *in molti Paesi un alimento viene considerato adulterato se:*

- Contiene materiale vegetale o animale sporco, putrefatto, decomposto o malato
- È infestato da insetti o inadatto al consumo umano
- È confezionato o conservato in condizioni non igieniche
- Contiene ingredienti tossici
- È stato sostituito con sostanze inferiori o meno costose
- Sono stati rimossi alcuni dei suoi costituenti
- È imballato con materiali tossici o nocivi
- Contiene additivi proibiti, o additivi consentiti in quantità superiori ai limiti prescritti
- La sua qualità è inferiore allo standard prestabilito
- È di natura o qualità diversi dal dichiarato, o utilizza descrizioni false o fuorvianti

Le stesse leggi controllano

- La composizione riguardo l'uso di additivi e la contaminazione
- L'etichettatura dei prodotti

Compiti della chimica degli alimenti

- Determinare la composizione delle materie prime e prodotti finiti
- Caratterizzare reazioni e processi durante la produzione, trasformazione, stoccaggio e cottura. Il compito è complicato dalla natura complessa e non riproducibile di questi materiali
- Mantenere il legame tra questi studi e gli aspetti tecnologici ed economici
- Mantenere il passo con l'evoluzione delle tecniche analitiche, con particolare attenzione alle nuove problematiche (forte attenzione dei consumatori per problemi legati alla contaminazione e ai rischi per la salute)

Un campo molto vasto e sfaccettato

Analisi e certificazione

Due aree:

1. **Presenza di ingredienti estranei o nocivi**, generalmente evidenziata tramite procedure analitiche standard → prova di composizione (analisi)

Le tecniche analitiche classiche sono rivolte alla determinazione della composizione chimica dell'alimento, con l'obiettivo di stabilirne il potere nutritivo e la rispondenza a dati criteri nutrizionali (ad es.: tenore di acqua, carboidrati, sostanze azotate, ceneri...). Queste tecniche, dunque, privilegiano il primo aspetto (nutrizionale) dell'analisi, e sono volte a rivelare la qualità di base, ed eventualmente frodi grossolane; costituiscono dunque il livello base dell'analisi. Queste tecniche sono standardizzate in metodi ufficiali, che consentono la certificazione dei risultati.

Un altro gruppo di metodi è rivolto alla determinazione di sostanze del tutto estranee all'alimento, quali residui di pesticidi, tossine da contaminazione fungina o batterica, ecc., o contaminazioni biologiche, e riguarda ancora l'aspetto nutrizionale (l'alimento non deve essere nocivo). In questi casi lo scopo dell'analisi è di rivelare la presenza di particolari sostanze, normalmente assenti.

2. **Vendita di alimenti di qualità diversa dal dichiarato** → prova di composizione (analisi), mancata, falsa o fuorviante dichiarazione (etichettatura)

Le problematiche emerse più di recente riguardano specificamente l'aspetto edonistico del cibo, in quanto si occupano di determinare parametri che non mettono in dubbio il potere nutrizionale o l'assenza di pericolosità dell'alimento. Si tratta quindi di problemi "sottili", in quanto riguardano la determinazione di

- Variazioni nel rapporto di composizione di sostanze normalmente presenti nell'alimento.
- Presenza di sostanze normalmente già presenti nell'alimento ma di origine biologica diversa

Aggiunta di sostanze normalmente presenti nell'alimento, ma provenienti da altra specie. Ad es.: l'aggiunta di zucchero ai vini per aumentarne il grado alcolico è consentita solo con certe restrizioni. Come si può stabilire l'avvenuta aggiunta, *dato che si tratta della stessa sostanza*, anche se di origine diversa (zucchero di canna o di barbabietola)?

Componenti aromatici. Se estratti da fonti naturali hanno prezzi enormemente maggiori dei corrispondenti sintetici, *sebbene la composizione chimica sia la stessa*.

In tempi recenti, hanno avuto forte impatto le questioni relative all'insorgenza della BSA solo in certi ceppi bovini britannici, e problemi legati agli OGM.

- **Trattamenti subiti**
Ottenimento dell'olio d'oliva per pressatura meccanica o per estrazione con solventi, presenza di componenti derivati da OGM
- **Provenienza geografica**
Molti cibi sono caratteristici di particolari regioni; l'origine è spesso presa come indice di qualità.

Questi problemi non rientrano chiaramente nel SFDA 1875 (eccetto forse il punto 4), ed illustrano la necessità di aggiornare continuamente le normative ed i metodi analitici in relazione alle tendenze dei consumatori (e anche alla creatività degli adulteratori!).

Esempio: tipiche adulterazioni di bevande alcoliche

Adulterazione	Prodotto
Aggiunta di acqua	vini, sidro
Aggiunta di zucchero	vini (è permessa l'aggiunta di mosto d'uva)
Denominazione di origine falsa	vini, cognac, champagne, whisky...
Provenienza botanica dell'alcool non corrispondente	uso di alcool di sintesi; alcool di barbabietola nel rum, etc.
Varietà non corrispondente	vini (altre varietà di uve)
Aggiunta di coloranti	vini, brandy, etc.
Aggiunta di aromi di sintesi	tutte le bevande, eccetto dove consentito e dichiarato

Il ruolo dell'industria

L'ottica generale odierna è di garantire la "qualità" degli alimenti e quindi la soddisfazione del consumatore. In questo processo il consumatore gioca un ruolo sempre meno passivo; è essenziale stabilire un rapporto con esso, e comprenderne le aspettative.

Secondo la norma ISO 8402, la *qualità* è "*l'insieme delle proprietà e delle caratteristiche di un prodotto o servizio che gli conferiscono l'attitudine a soddisfare bisogni espressi o impliciti*".

Allo scopo, sono stati codificati dei metodi gestionali che codificano le norme ritenute necessarie a garantire la sicurezza e la qualità.

Un esempio è il sistema **ISO 9000** (che in realtà si applica a tutte le industrie manifatturiere e di servizi). Il sistema richiede che i produttori definiscano i loro standard e possano dimostrare la conformità ad essi, con l'obiettivo di controllare e migliorare gli standard di qualità a tutti i livelli operativi.

La conformità alle norme ISO 9000 può essere certificata attraverso

- Valutazione delle procedure di approvvigionamento (rintracciabilità delle materie prime)
- Identificazione e rintracciabilità del prodotto (identificazione del lotto di produzione)
- Controllo del processo produttivo (immissione sul mercato solo dopo verifica analitica)
- Controllo delle apparecchiature di misura, validazione delle metodologie analitiche
- Controllo dell'immagazzinamento, imballaggio e conservazione
- Mantenimento della documentazione (archiviazione dati)

Il sistema **HACCP** (*Hazard Analysis and Critical Control Points*), inizialmente ideato per l'identificazione del solo rischio microbiologico, è ora generalizzato a tutti i rischi correlati agli alimenti (microbiologico, chimico, fisico), e può essere applicato all'intera catena produttiva.

L'HACCP pone l'accento sul controllo del processo piuttosto che del prodotto. I *punti critici di controllo (CCP)* sono momenti di rischio del processo produttivo, il cui monitoraggio costante dovrebbe consentire un rapido intervento correttivo. I vantaggi dovrebbero essere sia per il consumatore (maggiore garanzia) che per il produttore (minori costi, legati ad es. al ritiro di prodotti difettosi).

Ad esempio, nella produzione di derivati delle uova, i *CCP chimici* più importanti sono: (a) la scelta della materia prima; (b) il lavaggio e disinfezione del guscio, mentre i *CCP microbiologici* sono: (a) la scelta della materia prima; (b) il trasporto delle uova; (c) lo stoccaggio; (d) il lavaggio e disinfezione del guscio; (e) dopo sgusciatura e filtrazione, lo stoccaggio refrigerato; (f) la pastorizzazione, ed infine (g) lo stoccaggio finale. Vi è anche un *CCP fisico* (filtrazione).

La procedura HACCP stabilisce:

- I parametri da tenere sotto controllo e i loro limiti: ad es. tempo, temperatura, pH...
- Un sistema di controllo: le prove devono essere di rapida esecuzione → procedure analitiche moderne (sensori...). Se attuato tempestivamente, il controllo equivale alla prevenzione
- Interventi nei casi di deviazione dai limiti: preferibilmente da eseguire prima che il parametro sfugga al controllo
- Procedure di verifica: analisi nei punti critici, intermedi e prodotto finito
- Procedure di registrazione e documentazione

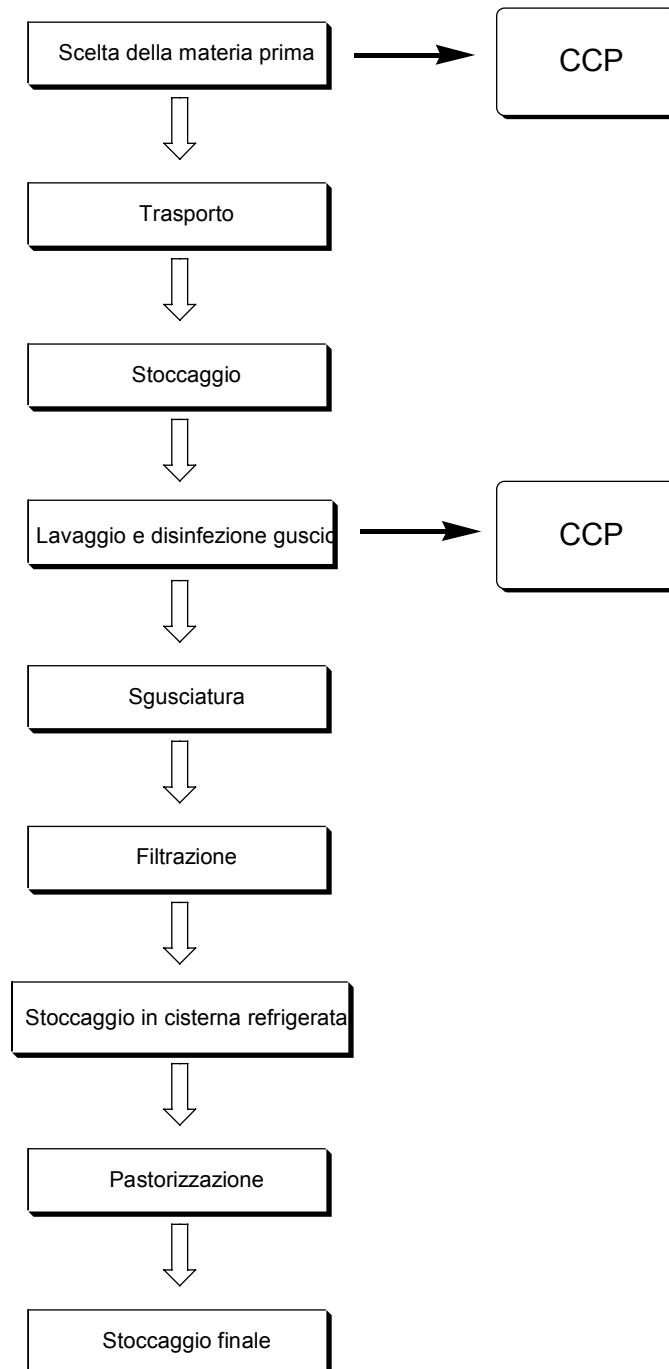
I punti critici vengono stabiliti da

- Analisi di modelli (ad es. simulazioni della crescita di microrganismi nel prodotto)
- Prove sperimentali di crescita per inoculazione nel prodotto sotto normali condizioni di stoccaggio
- Challenge test (prova dell'efficacia di antibatterici)

La legislazione corrente richiede il controllo di un sempre maggior numero di punti critici, e questi metodi sono ormai affermati sia nell'UE che in USA.

L'HACCP è parte integrante del Sistema Qualità ISO 9000, le cui norme sono unificate; pertanto le relative certificazioni hanno valore transnazionale nell'UE.

Diagramma di flusso per la produzione di ovoprodotti



Adattato da: B. Rindone, Dispense "HACCP: Principi ed applicazioni nel settore alimentare".

Metodi per l'analisi degli alimenti

I metodi generali sono standardizzati in procedure ufficialmente accettate per la certificazione, e spesso sono incorporati in procedure automatizzate.

I metodi "tradizionali" si possono suddividere in:

- **Metodi fisici** (microscopia per l'esame istologico di parti vegetali o animali, peso specifico, potere ottico rotatorio, indice di rifrazione per alimenti liquidi, come oli e succhi di frutta; spettroscopia UV, IR, NMR)
- **Metodi chimici** (gravimetria, titolazione, complessometria) per i danni dovuti ad agenti chimici, biochimici, microbici, da insetti, o per la determinazione di vitamine, sali minerali, metalli pesanti
- **Metodi strumentali** (microcalorimetria, fluorimetria, spettrofotometria per la determinazione di vitamine, sali minerali; cromatografia, elettroforesi, saggi enzimatici)

Più recentemente, si sono affermati diversi nuovi metodi, basati su metodi di biologia molecolare e spettroscopici, per affrontare l'analisi degli alimenti nella prospettiva di disporre di

- Metodi portatili e automatizzabili (kit)
- Metodi più selettivi o più sensibili (analisi di contaminazioni in tracce)
- Tecniche di ingegneria genetica, isolamento di geni, clonazione, uso di DNA ricombinante → tecniche immunochimiche, biosensori, sonde DNA
- Metodi enzimatici per la rivelazione di molecole in tracce
- Metodi isotopici (IRMS, SNIF-NMR)

Metodi tradizionali

Preparazione dei campioni

Gli alimenti sono materiali per loro natura molto eterogenei → omogeneizzazione, campionamento statistico.

Umidità

Si ritrova come acqua legata, adsorbita e libera presente in quantità variabili. È importante perché legata alla facilità di attacco da microorganismi e all'insorgere della reazione di Maillard. Nel caso della carne, la capacità di ritenzione idrica è legata alla consistenza della carne.

Ceneri e sostanze minerali (calcio, potassio, sodio, fosfati)

Residuo dopo la combustione della parte organica a circa 500 °C.

I minerali vengono determinati nelle ceneri. I sali minerali come Ca, K, e Na vengono determinati per spettrometria di assorbimento atomico, mentre i fosfati per precipitazione come fosfomolibdato.

Cloruro di sodio: conoscere la concentrazione di sale negli alimenti è spesso necessaria per ragioni di conservazione e di gusto. Il contenuto viene determinato sulle ceneri per titolazione con argento nitrato.

Acidità titolabile e pH

Conoscere l'acidità è importante perché la concentrazione acida è legata all'attività enzimatica e alla crescita di microbi durante la conservazione e il deterioramento. L'acidità viene misurata per titolazione con alcali. Questo valore non indica la natura dell'acido.

La misura del pH negli alimenti è difficoltosa a causa della loro natura eterogenea. Può essere effettuata con elettrodi a vetro speciali da inserire direttamente nel campione (ad es. carne).

Sostanze azotate e proteine grezze

il metodo principale è quello di *Kjeldahl* (che dà risultati per l'azoto organico ma non per quello inorganico, come nitrati e nitriti). Il metodo è basato sulla combustione umida del campione per riscaldamento con acido solforico concentrato in presenza di catalizzatori (HgO, Se), in modo da ridurre l'azoto organico ad ammoniaca, che viene così trasformata in solfato di ammonio. L'ammoniaca viene quindi titolata. Sono disponibili dispositivi automatici.

Il valore così ottenuto può essere convertito in contenuto di proteine grezze tramite opportune tabelle.

Grassi

I grassi sono costituiti da varie sostanze lipidiche (principalmente triacilgliceroli, cioè triesteri del glicerolo con acidi carbossilici saturi o insaturi (acidi grassi). Un parametro importante è legato non solo al loro potere energetico, ma anche (e soprattutto) alla loro composizione negli acidi grassi costituenti.

I grassi liberi possono essere estratti con solventi non polari (etere di petrolio, etere etilico), mentre i grassi legati debbono essere estratti con solventi più polari come gli alcoli. Vengono analizzati per gascromatografia (previa derivatizzazione). Queste metodiche verranno presentate più in dettaglio nella parte dedicata all'olio di oliva.

Carboidrati

Negli alimenti, i carboidrati sono presenti come oligosaccaridi, generalmente monosaccaridi (pentosi ed esosi: glucosio, fruttosio...) e disaccaridi (saccarosio), oppure come polisaccaridi (amido, cellulosa).

Un test qualitativo per accertare la presenza di carboidrati consiste nel trattare il campione con acido solforico concentrato e α -naftolo. L'acido idrolizza e decompone i carboidrati a 5-idrossimetilfurfurale, che dà un composto di addizione colorato con l' α -naftolo.

Altre prove qualitative, per gli zuccheri riducenti, sono quelle basate sul reattivo di Fehling e simili (formazione di un precipitato di ossido rameoso, Cu_2O , per riduzione di Cu(II) da parte del gruppo aldeidico dello zucchero).

Sono applicabili, naturalmente, anche vari metodi cromatografici. Per la GC è necessaria la derivatizzazione (TMS) dato che i carboidrati non sono volatili.

Inoltre, si può sfruttare l'elevato *potere ottico rotatorio* di molti carboidrati. Si misura l'angolo di rotazione di un fascio di luce polarizzata linearmente (riga D del sodio), che può essere

rapportato al *potere rotatorio specifico* $[\alpha]_D^{20} = \frac{100\alpha}{lc}$, dove α è l'angolo misurato, l la

lunghezza della cella polarimetrica, e c la concentrazione (a 20 °C). Questo metodo consente determinazioni quantitative, ma richiede una conoscenza del tipo di zucchero. Viene molto usato nell'analisi di processo durante l'estrazione del saccarosio dalla barbabietola.

Fibre grezze e fibre dietetiche

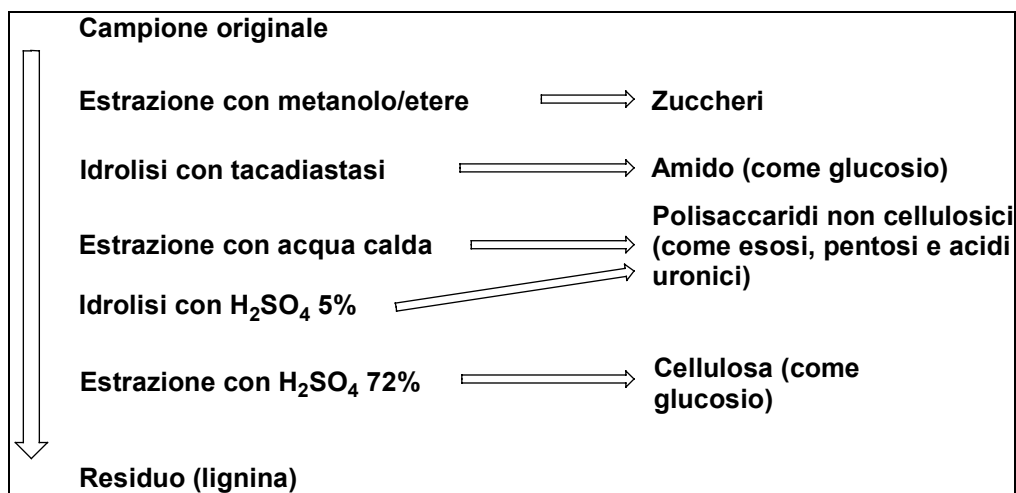
la *fibra grezza* è il materiale, insolubile e combustibile, che rimane dopo il trattamento consecutivo con etere di petrolio, acido solforico diluito, idrossido di sodio diluito, acido cloridrico diluito, alcool ed etere. Questo trattamento dà una fibra grezza costituita in un gran parte da cellulosa e pentosani (lignina).

Le *fibre dietetiche* possono essere definite come i componenti dell'alimento che non vengono digeriti nel tratto intestinale in sostanze a più basso peso molecolare assorbibili.

Comprendono *emicellulose*, *pectine*, *cellulosa*, *mucillaggini*, *lignina* (in realtà alcune di

queste sostanze sono solubili e non fibrose). Il ruolo delle fibre dietetiche nella dieta è ben noto (mantenimento della peristalsi intestinale), ed è ora considerato importante nella nutrizione.

La determinazione di queste sostanze è empirica, e non vengono determinati componenti individuali.



Sostanze estranee (test di "sporizia")

Determinazione di materiale estraneo: terra, sabbia, ma soprattutto frammenti di insetti e pelo di roditori. Quest'ultimo è sempre contenuto nelle loro feci, per cui la loro presenza è indice di contaminazione. Il test è importante soprattutto per le farine; viene svolto sciogliendo il materiale in un opportuno solvente ed esaminando i residui.

Metodi moderni

Sensori

Sono dispositivi composti da una *sonda* (molecolare, enzimatica, microbica) accoppiata ad un *trasduttore*, che trasforma il segnale così prodotto in una grandezza misurabile da un *rivelatore* chimico, elettrochimico, ottico, o termico. Si possono progettare sensori in grado di sfruttare virtualmente qualsiasi reazione o interazione; il loro vantaggio sta nelle ridotte dimensioni, facile trasportabilità e facilità d'uso. La tendenza odierna è, quindi, di sostituire le tipiche reazioni chimiche o biochimiche "per via umida" con sensori o biosensori.

In chimica degli alimenti, i sensori trovano impiego, tra l'altro, nell'analisi di pesticidi, tossine, contaminazione microbica e nel controllo di inattivazione degli enzimi.

Tecniche immunologiche

I saggi immunochimici utilizzano a scopo analitico la reazione tra un anticorpo (o un suo frammento) prodotto in risposta ad un antigene caratteristico, ed un materiale biologico contenente l'antigene. Questi metodi sono relativamente recenti; uno dei loro vantaggi è dato dalla realizzabilità di kit portatili. Le applicazioni correnti includono la determinazione di

- Micotossine, pesticidi, tossine naturali
- Proteine (glutine), allergeni, tossine batteriche e batteri patogeni (*Salmonella*, *Listeria*)

Le applicazioni possibili sono in linea di principio illimitate.

Il test LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*)

Un test peculiare per la presenza di batteri Gram-negativi, che si è rivelato utile in molti casi, è dato dalla reazione tra le endotossine prodotte da batteri Gram-negativi e una proteina presente sulla superficie delle cellule del sangue (amebociti) degli xifosuri o limuli (*Limulus polyphemus*). Tale saggio è basato sull'osservazione che l'infezione di questi artropodi da parte di batteri Gram-negativi porta ad una trombosi fatale.

La prova viene eseguita incubando un estratto acquoso (lisato) di amebociti di *Limulus* con le endotossine di batteri Gram-negativi *in vitro*, che eventualmente porta alla coagulazione. Il saggio è semiquantitativo e automatizzabile; viene utilizzato per stabilire la qualità batteriologica del latte crudo e pastorizzato.

Sonde DNA (DNA Probes)

Una sonda DNA consiste in un frammento di DNA, che viene impiegato per rivelare la presenza di una specifica sequenza di DNA "bersaglio" presente nel DNA di un dato organismo. Queste sonde vengono marcate per permettere di rivelare l'avvenuta ibridazione con la sequenza bersaglio; la marcatura può essere effettuata con isotopi radioattivi (^{32}P), enzimi o altre molecole facili da rivelare. L'importanza di questo metodo nel contesto alimentare deriva dalla sua capacità di riconoscere e caratterizzare organismi specifici, e materiali derivati da essi. Tra le applicazioni ricordiamo:

- Determinazione di agenti patogeni (*Salmonella*, *Staphylococcus* sp., *Listeria*, virus dell'epatite A)
- Autenticità di carne e prodotti vegetali (cultivar)
- Identificazione dei funghi commestibili

Additivi e aromi

Gli additivi sono sostanze aggiunte agli alimenti durante il ciclo produttivo, senza esserne un ingrediente principale. L'uso di additivi per la conservazione del cibo è antico (sale, olio, aceto, alcool, fumo...).

Al giorno d'oggi, la produzione, preparazione, confezionamento e distribuzione del cibo è un'industria sempre più complessa. I vari stadi sono assistiti dall'uso di additivi chimici e materiali da imballaggio, per cui il prodotto finito può contenere varie quantità di materiale non nutritivo introdotto deliberatamente o accidentalmente. Con il termine *additivi* si intendono (a differenza dei *contaminanti*) le sostanze intenzionalmente introdotte nell'alimento posto in vendita, e sono utilizzati per raggiungere uno specifico obiettivo tecnologico. Ad esempio per incrementare:

- Il valore nutritivo (addizione di vitamine, sali minerali, amminoacidi).
- Il valore sensoriale (colore, odore, sapore, consistenza), che può diminuire durante la lavorazione. A questo si può ovviare con additivi come *pigmenti*, *aromi*, *esaltatori di sapidità*.
- La durata di conservazione (*shelf life*). Infatti, nei Paesi industrializzati la crescente domanda di cibi preparati rende desiderabile un allungamento della disponibilità dell'alimento. Inoltre, la situazione alimentare mondiale richiede comunque la conservazione, per ridurre al massimo il deterioramento. Questo implica protezione dall'attacco microbico, stabilizzazione del pH, stabilizzazione della consistenza con agenti ispessenti o gelificanti.

È implicito che gli additivi (e i loro prodotti di degradazione) non debbono essere tossici ai livelli in uso, per quanto riguarda la tossicità sia acuta che cronica (in particolare potenziali effetti cancerogeni, teratogeni e mutageni). Per questi motivi, il loro uso è regolato per legge in tutti i Paesi, con limiti qualitativi e quantitativi agli additivi consentiti.

Vitamine, sali minerali

Vengono spesso aggiunti per compensare perdite di lavorazione, o per aumentare il valore nutritivo. Alcune vitamine hanno anche altri effetti benefici, ad es. la *vitamina C* (acido ascorbico) funziona anche da antiossidante.

L'aggiunta di sali di *ferro* è frequentemente impiegata per supplire alla mancanza di disponibilità nei generi alimentari. Altri minerali aggiunti spesso sono il *calcio*, *magnesio*, *rame* e *zinco*. L'aggiunta di *iodio* al sale ha importanza in regioni carenti di iodio.

Sostanze aromatiche

Le sensazioni olfattive e gustative che vengono provate durante il consumo dei cibi sono dovute ad un insieme complesso di sostanze che vi contribuiscono, note come *aromi*. Alcune sostanze sono responsabili solo del gusto o dell'odore, mentre altre contribuiscono ad entrambe le sensazioni. Le prime sono generalmente meno volatili. Occorre in primo luogo notare che la stessa sostanza può contribuire al tipico aroma di un cibo e impartire qualità negative ad un altro.

Sebbene gli alimenti siano aromatizzati da secoli, ai nostri tempi la produzione industriale richiede un uso sempre maggiore di sostanze aromatiche, sia perché alcuni aromi naturali sono rari e costosi, sia perché durante il ciclo produttivo si hanno perdite di queste sostanze. Gli alimenti maggiormente aromatizzati sono le bevande analcoliche, i prodotti dolciari, gli spuntini. I tipi di aroma più frequentemente usati sono: di agrumi, menta, frutti rossi, vaniglia, carne.

Il numero dei composti aromatici negli alimenti è molto alto (> 6000), sebbene queste sostanze siano presenti in piccole quantità (10-15 mg/kg).

Ciascuna sostanza ha una propria concentrazione di soglia, al di sopra della quale comincia ad impartire l'aroma. Ad esempio, la soglia minima di percezione in soluzione acquosa è di 100 mg/l per l'etanolo, 0.02 mg/l per la vanillina, e 2×10^{-5} mg/l per il metantiolo (CH_3SH).

I cibi preparati per fermentazione e/o trattamenti termici (es. caffè, tè, prodotti da forno) sono particolarmente ricchi di sostanze aromatiche. Infatti, durante questo trattamento avviene una serie molto complessa di reazioni, nota come *reazioni di Maillard*.

Reazione di Maillard (cenni)

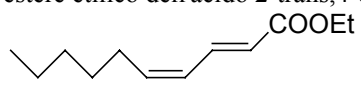
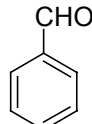
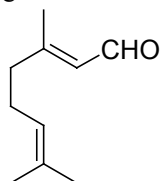
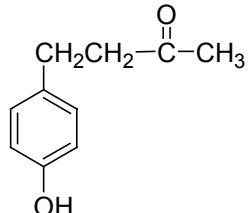
Questa reazione richiede come reagenti iniziali un gruppo amminico ed il gruppo ossidrilico di un carboidrato. Il gruppo amminico viene fornito da amminoacidi come la lisina, l'arginina o la prolina. Lo zucchero è generalmente glucosio o fruttosio. Occorre notare che la reazione può avvenire lentamente anche senza riscaldamento, purché in condizioni di bassa umidità. Pertanto è un processo generale durante la conservazione degli alimenti, soprattutto se disidratati.

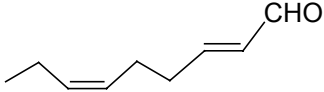
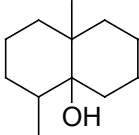
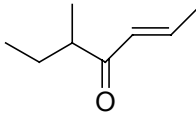
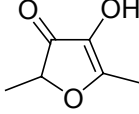
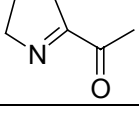
Il risultato di queste reazioni è la formazione di:

- Pigmenti bruni (*melanoidine*), di struttura poco caratterizzata (contengono quantità variabili di azoto, e sono di peso molecolare variabile). Questi pigmenti sono responsabili dell'imbrunimento dei prodotti farinacei in seguito alla cottura. Per contro, l'imbrunimento di altri alimenti poco colorati o di colore proprio caratteristico (ad es. latte, pomodoro, minestre in polvere) è indesiderabile e deve essere evitato.
- Composti volatili e sostanze aromatiche, spesso componenti essenziali dell'aroma, ma anche responsabili di caratteristiche organolettiche negative. Ad esempio, la reazione di Maillard fa parte integrante del processo di panificazione; il 4-idrossi-2,5-dimetil-3(2H)-furanone e la 2-acetil-1-pirrolina (vedi Tabella) sono prodotti di questa reazione presenti in alimenti quali pane, biscotti, birra, caffè.
- Composti fortemente riducenti che possono contribuire alla stabilità dei cibi verso l'ossidazione
- Composti mutageni

Si ha anche perdita di amminoacidi essenziali e reticolazione delle proteine.

Struttura e di sorgenti di alcune sostanze aromatiche

Composto	Aroma	Sorgenti
estere etilico dell'acido 2-trans,4-cis-decadienoico 	pera	pere
benzaldeide 	mandorle amare	mandorle, ciliegie, prugne
geraniale 	limone	limoni
1-(p-idrossifenil)-3-butanone (<i>raspberry ketone</i>) 	lampone	lamponi
(R)-(-)-1-otten-3-olo	funghi	champignon, camembert

$\begin{array}{c} \text{CH}=\text{CH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{C}-(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array}$		
2-trans,6-cis-nonadienale 	cetriolo	cetrioli
geosmina 	terra	barbabietola
trans-5-metil-2-epten-4-one (filbertone) 	noci	nocciole
4-idrossi-2,5-dimetil-3(2H)-furanone 	caramello	biscotti, birra, caffè
2-acetil-1-pirrolina 	abbrustolito	crosta del pane

L'analisi di queste sostanze è particolarmente difficile, a causa delle basse concentrazioni e della loro grande varietà. Ciò nonostante, i risultati sono importanti e richiesti perché stabiliscono la qualità dei passaggi di trasformazione, ed eventuali perdite. Inoltre, la caratterizzazione degli aromi permette, ove consentito, di sostituire quelli rari e costosi con i loro equivalenti sintetici.

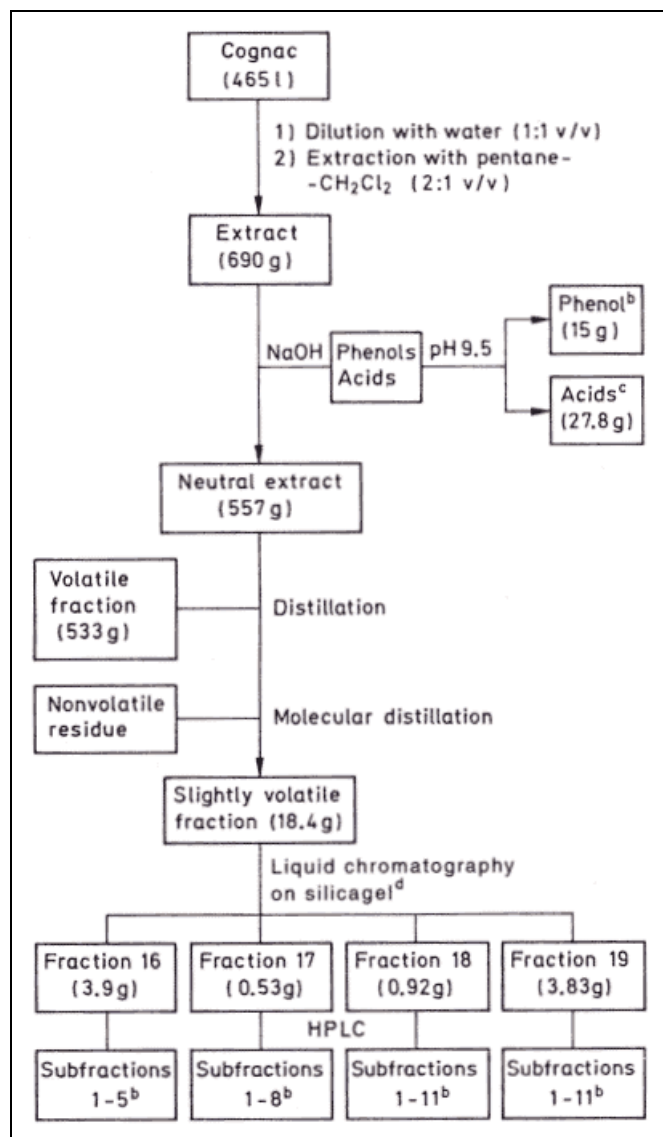
Date le piccole quantità in gioco, e la complessità molecolare, la tecnica più potente per questa analisi è probabilmente la gascromatografia (o la cromatografia liquida) abbinata alla spettrometria di massa (*GC-MS*, *LC-MS*). Recentemente, anche la spettroscopia NMR è stata applicata con successo a problemi di questo genere, soprattutto per la distinzione tra aromi naturali ed equivalenti sintetici (vedi analisi isotopica).

Una delle difficoltà che si incontrano riguarda le tecniche di estrazione.

Le sostanze aromatiche volatili presenti nella fase vapore sovrastante un alimento possono essere rivelate mediante *analisi dello spazio di testa*, cioè l'analisi della fase gassosa stessa. Richiede tecniche di rivelazione molto sensibili, perché il contenuto di sostanze volatili negli alimenti è relativamente basso.

Alternativamente, l'alimento può essere sospeso in acqua e sottoposto a distillazione, che permette di recuperare i componenti più volatili in forma concentrata. Il distillato viene poi estratto con solventi organici e analizzato. Questo trattamento, però, richiede un trattamento termico che può alterare la composizione.

La separazione di queste miscele richiede vari passaggi, ad esempio trattamento con alcali per separare i componenti acidi (acidi carbossilici, fenoli). A titolo di esempio si riporta la procedura usata per l'analisi dei componenti aromatici nel cognac.



Analisi dei componenti volatili aromatici del cognac. (b) l'analisi GC-MS rivela 18 acetali, 59 alcoli, 28 aldeidi, 70 esteri, 35 chetoni, 3 lattoni, 8 fenoli, e 44 altri composti. (c) 27 composti. (d) separazione per HPLC.
 da: H.-D. Belitz, W. Grosch, *Food Chemistry*, Springer, Berlin, 1999.

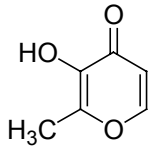
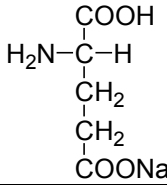
Alcuni aromi naturali sono stati completamente caratterizzati, e per quelli più importanti sono state messe a punto procedure di sintesi per permetterne la disponibilità a prezzi molto più bassi. Così, la *vanillina* (3-metossi-4-idrossibenzaldeide) può essere preparata per sintesi ad un prezzo molto minore. La vanillina sintetica può essere differenziata da quella naturale dal rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (→ Metodi isotopici).

Accanto a questi aromi, vi sono gli *aromi artificiali*, cioè sostanze non presenti naturalmente. Dove consentito, possono essere aggiunte agli alimenti, purché questo venga dichiarato sull'etichetta. I requisiti sono molto severi: deve essere assolutamente esclusa la nocività, ed inoltre le sostanze devono essere accuratamente purificate per eliminare eventuali impurezze con aroma estraneo. Uno degli aromi artificiali più importanti è l'*etilvanillina* (3-etossi-4-idrossibenzaldeide), usata in sostituzione della vanillina a causa del suo aroma 3-4 volte più intenso.

Esaltatori di sapidità

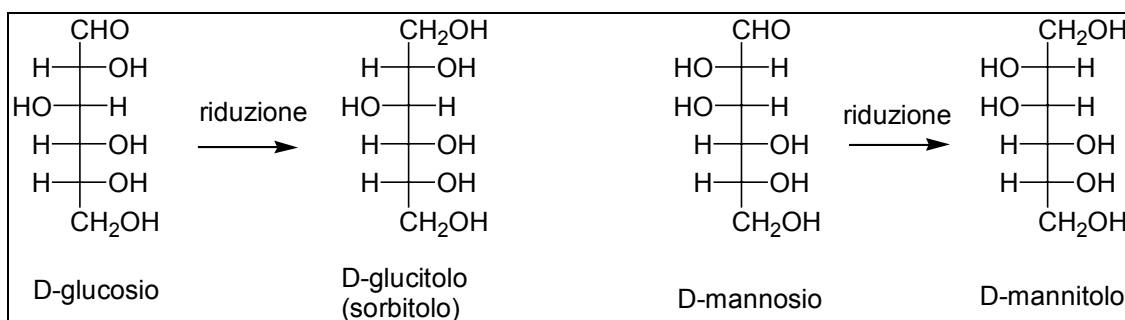
Queste sostanze esaltano l'aroma del cibo pur senza avere un proprio odore o gusto caratteristico. Quello usato più di frequente è il *glutammato monosodico* (MSG, $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COONa}$) nei cibi a base di carne e minestre. Il *maltolo* (3-idrossi-2-

metil-4-pirone) esalta il sapore dolce dei cibi a base di carboidrati (es. succhi di frutta, marmellate), per cui consente di ridurre il tenore di zuccheri.

	
Maltolo	Glutammato monosodico

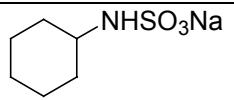
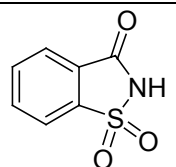
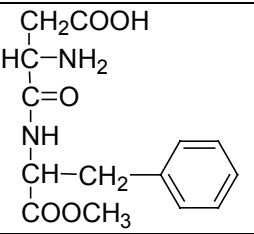
Sostituti dello zucchero ed edulcoranti

I sostituti dello zucchero sono sostanze capaci di conferire sapore dolce come gli zuccheri (saccarosio, glucosio) ma vengono metabolizzati senza l'intervento dell'insulina. I più importanti sono gli alcoli ottenibili per riduzione degli zuccheri, come il *sorbitolo*, lo *xilitolo* ed il *mannitolo*. Vengono usati negli alimenti dietetici, e hanno proprietà cariogene inferiori agli zuccheri.



Gli edulcoranti sono composti naturali o sintetici in grado di conferire sapore dolce ma possiedono un valore nutritivo scarso o nullo in rapporto al sapore dolce. La loro importanza è notevolmente cresciuta negli ultimi decenni, in conseguenza dell'aumento della popolazione obesa e quindi alla crescente richiesta di alimentazione ipocalorica.

Gli edulcoranti artificiali "storici", *saccarina* e *ciclammati*, sono ormai abbandonati a causa della loro nocività; lo sviluppo di nuovi edulcoranti è comunque complicato dalla scarsa conoscenza della relazione tra struttura molecolare e sapore. In effetti sono note moltissime sostanze di sapore dolce anche molto più marcato del saccarosio, ma molte di queste sono tossiche (ad es. le nitroaniline). Attualmente un edulcorante molto usato è l'*aspartame* (estere metilico del dipeptide L-aspartil-L-fenilalanina, L-Asp-L-Phe-OMe). Uno dei problemi connessi al suo uso è la scarsa stabilità all'idrolisi nelle condizioni di conservazione.

		
Sodio ciclammati	Saccarina	Aspartame

Coloranti

La perdita del colore naturale durante la lavorazione è frequente. Vi sono numerosi coloranti e pigmenti naturali che vengono quindi impiegati allo scopo, tipicamente i colori giallo (carotenoidi) e rosso (barbabietola). Attualmente, vi sono pochissimi coloranti sintetici ammessi, ma la legislazione varia da Paese a Paese.

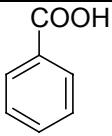
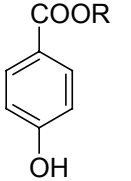
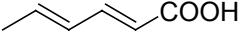
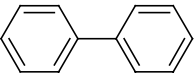
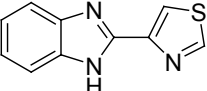

Conservanti

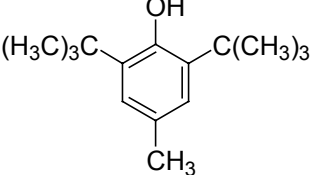
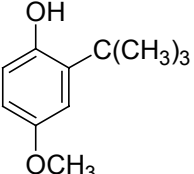
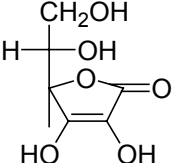
Gli *antimicrobici* vengono utilizzati per inibire la crescita di microorganismi quali batteri, muffe e lieviti. Il gruppo degli *antiossidanti* (inibitori di reazioni radicaliche) previene invece l'autoossidazione dei lipidi, che porta all'irrancidimento (→ olio di oliva). Esempi: Acido L-ascorbico e sali, BHA, BHT. La determinazione analitica di queste sostanze prevede vari stadi di estrazione dal materiale di partenza, e la determinazione qualitativa e quantitativa per via cromatografica.

Uso dei conservanti

Antimicrobico	Efficace contro	Alimento	Note
Anidride solforosa (SO ₂)	muffe, lieviti e batteri	vari; molto usato nei vini	rottura dei ponti disolfuro, disattiva vitamina B
Nitrati e nitriti (NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻)	<i>Clostridium botulinum</i>	carni	formazione di nitrosammine NO ₃ ⁻ → NO ₂ ⁻ NO ₃ ⁻ presente naturalmente. nei vegetali mantiene il colore rosso della carne
Acido benzoico e sali <i>p</i> -Idrossibenzoati (paraben) Acido propionico e sali	muffe e lieviti muffe e lieviti muffe	vari vari pane, farinacei	presente naturalmente in certi formaggi (Emmental)
Acido sorbico Bifenile, tiabendazolo Ossido di etilene	muffe e lieviti muffe tutti i microorganismi e virus	formaggi agrumi e loro imballaggi sterilizzazione di nocciole, amidacei, cibi disidratati, spezie	estremamente tossico, deve essere eliminato alcuni prodotti di degradazione sono tossici

Conservanti

Acido benzoico	
<i>p</i> -Idrossibenzoati	 R = CH ₃ , <i>n</i> -C ₄ H ₉
Acido sorbico Acido propionico	 CH ₃ CH ₂ COOH
Bifenile	
Tiabendazolo	
Ossido di etilene (ossirano)	

2,6-di- <i>t</i> -butil-4-idrossitoluene (BHT)	
3- <i>t</i> -butil-4-idrossianisolo (BHA)	
Acido L-ascorbico	

Contaminanti

Sostanze tossiche che si possono trovare accidentalmente negli alimenti per vari motivi:

- Inquinanti derivati da combustibili fossili o scarichi industriali (elementi in tracce, idrocarburi aromatici policiclici, diossine)
- Componenti degli imballaggi, detergenti, disinfettanti (formaldeide)
- Metaboliti di microorganismi (micotossine)
- Residui di composti chimici usati in agricoltura (pesticidi e fertilizzanti)
- Residui dell'allevamento (medicinali, additivi ai mangimi)
- Sostanze tossiche formate nella digestione di alcuni cibi o additivi (nitrosammine)

È ovviamente indispensabile analizzare continuamente la qualità degli alimenti, determinare le fonti di contaminazione, e così adeguare costantemente la legislazione a stabilire livelli ammessi, divieti e controlli.

Il ruolo della chimica analitica "classica" in questo campo è ovviamente cruciale; una accurata valutazione della concentrazione dei contaminanti è indispensabile per valutare gli effetti tossici sugli animali oltre che, ovviamente, la loro presenza negli alimenti.

Dato che queste sostanze sono (sperabilmente) presenti solo in tracce, i metodi analitici debbono essere molto sensibili. Per i contaminanti organici la spettrometria di massa, abbinata alla separazione cromatografica, risulta il metodo più versatile e usato; per quelli inorganici il metodo preferito è l'assorbimento atomico.

Determinare la tossicità di una sostanza non è semplice, dato che richiede una valutazione della tossicità acuta (LD_{50}), subacuta (test per 4 settimane) e cronica (da 6 mesi a 2 anni; quest'ultima è correlata, tra l'altro, al potere cancerogeno, mutageno e teratogeno).

La valutazione viene fatta sulla base del parametro *NOEL* (*No Observed Effect Level*), che rappresenta il dosaggio massimo che non produce alcun effetto osservabile negli animali da esperimento durante l'intero ciclo vitale durante diverse generazioni. La dose considerata tossicologicamente accettabile (*Accepted Daily Intake, ADI*) è ricavata dal *NOEL* moltiplicandolo per un fattore empirico (generalmente 0.01) che tiene conto delle deviazioni dalla media. Le concentrazioni massime effettivamente consentite dalla legge sono poi corrette per le quantità dell'alimento normalmente assunte, e risultano spesso molto inferiori a quelle tossicologiche.

Elementi in tracce

Sono elementi pesanti presenti in piccole quantità naturalmente nel suolo e nel mare. Quelli di maggior interesse sono il piombo, il mercurio e il cadmio. Vengono analizzati tramite spettrofotometria di assorbimento atomico, così come altri elementi in tracce di minore importanza (arsenico, stagno, rame, zinco).

Piombo

La principale sorgente di contaminazione è rappresentata dai residui della combustione delle benzine contenenti piombo tetraetile, $Pb(C_2H_5)_4$, come antidetonante (PbO , $PbBr_2$, $PbCl_2$). Questi effetti vengono maggiormente osservati nelle piante che crescono vicino alle strade. Data la diminuzione nell'uso di queste benzine, questo tipo di contaminazione è in calo. (In effetti, l'analisi delle ossa e capelli umani di epoca preindustriali rivela che questa contaminazione era allora molto più alta, a causa dell'uso di condutture di piombo e di manufatti contenenti piombo). I maggiori livelli di Pb si riscontrano nei vegetali a foglia larga (soprattutto le foglie esterne) e nel fegato.

Mercurio

Mentre il mercurio metallico (così come il piombo) è relativamente poco assorbibile ed inerte, i derivati organici del mercurio, tipicamente dimetil mercurio $\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$, sono estremamente tossici e solubili nei lipidi. Le sorgenti di contaminazione sono:

- Alcuni tipi di fungicidi per sementi (le sementi così trattate non devono essere usate in alimentazione, ma solo per la semina)
- Accumulo nel tessuto adiposo dei pesci di composti mercurio-organici, derivanti dalla trasformazione del mercurio inorganico naturale presente nei sedimenti ad opera della microflora
- Inquinamento causato dai processi "cloro-soda" (elettrolisi della soluzione acquosa di NaCl per dare cloro e idrossido di sodio), un tempo effettuati con elettrodi di mercurio; questo inquinamento è stato responsabile di estesi avvelenamenti in Giappone (caso "Minimata", tonni al mercurio). Il progressivo abbandono di questi processi industriali ha reso i livelli di Hg nell'ambiente stabili negli ultimi 50 anni. Gli alimenti con più alto tenore di Hg sono comunque i pesci, sia d'acqua dolce che marini.

Cadmio

A differenza di Pb e Hg, il cadmio viene assorbito facilmente dalle piante e distribuito uniformemente nei tessuti, per cui la decontaminazione è difficile. I livelli di contaminazione sono attualmente bassi, ma deve essere controllato per la sua tossicità renale. Le principali fonti alimentari di Cd sono gli organi interni animali (fegato, reni) e il latte. Inoltre, alcuni funghi selvatici accumulano livelli di Cd relativamente alti.

Pesticidi

Si intendono le sostanze usate in agricoltura per proteggere le piante da infestazioni varie. Si possono distinguere: erbicidi, fungicidi, insetticidi, acaricidi, nematocidi, molluschicidi, rodenticidi. Il loro uso è regolamentato (dosi massime, tempi di applicazione prima del raccolto...) in modo da ridurre al massimo la loro presenza sui prodotti agricoli e quindi negli alimenti. La contaminazione può anche avvenire in seguito al trattamento sul raccolto, o durante l'immagazzinamento.

Insetticidi

Idrocarburi clorurati, organofosfati e carbammati. I primi destano le maggiori preoccupazioni a causa della loro stabilità nell'ambiente, e il loro accumulo nel grasso animale. Il loro uso è continuamente in calo. I carbammati e gli organofosfati, invece, se utilizzati correttamente, vengono degradati e non danno residui, così come insetticidi naturali come i piretroidi.

Erbicidi

Generalmente non lasciano residui, e la loro tossicità è bassa per i mammiferi.

Fungicidi

Ditiocarbammati ($\text{N}-\overset{\text{S}}{\parallel}{\text{C}}-\text{S}-$), mercurio-organici (R-Hg-X). I loro residui sono presenti nelle verdure, soprattutto la lattuga.

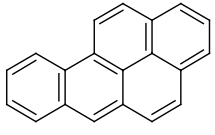
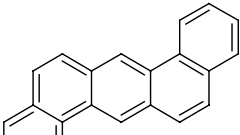
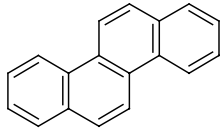
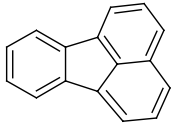
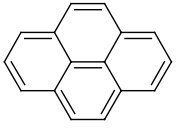
Antibiotici

Usati per combattere o prevenire malattie animali; i loro residui sono presenti nelle uova e nel latte. Pongono un rischio per la salute umana, dato che basse dosi, assunte per lungo tempo,

possono favorire la comparsa di ceppi resistenti. Per questo motivo, se ne limita l'uso ad antibiotici non usati in terapia umana.

Idrocarburi aromatici policiclici (PAH)

Sono idrocarburi contenenti 3 o più anelli benzenici fusi assieme.

				
benzo[α]pirene	1,2-dibenzoantracene	crisene	fluorantene	pirene

Hanno tutti proprietà cancerogene, e si formano in quantità variabile durante la combustione delle sostanze organiche. La contaminazione degli alimenti può derivare indirettamente dall'atmosfera (nelle zone industrializzate), o durante l'essiccazione dei cereali.

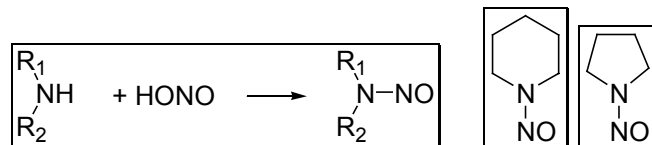
Una contaminazione diretta si ha invece durante l'arrostimento (di carne, pesce, caffè su fuoco di carbone o legna) e l'affumicatura (di carne, pesce). Gli impianti di affumicatura industriale sono oggi progettati in modo da minimizzare questa contaminazione.

Il tenore in PAH viene riferito allo standard benzo[α]pirene e non deve superare 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

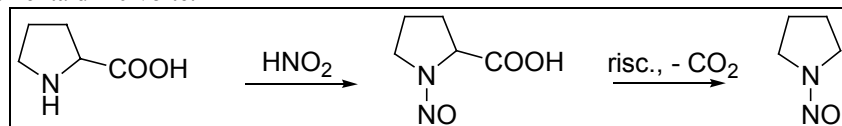
Nitrosammine

Le nitrosammine ($\text{R}_2\text{N}-\text{NO}$) sono potenti cancerogeni. La più nota è la dimetilnitrosammina (*N*-nitrosodimetilammina, $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{NO}$), ma sono attive anche la nitrosopiperidina e la nitrosopirrolidina.

Queste sostanze si formano per azione dell'acido nitroso sulle ammine. La reazione più tipica è con le ammine secondarie, ma anche le ammine primarie e terziarie possono dar luogo a nitrosammine attraverso reazioni intermedie.



Questa contaminazione ha origine sia esogena che endogena. Nel primo caso, le nitrosammine si formano durante l'arrostimento e la frittura della carne. Così, ad esempio, la nitrosopirrolidina si forma per nitrosazione della prolina e successiva decarbossilazione alla temperatura di cottura. Nel processo, il contenuto di nitrosammine aumenta di 10 volte.



L'origine endogena deriva da reazione dello ione nitrito (e soprattutto nitrato, che viene ridotto a nitrito dalla flora batterica della saliva) con ammine, entrambi abbondanti nel cibo. Molte verdure contengono di per sé notevoli quantità di ioni nitrato, che può essere ulteriormente aumentato dall'uso di nitrati come fertilizzanti.

La diminuzione della quantità di nitrosammine può essere ottenuta aggiungendo inibitori (ad es. acido L-ascorbico, che riduce NO_2^- a NO) o riducendo il contenuto di ioni nitrito aggiunti come conservanti alla carne (ma l'eliminazione completa espone al pericolo di botulismo).

Tossine batteriche

La maggior parte delle intossicazioni alimentari è di natura batterica. Le più tipiche sono: intossicazione da *Clostridium botulinum* o *Staphylococcus aureus*, malattie causate da contaminazione da batteri quali *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, infezioni da *Salmonella* o *Shigella*. Gli alimenti sorgente di infezioni sono le uova, il pollame surgelato, la carne tritata.

Micotossine

Sono un gruppo molto vasto di tossine prodotte da funghi microscopici e muffe. Storicamente, una fonte diffusa di grave contaminazione era l'infezione dei cereali, soprattutto la segale, da *Claviceps purpurea* (ergot). L'infezione fungina provoca escrescenze violacee sui chicchi di segale (*segale cornuta*). In assenza di controlli, i chicchi infestati venivano macinati nella farina. Le tossine così prodotte (*alcaloidi dell'ergot*) danno un quadro tossicologico (ergotismo) caratterizzato da convulsioni, disturbi nervosi, cancrena. Grazie al trattamento con agenti antifungini, e alla selezione dei grani prima della macinazione, questa infestazione è ora praticamente debellata.

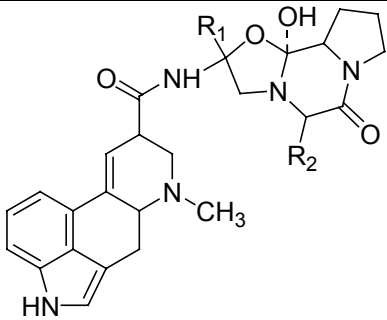
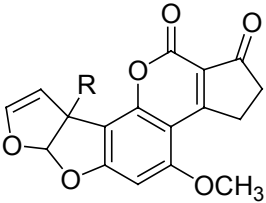
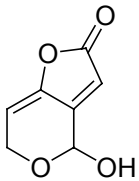
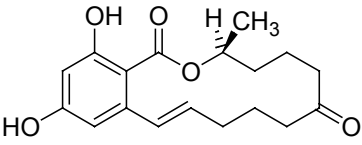
Al giorno d'oggi, dal punto di vista della conservazione degli alimenti, le più importanti sono le micotossine prodotte dal genere *Aspergillus* (*aflatossine*). Questi funghi infestano principalmente mais, riso e arachidi. Il materiale contaminato (aflatossine B) può entrare in mangimi animali e di qui al latte, dove vengono metabolizzate in altre sostanze (aflatossine M) anch'esse tossiche.

Le aflatossine sono di tossicità estrema. L'aflatossina B₁ è il più potente cancerogeno conosciuto; 10 µg/kg provocano cancro al fegato o cirrosi epatica. Per confronto, basti pensare che una sostanza nota per le sue proprietà cancerogene come la dimetilnitrosammina ha effetto solo a concentrazioni di 750 µg/kg.

Questa contaminazione è attualmente oggetto di controllo analitico e di severe misure legislative, che la mantengono sotto controllo (solo 1 arachide su 10000 è oggi contaminata da aflatossine).

Vi sono comunque numerosi altri funghi microscopici (*A. versicolor*, *A. ochraceus*, *Fusarium spp.*) che producono tossine pericolose (sterigmatocistina, ocratossine, zearalenone), responsabili di contaminazioni domestiche, dovute ad es. a frutta o pane ammuffiti.

Struttura di alcune micotossine

 <p> $R_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $R_2 = \text{CH}_2\text{Ph}$ (Ergocristina) $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_2\text{Ph}$ (Ergostina) $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_2\text{Ph}$ (Ergotamina) $R_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (Ergocriptina) </p> <p>Alcaloidi dell'ergot <i>Claviceps purpurea</i> Convulsioni, cancrena</p>	 <p>Aflatossina B₁ (R = H) <i>Aspergillus flavus</i> Cancro al fegato, cirrosi epatica</p>
 <p>Patulina <i>Penicillium expansum</i>, <i>Blassochlamys nivea</i> Tossina cellulare</p>	 <p>trans-Zearalenone <i>Fusarium graminearum</i> Estrogeno, infertilità</p>

Oli e grassi



Contrariamente alle categorie di alimenti che verranno descritte in seguito, i grassi hanno una composizione chimica relativamente semplice da descrivere.

La grande maggioranza dei grassi e oli consiste di triesteri del glicerolo (glicerina) (*triacilgliceroli*) che differiscono in certa misura per la composizione in *acidi grassi*, e costituisce la frazione saponificabile. Altri costituenti sono, in misura inferiore al 3%, una frazione non saponificabile ed altri componenti come gli acidi grassi liberi, i mono- e di-gliceridi.

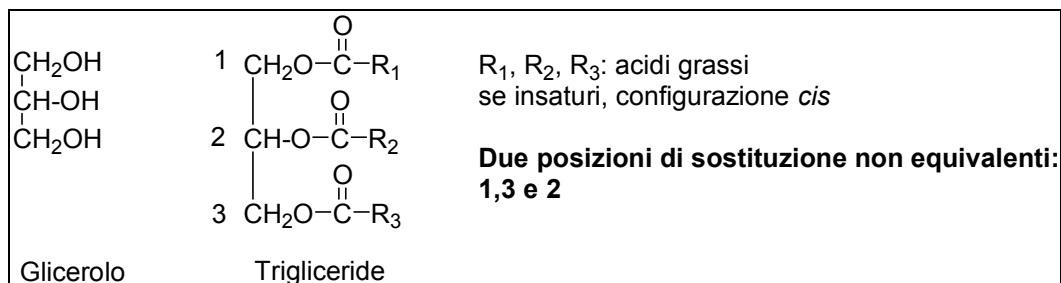
La distinzione tra oli e grassi è basata sulla consistenza; col termine di *olio* e *grasso* vengono designati i lipidi liquidi e solidi, rispettivamente. (La distinzione è ovviamente imprecisa, dato che queste sostanze sono miscele e quindi spesso sono semi-solidi). Useremo pertanto il termine "grassi" per indicare i lipidi in genere.

La maggior parte degli *oli vegetali* usati per l'alimentazione derivano dalla soia, arachide, girasole, senape, sesamo (piante annuali); palma, cocco, oliva (piante perenni). Negli ultimi anni anche l'olio di cotone è stato impiegato a scopo alimentare; l'olio di germe di grano e l'olio di riso sono considerati oli di valore. Altri oli vegetali, come l'olio di lino, di ricino etc. sono usati solo per scopi non alimentari, ma si ritrovano a volte come adulteranti o contaminanti.

I *grassi animali* derivano da sottoprodotti della lavorazione della carne, oppure dal latte (burro etc.), e anch'essi sono ampiamente usati nell'alimentazione. Tutti questi grassi vengono utilizzati come tali, o dopo estrazione con solventi, processi di raffinazione, deodorizzazione, decolorazione, idrogenazione, etc.

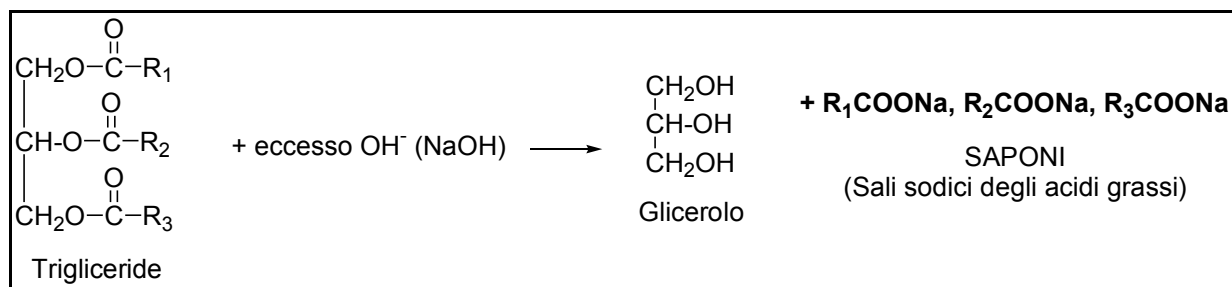
Sostanze saponificabili

Questa frazione (che come accennato sopra costituisce oltre il 96% del totale) è costituita da triacilgliceroli (TG) in cui il residuo acilico è dato dagli *acidi grassi*, cioè acidi carbossilici a catena lineare, saturi o insaturi, generalmente con un numero pari di atomi di carbonio.



Sono presenti, in misura molto minore, anche di- e mono-gliceridi (DG, MG). Queste sostanze costituiscono la frazione nota come *sostanze saponificabili*, in quanto, essendo esteri carbossilici, reagiscono con le basi a dare la ben nota reazione.

Saponificazione



Acidi grassi

Nome	n. C, insat., posizione	Formula	Struttura
Miristico	14:0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₂ -COOH	
Palmitico	16:0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₄ -COOH	
Stearico	18:0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₆ -COOH	
Oleico	18:1 (9)	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-CH ₂ -(CH ₂) ₆ -COOH	
Elaidinico	18:1 (9)	isomero <i>trans</i> dell'acido oleico	
Linoleico	18:2 (9,12)	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -(CH=CH-CH ₂) ₂ -(CH ₂) ₆ -COOH	
α-Linolenico	18:3 (9,12,15)	CH ₃ -CH ₂ -(CH=CH-CH ₂) ₃ -(CH ₂) ₆ -COOH	
Erucico	22:1 (13)	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-CH ₂ -(CH ₂) ₁₀ -COOH NOCIVO	

- Gli acidi grassi insaturi hanno quasi sempre configurazione *cis* (Z) a tutti i doppi legami; possono essere monoinsaturi (MUFA) o poliinsaturi (PUFA). I doppi legami dei PUFA generalmente *non* sono coniugati (il gruppo insaturo è di tipo allilico, vedi ad es. acido α-linolenico).
- Gli acidi grassi insaturi, avendo configurazione *cis* del doppio legame, hanno una struttura piegata che rende l'impaccamento cristallino poco efficiente, mentre quelli saturi possono adottare conformazioni *trans* estese, dall'efficiente impaccamento. Pertanto, i TG dal forte contenuto di acidi insaturi hanno un punto di fusione molto più alto di quelli derivati dagli acidi saturi, e danno quindi origine agli oli (liquidi).
- L'acido linoleico non viene sintetizzato nel corpo umano, ed è quindi un *acido grasso essenziale*.
- L'acido elaidinico (*trans*) è praticamente assente dagli oli di oliva ottenuti per spremitura, mentre si trova in piccole quantità negli oli di sansa.

Nei TG naturali, la distribuzione degli acidi grassi sulle posizioni 1,3 o 2 del glicerolo non è casuale:

- Palmitico e stearico → di preferenza in 1,3
- Gli acidi da C₂₀ in su si trovano esclusivamente in 1,3
- Oleico e linoleico → prevalentemente in 2
- Linolenico → variabile

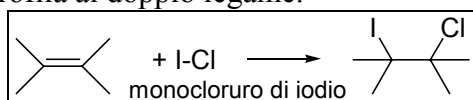
Nei TG sintetici la distribuzione è casuale.

Numero di saponificazione (SN)

È un dato analitico standard legato al peso molecolare degli acidi grassi: il numero di saponificazione è il peso di KOH (in mg) necessario per idrolizzare 1 g di olio o grasso sotto condizioni standardizzate. Più alto è il valore di SN, più basso è il peso molecolare medio degli acidi grassi contenuti. Tuttavia, l'intervallo in cui giace questo parametro è abbastanza simile per la maggior parte dei grassi, per cui è ormai di minore importanza.

Numero di iodio (IN)

L'ammontare di acidi grassi insaturi (numero di doppi legami C=C) viene determinato tramite il *numero di iodio*, cioè la quantità di iodio (o, più comunemente, monocloruro di iodio I-Cl) che può dare addizione elettrofila al doppio legame.



È espresso come grammi di iodio necessari per legarsi a 100 g di grasso. I valori sono abbastanza caratteristici per gli acidi grassi con uguale numero di doppi legami; ad es. oleico (IN = 89.9), linoleico (IN = 181), linolenico (IN = 273).

Sostanze non saponificabili

Vi è anche una parte di *sostanze non saponificabili*, costituita principalmente da *steroli*, ma anche da *idrocarburi* e, negli oli vegetali, da *polifenoli*, *tocoferoli* e *pigmenti clorofillinici*. L'idrocarburo più diffuso è lo *squalene* (C₃₀). I polifenoli e i tocoferoli sono inibitori di reazioni radicaliche, quindi hanno azione antiossidante e contribuiscono a prolungare la durata di conservazione di questi prodotti. L'estere acetico dell' α -tocoferolo è noto anche come vitamina E (α -tocoferil acetato).

Principali sostanze non saponificabili

Colesterolo	
Campesterolo	
Stigmasterolo	
β -Sitosterolo	

Δ^5 -Avenasterolo	
Δ^7 -Stigmasterolo	
Squalene	
α -Tocoferolo (Vitamina E: α - tocoferil acetato)	
Tirosolo, Idrossitirosolo, Acido 4-idrossi- fenilacetico (olio di oliva)	

La composizione in triacilgliceroli e steroli dipende, spesso in modo sostanziale, dalla specie di origine; pertanto questi parametri risultano importantissimi nel rivelare la miscelazione tra grassi di varia origine (vedi oltre).

Contaminanti ed adulteranti

Durante la raccolta delle piante usate per l'estrazione dell'olio di semi, i semi possono venire contaminati da semi di erbacce, alcune delle quali sono tossiche (ad es. ricino). Il problema è importante solo per la soia coltivata in Paesi extraeuropei.

La "sindrome dell'olio tossico" in Spagna (Toxic Oil Syndrome)

Negli anni '80, in Spagna si verificarono numerosissimi casi di intossicazione con sviluppo di gravi problemi polmonari acuti, e neuromuscolari cronici. La determinazione dell'agente causale ha comportato molte difficoltà, in parte dovute all'impossibilità di ricostruire completamente lo svolgimento degli eventi. Gli oli ritenuti responsabili dell'intossicazione sono stati analizzati ricercando vari prodotti chimici industriali e pesticidi. Sebbene il contenuto di cloro sia risultato anomalo, questi oli contenevano olio di colza a basso tenore di acido erucico, contaminato con prodotti di reazione dell'anilina (principalmente anilidi degli acidi grassi, R-C(O)NPh) miscelato in vario modo con altri grassi animali e vegetali.

Sembra stabilita una correlazione tra la sindrome ed il consumo di olio di colza contaminato con anilina. Permangono comunque notevoli dubbi, dato che i sintomi riscontrati non corrispondono a quelli dell'intossicazione da anilina, e non si è riusciti a riprodurre la sindrome negli animali da esperimento con le anilidi degli acidi grassi. Una delle ipotesi, quindi, è che l'agente causale fosse un contaminante dell'anilina, introdotto durante il trasporto o formatosi per reazione con normali componenti dell'olio. Sono state avanzate anche numerose altre ipotesi, tutte di verifica molto difficile. Vedi per esempio <http://education.guardian.co.uk/higher/research/story/0,9865,542111,00.html>

Miscele di grassi

Gli oli commestibili vengono spesso miscelati fra loro in proporzioni variabili. Dato che il loro costo è molto variabile, è evidente che possono essere perpetrate frodi legate alla

miscelazione non dichiarata, o in misura diversa dal dichiarato, di oli di poco pregio in oli pregiati (tipicamente l'olio di oliva e l'olio di cocco).

Analisi degli acidi grassi

Dato che la biosintesi dei grassi vegetali e animali è specifica per ogni specie, la composizione in acidi grassi può rivelare l'adulterazione. È importante sia la composizione percentuale, sia il rapporto tra certi acidi specifici. La composizione in acidi grassi dipende fortemente dalla specie di origine, ma anche dal tipo di allevamento (grassi animali) e dalle cultivar e dall'ambiente di crescita (grassi vegetali). Pertanto, le composizioni qui sotto riportate debbono intendersi come valori medi.

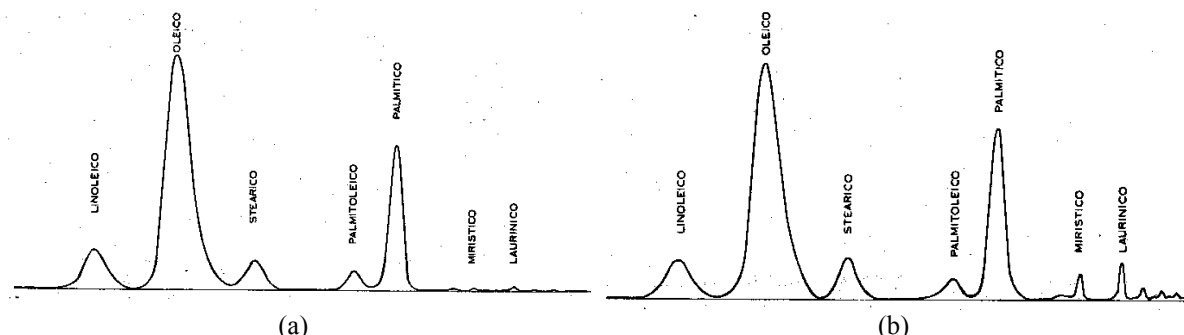
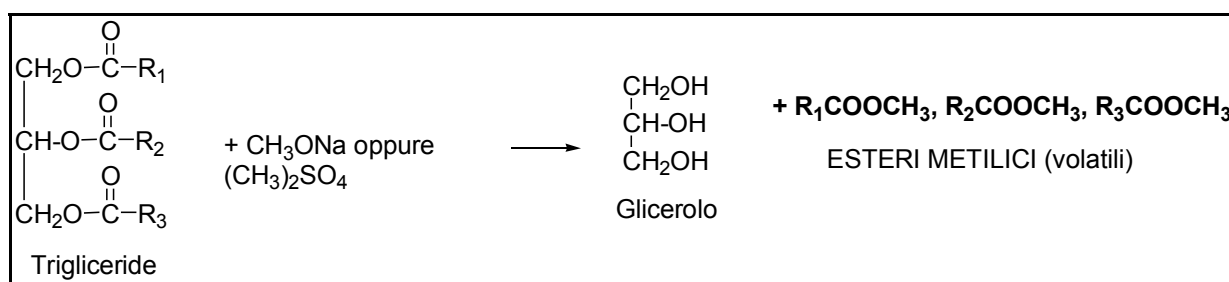
Composizione media di vari tipi di grassi

Origine	Non saponif. (%)	Acidi grassi saturi (%)				Acidi grassi insaturi (%)			
		12:0 Laurico	14:0 Miristico	16:0 Palmitico	18:0 Stearico	16:1 Palmitoleico	18:1 Oleico	18:2 Linoleico	18:3 Linolenico
Cocco	0.2-0.6	41-46	18-21	9-12	2-4	-	5-9	0.5-3	-
Mais	1.3-2.0	< 0.5	< 0.4	9-12	1-3	< 0.5	25-35	40-60	1
Oliva	< 1.4	-	-	7-16	2.4	1-2	64-86	4-15	0.5-1
Soia	0.5-1.5	-	< 0.5	8-12	3-5	-	-	-	18-25*
Girasole	0.4-1.4	-	< 0.1	5-6	2.5-6.5	< 0.5	14-34	55-73	< 0.4
Sego di manzo	0.3-0.8	-	2-4	23-29	20-35	0.5	2-4	26-45	2-6
Aringa	0.7-1.0	-	7.5	18	2	8	17	1.5	0.5

*50% di C_{20:1}.

Analisi degli acidi grassi: derivatizzazione

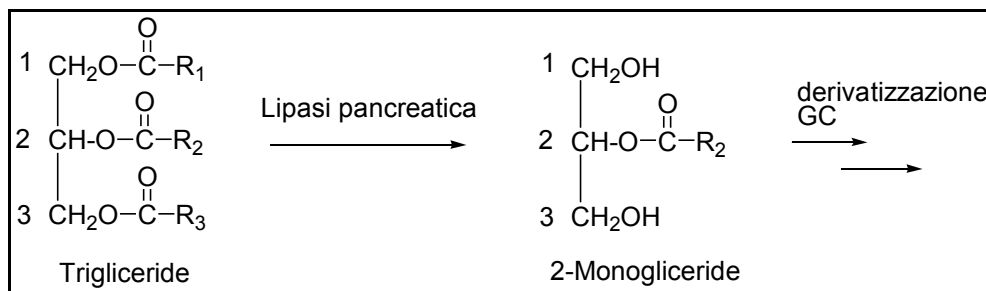
L'analisi dei grassi per determinare il contenuto in acidi grassi può essere eseguita per via gascromatografica (GC). Dato che però gli esteri del glicerolo non sono sufficientemente volatili, è necessario eseguire previamente una *derivatizzazione*, cioè una reazione che trasformi l'analita in una sostanza più volatile. Nel caso in questione, la derivatizzazione consiste nella trasformazione in esteri metilici (*transesterificazione*) per reazione con un agente metilante come il sodio metossido o il dimetil solfato.



Gascromatogramma degli esteri metilici di acidi grassi da olio di oliva (a) e adulterato con grassi animali (b). In (a) si nota il bassissimo contenuto in acidi inferiori a C₁₆ (miristico, laurico), molto evidente invece in (b).

da: G. Amandola, V. Terreni, *Analisi chimica strumentale e tecnica*, Masson, 1977.

l'olio è naturale, in posizione 2 vi sono solo piccole quantità (< 2%) di acidi grassi saturi (palmitico, stearico), mentre nei TG sintetici la distribuzione è casuale.



Analisi della frazione non saponificabile

In molti casi, l'analisi degli acidi grassi non dà risposte chiare, sia perché vi sono variazioni dovute all'origine geografica e alla varietà delle cultivar, sia perché alcuni oli vegetali hanno una composizione molto simile. Ad esempio, l'adulterazione dell'olio di oliva con olio di colza, girasole o nocciolo non può essere rivelata in tale modo.* Perfino l'adulterazione con certi grassi animali è difficile da determinare in questo modo.

Si ricorre quindi all'analisi della frazione non saponificabile, tipicamente degli steroli. La composizione sterolica è strettamente correlata alla specie vegetale di origine, e meno all'origine geografica e al trattamento (olio vergine, di sansa, rettificato, ...).

Composizione sterolica percentuale degli oli vegetali

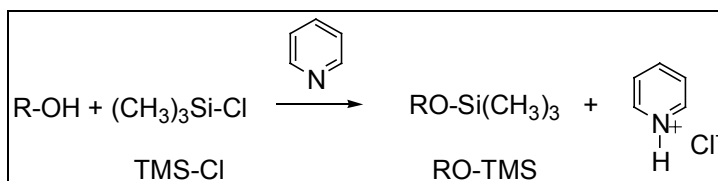
Sterolo	Girasole	Arachide	Soia	Mais	Oliva	Colza
Colesterolo	0.0	0.3	0.0	0.0	0.1	0.9
Brassicasterolo	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	12.7
Campesterolo	8.3	15.2	21.8	20.2	2.3	27.5
Stigmasterolo	8.1	7.9	21.8	3.8	0.1	0.0
β-Sitosterolo	67.6	62.6	51.0	70.0	88.1	58.9
Δ ⁷ -Stigmasterolo	10.3	0.0	3.6	0.7	0.1	0.0

La tabella mostra chiaramente che l'adulterazione dell'olio di oliva con olio di girasole innalza fortemente il tasso di Δ⁷-stigmasterolo. Analogamente, la presenza di olio di colza viene svelata dalla grande quantità di uno sterolo caratteristico delle Crucifere (*brassicasterolo*). L'analisi può essere complementata da analoghe determinazioni del contenuto di tocoferoli. Infine, la presenza di grassi animali viene evidenziata dall'alto contenuto di colesterolo di questi ultimi. Fa eccezione però l'olio di palma, in cui il colesterolo può raggiungere l'8%.

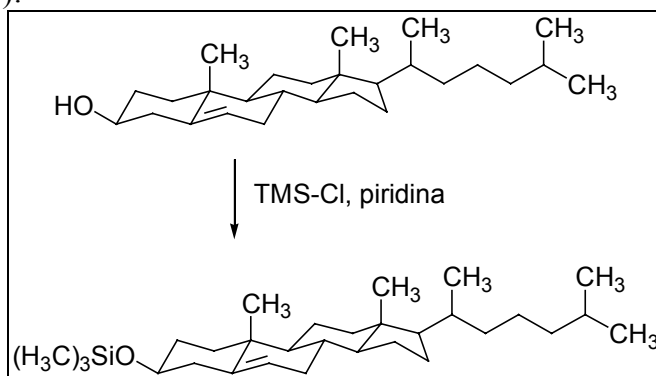
Analisi della frazione non saponificabile per via GC

Il residuo della saponificazione viene estratto con un solvente poco polare (etere etilico). Come nel caso dei TG, anche gli steroli non sono sufficientemente volatili per la GC, per cui vengono derivatizzati trasformandoli negli eteri trimetilsililici (TMS = (CH₃)₃Si-) per reazione con trimetilsilil cloruro (TMS-Cl):

* Va ricordato che l'olio di colza (*Brassica campestris*, *Brassica napus*) normalmente contiene acido erucico (C_{22:1}), che è nocivo, in quanto provoca lesioni del muscolo cardiaco; sono state però selezionate varietà in cui l'acido erucico è quasi assente (*canola*).



Esempio (colesterolo):



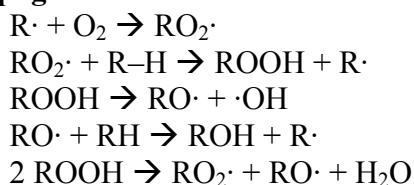
Deterioramento dei grassi

Il deterioramento degli oli e grassi durante la conservazione non è solo un problema economico. Infatti, in seguito all'irrancidimento anche il valore nutritivo diminuisce a causa della degradazione delle vitamine e degli acidi grassi. Pertanto, la stabilità di un olio nei confronti dell'ossidazione è uno dei parametri che determinano il suo impiego nell'industria alimentare.

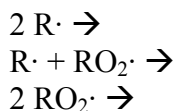
Il deterioramento ossidativo avviene per dissoluzione dell'ossigeno atmosferico e sua successiva reazione (*autoossidazione*), principalmente (ma non esclusivamente), con il doppio legame C=C degli acidi grassi insaturi nei triacilgliceroli. Il processo è una reazione radicalica a catena:

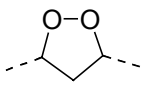
1. **Iniziazione:** formazione di radicali alcossile (RO·) o alchile (R·), per esempio ad opera della luce. È per questo motivo che la durata di conservazione dei grassi è maggiore se vengono conservati al buio.

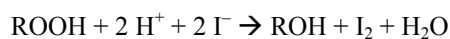
2. **Propagazione:**



3. **Terminazione:** ricombinazione dei radicali con formazione di composti stabili

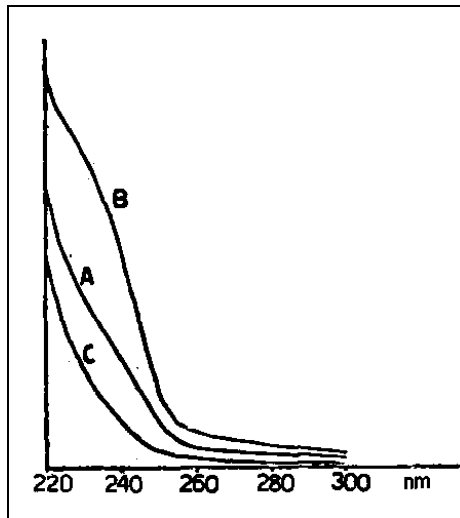


I prodotti dell'autoossidazione sono: *idroperossidi* R-OOH, *epiperossidi* , *aldeidi* e *chetoni* (che conferiscono odore di rancido). La presenza di perossidi indica l'avvenuta ossidazione, e viene determinata per titolazione iodometrica.



Spettro UV e prodotti di ossidazione

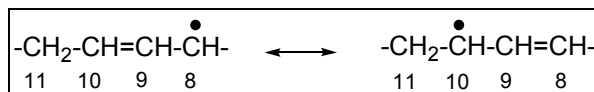
La presenza di prodotti di ossidazione e degradazione, nonché dell'acidità libera, provoca un aumento nell'assorbimento UV. Pertanto, la spettroscopia UV è utile nella ricerca di oli di qualità inferiore e per verificare le condizioni di conservazione. L'analisi viene effettuata alle lunghezze d'onda di 232 e 270 nm, dando un coefficiente di estinzione specifica $K_{232} = \frac{A_{232}}{C \cdot s}$, dove A_{232} è l'assorbanza misurata, C la concentrazione (in g/100 ml) e s lo spessore (in cm) della cella.



Spettri UV di olio di oliva vergine. Stato normale (A); dopo due anni di conservazione (B); dopo due anni di conservazione e passaggio su ossido di alluminio (Al_2O_3) (C).
 da: F. Tateo, *Analisi dei prodotti alimentari*, Chiriotti Ed., Pinerolo, 1978.

Autoossidazione dell'acido oleico

Come esempio, riportiamo in dettaglio il processo di autoossidazione dell'acido oleico. Si suppone che il processo venga iniziato da un radicale perossidico $RO_2\cdot$ con estrazione di un atomo di idrogeno (H) dal substrato. Le posizioni di attacco sono C-8 e C-11, cioè le due posizioni alliliche rispetto al doppio legame tra C-9 e C-10. Si forma quindi un radicale allilico stabilizzato per risonanza; ad esempio, quello per attacco a C-8 può essere descritto come



in cui risulta evidente che l'elettrone spaiato è delocalizzato tra le posizioni 8 e 10 (oppure 9 e 11 nel caso avvenga estrazione da C-11).

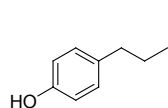
Il processo si propaga per reazione del radicale allilico con ossigeno molecolare. La reazione avviene ad entrambe le posizioni appena indicate, e porta alla formazione di due diversi radicali idroperossido ($R-OO\cdot$) per ciascun processo. Questi radicali possono propagare la catena estraendo a loro volta un atomo di idrogeno dal substrato, formando un idroperossido (ROOH).

Il processo globale risulta: $R-H + O_2 \rightarrow R-OOH$.

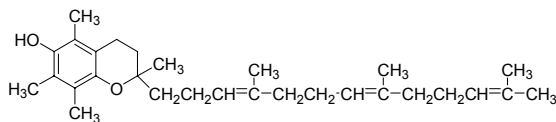
La configurazione del doppio legame risultante è sia *cis* che *trans* (a differenza dei reagenti, che sono sempre *cis*).

Notiamo infine che i radicali R' possono sempre e comunque dare luogo a polimerizzazione, particolarmente rapida se il contenuto di PUFA è elevato. Ad esempio, l'olio di lino, dall'alto tenore di acido linolenico, per autoossidazione dà polimeri solidi, e pertanto viene usato principalmente nella preparazione di vernici.

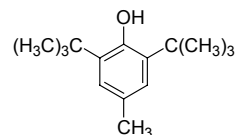
Il meccanismo dell'autoossidazione ci aiuta a comprendere l'inibizione di questo fenomeno ad opera degli antiossidanti naturali o artificiali. Gli alimenti naturali contengono piccole quantità di sostanze strutturalmente riconducibili ai fenoli (polifenoli, tocoferoli), che fungono da inibitori di reazioni radicaliche. Sono usati anche antiossidanti artificiali, come il BHT.



Tirosolo
(olio di oliva)

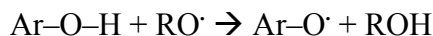


α -Tocoferolo (olio di oliva)

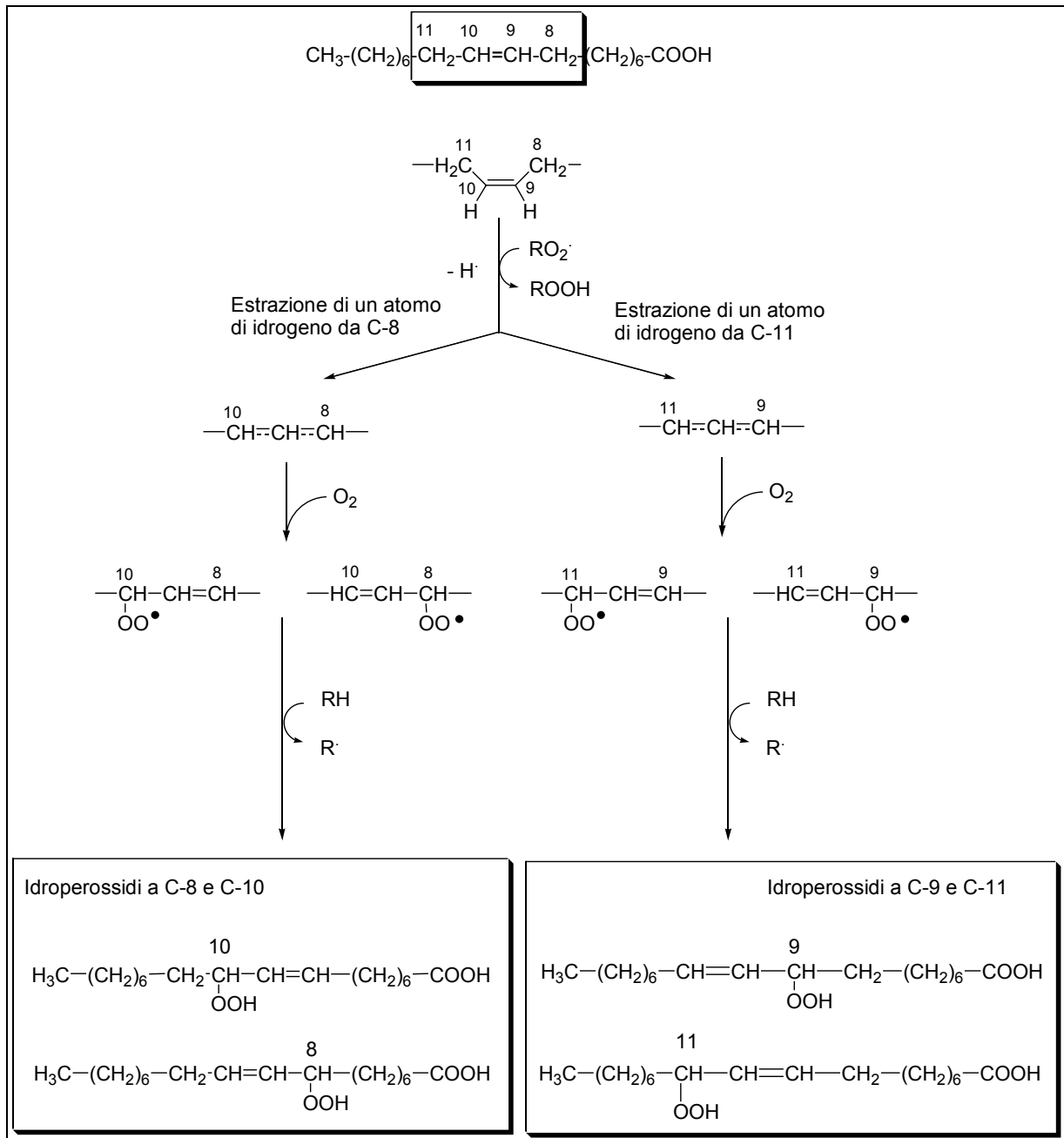


BHT (sintetico)

Schematizziamo la struttura del composto fenolico come Ar-OH, dove Ar è un gruppo aromatico. La reazione con un radicale RO \cdot o RO $_2\cdot$ porta all'estrazione dell'idrogeno ossidrilico, con formazione di un radicale Ar-O \cdot , il quale è stabilizzato per risonanza con il gruppo aromatico e risulta relativamente stabile.

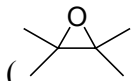


In particolare, Ar-O \cdot non è in grado di estrarre a sua volta H \cdot dal substrato, e quindi di propagare la catena. Reagisce invece con gli altri radicali liberi presenti (ad es. Ar-O \cdot + RO \cdot \rightarrow Ar-OOR) per formare prodotti relativamente stabili. Per questi motivi, queste sostanze sono note come "spazzini dei radicali" (*radical scavengers*).



Cambiamenti indotti dal riscaldamento

Una gran parte dei grassi alimentari viene usata nella frittura dei cibi. Durante questo processo, avvengono reazioni che portano al loro deterioramento, con conseguenze sia sulle proprietà organolettiche che nutrizionali. I processi in questione sono l'ossidazione termica, l'idrolisi e la polimerizzazione. I prodotti principali sono aldeidi (-CHO) ed epossidi



() (→ Analisi tramite spettroscopia NMR).

È quindi desiderabile stabilire se un dato tipo di olio sia adatto alla frittura. Allo scopo, vengono analizzate le proprietà fisiche alterate dalla frittura (viscosità, schiumeggiamento dovuti alla formazione di polimeri) e ricercati i prodotti di degradazione: composti carbonilici α,β -insaturi, dieni e trieni coniugati (tramite numero di iodio, spettroscopia UV) e composti

polari (contenuto di perossidi e acidi grassi liberi, determinazione della costante dielettrica). Alcuni prodotti di decomposizione sono volatili, ed è quindi necessario analizzare anche la fase gassosa sovrastante.

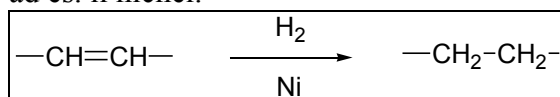
Occorre notare che le alterazioni nell'olio sono dovute in gran parte all'alimento che viene fritto, piuttosto che al trattamento termico di per sé.

I prodotti di degradazione considerati maggiormente tossici sono i monomeri ciclici derivanti dagli acidi grassi poliinsaturi, come l'acido linolenico. Pertanto, ad es., in Francia è proibito l'uso di oli contenenti più del 2% di acido linolenico per la frittura.

Grassi idrogenati: margarina

Nel 1902, W. Normann brevettò un metodo (denominato "indurimento dei grassi") per convertire gli oli (liquidi) in grassi solidi. All'epoca il metodo era rivolto alla sostituzione del burro, molto costoso, con grassi di simile consistenza ma più economici, ma ha tuttora grande importanza economica (ad es., anche gli oli marini diventano adatti al consumo umano dopo l'indurimento). I grassi così ottenuti sono noti come "margarina".

Il processo è essenzialmente l'idrogenazione del doppio legame degli acidi insaturi in presenza di catalizzatori, ad es. il nichel.



I PUFA possono essere parzialmente idrogenati (ad es. idrogenando selettivamente l'acido linolenico), dando luogo a grassi di maggiore stabilità all'ossidazione. È anche possibile mantenere intatto l'acido linoleico, che in quanto acido grasso essenziale deve essere preservato.

In aggiunta all'idrogenazione, si ha anche isomerizzazione, con spostamento del doppio legame in altre posizioni e formazione di acidi grassi *trans*. Sebbene gli acidi *trans* non siano ritenuti nocivi in alcun modo, si cerca di ridurne la quantità al minimo. La loro presenza viene comunque rivelata facilmente per via GC.

L'idrogenazione provoca anche cambiamenti nella frazione non saponificabile: i carotenoidi (vitamina A) vengono anch'essi idrogenati, ma gli steroli e i tocoferoli normalmente non vengono alterati.

Olio di oliva: aspetti specifici

L'olio di oliva è il prodotto della premitura delle olive (*Olea europaea sativa*). Il termine "olio extra vergine" è riservato all'olio estratto con metodi esclusivamente meccanici e fisici (molitura, centrifugazione, pressatura) senza alcun trattamento termico o chimico (International Olive Oil Council, *Resolution RIS-2/74-IV-96*, Madrid, 1996; Regulation no. 2568/91, *Off. J. Eur. Commun. L248*, 1991).

L'olio extravergine viene quindi ottenuto per spremitura a freddo, a cui segue una ulteriore pressatura a moderata temperatura (40 °C). Gli oli ottenuti per trattamenti via via più drastici (pressatura a caldo, estrazione con solventi, raffinazione) sono meno pregiati, perché il lasso di tempo che trascorre tra raccolta e lavorazione è più lungo. In tale periodo intervengono processi di degradazione ossidativa e fermentativa, che portano alla formazione di acidi grassi liberi e di perossidi, ed inoltre alla perdita di alcuni componenti minori come tocoferoli e polifenoli. Pertanto, questi oli debbono essere sottoposti a raffinazione (detta anche rettificazione) per trattamento con alcali.

L'alto valore commerciale dell'olio extra vergine rende appetibile l'adulterazione con oli di minor qualità → necessità di metodi analitici in grado di svelare l'adulterazione.

Classificazione degli oli di oliva

Gli oli di oliva sono classificati in:

- Oli direttamente commestibili (da operazioni puramente meccaniche sull'oliva) → *oli vergini*
- Oli ottenuti per estrazione con solventi dalle sanse → *oli di sansa*
- Oli resi commestibili per raffinazione

I parametri secondo i quali vengono classificati sono

- Acidità libera (% acido oleico)
- Quantità di perossidi (in meq di ossigeno/kg)
- Assorbimenti specifici nell'UV
- Valutazione organolettica

Categorie (Normativa CEE 2568/91 e successive modifiche)

Categoria Olio di oliva	Acidità libera	Perossidi (*)	K_{232}	K_{270}	Indice di rifrazione	Destinazione
extra vergine	< 1.0%	< 20	< 2.50	< 0.20		Consumo diretto
vergine	< 2.0%	< 20	< 2.60	< 0.25	1.4665-1.4679	Consumo diretto
vergine corrente	< 3.3%	< 20	< 2.60	< 0.25		Solo all'ingrosso
vergine lampante	> 3.3%	> 20	< 3.70	> 0.25	1.4665-1.4682	Raffinazione

(*) meq di ossigeno attivo/kg

Componenti principali:

(a) Sostanze saponificabili

- Triesteri del glicerolo (glicerina) con acidi carbossilici a catena lineare, saturi o insaturi (acidi grassi) (triacilgliceroli, TG)
- In misura molto minore, di- e mono-acilgliceroli (DG, MG). Il contenuto di DG e MG è notevolmente maggiore negli oli di sansa o raffinati, dato che derivano dall'idrolisi parziale dei TG

(b) Sostanze non saponificabili

- Steroli
- Idrocarburi
- Polifenoli (tirosole, idrossitirosole, acido 4-idrossifenilacetico)
- Pigmenti clorofillinici
- Componenti odorosi

I polifenoli presenti nell'olio di oliva:

- Conferiscono stabilità all'ossidazione (inibitori di reazioni radicaliche)
- Partecipano alle qualità organolettiche (sapore pungente/amaro)
- Vengono perduti nei processi di estrazione con solventi (oli di sansa) o di raffinazione

Composizione in acidi grassi dell'olio di oliva

Acido	Contenuto ammesso
Acidi < C ₁₂	assenti
totale Laurico, C ₁₂ + Miristico, C ₁₄	< 0.1%
Palmitico, C ₁₆	< 17.0%
Stearico, C ₁₈	< 3.5%
Oleico, C _{18:1}	> 65.0%
Linoleico, C _{18:2}	< 13.5%

Linolenico, C _{18:3}	< 1.5%
Arachidico, C ₂₀	< 0.7%

Vi sono forti variazioni dovute all'origine geografica e alla varietà delle cultivar. L'analisi non consente di evidenziare frodi per aggiunta di oli di semi, che possono avere composizione molto simile, tipicamente olio di girasole, nocciolo e colza → Analisi degli steroli

Composizione in steroli e idrocarburi dell'olio di oliva

Sterolo o idrocarburo	Contenuto (% steroli tot.)
Colesterolo	tracce 0.5 mg/kg
Campesterolo	2.5-3.5% 19 mg/kg
Stigmasterolo	0.9-3.0% 0.5 mg/kg
β-Sitosterolo	94% 732 mg/kg
Δ ⁵ -Avenasterolo	10-18% 78 mg/kg
Δ ⁷ -Stigmasterolo	< 1% 0.5 mg/kg
Brassicasterolo	0.1% 0.5 mg/kg
Squalene	1-7 g/kg

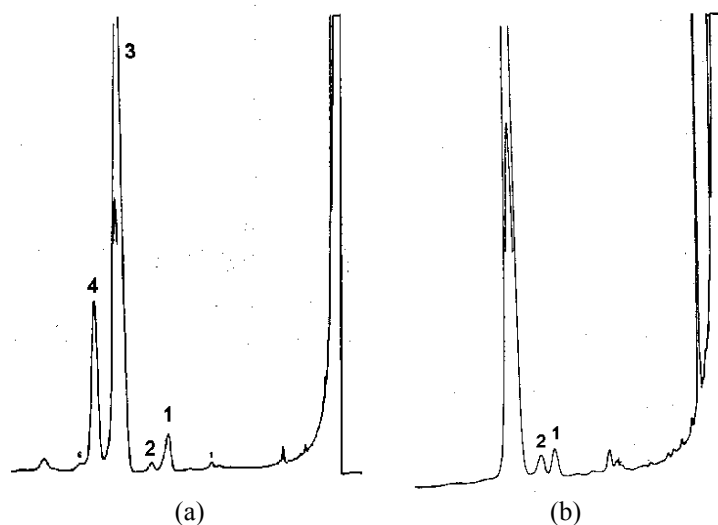
Composizione sterolica percentuale degli oli vegetali

Sterolo	Girasole	Arachide	Soia	Mais	Oliva	Colza
Colesterolo	0.0	0.3	0.0	0.0	0.1	0.9
Brassicasterolo	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	12.7
Campesterolo	8.3	15.2	21.8	20.2	2.3	27.5
Stigmasterolo	8.1	7.9	21.8	3.8	0.1	0.0
β-Sitosterolo	67.6	62.6	51.0	70.0	88.1	58.9
Δ ⁷ -Stigmasterolo	10.3	0.0	3.6	0.7	0.1	0.0

Gli oli di sansa di oliva contengono una maggior quantità di stigmasterolo (1.5-3.5%)

La sofisticazione con olio di girasole porta ad alte quantità (8%) di Δ⁷-stigmasterolo

L'olio di colza contiene grandi quantità di uno sterolo caratteristico delle Crucifere (*brassicasterolo*).



Gasromatogramma degli steroli contenuti nell'olio di oliva extra vergine (a) e di sansa (b): Campesterolo (1), stigmasterolo (2), β -sitosterolo (3), Δ^5 -avenasterolo (4). Notare la maggior quantità di stigmasterolo in (b).
da: F. Tateo, *Analisi dei prodotti alimentari*, Chiriotti Ed., Pinerolo, 1978.

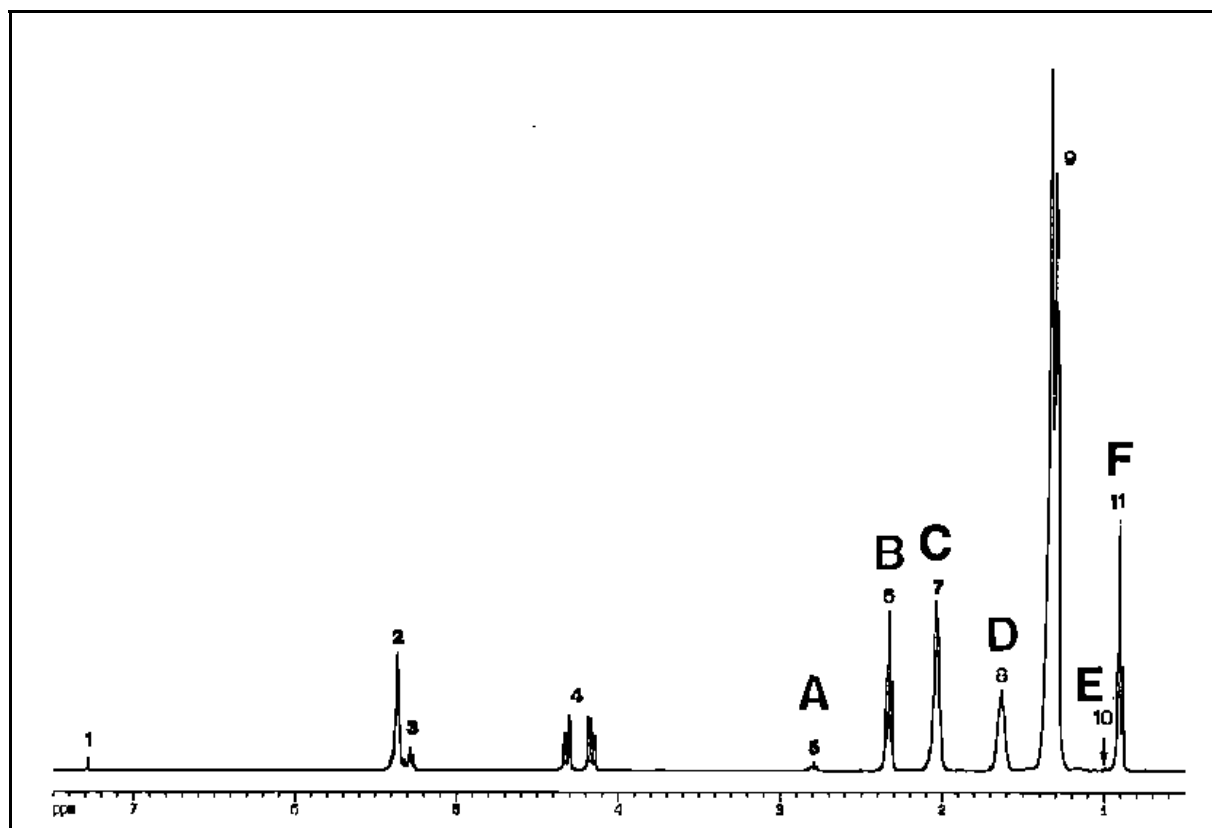
Parametri analitici legati alla genuinità degli oli vergini

L'analisi dei *polifenoli* consente di rivelare la genuinità dell'olio di oliva, in relazione alla possibile adulterazione con oli raffinati. Negli oli vergini, il 50% circa della frazione fenolica è costituita da tirosolo, idrossitirosolo e acido 4-idrossifenilacetico. Negli oli non raffinati, il tirosolo è presente in concentrazione > 30 mg/kg, mentre risulta assente negli oli raffinati. L'*acido elaidinico* è praticamente assente negli oli di pressione; per l'olio vergine non deve essere dosabile (GC), per gli altri oli può arrivare allo 0.3%.
La degradazione dell'olio porta alla saturazione di parte dei doppi legami \rightarrow diminuzione del numero di iodio

Analisi dell'olio di oliva tramite spettroscopia NMR

È un metodo non distruttivo; l'olio viene semplicemente disciolto in cloroformio o dimetil solfossido. La semplice esecuzione degli spettri ^1H e ^{13}C fornisce utili informazioni sulla composizione.

Spettro ^1H NMR dell'olio di oliva

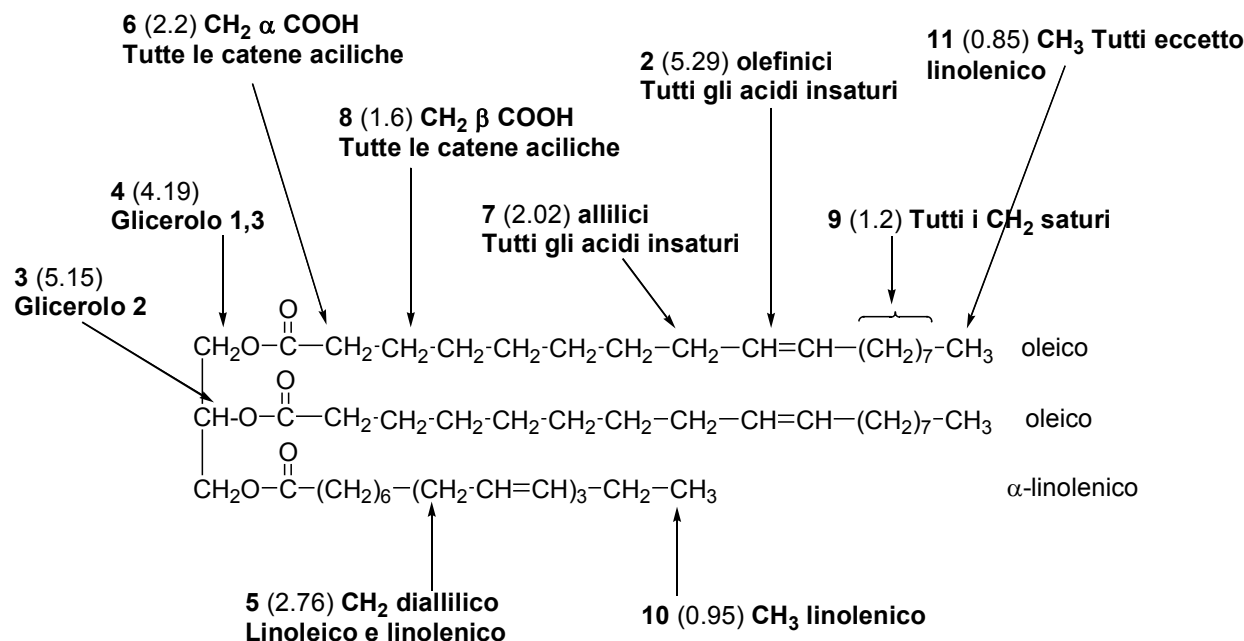


Spettro NMR ^1H di un olio di oliva vergine.
da: R. Sacchi, F. Addeo, L. Paolillo, ^1H and ^{13}C NMR of Virgin Olive Oil, *Magn. Reson. Chem.* **1997**, 35, S133.

Lo spettro risulta suddiviso in differenti regioni, delle quali quelle contrassegnate dalle lettere **A-F** sono relative a protoni della catena dell'acido grasso e quindi più interessanti ai fini diagnostici. Il segnale **2** (δ 5.29) è tipico per i protoni olefinici, e quindi è legato alla presenza di acidi grassi insaturi. I segnali **3** e **4** (δ 5.15, 4.19) appartengono invece ai protoni in posizione 2 o 1,3 del glicerolo. Il picco **A** (**5**, δ 2.76) viene assegnato al gruppo metilenico diallilico della catena degli acidi linoleico e linolenico, ed è quindi diagnostico per questi ultimi. Il picco **B** (**6**, δ 2.2) invece appartiene al gruppo metilenico in α rispetto al gruppo carbossilico. Il segnale **C** (**7**, δ 2.02) è caratteristico dei protoni allilici presenti in tutti gli acidi insaturi. Inoltre, troviamo **D** (**8**, δ 1.6) relativo al gruppo metilenico in β rispetto al gruppo carbossilico. L'intenso segnale **9** (δ 1.2) è relativo a tutti i gruppi metilenici saturi, quindi sempre presente e non diagnostico.

La zona più schermata, $\delta < 1$, presenta i segnali metilici terminali della catena. È importante notare il debole picco **E** (**10**, δ 0.95), specifico per i protoni metilici dell'acido linolenico in quanto solo quest'ultimo presenta tali protoni in posizione omoallilica. Molto più intenso risulta, ovviamente, il segnale **F** (**11**, δ 0.85) che comprende tutti i protoni metilici degli altri acidi grassi, nei quali non vi sono gruppi insaturi adiacenti.

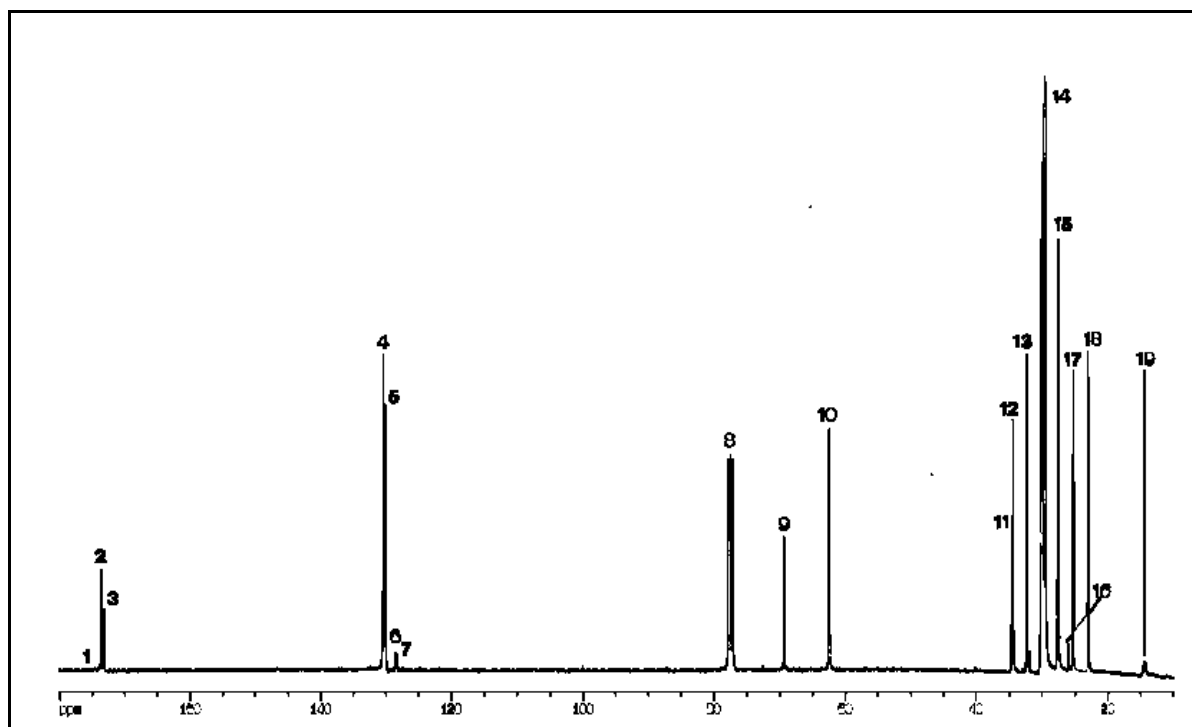
Le assegnazioni sono riportate nel diagramma seguente.



Chemical shift (δ) e assegnazioni delle principali risonanze nello spettro ^1H NMR dell'olio di oliva vergine

Picco	δ (ppm)	Protone	Assegnazione
1	7.26	CHCl ₃	Cloroformio (solvente)
2	5.29	CH=CH	Tutti gli acidi grassi insaturi
3	5.15	CHOCOR	Glicerolo (TG)
4	4.19	CH ₂ OCOR	Glicerolo (TG)
5	A 2.76	CH=CHCH ₂ CH=CH	Linoleico e linolenico
6	B 2.2	CH ₂ COO	Tutte le catene aciliche
7	C 2.02	CH ₂ CH=CH	Tutti gli acidi grassi insaturi
8	D 1.6	CH ₂ CH ₂ COO	Tutte le catene aciliche
9	1.2	(CH ₂) _n	Tutte le catene aciliche
10	E 0.95	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Linolenico
11	F 0.85	CH=CHCH ₂ CH ₃	Tutti gli acidi eccetto il linolenico

Spettro ^{13}C NMR dell'olio di oliva



Spettro NMR ^{13}C di un olio di oliva vergine.

da: R. Sacchi, F. Addeo, L. Paolillo, ^1H and ^{13}C NMR of Virgin Olive Oil, *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*, S133.

Nello spettro ^{13}C possiamo distinguere essenzialmente quattro regioni.

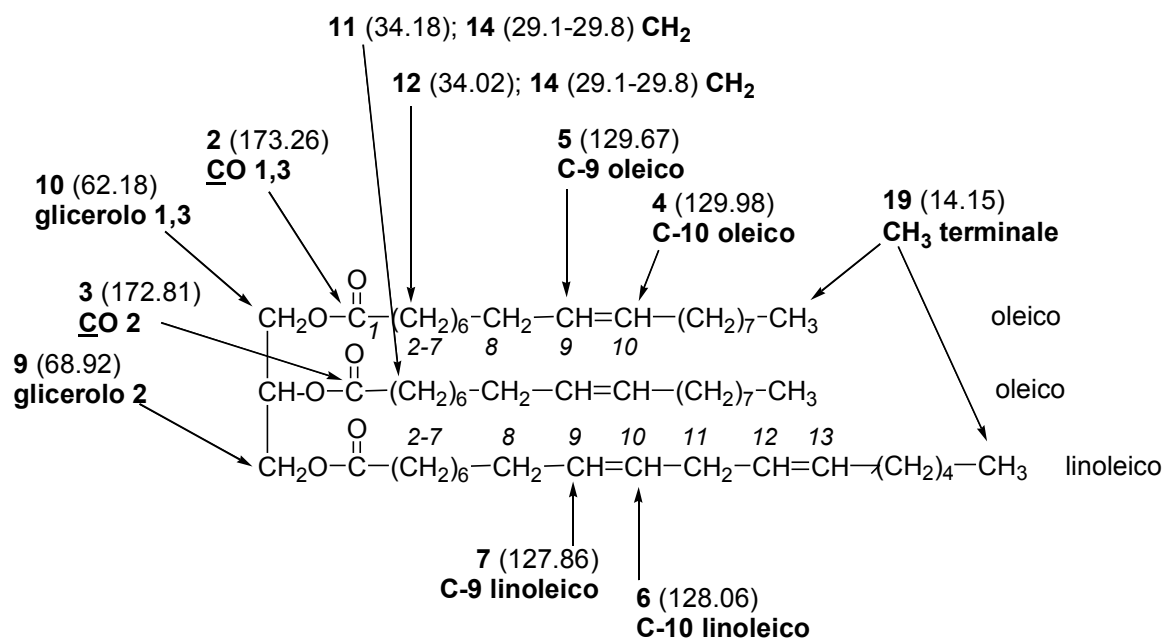
La prima (δ 172-176) evidenzia i segnali del carbonio carbonilico, le cui intensità sono basse a causa soprattutto del lungo tempo di rilassamento. Il segnale **1** (δ 174-176), di intensità particolarmente bassa, è relativo agli acidi grassi liberi ($\text{R}-\text{COOH}$), che in un olio vergine debbono essere presenti solo in piccola quantità. I segnali **2** e **3**, molto vicini tra loro (δ 172.8, 173.3), appartengono al carbonio carbonilico dei TG rispettivamente nelle posizioni 1,3 e 2.

La seconda regione (δ 127-130) riguarda gli atomi di carbonio olefinici negli acidi grassi insaturi. Dato che il TG più abbondante nell'olio di oliva è la trioleina, troviamo in questa zona il segnale **4** (δ 129.98) relativo al C-10 del residuo oleico, ed il segnale **5** (δ 129.67) del C-9. Sono evidenti, seppure in piccola quantità, anche i segnali degli atomi di carbonio insaturi dei residui dell'acido linoleico: **6** (δ 128.06) e **7** (δ 127.86) (C-10 e C-9, rispettivamente).

Nella regione tra δ 62-69 troviamo i segnali del glicerolo: **9** (δ 68.92; posizione 2) e **10** (δ 62.18; posizioni 1,3).

Nella regione $\delta < 30$ (picchi **11-19**) risuonano tutti gli atomi di C alifatici. Risulta prominente il segnale **14**, composto da molte risonanze ravvicinate (δ 29.1-29.8) e relativo ai segnali metilenici eccetto quelli in posizione 2 nella catena dell'acido grasso: **11** (δ 34.18, posizione 2 del glicerolo) e **12** (δ 34.02, posizioni 1,3 del glicerolo). Notiamo infine il segnale **19** (δ 14.15), relativo al carbonio metilico terminale.

Le assegnazioni sono riportate nel diagramma seguente (per chiarezza, un residuo linoleico è stato posto in posizione 3 del glicerolo, sebbene non sia la posizione tipica nei TG naturali).

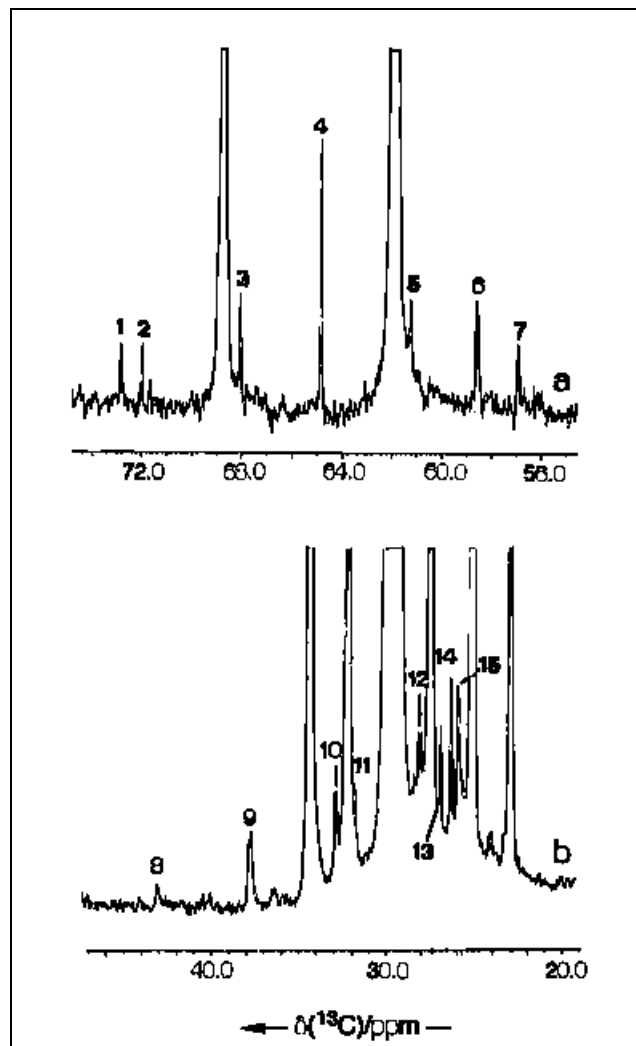
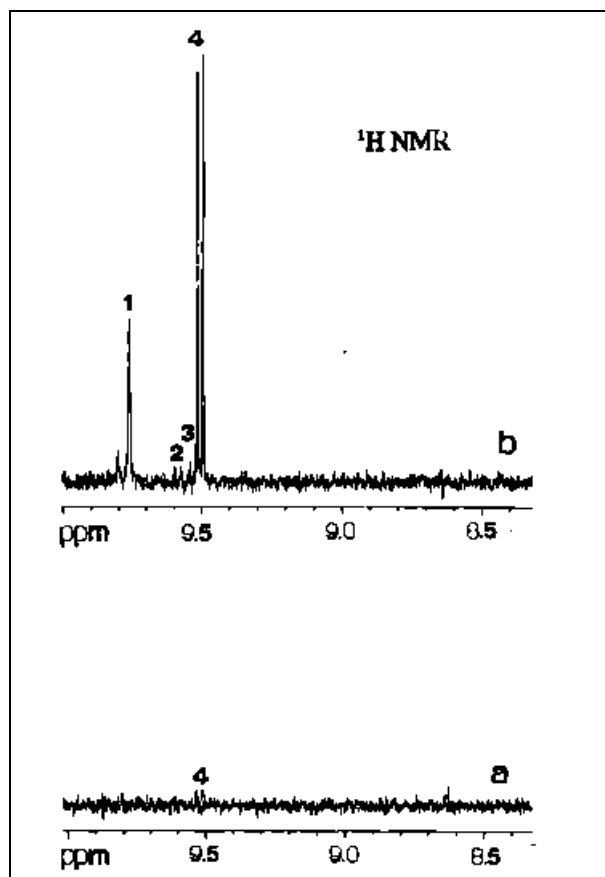


Chemical shift (δ) e assegnazioni delle principali risonanze nello spettro ^{13}C NMR dell'olio di oliva vergine

Picco	δ (ppm)	Carbonio	Assegnazione
1	174–176	C-1	Acidi grassi liberi
2	173.26	C-1, sn-1,3	Gruppo carbonilico TG
3	172.81	C-1, sn-2	Gruppo carbonilico TG
4	129.98	C-10	Oleico
5	129.67	C-9	Oleico
6	128.06	C-10	Linoleico
7	127.86	C-12	Linoleico
8	77.01	CDCl_3	Cloroformio (solvente)
9	68.92	CHO- , sn-2	Glicerolo (TG)
10	62.18	$\text{CH}_2\text{O-}$, sn-1,3	Glicerolo (TG)
11	34.18	C-2, sn-2	Tutte le catene aciliche
12	34.02	C-2, sn-1,3	Tutte le catene aciliche
14	29.1–29.8	$(\text{CH}_2)_n$	Tutte le catene aciliche
19	14.15	$\omega 1$ ($-\text{CH}_3$)	Tutte le catene aciliche

Effetto dello stress termico sull'olio di oliva

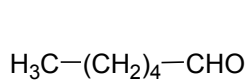
Una notevole parte degli oli commestibili viene impiegata nella frittura dei cibi. Durante questo processo avvengono notevoli deteriorazioni del gusto e del valore nutritivo attraverso reazioni di ossidazione, idrolisi e polimerizzazione.



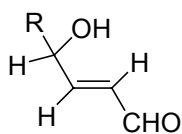
Spettro ^1H (solo regione aldeidica) NMR di un olio di oliva vergine prima (a) e dopo (b) 90 min. di stress termico a 180°C . I picchi 1, 2, 3, 4 indicano la formazione di aldeidi.

Spettro ^{13}C NMR di un olio di oliva vergine dopo 90 min. di stress termico a 180°C . I picchi 6, 7, 12, 14 indicano la formazione di epossidi.

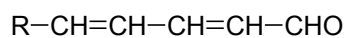
da: R. Sacchi, F. Addeo, L. Paolillo, ^1H and ^{13}C NMR of Virgin Olive Oil, *Magn. Reson. Chem.* **1997**, 35, S133.



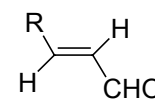
1



2



3



4

Cereali



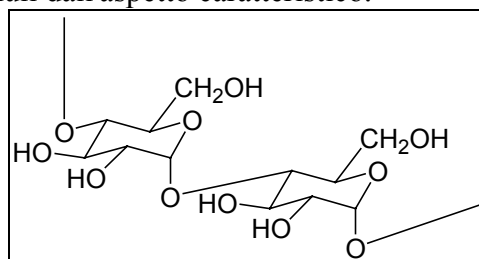
I cereali sono uno degli alimenti più importanti, dal momento che forniscono il 50% del fabbisogno giornaliero di carboidrati, il 30% delle proteine, e il 50% della vitamina B, oltre a sali minerali e oligoelementi. Nei Paesi meno sviluppati sono la principale fonte di energia, proteine, vitamine e sali minerali.

I cereali vengono coltivati a scopo alimentare da più di 7000 anni. Al giorno d'oggi, quelli più comunemente coltivati sono frumento, riso, mais, orzo, segale e sorgo. Di questi, solo il frumento e la segale sono adatti per la panificazione.

Le varietà di cereali differiscono nelle loro proprietà chimico-fisiche rispetto all'uso finale (preparazione di pane, biscotti, pasta, etc.). La qualità è determinata dalla specie, varietà, stagione e località di raccolto, miscelazione, durata e condizioni di conservazione, contaminazione da polvere, pietre, altri semi, presenza di residui tossici o pesticidi, etc. La qualità deve quindi essere valutata rispetto al tipo, genuinità, stagionatura, adattabilità all'uso richiesto.

La composizione e le proprietà nutrizionali dei cereali sono simili; sono composti principalmente di amidi, fibre grezze, proteine (5-15%), e quantità minori di grassi e polisaccaridi non amidacei.

Il componente principale, ed il più importante, è ovviamente l'*amido*; con questo termine viene designato l'omopolisaccaride costituito da unità di glucosio unite da un legame α -1,4 glicosidico. L'*amilosio* (ca. 25% dell'amido totale) è costituito da 250-300 unità, mentre l'*amilopectina* (ca. 75%) ha un peso molecolare più elevato ed una struttura ramificata (ogni 25 unità di glucosio vi è un legame α -1,6 glicosidico). Nei cereali e nelle loro farine l'amido si presenta sotto forma di granuli dall'aspetto caratteristico.



Amiliosio

La *cellulosa* e i *pentosani* (noti anche come lignina) costituiscono invece la parte indigeribile (\rightarrow fibra grezza o dietetica). Nella cellulosa, il legame glicosidico è β -1,4 ed il peso molecolare è molto superiore (>3000 unità). I pentosani derivano dalle pareti cellulari vegetali, e non sono ben caratterizzati.

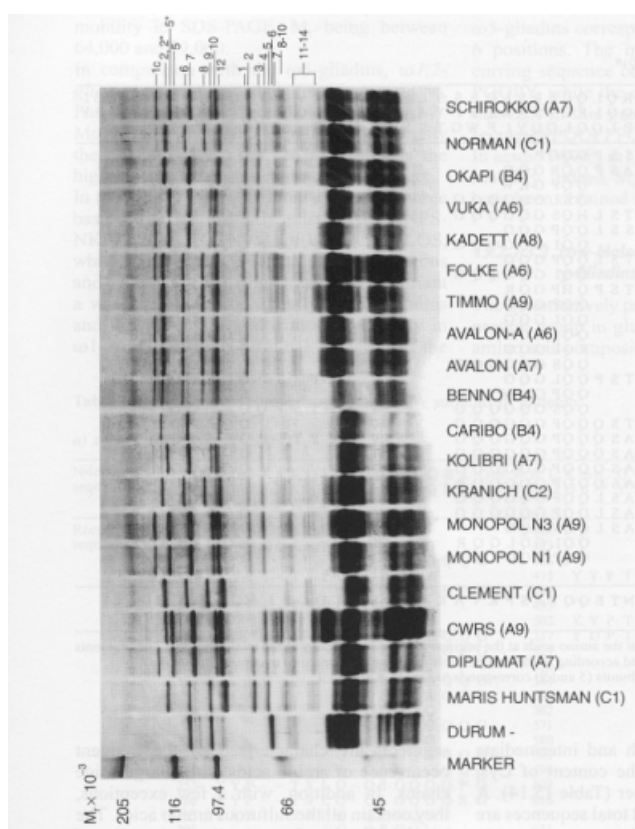
Per aggiunta di acqua alla farina di frumento, si ottiene un impasto (*dough*) il quale, dopo lavaggio, lascia come residuo la frazione proteica, nota in genere come *glutine*. Queste proteine vengono classificate in quattro gruppi: *albumine* e *globuline*, solubili in acqua o sale; sono il 15% del totale e costituiscono la frazione non-glutine; *prolammine* (*gliadine*) e *gluteline* (*glutenine*), solubili in etanolo e acidi diluiti, rispettivamente; sono l'85% del totale e costituiscono il glutine.

Le proprietà viscoelastiche (consistenza) dell'impasto per la panificazione, e quindi dei prodotti derivati dalla cottura in forno, sono dovute alla presenza dell'amido, sebbene la creazione delle strutture che consentono la lievitazione dipenda dal contenuto di glutine. Nel caso della segale, che non produce glutine, la panificazione dipende dalla presenza dei pentosani, che hanno la proprietà di rigonfiarsi in acqua.

Miscele tra varietà e specie diverse

La pasta viene preparata da grano duro al 100%; ciò nonostante, durante la coltivazione, il raccolto e la lavorazione si ha sempre contaminazione da grano tenero (*Triticum aestivum*), cosa che deve essere tenuta sotto controllo. Il problema è particolarmente importante in Italia, in cui il contenuto massimo di grano tenero nella pasta è sottoposto a norme di legge. Sono di particolare interesse, quindi, i test analitici in grado di differenziare il grano duro da quello tenero.

Per elettroforesi su gel poliacrilammidico, la frazione gliadinica viene risolta in quattro grandi gruppi di bande (α , β , γ , e ω -gliadine) caratteristici della varietà di frumento, in quanto determinati dal fenotipo ed indipendenti dalle condizioni di crescita. La tecnica è però complicata; una metodica correlata e di più semplice esecuzione è basata sull'elettroforesi capillare. L'esempio qui sotto mostra la analoga separazione elettroforetica delle glutenine.



Separazione elettroforetica SDS-PAGE delle glutenine di varie cultivar di frumento. Per ogni cultivar, è indicata la qualità per la panificazione (A9: molto alta, C1: molto bassa).
da: H.-D. Belitz, W. Grosch, *Food Chemistry*, Springer, Berlin, 1999.

Un approccio del tutto diverso è basato sull'analisi microscopica dei granuli di amido. In questo caso, i parametri rilevanti sono: il diametro equivalente $= 2\left(\frac{area}{\pi}\right)^{1/2}$ e il rapporto tra lunghezza e larghezza.

Anche il contenuto in sali minerali è diverso e può essere sfruttato a scopi analitici: infatti il tenore in magnesio, calcio, zinco e manganese è maggiore nel grano duro, mentre è vero il contrario nel caso del potassio.

Qualità nella lavorazione

Una delle proprietà più importanti a livello industriale è legata al comportamento delle farine nel processo di panificazione. Infatti, nella lievitazione l'idratazione del glutine deve dare luogo ad un impasto elastico, estensibile, impermeabile ai gas. Nell'industria moderna, la struttura dell'impasto viene sviluppata tramite il forte apporto di energia meccanica per un breve periodo (contrariamente alla panificazione manuale, molto più lenta). Sfortunatamente, non vi è alcun semplice indicatore biochimico in grado di prevedere la qualità della farina a questo riguardo. Pur tuttavia, la consistenza dell'impasto sembra essere legata ad un alto rapporto glutenine/gliadine e alla presenza di certe subunità della glutenina ad alto peso molecolare. In particolare, l'ossidazione dei gruppi tiolici (-SH) a disolfuro (-S-S-) (che avviene spontaneamente per ossidazione della farina durante la conservazione) provoca la reticolazione delle catene proteiche, con conseguente aumento del peso molecolare e migliore consistenza dell'impasto.

Ricordiamo infine che la preparazione dei "pancakes" americani, dalla tipica consistenza gommosa, viene migliorata dall'uso di farine sottoposte a clorurazione. Si ritiene che il miglioramento sia basato sulla maggiore idrofobicità dei granuli di amido clorurati.

Qualità microbiologica

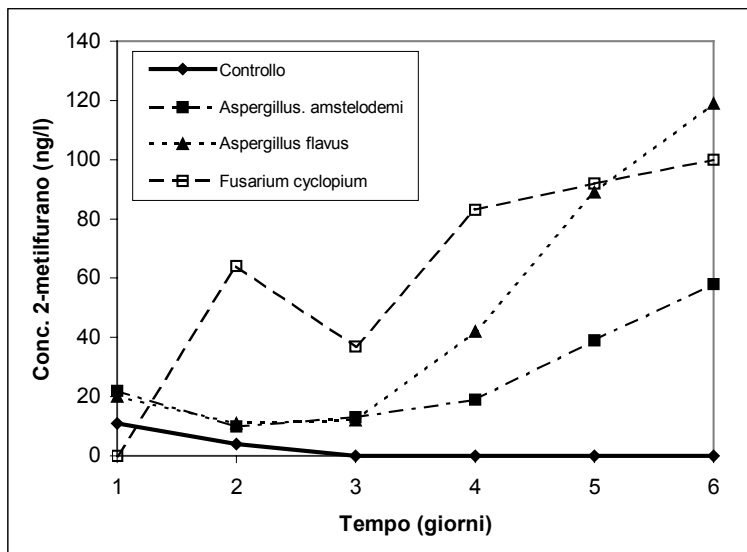
I cereali possono essere conservati senza perdita di qualità per 2-3 anni, purché il contenuto di acqua venga ridotto dal valore naturale del 20-24% a non più del 14%. Il basso tenore di umidità è necessario per evitare la proliferazione di microorganismi e per ridurre il metabolismo intrinseco dei semi. I cereali così preparati vengono poi fumigati con AlP o Mg_3P_2 (che vengono idrolizzati a PH_3), HCN, etilene ossido per controllare la proliferazione di microorganismi.

Ciò nonostante, circa il 2% della produzione mondiale di cereali viene danneggiato da microorganismi, che provocano cambiamenti nei grassi (lipolisi), proteine, carboidrati (saccarolisi), minerali e vitamine; l'infestazione da funghi è generalmente accompagnata da un forte aumento nell'acidità.

Il problema principale è però dato dalla potenziale formazione di *micotossine* (aflatossine, ocratossine) ed allergeni. Ad esempio, le ocratossine (da *Aspergillus ochraceus*) si formano nei cereali se l'umidità è eccessiva, e lo zearalenone viene prodotto da *Fusarium graminearum*. La grande tossicità di queste sostanze ne rende indispensabile il controllo.

Uno dei metodi per rivelare la contaminazione da muffe è basato sull'analisi del contenuto di *ergosterolo*, il principale componente strutturale della membrana citoplasmatica dei funghi. La presenza di ergosterolo può essere rivelata sfruttando la fluorescenza del complesso di addizione con lo iodio.

Anche l'analisi (per via GC) dello spazio di testa si è rivelata un metodo utile per rivelare la presenza di infezioni fungine. I principali prodotti sono alcoli (soprattutto 3-metil-1-butanol, 1-otten-3-olo, 3-ottanol), alcani e terpeni, e la loro distribuzione può essere associata alla specie contaminante.



Concentrazione del 2-metilfurano (ng/l di aria) nello spazio di testa di farina contaminata da funghi.
Dati da: R. S. Singhal, P. R. Kulkarni, D. V. Rege, *Handbook of Indices of Food Quality and Authenticity*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, 1997.

Infestazione da insetti

Durante la conservazione dei cereali, è frequente l'infestazione da parte di insetti, per cui i prodotti relativi (farina e derivati) possono essere contaminati dagli insetti stessi, uova, larve, nonché pelo di roditori, con ovvie implicazioni legate alla cattiva conservazione e la conseguente sporcizia. Per di più alcuni eterotteri, nutrendosi dei chicchi di cereali vi lasciano residui salivari che contengono proteasi. Questi enzimi distruggono la struttura del glutine; le farine così preparate danno impasti molli e appiccicosi, al punto da non essere più adatte alla panificazione.

La rivelazione di questa contaminazione è in primo luogo basata sull'esame visivo, microscopico o radiografico del materiale, potendosi evidenziare la presenza di frammenti degli insetti stessi etc. Questo metodo però è in grado di rivelare solo la presenza di insetti sviluppati, cioè una infestazione in grado avanzato.

Metodi più sensibili sono basati sulla ricerca di materiale derivato dalle cellule degli insetti (chitina) o di roditori e uccelli (cheratina nei peli e nelle penne) sfruttando coloranti opportuni. È inoltre possibile ricercare i prodotti di escrezione degli insetti, principalmente l'acido urico.

Frutta e verdura



Sono costituenti essenziali della dieta. Nonostante l'enorme varietà di specie vegetali commestibili, la tendenza generale è ormai quella di restringere il consumo a relativamente poche varietà (*cultivar*) appositamente selezionate per favorire proprietà quali l'aspetto visivo, le dimensioni, il tempo di maturazione, la conservabilità. Queste varietà possono differire ampiamente anche per il costo finale, e pertanto è desiderabile poterle classificare in base a questi parametri.

Il problema è reso molto vasto non solo dal numero di specie vegetali coinvolte, ma anche dal fatto che questi alimenti vengono consumati sia come tali, sia sotto forma di una grandissima varietà di derivati, come frutta e verdura in scatola, sciroppata, succhi di frutta, bibite, salse, conserve, etc. (senza contare le bevande alcoliche, che costituiscono un grande capitolo a parte). Per di più, la composizione chimica della polpa e del succo di una stessa varietà di frutta varia ampiamente a seconda del luogo di coltivazione, della stagione, del modo di estrazione, etc. Di conseguenza, è difficile stabilire delle specifiche standard generalmente valide per certificare l'autenticità. Non è quindi possibile in questa sede trattare esaurientemente la problematica, ma ci limiteremo a fornirne alcuni punti chiave.

Alimenti freschi

- Presenza di residui di pesticidi e altri prodotti agrochimici
- Contaminazione da muffe e insetti
- Maturazione artificiale

Alimenti derivati

- Miscelazione con cultivar inferiori, materiale a maturazione scarsa o eccessiva, materiale non commestibile (bucce, semi)
- Addizione di acidi organici, zuccheri, coloranti e aromi artificiali, conservanti.

Succhi di frutta e verdura

La qualità di molti succhi di frutta e bevande viene principalmente determinata dall'esame organolettico (colore, viscosità, gusto di "cotto", gusto amaro, etc.) e da alcuni parametri chimici come il contenuto di zucchero e di acido ascorbico, e l'acidità.

L'aspetto di composizione più importante è dato dal contenuto di frutta, che di norma è regolamentato sia per proteggere il consumatore, sia contro la pressione da parte dei produttori di frutta. Vari costituenti del succo di frutta possono essere usati come indici (sali inorganici, composti azotati, polifenoli, vitamine, pigmenti).

L'adulterazione del succo di agrumi è un problema riconosciuto a livello mondiale. Viene effettuata per diluizione con acqua, aggiunta di zuccheri o di acidi, ed intensificazione dell'aroma. Sono note anche pratiche di aggiunta di sostanze estranee (polisaccaridi, idrolisati dell'amido) e succhi di altra frutta. Nonostante siano stati fatti notevoli progressi (→ *metodi isotopici*), la maggior parte di queste adulterazioni rimane difficile da diagnosticare.

Ad esempio, il contenuto di ceneri e fosforo nella frutta dipende poco dalla provenienza, e costituisce un criterio per rivelare l'aggiunta di acqua.

Il metodo più comunemente usato per il succo d'arancia è però basato sull'analisi del contenuto in amminoacidi liberi, dato che la concentrazione di alcuni amminoacidi (Lys, His, Arg) è soggetta a forti fluttuazioni, mentre quella di altri (Pro, Gly, idrossiprolina) rimane costante. Pertanto, un abbassamento nel contenuto di questi amminoacidi è indice di adulterazione.

Analogamente, il contenuto dell'amminoacido ornitina (caratteristico del pompelmo) può essere usato per gli stessi scopi.

Succhi misti

Molti succhi di frutta sono posti in commercio come miscele di succhi di frutta varia. È nell'interesse sia dei consumatori che dei produttori essere in grado di stabilirne la composizione, per mettere in evidenza sia la possibile adulterazione con succhi meno pregiati, sia la frode fiscale legata a dazi doganali su certi succhi di frutta, come quello d'uva.

L'analisi di questi componenti è basata sul diverso contenuto dei vari succhi di origine nei loro costituenti (zuccheri, polifenoli, amminoacidi, acidi organici e pigmenti). Ad esempio, si può esaminare il rapporto fruttosio/glucosio, e soprattutto la presenza di sorbitolo, presente solo in alcuni frutti (pere, ciliegie, prugne, mele, pesche) ma scarsissimo o assente in altri (uva, more, lamponi, fragole).

Il contenuto in polifenoli specifici di certe specie può venire analizzato via HPLC.

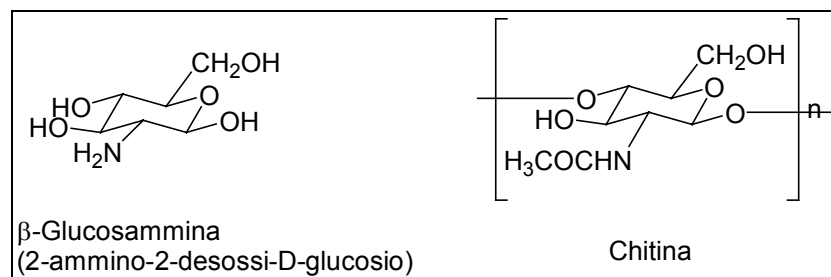
Composto polifenolico	Presente in	Rivela
Quercetin-3-rutinoside	comune, ma non nelle fragole	succo di anice nel succo di fragole
Quercetin-3-O-(2"-O- α -L-ramnosil-6"-O- α -L-ramnosil- β -D-glucoside	ribes rosso	ribes rosso nei prodotti da ribes nero
Naringina	pompelmo	succo di pompelmo nel succo d'arancia
Schaftoside	fichi	succo di fichi nel succo d'uva
Florizina	mele	succo di mela nel succo di pera
Isoramnetinglucoside	pere	succo di pera nel succo di mela

Altri esempi di analisi simili verranno presentate nella parte relativa ai metodi isotopici.

Contaminazione microbiologica

L'attacco della frutta da parte di muffe provoca il degrado di molte proprietà organolettiche (colore, consistenza), oltre ovviamente a generare tossine. La *patulina* (prodotta, tra gli altri, da *Penicillium expansum* e *Blassochlamys nivea*) ne è un esempio, tipico dei derivati della mela.

La contaminazione può essere rivelata analizzando alcuni componenti del micelio fungino, come la *chitina* e la *glucosammina* (assenti nelle piante superiori).



È anche possibile la ricerca di metaboliti, come l'acido succinico e alcune ammine volatili (ad es. butilammina).

Caffè



Questa bevanda stimolante, a causa del contenuto di caffeina, fa parte della dieta di quasi tutte le popolazioni. Il caffè deriva dai frutti di piante tropicali del genere *Coffea*. Il caffè in grani viene ottenuto per torrefazione dei semi della pianta, ed è solo dopo questo processo che acquista le sue proprietà organolettiche.

Delle oltre 70 specie solo tre vengono coltivate, e solamente due hanno importanza economica: *Coffea arabica* (75% della produzione mondiale) e *Coffea canephora* o *robusta* (25%). Tra le due, l'*arabica* è la specie più pregiata a causa delle migliori proprietà organolettiche del caffè ottenuto. Per contro, la *robusta* dà un caffè dall'aroma più forte ma meno raffinato, ed è pertanto meno pregiata. La chimica analitica del caffè è, quindi, in massima parte rivolta ad evidenziare la miscelazione di *robusta* nell'*arabica*.

Miscele di caffè

Nel caso dei chicchi non torrefatti, la rivelazione è basata sulla differente dimensione dei chicchi, ma soprattutto sull'alto contenuto di saccarosio in *arabica*, mentre *robusta* contiene maggiormente glucosio e fruttosio.

Dopo la torrefazione, le due specie vengono distinte con vari metodi, basati sull'analisi della frazione non saponificabile dei lipidi. I più importanti sono il cafestolo, il 16-O-metilcafestolo, ed il kahweolo. Il kahweolo è presente solo in piccola quantità in *robusta*, ma è soggetto a degradazione in seguito alla torrefazione. Un indice più significativo è il contenuto di 16-O-metilcafestolo, il quale non viene degradato, ed è presente solo nella *robusta*. L'analisi (HPLC) consente di rivelare fino al 2% della specie estranea, persino nel caffè solubile.

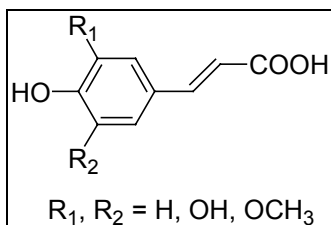
Caffeina	Cafestolo (R = H) 16-O-metilcafestolo (R = CH ₃)	Kahweolo

Le due specie differiscono anche per il contenuto medio di caffeina (0.8-2.5% per *arabica* e fino al 4% per *robusta*), ma questo parametro è molto variabile.

Anche le caratteristiche legate ai componenti aromatici vengono utilizzate per la distinzione. A tale riguardo, viene applicata l'analisi dello spazio di testa; le due specie differiscono grandemente sotto molti aspetti. Ricordiamo che l'aroma del caffè non è stabile; alcuni componenti importanti, come il metantiolo (CH₃SH) e il 2,3-pentandione (CH₃-C(O)-C(O)-CH₂CH₃) sono molto volatili e vengono rapidamente perduti (soprattutto nel caso del caffè macinato); la loro concentrazione è pertanto un indice di freschezza.

Origine geografica

La produzione del caffè è regolata da norme internazionali che assegnano quote di produzione ai vari Paesi produttori. È pertanto possibile avere truffe legate al contrabbando di caffè di origine geografica diversa verso altre regioni, la cui origine geografica risulta pertanto falsamente descritta. È quindi desiderabile possedere indicatori affidabili dell'origine geografica. A questo riguardo, la composizione in *acidi clorogenici* (acidi idrossicinnamici) risulta indicativa.



Struttura di alcuni acidi clorogenici. Acido *p*-cumarico ($R_1 = R_2 = H$); acido ferulico ($R_1 = H, R_2 = OCH_3$); acido caffeico ($R_1 = H, R_2 = OH$); acido sinapico ($R_1 = R_2 = OCH_3$).

Surrogati del caffè

Sono costituiti da parti vegetali che, dopo torrefazione, possono dare una bevanda simile al caffè. Vengono consumati come tali o miscelati al caffè, e possono quindi essere usati per adulterarlo. Il più comune è la cicoria (essa stessa può essere adulterata!), ma vengono usati anche cereali torrefatti (orzo) o fichi. Questi materiali possono essere riconosciuti sulla base di analisi microscopiche e del contenuto di caffeina. Nel caso della cicoria, si può ricorrere al contenuto di acidi clorogenici come gli acidi 4- e 5-caffeoilchinico, presenti nel caffè ma molto scarsi nella cicoria torrefatta.

Acido 5-caffeoilchinico	Acido 4-caffeoilchinico	(Acido caffeico)

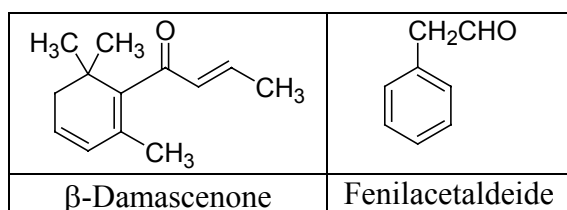
Adulterazione del caffè solubile

Il riconoscimento di questa frode è considerato importante, dato che esistono in commercio svariati surrogati solubili di prezzo molto minore. In questo caso, ovviamente, l'analisi microscopica è inutile; la distinzione è basata principalmente sul diverso contenuto di monosaccaridi. Nel caffè solubile puro, il monosaccaride più abbondante è l'arabinosio (0.4-2.5%), seguito dal galattosio (0.1-1.0%) e mannosio (0.2-0.9%). Glucosio e fruttosio sono scarsi (< 0.5%); xilosio e ribosio sono presenti solo in tracce. La presenza di glucosio >1.8% e fruttosio >0.8% è considerata indice di adulterazione.

Miele

Il miele è una sostanza prodotta dalle api dal nettare dei fiori; viene usato come dolcificante fin dall'antichità. Viene usato come ingrediente in centinaia di alimenti, come i corn flakes. In termini commerciali, la presenza del miele spesso denota nella pubblicità alta qualità e genuinità non associate ad altri dolcificanti.

Il miele è essenzialmente una soluzione molto concentrata (umidità 16%) di zucchero invertito (69% glucosio + fruttosio), ma contiene anche una varietà di altri carboidrati, principalmente disaccaridi (saccarosio: 1%; maltosio: 7%), enzimi, amminoacidi (principalmente prolina prodotta dalle api), acidi organici, sali minerali (Mn, P, B), sostanze aromatiche (β -damascenone, fenilacetaldeide), pigmenti, cere, polline etc.



Il miele normalmente contiene una fase cristallina ed una sciropposa, il cui rapporto (e quindi la consistenza) dipende dalla composizione zuccherina e dal contenuto di acqua. La cristallizzazione, cioè la separazione di cristalli di glucosio, è indesiderabile. La probabilità di cristallizzazione è maggiore se il contenuto di glucosio e saccarosio è più alto, o quando è elevato il rapporto glucosio/acqua. Per contro, la cristallizzazione è meno probabile quando il contenuto di polisaccaridi è elevato. In ogni caso, le dimensioni dei cristalli debbono essere le più piccole possibili, per evitare agglomerazione che rende necessario il riscaldamento del miele per poterlo utilizzare nella produzione dolciaria.

Qualità del miele

La qualità del miele viene valutata rispetto all'adulterazione, alla differenziazione dal miele prodotto da api nutrite con zucchero, e all'identificazione dell'origine botanica e geografica. Tutte queste valutazioni sono di notevole importanza, a causa della disponibilità limitata e del notevole prezzo del miele genuino.

Adulterazione del miele

L'adulterazione con zucchero invertito (miscela glucosio-fruttosio da idrolisi del saccarosio) è un problema di vecchia data. L'aggiunta di moderate quantità di zucchero invertito fa restare i livelli di glucosio e fruttosio entro i limiti normali per il miele. Questa frode può essere rivelata sfruttando il fatto che nella produzione dello zucchero invertito si forma anche 5-idrossimetilfurfurale, che viene analizzato per via spettrofotometrica. Nonostante il saggio abbia molte interferenze, un tenore di 5-idrossimetilfurfurale superiore a 50 mg/100 g viene considerato prova di questa adulterazione.

Analogamente, l'adulterazione con sciroppo di mais o di destrosio (*corn syrup*, *dextrose syrup*; prodotti dell'idrolisi dell'amido con acidi e/o enzimi) viene facilmente svelata dal basso rapporto fruttosio:destrosio.

Di recente, questa adulterazione è diventata molto più difficile da evidenziare, a causa della disponibilità commerciale di sciroppo di mais ad alto tenore di fruttosio (*high fructose corn syrup*, HFCS; prodotto per isomerizzazione enzimatica del glucosio). La composizione dell'HFCS rassomiglia fortemente a quella del miele, e può essere purificato accuratamente fino ad eliminare la maggior parte delle sostanze che ne rivelerebbero la presenza. Sono stati

provati e scartati numerosissimi metodi analitici; gli unici metodi che sembrano funzionare sono: (a) un metodo TLC che rivela la presenza di oligosaccaridi e maltodestrine nell'HFCS; (b) i metodi isotopici basati sul rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (→ metodi isotopici).

Miele da api nutrite con zucchero

Questa adulterazione può essere dimostrata tramite l'analisi del contenuto proteico: il miele da api nutrite con saccarosio ha un profilo proteico più semplice, non contiene prolina, e possiede una minore conducibilità elettrica.

Origine botanica e geografica

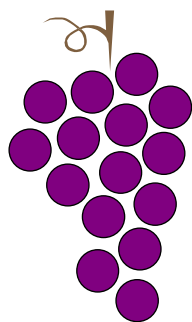
L'origine botanica può essere determinata dall'analisi del polline, oppure da una complessa valutazione del rapporto tra i vari zuccheri. Forse il metodo più potente è però l'analisi HPLC degli esteri fenolici (ad es. acido 2- e 4-idrossibenzoico, vanillico, siringico, *p*-metilcumarico, ferulico, etc.). Invece, il contenuto di flavonoidi è stato proposto come indice dell'origine geografica.

Contaminanti del miele

A parte la presenza di certi materiali (residui vegetali, parti del corpo delle api, e acari), è nota la possibile contaminazione da batteri aerobici, la cui presenza è minima nel caso del miele monoflorale (che viene estratto immediatamente dopo la fioritura). È nota anche la contaminazione da lieviti (*Saccharomyces*) e muffe (*Aspergillus*), che hanno la capacità di ridurre il glucosio a, tra l'altro, glicerolo. Pertanto, la ricerca del glicerolo può essere utilizzata come indicatore.

Ricordiamo infine la possibile contaminazione da pesticidi e acaricidi.

Vino



Il vino viene ottenuto dalla fermentazione alcolica totale o parziale del mosto d'uva. La coltivazione della vite (*Vitis vinifera*) e la relativa produzione vinicola è ben documentata dall'antichità nel bacino mediterraneo; in tempi relativamente recenti la coltivazione è stata estesa ad altri Paesi dal clima adatto: USA, Australia, Cile, Argentina, Sud Africa. I maggiori produttori sono Italia, Francia e Spagna.

Sono note circa 8000 cultivar della vite, ciascuna delle quali si differenzia per contenuto zuccherino e componenti aromatici, e dà origine a vino con caratteristiche distintive.

È di grande rilevanza il problema della *denominazione di origine*. È infatti sempre maggiore la richiesta di vini ottenuti da vitigni specifici, coltivati in regioni particolari (solitamente quelle di origine) ed eventualmente lavorati con metodi anch'essi specifici (ad es. metodo Champenois per lo champagne).

Per la legislazione italiana, tra i vini da pasto si distinguono i vini comuni e quelli tipici. Per questi ultimi, prodotti in zone ben definite, sono previste

- Denominazione di origine semplice (da vitigni tradizionali delle corrispondenti zone di produzione, vinificate secondo gli usi locali)
- Denominazione di origine controllata (risponde anche a requisiti prestabiliti)
- Denominazione di origine controllata e garantita (vini di grande pregio, commercializzati in bottiglia).

Dato il grande valore aggiunto al vino dall'aderenza a questi criteri, è di notevole importanza la disponibilità di tecniche analitiche che consentano di stabilire l'origine e il tipo di lavorazione del vino. Tuttavia il problema è reso molto complicato dall'enorme varietà di parametri che concorrono a determinarne la qualità, non ultima la variabilità con l'annata. In questa sede, pertanto, ci limiteremo a fornire alcuni dati essenziali sulla composizione del vino, in particolare sulle sostanze che concorrono a conferirgli le sue caratteristiche organolettiche.

Le tecniche analitiche che vengono utilizzate allo scopo sono quelle già viste, tipiche per le sostanze organiche, come tecniche cromatografiche, analisi dello spazio di testa, etc.

L'aggiunta di zucchero al mosto durante la fermentazione è una pratica diffusa e consentita in certi casi. La sua rivelazione è di norma effettuata con i → metodi isotopici.

Componenti del mosto; cenni su produzione e fermentazione

Il mosto contiene quantità uguali di glucosio e fruttosio, mentre il contenuto di saccarosio è molto più basso (10-12 g/l). Sono presenti piccole quantità di pectine e pentosani.

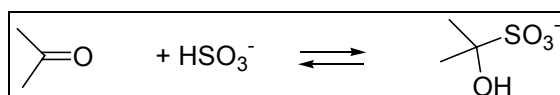
I principali acidi sono L-tartarico ed L-malico; il primo è più abbondante nelle buone annate.

Il contenuto di composti azotati e lipidi è molto basso. È importante invece la presenza di composti fenolici (*tannini*), presenti principalmente nel raspo, nella buccia e nei semi, e di pigmenti (*antocianine*). Queste sostanze, assieme ai componenti aromatici, sono essenziali nel determinare le caratteristiche del vino.

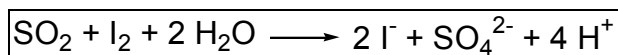
La fermentazione può avvenire spontaneamente (lieviti naturalmente presenti sulla superficie degli acini), o, preferibilmente, inoculando ceppi selezionati di *Saccharomyces cerevisiae*,

secondo le caratteristiche desiderate. Ricordiamo che la fermentazione naturale porta ad un contenuto di alcool non superiore a 17-18°, oltre il quale i fermenti vengono inattivati. Il mosto fresco viene trattato con anidride solforosa (SO₂, 50 mg/l) per prevenire l'ossidazione e la crescita di microorganismi indesiderati (batteri acetici, lieviti, muffe). Eventualmente, una quantità maggiore di SO₂ può essere usata allo scopo di bloccare la fermentazione portando quindi a vini più dolci.

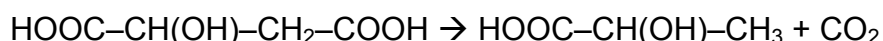
Il vino appena prodotto viene stabilizzato per ulteriore trattamento con SO₂ (o solfiti), che ha tra l'altro la funzione di eliminare composti carbonilici, soprattutto l'acetaldeide, per formazione di addotti bisolfitici (acidi idrossisolfonici), evitando così la formazione di note aromatiche indesiderabili (aceto, agrodolce).



L'uso di una corretta quantità di SO₂ è quindi molto importante per la qualità del vino; data la nocività di questo conservante, l'obiettivo è di avere una concentrazione di 30-50 mg di SO₂ libera per litro di vino finito. Un uso eccessivo di SO₂ porta infatti ad una completa chiarificazione del vino, e può quindi essere usato per mascherare difetti di lavorazione. L'analisi può essere effettuata con un normale metodo redox, per es. per titolazione iodometrica.



Alla fermentazione seguono svariati processi di lavorazione, tra cui ovviamente l'invecchiamento. Durante l'invecchiamento avvengono reazioni che portano al raggiungimento delle caratteristiche organolettiche tipiche, cioè la formazione o l'aumento di concentrazione delle sostanze aromatiche. Una delle più importanti reazioni è la *fermentazione malo-lattica*, cioè la degradazione dell'acido malico ad acido lattico per azione di vari microorganismi del genere *Pediococcus* e *Lactobacillus*:



Questa reazione riduce l'acidità del vino. → Aromi

Miglioramento

A volte è necessario migliorare artificialmente i vini ottenuti in annate sfavorevoli, i quali hanno un eccesso di acidità e un basso tenore di zuccheri, con lo scopo di riportare questi parametri a valori più tipici. I procedimenti che vengono adottati sono: l'aggiunta di zucchero, la deacidificazione e il taglio.

L'aggiunta di zucchero è regolata per legge nei Paesi produttori, e viene effettuata con saccarosio o mosto concentrato prima della fermentazione. L'operazione fa aumentare il grado alcolico, ma non migliora le componenti aromatiche, per cui i vini di bassa qualità non vengono migliorati.

La deacidificazione viene effettuata aggiungendo carbonato di calcio, che porta alla precipitazione di tartrato e/o malato di calcio.

Infine, il taglio con altri vini consente di rimediare a difetti, intensificare l'aroma o migliorare il colore, soprattutto allo scopo di assicurare una qualità uniforme.

L'aggiunta di anidride carbonica non dà miglioramenti sostanziali al vino.

Composizione e problemi analitici

La composizione chimica del vino è estremamente variabile, essendo influenzata da molti fattori ambientali (clima, condizioni meteorologiche, terreno), dal tipo di cultivar e naturalmente dalle modalità di produzione, invecchiamento etc.

A parte casi clamorosi di adulterazione grossolana (vino al metanolo), l'analisi del vino è rivolta soprattutto a stabilire parametri quali il grado alcolico, l'eventuale aggiunta di zuccheri, e la corretta lavorazione. In particolare, hanno grandissimo interesse attuale le problematiche relative alla certificazione dell'origine biologica (vitigno) e geografica. Questo è un campo di ricerca corrente, basato soprattutto su metodi isotopici, che tuttavia esula da questo Corso a causa della sua complessità.

L'analisi del vino è basata sull'estratto, tasso alcolico, contenuto di glicerolo, zuccheri, ceneri, tannini, pigmenti, composti azotati e aromatici. Però, dato il grandissimo numero di componenti sensibili, la valutazione e classificazione dei vini è possibile solo attraverso la combinazione di analisi chimiche e prove organolettiche.

Estratto

L'estratto comprende tutti i componenti, eccetto quelli volatili o distillabili. Alcuni sono preesistenti nel mosto, mentre altri si formano per fermentazione o degradazione. Dato che il contenuto di zucchero può essere manipolato, l'estratto "esente da zuccheri" è un parametro più rilevante per la valutazione della qualità.

Carboidrati

I carboidrati presenti nel vino completamente fermentato (0.03-0.5%) sono piccole quantità di glucosio e fruttosio (esosi), nonché di pentosi non fermentescibili. I vini non completamente fermentati contengono maggiori concentrazioni di esosi, soprattutto di fruttosio (che fermenta più lentamente). Il rapporto medio glucosio:fruttosio è 0.58:1, ma è ampiamente variabile. I vini con contenuto < 4 g/l di zuccheri sono designati "secchi".

Etanolo e altri alcoli

Anche il contenuto di etanolo è ampiamente variabile; normalmente è compreso tra 55-110 g/l, fino a 130 g/l per i vini dell'Europa meridionale. Un livello maggiore di 144 g/l è considerato indice di aggiunta di etanolo. Notiamo che la tradizionale unità di misura del tasso di etanolo (grado alcolico) è misurato in volume (ml) di etanolo per 100 ml di vino a 20 °C. La conversione tra questi dati richiede la densità delle soluzioni acqua/etanolo, e quindi apposite tabelle. Ad es.: 55 g/l → 6.97 gradi alcolici, 110 g/l → 13.92 gradi, 144 g/l → 18.3 gradi.

Il metanolo è presente in concentrazione molto piccola (38-200 mg/l), mentre il suo contenuto nelle vinacce fermentate è molto maggiore a causa dell'idrolisi delle pectine, per cui i distillati ne possono contenere 1-2%. A causa della sua tossicità, il contenuto di metanolo deve essere controllato; il problema è però importante solo per l'acquavite.

Gli alcoli superiori presenti nel vino sono il propilico, butilico e amilico. È presente una notevole quantità di glicerolo derivante dagli zuccheri (6-10 g/l), che conferisce al vino il cosiddetto "corpo".

Da notare anche l'eventuale presenza di mannitolo, assente nei vini sani ma presente in notevoli quantità (fino a 35 g/l) nei vini infetti da batteri.

Acidi organici

Gli acidi derivanti dall'uva sono: tartarico, malico e citrico, mentre gli acidi succinico, lattico e carbonico (CO₂), unitamente ad alcuni acidi volatili, derivano dalla fermentazione.

$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$
Acido tartarico	Acido malico	Acido citrico	Acido succinico	Acido lattico	Acido gluconico

I vini rossi hanno un'acidità inferiore a quella dei vini bianchi. I vini mediterranei tendono ad avere un'acidità relativamente bassa.

La presenza di acido acetico e propionico, come pure di quantità anomale di acido lattico, è indice di malattia.

Un saggio particolare è quello relativo alla presenza di acido gluconico. Questo acido si forma durante il processo di *botritizzazione*, diffuso in Trentino e Tirolo, che consiste nel lasciare i grappoli d'uva ad appassire su paglia. Durante questo tempo vengono attaccati dalla muffa *Botrytis cinerea*, con aumento della concentrazione zuccherina. La botritizzazione porta alla formazione di acido gluconico (fino a 2 g/l). La sua presenza è pertanto normale nei vini così ottenuti.

Fenoli, antocianine e composti azotati

I composti fenolici (tannini) sono derivati degli acidi clorogenici (→ caffè) e sono strutturalmente affini ai derivati presenti in quasi tutta la frutta. Sono quindi esteri di acidi idrossibenzoici, quali l'acido salicilico (2-idrossibenzoico), 4-idrossibenzoico, gallico (3,4,5-triidrossibenzoico) con zuccheri come il glucosio.

I tannini nei vini rossi, responsabili delle proprietà astringenti, tendono a polimerizzare durante l'invecchiamento, riducendo così la nota astringente.

Il colore del vino rosso è essenzialmente dovuto a pigmenti contenuti nella buccia degli acini d'uva. La struttura generale di questi pigmenti (antocianine) è quella di un catione benzopirilio sostituito in vario modo.

I composti azotati vengono in gran parte metabolizzati dai lieviti durante la fermentazione. Pertanto, rimangono soltanto piccole quantità (200-800 mg/l) di amminoacidi liberi.

$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3 \\ \\ \text{X}^+ \end{array}$
Acido salicilico	Acido 4-idrossibenzoico	Acido gallico	Antocianine

Sostanze aromatiche

I composti volatili noti sono più di 600, in concentrazioni di circa 1 g/l. Essi derivano in parte dall'uva stessa (aroma primario) e in parte dalla fermentazione (aroma secondario). Tuttavia, il reale contributo all'aroma è stato dimostrato solo per poche di queste sostanze. Peraltro, la maggior parte delle cultivar hanno aroma neutro; fanno eccezione Moscato, Pinot e Sauvignon, che sono ricche di sostanze aromatiche.

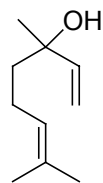
Tra le sostanze aromatiche troviamo i *terpeni*. Nell'uva, tuttavia, questi sono presenti prevalentemente come glicosidi inodori (ad eccezione del linalolo). È solo alla fine della

maturazione, e ancor di più durante la lavorazione, che si formano terpeni liberi, i quali danno una serie di reazioni (disidratazione, ciclizzazione) che portano ad altre sostanze. Pertanto, nonostante il numero limitato di monoterpeni presenti nel succo d'uva, si forma una grande quantità e varietà di sostanze aromatiche durante la produzione. La composizione terpenica può essere usata per differenziare le cultivar.

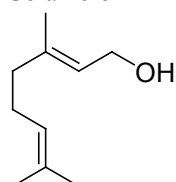
Sostanze aromatiche nel mosto e nel vino

Terpeni

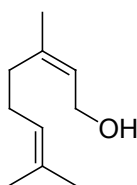
Linalolo



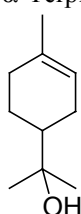
Geraniolo



Nerolo



α -Terpineolo



Esteri

R-COO-CH₂CH₃,

R = C₁, C₂, C₄, C₅, C₇, C₉

CH₃-CH(OH)-COO-CH₂CH₃

CH₃-COO-C₆H₁₃

CH₃-COO-CH₂CH₂-Ph

CH₃-COO-CH₂CH₂-CH(CH₃)-CH₃

Etile acetato, propionato, pentanoato, esanoato (caproato),
 ottanoato, decanoato

Etile lattato

Esil acetato

2-Feniletile acetato

3-Metilbutil acetato

Alcooli amilici

CH₃CH₂CH(CH₃)CH₂OH

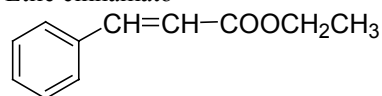
CH₃CH(CH₃)CH₂CH₂OH

2-Metil-1-butanolo

3-Metil-1-butanolo

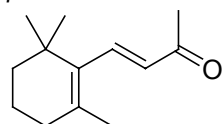
Componenti del bouquet

Etile cinnamato



Moscato

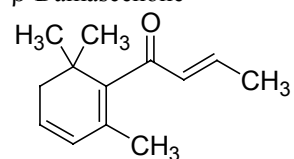
β -Ionone



Moscato

Linalolo, Geraniolo, Nerolo

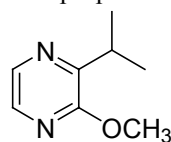
β -Damascenone



Moscato

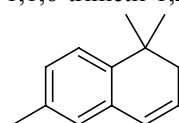
Riesling, Chardonnay

3-Isopropil-2-metossipirazina



Sauvignon

1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftalene



Riesling invecchiato

L'aroma durante la fermentazione è dovuto all'etanolo, alcoli superiori ed esteri. La valutazione della loro importanza ai fini sensoriali è molto difficile, perché l'aroma effettivamente percepito è dato da una miscela complessa in cui le proprietà dei componenti si influenzano a vicenda. Per di più, la soglia odorosa di ciascun componente è anche influenzata dal solvente, dalla concentrazione zuccherina e dal pH, come risulta dalla tabella qui sotto.

Effetto del mezzo sulla soglia odorosa di alcuni componenti aromatici del vino

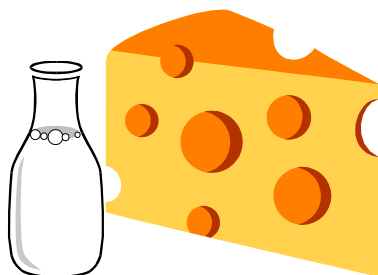
Composto	Valore di soglia ($\mu\text{g/l}$)			
	Acqua	Etanolo 12%, pH 3.3 con acido tartarico	Precedente + 100 g/l saccarosio	Vino bianco secco
Etile caproato	36	37	56	850
Etile acetato	25000	40000	-	160000
Alcool amilico (miscela di isomeri)	1900	12500	60000	180000

da: H.-D. Belitz, W. Grosch, *Food Chemistry*, Springer, Berlin, 1999.

La composizione nella frazione esterea, e soprattutto la sua grande variabilità, ha un grande effetto sulla componente "fruttata" dell'aroma.

Durante l'invecchiamento e la maturazione si sviluppa il cosiddetto "bouquet". Sebbene le proprietà sensoriali del bouquet siano ben conosciute, le sostanze aromatiche che vi contribuiscono non sono ben note, eccetto in alcuni casi (vedi tabella).

Latte e derivati



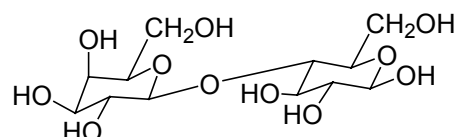
Il latte è il liquido secreto dalle ghiandole mammarie della femmina dei mammiferi; contiene quasi tutte le sostanze nutritive necessarie per il sostentamento. Sebbene l'uomo abbia usato fin dall'antichità il latte di capra, pecora e vacca come alimento, al giorno d'oggi il termine "latte" è sinonimo di "latte vaccino".

Il tipico aspetto bianco opaco del latte deriva dall'assorbimento e diffusione della luce da parte dei globuli di grasso e micelle proteiche (per questo motivo, anche il latte scremato mantiene il colore bianco). Il colore giallo pallido che a volte si osserva è dovuto alla presenza di caroteni ingeriti durante la pastura. Il grasso del latte si trova sotto forma di goccioline o globuli circondati da una membrana ed emulsionati nel *siero*. Questi globuli col tempo si separano dal siero, a meno che il latte non venga omogeneizzato (operazione in cui il diametro dei globuli viene fatto diminuire da 10 μm a $< 1 \mu\text{m}$).

A parte un 60-80% di acqua, il siero è costituito da varie sostanze (proteine, carboidrati, sali minerali); la parte proteica è costituita principalmente da sali di calcio delle caseine.

Le proteine del latte sono una miscela complessa, riconducibile alle proteine chiamate *caseina* (α -, β -, γ -caseina; è la più abbondante), *lattoalbumina* e *lattoglobulina*. Queste ultime possono essere differenziate geneticamente, e costituiscono la base per la determinazione della specie di origine (vedi oltre).

Lo zucchero principale del latte è, ovviamente, il *lattosio* (4-6% del totale), un disaccaride (O- β -D-galattopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranosio) il cui sapore dolce è notevolmente minore del fruttosio o del saccarosio.

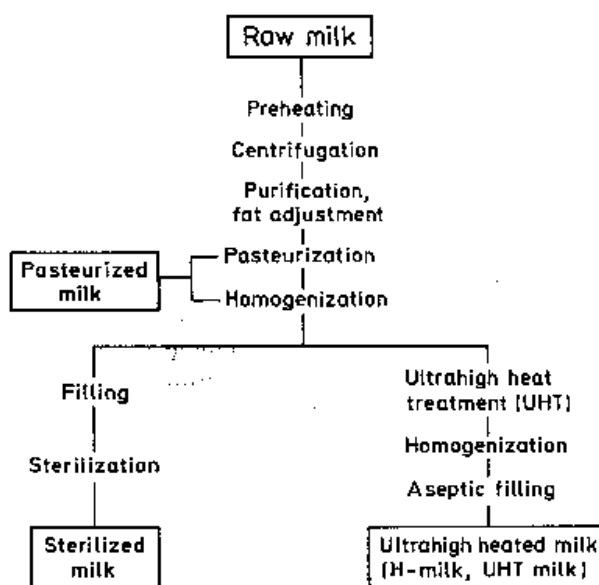


Il grasso del latte è costituito principalmente da triacilgliceroli (95-96%) e diacilgliceroli (1-2%), più steroli, fosfolipidi, acidi grassi liberi. La caratteristica della loro composizione risiede nella percentuale relativamente alta di acidi grassi a catena corta ($< C_{14}$), soprattutto il butirrico (C_4 , 3%), caproico (C_6 , 2%) e miristico (C_{14} , 9%).

Come accennato prima, il grasso è contenuto in globuli la cui membrana è proteica, che tra l'altro protegge i lipidi dall'azione delle lipasi presenti nel latte. Durante l'omogeneizzazione queste membrane vengono distrutte; pertanto, per evitare una degradazione immediata, le lipasi debbono essere inattivate per pastorizzazione *prima* dell'omogeneizzazione.

Il latte non viene quasi mai commercializzato come tale, ma sottoposto a vari trattamenti termici.

- *Pastorizzazione*: riscaldamento a 85 °C per 2-3 s (oppure 62-65 °C per 30 minuti)
- Trattamento *Ultra High Temperature* (UHT): 136 °C per 5-8 s, oppure per iniezione di vapore a 140 °C per 2-4 s e successivo confezionamento asettico
- *Processo Bactotherm*: combinazione di sterilizzazione centrifuga a 65-70 °C e trattamento UHT del sedimento (2-3% del latte totale), seguito dalla ricombinazione; dato che solo una piccola parte del latte viene sottoposta al trattamento termico, il gusto è migliore.



Trattamento del latte.

da: H.-D. Belitz, W. Grosch, *Food Chemistry*, Springer, Berlin, 1999.

In seguito al trattamento termico, si suppone che tutti i microorganismi vengano uccisi; l'efficacia della pastorizzazione viene controllata misurando l'attività delle fosfatasi. Oltre a questo, avvengono una serie di mutamenti nelle proteine (denaturazione) e, soprattutto, una complessa serie di reazioni, note collettivamente come *reazioni di Maillard*. Le reazioni di Maillard sono di portata generale in chimica degli alimenti, e coinvolgono reazioni fra gruppi ossidrilici (tipicamente dei carboidrati) e gruppi amminici (ad es. il gruppo NH₂ terminale della lisina), e portano alla formazione di pigmenti bruni, spesso non caratterizzati, i quali sono responsabili dell'imbrunimento di molti cibi cotti (*browning*). Nel caso del latte, quando questo viene sottoposto a sterilizzazione, la reazione di Maillard tra lattosio e gruppi amminici porta ad imbrunimento, formazione di maltolo, 5-idrossimetilfurfurale, 4-idrossi-2,5-dimetil-3(2H)-furanone (→ sostanze aromatiche). Assieme ad altre sostanze (solfuri, chetoni) queste sono responsabili del caratteristico sapore di "cotto".

Qualità del latte

La qualità del latte e dei suoi derivati comprende una grande varietà di caratteristiche:

- Assenza di sporcizia, antibiotici, agenti patogeni, residui di detergenti
- Certificazione dell'igiene durante la produzione
- Controllo della diluizione con acqua, rimozione del grasso, possibile aggiunta di adulteranti
- Possesso di aroma e gusto accettabili
- Quantità adeguata di costituenti nutritivi

L'adulterazione del latte implica l'aggiunta di qualsiasi sostanza, o la rimozione di qualunque componente. Le forme di adulterazione più banali (aggiunta di acqua, scrematura, etc.) sono facilmente riconosciute sulla base di semplici procedure, come la misura di densità e contenuto di grassi. Analogamente, adulterazioni accidentali in conseguenza di lavorazioni antiigieniche portano alla presenza di sporcizia, residui di detergenti, peli o letame, che vengono facilmente rivelati da un semplice esame visivo e organolettico.

Ciò nonostante, nel caso del latte la qualità batteriologica è di gran lunga l'aspetto di maggior interesse, mentre per il burro e i formaggi il parametro più importante è il gusto.

Adulterazione con latte di altra specie

Ciascun tipo di latte può essere impiegato aggiungendolo fraudolentemente ad uno dichiarato. La frode è di particolare rilevanza per i soggetti allergici, e in ogni caso l'origine dei prodotti importati nell'Unione Europea deve essere certificata.

Trattandosi di specie animali diverse, è possibile impiegare metodi immunologici per differenziare i tipi di latte.

Latte di pecora, capra e vacca

È possibile analizzare (a) il contenuto di acidi grassi, ed in particolare il rapporto tra quelli a catena lunga e a catena corta; (b) il contenuto di β -carotene, presente nel latte vaccino ma non in quello caprino. Infine, ci si può basare sulla differente mobilità elettroforetica delle *para*-K-caseine bovine e ovine.

Latte di vacca e di bufala

Il latte vaccino viene di frequente usato in aggiunta fraudolenta al più costoso latte di bufala nella produzione della mozzarella. Anche in questo caso, è utilizzabile la mobilità elettroforetica delle caseine. È inoltre possibile sfruttare il diverso contenuto in acidi grassi, in particolare palmitico (16:0) e oleico (18:1) nella frazione liquida ottenibile per cristallizzazione a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, in cui C_{16} e C_{18} sono meno e più abbondanti, rispettivamente, nel latte di bufala che non nel latte vaccino.

Latte di soia

Di recente, il latte e le proteine di soia hanno ricevuto notevole attenzione come fonte alternativa di proteine economiche e nutrienti, specialmente nei Paesi meno sviluppati, e sono spesso commercializzati come alimento sostitutivo per i vegetariani e gli allergici. Tuttavia, in molte nazioni non è consentito aggiungere proteine non derivate dal latte al latte bovino e derivati. Ciò nonostante, è difficile rivelare la presenza di queste sostanze, dato che le proprietà organolettiche di tali preparati non sono differenti. È possibile comunque impiegare metodi elettroforetici ed immunologici (questi ultimi possono rivelare fino a $< 1\%$ di soia).

Altri tipi di adulterazione

Miscelazione con grassi vegetali

Dato l'elevato prezzo del burro, è frequente la miscelazione con altri grassi, tipicamente vegetali (margarina). In questo caso, l'analisi viene effettuata tramite la diversa composizione in acidi grassi. È infatti possibile sfruttare la percentuale relativamente alta di acidi grassi a catena corta ($< C_{14}$), soprattutto il butirrico (C_4 , 3%), caproico (C_6 , 2%) e miristico (C_{14} , 9%), che sono invece molto scarsi nei grassi vegetali.

In alcuni Paesi è obbligatorio incorporare olio di sesamo nella produzione della margarina, dato che quest'ultimo contiene sesamolo, un fenolo la cui presenza viene facilmente e rapidamente rivelata da un test colorimetrico (reazione di Baudouin con furfurale/HCl).

Un metodo più sicuro è però dato dall'analisi della frazione insaponificabile (steroli). Nel caso del burro, l'insaponificabile è costituito per il 99% da colesterolo e per il restante da campesterolo ed ergosterolo, mentre gli oli vegetali contengono principalmente β -sitosterolo, che è assente nel burro.

Diluizione con acqua

È una delle più frequenti e antiche adulterazioni, e quindi le forniture di latte vengono costantemente controllate. Normalmente viene rivelata tramite l'innalzamento del punto di fusione (normalmente tra -0.53 e -0.55 °C), che cresce di 0.006 °C per ogni 1% di acqua aggiunta. A livello internazionale, il latte si intende non diluito se è minore di -0.535 °C; se è compreso tra -0.530 e -0.534 °C viene richiesto un controllo agli impianti; se è compreso tra -0.525 e -0.529 °C c'è forte probabilità di adulterazione, e se risulta > -0.525 °C il produttore è tenuto a discolarsi.

Qualità microbiologica dei latticini

Come già accennato, il grande interesse per il controllo batteriologico dei latticini deriva dal fatto che i batteri nel latte provocano sia deterioramento che malattie. Dal punto di vista della salute pubblica, pertanto, l'importanza di tali controlli è stata ben presto riconosciuta, e ormai è entrata nella prassi standard. In effetti, l'eradicazione della tubercolosi bovina e della brucellosi, unita alla pratica ormai diffusa della pastorizzazione, fa sì che l'interesse per l'esame batteriologico non sia più rivolto tanto all'aspetto sanitario, quanto al controllo della cura con cui il latte viene prodotto e trasformato. La catena produttiva è tipicamente sottoposta al protocollo HACCP.

Una prima valutazione, ovviamente, consiste nel conteggio delle colonie. Una contaminazione frequente è quella da *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*, che può avvenire per ricontaminazione del latte pastorizzato, e sembrano essere responsabili delle occasionali comparse improvvise di salmonellosi ed enterite.

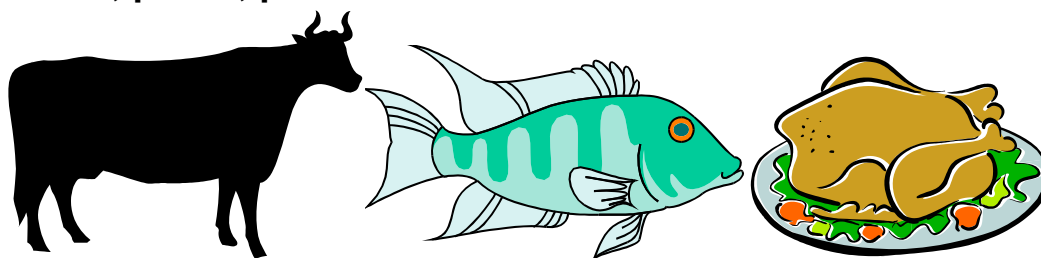
Inoltre, durante l'intera catena produttiva il latte viene mantenuto a basse temperature, cosa che può favorire la crescita di batteri psicrofili (in grado di crescere anche a circa 7 °C).

Questi batteri sono lipolitici e proteolitici, quindi in grado di produrre variazioni nel gusto ed altri difetti. In effetti, il deperimento del latte pastorizzato è generalmente dovuto alla comparsa di psicrofili; dato che questi vengono distrutti dalla pastorizzazione, la loro presenza indica l'avvenuta ricontaminazione.

I metodi per riconoscere la contaminazione batterica sono basati:

- (a) sulla misura dell'attività metabolica dei batteri: riduzione di coloranti da parte di deidrogenasi, calorimetria (lo sviluppo di batteri è accompagnato da emissione di calore), attività di catalasi e ossidasi;
- (b) sulla determinazione dei loro intermedi e sottoprodotti metabolici (piruvato, lattato, ammoniaca). La determinazione del piruvato è particolarmente importante, perché semplice da effettuare e soprattutto ben correlata al numero di colonie batteriche. Una concentrazione di piruvato maggiore di 0.5 ppm è sicuro indice di ricontaminazione del latte pastorizzato.

Carne, pesce, pollame e uova



Vi sono indicazioni certe del fatto che la carne di animali selvatici e domestici abbia giocato un ruolo importante nell'alimentazione umana fin dai tempi più antichi. In senso stretto, il termine "carne" indica il muscolo scheletrico degli animali a sangue caldo, ma vengono utilizzate anche altre parti, come il tessuto adiposo, alcuni organi interni e il sangue. Per cui la definizione del termine può variare secondo l'utilizzo. Ai fini legislativi, per esempio, il termine comprende tutte le parti degli animali a sangue caldo, in forma fresca o lavorata, adatte al consumo umano, mentre in termini colloquiali si intende generalmente il muscolo, con quantità variabili di grasso aderente.

Le carni comunemente in commercio sono quelle bovina, suina, ovina e il pollame. La tendenza odierna è quella di restringere il commercio a pochi ceppi selezionati allo scopo. Il punto è delicato per le popolazioni che si astengono, per motivi religiosi o di altro genere, da certe carni, come le suine, oppure relativamente a certi divieti, come quello di commercializzare la carne equina e di canguro in Australia.

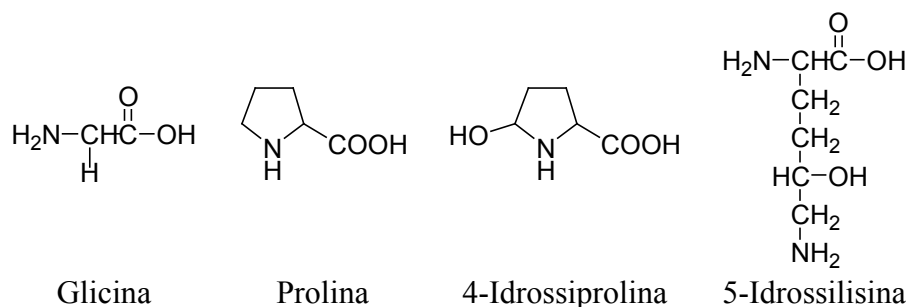
Per quanto riguarda il pesce, ricordiamo che il termine comprende anche specie (molluschi, crostacei) che non appartengono ai Pesci, ma che vengono comunque pescate e lavorate dalla stessa industria.

Carne

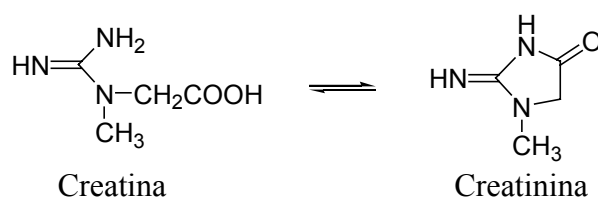
Il muscolo privato del grasso aderente contiene, in media, 76% di acqua, 21.5% di sostanze azotate, 1.5% di lipidi e 1% di sali minerali, nonché piccole quantità (< 0.2%) di carboidrati. In gran parte, quindi, la carne è costituita da proteine (in prevalenza miosina e actina, 65-70% del totale proteico).

Il colore rosso è dovuto al pigmento *mioglobina* (Mb), consistente in una proteina (globina) ed un pigmento (eme) come nell'emoglobina (Fe^{2+} -protoporfirina). (Tuttavia, il colore reale della carne è influenzato anche dalla diffusione della luce sulla superficie). La Mb è color porpora, mentre il complesso covalente tra Fe^{2+} -Mb e l'ossigeno (ossimioglobina, MbO_2) è color rosso vivo. Invece, il prodotto di ossidazione a Fe^{3+} (metmioglobina, MMb^+) è di color bruno. Il rapporto tra questi tre pigmenti determina il colore della carne, e ha un impatto notevole sull'aspetto e quindi sulla sua commerciabilità. MbO_2 è il pigmento che conferisce alla carne il tipico colore rosso considerato di qualità, ma è stabile solo a pressioni parziali di ossigeno relativamente elevate; invece, la formazione di MMb^+ è responsabile dell'imbrunimento, ed è quindi indesiderabile. MbO_2 (e quindi il colore rosso) può essere stabilizzata in presenza di leganti π -acidi (NO , CO , CN^-), in grado di legarsi stabilmente dando luogo a complessi con colore simile. Pertanto, ad esempio, la lavorazione può venire effettuata in atmosfera modificata (aria + CO), oppure trattando la carne con nitriti. Lo ione nitrito inizialmente ossida Mb a MMb^+ con formazione di ossido nitrico (NO) il quale forma complessi rosso brillante sia con Mb che con MMb^+ .

Fra le altre proteine, si trovano quelle del tessuto connettivo (collagene). Una caratteristica del collagene è l'alto tenore in glicina, prolina, 4-idrossiprolina e 5-idrossilisina. Pertanto, la presenza di questi amminoacidi (soprattutto la 4-idrossiprolina) è indicazione della presenza di materiale estraneo (e poco pregiato) nella carne.



Un costituente non proteico del tessuto muscolare è la coppia di derivati guanidinici *creatina/creatinina*. La loro presenza o concentrazione può essere utilizzata a fini analitici per rivelare la presenza di estratti di carne negli alimenti.



Pesce

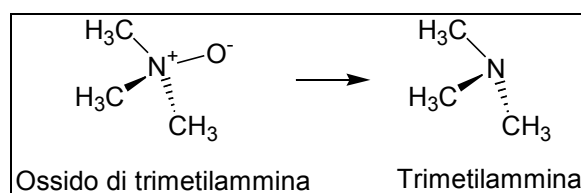
La composizione del pesce non è sostanzialmente diversa da quella del muscolo dei mammiferi, con un valore biologico abbastanza simile (sebbene il contenuto di grasso nel pesce sia ampiamente variabile con la specie). Il colore del muscolo è generalmente più tenue che nei mammiferi, e comunque è soggetto a forte degradazione. Inoltre, il contenuto di tessuto connettivo è minore nel pesce (per cui il pesce è più tenero). Il valore nutrizionale dei grassi del pesce è molto elevato, in ragione del forte contenuto in acidi grassi poliinsaturi (PUFA) con 5 o 6 doppi legami ($C_{20:5}$, $C_{22:6}$).

Vi sono diversi fattori che concorrono a rendere il pesce estremamente deperibile, come è noto. In primo luogo, la pelle dei pesci contiene numerose spore di batteri psicrofilici, in grado di crescere anche sotto i $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Questi batteri, assieme a quelli presenti nell'intestino, sono responsabili del veloce deterioramento.

Una caratteristica del pesce di mare è la presenza di trimetilammina ossido ($(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{O}^-$; 40-120 mg/kg), che svolge la funzione di regolazione della pressione osmotica. Dopo la morte, la degradazione batterica dà luogo alla formazione di trimetilammina, responsabile del caratteristico odore "di pesce". I pesci d'acqua dolce ne hanno un contenuto molto inferiore.

Un'altra caratteristica indesiderabile è il notevole contenuto di urea nei muscoli (particolarmente degli elasmobranchi), che viene rapidamente decomposta ad ammoniaca dalle ureasi batteriche durante la conservazione.

Inoltre, il grasso dei pesci è povero di tocoferoli, per cui è facilmente soggetto a degradazione ossidativa a carico dei PUFA. L'accertamento della qualità del pesce in modo rapido e affidabile è quindi un problema molto sentito nell'industria.



Qualità della carne

Dato il prezzo elevato, l'adulterazione della carne con carni di minor pregio è in aumento, soprattutto per i prodotti lavorati contenenti carne sminuzzata (hamburger, salsicce, etc.). Inoltre, dato che in molti Paesi è consentita l'aggiunta di proteine di soia, è necessario possedere metodi in grado di rivelarne la presenza ed il contenuto.

La qualità gastronomica (e quindi il prezzo) delle carni varia ampiamente in seguito ad età, sesso, provenienza, alimentazione, pratiche di allevamento, macellazione, conservazione, etc. e viene, in definitiva, valutata solo sulla base delle proprietà organolettiche. Questo rende conveniente l'aggiunta fraudolenta di specie meno pregiate (ad es. nel caso della selvaggina). Inoltre, sono intervenuti cambiamenti radicali nella pratica dell'allevamento, come l'uso di ormoni, antibiotici, etc. La crescente consapevolezza dei consumatori in merito alla possibilità che questi agenti possano essere nocivi fa sì che il loro uso sia regolamentato per legge.

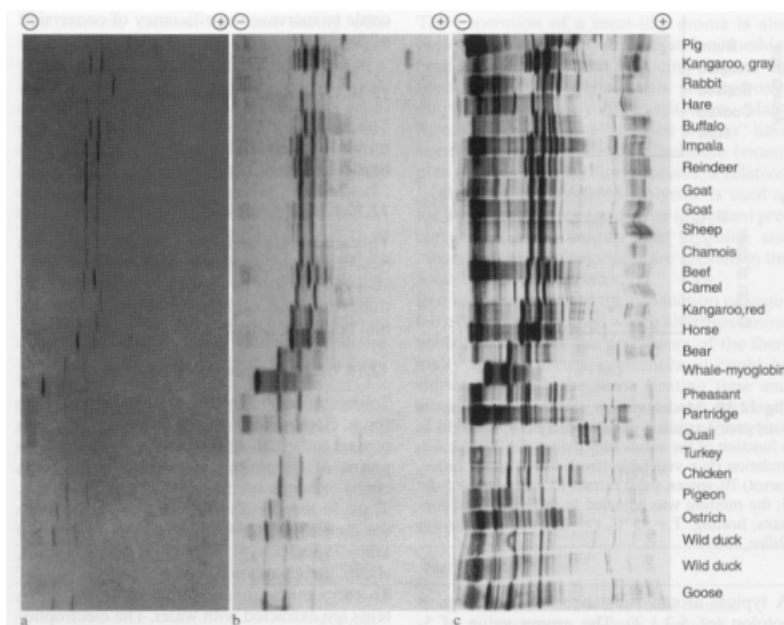
Identificazione della specie

L'adulterazione con specie meno pregiate è tra le più frequenti che si riscontrano; carni di pigmentazione simile (manzo e cavallo, manzo e montone, pollame e maiale) sono praticamente impossibili da distinguere visivamente una volta che siano state surgelate in blocco, o sminuzzate in prodotti lavorati. Pertanto l'identificazione della specie, specialmente negli alimenti lavorati, è un'area analitica tra le più difficili, ma molto importante sia per le implicazioni economiche sia igieniche.

Le tecniche per distinguere la carne di animali di specie differenti sono basate sull'esame di estratti muscolari, contenenti proteine sarcoplasmatiche e sangue. L'analisi è basata sull'elettroforesi, in grado di distinguere non solo le specie animali, compresi i pesci, ma anche la presenza di proteine dell'uovo e della soia. È anche usata per rivelare la presenza di carne di balena.

Come è ovvio, possono essere sfruttate anche le tecniche immunologiche. Così, antisieri alle mioglobine isolati dal muscolo degli ovini, suini ed equini possono rivelare la presenza di tali carni in quella bovina. Il test consente anche di evidenziare la soia, e può essere applicabile anche alle carni cotte.

I metodi elettroforetico e immunologico non sono sempre applicabili alle carni cotte, a causa della estesa denaturazione delle proteine. In tali casi, è preferibile il metodo basato sull'ibridazione del DNA.



Separazione delle proteine sarcoplasmatiche di vari animali a sangue caldo per elettroforesi PAGE. (a) Zona della mioglobina ed emoglobina senza colorazione; (b) Zona della mioglobina ed emoglobina dopo trattamento con *o*-dianisidina/H₂O₂; (c) Zone proteiche dopo colorazione con blu brillante coomassie.
 da: H.-D. Belitz, W. Grosch, *Food Chemistry*, Springer, Berlin, 1999.

Indicatori di igiene e freschezza

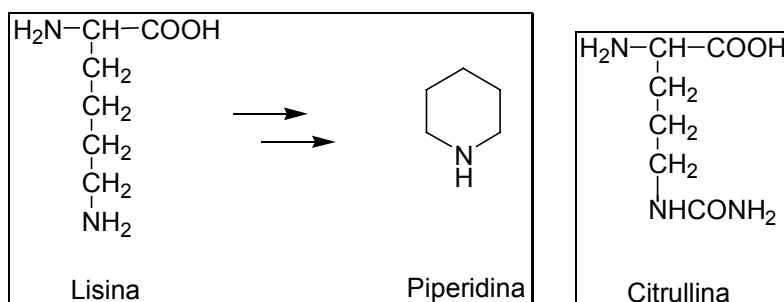
Per assicurare qualità e sicurezza a questi prodotti è importante curare l'igiene degli impianti di lavorazione. In primo luogo, occorre quindi controllare il numero e tipo di colonie batteriche eventualmente presenti.

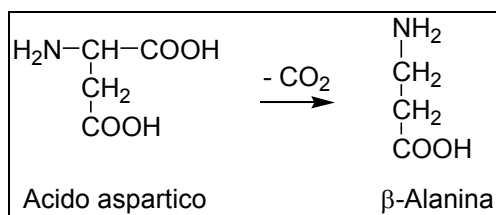
Un problema correlato è relativo alla garanzia che la macellazione sia stata eseguita su animali sani. Questo scopo viene raggiunto analizzando l'attività delle catalasi, che negli animali malati è superiore di circa tre volte rispetto agli animali sani.

Il deterioramento della carne viene controllato dall'analisi di parametri legati alla degradazione delle proteine e dei grassi, e da analisi microbiologiche. I saggi sono di particolare importanza nel caso dei pesci.

La degradazione delle proteine ad opera degli enzimi proteolitici batterici porta alla formazione di peptoni, amminoacidi e composti azotati volatili (quasi esclusivamente ammoniaca). Vengono ricercati, se possibile, amminoacidi assenti nelle carni fresche, oppure i loro prodotti di degradazione come la citrullina, la piperidina (prodotto di degradazione della lisina) e la β -alanina (H₂N-CH₂-CH₂-COOH, prodotta dalla decarbossilazione dell'acido aspartico).

Nei pesci e molluschi si formano anche ammine, soprattutto la trimetilammina (responsabile del tipico odore del pesce guasto), che nei pesci marini deriva direttamente dalla degradazione della trimetilammina ossido.





La degradazione dei grassi porta alla formazione di acidi grassi liberi e dei loro prodotti di ossidazione (perossidi, idrocarburi). In alcuni pesci, ad es. le sardine, il deterioramento provoca la comparsa di *chemiluminescenza*.

Contaminanti

Contaminazione chimica

La contaminazione di origine chimica nelle carni si riferisce alla presenza di: idrocarburi, composti organici clorurati e metalli pesanti.

La contaminazione da idrocarburi è importante per il pesce, che ne assorbe da sedimenti marini contaminati, dal cibo o dall'acqua. Gli alcani lineari vengono metabolizzati nel tratto digerente (ma non se assorbiti nelle branchie), e ha portato a forti danni alla pesca del *sea mullet* in Australia. L'origine di questi idrocarburi non è però ancora ben chiara. La contaminazione da idrocarburi (gasolio) è nota per le aragoste allevate in gabbie mantenute in acque inquinate. Analogamente, la presenza di composti organici clorurati tossici, come esaclorobenzene, DDT, bifenili policlorurati (PCB), dibenzo-*p*-diossine (TCDD) nei sedimenti marini inquinati fa sì che questi entrino nella catena alimentare di pesci e molluschi che si cibano dei sedimenti. L'analisi di questi contaminanti è basata sulla cromatografia liquida, con rivelatori a fluorescenza.

Anche la contaminazione da metalli pesanti riguarda principalmente il pesce. Molti organismi marini commestibili sono in grado di accumulare forti concentrazioni di metalli dalle acque. Così, ad es., le ostriche possono contenere quantità di zinco, cadmio o rame 10000 volte superiori a quella delle acque da cui provengono. In almeno un'occasione (ostriche in Tasmania), l'insorgenza di certi disturbi gastrici nei consumatori è stata fatta risalire al forte contenuto in questi metalli. Ricordiamo infine che il mercurio viene notoriamente accumulato nel pesce, se presente sotto forma di composti mercurio-organici come, ad es., il dimetilmercurio.

Contaminazione microbiologica

La qualità finale delle carni è fortemente influenzata dalla cura con cui sono state condotte le fasi di pre-lavorazione, come il trattamento e l'alimentazione degli animali, le modalità di macellazione, la conservazione della carcassa, il taglio, etc.

Per contro, il pesce risulta essere uno degli alimenti più deperibili, dato che si può avere sia contaminazione del materiale fresco da parte di vari microorganismi, sia decomposizione dovuta a crescita di batteri.

In generale, quindi, sia per la carne che per il pesce, è desiderabile avere dei metodi sicuri e rapidi per l'accertamento della qualità microbiologica, dato che questa ha un forte riscontro sia dal punto di vista della salute pubblica, sia da quello del controllo di produzione.

L'applicazione delle tradizionali tecniche risulta però di esecuzione troppo lunga per un controllo efficiente. Tra i metodi non microbiologici per l'analisi della contaminazione batterica sono stati sviluppati dei test di colorazione e sfruttando le proprietà elettriche.

La crescita batterica, infatti, provoca una diminuzione del potenziale redox, a causa dell'attività delle deidrogenasi. Un colorante come il blu di metilene o i sali di trifeniltetrazolio, agendo da accettore di idrogeno, viene ridotto ad una sostanza di colore diverso, permettendo così una rivelazione visiva. Alternativamente, si può sfruttare la variazione di resistenza (o conducibilità) elettrica indotta dalla crescita batterica: da una resistenza di circa 440-460 Ω subito dopo la pesca si passa a 260 Ω dopo 12 giorni, e al valore limite di 220 Ω dopo 16 giorni, trascorsi i quali il pesce non è più considerato adatto al consumo.

Additivi e adulteranti

Fra gli additivi di uso più frequente, troviamo nitrati e nitriti (KNO_3 , KNO_2 , o sali sodici). Queste sostanze hanno una duplice azione, conservante e di mantenimento del colore rosato. L'azione viene svolta dal nitrito, a cui il nitrato deve essere ridotto. L'effetto di evitare l'imbrunimento della carne è basato sulla formazione di nitroso derivati dell'emoglobina e mioglobina, come già visto. Tuttavia, i nitriti sono implicati nella formazione di \rightarrow nitrosammine cancerogene).

L'adulterazione della carne riguarda principalmente gli alimenti lavorati, come i salumi. Questi possono venire adulterati con farinacei (amido, pane, riso) e acqua fino a raggiungere la consistenza voluta. Spesso, ma non sempre, questa adulterazione può essere rivelata con i metodi tradizionali, dato che la composizione viene alterata in maniera sostanziale. In alternativa, si può determinare il contenuto di creatinina; tuttavia, la convenienza economica di questa adulterazione fa sì che la creatinina sintetica venga spesso addizionata al prodotto fino a raggiungere il tenore prescritto dalla legge. Questa adulterazione può essere rivelata solo attraverso l'analisi isotopica del contenuto di ^{14}C , dato che la sostanza sintetica ha un contenuto di ^{14}C molto minore di quella naturale (\rightarrow metodi isotopici).

Infine, è ben nota l'aggiunta di proteine non animali o non carnee ad alimenti carnei, ad es. farine di soia, uova, proteine del latte e plasma sanguigno. Tali aggiunte non pregiudicano le qualità nutrizionali e organolettiche, ma debbono essere controllate dato che possono portare ad una sostituzione delle costose proteine animali con proteine più economiche. Il controllo è basato, tra l'altro, sull'esame microscopico e sulla valutazione dei livelli di glucosammina; livelli elevati di glucosammina sono indicativi della presenza di questi adulteranti.

Uova

Le uova vengono utilizzate nell'alimentazione umana fin dall'antichità. Al giorno d'oggi, il termine "uova" indica, in maniera pressoché esclusiva, le uova di gallina. Le uova sono un alimento molto ricco di proteine e di facile digeribilità. A parte queste proprietà nutrizionali, le uova sono ampiamente usate nell'industria alimentare in virtù di alcune proprietà, cioè: coagulazione in seguito al riscaldamento (capacità di agire da agente legante); formazione di schiume per sbattitura (nei prodotti lievitati); proprietà emulsionanti (maionese, salse) e coloranti.

Qualità delle uova

Uno dei parametri più importanti da controllare è la presenza e le dimensioni di rotture del guscio, che, tra l'altro, espongono l'uovo a facile contaminazione batterica. A questo scopo le uova vengono esaminate in controluce (*candling*), anche in modo automatizzato utilizzando telecamere. Questo sistema non evidenzia però le rotture più minute; queste ultime vengono evidenziate applicando una soluzione amido-iodurata, che penetra nella membrana sotto la frattura e la colora di blu, facilitando così la rivelazione. Un sistema ancor più sofisticato richiede la scansione con un fascio laser a stretta focalizzazione; la luce che penetra nell'uovo

viene diffusa all'interno, aumentandone così la luminosità in controluce. Questo sistema consente di rivelare fratture di dimensioni superiori a 50 µm.

Un indice di qualità delle uova, adottato anche legalmente, è dato dall'altezza (o volume) della camera d'aria presente al polo più arrotondato. Durante la conservazione, infatti, si ha perdita di peso ed aumento di volume della camera d'aria.

Riguardo alla qualità microbiologica, occorre ricordare che è frequente la contaminazione batterica attraverso i pori del guscio. Questa contaminazione può avvenire a causa del personale addetto, acque di lavaggio o di condensa. La presenza di batteri Gram-negativi (Enterobatteri) può essere facilmente rivelata tramite il test LAL. La degradazione delle uova è, però, in gran parte dovuta a batteri del genere *Pseudomonas*, che (a differenza della maggior parte degli altri microorganismi) hanno la capacità di penetrare rapidamente attraverso il guscio intatto. In seguito alla contaminazione, viene generalmente prodotto nell'albume un pigmento (pioverdina) che può essere rivelato sfruttando la sua fluorescenza sotto illuminazione con luce UV.

Adulterazione delle uova

L'unica frode importante riguarda la messa in commercio di scarti di incubatrice, cioè di uova fecondate non sviluppate, che è proibita in molti Paesi. Il metodo attualmente migliore per evidenziare la frode è la ricerca dell'acido β-idrossibutirrico, molto scarso nelle uova appena deposte (0.4-0.6 mg/100 g) ma molto più abbondante (16 mg/100 g) negli scarti di incubatrice. L'analisi viene effettuata per estrazione dal materiale e GC.

Acqua potabile

L'acqua potabile deve essere trasparente, incolore, fresca e inodore, esente da agenti patogeni e a basso tenore di microorganismi; non deve essere corrosiva, e deve contenere sostanze solubili solo entro limiti stabiliti, normalmente < 1 g/l.

Di norma, l'acqua potabile viene attualmente ottenuta dalla purificazione di varie acque superficiali e sotterranee. Il processo di purificazione comprende: (a) rimozione delle particelle sospese per filtrazione attraverso ghiaia e sabbia; (b) flocculazione degli acidi umici (che conferiscono colore giallastro) con alluminio solfato; (c) eliminazione del ferro e manganese per aerazione (precipitazione di idrossido ferrico e MnO_2); (d) disinfezione per trattamento con cloro o ozono; (e) filtrazione su carbone attivo per eliminare impurezze odorifere.

Un parametro ben noto legato alla qualità dell'acqua è la sua *durezza*, cioè la concentrazione totale di Ca e Mg in mmol/l. Tuttavia, la durezza non è un parametro considerato importante per l'acqua potabile ordinaria, mentre lo è per le acque minerali.

L'analisi dell'acqua potabile coinvolge in massima parte la determinazione di specie inorganiche, più alcune categorie di sostanze organiche (idrocarburi aromatici policiclici e clorurati, pesticidi). In tutti i Paesi la legge richiede analisi e controllo costante dei parametri qui elencati.

Analisi chimico-fisica dell'acqua potabile

Parametro o componente	Valore limite ammesso
Temperatura	25 °C
pH	6.5-9.5
Conducibilità elettrica a 25 °C	2000 μ S/cm
Ossidabilità	5 mg O_2 /l
Durezza	- (mg/l)
Sodio	150
Potassio	12
Calcio	-
Magnesio	50
Ferro	0.2
Manganese	0.05
Alluminio	0.2
Ammonio	0.5
Argento	0.01
Solfato	240
Arsenico	0.04
Piombo	0.04
Cadmio	0.005
Cromo	0.05
Nichel	0.05
Mercurio	0.001
Cianuro	0.05
Fluoruro	1.5
Nitrato	50
Nitrito	0.1
PAH (come carbonio)	0.0002
Solventi clorurati	0.025
Tetracloruro di carbonio	0.003
Pesticidi, bifenili, terfenili	0.0001
Tensioattivi	0.2

da: H.-D. Belitz, W. Grosch, *Food Chemistry*, Springer, Berlin, 1999.

Acque minerali

Le acque minerali provengono da sorgenti incontaminate e vengono imbottigliate alla sorgente. Si suppone che abbiano particolare valore nutrizionale in virtù del loro contenuto di sali minerali. Pertanto, è consentito effettuare solo pochi trattamenti su tali acque, come la separazione di composti ferrosi e solforati, la rimozione o aggiunta di anidride carbonica.

Classificazione delle acque minerali

Descrizione	Requisiti
Oligominerale	Residuo solido < 500 mg/l
Minerale	< 50 mg/l
Ad alto contenuto di minerali	> 1500 mg/l
Cont. bicarbonato	bicarbonato > 600 mg/l
Cont. solfato	solfato > 200 mg/l
Cont. cloro	cloruro > 200 mg/l
Calcica	calcio > 150 mg/l
Magnesiaca	magnesio > 50 mg/l
Cont. fluoro	fluoruro > 1 mg/l
Ferruginosa	ferro(II) > 1 mg/l
Sodica	sodio > 200 mg/l
Per la preparazione di alimenti per l'infanzia	sodio < 20 mg/l, nitrato < 10 mg/l, nitrito < 0.02 mg/l
Iposodica	sodio < 20 mg/l

da: H.-D. Belitz, W. Grosch, *Food Chemistry*, Springer, Berlin, 1999.

Indicatori del processo di lavorazione

Le materie prime usate nella produzione dei generi alimentari subiscono vari processi di manipolazione, trasporto, stoccaggio, conservazione a breve termine, etc. Questa storia di lavorazione risulta cruciale nel determinarne le qualità finali, soprattutto dal punto di vista della "genuinità".

Ad esempio:

- Il latte utilizzato nella produzione di latticini è pastorizzato?
- Il latte utilizzato nella produzione di gelati è fresco o rigenerato?
- La carne o il pesce usato nella produzione dei rispettivi generi alimentari è fresca o congelata?

Risulta quindi importante comprendere i cambiamenti che avvengono durante queste manipolazioni:

- Lo stoccaggio è avvenuto a temperatura ambiente o in *congelamento*?
- Sono stati applicati *processi termici*, come la *pastorizzazione* o la *sterilizzazione*?
- L'alimento è stato sottoposto a *irradiazione* o *fumigazione*?

Trattamento termico

È una delle tecniche più comuni usate nell'industria e nella pratica culinaria, sia per la conservazione dei cibi sia per renderli accettabili per il consumo. Il suo scopo primario è quello di inattivare i microrganismi responsabili del deperimento, in modo da ottenere un alimento sterile, di accettabile durata di conservazione (shelf life) e, per quanto possibile, mantenendone le qualità.

Sterilizzazione

La sterilizzazione è una fase molto importante e delicata nella preparazione di alimenti a base di carne e pollame. L'efficacia di questo trattamento può essere analizzata controllando lo sviluppo di microrganismi (*Bacillus* sp., *Clostridia* sp.). Tuttavia, questo metodo richiede un esame di lunga durata (2-10 giorni), il che lo rende inadatto al controllo di processi in continuo.

Un metodo alternativo è basato sull'attività di alcuni enzimi, che può essere messa in relazione alla presenza di microrganismi. Ad esempio, l'attività dell'enzima *fosfatasi* (determinata usando il sodio *p*-nitrofenil fosfato come substrato) può essere messa in relazione alla quantità di forme microbiche vegetative sopravvissute alla sterilizzazione. Questo saggio viene utilizzato, ad esempio, per verificare la corretta pastorizzazione del latte (o la sua successiva contaminazione).

Il trattamento termico del latte sta alla base di molte delle caratteristiche del prodotto finale. Un sovrariscaldamento provoca perdite di valore nutritivo, nonché la comparsa del sapore "cotto" caratteristico del latte UHT. L'analisi del trattamento subito è basata sulla determinazione del grado di denaturazione delle proteine del siero. Nelle condizioni di "high temperature short time" (HTST: 73 °C, 15 s) si ha una denaturazione della α -lattalbumina (20%), β -lattoglobulina (25%) e albumina del siero bovino (39%), mentre nelle condizioni UHT (135 °C, 6 s) le percentuali di denaturazione sono, rispettivamente, del 46%, 89%, e 100%.

Cibi freschi e congelati

La capacità di distinguere tra questi tipi di lavorazione è considerata molto importante nel caso della carne, del pesce e delle verdure. Il processo di congelamento e scongelamento dei tessuti animali porta alla rottura degli organelli cellulari come mitocondri e lisosomi, provocando il rilascio di enzimi in essi contenuti (citocromo C ossidasi, glutammato-aspartato-amminotrasferasi, succinato-deidrogenasi, aril-solfatasi, β -glucuronidasi, fosfatasi, proteinasi, α -glucosidasi, β -N-acetilglucosamminidasi). L'aumento dell'attività enzimatica nei tessuti può quindi essere messa in relazione al processo di scongelamento. Tuttavia, queste analisi richiedono tecniche specifiche e di lunga esecuzione. Recentemente, è stato dimostrato che il saggio basato sull'enzima HADH (β -idrossiacil-CoA-deidrogenasi) con un metodo colorimetrico riesce a distinguere tra pesci, gamberi e rane freschi o congelati.

Analoghi test, basati sulla β -N-acetilglucosamminidasi sono disponibili per l'esame del pesce con rivelazione a fluorescenza, e possono essere eseguiti semplicemente tramite cartine indicatrici.

Irradiazione degli alimenti

L'irradiazione consiste nell'esporre il materiale a radiazioni ionizzanti (elettroni o raggi γ), allo scopo di

- Inibire il germogliamento
- Ritardare la maturazione della frutta
- Disinfestare da insetti
- Prolungare la durata di conservazione

L'unità di misura della *dose assorbita* è il Gray (Gy; $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1} = 1 \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$), ma è spesso usata l'unità rad ($1 \text{ rad} = 0.01 \text{ Gy}$).

Secondo la FAO/WHO, l'irradiazione con dosi fino a 10 kGy (= 1 Mrad) non provoca alcun rischio tossicologico. Tuttavia, la preoccupazione espressa dai consumatori ha reso indispensabile lo sviluppo di metodi tesi ad individuare, ad esempio, un possibile sovradosaggio.

Una difficoltà intrinseca a questo problema sta nel fatto che i cambiamenti provocati negli alimenti irradiati sono scarsi e spesso identici a quelli indotti da altri trattamenti, come quello termico.

Sono stati comunque sviluppati metodi che danno un'indicazione preliminare dell'avvenuta irradiazione, che può poi essere confermata. Questi sono basati sui danni provocati dalle radiazioni ionizzanti in genere, come danni al DNA, cambiamenti nel pigmento della frutta e nei componenti volatili delle verdure, e variazioni nella flora batterica.

Test basati sulle variazioni nella flora batterica

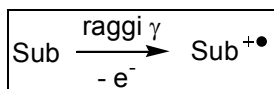
Quest'ultimo metodo è ovviamente basato sul fatto che l'irradiazione viene usata proprio per combattere o eliminare i microrganismi, e pertanto le variazioni nella popolazione microbica possono indicare l'avvenuta irradiazione.

Ad esempio, l'irradiazione del pesce con dosi fino a 5 kGy distrugge completamente *Pseudomonas* sp., mentre *Moraxella* sp. sembra resistere fino a oltre 5 kGy. Anche questo metodo risente della lunga durata di esecuzione.

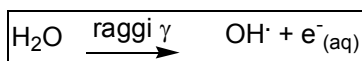
Un metodo molto più semplice e rapido consiste nel misurare il livello di *acidi volatili* e di *azoto basico volatile* prodotti dai batteri (come *Aeromonas hydrophila*) deliberatamente introdotti nell'alimento da esaminare. Il metodo è basato sull'osservazione che l'irradiazione non influenza la crescita di batteri sul materiale irradiato, ma la produzione di queste sostanze volatili viene abbattuta del 40-50% nel materiale irradiato.

Test basati sulla presenza di sostanze derivanti dalla radiolisi

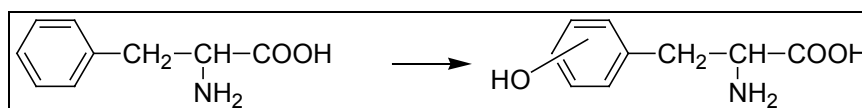
L'irradiazione provoca la formazione di radicali liberi (*radiolisi*); generalmente il processo primario è lo strappo di un elettrone da un substrato neutro, con formazione di un radicale catione.



In soluzione acquosa tipicamente si forma il radicale ossidrile (OH^\bullet), una specie estremamente reattiva.



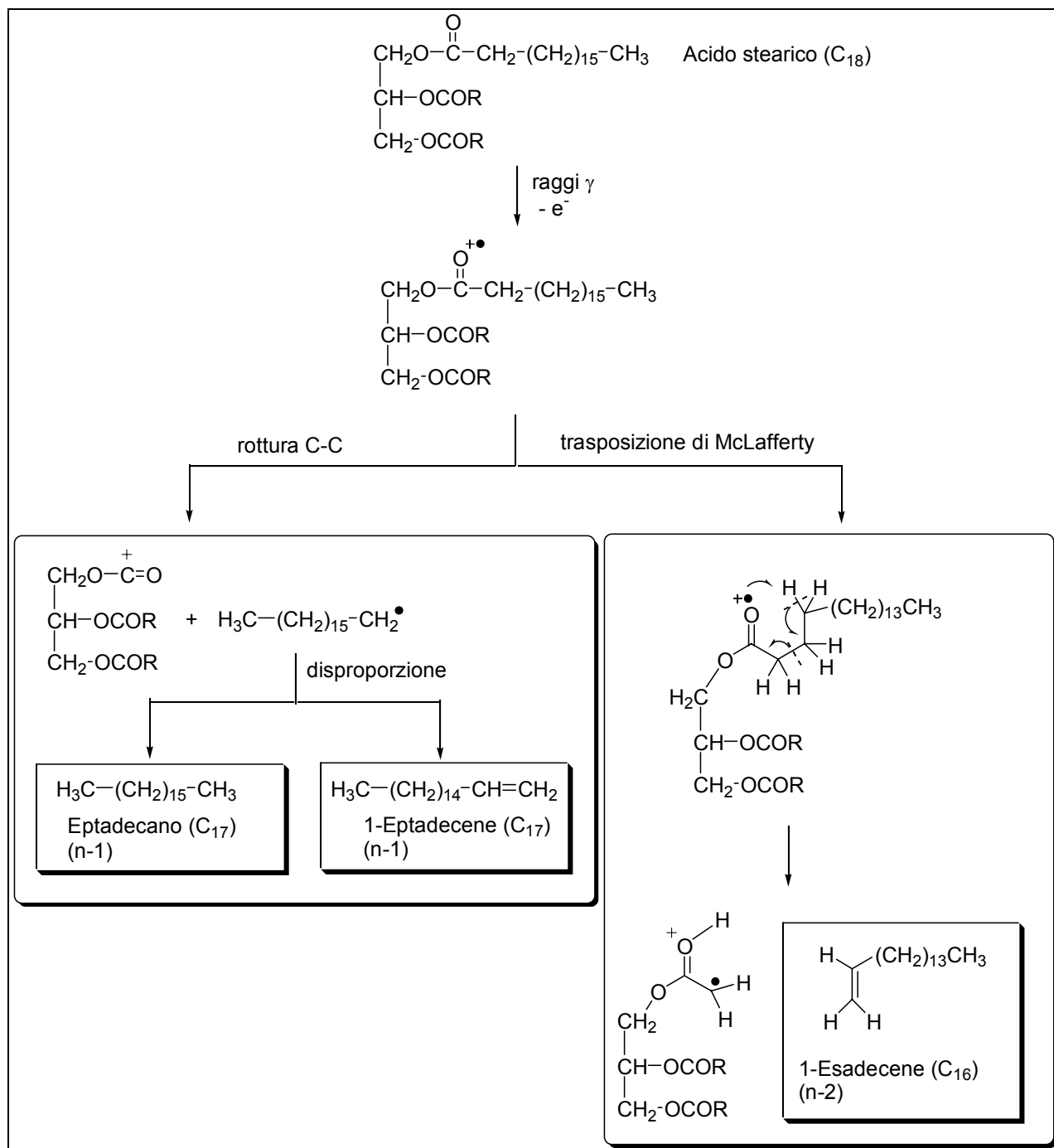
Pertanto, l'irradiazione degli amminoacidi proteici provoca la formazione di prodotti che si possono considerare derivati dall'azione di radicali ossidrile prodotti dalla radiolisi: così, la fenilalanina (proteine che ne contengono) dà origine a prodotti ossidrilati quali *o*-, *m*- e *p*-tirosina.



Il saggio prevede la preventiva rimozione della tirosina libera naturalmente presente nel materiale, e sua successiva idrolisi per liberare la tirosina formata per irradiazione, che viene poi rivelata tramite HPLC. L'attendibilità di questo saggio è però diminuita dal fatto che la *o*-tirosina si ritrova anche nella carne non irradiata, e si può formare anche per *fotolisi* (reazione chimica susseguente all'irradiazione con radiazioni non ionizzanti, quali l'UV).

Quindi, è probabile che l'avvenuta irradiazione non possa essere rivelata da un solo saggio, ma piuttosto da un "profilo" complesso, che tenga conto dei risultati provenienti da varie metodiche.

L'irradiazione dei lipidi provoca cambiamenti trascurabili nel profilo di composizione in acidi grassi, esteri e triacilgliceroli. Per contro, l'irradiazione dei fosfolipidi in sospensione acquosa porta alla formazione di vari prodotti, che però si riscontrano anche nei lipidi non irradiati. Invece, la presenza di idrocarburi può essere messa in relazione con la radiolisi: infatti la radiolisi degli acidi grassi comporta la formazione di idrocarburi con un atomo di carbonio in meno, oppure con due atomi di carbonio in meno ed un doppio legame in più rispetto all'acido grasso di partenza. Se consideriamo, ad esempio, un lipide contenente un residuo derivante dall'acido stearico (C_{18}), la radiolisi porterà alla formazione del relativo radicale catione, da cui si possono formare: (a) l'eptadecano e l'1-eptadecene (C_{17}) per rottura del legame C-C estereo e successiva disproporzione del radicale alchilico così formato; oppure (b) l'1-esadecene (C_{16}) per riarrangiamento (trasposizione di McLafferty).



È di particolare importanza il fatto che gli idrocarburi formati per radiolisi non sono presenti negli alimenti non irradiati.

Analogamente, la formazione di 2-alcil-ciclobutanoni con lo stesso numero di atomi di carbonio è stata proposta come marcatore dell'irradiazione, dato che questi composti non si formano in assenza di irradiazione, nemmeno in carni decomposte per azione microbica, né per trattamento termico.



L'esposizione del DNA alle radiazioni ionizzanti dà luogo a rotture di singolo e doppio strand, lesioni nelle basi puriniche e pirimidiniche, rottura nella catena zuccherina, e a reticolazione DNA-DNA e DNA-proteine. Il glicole timinico (5,6-diidrossidiidrotimina) è uno dei prodotti principali del danno alle basi del DNA, e la sua presenza potrebbe essere utilizzata a scopi analitici. Il problema principale è legato al fatto che simili cambiamenti possono essere indotti da altri trattamenti (come il congelamento), per cui queste prove non hanno molto significato se non in presenza di materiale di controllo.

Infine, ricordiamo che la radiolisi dà come prodotto primario vari radicali liberi, che in linea di principio potrebbero essere presi come indicatori dell'irradiazione. Tuttavia, come appena visto, la maggior parte di questi radicali ha vita troppo breve per poter essere rivelato come tale (ed infatti vengono ricercati i prodotti di queste reazioni). Una eccezione è però costituita dagli alimenti con un contenuto di acqua relativamente basso, come le ossa, la frutta secca, le conchiglie, i gusci d'uovo e le spezie. In tali casi, i radicali vengono intrappolati nel reticolo cristallino e possono essere rivelati tramite la spettroscopia EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*; detta anche ESR, *Electron Spin Resonance*).^{*} La tecnica è principalmente applicata alle ossa; sebbene il campo di applicazione sia limitato, è importante perché il tipo di spettro EPR che si ottiene è caratteristico degli alimenti irradiati, e non si riscontra nei materiali non irradiati, comunque trattati.

^{*} La spettroscopia EPR è analoga all'NMR, ma sfrutta l'interazione tra la radiazione elettromagnetica e lo spin elettronico anziché lo spin nucleare. Pertanto, è applicabile solo a specie dotate di un momento angolare di spin diverso da zero, tipicamente quelle con elettroni spaiati come i radicali liberi (paramagnetiche). Lo spettro viene eseguito ponendo il campione in un campo magnetico (analogamente all'NMR), e osservando la risonanza in seguito all'irradiazione con microonde. Lo spettro risultante deriva anche dall'interazione con gli spin nucleari circostanti (analogamente all'accoppiamento scalare), e spesso dà luogo ad un "pattern" riconoscibile.

Metodi isotopici nell'analisi degli alimenti

L'idrogeno e il carbonio presenti nelle sostanze naturali (ad es. glucosio, etanolo, lipidi) sono presenti in gran parte sotto forma degli isotopi ^1H (99.98%) e ^{12}C (98.9%). Il restante è costituito da isotopi rari, cioè il deuterio (^2H o D, 0.01%) ed il carbonio-13 (^{13}C , 1.1%). (Sono presenti anche piccolissime quantità dell'isotopo radioattivo ^{14}C formate dai raggi cosmici nell'atmosfera e, più recentemente, dalle esplosioni nucleari).

L'importanza dei metodi isotopici, riconosciuta e sfruttata solo di recente, deriva dal fatto che i rapporti appena visti sono dei valori medi, ma i vari siti delle molecole da cui provengono ne contengono in quantità diversa a seconda di

- località geografica di coltivazione o crescita
- metabolismo dell'organismo → *isotopomeri*

Esempio: **etanolo** ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$)

La molecola dell'etanolo ha tre tipi di atomi di idrogeno, quelli metilici ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$), metilenici ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) e ossidrilici ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) e due tipi di atomi di carbonio (metilico, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ e metilenico, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$).

Data la scarsa abbondanza naturale, la probabilità di avere più di un deuterio o un ^{13}C per molecola è trascurabile (0.000001% e 0.01% per ^2H e ^{13}C , rispettivamente).

Per il deuterio i tre isotopomeri principali sono

$\text{CH}_3\text{-CDH-OH}$	$\text{CDH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OD}$
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{D} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{D} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{OD} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$

Analogamente per il carbonio: due isotopomeri principali

$^{13}\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	$\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{CH}_2\text{-OH}$
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-^{13}\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-^{13}\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$

I quali, differendo solo per la massa, hanno proprietà chimiche tanto simili da essere difficilmente distinguibili con i normali metodi chimico-fisici → (*effetto isotopo cinetico o di equilibrio*).

Invece, qualunque metodo (tipicamente spettroscopico) in grado di distinguere gli isotopi fra loro può individuare la diversa composizione isotopica, ed eventualmente risalire all'origine (biologica o geografica) della molecola in questione.

Due tali metodi sono attualmente disponibili: la spettrometria di massa e la spettrometria di risonanza magnetica nucleare (NMR). Il primo metodo è basato sul fatto che i vari isotopomeri hanno masse sia pure di poco diverse, e quindi si può, ad esempio, risalire al rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

Alternativamente, si può sfruttare il fatto che i nuclidi ^1H e ^2H danno segnali distinti all'NMR. Eseguendo uno spettro NMR del deuterio si può quindi conoscere il rapporto tra il contenuto in deuterio dei vari siti.

Metodi isotopici basati sul rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^2\text{H}/^1\text{H}$

Come è noto, la fotosintesi utilizza la CO_2 atmosferica per la sintesi di composti organici. Nell'atmosfera la CO_2 è presente nei due isotopomeri $^{12}\text{CO}_2$ e $^{13}\text{CO}_2$. A causa dell'effetto isotopico cinetico, essi reagiscono con velocità leggermente diverse: generalmente, l'isotopo più pesante dà reazioni più lente, per cui i prodotti sono arricchiti nell'isotopo leggero ed impoveriti nell'isotopo pesante (*frazionamento isotopico*). L'entità di questo arricchimento dipende strettamente dal meccanismo della reazione.

Ne consegue che la distribuzione isotopica di una certa molecola devia dalla media, misurata rispetto ad uno standard internazionale secondo l'espressione

$$R = \frac{c_{\text{pesante}}}{c_{\text{leggero}}}; \delta = \frac{R_{\text{campione}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \times 1000$$

$$R_{\text{campione}} = R_{\text{standard}} \left(1 + \frac{\delta}{1000} \right)$$

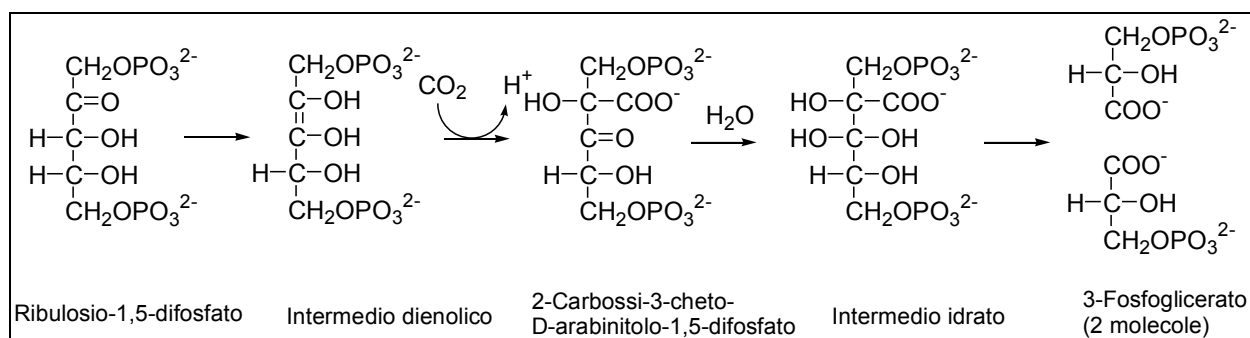
$R = 0.0112372$ per $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Standard: PDB (CaCO_3 , dalla Pee Dee Belemnite, South Carolina)

$R = 0.00015576$ per $^2\text{H}/^1\text{H}$. Standard: SMOW (Standard Mean Ocean Water).

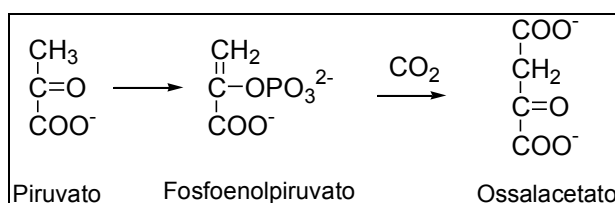
Il valore di $\delta(^{13}\text{C})$ per la CO_2 atmosferica è pari a -8 ± 1 ‰, e diminuisce in seguito alla fissazione fotosintetica in funzione del tipo di fotosintesi della pianta, per cui i valori di δ sono negativi. Un ulteriore impoverimento in ^{13}C si ha durante le successive reazioni metaboliche.

Le reazioni fotosintetiche che non richiedono la luce (dark reactions) possono avere due decorsi differenti.

Nelle piante di tipo C_3 la riduzione della CO_2 dà il 3-fosfoglicerato (gliceraldeide-3-fosfato; contenente 3 atomi di carbonio, da cui il nome) tramite la D-ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi, il quale entra nel ciclo di Calvin.



Le piante tipo C_4 danno, per riduzione della CO_2 tramite la fosfoenolpiruvato carbossilasi, l'ossalacetato (con 4 atomi di carbonio), che entra nel metabolismo tipo Hatch-Slack.



Vi sono poi piante di tipo CAM (Crassulacean acid metabolism) che effettuano un metabolismo C₃ o C₄ secondo le condizioni ambientali.

Gli zuccheri formati da piante C₄ contengono più ¹³C che non dalle piante C₃; ovviamente le piante CAM hanno un contenuto intermedio.

Origine	Accettore CO ₂	δ(¹³ C) (‰)	Sorgenti
CO ₂ atmosferica	-	-8 ± 1	-
Derivati del petrolio	-	ca. -27	-
Piante C ₃ (→ fosfoglicerato)	D-Ribulosio-1,5-bisfosfato	da -32 a -24	frumento, riso, segale, patata, orzo, arancio, barbabietola, vite girasole, soia, palma, cocco, arachide
Piante C ₄ (→ acido ossalacetico)	Fosfoenolpiruvato	da -16 a -10	mais, miglio, canna da zucchero
Piante CAM	misto	da -30 a -12	ananas, vaniglia, cactacee, agave

Un'applicazione analoga può essere concepita utilizzando l'isotopo radioattivo ¹⁴C, il cui tempo di dimezzamento ($\tau_{1/2} = 5730$ anni) è sufficientemente breve da far sì che i derivati del petrolio non ne contengano più in misura apprezzabile. Viceversa, gli organismi vegetali viventi, che utilizzano la CO₂ atmosferica per la fotosintesi, danno luogo a sostanze organiche contenenti ¹⁴C, che quindi risultano debolmente radioattive. La misura offre potenzialmente il vantaggio di un'altissima sensibilità, ma è complicata dal contenuto variabile di ¹⁴C nell'atmosfera a causa delle esplosioni nucleari degli ultimi decenni.

Analoghe considerazioni valgono per altri elementi presenti in natura in più forme isotopiche, come ¹⁸O/¹⁶O, ¹⁵N/¹⁴N, ³⁴S/³²S.

Per quanto riguarda l'idrogeno, vi è un forte effetto isotopo dovuto alla grande differenza di massa (un fattore 2) tra ¹H e ²H (D). I tre isotopomeri dell'acqua (H₂O, HDO, D₂O) hanno proprietà chimico-fisiche differenti (il punto di ebollizione della D₂O è 101.4 °C). Durante in ciclo dell'acqua, nell'evaporazione la concentrazione di deuterio diminuisce, per cui l'acqua di superficie e piovana contiene meno deuterio degli oceani. L'arricchimento in deuterio degli oceani è massimo all'equatore (dove la temperatura è maggiore) e diminuisce all'aumentare della latitudine.

L'idrogeno utilizzato dalle piante usate come alimento proviene dalle precipitazioni e dall'acqua di superficie in un dato luogo di crescita. Pertanto, i valori di δ(²H) dei prodotti derivanti da piante sono negativi, e anche piante dallo stesso tipo di fotosintesi, ma coltivate in luoghi diversi, possono differire nel valore di δ(²H).

I valori di δ(²H) sono molto maggiori dei corrispondenti δ(¹³C) perché l'effetto isotopo è molto maggiore (a causa della forte differenza di massa). Normalmente il contenuto di deuterio viene espresso tramite il valore di *R* piuttosto che δ.

È quindi evidente che i metodi isotopici possono fornire un mezzo nuovo e potente per l'analisi degli alimenti. In aggiunta ai metodi analitici "classici", che normalmente rivelano alterazioni nella composizione chimica qualitativa e quantitativa, l'analisi isotopica permette di rivelare differenze tra isotopomeri, cioè sostanze aventi la stessa struttura chimica e presenti nella stessa quantità.

Analisi tramite spettrometria di massa

Le tecniche basate sulla spettrometria di massa vengono chiamate *IRMS* (*Isotope Ratio Mass Spectrometry*). È necessaria alta risoluzione, dato che si vanno ad osservare piccole differenze di massa. L'analisi può essere effettuata per pirolisi (py-IRMS):

- Il materiale viene sottoposto a combustione catalitica → CO₂ + H₂O + N₂

- Riduzione catalitica $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2$
- Determinazione del rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^2\text{H}/^1\text{H}$
 oppure direttamente su frazioni cromatografiche (GC-IRMS).

Analisi tramite spettroscopia NMR

La tecnica è basata principalmente sul rapporto $^2\text{H}/^1\text{H}$, a causa della scarsa sensibilità del ^{13}C all'NMR. Rispetto ai metodi MS, l'NMR offre comunque il vantaggio di fornire indicazioni strutturali molto dettagliate. Infatti, le complesse molecole organiche contengono molti atomi di idrogeno chimicamente non equivalenti fra loro (siti), che danno luogo a differenti segnali NMR (sia ^1H che ^2H). Il contenuto di deuterio di ciascun sito non è casuale, ma risulta specifico per l'origine biologica e perfino geografica della molecola, per cui l'insieme di queste informazioni costituisce una "impronta digitale". Questa molteplicità di informazioni rende molto difficile (cioè economicamente non conveniente) l'adulterazione. La tecnica nel suo complesso prende il nome di *SNIF-NMR* (*Site-specific Natural Isotope Fractionation NMR*). È un metodo ufficialmente adottato dall'Unione Europea.

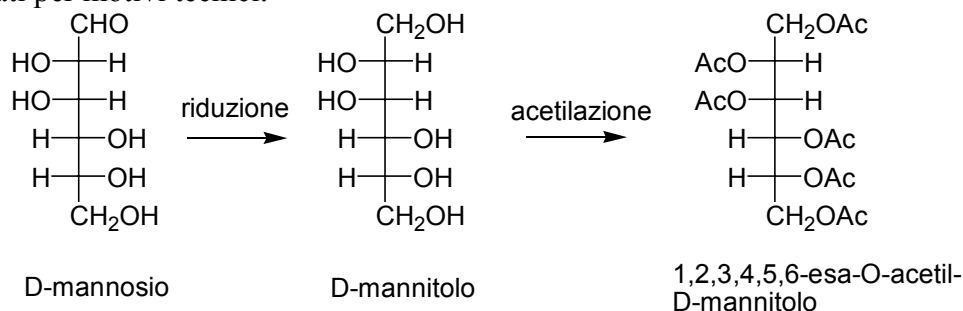
Come suggerito da queste considerazioni, i metodi isotopici possono essere messi a frutto in due aree della chimica degli alimenti:

1. La rivelazione di componenti provenienti da fonti biologiche diverse da quelle dell'alimento originale
2. La rivelazione della provenienza geografica dell'organismo, con ovvie conseguenze relative alla certificazione di origine.

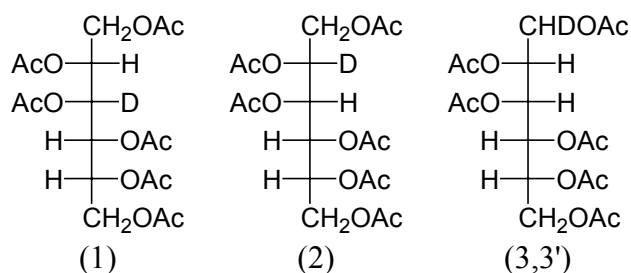
Esempi

Distinzione di carboidrati di varia origine biologica tramite NMR del deuterio

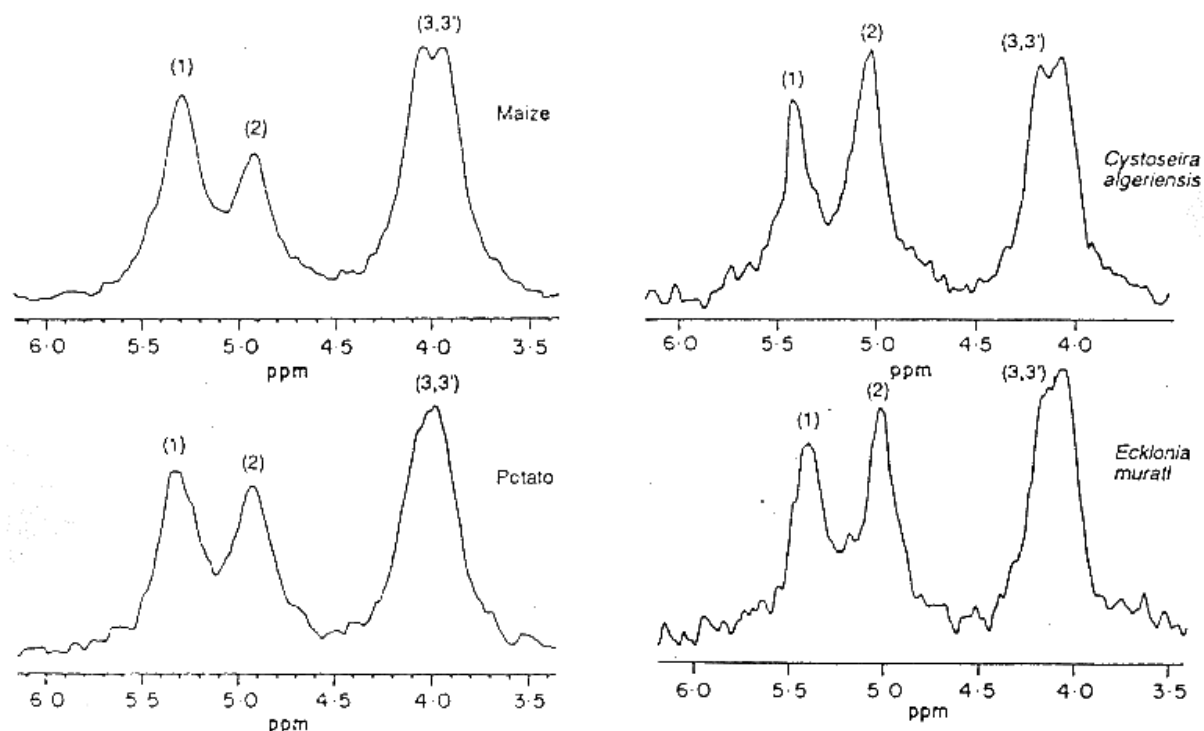
Un esempio di carattere generale è dato dal contenuto di deuterio del mannitolo ottenuto per idrogenazione del glucosio derivante da diverse fonti biologiche: amido di mais, amido di patata, o estratto da due specie diverse di alghe. Gli spettri ^2H sono stati ottenuti sui derivati peracetilati per motivi tecnici.



Gli isotopomeri deuterati sono alle posizioni 2,3 (1,2) oppure 1,6 (3,3').



La figura qui sotto mostra la diversa altezza dei segnali marcati con (1) e (2) nei quattro casi considerati.



Spettri NMR ^2H in abbondanza naturale di 1,2,3,4,5,6-esa-O-acetilmannitolo preparato per idrogenazione del glucosio. Dall'alto in basso e da sinistra a destra: (a) amido di mais; (b) amido di patata; (c) estratto dall'alga *Cystoseira algeriensis*; (d) estratto dall'alga *Ecklonia murati*.
 da: Martin, Martin, Zhang, Site-Specific Isotope Fractionation of Hydrogen in Plant Products Studied by Nuclear Magnetic Resonance, *Plant, Cell and Env.* **1992**, 15, 1037.

Adulterazione del succo di arancia con zucchero di altra origine

L'analisi isotopica permette di distinguere la differente origine biologica dello zucchero sfruttando il diverso metabolismo dell'arancio (C_3) dalla canna da zucchero o del mais (C_4). Nel caso della canna da zucchero e del mais, l'adulterazione può essere rivelata dalla diminuzione di $\delta(^{13}\text{C})$, mentre nel caso della barbabietola (C_3) si ricorre al valore di $\delta(^2\text{H})$. Quest'ultimo può essere sfruttato anche per rivelare additivi sintetici derivati dal petrolio (vedi vanillina).

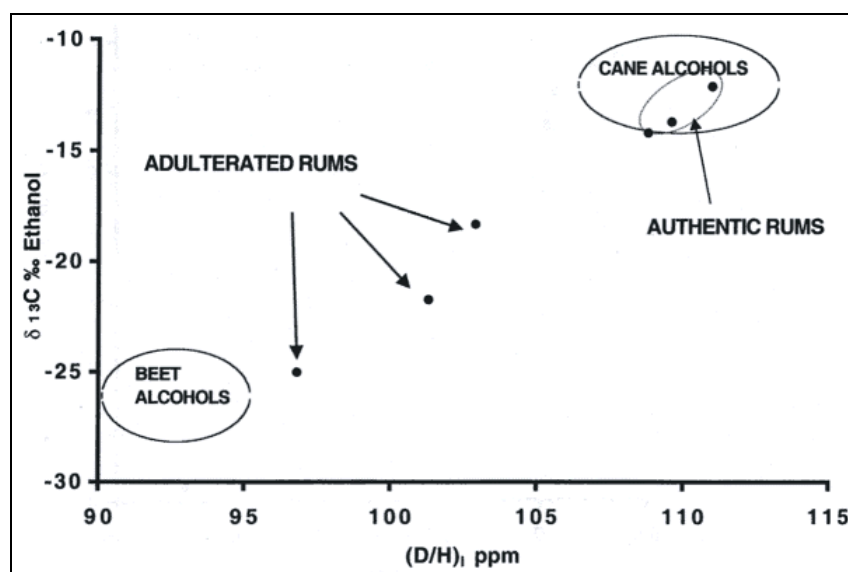
Alimento	$\delta(^{13}\text{C})$ (‰)	$\delta(^2\text{H})$ (‰)
Succo d'arancia liofilizzato (pianta C_3)	-25.6	-
Saccarosio da succo d'arancia	-25.5	-22
Zucchero di barbabietola (pianta C_3)	-25.6	-135
Zucchero di canna (pianta C_4)	-11.5	-50
Sciroppo glucosio-fruttosio di mais (pianta C_4)	-10.8	-31

Zuccheri estranei nel vino e bevande alcoliche

L'aggiunta di zucchero al vino è volta ad aumentarne artificialmente il grado alcolico, consiste nell'aggiungere zucchero estraneo prima o durante la fermentazione. Nell'Unione Europea questa pratica è regolamentata (EC Regulation n. 822/87, *Off. J. Eur. Commun.* **L84**, 27/03/87).

In seguito alla fermentazione, lo zucchero viene trasformato in etanolo. Mentre, come appena visto, l'aggiunta di zucchero di canna viene facilmente rivelata dal $\delta(^{13}\text{C})$ nell'etanolo risultante, l'aggiunta di zucchero di barbabietola non può essere rivelata in questo modo. Si ricorre pertanto all'analisi SNIF-NMR del deuterio contenuto nei due siti non equivalenti dell'etanolo (vedi sopra). Il rapporto tra il contenuto di deuterio del gruppo metilico (R_I) e metilenico (R_{II}) è molto diverso per lo zucchero d'uva e di barbabietola. Più specificamente, R_I dipende principalmente dal contenuto di deuterio dello zucchero, mentre R_{II} contiene informazioni circa il processo di fermentazione.

Risulta quindi possibile determinare l'origine botanica di vari prodotti alcolici. Il rum e la tequila (da piante C_4 e CAM) hanno alti valori di R_I e $\delta(^{13}\text{C})$, mentre i rapporti sono minori per liquori derivati da piante C_3 (prugno, ciliegio, melo, patata).



Controllo dell'autenticità del rum per analisi isotopica. Ascissa: $(D/H)_I = R_I =$ rapporto $^2\text{H}/^1\text{H}$ per il gruppo metilico dell'etanolo.

da: C. Guillou, F. Reniero, Isotopic methods for the control of food products and beverages, *Techn. Doc. IAEA*, in corso di stampa.

Analogamente, si può rivelare la presenza di alcool derivato dal mais (C_4) assieme ad alcool da malto d'orzo (C_3) nel whisky.

L'utilità di queste tecniche risulta particolarmente evidente se queste adulterazioni vengono effettuate con etanolo purissimo, quindi privato dei componenti tipici dell'origine botanica (che possono essere rilevati tramite GC). Analogamente, l'aggiunta di etanolo di sintesi (dal petrolio) viene evidenziata dal suo alto contenuto di deuterio.

Simili considerazioni valgono per l'aceto. La relazione esistente tra $\delta(^{13}\text{C})$ e $\delta(^2\text{H})$ permette di "separare" in due zone distinte l'aceto naturale da quello di sintesi.

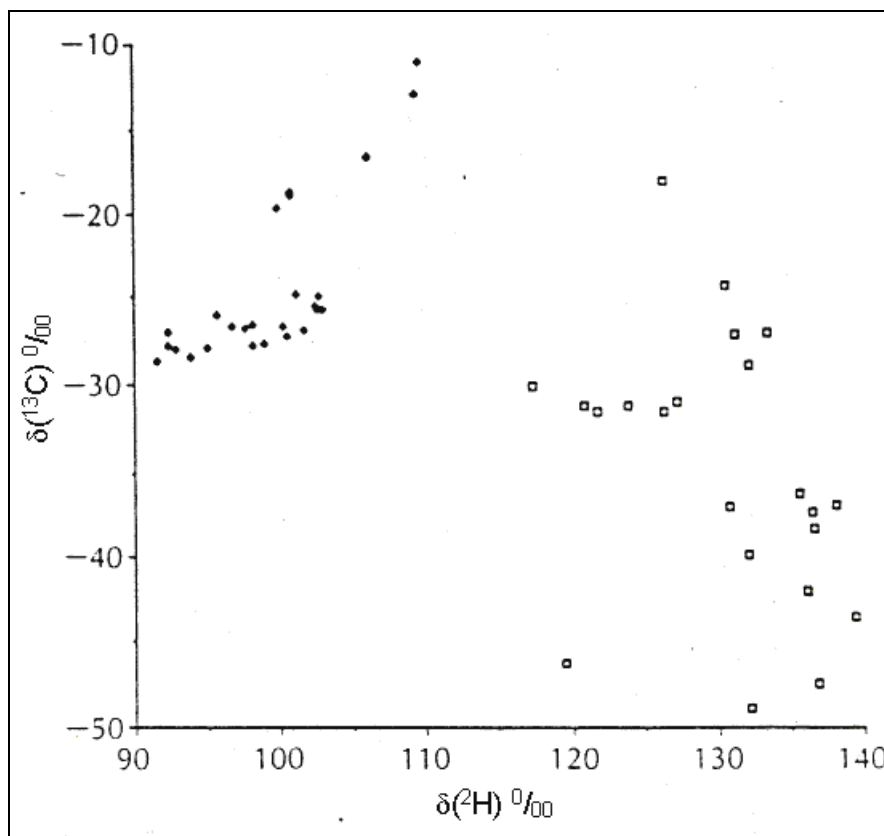


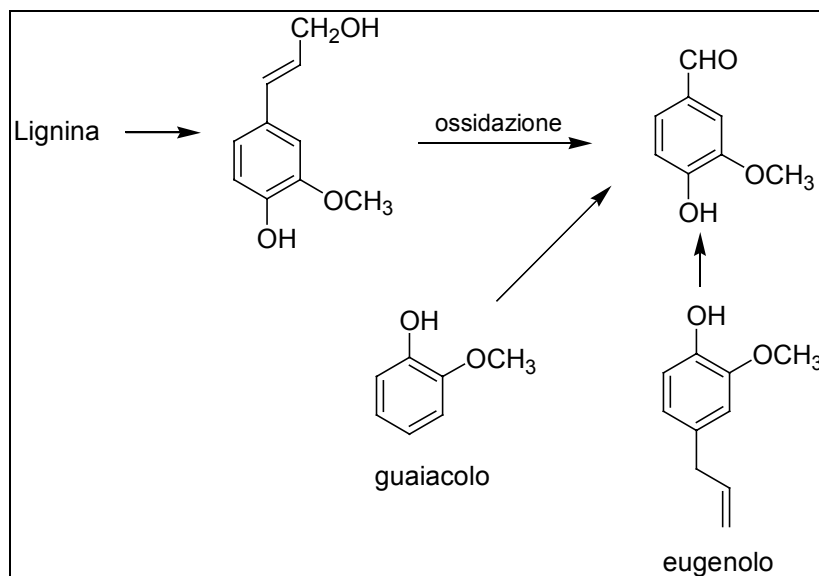
Grafico di $\delta(^{13}\text{C})$ contro $\delta(^2\text{H})$ (gruppo metilico) dell'acido acetico, per aceti naturali (◆) e sintetici (□).
da: C. Guillou, G. Remaud, G. J. Martin, *Trends Food Sci. Technol.* **1991**, 85.

Sciropo glucosio/fruttosio nel miele

Come visto in precedenza, l'adulterazione del miele con *high fructose corn syrup* (HFCS) è molto difficile da rivelare a causa della composizione molto simile a quella del miele autentico. Dato che praticamente tutte le piante da nettare sono di tipo C_3 , è possibile distinguere gli zuccheri così prodotti dall'HFCS, che deriva dal mais (C_4) e ha pertanto un contenuto di ^{13}C ($\delta(^{13}\text{C}) = -10$ ‰) maggiore che non il miele ($\delta(^{13}\text{C})$ tra -23 e -28 ‰). Tuttavia, una seria interferenza è data dal fatto che il miele di agrumi ha valori di $\delta(^{13}\text{C})$ sensibilmente più alti. Inoltre, se l'HFCS viene prodotto da amido di patate (C_3) il saggio non ha valore.

Aromi naturali e sintetici

Come già accennato, la vanillina (3-metossi-4-idrossibenzaldeide) è uno degli aromi più usati nell'industria alimentare. L'aroma che può essere legalmente designato come "naturale" è solo quello estratto dai baccelli della pianta di vaniglia. Esistono però altri due metodi per sintetizzare la vanillina: uno emisintetico per idrolisi alcalina della lignina, con l'alcool coniferilico come intermedio, oppure per sintesi dall'eugenolo o dal guaiacolo.



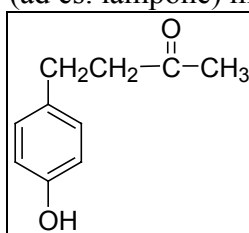
La vaniglia è una pianta di tipo CAM, e come tale ha un contenuto di ¹³C relativamente alto ($\delta(^{13}\text{C})$ circa -20‰ , $R = 1.101\%$), mentre le altre fonti hanno valori più bassi ($< -26\text{‰}$, $R < 1.094\%$). L'intervallo è specifico per ciascun sito:

Origine	R% (CHO)	R% (C anello)	R% (OCH ₃)
Vaniglia	1.074	1.113	1.061
Lignina	1.062	1.102	1.066

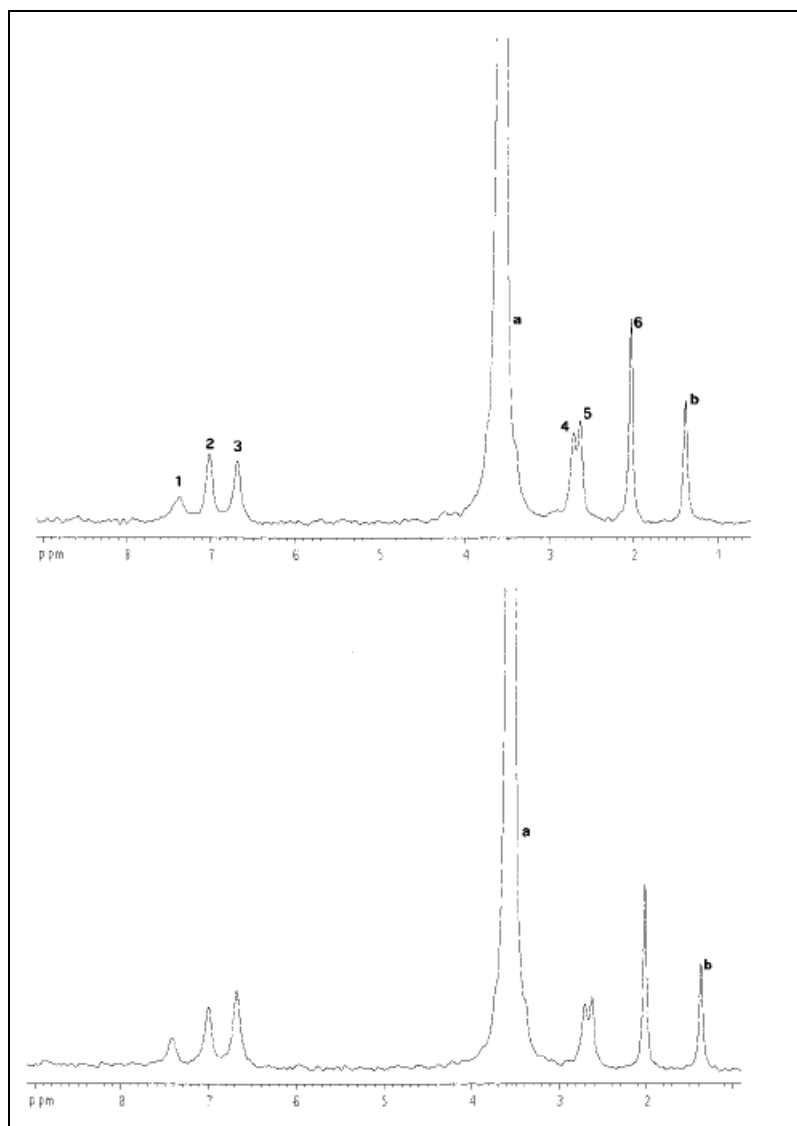
Questo metodo ha funzionato finché non è stata introdotta sul mercato vanillina sintetica leggermente arricchita in ¹³C (ai gruppi metossilico e carbonilico) in modo tale da mimare il contenuto naturale. Integrando i dati ¹³C con quelli relativi a ²H, è possibile smascherare anche questa frode. Infatti, anche il rapporto D/H è specifico per ciascun idrogeno distinto nella molecola (ve ne sono 5); l'arricchimento selettivo in deuterio risulta così costoso da non giustificare più la frode.

Aroma di lampone: il "raspberry ketone"

Un aroma dalla soglia molto bassa (5 µg/kg) è il 1-(p-idrossifenil)-3-butanone (*raspberry ketone*), molto diffuso in varie piante (ad es. lampone) ma sempre in quantità molto basse.



Anche in questo caso esistono numerosi metodi di sintesi per la sua preparazione. Ciò nonostante, il derivato naturale conferisce un elevato valore aggiunto all'alimento (e ne aumenta di molto il prezzo). Pertanto, è necessario controllare la provenienza dell'aroma. Alcuni metodi di sintesi, di natura simili al processo biologico, danno valori di $\delta(^{13}\text{C})$ molto simili a quello naturale. La spettroscopia NMR del deuterio permette di rivelare l'eventuale adulterazione analizzando le intensità relative dei segnali dell'idrogeno in posizione orto (2) e in meta (3) rispetto al gruppo ossidrilico. Per la sostanza non naturale, si ha $R_2 > R_3$, e ovviamente l'inverso per quella naturale.

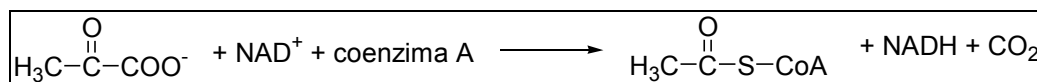


Spettro NMR ^2H del raspberry ketone di origine sintetica (in alto) e naturale (in basso). Si nota il diverso rapporto tra i segnali 1 (OH), 2 (H-2) e 3 (H-3).

da: G. Fronza, C. Fuganti, C. Guillou, F. Reniero, D. Joulain, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 248.

Oli e grassi

Anche i lipidi posseggono un basso rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, che trae origine dal frazionamento isotopico durante l'ossidazione del piruvato ad acetil coenzima A.



È stato dimostrato che esiste una grande differenza di contenuto isotopico tra gli atomi di carbonio metilico e carbonilico dell'acetil CoA e quindi dei lipidi da esso derivati. I valori di $\delta(^{13}\text{C})$ degli oli derivati da piante C_3 cadono nell'intervallo tipico (da -25 a -28 ‰). Pertanto, l'olio di mais (C_4) viene facilmente rivelato dal suo valore più basso. Studi recenti sembrano indicare come possibile l'identificazione della provenienza geografica dell'olio di oliva sulla base di rapporti isotopici.