

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
INGEGNERIA AGRARIA

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 07/C1 – INGEGNERIA AGRARIA, FORESTALE E  
DEI BIOSISTEMI

Settore Scientifico disciplinare: AGR/09 – MECCANICA AGRARIA

TITOLO TESI

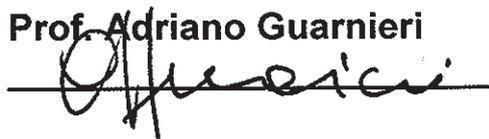
**Valutazione della qualità ed autenticità di prodotti oleari  
e lattiero caseari mediante metodi fisici di analisi  
accoppiati a tecniche statistiche multivariate**

Presentata da: Dr. Lorenzo Cerretani



Coordinatore Dottorato

Prof. Adriano Guarnieri



Relatori

Prof. Angelo Fabbri



Dr. Luigi Ragni



Esame finale anno 2013

**VERBALE DEL COLLEGIO DOCENTI  
DOTTORATO IN INGEGNERIA AGRARIA**

Il giorno 07.03.2013 alle ore 19.00 in una sala del Dipartimento di Economia e Ingegneria Agrarie dell'Università di Bologna, si riunisce il Collegio dei Docenti del Dottorato in Ingegneria Agraria.

Risultano presenti: Adriano Guarnieri, Patrizia Tassinari, Marco Bentini, Giuseppe Taglioli, Giorgio Ade, Fabio Pezzi, Giovanni Molari, Angelo Fabbri, Paolo Zappavigna, Luigi Ragni, Donatella Pavanelli, Paolo Liberati, Daniele Torreggiani, Stefano Benni

Risultano assenti giustificati: Valda Rondelli, Antonio Checchi, Claudio Caprara.

Presiede la seduta il: prof. ing. Adriano Guarnieri

Segretario del collegio: prof. ing. Giovanni Molari

**ORDINE DEL GIORNO**

1. Comunicazioni
2. Presentazione dottorandi XXV da allegare alla tesi
3. Varie

.....OMISSIS.....

**2) Presentazione dottorandi XXV Ciclo da allegare alla tesi**

Il Collegio è chiamato a redigere, per ciascun allievo, la "presentazione" da allegare alla tesi finale.

Si invitano, a tal fine, i componenti del Collegio, che prevalentemente hanno guidato le attività di ricerca dei dottorandi a voler illustrare i contenuti delle predette tesi ed i risultati conseguiti dagli allievi.

Dopo ampia discussione, il Collegio dei Docenti decide, unanime, di approvare le "presentazioni" di seguito riportate che illustrano la personalità di ciascun dottorando e l'attività scientifico - formativa svolta durante il corso, mettendone in luce gli aspetti positivi o, eventualmente, negativi.

**Dott. Lorenzo Cerretani**

**Curriculum seguito: Macchine e impianti per i prodotti agricoli**

**Titolo tesi: Valutazione della qualità ed autenticità di prodotti oleari e lattiero caseari mediante metodi fisici di analisi accoppiati a tecniche statistiche multivariate**

Il dott. Lorenzo Cerretani, nel periodo di attività del dottorato, ha partecipato con interesse alle attività formative inerenti il proprio ambito di ricerca. Ha svolto una fruttuosa attività di ricerca nell'ambito della valutazione qualitativa e di genuinità attraverso metodi di analisi fisici accoppiati all'analisi statistica multivariata. In questo tema il dott. Cerretani ha concentrato la sua attività di ricerca su due matrici alimentari, ovvero quella olearia e quella lattiero-casearia. Il dott. Cerretani ha collaborato inoltre alla messa a punto di un sistema fisico (atmospheric plasma generated by a resistive barrier discharge device) per la deodorazione di oli. Il dott. Cerretani ha partecipato a diversi convegni nazionali ed internazionali ed ha collaborato allo sviluppo di pubblicazioni su riviste internazionali con IF nell'ambito delle tematiche indicate. Ha inoltre svolto attività di referee per diverse riviste internazionali con IF. Visto il percorso formativo svolto, il collegio dei docenti esprime unanime il parere favorevole all'attribuzione del titolo di Dottore di Ricerca per il dott. Lorenzo Cerretani

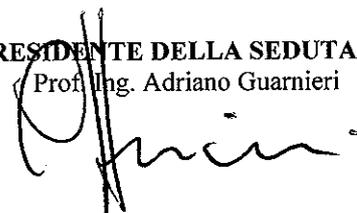
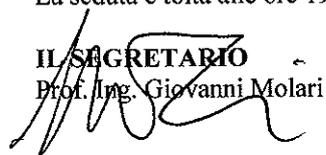
.....OMISSIS.....

Le deliberazioni assunte in questa seduta, sono redatte, lette e sottoscritte seduta stante.

La seduta è tolta alle ore 19.45.

**IL SEGRETARIO**  
Prof. Ing. Giovanni Molari

**IL PRESIDENTE DELLA SEDUTA**  
Prof. Ing. Adriano Guarnieri





## **Ringraziamenti**

Ringrazio sinceramente le persone che mi hanno permesso di svolgere questo lavoro di tesi. Infatti, la presente tesi di dottorato raccoglie i risultati delle ricerche condotte in collaborazione con i diversi gruppi di ricerca con cui ho lavorato in questi tre anni.

A questo punto devo ringraziare le persone che hanno permesso la realizzazione di questo lavoro il Prof. Adriano Guarnieri, il Prof. Angelo Fabbri ed il Dr. Luigi Ragni.

Considerando, quindi il contributo di tutti a questo lavoro, vanno sicuramente ringraziati i colleghi e gli amici con cui ho collaborato e che rappresentano i co-autori dei lavori di ricerca che sono stati pubblicati: C. Barnaba, A. Bendini, M.F. Caboni, E. Casiraghi, C. Cevoli, E. Chiavaro, A. Cichelli, A. Fabbri, T. Gallina Toschi, A. Giuliani, A.M. Gómez-Caravaca, A. Gori, G. Lercker, M.J. Lerma-García, R. Lusardi, R.M. Maggio, M. Nocetti, M. Paciulli, G. Ramis-Ramos, M. Rinaldi, P. Rocculi, S. Romani, E.F. Simó-Alfonso, E. Valli, S. Vecchio, V. Verardo.

Infine, ma non per ultimo un ringraziamento speciale va a tutta la mia famiglia ed in particolare a Manuela ed alla mia piccola Silvia.

## 1. Sommario

Oggi si usa sempre più spesso il suffisso omico per designare l'applicazione in diversi campi scientifici dell'approccio fruttuoso della metabolomica. La metabolomica è lo studio sistematico delle uniche tracce chimiche lasciate da specifici processi metabolici. Il primo vero lavoro scientifico che ha visto l'applicazione della metabolomica risale al 1971 (Pauling, Robinson, Teranishi, Cary, 1971). L'idea concepita da Pauling e collaboratori era che i dati ricchi di informazioni che riflettono lo stato funzionale di un sistema biologico complesso risiede nel modello quantitativo e qualitativo dei metaboliti nei fluidi corporei. Vent'anni dopo questo approccio fu ampiamente applicato per via della più diffusa disponibilità degli strumenti necessari a analizzare tali informazioni. Sicuramente il successo delle scienze omiche è stato favorito dalla disponibilità di strumenti statistici più rapidi e di più facile utilizzo. Partendo da queste premesse ed utilizzando strumenti analitici diversi da quelli utilizzati normalmente nelle scienze omiche (tecniche separative e spettrometriche e risonanza magnetica nucleare) in questo lavoro di tesi sono stati combinati metodi fisici di analisi accoppiati a tecniche statistiche multivariate per valutare tanto la qualità così come l'autenticità di alcuni prodotti alimentari (in particolare prodotti oleari e lattiero caseari).

L'applicazione di strumenti fisici permette di abbattere i costi ed i tempi necessari per le analisi classiche ed allo stesso tempo può fornire un insieme diverso di informazioni che possono riguardare tanto la qualità come l'autenticità di prodotti.

Per il buon funzionamento di tali metodi è necessaria la costruzione di modelli statistici robusti che utilizzino set di dati correttamente raccolti e rappresentativi del campo di applicazione.

In questo lavoro di tesi sono stati analizzati oli vegetali e alcune tipologie di formaggi (in particolare pecorini per due lavori di ricerca e Parmigiano-Reggiano per un altro).

Sono stati utilizzati diversi strumenti di analisi (metodi fisici), in particolare la spettroscopia, l'analisi termica differenziale, il naso elettronico, oltre a metodiche separative tradizionali.

I dati ottenuti dalle analisi sono stati trattati mediante diverse tecniche statistiche, soprattutto: minimi quadrati parziali; regressione lineare multipla ed analisi discriminante lineare.

**Keywords:** Olio Vegetale; Olio vergine di oliva; Formaggio Pecorino; Parmigiano-Reggiano; Analisi termica differenziale; DSC; Spettroscopia; FT-IR; FT-NIR; Naso elettronico; Analisi discriminante lineare; LDA; Minimi quadrati parziali; PLS; Regressione lineare multipla; MLR; Analisi dei componenti principali.

## Indice

Ringraziamenti.....	1
1. Sommario.....	2
2. Indice.....	3
3. Lista delle abbreviazioni.....	5
4. Struttura della tesi.....	6
5. Introduzione.....	8
<b>5.1 Le analisi per la valutazione della qualità e genuinità degli oli e dei formaggi.....</b>	<b>8</b>
5.1.1 La qualità degli oli alimentari.....	9
5.1.2 Il caso degli oli ottenuti dalla lavorazione delle olive.....	10
5.1.3 Come misurare o controllare obiettivamente la qualità degli oli d'oliva.....	13
5.1.4 La presenza e i ruoli dell'acqua negli oli vergini di oliva.....	13
5.1.5 Indicazioni per la conservazione degli oli vergini da olive.....	15
5.1.6. Controllo della qualità degli oli ottenuti dalle olive: caratteristiche sensoriali degli oli vergini.....	16
5.1.7. Controllo della qualità degli oli ottenuti dalle olive: ossidazione degli oli vergini d'oliva.....	17
5.1.8. Controllo della qualità degli oli ottenuti dalle olive: recenti frodi nel settore degli oli provenienti dalla lavorazione delle olive.....	18
5.1.9. Genuinità e qualità.....	19
5.1.10 Composti gliceridici.....	19
5.1.11 Analisi degli acidi grassi.....	20
5.1.12 Determinazione della composizione degli acidi grassi.....	21
5.1.13 Determinazione dei componenti dell'insaponificabile (liberi e combinati).....	21
5.1.14 Resistenza all'ossidazione forzata.....	21
5.1.15 Composti fenolici.....	22
5.1.16 Prodotti d'ossidazione dei fenoli e polifenoli.....	22
5.1.17 Componenti volatili.....	22
5.1.18 Le verifiche per genuinità del Parmigiano-Reggiano e per altre tipologie di formaggi.....	23
<b>5.2 Metodi di analisi fisici: la spettrometria nell'infrarosso, la calorimetria a scansione differenziale e il naso elettronico.....</b>	<b>24</b>
5.2.1 Principi teorici di spettroscopia IR.....	24
5.2.2 Spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR).....	28
5.2.4 Strumenti.....	30
5.2.4 Tecniche di campionamento.....	31
5.2.5 La spettroscopia nel medio infrarosso (MIR).....	32
5.2.6 Lo strumento FT-IR.....	34
5.2.7 Analisi termica differenziale (DSC).....	35
5.2.8 Applicazioni della tecnica DSC all'analisi degli oli vegetali.....	36
5.2.9 Il naso elettronico.....	37

---

<b>5.3 L'analisi statistica multivariata quale strumento per l'interpretazione dei risultati analitici</b> .....	38
7. Conclusioni.....	41
8. Bibliografia.....	44
9 Pubblicazioni.....	47

### 3. Lista delle Abbreviazioni

<b>ANN</b>	Rete neurale artificiale
<b>ATR</b>	Riflettanza totale attenuata
<b>CE</b>	Comunità Europea
<b>CGC</b>	Gas cromatografia capillare
<b>DSC</b>	Analisi termica differenziale
<b>FT-IR</b>	Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier
<b>GC</b>	Gas cromatografia
<b>GC-MS</b>	Gas cromatografo accoppiato a spettrometro di massa
<b>HPLC</b>	Cromatografia liquida ad alta prestazione
<b>IRE</b>	Elemento interno di riflettanza
<b>LDA</b>	Analisi discriminante lineare
<b>MIR</b>	Spettroscopia nel medio infrarosso
<b>MLR</b>	Regressione lineare multipla
<b>MOS</b>	Ossidi metallici semiconduttori
<b>NIR</b>	Spettroscopia nel vicino infrarosso
<b>OFA</b>	Acidi grassi ossidati
<b>PCA</b>	Analisi delle componenti principali
<b>PLS</b>	Minimi quadrati parziali
<b>TLC</b>	Cromatografia su strato sottile
<b>TMS</b>	Trimetilsilil derivati
<b>VOO</b>	Olio vergine di oliva

#### 4. Struttura della tesi

Questa tesi si basa sui lavori sperimentali condotti durante il triennio di dottorato che hanno originato 13 diversi manoscritti pubblicati durante questo periodo su alcune riviste scientifiche la gran parte delle quali sono classificate dall'Institute for Scientific Information (ISI). Pertanto la presente tesi riporta un'introduzione generale che prende in considerazione le due tipologie di matrici oggetto del lavoro di tesi (oli vegetali e formaggi), oltre ai principali strumenti analitici utilizzati durante le attività sperimentali nonché una breve illustrazione degli strumenti di analisi statistica multivariata. Per le specifiche disamine dello stato dell'arte, nonché per le specifiche sezioni di materiali e metodi e risultati e discussioni di ciascuna attività sperimentale si rimanda ad ognuno degli articoli pubblicati. Nel testo tali articoli sono menzionati come **articolo 1-13** e di seguito sono elencati in ordine cronologico di pubblicazione (IF complessivo pari a 35,738):

- Articolo 1** Lerma-García, M.J., Gori, A., **Cerretani, L.**, Simó-Alfonso, E.F., Caboni, M.F. Classification of Pecorino cheeses produced in Italy according to their ripening time and manufacturing technique using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 93 (10), pp. 4490-4496, 2010 (IF 2,564).
- Articolo 2** **Cerretani, L.**, Giuliani, A., Maggio, R.M., Bendini, A., Toschi, T.G., Cichelli, A. Rapid FTIR determination of water, phenolics and antioxidant activity of olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112 (10), pp. 1150-1157, 2010 (IF 1,733).
- Articolo 3** Lerma-García, M.J., **Cerretani, L.**, Cevoli, C., Simó-Alfonso, E.F., Bendini, A., Toschi, T.G. Use of electronic nose to determine defect percentage in oils. Comparison with sensory panel results. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 147 (1), pp. 283-289, 2010 (IF 3,898).
- Articolo 4** Maggio, R.M., Valli, E., Bendini, A., Gómez-Caravaca, A.M., Toschi, T.G., **Cerretani, L.** A spectroscopic and chemometric study of virgin olive oils subjected to thermal stress. *Food Chemistry* 127 (1), pp. 216-221, 2011 (IF 3,655).
- Articolo 5** **Cerretani, L.**, Maggio, R.M., Barnaba, C., Toschi, T.G., Chiavaro, E. Application of partial least square regression to differential scanning calorimetry data for fatty acid quantitation in olive oil. *Food Chemistry* 127 (4), pp. 1899-1904, 2011 (IF 3,655).
- Articolo 6** Cevoli, C., **Cerretani, L.**, Gori, A., Caboni, M.F., Gallina Toschi, T., Fabbri, A. Classification of Pecorino cheeses using electronic nose combined with artificial neural network and comparison with GC-MS analysis of volatile compounds. *Food Chemistry* 129 (3), pp. 1315-1319, 2011 (IF 3,655).
- Articolo 7** Lerma-García, M.J., Simó-Alfonso, E.F., Bendini, A., **Cerretani, L.** Rapid evaluation of oxidised fatty acid concentration in virgin olive oil using Fourier-

transform infrared spectroscopy and multiple linear regression. *Food Chemistry* 124 (2), pp. 679-684, 2011 (IF 3,655).

**Articolo 8** Lerma-García, M.J., Lusardi, R., Chiavaro, E., **Cerretani, L.**, Bendini, A., Ramis-Ramos, G., Simó-Alfonso, E.F. Use of triacylglycerol profiles established by high performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detection to predict the botanical origin of vegetable oils. *Journal of Chromatography A* 1218 (42), pp. 7521-7527, 2011 (IF 4,531).

**Articolo 9** Maggio, R.M., **Cerretani, L.**, Barnaba, C., Chiavaro, E. Application of differential scanning calorimetry-chemometric coupled procedure to the evaluation of thermo-oxidation on extra virgin olive oil. *Food Biophysics* 7 (2), pp. 114-123, 2012 (IF 2,187).

**Articolo 10** Gori, A., Maggio, R.M., **Cerretani, L.**, Nocetti, M., Caboni, M.F. Discrimination of grated cheeses by Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometric techniques. *International Dairy Journal* 23 (2), pp. 115-120, 2012 (IF 2,401).

**Articolo 11** Bendini, A., Valli, E., Rocculi, P., Romani, S., **Cerretani, L.**, Gallina Toschi, T. A new patented system to filter cloudy extra virgin olive oil. *Current Nutrition & Food Science* 9, pp. 43-51, 2013.

**Articolo 12** Valli, E., Bendini, A., Maggio, R.M., **Cerretani, L.**, Toschi, T.G., Casiraghi, E., Lercker, G. Detection of low-quality extra virgin olive oils by fatty acid alkyl esters evaluation: A preliminary and fast mid-infrared spectroscopy discrimination by a chemometric approach. *International Journal of Food Science and Technology* 48 (3), pp. 548-555, 2013 (IF 1,259).

**Articolo 13** Gómez-Caravaca, A.M., Maggio, R.M., Verardo, V., Cichelli, A., **Cerretani, L.** Fourier transform infrared spectroscopy-Partial Least Squares (FTIR-PLS) coupled procedure application for the evaluation of fly attack on olive oil quality. *LWT - Food Science and Technology* 50 (1), pp. 153-159, 2013 (IF 2,545).

## 5. Introduzione

### 5.1 Le analisi per la valutazione della qualità e genuinità degli oli e dei formaggi

Il concetto di qualità è sicuramente complesso ed ampio, infatti riguarda ambiti diversi per il consumatore che contribuiscono con pesi differenti in funzione dello specifico prodotto alimentare. In prima approssimazione sono quattro gli aspetti principali: la qualità igienica, la qualità nutrizionale, la qualità edonistica e la qualità socio-culturale [1].

La **qualità igienica** o la sicurezza di un prodotto alimentare è al primo posto nelle scelte di tutti i parametri della produzione agro-alimentare: tuttavia, come è immediato ricordare a causa dei recenti scandali verificatisi per alcuni tipi di carne, di prodotti vegetali o in passato per il vino, non può essere considerata scontata, come invece dovrebbe essere. Il settore dei prodotti farmaceutici ha una regolamentazione molto più esigente di quella dei prodotti alimentari, anche se per molti casi gli alimenti possono essere veicolo di molte sostanze attive e assomigliare nei meccanismi di azione e nel sistema di introduzione, nel bene o nel male, a veri e propri farmaci.

La **qualità nutrizionale** di un prodotto alimentare viene spesso resa nota attraverso gli strumenti di comunicazioni a disposizione delle aziende produttrici nel rispetto della normativa vigente che negli ultimi anni è stata rivista con l'obiettivo di tutelare maggiormente il consumatore [2]. Infatti, una buona educazione alimentare, condotta fin dalle scuole primarie così come la corretta informazione possono trainare il consumatore verso una maggiore consapevolezza all'acquisto e verso una maggiore attenzione agli aspetti nutrizionale. Sempre in questa direzione, va sottolineato che recentemente la legislazione relativa alle indicazioni nutrizionali e salutistiche sulle indicazioni che possono essere poste nelle etichette dei prodotti alimentari [3] ha inserito le dovute restrizioni, utili allo scopo di normare i messaggi.

La **qualità edonistica** di un prodotto alimentare ha forte presa sul consumatore e, purtroppo, è spesso trainante negli acquisti e quindi è obiettivo primario della produzione di alimenti, più di ogni altro aspetto di qualità. L'accettazione di un prodotto alimentare, condizionata da alcuni fattori dei quali l'aspetto edonistico è il principale, è ritenuta dalle aziende produttive più importante di qualsiasi altro parametro per le scelte di produzione. Si acquista molto di più quello che piace, senza far considerazioni di altro tipo e, anche in questo caso, l'educazione alimentare rappresenta un elemento importante.

La **qualità socio-culturale** è quella che lega il consumatore alle sue tradizioni e alle sue origini, che sono fortissime anche in fatto di alimenti. E' ben noto come sia importante per l'uomo il legame con il paese di origine, ravvivato spesso solo attraverso il rito del cibo: certe preparazioni o determinati piatti vengono "religiosamente" tramandati dagli emigrati ai loro figli nelle nuove nazioni, così come gli immigrati in un determinato paese fanno fiorire le imprese che producono i loro cibi tradizionali. I prodotti "tipici" sono la definizione della tradizione e la loro elevata accettazione è il segno di un certo piacere del consumatore nel ritorno al passato, come legame con la tradizione. E' anche qualità socio-culturale quella che viene di solito attribuita al cibo consumato in piacevole compagnia, che per questo appare migliore di quello che realmente sarebbe in un consumo solitario. I mutamenti degli stili di vita e dei sistemi di approvvigionamento dei prodotti alimentari hanno condizionato anche i sistemi di produzione delle materie prime e, pertanto, è necessario un certo spirito di adattamento nei settori della produzione primaria [1].

Nell'ambito di questi cambiamenti, la produzione primaria si trova a scegliere fra prodotti destinati alla grande industria di trasformazione (come ad es. le colture da estrazione, come oleaginose, barbabietole da zucchero, mais da amideria, ecc.) e produzioni particolari, con vendita diretta o con vendita per settori di "nicchia" (piante officinali, oli di oliva di pregio, insaccati, formaggi, vini di pregio, ecc.) [1].

### ***5.1.1 La qualità degli oli alimentari***

Gli oli ed i grassi alimentari sono deteriorabili e possono essere ottenuti da fonti naturali, che non sempre si trovano in condizioni di conservazione e di qualità ottimali. In particolare, si possono osservare oli e grassi ossidati fin dal momento di estrazione dalla matrice dalla quale si ottengono, per cui vengono sottoposti a processi di raffinazione in modo da essere resi commestibili. La raffinazione delle sostanze grasse opera una concreta eliminazione di diverse sostanze ossidate, soprattutto quelle polari e quelle volatili, ma non riesce ad evitare una parte residua ossidata che, permanendo nel prodotto a fine lavorazione, ne determinerà il successivo tempo di conservazione (shelf life). Oltre a ciò, l'eliminazione delle sostanze polari o volatili, impoverisce la sostanza grassa dei suoi importanti componenti minori, interessanti per gli aspetti salutistico-nutrizionali, tra i quali sono spesso presenti anche dei composti antiossidanti. Pertanto, la conservabilità (serbevolezza) è un parametro di qualità di una sostanza grassa, a parità di tutti gli eventuali parametri di qualità associati ai prodotti alimentari.

Un altro importante parametro qualitativo si riferisce alle caratteristiche sensoriali delle sostanze grasse, questo aspetto è particolarmente importante nel caso degli oli provenienti dalla lavorazione delle olive, infatti tutti gli altri oli sono per regola da raffinare e, pertanto, perdono a seguito di questi trattamenti i composti responsabili delle caratteristiche sensorialmente riscontrabili [1].

### ***5.1.2 Il caso degli oli ottenuti dalla lavorazione delle olive***

Gli oli provenienti dalla lavorazione delle olive rappresentano uno dei più antichi alimenti. Insieme all'albero di olivo essi sono infatti noti da millenni e, anche se nel tempo hanno avuto qualche altro impiego oltre a quello alimentare, ad esempio come unguento per gli atleti, come fonte di illuminazione e di riscaldamento, oggi hanno praticamente solo la destinazione a condimento o come mezzo di cottura.

Gli oli provenienti dalla lavorazione delle olive sono apprezzati da numerosissimi consumatori. Tuttavia, se si chiede a diverse persone di assaggiare oli di provenienza differente, la preferenza cade tendenzialmente su uno solo ovvero quello più simile agli oli abitualmente consumati e/o prodotti nelle loro zone di origine. In altre parole, il legame fra l'abitudine alimentare della regione o della zona d'origine del consumatore e la valutazione soggettiva della qualità è molto forte, più che per molti altri aspetti tradizionali.

Le caratteristiche degli oli prodotti nelle numerosissime zone vocate alla olivicoltura sono condizionate da molteplici fattori, primo dei quali è il sistema di abitudini colturali e di quelle legate alla lavorazione delle olive raccolte (Schema 1). Si consumano preferibilmente, quindi, oli che sono prodotti secondo la tradizione delle proprie zone di origine, caratteristica questa che risulta molto variabile in un paese come l'Italia, che presenta una grande frammentazione nella produzione olivicola, oltre che un'elevata variabilità delle condizioni ambientali e pedo-climatiche [1].

Schema 1  
Filiere produttiva degli oli d'oliva, in relazione alla formazione delle caratteristiche di qualità degli oli al consumo



Nel caso degli oli d'oliva, il concetto di qualità è poco definibile sulla base del gusto che, per le ragioni esposte, è particolarmente variabile. Allora, per definire le caratteristiche di qualità degli oli vergini è necessario rifarsi ad altri parametri di valutazione.

Se consideriamo l'olio ottenuto dalle olive come una "conserva" di olive, così come il formaggio lo è del latte, i salumi della carne e, forse, il vino dell'uva, le confetture dei diversi tipi di frutta e via dicendo, allora ci si aspetta che l'olio ricordi le caratteristiche della materia prima oliva. Essendo numerose le cultivar di olive con caratteristiche organolettiche molto differenti, in corrispondenza vi saranno molti tipi di oli diversi pur tutti potenzialmente di buona qualità. Oltre a ciò, l'olio dovrebbe mantenere queste caratteristiche per periodi prolungati, almeno un anno, in relazione al genere di produzione che è di tipo annuale.

Negli ultimi decenni si sono verificati profondi cambiamenti nella conoscenza degli aspetti nutrizionali dell'olio di oliva, tanto da considerarlo alla base della cosiddetta "dieta mediterranea" e quindi ricco di importanti principi nutrizionali indispensabili, quali gli

acidi grassi monoinsaturi e gli acidi grassi essenziali e di particolari componenti della dieta utili alla conservazione nel tempo delle caratteristiche citate e, forse, anche al mantenimento della salute, quali gli antiossidanti. Rispetto a tutti gli altri oli, gli oli vergini d'oliva possiedono marcate proprietà organolettiche, carenti o addirittura assenti nelle altre sostanze grasse, a causa delle pratiche tecnologiche di produzione. In virtù di ciò sono sempre più apprezzati in cucina per la loro capacità di rendere più appetitosi molti cibi e pertanto risultano più diffusi nei consumi.

Per tradizione culturale e per la particolare struttura del territorio italiano, le zone di produzione delle olive e la localizzazione dei corrispondenti frantoi sono molto frammentate, portando di conseguenza ad una miriade di prodotti differenti, seppure molti di elevata qualità individuale.

Le caratteristiche riconducibili alle singole cultivar che danno luogo alle differenze sensoriali degli oli di diversa provenienza sono riscontrabili anche dai consumatori in relazione ai propri gusti, ma molto spesso non è considerato un pregio nelle produzioni a carattere industriale bensì un difetto. Infatti, la costanza delle caratteristiche di un prodotto, anche per quelli di tipo non alimentare, è la prima prerogativa che deve possedere per essere commercializzato: con proprietà ottime, buone o mediocri, spesso non importa, basta che sia costante. Naturalmente, nel caso di agro-alimenti, è più facile garantire negli anni la costanza di una qualità mediocre piuttosto che quella di una qualità ottimale, spesso dipendente dagli andamenti climatici, per cui la tendenza è quella di orientarsi verso la mediocrità, facendo miscele in modo da rendere il più possibile uguale e costante il prodotto. Tutto ciò è facilitato da un largo consumo che mediamente rende il consumatore non in grado di distinguere le differenze organolettiche.

Produrre bene, oggi, non è sufficiente e, in generale, ha costi di lavorazione superiori alle produzioni meno curate, per cui si evidenzia, salvo eccezioni, una tendenza verso le produzioni meno qualificate e meno onerose. Tuttavia i consumatori attenti possono rivolgere le proprie attenzioni verso i prodotti tipici che hanno caratteristiche peculiari. Questa tendenza ha portato alla nascita di mercati di nicchia, come sono quelli delle denominazioni di origine o degli oli monovarietal, che garantiscono la provenienza territoriale oltre alla presenza di specifiche caratteristiche di pregio. Per quanto riguarda quest'ultimo settore, si può facilmente comprendere l'utilità del mantenimento di tali differenze assaggiando da profani oli monovarietal diversi: ad esempio quello prodotto dalla varietà siciliana Tonda Iblea caratterizzata da profumi che ricordano il pomodoro, o la pugliese Cellina di Nardò con evidenti note riconducibili al frutto del lampone, piuttosto

che il monovarietale romagnolo prodotto dalle olive Ghiacciola caratterizzato da odori erbacei che rimandano al carciofo [1].

### ***5.1.3 Come misurare o controllare obiettivamente la qualità degli oli d'oliva***

In generale le condizioni sono delineate nel regolamento della CE [4], sulle caratteristiche degli oli provenienti dalla lavorazione delle olive e sul loro controllo. Infatti, stabilito che l'olio non debba contenere sostanze estranee alle olive (come ad es. gli idrocarburi alogenati), che non debba essere ottenuto con miscelazione o mezzi illeciti, non deve presentare livelli di difetti al di sopra di una certa entità (panel test).

Chi produce oli direttamente dalle olive sa che i controlli che dovrebbe condurre sono piuttosto limitati: oltre alle caratteristiche organolettiche, sono da verificare l'acidità, gli alchil esteri ed il valore dei perossidi (numero di perossidi, NP), poiché ancora oggi non si è in grado di tenere sempre sotto controllo le variabili che influenzano questi due parametri attraverso altre scelte ed è necessario classificare su tali valori la categoria commerciale, oltre all'analisi organolettica, per rilevare e valutare eventuali difetti. Tutte le altre analisi previste non è necessario svolgerle, in questo caso. Chi è costretto, invece, a controllare a fondo l'olio, oltre alle strutture ufficiali preposte allo scopo, è chi l'acquista e lo imbottiglia, e/o lo commercializza, per assicurarsi della corretta dichiarazione posta o da porre in etichetta [1].

In sostanza, non è problematico, al livello della produzione primaria il controllo "commerciale" dell'olio; il problema semmai è come meglio produrlo per ridurre al minimo i parametri: acidità, alchil esteri, numero di perossidi e caratteristiche sensoriali.

### ***5.1.4 La presenza e i ruoli dell'acqua negli oli vergini di oliva***

L'acqua negli alimenti esercita un comportamento differente, in funzione della quantità presente, sull'ossidazione dei lipidi: a basse concentrazioni non può opporsi all'ossidazione, ad elevate concentrazioni favorisce gli scambi molecolari promuovendo l'ossidazione, mentre a valori intermedi (prodotti ad umidità intermedia, IMF) ostacola la propagazione dei radicali liberi e lo sviluppo dell'ossidazione [1].

L'acqua negli alimenti ha un ruolo fondamentale per la sua importanza sull'organismo umano e per la capacità di rendere molte matrici alimentari gradevoli ed adatte al consumo, oltre a contribuire a mantenere nella condizione di soluti molti componenti altrimenti sgradevoli alla degustazione. Infatti, l'acqua si dispone all'interno dell'alimento aggregandosi a molti tipi di molecole, soprattutto macromolecole come carboidrati e

proteine, contribuendo alle loro caratteristiche reologiche a noi note come piacevoli, come l'elasticità (delle proteine) e la morbidezza (della parte più interna dei prodotti da forno, ecc.). Oltre a questo, è capace di sciogliere sali e sostanze organiche polari di piccola e media dimensione, favorendo la loro presenza in sistemi non adatti a contenere composti polari, stabilizzando in sospensioni, dispersioni e dispersioni colloidali.

Molto importante è l'azione sensoriale che l'acqua esercita nelle soluzioni acquose o in dispersioni nelle matrici idrofobe. La sensazione organolettica colta al gusto e legata all'odore di un alimento sono condizionate dalla presenza e dalla forma in cui si trova l'acqua nell'alimento. Il gusto viene captato dalla sequenza di contatti delle strutture molecolari presenti nell'alimento, modulata dalla loro collocazione nelle fasi acquosa ed organica, privilegiando prima il contatto con quella acquosa in relazione al fatto che le papille gustative sono bagnate di acqua (saliva).

Negli oli alimentari sono state rivelati [5] quantitativi di acqua che vanno da 300 a 2000 mg/kg, quantitativi spesso ben al di sopra dei contenuti di saturazione (valutabili in 250-300 mg/kg, in assenza di componenti minori). La spiegazione di queste quantità è data dalla presenza di una situazione di microgocce di acqua dispersa nell'olio stabilizzata dall'aggregazione-dissoluzione di un gruppo di sostanze polari, idrosolubili e/o idrocompatibili che vanno dai sali minerali, acidi liberi, digliceridi, fosfolipidi, fino a sostanze alcoliche e fenoliche (Figura 1). Si tratta di dispersione (fine emulsione o microemulsione) e non di sospensione, data l'impossibilità di separare con mezzi fisici l'acqua, insieme ai suoi componenti, dall'olio. La quantità di acqua che si trova dispersa negli oli vergini d'oliva è relativamente variabile in relazione alla tecnologia di estrazione ed alla disponibilità di componenti minori che agiscono da surfattanti. Tale dispersione si configura come struttura micellare per il comportamento che la rende stabile e le micelle hanno una dimensione talmente piccola da non essere visibili ad occhio nudo, negli oli filtrati (inferiore al micrometro e più vicina a 0,1  $\mu\text{m}$ ). Calore e freddo intensi operano una destabilizzazione della dispersione, anche se con meccanismi differenti, confermando che si tratta di una dispersione metastabile, cioè le micelle sono quantitativamente al di sopra del contenuto d'acqua corrispondente alla saturazione.

Al microscopio ottico molto potente (1600 ingrandimenti), nel caso di oli extravergini di oliva, si possono rilevare sia l'aspetto che le dimensioni di tali micro-micelle (Figura 1).

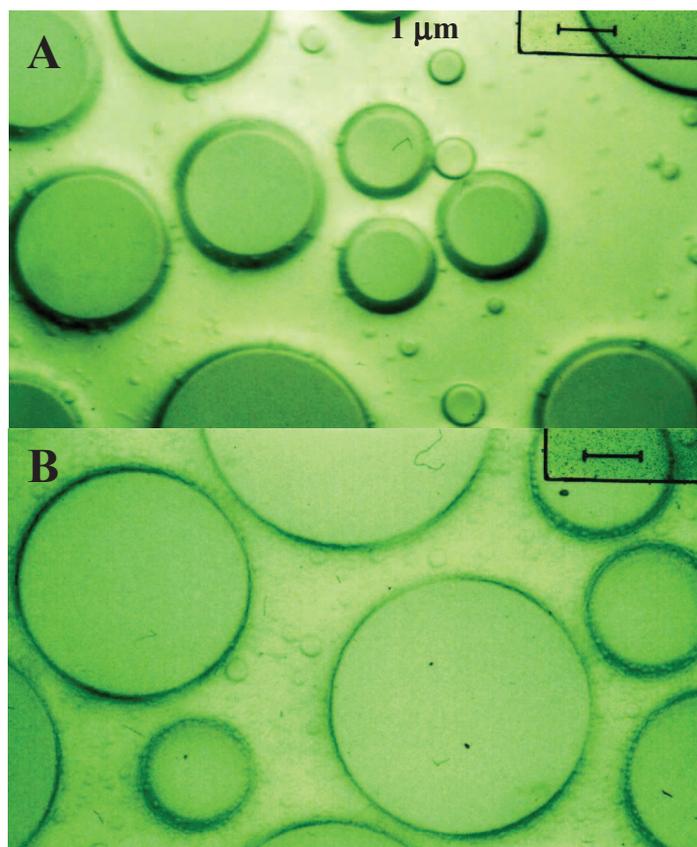


Figura 1

Microfotografia [6] di oli d'oliva durante il loro decongelamento: olio deodorato (A) e olio extravergine di oliva (B). Sono indicate alcune piccole gocce d'acqua, nei pressi del contorno di grosse gocce di olio.

Dopo solidificazione ad una temperatura inferiore a 8°C circa, l'olio viene fatto scongelare sotto un potente microscopio ottico (1600 ingrandimenti). La figura A corrisponde ad un olio deodorato "delicatamente", mentre la figura B a quello di un olio extravergine di oliva. Le frecce indicano le piccole gocce di acqua. Si possono osservare le piccolissime gocce di acqua presenti in maggiore quantità nella figura B. Le microgocce di acqua sono in prevalenza attratte dalla superficie esterna, una specie di membrana, delle gocce più grosse.

### ***5.1.5 Indicazioni per la conservazione degli oli vergini da olive***

La composizione degli oli provenienti dalla lavorazione delle olive è stata studiata da molti gruppi di ricerca nazionali ed internazionali. Tuttavia, rimangono ancora delle incognite sul comportamento dell'olio durante la conservazione, sulla complessità delle sensazioni relative all'analisi sensoriale, sulla stabilità all'ossidazione in relazione alla presenza di antiossidanti di tipo fenolico e polifenolico e sulla possibilità di rivelare la presenza di alcune particolari frodi attualmente in uso [1].

È noto da molto tempo che la stabilità di un olio che abbia subito un raffreddamento tale da solidificare, attraverso la graduale cristallizzazione dei gliceridi, quando fonderà di nuovo presenterà una minore stabilità alla conservazione.

La conservazione dell'olio è condotta a temperature basse oppure a quelle ambientali, spesso senza capire che non è casuale la serie di eventi che corrispondentemente si possono verificare. Inoltre, quando la temperatura scende al di sotto degli 8 °C l'olio vergine da olive tende a cristallizzare nei componenti trigliceridici: questo costringe tutte le altre sostanze ad attendere che i trigliceridi si esauriscano prima di solidificare, ammesso che le condizioni di temperatura lo permettano. Proprio per questa motivazione diversi componenti minori, in particolare quelli a struttura fenolica, tendono a separarsi per una buona parte, in quanto le micromicelle in cui essi sono presenti (in forma dispersa colloidale nell'olio) in virtù dell'acqua in esso contenuta, in condizione metastabile, si avvicinano in maniera determinante per la rottura di tale condizione.

I tentativi successivi di ri-solubilizzare questi costituenti precipitati in una specie di nuvola di nebbia pesante, una volta "scongelato" l'olio, sono vanificati dall'incapacità di sciogliere quelle quantità di componenti, dei quali l'olio è già saturo. L'unica possibilità sarebbe disperdere i solidi mediante omogeneizzazione, però con grave danno all'olio.

L'olio, perdendo in tal modo una parte non trascurabile di antiossidanti –nella migliore condizione di efficacia in fase dispersa- vede ridotta la sua serbevolezza originale. Oltre a ciò, l'aggregazione di componenti ricchi in acqua porterà nel tempo alla formazione della sensazioni organolettiche sgradevoli, a causa di fermentazioni anomale da parte di microrganismi presenti. Per queste motivazioni, da sempre viene consigliato separare il solido di fondo dall'olio.

Analogamente il tentativo di aggiungere composti fenolici o sostanze simili in oli (vergini o di semi) non sortisce risultati interessanti in quanto i quantitativi di acqua presente o sono troppo scarsi ( acqua < 500 mg/kg) o sono già saturi di sostanze disciolte o associate (acqua > 500 mg/kg). Anche l'acqua, quindi, rappresenta uno strumento per comprendere tale comportamento [1].

#### ***5.1.6. Controllo della qualità degli oli ottenuti dalle olive: caratteristiche sensoriali degli oli vergini***

La maggior parte dei componenti volatili sono responsabili di molte note aromatiche, soprattutto di profumi ma anche di alcuni odori particolari (percepibili per via retro-olfattiva). Le sostanze fenoliche, invece, sono -almeno molte di esse- responsabili dei sapori degli oli vergini.

La presenza nei sistemi naturali come gli oli vergini d'oliva, ottenuti mediante tecnologie convenzionali, di acqua "tecnologica" costringe una parte di sostanze fenoliche a risiedere

in micromicelle corrispondenti all'acqua dispersa, stabilizzate proprio dalla serie di sostanze che si interfacciano a causa della loro struttura molecolare con una parte polare ed una poco polare (sciolta nella fase oleosa); ciò permette la repulsione tra le micelle in avvicinamento e la stabilizzazione della dispersione corrispondente.

Le sostanze che risiedono all'interno delle micro-micelle sono "sentite" dal punto di vista sensoriale in maniera differente da quelle sciolte nell'olio; infatti, esse sono presenti in fasi differenti e per essere percepite al momento dell'assaggio devono venire a contatto con le papille gustative dell'apparato boccale, ricoperte da un sistema acquoso (saliva). Questa situazione porta a "sentire" prima le sensazioni legate ai componenti maggiormente idrocompatibili e poi, in un secondo momento, a quelli più idrofobi (retrogusto) [1].

#### ***5.1.7. Controllo della qualità degli oli ottenuti dalle olive: ossidazione degli oli vergini d'oliva***

L'ossidazione delle sostanze grasse in generale ha un andamento molto simile, ad eccezione degli oli vergini di oliva che presentano un andamento particolare. Innanzitutto, chi ha fatto studi su questo argomento ha constatato negli oli d'oliva come i tocoferoli durante la conservazione tendano a diminuire in maniera progressiva, tanto da essere considerati marcatori dell'ossidazione stessa. Con un periodo di attesa sufficientemente lungo, in condizioni di confezione sigillata, si può rilevare come essi ricompaiano in oli ossidati. In oli vecchi e già rancidi si possono infatti misurare quantitativi di tocoferoli paragonabili a quelli originalmente presenti [1].

I tocoferoli, quindi, si vanno rigenerando a spese di altri costituenti antiossidanti, che evidentemente a loro volta si ossidano. Ma perché questi ultimi non agiscono direttamente, senza scomodare i tocoferoli per questa azione, dato che poi comunque anch'essi saranno destinati ad ossidarsi?

Se si determina l'andamento dei perossidi (attraverso il numero di perossidi), ci si rende conto che il comportamento in tempi brevi assomiglia più ad un profilo a forma di sega piuttosto che ad una retta o ad una curva.

L'interpretazione di questo comportamento fino a poco tempo fa era fornita dal meccanismo cinetico che prevede un accumulo di sostanze perossidiche per avere una buona probabilità di far funzionare gli antiossidanti presenti, che abbassano la quantità di perossidi. Questo andamento ciclico potrebbe consentire di misurare un valore di perossidi maggiore un giorno e minore dopo qualche giorno, in antitesi al comportamento più logico osservato per gli oli raffinati.

La presenza delle micromicelle e quindi dell'acqua, può spiegare meglio un comportamento antiossidante vero, un po' "ritardato", considerando la necessità del verificarsi di scontri attivi con strutture (micelle) caricate parzialmente (strutture molecolari esposte dalla parte dell'olio).

Recentemente, è stato osservato che l'olio d'oliva, quando sottoposto a raffreddamento sembra ossidarsi più velocemente a bassa temperatura (se l'olio è parzialmente cristallizzato) che a temperature maggiori: esattamente all'opposto di quanto ci si attenderebbe. L'interpretazione fornita si basa sul fatto che a bassa temperatura gli antiossidanti si separano dall'olio e non possono più svolgere la loro azione antiossidante, aggravata dal fatto che a bassa temperatura cristallizzano prima gli acidi grassi meno insaturi, residuando una composizione pertanto più ossidabile. Pur ritenendo che non si possano escludere questi due aspetti, si sa che la cristallizzazione avviene in "purezza", cioè fra gliceridi più simili a partire da quelli più rappresentati: questo comportamento prevede un effetto di concentrazione di tutte le sostanze definite componenti minori. Fra questi, le micromicelle rappresentano una situazione che va deteriorandosi mano a mano che queste sono costrette ad avvicinarsi fino a collassare. Tale situazione si risolverà con una perdita di fenoli e polifenoli, come già detto. La considerazione è valida anche per i perossidi –gli idroperossidi degli acidi grassi insaturi, per l'esattezza- che tenderanno ad incrementare esasperando le condizioni ossidative.

Quindi, più che diminuzione dei fenoli antiossidanti ed insaturazione aumentata, sarebbe l'aumento di concentrazione dei perossidi in un compartimento ridotto la causa più probabile del comportamento sperimentale osservato. Oltre a ciò si potrebbe considerare l'effetto chimico fisico di "espulsione" dell'esanale, analiticamente misurata come indice di ossidazione, dovuta alla progressiva riduzione degli spazi e all'eccessiva sua concentrazione (sovrassaturazione) [1].

#### ***5.1.8. Controllo della qualità degli oli ottenuti dalle olive: recenti frodi nel settore degli oli provenienti dalla lavorazione delle olive***

L'ultima frode che è stata considerata problematica da studiare ha riguardato la riduzione o eliminazione di sostanze maleodoranti da oli che, in seguito al trattamento migliorano le proprie condizioni commerciali (passando a categorie merceologiche di livello superiore). Questo procedimento, fraudolento se applicato a oli commercializzati come vergini o che saranno miscelati con altri per essere venduti come vergini, quando è condotto in condizioni blande ("deodorazione soft o delicata") non lascia segni di facile individuazione.

La deodorazione, da quel po' che si può sapere a riguardo, sembra venga condotta attraverso sistemi differenti: con una specie di distillazione molecolare, condotta sotto vuoto e a bassa temperature, o mediante gorgogliamento con azoto o vapor d'acqua a circa 100 °C, oppure con l'impiego di polveri adsorbenti o ancora con l'impiego di membrane filtranti.

Dopo diversi anni di ricerche [5] di marker in grado di individuare tale frode, finalmente nel 2006 il gruppo di ricercatori dell'Istituto de la Grasa di Sevilla coordinati dal dott. Arturo Cert Presentano al Congresso della Federazione Europea di Scienza e Tecnologia dei Lipidi (EUROFED LIPID) l'analisi degli alchil esteri [7].

#### **5.1.9. Genuinità e qualità**

Spesso la qualità di un olio ottenuto dalle olive è confusa con la genuinità. Un olio che corrisponda a quello indicato in etichetta è genuino, ma non è automaticamente di qualità.

Nel caso degli oli da olive la genuinità è molto importante, perché per tutte le altre sostanze grasse i prezzi sono abbastanza vicini da non rendere economicamente interessante la frode.

La genuinità degli oli da olive è controllabile impiegando le determinazioni analitiche previste per i parametri corrispondenti dal Reg. CEE 2568 del 1991 e successive modificazioni [4].

#### **5.1.10 Composti gliceridici**

I maggiori costituenti di una sostanza grassa alimentare sono composti di natura gliceridica: in particolare, normalmente, dominano i trigliceridi (triacilgliceroli) fino oltre al 95% circa, poi vi sono digliceridi (diacilgliceroli) fino al 2-4% ed infine i monogliceridi (monoacilgliceroli). L'analisi dei costituenti gliceridici è importante per vari aspetti: alcuni di essi sono caratterizzanti per la valutazione della qualità delle materie prime (digliceridi totali), alcuni lo sono per la rivelazione di frodi (2-monogliceridi), alcuni altri per la valutazione della freschezza (1,2-digliceridi/1,3-digliceridi) e altri ancora per la previsione della conservazione (trigliceridi ossidati). Dal punto di vista diagnostico per il controllo della genuinità sono importanti gli acidi grassi, tanto da essere determinati come composizione da tutti coloro che esaminano le sostanze grasse alimentari [1].

*Analisi dei diacilgliceroli (digliceridi):* La quantità totale dei diacilgliceroli (DG) è in relazione al livello di idrolisi della sostanza grassa, sia subito a livello di materia prima (conservazione) sia incrementata dalla sua trasformazione. Attraverso l'idrolisi si forma anche acidità libera, normalmente misurata come parametro di qualità, ma nel caso di oli

che vengano poi raffinati, rimangono come testimoni dell'inacidimento solo i digliceridi. Oggi sono possibili analisi che realizzano ottime separazioni basate sulla dimensione e sul grado di insaturazione totale del singolo digliceride, si è potuto mettere a punto un metodo di determinazione dei digliceridi per la misurazione anche degli 1,2-DG separatamente dagli 1,3-DG. Con tale possibilità analitica si è evidenziata l'importanza della determinazione del rapporto fra i due tipi di digliceridi nella valutazione della qualità degli oli di oliva. Tale rapporto diminuisce sempre di più in quanto gli 1,3-DG incrementano, nel tempo di conservazione, per effetto idrolitico selettivo dei TG e per isomerizzazione dagli 1,2-DG [1].

*Analisi dei monoacilgliceroli (monogliceridi).* La determinazione della composizione degli acidi grassi presenti nella posizione centrale della glicerina, dopo degradazione con lipasi pancreatici dei trigliceridi di origine vegetale, è utile all'individuazione di sostanze grasse esterificate chimicamente. L'analisi diretta dei monogliceridi (come trimetilsilil derivati, TMS) nel lipolizzato ha permesso un notevole risparmio di tempo e una migliore misura a causa della diminuzione delle interferenze, spesso riscontrate per il metodo ufficiale di analisi precedenti [1].

#### **5.1.11 Analisi degli acidi grassi**

La determinazione degli acidi grassi è la più classica delle determinazioni gas cromatografiche: oggi si preferisce affrontare oltre alla determinazione degli acidi grassi totali o di quelli relativi a particolari frazioni lipidiche, in diversi casi, la determinazione degli acidi grassi liberi, previo trattamento metilante con diazometano. Rimane importante ricordare, tuttavia, che quando la composizione di un olio, o di lipidi in generale, non è stata ampiamente studiata, è bene approfondire in via preliminare la distribuzione dei costituenti anche mediante una cromatografia su strato sottile (TLC) di tipo analitica, dalla quale può emergere la presenza di derivati degli acidi grassi, ossidati o più polari.

Nel caso della determinazione della composizione degli acidi grassi (sotto forma di esteri metilici) è stato ampiamente sfruttato l'impiego di colonne capillari polari, che forniscono la possibilità di separare abbastanza bene anche gli acidi grassi *trans*-isomeri, al punto da diventare un metodo della CE per il controllo della genuinità degli oli vergini (che non hanno subito raffinazione) [1].

### **5.1.12 Determinazione della composizione degli acidi grassi**

La composizione degli acidi grassi consente di svelare le frodi più grossolane, in quanto è la determinazione che viene condotta più di frequente e, quindi chi froda, la conosce e ne rispetta le possibilità diagnostiche, operando frodi che non siano facilmente svelate da questa analisi. Tuttavia, nella determinazione della composizione degli acidi grassi è possibile valutare anche gli acidi grassi in configurazione *trans*, con particolare interesse per quelli monoinsaturi (monoeni). Tali isomeri *trans* sono la traccia di raffinazione degli oli e, quindi la loro presenza è indice -come le determinazioni spettrofotometriche- di miscele con oli raffinati [1].

### **5.1.13 Determinazione dei componenti dell'insaponificabile (liberi e combinati)**

I componenti "minori" degli oli, soprattutto quelli dell'insaponificabile sono da sempre stati considerati molto informativi sulle miscele fraudolente degli oli d'oliva. I metodi più interessanti sono quelli basati sui componenti dell'insaponificabile liberi ed esterificati, determinati mediante analisi separate, con particolare riferimento per gli steroli [8]. Questo metodo consente di rivelare piccole presenze di olio di nocciola, anche se sottoposto preventivamente a deodorazione spinta per eliminare i componenti liberi dell'insaponificabile (che di solito sono maggioritari).

Oltre a ciò, la validità delle determinazioni sui componenti dell'insaponificabile sta nella capacità di indicare la presenza di determinati oli nelle miscele con oli d'oliva, anche in relativamente piccole quantità.

La determinazione quali-quantitativa degli stereni, con particolare interesse per gli steradieni, fa parte delle determinazioni utili a svelare la miscela di oli raffinati negli oli vergini, quella più sensibile.

Recentemente sono state proposte delle condizioni d'analisi per i componenti dell'insaponificabile che richiamano la logica dei "finger print". Si tratta di una specie di "insapogramma" (cromatogramma della frazione insaponificabile), i cui costituenti dal punto di vista quali-quantitativo possono indicare una situazione anomala molto rapidamente e, in questi casi, imporre altri tipi d'indagine. Nella maggior parte dei casi non sarà necessario procedere con ulteriori analisi, risparmiando onerosi impegni d'analisi [1].

### **5.1.14 Resistenza all'ossidazione forzata**

Fra i vari sistemi di valutazione della situazione ossidativa di una sostanza grassa, i test di resistenza ad ossidazione accelerata o di resistenza al maltrattamento termo-ossidativo,

sembrano quelli più efficaci, anche se sono criticabili per numerosi aspetti. Lo scopo è quello di ottenere una misura obiettiva della sua qualità in relazione alla stabilità durante la conservazione. Sono disponibili alcune apparecchiature automatizzate capaci di fornire un dato di stabilità molto utilizzato per caratterizzare una sostanza grassa e, in alcuni casi, diagnostico per capire l'influenza di alcuni parametri di produzione sulla qualità di un olio. Questa determinazione si riferisce ad un aspetto della qualità intrinseca che però non ha avuto ancora impieghi ufficiali [1].

#### ***5.1.15 Composti fenolici***

La determinazione dei componenti con struttura molecolare fenolica e più nello specifico *o*-difenolica per via della loro maggiore attività [9] ha lo scopo di qualificare la capacità antiossidante dell'olio e quindi la sua futura stabilità durante la conservazione [10]. Pertanto, la determinazione chimico-analitica dei composti fenolici e della loro attività antiossidante ha caratteristiche simili a quella più empirica della resistenza all'ossidazione forzata, una determinazione utile a stabilire la qualità intrinseca dell'olio.

#### ***5.1.16 Prodotti d'ossidazione dei fenoli e polifenoli***

Questa valutazione analitica non ha ancora avuto una definizione nella forma di metodo analitico, tuttavia, la presenza di prodotti di ossidazione di tali molecole è inevitabile in un olio. Essi derivano dal contatto olio pasta, ma anche dalla protezione che i polifenoli esercitano nel tempo di conservazione. Determinare i fenoli ossidati, insieme alla misura totale dei fenoli e polifenoli (o degli *o*-difenoli) significa poter mettere in relazione questi dati con la reale capacità antiossidante. Infatti, il potere antiossidante complessivo è condizionato dagli equilibri che si instaurano fra i componenti redox, ovvero tra fenoli presenti in forma ridotta (attiva) ed in forma ossidata.

In ogni caso, quando si potrà disporre di un metodo analitico per i prodotti d'ossidazione dei fenoli, la determinazione sarà rivolta all'aspetto della qualità intrinseca del prodotto, o meglio alla sua stabilità nel tempo [1].

#### ***5.1.17 Componenti volatili***

Le sostanze volatili costituiscono in generale i componenti odorosi di un alimento e, nel caso degli oli vergini d'oliva, sono di particolare importanza per il giudizio sensoriale. La disponibilità di una metodica di analisi dei volatili degli oli vergini, oltre a consentire un controllo quali-quantitativo dei componenti responsabili di pregi e difetti percepibili

all'olfatto, è anche utile in un controllo anti-frode, in quanto permette il contemporaneo dosaggio del contenuto di composti benzenici e di idrocarburi alogenati [1].

### ***5.1.18 Le verifiche per genuinità del Parmigiano-Reggiano e per altre tipologie di formaggi***

Come noto ai consumatori, e come ben illustrato da Bertozzi e Bocedi in un recente volume del mensile L'Agricoltura [11], la fama acquisita dal Parmigiano-Reggiano durante i suoi nove secoli di vita ha portato a molteplici tentativi di imitazione con lo scopo di sfruttare in modo illecito il suo valore. Pertanto, nel corso dei secoli sono state messe in atto diverse iniziative per garantire l'origine del prodotto, così come tale prodotto ha rappresentato un esempio oltre che il precursore degli attuali sistemi di tutela dei prodotti legati ad una specifica zona di origine. Infatti, il duca di Parma Filippo di Borbone con una "grida" del 16 giugno 1751 imponeva sin da allora di bollare i formaggi prodotti nel Parmense. Si arriva quindi ai primi anni del 1900 quando si realizzarono azioni congiunte che portarono prima alla tutela del Grana Tipico, poi del Parmigiano-Reggiano con un ambito di protezione molto ampio. Nello specifico, già nel 1909 i rappresentanti delle Camere di commercio di Parma, Reggio Emilia, Modena e Mantova avviarono un'azione per un'unica organizzazione di "marcatura del grana" che portò nel 1921 alla costituzione di un comitato interregionale con lo scopo di identificare il "formaggio Reggiano tipico", apponendo su ogni forma una marca d'origine a garanzia dei caratteri tipici esterni ed interni del formaggio "Grana Reggiano". Successivamente, nel 1934 venne costituito il Consorzio Volontario Interprovinciale del Grana Tipico, che comprendeva la "zona veramente classica della produzione dello squisito e rinomato formaggio universalmente noto sotto il nome di reggiano e di parmigiano" che nel 1937 veniva estesa alla provincia di Bologna in sinistra Reno, con lo scopo di difendere, tutelare e promuovere il prodotto [11].

Dopo la seconda guerra mondiale, nel 1951 venne sottoscritta a Stresa fra i rappresentanti di Italia, Francia, Svizzera, Austria, Danimarca, Norvegia, Paesi Bassi e Svezia la prima Convenzione Internazionale sull'impiego delle *denominazioni d'origine* e *denominazioni dei formaggi*, che portò poi alla legge italiana n. 125 del 1954 sulla tutela dei formaggi, suddivisi in denominazioni d'origine e tipiche [11].

La denominazione Parmigiano-Reggiano venne riconosciuta l'anno successivo e il Consorzio del Parmigiano-Reggiano svolse un ruolo di primo piano per ottenere tali provvedimenti, in virtù della necessità di riconoscere la denominazione a livello nazionale ed internazionale. La normativa nazionale istituì anche specifiche disposizioni e sanzioni

penali contro le frodi e la concorrenza sleale per la tutela delle denominazioni d'origine dei formaggi e, infine, sostituite dal Regolamento (CEE) 2081/92, oggi Regolamento (CE) 510/06 [12]. Tale normativa conferisce un'ampia difesa alle denominazioni registrate, in quanto specificava che le stesse erano tutelate contro qualsiasi usurpazione, imitazione ed evocazione, anche se tradotte e anche se la vera origine del prodotto era indicata, protezione mantenuta dell'attuale Reg.(CE) 510/06 e che va al di là del rischio di confusione del consumatore, come poi ribadito in reiterate occasioni dalla Corte di Giustizia Europea.

A tutela del prodotto processato e confezionato, il DPR 22 settembre 1981 stabilì che i formaggi a denominazione d'origine potevano essere commercializzati anche in parti preconfezionate e che sugli involucri delle stesse doveva essere estesa l'apposizione della denominazione d'origine. Infine il DPCM 4 novembre 1991 estese l'uso della denominazione di origine del formaggio «Parmigiano-Reggiano» anche alla tipologia «grattugiato».

Alla stregua del Parmigiano-Reggiano, anche altri formaggi che vantano il riconoscimento della Denominazione di Origine Protetta, possono beneficiare delle tutele legate a questo marchio Europeo. Tra i Pecorini vantano tale riconoscimento il Pecorino Sardo, il Pecorino Romano, il Pecorino Toscano, il Pecorino Siciliano, il Fiore Sardo, il Canestrato Pugliese ed il formaggio di Fossa di Sogliano al Rubicone e Talamello). Tali formaggi sono caratterizzati dall'utilizzo di una materia prima che determina specifiche caratteristiche sensoriali e compositivo oltre all'effetto del processo di produzione che caratterizza ciascuno di questi.

## **5.2 Metodi di analisi fisici: la spettrometria nell'infrarosso e calorimetria a scansione differenziale**

### ***5.2.1 Principi teorici di spettroscopia IR***

La spettroscopia è la scienza che studia l'interazione tra la radiazione elettromagnetica e la materia. In particolare, la spettroscopia, è utilizzata per indicare la separazione, rivelazione e registrazione di variazioni di energia (picchi di risonanza) che interessano nuclei, atomi o intere molecole. Queste variazioni energetiche sono dovute all'interazione tra radiazione e materia, specificatamente all'emissione, assorbimento o diffusione di radiazioni o particelle elettromagnetiche [13].

La base teorica di tale interazione è la natura quantica del trasferimento di energia dal campo di radiazioni alla materia e viceversa. Infatti, sia la materia che il campo elettromagnetico hanno una “doppia natura”, ossia la possibilità di comportarsi sia come onda che come particella.

La radiazione elettromagnetica è una forma di energia che si propaga attraverso lo spazio ad altissima velocità come un'onda e si può presentare sotto numerose forme, fra cui una delle più comuni è la luce.

Essa è la risultante della sovrapposizione di un campo elettrico e di un campo magnetico ortogonali mutuamente accoppiati: ciascuno dei due è sorgente dell'altro e si propaga con andamento sinusoidale sia nello spazio che nel tempo. (figura 2)

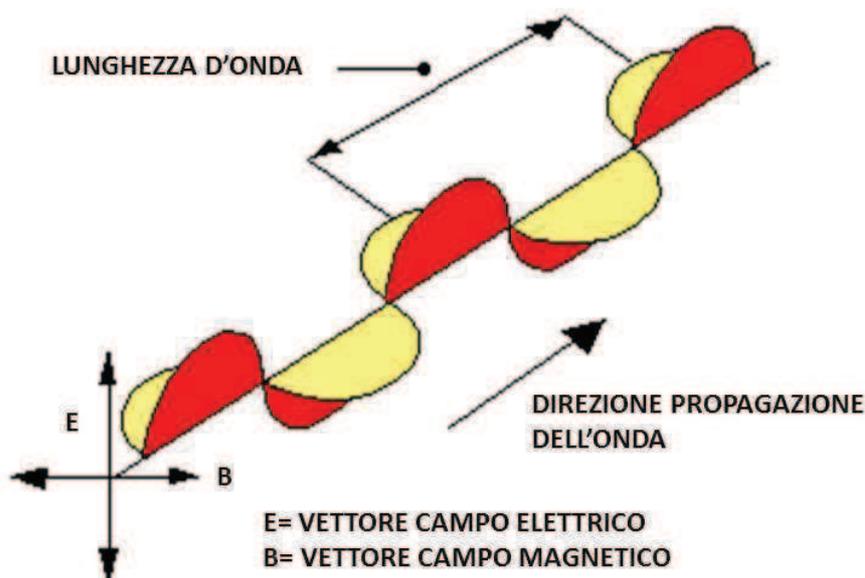


Figura 2  
Rappresentazione di un'onda elettromagnetica

Il carattere ondulatorio della radiazione elettromagnetica è comunemente descritto da:

- **lunghezza d'onda ( $\lambda$ )**, che rappresenta la distanza tra due massimi adiacenti e viene misurata in nm;
- **frequenza ( $\nu$ )**, che rappresenta il numero di oscillazioni descritte dall'onda nell'unità di tempo ed è misurata in Hertz (cicli/s);
- **numero d'onda ( $\sigma$ )**, che rappresenta il numero di onde presenti in un'unità di lunghezza ed è misurato in  $\text{cm}^{-1}$ ;
- **velocità di propagazione (c)**, che è la velocità con la quale avanza il fronte d'onda e che nel vuoto, per tutte le frequenze, assume il valore di  $2,998 \cdot 10^{10}$  cm/s.

Lo spettro della radiazione elettromagnetica è composto da diverse zone delimitate da lunghezze d'onda precise. Questa suddivisione origina cinque grandi gruppi: la frazione visibile, che occupa la parte centrale dello spettro ed ha caratteristiche intermedie, la frazione ultravioletta e i raggi ionizzanti, caratterizzati da alte frequenze e corte lunghezze d'onda, ed infine la frazione infrarossa e le onde radio, caratterizzate da bassa frequenza ed alte lunghezze d'onda (figura 3).

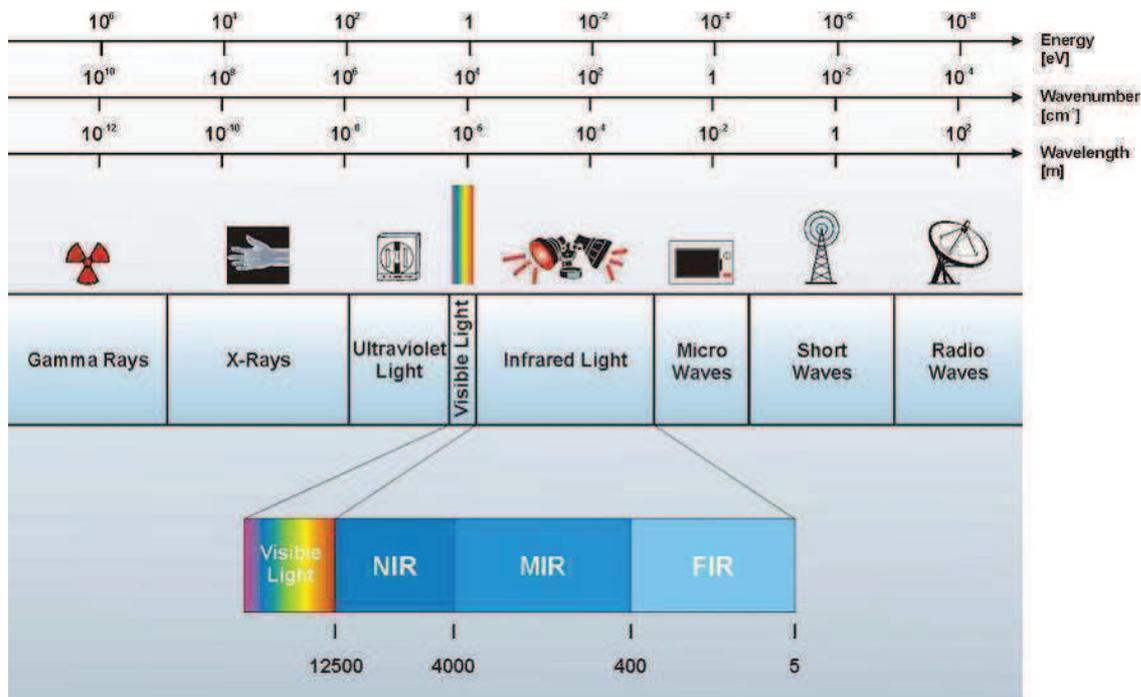


Figura 3  
Rappresentazione grafica delle zone dello spettro elettromagnetico

La radiazione rivela la sua natura corpuscolare quando interagisce con la materia. Essa non trasmette una quantità di energia continua ma trasmette “pacchetti” di energia quantizzati; può essere quindi vista come un flusso di particelle dette fotoni.

Quando l'energia di una radiazione va incontro a quella di una molecola che sta vibrando, c'è un trasferimento netto di energia che può avvenire solo ed unicamente se il fotone ha una frequenza, e quindi un'energia, uguale a quella necessaria per far passare la molecola dallo stato fondamentale a quello eccitato.

Ciò può essere rappresentato come variazione di energia in ordinata e lunghezza d'onda in ascissa, ovvero come uno spettro (figura 4).

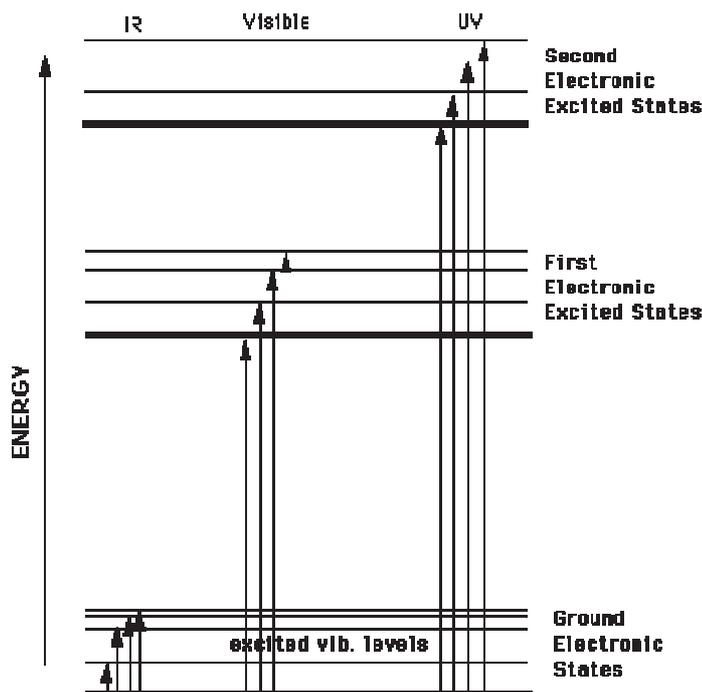


Figura 4  
stati energetici quantizzati di un atomo

L'energia più bassa corrisponde alla configurazione più stabile detta “configurazione di base”, il livello successivo corrisponde al primo livello eccitato.

Se un fotone di energia uguale al dislivello tra le due configurazioni considerate colpisce una molecola, un elettrone che si trova allo stato di base possiede una certa probabilità di portarsi allo stato eccitato: il fotone è stato assorbito. Dopo un certo tempo, tipicamente di  $10^{-8}$  secondi, l'elettrone ritorna allo stato base ed emette un'energia uguale al salto di energia tra i due livelli.

Conoscendo l'intensità della radiazione incidente e di quella emessa, si può risalire alla frequenza della radiazione che è stata assorbita e quindi al salto energetico a cui è andata incontro la molecola. Infine, sapendo che i salti con un dato livello energetico possono interessare solo certe molecole, si può capire quali molecole costituiscono la materia. Per questi motivi, l'assorbimento o l'emissione di energia da parte della materia è uno dei più importanti marchi d'identificazione forniti dalla natura [13].

Una radiazione della frazione IR dello spettro è caratterizzata da una bassa energia; i fotoni non sono in grado di eccitare la molecola ma possono indurre moti vibrazionali degli elettroni in modo tale che il suo momento dipolare elettrico cambia durante la vibrazione.

I fondamentali tipi di vibrazione causati dall'incidenza di una radiazione della frazione **IR** dello spettro sono:

- **stretching** (stiramento), ovvero la vibrazione del legame lungo il piano, in conseguenza al quale varia ritmicamente la distanza interatomica e può essere simmetrico o asimmetrico;
- **bending** (deformazione) ovvero un movimento a forbice, caratterizzato da una variazione dell'angolo tra due atomi nel piano (scissoring e rocking) e fuori piano (wagging e twisting).

### 5.2.2 Spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR)

La spettroscopia del vicino infrarosso analizza gli stati vibrazionali delle molecole utilizzando onde elettromagnetiche con un'energia dei fotoni nell'intervallo tra  $2,65 \cdot 10^{-19}$  e  $7,96 \cdot 10^{-20}$  J a cui corrisponde una lunghezza d'onda tra 780 e 2500 nm.

Nella zona dello spettro elettromagnetico definita come vicino infrarosso (NIR), le energie in gioco sono atte a determinare una variazione nel moto vibrazionale delle molecole e in particolare dei legami in esse presenti. Gli assorbimenti degli stati fondamentali cadono quasi sempre nella regione tra 2500 e 15000 nm ( $4000-660 \text{ cm}^{-1}$ ) definita come medio infrarosso (MIR), mentre quelli degli stati con frequenze multiple a quella dello stato fondamentale, detti overtones, sono caratteristici della zona del NIR.

La spettroscopia nel vicino infrarosso permette, quindi, di ottenere un'analisi di tipo quantitativo nel determinare componenti che contengono legami **C-H**, **N-H**, **O-H** ad esempio per la misura di acqua, fenoli, alcoli, ammine ed idrocarburi, consentendo sia di effettuare un'analisi diretta sul campione sia di ottenere uno spettro caratteristico del campione.

Le misure NIR possono essere eseguite sia in trasmittanza che in riflettanza; nel caso dell'acquisizione dei dati in trasmittanza ciò che viene misurato è l'intensità della luce trasmessa attraverso il campione rispetto all'intensità della luce incidente:

$$T = I/I_0$$

Lambert e Beer osservarono che la quantità di radiazione assorbita o trasmessa da una soluzione o da un mezzo era funzione esponenziale della concentrazione della sostanza assorbente contenuta e della lunghezza del cammino percorso dalla radiazione attraverso il campione.

Integrata per uno spessore finito, secondo la legge di Lambert e Beer, è definita assorbanza di un campione:

$$A = \log I/T = k_a c l$$

dove  $K_a$  è il coefficiente di estinzione molare,  $c$  è la concentrazione ed  $l$  è la lunghezza del cammino ottico della radiazione incidente attraverso il campione.

Nel caso di acquisizione di dati in *riflettanza*, ciò che viene misurato è l'intensità della luce riflessa rispetto all'intensità della luce incidente:

$$R = I_{rifl} / I_0$$

Secondo la legge di Kubelka-Munk, la riflettanza dipende dal coefficiente di assorbimento  $K_R$  e dal coefficiente di dispersione  $s$  di un campione:

$$f(R_\infty) = K_R / s$$

dove  $R_\infty$  è la riflettanza assoluta.

A livello sperimentale viene normalmente misurata la riflettanza relativa, cioè l'intensità della luce riflessa dal campione rispetto all'intensità della luce riflessa da un materiale di riferimento, con una riflettanza assoluta alta e costante (teflon, MgO, dischi di materiale ceramico). Nella pratica, la riflettanza relativa è spesso convertita in assorbanza apparente  $A'$ , utilizzando una relazione empirica tra concentrazione di analita e riflettanza simile alla legge di Lambert e Beer:

$$A' = \log 1/R = a' c$$

Tuttavia, se la matrice è altamente assorbente o l'analita mostra bande di assorbimento piuttosto intense la relazione lineare tra assorbanza e concentrazione viene meno. Sia per la trasmittanza che per la riflettanza le equazioni proposte sono ricavate da situazioni ideali e sono applicabili solamente quando gli assorbimenti sono deboli o il prodotto tra concentrazione e coefficiente di estinzione molare è piccolo. Nel caso della spettroscopia NIR, l'assorbimento avviene da parte della matrice, che non è separabile dall'analita, e può assorbire alle medesime lunghezze d'onda del composto in esame.

L'interazione con la materia può avvenire quindi in diversi modi, ovvero può essere assorbita dal campione, riflessa, oppure trasmessa in parte o completamente attraverso il campione. Il modo ed il grado con cui questi effetti avvengono dipendono dallo stato fisico del campione e dal sistema di lettura utilizzato. Capire queste interazioni è importante per

comprendere le potenzialità di uno strumento NIR. I sistemi a trasmissione sono usati principalmente per campioni allo stato liquido o per strati sottili di solidi, mentre la modalità di riflessione della radiazione è più utile per campioni allo stato solido. Se il campione non riflette e non trasmette la radiazione in modo sufficiente, è possibile utilizzare come parametro la misura della trasflettanza. In questo caso la radiazione penetra nel campione, che ne assorbe una parte, poi viene riflessa su una superficie non assorbente posta sul fondo della cella e ritrasmessa attraverso il campione al detector.

Sono attualmente disponibili diverse tipologie di sistemi di presentazione, strettamente dipendenti dalla tecnologia di costruzione dello strumento.

Spesso poi la spettroscopia è affetta da fenomeni di scattering, ovvero di diffrazione della radiazione sulla superficie, specialmente nel caso dell'acquisizione su campioni solidi: infatti, tanto più si ha scattering della radiazione incidente, tanto meno in profondità penetra il raggio e perciò tanto minore sarà l'assorbanza (apparente o reale). I fenomeni di scattering dipendono essenzialmente dalle proprietà fisiche del campione (dimensione delle particelle, ambiente cristallino) e possono provocare spostamenti nella linea di base dello spettro e indurre fenomeni di col linearità alle diverse lunghezze d'onda [14].

La dipendenza del segnale dalle proprietà fisiche del campione, che è molto utile quando la tecnica NIR è impiegata per determinare parametri fisici, è un notevole svantaggio quando è utilizzata per determinazioni qualitative come l'identificazione di prodotti o il monitoraggio di parametri chimici di un processo (umidità, omogeneità dei campioni), e per l'analisi quantitativa di uno o più componenti. Per ovviare a ciò, sono stati messi a punto alcuni pretrattamenti di tipo matematico da eseguirsi sugli spettri prima dell'elaborazione statistica vera e propria.

### 5.2.3 Strumenti

Un generico spettrometro che emette nella regione dell'infrarosso, è costituito da un gruppo d'elementi di base: una sorgente di radiazioni, un selezionatore di lunghezze d'onda, un sistema di esposizione del campione alla radiazione e un detector, secondo la schema illustrato in figura 5:



Figura 5  
Schema di uno spettrometro

### 5.2.4 Tecniche di campionamento

La strumentazione NIR è in continua crescita, grazie allo sviluppo di fibre ottiche che permettono di acquisire gli spettri in modo diretto e semplice ponendo la punta della fibra stessa sulla superficie e/o all'interno del campione.

In caso di misure su solidi disomogenei, invece, il sistema di campionamento più adatto è quella della sfera integratrice, il cui principio di funzionamento è illustrato in figura 6.

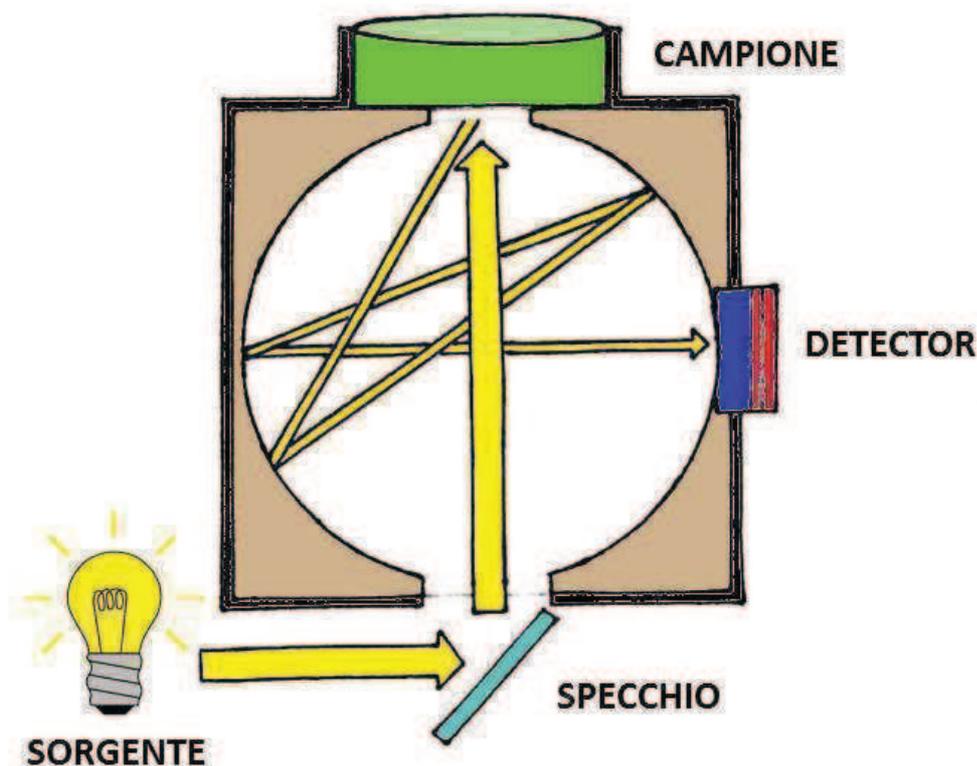


Figura 6  
Principio di funzionamento di una sfera integratrice.

La radiazione colpisce uno specchio esterno alla sfera che a sua volta la indirizza sul campione. La parte di radiazione non assorbita dal campione è riflessa verso la superficie interna della sfera ed è raccolta dal detector. La sfera è ricoperta interamente in oro, ha un'area di misura di 15 mm di diametro e ha un sistema di riferimento interno. Il campione viene generalmente raccolto in un contenitore con fondo trasparente alla radiazione e dotato di una geometria tale da permettere anche la rotazione del campione, operazione necessaria quando si lavora con campioni non omogenei.

La spettroscopia NIR è largamente impiegata nell'industria alimentare per l'analisi compositiva centesimale di materie prime, intermedi di lavorazione, così come di prodotti finiti.

### ***5.2.5 La spettroscopia nel medio infrarosso (MIR)***

La spettroscopia nel medio infrarosso (MIR, anche se spesso indicato come IR) è una tecnica basata sull'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche nella regione dello spettro di numeri d'onda compresi tra 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Lo spettro di un prodotto alimentare acquisito mediante spettroscopia MIR è in grado di rivelare informazioni sulla natura dei legami presenti all'interno del campione e quindi sulla sua struttura molecolare. Tale tecnica spettroscopica può pertanto trovare impiego sia nell'analisi quantitativa che nell'analisi qualitativa di un prodotto alimentare. La spettroscopia nel medio infrarosso ha avuto un largo impiego nel settore dell'industria farmaceutica al fine dell'identificazione di composti chimici, grazie allo stretto legame esistente tra la natura chimica della materia e la sua capacità di assorbimento delle radiazioni MIR. L'esposizione dei composti ai raggi infrarossi provoca infatti l'eccitazione dei legami covalenti presenti all'interno della molecola e il conseguente salto energetico dallo stato fondamentale della struttura molecolare a quello eccitato.

La lunghezza d'onda alla quale si verifica una vibrazione molecolare può essere facilmente associata ad una determinata tipologia di legame, nonché ad una specifica modalità vibrazionali (di stretching o bending). L'energia vibrazionale è inoltre strettamente correlata alla forza di legame e alla massa del sistema molecolare. Sono queste le caratteristiche che permettono l'identificazione di specifiche identità chimiche. In tabella 1 sono riportate le frequenze di assorbimento della radiazione MIR di alcuni gruppi molecolari.

Tabella 1: Frequenze di assorbimento della radiazione MIR di alcuni gruppi molecolari

Numero d'onda (cm <sup>-1</sup> )	Gruppo funzionale	Modalità vibrazionale	Costituente
<b>Regione delle impronte digitali</b>			
1036,1088	C-O	Stretch	
1060	C-O	Stretch	Carboidrati
900-1200	C-O, C-C, O-H	Stretch	Carboidrati
1115-1170	C-O	Stretch	
1232	C-H	Bend	
1240	C-O	Stretch	
1371	C-H	Bend	
1274,1372, 1445, 1486	O-C-H, C-C-H, C-O-H	Bend	
1400, 1477	C-H	Bend	
<b>Regione dei gruppi funzionali</b>			
1535-1570	Amido II	Stretch	Proteine
1620-1690	Amido I	Stretch	Proteine
1640	O-H	Bend	Umidità
1600-1900	O-H	Bend	Ac. Organici
1700-1765	C=O	Stretch	Lipidi
2869	CH <sub>2</sub>	Stretch	Lipidi
2926	CH <sub>3</sub>	Stretch	Lipidi
3047-3703	O-H	Stretch	Umidità

I recenti progressi nell'ambito della spettroscopia MIR (spettroscopia FT-IR) e le relative tecniche di "presentazione" dei campioni (cristalli in riflettanza attenuata) hanno condotto al crescente interesse verso tale tecnica in quanto si tratta di una metodica rapida, non distruttiva e relativamente economica che produce un grandissimo numero di informazioni attraverso un'unica analisi.

### **5.2.6 Lo strumento FT-IR**

Il principale componente di uno spettrometro FT-IR è l'interferometro. Il segnale che arriva al detector produce un interferogramma che contiene le informazioni spettrali riguardanti il campione. L'interferogramma è quindi facilmente digitalizzato attraverso l'applicazione di un algoritmo matematico (la trasformata di Fourier): in questo modo si ottiene un grafico delle assorbanze tipiche di ogni legame molecolare presente nella sostanza analizzata per ottenere un incremento del segnale rispetto al rumore di fondo si opera generalmente una media tra più di un interferogramma.

Prima di analizzare ogni campione, si raccoglie uno spettro di background attraverso un'analisi in bianco. Rapportando ogni singola analisi al relativo background si produce uno spettro di assorbanza o trasmittanza, nel quale il rumore di fondo legato alle condizioni esterne è eliminato.

Un altro vantaggio correlato all'utilizzo della spettroscopia FT-IR è che tale sistema è calibrato al fine di provvedere ad una stabilità duratura dello strumento.

Le tecniche di presentazione dei campioni per la valutazione in trasmissione sono sempre state le più comunemente impiegate per il campionamento e l'analisi di gas, liquidi, paste e polveri. Tuttavia, grazie alla facilità di collocazione del campione e di pulizia dello strumento, la tecnica della riflettanza totale attenuata (ATR) è divenuta il metodo di più largo impiego per l'analisi delle sostanze liquide, delle paste e persino delle polveri.

Tale metodica si basa sul principio di trasmissione della radiazione attraverso un elemento ottico chiamato IRE (elemento interno di riflettanza) [15].

In questo sistema, il raggio luminoso attraversa il cristallo ATR e viene riflesso all'interfaccia cristallo/campione; l'angolo di incidenza impiegato permette di ottenere più di una riflessione del raggio ad opera del campione.

In ogni punto in cui le radiazioni colpiscono l'interfaccia cristallo/campione, esse penetrano per una distanza di circa 2  $\mu\text{m}$  all'interno della sostanza in analisi e subiscono un decadimento logaritmico "come un'onda" all'interno del mezzo attraversato. L'energia riflessa è pertanto ridotta a causa di un parziale assorbimento della radiazione ad opera del campione; l'informazione relativa alla quantità di energia assorbita è rilevata dal detector, con la conseguente rappresentazione di uno spettro. I materiali generalmente impiegati per la produzione dei cristalli IRE sono caratterizzati da un altissimo indice di rifrazione; tra questi i più comuni sono seleniuro di zinco e il germanio (Ge).

### **5.2.7 Analisi termica differenziale (DSC)**

La calorimetria a scansione differenziale (DSC) è una tecnica analitica strumentale che consente di valutare i cambiamenti delle proprietà chimico-fisiche della materia in funzione della temperatura attraverso la rivelazione dei cambiamenti termici associati alle fasi di transizione come cristallizzazione, fusione e transizioni vetrose. Questa tecnica presenta indiscutibili vantaggi tra cui: estrema versatilità, semplicità applicativa, rapidità, scarso o nullo impatto ambientale, utilizzo di campioni tal quali senza necessitare di modifica delle caratteristiche iniziali.

Il calorimetro differenziale a scansione è uno strumento che può essere utilizzato per caratterizzare transizioni del primo ordine (fusione: denaturazione proteica, gelatinizzazione dell'amido, fusione del grasso) o del secondo o pseudo secondo ordine (transizione vetrosa: sistemi a base di granuli di amido o alimenti congelati). Con tale strumento è possibile inoltre studiare la stabilità ossidativa dei grassi, la purezza degli aromi, il procedere di reazioni enzimatiche, la crescita microbica o per sviluppare modelli di previsione della qualità degli alimenti, nonché simulare i trattamenti termici. È stata applicata anche alla cristallizzazione dei grassi e si è rivelata un utile complemento delle tecniche analitiche più tradizionali come la gascromatografia e la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa.

Il calorimetro a scansione differenziale confronta il passaggio di flusso termico del campione con quello di un materiale di riferimento inerte sia in fase di riscaldamento che di raffreddamento. Dall'analisi in DSC si ottengono dei termogrammi caratterizzati da picchi endotermici e/o esotermici, la cui area è proporzionale all'entalpia assorbita o persa dal campione durante la transizione di fase; questa si verifica durante una specifica scansione di temperatura e dipende dalla composizione e dalle proprietà fisiche del campione in esame.

L'analisi calorimetrica si svolge all'interno di una piccola fornace all'interno del calorimetro, resistente alla corrosione, che si scalda e si raffredda rapidamente. La temperatura della fornace viene misurata e controllata da una resistenza di platino.

Il campione sottoposto ad analisi può essere allo stato liquido, solido, in forma di polvere, di film o di granuli, e deve essere ben distribuito nel porta campione (capsula di alluminio usa e getta) e sempre tenuto sotto costante raffreddamento. Tramite l'unità di controllo, una volta inseriti campione e riferimento nella fornace, si chiude ermeticamente la stessa in modo da isolare l'ambiente di prova dall'esterno.

Viene poi caricato il programma termico (solitamente una rampa lineare di temperatura) e all'interno della fornace contenente il materiale da analizzare viene creata un'atmosfera

inerte con un flusso continuo ed uniforme di azoto. Iniziata la prova, il calore ceduto dalla fornace riscalda sia il campione che il riferimento in egual modo. Durante tutto l'arco dell'esperimento un sistema di termocoppie raccoglie i dati di temperatura. L'elaborazione dei dati consiste nel rilevare i flessi di un grafico che riporta il flusso termico espresso in W/g in funzione della temperatura espressa in °C. La visualizzazione mediante software dei termogrammi permette di calcolare l'entalpia correlata al processo dall'area del picco esotermico o endotermico associato alla transizione di fase e i valori di temperatura iniziale e finale del processo stesso.

### ***5.2.8 Applicazioni della tecnica DSC all'analisi degli oli vegetali***

In ambito applicativo nel settore degli oli vegetali si può far riferimento alle attività svolte dal gruppo di ricerca del Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università di Parma in collaborazione con altri ricercatori Italiani e stranieri, che ha intrapreso a partire dal 2005, uno studio di valutazione sulla applicazione della tecnica DSC a matrici grasse e ad oli di origine vegetale rivolgendo particolare attenzione allo studio della sua applicabilità all'olio di oliva.

Sono stati presi in considerazione diversi ambiti di ricerca tra cui :

- la correlazione tra le proprietà termiche con le analisi relative alla composizione chimica di oli di oliva extravergini monovarietali [16-18] per interpretare le correlazioni tra composizione chimica e parametri qualitativi caratterizzanti oli prodotti da una sola varietà di olivo e proprietà termiche;
- l'individuazione di frodi legate all'aggiunta di oli a minor valore commerciale (olio di nocciola raffinato o olio di girasole ad alto contenuto di acido oleico) in olio extravergine di oliva [19] per una determinazione qualitativa rapida e semplice di questa pratica illecita diffusa nel settore degli oli extravergini di oliva;
- la discriminazione di oli di oliva appartenenti a diverse categorie commerciali sulla base dei diversi termogrammi ottenuti [20];
- l'influenza del riscaldamento a microonde sulle proprietà termiche di differenti categorie commerciali di oli di oliva [21] con la relativa valutazione delle modifiche delle proprietà termiche in funzione del grado di ossidazione raggiunto;
- la valutazione delle variazioni indotte nelle proprietà termiche in raffreddamento dalla conservazione degli oli durante test di invecchiamento in condizioni di ossidazione accelerata per olio di oliva [22] simulando condizioni che meglio ricalcano quelle di un prolungato stoccaggio del prodotto.

Da queste attività di ricerca risulta che le proprietà termiche che si ottengono dai profili di cooling e melting di un olio forniscono importanti informazioni sulle sue caratteristiche qualitative, conservative ed ossidative.

### 5.2.9 Il naso elettronico

L'identificazione delle sostanze volatili può essere effettuata in modo accurato e preciso attraverso i tradizionali metodi di analisi chimica strumentale, principalmente: la gascromatografia (GC) combinata con la spettrometria di massa (MS). Per contro, tali metodi di analisi sono decisamente costosi, richiedono personale specializzato per il loro utilizzo e raramente possono essere impiegati per monitoraggi di processo o in ambienti diversi dai laboratori. Ciò ha determinato un crescente interesse per nuovi sistemi di analisi che possano fornire informazioni anche parziali sulle miscele di sostanze volatili (ad esempio un controllo di qualità, senza la necessità di determinare l'esatta composizione chimica).

In tale ambito si inseriscono i sensori chimici, dispositivi che convertono una grandezza chimica, generalmente una variazione di concentrazione o pressione parziale di un gas o di una miscela di gas, in un segnale elettrico. Fra i vari tipi di sensori chimici possiamo citare le classi principali, in base al loro principio di funzionamento: *sensori conduttometrici*, *sensori piezoelettrici*, *sensori elettrochimici o amperometrici* e *MOSFET (metal-oxidesemiconductor field-effect-transistor)*.

Due sono le tipologie di sensori appartenenti alla prima classe: gli ossidi metallici semiconduttori (*MOS: metal oxide semiconductor*) ed i polimeri conduttori (*CP: conducting polymer*). Entrambi esibiscono una variazione di conducibilità elettrica quando esposti ad una atmosfera contenente ossigeno ed altri gas- La variazione di resistenza del dispositivo si può misurare molto semplicemente applicando una piccola differenza di potenziale ai capi degli elettrodi e sfruttando la legge di Ohm; tali dispositivi hanno infatti un comportamento ohmico all'interno dell'intervallo  $\pm 10$  V. I sensori a semiconduttore tipicamente disponibili sul mercato hanno come materiale sensibile ossido di stagno ( $\text{SnO}_2$ ), ossido di zinco ( $\text{ZnO}$ ), ossido di titanio ( $\text{TiO}_2$ ), ossido di tungsteno ( $\text{WO}_3$ ).

L'importanza della riproducibilità del dispositivo risulta evidente da quando è stato introdotto il concetto di naso elettronico, come insieme (*serie*) di sensori.

Questi sensori presentano tuttavia alcuni inconvenienti: sono generalmente non selettivi nei confronti di una determinata specie gassosa, mostrano una cross-sensibilità all'umidità, tendono a modificarsi nel tempo (problema della stabilità della risposta o *drift*) rendendo

necessaria una taratura periodica e necessitano di essere riscaldati a temperature fra i 200 ed i 400 °C per poter funzionare. Infatti a temperatura ambiente sarebbero troppo isolanti. Per incrementare la selettività dei singoli sensori sono stati compiuti numerosi tentativi, soprattutto depositando catalizzatori sulla superficie del film in modo da favorire solo le reazioni desiderate. In realtà si può differenziare la risposta con l'utilizzo di catalizzatori ma non si è ancora riusciti a creare un sensore sensibile esclusivamente ad una specie gassosa.

### **5.3 L'analisi statistica multivariata quale strumento per l'interpretazione dei risultati analitici**

Con le denominazioni scienze omiche che si sono diffuse ampiamente negli ultimi anni si indica l'applicazione in diversi campi scientifici dell'approccio fruttuoso della metabolomica. Quest'ultima denominazione indica lo studio sistematico delle esclusive impronte chimiche lasciate da specifici processi cellulari. Il primo vero lavoro scientifico che ha visto l'applicazione della metabolomica risale a più di 40 anni fa [23]. Infatti nel 1971 Pauling pubblicò un lavoro [23] in cui l'idea concepita insieme ai suoi collaboratori era che i dati ricchi di informazioni che riflettono lo stato funzionale di un sistema biologico complesso risiede nel modello quantitativo e qualitativo dei metaboliti nei fluidi corporei. Vent'anni dopo questo approccio fu ampiamente applicato per via della più diffusa disponibilità degli strumenti informatici e statistici necessari a "trattare" tali informazioni. Normalmente nelle scienze omiche si utilizzano tecniche separative e spettrometriche e risonanza magnetica nucleare combinate con metodi fisici di analisi accoppiati a tecniche statistiche multivariate (figura 7).

Nella stessa direzione vanno gli studi che prevedono l'applicazione di strumenti fisici accoppiati a metodi di trattamento statistico dei dati, in tali casi inoltre, a differenza dei processi di analisi omica possono essere eliminate o ridotte le manipolazioni ed i pretrattamenti dei campioni che spesso hanno l'obiettivo di estrarre e concentrare alcune specifiche molecole ma che possono rappresentare fonti di errori e di interferenza. L'utilizzo di mezzi e strumenti fisici accoppiati a metodi statistici permettono di abbattere i costi ed i tempi necessari per le analisi classiche ed allo stesso tempo possono fornire un insieme diverso di informazioni che riguardano tanto la qualità come l'autenticità di prodotti.

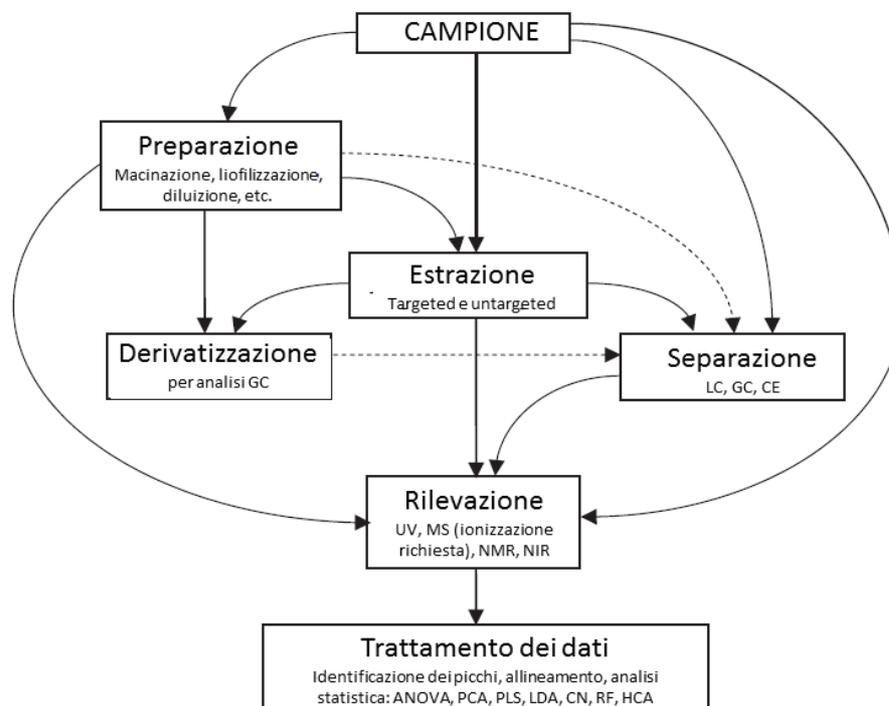


Figura 7

Rappresentazione schematica del processo di analisi omica (rielaborato da [24]).

Per il buon funzionamento di tali metodi è necessaria la costruzione di modelli statistici robusti che utilizzino set di dati correttamente raccolti e rappresentativi del campo di applicazione.

Secondo la definizione dell'enciclopedia Treccani [25] l'analisi statistica multivariata è l'insieme dei metodi statistici e delle tecniche usati nello studio della variazione simultanea di due o più variabili casuali. Date le distribuzioni congiunte di due o più variabili, il sistema più utile per analizzare i dati è quello di rappresentarli sotto forma tabellare o matriciale in cui ciascuna riga rappresenta le caratteristiche osservate sul generico elemento, mentre ciascuna colonna rappresenta la variabilità della stessa caratteristica sui diversi elementi. In particolare, se la matrice dei dati è esprimibile linearmente in funzione di una matrice di variabili indipendenti, si parla di modello lineare multivariato.

Una distinzione essenziale nell'analisi multivariata è se si tratti di analizzare un sistema di covarianza tra gruppi (gli oggetti da esaminare appartengono a più di una popolazione) oppure entro gruppi (gli oggetti appartengono a un'unica popolazione). Le tecniche usate nel primo caso mirano a porre in evidenza un'eventuale disomogeneità dei campioni, e lo

scopo dell'analisi multivariata può essere quello di determinare se i vettori medi delle popolazioni siano o meno uguali (ed è il caso dell'analisi multivariata della varianza), oppure quello di trovare combinazioni lineari delle variabili che massimizzino le differenze tra gruppi preesistenti (analisi discriminante) [25].

Esistono inoltre metodi che consentono di raggruppare gli oggetti a seconda del grado di somiglianza che essi presentano; questi metodi vanno generalmente sotto il nome di *analisi dei clusters*, e lo scopo principale dell'analisi è quello di risolvere una raccolta eterogenea e unica di oggetti in una serie di suddivisioni omogenee al loro interno. Quando gli oggetti da esaminare sono tratti da un'unica popolazione, l'attenzione è rivolta innanzitutto ai modi di semplificare la struttura dei dati. Così, mentre l'analisi dei *clusters* tende a raggruppare quelle variabili che sono altamente correlate, l'analisi dei fattori ha lo scopo di risolvere le correlazioni tra variabili in quelle che si ritengono le loro cause determinanti, cioè di esprimere la covarianza in termini di un certo numero di fattori (inferiori al numero delle variabili) che spieghino una grande parte della varianza e della covarianza delle variabili originarie [25].

## 6. Conclusioni

Partendo dalle precedenti esperienze di ricerca [26, 27], incentrate sull'impiego della spettroscopia nel medio infrarosso (MIR) a trasformata di Fourier (FT-IR) per valutare il contenuto in acidi grassi, il numero di perossidi ed altri indici ossidativi di oli extravergini di oliva, è stato ideato il lavoro realizzato nell'**Articolo 2**. Nell'**Articolo 2** è stato messo a punto, per la prima volta, un metodo di analisi basato nell'acquisizione di spettri mediante ATR-FTIR e successivo trattamento di dati mediante l'analisi statistica dei minimi quadrati parziali (PLS, partial least squares). In particolare, tale lavoro permette di valutare contemporaneamente il contenuto in acqua, il contenuto totale in composti fenolici e l'attività antiossidante dell'olio che come già discusso sono fortemente connessi con la qualità e con le proprietà salutistiche attribuite agli oli vergini di oliva. L'**Articolo 7**, l'**Articolo 12** e l'**Articolo 13** si inseriscono nello stesso ambito di ricerca, ovvero quello di applicare l'FT-IR per valutare altri parametri qualitativi dell'olio vergine di oliva. In particolare, nell'**Articolo 7** il metodo spettroscopico è stato utilizzato per valutare il contenuto in acidi grassi ossidati (OFA) che rappresentano i prodotti secondari dell'ossidazione lipidica e pertanto connessi con l'invecchiamento e la shelf life degli oli vergini. Nell'**Articolo 7**, è stato realizzato un modello predittivo del contenuto in OFA mediante il trattamento statistico della regressione lineare multipla (MLR) degli spettri acquisiti mediante ATR-FTIR. L'**Articolo 12**, di recente pubblicazione, documenta la messa a punto di un metodo che utilizza l'acquisizione di spettri mediante ATR-FTIR e successivo trattamento statistico PLS per predire il contenuto in alchil esteri in oli d'oliva. Come ampiamente discusso nell'introduzione, il contenuto in alchil esteri è connesso tanto con aspetti qualitativi quanto con la genuinità degli oli vergini di oliva. Anche l'**Articolo 13** utilizza la combinazione degli spettri acquisiti con la tecnica ATR-FTIR ed il successivo trattamento statistico PLS per stabilire in questo caso la qualità della materia prima da cui gli oli sono stati prodotti, ed in particolare il grado di attacco delle olive da *Bactrocera oleae* che rappresenta una delle principali cause del decadimento qualitativo degli oli vergini di oliva. Nell'**Articolo 4** è stata utilizzata sempre la spettroscopia (in questo caso oltre alla MIR anche la Vis-NIR) per acquisire spettri che sono stati trattati con il metodo statistico PLS per realizzare modelli predittivi per stabilire il grado di stress termico subito da oli sottoposti a riscaldamento.

L'**Articolo 5** e l'**Articolo 9** sono in linea alle esperienze precedenti [26, 27] e con l'**Articolo 4** per quanto riguarda la matrice ed i metodi statistici applicati tuttavia la

metodica di analisi applicata in questi lavori è stata l'analisi termica differenziale (DSC). Nelle precedenti esperienze [16-22] di utilizzo di tali metodi sulle sostanze grasse sono stati valutati soltanto alcuni parametri derivanti dalle curve di cooling e melting. Nell'**Articolo 5** e nell'**Articolo 9** invece, sono stati considerati tutti i punti che costituiscono le curve in accordo a quanto avviene nelle scienze omiche. In particolare nell'**Articolo 5** è illustrato il lavoro di ricerca condotto per la realizzazione di un modello predittivo della composizione in acidi grassi utilizzando DSC accoppiata all'analisi PSL. I modelli di regressione realizzati nell'**Articolo 5** sono risultati in grado di predire tanto la composizione in acidi grassi intesa come gruppi (saturi, monoinsaturi e polinsaturi) così come singoli acidi grassi. L'**Articolo 9** documenta il lavoro di ricerca realizzato accoppiando l'analisi DSC all'analisi dei componenti principali (PCA) allo scopo di realizzare modelli in grado di analizzare le caratteristiche di oli sottoposti a stress termici derivanti da riscaldamento per tempi diversi tanto in forno convenzionale come in forno a microonde. Restando sempre sulla matrice olio, l'**Articolo 3** riporta i risultati della ricerca realizzata con l'uso di un naso elettronico a sensori di ossidi metallici (MOS) in combinazione con l'analisi discriminante lineare (LDA) e una rete neurale artificiale (ANN), per prevedere le caratteristiche sensoriali di oli vergini di oliva. Generalmente, e secondo la normativa vigente, tali caratteristiche sono valutate da un panel di assaggiatori esperti. Il lavoro di ricerca descritto ha mostrato la potenzialità del naso elettronico a sensori di ossidi metallici di fornire risultati analoghi a quelli di un panel. L'**Articolo 8** riporta i risultati di un ulteriore studio applicato agli oli vegetali, in questo specifico lavoro di ricerca è stato messo a punto un nuovo metodo di analisi della composizione in acidi grassi mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiato al trattamento statistico LDA, al fine di realizzare un modello in grado di predire l'origine botanica di oli vegetali utile per evitare frodi molto frequenti. L'ultimo lavoro sull'olio extravergine di oliva è l'**Articolo 11** in cui viene riportato l'attività di ricerca condotta per la realizzazione di un nuovo processo brevettato per la filtrazione degli oli. In questo caso sono state condotte diverse analisi qualitative per la valutazione dei diversi trattamenti condotti durante la sperimentazione. L'analisi PCA ha permesso di individuare l'effetto esplicato dalle diverse tipologie di filtrazione sulle caratteristiche degli oli, in modo da individuare il sistema più idoneo allo scopo. L'**Articolo 1**, l'**Articolo 6** e l'**Articolo 10** riguardano l'attività di ricerca condotta su dei campioni di formaggio. In particolare, l'**Articolo 1** riporta i risultati delle prove sperimentali condotte per la messa a punto di un metodo di analisi ATR-FTIR accoppiato all'analisi LDA per discriminare i processi di conservazione subiti da diversi formaggi pecorini allo scopo di realizzare un

modello in grado di individuare l'effettiva stagionatura obbligatoria per i formaggi a denominazione di origine Formaggio di Fossa di Sogliano al Rubicone e Talamello. Lo stesso obiettivo è stato conseguito nell'**Articolo 6** mediante l'impiego di un naso elettronico MOS applicando l'analisi statistica ANN. Nell'**Articolo 10** è stato realizzato mediante il trattamento statistico LDA degli spettri acquisiti mediante ATR-FTIR per la creazione di un modello predittivo per attestarne l'originalità di formaggi Parmigiano-Reggiano grattugiati.

I risultati di queste attività di ricerca hanno mostrato l'utilità di analizzare la totalità delle informazioni fornite da diversi strumenti di analisi (ad esempio gli interi spettri o l'intero segnale di un sensore MOS) o di poter combinare i dati ottenuti dalle singole analisi per realizzare modelli statistici predittivi o classificativi utili al fine di stabilire la qualità o genuinità di un olio vegetale o più nello specifico di oli extravergini di oliva così come per quanto attiene all'aspetto origine per alcune categorie di formaggi a pasta dura.

La maggior parte delle metodiche analitiche impiegate in questa attività di tesi hanno il vantaggio di non richiedere solventi nonché di poter essere facilmente automatizzabili e di consentire una semplice interpretazione dei risultati grazie all'utilizzo degli strumenti statistici accoppiati.

## 8. Bibliografia

- [1] Lercker, G., Bendini, A., Cerretani, L. Controllo di qualità in "L'Ulivo e L'olio" Bayer CropScience, Ed. Script, Bologna, pp. 606-619, 2009, ISBN: 978-88-902791-6-4.
- [2] Regolamento (UE) N. 1169/2011 del parlamento Europeo e del consiglio del 25 ottobre 2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori. Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea L 304 pp. 18-63, 2011.
- [3] Regolamento (CE) N. 1924/2006 del parlamento Europeo e del consiglio del 20 dicembre 2006 relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea L 404 pp. 9-25, 2006.
- [4] Regolamento (CEE) N. 2568/91 della commissione dell'11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti. Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea L 248 pp.1-109, 1991.
- [5] Cerretani, L., Bendini, A., Barbieri, S., Lercker, G. Osservazioni preliminari riguardo alla variazione di alcune caratteristiche chimiche di oli vergini da olive sottoposti a processi di deodorazione "soft". Rivista Italiana delle Sostanze Grasse 85 (2) , pp. 75-82, 2008.
- [6] Lercker, G., Bendini, A., Cerretani, L. Qualità, composizione e tecnologia di produzione degli oli vergini di oliva. Progress in Nutrition 9 (2) , pp. 134-148, 2007.
- [7] Pérez-Camino, M.D.C., Cert, A., Romero-Segura, A., Cert-Trujillo, R., Moreda, W. Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (15) , pp. 6740-6744, 2008.
- [8] Cercaci, L., Rodriguez-Estrada, M.T., Lercker, G. Solid-phase extraction-thin-layer chromatography-gas chromatography method for the detection of hazelnut oil in olive oils by determination of esterified sterols. Journal of Chromatography A 985 (1-2) , pp. 211-220, 2003.
- [9] Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T., Lercker, G., Compagnone, D., Fernández-Gutiérrez, A. Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (23) , pp. 8918-8925, 2005.

- 
- [10] Lozano-Sánchez, J., Bendini, A., Quirantes-Piné, R., Cerretani, L., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. Monitoring the bioactive compounds status of extra-virgin olive oil and storage by-products over the shelf life. *Food Control* 30 (2) , pp. 606-615, 2013.
- [11] Bertozzi, L., Bocedi, G., La tutela della Dop: l'esperienza del Consorzio. *Agricoltura (suppl. 44)*, pp.27-29, 2010.
- [12] Regolamento (CE) n. 510/2006 del consiglio del 20 marzo 2006 relativo alla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d'origine dei prodotti agricoli e alimentari, *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea L 93*, pp.12-25, 2006.
- [13] Miller, C.E. Chemical Principles of Near-infrared technology, in "Near-infrared technology in the Agricultural and food industry", 2nd edition, American Association of cereal chemist, st. Paul, Minnesota, USA (2001).
- [14] Dahm, T., Manske, D., Tewordt, L. Cooper pair and spin fluctuations in underdoped high-temperature superconductors. *Europhysics Letters* 55 (1) , pp. 93-99, 2001.
- [15] Poston, P.E., Rivera, D., Uibel, R., Harris, J.M. In situ detection of adsorbates at silica/solution interfaces by Fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy using a silica-coated internal reflection element. *Applied Spectroscopy* 52 (11) , pp. 1391-1398, 1998.
- [16] Chiavaro, E., Vittadini, E., Rodriguez-Estrada, M.T., Cerretani, L., Bonoli, M., Bendini, A., Lercker, G. Monovarietal extra virgin olive oils: Correlation between thermal properties and chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (26) , pp. 10779-10786, 2007.
- [17] Chiavaro, E., Vittadini, E., Rodriguez-Estrada, M.T., Cerretani, L., Bendini, A. Monovarietal extra virgin olive oils. Correlation between thermal properties and chemical composition: Heating thermograms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2) , pp. 496-501, 2008.
- [18] Chiavaro, E., Rodriguez-Estrada, M.T., Bendini, A., Cerretani, L. Correlation between thermal properties and chemical composition of Italian virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112 (5) , pp. 580-592, 2010.

- 
- [19] Chiavaro, E., Vittadini, E., Rodriguez-Estrada, M.T., Cerretani, L., Bendini, A. Differential scanning calorimeter application to the detection of refined hazelnut oil in extra virgin olive oil. *Food Chemistry* 110 (1) , pp. 248-256, 2008.
- [20] Chiavaro, E., Rodriguez-Estrada, M.T., Barnaba, C., Vittadini, E., Cerretani, L., Bendini, A. Differential scanning calorimetry: A potential tool for discrimination of olive oil commercial categories. *Analytica Chimica Acta* 625 (2) , pp. 215-226, 2008.
- [21] Chiavaro, E., Barnaba, C., Vittadini, E., Rodriguez-Estrada, M.T., Cerretani, L., Bendini, A. Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part II. Effect on thermal properties. *Food Chemistry* 115 (4) , pp. 1393-1400, 2009.
- [22] Chiavaro, E., Mahesar, S.A., Bendini, A., Foroni, E., Valli, E., Cerretani, L. DSC evaluation of olive oil during accelerated oxidation. *Italian Journal of Food Science* 23 (2) , pp. 164-172, 2011.
- [23] Pauling, L., Robinson, A.B., Teranishi, R., Cary, P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (10) , pp. 2374-2376, 1971.
- [24] Cevallos-Cevallos, J.M., Reyes-De-Corcuera, J.I., Etxeberria, E., Danyluk, M.D., Rodrick, G.E. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science and Technology* 20 (11-12) , pp. 557-566, 2009.
- [25] AA.VV. Treccani.it - Enciclopedia on line. Istituto dell'Enciclopedia Italiana.
- [26] Maggio, R.M., Kaufman, T.S., Del Carlo, M., Cerretani, L., Bendini, A., Cichelli, A., Compagnone, D. Monitoring of fatty acid composition in virgin olive oil by Fourier transformed infrared spectroscopy coupled with partial least squares. *Food Chemistry* 114 (4) , pp. 1549-1554, 2009.
- [27] Mahesar, S.A., Bendini, A., Cerretani, L., Bonoli-Carbognin, M., Sherazi, S.T.H. Application of a spectroscopic method to estimate the olive oil oxidative status. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112 (12) , pp. 1356-1362, 2010.



# ARTICOLO 1

Lerma-García, M.J., Gori, A., **Cerretani, L.**, Simó-Alfonso, E.F., Caboni, M.F.

Classification of Pecorino cheeses produced in Italy according to their ripening time and manufacturing technique using Fourier transform infrared spectroscopy.

*Journal of Dairy Science* 93 (10), pp. 4490-4496, 2010 (IF 2,564).

## ARTICOLO 2

**Cerretani, L.**, Giuliani, A., Maggio, R.M., Bendini, A., Toschi, T.G., Cichelli, A.  
Rapid FTIR determination of water, phenolics and antioxidant activity of olive  
oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112 (10), pp. 1150-1157,  
2010 (IF 1,733).

## ARTICOLO 3

Lerma-García, M.J., **Cerretani, L.**, Cevoli, C., Simó-Alfonso, E.F., Bendini, A., Toschi, T.G. Use of electronic nose to determine defect percentage in oils. Comparison with sensory panel results. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 147 (1), pp. 283-289, 2010 (IF 3,898).

## ARTICOLO 4

Maggio, R.M., Valli, E., Bendini, A., Gómez-Caravaca, A.M., Toschi, T.G., **Cerretani, L.** A spectroscopic and chemometric study of virgin olive oils subjected to thermal stress. *Food Chemistry* 127 (1), pp. 216-221, 2011 (IF 3,655).

## ARTICOLO 5

**Cerretani, L.**, Maggio, R.M., Barnaba, C., Toschi, T.G., Chiavaro, E.  
Application of partial least square regression to differential scanning calorimetry data for fatty acid quantitation in olive oil. *Food Chemistry* 127 (4), pp. 1899-1904, 2011 (IF 3,655).

## ARTICOLO 6

Cevoli, C., **Cerretani, L.**, Gori, A., Caboni, M.F., Gallina Toschi, T., Fabbri, A.  
Classification of Pecorino cheeses using electronic nose combined with artificial  
neural network and comparison with GC-MS analysis of volatile compounds.  
*Food Chemistry* 129 (3), pp. 1315-1319, 2011 (IF 3,655).

## ARTICOLO 7

Lerma-García, M.J., Simó-Alfonso, E.F., Bendini, A., **Cerretani, L.** Rapid evaluation of oxidised fatty acid concentration in virgin olive oil using Fourier-transform infrared spectroscopy and multiple linear regression. *Food Chemistry* 124 (2), pp. 679-684, 2011 (IF 3,655).

## ARTICOLO 8

Lerma-García, M.J., Lusardi, R., Chiavaro, E., **Cerretani, L.**, Bendini, A., Ramis-Ramos, G., Simó-Alfonso, E.F. Use of triacylglycerol profiles established by high performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detection to predict the botanical origin of vegetable oils. *Journal of Chromatography A* 1218 (42), pp. 7521-7527, 2011 (IF 4,531).

## ARTICOLO 9

Maggio, R.M., **Cerretani, L.**, Barnaba, C., Chiavaro, E. Application of differential scanning calorimetry-chemometric coupled procedure to the evaluation of thermo-oxidation on extra virgin olive oil. *Food Biophysics* 7 (2), pp. 114-123, 2012 (IF 2,187).

## ARTICOLO 10

Gori, A., Maggio, R.M., **Cerretani, L.**, Nocetti, M., Caboni, M.F. Discrimination of grated cheeses by Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometric techniques. *International Dairy Journal* 23 (2), pp. 115-120, 2012 (IF 2,401).

## ARTICOLO 11

Bendini, A., Valli, E., Rocculi, P., Romani, S., **Cerretani, L.**, Gallina Toschi, T.  
A new patented system to filter cloudy extra virgin olive oil. *Current Nutrition & Food Science* 9, pp. 43-51, 2013.

## ARTICOLO 12

Valli, E., Bendini, A., Maggio, R.M., **Cerretani, L.**, Toschi, T.G., Casiraghi, E., Lercker, G. Detection of low-quality extra virgin olive oils by fatty acid alkyl esters evaluation: A preliminary and fast mid-infrared spectroscopy discrimination by a chemometric approach. *International Journal of Food Science and Technology* 48 (3), pp. 548-555, 2013 (IF 1,259).

## ARTICOLO 13

Gómez-Caravaca, A.M., Maggio, R.M., Verardo, V., Cichelli, A., **Cerretani, L.**  
Fourier transform infrared spectroscopy-Partial Least Squares (FTIR-PLS)  
coupled procedure application for the evaluation of fly attack on olive oil quality.  
*LWT - Food Science and Technology* 50 (1), pp. 153-159, 2013 (IF 2,545).

## LINK PER CONSULTAZIONE ON-LINE

- Articolo 1** Lerma-García, M.J., Gori, A., **Cerretani, L.**, Simó-Alfonso, E.F., Caboni, M.F. Classification of Pecorino cheeses produced in Italy according to their ripening time and manufacturing technique using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 93 (10), pp. 4490-4496, 2010 (IF 2,564).  
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3199>
- Articolo 2** **Cerretani, L.**, Giuliani, A., Maggio, R.M., Bendini, A., Toschi, T.G., Cichelli, A. Rapid FTIR determination of water, phenolics and antioxidant activity of olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112 (10), pp. 1150-1157, 2010 (IF 1,733).  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.201000356/abstract>
- Articolo 3** Lerma-García, M.J., **Cerretani, L.**, Cevoli, C., Simó-Alfonso, E.F., Bendini, A., Toschi, T.G. Use of electronic nose to determine defect percentage in oils. Comparison with sensory panel results. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 147 (1), pp. 283-289, 2010 (IF 3,898).  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2010.03.058>
- Articolo 4** Maggio, R.M., Valli, E., Bendini, A., Gómez-Caravaca, A.M., Toschi, T.G., **Cerretani, L.** A spectroscopic and chemometric study of virgin olive oils subjected to thermal stress. *Food Chemistry* 127 (1), pp. 216-221, 2011 (IF 3,655).  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.018>
- Articolo 5** **Cerretani, L.**, Maggio, R.M., Barnaba, C., Toschi, T.G., Chiavaro, E. Application of partial least square regression to differential scanning calorimetry data for fatty acid quantitation in olive oil. *Food Chemistry* 127 (4), pp. 1899-1904, 2011 (IF 3,655).  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.041>
- Articolo 6** Cevoli, C., **Cerretani, L.**, Gori, A., Caboni, M.F., Gallina Toschi, T., Fabbri, A. Classification of Pecorino cheeses using electronic nose combined with artificial neural network and comparison with GC-MS analysis of volatile compounds. *Food Chemistry* 129 (3), pp. 1315-1319, 2011 (IF 3,655).  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.126>
- Articolo 7** Lerma-García, M.J., Simó-Alfonso, E.F., Bendini, A., **Cerretani, L.** Rapid evaluation of oxidised fatty acid concentration in virgin olive oil using Fourier-transform infrared spectroscopy and multiple linear regression. *Food Chemistry* 124 (2), pp. 679-684, 2011 (IF 3,655).  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.054>
- Articolo 8** Lerma-García, M.J., Lusardi, R., Chiavaro, E., **Cerretani, L.**, Bendini, A., Ramis-Ramos, G., Simó-Alfonso, E.F. Use of triacylglycerol profiles established by high performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detection to predict the botanical origin of vegetable oils. *Journal of Chromatography A* 1218 (42), pp. 7521-7527, 2011 (IF 4,531).  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.078>

**Articolo 9** Maggio, R.M., **Cerretani, L.**, Barnaba, C., Chiavaro, E. Application of differential scanning calorimetry-chemometric coupled procedure to the evaluation of thermo-oxidation on extra virgin olive oil. *Food Biophysics* 7 (2), pp. 114-123, 2012 (IF 2,187).

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11483-012-9248-1>

**Articolo 10** Gori, A., Maggio, R.M., **Cerretani, L.**, Nocetti, M., Caboni, M.F. Discrimination of grated cheeses by Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometric techniques. *International Dairy Journal* 23 (2), pp. 115-120, 2012 (IF 2,401).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.11.005>

**Articolo 11** Bendini, A., Valli, E., Rocculi, P., Romani, S., **Cerretani, L.**, Gallina Toschi, T. A new patented system to filter cloudy extra virgin olive oil. *Current Nutrition & Food Science* 9, pp. 43-51, 2013.

<http://www.eurekaselect.com/106102/article>

**Articolo 12** Valli, E., Bendini, A., Maggio, R.M., **Cerretani, L.**, Toschi, T.G., Casiraghi, E., Lercker, G. Detection of low-quality extra virgin olive oils by fatty acid alkyl esters evaluation: A preliminary and fast mid-infrared spectroscopy discrimination by a chemometric approach. *International Journal of Food Science and Technology* 48 (3), pp. 548-555, 2013 (IF 1,259).

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2012.03220.x/abstract>

**Articolo 13** Gómez-Caravaca, A.M., Maggio, R.M., Verardo, V., Cichelli, A., **Cerretani, L.** Fourier transform infrared spectroscopy-Partial Least Squares (FTIR-PLS) coupled procedure application for the evaluation of fly attack on olive oil quality. *LWT - Food Science and Technology* 50 (1), pp. 153-159, 2013 (IF 2,545).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.06.007>