

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
SEDE DI CESENA

FACOLTÀ DI AGRARIA

CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA RELAZIONE FINALE

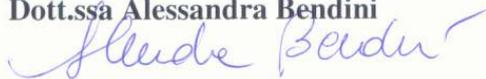
METODI CONVENZIONALI ED INNOVATIVI
PER LA MISURA DEL CONTENUTO D'ACQUA
NEGLI OLI EXTRAVERGINI D'OLIVA

Relazione finale in

Analisi Chimiche dei Prodotti Alimentari

Relatore

Dott.ssa Alessandra Bendini



Presentata da

Anton Kuti



Correlatori

Dott. Enrico Valli



Dott.ssa Eleonora Iaccheri



Sessione terza

Anno Accademico 2011/2012

INDICE

1. SCOPO DELLA RELAZIONE FINALE	4
2. INTRODUZIONE	6
2.1 La filiera olivicola in Italia	6
2.2 La produzione di oli extravergini di oliva di alta qualità	7
2.3 L'olio extravergine d'oliva	8
2.3.1 Variabili di controllo nella trasformazione delle olive	8
2.3.2 Operazioni preliminari	8
2.3.3 Frangitura	11
2.3.4 Gramolatura	12
2.3.5 Separazione	13
2.3.6 Filtrazione	14
2.3.7 Confezionamento e conservazione	15
2.3.8 La resa in olio	15
2.4 Composizione dell'olio d'oliva	16
2.4.1 Composizione in acidi grassi degli oli vergini di oliva	17
2.4.2 Le vitamine	18
2.4.3 I pigmenti	19
2.4.4 Sostanze a struttura fenolica	19
2.4.5 Tocoferoli e tocotrienoli	21
2.4.6 Componenti minori	22
2.4.7 La presenza di acqua nell'olio	22

2.5 Analisi delle proprietà dielettriche	26
2.5.1 <i>Proprietà dielettriche dei prodotti alimentari</i>	26
2.5.2 <i>Stato dell'arte</i>	26
2.5.3 <i>Classificazione delle proprietà dielettriche</i>	28
2.5.4 <i>Fattori che influenzano le proprietà dielettriche</i>	30
2.5.5 <i>Tecniche di analisi</i>	31
2.5.6 <i>Condensatore a piatti paralleli</i>	31
2.6 Misura del contenuto in acqua mediante metodi tradizionali gravimetrici e titrimetrici	33
2.6.1 <i>Metodo titrimetrico di Karl Fisher</i>	33
2.6.2 <i>Determinazione della variazione di peso in seguito a riscaldamento in stufa (ISO 662:1998)</i>	35
3. MATERIALI E METODI	36
3.1 Campioni	36
3.2 Piano analitico	36
3.3 Titolazione volumetrica di Karl Fischer	36
3.3.1 <i>Solventi, reagenti, standard e strumentazioni</i>	36
3.3.2 <i>Reagenti a due componenti</i>	37
3.3.3 <i>Determinazione della concentrazione del titolante con lo standard d'acqua 10,0</i>	37
3.3.4 <i>Avvertenze</i>	38
3.3.5 <i>Procedimento</i>	38
3.4 Determinazione della variazione del peso in seguito a riscaldamento in stufa (ISO 662:1998)	39
3.4.1 <i>Strumentazione</i>	39
3.4.2 <i>Procedimento</i>	40

3.5 Metodo gravimetrico mediante l'utilizzo della Termobilancia	41
3.5.1 <i>Attrezzatura</i>	41
3.5.2 <i>Procedimento</i>	42
3.6 Determinazione del contenuto di acqua mediante metodo capacitivo	42
3.6.1 <i>Attrezzature</i>	42
3.6.2 <i>Procedimento</i>	43
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	44
4.1 <i>Determinazione del contenuto di acqua nei campioni esaminati</i>	44
4.1.1 <i>Metodo gravimetrico in stufa</i>	44
4.1.2 <i>Correlazioni fra le determinazioni analitiche tradizionali</i>	44
4.1.3 <i>Valutazione del contenuto in acqua mediante analisi dielettrica</i>	51
5. CONCLUSIONI	54
6. BIBLIOGRAFIA	56
7. RINGRAZIAMENTI	59

1. SCOPO DELLA RELAZIONE FINALE

Sebbene l'olio extravergine di oliva sia per la maggior parte costituito da trigliceridi, non può essere considerato una matrice omogenea a causa della presenza di numerosi composti minori, tra cui anche tracce di acqua, che vengono trasferiti dal frutto all'olio durante il processo di trasformazione tecnologica. I composti anfifilici come i mono e digliceridi, gli acidi grassi liberi, gli steroli ed i fosfolipidi presenti nell'olio extravergine di oliva, si aggregano spontaneamente all'interfaccia acqua-olio mediante interazioni idrofobiche/idrofiliche per formare aggregati colloidali e dare origine a "micelle inverse". Composti con un certo grado di polarità quali le molecole a struttura fenolica e tracce di aminoacidi e zuccheri si dispongono preferenzialmente all'interno di tali micelle dove si trova l'acqua.

In base a queste considerazioni, assume importanza lo sviluppo di un metodo per la misura dell'acqua presente nell'olio extravergine di oliva che sia sufficientemente rapido ed affidabile.

Attualmente, i metodi comunemente accettati sono la determinazione gravimetrica mediante essiccamento in stufa (ISO 662, 1998) e la determinazione per via titrimetrica basata sul metodo di Karl Fischer (AOAC, 1998). Questi approcci metodologici sono però inficiati da alcuni aspetti negativi, quali ad esempio il tempo di analisi e la quantità di reagenti e solventi impiegati.

Le tecniche dielettriche sono state applicate alla valutazione di diversi parametri compositivi degli oli extravergini di oliva. Il metodo con condensatore a piatti paralleli o altri sistemi di misura dielettrica sono stati applicati alla stima del contenuto di acqua negli oli extravergini di oliva utilizzando frequenze selezionate ed analisi di regressione lineare.

La finalità di questo lavoro sperimentale è di indagare il contenuto di acqua in un ampio set di campioni di oli extravergini di oliva, mediante l'applicazione di diverse metodiche analitiche, sia tradizionali che innovative.

Nella presente sperimentazione si studieranno le correlazioni esistenti tra contenuto in acqua e capacità dielettrica misurata alla frequenza di 2 kHz su un gruppo di 23 campioni di oli extravergini di oliva reperiti dal commercio.

Per verificare l'applicabilità di questo metodo innovativo basato sulle proprietà dielettriche per la determinazione dell'acqua, più semplice e rapido rispetto a quelli tradizionali, che non utilizza solventi, dunque a basso impatto ambientale, si valuterà la correlazione dei risultati ottenuti rispetto ad uno dei metodi tradizionali (nello specifico, la determinazione gravimetrica del contenuto in acqua mediante stufa).

Inoltre, si verificherà, su un gruppo di 60 oli extravergini di oliva reperiti dal commercio, l'esistenza di correlazioni tra i tre metodi "tradizionali" per la determinazione dell'acqua, cioè la determinazione gravimetrica mediante essiccamento in stufa o l'utilizzo della termobilancia e la determinazione titrimetrica di Karl Fisher con sistema automatizzato.

2. INTRODUZIONE

2.1 La filiera olivicola in Italia

La filiera olivicola in Italia è composta da un'ampia base produttiva agricola, a valle della quale si ha un ristretto numero di operatori industriali e commerciali, ed un limitato gruppo di acquirenti per le principali catene distributive. Essa si attesta, nel quadro mondiale, al secondo posto dopo la Spagna per quantità di olio prodotto (Lercker et.al, 2007; Amirante et.al, 2006). Le cultivar che caratterizzano il panorama dell'olivicoltura italiana sono state censite e risultano superiori a 350; esse costituiscono la base dell' eccellenza qualitativa del prodotto, ma nello stesso tempo, tendono a limitare lo sviluppo verso i sistemi produttivi più razionali ed economici (Elaborazioni ISMEA su dati Assistol e Federolio). I frantoi che hanno svolto attività nel periodo 2006-2008 sono stati pari a ca. 6.180 unità. Attualmente si stima che siano in attività ca. 5.700 frantoi con una potenzialità operativa non marginale; ca. 3450 di questi sono localizzati nel meridione ed il 15% (ca. 735) hanno anche piccoli impianti di imbottigliamento (Elaborazioni ISMEA su dati AGEA). La prima fase della trasformazione primaria è soggetta ad un processo di ristrutturazione i cui elementi portanti sono riassumibili in una lenta riduzione del numero dei frantoi, a cui corrisponde una debole crescita della loro dimensione operativa, con la contemporanea introduzione di innovazioni costruttive, come impianti di molitura che operano con logiche marginali. Negli ultimi anni si è registrato, inoltre, un aumento del numero di frantoi aziendali, rispetto ai frantoi sociali o di carattere associativo, segno di un aumento del numero di aziende agricole produttrici che tendono a collocarsi in modo autonomo sul mercato.

2.2 La produzione di oli extravergini di oliva di alta qualità

L'innovazione tecnologica nel settore degli oli extravergini di oliva deve rispondere principalmente all'evoluzione del concetto di qualità. Infatti, la nuova tendenza, sempre più diffusa, è quella di produrre olio extravergine di oliva “di alta qualità”, che fatti salvi gli indici di genuinità e i parametri di alterazione idrolitica e ossidativa, si differenzia dalla classe merceologica “olio extravergine di oliva” per una serie di ulteriori parametri analitici, rispetto a quelli previsti dai limiti di legge, dotati di proprietà salutistiche e peculiari caratteristiche sensoriali (Lercker et.al, 2007; Amirante et.al, 2006). Due indici essenziali sono rappresentati dal contenuto in composti fenolici, che oltre ad influenzare la shelf-life conferiscono le tipiche note di “amaro” e “piccante” (Bendini et al., 2007) e dal contenuto in tocoferoli, responsabili insieme ai precedenti soprattutto delle proprietà salutistiche dell'olio (Servili et al., 2004). Un altro gruppo di sostanze di importanza rilevante per ottenere un olio extravergine di oliva di alta qualità sono i composti volatili, che conferiscono le specificità aromatiche di “fruttato verde”, “fruttato maturo” e i peculiari sentori positivi olfattivi (pomodoro, mandorla, carciofo, erba, etc.) al prodotto (Angerosa et.al, 2004). Infine i pigmenti, pur non influenzando direttamente la qualità sensoriale, impartiscono il colore all'olio e avendo un effetto pro-ossidante alla luce, ne condizionano la shelf-life in funzione della concentrazione on cui vengono trasferiti durante la tecnologia di estrazione (Giuliani et.al, 2011). La tecnologia di estrazione influenza notevolmente le caratteristiche salutistiche e sensoriali dell'olio extravergine di oliva e pertanto deve essere ottimizzata a scapito della resa del prodotto, che è spesso negativamente correlata alla qualità dell'olio (Lercker et.al, 2007; Amirante et.al, 2006).

2.3 L'olio extravergine di oliva

2.3.1 Variabili di controllo nella trasformazione delle olive

La produzione di oli vergini da olive comprende una serie di fasi di lavorazione, che hanno il principale obiettivo di estrarre il prodotto finito dalle olive, cercando di arrecargli il minor danno possibile. Dal momento della raccolta, il frutto subisce delle piccole lesioni che innescano una serie di processi enzimatici che portano ad un degrado del prodotto che si protrarrà durante la conservazione delle olive; da qui la necessità di conservare le olive il meno possibile e di accelerare il più possibile l'avvio delle operazioni di estrazione dell'olio. Per poter ottenere un prodotto di elevata qualità, è quindi necessario partire da una materia prima di buona qualità: il processo di estrazione non consente infatti di aumentare la qualità dell'olio prodotto, ma ne determina una riduzione se la tecnica estrattiva non viene realizzata correttamente.

2.3.2 Operazioni preliminari

Per operazioni preliminari si intendono i passaggi che le olive incontrano dal campo alla frangitura, quindi la raccolta, lo stoccaggio, il lavaggio e la defogliazione. Risultano essere passaggi cruciali per il mantenimento strutturale del frutto e il loro corretto svolgimento è determinante per lo sviluppo di *off-flavours* nel prodotto finito. Il periodo di raccolta deve tener conto della cultivar e dell'andamento climatico relativo all'annata. Il momento ottimale viene raggiunto quando le olive sono a media maturazione. In questo momento si ha il maggior quantitativo di olio e il maggior peso del frutto. Anticipando la raccolta, è possibile ottenere oli ricchi di sostanze fenoliche, con una buona resistenza all'ossidazione e un profilo sensoriale ricco e intenso, a scapito, però, della resa in olio. La raccolta tardiva, invece, porta ad oli acidi e poco stabili, in cui il

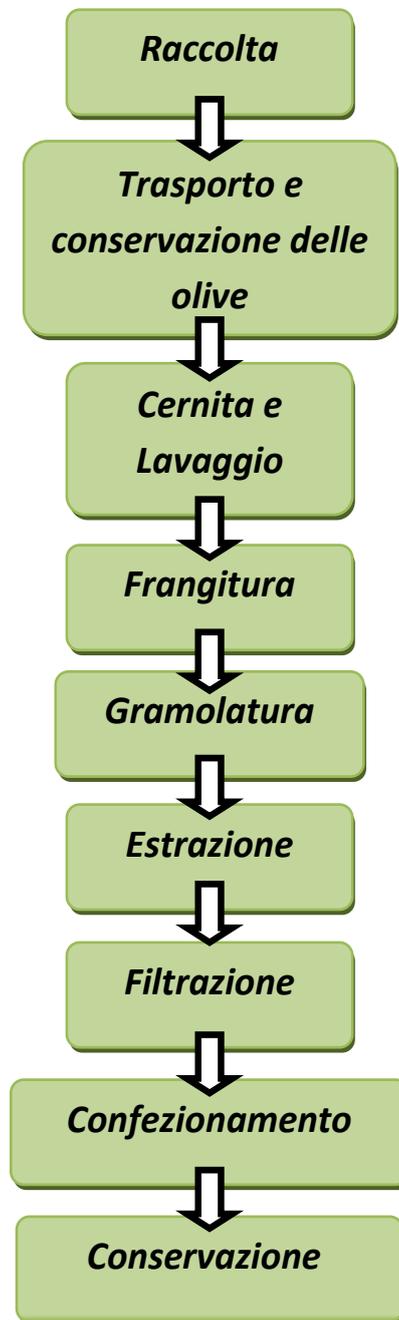


Figura 1 Diagramma di flusso della produzione di olio extravergine d'oliva.

raggrinzimento e la conseguente rottura delle cellule hanno già dato il via alle attività enzimatiche. I sistemi di raccolta sono una delle cause più importanti della produzione di oli scadenti: l'utilizzo di metodi di raccolta violenti provoca ammaccature nelle drupe e favorisce il contatto tra olio ed enzimi, perciò il tempo che intercorre tra la raccolta e la lavorazione delle olive, è determinante sulla qualità dell'olio che verrà prodotto. La raccolta manuale o l'utilizzo di macchinari che la imitano sono preferibili per ottenere un prodotto di qualità.

Il tempo e le modalità di conservazione delle olive sono molto importanti ai fini della qualità organolettica dell'olio prodotto. Le drupe dell'olivo, come tutti i frutti, "respirano" durante la conservazione, con sviluppo di calore e consumo anche di polifenoli. Per lo stoccaggio del prodotto, una volta effettuato mediante sacchi di juta, è preferibile l'utilizzo di cassette forate di media o alta capacità, aperte, in modo da garantire l'aerazione, e non eccessivamente alte per evitare la creazione di strati troppo spessi, che favoriscono lo schiacciamento delle olive.

Per questi motivi è importante contenere il più possibile i tempi di conservazione, tenendo anche conto del grado di danneggiamento dei frutti. Per limitare i processi di decadimento qualitativo è consigliabile disporre le olive su strati più sottili possibile (10-15 cm), in ambienti asciutti e ben areati. Generalmente, si preferisce iniziare il processo di produzione entro 48 ore dalla raccolta. I processi di cernita e lavaggio sono necessari ad allontanare corpi estranei quali foglie e altro materiale proveniente dalla raccolta, specialmente se questa è basata sulla cascola. La presenza di rami o materiale minerale risulta essere dannoso per i macchinari, mentre l'eccesso di foglie, specialmente in impianti moderni che riducono notevolmente le dimensioni di queste in fase di frangitura aumentando la superficie di contatto con l'olio, modifica in maniera significativa le caratteristiche di flavour e di colore dell'olio in quanto lo arricchisce di pigmenti clorofilliani i quali però, rappresentano un elemento pro-ossidante in presenza di luce e, se la conservazione non viene effettuata in condizioni adeguate, la loro presenza può favorire l'innescò di processi

ossidativi e di conseguenza l'invecchiamento precoce del prodotto. L'eliminazione di questi materiali avviene attraverso un flusso d'aria, che allontana le foglie, e con l'immersione delle olive in un bagno d'acqua nel quale i materiali più pesanti precipitano (Lercker *et al.*,2007; Lercker G., Toschi T., 2005).

2.3.3 *Frangitura*

L'influenza della fase di frangitura sulle caratteristiche finali di un olio è dovuta al fatto che i diversi metodi di rottura delle olive sono direttamente legati con i tempi di gramolatura necessari per l'aggregazione delle goccioline di olio. L'utilizzo di molazze tradizionali, ruote in pietra che vengono fatte muovere su un piano in granito su cui sono disposte le olive, prevede una contemporanea gramolatura della pasta di olive che si va formando, limitando quindi questi tempi. Trovano impiego soprattutto in abbinamento al sistema di estrazione tradizionale a presse, ma, sovente, sono utilizzate anche nei processi estrattivi continui, per ottenere oli con caratteri organolettici armonici e più equilibrati. I limiti delle molazze sono rappresentati dal costo elevato e dall'ampio spazio occupato, nonché dalla discontinuità arrecata all'intero processo. Tra i frangitori moderni, uno dei più utilizzati è quello costituito da martelli (fissi o snodati) montati su un disco ruotante che schiacciano le olive contro una griglia forata, la cui dimensione è variabile a seconda della pezzatura della pasta desiderata. I martelli provocano una violenta rottura delle drupe favorendo l'estrazione dei pigmenti clorofilliani e delle sostanze fenoliche (oli dallo spiccato sentore amaro e una buona stabilità ossidativa); presentano l'inconveniente di innalzare la temperatura della pasta di olive, anche se per breve tempo, e di creare emulsioni, che richiedono tempi di gramolatura più lunghi. I martelli possono essere sostituiti con dischi dentati, che lavorano a velocità di rotazione inferiori e che

causano un minore aumento di temperatura, ma che risultano fragili in presenza di materiali estranei (Lercker *et al.*, 2007; Lercker G., Toschi T., 2005).

2.3.4 Gramolatura

L'effetto principale che si vuole ottenere con questa operazione è l'aggregazione delle goccioline di olio estratte dal frutto mediante frangitura, favorendo l'estrazione dalla pasta di olive. Durante questo processo si ottiene, inoltre, una serie di trasformazioni che risultano decisive sul prodotto finale. I composti fenolici passano dalla forma glicosilata, più affine alla fase acquosa, a composti meno polari che si ripartiscono tra l'acqua e l'olio. S'innescano, inoltre, il "ciclo della lipossigenasi", con la conseguente formazione dei composti volatili e definizione del profilo sensoriale dell'olio. I parametri da tenere monitorati in questa fase sono il tempo e la temperatura del processo. L'aumento del tempo di gramolatura determina una maggiore resa in olio, fino al raggiungimento di un plateau legato al metodo di estrazione, ma riduce il contenuto in sostanze antiossidanti e di conseguenza la stabilità ossidativa dell'olio prodotto. Le basse temperature (18-20°C) non permettono una resa soddisfacente e non facilitano l'estrazione di composti fenolici e la formazione di sostanze aromatiche. L'aumento di temperatura favorisce questi processi, ma deve essere controllata con attenzione in quanto controproducente, una volta superate determinate temperature (massimo 35°C, temperature ottimali intorno ai 22-28°C) si innescano processi ossidativi che portano alla formazione di prodotti di ossidazione ed alla diminuzione del contenuto in composti fenolici. I macchinari possono essere orizzontali o verticali: i primi garantiscono un migliore rimescolamento, mentre le gramole verticali riducono il contatto con l'ossigeno, condizione che si può ottenere anche processando la pasta in macchinari riempiti di gas inerte, solitamente azoto (Lercker *et al.*, 2007; Lercker G., Toschi T., 2005; Cerretani *et al.*, 2010).

2.3.5 Separazione

La fase di separazione, o estrazione, prevede l'allontanamento dell'olio dalla pasta di olive attraverso un processo meccanico. Il sistema tradizionale si basa sull'applicazione di pressione (fino a 400 atm). La pasta di olive viene disposta su superfici drenanti (fiscoli) che trattengono la parte solida. La fase liquida che si ottiene è formata da olio e acqua di vegetazione, successivamente separati mediante separatore centrifugo verticale, agendo sul diverso peso specifico delle due fasi. Il carattere discontinuo e il rischio di fermentazioni che possono interessare i fiscoli, difficili da pulire completamente, hanno portato allo sviluppo di sistemi continui centrifughi, verticali o orizzontali (detti decanter). La differenza tra i diversi sistemi di separazione con decanter è rappresentata dalla quantità di acqua aggiunta in fase di separazione. Quest'ultimo fattore ha un effetto sulla qualità dell'olio ed in particolare sul suo contenuto in composti fenolici, che calano con il maggiore impiego di acqua, in quanto esso determina un dilavamento causato dalle modificazioni degli equilibri di ripartizione di tali composti tra olio e acqua. I decanter, inoltre, possono essere differenziati a seconda del numero di "fasi" che consentono di ottenere; i macchinari meno recenti sono a "tre fasi", necessitano dell'aggiunta di maggiori quantitativi di acqua per facilitare la separazione e consentono di ottenere 3 fasi: frazione oleosa, l'acqua di vegetazione e la sansa solida (50% di umidità). Più recenti sono invece i sistemi a due fasi, che portano alla produzione di sole due fasi: quella oleosa e quella formata da sansa umida (65% di umidità). È stato sviluppato anche un sistema a "due fasi e mezzo", che opera come in analogia a quello a tre fasi per quanto riguarda la produzione delle tre frazioni al due fasi per quanto riguarda l'utilizzo dell'acqua in piccole quantità (da 0 a 30 litri a seconda delle caratteristiche della pasta), in modo da limitare le difficoltà di gestione di sansa eccessivamente umida e la quantità di acqua necessaria per la separazione. La maggior parte delle produzioni industriali prevede il passaggio dell'olio appena prodotti in separatori centrifughi verticali, che garantiscono la

separazione di residui di particelle solide e acqua, ma esistono impianti pilota che ne sono sprovvisti. Questo progetto sperimentale è stato condotto su oli prodotti in minifrantoio Oliomio in grado di lavorare circa 150 Kg di olive/ora. L'impianto in dotazione presso il Campus di Scienze degli alimenti, realizzato in acciaio inox (parti a contatto con le olive e l'olio), è dotato di un frangitore a martelli, una gramola verticale ed un separatore centrifugo ad asse orizzontale a due fasi. Questi impianti, solitamente, non prevedono la presenza di separatori centrifughi, fornendo così un prodotto torbido. Lo stoccaggio dell'olio appena estratto deve essere effettuato in serbatoi in acciaio inox in assenza di ossigeno (Lercker *et al.*, 2007; Lercker G., Toschi T., 2005; Cerretani *et al.*, 2010).

2.3.6 Filtrazione

Come già detto l'olio ottenuto dalla maggior parte degli impianti di estrazione è un succo torbido ed opalescente con impurità solide in sospensione, come tracce d'acqua in micro-emulsione e materiale proteico in dispersione, che possono promuovere l'attività enzimatica ed ossidativa, compromettendo la qualità chimica e organolettica del prodotto e la sua stabilità. Questi composti si depositano sul fondo del contenitore, determinando l'insorgenza del difetto di morchia, oltre a rappresentare il substrato adatto per l'attività di enzimi che, anche se meno attivi in confronto alle fasi di frangitura, gramolatura ed estrazione, possono favorire il decadimento qualitativo del prodotto. La formazione del deposito sul fondo delle bottiglie rappresenta inoltre un elemento negativo e di rifiuto da parte del consumatore. I metodi industriali di filtrazione prevedono passaggi dell'olio effettuati su materiali filtranti organici (cotone, cartone) e inorganici (diatomite), seguita da una fase di brillantatura mediante filtri pressa, con l'eliminazione dell'umidità residua. Questo procedimento ha come obiettivo quello di garantire un prodotto standard, limpido, privo di rischi di cambiamenti imprevisti, in fase di conservazione, dovuti ad una composizione

non omogenea a scapito però di un impoverimento del profilo fenolico degli oli prodotti.

2.3.7 Confezionamento e conservazione

Anche il processo di confezionamento è determinante per la stabilità di un olio. La presenza di clorofilla aumenta notevolmente i processi di foto-ossidazione, agendo come catalizzatore. Il vetro scuro non riesce a fermare tutte le radiazioni luminose, ma il suo utilizzo garantisce il passaggio di quello spettro luminoso che l'olio non è in grado di assorbire e quindi di utilizzare, limitando la foto-ossidazione. Per allontanare buona parte dell'ossigeno contenuto nello spazio di testa, si può utilizzare una goccia di azoto liquido prima dell'incapsulazione della bottiglia. Un buon sistema di sigillazione permette al prodotto di "consumare" tutto l'ossigeno presente con l'aiuto di una buona concentrazione di sostanze antiossidanti, bloccando l'avanzare della formazione di composti sgradevoli. Contenitori che riducono al minimo la superficie di contatto olio-aria possono limitare i processi di ossidazione. Le condizioni di conservazione ottimali sono a temperatura costante, intorno ai 12-14°C, al riparo da fonti luminose. Temperature eccessivamente basse (< 8°C) possono causare l'insolubilizzazione di composti poco solubili (in particolare, fenoli idrofili), che faticano a tornare tali in fase di "scongelamento", riducendo la loro attività antiossidante.

2.3.8 La resa in olio

La resa in olio è, chiaramente, il parametro più importante per i produttori. I fattori di cultivar, di periodo di raccolta e di processo, già considerati in precedenza, sono da valutare con attenzione al fine di ottenere il miglior risultato possibile in relazione con il tipo di prodotto che si vuole ottenere.

Solitamente, la resa viene valutata intorno al 14-25%. Bisogna, però, tenere conto del fatto che un'eccessiva attesa nei tempi di raccolta e di processo producono un aumento di resa fittizio, in quanto il peso dell'oliva diminuisce per perdita di acqua e il maggiore contenuto in olio è da considerarsi relativo.

2.4 Composizione dell'olio d'oliva

L'olio d'oliva è composto per il 99% da trigliceridi e secondariamente da acidi grassi liberi, mono e digliceridi, idrocarburi, steroli, alcoli alifatici, tocoferoli e pigmenti. La composizione in acidi grassi varia in relazione alla varietà dell'olivo, al grado di maturazione delle drupe, al clima e al periodo della raccolta. Vi sono degli acidi grassi tipici per tutti gli oli ottenuti da olive, quali lo stearico, il palmitico, l'oleico ed il linoleico. Una caratteristica che distingue l'olio di olive dagli altri oli vegetali è legata al suo maggior contenuto di acido oleico. L'acido oleico non dovrebbe essere inferiore al 73%, il linoleico invece non dovrebbe superare il 10% e il rapporto oleico/linoleico dovrebbe essere maggiore o uguale a 7. Queste caratteristiche permettono all'olio di oliva di avere una buona stabilità ossidativa, quindi di conservarsi a lungo. L'irrancidimento nell'olio è ostacolato dal contenuto di tocoferoli e polifenoli che svolgono un'importante funzione antiossidante.

La frazione dell'insaponificabile costituisce l'1% circa della componente lipidica dell'olio di oliva e contiene:

- idrocarburi, tra cui lo squalene;
- fitosteroli, in particolare campesterolo, stigmasterolo, β -sitosterolo;
- vitamine liposolubili, β -carotene e tocoferoli;
- pigmenti, fra cui clorofilla e caroteni;
- alcoli alifatici superiori esterificati di acidi grassi (cere) ed alcoli triterpenici;

L'olio extravergine d'oliva quindi è un succo oleoso estratto tramite processi di molitura delle drupe. Viene ottenuto dai frutti freschi di buona qualità che ne garantiscono un caratteristico profilo sensoriale. L'olio extravergine di oliva è ottenuto unicamente mediante procedimenti meccanici e fisici, in condizioni tali che non causino alterazione dell'olio. Inoltre il prodotto non deve aver subito alcun trattamento diverso dal lavaggio, decantazione, centrifugazione e filtrazione, esclusi gli oli ottenuti con solventi o coadiuvanti chimici.

2.4.1 Composizione in acidi grassi degli oli vergini di oliva

Gli acidi grassi presenti negli oli vergini d'oliva sono per la maggior parte legati ad una molecola di glicerina, formando in prevalenza trigliceridi (98-99%). E' presente, comunque, una piccola percentuale di mono e di-gliceridi, derivanti da un'incompleta biosintesi (1,2-digliceridi) oppure da processi di idrolisi dei trigliceridi (1,3-digliceridi). La composizione acidica dell'olio da olive è principalmente rappresentata da acidi grassi monoinsaturi con netta prevalenza di acido oleico normalmente presente con una quantità media pari a circa l'80% degli acidi grassi totali, da acidi grassi polinsaturi con un contenuto non superiore al 10%, in particolare con prevalenza di acido linoleico, da acidi grassi saturi in quantità media pari al 15%, tra cui predomina l'acido palmitico e, in quantità minore, lo stearico. Queste proporzioni sono di notevole importanza in quanto influenzano in maniera significativa la stabilità ossidativa del prodotto. Un eccesso di acidi grassi polinsaturi ω -3 e ω -6, nonostante abbia dei risvolti positivi dal punto di vista nutrizionale, è causa dell'insorgenza rapida di processi di irrancidimento, in quanto tali acidi grassi, a causa della presenza di insaturazioni, risultano particolarmente sensibili all'ossidazione. La composizione in acidi grassi varia in relazione alla varietà dell'olivo, al grado di maturazione delle drupe, al clima e al periodo della raccolta, per questo il profilo in acidi grassi rappresenta uno dei più importanti descrittori dell'olio d'oliva,

attraverso il quale possiamo valutarne la qualità, ma risulta anche un indice di genuinità del prodotto in quanto consente di rivelare eventuali adulterazioni. Attraverso lo studio delle percentuali dei diversi acidi grassi, del loro grado di insaturazione e della loro forma isomerica (*cis* o *trans*), è infatti possibile valutare l'eventuale aggiunta di oli di provenienza diversa dalle olive. Il rapporto tra acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi presenti nell'olio rappresenta un indicatore della stabilità ossidativa di un olio ed è considerato favorevole quando > 7 (Cerretani *et al.*, 2010). Infine, per la valutazione dello stato di conservazione, si può procedere con la determinazione dei gliceridi; i digliceridi generalmente sono presenti nelle forme isomeriche 1,2 e 1,3 e gli isomeri 1,2, essendo meno stabili, isomerizzano spontaneamente nella forma 1,3 perciò la presenza di quantità significative di 1,3-digliceridi, è indice di un olio invecchiato.

2.4.2 Le vitamine

Nel sistema olio possiamo trovare diversi composti vitaminici o con attività pro vitaminica. Per quanto riguarda le vitamine liposolubili, nell'olio vergine di oliva troviamo modeste quantità di β -carotene (pro-vitamina A) alfa-tocoferolo (vitamina E). I tocoferoli, presenti negli oli vergini in quantità variabili, hanno la funzione di proteggere dall'ossidazione le strutture lipidiche, di salvaguardare l'integrità delle membrane biologiche, contrastando la perossidazione degli acidi grassi insaturi innescata dai radicali liberi; la loro azione antiossidante è esaltata dalla presenza dei fosfolipidi. La vitamina F è costituita da una miscela di acidi grassi essenziali (AGE), prevalentemente acido linoleico (ω -6) ed acido α -linoleico (ω -3). Gli effetti di questa vitamina si ripercuotono sulle arterie, ostacolando la deposizione di trigliceridi e colesterolo. Il β -carotene dal punto di vista nutrizionale è molto importante poiché a livello della mucosa intestinale viene trasformato in trans-retinolo, ovvero nella vitamina A. A differenza di

questa vitamina, il β -carotene ha un'elevata attività antiossidante. Gli oli vergini da olive contengono quantità variabili di β -carotene comprese tra 0,3 e 4,2 mg/kg (Capella *et al.*, 1997).

2.4.3 I pigmenti

Il pigmento che troviamo maggiormente nell'olio d'oliva è la clorofilla, formata da quattro anelli di pirrolo con un atomo di magnesio al centro e una lunga catena alcolica esterificata. Questo componente è responsabile della colorazione verde dell'olio, una caratteristica ritenuta molto importante da parte del consumatore e che è influenzata da diversi fattori: cultivar, zona di coltivazione, periodo di raccolta e dai metodi di processo (Cerretani *et al.*, 2008; Esclar *et al.*, 2007). Sono ricchi di clorofilla gli oli ottenuti da olive non ancora invaiate, quelli ottenuti da olive non defogliate e quelli prodotti con una seconda pressione dalle sanse. In quantità minore, possiamo trovare carotenoidi (ne sono presenti circa 80 composti), in particolare il β -carotene. Questi componenti sono responsabili della colorazione gialla dell'olio, esplicano attività di provitamina A ed il loro contenuto dipende da molti fattori, come l'ambiente pedoclimatico, la tecnologia di estrazione dell'olio ed il sistema di conservazione. I carotenoidi esplicano l'attività antiossidante neutralizzando l'ossigeno singoletto, mentre le clorofille hanno azione pro ossidante, poiché catalizzano, in presenza di luce, la produzione di ossigeno allo stato di singoletto. È dunque importante, per la stabilità dell'olio, un giusto rapporto tra queste due categorie di pigmenti.

2.4.4 Sostanze a struttura fenolica

I componenti fenolici, definiti genericamente polifenoli, rappresentano un fattore importante nella valutazione della qualità dell'olio vergine di oliva, in quanto responsabili della stabilità ossidativa e delle caratteristiche sensoriali di

tale prodotto. Tali composti sono caratterizzati da almeno un singolo anello fenolico, sostituito con altri gruppi funzionali. La disposizione dei diversi gruppi funzionali in posizione orto e para fornisce un quadro di composti con caratteristiche fisiche e chimiche molto diverse tra loro. I composti fenolici dell'olio sono riconosciuti essere antiossidanti naturali dell'olio e sono distinguibili in molecole fenoliche lipofile quali i tocoferoli e sostanze fenoliche. La frazione costituita dalle sostanze fenoliche idrofile è la più importante per caratterizzare l'olio vergine di oliva, poiché le sostanze fenoliche lipofile (tocoferoli) sono riscontrabili in altre matrici e quindi non sono esclusive di questo prodotto. L'olio vergine da oliva, contiene diverse classi di componenti fenoliche tra cui i fenoli semplici, che comprendono gli alcoli fenolici (tirosole ed idrossitirosole) e gli acidi fenolici (derivati dell'acido benzoico e dell'acido cinnamico); i fenoli complessi, noti come secoiridoidi; i flavonoidi (apigenina e luteolina) e i lignani (acetossipinoresinolo e pinoresinolo). Questi composti si originano durante la fase di estrazione meccanica dell'olio a partire dai polifenoli glucosidici presenti nell'oliva e la loro presenza nell'olio è influenzata da fattori agronomici, tecnologici e di conservazione. Tra i fattori agronomici rientrano variabili come la cultivar, il sistema di allevamento, lo stato sanitario e l'epoca di raccolta. Un precedente studio (Brenes *et al.*, 2002) mostra come alcuni composti fenolici possano essere utilizzati come marker varietali e quindi rappresentano degli elementi utili a discriminare oli provenienti da zone diverse. È stato rilevato, inoltre, come fattori quali la scarsità di acqua e l'attacco da parte di patogeni portino ad un aumento della quantità di sostanze fenoliche, in quanto i composti fenolici, essendo dei metaboliti secondari del ciclo di accrescimento della pianta, tendono ad essere maggiormente prodotti in situazioni di stress della pianta. Anche lo stadio di maturazione e l'epoca di raccolta, sono fattori determinanti; in generale si ha una tendenza alla diminuzione del contenuto in composti fenolici nel tempo, anche se questo andamento non è lineare ed è differente da un composto all'altro. Ad esempio, la

quantità di fenoli semplici aumenta con il tempo, in quanto derivanti dall'attività enzimatica che degrada i fenoli complessi (Gallina Toschi T., 2005). Tra i fattori tecnologici, il processo di frangitura, rappresenta il principale fattore responsabile del rilascio di questi composti nell'olio. Durante la fase di conservazione, l'olio subisce modificazioni indotte da processi ossidativi ed enzimatici. La degradazione ossidativa determina la riduzione dei composti fenolici, modificando le caratteristiche nutrizionali e sensoriali del prodotto. L'intervento dei vari composti fenolici presenti nell'olio in questi processi non è omogeneo, si registra infatti un'attività antiossidante diversa per ogni tipo di composto fenolico, maggiormente esplicita da idrossitirosolo e oleuropeina aglicone (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005), grazie ai due ossidrili in posizione *orto*. L'olio è comunque un sistema in continuo mutamento, per il quale è difficile prevederne la conservabilità in relazione a fattori non sempre facilmente controllabili, senza conoscere l'evoluzione della composizione fenolica. Tuttavia, un indice molto utile nel valutare la conservabilità del prodotto, è rappresentato dalla determinazione del contenuto in *o*-difenoli, in quanto più attivi nei processi ossidativi (Lercker G., 2005).

2.4.5 Tocoferoli e tocotrienoli

Tocoferoli e tocotrienoli sono composti fenolici lipofili, che rivestono un ruolo importante dal punto di vista nutrizionale in quanto precursori della vitamina E. Nell'olio extra vergine di oliva sono rappresentati in prevalenza dall' α -tocoferolo (circa il 90% dei tocoferoli totali) e da quantità minori di β -, γ - e δ -tocoferolo. L'importanza della presenza di questi composti negli oli d'oliva vergini è legata al ruolo di antiossidanti naturali, responsabili della conservabilità e della stabilità nel tempo dell'olio in cui sono contenuti. In sinergia con i composti fenolici idrofili, svolgono un ruolo fondamentale nel mantenere l'integrità delle membrane cellulari biologiche e nell'inibizione del processo di formazione di

radicali liberi, responsabili dei processi di ossidazione. In particolare, sono abili scavenger dei radicali lipoperossidici e vengono denominati antiossidanti di tipo chainbreaking, per la capacità di interrompere la catena di reazioni di propagazione dei radicali perossidici (Lozano-Sanchez J., 2010; Baldioli *et al*, 1996).

2.4.6 Componenti minori

Si riconosce l'importanza dei cosiddetti "componenti minori" (vale a dire i componenti presenti in bassa concentrazione nella matrice lipidica) per la caratterizzazione degli oli vergini ed extra vergini di oliva. Questi componenti comprendono composti antiossidanti e tutte le sostanze responsabili delle caratteristiche organolettiche dell'olio.

L'acqua è il componente principale del frutto dell'olivo, essendo circa la metà del suo peso totale. La quasi totalità dell'acqua del frutto più l'acqua di processo addizionata nel corso della lavorazione, rappresentano un sottoprodotto di processo, ma una piccola quantità di acqua permane nell'olio. In particolare è stata osservata negli oli extra vergini di oliva la presenza di acqua in microemulsione/dispersione, in percentuali molto limitate (in un intervallo in media compreso tra 0,07 e 0,15%).

2.4.7 La presenza di acqua nell'olio

In funzione della tipologia di olio vergine da olive il contenuto di acqua è stato visto variare da 300 a 2000 mg per kg di olio, spesso più della soglia di "saturazione" (300-400 mg per kg di olio). Questa acqua è presente in forma di microgocce disperse in olio (emulsione fine o micro emulsione), che vengono stabilizzate dall'aggregazione-dissoluzione di un gruppo di sostanze polari, solubili in acqua e/o acqua-compatibili, acidi grassi liberi, digliceridi,

fosfolipidi, sostanze fenoliche. Il contenuto in acqua dipende soprattutto dal tipo di processo tecnologico impiegato nella produzione dell'olio vergine da olive e la sua presenza può influire sulla stabilità dell'olio durante la conservazione. L'acqua ha un'importante azione di dissoluzione delle molecole più polari a struttura fenolica e polifenolica, che svolgono un'azione antiossidante fondamentale per la matrice lipidica, stabilizzandone la presenza in dispersioni colloidali (Bendini et al., 2007). Generalmente gli oli vergini di oliva prodotti da impianti di estrazione a due fasi contengono una quantità inferiore di acqua rispetto a quelli ottenuti da un sistema con decanter a tre fasi. Il sistema di filtrazione dell'olio costituisce un'altra variabile di processo importante, poiché con sistemi classici parte dell'acqua ed anche dei componenti polari viene eliminata per l'ottenimento di un prodotto completamente limpido. In oli non filtrati può permanere invece un significativo contenuto di acqua (maggiore dello 0,1%) che, durante la fase di conservazione, può innescare più facilmente reazioni di tipo idrolitico e costituire il mezzo necessario allo sviluppo di microrganismi responsabili di off-flavor (in particolare avvinato, riscaldo-morchia). Inoltre, il processo di raffinazione applicato per la rettificazione degli oli (ad esempio dell'olio vergine lampante) provoca una sostanziale deplezione di acqua e, contestualmente, di composti fenolici con il raggiungimento di valori inferiori allo 0,05% di acqua e di un contenuto di polifenoli totali inferiore a 100 mg di acido gallico/kg di olio.

Durante la conservazione fenomeni diversi possono influenzare la stabilità dell'acqua microdispersa, in primo luogo la variazione della temperatura. Sbalzi di temperatura possono destabilizzare l'acqua e in particolare, questo effetto può essere amplificato dalla bassa temperatura, che determina una cristallizzazione dei gliceridi, con la separazione di acqua e una parziale aggregazione della stessa al ripristino della fase liquida. Studi sperimentali hanno dimostrato che la cristallizzazione parziale può verificarsi già sotto i 12°C, in particolare in oli caratterizzati da un basso contenuto di acidi grassi polinsaturi. Pertanto, una

ottimale temperatura di conservazione del prodotto si ha nell'intervallo compreso fra 12-15°C.

In precedenti studi (Frankel *et al.*, 1994; Frankel, 1996), condotto sulle differenze di affinità tra sostanze antiossidanti, ha permesso di definire la teoria del “paradosso polare”, secondo il quale tali differenze si ripercuotono sull'attività degli antiossidanti, in relazione al tipo di sistema in cui si trovano. In particolare, gli antiossidanti idrofili in emulsione olio-acqua, si distribuiscono nella fase acquosa alla quale sono chimicamente più affini; questo però può comportare una minor protezione della matrice grassa da parte di tali antiossidanti rispetto a quelli lipofili, i quali si orientano sull'interfaccia olio-acqua. Al contrario, in un sistema omogeneo come l'olio privo di acqua, gli antiossidanti idrofili si orientano sull'interfaccia aria-olio ed è proprio in questa posizione che esplicano maggiormente la loro attività protettiva nei confronti della matrice grassa; comportamento opposto si ha per i composti lipofili che si stabilizzano nella fase oleosa alla quale sono più affini.

Tra gli oli vegetali ad uso alimentare, l'olio extravergine di oliva é quello maggiormente dotato di caratteristiche nutrizionali e sensoriali che lo rendono un ingrediente basilare della dieta mediterranea. Queste proprietà sono in relazione non solo alla composizione in acidi grassi, che non è significativamente diversa da un olio di oliva raffinato, ma soprattutto alla presenza di composti fenolici e polifenolici che impartiscono all'olio sia stabilità all'ossidazione che caratteristiche sensorialmente percepibili. Infatti, proprio grazie alla capacità dell'acqua di dissolvere tali molecole idrofile, quindi dotate di una bassa affinità con la fase oleosa, l'acqua contribuisce direttamente alla percezione del gusto di amaro e piccante dell'olio e indirettamente alla sua stabilità all'ossidazione. La minima presenza di acqua negli oli vergini di oliva è responsabile della formazione e persistenza della cosiddetta “velatura” (torbidità), una sospensione creata da materiali microdispersi. Ciò sembra influire sulla stabilità ossidativa del prodotto, anche se esistono in letteratura

pareri contrastanti (Dais Photis et al. 2008). La resistenza dell'olio all'ossidazione, come riportato da Ambrosone ed al. (2006), dipende dalla stabilità della microemulsione olio-acqua. Inoltre, la velocità dei processi ossidativi dipende strettamente dal rapporto tra superficie e volume di dispersione di acqua; pertanto è fondamentale lo studio approfondito di questi sistemi colloidali per comprendere il legame tra l'ossidazione dovuta al processo e la struttura della microemulsione.

Gli anfifili endogeni che si trovano negli oli vergini da olive, in presenza di un interfaccia olio-acqua migrano concentrandosi preferenzialmente su questa interfaccia, formando strutture energeticamente più favorite. Le diverse combinazioni dei composti minori sulla superficie attiva può dare luogo alla formazione di strutture fisiche conosciute come associazioni colloidali sottoforma di "micelle inverse" e strutture lamellari. Queste micelle inverse sono dette così perché strutturate al contrario alle normali micelle, cioè contengono un cuore idrofilico, detto usualmente "water pool" stabilizzato da un monostato di molecole surfactanti. La dimensione delle goccioline d'acqua incrementa con l'aumento del contenuto di acqua. Le micelle inverse sono degli aggregati dinamici che si posizionano in modo casuale seguendo i moti Browniani e scambiando il loro contenuto di acqua; sono efficienti "nano-reattori" poiché permettono un'ampia superficie di contatto tra olio e acqua e rendono possibile la coesistenza di componenti sia solubili in olio che in acqua. Le micelle inverse in matrice lipidica sono formate da surfactanti con bassi valori di bilancio idrofilico-lipofilico (HLB); esempi di surfactanti con bassi valori HLB sono gli acidi grassi liberi ($HLB \approx 1,0$), i digliceridi ($HLB \approx 1,8$) i monogliceridi (HLB 3,4–3,8). Anche i fosfolipidi con valori di HLB intermedi ($HLB \approx 8,0$) possono formare micelle inverse in mezzi non acquosi (Xenakis et al., 2010).

In base a quanto precedentemente riportato, è importante monitorare il contenuto di acqua dell'olio extravergine di oliva in quanto rappresenta un'importante fattore per il controllo della sua qualità. Le tecniche analitiche

comunemente utilizzate per la misura di tracce di acqua in varie matrici sono la l'essiccazione in stufa (metodo gravimetrico), la titolazione di Karl Fisher (specifica perché avviene in ambiente non acquoso) ed infine, è possibile applicare la determinazione mediante la termobilancia (versione più rapida del metodo gravimetrico). Queste determinazioni sono descritte nel paragrafo "Materiali e metodi".

2.5 ANALISI DELLE PROPRIETA' DIELETTRICHE

2.5.1 Proprietà dielettriche dei prodotti alimentari

Le proprietà dielettriche delle diverse matrici alimentari trovano notevoli applicazioni dovute alle mutevoli esigenze di veloci tecnologie adatte ad industrie e laboratori di ricerca. Diviene pertanto utile sviluppare migliori dispositivi di rilevazione per il controllo di specifiche di processo e di prodotto e approfondire la comprensione delle proprietà dielettriche dei materiali e delle tecniche per la loro misurazione. Le proprietà dielettriche contribuiscono alla spiegazione e comprensione di determinate proprietà chimico-fisiche; quando correlate con le altre caratteristiche dei materiali, quali umidità o densità, possono inoltre essere utilizzate per misurare tali caratteristiche. Le proprietà dielettriche dei prodotti alimentari nel campo delle radiofrequenze e delle microonde sono strettamente legate alla loro composizione, densità e temperatura.

2.5.2 Stato dell'arte

Lizhi et al. (2008) hanno sviluppato uno studio sulle proprietà dielettriche di 10 oli vegetali edibili. Gli autori hanno preso in considerazione un intervallo di frequenza compreso tra i 100 Hz e 1 MHz considerando gli effetti della temperatura (20-45°C), il contenuto di umidità (0,002-0,31%), e la componente

in acidi grassi sulle proprietà dielettriche degli oli. Le analisi sono state effettuate tramite un condensatore a piatti paralleli collegato ad un misuratore LCR. I risultati hanno mostrato come il "loss factor" degli oli diminuisca con l'aumentare della frequenza dai 100 Hz ai 13,2 kHz, per poi aumentare all'incremento della frequenza. Tale studio ha inoltre evidenziato che la costante dielettrica degli acidi grassi tende ad aumentare all'aumentare del numero di doppi legami o della lunghezza delle catene molecolari. Sia la costante dielettrica che il loss factor degli oli diminuiscono con l'aumentare della temperatura. Per quanto riguarda la presenza di acqua nell'olio, gli autori hanno messo in evidenza come la costante dielettrica degli oli subisce degli incrementi all'aumentare del contenuto di umidità, maggiormente evidenti a basse frequenze di essiccazione. Dai risultati ottenuti in questo esperimento si evince che l'olio e l'acqua hanno valori differenti di costante dielettrica; la costante dielettrica dell'acqua è pari a circa a 77,02, mentre per quanto riguarda gli oli si aggira intorno ai 3,04 – 3.20 a 1 MHz e 25°C. La notevole differenza tra le costanti dielettriche provoca effetti sul comportamento dielettrico del prodotto. Senatra (2006) ha sviluppato uno studio sull'utilizzo di tre diverse tecniche sperimentali per determinare la concentrazione di acqua in olio. In particolare ha considerato l'analisi dielettrica, la depolarizzazione termicamente stimolata e la calorimetria a scansione (DSC). L'attenzione si è focalizzata sul sistema di concentrazione dell'acqua. Sono state studiate due microemulsioni differenti per l'olio utilizzato. I risultati hanno mostrato come il comportamento dell'acqua presente in dispersione con sfere di diametro di 10 nm ed il comportamento di massa della fase continua, siano influenzati dal rapporto superficie/volume. Altri studi interessanti sul comportamento dielettrico di emulsioni di acqua in olio sono stati condotti da Meier e Eicke (1996) e da Xue (2001) con l'obiettivo di sviluppare modelli per la caratterizzazione delle proprietà dielettriche di due fasi immiscibili.

2.5.3 Classificazione delle proprietà dielettriche

Le proprietà dielettriche dei materiali sono classificate in due categorie: attive e passive, entrambe dipendenti dalla natura del materiale e influenzate dall'ambiente. Le proprietà dielettriche attive sono caratterizzate da una sorgente di energia nel materiale e possono dare origine ad una forza elettromotrice o ad una differenza di potenziale. Le proprietà passive sono proprietà intrinseche del materiale determinate dalla composizione chimica e dalle strutture molecolari ed influenzano la distribuzione dei campi elettromagnetici (Nelson, 1973; Nelson, 1978). Un'ulteriore classificazione delle proprietà dielettriche evidenzia: parametri costitutivi: permittività (costante dielettrica), permeabilità magnetica e conduttività. In generale vengono descritte come proprietà elettromagnetiche complesse del materiale utili nel comprendere e descrivere l'interazione delle onde elettromagnetiche con la materia. Le caratteristiche dei materiali in corrente alternata sono meglio definite in termini di concetti di campo elettromagnetico. In elettrostatica assumono particolare importanza le caratteristiche superficiali. Questi concetti sono applicati in molte tecniche di misurazione, nelle quali le proprietà dielettriche del materiale vengono calcolate attraverso misurazioni di impedenza o ammettenza su campioni di materiale dielettrico. Queste proprietà vengono trattate come densità di carica elettrica e resistività. Le proprietà di massa del materiale influenzano la distribuzione di carica. Le caratteristiche di conduzione dielettrica sono importanti per i materiali isolanti. Le caratteristiche di risonanza magnetica nucleare e di risonanza di spin elettronico possono essere considerate come proprietà elettriche.

La permittività del materiale riferita alla permittività del vuoto (ϵ_0) è il parametro utilizzato abitualmente nelle applicazioni pratiche.

La permittività relativa complessa (ϵ_r) è:

$$\epsilon_r = \epsilon_r' - j \epsilon_r'' = \epsilon' / \epsilon_0 - j(\epsilon'' / \epsilon_0)$$

dove la componente reale è la costante dielettrica e la componente immaginaria è il "loss factor". Le proprietà dielettriche di maggior interesse sono la

conduttività (σ), la costante dielettrica (ϵ'), il loss factor (ϵ'') e la tangente di perdita ($\tan\delta$). A parte σ , sono tutte quantità adimensionali. La conduttività è il reciproco della resistività elettrica, che esprime la resistenza del materiale al passaggio della corrente. La conduttività in corrente continua è il risultato del moto di cariche libere e ioni; questo tipo di condizione contribuisce alla conduttività totale a basse frequenze. I campi elettrici alternati producono una componente aggiuntiva della conduttività; tale componente è predominante a frequenze troppo alte perché la conduttività ionica costituisca il contributo maggiore. La conduttività in corrente alternata di un materiale è data da:

$$\sigma = \omega \epsilon_0 \epsilon_r''$$

dove $\omega = 2\pi\nu$ è la frequenza angolare del campo alternato.

La costante dielettrica ed il loss factor sono proprietà che descrivono le interazioni tra il materiale e le onde elettromagnetiche. Esse determinano, ad esempio, se i metodi di riscaldamento con le onde elettromagnetiche sono utilizzate, determinando inoltre l'energia assorbita dal materiale durante i processi. La costante dielettrica di un materiale è legata alla sua capacità di immagazzinare energia in un campo elettrico, mentre il loss factor è legato alla capacità di un materiale di assorbire energia dal campo. La costante dielettrica di un materiale è spesso considerata come il rapporto tra la capacità di un condensatore con il materiale, come il suo dielettrico, e la capacità dello stesso condensatore in presenza d'aria. Il loss factor è un indice delle caratteristiche di dissipazione di energia del materiale quando questo viene esposto a campi elettrici alternati. Nei materiali alimentari contenenti sostanze ioniche, il loss factor è influenzato da due meccanismi differenti: la conduzione ionica e l'assorbimento dielettrico. Perciò il loss factor può essere definito come:

$$\epsilon_r''_{\text{eff}} = \epsilon_r'' + \sigma / \epsilon_0 \omega$$

2.5.4 Fattori che influenzano le proprietà dielettriche

Le proprietà dielettriche degli alimenti sono influenzate da diversi fattori tra i quali umidità, oggetto dello studio in questione. Le proprietà dielettriche sono influenzate dall'umidità per il modo in cui l'acqua è trattenuta dal materiale. L'acqua chimicamente legata esercita un'influenza minore rispetto all'acqua libera, nella quale le molecole possono orientarsi liberamente con il campo elettrico applicato.

Le proprietà dielettriche degli alimenti dipendono inoltre da diversi fattori, uno tra i più importanti è la frequenza. Le proprietà dielettriche della maggior parte dei materiali variano con la frequenza del campo elettrico applicato. La polarizzazione elettronica risulta essere la causa di questo fenomeno, comporta uno spostamento degli elettroni rispetto al nucleo. Mantenuite costanti le altre condizioni, la costante dielettrica diminuisce o rimane costante all'aumentare della frequenza. A basse frequenze i dipoli sono orientati con il campo applicato, quando il campo oscilla seguono invece l'orientamento, infine ad alte frequenze i dipoli non riescono più a mantenere il passo con il campo applicato assumendo così un'orientazione casuale. Come risultato si avrà che in questa regione la costante dielettrica diminuisce all'aumentare della frequenza. Le proprietà dielettriche sono influenzate dalla temperatura e dell'intervallo di frequenze considerato. L'effetto della temperatura sulle proprietà dielettriche di materiali alimentari a basso contenuto di umidità sembra essere legato alla mobilità dell'acqua legata. Nei materiali alimentari a basso contenuto di umidità vi è un aumento dei valori delle proprietà dielettriche. Infine, le proprietà dielettriche dei prodotti alimentari sono determinate principalmente dalla loro composizione chimica ed in misura minore dalla struttura fisica.

2.5.5 Tecniche di analisi

La misurazione delle proprietà dielettriche ha acquistato importanza grazie al suo possibile impiego per il controllo non distruttivo di proprietà specifiche di materiali soggetti a cambiamenti chimici o fisici. Esistono diverse tecniche esplorative delle proprietà dielettriche che possono essere classificate come metodi a riflessione o trasmissione, che utilizzano sistemi risonanti, con strutture aperte o chiuse. Il metodo utilizzato in questo lavoro di tesi riguarda la spettroscopia capacitiva tramite ponte LCR con impiego di una sonda a condensatore.

2.5.6 Condensatore a piatti paralleli

Questo metodo prevede l'utilizzo di un condensatore a piatti paralleli come sonda ed un analizzatore di impedenza o come nel nostro caso, un LCR per misurare la capacità e dissipazione. È un metodo poco costoso e relativamente semplice. Un condensatore è un dispositivo in grado di immagazzinare carica elettrica e quindi energia. È costituito da conduttori isolati che portano cariche uguali, ma di segno opposto, posti a distanze ravvicinate. I conduttori sono dette piastre o piatti (il condensatore utilizzato per la sperimentazione ha più piatti paralleli). Quando si applica una tensione al condensatore tra i piatti si genera, ad opera delle cariche opposte, un campo elettrico uniforme.

Per un dato condensatore la quantità di carica Q è proporzionale alla differenza di potenziale V applicata:

$$Q = CV$$

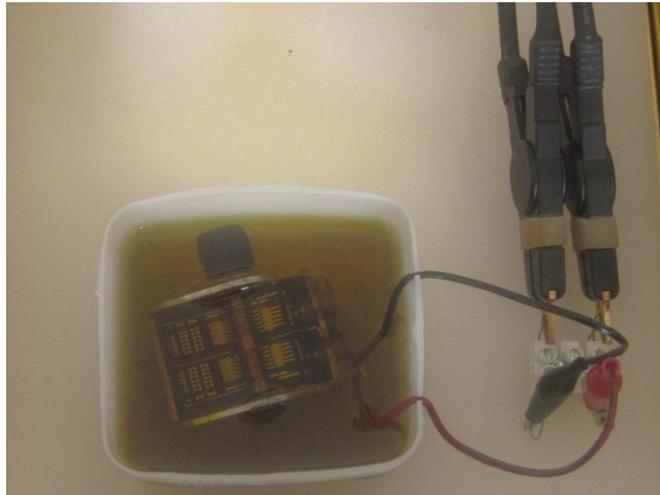
La costante di proporzionalità C è la capacità del condensatore e di misura in Farad (F).

$$1F = 1C/V$$

In assenza di un dielettrico la capacità dipende solo dalla struttura e dalle dimensioni del condensatore stesso. La capacità di un condensatore piano risulta:

$$C = \epsilon_0 A/d$$

Dove A è la superficie dei piatti, d la distanza e ϵ_0 la costante dielettrica del



vuoto ($\epsilon_0 = 8'85 \text{ pF/m}$).

Figura 2 Condensatore a piatti paralleli

Quando tra i piatti del condensatore si inserisce un materiale isolante, ossia un dielettrico, la tensione indicata dall'elettrometro diminuisce. Quindi, l'introduzione di un dielettrico causa un aumento della capacità del condensatore. Qualora il dielettrico saturi lo spazio compreso tra i piatti, la capacità aumenta secondo un fattore adimensionale ϵ_r chiamato costante dielettrica relativa del materiale. La capacità può quindi essere descritta secondo l'espressione:

$$C = \epsilon_0 l$$

dove l ha le dimensioni di una lunghezza e , quando un dielettrico riempie completamente lo spazio, l'equazione diventa:

$$C = \epsilon_r \epsilon_0 l = \epsilon_r C_0$$

In un materiale dielettrico avvengono fenomeni di dipolo elettrico elementari, presenti nel materiale o indotti dall'applicazione di un campo elettrico. L'applicazione di un campo elettrico esterno comporta un parziale allineamento dei dipoli che aumenta al diminuire della temperatura e all'aumentare del campo elettrico. Perciò in tutti i materiali dielettrici l'effetto dell'applicazione di un campo elettrico è la polarizzazione che presenta cariche positive da una parte e cariche negative dall'altra.

2.6 Misura del contenuto in acqua mediante metodi tradizionali gravimetrici e titrimetrici

2.6.1 Metodo titrimetrico di Karl Fisher

Il metodo Karl Fisher è stato messo a punto dal chimico tedesco da cui ha preso il nome e consiste in una titolazione basata sull'ossidazione dell'anidride solforosa ad opera dello iodio, in presenza di acqua. È un metodo molto

sensibile, capace di rilevare tracce di acqua in un campione fino a poche parti per milione. Si basa sulla seguente reazione di ossido-riduzione:



La titolazione viene condotta in solvente anidro, generalmente metanolo, in presenza di una base capace di neutralizzare l'acido solforico prodotto dalla reazione e di creare una soluzione tampone che stabilizzi il pH su valori ottimali per lo svolgersi della reazione, compresi tra 5 e 7; inizialmente la base scelta fu la piridina, oggi sostituita dal meno tossico imidazolo o dalla dietanolammina.

La determinazione consiste essenzialmente in due fasi: la reazione del metanolo con l'anidride solforosa che produce un monometil-solfito che viene successivamente ossidato dallo iodio.



Dove: RN rappresenta una molecola di base generica

La reazione di Karl Fisher può avvenire solo in un definito intervallo di pH, compreso tra 5 e 7, in cui la reazione rimane costante. Se il pH risulta troppo basso, il punto finale della reazione non sarà raggiunto. Se il pH è alto, invece, intervengono reazioni collaterali che rendono la titolazione non stechiometrica. Pertanto, gli errori che si verificano nel corso della titolazione possono essere limitati monitorando il pH nel corso della reazione con un pH-metro. La titolazione di Karl Fisher viene detta volumetrica e richiede pertanto la determinazione del titolo del reagente. Il campione può essere introdotto direttamente nella cella di titolazione, dove precedentemente viene determinata la concentrazione di acqua del solvente, che verrà sottratta dall'analisi del campione. Il punto finale della reazione viene raggiunto quando si verifica un leggero eccesso di iodio, che si realizza quando non vi è più acqua nella cella di titolazione. Tra i vantaggi di questo metodo, rispetto alla misurazione del contenuto di acqua per essiccamento del campione in stufa, si ha la rapidità

(pochi minuti contro qualche ora) e la specificità (solo l'acqua reagisce, non gli altri composti volatili eventualmente presenti nel campione).

2.6.2 Determinazione della variazione di peso in seguito a riscaldamento in stufa (ISO 662:1998)

La determinazione dell'umidità è frequentemente ottenuta mediante il metodo della sostanza secca. La determinazione di tale umidità, rappresentata dalla quantità di acqua presente, è ottenuta mediante evaporazione in stufa. Per compiere l'essiccazione il più comune mezzo utilizzato è il forno ad aria forzata. In particolare questo metodo determina il contenuto di acqua tramite la differenza di peso del campione prima e dopo l'essiccazione. Il dato ottenuto è un valore percentuale (peso su peso di campione) che rappresenta la concentrazione di umidità. Un errore derivante da questa analisi può essere rappresentato dalla perdita di composti volatili durante la permanenza in forno (tuttavia, è necessario tener conto che questi rappresentano solo una variazione infinitesima dell'ordine di unità di ppm). Inoltre la tecnica può richiedere da qualche decina di minuti a 48 ore, in base all'alimento analizzato, pertanto non si presenta come metodo rapido.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campioni

Un ampio set di oli extravergini di oliva (60 campioni, denominati 1-60) é stato reperito dal commercio, i campioni sono stati sottoposti alle prime tre determinazioni "tradizionali" del piano analitico sotto riportato, per la valutazione del contenuto in acqua.

Per un set di ulteriori 23 campioni (denominati 61-84) è stato determinato il contenuto in acqua mediante valutazione delle proprietà dielettriche e le misurazioni sono state messe a confronto con i dati ottenuti con metodo gravimetrico (stufa).

3.2 Piano analitico

Sui campioni descritti nel paragrafo precedente, sono state realizzate le seguenti determinazioni analitiche per la valutazione del contenuto in acqua:

- i. Metodo gravimetrico per essiccamento in stufa;
- ii. Metodo gravimetrico con utilizzo della termobilancia;
- iii. Titolazione volumetrica di Karl Fischer;
- iv. Misure dielettriche.

3.3 Titolazione volumetrica di Karl Fischer

3.3.1 Solventi, reagenti, standard e strumentazioni

L'Hydranal Solvent Oil fornito da Fluka Riedel-de Haën Sigma-Aldrich (Buchs, Svizzera) ed il cloroformio fornito dalla Merck (Darmstadt, Germania) sono stati utilizzati in miscela 2:1. Il titolante impiegato, Hydranal Titrant 2, è stato fornito da Fluka Riedel-de Haën Sigma-Aldrich, mentre lo standard impiegato per la calibrazione dello strumento era l'Hydranal-Water Standard 10,0, fornito

da Fluka Riedel-de Haën Sigma-Aldrich. Lo strumento utilizzato era un TITROMATIC 1S, titolatore bisvoltammetrico Karl Fischer con cella senza diaframma, fornito dalla Crison (Carpi, Modena, Italia).

3.3.2 Reagenti a due componenti

Il titolante impiegato, Hydranal Titrant 2, contiene iodio e metanolo. Il solvente impiegato, Hydranal Solvent Oil, contiene anidride solforosa, imidazolo e metanolo. La concentrazione del titolante impiegato nelle analisi era di 5 mg/mL (per campioni con un contenuto di acqua di circa 1000 mg/kg).

3.3.3 Determinazione della concentrazione del titolante con lo standard d'acqua 10,0 (calibrazione)

Per un consumo ottimale di 2-3 mL di titolante con concentrazione 5 mg/mL si possono impiegare 1-1,5 g di Water standard 10,0. La sequenza operativa é la seguente:

- Si apre la fiala immediatamente prima della misurazione seguendo le istruzioni allegate;
- si lava una siringa da 10 mL con circa 1 mL di standard d'acqua;
- si aspira l'intero contenuto della fiala nella siringa da 10 mL;
- si eroga di volta in volta un'aliquota di 1-1,5 mL e si determina il peso mediante pesata differenziale. Il contenuto della fiala risulta sufficiente per 3-5 determinazioni.
- si inizia la titolazione senza tempo di miscelazione.

Il titolo esatto dello standard viene inserito nello strumento qualora le tre repliche diano un errore inferiore al 20%.

3.3.4 Avvertenze

- Ad una concentrazione di titolante pari a 2 mg/mL o 1 mg/mL, è possibile utilizzare uno standard d'acqua di 1,0 mg d'acqua/g;
- per ciascuna determinazione di concentrazione è bene impiegare una fiala nuova, poiché una volta aperta, può penetrare umidità; questo fornirebbe un risultato errato;
- aspirando l'intero contenuto della fiala nella siringa, è possibile ridurre l'effetto dell'umidità atmosferica;
- le siringhe in plastica possono cedere umidità. Lavando e condizionando la siringa come detto, è possibile ridurre questo errore. L'ideale è usare una siringa in vetro.

3.3.5 Procedimento

A seconda della tipologia di campione da analizzare, sono stati messi a punto procedimenti di caricamento tali da escludere o minimizzare eventuali interferenze dovute ad assorbimento o cessione di umidità atmosferica. In particolare questo metodo ha impiegato il procedimento di pesata di campioni liquidi con la tecnica della pesata differenziale o retropesata.

Di seguito si riportano i punti della tecnica:

- Si riempie un quarto della siringa con il campione;
- si solleva il pistone e si lava la siringa con il campione, agitandola;
- si riempie la siringa con il campione e si asciuga la punta con un fazzoletto di carta e si elimina l'eventuale presenza di aria;
- si carica la siringa con il campione (capovolta) in un bicchiere sulla bilancia si azzerla la bilancia facendo la tara;
- si inietta il campione nella cella di titolazione;
- si risollewa il pistone affinché la goccia sulla punta dell'ago rifluisca nell'ago;

- si pone nuovamente la siringa con il resto del campione nel bicchiere sopra la bilancia e si procede alla seconda pesata (pesata differenziale);
- si inizia la titolazione;
- si inserisce il peso esatto nel display del titolatore, il quale calcolerà il contenuto di acqua.

Ogni campione viene replicato tre volte e il valore medio si considera accettabile qualora l'errore é compreso entro il 20%.

3.4 Determinazione della variazione di peso in seguito a riscaldamento in stufa (ISO 662:1998)

3.4.1 Strumentazione

Vaschette in alluminio (**Figura 3**); stufa; essiccatore in vetro; bilancia analitica.



Figura 3 Vaschette in alluminio

3.4.2 Procedimento

Il procedimento si basa sulla variazione del peso in seguito al riscaldamento in stufa, in accordo con la metodica standard ISO 662:1998.

Si pesano esattamente circa 10 g di campione di olio all'interno di una vaschetta di alluminio, precedentemente portata a peso costante (dopo riscaldamento in stufa per un'ora a 103°C (±2 °C) e raffreddamento in essiccatore). Si pone in stufa la vaschetta contenente il campione per 1 ora, alla temperatura di 103°C (±2°C). Successivamente, si trasferisce la vaschetta in essiccatore a temperatura ambiente, fino al completo raffreddamento (circa 30 min) e si pesa su bilancia analitica. Per ottenere una stabilizzazione della perdita di massa e verificare eventuali fenomeni ossidativi, si reintroduce il campione in stufa per 30 min e si ripesa dopo raffreddamento in essiccatore. Le vaschette di alluminio devono essere prelevate sempre con le pinze per evitare eventuali cessioni di umidità e quindi modificazioni del peso. Per ogni campione vengono effettuate tre repliche. Il contenuto di acqua viene calcolato secondo la seguente formula:

$$\text{Acqua (\%)} = (D-F)/C*100$$

in cui:

D è il peso (g) della vaschetta contenente il campione prima dell'essiccazione

F è il peso costante (g) della vaschetta contenente il campione dopo l'essiccazione

C è il peso del campione (g) prima dell'essiccazione

I valori del contenuto in acqua sono espressi in ppm (mg di acqua per kg di olio) e sono riportati in **Tabelle 1-4** nel capitolo 4.

3.5 Metodo gravimetrico mediante l'utilizzo della termobilancia

3.5.1 Attrezzature

Termobilancia (**Figura 4**) costituita da:

Display LCD retroilluminato;

Unità di visualizzazione dei risultati (es. % umidità);

Processo di essiccazione attivo ;

Lampada alogene in vetro al quarzo (400 W);

Memoria interna alla bilancia per svolgimento automatico di 5 cicli di essiccazione completi (nel nostro caso 3 repliche) .



Figura 4 Termobilancia

3.5.2 Procedimento

Il metodo consiste nel porre un'apposita vaschetta (piatti per campioni in alluminio di un diametro di 92 mm) in termobilancia, programmare la bilancia a 138°C per un tempo di 4 min (con preriscaldamento). Quindi tarare e porre sul piattino 10 g di olio ed attendere 4 min. In seguito sul display viene visualizzato il peso dopo l'evaporazione dell'acqua e la percentuale di umidità evaporata. Si calcola la % effettiva di acqua contenuta nell'olio.

3.6 Determinazione del contenuto di acqua mediante metodo dielettrico

3.6.1 Attrezzatura

La strumentazione (**Figura 5**) utilizzata per le misure capacitive comprende:

- ponte LCR meter (Lcr 8101G, Gwinstek), collegato alla sonda di acquisizione tramite cavo dielettrico bipolare.
- Condensatore a piatti paralleli utilizzato come sonda (rotore e statore aventi 10 e 12 piatti).
- Personal computer per la registrazione ed elaborazione dei dati.

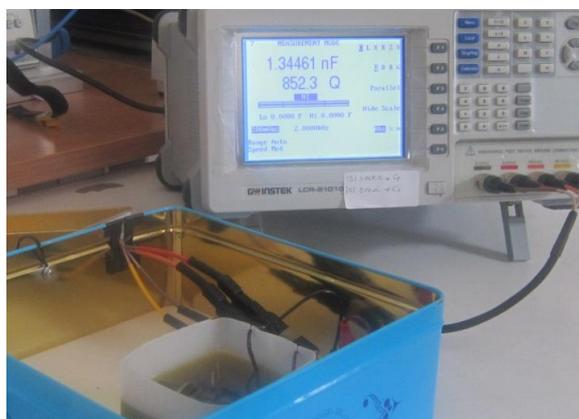


Figura 5 Ponte LCR meter (Lcr 8101G, Gwinstek)

3.6.2 Procedimento

La misurazione é stata condotta in triplo per ogni campione prelevato nella quantità di circa 150 g. I dati capacitivi sono stati acquisiti a 2 KHz di frequenza. Al termine dell'acquisizione di ogni campione, la sonda è stata lavata mediante un solvente a base di *n*-esano ed asciugata accuratamente con aria compressa, al fine di rimuovere tracce di solvente.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Determinazione del contenuto di acqua nei campioni esaminati

4.1.1 Metodo gravimetrico in stufa

Considerando i risultati ottenuti con metodo gravimetrico in stufa, i 60 campioni esaminati hanno evidenziato un contenuto in acqua compreso tra un minimo di 323 ed un massimo di 2060 mg/kg, con un valore medio di 770.

I valori relativi a ciascun campione sono riportati nelle **Tabelle 1-4**.

Si tratta di un intervallo ampio, che mostra come i campioni presentassero un contenuto eterogeneo di acqua, in funzione delle variabili compositive della materia prima e di processo, precedentemente descritte nell'introduzione di questo lavoro di tesi.

4.1.2 Correlazioni fra le determinazioni analitiche tradizionali

Un soddisfacente livello di correlazione è stato evidenziato fra i tre metodi considerati. Tra le correlazioni rappresentate nelle **Figure 6-8**, quella migliore è relativa a quella tra i dati ottenuti con il metodo gravimetrico della stufa ed il metodo titrimetrico di Karl Fischer (**Figura 8**) dove si è ottenuto un R^2 pari a 0,82 che può essere considerato un valore più che buono. Si è registrata una tendenza a valori inferiori ottenuti con il metodo gravimetrico in stufa rispetto a quello titrimetrico di Karl Fischer. La correlazione più bassa che si è ottenuta è quella raffigurata in **Figura 7** dove per i dati dei due metodi gravimetrici della stufa contro quelli della termobilancia si è registrato un R^2 pari a 0,70, che comunque indica un grado di correlazione soddisfacente. In questo caso si è osservata una tendenza a valori più elevati ottenuti con la termobilancia rispetto alla stufa. Un R^2 di 0,74 è stato infine evidenziato per la correlazione dei valori del metodo titrimetrico di Karl Fischer con quelli del metodo gravimetrico mediante uso di termobilancia (**Figura 6**).

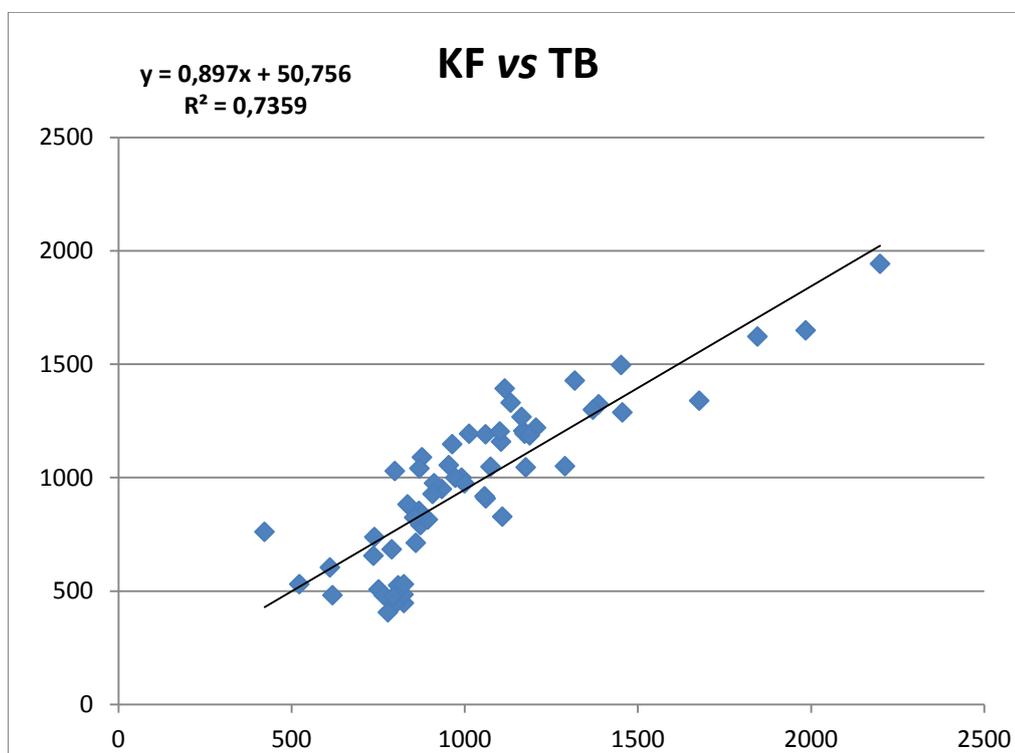


Figura 6. Correlazione tra Karl Fischer (KF) e Termobilancia(TB)

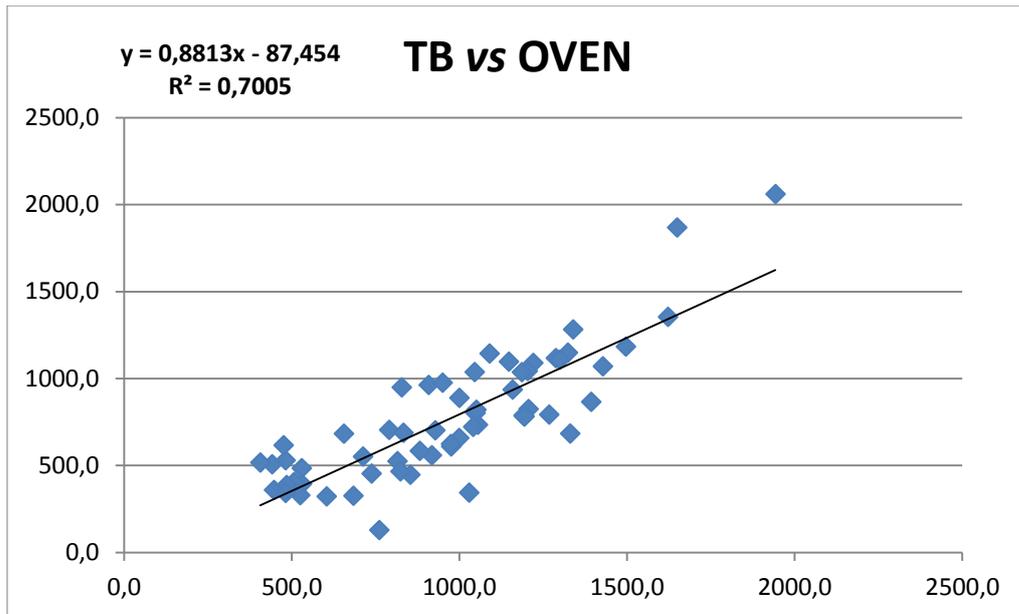


Figura 7. Correlazione tra termobilancia (TB) e stufa (OVEN)

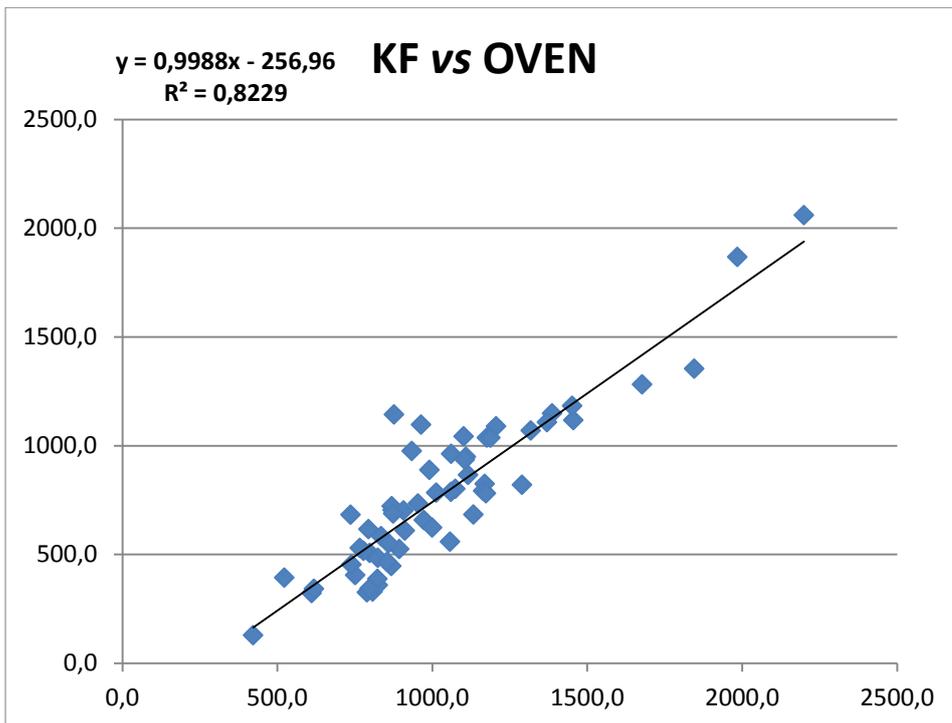


Figura 8. Correlazione tra Karl Fischer (KF) e stufa (OVEN)

	Karl-Fisher		Termobilancia		Stufa	
	<i>media</i>	<i>sd</i>	<i>media</i>	<i>sd</i>	<i>media</i>	<i>sd</i>
1	1845	75	1622	81	1355	98
2	872	35	791	42	704	45
3	1984	88	1650	82	1868	109
4	736	30	656	33	683	40
5	522	25	530,5	29	394	15
6	1677	69	1339	71	1282	91
7	611	10	604	54	323	2
8	751	7	507	69	405	85
9	808	15	525	94	330	18
10	824	38	447	4	359	28
11	823	7	485	48	388	5
12	789	48	684	18	326	10
13	798	56	442	59	507	19
14	893	9	815	52	525	75
15	868	9	854	52	447	7
16	824	16	530	140	485	9
17	618	24	482	13	342	24
18	778	4	406	59	517	12
19	421	46	761	28	129	6
20	766	16	482	2	530	31

Tabella 1 Dati (valori medie di tre repliche e deviazione standard espressi in mg/kg) del contenuto in acqua misurato mediante i tre metodi tradizionali dei campioni numerati da 1 a 20.

	Karl-Fisher		Termobilancia		Stufa	
	<i>media</i>	<i>sd</i>	<i>media</i>	<i>sd</i>	<i>media</i>	<i>sd</i>
21	1061	23	908	52	963	28
22	1176	220	1045	14	1037	20
23	964	12	1148	177	1097	13
24	1206	74	1221	5	1090	111
25	934	35	950	5	976	27
26	991	23	1000	220	889	84
27	798	16	1029	109	344	29
28	794	16	476	15	617	38
29	876	10	1090	108	1144	75
30	911	46	976	2	610	27
31	1108	59	828	206	949	46
32	973	7	999	120	659	52
33	1115	75	1393	59	866	106
34	954	38	1055	60	735	15
35	1169	21	1206	61	825	66
36	1387	15	1323	212	1149	69
37	1074	22	1048	100	802	66
38	739	65	738	212	454	48
39	869	62	1041	58	722	47
40	907	66	928	127	702	77

Tabella 2 Dati (valori medie di tre repliche e deviazione standard espressi in mg/kg) del contenuto in acqua misurato mediante i tre metodi tradizionali dei campioni numerati da 21 a 40.

	Karl-Fisher		Termobilancia		Stufa	
	<i>media</i>	<i>sd</i>	<i>media</i>	<i>sd</i>	<i>media</i>	<i>sd</i>
41	1013	73	1193	167	784	21
42	874	42	833	57	688	58
43	1164	53	1268	91	793	21
44	854	84	824	83	466	31
45	1060	20	1191	15	788	13
46	1057	41	917	43	559	29
47	1318	70	1428	66	1070	81
48	1455	27	1288	137	1118	43
49	1105	46	1159	101	936	111
50	835	29	882	92	584	28
51	859	62	713	81	552	5
52	999	70	975	12	624	55
53	1289	25	1051	87	821	114
54	1173	52	1194	64	782	37
55	1133	107	1331	79	684	35
56	1101	81	1204	114	1043	9
57	1370	86	1300	47	1108	64
58	1187	40	1186	7	1037	17
59	1451	138	1496	90	1184	159
60	2199	128	1943	163	2060	141

Tabella 3 Dati (valori medie di tre repliche e deviazione standard espressi in mg/kg) del contenuto in acqua misurato mediante i tre metodi tradizionali dei campioni numerati da 41 a 60.

Pur essendosi registrate delle soddisfacenti correlazioni tra le tre tecniche tradizionali, i valori del contenuto in acqua dei campioni si presentano variabili in funzione dell'utilizzo di una modalità di misurazione rispetto all'altra. Questo fenomeno osservato ha alcune spiegazioni: le tecniche gravimetriche basate sull'essiccamento della matrice non sono in grado di distinguere tra acqua ed altri composti in grado di volatilizzare, il risultato é che in realtà ciò che viene quantificato non é esattamente il contenuto di acqua ma la perdita di massa del prodotto nelle condizioni applicate. Tutti i composti volatili contribuiscono alla perdita in peso, anche quelli non originariamente presenti come tali ma formatisi in seguito a modificazioni chimiche innescate dall'elevata temperatura, quali le reazioni di decomposizione ossidativa; d'altra parte, l'acqua legata può sfuggire alla determinazione. Le diverse tecniche presentano vantaggi e svantaggi, in particolare quelle basate sull'essiccamento per riscaldamento necessitano di tempi d'analisi molto più lunghi rispetto al metodo titrimetrico di Karl Fischer, fatta eccezione l'applicazione della termobilancia: classicamente il metodo gravimetrico mediante stufa richiede diverse ore per arrivare ad una costanza della massa pesata, che comunque solo raramente é in realtà possibile raggiungere. In genere, si raccomanda di terminare la misurazione entro un tempo prefissato (es. 2 ore), per rendere i risultati più comparabili, poiché in molti casi si osserva un'ulteriore perdita in peso causata da reazioni decompositive. Uno svantaggio del metodo titrimetrico di Karl Fischer é invece rappresentato dall'uso di reattivi e solventi.

Un'altra variabile da considerare quando si effettuano le analisi comparative tra campioni é che la concentrazione di acqua nell'olio tende a variare in modo significativo in relazione al tempo di conservazione ed all'apertura del contenitore a causa dell'assorbimento di acqua dall'ambiente o perdita di acqua dall'olio verso l'ambiente.

4.1.3 Valutazione del contenuto in acqua mediante analisi dielettrica

In **Tabella 4** sono riassunti i valori medi e le relative deviazioni standard del contenuto di acqua di 23 campioni di olio extra vergine di oliva, numerati da 61 ad 84, caratterizzati da dati ottenuti con il metodo gravimetrico mediante stufa variabili tra 178 mg/kg e 1321 mg/kg. Pur avendo un numero più limitato di campioni rispetto al precedente confronto tra le tre tecniche tradizionali (23 vs 60), è stato possibile analizzare campioni caratterizzati da un intervallo sufficientemente ampio di valori di contenuto in acqua, che si possono considerare rappresentativi dei prodotti comunemente ritrovabili in commercio. A fianco ai dati ottenuti con il metodo per essiccazione in stufa è possibile osservare quelli ottenuti con il metodo innovativo capacitivo (dielettrico) che prevede l'uso di un condensatore a piatti paralleli.

In **Figura 9** è rappresentato il modello di regressione lineare ottenuto correlando le misure dielettriche capacitive con il contenuto d'acqua misurato con la stufa. Il modello è caratterizzato da un coefficiente di correlazione R^2 pari a circa 0,82, dato che si può considerare buono per il modello predittivo costruito con i dati dell'analisi dielettrica, anche se in questo caso è stato considerato un numero di campioni più limitato rispetto alle correlazioni tra tecniche tradizionali.

	Stufa		Dielettrico	
	<i>media</i>	<i>sd</i>	<i>media</i>	<i>sd</i>
61	1003	70	1344,56	0,04
62	741	13	1340,70	0,02
63	965	31	1343,53	0,06
64	1321	99	1351,27	0,01
65	815	36	1342,73	0,06
66	760	29	1344,15	0,06
67	832	18	1344,39	0,03
68	981	52	1344,67	0,02
69	898	57	1347,28	0,04
70	560	3	1339,18	0,04
71	921	52	1347,44	0,02
72	1249	14	1349,71	0,03
73	908	7	1344,36	0,01
75	178	40	1334,67	0,07
76	294	52	1337,00	0,02
77	1036	26	1344,56	0,04
78	671	22	1342,75	0,05
79	620	15	1342,25	0,06
80	255	13	1340,00	0,04
81	420	45	1342,01	0,02
82	233	3	1337,10	0,03
83	728	15	1342,39	0,06
84	957	35	1348,82	0,05

Tabella 4 Valori medi e le relative deviazioni standard. Per il metodo di essiccamento in stufa sono espressi in mg/kg. Per il metodo capacitivo sono espressi in pF (pico-Faraday).

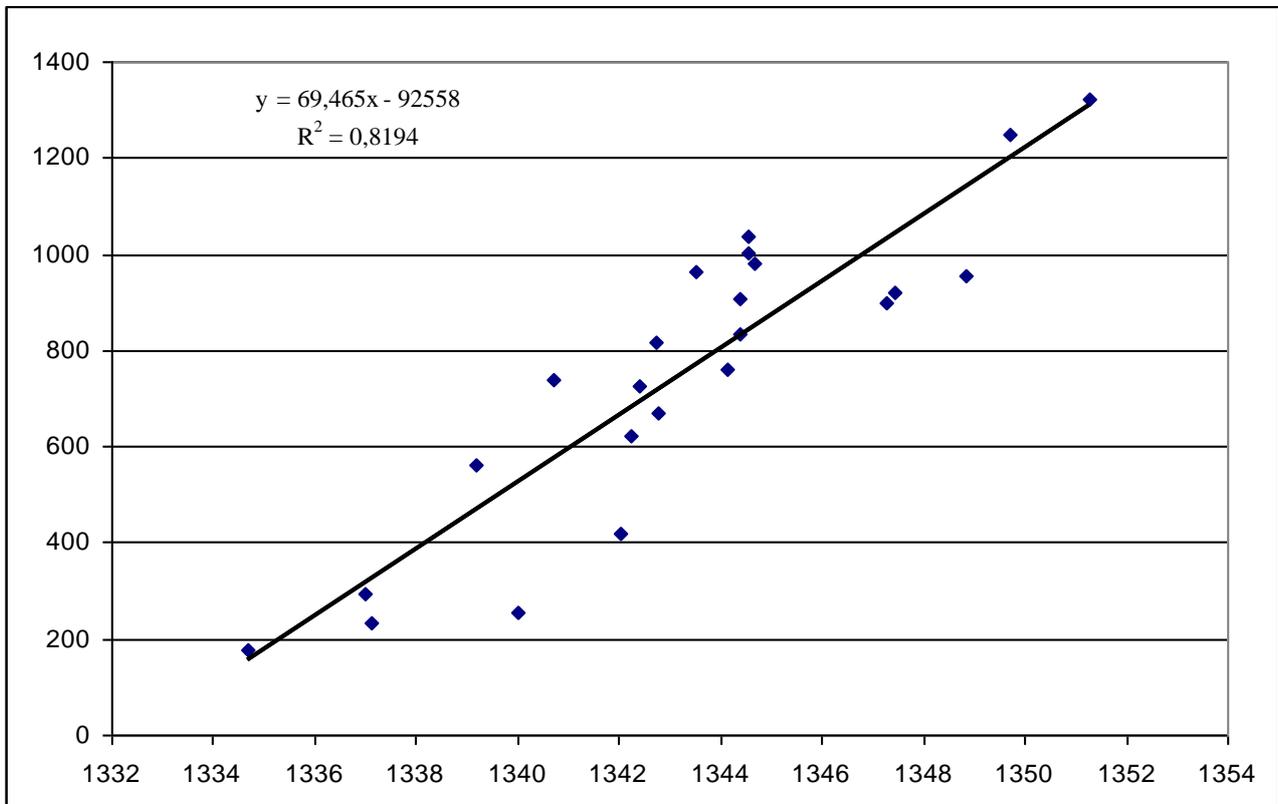


Figura 9. Correlazione tra misure dielettriche e con stufa

5. CONCLUSIONI

Nell'ambito del presente lavoro sperimentale sono state prese in considerazione differenti tecniche, tradizionali ed innovative, per la determinazione del contenuto di acqua presente negli oli extravergine di oliva. Seppur presente nell'olio in quantità limitata, l'acqua é in grado di favorire la dissoluzione e veicolare componenti minori idrofilici (come le molecole a struttura fenolica e polifenolica) all'interno di micelle inverse che si creano nella matrice lipidica quando alla superficie acqua-olio si aggregano composti anfifilici (come i digliceridi, i monogliceridi, gli acidi grassi liberi, i fosfolipidi etc.) che danno luogo alla formazione di aggregati colloidali.

I risultati ottenuti su un set di 60 campioni hanno evidenziato come esistano correlazioni positive e soddisfacenti tra le diverse metodiche analitiche tradizionali quali la titolazione titrimetrica di Karl Fisher e quelle gravimetriche per essiccamento in stufa o mediante termobilancia. La migliore correlazione in termini di R^2 con valore pari a circa 0,82 è stata ottenuta tra i metodi Karl Fisher ed essiccamento in stufa, mentre per esempio quella tra i due metodi gravimetrici (stufa e termobilancia) ha fatto registrare un valore inferiore (0,70). Pur essendosi verificate delle soddisfacenti correlazioni tra le tre tecniche tradizionali, i valori del contenuto in acqua dei campioni si sono presentati variabili in funzione dell'utilizzo di una modalità di misurazione rispetto all'altra. Tale variabilità é funzione di diversi fattori: la difficoltà di determinare l'acqua fortemente legata nel caso dei metodi per essiccamento; la perdita in peso causata anche da altri componenti in grado di volatilizzare alle condizioni analitiche adottate; la possibilità di formazione di composti non originariamente presenti come risultato di modificazioni chimiche indotte dall'elevata temperatura.

Il contenuto di acqua è stato quindi stimato anche mediante una tecnica innovativa a basso costo basata su misure dielettriche. Considerato che l'olio extravergine di oliva è noto essere un ottimo isolante, il fenomeno dielettrico osservato risulta essere di natura capacitiva. Il risultato di correlazione ottenuto su un set di 23 oli extravergini di oliva applicando in parallelo questa tecnica rapida e la misura gravimetrica con stufa (che è un metodo ISO), è da considerarsi soddisfacente, con un R^2 pari anche in questo caso a 0,82.

In conclusione, le tecniche attualmente utilizzate per la determinazione del contenuto di acqua in oli extravergine di oliva risultano tra loro correlate. Considerando che tali tecniche tradizionali sono dispendiose o in termini di tempo (gravimetrico mediante stufa) o in termini di consumo di reagenti e solventi (titrimetrico con reattivo di Karl Fischer), il nuovo approccio sperimentato mediante misure capacitive può essere considerato molto interessante anche se, sicuramente, sarà da applicare ad un numero più ampio di campioni per rendere l'evidenza sperimentale più robusta.

6. BIBLIOGRAFIA

Alloggio V., CAPONIO F. (1997) "Influenza delle tecniche di preparazione della pasta di olive sulla qualità dell'olio. Nota II. Evoluzione delle sostanze fenoliche e di alcuni parametri di qualità in funzione della maturazione delle drupe in oli di oliva vergine della cv Coratina." Riv. Ital. Sost. Grasse. 74: 443-447.

Bendini A., Cerretani L., Carrasco-Pancorbo A., M. Gómez-Caravaca A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Lercker G., (2007). "Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods: an overview of the last decade" *Molecules*. 12: 1679-1719.

Bonoli-Carbognin M., Cerretani L., Bendini A., Gallina Toschi T., Lercker G.. (2005). "Prove di conservazione a diversa temperatura di olio da olive monovarietal" *Ind. Aliment.* 452: 1135-1141.

Carrasco-Pancorbo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Gallina Toschi T., Fernández-Gutiérrez A., (2005). "Analytical determination of polyphenols in olive oils" *J. Sep. Sci.* 28: 837-858.

Cerretani L., Bendini A., Barbieri S., Lercker G.. (2008). "Osservazioni preliminari riguardo alla variazione di alcune caratteristiche chimiche di oli vergini da olive sottoposti a processi di deodorazione "soft"". Riv. Ital. Sost. Grasse 85: 75-82.

Cerretani L., Bendini A., Lercker G., Gallina T. (2005) “Analytical comparison of monovarietal virgin olive oil, obtained by both a continuous industrial plant and a low-scale mill.” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107: 93-100.

Donatella Senatra (2006). “Dielectric analysis and differential scanning calorimetry of water in oil microemulsions. *Adv. Colloid Int. Sci.*” 123-126: 415-424.

Eleonora Iaccheri. (anno accademico 2009-2010). Tesi in Proprietà chimico meccaniche “Tecniche dielettriche per la determinazione dell’acqua negli oli extravergini d’oliva”.

Fantini Fabio (anno accademico 2011-2012). Tesi in Analisi chimiche dei prodotti alimentari “Valutazione della qualità degli oli extravergini di olive chiarificati mediante gas inerti”.

Gallina Toschi T., Bendini A., Cerretani L., Lercker G.. (2010). “L’olio vergine ed extra vergine di oliva: componenti minori, scelte agronomiche, tecnologie di estrazione e qualità.” *Italus Hortus*, 17 (7): 91-103.

Lercker G., Bendini A, Cerni S, Cerretani L, Caramia G, Piccioni P, Mondini G, Mengucci A, Ricci A. (2007). *Un filo d’olio .”Guida all'acquisto ed al consumo dell'olio extravergine di oliva”*.

Lercker G., Bendini A., Cerretani L.. (2007). "Qualità, composizione e tecnologia di produzione degli oli vergini di oliva" *Progr. Nutr.* 9: 134-148.

Lercker G., Zuzic I. (2010). “Istrian liquid green gold”. Dal capitolo “Caratteristiche chimico-fisiche degli oli extravergini d’oliva” .78-82 ISBN 978-953-99429-4-4.

Lizhi H., Toyoda K., Ihara I. (2008). "Dielectric proprieties of edible oils and fatty acids as a function of frequency, temperature, moisture and composition". J. Food Eng. 88: 151-158.

Montedoro G. F., Baldioli M. (2003). Frutto: "struttura anatomica e composizione chimica. Corso di aggiornamento: L'estrazione dell'olio di oliva: aggiornamento sulle conoscenze biochimiche-tecnologiche e impiantistiche in relazione alla qualità dell'olio e allo smaltimento dei rifiuti." Accademia nazionale dell'olio e dell'olivo. Spoleto 28-31 ottobre (2003).

Qinmgzhong X. (2001). "Study on dielectric proprieties of oil/water random composites". J. Electrostatics. 50: 169-175.

Xenakis A, Papadimitriou V., Sotiroudis T. G. (2010) "Colloidal structures in natural oils" Curr. Opinion Coll. Int. Sci. 15: 55–60.

7. RINGRAZIAMENTI

I miei ringraziamenti sono rivolti a coloro che hanno fiducia in me e che mi hanno sempre sostenuto sia moralmente che economicamente: i miei genitori e la nonna. Grazie!.

I miei ringraziamenti sono rivolti a coloro che mi hanno permesso di realizzare questo lavoro; Alessandra Bendini, Enrico Valli e Eleonora Iaccheri, che mi hanno sopportato e supportato, aiutato e sostenuto lungo tutto il periodo elaborativo della tesi. Grazie!

I miei ringraziamenti sono rivolti a coloro che mi conoscono che mi hanno aiutato in questo percorso di studio, a coloro che mi hanno sostenuto come potevano e spero che continueranno a farlo; Zhanna Kuti, Igor Žužić, Anton Matosevic.