



Università degli Studi di Messina

Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche e Ambientali
Dottorato di Ricerca in “Scienze Chimiche”

Preparazione e caratterizzazione di assoluta di fiori di pompelmo e di limone mediante heart-cutting MDGC, GC-MS/MS ed UPLC-MS/MS

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Rosaria Costa

Tesi di Dottorato di:

Vito Pellizzeri

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa Paola Dugo

XXXII Ciclo, 2017-2019

INDICE DEGLI ARGOMENTI

<i>Capitolo 1</i>	
Il genere “ <i>Citrus</i> ”	pag. 3
<i>Capitolo 2</i>	
Gli oli essenziali agrumari	pag. 9
<i>Capitolo 3</i>	
Tecniche di estrazione degli oli essenziali	pag. 21
<i>Capitolo 4</i>	
La gas cromatografia multidimensionale	pag. 39
<i>Capitolo 5</i>	
L’analisi chirale	pag. 59
<i>Capitolo 6</i>	
I composti non volatili nelle essenze agrumarie	pag. 63
<i>Capitolo 7</i>	
Caratterizzazione dell’assoluta di fiori di pompelmo e di limone	pag. 70
<i>Capitolo 8</i>	
Risultati e Discussione	pag. 88
<i>Capitolo 9</i>	
Conclusioni	pag. 99
Bibliografia	pag. 101

Capitolo 1

IL GENERE “*Citrus*”



Le piante appartenenti al genere *Citrus* sono grandi arbusti o alberi sempreverdi che raggiungono dai 5 ai 15 metri di altezza e producono frutti fragranti e molto ricchi di succo.

Le prime notizie storiche riguardanti gli agrumi possono essere datate tra il 2400 e l'800 a.C. La loro origine è stata ormai accertata ed è possibile localizzarla in estremo Oriente dalle regioni sub-tropicali all'arcipelago malese.

Le più recenti ricerche genetiche hanno stabilito che tutti gli agrumi discendono da tre progenitori: il cedro, il pomelo e il mandarino.

Il primo agrume diffusosi in Medio Oriente ed in Europa è probabilmente il cedro [1], riportato da Teofrasto nel 300 a.C. con il nome di “Pomo di Media” e successivamente visibile in alcune monete ebraiche; presso gli ebrei era infatti considerato un frutto sacro. In molte pitture presso Pompei ed Ercolano vengono raffigurati foglie e frutti, probabilmente di limone, frutto al quale si fa riferimento nel trattato di arte culinaria di Marco Apicio, gastronomo di epoca romana, e nei trattati di medicina di quel periodo.

Anche se la presenza e l'utilizzo degli agrumi è ben documentata durante il periodo classico, la loro diffusione si interruppe con la caduta dell'Impero Romano. La successiva reintroduzione, da cui si ebbe il vero sviluppo dell'utilizzo degli agrumi nel Mediterraneo, si deve agli Arabi. Durante il XIII e il XIV secolo gli agrumi vennero intensamente coltivati in Spagna e in Sicilia, e nel XVI secolo l'utilizzo del limone come bevanda per prevenire e curare malattie come lo scorbuto, causato da carenza di vitamina C, si diffuse ampiamente [2].

Ai giorni nostri la coltivazione e trasformazione degli agrumi è diffusa soprattutto negli Stati Uniti, in Giappone, in Brasile, Argentina, Messico, Spagna, Italia ed altri paesi del bacino mediterraneo. Tuttavia, nonostante la grande varietà di specie presenti, solo alcune rivestono importanza dal punto di vista industriale, sia per la trasformazione sia per il consumo diretto; tra queste si ricordano: limone, bergamotto, mandarino, arancia dolce, arancia amara, cedro, pompelmo, clementine e limetta. L'arancia dolce è in particolare la specie di agrume che per quantità riveste sicuramente più importanza.



La classificazione botanica degli agrumi più accreditata è quella proposta da Engler e di seguito riportata:




- Sottodivisione: Angiosperme
- Classe: Monocotiledoneae
- Ordine: Geraniales
- Famiglia: Rutaceae
- Sotto-famiglia: Aurantioideae
- Tribù: Citreae




- Sotto-tribù: Citrinae
- Generi: *Citrus; Poncirus; Fortunella*

Di seguito in Tabella 1 vengono riportati i nomi e le caratteristiche degli agrumi più utilizzati industrialmente e per consumo diretto.

Tabella 1 Caratteristiche tassonomiche delle principali specie di agrumi [1]

Nome comune e nome botanico	Descrizione
<p data-bbox="384 741 644 842">Arancio amaro <i>Citrus aurantium</i></p> 	<p data-bbox="847 741 1469 1357">Albero di medie dimensioni con chioma compatta e presenza di spine sui rami; foglie mediamente grandi, ovoidali, provviste di picciolo alato. Fiori bianchi di grandi dimensioni molto profumati, di norma ermafroditi. Frutti tondi schiacciati alle estremità. Buccia spessa e rugosa di colore da giallo ad arancione. Polpa acida e di sapore amaro con notevole presenza di semi.</p>
<p data-bbox="400 1386 628 1487">Arancio dolce <i>Citrus sinensis</i></p> 	<p data-bbox="847 1386 1469 1868">Albero di medie dimensioni, rami a volte con presenza di spine flessibili, foglie con apice appuntito e base rotondeggiante. Fiori di medie dimensioni bianchi e profumati. Frutti subglobosi, ovali di colore che può andare dal giallo al rosso con presenza di semi.</p>

<p>Bergamotto <i>Citrus bergamia</i></p> 	<p>Albero di medio sviluppo con chioma espansa, rami senza spine. Foglie grandi di colore verde scuro. Fiori di colore bianco di media grandezza singoli o a grappoli. Frutti sferici di colore giallo chiaro quando sono maturi. Polpa consistente, molto acida, dal sapore amaro, con pochi semi.</p>
<p>Cedro <i>Citrus medica</i></p> 	<p>Albero di piccola dimensione dalla forma irregolare. Rami con grosse spine ascellari, foglie ellittiche con picciolo corto non alato. Fiori grandi di colore bianco con venature violacee. Frutti di grandi dimensioni di forma ovale dal colore giallo con buccia particolarmente spessa e rugosa. Polpa acida con presenza di numerosi semi.</p>
<p>Clementine <i>Citrus clementine</i></p> 	<p>Albero vigoroso che tende ad espandersi. Rami di norma sprovvisti di spine. Foglie di dimensioni variabili, fiori di colore bianco spesso a grappoli, frutti di dimensioni variabili di norma appiattiti. Buccia molto sottile con colore dal giallo al rosso. Polpa dal colore arancio dal sapore dolce, solitamente non presenta semi.</p>

<p>Limetta messicana o key Lime <i>Citrus aurantifolia</i></p> 	<p>Piccolo albero con rami irregolari con spine corte molto appuntite. Foglie piccole di colore verde pallido con apice ottuso, provviste di picciolo alettato. Fiori bianchi di piccole dimensioni di solito ascellari. Frutto piccolo di colore giallo verdastro con buccia molto sottile e semi piccoli e poco numerosi.</p>
<p>Limetta apirena o Limetta Tahiti o persiana <i>Citrus latifolia</i></p> 	<p>Albero di medie dimensioni con chioma espansa e pendente, quasi senza spine. Foglie verdi di media grandezza con picciolo alettato; germogli e fiori di colorazione violacea, frutti di piccola taglia rotondeggianti di colore giallo chiaro a maturazione, talvolta con presenza di un piccolo lobo. Polpa acida dall'aroma caratteristico priva di semi. Specie molto resistente al freddo al pari del limone.</p>
<p>Limetta Dolce <i>Citrus limetta</i></p> 	<p>Albero di media taglia con portamento espanso e poche spine. Foglie ovali dotate di picciolo alato. Fiori bianchi di medie dimensioni. Buccia sottile di colore giallo. Polpa priva di acidità con pochi semi.</p>

<p style="text-align: center;">Limone <i>Citrus limon</i></p> 	<p>Albero di medio-grandi dimensioni con portamento espanso. Rami a volte con presenza di spine, foglie di colore verde chiaro. Fiori di colore dal bianco al violaceo profumati. Frutti dalla forma allungata con buccia mediamente rugosa. Polpa ricca di succo mediamente acida con presenza di semi.</p>
<p style="text-align: center;">Mandarino <i>Citrus reticulata</i></p> 	<p>Albero di media taglia dal portamento espanso. Rami sottili senza spine. Foglie piccole di colore verde scuro, fiori bianchi con sviluppo a grappolo, frutto di piccole dimensioni schiacciato ai poli. Buccia sottile di facile rimozione di colore giallo rossastro. Polpa dal sapore dolce con presenza di semi appuntiti.</p>
<p style="text-align: center;">Pompelmo <i>Citrus paradisi</i></p> 	<p>Pianta vigorosa con notevole sviluppo ed elevata capacità di adattamento. Chioma irregolare, rami lisci senza spine, foglie grandi di colore verde chiaro con picciolo alato. Buccia liscia di colore giallo pallido, polpa ricca di succo, acida, dal sapore molto amaro, semi di grandi dimensioni.</p>

Capitolo 2

GLI OLI ESSENZIALI AGRUMARI

2.1 Introduzione

Gli oli essenziali agrumari sono delle miscele di composti organici estratti per pressione a freddo e distillazione dalla buccia dei frutti, o in alcuni casi recuperati dalla concentrazione del succo.

Queste miscele sono costituite, nel caso di oli ottenuti per pressione a freddo, da una frazione volatile, che rappresenta l'85-99% del totale, e da una frazione non volatile che può arrivare fino al 15%.

Nella Tabella 2 sono riportate le percentuali medie di frazione non volatile per i principali tipi di agrumi.

Tabella 2 Percentuale di frazione non volatile nelle principali tipologie di agrumi [3]

Tipologia di agrume	% media di frazione non volatile
Arancia dolce	3
Arancia amara	3
Mandarino	3,5
Limone	3
Bergamotto	5
Pompelmo	5
Limetta	7
Tangerino	3

La frazione volatile degli oli essenziali agrumari è così denominata in ragione del fatto che le molecole che la costituiscono hanno un basso peso molecolare e una certa tendenza all'evaporazione, tanto da caratterizzarne l'odore. Essa è per lo più costituita

da idrocarburi monoterpenici, loro derivati ossigenati e idrocarburi sesquiterpenici; inoltre sono presenti derivati ossigenati a catena lineare, come alcoli e aldeidi alifatiche, e piccole quantità di composti azotati e solforati che conferiscono, dove presenti, importanti qualità olfattive agli oli essenziali.

La frazione non volatile è costituita da composti organici a più alto peso molecolare come di- tri- e tetraterpeni, cere, carotenoidi, cumarine e psoraleni, come verrà approfondito successivamente.

2.2 I costituenti della frazione volatile

2.2.1 I terpeni

La costituente quantitativamente più importante negli oli essenziali agrumari è decisamente rappresentata dai monoterpeni.

Questi sono molecole costituite da scheletri di atomi di carbonio ottenuti per unione di due unità di isoprene. La stessa via biosintetica che porta alla formazione dei monoterpeni conduce anche alla formazione di alcoli e aldeidi terpeniche nonché alla formazione dei sesquiterpeni. Essa prevede, inizialmente, la condensazione aldolica di due molecole di acetilcoenzima A e l'ottenimento, come intermedio, dell'acido mevalonico, e successivamente, tramite fosforilazione, dell'isopentenil pirofosfato (IPP), che rappresenta il mattone su cui si costruiscono tutti i composti terpenici.

Possiamo successivamente suddividere i terpeni presenti negli oli essenziali agrumari in:

- Monoterpeni
- Sesquiterpeni
- Aldeidi e chetoni terpenici
- Alcoli terpenici
- Esteri terpenici

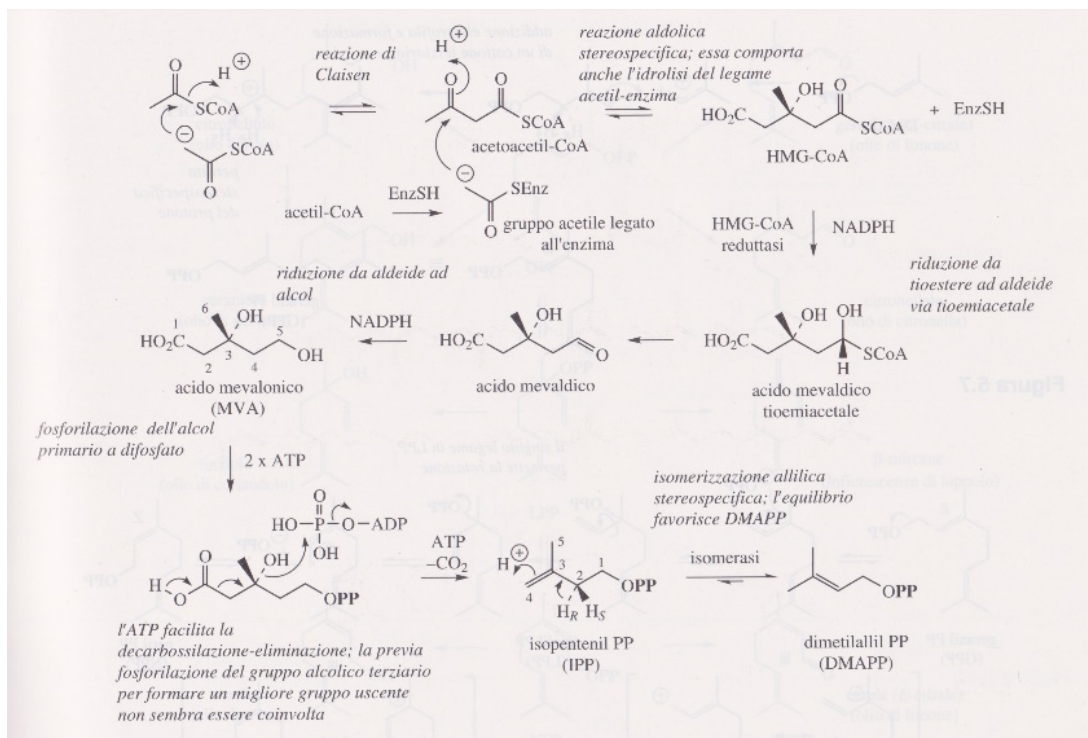


Figura 1 Percorso biosintetico dei terpeni

Come precedentemente riportato, i monoterpeni rappresentano non solo la parte più importante in quantità, ma anche la cosiddetta “nota di testa”, ovvero la parte più volatile degli oli essenziali di agrumi. Fra questi, quello presente in maggior quantità è il limonene, che nell’olio essenziale di arancio rappresenta circa il 97% della frazione volatile.

I sesquiterpeni rappresentano la frazione più pesante della parte volatile, sono costituiti da tre unità isopreniche, e di solito la loro presenza caratterizza il profilo degli oli essenziali; a titolo esemplificativo si citano: il valencene, presente nell’olio essenziale di arancia dolce, il bisabolene, presente nel limone, nella limetta e nel bergamotto, il farnesene, caratteristico del tangerino.

I derivati ossigenati dei terpeni rappresentano la parte dell’olio essenziale che ha un maggior impatto olfattivo, cioè che ne caratterizza fortemente l’odore. Ad esempio, l’olio essenziale di bergamotto deve le sue qualità olfattive principalmente alla presenza di alte quantità di linalolo ed acetato di linalile, così come nel limone si deve

al nerale al geraniale (cital), la classica nota esperidata di agrumi. Nel mandarino invece, oltre al dimetilantranilato, una parte dell'odore caratteristico si deve al sinensale, aldeide sesquiterpenica presente in piccole quantità sia nel mandarino sia nel clementino. Ricordiamo infine il nootkatone, chetone sesquiterpenico che conferisce una caratteristica nota amara all'olio essenziale di pompelmo.

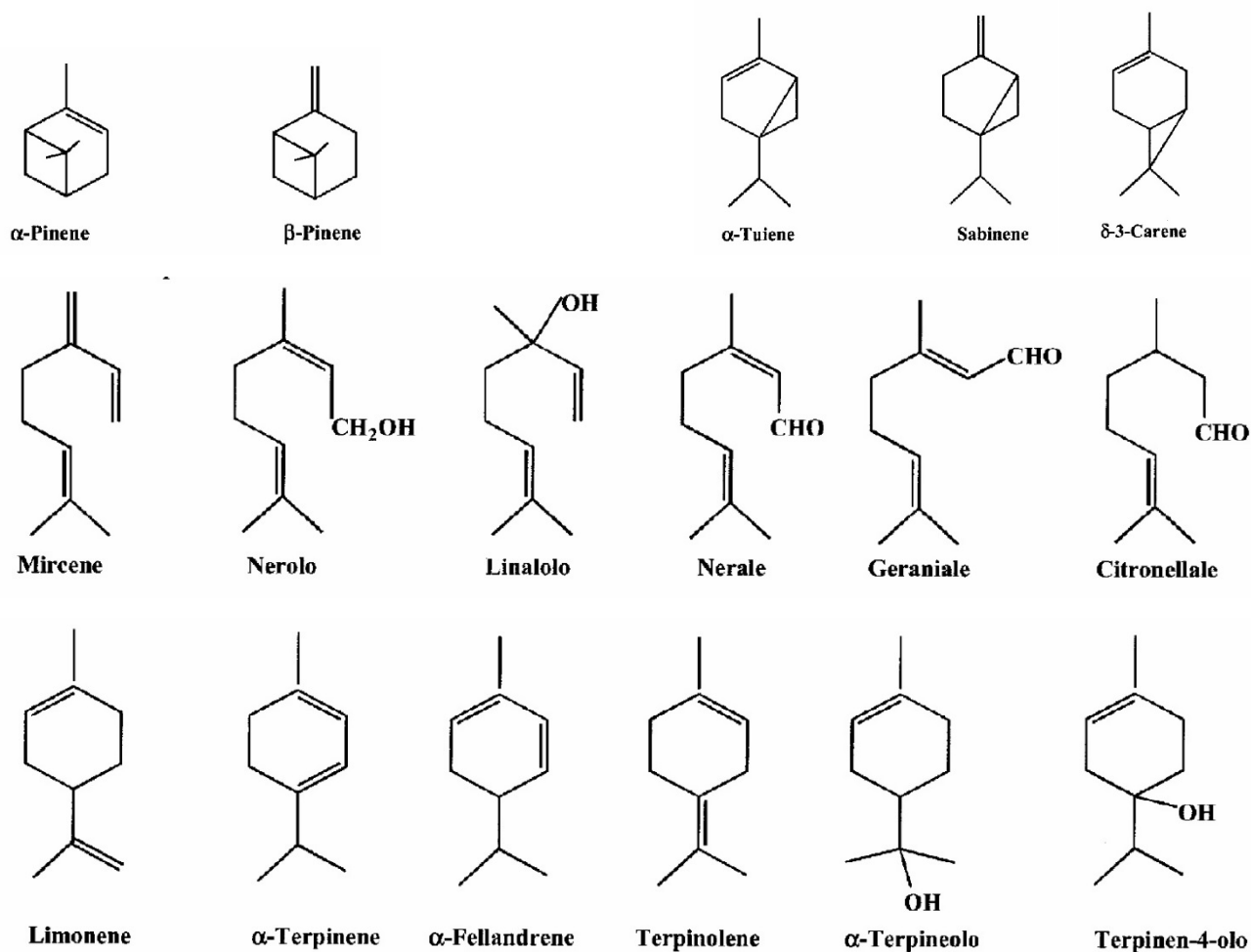


Figura 2 Principali composti terpenici

2.2.2 Composti non terpenici

Oltre alla frazione terpenica, negli oli essenziali agrumari sono presenti altri composti di varia natura, alifatica, carbonilica, composti azotati e solforati. Alcuni di questi, anche se presenti in quantità molto basse, riescono a caratterizzare in modo univoco gli oli essenziali. È il caso, ad esempio, dei composti solforati, mercaptani per lo più,

presenti nell'olio essenziale di pompelmo. Notevole importanza rivestono le aldeidi alifatiche, in particolare ottanale, nonanale, decanale e dodecanale; questa serie di composti, dall'odore molto intenso, e presenti in tutti gli oli essenziali agrumari, caratterizza fortemente alcune essenze, come quella di arancio. Tra i composti azotati citiamo il metil-N-metilantranilato, caratteristico del mandarino, a cui conferisce la classica nota di "bruciato"; il metilantranilato, presente nell'olio essenziale di neroli; e l'indolo, dalla caratteristica nota di "armadio chiuso" o anche da alcuni definita "fecale", presente nell'olio essenziale di neroli e, in particolare, nell'assoluta di fiori di arancio amaro. Per finire, una notevole importanza sotto il profilo olfattivo rivestono alcuni alcoli alifatici a corta catena, come esenolo e ottanolo, oltre ad esteri come il butirrato di etile, che caratterizzano particolari oli di arancia dolce distillati.

2.3 Altri oli essenziali agrumari

Oltre agli oli essenziali *cold pressed*, ovvero ottenuti mediante lavorazione meccanica a freddo del frutto intero o delle bucce, è notevole la produzione di oli essenziali distillati. Questa operazione si rende necessaria a fini tecnologici per rimuovere la parte non volatile, principalmente per l'utilizzo di queste essenze in profumeria. Infatti, la frazione rimossa da oli essenziali come limone, bergamotto, limetta, arancia amara e pompelmo, contiene cumarine e psoraleni, sostanze fotoirritanti, cioè che a diretto contatto con la pelle e per effetto della luce solare possono indurre eczemi, eritemi ed ustioni. Si rende quindi necessaria questa operazione al fine di poter utilizzare questi oli quali ingredienti di profumi e di cosmetici, nel rispetto della normativa internazionale che disciplina e regola l'impiego di queste materie prime.

Inoltre, si ricorre alla distillazione anche per ottenere prodotti incolori per il loro utilizzo in bevande. Altre volte, invece, come nel caso dell'olio essenziale di limetta key, la distillazione, operata in precise condizioni, permette di ottenere oli essenziali con profili olfattivi particolari e nettamente diversi da quelli del frutto di partenza.

Tabella 3 Componenti identificati nella frazione volatile di oli agrumari “cold pressed”. L= Limone; B = Bergamotto; AA = Arancia Amara; AD = Arancia Dolce; M = Mandarino; C = Clementino; P = Pompelmo; LK = limetta Key; LP = Limetta Persiana. [3]

	L	B	AA	AD bionda	AD rossa	M	C	P	LK	LP
esanolo ^(t)			+							
triclene	+	+							+	+
α -tuene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -pinene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
canfene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
tuia-2,4(10)-diene									+	+
eptanolo						+				
sabinene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β -pinene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6-metil-5-epten-2-one	+	+				+			+	+
mircene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
deidro-1,8-cineolo ^(t)									+	+
α -fellandrene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ottanale	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
decano									+	+
esil acetato		+								
δ -3-carene	+	+	+	+	+	+	+		+	+
α -terpinene	+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>p</i> -cimene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
limonene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β -fellandrene	+	+	+	+		+	+	+	+	+
1,8-cineolo	+	+				+			+	+
(Z)- β -ocimene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(E)- β -ocimene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
γ -terpinene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cis</i> -sabinene idrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cis</i> -linalolo ossido		+								
ottanolo	+	+	+	+	+	+	+	+		
terpinolene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>trans</i> -linalolo ossido		+								
<i>trans</i> -sabinene idrato	+		+		+	+	+		+	+
linalolo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
nonanale	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,3,8, <i>p</i> -mentatriene						+				
endo-fencholo									+	+
<i>cis</i> - <i>p</i> -ment-2-en-1-olo									+	+
<i>cis</i> -pinene idrato ^(t)						+				
eptil acetato		+								
<i>cis</i> -limonene ossido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
allo-ocimene ^(t)	+	+							+	+
<i>trans</i> -pinocarveolo									+	+
<i>trans</i> -limonene ossido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
canfora	+	+				+			+	+
<i>trans</i> - <i>p</i> -ment-2-en-1-olo									+	+
isopulegolo		+								
(E)-mirossido			+							

	L	B	AA	AD bionda	AD rossa	M	C	P	LK	LP
citronellale	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
borneolo	+		+						+	+
cis-pinocamfone									+	+
terpinen-4-olo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
nonanolo ^(t)			+							
p-cimen-8-olo						+				
α -terpineolo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
cis-piperitolo									+	+
decanale	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
dodecano		+							+	+
trans-carveolo				+			+	+		
ottile acetato	+	+	+	+	+	+	+	+		
cis-carveolo				+	+		+			
nerolo	+	+	+	+	+	+		+	+	+
citronello	+	+	+			+				
citronellile formiato				+	+					
carvone		+		+	+	+	+	+		
nerale	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
piperitone ^(t)	+		+			+			+	+
cis-sabinene idrato acetato ^(t)		+								
geraniolo	+	+		+	+			+	+	+
linalile acetato		+	+			+	+	+		
(E)-dec-2-en-1-ale ^(t)		+		+	+	+	+			
perilla aldeide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
geraniale	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
decanolo								+		
bornile acetato	+	+							+	+
indolo ^(t)		+								
perilla alcol						+	+			
cis- β -terpineolo								+		
trans-pinocarville acetato									+	+
timolo						+	+			
carvacrolo ^(t)									+	+
tridecano									+	+
undecanale	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(E,E)-2,4-decadienale			+	+	+	+	+			
nonile acetato	+	+	+	+	+	+				
metil geranoato	+	+								
δ -elemene		+	+						+	+
linalile propanoato		+								
α -terpenil acetato		+	+	+	+		+	+	+	+
trans-carville acetato ^(t)								+		
citronellile acetato	+	+	+	+	+	+		+	+	+
nerile acetato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -copaene				+	+	+	+	+		
geranile acetato	+	+	+	+	+	+	+		+	+

	L	B	AA	AD bionda	AD rossa	M	C	P	LK	LP
β -bisabololo	+	+							+	+
α -bisabololo	+	+							+	+
β -sinensale				+	+		+	+		
emiarina									+	+
pentadecanale									+	+
(E,E)-farnesolo								+		
(E,Z)-farnesolo								+	+	+
α -sinensale			+	+	+	+	+			
nootkatone	+	+	+	+	+			+		
esadecanale				+	+	+		+	+	+

L'olio essenziale di limetta key, distillato a contatto con il succo molto acido, subisce modificazioni importanti nei suoi componenti, con formazione di alte percentuali di alcoli terpenici: l'1-4 cineolo, il fenciolo, l'alfa-terpineolo ed altri, che conferiscono una qualità olfattiva altrimenti non raggiungibile.

Altri tipi di oli essenziali agrumari si ottengono non dai frutti, ma per distillazione in corrente di vapore di foglie, rametti e fiori; si tratta dei petitgrain e del neroli. Fra tutte le piante di agrumi, quelle che rivestono un interesse industriale nella produzione di petitgrain sono principalmente il limone, l'arancia amara e il mandarino; la produzione di neroli si ottiene esclusivamente dalla distillazione in corrente di vapore dei fiori di arancia amara.

La composizione di questi distillati e il loro profilo olfattivo sono ben diversi da quelli delle essenze ricavate dai frutti, anche se molti componenti sono identici. In particolare questi oli essenziali sono caratterizzati da notevole fragranza e dalla presenza di una maggiore quantità di composti ossigenati; ad esempio, il petitgrain di arancia amara (Bigaradier) può contenere anche il 50% di acetato di linalile; il petitgrain di limone (Citronnier) contiene elevate quantità di citral (nerale + geraniale), e il petitgrain di mandarino (Mandarinier) contiene circa il 45% di metil-N-metilantranilato.

Tabella 4 Componenti identificati nel Petitgrain - AA = Arancia amara; AD = Arancia dolce; L = Limone; M = Mandarino[3].

	AA	AD	L	M
triciclene	+	+	+	+
α -tuiene	+	+	+	+
α -pinene	+	+	+	+
α -fencene	+	+	+	+
canfene	+	+	+	+
sabinene	+	+	+	+
β -pinene	+	+	+	+
6-metil-5-epten-2-one	+	+	+	+
mircene	+	+	+	+
ottanale		+	+	+
α -fellandrene	+	+	+	+
δ -3-carene	+	+	+	+
α -terpinene	+	+	+	+
<i>o</i> -cimene	+	+	+	+
<i>p</i> -cimene	+	+	+	+
limonene	+	+	+	+
β -fellandrene	+	+	+	+
1,8-cineolo	+	+	+	+
(Z)- β -ocimene	+	+	+	+
(E)- β -ocimene	+	+	+	+
γ -terpinene	+	+	+	+
<i>cis</i> -sabinene idrato	+	+	+	+
<i>cis</i> -linalolo ossido	+	+	+	+
ottanolo				+
<i>p</i> -ment-(2,4)8-diene ⁽¹⁾	+	+	+	
terpinolene	+	+	+	+
<i>trans</i> -linalolo ossido	+			
<i>p</i> -cimenene	+			+
linalolo	+	+	+	+
nonanale	+	+	+	+
1,3,8- <i>p</i> -mentatriene				+
<i>cis</i> - <i>p</i> -ment-2-en-1-olo	+	+	+	+
<i>cis</i> -limonene ossido			+	+
allo-ocimene	+	+	+	+
<i>trans</i> -limonene ossido			+	+
<i>trans</i> - <i>p</i> -ment-2-en-1-olo ⁽¹⁾	+	+		
iso-pulegolo		+	+	
(E)-mirossido	+			
iso-isoptulegolo		+	+	
citronellale	+	+	+	+
borneolo				+
terpinen-4-olo	+	+	+	+
<i>p</i> -cimen-8-olo		+		+
α -terpineolo	+	+	+	+
<i>cis</i> -piperitolo		+		

	AA	AD	L	M
decanale		+	+	+
<i>trans</i> -piperitolo		+		
nerolo	+	+	+	+
citronellolo		+	+	+
timolo metil etere				+
citronellile formiato ^(t)		+		
nerale	+	+	+	+
geraniolo	+	+	+	+
linalile acetato	+	+	+	+
geraniale	+	+	+	+
timolo		+		+
undecanale			+	
carvacrolo				+
metil geranoato	+	+	+	
metil antranilato				+
δ -elemene	+			
α -cubebene ^(t)	+			
linalile propanoato	+			
α -terpenile acetato	+			+
citronellile acetato	+	+	+	
nerile acetato	+	+	+	+
α -copaene ^(t)	+	+		
geranile acetato	+	+	+	+
β -elemene	+	+	+	+
metil N-metil antranilato	+	+	+	+
metil eugenolo			+	
β -cariofillene	+	+	+	+
<i>cis</i> - α -bergamottene		+		
α -cadinene ^(t)		+		
<i>trans</i> - α -bergamottene	+		+	
α -umulene	+	+	+	+
nerile propanoato ^(t)			+	
β -santalene		+		
(<i>Z</i>)- β -farnesene	+	+	+	
metil-N-dimetil antranilato				+
geranile propanoato			+	
α -selinene		+		+
valencene		+		
biciclogermacrene	+	+	+	+
α -muurolene	+			
germacrene A ^(t)		+		
β -bisabolene	+	+	+	+
(<i>E,E</i>)- α -farnesene	+	+	+	+
δ -cadinene	+	+	+	+
elemolo		+		
(<i>E</i>)-nerolidolo	+	+	+	
(<i>Z</i>)-3-esenilbenzoato		+		+

	AA	AD	L	M
germanene D-4-ol ⁽¹⁾			+	
spatulenolo ⁽¹⁾	+	+		+
cariofillene ossido	+	+	+	+
epi- α -cadinolo	+			+
α -cadinolo	+			
2,3-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)-2-norbomanolo			+	
canferenolo			+	
α -bisabololo			+	
β -sinensale		+		
α -sinensale		+		

L'olio essenziale di neroli è l'unico distillato da fiori di agrumi di cui esiste una produzione, per lo più in Tunisia ed in Marocco. Il costo di questa essenza è molto alto se relazionato a quello di agrumi cold-pressed o ai petitgrain. Esso è caratterizzato da note floreali molto particolari, date in gran parte dalla presenza del metilantranilato, dell'acetato di linalile e dal linalolo. Esso può essere ottenuto oltre che per distillazione in corrente di vapore anche per estrazione con solvente, ottenendo in questo caso l'assoluta di fiori di arancia amara. La composizione è tuttavia diversa, poichè l'assoluta è caratterizzata da una minore percentuale di limonene e dalla presenza di una sensibile quantità di indolo, alcol feniletilico ed alcoli sesquiterpenici, come nerolidolo e farnesolo. Nonostante le numerose ricerche esistenti in letteratura, la composizione dell'olio essenziale di neroli così come quella dell'assoluta, non è perfettamente stabilita: tanti sono i fattori che ne influenzano il profilo, come l'origine geografica, la cura nel maneggiare la materia prima, le condizioni della distillazione o dell'estrazione.

Tabella 5 Confronto tra i componenti principali dell'essenza di neroli distillata ed estratta con solvente [3].

Componente	Distillato (%)	Assoluta (%)
Limonene	7,8 – 11,9	5,1
(Z)- β -Ocimene	0,4 – 0,6	5,1
Linalolo	43,7 – 53,33	38
Acetato di linalile	2,2 – 14,6	16,8
Alcol feniletilico	-	4,5
α -terpineolo	4,9 – 6,2	2,4
Terpinen-4-olo	0,4 – 0,8	-
Nerolo	0,9 – 1,3	0,9
Geraniolo	2,9 – 3,3	1,6
Farnesolo	-	7,7
Nerolidolo	-	7,6
Metil antranilato	0,04 – 0,12	3,0
Indolo	-	1,0

Capitolo 3

TECNICHE DI ESTRAZIONE DEGLI OLI ESSENZIALI

L'estrazione dell'olio essenziale, generalmente corrispondente alla componente odorosa, da una matrice vegetale può essere effettuato in diversi modi. Ogni processo di estrazione ha come obiettivo la massima resa e nel contempo, il mantenimento del profilo olfattivo della materia prima di partenza.

Nel campo degli agrumi, i processi di estrazione più diffusi sono l'espressione, termine con il quale si indicano i processi meccanici di estrazione a freddo, e la distillazione. Tuttavia, su altre matrici vegetali di interesse olfattivo, si utilizzano anche l'estrazione con solvente, l'estrazione con fluidi supercritici e l'ormai abbandonato enfleurage. Per tutti i processi di estrazione implementati sono di notevole importanza, al fine della buona riuscita dell'operazione, molti fattori, quali: condizioni della materia prima, macchinari utilizzati, temperature, solventi utilizzati, processi di separazione/raffinazione.

3.1 *Espressione*

I processi di estrazione meccanica a freddo sono di gran lunga quelli più utilizzati per l'ottenimento di oli essenziali agrumari di alta qualità.

Agli albori dell'industria agrumaria, tutte le operazioni di estrazione venivano effettuate manualmente, i frutti venivano cavati con piccoli arnesi e poi pressati con delle macchine, e l'essenza veniva estratta con il metodo della "scodella" o con quello della "spugna". In ogni caso, queste lavorazioni richiedevano un enorme impiego di manodopera e tempi lunghi. Tutto questo non era compatibile con la crescente richiesta

di essenza da parte del mercato, per cui si rese necessario automatizzare i processi, al fine di velocizzare le operazioni e aumentare le rese.

La prima macchina realizzata per l'estrazione dell'essenza di bergamotto vide la luce nel 1840 all'opera di Nicola Barillà e prese il nome di "Macchina Calabrese". Questa macchina non è altro che un'automatizzazione del metodo della "scodella": sono infatti presenti due coppe, una fissa e una mobile, che schiacciano il frutto e lo raschiano facendo fuoriuscire l'essenza. La macchina Calabrese, in uso fino ai primi anni '90, consentiva di ottenere essenze di alta qualità ma con un processo lento e di manodopera gravosa.

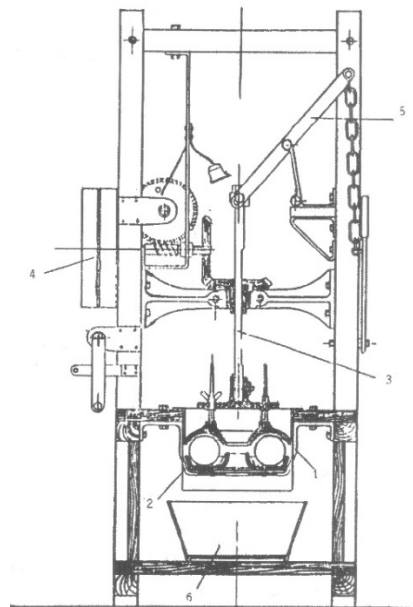


Figura 3 Macchina Calabrese [1]

I processi di estrazione meccanica possono essere applicati solo ai frutti, nei quali l'olio essenziale è localizzato in otricoli presenti nella buccia esterna. In ragione di ciò, il processo meccanico non fa altro che rompere questi otricoli, trascinando via l'olio essenziale con l'ausilio di acqua; si ottiene così un'emulsione, da cui viene poi separata l'essenza per centrifugazione. Sono diversi i macchinari che nel tempo sono stati progettati e sono attualmente in uso al fine di ottenere sia l'olio essenziale che il succo degli agrumi.

Tra questi possiamo citare:

- Macchina Pelatrice
- Macchina Sfumatrice
- Torchio
- Macchina FMC
- Macchina Persian Brown

La macchina Pelatrice si avvale di rulli raspanti che, ruotando, grattano la buccia dei frutti con l'ausilio di spruzzi di acqua; la frutta pelata viene pressata in estrattori a rulli per ricavare il succo mentre la buccia macinata ed emulsionata con acqua va verso i separatori, dove appunto viene separata dall'olio essenziale. Allo stesso modo funziona la macchina Persian Brown, la quale, tuttavia, invece di raspare il frutto lo punge con minuscoli aghi montati su dei rulli rotanti. Il percorso seguito rimane il medesimo, ma si ottiene un'essenza più pulita.

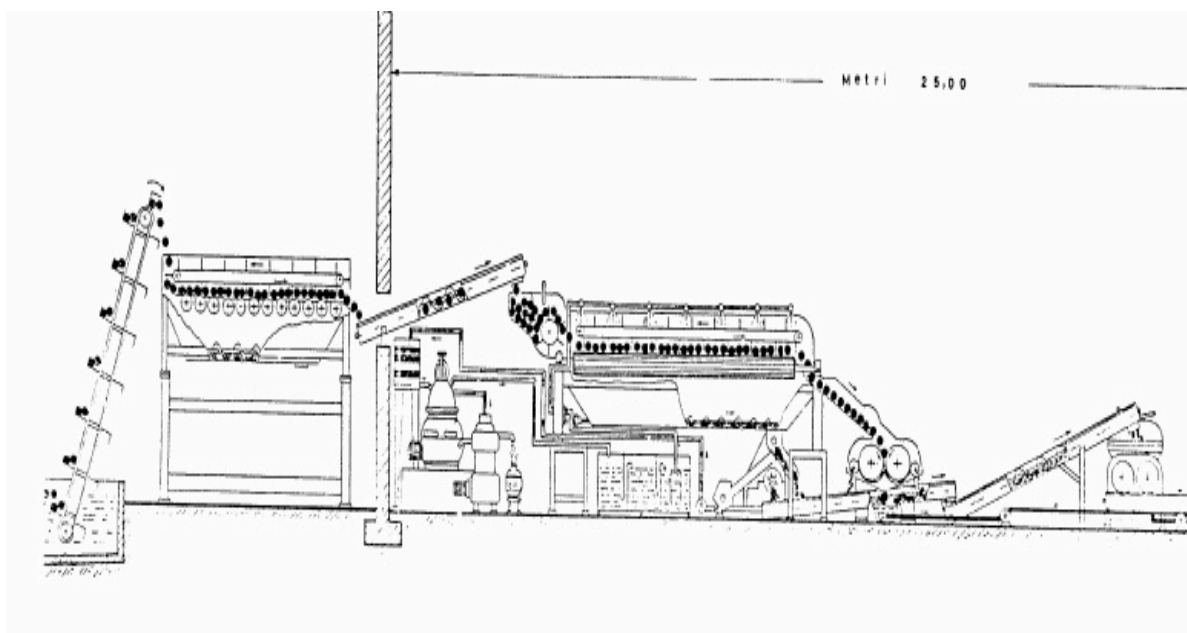


Figura 4 Macchina Pelatrice [1]



Figura 5 Interno di una macchina pelatrice

La macchina sfumatrice agisce sulle mezze bucce depolate schiacciandole contro una parete per fare uscire fuori, con l'ausilio di getti di acqua, l'olio essenziale, che poi viene separato nelle centrifughe.

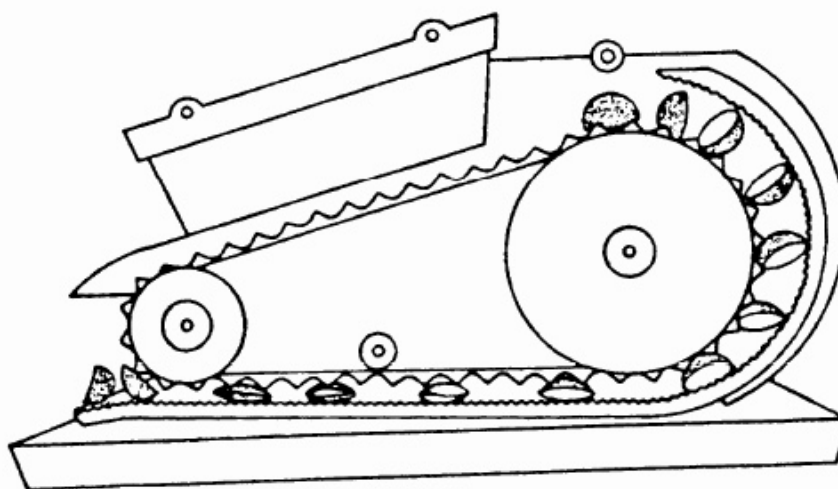


Figura 6 Macchina Sfumatrice [1]

I frutti vengono prima trattati con la macchina birillatrice, o macchina a bulbo, la quale li taglia a metà ed estrae il succo, con un meccanismo molto simile ad un classico spremiagrumi casalingo; le bucce così ottenute vengono pressate all'interno della sfumatrice, dove, con opportuna cautela, è necessario applicare la corretta pressione per evitare la fuoriuscita di liquido acquoso dalle scorze. Solitamente, in un processo ottimizzato, le essenze ottenute con la macchina sfumatrice hanno un profilo olfattivo

migliore rispetto a quelle ottenute con macchina pelatrice. Tuttavia, rispetto a quest'ultima, il processo che prevede la birillatrice e poi la sfumatrice risulta più lento, e di conseguenza limitante nelle quantità di frutta lavorabile; questa varia da 1,2 a 4,5 tonnellate/h.

Il torchio viene utilizzato per lavorazioni sul frutto intero. Il principio di funzionamento è simile a quello della sfumatrice: i frutti vengono pressati, da una o due eliche in bronzo e in acciaio inox che ruotano l'una contro l'altra contro una parete forata, da cui esce contemporaneamente olio essenziale e succo. Operando con due torchi in serie, e applicando pressioni diverse, si può ottenere dal primo torchio una maggior quantità di olio essenziale, fra l'altro più pregiato; mentre gran parte del succo viene recuperato dal secondo torchio. Solitamente l'olio essenziale di seconda spremitura viene recuperato per distillazione.

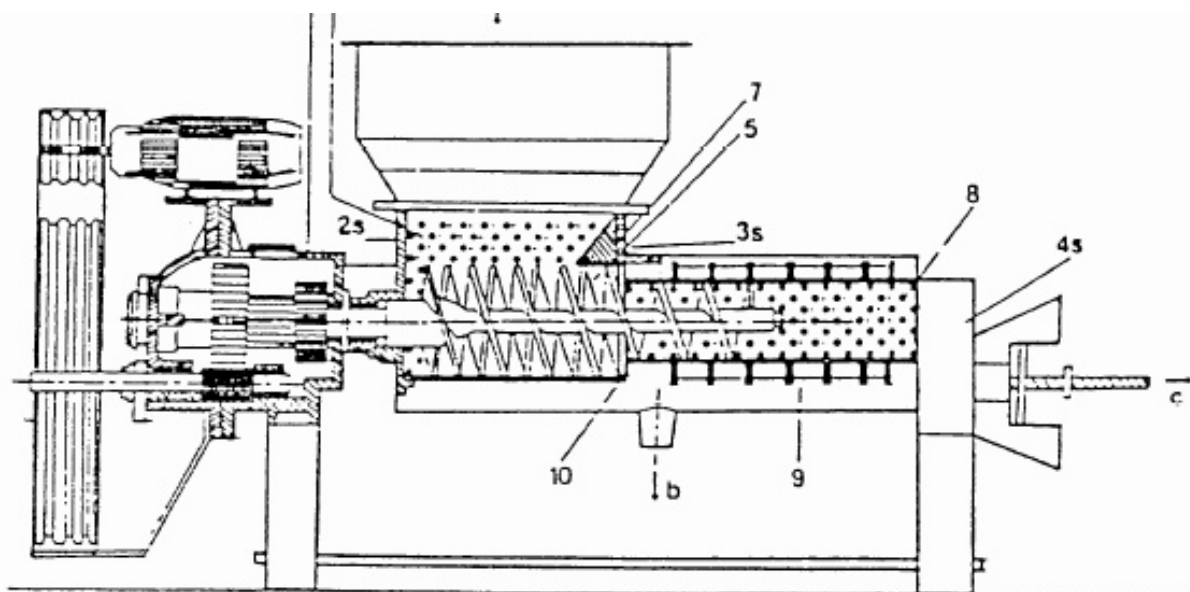


Figura 7 Torchio a doppia elica [1]

La macchina FMC, di origine americana ma con varianti italiane, è una delle più innovative nel campo industriale agrumicolo poiché consente di ottenere al medesimo tempo sia il succo che l'olio essenziale, senza che questi vengano in contatto. In Italia questa macchina trova impiego soprattutto per la lavorazione del limone poiché

consente di ottenerne essenze di alto pregio. I principali vantaggi derivanti dal suo utilizzo sono i seguenti:

- elevata resa in olio essenziale;
- sistema di ricircolo dell'acqua utilizzata per estrarre l'essenza che permette da un lato un minor consumo di quest'ultima, dall'altro una minore perdita di composti ossigenati in essa solubili, che rappresentano una parte "olfattivamente" molto importante dell'olio essenziale;
- produzione emulsione olio/acqua con minor contenuto di pectine colloidali più facili da separare in fase di centrifugazione.

Un inconveniente nell'utilizzo di questa macchina risiede nel fatto che deve essere calibrata sulla pezzatura dei frutti.

Il funzionamento dell'estrattore FMC è basato sull'utilizzo di due coppe, una superiore ed una inferiore, con forma simile a quella di una mano che schiacciano il frutto con un duplice effetto: all'esterno si osserva l'esplosione degli otricoli e la liberazione dell'olio essenziale, allontanato da spruzzi d'acqua; all'interno viene fatto penetrare un tubo tagliente per la raccolta del succo. La riapertura delle due coppe spinge via il frutto esausto e ne accoglie uno nuovo.

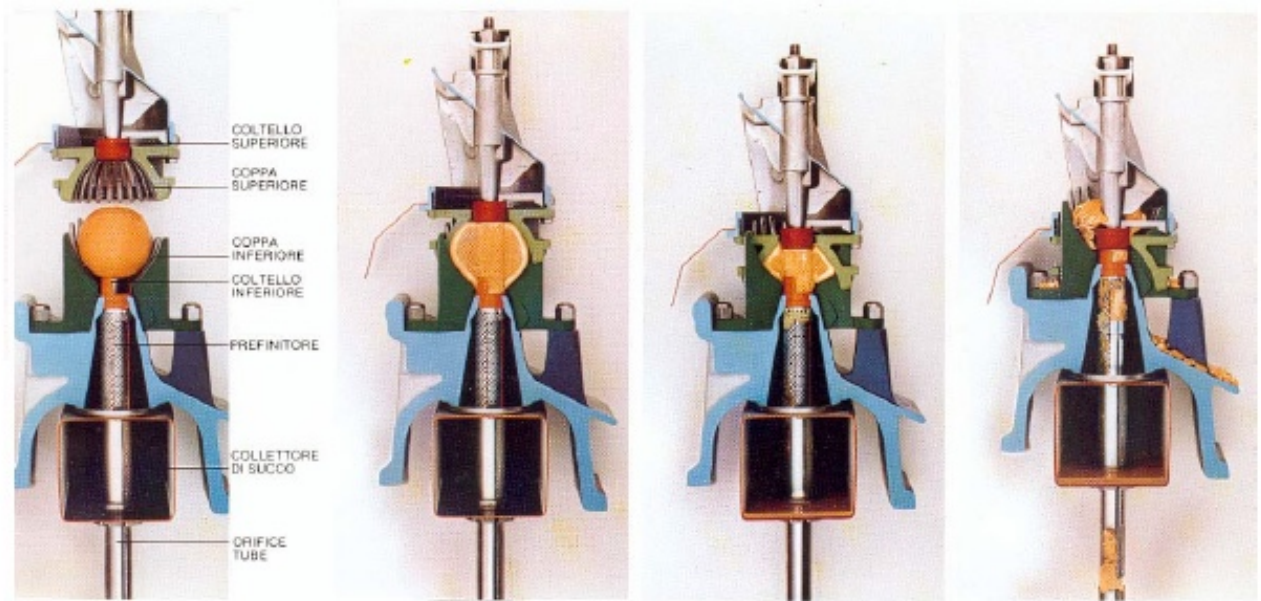


Figura 8 Fasi di funzionamento dell'estrattore FMC [1]

Solitamente una macchina FMC contiene al suo interno da 5 a sei estrattori che lavorano in parallelo; una configurazione come quella descritta è in grado di processare 2/3 tonnellate/h.

3.2 Distillazione

La distillazione è il primo processo inventato dall'uomo al fine di estrarre oli essenziali da materiale vegetale. Già nel 2000 a.C. in Cina le essenze venivano ottenute per distillazione da piante officinali. Dei resti trovati in Pakistan hanno messo in luce come già nel 500 a.C. questa tecnica venisse utilizzata per la purificazione dell'alcol etilico. Nell' VIII secolo gli Arabi e i Persiani utilizzavano la distillazione per purificare esteri naturali da usare in profumeria e in prodotti cosmetici. La distillazione fu infatti introdotta nell'Europa medioevale nel XII secolo grazie alla traduzione di testi di alchimisti arabi. Nel 1500, un alchimista tedesco Hieronymus Braunschweig, scrisse il primo trattato europeo sulla distillazione, seguito nel 1651 dal libro *The Art of Distillation* a cura del francese John French.

La distillazione è un processo fisico secondo il quale è possibile separare due o più componenti sulla base del loro diverso punto di ebollizione. Questo metodo consente la separazione della frazione volatile da una matrice vegetale, oppure il frazionamento di un olio essenziale fino al recupero di alcune singole componenti.

In linea generale un distillatore è costituito dalle seguenti parti:

- una caldaia;
- un recipiente di contenimento;
- una colonna di distillazione (impaccata o meno);
- un condensatore;
- un recipiente di raccolta.



Figura 9 Piccolo distillatore

Nel caso degli agrumi, la distillazione viene usata principalmente per quattro motivi:

- recupero di oli essenziali dalle acque di lavorazione;
- frazionamento/concentrazione degli oli essenziali cold pressed;

- ottenimento di oli essenziali distillati privi di frazione non volatile;
- ottenimento di Petitgrain e Neroli.

Nei primi tre casi, si utilizzano apparecchiature in acciaio inox riscaldate esternamente da una camicia e sotto un vuoto spinto. Questo consente di distillare a temperature inferiori rispetto al normale punto di ebollizione degli oli essenziali a pressione atmosferica. L'abbassamento della temperatura di ebollizione, intorno agli 80°C, fa in modo che l'olio ottenuto conservi le proprie qualità olfattive.

Con queste apparecchiature è possibile frazionare gli oli essenziali, ossia separare la frazione dei monoterpeni più leggera, e concentrare i composti ossigenati che conferiscono un'intensità maggiore all'essenza. In questo processo, tramite l'introduzione del vapore, si può ottenere la deterpenazione dell'olio essenziale, ovvero l'allontanamento ulteriore del residuo non volatile e l'ottenimento di essenze maggiormente solubili in miscele idroalcoliche. Le tecniche più moderne di frazionamento prevedono l'utilizzo della distillazione molecolare. Questa tecnologia particolare opera sotto vuoto particolarmente spinto e le superfici di evaporazione e quella di condensazione sono molto vicine. In questo caso si vengono a creare condizioni per cui il cammino libero medio di ogni singola molecola è strettamente correlato alle dimensioni dell'apparecchiatura, la velocità di evaporazione non dipende dalla pressione ed è regolata dalla dinamica molecolare piuttosto che dalla dinamica dei fluidi. Pertanto, il percorso di ogni singola particella risulta molto breve. Questa tecnica consente di separare i singoli componenti di una miscela di oli essenziali.

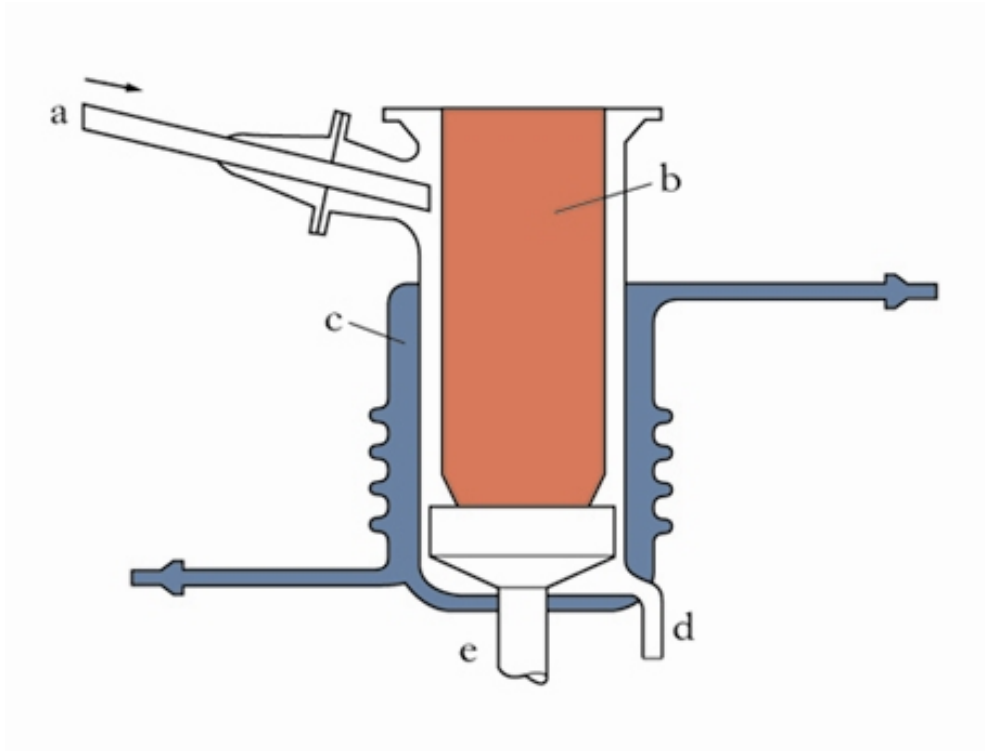


Figura 10 Schema semplificato di un distillatore molecolare

Nel caso in cui la distillazione venga impiegata per l'ottenimento di Petitgrain e Neroli, le apparecchiature utilizzate sono differenti rispetto a quelle già viste.

In particolare, in questi casi viene utilizzata la distillazione in corrente di vapore senza presenza di colonna di distillazione e, quando presente, essa risulta di corte dimensioni. Con questo procedimento l'olio essenziale viene estratto dalla matrice vegetale per trascinamento da parte del vapore. Questo infatti dapprima provoca l'apertura degli otricoli grazie al calore che cede, e poi, per azione meccanica di trascinamento, convoglia l'essenza verso la testa di distillazione, e da qui al condensatore. Una volta condensato, l'olio essenziale e l'acqua si separano in due fasi distinte, consentendo il recupero dell'essenza; l'idrolato, parimenti ottenuto, può essere scaricato o in parte rimesso in circolo all'interno del sistema.

Il distillatore in corrente di vapore può operare a pressione ridotta, in questo modo si limita il danno che il calore può portare all'essenza e la creazione di artefatti non

presenti nel materiale di partenza. Distillando a pressione ridotta si ottengono oli essenziali di maggior pregio e con un profilo olfattivo più fedele alla matrice vegetale di partenza.

La distillazione in corrente di vapore è applicabile a tutte le matrici vegetali che non contengono componenti odorose eccessivamente termolabili. Anche se minime, delle modificazioni nella composizione e nel profilo olfattivo si verificano comunque.

I fattori che influenzano la qualità delle essenze ottenibili con la distillazione sono molteplici, in primo luogo il tipo di materiale da distillare, le sue dimensioni e la disposizione all'interno del distillatore. Infatti, una eccessiva pressatura o un materiale estremamente fino possono causare locali surriscaldamenti con produzione di artefatti che incidono negativamente sulla qualità dell'olio essenziale. A questo scopo spesso nel recipiente di distillazione sono inserite delle griglie che separano il materiale vegetale così da agevolare il passaggio del vapore.

Sono altresì importanti l'organizzazione strutturale, la forma e le dimensioni del distillatore, al fine di rendere efficienti gli scambi termici ed evitare i surriscaldamenti, specie in testa al distillatore.

Altri fattori determinanti sono la pressione e la temperatura di esercizio, il ricircolo o meno dell'acqua di distillazione, e la durata della stessa.

Alcuni tipi di distillatori hanno una caldaia per la produzione del vapore separata dal recipiente dove si trova il materiale da distillare, altri invece contengono l'acqua al proprio interno separata dal materiale vegetale tramite una griglia. Spesso la distillazione del materiale vegetale avviene in batterie di distillatori, poiché apparati di dimensioni eccessive possono dare una minore resa, dovuta al percorso troppo lungo che deve fare l'essenza per arrivare al condensatore, inoltre, aumentando la permanenza ad alta temperatura, si hanno maggiori probabilità di danni termici.

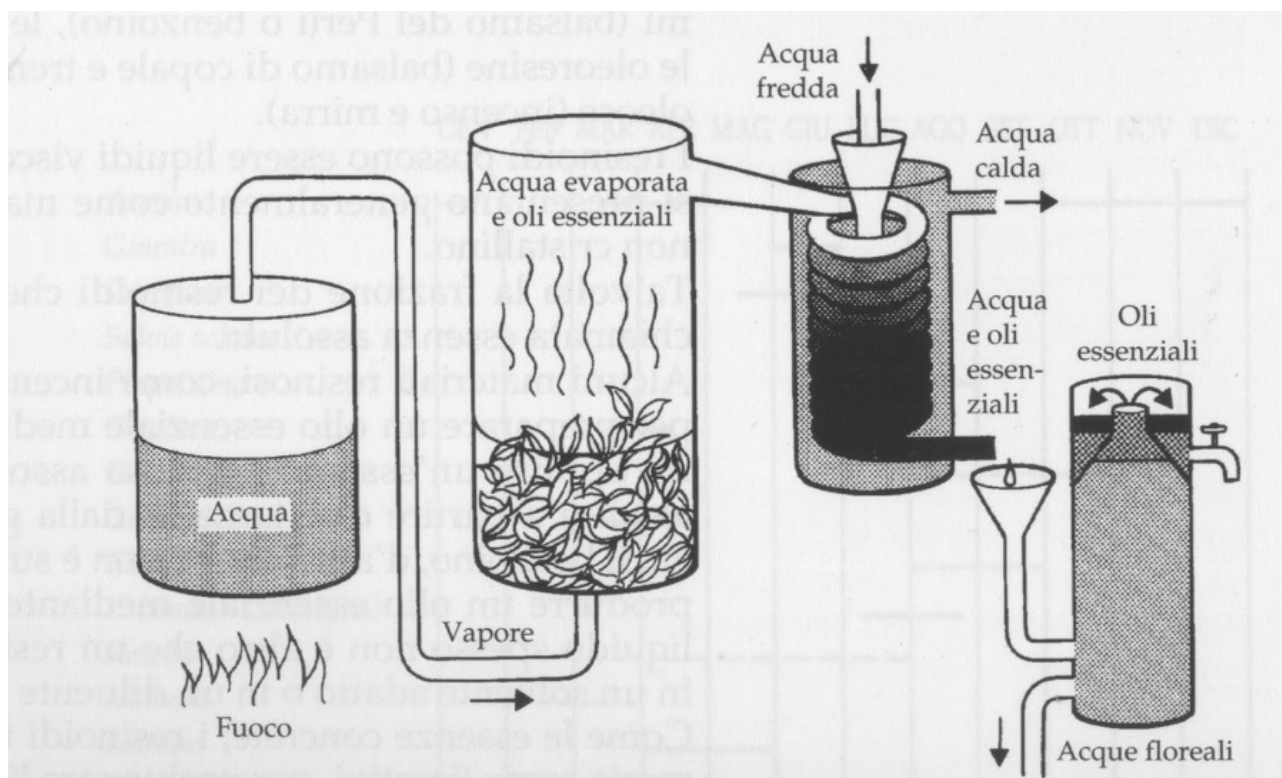


Figura 11 Schema di un distillatore in corrente di vapore con caldaia di produzione del vapore separata

Dalla distillazione si ha l'ottenimento di due prodotti: l'olio essenziale e l'idrolato, ovvero l'acqua di distillazione contenente una parte di componenti dell'olio essenziale maggiormente solubili in essa. In alcuni casi, ad esempio nella produzione del neroli, l'idrolato viene estratto con solventi come esano o etere di petrolio, ottenendo un prodotto denominato Water Absolute, oppure, in seguito a svariati trattamenti, l'idrolato viene impiegato come agente profumante o in campo cosmetico.

3.3 *Enfleurage*

Molti componenti degli oli essenziali sono talmente termolabili da non poter tollerare la distillazione. È il caso delle essenze floreali, i cui componenti a contatto con le alte temperature, si degradano o si trasformano, incidendo negativamente sulla qualità dell'olio essenziale.

L'Enfleurage è appunto applicato ai fiori, la cui attività funzionale non si interrompe con la raccolta e in cui continua la produzione di profumo fintanto che hanno vitalità.

Si ungono dei telai di vetro con un prodotto che nella regione di Grasse, luogo dove è stato sviluppato e perfezionato questo procedimento, viene chiamato “axonge”. Questo è un miscuglio di grasso di maiale e bue precedentemente purificato e preparato in modo da lasciare alcuna traccia di cattivo odore e da conservarsi tale per diversi anni senza irrancidire. I fiori sono posti su telai di vetro cosparsi di questo materiale, le cui cornici sovrapposte formano una serie di camere chiuse nelle quali il profumo prodotto dal fiore è veicolato dall’aria e trasportato al solvente grasso che lo adsorbe. I fiori, ogni due-tre giorni vengono rinnovati fino al momento in cui l’axonge può considerarsi satura di profumo. La pomata così ottenuta viene sciolta in alcol etilico, con il quale viene lavata diverse volte, e dall’evaporazione dell’alcol si ottengono le *absolute di pomata* [4].



Figura 12 Telai di vetro utilizzati per l'enfleurage

Le absolute ottenute con questo procedimento sono di alta qualità olfattiva; tuttavia la completa rimozione del grasso usato per l'estrazione risulta quasi impossibile, così

come aumentano i tempi di produzione, con conseguenti alti costi del prodotto. Positivo è tuttavia il dato della resa, che risulta alta, se paragonata a quella di estrazione con solvente, poiché i fiori si mantengono vitali e continuano a produrre profumo anche dopo la raccolta.

3.4 Estrazione con solventi volatili

I primi esperimenti di estrazione degli oli essenziali con solventi organici risalgono al 1757, tuttavia furono, nel 1888, Joseph Robert e Massignon a depositare il brevetto per l'utilizzo dell'etere di petrolio e successivamente, nel 1890, a fondare la Société des Parfums Naturales, dando inizio alla produzione industriale delle essenze Assolute [3]. Questa metodologia soppiantò gradualmente l'utilizzo dell'enfleurage, poiché meno costosa e più veloce; inoltre, i prodotti ottenuti non presentavano residui oleosi, risultando pienamente solubili in fase alcolica.

Il principio di funzionamento è il medesimo dell'enfleurage: il solvente organico (etere di petrolio o esano) viene messo a contatto per un determinato tempo con il materiale vegetale, e l'operazione viene ripetuta fino a completo esaurimento della matrice trattata. L'eliminazione del solvente, tramite distillazione sotto vuoto, porta all'ottenimento di una cosiddetta “concreta”, una sostanza solida di colore scuro che contiene sia l'essenza sia le cere contenute nella matrice. La concreta viene poi sciolta in alcol etilico assoluto, che viene successivamente raffreddato in modo da far precipitare le cere in esso insolubili, rimosse per filtrazione. Dall'evaporazione sotto vuoto della soluzione alcolica si ottengono i P.N.S.C., ovvero i prodotti naturali senza cere, anche chiamati “Assolute”.

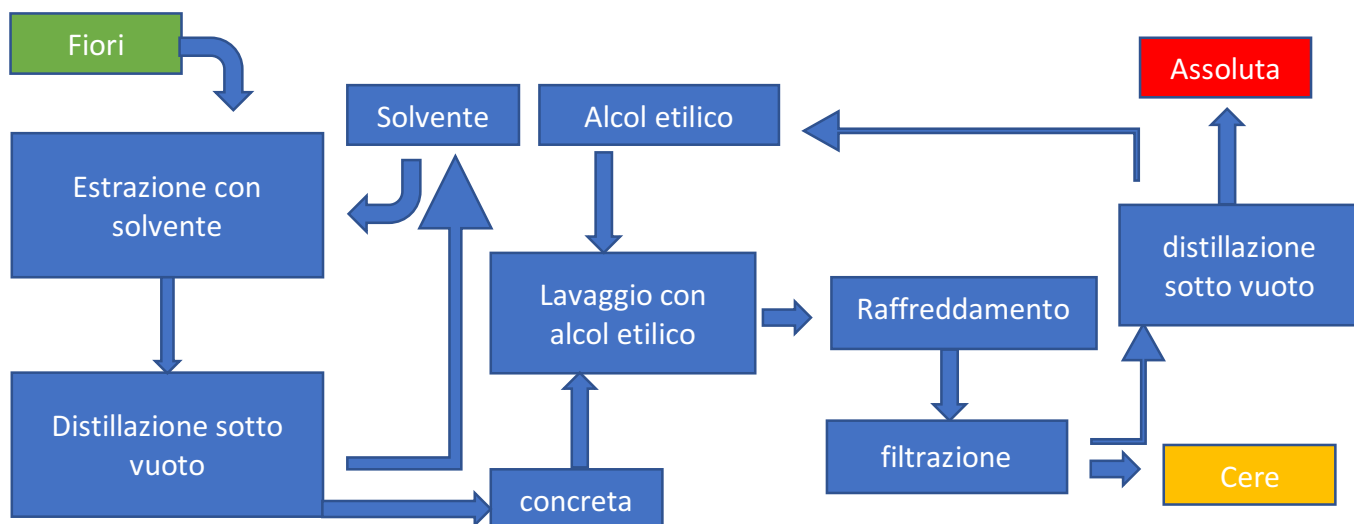


Figura 13 Schema di processo di estrazione con solvente

Anche in questo tipo di processo le variabili operative giocano un ruolo fondamentale nell'ottenimento di prodotti di alta qualità. Fattori determinanti sono il tipo di solvente utilizzato in relazione alla matrice da estrarre, la sua purezza e il tempo di contatto.

I solventi utilizzati in questi processi sono principalmente due: etere di petrolio ed esano, il cui grado di purezza deve essere adeguato per evitare che rimangano cattivi odori all'interno dei prodotti finiti, oppure contaminanti nocivi. Il tempo di contatto è fondamentale per ottenere la massima resa possibile ma anche la qualità migliore del prodotto. Infatti, più il solvente viene lasciato a contatto con la matrice vegetale, maggiore è la probabilità che vengano estratte sostanze indesiderate o che si instaurino processi di degradazione con lo sviluppo di off-flavours. Solitamente l'ottimizzazione del processo di estrazione va effettuata in base alla matrice.

Altri punti critici del processo sono gli stadi di distillazione dei solventi, che deve essere operata sotto vuoto, avendo cura che, oltre al solvente, non vengano rimosse anche alcune componenti più "leggere" dell'essenza. Questo inconveniente può capitare soprattutto nell'ultimo stadio, durante la rimozione dell'alcol etilico, poiché il suo punto di ebollizione è più alto rispetto al primo solvente utilizzato.

Le materie prime per cui si usa questo tipo di processo sono soprattutto fiori quali il gelsomino, la tuberosa, il fiore di arancia amara, la rosa, la giunchiglia, ma anche alcune matrici come il fieno greco, le foglie di pomodoro e di violetta, la lavanda.

Sebbene sia nata e si sia sviluppata in Francia, allo stato attuale la produzione di assolute riguarda principalmente il Nord Africa e l'India, mentre nella regione di Grasse ancora oggi si estraggono materie prime di elevatissimi qualità e costo.

3.5 Estrazione con CO₂ in fase supercritica

L'estrazione con solventi volatili viene "superata" tecnologicamente, ma non realmente, dall'estrazione in fase supercritica. Difatti le legislazioni sempre più stringenti nonché il cammino verso tecnologie più "green", hanno visto lo sviluppo di questa tecnologia con ottimi risultati sulla qualità dei prodotti.

L'estrazione in sé avviene secondo gli stessi meccanismi sopra riportati per l'estrazione con solvente, ma è quest'ultimo che, per le sue proprietà, conferisce innovazione ed eco compatibilità alla tecnica. L'anidride carbonica, in determinate condizioni di pressione e temperatura, ovvero sopra i 31 °C e le 73,8 atm [5], passa dallo stato aeriforme allo "stato supercritico", in cui ha le proprietà di un solvente liquido apolare come l'esano, ma la viscosità e le capacità di penetrazione di un gas. Queste qualità risultano ottimali per l'estrazione dell'olio essenziale.

Tuttavia, gli impianti per operare con fluidi supercritici sono notevolmente più complessi rispetto a quelli che usano solventi volatili: in un estrattore SFE le pressioni di esercizio sono elevate, la strumentazione è molto più sofisticata e costosa. Parallelamente a questi svantaggi, non vi è dubbio che la SFE offra degli evidenti benefici.

L'anidride carbonica a differenza del solvente, evapora a temperatura ambiente, per cui viene eliminato lo stadio intermedio di rimozione del solvente di estrazione. Inoltre non lascia traccia di sé nella concreta ottenuta. Questo è un grande vantaggio, poiché la legislazione non ammette la presenza di solventi organici, sempre più banditi dalla pratica industriale e accademica.



Figura 14 Impianto da laboratorio per l'estrazione con CO₂ supercritica

Tramite questo processo si possono ottenere due tipi di prodotti: l'estratto in CO₂ totale, ovvero il prodotto ottenuto dopo l'evaporazione dell'anidride carbonica (corrispondente alla classica concreta); e l'estratto selezionato, ovvero lavato con alcol etilico al fine di eliminare la parte cerosa e ottenere un prodotto molto simile alle classiche assolute.

La qualità degli estratti SFE è molto elevata, paragonabile, se non superiore a quella delle assolute ottenute con solventi volatili. Cionondimeno, al già citato costo e alla maggiore complessità impiantistica, si aggiunge la necessità di manodopera specializzata. Ultimamente, oltre che per la produzione di materie prime da impiegare

in profumeria, la SFE è utilizzata con successo nella formulazione di flavours e aromatizzanti per l'industria alimentare. Si ricorda che una delle applicazioni della SFE più diffusa in ambito alimentare è la “decaffeinizzazione”. La totale assenza di residui di solvente organico ha infatti permesso l'utilizzo in campo alimentare di estratti dapprima non utilizzabili perché ricavati con solventi organici.

3.6 Altri tipi di estrazione

Quelli fino ad ora elencati sono i metodi classici per la produzione degli oli essenziali da matrici vegetali. In realtà esistono anche altri metodi “minori” che in altri ambiti di applicazione, come quello erboristico, riscuotono addirittura più successo.

Uno di questi metodi è la macerazione alcolica, che consiste nell'estrarre la materia prima con alcol, per una durata di giorni/settimane. È un metodo comunemente utilizzato su matrici vegetali secche, come radici di piante, spezie o addirittura matrici di origine animale, come l'ambra grigia, lo zibetto o il cervo muschiato.

Dalla macerazione in alcol in rapporto 1 a 10 con la matrice vegetale si ottiene la tintura; utilizzando percentuali di acqua, si ottengono le tinte idroalcoliche.

Se la macerazione viene condotta in un olio vegetale si ottiene l'oleolito profumato. Questo metodo, conosciuto fin dai tempi antichi, utilizzato già in epoca egizia e romana, può ritenersi l'antenato dell'Enfleurage [4].

Capitolo 4

LA GAS CROMATOGRAFIA MULTIDIMENSIONALE (MDGC)

4.1 *La Cromatografia*

La cromatografia è una tecnica analitica che rende possibile l'identificazione e il dosaggio dei singoli componenti di miscele complesse, in funzione della loro diversa capacità di distribuirsi tra una fase stazionaria ed una fase mobile. La definizione IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) descrive la cromatografia come “metodo usato principalmente per la separazione dei componenti di una miscela; i componenti vengono distribuiti tra due fasi, una delle quali è fissa mentre l'altra è mobile. La fase stazionaria può essere un solido, o un liquido supportato su di un solido, o un gel. La fase stazionaria può essere impaccata in una colonna, stratificata sulle pareti interne o distribuita come un film”.

4.2 *Classificazione delle tecniche cromatografiche*

Le tecniche cromatografiche possono essere classificate in base alla natura della fase mobile, a seconda se questa sia liquida o gassosa, in due grandi classi: la cromatografia liquida e la gas cromatografia.

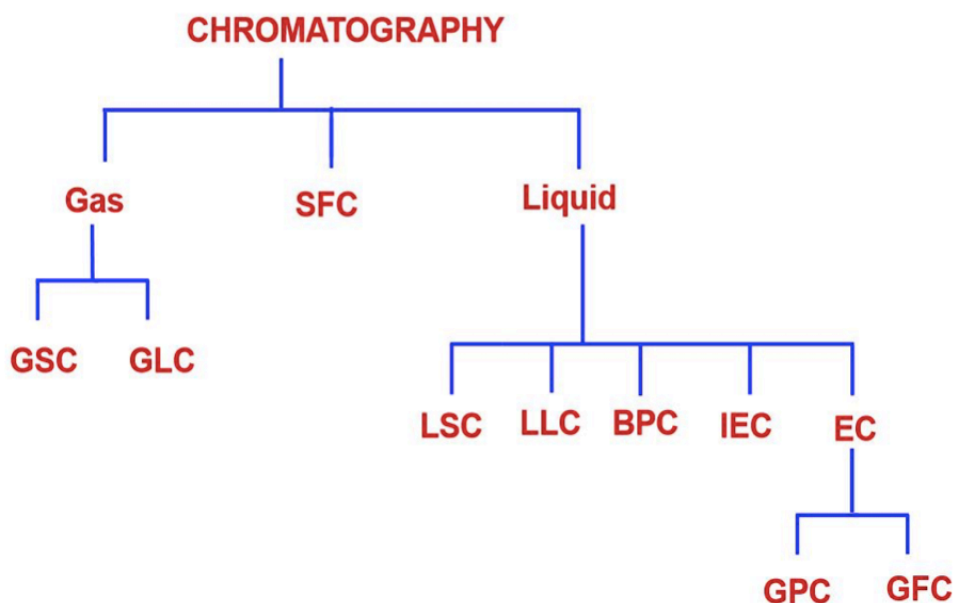


Figura 15 Classificazione delle tecniche cromatografiche

4.3 La Gascromatografia (GC)

La Gas cromatografia è un processo analitico in cui la fase mobile è rappresentata da un gas mentre la fase stazionaria si trova all'interno di una colonna. Le tipologie di fase stazionaria possono essere essenzialmente due:

- Fasi solide – in questo caso si parla di cromatografia di adsorbimento
- Fasi liquide – in questo caso di parla di cromatografia di ripartizione

Il primo tipo di fase stazionaria, quella solida, ormai quasi inutilizzato, è rappresentato da un solido contenente dei siti attivi che interagiscono con i componenti della miscela da separare. L'interazione con i componenti risulta diversa a seconda delle caratteristiche chimiche degli stessi; questo comporta un rallentamento della loro velocità di percorrimiento della colonna e, di conseguenza, essi giungeranno al rivelatore in tempi differenti, consentendo la loro separazione.

Nel secondo caso, la fase stazionaria è rappresentata da un liquido molto viscoso supportato da un materiale solido di granulometria adeguata posto all'interno della colonna.

In linea generale un sistema gas cromatografico è costituito dalle seguenti parti:

- Sorgente del gas (bombola)
- Iniettore
- Colonna cromatografica
- Forno ventilato
- Rivelatore
- Sistema di elaborazione dei dati

4.3.1 *Il gas di trasporto*

Il gas di trasporto in GC rappresenta la fase mobile. Esso, a differenza della cromatografia liquida, dove la fase mobile svolge un ruolo importante nella separazione, ha solo la funzione di carrier. I gas più comunemente utilizzati sono elio, azoto ed idrogeno, poiché si comportano idealmente alle basse pressioni e alle temperature utilizzate. L'utilizzo di uno di questi gas dipende anche dal rivelatore, ma di solito si preferisce l'elio all'idrogeno per motivi di sicurezza, anche se maggiormente costoso. Una caratteristica essenziale è la purezza del gas poiché la presenza di impurezze soprattutto di natura organica, possono interferire con il rivelatore aumentando il rumore di fondo.

4.3.2 *L'iniettore*

Il sistema di iniezione del campione costituisce un elemento importante in termini di efficienza, selettività, sensibilità e risoluzione. Esso ha infatti il delicato compito di focalizzare il campione in testa alla colonna cromatografica.

Il campione da sottoporre ad analisi, a prescindere dallo stato fisico, viene introdotto con apposite siringhe nella camera d'iniezione perforando un setto costituito da una particolare gomma termoresistente. Nella camera di iniezione, termostata solitamente ad un valore superiore di 50°C rispetto alla temperatura max della colonna, il campione viene istantaneamente vaporizzato e introdotto in colonna come una banda stretta in modo da ridurre al minimo l'allargamento dei picchi del cromatogramma.

Esistono diversi tipi di iniettore sviluppati per la gascromatografia:

- **Iniettore split/splitless:** è il sistema più utilizzato in gas cromatografia: esso prevede un setto in silicone che viene perforato dalla siringa che introduce il campione in una camera di vaporizzazione di vetro chiamata "Liner", contenente di solito una piccola quantità di lana di vetro che ha il compito di mescolare il campione. All'uscita del liner, una valvola "splitta" o meno il campione, ovvero fa in modo che solo una parte del campione vada in colonna, mentre l'altra viene scaricata all'esterno. Il rapporto di splittaggio, ovvero il rapporto tra il flusso che va in colonna e quello che va fuori, può essere stabilito dall'utente, il quale può operare in modalità "splitless" ovvero mandando tutto in colonna, o "split", con rapporto di splittaggio, generalmente da 1:20 fino a 1:1000. La modalità split, opportunamente regolata, consente di avere bande focalizzate in testa alla colonna molto strette, migliorando sensibilmente l'efficienza della separazione.
- **Iniettore PTV:** è un tipo di iniettore in cui il campione viene introdotto "a freddo"; successivamente si può scegliere di applicare una programmata di temperatura per riscaldarlo, vaporizzando dapprima solo il solvente, e poi via via tutti gli analiti, inviandoli alla colonna in modalità splitless. Il vantaggio di questo tipo di iniettore è che abbassa i limiti di rivelabilità, poiché consente di iniettare volumi di campione maggiori.

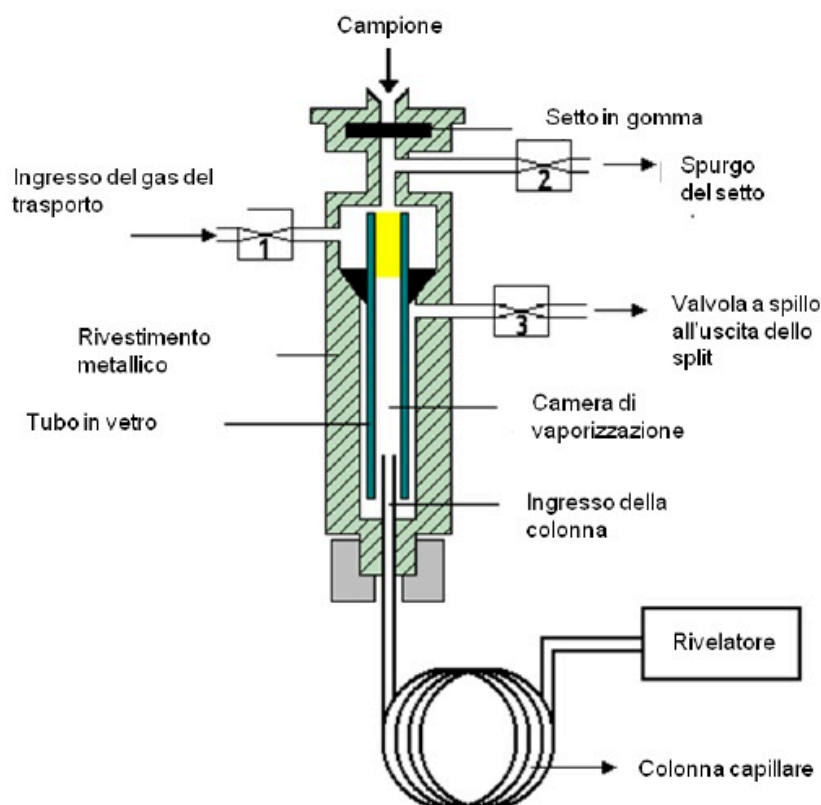


Figura 16 Schema di un Iniettore Split/Splitless

- Iniettore “on column”**: questo tipo di iniettore consente l’introduzione del campione direttamente all’interno della colonna riducendo al minimo le perdite, inevitabili durante il passaggio nella camera di vaporizzazione e allo split. Una valvola regola l’apertura di una porta che consente l’ingresso della siringa nella parte iniziale della colonna, la quale è investita da un flusso di aria fredda; ciò consente l’introduzione del campione allo stato liquido. Questo tipo di iniettore è indicato per l’analisi di componenti termolabili che, diversamente, con una vaporizzazione a caldo andrebbero perduti. Inoltre, in alcuni modelli è possibile applicare alla parte iniziale della colonna una programmata di temperatura diversa rispetto al resto, in modo da selezionare programmi a bassa temperatura per i componenti maggiormente termolabili.

4.3.3 *La colonna*

La colonna analitica è il luogo dove avviene fisicamente la separazione cromatografica. Le colonne possono essere impaccate o capillari; le prime non vengono più utilizzate, le seconde sono costituite da un tubo molto piccolo del diametro interno compreso tra 0,1 e 0,5 mm e di lunghezza da 1 a 100 m. Sono costituite solitamente da silice fusa e sulle pareti interne è depositato un sottilissimo film di fase stazionaria liquida che può essere legata chimicamente alla colonna se sono presenti gruppi silanologici Si-OH. Le colonne capillari vengono distinte in:

- **Colonne WCOT (Wall Coated Open Tubular):** sono i modelli più semplici in cui la fase stazionaria è depositata sulle pareti interne della colonna. Prima di essere ricoperta dalla fase stazionaria, la superficie interna viene trattata con HCl per disattivare i gruppi silanologici presenti.
- **Colonne SCOT (Support Layer Open Tubular):** anche questo tipo viene preventivamente trattato con HCl per creare uno strato poroso su cui viene stratificato BaCO_3 . Successivamente la colonna viene ricoperta con una fase fissa liquida. La presenza del carbonato di bario aumenta la superficie disponibile per la fase stazionaria e quindi la capacità della colonna.
- **Colonne PLOT (Porous Layer Open Tubular):** anche in questo caso si opera in maniera tale da rendere la superficie interna porosa prima di depositare la fase stazionaria. Il composto utilizzato a questo scopo è l'acido fluoridrico

4.3.4 *Teoria e meccanismo della separazione*

Il principio che regola il processo cromatografico si basa sulla migrazione differenziale dei componenti di una miscela tra una fase fissa ed una fase mobile. La fase stazionaria tende a trattenere i componenti, la fase mobile li trascina con sé. Viene definito tempo di ritenzione assoluto (t_R) il tempo in cui il campione viene completamente eluito dalla colonna. Il tempo di ritenzione di una sostanza non trattenuta dalla fase stazionaria, pari al tempo necessario alla fase mobile a completare tutto il percorso cromatografico

viene definito tempo morto (t_M). Il tempo effettivo di permanenza di un componente nella fase stazionaria (t'_R) si può calcolare applicando la seguente formula:

$$t'_R = t_R - t_M$$

Un altro parametro fondamentale è il coefficiente di ripartizione (K) che indica il rapporto tra le concentrazioni della sostanza nella fase stazionaria (C_S) e nella fase mobile (C_M):

$$K = C_S / C_M$$

Il valore del coefficiente di ripartizione ad una particolare temperatura, è caratteristico per ogni singolo componente [6].

L'efficienza di una colonna, per la capacità di separazione, si può calcolare misurando l'allargamento di banda che un componente subisce durante l'attraversamento della colonna. Può essere espresso come altezza equivalente ad un piatto teorico (HEPT).

$$HEPT = L/N$$

Dove L è la lunghezza della colonna ed N è il numero dei piatti teorici. Con il termine "piatto teorico" si indica il più piccolo tratto di colonna in cui si stabilisce un equilibrio tra molecole che passano dalla fase mobile a quella stazionaria, e viceversa. Il numero dei piatti teorici di una colonna si ricava utilizzando il tempo di ritenzione e l'ampiezza a metà altezza ($W_{1/2h}$) del picco cromatografico [7].

Anche la selettività è un parametro molto importante che riguarda le interazioni chimico fisiche tra i componenti della miscela e la fase stazionaria; essa si esprime tramite il rapporto tra i tempi di ritenzione di due diversi componenti:

$$\alpha = (t'_R)_2 / (t'_R)_1$$

l'espressione migliore per esprimere l'efficienza di una colonna è l'equazione di Van Deemter

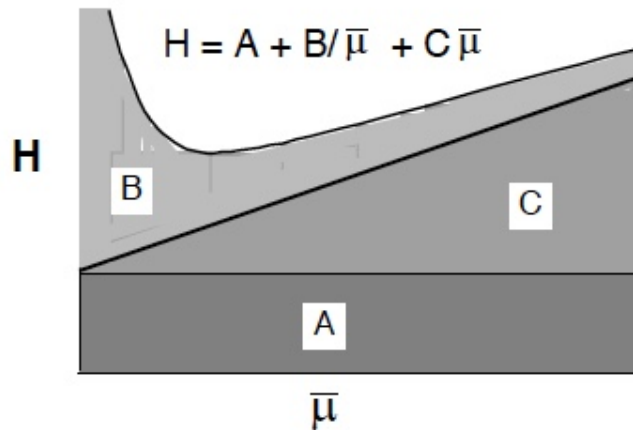


Figura 17 Grafico che illustra l'equazione di Van Deemter

nella quale μ è la velocità lineare media della fase mobile, A un termine relativo alla diffusione viscosa, B il termine relativo alla diffusione longitudinale e C la resistenza ai trasferimenti di massa in fase mobile ed in fase stazionaria.

La risoluzione è il parametro che misura la capacità di un sistema cromatografico di fornire la separazione migliore tra due picchi diversi. La capacità di risoluzione della colonna si esprime con la seguente equazione:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{k_2 + 1} \right)$$

dove N è il numero di piatti teorici della colonna, α è il fattore di selettività e K è il fattore di ritenzione.

La separazione di un soluto in gas cromatografia è legata essenzialmente al suo grado di solubilità nella fase stazionaria ed alla sua tensione di vapore. Tra due soluti con solubilità diverse il tempo richiesto per l'eluizione di un'analita dipende principalmente dal periodo che trascorre nella fase stazionaria. Di conseguenza, il

soluto meno solubile nella fase stazionaria è anche il meno ritenuto, per cui viene rivelato per primo e presenta una larghezza di banda minore. Il processo di ripartizione porta ad una distribuzione gaussiana degli analiti: il tempo di ritenzione corrisponde all'apice della distribuzione mentre il grado di solubilità viene espresso dal coefficiente di ripartizione (K). Questo parametro, che dipende dalla natura chimica dell'analita, dalla temperatura della colonna e dal tipo di fase stazionaria, si può calcolare con la seguente espressione:

$$\log K = \frac{A}{T_c} + B$$

dove A e B sono delle costanti. Si può dedurre da questa espressione che il coefficiente di ripartizione diminuisce all'aumentare della temperatura della colonna, di conseguenza la solubilità degli analiti si riduce. In questo modo ci sarà un valore di temperatura ottimale al quale avremo la massima risoluzione tra i due picchi. Tra due soluti con solubilità simili invece la separazione sarà effettuata essenzialmente sulla base dei punti di ebollizione; il componente con il minor punto di ebollizione verrà eluito per primo.

4.3.5 *Il rivelatore*

Il rivelatore è la parte dello strumento che trasforma la separazione analitica in un risultato quali-quantitativo. Per ottenere dei buoni risultati, una separazione analitica deve essere accompagnata ad un'elevata sensibilità del rivelatore. Le caratteristiche che un rivelatore deve avere, per un corretto utilizzo in gas cromatografia, devono essere:

- Adeguata sensibilità
- Stabilità e riproducibilità della risposta

- Linearità fra concentrazione e risposta del rivelatore in un ampio intervallo di concentrazione (diversi ordini di grandezza)
- Temperature di esercizio fino a 400 °C
- Tempi di risposta brevi ed indipendenti dal flusso
- Affidabilità elevata e facilità di utilizzo
- Risposta altamente prevedibile e selettività nei confronti di una o più classi di composti
- Possibile non distruttività dei composti

Nessun rivelatore riesce a soddisfare tutte le caratteristiche sopra elencate, di conseguenza la scelta del rivelatore va fatta in funzione degli analiti da separare e del risultato da ottenere. Di seguito sono elencati i diversi tipi di rivelatore per la gas cromatografia:

- Rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID)
- Rivelatore a conducibilità termica (TCD)
- Rivelatore a cattura di elettroni (ECD)
- Rivelatore ad emissione termoionica (TED o NPD)
- Rivelatore a fotometria di fiamma (FPD)
- Spettrometro di massa

Il rivelatore più utilizzato in gas cromatografia è sicuramente il FID, un rivelatore universale che risponde a quasi tutti gli analiti di natura organica. Le componenti eluite dalla colonna vengono bruciate da una fiamma alimentata ad idrogeno ed aria all'uscita di un ugello che funge da anodo; mentre il cilindretto metallico che lo avvolge, invece, funge da catodo; ai due poli è applicata una tensione di 300 V. Quando brucia solo la miscela idrogeno/carrier la corrente ionica generata è molto debole, quando invece passa un analita la corrente generata è alta, con un segnale elettrico corrispondente

molto intenso che si tradurrà in un picco cromatografico. Questo tipo di rivelatore non è selettivo ed è distruttivo ma possiede una sensibilità molto elevata. Nella figura sottostante uno schema di funzionamento di un detector FID [7].

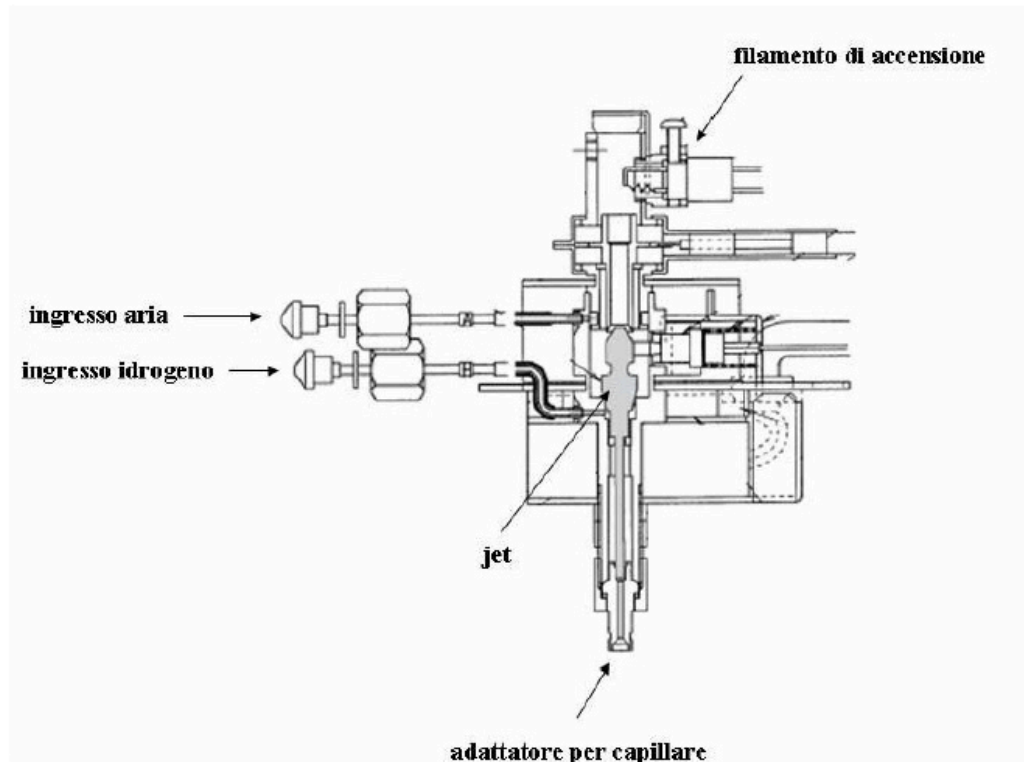


Figura 18 Schema di un rivelatore FID

Un altro rivelatore molto utilizzato, soprattutto per quanto riguarda l'identificazione degli analiti incogniti di una miscela, è lo spettrometro di massa. Questo rivelatore è un sistema molto complesso, formato da più parti ed operante sotto alto vuoto, che riesce a determinare il peso molecolare degli analiti o di frammenti da esso generati.

Le parti che costituiscono lo spettrometro di massa sono:

- La sorgente ionica
- Le lenti di focalizzazione
- L'analizzatore di massa

- Il rivelatore
- Il sistema di raccolta ed elaborazione dei dati

La sorgente ionica più utilizzata in GC è l'impatto elettronico (EI) ovvero il bombardamento di elettroni emessi da un filamento di tungsteno ed accelerati. La ionizzazione delle molecole che escono dalla colonna, generata dall'impatto e dalla frammentazione, si manifesta nella formazione di un fascio di particelle ionizzate, convogliate nell'analizzatore di massa, dove giungono in seguito a focalizzazione ed accelerazione da parte di un set di lenti magnetiche. Altri tipi di ionizzazione sono la ionizzazione chimica, la ionizzazione con sorgente laser MALDI (non usata in GC), l'ESI ovvero l'electrospray e l'APCI ovvero la ionizzazione a pressione atmosferica. Le ultime due tipologie di sorgente sono maggiormente utilizzate in cromatografia liquida dove si rende più difficoltoso accoppiare la parte cromatografica con lo spettrometro di massa, il quale richiede la presenza del vuoto. A seconda dello spettrometro di massa, si hanno diversi tipi di analizzatori, che si differenziano per velocità e accuratezza nella selezione delle masse ioniche da cui vengono attraversati. Il compito dell'analizzatore è quello di filtrare la corrente ionica permettendo il passaggio degli ioni in base al loro rapporto massa/carica elettrica. Questa selezione avviene con modalità diverse a seconda del tipo di analizzatore. Uno dei più utilizzati in GC è l'analizzatore quadrupolare, il quale offre una buona affidabilità, dimensioni ridotte, alta velocità di scansione. Di contro però, la misurazione del peso molecolare degli ioni generati dalla sorgente non è molto preciso. Il quadrupolo è costituito da quattro barre d'acciaio poste in parallelo a cui vengono applicati un campo elettrico ed un campo magnetico variabile. La scansione di campo comporta il passaggio di determinati ioni aventi un preciso rapporto massa/carica, il resto delle particelle collide contro le barre e non viene rivelato.

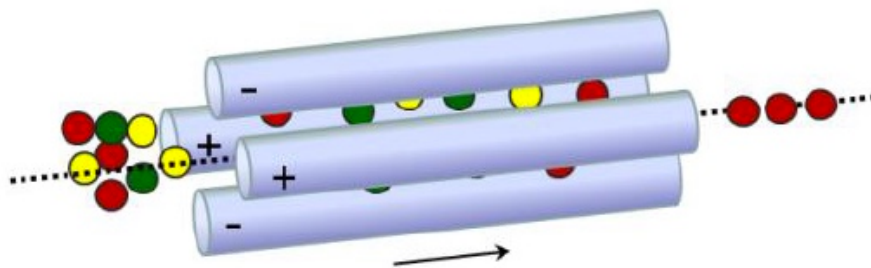


Figura 19 Analizzatore quadrupolare

L'utilizzo di più di un quadrupolo e di una specifica cella di collisione consente di frammentare gli ioni formati dalla sorgente e di studiare la massa degli ioni prodotti. Questa configurazione, detta a triplo quadrupolo, è di fondamentale importanza nel riconoscimento delle molecole che hanno uguale massa molecolare ma differente struttura chimica. Altri tipi di analizzatori sono il settore magnetico, il tempo di volo TOF, l'analizzatore orbitale ORBITRAP: questi tre analizzatori, a differenza del quadrupolo, consentono di ottenere una misura della massa molecolare molto più accurata; di contro le dimensioni sono molto maggiori del quadrupolo e anche il loro funzionamento richiede una maggiore accortezza.

4.4 La gas cromatografia multidimensionale

L'esistenza di matrici naturali estremamente complesse pone diversi problemi dal punto di vista analitico nell'approccio gas cromatografico. Spesso, infatti, soprattutto quando si deve andare ad identificare e quantificare componenti in piccole quantità in miscele molto complesse, fenomeni di coeluzione possono rendere questa operazione praticamente impossibile. Per tale motivo si è resa necessaria la ricerca di nuovi approcci che fornissero un potere di separazione maggiore.

Il concetto di cromatografia multidimensionale può essere descritto considerando il processo di separazione bidimensionale (2D) su carta [8]. In questo caso la migrazione avviene lungo due assi ortogonali (x ed y) come illustrato nella figura sottostante.

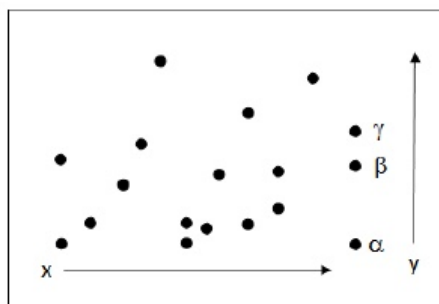


Figura 20 Cromatografia Bidimensionale su carta

Osservando il cromatogramma bidimensionale, e considerando i picchi α , β e γ , si nota come essi risultino coeluiti nell'asse x e separati lungo l'asse y, ovvero dopo l'applicazione di una ulteriore dimensione di separazione. Affinché ciò avvenga, è necessario che i meccanismi di separazione nelle due dimensioni siano diversi: in questo modo, la probabilità statistica che due o più composti abbiano lo stesso tempo di ritenzione in entrambe le dimensioni è molto bassa.

La capacità di un piano bidimensionale si può calcolare con buona approssimazione dividendo l'area del piano ($L_1 \times L_2$) per l'area del picco (considerato di dimensione quadrata) ($a \times b$).

$$n_c \sim \frac{L_1 L_2}{ab} \sim n_{c1} n_{c2}$$

considerando i rapporti L_1/a e L_2/b equivalenti in entrambe le dimensioni possiamo dire che la capacità totale del sistema bidimensionale si può approssimare al prodotto delle capacità relative nelle singole dimensioni. I sistemi gas cromatografici multidimensionali "on-line" sono, di solito, caratterizzati da due sistemi separativi indipendenti uniti in serie mediante un'interfaccia che permette il trasferimento sequenziale, o di bande continue, dalla prima alla seconda dimensione.

L'accoppiamento di due colonne GC con selettività differente costituisce un valido approccio analitico al fine di risolvere i problemi dovuti alla complessità delle matrici di campioni reali. L'approccio gas cromatografico multidimensionale (MDGC)

consiste in un processo separativo che utilizza due colonne (1D e 2D) aventi differenti fasi stazionarie, in cui una o più frazioni di eluato vengano automaticamente isolate da 1D e trasferite in 2D dove avviene un'ulteriore separazione. Un tale sistema garantisce quindi un potere risolutivo sensibilmente più elevato rispetto alle metodiche convenzionali consentendo la separazione bidimensionale dell'intera matrice [9].

Una scelta fondamentale nella gas cromatografia bidimensionale riguarda i tipi di colonna da utilizzare. La colonna 1D è di solito una colonna capillare convenzionale con fase stazionaria apolare o polare; la colonna 2D invece, va scelta in relazione al sistema MDGC utilizzato, ovvero Heart-Cutting o Comprehensive; essa può essere una colonna convenzionale lunga fino a 30 m, oppure, nel caso di un sistema comprehensive, una colonna con diametro interno ridotto e lunghezza di 1-2 metri. Questa differenza nasce dal fatto che mentre nel primo sistema è l'utente che, dopo esperimenti preliminari, sceglie quali e quante frazioni dell'effluente di prima dimensione desidera mandare in seconda dimensione, nel caso dei sistemi comprehensive invece, si ha una modulazione continua, con tagli di eluato ogni 4-8 secondi ed invio nella seconda dimensione. Di conseguenza le dimensioni della seconda colonna devono permettere che ogni frazione venga completamente eluita prima dell'ingresso di quella successiva. La fase stazionaria 2D deve essere diversa da quella 1D così da riuscire a separare composti che in prima dimensione sono stati coeluiti o separati parzialmente. In seconda dimensione può inoltre essere scelta anche una fase stazionaria chirale per la separazione enantiomerica.

La tecnica MDGC heart-cutting è stata introdotta durante la metà degli anni '50 (Simmons and Snyder, 1958). Il core di questa tipologia di strumentazione è il sistema di trasferimento dalla prima alla seconda dimensione. I primi esperimenti sono stati condotti usando due colonne impaccate unite da una valvola rotativa. Tuttavia questa tecnica portava diversi svantaggi, come la presenza di fenomeni di assorbimento, volumi morti eccessivi e frequenti perdite di gas. Nel 1968, Deans inventò un sistema di trasferimento senza valvole e parti in movimento che prende il nome di Deans Switch.

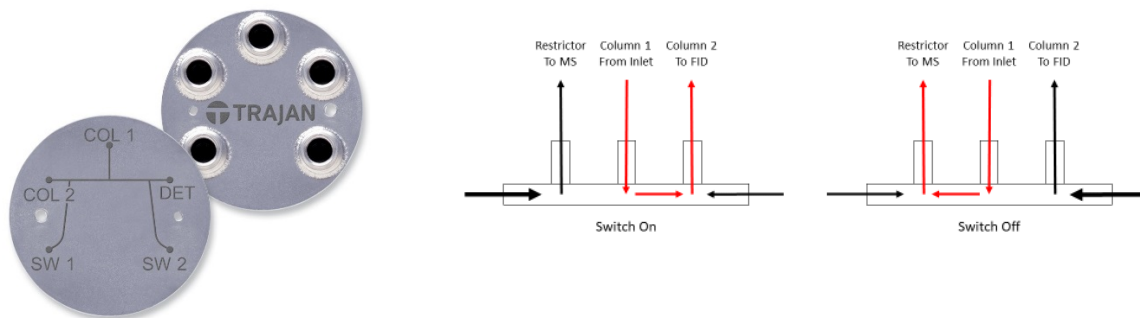


Figura 21 Deans Switch e schema di funzionamento

Il Deans Switch è costituito da tre fori di entrata e due di uscita; nel foro centrale entra l'effluente della prima colonna, le due uscite, disposte ai lati opposti, portano una al primo detector, l'altra alla seconda colonna. Le altre due entrate permettono l'ingresso di un flusso di azoto. Un regolatore di pressione regola il flusso dell'azoto in entrata dai due fori laterali. Sbilanciando i due flussi di azoto si riesce a direzionare l'effluente della prima colonna o verso il detector o verso la seconda dimensione. L'importante innovazione di Deans venne perfezionata da Schomburg et al. (1982), i quali introdussero il sistema di commutazione "live", ovvero l'utilizzo di un sottile capillare di platino che unisce le due colonne, mentre i flussi pressori supplementari sono regolati da valvole a spillo.

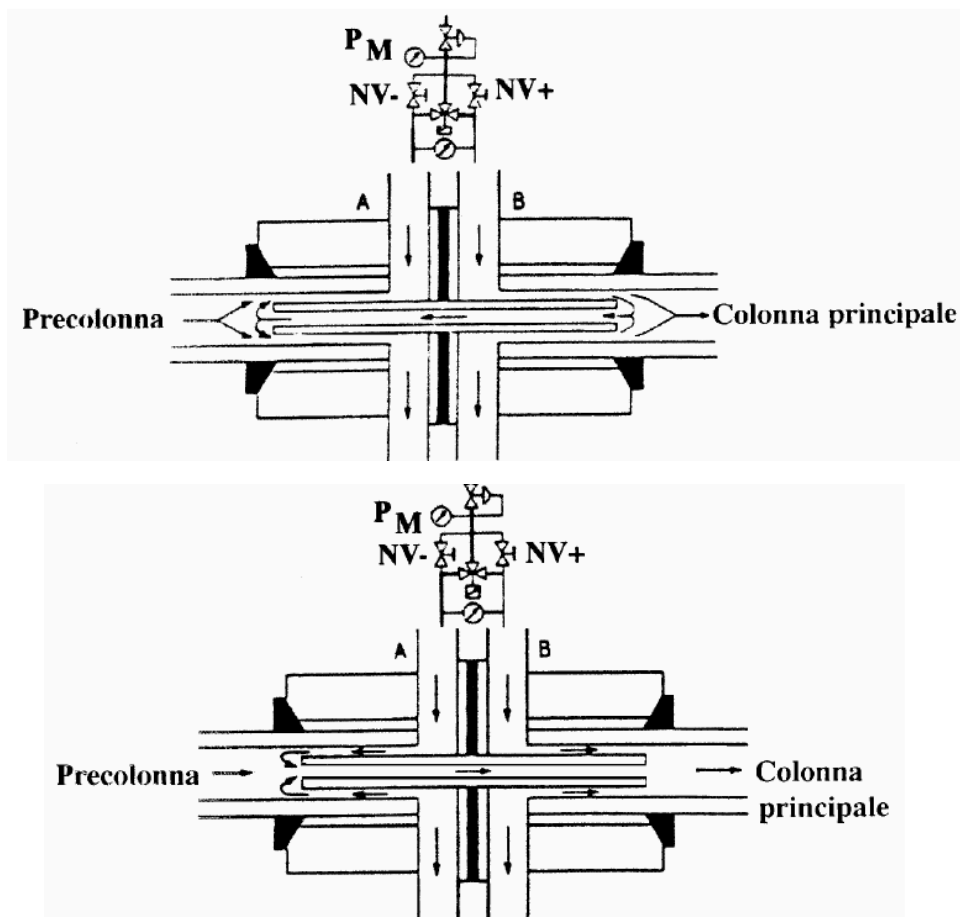


Figura 22 Schema di un Live Switch

Il live switch è un sofisticato sistema di accoppiamento delle due colonne poste nel circuito del gas di trasporto. Le due colonne capillari, l'uscita della prima e l'entrata della seconda, sono inserite in un capillare di platino che rappresenta la parte centrale del sistema. Un flusso di gas di trasporto viene immesso attraverso le due linee A e B e controllato da due valvole NV- e NV+. Le differenze di pressione tra le estremità del sistema vengono misurate da un manometro. Se la pressione nella linea A è inferiore a quella della linea B (posizione di stand by), l'effluente proveniente dalla prima dimensione non può entrare nel capillare di platino e viene così direzionato verso il primo detector.

Il cromatogramma ottenuto in questo modo consente di individuare i tempi in cui effettuare, durante una successiva analisi, i trasferimenti in seconda dimensione. Se la pressione nella linea A è maggiore di quella della linea B, posizione di taglio,

l'effluente proveniente dalla prima colonna passerà attraverso il capillare di platino e entrerà nella seconda colonna, raggiungendo, quindi, il detector posto all'uscita di questa.

Circa 10 anni dopo l'introduzione del sistema di Deans i primi strumenti commerciali costruiti dalla Siemens vedono la luce [10]. Durante gli anni '80, sono state introdotte notevoli innovazioni nel design delle valvole con l'utilizzo di materiali elastomerici termostabili e l'eliminazione dei volumi morti, portando a notevoli risultati senza problemi nell'uso delle valvole (Jennings, 1984).

Tuttavia una delle limitazioni del sistema MDGC equipaggiato con il live switch risiede nel fatto che è possibile effettuare un solo taglio per singola analisi. Questo è causato dal fatto che nel momento in cui viene effettuato il taglio, aumenta la resistenza al flusso, poichè le colonne vengono collegate in serie e questo provoca uno slittamento dei tempi di ritenzione dei componenti successivi, rendendo impossibile la programmazione di altri tagli. Nel 1998, a Messina viene sviluppato un nuovo sistema MDGC che utilizza una valvola meccanica termostabile a sei vie per il trasferimento dalla prima alla seconda dimensione. Questo nuovo sistema evita i problemi di sovrappressione e permette di eseguire un maggior numero di tagli durante la singola analisi.

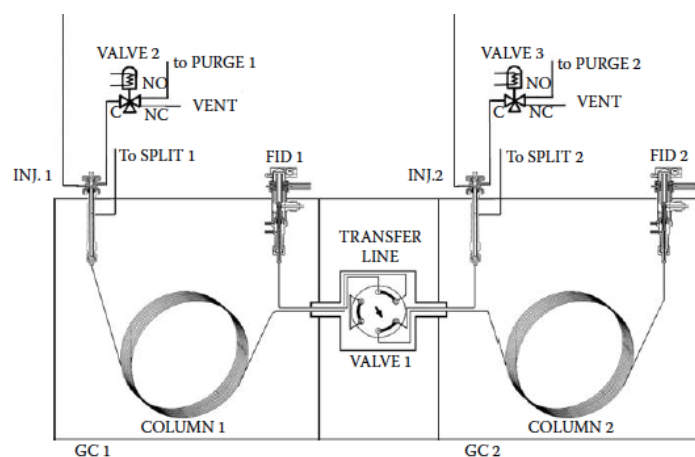


Figura 23 Sistema bidimensionale con forni separati da valvola meccanica a 6 vie

L'MDGC si è rivelata una tecnica efficace nell'analisi dei composti chirali negli oli essenziali; l'utilizzo di una colonna non chirale in prima dimensione e di una chirale in seconda ha permesso di superare i limiti dell'analisi chirale monodimensionale poiché la notevole complessità dei campioni reali supera le capacità separative delle colonne chirali.

La capacità in termini di picchi di un sistema MDGC si può calcolare sommando la capacità della prima colonna a quella della seconda, moltiplicata per il numero di tagli effettuati.

$$n_c = (n_{c1} + (n_{c2} \times x))$$

Con l'avvento degli strumenti GC-MS di basso costo la tecnica MDGC classica si avvia verso il declino, già verificatosi negli ultimi 8-10 anni; tuttavia, in tempi recenti, grazie agli ultimi sistemi con forni separati e all'utilizzo dello spettrometro di massa in seconda dimensione, questa tecnica sta tornando ad essere popolare in ambito accademico e industriale. Ciò si deve anche al miglioramento tecnologico sia in termini di hardware che di software.



Figura 24 Sistema MDGC heart-cutting accoppiato a uno spettrometro di massa

Capitolo 5

L'ANALISI CHIRALE

Gli oli essenziali agrumari, come tutti quelli naturali, sono costituiti da molecole organiche, molte delle quali chirali. I complessi meccanismi di biosintesi di queste sostanze, spesso coadiuvati da specie enzimatiche, fanno sì che in questi composti il rapporto enantiomerico non sia 50/50 (racemico), ma sia caratteristicamente spostato verso uno dei due enantiomeri. La distribuzione enantiomerica della frazione volatile degli oli essenziali agrumari può dare notevoli informazioni sulla genuinità, qualità, provenienza geografica e metodologie estrattive.

Com'è noto, due enantiomeri sono due molecole che hanno la stessa struttura chimica e le stesse proprietà chimico-fisiche, differendo esclusivamente sul piano ottico. Sono altresì due immagini speculari non sovrapponibili. Questo tipo di isomeria può comportare anche una diversa attività biologica dei due enantiomeri, poiché spesso questa si esplica tramite interazione stereoselettiva con dei recettori proteici. La differente attività biologica di due enantiomeri si manifesta spesso anche macroscopicamente, ad esempio nelle differenti proprietà organolettiche.

Il due enantiomeri del linalolo presentano due odori sensibilmente differenti: l' (S)-(+)-linalolo ricorda la lavanda e i citrus, l'(R)-(-)-linalolo odora più di corteccia e lavanda. All'interno di una colonna cromatografica classica l'interazione degli enantiomeri di un determinato composto con la fase stazionaria non comporta differenze nei tempi di eluizione, di conseguenza è impossibile determinare la composizione enantiomerica di un olio essenziale utilizzando questo tipo di colonna. Esistono tuttavia fasi stazionarie chirali con le quali l'interazione degli enantiomeri di uno stesso componente si traducono in diversi tempi di ritenzione. In questo modo è possibile separare le coppie chirali degli oli essenziali. Le fasi stazionarie chirali più utilizzate in questo tipo di determinazioni sono le ciclodestrine modificate, pure o

diluite a diverse percentuali con i polisilossani. Tuttavia, come già detto in precedenza, gli oli essenziali agrumari sono miscele estremamente complesse ed il dosaggio enantiomerico di tutti i componenti tramite un'analisi gas cromatografica diretta risulta molto difficile, anche se alle volte possibile almeno per quanto riguarda i componenti presenti in grandi quantità.

Diventa una fase estremamente critica quella della scelta e messa a punto delle condizioni sperimentali al fine di evitare la sovrapposizione dei picchi enantiomerici. Un approccio più conveniente consiste nel frazionare l'olio di partenza in miscele più semplici, maggiormente adatte alla capacità della colonna chirale.

I frazionamenti possono essere effettuati mediante cromatografia su strato sottile (TLC) oppure mediante HPLC; un'alternativa sono i sistemi accoppiati LC-GC e la MDGC. Quest'ultima tecnica è sicuramente la più adatta bassi pensare che con essa è stata ottenuta la maggior parte dei dati scientifici esistenti sulla composizione enantiomerica degli oli essenziali. L'accoppiamento LC-GC per effettuare l'analisi chirale prevede il trasferimento dalla fase LC alla fase GC anche di più frazioni. Una volta selezionate le frazioni da inviare dalla prima colonna in fase liquida alla colonna in fase gassosa, si procede in modo sequenziale. Non è possibile infatti inviare una seconda frazione prima che quella precedente sia completamente eluita. A tal fine, una volta mandata la frazione in seconda dimensione, il flusso LC viene interrotto; questa operazione non comporta eccessivi allargamenti di banda nella colonna LC, dove l'eluizione riprende non appena la colonna in fase gassosa risulta nuovamente disponibile per l'eluizione di una nuova frazione. Il processo nel complesso risulta piuttosto lungo. L'approccio MDGC, invece, risulta il più efficiente in questo tipo di analisi, con i primi esperimenti effettuati già intorno al 1990 [11], usando un cromatografo Siemens dotato di Deans Switch, con cui sono stati ottenuti i rapporti enantiomerici di alcuni monoterpeni in oli essenziali agrumari.

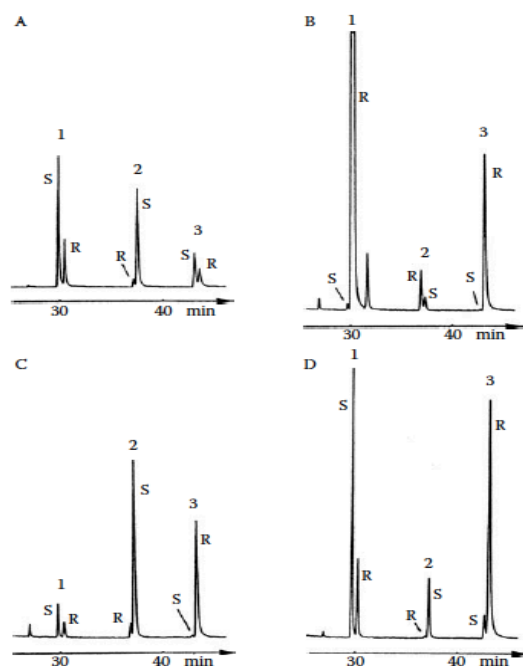


Figura 25 Analisi MDGC di alfa-pinene(1), beta-pinene (2) e limonene (3) usando una 2,3-tri-O- β -ciclodestrina. A - miscela di standard; B - olio essenziale di arancia dolce; C - olio essenziale di limone; D - olio essenziale di limetta [27].

Rispetto al sistema LC-GC, il sistema MDGC permette il trasferimento durante la stessa analisi, dalla prima alla seconda colonna GC, di più frazioni che possono essere analizzate contemporaneamente in seconda dimensione. Durante gli anni '90, un nuovo tipo di strumento MDGC con una valvola meccanica per il trasferimento dalla prima alla seconda dimensione è stato messo a punto ed utilizzato presso i laboratori coordinati dal prof. Giovanni Dugo dell'Università di Messina. Con questo sistema innovativo è stato possibile caratterizzare alcuni composti come sabinene, beta-pinene, limonene, linalolo, acetato di linalile, terpinen-4-olo e alfa terpineolo, negli oli essenziali agrumari.

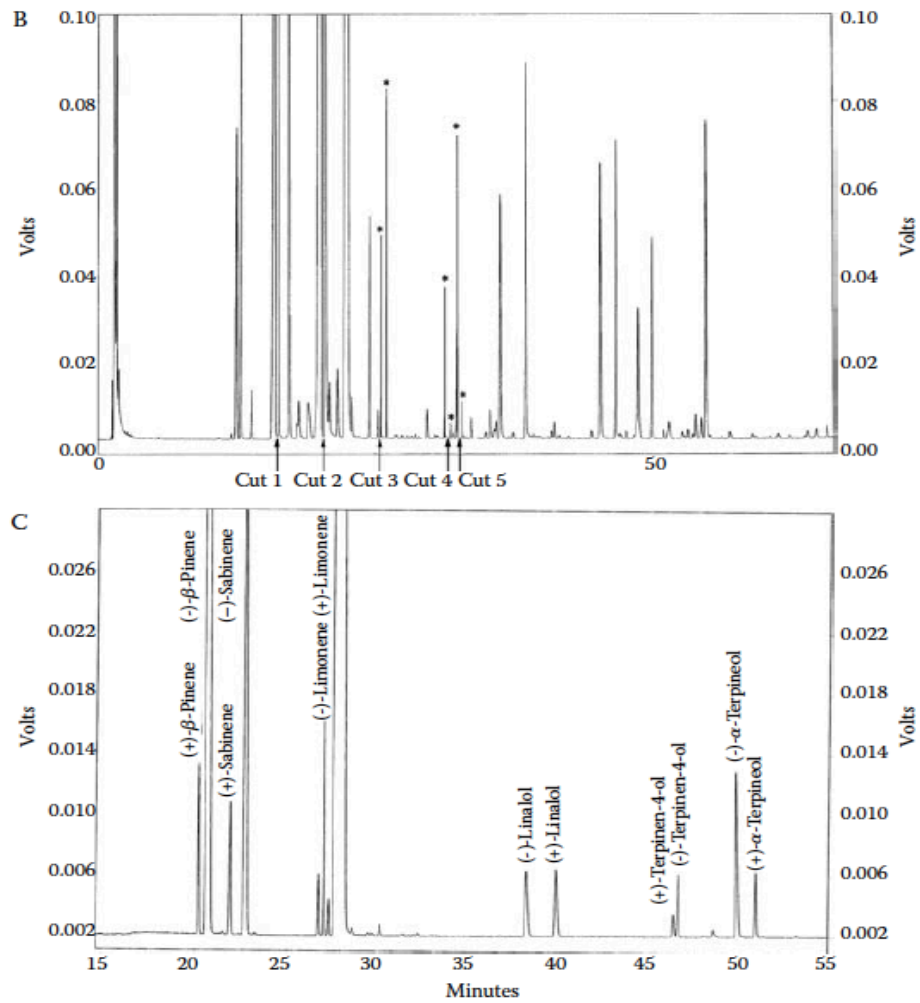


Figura 26 Analisi chirale di un olio essenziale di limone; B - cromatogramma di prima dimensione; C - cromatogramma in seconda dimensione [28].

Capitolo 6

COMPOSIZIONE DELLA FRAZIONE NON VOLATILE DELLE ESSENZE AGRUMARIE

La frazione non volatile delle essenze agrumarie è presente negli oli essenziali estratti a freddo oppure in alcuni derivati da questi ottenuti (oli concentrati, defurocumarinizzati, distillati particolari). Essa può rappresentare in alcuni casi fino al 15% dell'olio essenziale estratto a freddo. La frazione non volatile riveste notevole importanza non solo per la qualità e genuinità dell'olio essenziale, ma anche per le sue proprietà olfattive, poiché ne aumenta la persistenza agendo come “fissativo”, e alle volte apportando delle note olfattive particolari.

Questa frazione degli oli essenziali presenta una composizione chimica molto complessa che comprende composti chimici di natura estremamente diversa. Di seguito vengono elencate le classi chimiche di appartenenza dei composti che si possono ritrovare nella parte non volatile degli oli essenziali agrumari:

- Cere: costituite per lo più da paraffine, aldeidi alifatiche a lunga catena, alcoli a lunga catena, acidi grassi, triterpenoidi
- Composti ossigenati di natura eterociclica: cumarine, furocumarine, psoraleni, flavoni, isoflavoni
- Carotenoidi e xantofille

6.1 *Le cere*

Le cere rappresentano la parte maggioritaria che compone la frazione non volatile degli oli essenziali. Questa frazione è composta essenzialmente da alcani $C_{23} - C_{33}$, alcheni $C_{23} - C_{25}$, e aldeidi $C_{24} - C_{28}$ [12]. Componenti minori sono alcoli e triterpenoidi [13]. Uno studio condotto presso l'Università degli Studi di Messina ha investigato la

composizione chimica della frazione cerosa di diversi tipi di agrumi tramite una tecnologia che prevedeva l'utilizzo di un HPLC in prima dimensione e di un GC in seconda dimensione. Questa tecnica bidimensionale si è resa necessaria poiché la frazione non volatile, oltre ad essere molto complessa, è composta da specie chimiche con elevati punti di ebollizione. In questo modo è stato possibile isolare frazioni con minore complessità da mandare in seconda dimensione applicando le opportune programmate di temperatura [14]. Con l'ausilio di questa tecnica sono state identificate una serie di *n*-alcani C₁₂ – C₃₃ e una serie di alcani ramificati C₂₃ – C₃₁. La concentrazione di queste specie chimiche varia notevolmente a seconda del tipo di agrume: la quantità di alcani lineari è più elevata nell'arancia dolce e più bassa nell'arancia amara, dove di solito sono prevalenti gli alcani con numeri dispari di atomi di carbonio rispetto a quelli pari. Negli oli essenziali di limone, bergamotto e arancia dolce, i normal-alcani sono di solito presenti in ordine decrescente secondo l'ordine: *n*-C₂₉, *n*-C₃₁, *n*-C₂₇, *n*-C₂₅. Per quanto riguarda gli iso-alcheni, la specie chimica presente in quantità più elevata è il *i*-C₂₅ (2-methyl-C₂₄H₄₉) mentre la concentrazione di altri alcani ramificati di solito decresce con l'aumento del numero di atomi di carbonio. Per quanto riguarda nell'arancia dolce e nel bergamotto la concentrazione di isoalcheni è inferiore rispetto a quella degli alcheni lineari invece, nell'arancio amaro, nel mandarino e nel limone la concentrazione di isoalcani ed alcani lineare si equivale.

6.2 Carotenoidi

I carotenoidi sono una vasta classe di composti chimici, di cui circa 600 isolati da fonti naturali ed elencati in “Key to Carotenoids” (O. Strauss, 1987). Essi sono costituiti da unità isopreniche in posizione “testa-coda”, tranne al centro dove il legame è di tipo “coda-coda”: ciò conferisce simmetria alle molecole. Tutti i carotenoidi possono considerarsi derivati dalla struttura di base con formula bruta C₄₀H₅₆, e sono caratterizzati da una lunga serie di doppi legami coniugati. Per idrogenazione e ciclizzazione delle parti estreme della molecola si possono ottenere diversi tipi di carotenoidi.

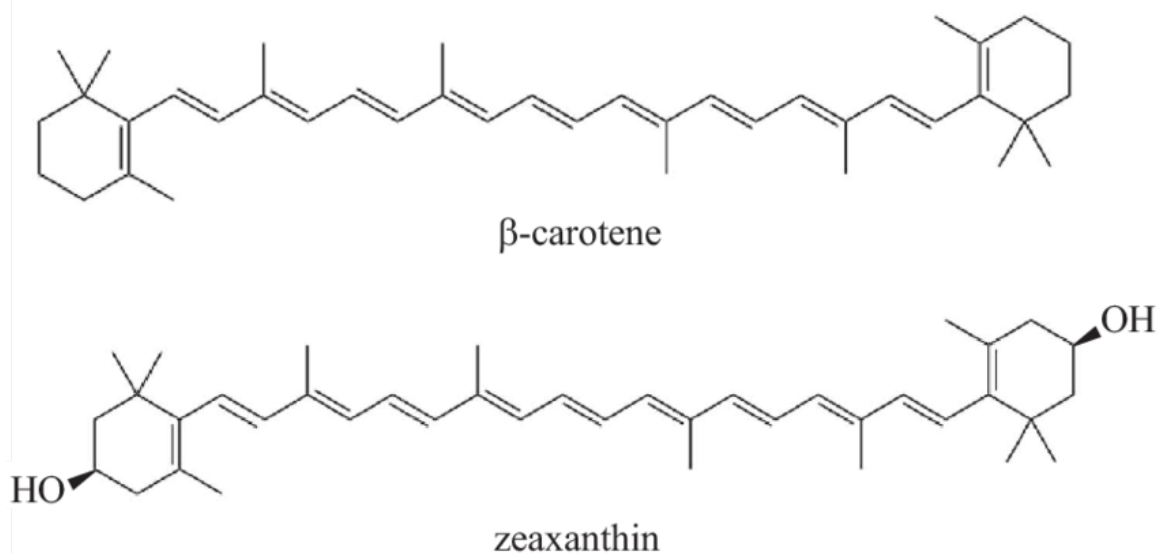


Figura 27 Struttura chimica di beta-carotene e zeaxantina

I carotenoidi possono essere molecole chirali: circa 340 fra quelli attualmente conosciuti possiedono da 1 a 5 centri chirali, solitamente in una sola configurazione. La presenza o meno di atomi di ossigeno costituisce la differenza tra caroteni e xantofille. I carotenoidi vengono denominati usando come prefisso delle lettere greche che identificano la parte terminale della molecola. Tutti i carotenoidi presentano un tipico assorbimento nel visibile, motivo per cui questi composti sono fortemente colorati dal giallo al rosso, al verde, al viola. I carotenoidi più caratteristici sono il beta-carotene, il licopene, la zeaxantina, la luteina, la violaxantina, la neoxantina, la fucoxantina e l'astaxantina. Alcuni di essi, come il beta-carotene, possiedono un'importante attività biologica, essendo precursori della vitamina A, e vengono infatti definiti provitamine. Alcuni enzimi situati nella mucosa intestinale processano le molecole dei carotenoidi, contenenti almeno un anello beta-cicloesenilico non sostituito, partendo da un'estremità e fermandosi a metà della molecola, dove cambia il tipo di legame. Nel caso del beta-carotene, si libera una molecola di vitamina A, poiché esso possiede due unità beta-cicloeseniliche non sostituite; altri carotenoidi, che

possiedono solo una di queste due unità, hanno una resa massima, in vitamina A, pari al 50% di quella del beta-carotene.

Altri tipi di carotenoidi maggiormente ricchi di ossigeno sono gli epossidi e i furanoidi considerati derivati della zeaxantina. Molecole in cui lo scheletro di atomi di carbonio è stato ridotto da una o da entrambe le estremità prendono il nome di apocarotenoidi. Essendo i carotenoidi costituiti da un elevato numero di doppi legami, l'isomeria cis-trans rende possibili numerosi isomeri che, a volte, presentano attività biologiche differenti. Il numero di isomeri possibile per ogni carotenoide dipende dal grado di impedimento sterico dei doppi legami; inoltre essi hanno una certa tendenza ad isomerizzare quando sono in soluzione, esposti a fonti di calore o alla luce. I carotenoidi sono ampiamente presenti negli agrumi, sia nell'endocarpo che nel pericarpo, dove sono localizzati anche gli oli essenziali. Alcuni di questi, infatti, sono colorati intensamente dal giallo al rosso, come ad esempio mandarino, arancia e pompelmo. Nell'olio essenziale di arancia dolce prevalgono le xantofille come violaxantina e luteoxantina, nel mandarino prevale la criptoxantina; di solito, queste specie chimiche sono esterificate con acidi grassi. Nel pompelmo è presente in notevole quantità il licopene: è peculiare che questo agrume non contenga carotenoidi ossigenati ma solo idrocarburici [15].

6.3 Composti eterociclici contenenti ossigeno

La composizione quali-quantitativa della frazione contenente i composti eterociclici dell'ossigeno costituisce un importante parametro per la valutazione della genuinità e qualità e per l'utilizzo degli oli essenziali agrumari. Questi composti hanno strutture chimiche diverse fra di loro ma possono essere ricondotti a tre sottoclassi, nelle quali le varie specie differiscono per sostituzione in determinate posizioni di scheletri molecolari. Possiamo identificare quindi tre classi di composti eterociclici:

- Cumarine
- Psoraleni, angelicine, piranocumarine
- Polimetossiflavoni

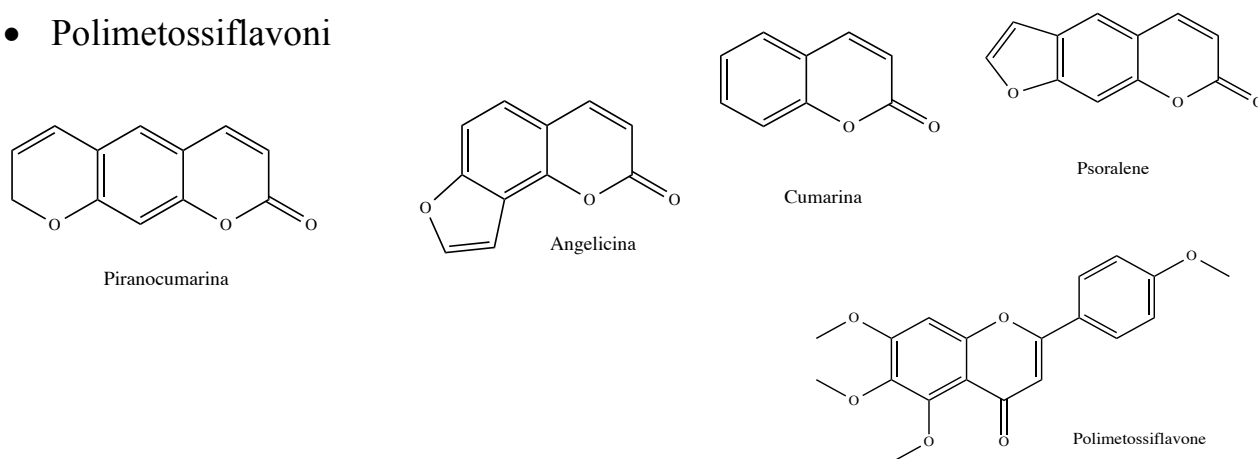


Figura 28 Composti eterociclici contenenti ossigeno

Le cumarine sono composti molto diffusi nel mondo vegetale, in particolare nelle Leguminose, Moriaceae, Meliaceae, Umbelliferae e Rutaceae [16]. Attualmente il numero di questi composti identificati in matrici naturali è superiore a 600. Queste molecole sono di notevole interesse scientifico poiché possiedono svariati tipi di attività biologica e una caratteristica fluorescenza all'irradiazione con luce ultravioletta. Tra queste possiamo citare l'attività antibatterica ed antimicotica,

proprietà anticoagulanti, vasodilatatorie, diuretiche ma anche epatotossiche e stimolanti la respirazione. Inoltre, alcune furocumarine sono causa di fotosensibilizzazione cutanea a causa di addotti con il DNA causati dalla luce UV. Una relazione struttura-attività è stata messa in evidenza in furocumarine, xantoina, psoralene, e bergaptene, mentre le furocumarine fenoliche e i composti più sostituiti sono risultati inattivi. A causa di questi problemi l'utilizzo in ambito di profumeria e cosmetica di oli essenziali cold pressed di bergamotto, limone, limetta, pompelmo e arancia amara, ha subito delle restrizioni aprendo il campo verso prodotti a basso o assente contenuto di furocumarine, come i distillati o i defurocumarinizzati. Nelle piante, la biosintesi delle cumarine avviene a partire dagli acidi shikimico e corismico da cui si formano amminoacidi come fenilalanina e tirosina, successivamente convertiti ad acido trans-cinnamico; la ortoidrossilazione di quest'ultimo porta alla cumarina stessa, mentre dall'acido 4-idrossicinnamico si ottiene l'umbelliferone, considerato il precursore di tutte le 7-idrossicumarine [16].

La distribuzione di questi composti negli oli essenziali di agrumi risulta molto varia: cumarine e furocumarine sono presenti in maggior quantità in bergamotto, limone e limetta, ma anche in pompelmo e arancia amara, dove si riscontrano discrete quantità soprattutto di bergaptene. Nel limone, le specie più abbondanti sono il citroptene e la bergamottina, mentre il bergamotto presenta un profilo più semplice con prevalenza di bergaptene. La limetta è fra gli agrumi con un maggiore contenuto di composti a nucleo eterociclico ossigenato, in modo particolare cumarine e furocumarine; contiene infatti elevate quantità di citroptene, erniarina e bergamottina, e modeste quantità di bergaptene. Nell'arancia dolce, nel mandarino, nel clementino e nel tangerino prevale la presenza di flavoni, in particolare di nobiletina, tangeretina ed eptametossiflavone. In questi agrumi non sono presenti furocumarine o altri composti fotosensibilizzanti.

Tabella 6 composti eterociclici dell'ossigeno nei principali oli essenziali agrumari; A.A = Arancio Amaro, A.D. = Arancio Dolce, L = Limone, Lim = Limetta, B = Bergamotto, M = Mandarino, P = Pompelmo [3]

	A.A.	A.D.	L	Lim	B	M	P
Auraptene (7-geranilossicumarina)	+		+				+
Auraptenolo (7-(2'-idrossi-isopent-3'-enilossi)cumarina)	+						
Marmina (7-(6',7'-diidrossi-geranilossi)cumarina)							+
Umbelliferone (7-idrossicumarina)	+						
Erniarina (7-metossicumarina)			+	+			
Epossiauraptene (7-(6',7'-epossigeranilossi)cumarina)							+
7-Isopentenilossicumarina			+				
Meranzina (7-metossi-8(2',3'-epossi)isopentenilcumarina)	+						+
Ostolo (7-metossi-8-isopentenilcumarina)	+						+
Meranzina idrata (7-metossi-8(2',3'-diidrossi)isopentilossicumarina)	+						+
Isomeranzina (7-metossi-8-(2'-one-isopentil)cumarina)	+						+
7-(Metossi-8(2'-formil-2'-metilpropil)cumarina)							+
Citroptene (5,7-dimetossicumarina)	+	+	+	+	+		+
5-Isopentenilossi-7-metossicumarina				+	+		
5-(2',3'-Eossi-isopentilossi)-7-metossicumarina				+			
5-Geranilossi-7-metossicumarina				+	+		
5-(2',3'-Diidrossi-isopentilossi)-7-metossicumarina				+			
Bergaptene (5-metossipsoralene)	+	+		+	+		+
Epossibergamottina (5-(6',7'-epossi-geranilossipsoralene)	+						+
Epossibergamottina idrata (5-(6',7'-diidrossi-geranilossipsoralene)	+						+
Bergamottina (5-geranilossipsoralene)			+	+	+		+
Bergaptolo (5-idrossipsoralene)	+	+	+		+		+
Ossipecedanina (5-(2',3'-epossi-isopentilossi)psoralene)			+	+	+		
Ossipecedanina idrata (5-(2',3'-diidrossi-isopentilossi)psoralene)			+	+	+		
Pabulenolo/Gosferolo (5-(2'-idrossi-3'-metilbut-3'-enilossi)psoralene)			+				
Isoimperatorina (5-isopentenilossipsoralene)			+	+			
8-Geranilossipsoralene			+	+			
Eraclenina (8-(2',3'-epossi-isopentilossi)psoralene)			+	+			
Eraclenolo (8-(2',3'-diidrossi-isopentilossi)psoralene)			+				
Imperatorina (8-isopentenilossipsoralene)			+	+			
8-(6',7'-Epossigeranilossi)psoralene			+				
5-Metossi-8(2',3'-epossi-isopentilossi)psoralene			+				
5-Geranilossi-8-metossipsoralene			+	+			
Biacangelicina (8-(2',3'-diidrossi-isopentilossi)-5-metossipsoralene)			+		+		
Isobiacangelicolo (5-metossi-8-(2'-one-isopentil)psoralene)				+			
5-Isopent-2'-enilossi-8-(2',3'-epossiisopentilossi)psoralene			+				
Fellopterina (5-metossi-8-isopentenilossipsoralene)			+				
Biacangelicolo (5-metossi-8-(2',3'-epossi-isopentilossipsoralene)			+	+	+		
Isopimpinellina (5,8-dimetossipsoralene)				+			
Cnidilina (5-Isopentenilossi-8-metossipsoralene)				+			
Neobiacangelicolo (5-metossi-8-(2'-idrossi-3'-metilbut-3'-enilossi)psoralene)			+				
5isopentenilossi-8-(2',3'-diidrossi-isopentilossi)psoralene			+				
Cnidicina (5,8-diisopentenilossi)psoralene)			+				
5-Metossi-8-geranilossipsoralene			+				
3,6,7,8,4'-Pentametossiflavone	+						
Tangeretina (4',5,6,7,8-pentametossiflavone)	+	+					+
Nobiletina (3',4',5,6,7,8-esametossiflavone)	+	+					+
3,3',4',5,6,7,8-Eptametossiflavone	+	+					+
Sinensetina (3',4',5,6,7-pentametossiflavone)		+			+	+	
3,3',4',5,6,7-Esametossiflavone		+					
Tetra-O-metilscutellareina (4',5,6,7-tetrametossiflavone)	+	+			+	+	

Capitolo 7

CARATTERIZZAZIONE DELL'ASSOLUTA DI FIORI DI POMPELMO E DI LIMONE

Sin dagli albori della profumeria, le essenze ricavate dai fiori hanno avuto una notevole importanza poiché conferiscono alle fragranze, in modo particolare a quelle femminili, complessità. Tra le essenze agrumarie, solo il neroli, ricavato dai fiori di arancia amara, viene prodotto industrialmente per essere impiegato nelle composizioni di alta profumeria. Gli altri tipi di agrumi sono in larga parte processati industrialmente per essere destinati al consumo diretto, mentre nel caso dell'arancia amara questo fenomeno è limitato. Altrettanto importante è il fatto che i fiori di questa pianta possiedono un profilo olfattivo decisamente interessante per l'uso in profumeria. Mentre per l'essenza di neroli sono state prodotte numerose indagini scientifiche, per quanto riguarda lo studio degli altri fiori di agrumi i dati sono spesso esigui e a volte discordanti. Nella letteratura scientifica sono presenti per lo più articoli riguardanti la caratterizzazione della parte volatile, effettuata per spazio di testa, su più di una specie agrumaria. Uno di questi riporta la composizione della frazione volatile di nove cultivar diverse, tra cui arancia dolce, limone, mandarino e pomelo [17]. Altri lavori riportano invece la composizione di singole specie, sempre ottenuta tramite analisi dello spazio di testa [18].

Nel presente lavoro di tesi è stata effettuata la caratterizzazione della parte volatile e della parte non volatile di un'assoluta ottenuta, per estrazione con solvente, da fiori di due specie agrumarie: limone e pompelmo.

7.1 Stato dell'arte

Come appena detto, i dati di letteratura sulla caratterizzazione di queste matrici sono limitati. Essi si riferiscono essenzialmente all'analisi della frazione volatile senza effettuare una procedura di estrazione classica, quanto piuttosto una microestrazione

in fase solida (SPME), tecnica oggi molto utilizzata per l'ottenimento di profili della frazione volatile di matrici vegetali. Dai lavori precedentemente citati è possibile evincere come i profili, sia dei fiori di limone che di quelli di pompelmo, siano sensibilmente diversi rispetto alla composizione degli oli essenziali dei rispettivi frutti. Nel caso dei fiori di limone, il componente principale è sempre il limonene, ma viene riportata una considerevole percentuale di linalolo (3,94 %), cariofillene (3,14 %) e una piccola percentuale di indolo (0,73%), solitamente non presente nell'olio essenziale di limone. Il profilo volatile dei fiori di pompelmo presenta invece una bassa percentuale di limonene (3,32-3,68 %) ed un'alta quantità di linalolo (21,50-48,43 %) ed indolo (7,88-8,84 %). Nella tabella sottostante vengono riportati i componenti principali della frazione volatile dei due fiori, secondo la letteratura citata.

Tabella 7 Componenti principali della frazione volatile dei fiori di limone e di pompelmo a completa apertura [19]

Componente	Limone var. Eureka	Pompelmo var. Yuhuanyou	Pompelmo var. Zaoxiangyou
Linalolo	3,94	21,59	48,43
Limonene	52,53	3,68	3,32
Indolo	0,73	8,84	7,88
Metilantranilato	0,04	2,79	-
β -pinene	1,11	2,42	4,90
Geraniale	0,50	2,40	0,76
mircene	2,42	1,55	0,99
(E)- β - ocimene	-	-	8,33
Beta-elemene	6,02	4,98	2,25
Gamma-terpinene	3,17	11,06	0,04
(Z)- β -ocimene	-	-	0,22
Nerale	0,52	1,64	0,72

β -farnesene	1,64	5,16	-
Nerolidolo	0,064	0,92	8,75
Cariofillene	3,14	2,18	0,05

È stata anche riportata la variazione della composizione volatile durante tutta la fase di apertura dei fiori. Da questi dati si può evincere come la composizione volatile di queste matrici sia estremamente variabile anche all'interno della stessa specie ed in relazione alle condizioni di maturazione.

7.2 Materiali e reagenti utilizzati

I solventi per l'estrazione e l'analisi del materiale vegetale, quali esano, metanolo, acetato di etile e acqua di elevata purezza (grado LC-MS), sono stati acquistati da Merk KGaA (Milano, Italia). Le colonne per l'analisi gas cromatografica sono state ottenute da Phenomenex Italia (Milano) mentre la colonna utilizzata per l'analisi HPLC è stata acquistata da Agilent (Milano, Italia). Altri materiali consumabili, quali siringhe, carta da filtro e filtri a siringa in PTFE 0,45 e 0,2 micron, sono stati acquistati da Supelco Italia.

7.3 Strumentazione analitica utilizzata

Per l'evaporazione dei solventi di estrazione è stato utilizzato un rotavapor R-110 Buchi s.r.l. (Cornaredo, Italia). Per la caratterizzazione qualitativa, quantitativa e per l'analisi chirale della frazione volatile sono stati utilizzati: un sistema GCMS-TQ8030 della Shimadzu (Osaka, Giappone), dotato di autocampionatore AOC-20is, e un MDGC/GCMS (Shimadzu) equipaggiato con due forni accoppiati, con un detector FID e con uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo; i dati sono stati elaborati mediante il software in dotazione agli strumenti: *GCMSsolution* ver. 4.0, *GCsolution* ed *MDGCsolution*.

Per la caratterizzazione della frazione non volatile è stato utilizzato un HPLC-MS/MS Shimadzu LCMS-8040 equipaggiato con due pompe quaternarie LC 20AD, Degaser, rivelatore UV-Vis (190-800 nm) con microcella, spettrometro di massa a triplo quadrupolo con sorgente ESI operante sia in modalità negativa che positiva, nebulizer gas e drying gas, azoto, e argon per la cella di collisione. I dati LC-MS sono stati processati con il Software *LabSolution* in dotazione dello strumento.

7.4 Materiale Vegetale

I fiori di limone e di pompelmo sono stati raccolti nel periodo di fioritura aprile-maggio 2019 da piante di circa 20 anni di età presso il Comune di Furci Siculo, nella provincia di Messina, offerti gentilmente da agricoltori operanti nel territorio. Sono stati raccolti 700 grammi di fiori di pompelmo bianco e 500 grammi di fiori di limone circa al 50% varietà Interdonato e 50% varietà Monachello. I fiori sono stati processati subito dopo la raccolta, al fine di preservare al massimo l'aroma caratteristico.



Figura 29 Fiori di limone



Figura 30 Fiori di Pompelmo

7.5 Preparazione dell'assoluta

Esperimenti preliminari, effettuati prima della vera e propria estrazione, sono stati condotti al fine di poter determinare le condizioni migliori per poter ottenere al contempo una migliore resa, un profilo olfattivo più vicino alla matrice originale e un minor contenuto di cere.

A questo scopo sono state condotte due serie di estrazioni utilizzando 10 g di fiori per volta. Nel primo caso sono stati effettuati tre lavaggi con 50 ml di esano per volta, della durata di 30 minuti ciascuno per un tempo di contatto totale di 90 minuti. Durante l'estrazione i fiori sono stati agitati nel solvente mediante un agitatore magnetico ad un moderato regime di giri.

Nel secondo caso è stata effettuata la stessa operazione nelle medesime condizioni, ma per un tempo di contatto pari alla metà del precedente, ovvero 15 min per lavaggio.

Le frazioni ottenute sono state trattate con sodio solfato anidro e filtrate con carta da filtro; successivamente sono state evaporate mediante rotavapor alla temperatura di 35°C e alla pressione di 150 mbar. In seguito, i sei campioni così ottenuti sono stati valutati dal punto di vista olfattivo e ne è stata registrata la resa. Nella tabella sottostante vengono riportati i risultati ottenuti dagli steps preliminari.

Tabella 8 Risultati delle estrazioni preliminari

Estrazione	Resa %	Odore (similarità con i fiori)
1 a 30 min	0,16	+++
2 a 30 min	0,1	++
3 a 30 min	0,04	+
Totale	0,30	
1 a 15 min	0,14	+++
2 a 15 min	0,08	+++
3 a 15 min	0,04	+
Totale	0,26	

Gli esperimenti preliminari, condotti solo sui fiori di pompelmo, hanno portato alla decisione di eseguire l'estrazione effettuando solo due lavaggi con solvente per un tempo non superiore ai 15 minuti ciascuno. Difatti, seppur con una minore resa, questa procedura permette di ottenere un prodotto più fedele all'odore dei fiori di partenza e con un minore contenuto di cere. Il terzo lavaggio infatti, estrae principalmente la parte cerosa, producendo un estratto dall'odore meno intenso e meno caratteristico. Inoltre, è ragionevole pensare che i componenti odorosi, essendo molecole strutturalmente più piccole, vengano solubilizzati con più facilità e quindi necessitino di un tempo di contatto inferiore.

L'estrazione vera e propria dei fiori di pompelmo e di limone è stata effettuata rispettivamente su 700g e su 500g di materiale vegetale. I fiori sono stati posti all'interno di un agitatore meccanico a motore, in rapporto 1:5 con il solvente, e sono stati agitati per 15 minuti a circa 700 giri al minuto. Al termine delle due estrazioni il liquido è stato raccolto in una beuta da 10 litri, a cui è stato aggiunto il 2% di solfato di sodio anidro al fine di rimuovere l'umidità all'interno dell'estratto. Dopo aver agitato brevemente, la miscela è stata filtrata su carta da filtro in cellulosa ed il solvente

è stato evaporato, tramite rotavapor, alla temperatura di 35 °C e 150 mbar di pressione, fino alla quasi completa rimozione del solvente. Il residuo ottenuto è stato posto sotto corrente di azoto per 15 min per allontanare gli ultimi residui di esano. Il prodotto così ottenuto rappresenta la cosiddetta “concreta”, contenente sia l’essenza sia le cere. Per quanto riguarda i fiori di pompelmo, sono stati ottenuti da 700g di fiori circa 2,1 grammi di concreta con una resa dello 0,3%, mentre per i fiori di limone 1,4 grammi di concreta, con una resa dello 0,28%. Le rese ottenute sono state più alte di quelle avute negli esperimenti preliminari, e questo può essere ragionevolmente spiegato dal fatto che su scala maggiore le condizioni di estrazione siano migliori e le perdite nelle varie operazioni siano minori. Le due concrete ottenute, di colore intenso e consistenza viscosa, sono state trattate con alcol etilico assoluto in rapporto 1:10 e conservate, dopo opportuna agitazione, alla temperatura di -5 °C per 20 minuti. Successivamente sono state filtrate con l’ausilio di due filtri a siringa di porosità decrescente da 0,45 micron a 0,2 micron. Questa operazione si è resa necessaria al fine di allontanare la parte cerosa non solubile in alcol etilico. Le due soluzioni alcoliche sono state evaporate mediante rotavapor alla temperatura di 40 °C e alla pressione di 35 mbar. Per evitare la perdita dei componenti più volatili dei due campioni l’evaporazione è stata condotta sotto vuoto, ed è stata interrotta prima del completamento del processo di evaporazione, avvenuto a pressione e temperatura atmosferica sotto corrente di azoto per 30 minuti circa. Le assolute di fiori di pompelmo e di limone risultanti hanno un colore e un odore molto intensi. Le rese di ottenimento dell’assoluta a partire dalla concreta sono state nel caso del pompelmo e del limone rispettivamente dell’80 % e del 85 %, per una resa finale considerando il peso iniziale dei fiori, dello 0,24 % circa in entrambi i casi.

7.7 Analisi della frazione volatile

L’analisi della frazione volatile è stata svolta in due distinte fasi. In una prima fase è stata effettuata la caratterizzazione quali-quantitativa utilizzando il primo GC-FID del sistema MDGC in modalità stand-by e il GCMS-TQ8030, in una seconda fase è stato utilizzato il sistema MDGC in modalità heart-cutting per effettuare l’analisi chirale.

7.7.1 Caratterizzazione quali/quantitativa della frazione volatile

L'analisi qualitativa è stata condotta mediante GC-MS, le analisi sono state condotte in programmata di temperatura secondo il seguente gradiente: fino a 2 min a 50°C, incrementando fino a 250° a 3°C/min. La colonna utilizzata è stata una Zebron-5ms (Phenomenex, USA) di dimensioni 30 m × 0.25 mm (diametro interno) × 0.25 µm (spessore interno del film di fase stazionaria); l'iniettore split-splitless operante in rapporto 50:1 è stato settato ad una temperatura di 250 °C. Le due assolute di fiori di limone e di pompelmo sono state diluite 10 volte con esano ed è stato iniettato 1,0 µl di campione. Il gas carrier utilizzato è stato elio ad una velocità lineare costante di 30 cm/sec. La temperatura di interfaccia dello spettrometro di massa è stata di 250 °C, la sorgente ha operato in modalità di ionizzazione ad impatto elettronico, il voltaggio del detector è stato di 0,95 kV. L'acquisizione di massa è avvenuta in modalità di Total Ion Current in un range da 40 a 350 unità di massa atomica (amu), con una velocità di scansione pari a 1666 amu/sec.

L'identificazione dei componenti dei due oli essenziali è stata effettuata tramite l'ausilio di quattro librerie di spettri di massa: FFSNC 2, Adams IV edizione, NIST 11 e Wiley 9. Inoltre è stata effettuata la comparazione degli indici di ritenzione (RI) relativi ai tempi di ritenzione di una serie di n-alcani (C₇-C₃₀) con gli stessi riportati in letteratura [20-21].

L'analisi quantitativa è stata effettuata utilizzando il primo GC del sistema MDGC equipaggiato con il detector FID e sistema di autoiniezione AOC-20is. Il gradiente GC-MS e la colonna erano i medesimi utilizzati per l'analisi. La pressione del gas (elio) all'iniettore è stata di 100 kPa, ad una velocità lineare costante di 30 cm/sec. Il detector FID è stato alimentato con idrogeno a 50 ml/min. ed aria a 400 ml/min.

Il profilo in percentuale dei campioni analizzati è stato ottenuto attraverso la normalizzazione delle aree dei picchi del cromatogramma attraverso il software *GC solution*. Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

7.7.2 *Analisi chirale della frazione volatile*

L'analisi chirale dei due campioni è stata effettuata sfruttando le potenzialità del sistema MDGC Shimadzu, dotato di un detector FID in prima dimensione e di uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo in seconda dimensione. Il campione viene iniettato nel GC-1 attraverso un iniettore split-splitless, dove è posizionato un multi-Deans switching, il quale permette di effettuare i tagli di frazioni selezionate di eluato della prima dimensione e di mandarli in seconda dimensione. Un sistema APCB mantiene la pressione costante a 100 kPa. Il sistema è provvisto di (Advanced Pressure Control) due diverse colonne: in prima dimensione è stata montata una colonna capillare Zebron-5ms (v. sopra), mentre in seconda dimensione è alloggiata una colonna capillare Mega-Dex DEt (Mega, Milano, Italia) con fase stazionaria costituita da una β -ciclodestrina modificata (dietil-tert-butil-silil- β -ciclodestrina) di dimensioni $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$ (diametro interno) $\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ (spessore di film). La programmata di temperatura utilizzata in prima dimensione è stata la seguente: da 50 a 280°C a $4^\circ\text{C}/\text{min.}$, in seconda dimensione: $0\text{-}6\text{ min. } 50^\circ\text{C}$, poi da 50°C a 220°C alla velocità di $2^\circ\text{C}/\text{min.}$ Prima dell'analisi il campione è stato diluito 10 volte con n-esano ed $1,0\text{ }\mu\text{l}$ è stato iniettato in modalità split 1:50, alla temperatura di $250\text{ }^\circ\text{C}$ all'iniettore. Il gas carrier elio è stato utilizzato alla velocità lineare di $25\text{ cm}/\text{sec.}$, il detector FID operante ad una temperatura di $300\text{ }^\circ\text{C}$ è stato alimentato da H_2 ($40/\text{min.}$), N_2 ($80\text{ ml}/\text{min.}$) ed aria ($400\text{ ml}/\text{min.}$). I parametri dello spettrometro di massa in seconda dimensione erano i medesimi utilizzati per l'analisi qualitativa sopra descritta. I dati sono stati elaborati mediante il software dedicato *MDGC Solution* Shimadzu.

7.8 *Analisi della frazione non volatile*

La caratterizzazione della frazione non volatile delle assolute ottenute dai fiori di limone e di pompelmo è stata effettuata utilizzando un HPLC Shimadzu, serie LCMS 8040, dotato di sorgente ionica ESI operante sia in modalità positiva che negativa. La colonna utilizzata è stata una C_{18} Zorbax, di Agilent Technologies, di dimensioni 100 mm (lunghezza) $\times 2,1\text{ mm}$ (diametro interno) con dimensioni delle particelle, di tipo

core shell, di 1,8 micron. Le analisi sono state rivolte all'identificazione e quantificazione delle cumarine, furocumarine e flavoni possibilmente presenti nei due campioni.

7.8.1 Ottimizzazione del metodo

La messa a punto del metodo è stata effettuata sul campione di fiori di pompelmo, preventivamente diluito 200 volte. Inizialmente sono state utilizzate come fasi mobili H₂O + acido formico 0,1% (fase A) e Metanolo + 0,1% acido formico (fase B); il forno della colonna è stato termostato a 40 °C, il rivelatore UV-Vis settato alla lunghezza d'onda di 316 nm, e lo spettrometro di massa operante in Total Ion Current in modalità positiva. Il flusso di gas nebulizzante di 15 litri/h e il flusso di gas dissecante di 3 litri/h, la temperatura del blocco riscaldato è stata settata a 450 °C mentre la transfer line a 250°C, il potenziale elettrico della sorgente è stato impostato a 4,5 Kv. L'eluizione è stata condotta in modalità gradiente come riportato nella seguente tabella.

Tabella 9 Gradiente iniziale per l'ottimizzazione del metodo

Minuti	Percentuale di fase B
0	40
8	80
10	90
15	100
13	100
13.5	40
15	40

Queste condizioni di separazione si sono tuttavia rivelate non idonee poiché si verificavano coeluzioni nella parte iniziale e finale del cromatogramma che non

permettevano una buona identificazione e quantificazione dei componenti. In ragione di questo sono state fatte diverse prove, prima variando il gradiente e poi passando a fasi mobili diverse in particolare sostituendo il metanolo con l'acetonitrile; quest'ultimo, essendo un solvente più "forte" per questo tipo di fase stazionaria, riesce ad eluire più facilmente i componenti rispetto al metanolo a parità di concentrazione. La fine del processo di ottimizzazione ha permesso di ottenere il gradiente mostrato in Tabella 10 usando come fase B Acetonitrile + 0,1% di acido formico.

Tabella 10 Gradiente definitivo per la separazione HPLC.

Minuti	Percentuale di fase B
0	20
5	60
10	80
15	95
18	95
18.1	20
20	20

Tramite l'utilizzo di questo gradiente è stato possibile ottenere una separazione sufficiente all'identificazione e quantificazione dei componenti; di seguito, nella figura sottostante, viene mostrato il profilo ottenuto rispettivamente per l'assoluta dei fiori di pompelmo e per l'assoluta dei fiori di limone.

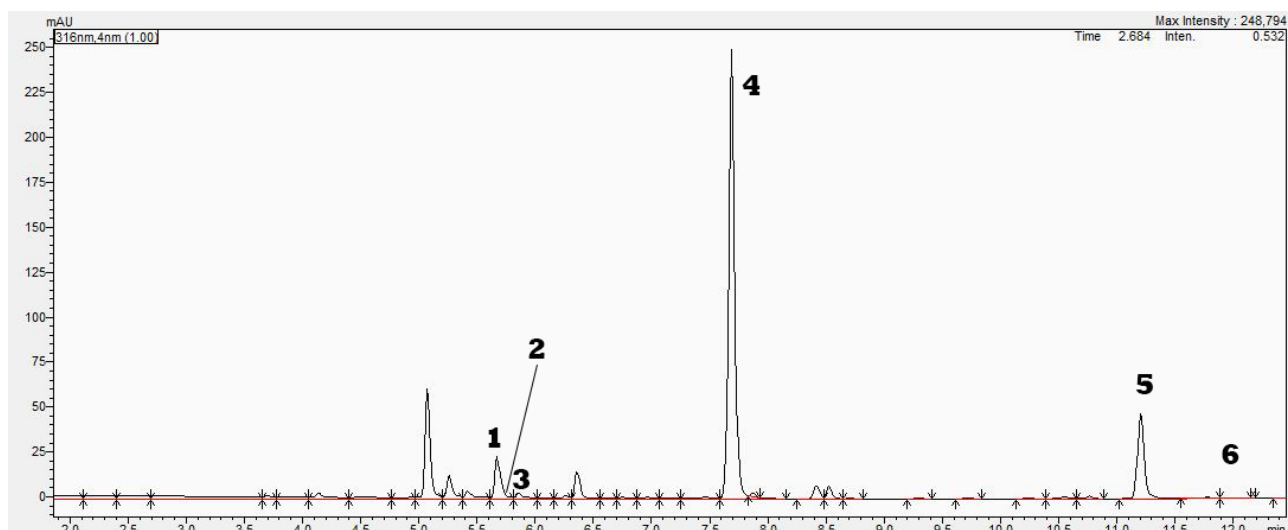


Figura 30 Profilo HPLC-UV relativo all'assoluta dei fiori di pompelmo; (1) Meranzina, (2) Bergaptene, (3) Isomeranzina, (4) Epossiauraptene, (5) Bergamottina, (6) Auraptene

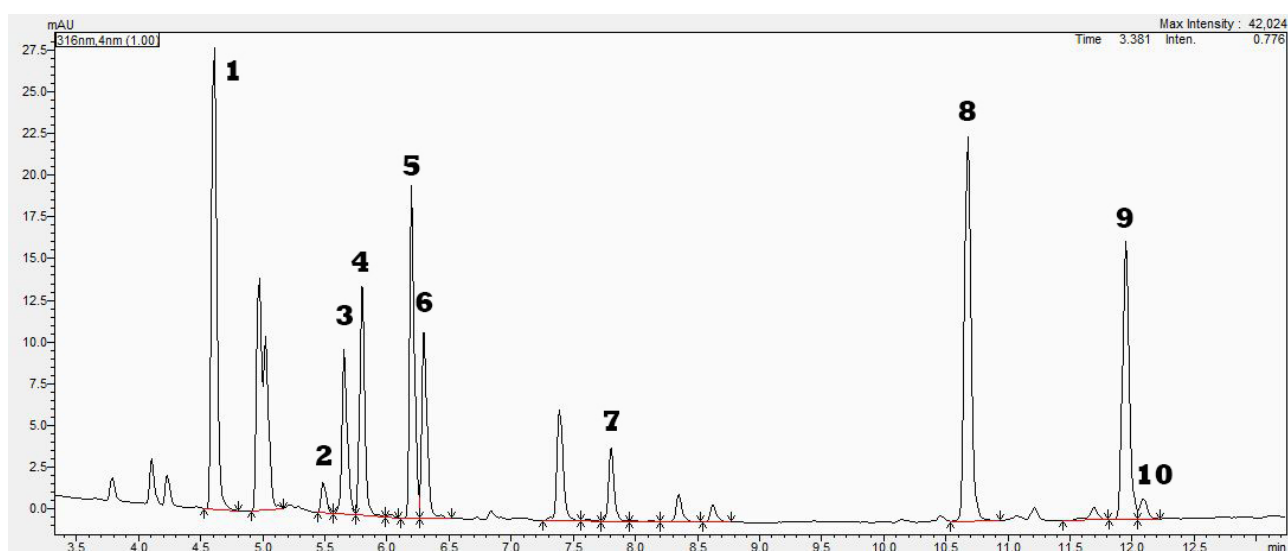


Figura 31 Profilo UV relativo all'assoluta di fiori di limone; (1) Erniarina, (2) Citroptene, (3) Bergaptene, (4) Eracleina, (5) Biakangelicolo, (6) Ossipeucedanina, (7) Fellopterina, (8) 8-Geranilossipsoralene, (9) Bergamottina, (10) 5-Geranilossipsoralene

7.8.2 Identificazione dei componenti

Per l'identificazione dei componenti sono state utilizzate miscele di standard, una per quanto riguarda i fiori di limone, una per i fiori di pompelmo, e una terza contenente esclusivamente bergaptene, bergamottina e cumarina, usata come standard interno. L'acquisizione dei dati al rivelatore UV-Vis è stata effettuata alla lunghezza d'onda di

316 nm, tipica delle cumarine. Inoltre, per avere un'ulteriore conferma, sono stati confrontati i pesi molecolari degli standard con quelli del campione ottenuti allo spettrometro di massa. Un primo tentativo di identificazione è stato effettuato, infatti, tramite lo spettrometro di massa: l'analisi in totali ion current (TIC) in modalità positiva ha permesso di fare dei tentativi di identificazione che successivamente sarebbero stati confermati tramite l'analisi di miscele di standard.

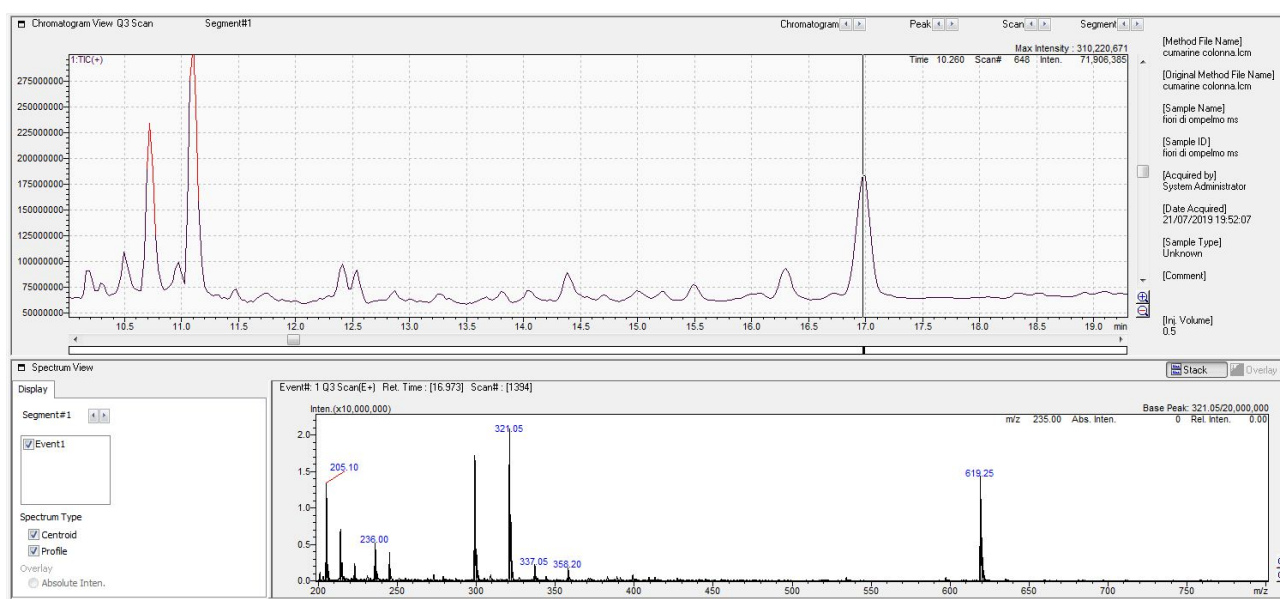


Figura 32 Spettro di massa ESI+ dell'auraptene identificato nell'assoluta di fiori di pompelmo

Dalla figura 32 è ad esempio possibile notare come, nel caso dell'auraptene, spesso oltre allo ione molecolare $[M+1]^+$ di massa 299 sia presente anche lo ione $[M+Na]^+$ di massa 321 e il dimero $[2M+Na]^+$ di massa 619. Finita la prima fase di identificazione tentativa, l'iniezione delle miscele di standard per i rispettivi tipi di campione ha portato nella maggior parte dei casi alla conferma delle identificazioni fatte in precedenza.

Due composti in particolare, bergaptene e bergamottina, presenti in tracce nell'assoluta di fiori di pompelmo, sono stati sottoposti a frammentazione MRM nella cella di collisione al fine di poter delucidare la loro struttura.

7.8.3 *Quantificazione dei componenti identificati*

Al fine di poter quantificare correttamente i componenti identificati, sono state effettuate tre calibrazioni diverse.

Una calibrazione è stata fatta usando un mix di standard caratteristici del pompelmo: sono state preparate 5 diluizioni in un range da 1 a 100 ppm, e sono state analizzate in triplicato in ordine crescente di concentrazione. Per questa calibrazione è stato utilizzato il detector UV-Vis poiché la presenza di questi composti era sufficiente per consentirne la corretta quantificazione. Gli standard usati sono stati i seguenti:

- Meranzina
- Isomeranzina
- Tangeritina
- Nobiletina
- Epossibergamottina
- Auraptene
- Epossiauraptene

Da una stock solution di 100 ppm sono state effettuate opportune diluizioni ottenendo le seguenti concentrazioni: 1 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm, 100 ppm.

Una calibrazione a parte è stata effettuata, mediante spettrometria di massa, per bergaptene e bergamottina per due principali motivi:

- la loro bassa concentrazione;
- la coeluzione di meranzina e bergaptene che rendeva impossibile la loro identificazione e quantificazione al rivelatore UV-Vis.

Al fine di essere maggiormente sicuri dell'identificazione e della quantificazione dei due composti è stato condotto uno studio di frammentazione dei due componenti mediante l'utilizzo della cella di collisione e del gas argon. Il software *LabSolution* consente di effettuare una frammentazione automatica dei composti una volta stabilita la massa dei precursori, ovvero dello ione molecolare del composto più abbondante. Il

programma effettua una serie di 7 iniezioni dei singoli componenti direttamente nello spettrometro di massa (rimuovendo preventivamente la colonna cromatografica). Dapprima vengono ottimizzati i parametri per avere una maggior intensità del precursore successivamente il sistema effettua uno screening dei frammenti ottenuti mediante la collisione del precursore con il gas argon nella cella di collisione; infine vengono selezionati due o più frammenti detti “figli” e ne vengono ottimizzate le condizioni per ottenere l’intensità più elevata.

Una volta effettuata l’ottimizzazione per bergaptene, bergamottina e per la cumarina, usata come standard interno, sono state preparate da tre stock solutions di questi tre componenti 4 mix a diversa concentrazione (0,1 ppm, 1ppm, 5ppm e 10 ppm) per bergaptene e bergamottina, mentre la concentrazione della cumarina è stata sempre di 1 ppm.

Per i componenti dell’assoluta di fiori di limone sono state eseguite le stesse operazioni, utilizzando esclusivamente il rivelatore UV-Vis per la quantificazione di tutti i componenti, anche di bergaptene e bergamottina. Questi ultimi, infatti, erano presenti in quantità maggiori e non presentavano coeluzioni. Gli standard utilizzati sono stati i seguenti:

- Erniarina
- Citroptene
- Bergaptene
- Eracleina
- Biakangelicolo
- Ossipeceudanina
- Fellopterina
- 8-Geranilossipsoralene
- Bergamottina
- 5-Geranilossi-7-metossicumarina

Anche in questo caso da una stock solution di 100 ppm sono state preparate 5 soluzioni iniettate in triplicato in ordine crescente di concentrazione da 1 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm, 100 ppm.

Le rette di calibrazione sono state costruite mediante il metodo dello standard esterno, dopo opportuna integrazione dei picchi cromatografici UV.

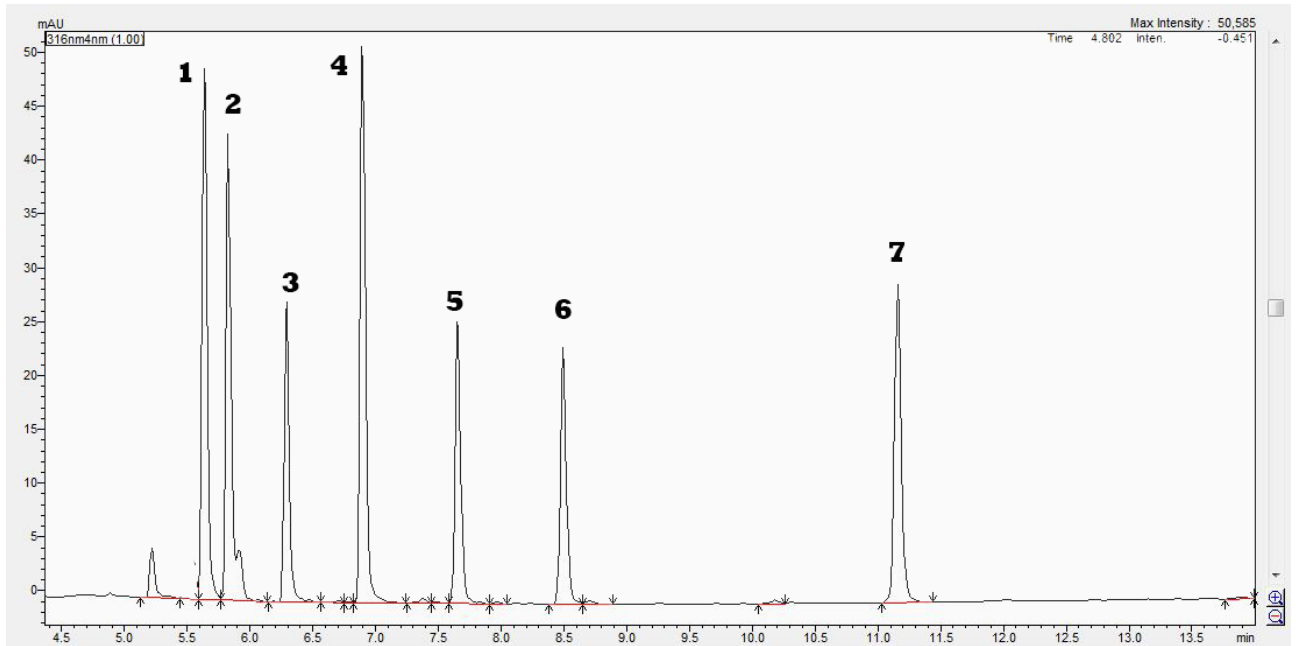


Figura 33 Separazione della miscela di standard caratteristici del pompelmo; (1) Meranzina; (2) Isomeranzina; (3) Nobiletina; (4) Tangeretina; (5) Epossiauraptene; (6) Epossibergamottina; (7) Auraptene

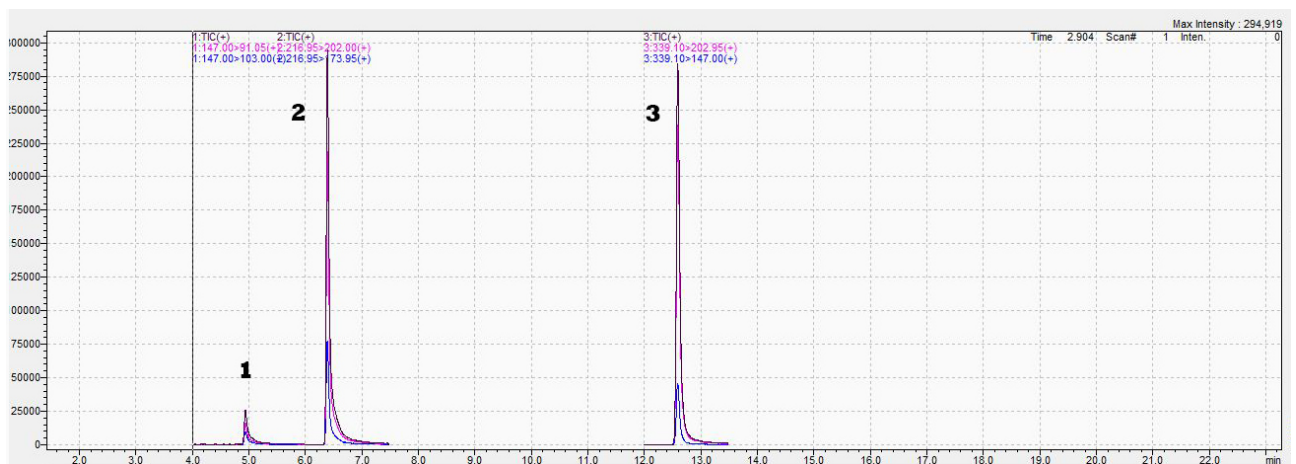


Figura 34 Cromatogrammi LC/MS del mix bergaptene/bergamottina in modalità MRM; (1) Cumarina I.S.; (2) Bergaptene; (3) Bergamottina

7.8.4 Validazione del metodo

La determinazione del limite di identificazione (LOD) e del limite di quantificazione (LOQ) è stata effettuata seguendo le linee guida EURACHEM [22]. A questo scopo dei campioni di terpene di limone e di terpene di pompelmo sono stati diluiti 200 volte in metanolo, addizionati alle miscele di standard per ottenere una concentrazione di 0,1 ppm ciascuno e sono stati iniettati 10 volte consecutivamente. Il valore di LOD è stato ottenuto moltiplicando lo scarto tipo s , ottenuto dalle varie misurazioni a bassa concentrazione, per 3,3; il valore di LOQ è stato ottenuto moltiplicando per 3 il valore di LOD. Per il bergaptene e la bergamottina, quantificati mediante spettrometria di massa, è stata seguita la medesima procedura variando solo la concentrazione di iniezione a 0,01 ppm.

7.8.5 Analisi dei campioni

Prima dell'analisi, i campioni sono stati diluiti 200 volte, sia in fase di ottimizzazione del metodo che nelle condizioni finali. Nonostante il fattore di diluizione possa apparire eccessivo, esso si è reso necessario in considerazione delle apparecchiature e dei dispositivi cromatografici utilizzati. Nella fattispecie, operare con colonne cromatografiche come quella utilizzata (core shell di dimensioni ridotte) e con lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo, richiede una maggiore accortezza al fine di evitare possibili intasamenti della colonna. Ciò comporterebbe un aumento della contropressione, ed accumulo di materiale ceroso su parti delicate dello spettrometro, che a loro volta possono causare interferenze nelle analisi successive o un calo di sensibilità, fino a casi di ostruzione di capillare e transfer line. I campioni opportunamente diluiti in metanolo per LC-MS sono stati agitati per 1 minuto fino a completa dissoluzione e filtrati con l'ausilio di filtri a siringa in PTFE, prima da 0,45 micron e, successivamente da 0,2 micron, al fine di allontanare le eventuali particelle in sospensione residue. Sia l'analisi dei campioni che quella degli standard sono state precedute da un'analisi in bianco effettuata con acqua distillata per HPLC-MS, al fine

di verificare la presenza di eventuali interferenti presenti nella colonna o di residui di analisi precedenti. Tutte le corse effettuate con il bianco ne sono risultate esenti. L'analisi dei campioni è stata effettuata in triplicato.

Capitolo 8

RISULTATI E DISCUSSIONE

8.1 Analisi della frazione volatile

L'analisi della frazione volatile delle due assolute di fiori di pompelmo e di limone ha mostrato una composizione assai complessa. I risultati ottenuti per l'assoluta di fiori di limone evidenziano una certa corrispondenza con la composizione tipica di un olio essenziale di limone; tuttavia, sono stati identificati e quantificati componenti non presenti in quest'ultimo e che caratterizzano notevolmente il profilo olfattivo dell'assoluta. Sebbene sia possibile notare come il contenuto di sabinene, limonene, β -pinene, citral e β -bisabolene risulti comparabile con i valori tipici di un olio essenziale di limone, altri come γ -terpinene, linalolo, (E)- β -ocimene ed (E)-cariofillene risultano nettamente diversi. Inoltre va evidenziata la presenza di componenti come indolo, metile antranilato, nerolidolo e farnesolo, non presenti nell'olio essenziale di limone. Di seguito sono riportati il profilo cromatografico ottenuto per l'assoluta di fiori di limone e la relativa tabella contenente i risultati in area percentuale.

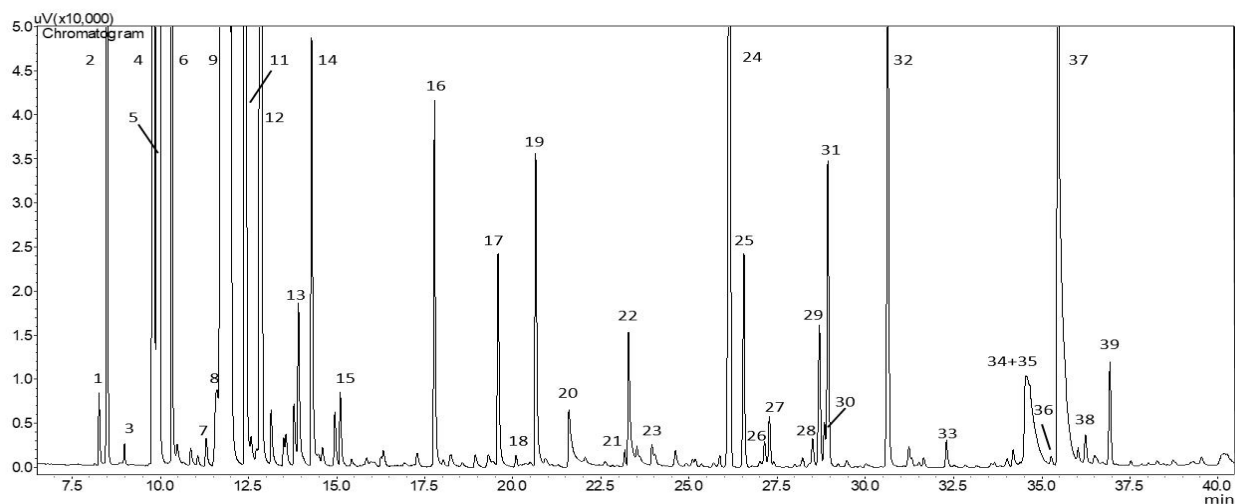


Figura 35 Profilo gas cromatografico dell'assoluta di fiori di limone

Tabella 11 Composizione della frazione volatile dell'assoluta di fiori di limone. RI_{lit} - indici di ritenzione di Van den Dool & Kratz estrapolati dalla letteratura e dai database delle librerie di massa utilizzate per l'identificazione; RI_{exp} - indici di ritenzione determinati su una colonna Zebron-5ms

N° Picco	Composti	RI_{lit}	RI_{exp}	Area %	SD
1	α -thujene	930	932	0,10	0,01
2	α -pinene	933	935	0,95	0,08
3	camphene	953	955	0,03	0,01
4	sabinene	972	972	1,83	0,08
5	β -pinene	978	980	12,17	0,12
6	myrcene	991	993	0,98	0,04
7	α -terpinene	1018	1019	0,06	0,01
8	p-cymene	1028	1028	0,23	0,03
9	limonene	1030	1033	59,35	0,23
10	(Z)- β -ocimene	1033	1035	0,11	0,02
11	(E)- β -ocimene	1039	1038	4,56	0,15
12	γ -terpinene	1059	1062	5,11	0,07
13	terpinolene	1089	1090	0,33	0,04
14	linalool	1101	1101	0,76	0,04
15	allo-ocimene	1131	1134	0,13	0,03
16	α -terpineol	1195	1199	0,70	0,04
17	neral	1238	1239	0,43	0,01
18	geraniol	1259	1260	0,03	0,01
19	geranial	1268	1268	0,61	0,03

20	indole	1290	1292	0,22	0,01
21	δ -elemene	1400	1405	0,03	0,01
22	Methyl anthranilate	1416	1418	0,31	0,04
23	Neryl acetate	1361	1363	0,05	0,01
24	(E)-caryophyllene	1417	1422	1,96	0,05
25	trans- α -bergamotene	1432	1433	0,41	0,03
26	(E)- β -farnesene	1454	1453	0,05	0,01
27	α -humulene	1452	1456	0,11	0,02
28	pentadecane	1500	1500	0,06	0,01
29	bicyclogermacrene	1493	1502	0,30	0,03
30	(E,E)- α -farnesene	1504	1506	0,08	0,02
31	β -bisabolene	1508	1512	0,61	0,04
32	(E)-nerolidol	1560	1561	1,09	0,06
33	germacrene-D-4-ol	1574	1576	0,06	0,01
34	2,3-dihydrofarnesol	1600	1602	0,37	0,04
35	α -bisabolol	1631	1633	0,49	0,05
36	(2E,6Z)-farnesal	1680	1681	0,03	0,01
37	(2E,6Z)-farnesol	1698	1700	2,30	0,08
38	α - hexylcinnamaldehyde	1746	1752	0,06	0,01
39	octyl octanoate	1781	1779	0,21	0,04
	Total			97,27	0,71

Dal confronto dei dati della tabella 11 con quelli della tabella 7 appare evidente come, sebbene alcuni componenti caratterizzanti come l'indolo ed il metile antranilato siano presenti, i dati ottenuti siano in sostanziale disaccordo con quelli riportati in letteratura [19]. Tuttavia i valori della tabella 7 sono stati ottenuti tramite microestrazione in fase solida (SPME), e non mediante un processo di estrazione con solvente, di conseguenza questo potrebbe essere il principale motivo di una così marcata differenza sui dati ottenuti.

Per quanto riguarda la composizione dell'assoluta di fiori di pompelmo, in questo caso il confronto con l'olio essenziale del corrispondente frutto mostra differenze più marcate rispetto all'assoluta di fiori di limone. Il profilo di questo olio essenziale non ricorda in nessun modo quello dell'olio essenziale di pompelmo. Ad esempio, il

contenuto di limonene risulta più che dimezzato, mentre si evidenzia un contenuto elevato di β -pinene, (E)- β -ocimene e linalolo. Interessante risulta anche la presenza di tracce di indolo, di una buona percentuale di metile antranilato, di (E)-cariofillene, di germacrene D, di (E)-nerolidolo e di (2E, 6Z)-farnesolo. Il profilo cromatografico e i dati ottenuti sono riportati nella figura e nella tabella sottostanti.

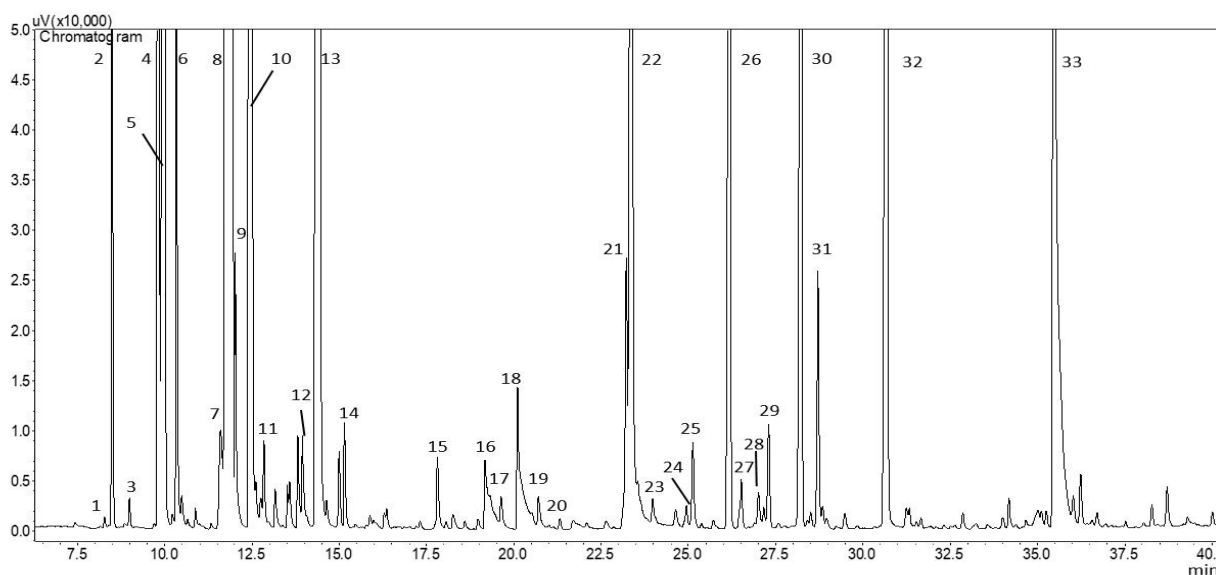


Figura 36 Profilo GC-FID dell'assoluta di fiori di pompelmo

Tabella 12 Composizione della frazione volatile di assoluta di fiori di pompelmo. RI_{lit} : Indici di Ritenzione di Van den Dool & Kratz estrapolati dalla letteratura e dai database di spettri di massa; RI_{exp} : Indici di Ritenzione determinati su una colonna Zebron-5ms.

N° Picco	Composto	RI_{lit}	RI_{exp}	Area %	SD
1	α -thujene	930	932	0,01	0,01
2	α -pinene	933	935	0,58	0,04
3	camphene	953	955	0,03	0,01
4	sabinene	972	972	1,58	0,10
5	β -pinene	978	980	11,75	0,11
6	myrcene	991	993	0,69	0,04
7	p-cymene	1028	1028	0,23	0,03
8	limonene	1030	1033	39,26	0,21
9	(Z)- β -ocimene	1033	1035	0,37	0,04
10	(E)- β -ocimene	1039	1038	11,25	0,20
11	γ -terpinene	1059	1062	0,14	0,02

12	terpinolene	1089	1090	0,18	0,03
13	linalool	1101	1101	10,85	0,25
14	allo-ocimene	1131	1134	0,14	0,03
15	α -terpineol	1195	1199	0,13	0,02
16	nerol	1225	1230	0,17	0,02
17	neral	1238	1239	0,07	0,02
18	geraniol	1259	1260	0,46	0,06
19	geranial	1268	1268	0,08	0,01
20	indole	1290	1292	0,04	0,01
21	δ -elemene	1400	1405	0,49	0,04
22	methyl anthranilate	1416	1418	3,63	0,13
23	neryl acetate	1361	1363	0,04	0,01
24	β -bourbonene	1381	1384	0,04	0,02
25	β -elemene	1390	1391	0,15	0,03
26	(E)-caryophyllene	1417	1422	2,27	0,08
27	trans- α -bergamotene	1432	1433	0,11	0,02
28	(E)- β -farnesene	1454	1453	0,07	0,02
29	α -humulene	1452	1456	0,17	0,04
30	germacrene D	1480	1479	2,94	0,07
31	bicyclogermacrene	1493	1502	0,44	0,05
32	(E)-nerolidol	1560	1561	3,64	0,08
33	(2E,6Z)-farnesol	1698	1700	3,99	0,10
	TOTAL			95,99	1,85

Anche in questo caso risulta evidente, dal confronto con i dati di Tabella 7, la notevole discrepanza con i dati di letteratura, soprattutto nelle percentuali di β -pinene, linalolo, limonene ed indolo.

Risulta di notevole interesse la comparazione dei dati ottenuti tra le due assolute. I profili GC sono abbastanza simili. Così come il loro odore ad una grossolana valutazione olfattiva. Spicca la similarità quantitativa di β -pinene, sabinene ed (E)-cariofillene. Si notano marcate differenze nel contenuto di linalolo e metile antranilato, che conferiscono un maggior carattere floreale all'assoluta di pompelmo, mentre la presenza di maggiori quantità di nerale, geraniale e di α -terpineolo possono giustificare il carattere olfattivo maggiormente citrico-esperidato dell'assoluta di limone, arricchita da una nota "animale" data dall'indolo.

L'analisi chirale è stata condotta sui componenti principali delle due assolute di limone e di pompelmo al fine di rivelarne la distribuzione enantiomerica. I risultati sono riepilogati nelle tabelle sottostanti.

Tabella 13 Distribuzione enantiomerica dell'assoluta di fiori di pompelmo

Componente	Rapporto enantiomerico	Eccesso enantiomerico
(+)- α -Pinene/(-)- α -Pinene	17,80/82,20	64,40 %
(+)- β -Pinene/(-)- β -Pinene	0,33/99,66	99,33 %
(+)-Sabinene/(-)-Sabinene	10,72/89,28	78,56 %
(-)-Limonene/(+)-Limonene	1,33/98,67	97,34 %
(+)-Linalolo/(-)-Linalolo	2,11/97,89	95,78 %

Tabella 14 Distribuzione enantiomerica dell'assoluta di fiori di limone

Componente	Rapporto enantiomerico	Eccesso enantiomerico
(+)- α -Pinene/(-)- α -Pinene	30,95/69,05	38,1 %
(+)- β -Pinene/(-)- β -Pinene	3,21/96,79	93,58 %
(-)-Sabinene/(+)-Sabinene	14,86/85,14	70,28 %
(-)-Limonene/(+)-Limonene	7,85/92,15	84,3 %
(+)-Linalolo/(-)-Linalolo	42,7/57,3	14,6 %
(+)- α -Terpineolo/(-)- α -Terpineolo	25,6/74,4	48,8 %

Dai dati riportati nelle due tabelle è possibile notare come nel caso dell'assoluta di fiori di limone la composizione enantiomerica sia sostanzialmente in accordo con i dati di letteratura riguardanti l'olio essenziale di limone.

Invece, nel caso dell'assoluta di fiori di pompelmo, i dati si discostano da quelli presenti in letteratura per l'olio essenziale di pompelmo cold pressed.

Ad eccezione del limonene, che mostra un rapporto enantiomerico sovrapponibile a quello dell'olio essenziale, tutti gli altri composti mostrano una distribuzione enantiomerica quasi opposta a quella dell'olio.

La tabella seguente rende facile un confronto fra i dati ottenuti e quelli presenti nella letteratura scientifica riguardanti l'olio essenziale di pompelmo.

Tabella 15 Confronto della distribuzione enantiomerica tra l'assoluta di fiori di pompelmo e i dati di letteratura riguardanti l'olio essenziale di Pompelmo) [3]

Componente	Assoluta di fiori di Pompelmo	Olio essenziale di Pompelmo cold pressed
(+)- α -Pinene/(-)- α -Pinene	17,80/82,20	(99,2-99,5)/(0,8-0,5)
(+)- β -Pinene/(-)- β -Pinene	0,33/99,66	(63,8-72,4)/(36,2-27,6)
(+)-Sabinene/(-)-Sabinene	10,72/89,28	(98,4-98,5)/(1,6-1,5)
(-)-Limonene/(+)-Limonene	1,33/98,67	(0,4-0,5)/(99,5-99,6)
(+)-Linalolo/(-)-Linalolo	2,11/97,89	(76,6-74,5)/(23,4-23,5)

8.2 *Analisi della frazione non volatile*

L'analisi della frazione non volatile delle due assolute ha mostrato una composizione in parziale accordo con quella riscontrata negli oli essenziali estratti a freddo dai frutti delle rispettive piante. Inoltre è da evidenziare come, in entrambe le assolute, non sia stato possibile identificare, nonostante l'utilizzo dello spettrometro di massa, tutti i picchi del cromatogramma UV-Vis. La mancata identificazione si deve a due fattori: l'indisponibilità di tutti gli standard necessari e la non corrispondenza degli spettri di

massa con i dati di letteratura riguardanti i pesi molecolari di cumarine, psoraleni e flavoni [23-25]. Inoltre, durante l'esecuzione delle analisi è stato notato, ad esempio nel caso dei fiori di pompelmo, che alcuni picchi presenti nel cromatogramma Uv-Vis erano totalmente assenti nel cromatogramma acquisito in TIC+ alla massa. Questo fenomeno può essere ragionevolmente spiegato ipotizzando che i componenti incogniti abbiano una struttura chimica nettamente diversa da cumarine e psoraleni, e che possano essere, ad esempio, di natura polifenolica.

Nell'assoluta di fiori di pompelmo il composto presente in maggior quantità è l'eossiauraptene, seguito dall'auraptene; in minor quantità, sono presenti meranzina, isomeranzina ed epossibergamottina. Presenti in piccola quantità anche bergaptene e bergamottina. Non sono stati invece identificati componenti tipici dell'olio essenziale di pompelmo come nobiletina, tangeretina ed ostolo. La tabella sottostante riporta i risultati ottenuti per l'assoluta di fiori di pompelmo comparata con un profilo tipico di olio essenziale di pompelmo riportato in letteratura [26]

Tabella 16 Risultati ottenuti per l'assoluta di fiori di pompelmo e comparazione con i dati di un olio essenziale di pompelmo cold pressed; Idnq = identificato ma non quantificato

Componente	Assoluta di fiori di Pompelmo	Olio essenziale di Pompelmo
Meranzina idrata	Idnq	85 +/- 4,5
Meranzina	994 +/- 3,1	6268 +/- 86,0
Isomeranzina	363 +/- 8,4	1387 +/- 9,2
Bergaptene	176 +/- 8,6	75 +/- 3,6
Nobiletina	-	81 +/- 5,0
Epossibergamottina idrata	Idnq	312 +/- 12,4
Tangeretina	-	154 +/- 9,5
Eossiauraptene	209770 +/- 300,1	4074 +/- 51,9
Ostolo	-	1179 +/- 16,2
Epossibergamottina	551 +/- 6,9	8098 +/- 87,5

Auraptene	3259 +/- 68,4	3356 +/- 41,1
Bergamottina	19,2 +/- 0,7	394 +/- 7,4

Al fine di correggere l'errore sulla quantificazione della meranzina, coeluita con il bergaptene, è stata calcolata la sua area relativa al cromatogramma UV-Vis utilizzando l'equazione della retta di calibrazione di questo componente effettuata per l'assoluta di fiori di limone (al rivelatore UV-Vis). L'area ottenuta è stata sottratta a quella integrata per la meranzina così da calcolarne la concentrazione.

L'analisi della frazione non volatile dell'assoluta di fiori di limone ha mostrato, come nel caso dei fiori di pompelmo, una certa differenza rispetto alla composizione non volatile del frutto della stessa pianta. Sono stati identificati e quantificati componenti di solito non presenti nell'olio essenziale di limone o presenti in piccole quantità [3], come ad esempio erniarina, bergaptene ed eracleina. Di contro è stata rivelata una modesta quantità di citroptene, uno dei componenti più abbondanti nell'essenza di limone. Anche in questo caso alcuni componenti non sono stati identificati per assenza dei relativi standard e mancata corrispondenza dello spettro di massa con i dati di letteratura.

La tabella 16 riporta il confronto dei dati ottenuti sull'assoluta di fiori di limone con quelli di un olio essenziale di limone estratto a freddo presi in letteratura [26].

Tabella 17 Composizione della frazione non volatile dell'assoluta di fiori di limone a confronto con quella di un olio essenziale di limone (dati di letteratura)

Componente	Assoluta di fiori di Limone	Olio essenziale di Limone
Erniarina	1015 ± 20,3	-
Citroptene	169 ± 2,1	726 ± 6,9
Bergaptene	506 ± 7,4	-
Eracleina	869 ± 15,2	-
Biakangelicolo	1242 ± 28,4	708 ± 5,2
Oxypeucedanina	687 ± 8,7	1372 ± 30

Isoimperatoina	-	33 ± 3,6
Imperatoina	-	34 ± 2,9
Fellopterina	110 ± 3,4	118 ± 5,6
5-isopentenilossi-7-MOC	-	151 ± 6,2
8-Geranilossipsoralene	2114 ± 55,4	806 ± 8,6
Bergamottina	2776 ± 65,5	2925 ± 12,3
5-geranilossi-8-MOC	99 ± 4,2	1754 ± 10,5

La procedura di calibrazione ha mostrato ottimi valori dei coefficienti di correlazione R^2 per tutti i composti esaminati, in media sempre superiori a 0,996. La procedura di validazione ha permesso di calcolare LOD e LOQ per tutti gli standard utilizzati. Nella tabella 12 sono riportati i dati ottenuti.

Tabella 18 Dati relativi alla validazione del metodo HPLC

Composto	R^2	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Erniarina	0,999	0,042	0,126
Citroptene	0,998	0,035	0,105
Meranzina	0,996	0,041	0,123
Bergaptene (UV)	0,997	0,028	0,084
Isomeranzina	0,999	0,043	0,129
Eracleina	0,996	0,040	0,120
Biakangelicolo	0,998	0,060	0,180
Ossipecudanina	0,998	0,070	0,210
Fellopterina	0,999	0,037	0,111
Epossiauraptene	0,999	0,040	0,12
Epossibergamottina	0,996	0,070	0,280
8-Geranilossipsoralene	0,999	0,091	0,273
Bergamottina (UV)	0,999	0,021	0,063

Auraptene	0,998	0,032	0,096
5-Geraniolossi-7-MOC	0,998	0,042	0,126
Bergaptene (MS/MS)	0,997	0,0031	0,0093
Bergamottina(MS/MS)	0,998	0,0023	0,0069

Capitolo 9

CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo la caratterizzazione di due assolute ricavate da fiori di limone e da fiori di pompelmo. La ricerca effettuata non si è tuttavia soffermata esclusivamente sull'indagine della composizione chimica, ma ha anche cercato di stabilire una metodologia di estrazione in grado di dare origine ad un prodotto con un profilo olfattivo molto simile a quello dei fiori di partenza. Ciò significa che lo studio effettuato non consiste in una mera elencazione di composti chimici, ma rappresenta una valida analisi del profilo olfattivo di queste materie prime. L'ottimizzazione del metodo estrattivo ha infatti permesso di ottenere due assolute con un'elevata corrispondenza olfattiva con i fiori di partenza, stabilendo esattamente rese e tempi di contatto.

La tecnica di analisi gas cromatografica unita all'utilizzo di un rivelatore FID ha permesso di quantificare con una buona accuratezza le componenti identificate nella frazione volatile delle due assolute; l'utilizzo come detector dello spettrometro di massa, attraverso il confronto degli spettri di massa dei componenti separati con quelli presenti in ben 4 librerie di massa con indici di ritenzione, ha consentito di identificare rispettivamente il 95,99% e il 97,27% delle frazioni di pompelmo e di limone.

Inoltre, per mezzo della tecnica MDGC "heart-cutting", è stata caratterizzata la distribuzione enantiomerica dei componenti principali delle due matrici, di per sé abbastanza complesse e di non facile risoluzione, utilizzando un'analisi chirale monodimensionale.

Mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata al detector UV-Vis e allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo, sono state identificate e quantificate efficacemente la maggior parte delle specie cumariniche e furocumariniche presenti nelle due assolute. L'utilizzo di una colonna con diametro

interno di 2,1 mm e con particelle di dimensioni di 1,8 micrometri ha permesso di ottenere una buona risoluzione dei picchi e di accorciare i tempi di analisi rispetto all'utilizzo di colonne tradizionali con diametro interno da 4,6 mm. Grazie allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo si è riusciti ad identificare e quantificare molecole presenti in piccola quantità, e di risolvere coppie critiche coeluite come nel caso del bergaptene e della meranzina nell'assoluta. Questo è stato possibile tramite l'analisi in modalità MRM utilizzando come standard interno la cumarina.

In generale, i dati ottenuti dall'analisi della frazione volatile e di quella non volatile delle due assolute mettono in luce l'unicità della composizione chimica di questi prodotti e, nel caso della frazione volatile, la novità delle informazioni prodotte da questo lavoro di tesi. I pochi dati recuperati dalla letteratura non corrispondono infatti a quelli presentati in questa sede.

L'analisi della frazione non volatile, sebbene riferita esclusivamente alla costituente delle cumarine e furocumarine, costituisce al momento attuale l'unica fonte di dati scientifici su queste matrici.

L'analisi chirale ha messo in evidenza come la distribuzione enantiomerica di questi due prodotti sia a volte in disaccordo rispetto a quella riportata in letteratura per gli oli essenziali. Anche in questo caso i dati prodotti risultano preziosi.

I risultati ottenuti da questo lavoro di tesi mostrano come le assolute di fiori di pompelmo e di limone siano delle materie prime interessanti, sotto il profilo chimico-cromatografico, per l'utilizzo nel campo della profumeria a diversi livelli. Esse infatti presentano i componenti tipici degli agrumi, ma con la presenza di composti chimici dall'odore spiccatamente floreale, inusuali nelle ordinarie fragranze esperidate. C'è da dire che, al pari dell'essenza di neroli, anche in questo caso gli ipotetici costi di produzione sarebbero molto alti. Tuttavia l'impiego nel settore dell'alta profumeria potrebbe giustificare i costi di produzione. La caratterizzazione effettuata sulla frazione non volatile rappresenta un valido supporto per la valutazione della dose massima di impiego nelle composizioni, in accordo con le normative vigenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Di Giacomo, A. e Mincione, B. (1994) *Gli oli Essenziali Agrumari in Italia* – Laruffa Editore, Reggio Calabria.
2. Calabrese, F. (2002) Origin and history. In:G.Dugo e A Di Giacomo (eds), Citrus. The genus citrus, Cap. 1, Thaylor and Francis Books Ltd, Londra.
3. Dugo G., Mondello L., Citrus Oils, composition, advanced analytical techniques, contaminants and biological activities; Taylor and Francis Group
4. Guy Robert (2003), I Sensi e l'Essenza del Profumo, Le Materie Prime Naturali; Franco Angeli Editore
5. Reid, R. C., Prausnitz, J. M., and Poling, B. E.: The Properties of Gases and Liquids, McGraw-Hill, Inc., New York, 1987.
6. C. F. Poole, The essence of chromatography, Elsevier, Amsterdam, 2003.
7. H. M. McNair and J. M. Miller, Basic Gas Chromatography, Wiley & Sons, New York, (1998).
8. T.A. Berger, Chromatographia 42 (1996) 63.
9. J. Dallüge, J. Beens, U.A.T. Brinkman, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 69.
10. Dugo G., Mondello L., Citrus Oils, composition, advanced analytical techniques, contaminants and biological activities; Taylor and Francis Group.
11. Mosandl et al., 1990; Hener et al., 1990a,b; Kreis et al., 1991; Mosandl, 1995.

12. Nordby H E, McDonald R E 1991 Relationship of epicuticular wax composition of grapefruit to chilling injury. *J Agric Food Chem* 39 957-962.
13. J. Wang, H. Hao, R. Liu, Q. Ma, J. Xu, F. Chen, Y. Cheng, X. Deng, Comparative analysis of surface wax in mature fruits between Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis*) from the perspective of crystal morphology, chemical composition and key gene expression, *Food Chem.* 153 (2014) 177–185.
14. Lanuzza F., Micali G., Currò P. Calabrò G.; On-line HPLC-HRGC Coupling in the Study of Citrus Oils: Sesquiterpene and Paraffin Hydrocarbons; *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL*, VOL. 6,29-37 (1991).
15. Di Giacomo, A. (1970) I Carotenoidi negli Agrumi. Stazione sperimentale per l'industria delle essenze e dei derivati agrumari, Reggio Calabria.
16. Brown, S.A. e Zobel, A.M. (1990) Biosynthesis and distribution of coumarins in the plant. Atti del congresso Cumarine: ricerca ed applicazioni, Padova, 20-22 Settembre.
17. Azam M., Song M., Fan F., Zhang B., Xu Y., Xu C. (2013) Chen K.; Comparative Analysis of Flower Volatiles from Nine Citrus at Three Blooming Stages; *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 22346-22367; doi:10.3390/ijms141122346
- 18.1 Mun-Wai Cheong , Xiu-Qing Loke , Shao-Quan Liu , Kiki Pramudya , Philip Curran & Bin Yu (2011). Characterization of Volatile Compounds and Aroma Profiles of Malaysian Pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) Blossom and Peel, *Journal of Essential Oil Research*, 23:2, 34-44.

19. Azam M., Song M., Fan F., Zhang B., Xu Y., Xu C. (2013) Chen K.; Comparative Analysis of Flower Volatiles from Nine Citrus at Three Blooming Stages; *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 22346-22367; doi:10.3390/ijms141122346.
20. Adams RP (2007) In: Allured Publishing Corporation (ed) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
21. Mondello L (2011) FFNSC 2: Flavour and Fragrances of Natural and Synthetic compounds, mass spectral database. Wiley, Hoboken.
22. The fitness for purpose of Analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. EURACHEM guide, Prague (1998).
23. Richard Hiserodt* and Li Chen. An LC/MS/MS Method for the Analysis of Furocoumarins in Citrus Oil, International Flavors & Fragrances Inc., 1515 State Highway 36, Union Beach, NJ 07735.
24. Hwang Eui Cho , Su Youn Ahn , Sun Cheun Kim , Mi Hee Woo , Jin-Tae Hong & Dong Cheul Moon PhD & Professor (2014) Determination of Flavonoid Glycosides, Polymethoxyflavones, and Coumarins in Herbal Drugs of Citrus and Poncirus Fruits by High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Letters*, 47:8, 1299-1323, DOI: 10.1080/00032719.2013.871548.
25. Hai-Fang Chena, Wu-Gang Zhangb, Jin-Bin Yuana, Yan-Gang Li a, Shi-Lin Yangb, Wu-Liang Yanga,* Simultaneous quantification of polymethoxylated flavones and coumarins in *Fructus aurantii* and *Fructus aurantii immaturus* using

HPLC–ESI-MS/MS; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 59
(2012) 90– 95

26. Marina Russo , Germana Torre , Caterina Carnovale , Ivana Bonaccorsi , Luigi Mondello & Paola Dugo (2012) A new HPLC method developed for the analysis of oxygen heterocyclic compounds in Citrus essential oils, Journal of Essential Oil Research, 24:2, 119-129, DOI: 10.1080/10412905.2012.659523.

27. Mosandl, A., and V. Schubert, J. Essent. Oil Res. 2, 121–132, 1990.

28. Mondello, L., et al., J. High Resolut. Chromatogr. 22, 350–356, 1999