



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**EFFETTO DEL TRATTAMENTO TERMICO SUI
PRODOTTI DI OSSIDAZIONE DEL
COLESTEROLO NEL SALMONE (*SALMO SALAR*)**

**EFFECT OF THERMAL TREATMENT ON CHOLESTEROL OXIDATION PRODUCTS IN
SALMON (*SALMO SALAR*)**

Studente:
EDOARDO TITTI

Relatore:
PROF. DEBORAH PACETTI

Correlatore:
PROF. GIUSEPPE NATALE FREGA

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

Sommario

1 Introduzione	3
1.1 Salmone	4
1.1.1 Consumo del salmone	5
1.1.2 Anatomia del salmone	6
1.1.3 Caratteristiche nutrizionali	7
1.1.4 Frazione lipidica	8
1.2 Colesterolo	9
1.2.1 Ruolo del colesterolo	9
1.3 Prodotti di ossidazione del colesterolo (COPS)	10
1.3.2 Termo ossidazione del colesterolo	11
1.3.3 Attività dei COPs sull'organismo	12
1.3.4 COPs come biomarcatori di malattie croniche	12
1.4 Trattamento termico	12
1.4.1 Cottura in forno ventilato	13
1.4.2 Cottura a vapore	13
1.4.3 Forno combi	13
1.4.4 <i>Sous vide</i>	14
2 Scopo della tesi	18
3 Materiali e metodi	19
3.1 Standard e reagenti	19
3.2 Campionamento	19
3.3 Trattamenti di cottura	19
3.4 Estrazione lipidica	20
3.4.1 Prove di super ossidazione	20
3.5 Determinazione di colesterolo e COP	20
3.6 Analisi GC-MS	21
3.7 Analisi statistica	21
4 Risultati e discussione	22
4.1 Identificazione GC-MS	22
4.2 Prove preliminari di super ossidazione	22
4.3 Effetto del trattamento termico sul grasso	27
4.4 Effetto del trattamento termico sul colesterolo	27
4.5 Effetto del trattamento termico sui COPs	29
Conclusioni	31
Bibliografia	32

Tabella 1. Valori nutrizionali Salmo salar per porzione (100 g) (USDA National Nutrient Database for Standard Reference). IU (Unità Internazionale) è un'unità di misura della quantità di una sostanza, basata sul suo effetto ovvero sulla sua attività biologica.	7
Tabella 2. Descrizione dei trattamenti termici applicati al salmone crudo utilizzando il forno	20
Tabella 3. <i>Contenuto di colesterolo espresso in mg/kg di olio su campione di salmone fresco e congelato e relativa % di diminuzione di colesterolo</i>	26
Tabella 4. Quantità di COPs nel salmone crudo fresco e super ossidato e nel campione di salmone crudo congelato e super ossidato e % COPs/ colesterolo	26
Tabella 5. <i>% di grasso e % di acqua determinati nei campioni di salmone sottoposto a cottura presenti nei 2 campionamenti</i>	27
Tabella 6. <i>Contenuto di colesterolo espresso in mg/kg olio in funzione al tipo di cottura adottata. I dati sono espressi come media di 2 repliche ± deviazione standard. L'Anova è stata condotta per campionamento (P < 0.05).</i>	28
Tabella 7. <i>Contenuto 7K espresso in mg/kg olio</i>	30

Figura 1. Ciclo vitale <i>Salmo salar</i>	4
Figura 2. Principali paesi produttori (FAO, 2006)	6
Figura 3. <i>Salmo salar</i>	7
Figura 4. Struttura chimica del colesterolo. In giallo la porzione idrofobica, con i quattro anelli aromatici, ed in rosa il gruppo ossidrilico polare.....	9
Figura 5. Strutture derivanti dall'ossidazione lipidica subita dal colesterolo.....	10
Figura 6. Posizioni nella molecola del colesterolo suscettibili all'ossidazione (Source: Smith 1987).	11
Figura 7. Modello che rappresenta il trasporto di calore e di massa durante la cottura del merluzzo in un forno a convezione. (Blikra et al., 2019).....	13
Figura 8. Forno electrolux.....	15
Figura 9. Formule strutturali dei COPs presenti negli alimenti	16
Figura 10. Preparazione del salmone e sfillettatura	19
Figura 11. Picchi COPs identificati nel salmone.....	22
Figura 12. Spettri di frammentazione TIC (Total Ion Current).....	23
Figura 13. Spettri di frammentazione TIC (total ion current).....	24
Figura 14. Contenuto di colesterolo nel primo campionamento in relazione alle cotture effettuate.....	28
Figura 15. Contenuto di colesterolo nel secondo campionamento in relazione alle cotture effettuate.....	29

Riassunto

Il salmone, *Salmo salar*, è un pesce ricco in componenti lipidiche tra cui il colesterolo. Il consumo di salmone richiede dei processi di cottura, che potrebbero influenzare il contenuto in colesterolo. Il colesterolo può andare incontro a ossidazione quando subisce trattamenti termici durante la cottura, formando ossisteroli detti COPs. I COPs sono potenzialmente citotossici, mutagenici, cancerogeni e aterogenici.

In vista di questo, il presente studio ha lo scopo di valutare gli effetti della termo ossidazione in termini di COPs nel salmone. Il salmone è una matrice alimentare, dove la formazione di ossisteroli dipende dalla composizione chimica. Il salmone risulta essere ricco in antiossidanti come tocoferoli e astaxantina, e ricco in gli acidi grassi polinsaturi. Sono state effettuate differenti cotture: forno a convezione (TR) a 180°, forno a vapore (FS) mediante iniezione di vapore e i filetti sono stati cotti a 65° e 90°, forno *sous vide* (SV) dove il filetto è stato confezionato sottovuoto e successivamente cotto anch'esso a 65° e 90° e forno combinato (CO) che combina convezione-vapore. Il tempo medio di cottura è di circa 15-20 minuti. Successivamente è stata eseguita una estrazione lipidica. La determinazione dei COPs e colesterolo nel salmone prevede una saponificazione a freddo. In aggiunta nei COPs è stata eseguita una purificazione mediante SPE (estrazione in fase solida). Il colesterolo e COPs sono stati analizzati utilizzando la Gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS).

I dati ottenuti rivelano che il salmone fresco non contiene COPs, mentre l'ossidazione dell'olio di salmone fresco (privo di COPs) in forno ventilato a 180 °c per 3 ore ha sviluppato i seguenti COPs: 7a-HC, 7b-HC, 5,6b-CE, 5,6a-CE e 7 K, per un totale di 56.8 mg/kg olio (3% di COPs su colesterolo). Il trattamento termico condotto su filetti di salmone freschi (in forno ventilato TR, cottura a vapore FS, in forno combi CO, e sous vide SV) in nessun caso ha significativamente influenzato la % di grasso, % di acqua e colesterolo. Le cotture effettuate in laboratorio, non hanno avuto alcun effetto sull'ossidazione del colesterolo. L'unico COP identificato ma non quantificato è stato il 7K. Il trattamento termico con temperature inferiori a 120°, unito alla matrice del salmone ricca in carotenoidi (astaxantina), tocoferoli e acidi polinsaturi non promuovono la formazione dei COPs.

1 Introduzione

1.1 Salmone

Il salmone, *Salmo salar*, è un pesce tipico dei mari temperati del Nord Europa (Norvegia, Svezia) che fa parte della specie *anàdroma* (dal greco *anàdromos ana* = all'indietro e *dromos* = corsa). Il ciclo di vita del salmone prevede la riproduzione in acque di fiume, un periodo di sviluppo da uno a sei anni, migrazione in mare, fase di sviluppo fino alla maturità sessuale, e migrazione di ritorno nei fiumi per raggiungere i siti di riproduzione, come riportato in (Figura 1).

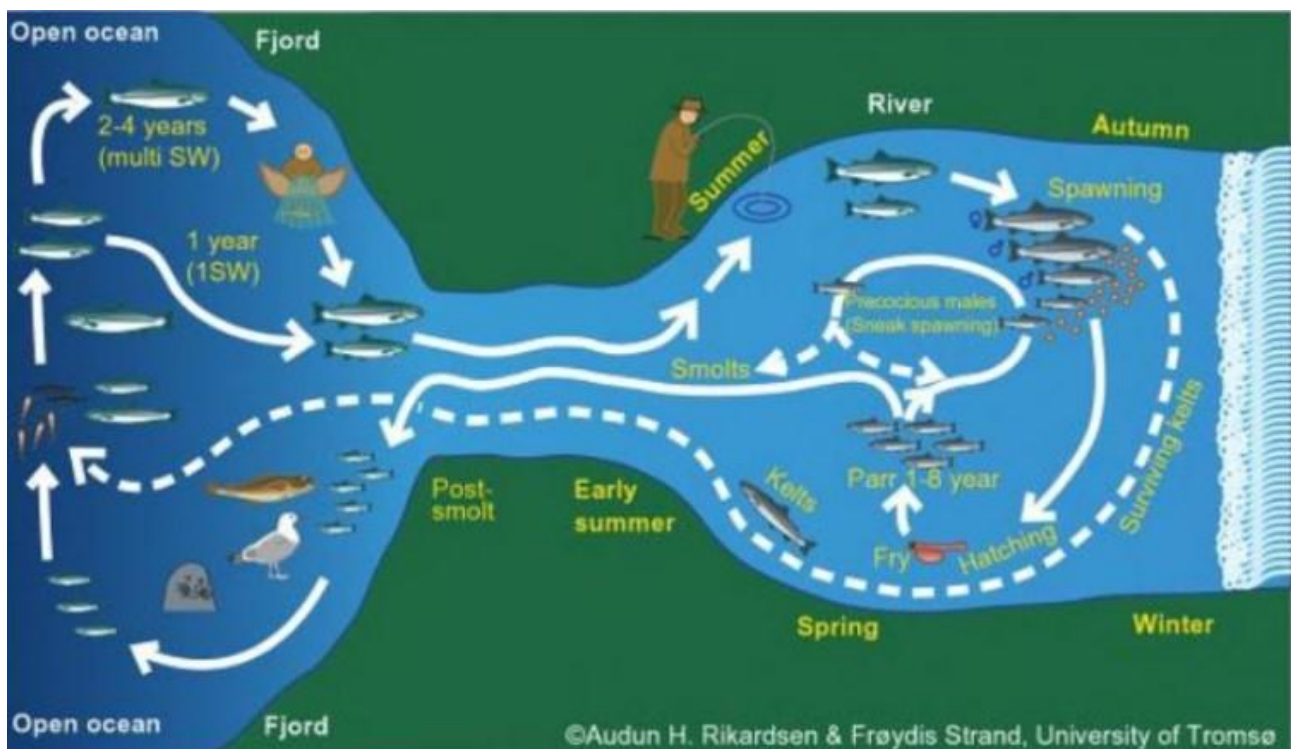


Figura 1. Ciclo vitale *Salmo salar*

I salmoni vengono definiti iteropari, ovvero si possono riprodurre più di una volta nella loro vita. Spesso vengono colpiti da malattie parassitarie dopo la risalita e in altri casi vengono predati. Per questo motivo non ci sono molti salmoni che si riproducono più volte. Gli esemplari femmina guidano il percorso dal fiume al mare con una disposizione a triangolo, generalmente di notte per evitare di essere predati. Non si conoscono molto bene le abitudini dei salmoni una volta giunti in mare. (Aas et al., 2010)

In fiume, i salmoni Atlantici depongono le uova, adesive che precipitano sul fondo, dove vengono nascoste tra i ciottoli o nella vegetazione. L'uovo fecondato comincia ad assorbire acqua; lo strato esterno si indurisce e successivamente comincerà il processo di sviluppo dell'embrione. Il periodo della rottura del guscio varia da 4/5 fino alle 20/21 settimane e dipende prettamente dalla temperatura dell'acqua. Alla nascita gli avannotti sono lunghi circa 15 – 25 mm.

In mare, i salmoni adulti si cibano di una grande varietà di organismi, la principale componente dell'alimentazione è rappresentata da crostacei planctonici e, in misura leggermente minore, da anfipodi e

decapodi. Gli esemplari di taglia maggiore predano anche molluschi, tunicati e pesci. Durante la migrazione riproduttiva i salmoni cessano di alimentarsi. Il periodo migliore per la riproduzione del salmone si estende da ottobre fino a novembre con picco massimo a fine ottobre. Il salmone sceglie delle zone particolari per riprodursi, infatti predilige acque non molto profonde con presenza di ghiaia sui fondali, dopo la fecondazione, ricopre le uova con la ghiaia. Questa operazione viene ripetuta diverse volte e richiede un dispendio di energia molto prolungato, che in molti casi genera la morte di molti individui. I salmoni che superano questa fase si rifugiano in profondità per alcune settimane, fino al completo recupero delle forze prima di tornare in mare. Una piccola parte migra nelle acque dolci, per poi tornare nelle acque salate in primavera. In ciascuna stagione riproduttiva ogni femmina emette da 1.500 a 1.800 uova per ogni chilo di peso, di colore rossastro o giallo arancio e dal diametro di circa 6 mm. Le larve prodotte rimangono tra la ghiaia del nido fino al riassorbimento del sacco vitellino, per emergere come avannotti a maggio o giugno. Gli avannotti restano in acque basse, lungo le sponde ai lati della corrente principale, fino alla taglia di circa 65 mm; in questa fase sono denominati "parr" e crescono lentamente fino a raggiungere i 12 - 15 cm di lunghezza, taglia alla quale sono pronti per migrare in mare. A causa della natura iteropara del salmone atlantico, la migrazione verso il mare è costituita da giovani e adulti che differiscono per dimensioni, maturità, esperienza, motivazione e conseguenze dei movimenti migratori. Alcuni studi hanno studiato il ruolo dell'ontogenesi in rapporto ai modelli di movimento tra i salmoni dell'Atlantico, monitorati nelle stesse condizioni ambientali. La temperatura ha influenzato positivamente il movimento verso il mare, così come il grado di movimento diurno ([Friendland et al., 2009](#)).

1.1.1 Consumo del salmone

Attualmente la produzione mondiale di salmone atlantico d'allevamento supera 1 milione di tonnellate (**Figura 2**). Il salmone dell'Atlantico d'allevamento rappresenta oltre il 90% del mercato del salmone d'allevamento e oltre il 50% del mercato globale del salmone. I principali mercati del salmone dell'Atlantico d'allevamento sono il Giappone, l'Unione europea e il Nord America. I prodotti principali sono freschi (barre intere, filetti), congelati e affumicati (principalmente per il mercato europeo). La piccola ma crescente proporzione sono i prodotti trasformati, che forniscono prodotti a valore aggiunto al mercato.



Figura 2. Principali paesi produttori (FAO, 2006)

Negli ultimi 10-15 anni, a causa del rapido aumento della produzione di salmone, i prezzi sono rapidamente diminuiti. Ora, il fornitore in più rapida crescita è il Cile, quindi può competere efficacemente con i produttori tradizionali in mercati distanti.

I produttori nordici tradizionali continuano a spostare gran parte delle loro ricerche sull'allevamento del salmone, che si concentra sulla costruzione di economie di scala, riducendo i costi di produzione unitaria e proteggendo i margini di profitto.

I consumi di salmone sono aumentati consistentemente a livello globale, raggiungendo nel 2017 la quota export di 21 miliardi. È quanto rivela una ricerca di mercato realizzata dal Norwegian Seafood Council (2017), l'ente di promozione per i prodotti ittici norvegesi (FAO, 2006).

Gli italiani preferiscono da sempre il consumo di pesce fresco, che viene venduto per il 60% come naturale, affumicato o pronto. In questo scenario, i prodotti ittici norvegesi ricoprono per l'Italia un ruolo fondamentale: nei primi mesi del 2018 il Norwegian Seafood Council ha assistito a una crescita del 24% delle esportazioni di salmone norvegese verso il nostro Paese, dall'inizio dell'anno a maggio.

Anche il consumo di salmone, come quello delle altre specie, sta progressivamente aumentando in Italia (+8% nel 2017, fonte Europanel): la crescita ha riguardato tutte le tipologie di preparazione di questo prodotto. Il salmone affumicato è quello che ha registrato una lieve diminuzione in termini di volumi (-2%), nonostante l'aumento dei prezzi del 10%, a conferma di quanto continui ad essere apprezzato dal mercato italiano. Il salmone congelato ha avuto l'aumento percentuale più alto mentre quello fresco ha registrato l'incremento minore (+5%) tra le categorie di prodotto, rispetto agli scorsi anni (FAO, 2006).

1.1.2 Anatomia del salmone

A livello anatomico-strutturale, il salmone risulta essere slanciato, con la testa relativamente piccola rispetto alle dimensioni medie del corpo del pesce. Presenta 2 pinne dorsali, la prima partendo dalla testa si trova approssimativamente al centro del corpo del pesce, è più grande della seconda. La seconda pinna dorsale è una pinna adiposa con margine, trasparente o grigio. Il salmone presenta anche 2 pinne ventrali, la prima è posta all'altezza della prima pinna dorsale. Entrambe queste pinne sono più piccole delle dorsali. Il salmone

dell'Atlantico ha una bocca che raggiunge il bordo posteriore dell'occhio senza superarlo, presenta una dentatura articolata sulle mascelle, sugli intermascellari, sul palatino, sulla lingua e nell'esofago. Gli occhi sono più grandi nei piccoli esemplari e diventano sempre più piccoli man mano che la taglia aumenta (**Figura 3**).



Figura 3. Salmo salar

1.1.3 Caratteristiche nutrizionali

Questo pesce presenta delle ottime qualità nutrizionali essendo una buona fonte di proteine, vitamine (vitamina B6, vitamina B12, vitamina B1 o tiamina, vitamina B3 o niacina), sali minerali (fosforo, selenio) e acidi grassi omega-3. Rientra tra la categoria dei pesci grassi. Il fosforo è importante per la salute di ossa e denti, mentre il selenio permette il buon funzionamento degli antiossidanti cellulari. La vitamina B6 stimola le funzioni cerebrali e previene l'invecchiamento, la vitamina B12 svolge un ruolo prezioso nella produzione dei globuli rossi e nella formazione del midollo osseo. La niacina (o vitamina B3) favorisce la circolazione, protegge la pelle e favorisce la digestione degli alimenti. La tiamina infine (o vitamina B1) rilascia all'organismo l'energia indispensabile nella quotidianità. La **Tabella 1** mostra le relative quantità contenute espresse in grammi relative a 100 g di prodotto.

Tabella 1. Valori nutrizionali Salmo salar per porzione (100 g) (USDA National Nutrient Database for Standard Reference). IU (Unità Internazionale) è un'unità di misura della quantità di una sostanza, basata sul suo effetto ovvero sulla sua attività biologica.

Valore nutrizionale	Energia 208,8 Kcal
Grassi totali	13.42 g
Acidi grassi saturi	3.05 g
Carboidrati	0.0 g
Proteine	20.42 g
Colesterolo	55 mg
Sodio	59 mg
Potassio	363 mg
Calcio	9 mg

Ferro	0.3 mg
Magnesio	27 mg
Vitamina B6	0.6 mg
Vitamina B12	3.2 µg
Vitamina A	50 IU*
Vitamina C	3.9 mg

1.1.4 Frazione lipidica

I lipidi sono un gruppo di composti generalmente solubili in solventi organici ma poco solubili in acqua. A livello di classificazione ritroviamo delle categorie: acidi grassi, trigliceridi, fosfogliceridi, colesterolo.

Gli acidi grassi vengono definiti come a lunga catena (C_{16} - C_{18}) saturi o insaturi (senza o con doppi legami tra i carboni). Gli acidi grassi sono la fonte primaria (in termini quantitativi) di energia per il nostro organismo e sono presenti soprattutto sotto forma di trigliceridi, cioè esterificati (legati con legame estere) al glicerolo (un polialcol). Il corpo umano non è in grado di sintetizzare acidi grassi con doppi legami vicini al metile terminale (ω -3): questi acidi grassi insaturi sono detti "essenziali" e vanno assunti con la dieta. I più importanti sono l'oleico, tra i monoinsaturi, il linoleico e il linolenico. Gli studi dimostrano nel salmone crudo vi è un alto contenuto lipidico 17,23%. I principali acidi grassi identificati nel salmone crudo sono: acido miristico 3,37%, acido palmitico 10,07%, acido palmitoleico 3,94%, acido oleico 31,39%, acido linoleico 12,06%, acido linolenico 3,97%, acido eicosapentaenoico (EPA), 4,80%, e acido docosaesaenoico (DHA), 5,74%.

I saponi sono acidi grassi a lunga catena salificati con Na^+ . I saponi in acqua formano strutture sopramolecolari dette "micelle" (delle microscopiche gocce): le code apolari degli acidi grassi, che fuggono l'acqua, sono rivolte verso il centro della micella mentre la testa polare (il gruppo carbossilico dissociato - COO^-) è rivolto verso l'acqua perché è carico (interagisce con gli H parzialmente positivi dell'acqua). Quindi il centro della micella è apolare. Sostanza lipofila (grassi) tenderanno a "sciogliersi" dentro la micella.

I trigliceridi sono esteri del glicerolo con 3 acidi grassi, che si depositano nel nostro organismo, accumulandosi nel tessuto adiposo, dentro gli adipociti, e sono la principale forma di deposito di energia metabolica (120000 kcal totali contro le 1200 del glicogeno).

Il tessuto adiposo è localizzato nel sottocute e intorno agli organi interni. L'idrolisi dei trigliceridi ad acidi grassi e glicerolo è catalizzata dagli enzimi lipasi.

I trigliceridi non si sciolgono in acqua (non hanno alcuna parte polare nella molecola), ma viaggiano nel sangue ricoperti da un guscio proteico, sotto forma di chilomicroni e di particelle lipoproteiche (VLDL, LDL, HDL). I fosfogliceridi che vengono definiti esteri del glicerolo con 2 acidi grassi e una "testa polare" contenente fosfato (da cui il nome fosfogliceridi) e si trovano alcuni esempi come fosfoetanolmina, fosfo-serina, fosfoinositolo o fosfocolina. Insieme al colesterolo, sono i costituenti delle membrane cellulari. Formano strutture sopramolecolari chiamate doppi strati (non formano micelle) (Small.D.M.1986).

1.2 Colesterolo

Il colesterolo presenta 4 anelli ciclici condensati, che presentano una testa polare e una coda apolare. A livello strutturale il colesterolo è importante per le funzioni delle membrane cellulari. L'unica parte polare della molecola è l'OH: nei doppi strati delle membrane l'ossidrilico si orienta verso la fase acquosa (intra- o extra-cellulare) e il resto della molecola (che è planare) si infila in mezzo alle code degli acidi grassi (**Figura 4**). Il colesterolo impedisce l'impaccamento delle code degli acidi grassi e assicura fluidità alle membrane.

Il colesterolo è un alcol policiclico aromatico, quindi possiede un legame insaturo in posizione 5, suscettibile all'ossidazione. La formula bruta del colesterolo è C₂₇, H₄₆, O₁

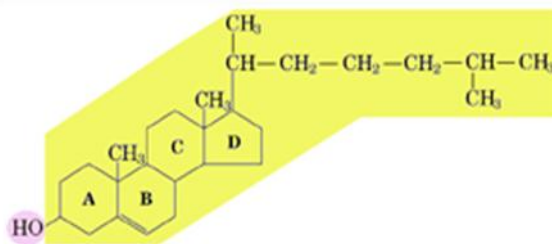


Figura 4. Struttura chimica del colesterolo. In giallo la porzione idrofobica, con i quattro anelli aromatici, ed in rosa il gruppo ossidrilico polare.

1.2.1 Ruolo del colesterolo

A livello strutturale il colesterolo è una componente essenziale di diverse strutture quali:

-costituente di membrane cellulari di tutte le cellule animali ma non vegetali, va a costituire l'unica specie lipidica che è in grado di possedere degli anelli rigidi sulla struttura. Circa l'85% del colesterolo libero cellulare si trova nella membrana plasmatica, dove si inserisce per >90% nel foglietto fosfolipidico interno (citoplasmatico) e per il 3÷5% in quello esterno, orientandosi con il gruppo -OH esposto alla superficie, in corrispondenza delle teste polari dei fosfolipidi. In tal modo esso diminuisce la fluidità della membrana, proprietà dalla quale dipendono importanti funzioni, ad esempio: permeabilità a piccole molecole idrosolubili; attività dei recettori e degli enzimi di membrana che generano messaggeri intracellulari; stabilità meccanica; formazione di vescicole per il trasporto del loro contenuto ai vari organuli intracellulari. Il colesterolo è anche presente nella struttura della guaina mielinica dei nervi.

-precursore degli acidi biliari, di vitamine e degli ormoni steroidei.

La biosintesi del colesterolo avviene a partire dall'acetil-CoA. Nel processo di biosintesi hanno successivamente luogo una serie di condensazioni che danno origine a catene isoprenoidi. Tra queste troviamo lo squalene, che nel processo di sintesi ciclizza formando lanosterolo, che è quindi convertito in colesterolo (Ge, L. 2016).

A livello cellulare la produzione del colesterolo dipende dalla concentrazione di isoprenoidi, lanosterolo, colesterolo e da alcuni ormoni, in primo luogo insulina e glucagone presenti all'interno della cellula. Se queste sostanze sono presenti in elevate concentrazioni si inibisce l'enzima HMG-CoA riduttasi, bloccando la

biosintesi di nuovo colesterolo. Il colesterolo in ambito medico è un parametro che viene costantemente monitorato nei pazienti. Il termine colesterolo, in medicina, è inteso come il livello di lipoproteine che circolano nel sangue in condizioni di digiuno. La relativa concentrazione viene detta Colesterolemia.

1.3 Prodotti di ossidazione del colesterolo (COPS)

Gli ossisteroli o COPS, sono prodotti di ossidazione del colesterolo. Questi condividono ma contengono un addizionale gruppo idrossi, chetone o epossido nel nucleo sterolico e/o un gruppo idrossile nella catena laterale delle loro molecole (Brown and Jessup, 2009). Si generano per via non enzimatica in seguito al processo di ossidazione dei lipidi nelle membrane biologiche, nelle lipoproteine o per via enzimatica, durante il catabolismo del colesterolo. In generale, gli ossisteroli biologici rientrano in due principali categorie: quelli ossigenati nell'anello sterolico, principalmente in posizione 7 (es.: $7\alpha/\beta$ -idroperossicolesterolo, 7-chetocolesterolo e $7\alpha/\beta$ -idrossicolesterolo) e quelli ossigenati nella catena laterale (es.: 24-idrossicolesterolo, 25-idrossicolesterolo e 27-idrossicolesterolo). Generalmente, gli steroli ossigenati nell'anello tendono a essere formati per via non enzimatica, mentre gli steroli ossigenati nella catena laterale solitamente hanno un'origine enzimatica. In (Figura 5) sono rappresentate le diverse strutture derivanti dall'ossidazione lipidica subita dal colesterolo.

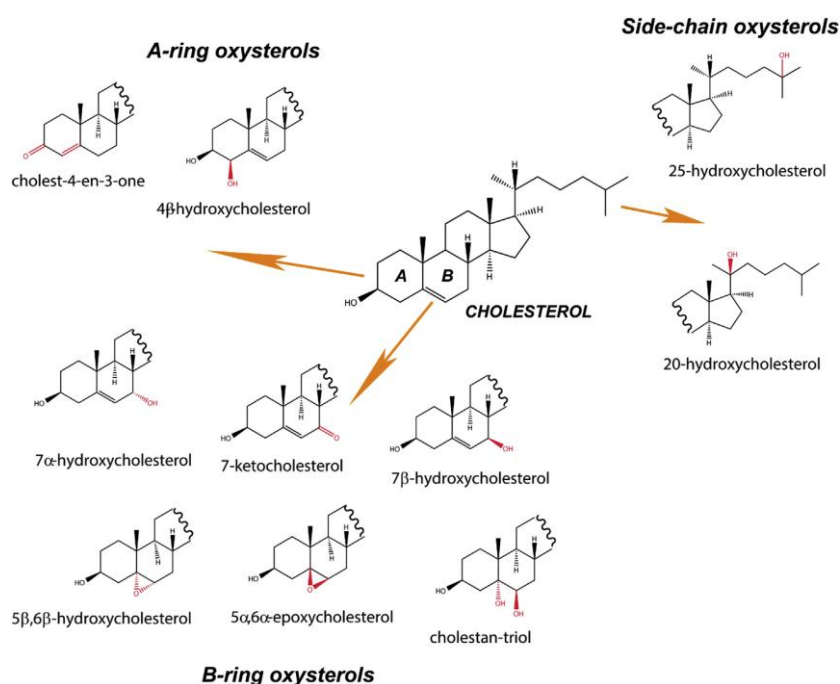


Figura 5. Strutture derivanti dall'ossidazione lipidica subita dal colesterolo

La presenza di un doppio legame rende il colesterolo suscettibile all'attacco radicalico, come descritto in (Figura 6), e determina l'estrazione di un atomo di idrogeno con conseguente formazione di un sito radicalico

sul carbonio 7, che reagisce successivamente con l'ossigeno molecolare, producendo un radicale perossilico. Questo radicale conserva la capacità di estrarre un ulteriore atomo di idrogeno da una molecola lipidica, generando il 7 α -idroperossicolesisterolo che, per successiva epimerizzazione, si trasforma in 7 β -idroperossicolesisterolo, isomero con una conformazione più stabile che si forma in modo predominante. I due idroperossidi sono prodotti instabili e vengono rapidamente ridotti nei corrispondenti idrossi derivati: 7 α -idrossicolesisterolo e 7 β -idrossicolesisterolo o disidratati con formazione di un oxo-derivato, il 7-chetocolesisterolo. L'ossidazione può anche continuare enzimaticamente e, in questo caso, vengono ridotti a epossicolesisteroli (Otaegui-Arrazola et al., 2010).

Gli ossisteroli, oltre ad essere generati endogenamente con reazioni chimico enzimatiche specifiche possono derivare dalla dieta (Biasi et al., 2013), in quanto sono presenti in diversi alimenti, in particolare alimenti ricchi in grasso. Generalmente, i prodotti contenenti colesisterolo sono suscettibili all'ossidazione. Non solo la lavorazione ma anche la conservazione per lunghi periodi non sottovuoto aumenta marcatamente la formazione di ossisteroli.

Gli ossisteroli più comunemente rilevati negli alimenti trasformati sono gli steroli 7-ossigenati (7-chetocolesisterolo, 7 α -idrossicolesisterolo, 7 β -idrossicolesisterolo) e gli steroli 5,6-ossigenati (5 α ,6 α -eossicolesisterolo, 5 β ,6 β -eossicolesisterolo, colestano-3 β ,5 α ,6 β -triolo), nonché il 25-idrossicolesisterolo, il 19-idrossicolesisterolo, il 20 α -idrossicolesisterolo, il 3 β -idrossi-5 α -colestano-6-one e il 3 β ,5 α -diidrossicolestano-6-one, che sono presenti in quantità minori (Guardiola et al., 2002). Il calore, il pH, la luce, l'ossigeno, l'attività dell'acqua e la presenza di acidi grassi insaturi sono i fattori che influenzano la formazione di COPs durante la lavorazione.

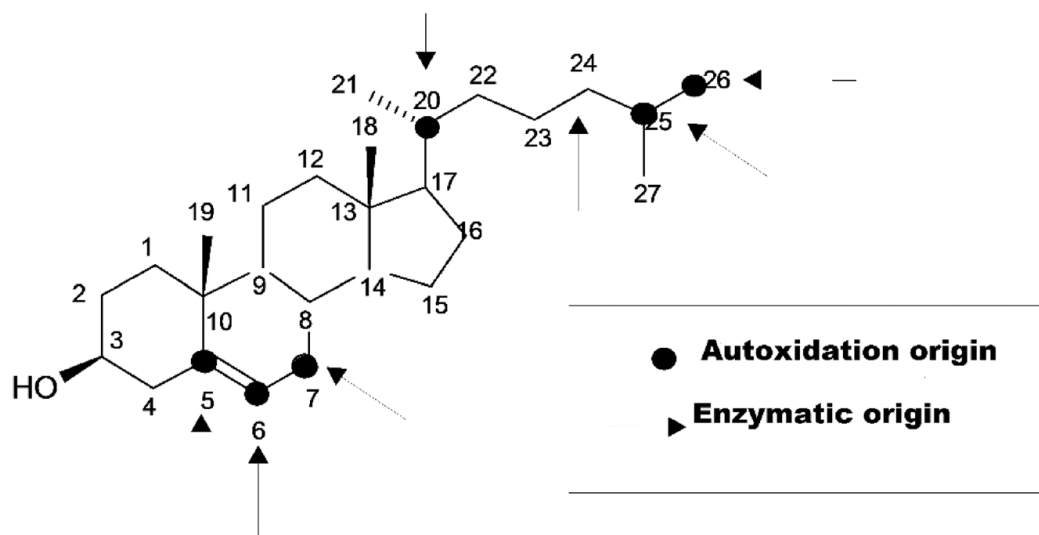


Figura 6. Posizioni nella molecola del colesisterolo suscettibili all'ossidazione (Source: Smith 1987).

1.3.2 Termo ossidazione del colesisterolo

Nel processo di termo ossidazione, i composti predominanti sono quelli derivati dall'ossidazione del carbonio C-7, sebbene il percorso di epossidazione comprende la formazione di 5,6 epossidi. Si formano i 7 α - e 7 β -idroperossidi simultaneamente, ma il 7 β -idroperossido è predominante in quanto termodinamicamente più

stabile. Quindi sono ridotti ai loro corrispondenti alcoli (7α - e 7β -idrossicololo) e 7-chetocolesterolo. Quest'ultimo composto può essere termicamente degradato a cholesta-3,5-dien-7-one. Inoltre, il colesterolo può degradare e originare altri prodotti come la corta catena di idrocarburi, aldeidi, chetoni o alcoli. Le vie della termo-ossidazione del colesterolo sono mostrate nella **(Figura 6)** (Dantas et al 2015).

1.3.3 Attività dei COPs sull'organismo

Negli ultimi decenni, sono emerse prove crescenti sul ruolo dei COPs nelle attività biologiche e patologiche sia in vitro che in vivo, con potenziali problemi di salute per l'uomo. Numerosi studi hanno dimostrato che i COPs possono esercitare effetti proinfiammatori, pro-ossidante, pro-fibrogenico, pro-apoptotico. I COPs hanno mostrato citotossicità, mutagenicità, cancerogenicità, Alzheimer, morbo di Parkinson e cancro al seno. L'approvato ruolo dei COPs nelle patologie umane, diffuse ed emergenti, ha fatto nascere la necessità di informazioni più accurate e sistematiche sull'assunzione con la dieta dei COPs in popolazioni target (es. neonati, persone anziane, ecc.) (Pereira et al., 2018).

Statisticamente il 45% degli americani ha sofferto di alcuni tipi di malattie croniche secondo l'Agenzia per Healthcare Research and Quality (AHRQ, 2014), risultando quindi i problemi sanitari più diffusi negli Stati Uniti (AA.VV, 2015; NIH, 2017).

L'ipercolesterolemia non può solo provocare problemi cardiovascolari, ictus e malattie associate ad esse ma elevate quantità di colesterolo nel corpo aumentano anche le quantità di COPs nel corpo. Diversi studi hanno dimostrato che alcuni COPs influiscono negativamente sulla funzione di alcuni importanti organi come cervello, occhi, cuore e vasi (Gargiulo et al., 2016).

1.3.4 COPs come biomarcatori di malattie croniche

E' stato dimostrato che i COPs possono influire negativamente sulla funzione di alcuni organi principali. Alcuni esempi citati da Lee et al hanno suggerito che l'apparente associazione di particolari COPs con persone più soggette a malattie croniche, potrebbe essere utile, al fine di utilizzare i COPs come biomarcatori per le malattie stesse. Citando alcuni esempi come la presenza di 7β -OH con il rischio di cancro al polmone. In individui che soffrono di sclerosi multipla elevate concentrazioni di 7-cheto sono state rilevate nel liquido cerebrospinale. Altri COPs derivati dall'autoossidazione del colesterolo (7α -OH, 7β -OH e 25-OH) sono presenti anche nel sistema nervoso centrale, dove possono causare danni alla mielina. (Pereira et al., 2018)

1.4 Trattamento termico

I pesci di solito non vengono consumati crudi, ma sono soggetti a differenze forme di trattamento termico. I diversi metodi di riscaldamento sono fattori chiave nel processo di ossidazione del colesterolo. Maggiori quantità di COPs si formano quando il cibo è sottoposto alla diretta azione del calore. Il salmone può richiedere un trattamento termico prima del consumo. Tecniche di cottura tradizionali o più innovative possono essere utilizzate nella sua preparazione, tra cui cottura in forno ventilato, cottura a vapore, cottura combi oppure *sous vide*, che ad oggi possono essere eseguite utilizzando moderni forni (Dantas et al., 2015)

1.4.1 Cottura in forno ventilato

La cottura in forno ventilato è una tecnica tradizionale che sfrutta principalmente convezione dell'aria calda per cuocere l'alimento. Il meccanismo viene descritto in **(Figura 7)**.

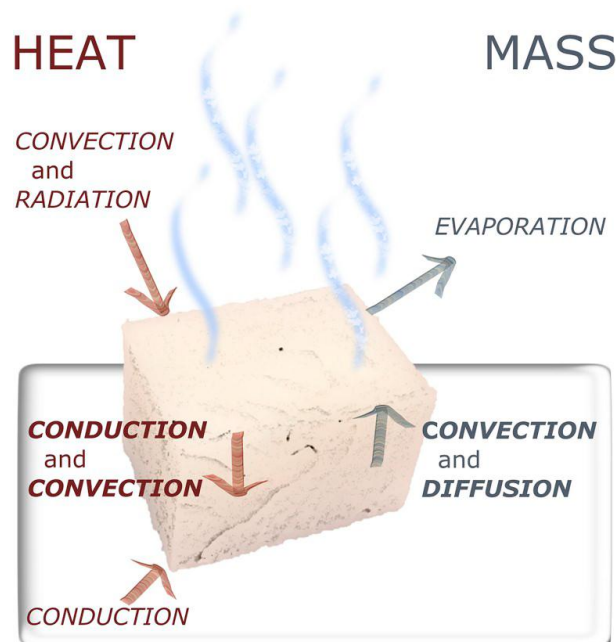


Figura 7. Modello che rappresenta il trasporto di calore e di massa durante la cottura del merluzzo in un forno a convezione. (Blikra et al., 2019)

1.4.2 Cottura a vapore

La cottura a vapore è un metodo di cottura che utilizza vapore generato continuamente dall'acqua bollente. Permette di ridurre il consumo di acqua anziché l'ebollizione. Inoltre, come hanno dimostrato Soares et al. (2017), la cottura a vapore è il processo più efficiente per conservare i composti salutari negli alimenti e nel pesce, poiché comporta minori perdite di composti volatili e mantiene l'integrità dell'alimento preservando le caratteristiche organolettiche. La cottura a vapore è una delle tecniche culinarie più innovative e consente di poter scegliere di volta in volta se usare le funzioni classiche del forno termo-ventilato o di cuocere a vapore. Tra i vantaggi del forno a vapore c'è la possibilità di modulare la quantità di vapore utilizzata calibrando l'aria in base agli alimenti da cucinare. Sembrerebbe anche che, cuocendo a vapore anziché nella modalità tradizionale, il risparmio in termini di tempo ed energia sia del 20%. La cottura all'interno del forno a vapore avviene mediante la vaporizzazione dell'acqua che, solitamente, viene introdotta all'interno di serbatoi laterali integrati alla struttura stessa del forno, da cui poi viene generato il vapore mediante uso di una piccola caldaia presente nel forno.

1.4.3 Forno combi

Sono disponibili forni a convezione a vapore o forni "combi" comunemente usati in ristoranti e catering vari. Secondo i produttori di forni, questa attrezzatura conserva la qualità dell'alimento con il minimo dispendio di energia e tempo. Permette di creare un numero di ricette di qualità costante. Grazie a un tale forno è

possibile risparmiare acqua e ridurre le perdite di cottura. Risparmia tempo e spazio nel ristorante in quanto vi è solo un pezzo di equipaggiamento necessario per più procedure di cottura. Nei moderni forni a convezione-vapore è possibile cucinare o riscaldare vari tipi di alimenti come carne, verdure e dolci allo stesso tempo, senza alcun trasferimento di odore (Zajac et al., 2015)

1.4.4 *Sous vide*

La cottura *sous vide* prevede un trattamento degli alimenti in condizioni controllate di temperatura e tempo all'interno di sacchetti sottovuoto termostabili. Permette al calore di essere trasferito efficacemente dall'acqua o dal vapore al cibo; elimina il rischio di ricontaminazione durante lo stoccaggio e previene le perdite per evaporazione di sostanze volatili e umidità durante la cottura (Baldwin, 2011). *Sous vide* è un termine francese che significa "sotto vuoto"; in inglese sta per "under vacuum". I prodotti *Sousvide* sono tipicamente riscaldati a temperature relativamente miti (65 °C - 95 °C) per un lungo periodo di tempo variabile in base al tipo di cottura da effettuare. I prodotti, in seguito al riscaldamento, sono rapidamente raffreddati e conservati in frigorifero (1°C - 4 °C) nel momento in cui non vengono consumati subito. La durata di conservazione dei prodotti *sous-vide* varia tra 6-42 giorni. C'è una tendenza a progettare trattamenti termici principalmente in funzione di una conservazione ottimale della qualità della distruzione batterica ottimale, in particolare nei prodotti ricchi (Goussault, 1993; Houben, 1999).

La cottura *sous-vide* fu adottata da Georges Pralus nel 1974 per il ristorante Troisgros (di Pierre e Michel Troisgros) a Roanne, (Francia). Georges scoprì che il "Foie gras" cotto in questo modo conserva il suo aspetto originale, non perde il suo grasso e ha una migliore consistenza.

Diversi scienziati hanno studiato attivamente la lavorazione *sous vide* dagli anni '90 (cfr Mossel and Struijk, 1991; Ohlsson, 1994; Schellekens, 1996) furono particolarmente interessati a usare questa tipologia di cottura per aumentare la "shelf life" degli alimenti minimamente trasformati.

In ambito culinario, la cottura *sous-vide* fu adottata da Georges Pralus nel 1974 per il ristorante Troisgros (di Pierre e Michel Troisgros) a Roanne, (Francia). Georges scoprì che il "Foie gras" cotto in questo modo conserva il suo aspetto originale, non perde il suo grasso e ha una migliore consistenza. Solo all'inizio degli anni 2000 la cottura *sous-vide* ha iniziato a diffondersi in molti ristoranti del mondo. (Keller et al., 2008).

Dal punto di vista microbiologico esistono tre principali fattori che determinano la sicurezza microbiologica dei prodotti *sous-vide*:

1. L'intensità del trattamento termico;
2. La rapidità del raffreddamento e la temperatura raggiunta;
3. Il controllo di stoccaggio refrigerato (temperatura e tempo) (SVAC, 1991).

Il comitato consultivo britannico sul microbiologico Safety of Food raccomanda, per i prodotti cotti lentamente con una shelf-life superiore a 10 giorni e fino a 42 giorni (63 °C), un trattamento termico di 90°C

per 10 minuti o letalità equivalente e condizioni di freddo rigido al fine di controllare il rischio di botulino da *Clostridium*. I pesci cotti con il metodo *sous-vide* conservano qualità intrinseche (mantenendo i frutti di mare naturali e freschi e prolungando la durata di conservazione). Poiché, applicare trattamenti termici elevati ai pesci provocherebbe una diminuzione della loro qualità organolettiche, è preferibile il trattamento termico nell'ordine di 60-80 °C per 20-40 minuti (**Figura 8**). Il controllo dei microrganismi sopravvissuti nel pesce cucinato con la tecnologia *sous-vide* a basse temperature è dunque un importante problema di sicurezza (NACMCF, 1990).



Figura 8. Forno electrolux

1.5 Effetto del trattamento termico sui COPs nel salmone

Le alte temperature producono una grande quantità di radicali liberi, questo causa l'accelerazione delle reazioni di propagazione e la decomposizione dei idroperossidi lipidici. I radicali liberi sono uno dei fattori principali della degradazione del colesterolo. Osada et al (1993) hanno dimostrato che l'ossidazione del colesterolo avviene dopo un trattamento ad alte temperature circa 120° in un tempo breve, e la composizione dei prodotti formati è strettamente correlata alla temperatura e al tempo del trattamento. La produzione degli ossisteroli raggiunge il massimo quando avviene un riscaldamento a 150°. Hanno anche osservato che il colesterolo rimane stabile e non produce gli ossidi se è riscaldato da solo. Invece, in presenza di olio, è stato dimostrato che il colesterolo è instabile, specialmente quando riscaldato con i grassi insaturi, per cui in questa condizione si originano maggiormente gli ossidi del colesterolo. Concludendo, è stato quindi dimostrato che la presenza di lipidi insaturi favorisce l'ossidazione del colesterolo (Dantas et al., 2015).

Le tipologie di ossisteroli maggiormente presenti negli alimenti sono riportate nella (**Figura 9**).

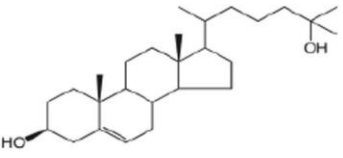
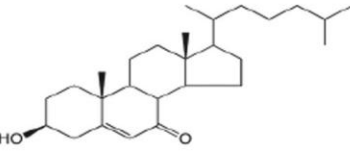
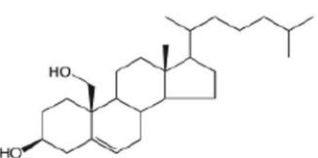
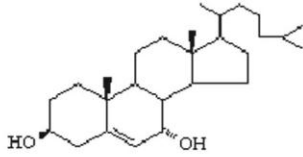
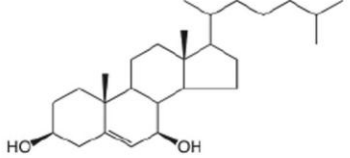
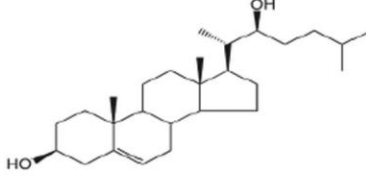
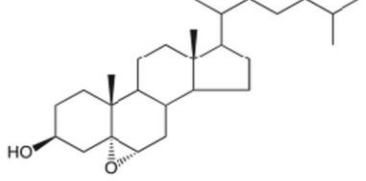
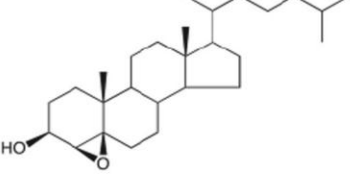
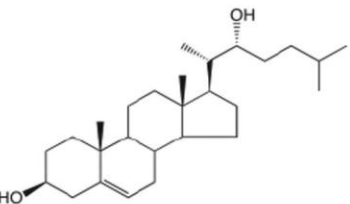
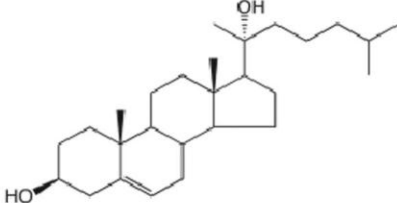
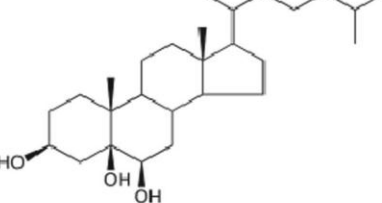
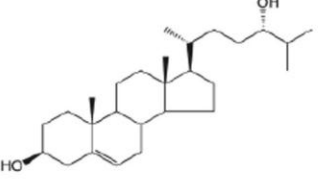
<p style="text-align: center;">25-HC (5-cholesten-3β-, 25-diol)</p> 	<p style="text-align: center;">7-K (5-cholesten-3β-ol-7-one)</p> 	<p style="text-align: center;">19-HC (cholest-5-en-3β,19-diol)</p> 
<p style="text-align: center;">7-HC (5-cholesten-3β, 7 α-diol)</p> 	<p style="text-align: center;">7-HC (5-cholesten-3β, 7 β -diol)</p> 	<p style="text-align: center;">22S-OH [22S]-Cholest-5-en-3β,19-diol H</p> 
<p style="text-align: center;">5,6-CE (5α, 6α-epoxy-5-cholestan-3β-ol)</p> 	<p style="text-align: center;">5,6-CE (5β, 6β-epoxy-5-cholestan-3β-ol)</p> 	<p style="text-align: center;">22R-OH ([22R]-Cholest-5-en-3β,19-diol)</p> 
<p style="text-align: center;">20-HC (5-cholesten-3β, 20 α-diol)</p> 	<p style="text-align: center;">CT (5α-cholestane-3β,5,6β-triol)</p> 	<p style="text-align: center;">24R-OH [24R]-Cholest-em-3β,24-diol</p> 

Figura 9. Formule strutturali dei COPs presenti negli alimenti

Sono stati determinati sei COPs nei campioni di nasello 24 (S) -OH, 22 (S) -OH, 25 (R) -OH, 25-OH, 19-OH e 7-cheto, (Zulet et al 2001). La maggior parte degli ossidi è stata originata dalla catena laterale del colesterolo e solo due ossidi (19-OH e 7-cheto) sono stati originati dalla catena principale. Normalmente, 25-OH era l'unico COP laterale trovato nei prodotti ittici. Quantitativamente, gli ossidi più abbondanti erano 25-OH (4,1–23,8 lg / g) e 19-OH (2,1–15,2 lg / g) in crudo e campioni alla griglia. Il 7-cheto, il principale ossido trovato nel pesce, è considerato un indicatore di ossidazione non lo era osservato nel nasello fresco, solo in scongelato o grigliato. E' stato studiato che questo COPs si forma in seguito a processi durante come congelamento e dopo trattamento termico. Appare quindi evidente di come la temperatura influenzi la formazione di questi prodotti di ossidazione derivanti dal colesterolo. Il contenuto totale di COPs è aumentato in modo significativo ($P < 0,02$) dopo la griglia, con aumenti tra il 57 e il 131%. In relazione a i singoli ossidi 24 (S) -OH e 25 (R) -OH si ha un aumento, di 350 e 335% (Osada et al., 1993) Secondo Osada et al può verificarsi l'autoossidazione del colesterolo in breve tempo se sottoposto a temperature superiori 120 C. Questi radicali interagiscono con il colesterolo e favoriscono l'ossidazione di steroli. Secondo Al-Saghir et al anno da cercare il maggiore grado di insaturazione, maggiore è l'ossidazione lipidica processo e più COPs si formano. In questi studi è evidente come l'elevata temperatura induce i processi ossidativi a carico del colesterolo.

2 Scopo della tesi

Lo scopo della tesi consiste nel valutare l'effetto del trattamento termico, eseguito in forno secondo tecniche di cottura tradizionali (forno a convezione) ed emergenti quali cottura a vapore, cottura combi (vapore combinato ad aria calda) e cottura sottovuoto, nella formazione di prodotti di ossidazione del colesterolo (COPs) nella matrice salmone.

3 Materiali e metodi

3.1 Standard e reagenti

Standard: colesterolo, 5 α -colestano, 24-idrossicolesterolo, 7-chetocholesterol (> 99%); KOH (85%); NaCl; Na₂SO₄; BSTFA (N, O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetammide con 1% trimetilclorosilano) e solventi qualità HPLC, usati per la preparazione degli standard e del campione, sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia). L'acqua ultrapura è stata preparata utilizzando un sistema milli-Q (Millipore, Millford, USA). Le colonne SPE Supelclean LC-Si SPE (500 mg, volume 6 ml) sono state acquistate da Sigma Aldrich (Milano, Italia).

3.2 Campionamento

Il salmone atlantico d'allevamento fresco (*Salmon salar*) è stato acquistato da un distributore locale. Sono stati eseguiti due campionamenti durante il periodo compreso tra ottobre e dicembre 2019. I campioni di pesce (dimensioni di 4-5 kg) sono stati tenuti refrigerati con ghiaccio a cubetti all'interno di scatole di polistirene e sono stati trasportati in laboratorio entro 1 ora dall'acquisto. Successivamente, i campioni di pesce sono stati puliti e sfilettati (**Figura 10**). Sono stati ottenuti filetti di $2,0 \pm 0,2$ cm di spessore e un peso medio di $200,0 \pm 20,0$ g (n = 2) e sottoposti a diversi trattamenti termici.



Figura 10. Preparazione del salmone e sfilettatura

3.3 Trattamenti di cottura

Per la cottura del salmone sono state prese in considerazione quattro tecniche di cottura al forno: forno a convezione (TR), forno a vapore (FS), forno *sous vide* (SV) e forno combinato (CO) (**Tabella 2**). Nel dettaglio, TR è stato eseguito in un forno preriscaldato a 180 ° C. La cottura FS è stata ottenuta mediante iniezione di vapore nella camera del forno (vapore saturo) e CO mediante vapore e aria calda, e i filetti di salmone sono stati cotti a 65° C e 90 °C. Per la cottura SV, ogni filetto è stato confezionato sottovuoto in un sacchetto di polipropilene resistente al calore (fino a 120 °C) progettato per questa tecnica culinaria, utilizzando un sigillatore sottovuoto. Quindi, i sacchetti di plastica sono stati sottoposti alla cottura a forno a vapore, con le stesse condizioni del trattamento FS (65 e 90 °C). Immediatamente dopo la cottura, le temperature interne dei filetti sono state controllate e ogni filetto è stato raffreddato, macinato in un tritatutto e successivamente utilizzato per l'analisi. In tutte le procedure, la temperatura interna rivelata dei filetti era di 60 °C e il tempo

medio di cottura di circa 15-20 minuti. Per ciascun campione di pesce, ciascun trattamento termico è stato replicato per 2 volte. I tempi e le temperature di cottura dei tre metodi di cottura sono stati decisi in linea con le reali condizioni domestiche.

Tabella 2. Descrizione dei trattamenti termici applicati al salmone crudo utilizzando il forno

Trattamento termico	Mezzo di riscaldamento	Temperatura °C	Abbreviazione	Temperatura al cuore °C
crudo	-	-	CR	60
tradizionale	Aria calda	180	TR	60
vapore	Vapore saturo	65	FS65	60
vapore	Vapore saturo	90	FS90	60
combi	Vapore + aria calda	65	CO65	60
combi	Vapore + aria calda	90	CO90	60
<i>sous vide</i>	Vapore saturo	65	SV65	60
<i>sous vide</i>	Vapore saturo	90	SV90	60

3.4 Estrazione lipidica

I lipidi totali sono stati isolati come descritto da Bligh & Dyer (1959). Sono stati aggiunti 20 g di salmone tritato di 60 mL di una soluzione di cloroformio: metanolo (1:2, v/v) e omogeneizzati con ULTRA-TURRAX. Successivamente, la miscela è stata filtrata sotto vuoto con un imbuto in porcellana Büchner dotato di filtro di carta. La soluzione ottenuta è stata sottoposta a tre lavaggi ciascuno con 20 mL di soluzione acquosa KCl (0,88%, p / v). L'acqua rimanente è stata eliminata dal solvente organico con solfato di sodio anidro e quindi il solvente (contenente la frazione lipidica) è stato evaporato con il rotavapor (50 °C).

3.4.1 Prove di super ossidazione

Per testare la metodica di analisi dei COPs e per verificare la formazione di COPs, sono state condotte delle prove di super ossidazione dell'olio di salmone estratto da salmone fresco crudo e dell'olio di salmone da salmone crudo congelato. Una volta estratto l'olio, 250 mg sono stati sottoposti ad un trattamento termico in un Becker in forno ventilato a 180°C per 3h.

3.5 Determinazione di colesterolo e COP

Una saponificazione a freddo (Sander et al., 1989) è stata applicata all'olio per determinare colesterolo e COPs. Sono stati aggiunti 250 mg di olio con 100 µL di una soluzione di 5a-colestanolo (10 mg / L toluene) e 25 µL di una soluzione di 24-idrossicolesterolo (0,5 mg / L) in esano:isopropanolo (3: 2 v / v), come standard interni per colesterolo e COPs, rispettivamente. Il campione è stato portato a secco sotto flusso di azoto e

aggiunto con KOH 1 M in metanolo (10 mL), avvolto con un foglio di alluminio e agitato per 18 ore per la saponificazione. È stato neutralizzato con acqua (10 mL) ed estratto con dietil etere (10 mL), agitato vigorosamente e separato (3 volte). Le frazioni dietiliche riunite sono state lavate con 5 mL di 0,5 M KOH e 5 mL di NaCl saturo. Gli estratti sono stati essiccati su solfato di sodio anidro e portati a secco con il rotavapor a 40 ° C. La sostanza saponificata è stata aggiunta con 1 mL di *n*-esano / dietil etere (75:25 v / v) da cui sono stati prelevati rispettivamente 100 e 900 µL per la determinazione del colesterolo e dei COPs.

Per il colesterolo, 100 µL di materia insaponificabile sono stati portati a secco sotto flusso di azoto, derivatizzati (20 minuti a temperatura ambiente) con 200 µL di BSTFA (N, O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamide), essiccati e aggiunti di 20 µL di *n*-esano.

Per i COPs, una purificazione su SPE secondo il metodo proposto da Larkeson et al. (2000) usando una cartuccia di silice (Supelcean LC-Si), condizionata con *n*-esano (10 mL), su cui è stato depositato l'estratto insaponificabile (900 µL), lavata con *n*-esano: dietil etere 75:25, v / v (2 mL), *n*-esano: dietil etere 60:40, v / v (6 mL) e infine i COPs sono stati eluiti con acetone (4 mL). La frazione purificata è stata derivatizzata come per il colesterolo e aggiunta di *n*-esano (100 µL).

3.6 Analisi GC-MS

Tutti i campioni sono stati iniettati (1 µL) in un gascromatografo, sistema GC / EI-MS (Thermo Scientific, USA), dotato di un iniettore split/splitless, una sorgente di ionizzazione elettronica (EI) e un analizzatore a quadrupolo singolo, usando una colonna Rtx-65TG (30m x 0,25 mmID, 0,1 µmDF, Da). La temperatura del forno iniziava a 200 °C, mantenuta per 1 minuto, e poi portata a 280 °C e mantenuta per 1min a una velocità di 2 °C / min. L'elio è stato usato come gas di trasporto con un flusso di 1,2 ml / min. L'iniettore è stato impostato a 320 °C in modalità splitless, la sorgente ionica (70 eV) è stata impostata a 250 °C e la linea ausiliaria a 280 °C. L'acquisizione è stata impostata nella modalità di scansione completa (TIC) della gamma di massa 70-650 m/z con il rivelatore acquisizione (gain) a 1,0.

L'identificazione dei COPs è stata eseguita per confrontando con standard puri: tempo di ritenzione e frammentazione dello spettro di massa. La quantificazione è stata eseguita con uno standard interno, 5 α -colestano per colesterolo e 24-idrossicolesterolo per i COPs, utilizzando fattori di risposta relativi che sono stati calcolati utilizzando soluzioni standard con concentrazioni note. Per colesterolo e COPs, il limite di rilevabilità (LOD) e limite di quantificazione (LOQ) è risultato essere 0.6 mg/L e 1.8 mg/L, rispettivamente.

3.7 Analisi statistica

I dati sono stati elaborati secondo ANOVA con il Tukey test ad un livello di significatività $P < 0.05$, utilizzando il software R.

4 Risultati e discussione

4.1 Identificazione GC-MS

Alcuni autori suggeriscono che i principali COPs che si ritrovano maggiormente negli alimenti siano: 7α -idrossicolesterolo, 7β -idrossicolesterolo, 5,6-epossicolesterolo, $5,6\alpha$ -epossicolesterolo, colestanoetriolo, 7α idrocolestano, colesterolo, 25 idrossicolesterolo, 7cheto colesterolo (Dantas et al., 2015). In quest'ottica sono stati iniettati in GC-MS gli standard dei possibili COPs che potrebbero trovarsi nel salmone per ottenere gli spettri di massa (Figura 11). Dal confronto con le frammentazioni riportate da altri autori come riportato in Figura 12 (Chiu et al., 2018), si può ritenere che le frammentazioni ottenute in questo lavoro coincidano e quindi si possono correttamente identificare i COPs, (tempo di ritenzione e spettro di frammentazione).

4.2 Prove preliminari di super ossidazione

Sono state eseguite prove preliminari su olio estratto da salmone fresco e da salmone fresco congelato da 6 mesi, sottoposti poi a ossidazione $180\text{ }^{\circ}\text{C} \times 3\text{ h}$ in forno ventilato per testare il metodo di analisi per il colesterolo e i COPs. In Tabella 3 si può osservare come avvenga una diminuzione del colesterolo, dopo la super ossidazione, indicando una degradazione del colesterolo. Il contenuto in colesterolo varia da 2008.5 a 4246.2 mg/kg olio. In entrambe le prove la diminuzione in colesterolo ammontava a circa il 30 %. Valutando il profilo in COPs prima e dopo la super ossidazione, il campione crudo fresco non ha mostrato la presenza di COPs, mentre nel relativo super ossidato sono stati identificati i seguenti COPs: 7a-HC, 7b-HC, 5,6b-CE, 5,6a-CE e 7 K (Figura 1) per un totale di 56.8 mg/kg olio, con prevalenza del 7 K e 7b-HC, rispettivamente come riportato Tabella 4. Nel campione di salmone congelato, solo alcuni COPs sono stati quantificati tra cui 7 K, 5,6b-CE e 7β -HC, ma in piccole quantità, mentre nel rispettivo olio super ossidato il totale di COPs è aumentato di 5 volte (97.1 mg/kg olio). In media la super ossidazione condotta su olio di salmone (fresco e congelato) ha prodotto circa il 3% di COPs su colesterolo. Lea castaneda et al, (2017) hanno condotto delle prove di ossidazione su olio di pesce con le microonde e in forno ventilato, trovando un aumento dei COPs in funzione del tipo di trattamento termico.

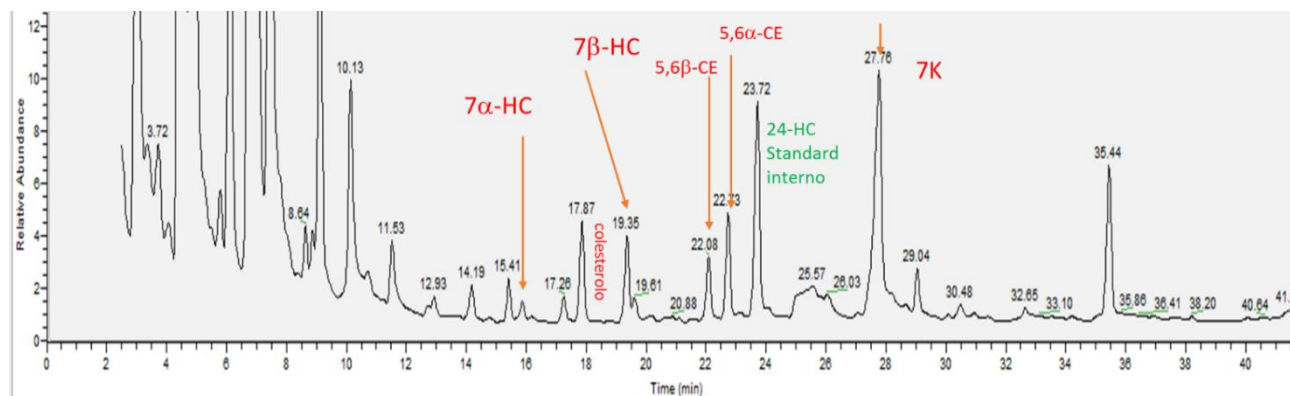


Figura 11. Picchi COPs identificati nel salmone

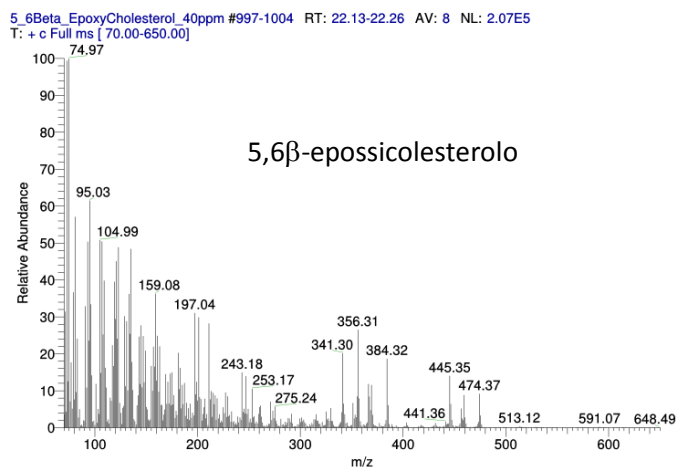
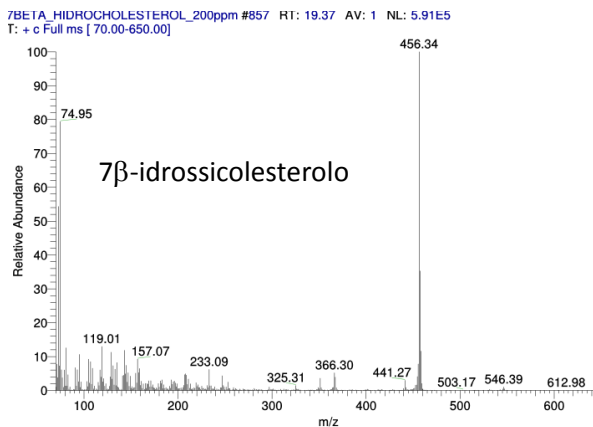
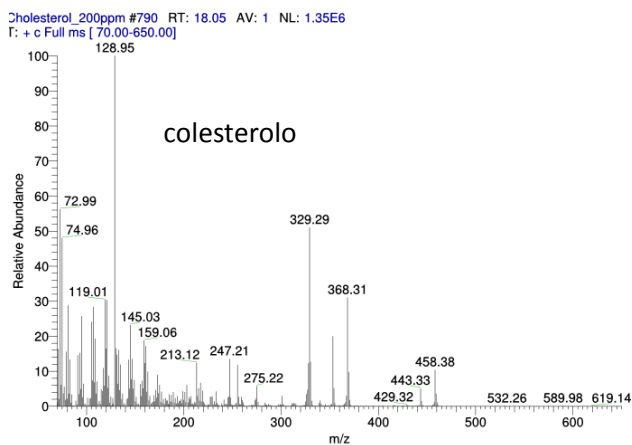
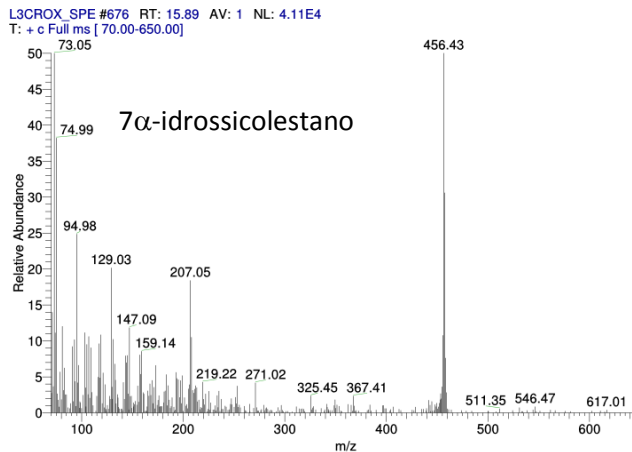
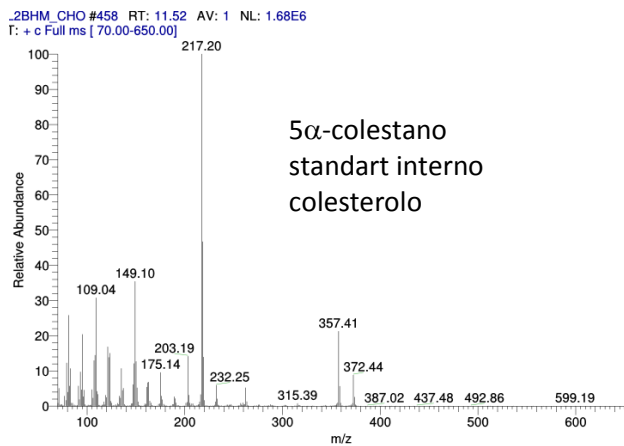
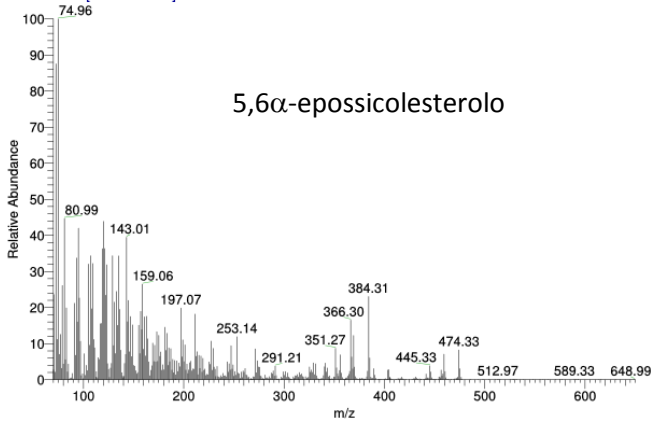
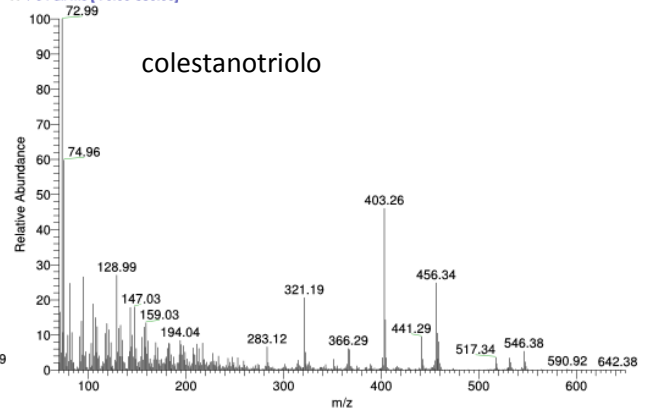


Figura 12. Spettri di frammentazione TIC (Total Ion Current)

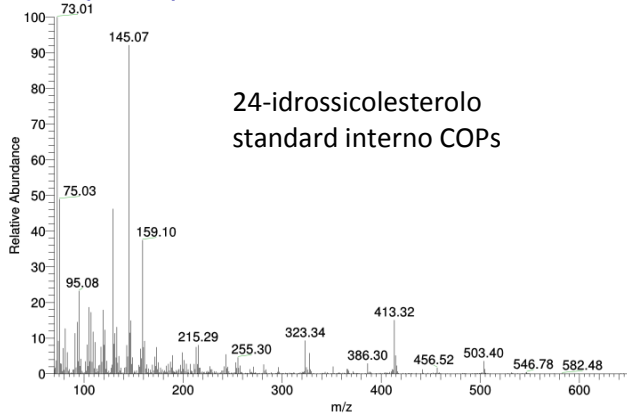
5alfa_6alfaCE_40ppm #1034 RT: 22.85 AV: 1 NL: 3.89E5
T: + c Full ms [70.00-650.00]



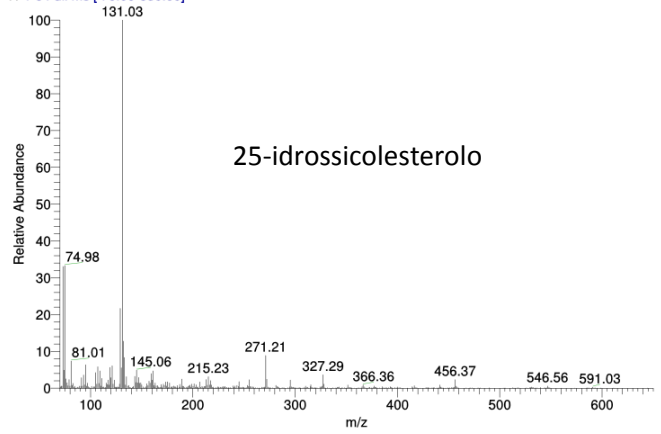
5alfa_cholestane3_6beta_triol_200ppm #1067 RT: 23.50 AV: 1 NL: 2.63E5
T: + c Full ms [70.00-650.00]



24HC50ppm #1074 RT: 23.76 AV: 1 NL: 1.85E5
T: + c Full ms [70.00-650.00]



25HC160ppmdi10volte #1097 RT: 24.10 AV: 1 NL: 4.72E5
T: + c Full ms [70.00-650.00]



5alfaCho_7keto_200ppm #1277 RT: 27.64 AV: 1 NL: 1.58E5
T: + c Full ms [70.00-650.00]

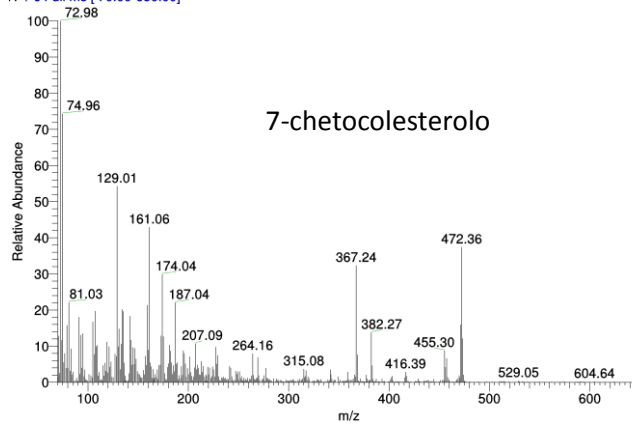


Figura 13. Spettri di frammentazione TIC (total ion current)

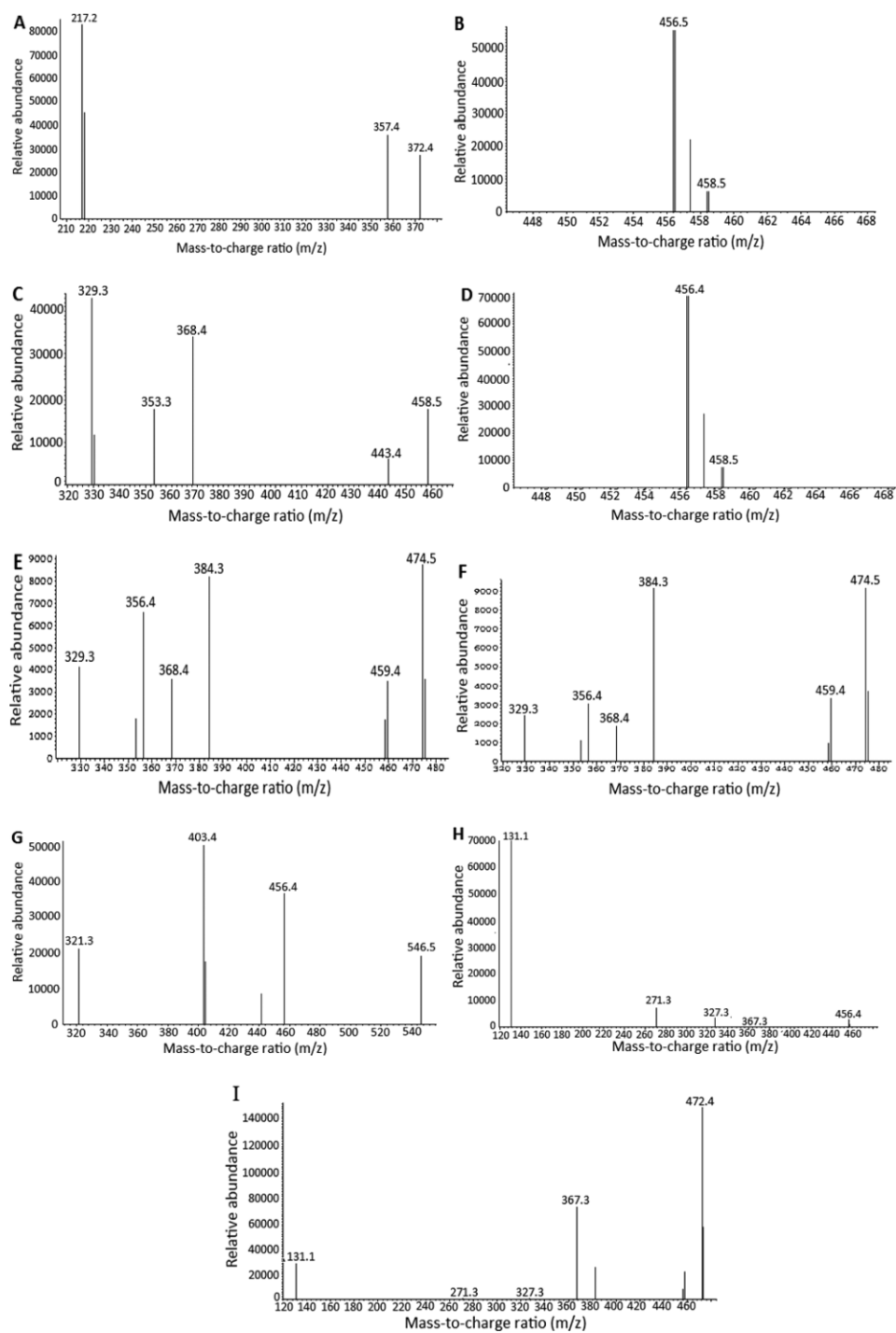


Figura 14. GC-MS-SIM spettro mostra l'abbondanza di ioni a differenti valori m/z per i trimetil derivati dai 7 COPs; colesterolo; e lo standard interno, 5 α colestano, nella carne e nei campioni del grasso animale. (A) 5 α -colestano (picco standard interno 1), (B) 7 α OH (picco 2), (C) cholesterol (picco 3), (D) 7 β -OH (picco 4), (E) 5,6,8-EP (picco 5), (F) 5,6 α -EP (picco 6), (G) triolo (picco 7), (H) 25-OH (picco 8), e (I) 7-cheto (picco 9) (Chiu et al., 2018).

Tabella 3. Contenuto di colesterolo espresso in mg/kg di olio su campione di salmone fresco e congelato e relativa % di diminuzione di colesterolo

Campione salmone	ossidazione	colesterolo mg/kg olio	diminuzione colesterolo in %
Crudo fresco	-	3052,4	34,19
Crudo fresco superossidato	180°C x 3 h	2008,5	
Crudo congelato	-	4246,2	28,27
Crudo congelato superossidato	180°C x 3 h	3045,6	

Tabella 4. Quantità di COPS nel salmone crudo fresco e super ossidato e nel campione di salmone crudo congelato e super ossidato e % COPS/ colesterolo

Campione salmone	colesterolo	mg/kg olio					totale COPS	COPS/colesterolo %
		7 α -HC	7 β -HC	5 β -CE	5 α -CE	7K		
Crudo fresco	3052,4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,01
Crudo fresco superossidato	2008,5	3,7	18,7	3,7	5,4	25,3	56,8	2,83
Crudo congelato	4246,2	<LOD	3,0	<LOD	5,9	13,0	22,0	0,52
Crudo congelato superossidato	3045,6	5,4	24,6	5,0	8,7	53,4	97,1	3,19

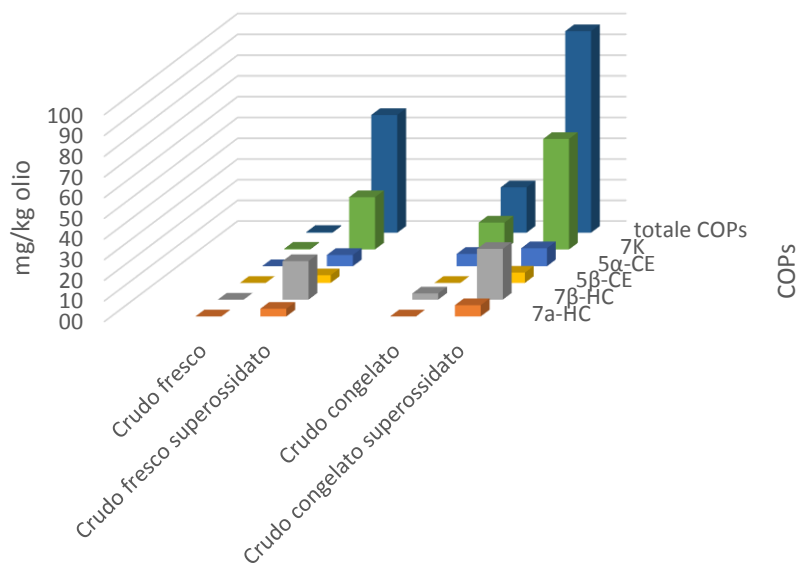


Figura 15. Contenuto in COPS espressi in mg/kg olio nei campioni di salmone fresco e congelato in relazione al tipo di campione utilizzato (Crudo o Congelato)

4.3 Effetto del trattamento termico sul grasso

In **Tabella 5** sono presenti i valori di % di grasso e di acqua, presenti nei 2 campionamenti effettuati, in relazione alle tipologie di cottura adottate. Nel primo campionamento, il valore minimo espresso in % di grasso corrisponde a 17,06 % per la cottura CO 65 ed il minimo corrisponde a 20,40% (CO 90). Nel secondo campionamento la % di grasso varia da 9.66 % a 16 %.

La % di acqua varia da 55.00 % a 59.79 % nel primo campionamento. Nel secondo campionamento i valori variano da 54.40 % a 62.96 %. I valori ottenuti sono in linea con i valori ottenuti in filetti di salmone sottoposti a frittura e a cottura al vapore nel lavoro di [Al Saghir et al., \(2004\)](#). Il trattamento termico, in nessun caso ha significativamente influenzato la % di grasso e % di acqua. [Danowska et al. \(2009\)](#) sostiene che la % di grasso nella cottura di alimenti cambia in funzione della % di acqua, che con la sua diminuzione produce una concentrazione della frazione lipidica.

Tabella 5. % di grasso e % di acqua determinati nei campioni di salmone sottoposto a cottura presenti nei 2 campionamenti

Camp 1	Descrizione	% grasso		% acqua		Camp 2	% grasso		% acqua	
S1 CR	Crudo	18,63	a	56,42	a	S2 CR	15,19	5,21 a	57,97	1,46 a
S1 TR	tradizionale	15,30 ± 0,08	a	57,20 ± 0,99	a	S2 TR	16,00 ± 5,66	a	54,40 ± 3,78	a
S1 FS 65	vapore	19,90	a	57,23	a	S2 FS 65	9,66	0,28 a	61,69	1,96 a
S1 FS 90	vapore	17,19 ± 0,97	a	55,00 ± 0,71	a	S2 FS 90	11,27 ± 2,50	a	55,39 ± 1,26	a
S1 CO 65	Combi	17,06 ± 0,09	a	56,65	0,30 a	S2 CO 65	7,09 ± 0,87	a	62,96	1,63 a
S1 CO 90	Combi	20,40 ± 1,56	a	56,25 ± 1,06	a	S2 CO 90	12,25 ± 5,30	a	58,16 ± 4,40	a
S1 SV 65	sous vide	11,50 ± 3,67	a	59,79 ± 0,35	a	S2 SV 65	14,13 ± 0,88	a	59,35 ± 0,91	a
S1 SV 90	sous vide	15,82 ± 0,67	a	59,63 ± 0,53	a	S2 SV 90	12,47 ± 1,87	a	59,47 ± 1,89	a

4.4 Effetto del trattamento termico sul colesterolo

Nel primo campionamento il contenuto di colesterolo varia da 2845.4 a 4739.0 ± 554,5 mg/kg olio, mentre nel secondo campionamento da 3252,3 ± 493 a 5427,8 ± 276 (**Tabella 6**). Nel primo campionamento i trattamenti SV a 65 e a 90 °C presentano un contenuto in colesterolo più elevato del salmone crudo e anche degli altri trattamenti termici. Il valore più alto è risultato essere nel campione S1 SV 65. Gli altri trattamenti termici non hanno condotto ad una variazione del contenuto in colesterolo in confronto con il campione crudo S1 CR (**Figura 14**). Un andamento più variabile è emerso dal secondo campionamento, con valori più elevati nei trattamenti FS 65, CO 65 e SV 90 con il massimo valore corrispondente al campione S2 FS 65 (5427,8 ± 276 mg/kg olio) (**Figura 15**). Dall'analisi statistica ANOVA è emerso che non ci sono differenze significative in contenuto di colesterolo in tutti i campioni (cotti e crudi) di entrambi i campionamenti, quindi le cotture non influenzano in maniera significativa i valori di colesterolo. La variazione dei dati ottenuta dai campionamenti non sembra essere dovuta alla cottura ma semplicemente al campionamento.

Si può dedurre che i trattamenti termici applicati al salmone non sono invasivi poiché non modificano il contenuto in acqua e quindi non vi è una concentrazione in colesterolo (Al Saghir et al., 2004).

Tabella 6. Contenuto di colesterolo espresso in mg/kg olio in funzione al tipo di cottura adottata. I dati sono espressi come media di 2 repliche \pm deviazione standard. L'Anova è stata condotta per campionamento ($P < 0.05$).

Campionamento 1	Descrizione	Colesterolo mg/kg oil			Campionamento 2	Colesterolo mg/kg oil		
S1 CR	crudo	2884,8		a	S2 CR	3474,8	\pm 597	a
S1 TR	tradizionale	3301,8	\pm 37,9	a	S2 TR	3252,3	\pm 493	a
S1 FS 65	vapore	3047,4		a	S2 FS 65	5427,8	\pm 276	a
S1 FS 90	vapore	2869,8	\pm 186,8	a	S2 FS 90	3355,4		a
S1 CO 65	combi	2845,4		a	S2 CO 65	4522,9	\pm 1172	a
S1 CO 90	combi	3483,5	\pm 27,0	a	S2 CO 90	3560,2	\pm 57	a
S1 SV 65	sous vide	4739,0	\pm 554,5	a	S2 SV 65	3673,0	\pm 607	a
S1 SV 90	sous vide	4268,6	\pm 492,3	a	S2 SV 90	4499,4	\pm 234	a

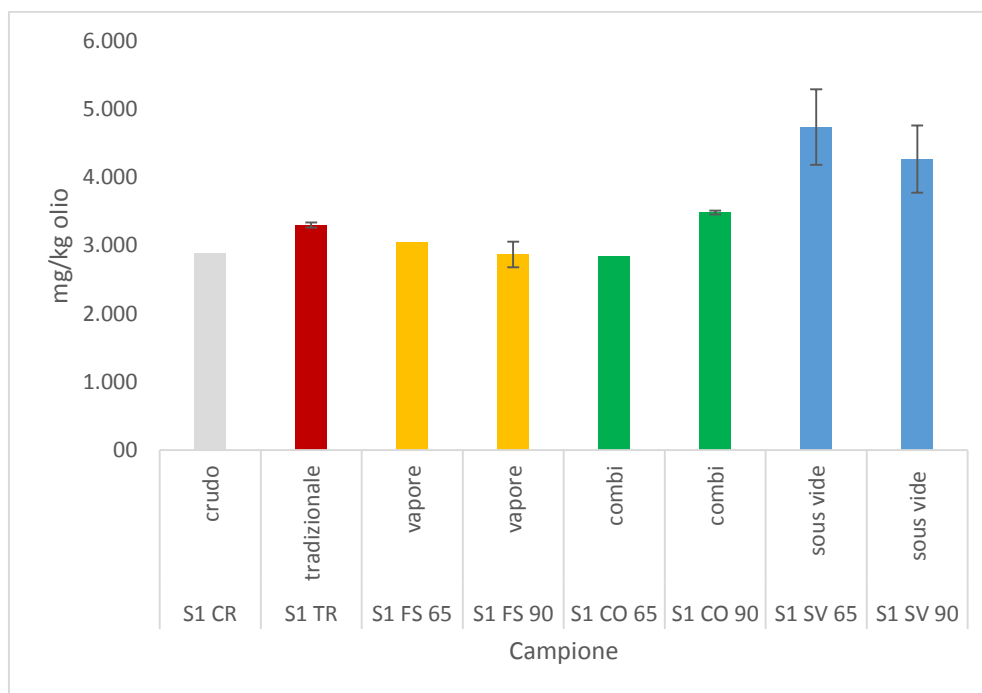


Figura 14. Contenuto di colesterolo nel primo campionamento in relazione alle cotture effettuate

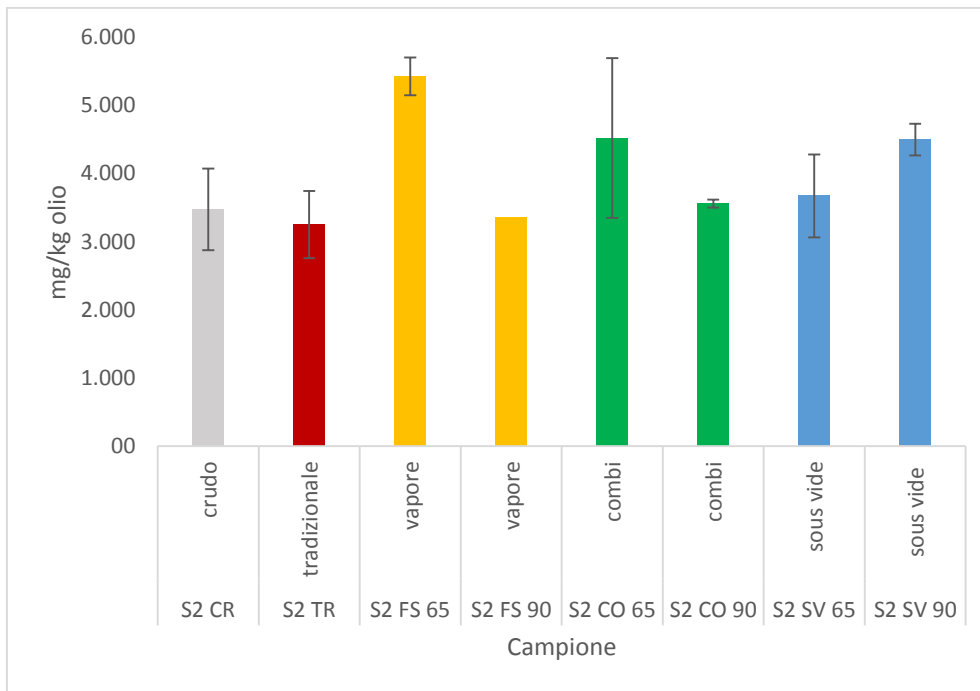


Figura 15. Contenuto di colesterolo nel secondo campionamento in relazione alle cotture effettuate

4.5 Effetto del trattamento termico sui COPs

Nella **Tabella 7** sono riportati i valori di 7K (COPs) in tutti i campioni salmone, cotti e crudi. In tutti i campioni non vi è stata una ossidazione del colesterolo, infatti solo in alcuni casi è stato identificato il 7K, ma senza mai superare il limite di quantificazione (LOQ). La cottura condotta a 180 °C e 65°C e 90 °C non ha avuto alcun effetto sui COPs, che non erano presenti nemmeno nei campioni crudi freschi. Hanno condotto delle prove di ossidazione su olio di pesce con le microonde e in forno ventilato, trovando un aumento dei COPs in funzione del tipo di trattamento termico.

In disaccordo, Lea castaneda et al, (2017) trova un aumento dei COPs in funzione del trattamento termico, applicato direttamente su olio di pesce. Infatti il forno ventilato (20 min) ha prodotto $15,4 \pm 0,1 \text{ mg/g}$ olio di 7K, ma essendo la cottura effettuata direttamente su olio di pesce, l'effetto della cottura può essere più invasivo rispetto al filetto di pesce. Al-Saghir et al. (2004) hanno analizzato campioni sottoposti a frittura (180°C/6 min) con differenti tipi di olio (olio d'oliva, olio di mais, e parzialmente olio vegetale idrogenato), fritto senza olio (6 minuti) e cottura a vapore (66° a 67°C/12 minuti). Gli autori hanno osservato un significativo incremento nella concentrazione del colesterolo totale ossidato nel campione cotto. I prodotti di ossidazione del colesterolo (COPs) aumentano dopo la cottura da $0,86 \text{ } \mu\text{g/g}$ nel campione crudo, a $5,98 \text{ } \mu\text{g/g}$ nel campione fritto senza olio, $3,98 \text{ } \mu\text{g/g}$ con olio di oliva, $3,34 \text{ } \mu\text{g/g}$ in parte nell'olio vegetale idrogenato e $9,88 \text{ } \mu\text{g/g}$ nel campione sottoposto a cottura a vapore. Tra tutti i processi, la cottura a vapore risulta avere un livello più alto di COPs, in quanto era dovuto a un più lungo trattamento termico (12 min) in confronto ai campioni fritti.

La temperatura e la composizione della matrice possono spiegare la non formazione dei COPs nei salmone cotti. Osada et al. (1993) hanno dimostrato che l'ossidazione del colesterolo, e la relativa formazione di COPs, avviene dopo un trattamento ad alte temperature circa 120° in un tempo breve, e la tipologia dei COPs formati è strettamente correlata alla temperatura e al tempo del trattamento. Escluso, la cottura in forno tradizionale (TR) condotta a 180 °C, le altre cotture (combi, CO e cottura a vapore, FS) sono state affettuate a 65 e 90 °C. Queste temperature non sono sufficienti ad innescare la reazione di ossidazione del colesterolo (Dantas et al., 2015). Inoltre, il salmone è una matrice alimentare che presenta un forte antiossidante come tocoferoli, astaxantina e acidi grassi polinsaturi che tendono ad essere ossidati più velocemente rispetto al colesterolo. L'astaxantina è un carotenoide che presenta una colorazione rosso-violacea. Dal punto di vista funzionale, è importante in quanto va a costituire la colorazione rossa del salmone fungendo quindi da importante criterio di qualità per il consumatore. È un potente antiossidante, eliminando i radicali liberi, inducendo la catalasi e superossido dismutasi [Esatbeyoglu et al \(2016\)](#).

Tabella 7. Contenuto 7K espresso in mg/kg olio

Campionamento 1	Descrizione	7K mg/kg oil	Campionamento 2	Descrizione	7K mg/kg oil
S1 CR	crudo	<LOD	S2 CR	crudo	<LOD
S1 TR	tradizionale	<LOD	S2 TR	tradizionale	<LOD
S1 FS 65	vapore	<LOD	S2 FS 65	vapore	<LOQ
S1 FS 90	vapore	<LOD	S2 FS 90	vapore	<LOQ
S1 CO 65	combi	<LOD	S2 CO 65	combi	<LOQ
S1 CO 90	combi	<LOD	S2 CO 90	combi	<LOD
S1 SV 65	sous vide	<LOD	S2 SV 65	sous vide	<LOD
S1 SV 90	sous vide	<LOQ	S2 SV 90	sous vide	<LOD

Conclusioni

Il salmone (*salmo salar*) contiene una considerevole quantità di colesterolo. È stato dimostrato, che il colesterolo in seguito a trattamenti termici, va incontro a processi ossidativi producendo COPs.

Il salmone fresco è una matrice che non contiene COPs, mentre l'ossidazione dell'olio di salmone fresco (privo di COPs) in forno ventilato a 180 °C per 3 ore ha sviluppato i seguenti COPs: 7a-HC, 7b-HC, 5,6b-CE, 5,6a-CE e 7 K, per un totale di 56.8 mg/kg olio (3% di COPs su colesterolo), con prevalenza del 7 K e 7b-HC

Il trattamento termico condotto su filetti di salmone freschi (in forno ventilato TR, cottura a vapore FS, in forno combi CO, e sous vide SV) in nessun caso ha significativamente influenzato la % di grasso, % di acqua e colesterolo. Le variazioni dei valori di grasso, acqua e colesterolo sono risultati dipendere dal campionamento e non dal trattamento termico oppure dalla temperatura (180, 90 e 65 °C). In entrambi i campionamenti il valore di colesterolo ammontava a circa 3000 mg/kg olio di salmone.

Le cotture, FS 65, FS 90, CO 65, CO 90, SV 65, SV 90 non hanno avuto alcun effetto sull'ossidazione del colesterolo. L'unico COP identificato ma non quantificato è stato il 7K. Il trattamento termico blando (<120 °C) unito alla matrice del salmone ricca in carotenoidi (astaxantina), tocoferoli e acidi polinsaturi non promuovono la formazione dei COPs.

Bibliografia

- Astiasarn, I., Ansorena, D., Echarte, M., Conchillo, A., & Menndez-Carreo, M. (2004). Cholesterol oxidation products in common cooked foods. Oxidos de colesterol en alimentos cocinados con presencia habitual en nuestra dieta. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 73(4), pp 47-53.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). Bligh-Dyer method. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*.
- Blikra, M. J., Skipnes, D., & Feyissa, A. H. (2019). Model for heat and mass transport during cooking of cod loin in a convection oven. *Food Control*, 102(4068), pp 29–37.
- Boni S., Pacetti D., Boselli E., & Balzano M., (2009). Caratterizzazione della frazione lipidica dei prodotti ittici nell'ambito del progetto Last Minute Fish. *VII Convegno AISSA "Agricoltura, Qualità Dell'Ambiente e Salute,"* pp 104–105.
- Boselli, E., Velazco, V., Fiorenza Caboni, M., & Lercker, G. (2001). Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. *Journal of Chromatography A*, 917(1–2), pp 239–244.
- Brown, L., (1993). *Acquacoltura per veterinari*, Pergamon Press. pp 462.
- Bruno, DW., & Poppe., TT. (1996). *Un atlante colorato delle malattie da salmone*. Academic Press Ltd, pp194.
- Chiu, C. W., Kao, T. H., & Chen, B. H. (2018). Improved Analytical Method for Determination of Cholesterol-Oxidation Products in Meat and Animal Fat by Quechers Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(13), pp 3561–3571.
- Choi, Y. S., Hwang, K. E., Jeong, T. J., Kim, Y. B., Jeon, K. H., Kim, E. M., Kim, C. J. (2016). Comparative study on the effects of boiling, steaming, grilling, microwaving and superheated steaming on quality characteristics of marinated chicken steak. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(1), pp 1–7.
- Dantas, N. M., Sampaio, G. Rodrigue., Ferreira, F. S. ilv., Labre, T. da S., Torres, E. A. parecid. F. da S., & Saldanha, T. (2015). Cholesterol Oxidation in Fish and Fish Products. *Journal of Food Science*, 80(12), pp 2627–2639.
- Echarte, M., Ansorena, D., & Astiasaran, I. (2001). Fatty acid modifications and cholesterol oxidation in pork loin during frying at different temperatures. *Journal of Food Protection*, 64(7), pp 1062–1066.
- Echarte, M., Conchillo, A., Ansorena, D., & Astiasaran, I. (2004). Evaluation of the nutritional aspects and cholesterol oxidation products of pork liver and fish pates. *Food Chemistry*, 86(1), pp 47–53.
- Esatbeyoglu, T., & Rimbach, G. (2017). Canthaxanthin: From molecule to function. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(6), pp 1–17.

- Friedland, K. D., MacLean, J. C., Hansen, Lars, P., Peyronnet, Arnaud, J., Karlsson, L., Reddin, G. D., Niall, Ó M., & McCarty, J. L. (2009). The recruitment of Atlantic salmon in Europe. *ICES Journal of Marine Science*, Volume 66, Issue 2: pp 289-304.
- Grünenwald, M., Adams, M. B., Carter, C. G., Nichols, D. S., Koppe, W., Verlhac-Trichet, V & Adams, L. R. (2019). Pigment-depletion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolt starved at elevated temperature is not influenced by dietary carotenoid type and increasing α -tocopherol level. *Food Chemistry*, 299(July).
- Guardiola, F., Codony, R., Rafecas, M., & Boatella, J. (1995). Comparison of three methods for the determination of oxysterols in spray-dried egg. *Journal of Chromatography A*, 705(2), pp 289–304.
- Johnson, C. B. (1996). Isolation of cholesterol oxidation products from animal fat using aminopropyl solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 736(1–2), pp 205–210.
- Khan, M. I., Min, J. S., Lee, S. O., Yim, D. G., Seol, K. H., Lee, M., & Jo, C. (2015). Cooking, storage, and reheating effect on the formation of cholesterol oxidation products in processed meat products. *Lipids in Health and Disease*, 14(1), pp 1–9.
- L, Ge., (2008). The Cholesterol Absorption Inhibitor Ezetimibe acts by Blocking the Sterol-Induced Internalization of NPC1L1, in *Cell Metabolism*, vol.7, pp 508-519.
- Leal-Castañeda, E. J., Hernández-Becerra, J. A., Rodríguez-Estrada, M. T., & García, H. S. (2017). Formation of cholesterol oxides in lipid medium during microwave heating. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(4), pp 1–13.
- Lee, S. O., Lim, D. G., Seol, K. H., Erwanto, Y., & Lee, M. (2006). Effects of various cooking and re-heating methods on cholesterol oxidation products of beef loin. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(5), pp 756–762.
- Lerfall, J., Bendiksen, E. Å., Olsen, J. V., Morrice, D., & Østerlie, M. (2016). A comparative study of organic- versus conventional farmed Atlantic salmon. I. Pigment and lipid content and composition, and carotenoid stability in ice-stored fillets. *Aquaculture*, 451, pp 170–177.
- Maldonado-Pereira, L., Schweiss, M., Barnaba, C., & Medina-Meza, I. G. (2018). The role of cholesterol oxidation products in food toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 118(May), pp 908–939.
- Min, J. S., Khan, M. I., Lee, S. O., Yim, D. G., Seol, K. H., Lee, M., & Jo, C. (2016). Impact of cooking, storage, and reheating conditions on the formation of cholesterol oxidation products in pork loin. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(1), pp 23–28.
- Osada, K., Kodama, T., Yamada, K., & Sugano, M. (1993). Oxidation of cholesterol by heating. *J Agric Food Chem*, 41, pp 202.
- Øystein, Aas., Anders, K., & Sigurd, E. (2010). *Atlantic Salmon Ecology*. Wiley-Blackwell.
- Park, P. W., Guardiola, F., Park, S. H., & Addis, P. B. (1996). Kinetic evaluation of 3 β -hydroxycholest-5-en-7-one (7-ketocholesterol) stability during saponification. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(5), pp 623–629.

- Pérez-Burillo, S., Rufián-Henares, J. Á., & Pastoriza, S. (2019). Effect of home cooking on the antioxidant capacity of vegetables: Relationship with Maillard reaction indicators. *Food Research International*, 121(July 2018), pp 514–523.
- Purser, J., & Forteach, N., (2003). Salmonidi In JS Lucas e PC Southgate, Acquacoltura. Farming Aquatic Animals and Plants. pp 295-320. Blackwell Publishing.
- Roberts RJ & Shepherd CJ. (1997). Manuale di Trout & Salmon Diseases. Blackwell Science. pp179.
- Sabri, A-S., Thurner, K-H., Frisch, G., Luf, W., Razzazi-Fazeli, E., & Elmadfa, I. (2004). Effects of Different Cooking Procedures on Lipid Quality and Cholesterol Oxidation of Farmed Salmon Fish (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (16), pp 5290-5296.
- Saldanha, T., & Bragagnolo, N. (2007). Cholesterol oxidation is increased and PUFA decreased by frozen storage and grilling of atlantic hake fillets (*Merluccius hubbsi*). *Lipids*, 42(7), pp 671–678.
- Sander, B. D., Addis, P. B., Park, S. W., & Smith, D. E. (2016). Quantification of Cholesterol Oxidation Products in a Variety of Foods. *Journal of Food Protection*, 52(2), pp 109–114.
- Small, D.M. (1986). Lipid classification based on interactions with water. *The Physical Chemistry of Lipids*, Plenum Press, New York, pp 89–95.
- Tong, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. *Journal of Food Science*, 65(8), pp 1325–1329.
- Willoughby, S. (1999). Manuale di Salmonid Farming. Blackwell Science. pp 359.
- Zhuang, H., & Savage, E. M. (2008). Validation of a combi oven cooking method for preparation of chicken breast meat for quality assessment. *Journal of Food Science*, 73(8).

Dediche e ringraziamenti

E' giunto il momento dei ringraziamenti,

Volevo ringraziare la mia famiglia per il supporto datomi in questo percorso universitario per la pazienza e per tutti quei consigli che solo una famiglia è in grado di dare.

Volevo ringraziare la professoressa Pacetti e la sua assistente Anka, per l'esperienza che mi hanno fatto vivere in laboratorio per gli insegnamenti e per la loro professionalità. Persone, umanamente parlando, splendide che sanno sempre approcciare con i ragazzi e che mettono le loro conoscenze al servizio degli studenti.

Volevo ringraziare i miei compagni di viaggio nonché di università Daniele e Samuele, per aver condiviso esami, appunti, ansie. Senza di loro questo percorso sarebbe stato sicuramente più difficile. In primis li ringrazio soprattutto perché ho trovato degli amici. Amici insostituibili.

Ringrazio gli amici di sempre e quelli conosciuti nel percorso di vita, e tutte le persone che mi hanno aiutato in maniera determinante in questo mio percorso.

Per finire volevo ringraziare me stesso, per aver combattuto contro i miei più grandi ostacoli, contro chi si è messo di traverso, contro chi non credeva in me. Mi dedico soprattutto questo primo grande successo.