

CONTROLLO DELLA FASE DI MACERAZIONE DELLE BUCCE DI LIMONE NELLA PREPARAZIONE DEL LIQUORE DI LIMONE

GIORGIO NOTA - DANIELE NAVIGLIO - RAFFAELE ROMANO -
VALENTINA SABIA - GERARDINA ATTANASIO - SALVATORE SPAGNA MUSSO

Dipartimento di Scienza degli Alimenti - Università degli Studi di Napoli "Federico II" - Via Università 100 - 80055 Portici (Na) - Italia

EXAMINATION OF THE LEMON PEEL MACERATION STEP IN THE PREPARATION OF LEMON LIQUOR

SUMMARY

The kinetics of the alcoholic extraction of essential oils from lemon peel, for the preparation of lemon liquor, can be carried out by means of spectrophotometry UV-VIS or by gas chromatography. The spectrophotometric technique is able to determine the kinetics of the extraction of the total components in the essential oils, while the gas chromatography technique is able to follow the extraction of the single components. The curve representing the kinetics of extraction of the essential oils obtained spectrophotometrically has the same trend of the curve of the single major components obtained through gas chromatography. At room temperature, the components found in a larger concentration reach equilibrium after 24 hours, while those in minor concentration are completely extracted after 3 to 4 days. Furthermore a method is proposed that allows to follow the dilution kinetics of ethanol by water contained in the peel.

RIASSUNTO

La cinetica di estrazione degli oli essenziali dalle bucce di limone mediante etanolo, per la preparazione del liquore di limone, può essere seguita sia mediante spettrofotometria UV-VIS, sia mediante gas cromatografia. La tecnica spettrofotometrica è in grado di seguire la cinetica di estrazione dei componenti totali, mentre quella gascromatografica consente di seguire la cinetica dei singoli componenti degli oli essenziali. Le cinetiche ottenute spet-

trofotometricamente seguono lo stesso andamento delle cinetiche dei componenti maggiori ottenute per via gascromatografica. A temperatura ambiente i componenti presenti in maggiore concentrazione vanno all'equilibrio dopo 24 ore, mentre quelli minori sono estratti completamente dopo 3-4 giorni. Viene inoltre proposta una metodica che permette di seguire la cinetica di diluizione dell'etanolo da parte dell'acqua contenuta nelle bucce.

INTRODUZIONE

Il liquore di limone, chiamato comunemente anche "limoncello", è una tipica bevanda campana dal gusto di limone, che sia in Italia che all'estero, si sta affermando sempre di più per via del suo pregevole aroma e per le piacevoli sensazioni gustative che ricordano le caratteristiche del limone fresco (1,2); di questo liquore va anche ricordato il suo indubbio potere digestivo. La coltivazione degli agrumi, in particolar modo del limone, assume una particolare rilevanza per le zone dell'Italia meridionale (3).

La produzione di "limoncello" a partire dalle bucce di limone costituisce una notevole fonte di reddito special-

mente in zone turistiche, quali Capri, la penisola sorrentina e la costiera amalfitana. Attualmente la quasi totalità della produzione dei limoni di queste zone viene impiegata per la fabbricazione di questo liquore (4,5). Poiché la tecnologia di produzione è estremamente semplice, un gran numero di piccole e piccolissime imprese, spesso a carattere familiare, sono interessate alla sua preparazione. La produzione del "limoncello" prevede le seguenti fasi: 1) lavaggio dei limoni freschi; 2) pelatura; 3) macerazione delle bucce in alcool per 7-10 giorni, a temperatura ambiente; 4) filtrazione dell'estratto; 5) diluizione dell'estratto con un'opportuna quantità di acqua zuccherata; 6) imbottigliamento; 7) confezionamento.

Da quanto esposto risulta evidente che la fase più delicata è rappresentata dalla macerazione delle bucce in alcool; in questa fase gli oli essenziali, insieme ai coloranti ed all'acqua, diffondono dalle bucce verso l'alcool (6); contemporaneamente, l'alcool dall'esterno, in parte, migra nell'interno delle bucce. Il processo si arresta quando si perviene ad un equilibrio dinamico. Un tempo inferiore a 7 giorni non garantisce, secondo la tradizione, una completa estrazione degli oli essenziali dalle bucce e non assicurerebbe, pertanto, la produzione di un liquore soddisfacentemente aromatico. Durante la macerazione, nessuna operazione viene effettuata per accertare quando l'estrazione degli oli essenziali

può ritenersi completa. Ad equilibrio raggiunto, un prolungamento della fase estrattiva costituisce un'inutile perdita di tempo e, di conseguenza, un aggravio economico.

SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo di questo lavoro è di mettere a punto una o più procedure basate su tecniche strumentali adatte a seguire la cinetica d'estrazione degli oli essenziali dalle bucce di limone, poste a macerare in alcool. Ci proponiamo, inoltre, di mettere a punto una procedura che consenta di seguire la cinetica di diluizione dell'alcool etilico da parte dell'acqua contenuta nelle bucce stesse. Le procedure analitiche dovranno essere sufficientemente semplici in maniera da poter essere impiegate anche da ditte che dispongono di laboratori chimici modestamente attrezzati.

MATERIALI E METODI

Strumentazione e reattivi

Spettrofotometro UV-VIS mod. 1601 (Shimadzu, Tokyo, Giappone) con cuvette da 1 cm di percorso ottico; gascromatografo Auto System XL equipaggiato con iniettore programmabile PSS e rivelatore a ionizzazione di fiamma (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA); colonna capillare Rtx-5, con fase stazionaria 5% difenil-95% dimetil silicone, l = 30 m, i.d. = 0,25 mm, f.t. = 0,25 μ (Restek, Bellefonte, PA, USA); gascromatografo mod. 17A interfacciato con lo spettrometro di massa mod. QP-5000 (Shimadzu, Tokyo, Giappone), operante con modalità di iniezione split-splitless ed equipaggiato con colonna capillare SPB-5, l = 60 m, i.d. = 0,25 mm, f.t. = 0,25 μ (Supelco, Bellefonte, PA, USA); titolatore di acqua Karl Fisher, mod. KF 2026 (Crison Instrument, Baar, Svizzera).

Etanolo 95% (Fluka, Dublino, Irlanda), Metanolo (Fluka, Dublino, Irlanda),

Hydranal Titrant 5 e Hydranal Solvent (Riedel-de Haen, Seelze, Germania), n-dodecano puro per analisi (Fluka, Dublino, Irlanda), limonene, β -pinene, γ -terpinene, α -pinene, sabinene, geraniale, tutti puri per analisi (Fluka, Dublino, Irlanda).

Procedura per l'estrazione degli oli essenziali dalle bucce di limone mediante etanolo al 95%

- Lavare ed asciugare i limoni.
- Sbucciare i limoni, separando l'albedo dal flavedo, per quanto è possibile.
- In un recipiente di vetro porre una opportuna quantità di bucce di limone (30 g possono essere adeguati) e 100 ml di etanolo al 95% (v/v).
- Coprire, porre in termostato alla temperatura di 20°C e lasciare macerare per il tempo desiderato, con occasionale agitazione.

Procedura per la determinazione della cinetica d'estrazione degli oli essenziali dalle bucce mediante spettrofotometria

- In funzione del tempo, dopo agitazione, prelevare un'aliquota dell'estratto e misurare l'assorbanza, senza diluire, a 400 nm; prelevare un'altra aliquota dell'estratto e misurarne l'assorbanza a 275 nm, dopo opportuna diluizione.
- Per ogni lunghezza d'onda, riportare in grafico l'assorbanza in funzione del tempo.

Procedura per la determinazione della cinetica d'estrazione degli oli essenziali dalle bucce mediante gas cromatografia

- In funzione del tempo, prelevare, dopo agitazione, 1,00 ml di estratto ed aggiungere 1,00 ml di soluzione etanolica di n-dodecano 100 mg/l, come standard interno.
- Sottoporre la soluzione così ottenuta ad analisi gas cromatografica.
- Riportare in grafico i rapporti tra le

aree dei picchi dei composti limonene, β -pinene, γ -terpinene e l'area dello standard interno.

- Riportare in grafico i rapporti tra le aree dei picchi dei composti α -pinene, sabinene, geraniale e l'area dello standard interno.

Procedura per la determinazione della cinetica di diluizione dell'etanolo con l'acqua derivante dalle bucce, durante la fase di estrazione degli oli essenziali

- Prelevare 100 μ l dell'estratto alcolico delle bucce di limone e titolare l'acqua in esso contenuta utilizzando il titolatore di Karl Fisher.
- Effettuare la determinazione dell'acqua nell'estratto alcolico ogni 15 minuti per le prime due ore; successivamente ogni ora.
- Riportare in grafico la concentrazione dell'acqua contenuta nell'estratto, in funzione del tempo.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Cinetica d'estrazione degli oli essenziali dalle bucce di limone per via spettrofotometrica

La cinetica d'estrazione degli oli essenziali mediante etanolo può essere seguita mediante misure strumentali. Lo spettro d'assorbimento dell'estratto condotto tra 200 e 500 nm indica che la soluzione assorbe in maniera significativa in tutto l'intervallo esplorato. Gli spettri d'assorbimento tra 200 e 500 nm, effettuati sull'estratto durante la fase di macerazione, presentano tutti lo stesso aspetto, il che sta a significare che i principali composti degli oli essenziali, responsabili dell'assorbanza, vengono estratti, nel tempo, sempre nello stesso rapporto.

In fig. 1 vengono riportate le assorbanze in funzione del tempo, a 275 e a 400 nm. La misura dell'assorbanza a 400 nm segue la variazione di concen-

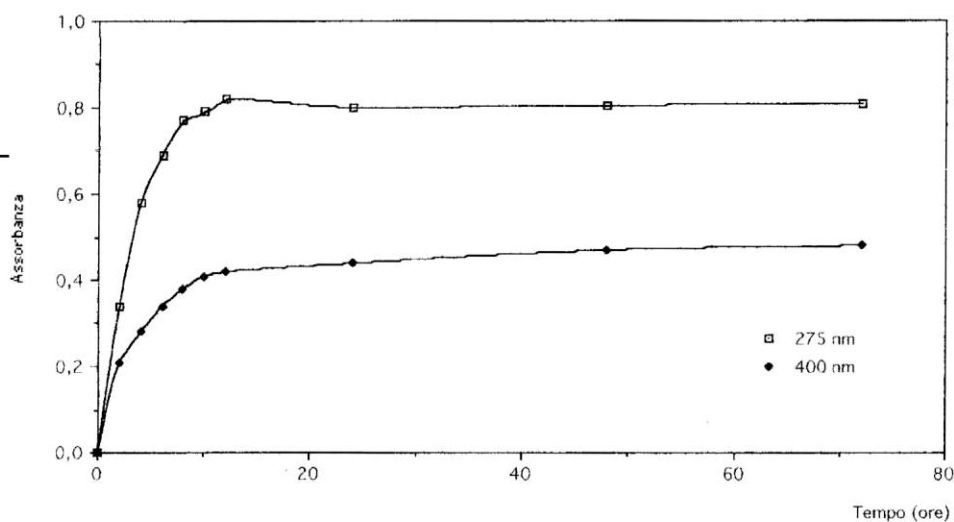


Fig. 1 - Assorbanza a $\lambda = 275$ nm e a $\lambda = 400$ nm esibita da un estratto alcolico di bucce di limone a vari tempi di macerazione.

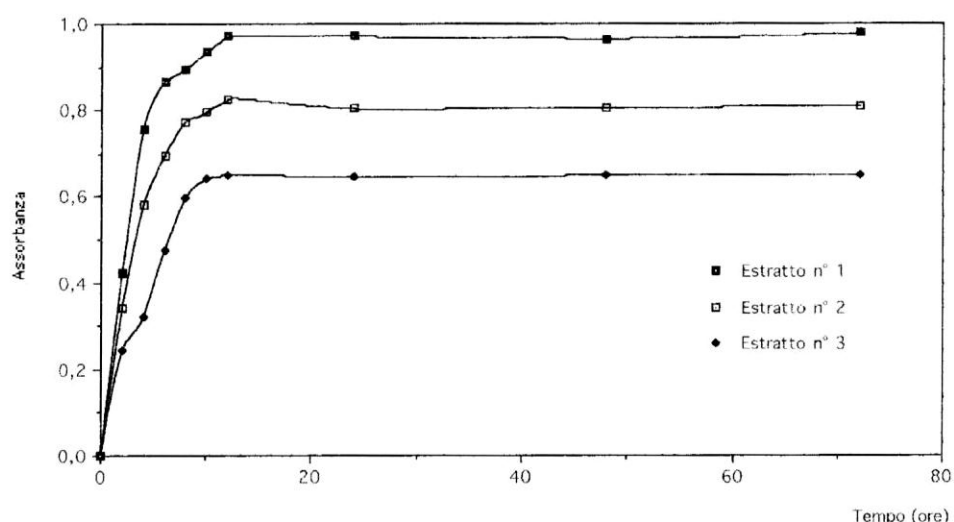


Fig. 2A - Assorbanza misurata a $\lambda = 275$ nm in funzione del tempo di macerazione per tre estratti alcolici preparati con bucce di limone colti dalla stessa pianta.

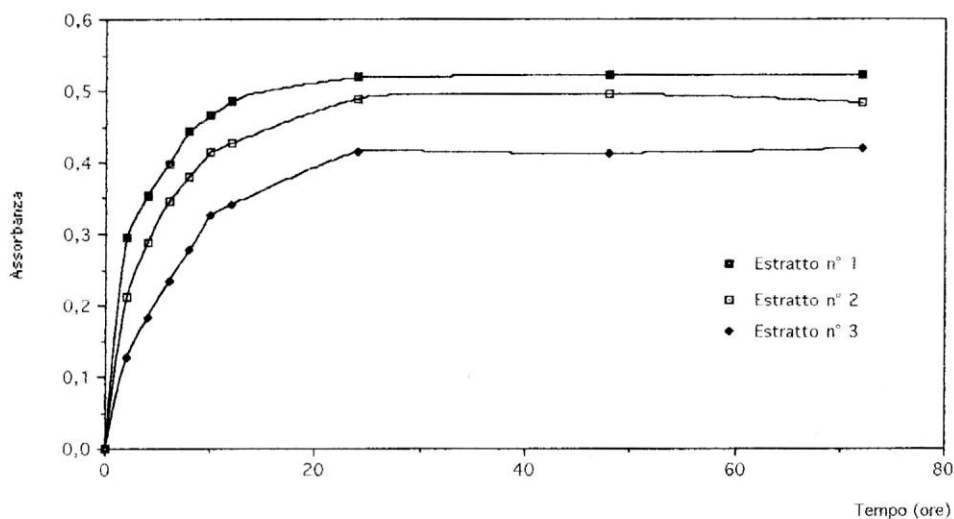


Fig. 2B - Assorbanza misurata a $\lambda = 400$ nm in funzione del tempo di macerazione per tre estratti alcolici preparati con bucce di limone colti dalla stessa pianta.

trazione dei coloranti naturali e può essere effettuata sull'estratto tal quale anche dopo appena 30 minuti dall'inizio della fase di estrazione; per la misura dell'assorbanza a 275 nm occorre diluire l'estratto con etanolo. Come si può osservare, ad entrambe le lunghezze d'onda, durante la fase d'estrazione, le assorbance dapprima crescono e poi assumono un valore costante. Gli andamenti delle due curve indicano che le assorbance raggiungono un valore costante nello stesso tempo; ciò significa che è possibile seguire l'estrazione degli oli essenziali dalle bucce sia attraverso la misura dell'intensità del colore a 400 nm, sia attraverso la variazione dell'assorbance a 275 nm.

Nelle fig. 2A e 2B vengono riportate le cinetiche di estrazione a 275 ed a 400 nm per tre estratti preparati mettendo a macerare 30 g di bucce per 100 ml di alcool etilico; le bucce sono state ricavate da limoni colti dalla stessa pianta. Come si può osservare le tre curve non sono sovrapponibili; lo scarto delle assorbance rispetto alla media può anche arrivare al 20% se si confrontano i risultati nella parte della curva parallela all'asse dei tempi, stando a dimostrare la non uniforme distribuzione degli oli essenziali e dei coloranti nelle bucce di frutti diversi, pur prelevati dalla stessa pianta. Fortunatamente le tre curve seguono un andamento simile e le assorbance raggiungono un valore comune dopo lo stesso tempo.

Cinetica d'estrazione degli oli essenziali dalle bucce di limone per via gascromatografica

In fig. 3 viene riportato un tipico cromatogramma di un estratto alcolico ottenuto tramite GC/MS dopo un giorno di infusione delle bucce di limone in alcool etilico. I picchi principali, riportati in tab. 1, sono stati identificati sia sulla base del confronto dei tempi di ritenzione di standard puri, sia sulla base degli spettri di massa. Campioni di estratti, prelevati in tempi diversi, sono

stati analizzati per via gas cromatografica.

In fig. 4 vengono riportati, in funzione del tempo di macerazione, i rapporti tra le aree dei picchi relativi al limonene, β -pinene, e γ -terpinene presenti nell'olio essenziale del limone in notevoli quantità (componenti maggiori) e l'area dello standard interno (n-dodecano); nella fig. 5 vengono riportate le variazioni, nel tempo, dei rapporti tra le aree relative all' α -pinene, sabinene, geraniale (componenti minori) e l'area dello standard interno. Come si può osservare le concentrazioni negli estratti, relative ai componenti maggiori, vanno a costanza nello stesso tempo; dopo un giorno, per questi composti l'estrazione può ritenersi conclusa. Le curve relative ai componenti minori presentano un andamento differente, indicando che i componenti minori vengono estratti più lentamente; tale comportamento era da attendere, in quanto questi composti vengono spinti in soluzione da un gradiente di concentrazione più basso; per questi composti il tempo necessario per una completa estrazione è di quattro giorni.

Il confronto delle curve spettrofotometriche con le curve gascromatografiche, relative ai componenti maggiori, indica che queste curve vanno a costanza dopo lo stesso tempo. Pertanto l'andamento dell'estrazione, per i componenti maggiori, può essere seguito sia per via spettrofotometrica, sia per via gascromatografica; l'andamento dell'estrazione dei componenti minori può solo essere seguito per via gascromatografica.

Effetto di diluizione dell'alcool etilico durante la macerazione delle bucce

Le bucce di limone, fresche, presentano un notevole contenuto di acqua. Abbiamo ipotizzato che durante la macerazione si verifica una diffusione dell'etanolo nell'interno delle bucce, e dell'acqua dalle bucce verso l'etanolo. Secondo questa ipotesi, durante la fase

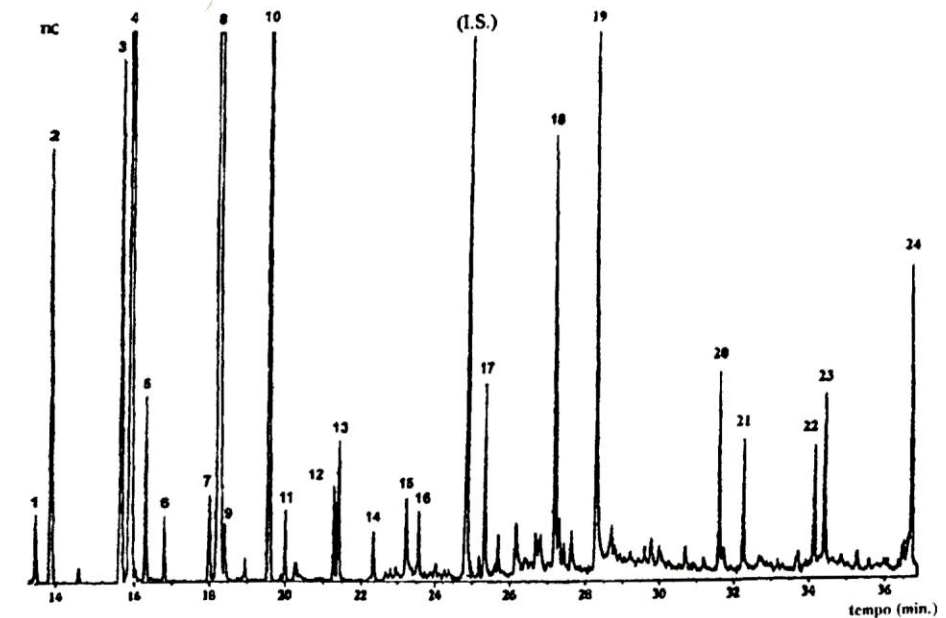


Fig. 3 - Cromatogramma GC/MS di un estratto alcolico di bucce di limone aggiunto di standard interno n-dodecano (I.S.). I numeri dei picchi corrispondono ai composti riportati in tab. 1.

estrattiva, l'alcole si diluisce; in aggiunta, diffondendo nell'interno delle bucce non è immediatamente recuperabile. Poiché il contenuto d'acqua delle bucce è di circa il 70% in peso e poiché si mettono di solito a macerare 30 g di bucce per ogni 100 ml di alcool etilico al 95% (v/v), ad equilibrio raggiunto la concentrazione dell'alcool dovrebbe scendere intorno all'80% (v/v); inoltre dovrebbero rimanere nei pori delle bucce circa 20 ml di etanolo all'80% (v/v).

Misure sperimentali effettuate sull'estratto alcolico, ad equilibrio raggiunto, indicano che la concentrazione dell'etanolo passa dal 95% (v/v) al 78% (v/v), in buon accordo con il valore ipotizzato. In fig. 5 viene riportata la curva sperimentale della cinetica di diluizione dell'alcool durante la macerazione. Come si può notare, occorrono circa quattro ore per il raggiungimento dell'equilibrio acqua-alcool etilico. Poiché, come visto, occorrono ventiquattro ore per estrarre completamente i principali componenti degli oli essenziali, non è possibile evitare la diluizione dell'etanolo.

Tabella 1 - Identificazione dei picchi del cromatogramma GC/MS di un estratto alcolico di bucce di limone riportato in fig. 3.

	Composto	tr, min	%
(1)	α -tuienene	13,493	0,40
(2)	α -pinene	13,883	1,81
(3)	sabinene	15,597	1,85
(4)	β -pinene	15,883	13,25
(5)	mircene	16,323	1,43
(6)	α -fellandrene	16,798	0,35
(7)	α -terpinene	18,038	0,19
(8)	limonene	18,351	65,29
(9)	<i>trans</i> -ocimene	18,401	0,06
(10)	γ -terpinene	19,612	9,81
(11)	<i>trans</i> -sabinene idrato	19,994	0,24
(12)	<i>cis</i> -sabinene idrato	21,280	0,31
(13)	linalolo	21,413	0,33
(14)	citronellale	22,333	0,15
(15)	4-nonanolo	23,225	0,18
(16)	terpinen-4-olo	23,555	0,14
(17)	α -terpineolo	25,326	0,35
(18)	nerale	27,170	0,87
(19)	geraniale	28,262	1,47
(20)	nerile acetato	31,587	0,44
(21)	geranil acetato	32,329	0,46
(22)	β -cariofillene	34,118	0,28
(23)	α -bergamottene	34,390	0,43
(24)	β -bisabolene	36,687	0,61

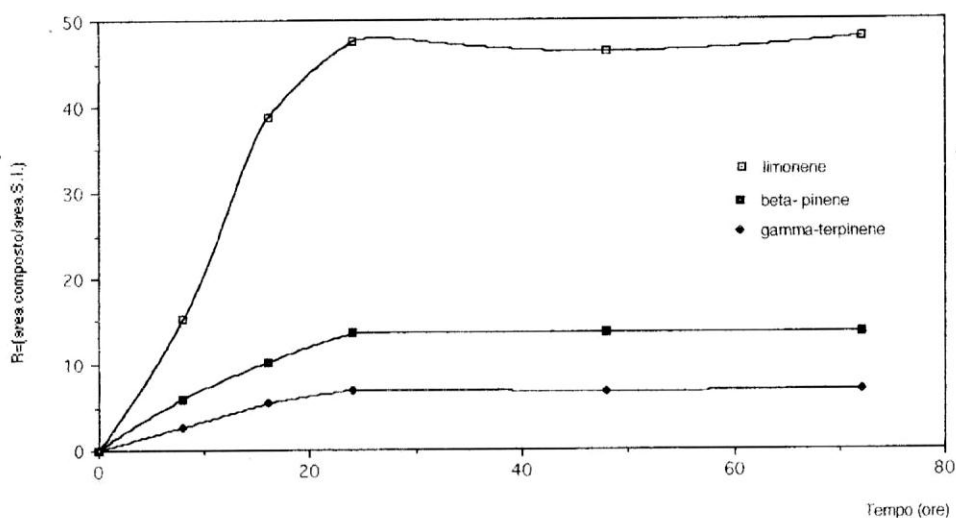


Fig. 4 - Cinetica di estrazione dei composti più abbondanti nelle bucce di limone seguita per via gascromatografica. Viene riportato l'andamento del rapporto area composto/area S.I. in funzione del tempo di macerazione.

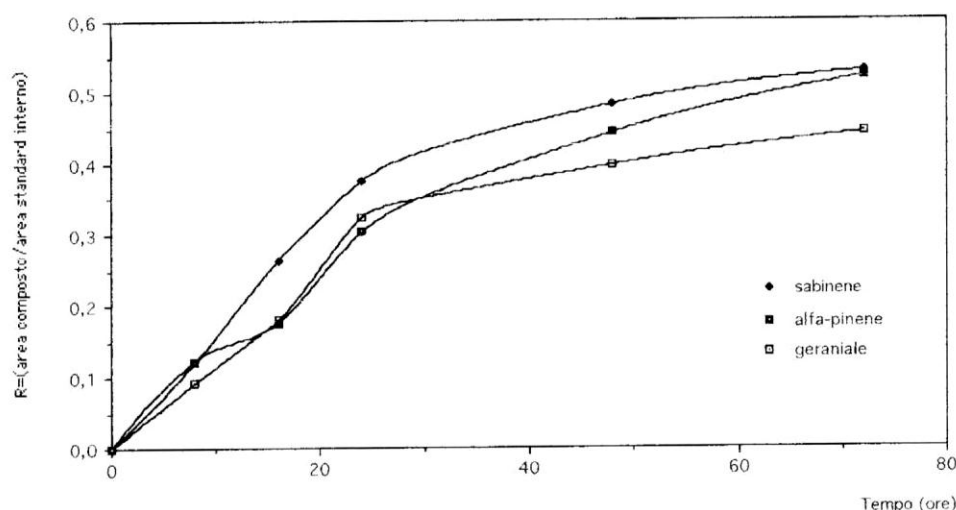


Fig. 5 - Cinetica di estrazione dei composti meno abbondanti nelle bucce di limone seguita per via gascromatografica. Viene riportato l'andamento del rapporto area composto/area S.I. in funzione del tempo di macerazione.

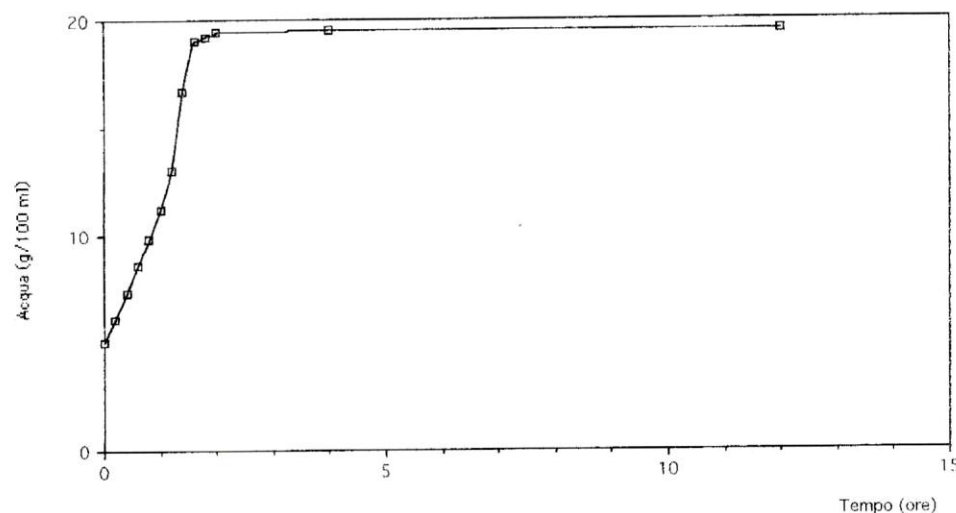


Fig. 6 - Cinetica di estrazione dell'acqua dalle bucce di limone. Viene riportata la quantità di acqua espressa in grammi presente in 100 ml di estratto in funzione del tempo di macerazione.

CONCLUSIONI

L'estrazione dei componenti maggiori degli oli essenziali, dalle bucce di limone, mediante alcool etilico può essere seguita mediante misure spettrofotometriche nel visibile e/o nel UV. Mediante gas cromatografia si possono seguire le cinetiche sia dei componenti maggiori, sia dei componenti minori. I componenti maggiori sono estratti completamente dopo un giorno; per i componenti minori sono necessari tre giorni di infusione delle bucce di limone in alcool etilico. Durante la fase di macerazione si osserva una diluizione dell'etanolo dovuta all'acqua presente nelle bucce; ad equilibrio raggiunto la concentrazione dell'alcool passa dal 95% (v/v) al 78% (v/v). La cinetica di estrazione dell'acqua dalle bucce è molto più veloce della cinetica relativa ai componenti degli oli essenziali per cui non è possibile estrarre questi ultimi senza abbassare il grado alcolico iniziale dell'alcool etilico impiegato.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Kimball D. (1991). Citrus processing - Quality control and technology. Van Nostrand Reinhold. New York.
- 2) Autori vari (1995). Prodotti agro-alimentari tipici della Campania. Dipartimento di Economia e Politica Agraria, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Napoli "Federico II".
- 3) Spina P. (1985). Trattato di agrumicoltura. Edagricole.
- 4) Di Giacomo A., Rapisarda P., Safina G. (1991). L'industria dei derivati agrumari. Problematiche generali del settore. Rivista delle Essenze e dei Derivati Agrumari, 31, 209-226.
- 5) Di Giacomo A., Mincione B. (1994). Gli oli essenziali agrumari in Italia; RAISA-CNR sottoprogetto 4; Laruffa Editore.
- 6) Rodriguez-Amaya D. (1993). Stability of carotenoids during the storage of food. Departamento de Ciencia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Brasile.