

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI FARMACIA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE
CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN FARMACIA**



Tesi di Laurea

**UTILIZZO DELL'ANALISI CROMATOGRAFICA
PER LA DETERMINAZIONE DELLA
SEROTONINA E DI ALTRE AMMINE BIOGENE
NEL CACAO**

Relatore: Ch.ma Prof.ssa Mirella Zancato

Laureanda: Sara Balzan

Anno Accademico 2007-2008

1. SIMBOLI ED ABBREVIAZIONI

a.C.	avanti Cristo
ACN	acetonitrile
AU	unità di assorbenza
C	carbonio
FM	fase mobile
FS	fase stazionaria
H	idrogeno
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
MAO	monoaminossidasi
N	azoto
PEA	feniletilammina
RPM	rotazioni per minuto
TFA	acido trifluoroacetico
UE	Unione Europea
UV	ultravioletto
Vis	visibile

2. INTRODUZIONE

2.1 THEOBROMA CACAO

2.1.1 Origine e diffusione

Theobroma cacao è il nome scientifico con il quale Linneo, biologo svedese considerato il padre della moderna “classificazione scientifica” degli organismi viventi, identificò la pianta del cacao.

La traduzione dal greco di Theobroma significa “cibo degli dei”, ma l’etimologia del termine “cacao” si basa su diverse teorie formulate negli anni.

Cacao, nella lingua della famiglia mixe-zoqueana che parlavano gli olmechi attorno al 1000 a.C., si pronunciava *kakawa*. In epoche successive i maya, più precisamente nel corso del loro periodo classico, iniziano a chiamare il theobroma *kakaw*. Essi amavano la bevanda di cacao preparata con acqua calda e poiché acqua si diceva *haa* e caldo si diceva *chaca*, la bevanda di cacao assunse il semplice nome di *chacauhaa*. Sinonimo di *chacau* era *chocol*, da cui deriva *chocolhaa*, sicuramente il primo nome che si avvicina allo spagnolo *chocolate*.

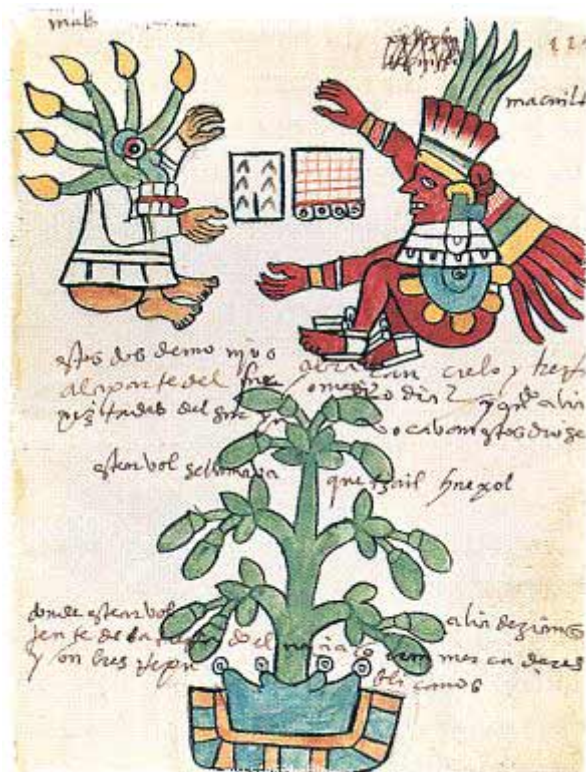
Una seconda teoria sull’origine della parola cacao è narrata dalla leggenda secondo la quale il dio azteco Quetzalcoàtal donò ai mortali il seme del cacao per farne una bevanda amara, energetica e afrodisiaca. Secondo tale teoria da qui deriverebbe il nome del seme *cacahuatl* e poi anche di *chocolatl*.

Una ulteriore teoria si basa sull’etimologia proposta da Thomas Gage in cui oltre al termine nahuatl *atl* si aggiunge *choco*, onomatopeico che indicherebbe il suono prodotto dal molinillo che agita la mistura durante la preparazione.

La pianta del cacao originò nelle foreste umide dei tropici americani, nei contrafforti orientali delle Ande dell’ Ecuador e delle Colombia, tra i fiumi Napo, Putumayo e Caquetà. I primi agricoltori che ne iniziarono la coltivazione furono i maya più di 2000 anni fa, anche se precise ricerche botaniche hanno stabilito che le sue origini risalgono a più di 6000 anni fa. Essi lo utilizzavano come alimento e moneta di scambio, arrivando quasi alla sua venerazione. Con valore mistico e religioso, il

cacao infatti veniva consumato durante le cerimonie importanti, offerto insieme all'incenso come sacrificio alle divinità. A conferma di ciò sono stati trovati diversi esempi di raffigurazioni della piana di cacao su alcuni vasi e codici minati maya. Oltre ad un uso liturgico e cerimoniale, nelle Americhe si diffuse anche il consumo di una bevanda chiamata *xocoalt*, preparata con chicchi di cacao fermentati macinati con pietre e cotti con acqua, che si mischiava con spezie, miele di agave, farina di mais fermentata, annatto e vaniglia. Secondo la tradizione meso-americana il cioccolato veniva assunto in forma di bevanda fresca, amara, densa e spumeggiante. Alla fine dell'era maya, i toltechi (X-XII secolo) e quindi gli aztechi, la cui ascesa incominciò nel XII secolo, proseguirono la sua coltivazione. Furono proprio questi ultimi a far conoscere ai conquistatori spagnoli il cacao all'inizio del XVI secolo. Sembra comunque che il primo contatto europeo con il cacao sia avvenuto nel 1502 durante il quarto viaggio di Cristoforo Colombo che sbarcato in Honduras ebbe l'occasione di assaggiare una bevanda a base di cacao e di portare con sé alcuni semi di cacao da mostrare a Ferdinando e Isabella di Spagna, che però non diedero alcuna importanza alla scoperta.

Si deve attendere il 1528 perché Hernán Cortés veda alla corte di Montezuma II la preparazione della cioccolata, condividendone il consumo. La ricetta della preparazione raggiunse ben presto



la Spagna, punto di partenza per la sua divulgazione in Europa. Dopo aver compreso il valore del cacao dagli aztechi, nel secolo XVI gli spagnoli favorirono la moltiplicazione delle sue coltivazioni in America centrale.

Solo nel '600, l'Italia poté conoscere la popolarità della cioccolata in Europa per merito del commerciante Antonio Carletti che trasportò la ricetta dalla Spagna alla

Toscana. Le tracce dell'antico legame fra Firenze e la cioccolata si ritrovano in alcuni fondi librari della Biblioteca Nazionale Centrale di Firenze.

Nel XVII secolo divenne un lusso tra i nobili d'Europa e gli Olandesi, abili navigatori, ne strapparono agli Spagnoli il controllo mondiale e il predominio commerciale.

Nella Venezia del '700 la cioccolata trovò la sua commercializzazione nelle prime "botteghe del caffè" che erano certamente anche botteghe della cioccolata e che facevano a gara per modificare la ricetta esistente inventando nuove versioni.

Fino a tutto il XVIII secolo il cioccolato venne considerato la panacea di tutti i mali e gli si attribuirono virtù miracolose. Nel 1760 la Gazzetta Veneta documentò l'ormai enorme diffusione del prodotto, molti stati come il Brasile, la Martinica e le Filippine aumentarono in modo spropositato la coltivazione del cacao.

La tappa fondamentale per il passaggio da cioccolata liquida a solida, la forma attualmente più consumata, è rappresentata dalla invenzione dell'olandese C. J. Van Houten di una macchina per separare il grasso dai semi tostati e macinati trasformandoli in *cacao in polvere* e *burro di cacao*. Egli sviluppò anche un processo di alcalinizzazione per neutralizzare gli acidi e rendere la polvere più solubile in acqua. Ancora oggi questo metodo è conosciuto con il nome



di "processo olandese". Daniel Peter, un fabbricante di candele svizzero, si unì al suocero nella produzione di cioccolato e

nel 1867 con l'aiuto di un fabbricante di alimenti per l'infanzia di nome Henri Nestlé

iniziarono ad includere il latte tra gli ingredienti. Prestando

attenzione a rimuovere l'acqua contenuta nel latte per poter

consentirne una più lunga conservazione, presentarono sul mercato nel 1875 il *cioccolato al latte*. In quegli stessi anni,



Rudolph Lindt mise a punto la tecnica chiamata *concaggio o conching*, fondamentale per ottenere una pasta di cacao omogenea.

La fortuna del cioccolato in Italia partì da Torino, città che ne divenne la capitale e che ancora oggi ne conserva la fama. Qui nel 1964 Pietro Ferrero inventò una crema di cioccolato e nocciole che chiamò *pasta Gianduia* con l'intenzione di venderne qualche chilo ai pasticceri di Alba (Piemonte), ma il prodotto ebbe un successo

superiore alle aspettative e qualche anno dopo, nel 1964, nacque la *Nutella* che divenne popolare in tutto il mondo.

Occorre ricordare che il cacao è stato anche motivo di continua lotta finanziaria tra i grandi esportatori (Africa e Brasile) ed i mercati d'acquisto (Europa e USA).



L'iniziale rialzo dei pezzi provocò una forma di boicottaggio commerciale soppresso dalle necessità della seconda guerra mondiale. Terminata la guerra, vi fu una diminuzione del prodotto, determinato dalle malattie e dall'invecchiamento delle piantagioni, sintomo di una non oculata gestione delle stesse.

2.1.2 Caratteristiche botaniche e coltivazione della pianta del cacao

Il cacao (*Theobroma cacao*) appartiene alla famiglia delle Sterculiaceae e all'ordine delle Malvales. La sua coltivazione richiede climi caldo-umidi: temperature comprese tra 20° e 30°C e umidità elevata e costante; sono inoltre essenziali precipitazioni copiose ben distribuite.

Gli alberi generati attraverso i semi, possiedono una *radice* allungata, profonda, che permette loro un buon ancoraggio e un gran numero di radici secondarie superficiali che assorbono l'umidità e i nutrienti, ma che non permettono loro di resistere molto alla siccità. Il *Theobroma cacao* è infatti un albero che non tollera l'insolazione diretta, per questo motivo viene coltivato all'ombra di altre specie ad alto fusto (banani, palme di cocco) definite "piantagioni madri del cacao".

La *riproduzione* sessuale è la più comune, ma si riproduce facilmente anche per riproduzione asessuale: talee, innesti, propaggini. Le *foglie* sono persistenti, alterne, ovali, con margine lievemente ondulato, lucide nella parte superiore, con picciolo fogliare dotato di articolazione che permette di orientarsi a seconda dell'intensità luminosa. Il cacao è una pianta cauliflora, questo significa che produce i suoi *fiori* lungo il tronco e i suoi rami principali, in strutture chiamate "cuscini floreali". I fiori sono piccoli ed ermafroditi in gran numero, ma si impollinano soltanto il 5-10% dei fiori prodotti. I *frutti* sono bacche chiamate "chireles", quando sono piccoli, mentre allo stato adulto sono chiamate "cabosse"; la percentuale di "chireles" che arrivano

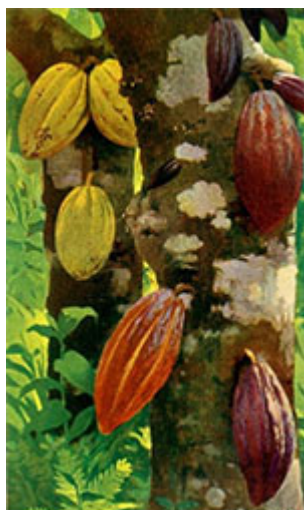
allo stato di “cabosse” è bassa, e questo fatto è considerato come un fenomeno di regolazione della produzione, in funzione della capacità fisiologica degli alberi. Si presentano sferici, cilindrici, appuntiti o smussati, lisci o rugosi, duri o morbidi a maturità. Il colore cambia secondo il grado di maturazione, variando dal verde al giallo o dal rosso all’arancione. La maturazione dei frutti, a seconda dei genotipi, dura tra i 4,5 e i 7 mesi, e le loro caratteristiche variano da una varietà all’altra e anche all’interno della stessa varietà. I semi (chiamati anche *fave*) in numero da 20 a 60 per frutto, sono disposti in file regolari ed immersi in una polpa mucillaginosa acidula contenente acqua, glucosio e fruttosio. La loro produzione comincia tra 1,5 e 5 anni dopo la messa a dimora degli alberi, a seconda della precocità della specie e delle condizioni ambientali.

2.1.3 Le varietà di *Theobroma cacao*

Attualmente si riconoscono 2 grandi gruppi botanici di cacao:

I - i cacao *criollos o finos* (creoli o fini)

II - i cacao *forasteros o amazonicos* (forestieri o amazzonici)



I cacao **criollos o finos** appartengono alla specie del *Theobroma cacao* subsp. *cacao*, si trovano principalmente in Messico, Colombia e Venezuela e si incontrano sempre come piante coltivate, ma sono soggette ad una grande erosione genetica. Questa è dovuta principalmente alla loro grande suscettibilità alle malattie, alle infezioni e alla grave riduzione del loro habitat, specialmente in Messico e nel Centro America. I cacao si sono riprodotti per semi e perciò presentano una grande variazione morfologica. Le loro bacche o cabosse sono allungate e poco lignificate, hanno una superficie rugosa con cinque suture o solchi molto marcati e terminano con una punta contorta, sono di colore verde o rossiccio quando mature; hanno semi lunghi e rotondi di colore bianco, fermentano facilmente e possiedono un aroma gradevole e

penetrante. Questa è la qualità migliore di cacao, ma la produzione mondiale si attesta attorno al 3%. Essendo molto costoso raramente viene usato da solo e spesso lo si trova miscelato con altre qualità.

I cacao **forasteros** o **amazonicos** appartengono alla specie del *Teobroma cacao* subsp. *sphaerocarpum* e costituiscono un gruppo molto diversificato. Si trovano allo stato selvatico nelle conche dei fiumi Orinoco e Rio delle Amazzoni. Sono alberi robusti con frutti ovali o rotondeggianti, superficie liscia, gialli o rossicci quando maturi, semi piccoli e appiattiti, di colore viola o biancastro, sapore forte senza aroma, qualità mediocre. Più resistenti alle malattie rispetto ai creoli.



Esistono poi i cacao **Trinitari** che presentano caratteristiche e qualità intermedie. Questi cacao furono selezionati a Trinidad come incroci naturali tra i Criollos, di cui possiedono la finezza dell'aroma e i Forasteros di cui possiedono la particolare resistenza alle malattie. Essi rappresentano il 10-

15% della produzione mondiale.

2.1.4 Le tappe della lavorazione

Il cacao è uno dei prodotti coloniali che subisce più trasformazioni prima di essere consumato. La lavorazione del cacao non avviene quasi mai nei paesi produttori a causa della mancanza di norme igieniche, ma generalmente avvengono negli USA e in Europa dove padroneggiano importanti imprese quali Mars, Hershey, Philipps Morris, Cadbury, Ferrero e Nestlé.

La **raccolta (1)**, la **fermentazione (2)** e l'**essiccazione (3)** sono le prime tre tappe di questo processo.

- **(1)** I frutti che crescono sul tronco e sui rami più grandi della pianta, vengono staccati per estrarne le fave che si trovano racchiuse nella polpa mucillaginosa composta principalmente da zuccheri. La polpa viene messa in tinozze di legno, cesti o stesa su fogli di banana per qualche giorno, a 40°-50°C, per favorire il processo della fermentazione.



- **(2)** La fermentazione consiste nella separazione delle fave di cacao dalla loro buccia e permette lo sviluppo degli oli essenziali. I microrganismi responsabili della fermentazione del cacao sono naturalmente presenti sulla matrice vegetale e nell'ambiente. Essi provocano delle modificazioni, quali la rottura delle pareti cellulari e la mescolanza dei composti fenolici con gli altri metabolici secondari. Il calore è necessario per liquefare la rimanente mucillagine, in cui gli zuccheri si trasformano in acidi (ac. lattico, ac. acetico) e soprattutto permette al tannino di formare tramite ossidazione il caratteristico colore bruno dei semi. La fermentazione ha inoltre la capacità di ridurre l'intensità dell'amaro e l'astringenza, per questo una buona fermentazione determina la qualità e il prezzo del cacao.

- **(3)** Il cacao fermentato viene poi essiccato per ridurre il tasso di umidità delle fave ancora molto ricche d'acqua. L'essiccazione può avvenire naturalmente al sole o mediante metodi artificiali che vedono l'utilizzo di stufe. Durante questo processo che dura diversi giorni, l'umidità nelle fave viene ridotta fino al 5-8% con



conseguente miglioramento della conservazione del cacao e perdita di peso (circa 2/3 del seme fresco) .

La lavorazione prosegue poi con la **spedizione (4)** e la **tostatura (5)** così da ottenere le fave di cacao.

- **(4)** Le fave essiccate vengono messe in sacchi di juta per evitare che il cacao assorba odori o venga a contatto con sostanze sgradevoli, e spedite nei centri di distribuzione. Qui avviene una ripulitura dei semi, per separare le fave da impurità e corpi estranei, e lo stoccaggio che può aver luogo sia in silos che in magazzini refrigerati.

- **(5)** Le fave spedite nei luoghi di tostatura vengono pulite da eventuali impurità e miscelate. La tostatura viene effettuata con aria riscaldata tra 120° e 140°C. Il tempo di tostatura varia da produttore a produttore a seconda del risultato che si vuole ottenere. Esistono diversi metodi di tostatura: classico, ad infrarossi, ad ultravioletti. La tostatura riveste una duplice funzione: tecnologica, promuovendo la formazione dell'aroma attraverso l'ossidazione dei composti fenolici, l'instaurarsi delle reazioni di Maillard, facilitando l'eliminazione dell'acido acetico e di altri esteri volatili negativi per l'aroma; e igienico-sanitaria, uccidendo microrganismi, uova e larve di parassiti sopravvissuti ai processi precedenti.

A conclusione di questa fase si sviluppa perciò l'aroma e il sapore tipico del cacao, i semi induriscono, diventano fragili e facilmente lavorabili.

Si prosegue quindi con la **macinazione (6)**, la **preparazione della ricetta (7)**, la **raffinazione (8)**, il **concaggio (9)**, il **temperaggio (10)** e il **modellaggio (11)** per produrre i prodotti alimentari a base di cacao.

- **(6)** La macinazione consiste nella frantumazione delle fave con mulini artigianali dotati di rulli di granito e la trasformazione del cacao in granella, il cui risultato finale è circa 54% di burro di cacao e il 46% di parte "magra" che a seconda dell'uso avrà granulometria diversa. La granulometria ottenuta viene messa in una macchina tritratrice chiamata "mélangeur", che la trasforma in un prodotto semilavorato denso e cremoso, detto "liquor" o "pasta di cacao". Questa viene poi divisa in pani, che necessitano di una breve stagionatura, protratta per circa 3-4 mesi prima di venire immessa in commercio.

- **(7)** In funzione del prodotto che si vuole preparare, si mescolano tutti gli ingredienti (zucchero, latte, nocciole, etc) e si ottiene una massa a base di cioccolato. Si aggiunge quindi lecitina, ingrediente fondamentale per emulsionare le tracce di

umidità con la parte lipidica, abbassando la viscosità e aumentando la fluidità del cioccolato. La lecitina di soia permette di abbassare le temperature di concaggio migliorando lo sviluppo dell'aroma finale e riducendo l'affioramento del burro di cacao.

- **(8)** Convogliando la massa ottenuta nei nulli delle refrigeratrici riduciamo la granulometria del cioccolato alle dimensioni di 30-40 μm .

- **(9)** Il concaggio richiede la lavorazione della pasta di cacao in grandi conche dove viene mantenuta ad una temperatura di 60°-80°C per un periodo che varia dalle 8 ore a 15 giorni, se il prodotto è molto raffinato. Grazie alla temperatura e al movimento rotatorio continuo che lo mescola si ottiene un prodotto liquido e privo di sostanze acide (acetone, etanolo, metanolo, acido acetico) ancora presenti, senza perdere l'aroma. A questo punto della lavorazione vengono aggiunti anche gli altri ingredienti come il burro di cacao e la lecitina di soia.

- **(10)** Il temperaggio consiste in uno shock termico che viene applicato al cacao con lo scopo di far solidificare il burro di cacao, orientando la cristallizzazione in una forma stabile per evitare che i cristalli affiorino, rendendo così il prodotto consistente e ben conservabile. In questa fase il cacao viene lentamente portato fino a 45°C, così che la parte lipidica possa fondere completamente, viene quindi raffreddato rapidamente fino a 27°C in una macchina detta "temperatrice" e successivamente portato di nuovo a 29°-30°C per il cioccolato al latte e 31°C per il fondente.



- **(11)** Il modellaggio è la fase finale, dove il cioccolato liquido viene introdotto in stampi di acciaio su nastri in movimento sottoposti a vibrazioni per eliminare il più possibile le bolle d'aria all'interno. Questi vengono poi raffreddati a circa 10°C in modo che il cioccolato solidificatosi si contrae staccandosi facilmente da essi. In fase di stoccaggio il cioccolato si conserva ad una temperatura di 15-16°C e ad un'umidità relativa inferiore al 50%.

2.2 IL LATO COMMERCIALE DEL CACAO

2.2.1 La produzione artigianale

Il lungo viaggio del cacao per arrivare nelle nostre pasticcerie nelle forme e nei gusti che conosciamo parte dalle aree tropicali del mondo, dove vengono coltivate le varie specie di *Theobroma cacao*.

La raccolta e la trasformazione del cacao richiedono molto lavoro, che consiste in numerosi passaggi e trattamenti, dai quali dipende la qualità del prodotto finito.

E' per questo motivo che al giorno d'oggi molti pasticceri artigiani produttori di cioccolato, decidono di curare il processo di lavorazione del cacao fin dalle sue origini, ovvero a partire dal frutto. Il materiale di partenza dunque non è più solo la pasta di cacao, ma la produzione può essere seguita a partire dalla fava essiccata e tostata da ditte specializzate (Domori per esempio), o addirittura dalla fava solamente essiccata.

I processi di tostatura, macinazione, preparazione della ricetta, raffinazione, concaggio e temperaggio vengono perciò seguiti direttamente nei laboratori; ciò permette ai pasticceri di ricavare artigianalmente anche il burro di cacao.

Il burro di cacao, è un grasso estratto dai semi di cacao, che ne contengono dal 50% al 57%, ottenuto tramite un'unica spremitura oppure due spremiture successive. Per utilizzare il burro di cacao per il cioccolato il procedimento prevede un ulteriore passo: la rifusione, che consente di eliminare le impurità. Il burro di cacao, può essere anche ottenuto da processi chimici, ma è di più bassa qualità e viene chiamato "burro di cacao olandese di seconda". La scelta di utilizzare il burro prodotto in casa, piuttosto che quello in commercio, spetta al pasticcere; come pure l'aggiunta di tutti gli altri ingredienti latte, lecitina di sodio, zucchero, purché vengano rispettati i limiti imposti dalla legislazione vigente. I vari produttori hanno quindi l'esclusività della ricetta e la possibilità di ottenere così cioccolato dal gusto e dalla consistenza diversi.

2.2.2 La particolarità del cioccolato di Modica

La cittadina di Modica, in Sicilia, è famosa per la produzione del suo particolare cioccolato, probabilmente simile al cioccolato della fine del '700 e inizi dell'800, per lo meno nello “spirito” della lavorazione.

La fase del concaggio qui non viene eseguita, e lo zucchero viene mescolato ad una temperatura moderata (attorno ai 36°C) alla pasta di cacao, senza aggiunte di burro di cacao. Viene poi modellata a freddo per ottenere le forme desiderate. In questo modo i cristalli di zucchero, che non vengono sminuzzati e ricoperti dal burro di cacao, si sentono benissimo in bocca e si vedono ad occhio nudo.



C'è chi sostiene che saltando la fase di concaggio si mantengono degli aromi che altrimenti si volatilizzerebbero. Questo in parte è vero, ma è anche vero che il concaggio elimina degli aromi indesiderati e diminuisce l'acidità del cioccolato.

Un altro pregio del concaggio è che le alte temperature che si raggiungono, possono anche produrre nuove sostanze aromatiche, trasformando i precursori ancora presenti in molecole “gustose”. Concludendo possiamo dire che è una questione di compromessi inevitabili e non da ultimo una questione di gusto personale.

2.2.3 Qualità del cacao: sostituzione parziale del burro di cacao

Se la produzione artigianale garantisce un certa qualità del prodotto acquistato, le tavolette che troviamo in commercio sembrano concepite soprattutto solo per attirare l'occhio del consumatore. La tipologia delle offerte è alquanto variegata, accanto a prodotti di buona qualità ne troviamo altri che contengono ingredienti da evitare (grassi vegetali, olio di arachide idrogenato, grasso butirrico, siero del latte ecc).

Esiste una legenda che viene utilizzata per valutare i prodotti in eccellenti, ottimi buoni, insufficienti e da evitare; per quanto riguarda il cioccolato la classificazione è la seguente:

	VALUTAZIONE
Assenza delle indicazioni nutrizionali	Da evitare
Aromi non naturali	Insufficienti
Prodotti con ingredienti surrogati di quelli principali (siero del latte, grasso butirrico...), ma specificati	Insufficienti
Prodotti con ingredienti non specificati (grassi vegetali, surrogati del burro di cacao)	Buoni
Impiego di grassi e oli vegetali idrogenati, margarina	Ottimi

I mass media hanno lanciato un allarme molto forte sul tentativo di compromettere la bontà e la genuinità del cioccolato dopo che la direttiva europea ha concesso di sostituire, almeno in parte, il burro di cacao con i grassi vegetali.

Tornando indietro al 1973, la direttiva comunitaria 73/241/CEE, che regolava la produzione e la confezione dei prodotti alimentari a base di cacao, aveva stabilito l'uso esclusivo del burro di cacao come unico grasso aggiunto nella ricetta del cioccolato. La stessa direttiva concedeva una dilazione di tre anni a quei paesi (Gran Bretagna, Irlanda e Danimarca) che producevano cioccolato impiegando anche altri grassi vegetali. L'Italia recepì la direttiva tre anni dopo, decidendo che, se l'alimento conteneva altri grassi diversi dal burro di cacao, non poteva essere commercializzato con la dicitura cioccolato, ma con quella di *surrogato del cioccolato*. Nel frattempo, rifiutandosi di adeguarsi alle normative europee, sette paesi dell'Unione (Austria,

Danimarca, Gran Bretagna, Finlandia, Irlanda, Portogallo e Svezia) continuarono a produrre e commercializzare prodotti contenenti grassi vegetali diversi dal burro di cacao. Con il passare degli anni però la libera circolazione delle merci costituiva un paradosso e una notevole concorrenza ai produttori di cioccolato "puro" (il burro di cacao è sicuramente più costoso di altri grassi più scadenti come olio di palma o di colza); per risolvere il problema il 23 giugno 2000 è stata emanata la direttiva 36/CE che autorizzava l'uso di grassi vegetali diversi dal burro di cacao in misura non superiore al 5% del prodotto finito. Fortunatamente però la stessa direttiva obbligava i produttori a specificare sull'etichetta l'impiego di questi grassi alternativi. In questo modo, pur non impedendo la produzione di cioccolato con una ricetta diversa da quella tradizionale, il consumatore risulta tutelato perché leggendo l'etichetta è in grado di distinguere i diversi tipi di cioccolato e fare una scelta consapevole.

2.2.4 La nuova moda degli aromi

Una delle ultime voci dell'etichetta alimentare è spesso costituita dalla parola *Aromi*. La genericità del termine non riesce a nascondere lo scopo dell'uso: gli aromi vengono aggiunti per riottenere un gusto, andato perso o comunque molto sbiaditosi a causa del processo di lavorazione. Nel caso peggiore gli aromi vengono invece usati per alterare il gusto di un prodotto. Al limite si potrebbe fare un cioccolato senza cacao e dargli il gusto del miglior cacao del mondo.



Nel cioccolato l'aroma più usato è la vanillina che se viene estratta dal chicco di vaniglia può essere denominata come aroma naturale.

Gli aromi naturali devono necessariamente essere ottenuti da vegetali o animali. Con l'evolversi della chimica è oggi abbastanza semplice analizzare le molecole di un aroma e quindi conoscerne la struttura chimica e realizzarla sinteticamente. Ovviamente il prodotto finito è indistinguibile da quello naturale: si parla di aroma

naturale identico. La vanillina ottenuta in laboratorio non è *artificiale* perché è presente in natura e l'uomo ha scoperto il modo di riprodurla.

Durante il lavoro in laboratorio è possibile modificare la molecola dell'aroma, addirittura migliorandone o potenziandone il gusto. Per esempio l'etilvanillina è una versione più forte della vanillina naturale o naturale identica (da tre a quattro volte).

La direttiva europea che regola le informazioni da riportare sull'etichetta prevede solo la dizione "aroma"; se si tratta di un aroma naturale, l'etichetta indicherà aroma naturale, altrimenti (aroma naturale identico o artificiale) resterà la sola parola aroma.

Ovviamente l'uso degli aromi artificiali è motivato da interessi commerciali, perché meno costosi; e di marketing, visto che il prodotto acquista un gusto più deciso.

Attualmente è di moda arricchire il cioccolato con aromi come peperoncino, cannella, vaniglia, agrumi e altri, che hanno come unico scopo quello di attirare l'attenzione, ma soprattutto la curiosità del consumatore.

Non da ultimo, l'esempio dell'azienda Novi che inspiegabilmente ha introdotto gli aromi in tutti i suoi cioccolati, causando però una perdita di credibilità nella proposta dei prodotti di qualità.

2.3 COMPOSIZIONE CHIMICA DEL CACAO

		Cacao in polvere (valore medio riferito a 100g di prodotto)
<i>Composizione generale</i>	Acqua	5,60 g
	Azoto totale	3,17 g
	Proteine (N x 6,25)	19,8 g
	Grassi	24,5 g
	Carboidrati disp.	10,8 g
	Minerali	6,53 g
<i>Carboidrati</i>	Saccarosio	--
	Lattosio	--
	Amido	8,6 g
<i>Minerali ed elementi in tracce</i>	Sodio	17 µg
	Potassio	1920 µg
	Magnesio	414 µg
	Manganese	2,5 µg
	Ferro	13 µg
	Rame	3,8 µg
	Zinco	8,2 µg
	Nickel	937 µg
	Cromo	159 µg
	Fosforo	656 µg
	Cloro	32 µg
	Fluoro	3,1 µg
	Iodio	
<i>Vitamine</i>	Vitamina B1	130 µg
	Vitamina B2	400 µg
	Nicotinamide	2700 µg
	Acido pantotenico	1100 µg
	Vitamina B6	140 µg
	Biotina	20 µg
	Acido folico	38 µg
<i>Acidi</i>	Acido ossalico	396 µg

2.3.1 Lipidi

Durante lo sviluppo dei semi, i triacilgliceroli (TAG) sintetizzati sono agglomerati in particelle intracellulari dette “corpi lipidici” di 0,5–2 μm di diametro, costituite da una matrice di TAG rivestita da un sottile strato fosfolipidico e dalle “oleosine”, proteine di 15,8 e 16,9 kDa. I TAG che sono costituiti dagli acidi palmitico (C16), stearico (C18) ed oleico (C18:1) rappresentano circa il 97-98% del burro di cacao.

Il *burro di cacao* è di colore giallo pallido, esso fonde completamente a 35° C, ha un peso specifico di 0,957–0,98 e rappresenta il 45–53% in peso delle fave ed il 4-8% della buccia. I trigliceridi rappresentativi del burro di cacao sono: POP (palmitico-oleico-palmitico), POS (palmitico-oleico-stearico) e SOS (stearico-oleico-stearico). Nel cacao rappresenta il 30-40% del peso totale e



trova applicazione nell'industria dolciaria, cosmetica e farmaceutica. Ci sono poi i lipidi definiti “*succedanei*” o “*sostitutivi*”: si tratta di lipidi dalle caratteristiche simili al burro di cacao che possono essere suddivisi in 3 categorie: i CBE (Cocoa Butter Equivalents), lipidi privi di acido laurico che possono essere aggiunti al burro senza alterarne le proprietà chimico-fisiche; i CBR (Cocoa Butter Replacers), lipidi privi di acido laurico ma con struttura dei TAG completamente differente; i CBS (Cocoa Butter Substitutes) lipidi contenenti acido laurico, chimicamente, utilizzabili solo per sostituzione completa del burro di cacao.

I lipidi possono essere estratti da liquor, massa o granella di cacao mediante presse a caldo, expeller (torsione), solventi organici (esano) e CO₂ supercritica.

2.3.2 Proteine

La frazione proteica rappresenta quantitativamente la seconda componente dopo quella lipidica, in quanto costituisce il 10-15% del peso secco dei semi e della buccia di cacao.

La composizione quali-quantitativa in proteine del cacao varia in relazione al grado di maturazione dei semi.

Il 60% dell'azoto totale dei semi fermentati è rappresentato da proteine, mentre quello non proteico è rappresentato da amminoacidi liberi, da NH_3 (che si forma durante la fermentazione), da metilxantine (teobromina, caffeina).

Nei semi di cacao le proteine possono essere raggruppate in base alla solubilità: *globuline* (43% circa), *albumine* (52%), *gluteline* (5%) e *prolamine* (in tracce).

Una rilevante frazione delle proteine dei semi appena raccolti è rappresentata da enzimi (*amilasi*, α - e β -*galattosidasi*, α - e β -*glucosidasi*, *poligatturonasi*, *endoproteasi*, *aminopeptidasi*, *invertasi*, *fosfatasi alcaline* e *acide*, *perossidasi*, *catalasi*, *lipasi*, ecc). L'attività di alcuni di questi enzimi (aminopeptidasi, invertasi, polifenolossidasi) viene fortemente ridotta dalla fermentazione, mentre le carbossipeptidasi sono solo parzialmente inattivati; al contrario le endoproteasi e le glucosidi restano attive durante tutta la fermentazione. L'attività degli enzimi durante la fermentazione e l'essiccazione è un fattore chiave per la formazione dei precursori dell'aroma. La tostatura elimina l'attività enzimatica residua.

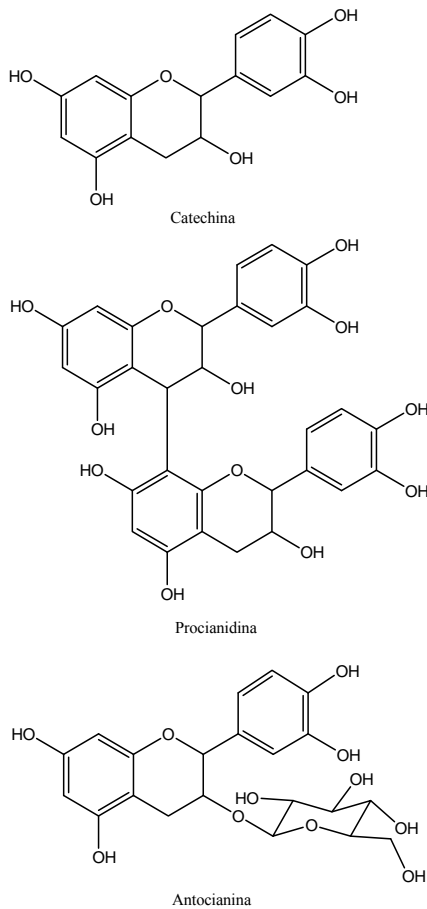
2.3.3 Carboidrati

Nei semi di cacao sono presenti mono-, oligo- e polisaccaridi.

Nelle fave fermentate *fruttosio* e *saccarosio* sono i principali zuccheri del cacao, seguiti da *glucosio* e *stachiosio*, *raffiniosio* e *verbascosio* sono invece presenti in minor quantità. L'*amido* è il polisaccaride digeribile predominante (3-7% nelle fave fermentate), mentre la *cellulosa* raggiunge il 9% nella fava fermentata essiccata intera. La frazione fibrosa comprende anche *galattani*, *pentosani*, *poligalatturonidi*, ed è concentrata principalmente nella buccia.

Durante la tostatura, la maggior parte del fruttosio e quasi tutto il glucosio scompaiono, essendo interessati come zuccheri riducenti nelle reazioni di Maillard; gli altri zuccheri non riducenti saccarosio, raffiniosio, stachiosio e verbascosio invece non diminuiscono.

2.3.4 Polifenoli



I polifenoli del cacao possono essere distinti in tre gruppi: *catechine* o *flavan-3-oli* (37% circa), *proantocianine* (58%) e *antocianine* (4%) .

I polifenoli sono contenuti assieme a purine e antocianine nelle cellule parenchimatiche pigmentate di maggiori dimensioni. Quelle di minori dimensioni contengono invece protoplasma, granuli di amido, di aleurone, globuli di grasso, e assieme a quelle di grandi dimensioni costituiscono i tessuti dei cotiledoni. Le fave fermentate ed essiccate del cacao Forastero contengono circa il 6% di polifenoli solubili; le fave fermentate non essiccate ne hanno circa il 5% e percentuali superiori possono essere considerate indice di cattiva fermentazione. Il cacao Criollo, in genere, contiene circa 2/3 dei polifenoli del Forastero e le antocianine non sono presenti in quantità significativa.

Durante la fermentazione, i polifenoli diffondono dalle cellule pigmentate e si ossidano, dando luogo a composti ad alto peso molecolare, in gran parte insolubili. I tannini idrolizzabili sono rappresentati essenzialmente da gallotannini; i tannini condensati sono rappresentati da flobafeni, composti molto ossidati responsabili della pigmentazione bruna, nera e rossastra del cacao fermentato tradizionalmente chiamata “rosso di cacao”. Il contenuto nei differenti tipi di cacao varia a seconda dei tempi e dei modi di lavorazione. Durante la fermentazione, le antocianine sono idrolizzate nelle rispettive antocianidine, che possono reagire con le catechine polimerizzando in tannini complessi. Il contenuto in antocianine scende oltre il 90% dopo pochi giorni di fermentazione. Il contenuto in proantocianidine, in particolare, risente della durata della fermentazione riducendosi ad un terzo del contenuto iniziale

dopo 120 ore, favorendo la variazione del colore delle fave dal violaceo al marrone scuro.

I trattamenti tecnologici del cacao durante la produzione del cioccolato (tostatura, macinazione, raffinazione, concaggio) influiscono diminuendo il contenuto in polifenoli, in funzione delle temperature raggiunte. Anche l'alcalinizzazione (se utilizzata) porta ad una riduzione in polifenoli.

E' stato dimostrato i polifenoli sono in grado di inibire la crescita di *Bacterium gengivalis* nel cavo orale, come pure di controllare la crescita di alcuni batteri in miscele per la produzione di gelati. Viene a loro attribuita anche la capacità di neutralizzare il perossido di idrogeno e l'anione superossido, possiedono perciò anche un'azione antiossidante.

2.3.5 Acidi

Gli acidi organici rappresentano l'1,2-1,6% del cacao fermentato. Nel seme a maturazione ottimale sono costituiti per la maggior parte da *acido citrico* e da *acido ossalico*, da piccole quantità di *acido malico*, *acetico* e *formico*. L'acido acetico, si forma durante la fermentazione insieme all'acido lattico e all'etanolo; la sua concentrazione nei cotiledoni dipende dalla durata della fermentazione e dell'essiccazione.

2.3.6 Vitamine

Le vitamine presenti nel cacao sono idrosolubili e liposolubili. Tra le vitamine idrosolubili ricordiamo la *tiamina* (vit B₁), la *riboflavina* (vit B₂), la *niacina* (vit B₃ o PP), l'*acido pantotenico* (vit B₅), il *piridossalfosfato* (vit B₆), e l'*acido ascorbico* (vit C); tra le liposolubili la *vitamina E*, che possiede interessanti capacità antiossidanti e la *vitamina A*.

2.3.7 Minerali

La presenza di oligoelementi nel cacao è significativa: in particolare il *magnesio* riveste un ruolo importante, specie in associazione con la 2-feniletilammina, nel determinare gli effetti anti-depressivi noti nel cioccolato.

Anche il *ferro* è presente in discreta quantità, soprattutto nel cacao in polvere; sono ben rappresentati pure *rame* e *manganese*.

Il cacao, nonostante non sia un alimento particolarmente allergizzante, risulta ricco in *nickel*, metallo in grado di scatenare allergia in individui predisposti.

2.3.8 Fattori antinutrizionali

Esistono nel cacao altri composti chimici, seppure definiti “minori” rispetto al contenuto percentuale e non fondamentali per la formazione dell’aroma tipico, che presentano in alcuni casi una valenza antinutrizionale o tossicologica.

Questi fattori sono in parte degradati dalla fermentazione e dall’essiccamento, ma in particolare dai trattamenti termici praticati nelle trasformazione in cioccolato e derivati.

I **polifenoli** possono essere considerati sostanze dall’attività bivalente: positiva, perché sono antiossidanti, antiradicalici, antimicrobici, antifungini e negativa, perché sono antinutrizionali, in grado di limitare la biodisponibilità di proteine ed enzimi, in particolare per l’azione precipitante dei tannini, e di alcuni elementi (es. Fe).

L’**acido fitico** è in grado di limitare l’assunzione a livello intestinale di cationi come Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , complessandosi con essi e formando sali insolubili.

L’**acido ossalico**, costituente di molti altri vegetali, è un fattore in grado di limitare l’assunzione di micro- o macro-elementi, formando ossalati insolubili; gli alimenti ricchi di ossalati possono ridurre la biodisponibilità di calcio. Il cacao in polvere ne contiene una discreta quantità, variabile dallo 0,3 allo 0,5%.

L’**acido clorogenico** è il nome dato ad una classe di composti fenolici acidi il cui maggior rappresentante è l’*acido 5-caffeoil-chinico*. L’acido clorogenico totale della fava di cacao varia dall’8,8 al 17,5 mg/kg in relazione alla varietà e risulta diminuito

sensibilmente dai trattamenti termici di tostatura. L'azione antinutrizionale è dovuta alla reazione dei chinoni che si formano, con le proteine, in particolare il gruppo amminico della lisina, il tiolico della cistina, il tiometilico della metionina e l'indolico del triptofano. Si ha una diminuzione della biodisponibilità di aminoacidi e l'inibizione di alcuni enzimi (fra cui alcuni implicati nella digestione).

L'**acido caffeico** libero (in parte derivante dall'idrolisi dell'acido clorogenico) è un fattore antinutrizionale in grado di limitare l'azione e la biodisponibilità della vitamina B₁ (tiamina).

L'**inibitore della tripsina** è un inibitore delle proteasi tipo Kunitz, attivo sulla tripsina e su α -amilasi; probabilmente ha per il cacao funzione di difesa contro i patogeni, come molti inibitori enzimatici.

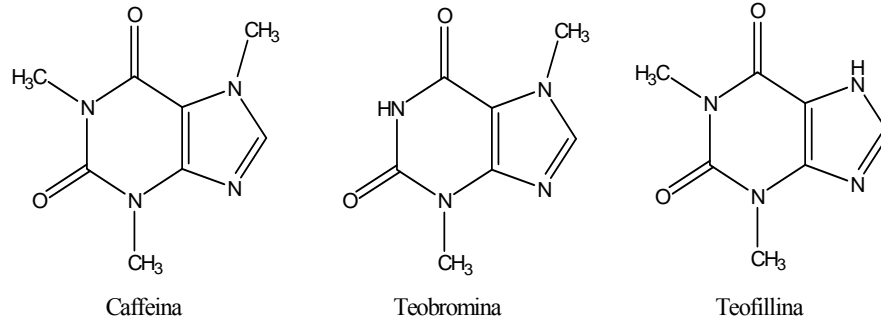
2.3.9 Sostanze naturali bioattive

Il cacao, come pure caffè, tè, matè e guaranà, viene definito alimento "nervino" perché contenente *sostanze bioattive* che secondo alcuni Autori sono in grado di influenzare il comportamento umano. Nonostante ciascuno di questi agenti farmacologici sia presente soltanto in bassi quantitativi, gli effetti uniti di questi residui, insieme alle proprietà sensoriali uniche del cioccolato, potrebbero essere in grado di comportare una leggera dipendenza e una continua ricerca di cioccolato. Inoltre è importante ricordare che gli alimenti gradevoli al palato quali il cioccolato, le torte e il gelato, stimolano il rilascio di sostanze "narcotiche" nel cervello conosciute come *endorfine*, chimicamente simili alla morfina, alle quali il cervello risponde come risponde alla morfina: sensazione di piacere, euforia e buon umore.

1 - Alcaloidi purinici

Gli alcaloidi purinici (detti anche metilxantine) caratterizzano la composizione chimica degli alimenti nervini e sono la **caffeina** (1,3,7-trimetil-2,6-diossipurina), la

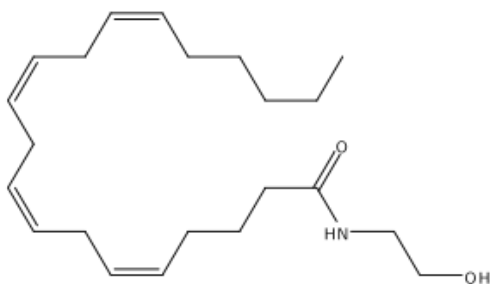
teobromina (3,7-dimetil-2,6-diossipurina) e la **teofillina** (1,3-dimetil-2,6-diossipurina).



La caffeina è presente nel cacao in quantità variabili (0,6-0,8%), abbastanza limitate se paragonate a quella del caffè e tè. Il maggior alcaloide purinico del cacao è la teobromina, che deve il suo nome proprio al genere Teobroma.

Gli alcaloidi purinici sono composti noti per la loro capacità di stimolazione del sistema nervoso, essi aumentano lo stato di veglia, la riduzione del senso di fatica, la concentrazione; la teobromina, rispetto alla caffeina, è uno stimolante meno potente, i suoi effetti su sistema nervoso centrale risultano minori. La teobromina però, è un vasodilatatore coronario e renale, con azione diuretica più marcata rispetto alla caffeina. Va rilevato che la caffeina determina un aumento della termogenesi con conseguente accrescimento del consumo energetico e perdita di peso. Durante la fermentazione, la teobromina, compartmentata nelle cellule del cotiledone, migra nella buccia; uno dei prodotti estratti e recuperati dalla buccia del cacao, infatti è proprio la teobromina, che viene estratta con solventi organici e purificata per essere usata come farmaco.

2 - Anandamide

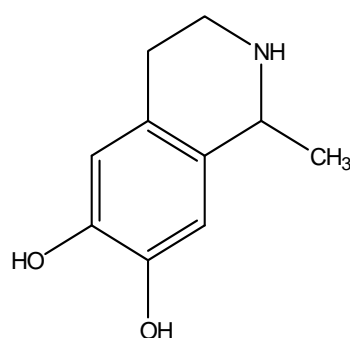


L'**anandamide** (N-arachidonoil-etanolamina) è un lipide endogeno in grado di legarsi al recettore dei cannabinoidi CB1 e quindi di generare effetti comportamentali e di produrre effetti sul

tono dell'umore e sulle funzioni cognitive quali l'apprendimento e la memoria. L'anandamide sembra essere in grado di stimolare le percezioni sensoriali inducendo euforia e senso di soddisfazione; in ogni caso, questa molecola non rappresenta problemi legati a fenomeni di dipendenza: è stato stimato che un uomo di 60 kg dovrebbe ingerire circa 10 kg di cioccolato al giorno per subirne questo effetto. Nel cioccolato sono evidenziate anche etanolamidi di acido oleico e linolenico che non attivano i recettori cerebrali dei cannabinoidi ma possono interferire con l'inattivazione dell'anandamide stessa.

3 - Tetraidroisochinoline

Il cacao e il cioccolato contengono due tetraidroisochinoline, **salsolinolo** e **salsolina**, alcaloidi dopamina-derivati che si formano naturalmente anche nel cervello dei mammiferi.

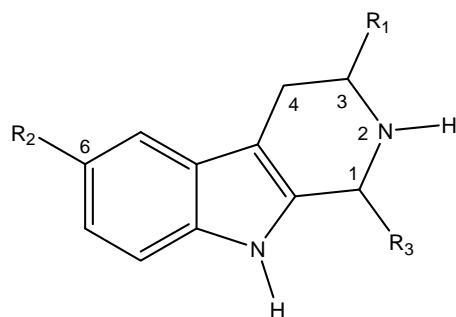


Salsolinolo

Sono composti dopaminergici che presentano diversi effetti neurofarmacologici: inibizione delle monoamminossidasi (MAO), inibizione della tiroxina idrossilasi e dell'uptake delle catecolamine, inibizione della formazione dell'AMP ciclico e del rilascio delle β -endorfine. Queste azioni si concretizzano in un effetto antidepressivo. Il salsolinolo può essere considerato una delle sostanze che determinano l'effetto di "dipendenza" psicologica dal cioccolato.

4 - Tetraidro- β -carboline (TH β C)

Le TH β C sono alcaloidi indolici naturali, prodotti da indolamine e aldeidi e/o α -chetoacidi attraverso una condensazione.

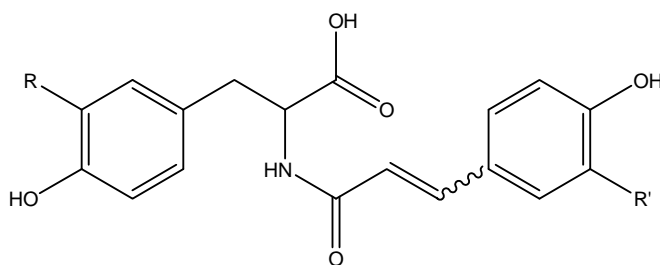


Tetraidro-β-carbolina

I precursori delle THβC sono L-triptofano, serotonina e triptamina. Le THβC identificate in condizioni fisiologiche nei tessuti e nei fluidi umani potrebbero avere un ruolo come neuro-modulatori, inibendo le monoamminossidasi (MAO), riconoscendo i recettori benzodiazepinici e modulando l'up-take ed il rilascio di serotonina. Grazie alla loro capacità di modulare le MAO potrebbero interagire con l'azione di alcune ammine biogene presenti nei derivati del cacao (in particolare la 2-fenilettilammina).

5 - Clovamide

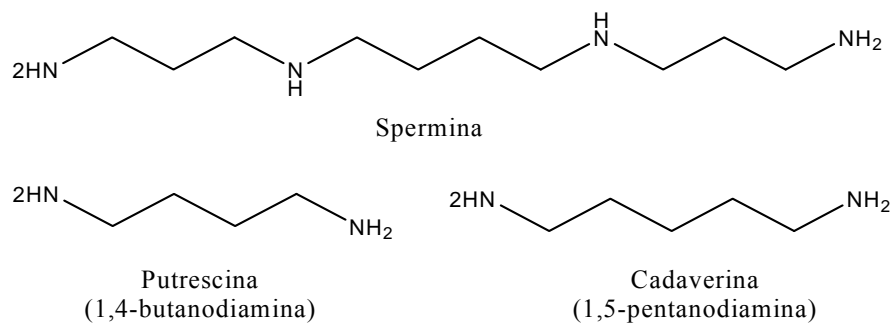
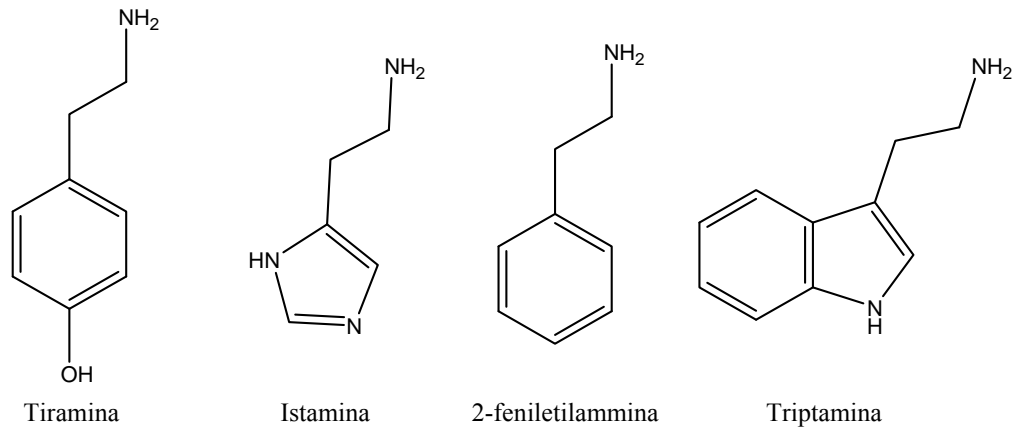
La presenza di **clovamide** (N-caffeoil-L-3,4-diidrossifenilalanina) e **desossiclovamide** nel liquor di cacao è stata confermata da recenti studi.



Clovamide

Si tratta di molecole con struttura analoga a quella dell'acido rosmarinico e dotate di spiccata attività antiossidante. L'attività antiossidante della clovamide, maggiore della desossiclovamide, è comparabile con quella di alcuni antiossidanti frequentemente utilizzati dall'industria, come acido ascorbico e α-tocoferolo; le proprietà antiossidanti della clovamide superano in attività e persistenza nel tempo quelle degli altri composti ad azione antiossidante presenti nel cacao.

2.4 LE AMMINE BIOGENE: 2-FENILETILAMMINA E TIRAMINA



Le ammine biogene sono sostanze basiche derivanti dalla decarbossilazione microbica degli amminoacidi. I batteri decarbossilasi-positivi in grado di produrre ammine biogene negli alimenti sono rappresentati principalmente dalla famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

Tiramina, triptamina, istamina e 2-fenilettilammina rappresentano le più comuni monoammine negli alimenti fermentati o in quelli ad avanzato grado di degradazione microbica. Le poliammide (spermina, spermidina, putrescina, cadaverina) possono in alcuni casi potenziare sinergicamente l'azione di alcune monoammine.

Le ammine biogene, molecole vasoattive, se introdotte in quantità sufficiente o simultaneamente a farmaci che inibiscono gli enzimi che le catabolizzano (monoamminossidasi e diamminossidasi, MAO-inibitori, DAO-inibitori), possono

provocare rossore al viso, mal di testa, brusche variazioni della pressione sanguigna, fino a morte per shock cardiocircolatorio.

Il cacao, come tutti gli alimenti fermentati microbiologicamente, può contenere monoammine, in particolare **2-feniletilammina** (derivante dalla decarbossilazione della fenilalanina), **tiramina** (dalla tirosina) e **triptamina** e **serotonina** (dal triptofano). Le ammine biogene nel cacao non raggiungono valori elevati nonostante alcuni individui ne risultino particolarmente sensibili, in particolare chi soffre di emicrania.

Dopo la tostatura del cacao si trova un aumento significativo della concentrazione di ammine biogene, probabilmente causato dalla decarbossilazione termica degli amminoacidi liberi.

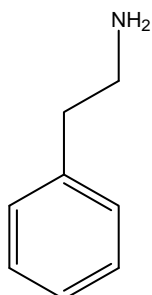
2.4.1 La 2-feniletilammina e la tiramina

La **2-feniletilammina** è un'ammina endogena analoga alle amfetamine sia dal punto di vista strutturale che farmacologico. L'anello benzenico di cui è costituita, ne conferisce il profilo aromatico mentre il gruppo amminico conferisce al composto il carattere basico in grado di reagire con acidi (es. formazione di sali con acido cloridrico). E' sintetizzata tramite decarbossilazione enzimatica della fenilalanina ed è una molecola fortemente basica che subisce un rapido metabolismo per effetto delle MAO, principalmente di tipo B, evitando così un eccessivo accumulo cerebrale. La 2-feniletilammina è considerata un neuromodulatore di sinapsi dopaminergiche, serotoninergiche e noradrenergiche.

A livello polmonare causa un iniziale rilassamento della parete parenchimale dei polmoni, probabilmente mediato da recettori beta-adrenergici, seguito da una contrazione a concentrazioni più elevate.

A livello cardiovascolare aumenta la pressione sanguigna aortica, essa probabilmente grazie al rilascio di norepinefrina endogena dalle terminazioni nervose adrenergiche, è in grado di dare sia un effetto inotropo positivo sia vasocostrizione.

A *livello nervoso*, a causa della sua rapida degradazione ad opera delle MAO, la 2-feniletilammina induce effetti farmacologici solo a dosi elevate o in situazioni di trattamenti con MAO-inibitori.



2-feniletilammina

Questa ammina è conosciuta come “love-drug” (droga dell’amore) perchè è in grado di produrre sensazioni come quelle sperimentate quando una persona è “innamorata” e si pensa sia responsabile degli effetti afrodisiaci che il cioccolato sembra possedere. Infatti la feniletilammina (PEA) viene rilasciata nel cervello quando l’individuo sperimenta sentimenti di gioia e amore.

Studi hanno dimostrato che la PEA ha interessanti proprietà nell’inibire l’appetito, ritardare la comparsa della fatica, modificare l’umore, favorire la veglia e le funzioni mentali, proprio come le amfetamine. Tutto ciò è legato all’abilità dell’ammina di modulare la trasmissione dopaminergica. Essa ha maggiore affinità della stessa dopamina sul meccanismo re-uptake della dopamina nelle vescicole pre-sinaptiche. Una volta nel cervello, essa viene catturata dalle vescicole pre-sinaptiche e occupa lo spazio normalmente occupato dalla dopamina. Ciò risulta in un aumento della dopamina liberamente circolante nei terminali pre-sinaptici e una maggiore concentrazione della dopamina diffusa nelle fessure sinaptiche, producendo così un rafforzamento della trasmissione dopaminergica. A basse dosi stimola il rilascio di dopamina dalle vescicole citoplasmatiche e si comporta come un agonista dopaminergico con azione rapida.

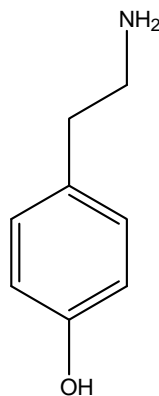
E’ importante ricordare che a differenza delle amfetamine la PEA è endogena al cervello umano, e non sviluppa ne tolleranza, ne dipendenza, ne produce effetti collaterali; mentre la feniletilammina endogena viene prodotta naturalmente dal

tessuto cerebrale, studi hanno dimostrato che anche quando viene somministrata essa è farmacologicamente attiva e in grado di stimolare. Si è infatti visto che i valori di feniletilammina sono ridotti nei tessuti e fluidi biologici di soggetti depressi e il ristabilimento con la feniletilammina e/o con il suo amminoacido precursore, la fenilalanina, sembra migliorare alcuni tipi di depressione.

In diversi studi è stato dimostrato che la PEA è in grado di controllare alcuni tipi di depressione nel 60 % dei pazienti (percentuale simile a quella di alcuni dei migliori farmaci antidepressivi come il Prozac) ma ha molti meno effetti tossici. Alcuni dei vantaggi che si possono constatare con il trattamento con questa ammina biogena sono: attività rapida, nell'ordine di ore o giorni, invece di settimane; attività in alcuni tipi di depressione che non rispondono ai farmaci antidepressivi standard; minori effetti collaterali a lungo termine, poiché ricostituiscono direttamente un neuromodulatore che era in deficit.

Il cioccolato, ma pure altri prodotti alimentari quali i formaggi, le carni lavorate, la salsa di soia, il pesce, il vino rosso, sono fonte considerevole di tiramina.

La **tiramina** è anche ampiamente rappresentata nell'organismo degli esseri viventi, è un'ammina sintetizzata per decarbossilazione della tirosina in seguito a processi fermentativi o di decomposizione batterica.



La tiramina, come tutte le monoammine, è metabolizzata dalle monoamminossidasi, c'è quindi il rischio che si verifichi la “cheese reaction”, ovvero la sindrome causata dall'eccessivo accumulo di monoammine dovuto all'effetto della tiramina potenziato dall'utilizzo di farmaci antidepressivi contenenti inibitori delle monoamminossidasi

(iMAO). Si tratta di una pericolosa ipertensione acuta, associata all'ingestione di alimenti ricchi di tiramina quando si è in cura con iMAO.

Essendo un simpaticomimetico è in grado di stimolare il rilascio di noradrenalina dalle vescicole neuronali causando vasocostrizione, con aumento dei battiti cardiaci e della pressione sanguigna; questo implica che nel caso in cui ci sia un'assunzione elevata di questa ammina si possa verificare la cosiddetta "risposta pressoria alla tiramina", con l' aumento della pressione sistolica di 30 mmHg o più. Recenti studi effettuati sul cacao hanno però dimostrato che l'assunzione di cioccolato, anziché provocare un aumento della pressione ne provocherebbe una diminuzione. Il Dipartimento di Farmacologia dell'Università di Colonia (Germania), ha pubblicato nel 2007 i risultati di alcuni trials randomizzati effettuati per determinare la variazione di pressione indotti dall'assunzione di cacao e di tè. Sono stati effettuati cinque studi sulla somministrazione del cacao su 173 pazienti per circa due settimane; dopo la dieta è stata riscontrata una diminuzione della pressione sistolica di 4,7 mmHg e della diastolica di 2,8 mmHg; l'assunzione di tè, invece, non ha provocato nessun effetto.

Un altro studio invece, è stato effettuato monitorando i valori pressori di 470 uomini anziani per quindici anni, ed è conosciuto con il nome di studio Zutphen Elderly. E' stato fatto un confronto dei valori pressori in assenza e in presenza di cacao nella dieta del paziente e si è giunti alla conclusione che in una coorte di uomini anziani l'assunzione di cacao è inversamente associata alla pressione sanguigna.

E' stato messo in evidenza che pazienti in terapia con rasagilina possono essere colpiti da crisi ipertensiva se durante l'assunzione del farmaco o nei quattordici giorni successivi assumono cibi ricchi di tiramina. La rasagilina è un farmaco usato nel trattamento del Morbo di Parkinson (da sola o in associazione con levodopa) e agisce come inibitore selettivo ed irreversibile delle MAO-B; il morbo infatti è caratterizzato da una perdita di cellule dopaminergiche in alcune aree del cervello e questo principio attivo aumenta e mantiene costante i livelli di dopamina in queste aree.

Esiste la possibilità che la tiramina agisca da neurotrasmettitore, è stata dimostrata infatti la presenza di un recettore con alta affinità per la tiramina, accoppiato a una proteina G e denominato TA1. L'azione diretta sul controllo della pressione

sanguigna, svolta da questa ammina, è giustificata dalla presenza di tali recettori nel cervello e in tessuti periferici quali i reni. Per caratterizzare il contributo alla regolamentazione del comportamento di questi recettori è stata creata una generazione di topi senza TA1; questi topi mancano dei “freni inibitori” e hanno una maggiore sensibilità verso gli effetti stimolanti delle amfetamine. TA1 sembra quindi svolgere un ruolo modulatore sulle funzioni catecolaminiche e rappresenta un potenziale meccanismo per il trattamento dei disturbi neuropsichiatrici.

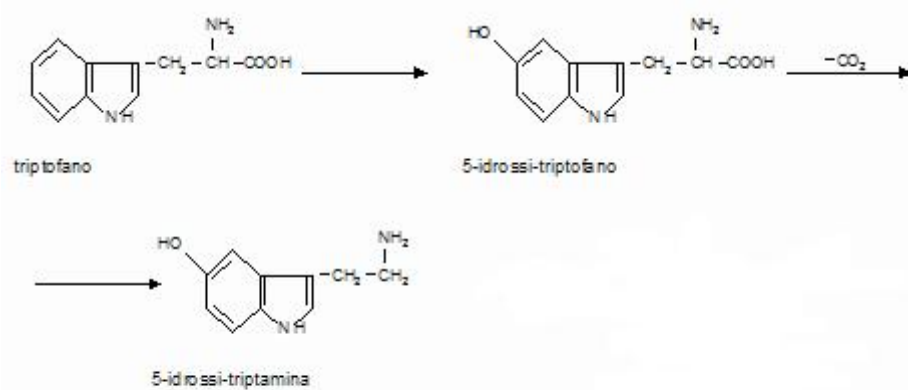
La tiramina è anche una delle principali sostanze a cui sono imputati gli effetti legati all'ubriachezza e alla conseguente cefalea. Inoltre è una molecola responsabile di allergie alimentari.

2.5 LE AMMINE BIOGENE: SEROTONINA

La **serotonina** (5-idrossitriptamina, 5-HT) è un neurotrasmettitore monoamminico sintetizzato nei neuroni serotonergici nel sistema nervoso centrale e in alcune cellule dell'apparato gastrointestinale (cellule enterocromaffini).

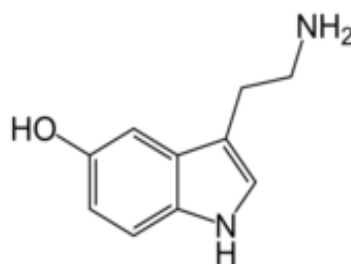
La sostanza fu isolata a Roma nel 1935, inizialmente considerata un polifenolo; due anni più tardi, in seguito a degli studi su ghiandole cutanee di *Discoglossus* e ghiandole salivari di polpi, fu rinominata enteramina, la quale fu definitivamente rinominata serotonina nel 1948.

La biosintesi della serotonina endogena segue una via simile a quella della noradrenalina, con la differenza che l'amminoacido precursore è il triptofano, invece della tirosina. Il triptofano viene convertito in 5-idrossitriptofano grazie all'azione dell'enzima triptofano-idrossilasi. Il 5-idrossitriptofano così prodotto viene decarbossilato a 5-HT, a opera dell'amminoacido decarbossilasi.



La degradazione della 5-HT avviene principalmente attraverso una deaminazione ossidativa, catalizzata dalle monoaminossidasi, seguita dall'ossidazione ad acido 5-idrossiindolacetico (5-HIAA).

La serotonina è presente ad alte concentrazioni in vari siti corporei: a livello della parete intestinale viene spesso immagazzinata nei neuroni e nelle cellule enterocromaffini come co-trasmittitore insieme con vari ormoni di natura peptica, come la somatostatina; nel sangue, più precisamente nelle piastrine che accumulano 5-HT durante il loro passaggio attraverso la circolazione intestinale, dove la concentrazione locale è relativamente alta; nel sistema nervoso centrale dove sono localizzati i neuroni serotoninergici. I corpi dei neuroni serotoninergici sono presenti nel tronco cerebrale a livello del bulbo, ponte e mesencefalo, concentrati nei nuclei del rafe; quest'ultimi danno origine ad un gruppo omogeneo di neuroni che proiettano i propri assoni verso tutte le aree del sistema nervoso centrale: corteccia, talamo, amigdala, ippocampo, nuclei della base, nucleo accumbens, cervelletto, midollo spinale. Le fibre serotoninergiche che proiettano verso le corna posteriori del midollo spinale, in particolare verso il nucleo spinale del trigemino, indicano un coinvolgimento del sistema serotoninergico nel controllo del dolore.



Per convenzione i recettori serotonergici sono stati divisi in sette diverse sottofamiglie (da 5-HT₁ a 5-HT₇) sulla base delle loro caratteristiche farmacologiche, della sequenza di amminoacidi, dell'organizzazione del gene e dei sistemi di trasduzione del segnale ad essi accoppiato; i recettori sono quasi esclusivamente di tipo metabotropo, accoppiati a proteine G; l'unico recettore ionotropo è il 5-HT₃, canale ionico permeabile ai cationi.

L'attivazione dei recettori 5-HT₁ da origine alla vasocostrizione dei grandi vasi intracranici, la cui dilatazione contribuisce all'emicrania; mentre l'attivazione dei recettori 5-HT_{2A} causa aggregazione piastrinica, così le piastrine che si raccolgono nei vasi rilasciano altra ammina. Se l'endotelio è intatto, la liberazione di 5-HT dalle piastrine adese causa vasodilatazione, che permette lo scorrimento del flusso sanguigno; se esso è danneggiato, la 5-HT causa costrizione e ostacola ulteriormente il flusso ematico. I recettori 5-HT₃ attivati stimolano invece le terminazioni nervose sensoriali nocicettive.

Importanti sono gli effetti fisiologici della serotonina nel tratto gastrointestinale: la 5-HT determina aumento della motilità intestinale, in parte per un effetto diretto sulle cellule muscolari lisce e in parte per un effetto indiretto di tipo eccitatorio sui neuroni enterici. Stimola la secrezione di fluidi e provoca nausea e vomito mediante la stimolazione del muscolo liscio e dei nervi sensoriali nello stomaco. Il riflesso peristaltico, evocato dall'aumento della pressione in un segmento d'intestino, è mediato, almeno in parte, dalla secrezione di serotonina da parte delle cellule enterocromaffini, in risposta allo stimolo meccanico. Le cellule cromaffini rispondono anche alla stimolazione vagale determinando la secrezione di 5-HT.

La serotonina possiede altri importanti effetti farmacologici, svolge un ruolo importante nella regolazione dell'umore, del sonno, della temperatura, della sessualità e dell'appetito; costituisce inoltre il freno naturale del riflesso dell'eiaculazione e un basso livello di questo neurotrasmettitore è la causa costituzionale principale dell'eiaculazione precoce.

Questo neurotrasmettitore è inoltre bersaglio di alcune droghe, come amfetamine e l'ecstasy, che agiscono inibendone la ricaptazione neuronale.

La serotonina è coinvolta in numerosi disturbi neuropsichiatrici, come l'emicrania, il disturbo bipolare, la depressione e l'ansia. Molti farmaci infatti agiscono sui recettori serotoninergici: agonisti del recettore 5-HT_{1D} (sumatriptam) per il trattamento dell'emicrania e agonisti del recettore 5-HT₄ (metoclopramide) per la stimolazione dell'attività peristaltica coordinata. Ci sono poi gli antagonisti del recettore 5-HT₃ (ondasetron) antiemetico e gli antagonisti del recettore 5-HT₂ (metisergide) per la profilassi dell'emicrania.

La serotonina non ha solo importanti effetti fisiologici, ma è anche il precursore della melatonina, ormone con elevata attività sedativa ed ipnotica. La melatonina è sintetizzata a partire dalla serotonina nella ghiandola pineale, che contiene tutti gli enzimi necessari per la sintesi dell'ormone a partire dal triptofano (attraverso la formazione dell'ammina). La produzione e la secrezione della melatonina sono influenzate dalla luce e dal buio: di notte c'è un aumento della quantità di ormone, mentre durante il giorno la sintesi e il rilascio sono molto ridotti. [28]

Secondo uno studio condotto presso il Children's Hospital di Boston per conto del National Institute of Health, la sindrome della morte improvvisa in culla (SIDS), che colpisce i bambini di età inferiore ad un anno ed è caratterizzata dall'impossibilità di trovarne le cause anche dopo l'autopsia, sarebbe legata a un anomalo funzionamento del tronco cerebrale; l'anomalia riscontrata dai ricercatori riguarderebbe la capacità del tronco di utilizzare e ricaptare la serotonina, che in questa specifica struttura partecipa al controllo di funzioni vitali come la respirazione e la regolazione della pressione. Si è scoperto che le strutture del tronco encefalico dei bambini deceduti per morte improvvisa contenevano un numero decisamente più elevato di neuroni serotoninergici, i quali però apparivano dotati di un numero di recettori per la serotonina di tipo 1A decisamente inferiore alla norma, così come inferiori apparivano i quantitativi della proteina necessaria alla ricaptazione della serotonina da parte dei neuroni. [18]

Alcuni studiosi del Dipartimento di Farmacologia e Tossicologia dell'Università di Innsbruck hanno invece effettuato una ricerca per determinare la relazione tra le alterazioni nello sviluppo cerebrale in soggetti affetti da Sindrome di Down e la concentrazione di alcuni amminoacidi e monoammine. Ne è emerso che in questa

sindrome c'è una diminuzione dei livelli di serotonina, GABA, taurina e dopamina nella corteccia frontale. [31]

Una ricerca di un gruppo di scienziati dell'Università di Pittsburg, pubblicata negli "Archives of General Psychiatry", riferisce che chi è affetto da anoressia manifesta un'alterazione dell'attività della serotonina. Lo studio compara l'attività della serotonina nelle donne anoressiche con altre ragazze che non hanno mai avuto disordini alimentari; i ricercatori hanno dimostrato che il livello di serotonina è significativamente più alto in numerose parti del cervello delle donne che sono state vittime della forma di anoressia che sfocia nella bulimia. Tutte le donne che manifestano forte ansia hanno un livello di serotonina molto alto; per i ricercatori questa scoperta suggerisce che il persistente disturbo del livello di 5-HT potrebbe essere legato all'accrescimento dell'ansia che poi scatena l'anoressia, anche se non scartano la possibilità che il livello dell'ammina sia alterato dalla malnutrizione. [15]

Un altro studio è stato condotto dallo Stanislas Family Study, che ha ricercato la relazione tra il polimorfismo del recettore 5-HT_{2A} e l'assunzione di cibo nei bambini e negli adolescenti; è emerso che la serotonina è un fattore chiave nel controllo dell'assunzione di cibo e probabilmente è implicato nell'eziologia della bulimia nervosa. [16]

3. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è la determinazione della serotonina nelle fave di cacao di diversa origine con metodo cromatografico. È stata altresì valutata la presenza di questa ammina biogena nelle prime fasi della lavorazione del cacao. Vari prodotti di eseguire una valutazione qualitativa e quantitativa della serotonina presente nelle fave di cacao provenienti da paesi diversi, mediante l'analisi cromatografica.

Venezuela, Madagascar, Ecuador e Perù sono gli stati di provenienza delle fave di cacao utilizzate per le nostre analisi.

Nei campioni esaminati abbiamo operato delle estrazioni e successivamente abbiamo caratterizzato la serotonina utilizzando l'HPLC. In concomitanza con l'analisi cromatografica della serotonina abbiamo determinato anche altre ammine presenti nel cacao: la 2-fenilettilammina e la tiramina.

Eseguendo un'analisi elementare abbiamo potuto determinare altresì, la presenza di azoto nei campioni.

4. MATERIALI E METODI

4.1 FAVE DI CACAO

Le analisi sono state svolte su fave di cacao tostate e sguasciate, della ditta Domori. Si è scelto di utilizzare quelle provenienti dai paesi maggior produttori:

- Sur del Lago (Venezuela)
- Sambirano (Madagascar)
- Arriba (Ecuador)
- Carenero Superior (Venezuela)
- Apurimac (Perù)
- Rio Caribe Superior (Venezuela)



Sono state sottoposte ad analisi anche fave non tostate, con guscio.

Tutte le fave trattate sono solo state triturate, senza subire altre lavorazioni.

4.2 REAGENTI

Per le operazioni di estrazione della serotonina e delle altre ammine dalle fave di cacao sono stati utilizzati i seguenti solventi: *etere di petrolio 40° - 60°*, *acido perclorico 70%*, *idrato di potassio* della ditta Carlo Erba Analyticals, *cloruro di sodio al 99%* della ditta Carlo Erba, *etere etilico* della ditta VWR International Prolabo.

Per le analisi cromatografiche: *acqua per HPLC* della ditta Carlo Erba Reagents, *acido trifluoroacetico 99%* della ditta Sigma-Aldrich e *acetonitrile per HPLC* della ditta Carlo Erba Reagents.

Gli standard delle ammine biogene usati sono: *serotonina* della ditta Sigma, e *tiramina* e *2-fenilettilammina* della ditta Fluka.

Per l'analisi elementare abbiamo usato come standard l'*acetanilide* della ditta BDH Microanalytical Reagent.

4.3 STRUMENTAZIONE

4.3.1 Strumenti per l'estrazione

- Bilancia analitica: la bilancia analitica è una Mettler AE100.
- Centrifuga: Le centrifugazioni sono state eseguite con una centrifuga modello Allegra 21R della ditta Beckman. Mentre le centrifugazioni con l'etere di petrolio sono state condotte a 8000 RPM per 10 minuti, ad una temperatura di 15° C, quelle con acido perclorico, sono state effettuate a 9000 RPM per 10 minuti, ad una temperatura di 20°.
- pHmetro: Le misurazioni di pH, sono state eseguite con pHmetro modello 744 della ditta Metrohm con elettrodo a vetro.
- Evaporatore: Per le evaporazioni della fase eterea fino ad un volume di 1ml, è stato utilizzato Rotavapor della ditta BÜCHI modello R-114 con bagno d'acqua, che vede l'utilizzo di una pompa da vuoto modello MZ 2C della ditta Vacuubrand.

4.3.2 Estrazione con solvente: l'imbuto separatore

L'estrazione con solvente è una tecnica di separazione che si basa sulla distribuzione del soluto tra due liquidi non miscibili, di cui uno è solitamente un solvente organico e l'altro una soluzione acquosa. Il soluto si distribuisce tra le due fasi fino al raggiungimento dell'equilibrio. All'equilibrio, un soluto che sia solubile in entrambe le fasi, sarà distribuito tra le due fasi secondo una legge che stabilisce il rapporto delle concentrazioni del soluto nei due solventi A e B:

$$K = C_A / C_B$$



dove K è il *coefficiente di distribuzione* o *di ripartizione*, un particolare tipo di costante d'equilibrio che è essenzialmente uguale al rapporto delle solubilità relative del soluto nei due solventi.

Per separare due liquidi immiscibili che quindi si stratificano uno sull'altro (in basso il più denso e in alto il meno denso) è possibile utilizzare l'*imbuto separatore*.

Questo strumento è dotato di un rubinetto nella parte inferiore per far defluire il liquido di densità maggiore e di norma viene utilizzato inserito in un apposito sostegno. Per l'estrazione si procede come segue:

1. L'imbuto separatore deve contenere più del doppio del volume da estrarre;
2. Si sceglie il solvente per l'estrazione ed il suo volume;
3. Sotto cappa si carica nell'imbuto, previamente sistemato sull'opportuno sostegno, la soluzione da estrarre ed il solvente scelto in ragione di circa un terzo del volume totale previsto e si tappa l'imbuto;
4. Capovolto l'imbuto, si agita lentamente e si apre il rubinetto per eliminare la sovrappressione;
5. Si agita vigorosamente e quindi si lascia assestare la miscela;
6. Si separano le due fasi e si raccoglie in un becker quella di interesse;
7. Si ripetono i punti 3-6 per 3 volte.

4.3.3 Strumenti per l'analisi elementare: CHN

Per la determinazione elementare di carbonio, idrogeno e azoto nelle fave di cacao abbiamo usato l'analizzatore elementare Perkin-Elmer 2400. Lo strumento usa un metodo di combustione che converte gli elementi del campione in semplici gas (CO_2 , H_2O , N_2). L'apparecchio è provvisto di un calcolatore per una rapida e corretta interpretazione dei dati e di una bilancia analitica.



E' necessario tarare la macchina facendo una corsa con il bianco e almeno una con una sostanza standard. . La quantità di sostanza da impiegare per l'analisi è compresa tra 1,000 e 3,000 mg. Il campione viene prima ossidato in un ambiente con ossigeno puro e i rimanenti gas sono poi tenuti a precise condizioni di pressione, temperatura e volume. I gas prodotti vengono miscelati e successivamente separati; una piccola quantità viene mandata al gascromatografo, e dopo la separazione vengono rivelati da un detector a conducibilità termica.

Il carbonio, l'idrogeno e l'azoto vengono rilevati rispettivamente come CO₂, H₂O e N₂.

4.3.4 Strumenti per l'analisi cromatografia: HPLC

HPLC sta per High Performance Liquid Chromatography che significa cromatografia liquida ad elevate prestazioni.

Essa rappresenta la naturale evoluzione della cromatografia su colonna a bassa pressione e delle sue varianti. Le alte prestazioni sono date da una particolare tecnica strumentale che ne giustifica non solo il nome, ma anche la qualità delle separazioni ottenute oltre che offrire la possibilità di fare un'analisi quantitativa della sostanza iniettata. Esistono diverse varianti dell'HPLC, che si basano su un diverso meccanismo di separazione e sulla natura delle fasi:

- Cromatografia di adsorbimento liquido-solido (LSC)
- Cromatografia di ripartizione a fase inversa liquido-liquido (LLC)
- Cromatografia di esclusione (SEC)
- Cromatografia a scambio ionico (IEC)
- Cromatografia su fase legata (BPC)

I componenti fondamentali dell'HPLC sono:

una pompa che regola e mantiene il flusso della fase mobile (costituita da liquido a bassa viscosità), un dispositivo per l'introduzione del campione, una colonna contenente la fase stazionaria (composta da microparticelle porose ben "impaccate" nella colonna) e un rivelatore per evidenziare, mediante opportuni segnali elettrici, i

componenti separati dalla colonna e permettere la valutazione qualitativa e quantitativa dei risultati.

Il campione può essere inserito con una siringa o mediante un'apposita valvola che viene azionata manualmente o meccanicamente. Una tipica valvola di iniezione dispone di un condotto di opportuno volume (loop) nel quale viene iniettato il campione mediante una normale siringa. Con un apposito comando, in questo condotto viene fatto passare il flusso di fase mobile la quale trascina perciò il campione in colonna.



Durante l'analisi, inoltre, è possibile tenere costante la composizione della fase mobile (eluizione isocratica) oppure è possibile variarla (eluizione a gradiente).

Nelle analisi dei campioni estratti dalle fave di cacao si è usato un sistema HPLC costituito da:

- 2 pompe a miscelazione ad alta pressione PRO STAR 210/215 della ditta Varian, con rivelatore PRO STAR 335 Photodiode Array detector della ditta Varian.
- una colonna C18 standard, lunga 25 cm, con 4,6 mm di diametro interno e granulometria FS 5 micron.
- un loop utilizzato da 100 μ l

La fase eluente utilizzata è costituita da due soluzioni:

(A) Acqua per HPLC a cui è stato aggiunto lo 0,01% di acido trifluoroacetico

(B) Acetonitrile per HPLC con il 5% di acqua per HPLC

L'eluizione è a gradiente:

- Tempo 0:00 A:90% B:10%
- Tempo 20:00 A:10% B: 90%
- Tempo 22:00 A:90% B:10%
- Tempo 27:00 A:90% B:10%

Il flusso della fase mobile è costante e di 1ml/min con pressione di lavoro di 115 bar.

La lunghezza d'onda della lampada UV (del rivelatore) è stata impostata a 206 nm.

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1 MESSA A PUNTO DELLE CONDIZIONI SPERIMENTALI

5.1.1 Analisi elementare

E' necessario effettuare due operazioni: calibrare con cura la bilancia analitica e verificare la temperatura dei forni.

Nella camera di combustione devono esserci 950° C, mentre in quella di riduzione la temperatura deve essere di 650° C.

L'analisi elementare non prevede il trattamento dei campioni da analizzare; è sufficiente tritare le fave e pesare da 1,000 mg a 3,000 mg di sostanza in una navicella di stagno che viene inserita direttamente nello strumento. Il peso viene rilevato automaticamente dall'analizzatore.

5.1.2 Estrazione del campione

La letteratura riporta delle metodiche ben precise per la determinazione delle ammine biogene nelle fave di cacao. Per l'ottenimento del campione da analizzare con la tecnica cromatografia dell' HPLC, occorre un'estrazione, cui seguirà una filtrazione e la separazione in imbuto separatore.

Nel nostro caso l'obiettivo era l'estrazione della serotonina, neurotrasmettitore monoamminico deputato alla regolazione dell'umore, del sonno, della temperatura, della sessualità e dell'appetito.

In mortaio si macinano, non troppo finemente le fave di cacao si pesano circa 8 g di campione e lo si suddivide in 4 provette da centrifuga. Si procede effettuando un passaggio noto come "metodo Soxhlet", utilizzato per la determinazione quantitativa della materia grassa. E' un metodo che si basa sull'estrazione della sostanza grassa dal campione con solvente scelto in base al tipo di grassi da determinare (si possono

usare etere etilico, etere di petrolio, esano o miscela). Nel nostro caso è utilizzato con lo scopo di sgrassare il campione.

Si aggiungono quindi 20 ml di etere di petrolio in ciascuna provetta e si centrifuga per 10 minuti, a 8000 RPM e a una temperatura di 15° C; estratto il surnatante si ripete l'operazione per altre due volte. In seguito, il residuo secco viene centrifugato per tre volte con acido perclorico al 10%, per 10 minuti, a 9000 RPM e a 20° C.

Il surnatante raccolto dopo ogni centrifugazione, viene portato a pH $8,5 \pm 0,1$ con idrato di potassio 4M. Avviene a questo punto una saponificazione che porta alla precipitazione della rimanente frazione grassa (n.d.r. il termine "saponificazione" è utilizzato in riferimento alla reazione di un idrossido di un metallo alcalino con un grasso che da origine a un "sapone"); processo facilitato dall'aggiunta di NaCl puro, che va a saturare la soluzione. La soluzione ottenuta viene ora filtrata con carta da filtro, trasferita in imbuto separatore e aggiunta di 100 ml di dietiletere.

Le ammine biogene, nel nostro caso la serotonina, vengono così estratte dall'etere. La frazione eterea raccolta viene concentrata fino a 1 ml circa con l'evaporatore rotante.

Al momento dell'analisi il campione viene portato a volume, in un matraccio da 5,0 ml, con una soluzione di TFA allo 0,01% (facente parte della fase mobile della corsa cromatografica).

5.1.3 Cromatografia liquida ad alta prestazione

Le analisi all'HPLC per la determinazione della serotonina, seguono il metodo oramai appurato dell'iniezione degli standard delle ammine biogene e in successione dei campioni. Sia gli standard che i campioni vengono diluiti con una miscela di acqua per HPLC a cui è stato aggiunto 0,01% di TFA, così da aumentare la polarità della molecola e permettere una migliore risoluzione.

La separazione della serotonina, come pure quella di altre ammine biogene quali 2-feniletilammina e tiramina, richiede una corsa cromatografica della durata di 27 minuti.

5.2 ANALISI STRUMENTALI

5.2.1 Analisi con CHN

Prima di ogni analisi vengono controllati tutti i parametri dell'analizzatore elementare verificandoli con uno standard preciso, l'acetanilide, della quale conosciamo le percentuali esatte di C, H e N e che permette allo strumento di risalire ai valori di ciascun campione (viene infatti utilizzata come *key-factor*).

Ogni campione viene pesato, messo nella navicella di stagno e inserito nello strumento. Il composto in esame subisce prima una combustione a 950° C e quindi i prodotti ottenuti attraversano una canna di riduzione a 650° C ottenendo così CO₂, H₂O e N₂.

5.2.2 Analisi con HPLC

L'uso di questo strumento ha permesso di ottenere la separazione della serotonina e di altre ammine biogene nelle fave di cacao.

Il valore dell'area di ciascun picco ottenuto ne ha consentito la determinazione quantitativa, utilizzando per ciascuna sostanza una *retta di taratura* preparata con tre concentrazioni di standard note e decrescenti a partire da una soluzione madre contenente 2,000 mg di standard in 100,0 ml di TFA allo 0,01%.

In questo modo abbiamo ottenuto le diverse rette che ci hanno permesso di estrapolare le concentrazioni delle ammine nei campioni e inoltre, hanno evidenziato la linearità della risposta cromatografica.

Le analisi sono state eseguite iniettando gli standard e poi i campioni in successione. Durante le corse cromatografiche assieme alla serotonina vengono separate altre sostanze con tempo di ritenzione di 5,03 e 7,50 minuti. Questi tempi di ritenzione appartengono a due ammine biogene, rispettivamente la tiramina e la 2-fenilettilammina.

Il tempo di ritenzione della serotonina, pari a 6,18 minuti, risulta invece essere molto vicino a quello della teobromina, il maggior alcaloide purifico presente nel cacao, presentando perciò grossi problemi nella determinazione delle concentrazioni della sostanza.

Inoltre consistenti concentrazioni di teobromina nel cacao, hanno spesso reso difficile la determinazione di quelle della serotonina, molto più basse e sensibili alla degradazione.

6. RISULTATI E DISCUSSIONE DEI DATI

6.1 RISULTATI E CONCLUSIONI DELL'ANALISI ELEMENTARE

<u>FAVE TOSTATE</u>	C%	H%	N%
SUR DEL LAGO <i>(Venezuela)</i>	61,25 ± 1,10	9,47 ± 0,20	2,36 ± 0,30
SAMBIRANO <i>(Madagascar)</i>	62,40 ± 0,11	9,70 ± 0,10	2,04 ± 0,02
ARRIBA <i>(Ecuador)</i>	61,80 ± 0,15	9,47 ± 0,01	2,40 ± 0,15
CARENERO SUPERIOR <i>(Ven)</i>	60,40 ± 0,25	9,15 ± 0,15	2,30 ± 0,02
APURIMAC <i>(Perù)</i>	62,95 ± 0,07	9,29 ± 0,12	2,35 ± 0,03
RIO CARIBE SUPERIOR <i>(Ven)</i>	62,45 ± 0,04	9,39 ± 0,04	2,00 ± 0,04

Attraverso l'analisi elementare abbiamo effettuato una prima valutazione delle caratteristiche delle fave.

Con questa metodica si è voluto verificare come a seconda della diversa provenienza o coltivazione vi siano differenze anche nella composizione chimica, infatti si sono esaminate e confrontate le quantità di carbonio, di idrogeno e di azoto presenti nei campioni provenienti da più paesi.

I valori derivano dalla media di tre analisi eseguite su ogni campione.

Dalla tabella sopra riportata risulta che la quantità di *carbonio* varia leggermente nei diversi campioni di fave tostate, mentre le percentuali di *idrogeno* ed *azoto* sono pressoché uguali.

	C%	H%	N%
<u>FAVE NON</u> <u>TOSTATE</u>	58,54 ± 1,15	8,65 ± 0,22	2,16 ± 0,05

L'analisi elementare è stata fatta anche su un campione di fave non tostate e si è notata una leggera differenza; qui il *carbonio* e l'*idrogeno* hanno una percentuale più bassa rispetto a quelle tostate, mentre non c'è una variazione dell'*azoto*.

L'analisi delle fave non tostate era stata effettuata per vedere se i processi di lavorazione del cacao possono influire sulla composizione chimica dello stesso; osservando i dati deduciamo che la tostatura non apporta grandi modifiche nella composizione chimica.

Abbiamo effettuato un'analisi elementare anche su campioni di fave provenienti dal Ghana. Parte delle fave in questione è stata sottoposta all'analisi elementare prima della tostatura e con esse sono state eseguite delle prove anche sulle bucce non ancora tostate. Una parte invece è stata analizzata dopo la tostatura a 160° C per 15 minuti, avvenuta in un laboratorio artigianale di produzione di cioccolato. La tabella sotto riportata mostra come vi sia una netta riduzione di *carbonio*, *idrogeno* e in parte anche di *azoto*, tra le fave e le bucce, siano esse tostate o non tostate.

	C%	H%	N%
<u>FAVE NON TOSTATE</u>	61,59 ± 0,15	9,34 ± 0,25	2,03 ± 0,38
<u>BUCCE NON TOSTATE</u>	51,23 ± 1,10	7,65 ± 0,40	2,62 ± 0,80
<u>FAVE TOSTATE</u>	59,93 ± 0,08	8,31 ± 1,05	2,68 ± 0,26
<u>BUCCE TOSTATE</u>	48,01 ± 1,17	4,79 ± 0,27	2,38 ± 1,02

Abbiamo potuto inoltre osservare la variazione della composizione chimica delle bucce; è evidente una netta riduzione dell'idrogeno dopo la tostatura, indice della perdita di una parte grassa e acquosa durante questa tappa.

I valori riportati in tabella, derivano dalla media di tre analisi eseguite su ogni campione.

6.2 RISULTATI E CONCLUSIONI DELL'ANALISI CROMATOGRAFICA

Serotonina nelle fave tostate

<u>FAVE TOSTATE</u>	SEROTONINA * mg/kg
SUR DEL LAGO <i>(Venezuela)</i>	2,20 ± 0,20
SAMBIRANO <i>(Madagascar)</i>	2,10 ± 0,80
ARRIBA <i>(Ecuador)</i>	0,80 ± 0,30
CARENERO SUPERIOR <i>(Venezuela)</i>	0,70 ± 0,30
APURIMAC <i>(Perù)</i>	---
RIO CARIBE SUPERIOR <i>(Venezuela)</i>	---

Serotonina nelle fave non tostate

	SEROTONINA * mg/kg
<u>FAVE NON TOSTATE</u> <i>(Venezuela)</i>	0,05 ± 0,03

* I valori riportati derivano da una media di 5 analisi eseguite su ogni campione.

La concentrazione della serotonina nei diversi campioni varia molto: in alcuni campioni di cacao raggiunge concentrazioni di 2,20 mg/kg, mentre in altri è addirittura assente.

Dalle analisi effettuate nelle fave non tostate è risultato che la serotonina è praticamente assente e ciò può essere dovuto al fatto che queste non hanno subito la tostatura per cui è venuta a mancare l'eventuale decarbossilazione termica del triptofano.

A nostro parere, inoltre, le fave non tostate sono più sensibili alle modalità di conservazione in quanto hanno una quantità di umidità maggiore rispetto a quelle tostate, per cui potrebbe esserci stata una degradazione dell'ammina.

Dalle analisi svolte, abbiamo potuto osservare una caratteristica interessante della serotonina: la sua rapida degradazione.

E' stata proprio questo a rendere inizialmente difficile la determinazione dell'ammina; abbiamo perciò ritenuto interessante analizzare questo problema e attraverso delle analisi temporali e metodiche abbiamo potuto riscontrare quanto riportato nelle tabelle qui sotto.

Influenza del tempo di macinazione delle fave di cacao nella concentrazione di *Serotonina*

	SEROTONINA * mg/kg nella fava macinata istantaneamente	SEROTONINA * mg/kg nella fava macinata anticipatamente
SUR DEL LAGO <i>(Venezuela)</i>	2, 54 ± 0,25	0,58 ± 0,03

* I valori riportati derivano da una media di 5 analisi eseguite su ogni campione.

Nota: Per anticipatamente s'intende che la macinazione delle fave di cacao è stata effettuata nei sette giorni precedenti l'estrazione.

Come si può notare il tempo di macinazione delle fave, è un fattore influente nella determinazione della serotonina; analisi effettuate in tempi successivi alla macinazione delle fave, nel nostro caso 7 giorni dopo la loro macinazione, hanno evidenziato una diminuzione della serotonina nel campione estratto e quantificato con HPLC.

Influenza del condizioni di conservazione dell'estratto delle fave di cacao nella concentrazione di *Serotonina*

	SEROTONINA * mg/kg nella fava macinata ed estratta istantaneamente	SEROTONINA * mg/kg nella fava macinata istantaneamente ed estratta dopo 7 giorni
SUR DEL LAGO <i>(Venezuela)</i>	2, 54 ± 0,25	0,21 ± 0,15

* I valori riportati derivano da una media di 5 analisi eseguite su ogni campione.

Un altro fatto che può influenzare la stabilità della serotonina è il tempo e la modalità di conservazione dell'estratto prima dell'analisi cromatografia.

Abbiamo potuto osservare che effettuando l'analisi cromatografica, 7 giorni dopo l'estrazione, vi è una evidente riduzione della concentrazione di serotonina.

Dalle nostre analisi abbiamo potuto dunque stabilire che: c'è una degradazione dell'ammina qualora il campione non venga trattato in tempi brevi; è importante

triturare le fave subito prima di operare l'estrazione delle ammine e effettuare le analisi cromatografiche non appena è stata effettuata l'estrazione del campione. Questi sono informazioni importanti non solo per le nostre analisi ma anche per quanto riguarda la conservazione del cacao per uso alimentare.

2-fenilettilammina nelle fave tostate

<u>FAVE TOSTATE</u>	PEA * mg/kg
SUR DEL LAGO <i>(Venezuela)</i>	0,62 ± 0,20
SAMBIRANO <i>(Madagascar)</i>	2,99 ± 1,78
ARRIBA <i>(Ecuador)</i>	---
CARENERO SUPERIOR <i>(Venezuela)</i>	1,63 ± 0,30
APURIMAC <i>(Perù)</i>	0,05 ± 0,01
RIO CARIBE SUPERIOR <i>(Venezuela)</i>	0,37 ± 0,03

2-fenilettilammina nelle fave non tostate

	PEA * mg/kg
<u>FAVE NON TOSTATE</u> <i>(Venezuela)</i>	0,12 ± 0,04

* I valori riportati derivano da una media di 5 analisi eseguite su ogni campione.

Dai dati ottenuti dalle analisi svolte in laboratorio, si può notare che la concentrazione di 2-fenilettilammina nelle fave di cacao varia in base alla provenienza. Nel cacao Sambirano è presente in maggior quantità, mentre nel cacao Arriba l'ammina è del tutto assente. Si può dedurre che queste differenze siano dovute soprattutto alla tipologia di fava, alla qualità di fermentazione ed essiccazione ma anche alle modifiche chimiche portate da alcune fasi della lavorazione delle fave: in particolare la tostatura che determina la decarbossilazione termica della fenilalanina, responsabile della formazione della 2-fenilettilammina.

Con ciò, è possibile spiegare perché in commercio esistono cacao più pregiati che derivano dalla lavorazione di fave provenienti da un'unica piantagione, e cacao di minor qualità che invece derivano da miscele di fave di diverse piantagioni.

La 2-fenilettilammina è presente nel cacao con valori troppo bassi per avere un effetto clinico; nei trattamenti farmacologici le dosi dell'ammina in questione sono di circa 10-60 mg al giorno, quantità di gran lunga superiori rispetto a quelle riscontrate nelle nostre analisi.

In ogni caso, la sua presenza, in associazione alle altre molecole bioattive presenti nel cacao, aiuta a migliorare l'umore, aumenta l'appetito, dà sensazione di piacere ed euforia.

Tiramina nelle fave tostate

<u>FAVE TOSTATE</u>	TIRAMINA * mg/kg
SUR DEL LAGO <i>(Venezuela)</i>	3,90 ± 0,20
SAMBIRANO <i>(Madagascar)</i>	8,30 ± 0,03
ARRIBA <i>(Ecuador)</i>	6,10 ± 0,50
CARENERO SUPERIOR <i>(Venezuela)</i>	5,60 ± 0,20
APURIMAC <i>(Perù)</i>	4,30 ± 1,40
RIO CARIBE SUPERIOR <i>(Venezuela)</i>	4,90 ± 1,00

Tiramina nelle fave tostate

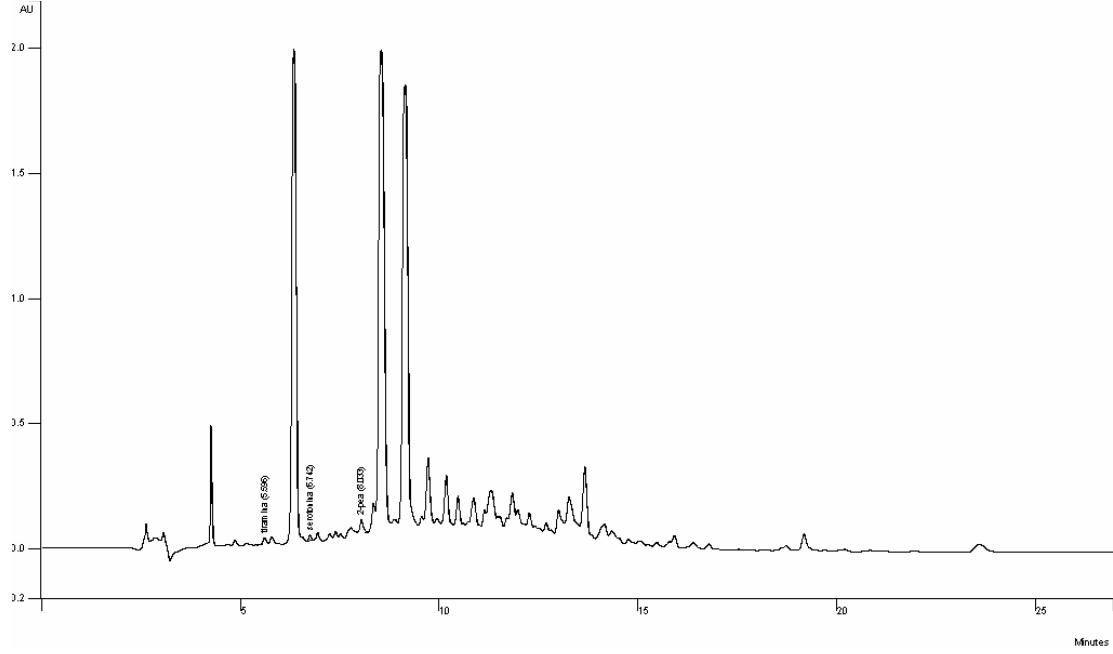
	TIRAMINA * mg/kg
<u>FAVE NON TOSTATE</u> <i>(Venezuela)</i>	1,00 ± 0,20

* I valori riportati derivano da una media di 5 analisi eseguite su ogni campione.

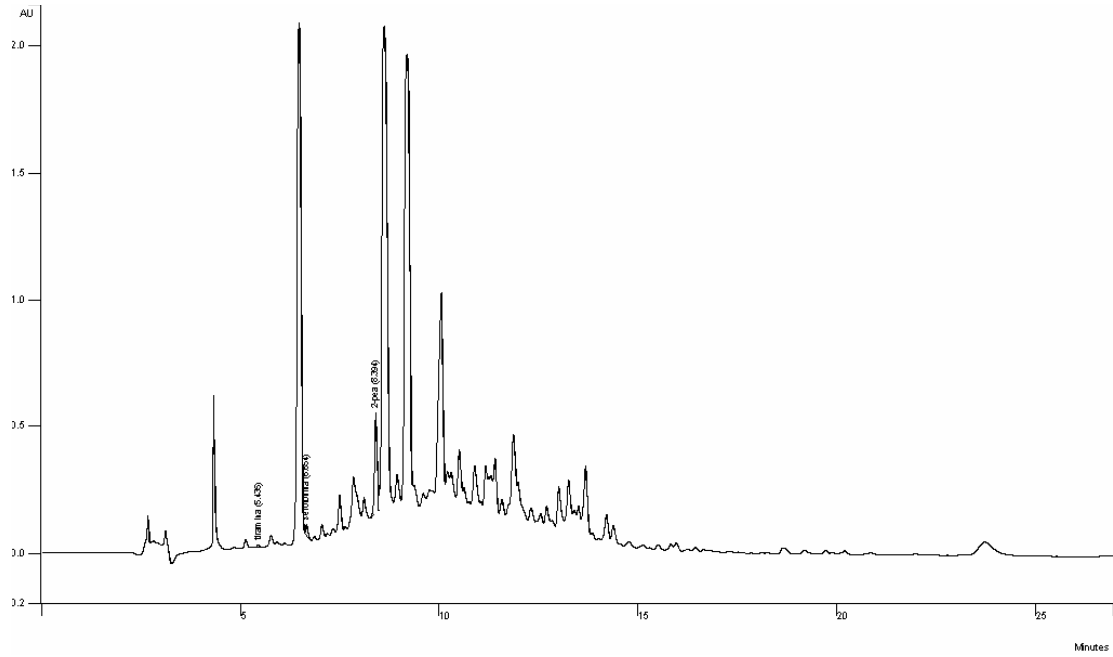
A differenza di quanto visto prima per la 2-feniletilammina, la concentrazione della tiramina nei diversi campioni non varia molto. Nelle tabelle sopra riportate, possiamo notare che in tutte le fave troviamo una concentrazione di ammina inferiore a 10 mg/kg, con una concentrazione maggiore nel cacao Sambirano e nettamente inferiore nelle fave non tostate. Possiamo supporre che la scarsa presenza di tiramina nelle fave non tostate, sia dovuta proprio alla mancata tostatura e dunque non sia avvenuta un'ulteriore decarbossilazione della tirosina. La carenza di ammina potrebbe comunque essere dovuta alla composizione chimica delle fave.

Anche in questo caso, i valori di tiramina trovati sono troppo bassi per poter affermare che possano provocare reazioni avverse; infatti affinché si verifichi la *cheese reaction* bisogna assumere almeno 150 mg/die di ammina, e ciò avverrebbe solo con un'ingestione di più di 15 kg di cacao.

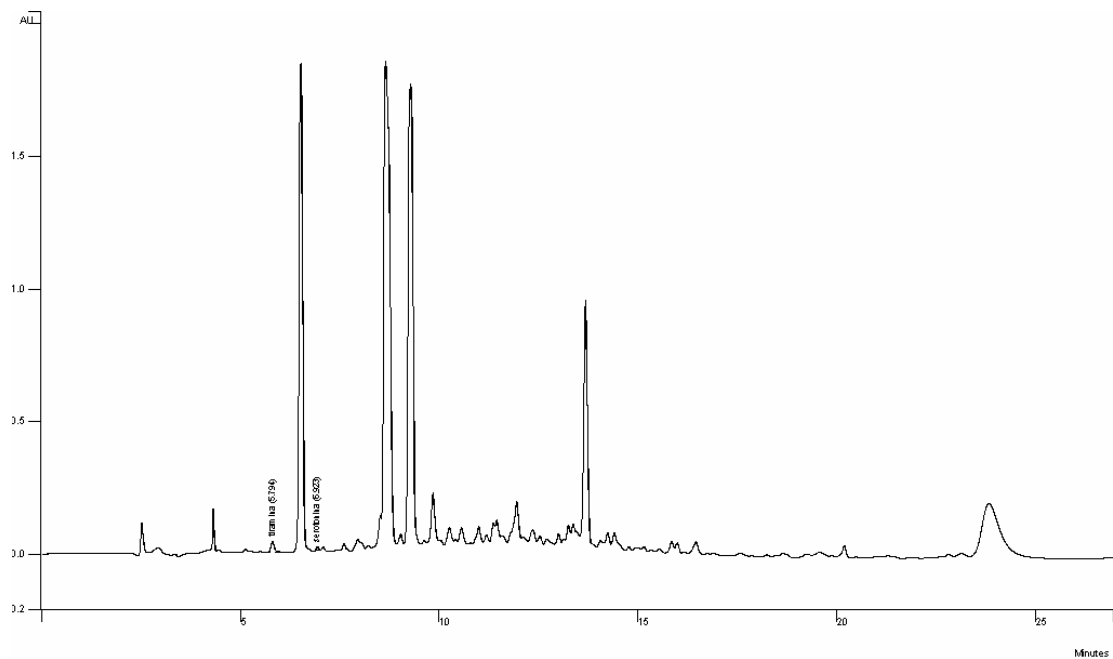
I cromatogrammi



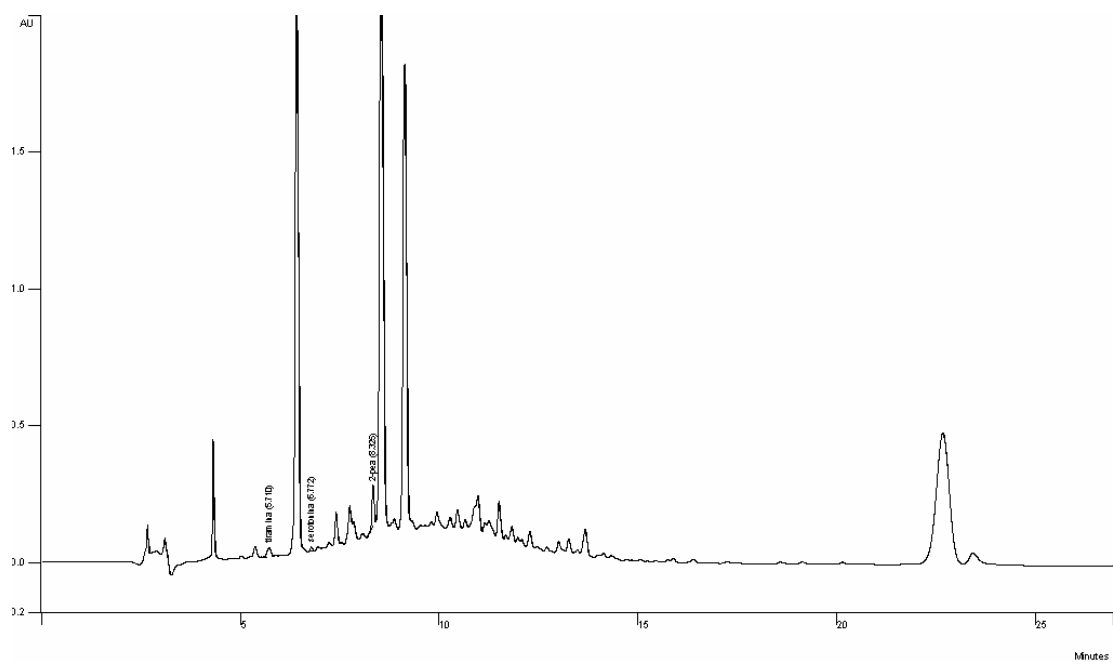
Fave Sur del Lago (*Venezuela*)



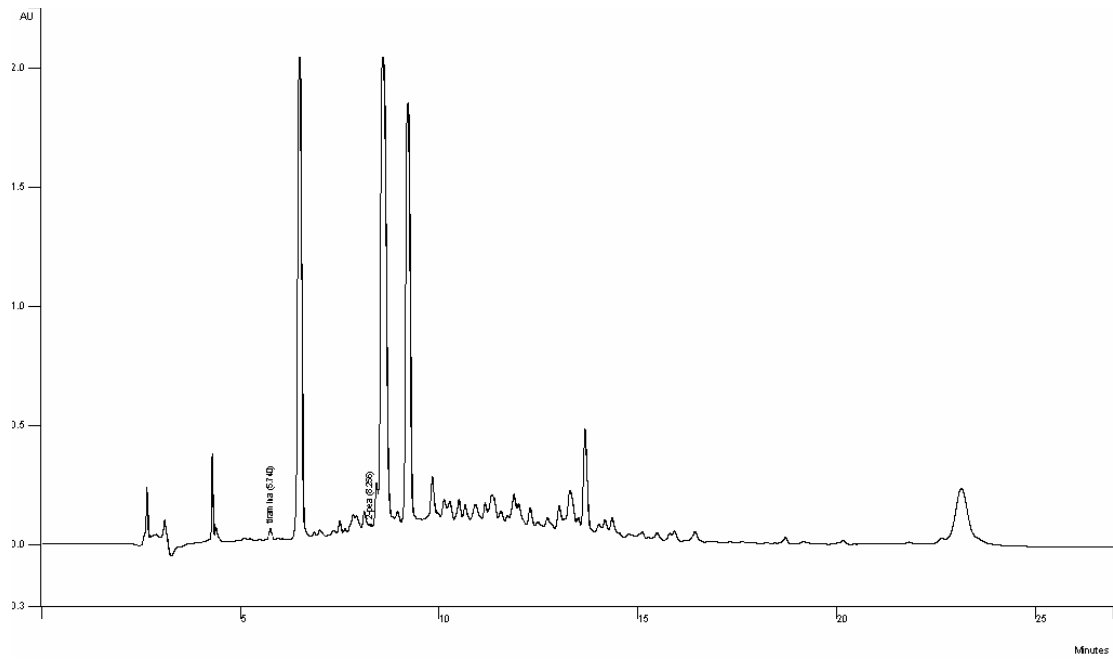
Fave Sambirano (*Madagascar*)



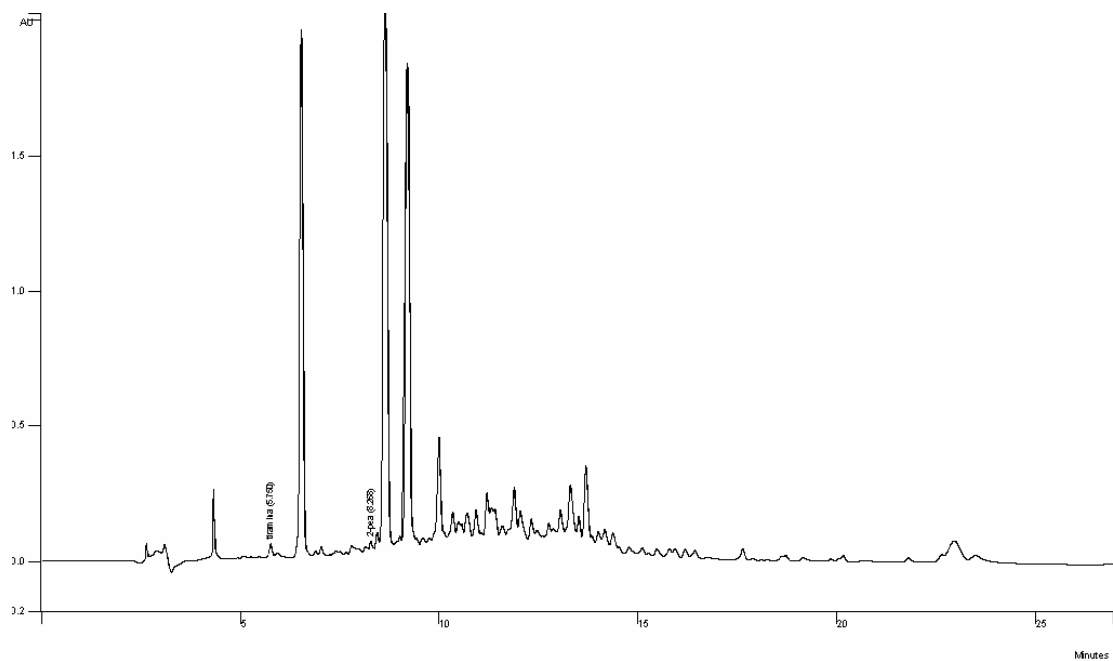
Fave Arriba (*Ecuador*)



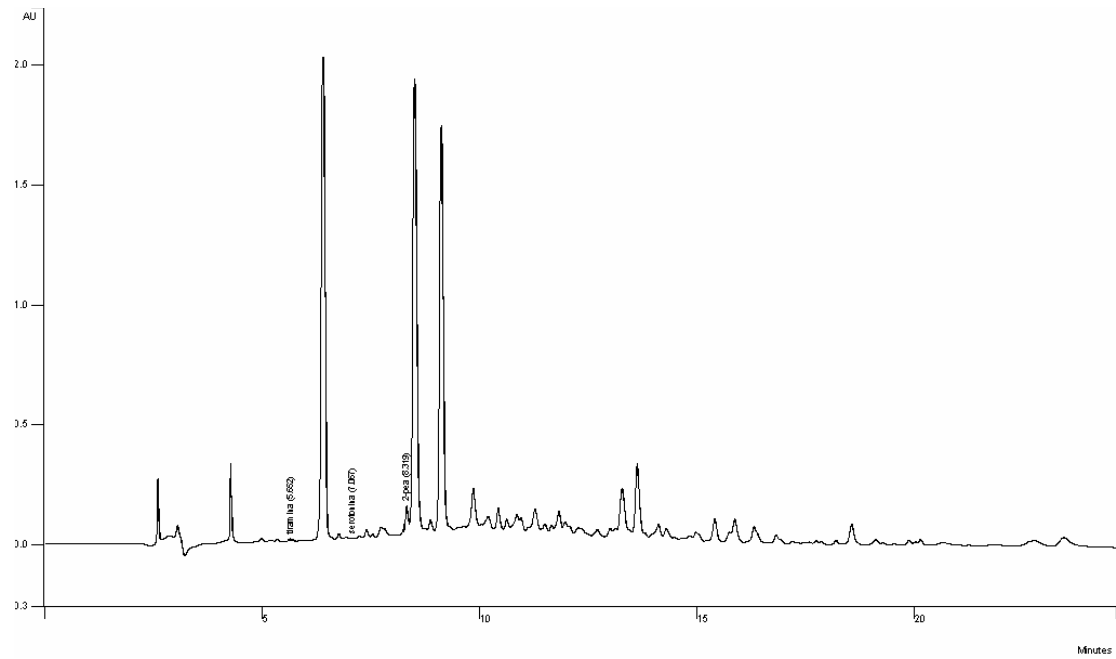
Fave Carenero Superior (*Venezuela*)



Fave Apurimac (*Perù*)



Fave Rio Caribe Superior (*Venezuela*)



Fave Non Tostate

7. IL FRUTTO FRESCO

7.1 APERTURA DEL FRUTTO IN LABORATORIO

Operando un taglio netto con un coltello, abbiamo aperto il frutto del cacao.

All'interno del frutto, c'erano 52 fave, avvolte da una mucillagine bianca e molto densa.

Con l'aiuto di un coltellino e dell'acqua, abbiamo ripulito le fave dalla mucillagine, operazione che ci è costata tempo e ci ha creato qualche difficoltà.

Le fave estratte sono state poi riposte in

frigo per evitare che subissero alterazioni ma in questo modo è venuta a mancare una delle tappe fondamentali della lavorazione del cacao: la fermentazione.



7.2 LE FAVE FRESCHE

Abbiamo quindi selezionato 18 fave fresche, abbiamo tolto la buccia con l'aiuto di un coltellino e le abbiamo triturate in un mortaio.

Su queste si è eseguito il procedimento di estrazione delle ammine biogene, ed è stata poi verificata la loro presenza mediante tecnica cromatografia ad alte prestazioni (HPLC).



In queste fave non abbiamo fatto l'analisi elementare in quanto l'elevata quantità di acqua avrebbe compromesso i risultati dell'analisi.

7.3 L'ESSICAMENTO DELLE FAVE

Le fave conservate, sono state invece utilizzate per simulare un'essiccazione. Sono state poste per 5 giorni in un forno della ditta Heraeus a 40° C e si è avviata così la loro essiccazione. Metà di queste fave è stata triturrata in mortaio e dopo avere eseguito l'estrazione delle ammine è stata effettuata l'analisi cromatografica. Queste fave sono state sottoposte anche all'analisi elementare con CHN.

7.4 LA TOSTATURA DELLE FAVE

Le rimanenti fave essiccate sono invece state tostate in forno a 120° C per 90 minuti. Successivamente le abbiamo sgusciate e triturate in un mortaio. Anche su queste è stata effettuata l'estrazione, l'analisi all'HPLC e l'analisi elementare.

7.5 RISULTATI E CONCLUSIONI

Analisi elementare

	C %	H %	N %
FAVE ESSICCATE	59,59 ± 0,35	8,45 ± 0,25	2,53 ± 0,07
FAVE TOSTATE	61,09 ± 0,19	8,96 ± 0,05	2,86 ± 0,14
BUCCE TOSTATE	46,18 ± 0,34	5,78 ± 0,16	1,44 ± 0,13

I valori riportati derivano da una media delle analisi eseguite su ogni campione.

I dati ottenuti dall'analisi elementare ci dimostrano che in queste fave, trattate da noi in laboratorio, non vi sono grandi variazioni di C, H, N.

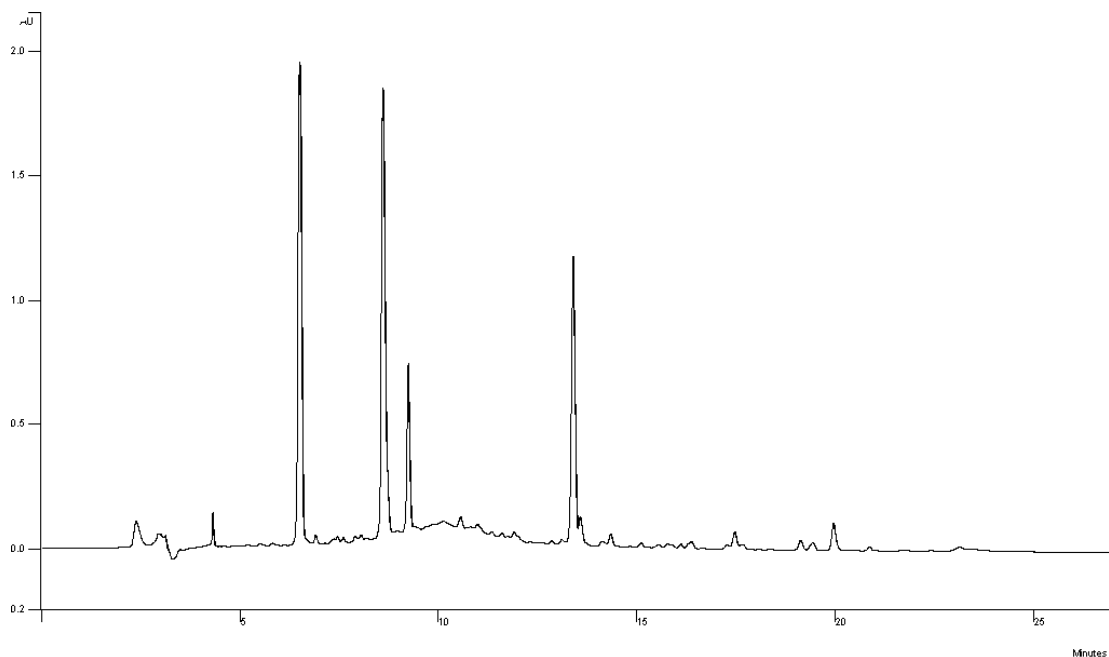
La tostatura avvenuta in forno, a 120° C per 90 minuti non comporta grandi variazioni nella composizione chimica: l'*azoto* e l'*idrogeno* hanno concentrazioni pressoché uguali; invece, per quanto riguarda il *carbonio* dopo la tostatura possiamo evidenziare un leggero incremento nella quantità percentuale.

L'analisi effettuata sulle bucce tostate, ha evidenziato una netta diminuzione dei valori percentuali di *carbonio*, *idrogeno* e *azoto*, rispetto alle fave tostate.

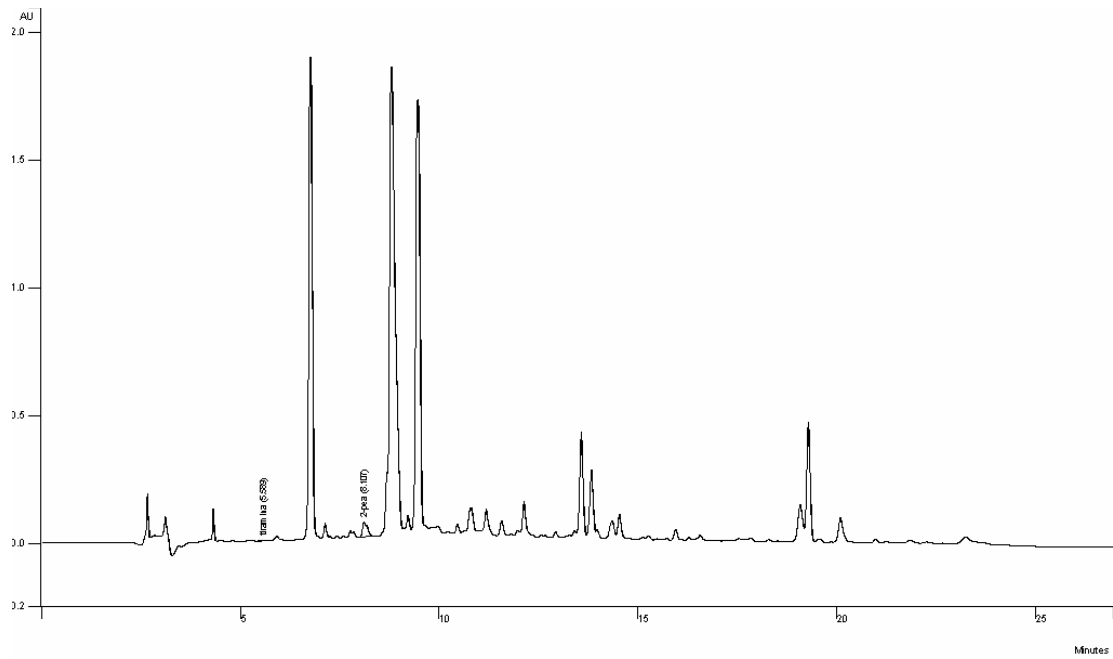
Analisi cromatografica

Dalle analisi effettuate è emerso che le fave fresche non contengono ammine biogene, mentre in quelle essiccate c'è la 2-feniletilammina e tracce di tiramina. Anche in quelle tostate si riscontra la sola presenza di PEA e tiramina.

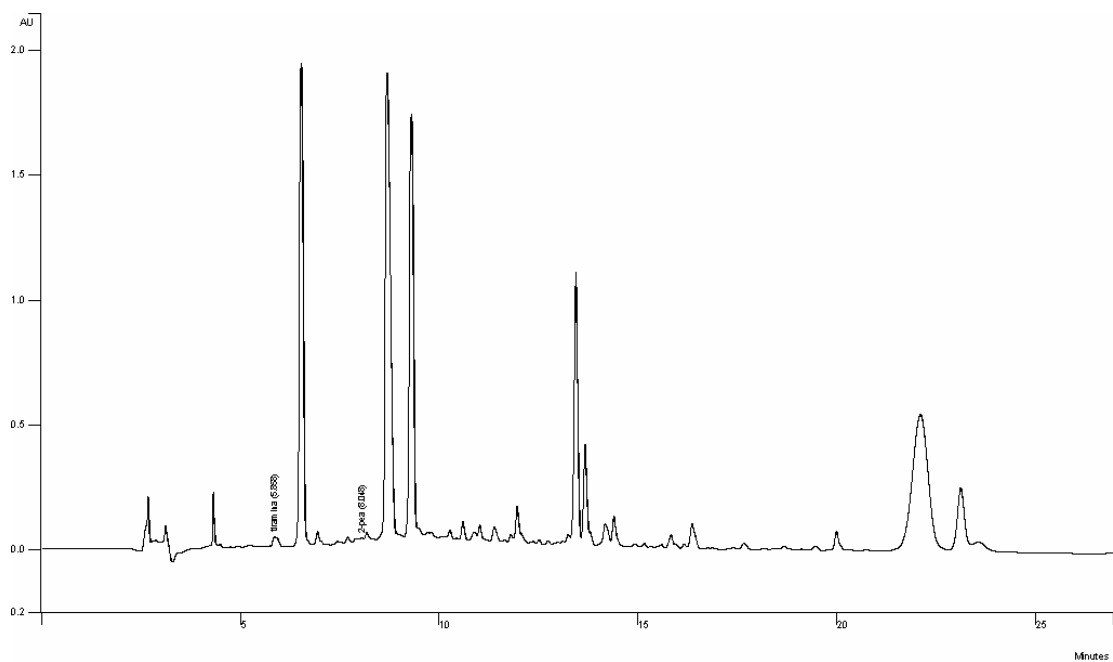
Il contenuto di ammine nelle fave, non corrisponde a quello che avremmo potuto trovare in un cacao trattato industrialmente in quanto nei nostri campioni è mancata la fermentazione dopo l'estrazione dal frutto; le fave infatti sono state conservate in frigo mentre normalmente subiscono la "fermentazione estrattiva" nel luogo di raccolta.



Fave Fresche



Fave Essiccate



Fave Tostate

8. BIBLIOGRAFIA

1. Pastore P, Favaro G, Badocco D, Tapparo A, Cavalli S, Saccani G, “Determination of biogenic amines in chocolate by ion chromatographic separation and pulsed integrated amperometric detection with implemented wave-form at Au disposable electrode”, J Chromatogr A. 2005 Dec 9;1098(1-2):111-5
2. Cabras P., Martelli A., “Chimica degli alimenti”, Ed. Piccin, 2004
3. AA.VV., “Cioccolato il cibo degli dei.” Mondadori, 1991.
4. Onal A., “A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods”, Food Chemistry 2007.103(4):1475-1486
5. Cozzi R., Protti P., Ruaro T., “Analisi chimica. Moderni metodi strumentali”, Ed. ESU
6. Castellani R., “Determinazione della 2-fenilettilammina nelle fave di cacao”. Tesi di laurea in Farmacia, Università di Padova, A.A. 2005-2006
7. Zancato M., Castellani R., Comai S., Bertazzo A., “Determinazione della 2-fenilettilammina nelle fave di cacao”.
8. Jeffrey Hurst W., Toomey P.B., “High-performance Liquid Chromatographic Determination of Four Biogenic Amines in Chocolate.”
9. Pecsok R.L., Shields L.D., “Metodi moderni di analisi chimica”, Ed. ETAS libri
10. Calbiani F., Careri M., Eviri L., Mangia A., Ristarà L., Zagnoni I., “Metodi rapidi per la determinazione di ammine biogene in prodotti caseari: estrazione ed analisi HPLC-ESI-MS/MS”.

11. Ziegleder G., Stojacic E., Stumpf B., “ Vorkommen von Phenylethylamin und seinen Derivaten in Kakao und Kakaoerzeugnissen.“ Z. Lebensm Unters Forsch 1992; 195: 235-238
12. www.food-info.net
13. <http://europa.eu/>
14. www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Azilect/H-574-PI-it.pdf
15. www.molecularlab.it/news/view.asp?n=3100
16. Herbeth B, Aubry E, Fumeron F, Aubert R, Cailotto F, Siest G, Visvikis-Siest S, “Polymorphism of the 5-HT_{2A} receptor gene and food intakes in children and adolescents: The Stanislas family Study”, Am J Clin Nutr. 2005 Aug;82(2):467-70
17. Wolinsky TD, Swanson CJ, Smith KE, Zhong H, Borowsky B, Seeman P, Branchek T, Gerald CP, “The Trace Amine 1 receptor knockout mouse: an animal model with relevance to schizophrenia”, Genes Brain Behav 2007 Oct;6(7):628-39
18. www.molecularlab.it/news/view.asp?n=4541
19. Buijsse B., Feskens EJ, Kok FJ, Kromhout D., “ Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study”, Arch Intern Med. 2006 Feb 27;166(4):411-7
20. Paterson DS, Trachtenberg FL, Thompson EG, Belliveau RA, Beggs AH, Darnall R, Chadwick AE, Krous HF, Kinney HC, “Multiple serotonergic brainsystem abnormalities in sudden infant death syndrome”, JAMA. 2006
21. Sahni R, Fifer WP, Myers MM, “Identifying infants at risk for sudden infant death syndrome”, Curr Opin Pediatr. 2007 Apr;19(2):145-9

22. Purves D., Fitzpatrick D., Augustine G.J., Katz L.C., Williams S.M., McNamara J., “Neuroscience Second Edition”
23. Taubert D., Roesen R., Schömig E., “Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis”, *Arch Intern Med.* 2007 Apr 9; 167(7):626-34
24. Villalón CM, Centurión D, “ Cardiovascular response produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implication”, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2007 Oct; 376(1-2):45-63
25. Saxena R, Villalón CM, “Cardiovascular effects of serotonin agonists and antagonists”, *J Cardiovasc Pharmacol*,1990;15 Suppl7:S17-34
26. Xie Z, Miller GM, “Trace amine-associated receptors 1 is a modulator of the dopamine transporter”, *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Apr;321(1):128-36
27. Zucchi R, Chiellini G, Scanlan TS, Grandy DK, “Trace amine-associated receptors and their ligands”, *Br J Pharmacol.* 2006 Dec;149(8):967-78
28. Siegel G.J, Agranoff B.W, Wayne Albers R, Fiske S, Uhler M, “Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. Sixth edition”
29. Sawaguchi T, Patricia F, Kadhim H, Groswasser J, Sottiaux M, Nishida H, Kahn A, “The relationship between neuronal plasticity an serotonergic neurons in the brainsistem of SIDS victims”, *Early Hum Dev.* 2003
30. Ishida K, Murata M, Katagiri N, Ishikava M, Abe K, Kato M, Utsunomiva I, Taguchi K, “Effects of beta-phenylethylamine on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area in the rat: a combined electrophysiological and microdialysis study”, *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Aug;314(2):916-22

31. Wiittle N, Sartori SB, Dierssen M, Lubec G, Singewald N, “Fetal Down syndrome brains exhibit aberrant level of neurotransmitters critical for normal brain development”, *Pediatrics*. 2007 Dec;120(6):e1465-71
32. Macht M, Roth S, Ellgring H, “Chocolate eating in healthy men during experimentally induced sadness and joy”, *Appetite* 2002 Oct;39(2):147-58
33. Khwanchuea R, Mulvany MJ, Jansakul C, “Cardiovascular effects of tyramine: Adrenergic and cholinergic interactions”, *Eur J Pharamcol*. 2008 Jan 28;579(1-3):308-17
34. Zhu ZT, Munhall AC, Johnson SW, “Tyramine excites rat subthalamic neurons in vitro by a dopamine-dependent mechanism”. *Neuropharmacology*. 2007 Mar;52(4):1169-78
35. Moon RY, Horne RS, Hauck FR, “Sudden infant death syndrome”, *Lancet*. 2007
36. Morris K., Taren D., “Eating your way to happiness: chocolate, brain metabolism and mood.”
37. Kaye W, “Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa”, *Physiol Behav*. 2007 Nov 29
38. Ishida K, Murata M, Kato M, Utsunomiva I, Hoshi K, Taguchi K, “Beta-phenylethylamine stimulates striatal acetylcholine release through activation of the AMPA glutaminergic pathway”, *Biol Pharm Bull*. 2005 Sep;28(9):1626-9
39. Sabelli H., Fink P., Fawcett J., Tom C., “Sustained antidepressant effect of PEA replacement.” *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1996 spr, 8:2, 168-71
40. <http://it.wikipedia.org/wiki/Cioccolato>