UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE

"STUDIO DI ALIMENTI TIPICI DELLA DIETA MEDITERRANEA MEDIANTE SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE"

Irene D'Amico

Laureata presso l'Università degli Studi del Molise
A.A. 2005/2006

TESI PRESENTATA PER IL CONSEGUIMENTO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
"BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI"
XXII Ciclo

Coordinatore: Prof. *Emanuele Marconi*

Tutor: Prof.ssa *Luisa Mannina*

Commissione nominata

Prof. Francesco Addeo

Prof.ssa Valeria Capilongo

Prof. Giancarlo Moschetti

Anni Accademici 2006/2009

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE 1
1.1 Referenze 6

CAPITOLO 2 - RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE 9
2.1 Introduzione 10
2.2 Momento angolare e momento magnetico nucleare (trattazione semi-classica) 10
2.3 Applicazione di una campo magnetico statico esterno 12
2.4 Livelli energetici 13
2.5 Magnetizzazione 15
2.6 La risonanza magnetica nucleare 15
2.7 Processi di rilassamento 17
2.8 Segnale NMR 19
2.9 *Chemical shift* e costanti di accoppiamento 21
2.10 Stabilità ed omogeneità del campo magnetico 24
2.11 Uso del solvente 24
2.12 Soppressione del segnale del solvente 25
2.13 Processamento dello spettro 26
2.14 Referenze 28

CAPITOLO 3 - ANALISI STATISTICA MULTIVARIATA 29
3.1 Introduzione 30
3.2 Organizzazione dei dati 30
3.3 Pretrattamento dei dati 31
3.4 Analisi esplorativa dei dati 32
3.5 Analisi della varianza 35
3.6 Analisi delle componenti principali 37
3.7 Analisi di agglomerazione 38
3.8 Analisi discriminante lineare 40
3.9 Referenze 43

CAPITOLO 4 - PROFILO METABOLICO DI ESTRATTI DI SPIGOLA (*DICENTRARCHUS LABRAX*) E DISCRIMINAZIONE TRA ALLEVATO E PESCATO MERINO 44
4.1 Introduzione 45
4.2 Materiali e Metodi 47
4.2.1 Campionamento 47

4.2.2 Analisi chimico fisiche 47
4.2.3 Analisi microbiologiche 48
4.2.4 Analisi NMR 49
4.3 Analisi statistica 52
4.4 Risultati e Discussione 53
4.4.1 Analisi chimico-fisiche 53
4.4.2 Analisi microbiologiche 53
4.4.3 Assegnazione degli spettri ^{1}H NMR e ^{13}C NMR 54
4.4.3.1 Analisi NMR dell'estratto acquoso 54
4.4.3.2 Analisi NMR dell'estratto organico 61
4.4.4 Discriminazione tra spigole di allevamento e pescato marino: risultati preliminari 69
4.5 Referenze 76

CAPITOLO 5 - LATTUGA: CARATTERIZZAZIONE NMR DI PRODOTTI GM E NON-GM 80
5.1 Introduzione 81
5.2 Materiali e Metodi 82
5.2.1 Campionamento 82
5.2.2 Processo di estrazione per l'analisi NMR 84
5.2.3 Misure NMR 85
5.2.4 Processing 86
5.2.5 Contenuto dei metaboliti negli estratti acquosi 86
5.3 Analisi statistica 86
5.4 Risultati e Discussione 87
5.4.1 Analisi metabolica: caratterizzazione di estratti acquosi di lattuga transgenica e *wild type* 87
5.4.2 Analisi dei metaboliti dell'astratto acquoso 94
5.5 Conclusioni 98
5.6 Referenze 100

CAPITOLO 6 - OLIO DI OLIVA AROMATIZZATO: CARATTERIZZAZIONE DI DIFFERENTI TIPOLOGIE DI OLI AROMATIZZATI 103
6.1 Introduzione 104
6.1.1 Tecniche di produzione degli oli di oliva aromatizzati 105
6.2 Materiali e Metodi 107
6.2.1 Campionamento 107
6.2.2 Misure NMR 108

6.3 Risultati e Discussione 110
6.3.1 Spettri ^{1}H NMR degli oli aromatizzati 110
6.3.1.1 Olio di oliva aromatizzato al bergamotto 110
6.3.1.2 Olio di oliva aromatizzato all'arancia 113
6.3.1.3 Olio di oliva aromatizzato al limone 114
6.3.1.4 Olio di oliva aromatizzato al rosmarino 116
6.3.1.5 Olio di oliva aromatizzato al peperoncino 116
6.3.1.6 Olio di oliva aromatizzato al cardamomo 117
6.3.1.7 Oli di oliva aromatizzati al mandarino, allo zenzero, al tartufi bianco e al basilico 117
6.3.2 Qualità dell'olio di oliva aromatizzato 118
6.4 Referenze 124

CAPITOLO 7 - GELATINA REALE: STUDIO PRELIMINARE DEL PROFILO METABOLICO E DISCRIMINAZIONE TRA PRODOTTI DI DIVERSA ORIGINE GEOGRAFICA 127
7.1 Introduzione 128
7.2 Materiali e Metodi 129
7.2.1 Preparazione dei campioni 129
7.2.2 Spettri ^{1}H HR-MAS NMR 129
7.2.3 Analisi statistica 130
7.3 Risultati e Discussione 131
7.3.1 Assegnazione dello spettro ^{1}H HR-MAS NMR 131
7.3.2 Analisi statistica 137
7.4 Referenze 141

ABBREVIAZIONI USATE NEL TESTO 142

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è uno strumento molto efficace ed ormai sempre più utilizzato nell'analisi degli alimenti. In particolare questa spettroscopia permette di studiare il profilo metabolico dei prodotti alimentari e quindi di ottenere informazioni sulla loro origine, qualità e genuinità. L'NMR ad alta risoluzione infatti è in grado di risolvere spettri di miscele complesse e di quantificare i composti presenti nel campione che viene analizzato tal quale o dopo una semplice estrazione. Le metodologie NMR sono quindi particolarmente adatte alle applicazioni nel campo della metabolomica che ha lo scopo di identificare i diversi metaboliti presenti in un campione (cellula o tessuto).

Nell'analisi degli alimenti il protocollo analitico da utilizzare può essere diverso secondo il problema specifico. Nel caso in cui si deve analizzare, ad esempio, l'effetto primario di una alterazione genetica è possibile circoscrivere l'analisi esclusivamente al substrato o al prodotto diretto che si forma a causa di tale modificazione. Questa strategia prende il nome di *target analysis* ed è principalmente usata per scopi di screening. In altre situazioni la procedura analitica può essere ristretta all'identificazione e alla quantificazione di un numero selezionato di metaboliti predefiniti in un campione biologico. Questo processo prende il nome di *metabolite profiling.* La scelta dei metaboliti può essere guidata da criteri quali l'appartenenza ad una classe di composti (carboidrati, lipidi, amminoacidi) o ad una precisa via metabolica. Un terzo approccio invece consiste in una analisi completa del campione, in cui tutti i metaboliti del sistema in esame vengono identificati e quantificati. Tale metodo rivela il metaboloma del sistema biologico e per questo è chiamato *metabolomica.* Infine, può non essere necessario identificare e quantificare i metaboliti presenti nel campione ma è sufficiente avere "l'impronta digitale" del campione in esame che può essere un cromatogramma o un spettro a seconda della metodica utilizzata. Questo processo è chiamato *metabolic fingerprinting* [1].

Tecniche analitiche come la cromatografia, sia liquida che in fase gassosa, sono molto adatte nei casi di *target analysis* o *metabolite profiling* in cui i componenti da determinare sono noti ed è quindi facile individuarli e quantificarli con appropriati standard. Le tecniche NMR, invece, sono particolarmente appropriate nella metabolomica propriamente detta e nel *metabolic fingerprinting* in cui non devono necessariamente essere conosciuti i composti da determinare.

Le analisi metabolomiche sono particolarmente importanti negli esperimenti comparativi nei quali si pone l'accento sui cambiamenti relativi delle concentrazioni dei metaboliti in campioni diversi. Quando gli spettri NMR di una serie di campioni vengono acquisiti nelle stesse condizioni (temperatura, concentrazione del campione, pH, etc.) l'intensità dei segnali NMR, proporzionale alla concentrazione dei composti

corrispondenti, può essere utilizzata come tale in appropriate analisi statistiche multivariate che permettono la comparazione tra campioni diversi individuandone somiglianze e differenze. Il protocollo statistico prevede un insieme di analisi tra cui l'analisi della varianza (ANOVA), l'analisi delle componenti principali (PCA) e l'analisi discriminante lineare (LDA) (*cfr. Capitolo 3*). La spettroscopia NMR insieme a metodi chemiometrici, ha permesso la caratterizzazione di diversi alimenti in relazione alla qualità, l'origine geografica e la genuinità.

Olio di oliva. Gli oli di oliva sono stati studiati approfonditamente con la tecnica NMR [2,3,4]. Le spettroscopie ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR, accoppiate ad una adeguata analisi statistica multivariata, si sono rivelate particolarmente efficaci ed hanno permesso di caratterizzare gli oli in base alla loro origine geografica [2, 4, 5] alla cultivar, alla qualità e genuinità [3, 6-8]. La spettroscopia ^{1}H NMR consente di determinare sia i composti principali presenti nell'olio di oliva che quelli minoritari con un identico errore sperimentale, costantemente basso, per ogni composto analizzato. La spettroscopia ^{13}C NMR, invece, fornisce informazioni sugli acidi grassi presenti ed è particolarmente utile per la determinazione della distribuzione delle catene grasse sulle posizioni *sn* 1,3 e *sn* 2 del glicerolo [9-14]. Le intensità dei segnali selezionati da spettri ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR, sottoposte ad opportuna analisi statistica, permettono di ottenere raggruppamenti secondo il problema specifico.

La tecnica NMR è stata anche validata nell'ambito di un progetto europeo come metodica analitica per rilevare aggiunte fraudolente di olio di nocciola in oli di oliva [15, 16].

Birra. Il protocollo NMR-analisi statistica è stato applicato anche al caso di birre di diversa produzione [17, 18]. In particolare in uno studio condotto su 50 birre di differente tipo, la PCA applicata ai dati NMR ha mostrato che la separazione dei campioni era dovuta alla diversa concentrazione di carboidrati, come le destrine, il maltosio e il glucosio, e di composti aromatici.

Alimenti altamente deperibili. Un ulteriore studio è stato condotto su alimenti deperibili trattati con radiazioni ionizzanti come il tartufo [19]. L'identificazione di una vasta gamma di composti appartenenti sia alla frazione idrosolubile quali carboidrati, amminoacidi, acidi organici, fenoli, sia a quella organica quali fosfolipidi, acidi grassi, steroli ha portato ad una caratterizzazione della composizione chimica.

Frutti e succhi di frutta. I succhi di frutta sono stati molto studiati grazie alla semplicità nella preparazione dei campioni e alla notevole importanza che essi rivestono nell'alimentazione umana ed animale. È stato quindi studiato il profilo metabolico mediante tecniche NMR di succhi di mela, di mango, d'arancia e di pomodoro. In una delle prime indagini è stato mostrato come combinando la spettroscopia ^{1}H-NMR e la statistica multivariata è stato possibile distinguere tra tre

tipi differenti di succhi di mela [20]. I principali componenti responsabili della classificazione sono risultati essere il saccarosio e l'acido malico.

Uno studio condotto da Le Gall *et al*., sui succhi di arancia ha dimostrato come succhi misti possono essere riconosciuti chiaramente da succhi d'arancia puri sulla base della diversa concentrazione di dimetilprolina [21].

L'analisi dettagliata dello spettro ^{1}H-NMR ad alta risoluzione del succo di pomodoro ha reso possibile, l'assegnazione di più di novanta segnali dovuti a diciannove metaboliti. Il profilo metabolico è poi stato elaborato con appropriata analisi statistica per la caratterizzazione di due diverse cultivar di pomodoro (*Red Setter* e *Ciliegino*).[22].

Usando tecniche NMR, diversi studi di *profiling* metabolico hanno mostrato come sia possibile distinguere specie e ceppi differenti di piante ma anche tessuti diversi all'interno della stessa pianta.[23, 24].

Alimenti OGM. Metodi NMR, insieme ad un appropriato trattamento statistico dei dati, vengono sempre più utilizzati per rivelare cambiamenti anche complessi nel fenotipo metabolico di organismi geneticamente modificati (OGM). La condizione principale per poter effettuare una comparazione tra una specie GM e la sua controparte non-GM è la possibilità di avere materiale biologico di buona qualità: piante cresciute nelle stesse condizioni, campionamento adeguato e rappresentativo e trattamento dei tessuti idoneo. Operando in tal modo si può ottenere una buona separazione tra linee transgeniche e linee *"wild type"*. In uno studio di Le Gall *et al*.,[25] è stata effettuata una comparazione tra pomodori "*wild type*" e cultivar transgeniche esprimenti geni regolatori del mais. Utilizzando l'analisi dello spettro ^{1}H-NMR degli estratti acquosi, in combinazione con l'analisi multivariata dei dati, la composizione metabolica dei pomodori geneticamente modificati è stata paragonata a quella dei rispettivi controlli mettendo in luce differenze in alcune sostanze coinvolte in una serie di vie metaboliche.

In un recente studio su campioni di pomodori transgenici, prodotti per accumulare le poliammide, spermidina e spermina, le analisi NMR hanno rivelato distinti trend metabolici nei frutti transgenici e nei controlli ("*wild type*"/azigotici).

Il successivo trattamento statistico dei dati NMR ha portato ad una distinzione tra i campioni di controllo e i campioni transgenici [26].

Tecniche di *fingerprinting* metabolico sono state applicate, inoltre, a campioni di mais transgenico con lo scopo di caratterizzare semi di mais ottenuti da piante GM e fare un confronto con campioni di mais ottenuti da piante non transgeniche. Il riconoscimento di metaboliti discriminanti nei campioni GM ha permesso di distinguere tra linee modificate e controlli [27, 28].

Il protocollo NMR è stato applicato anche a piselli GM per determinare se fossero rivelabili cambiamenti biochimici [29] e a patate con modificazioni genetiche apportate a livello di differenti vie metaboliche [30].

Questi lavori dimostrano che l'analisi NMR, accoppiata all'analisi statistica multivariata, rappresenta uno strumento particolarmente utile e affidabile nel controllo della qualità, dell'origine e della sicurezza degli alimenti.

In tale contesto si inserisce il presente lavoro di dottorato che ha avuto come scopo lo studio di alcuni alimenti tipici della dieta mediterranea mediante spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare.

Oggetto di studio sono stati:

- i prodotti ittici, nel caso specifico la spigola (*Dicentrarchus labrax*) di provenienza marina e di allevamento; mediante analisi NMR è stato possibile identificare il profilo metabolico delle due tipologie di prodotto e le informazioni ottenute sono state utilizzate al fine di discriminare i campioni in base alla loro origine [31].
- La lattuga. L'utilizzo della tecnica NMR, unita ad un'analisi statistica multivariata, ha permesso lo studio della variabilità metabolica di lattuga (*Lactuca sativa* cv. Luxor) geneticamente modificata, a diversi stadi di maturazione, e l'identificazione dei metaboliti responsabile della distinzione tra i campioni GM e i campioni convenzionali provenienti da colture non transgeniche [32].
- Oli di oliva aromatizzati. L'analisi ^{1}H ad alto campo in soluzione ha consentito la caratterizzazione preliminare di alcuni oli d'oliva aromatizzati e la valutazione, da un punto di vista qualitativo, della genuinità dell'olio d'oliva impiegato per la realizzazione del prodotto finito.
- Gelatine reali. Lo studio delle gelatine reali mediante l'utilizzo della spettroscopia HR-MAS NMR ha permesso l'individuazione di marker metabolici in grado di discriminare tra campioni di diversa provenienza geografica.

Il lavoro è stato svolto presso l'Università degli Studi del Molise e presso il laboratorio di Risonanza Magnetica Nucleare "Annalaura Segre" dell'Istituto di Metodologie Chimiche (IMC) presso il Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Area della Ricerca di Roma 1 – Montelibretti.

1.1 Referenze

[1] Fiehn O. (2002) Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.*, **48**, 155-171

[2] Mannina L., D'Imperio M., Lava R., Schievano E., Mammi S. (2005) Caratterizzazione NMR e analisi statistica di oli di oliva DOP veneti. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **82**, 59-63

[3] Mannina L., Patumi M., Fiordiponti P., Emanuele M.C., Segre A.L. (1999) Olive and hazelnut oils: a study by high-field ^{1}H NMR and gas chromatography. *Ital. J. Food Sci.*, **11**, 139-149

[4] Mannina L., Patumi M., Proietti N., Bassi D., Segre A.L. (2001) Geographical characterization of italian extra virgin olive oil using high field ^{1}H NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2687-2696

[5] D'Imperio M., Mannina L., Capitani D., Bidet O., Rossi E., Bucarelli F.M., Quaglia G.B., Segre A.L. (2007) NMR and Statistical Study of Olive Oils from Lazio: a geographical, ecological and agronomic characterization. *Food Chem.*, **105** (3), 1256-1267

[6] Mannina L., Sobolev A.P., Segre A.L. (2003) Olive oil as seen by NMR and chemometrics. *Spectr. Eur.*, **15** (3), 6-14

[7] Sacchi R., Mannina L., Fiordiponti P., Barone P., Paolillo L., *et al*. (1998) Characterization of Italian extra virgin olive oils using ^{1}H-NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3947-51

[8] Sacchi R., Patumi M., Fontanazza G., Barone P., Fiordiponti P., *et al*. (1996) A high field ^{1}H-NMR study of the minor components in virgin olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 747-58

[9] Sacchi R., Paolillo L., Giudicianni I., Addeo F. (1992) Analysis of the positional distribution of fatty acids in olive oil triacylglycerols by high resolution ^{13}C-NMR of the carbonyl region. *Ital. J. Food Sci.*, **2**, 117-123

[10] Sacchi R., Addeo F., Paolillo L. (1997) ^{1}H and ^{13}C-NMR of virgin olive oil: an Overview *Magn. Res. Chem.*, **35**, 133-145

[11] Sacchi R., Paolillo L., Giudicianni I., Addeo F. (1991) Rapid ^{1}H-NMR determination of 1,2 and 1,3 diglycerides in virgin olive oils. *Ital. J. Food Sci.*, **4**, 253–262

[12] Sacchi R., Addeo F., Giudicianni I., Paolillo L. (1989) La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare nell'analisi degli oli di oliva. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **LXVI**, 171-78

[13] Sacchi R., Addeo F., Giudicianni I., Paolillo L. (1990) Applicazione della spettroscopia ^{13}C-NMR alla determinazione di mono e digliceridi ed acidi grassi liberi nell'olio di oliva di pressione e nei rettificati. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse,* **67**, 345-52

[14] Sacchi R., Medina I., Paolillo L., Addeo F. (1994) High resolution ^{13}C-NMR olefinic spectra of DHA and EPA acids, methyl esters and triacylglycerols. *Chem. Phys. Lipids*, **69**, 65-73

[15] MEDEO progetto Europeo n° GRD1-2000-25011, Development and Assessment of Mehods for the Detection of Adulterazion of Olive with Hazelnut oil.

[16] Garzia-Gonzales D.L., Mannina L., D'Imperio M., Segre A.L., Aparicio R. (2004) Using ^{1}H and ^{13}C NMR techniques and artificial neural networks to detect the adulteration of olive oil with hazelnut oil. *Eur. Food Res. Technol.,* **219**, 545-548

[17] Duarte I.F., Barros A., Belton P.S., Righelato R., Spraul M., Humpfer E., Gil A.M. (2002) High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer. *J. Agric. Food Chem.,* **50**, 2475-2481

[18] Duarte I.F., Barros A., Almeida C., Spraul M., Gil A.M. (2004) Multivariate Analysis of NMR and FTIR Data as a Potential Tool for the Quality Control of Beer. *J. Agric. Food Chem.,* **52**, 1031-1038

[19] Mannina L., Cristinzio M., Sobolev A.P., Ragni P., Segre A.L. (2004) High-Field Nuclear Magnetic Resonance (NMR) study of truffles (*Tuberum aestivum vittandi*). *J. Agric. Food Chem.,* **52**, 7988-7996

[20] Belton P.S., Colquhoun I.J., Kemsley E.K., Delgadillo I., Roma P., Dennis M.J., Sharman M., Holmes E., Nicholson J.K., Spraul M. (1998) Application of chemometrics to the ^{1}H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. *Food Chem.,* **61**, 207-213

[21] Le Gall G., Puaud M., Colquhoun I.J. (2001) Discrimination between orange juice and pulp wash by H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy: Identification of marker compounds. *J. Agric. Food Chem.,* **49**, 580-588

[22] Sobolev A.P., Segre A.L., Lamanna R. (2003) Proton high-field NMR study of tomato juice. *Magn. Res. Chem.,* **41,** 237-245

[23] Holmes E., Tang H., Wang Y., Seger C. (2006) The assessment of plant metabolite profiles by NMR-based. *Methodol. Plant Med.,* **72**, 771-785

[24] Krishnan P., Kruger N.J., Ratcliffe R.G. (2005) Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *J. Ex. Bot.,* **56**, 255-265

[25] Le Gall G., Colquhoun I.J., Davis A.L. (2003) Metabolite Profiling of Tomato (*Lycopersicon esculentum)* Using ^{1}H NMR Spectroscopy as a Tool To Detect Potential Unintended Effects Following a Genetic Modification. *J. Agric. Food Chem.,* **51**, 2447-2456

[26] Mattoo A.K., Sobolev A.P., Neelam A., Goyal R.K., Handa A.K., Segre A.L. (2006) Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy-Based Metabolite Profiling of Transgenic Tomato Fruit Engineered to Accumulate Spermidine and Spermine Reveals Enhanced Anabolic and Nitrogen-Carbon Interactions. *Plant Physiol. Biochem.,* **142**, 1759-1770

[27] Manetti C., Bianchetti C., Bizzarri M., Casciani L., Castro C., D'Ascenzo G., *et al.* (2004) NMR-based metabonomic study of transgenic maize. *Phytochem.,* **65**, 3187-3198

[28] Baker J.M., Hawkins N.D., Ward J.L., Lovegrove A., *et al*. (2006) A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown GM wheat. *Plant Biotechnol. J.,* **4**, 381-392

[29] Charlton A., Allnutt T., Holmes S., Chisholm J., Bean S., Ellis N., *et al*. (2004) NMR profiling of transgenic peas. *Plant Biotechnol. J.,* **2**, 27-35

[30] Defernez M., Gunning Y.M., Parr A.J., Shepherd L.V.T., Davies H.V., Colquhoun I.J. (2004) NMR and HPLC-UV profiling of potatoes with genetic modifications to metabolic pathways. *J. Agric. Food Chem.,* **52**, 6075-6085

[31] Mannina L., Sobolev A.P., Capitani D., Iaffaldano N., Rosato M.P., Ragni P., Reale A., Sorrentino E., D'Amico I., Coppola R. (2008) NMR metabolic profiling of organic and aqueous sea bass extracts: implications in the discrimination of wild and cultured sea bass. *Talanta* **77**, 433-444

[32] Sobolev A.P., Capitani D., Giannino D., Nicolodi C., Testone G., Santoro F., Frugis G., Iannelli M.A., Mattoo A.K., Brosio E., Gianferri R., D'Amico I. and Mannina L. (2010) NMR-Metabolic Methodology in the Study of GM Foodstuff. *Nutrients* **2**, 1-15

CAPITOLO 2

RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE

2.1 *Introduzione*

Nel 1946 due distinti gruppi di ricerca, uno formato da Bloch, Hansen e Packard [1] e l'altro da Purcell, Torrey e Pound [2], osservarono indipendentemente per la prima volta, segnali di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) ricevendo per questa scoperta il premio Nobel per la Fisica nel 1952.

La Risonanza Magnetica Nucleare è stata successivamente sviluppata diventando una potente spettroscopia che consente di conoscere proprietà a livello sub-molecolare di materiali di diversa natura. In questo capitolo viene descritta la teoria alla base della Risonanza Magnetica Nucleare che consente di comprendere al meglio il fenomeno NMR dal punto di vista chimico; va comunque sottolineato che per una più profonda comprensione delle interazioni che regolano il comportamento degli spin nucleari è necessario un approccio spettroscopico che si avvale della meccanica quantistica.

2.2 *Momento angolare e momento magnetico nucleare (trattazione semi-classica)*

La Risonanza Magnetica Nucleare è legata alle proprietà magnetiche dei nuclei. Nella descrizione semi-classica di un atomo, il nucleo viene raffigurato come una sfera in rotazione attorno ad un asse. La maggior parte dei nuclei possiede quindi un momento angolare intrinseco, $\vec{P}$, dato da:

$$\vec{P} = \hbar \vec{I} \tag{1}$$

dove $\hbar$ è la costante di Planck, $h=6{,}626\ 10^{-34}\ Js$, diviso 2π e $\vec{I}$ è il momento angolare di spin nucleare.

Il valore del numero di spin nucleare *I* dipende dal numero atomico e dalla massa atomica:

- Se la massa atomica è dispari, *I* è la metà di un numero intero (^{1}H, ^{13}C,^{15}N, ^{31}P).
- Se il numero atomico è dispari e la massa atomica è pari, *I* è un numero intero (^{14}N, ^{2}H).
- Se numero atomico e massa atomica sono pari, *I* è nullo e il nucleo non è attivo all'NMR (^{12}C, ^{16}O).

Ciascun elemento, se dotato di isotopi, può quindi possedere più di un isotopo con spin nucleare non nullo, ciascuno con la propria abbondanza naturale. Alcuni esempi sono riportati in T*abella 2.1*.

Tabella 2.1. Esempi di isotopi a spin nucleare non nullo.

Nucleo	Abbondanza percentuale %	I	g_I	γ (rad/sec gauss)
^{1}H	99,98	½	5,5856912	26753
^{11}B	80,42	3/2	1,792424	8583,343343
^{13}C	1,108	½	1,40482	6726,77432
^{14}N	99,63	1	0,4037607	1932,547543
^{15}N	0,37	½	-0,5663784	2710,792313
^{17}O	0,037	5/2	-0,757516	3626,81503
^{19}F	100	½	5,257732	25168,41981
^{23}Na	100	3/2	1,478391	7076,43603
^{27}Al	100	5/2	1,456601	6971,118386
^{29}Si	4,70	½	-1,1106	5314,48345
^{31}P	100	½	2,26320	10829,792753

Il momento magnetico nucleare $\vec{\mu}$ è direttamente proporzionale al momento angolare nucleare $\vec{P}$:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{P} \tag{2}$$

dove la costante di proporzionalità γ è detta rapporto giromagnetico ed è una proprietà intrinseca di ogni nucleo.

Dalla combinazione delle equazioni (1) e (2) è possibile ricavare la relazione tra il momento magnetico nucleare $\vec{\mu}$ e il momento angolare di spin nucleare $\vec{I}$:

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I} \tag{3}$$

2.3 *Applicazione di un campo magnetico statico esterno*

Se un nucleo con momento angolare $\vec{P}$ e momento magnetico $\vec{\mu}$ è posto all'interno di un campo magnetico statico $\vec{B}_0$, che convenzionalmente è orientato lungo l'asse z, si avrà che la componente del momento angolare lungo l'asse z, P_z, sarà uguale ad un multiplo intero o semi intero di $\hbar$:

$$\mathrm{P}_z = m\hbar \tag{4}$$

dove *m*, numero quantico magnetico, può assumere tutti i valori compresi tra *+I* e *–I* (*m = I, I-1, I-2…,-I)*. Si deduce che *m* può assumere *2I+1* differenti valori che corrispondono ad un uguale numero di possibili orientazioni del momento angolare rispetto al campo magnetico esterno.

Dalle equazioni (2) e (4) si ottengono le corrispondenti componenti del momento magnetico lungo l'asse *z*:

$$\mu_z = m\hbar\gamma \tag{5}$$

Nella rappresentazione classica il nucleo è visto, quindi, come un dipolo che esegue un movimento di precessione intorno all'asse z lungo cui si orienta il campo magnetico esterno (*Figura 2.1*).

La frequenza di precessione è detta frequenza di Larmor ν_L ed è correlata all'intensità del campo magnetico esterno $\vec{B}_0$ dalla relazione:

$$\nu_L = \left|\frac{\gamma}{2\pi}\right| B_0 \tag{6}$$

oppure:

$$\omega_L = \gamma B_0 \text{ (rad s}^{-1}\text{)} \tag{7}$$

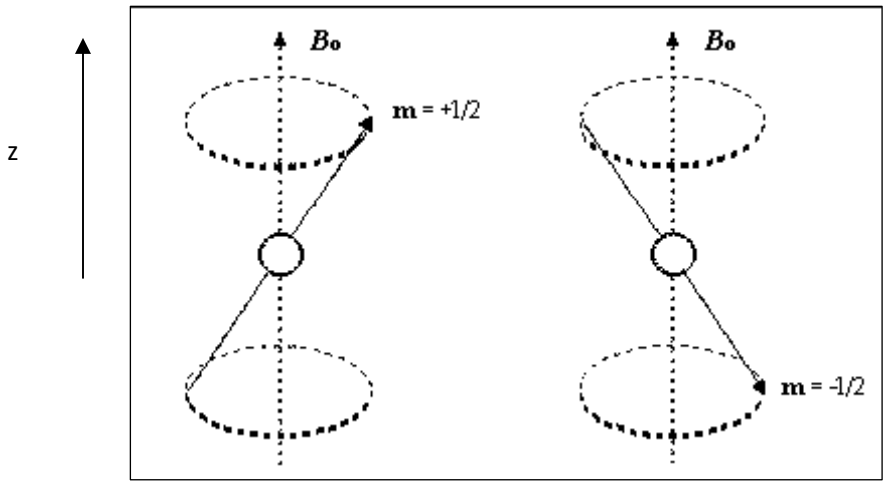

Figura 2.1. Moto di precessione parallela e antiparallela di un dipolo intorno all'asse z lungo cui si orienta il campo magnetico esterno.

2.4 *Livelli energetici*

L'energia di un dipolo magnetico all'interno di un campo magnetico esterno di intensità B_0 è:

$$E = -\mu_Z B_0 \tag{8}$$

dalla combinazione delle equazioni (5) e (8) si ottiene:

$$E = -m\gamma\hbar B_0 \tag{9}$$

da cui segue che per un nucleo con *2I+1* possibili orientazioni esistono *2I+1* livelli energetici disponibili, ad esempio, per nuclei con numero di spin *I* pari ad ½, come ^{1}H e ^{13}C, *m* può assumere soltanto due valori, + ½ e - ½ a cui corrispondono due livelli energetici in presenza del campo magnetico esterno; se $m = +½$ μ_z è parallelo alla direzione del campo, viceversa se $m = -½$ μ_z è antiparallelo. Il livello energetico corrispondente a $m = +½$ è denominato α, ed è per l'idrogeno e il ^{13}C, quello a minor energia, mentre, il livello energetico corrispondente a $m = -½$ è denominato β ed è a energia maggiore (*Figura 2.2*). La piccolissima differenza di energia tra i due livelli α e β è:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \tag{10}$$

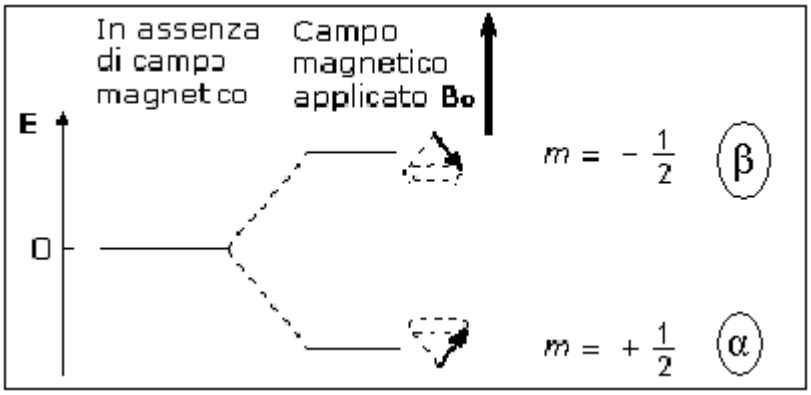

Figura 2.2. Livelli energetici di un dipolo magnetico spin +1/2 associati ad un campo magnetico esterno B_0

L'equazione (10) ci dimostra che la quantità di energia necessaria per promuovere la transizione tra i due livelli energetici è direttamente proporzionale all'intensità del campo magnetico esterno applicato.
In condizioni di equilibrio, la distribuzione degli spin nucleari tra i due livelli energetici, sempre assumendo che il nucleo abbia spin pari a ½, è data dalla legge di Boltzmann:

$$N_\beta / N_\alpha = e^{-\Delta E / kBT} \tag{11}$$

Dove N_β e N_α sono rispettivamente le popolazioni dei livelli energetici β e α, k_B è la costante di Boltzmann e T è la temperatura assoluta in K. A temperatura ambiente l'eccesso di popolazione del livello energetico inferiore è molto piccola (questo rapporto è dell'ordine di $1/10^5$ per lo spin ^1H in un campo magnetico di 11,7 Tesla).

2.5 *Magnetizzazione*

Sommando le componenti lungo l'asse *z* dei momenti magnetici nucleari si ottiene una magnetizzazione macroscopica M_0 allineata parallelamente all'asse del campo magnetico applicato poiché N_α è maggiore di N_β.

Teoricamente sarebbe possibile misurare M_0 ma poiché si è detto che la differenza N_α - N_β, a cui M_0 è correlata, è un valore molto piccolo diviene indispensabile esaminare gli effetti su una magnetizzazione indotta con metodi di risonanza. All'equilibrio la magnetizzazione macroscopica M_0 precede alla frequenza ω_L, del particolare spin osservato, attorno all'asse del campo magnetico applicato B_0 (*Figura 2.3*).

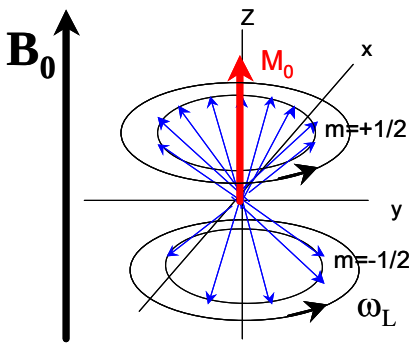

Figura 2.3. Moto di precessione alla frequenza ω_L dei momenti magnetici nucleari $N_\alpha + N_\beta$. Poiché $N_\alpha > N_\beta$ ne risulta una magnetizzazione macroscopica M_0 allineata lungo l'asse del campo magnetico $\vec{B}_0$.

Al fine di osservare un segnale NMR è necessario allontanare il sistema dallo stato di equilibrio, variando le popolazioni dei livelli energetici.

2.6 *La risonanza magnetica nucleare*

Fornendo energia al sistema mediante una radiazione elettromagnetica generata da un flusso di corrente sinusoidale si ottiene l'allontanamento del sistema dalla condizione di equilibrio. Di fatto, una radiazione elettromagnetica opportunamente applicata può essere considerata come dovuta ad un campo magnetico $\vec{B}_1$ ortogonale a $\vec{B}_0$, con $\left\|\vec{B}_1\right\| << \left\|\vec{B}_0\right\|$. I due campi magnetici risultano

ortogonali poiché il flusso di corrente sinusoidale proviene da una spira idealmente avvolta nel piano *x* e corrispondente a due vettori in contro-rotazione di intensità B_1[3,4]. Di questi due vettori solo uno, col corretto senso di rotazione rispetto alla precessione di Larmor, è attivo.

Un campo magnetico oscillante, linearmente polarizzato e di ampiezza $2B_1$ è equivalente ad una combinazione lineare di due campi magnetici di ampiezza B_1 che ruotano in direzioni opposte sul piano *xy* attorno all'asse *z*, ma l'interazione avviene solo tra la magnetizzazione e il campo magnetico che ruota nella sua stessa direzione (*Figura 2.4*).

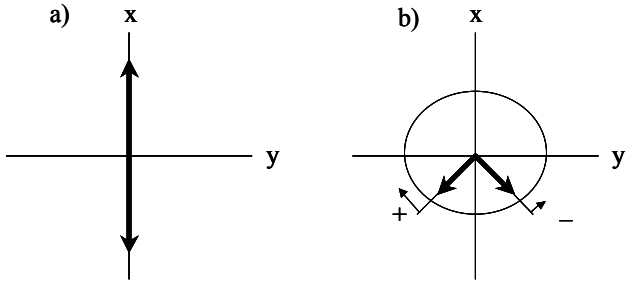

Figura 2.4. a) Campo oscillante linearmente polarizzato; b) Componenti rotanti in direzioni opposte.

Quando la frequenza di $\vec{B}_1$ è uguale alla frequenza di Larmor, ω_L, sarà soddisfatta la *condizione di risonanza*.

$$\Delta E = h\nu \tag{12}$$

In questo modo è possibile far avvenire transizioni fra livelli energetici e quindi modificare il numero di spin di ciascun livello energetico. La transizione dal livello energetico più basso a quello più alto può essere quindi ottenuta attraverso l'assorbimento di una radiazione elettromagnetica di frequenza ν tale da realizzare la condizione di risonanza.

Poiché le frequenze di precessione della maggior parte dei nuclei di interesse vanno dalle decine alle centinaia di MegaHertz per campi magnetici da uno a circa venti Tesla, sia la perturbazione che le risposte del sistema avvengono nel range delle radiofrequenze.

Oggi, contrariamente a quanto avveniva in passato [5], il sistema viene sottoposto ad un breve e intenso impulso di energia alla opportuna radiofrequenza ν_1. Secondo la corrente teoria degli impulsi, la breve durata dell'impulso (pochi microsecondi) fa sì che esso contenga non solo la frequenza ν_1 ma una banda continua di frequenze, simmetriche rispetto alla frequenza centrale ν_1, che eccita contemporaneamente tutti i nuclei compatibili con la banda di radiofrequenza eccitante [6].

L'interazione tra il campo magnetico applicato $\vec{B}_1$ e la magnetizzazione $\vec{M}$ produce una coppia torcente che muove la magnetizzazione verso il piano *xy*; la posizione finale della magnetizzazione dipende dalla durata dell'impulso.

L'esatto spostamento della magnetizzazione dall'asse *z* al piano *xy* si ha dando il cosiddetto impulso a 90°. La componente della magnetizzazione sul piano *xy* viene poi registrata da un apposito ricevitore.

Una volta perturbato, il sistema tende a tornare all'equilibrio al termine dell'impulso; i nuclei rilassano e tornano al loro stato originale, le popolazioni dei livelli energetici ritornano alla distribuzione di Boltzmann e la magnetizzazione M_{xy}, precedendo nel piano *xy*, torna al valore iniziale, M_0, allineata lungo l'asse *z* (*Figura 2.5*) [3, 4].

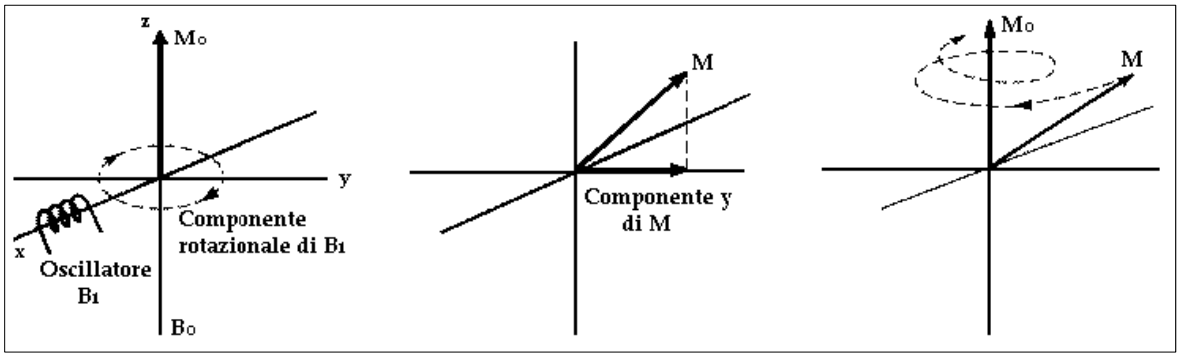

Figura 2.5. Perturbazione del sistema da parte del campo magnetico applicato B_1. La magnetizzazione viene mossa verso il piano *xy*. Al termine dell'impulso i nuclei rilassano e la magnetizzazione precede nel piano *xy* tornando allineata lungo l'asse *z*.

2.7 *Processi di rilassamento*

Vi sono due processi di rilassamento mediante i quali il sistema torna all'equilibrio: il primo, detto <u>*rilassamento longitudinale*</u> o *spin-reticolo* tiene conto degli scambi energetici che avvengono tra il sistema di spin e l'ambiente molecolare cui è

associato (reticolo) e comporta una progressiva diminuzione della componente della magnetizzazione lungo l'asse *z* verso il valore di equilibrio M_0. In sistemi omogenei, per ogni tipo di nucleo, il rilassamento ha un decadimento esponenziale con una costante di tempo T_1. Nel caso di scansioni multiple il rilassamento longitudinale può interferire con l'intensità del segnale perché si possono avere effetti dovuti alla saturazione, a questo si ovvia con opportuni ritardi (*relaxation delay*) inseriti tra una scansione e l'altra.

Il <u>*rilassamento trasversale*</u> o *spin-spin*, descritto dalla costante di tempo T_2, non implica alcuno scambio di energia ma è un processo di perdita di coerenza di fase tra le risonanze dei vari spin nucleari. L'insieme di piccoli magneti, ognuno dovuto a un singolo spin nucleare, perde infatti coerenza. Ne consegue che la componente della magnetizzazione nel piano *xy* perda intensità, vi è cioè una progressiva perdita di coerenza di fase tra gli spin nucleari e quindi un annullamento della componente della magnetizzazione nel piano *xy*. Nelle bande larghe in genere si hanno T_2 brevi; nelle bande strette, viceversa, il processo di perdita della fase è molto più lento con tempi di rilassamento T_2 molto più lunghi. (*Figura 2.6*).

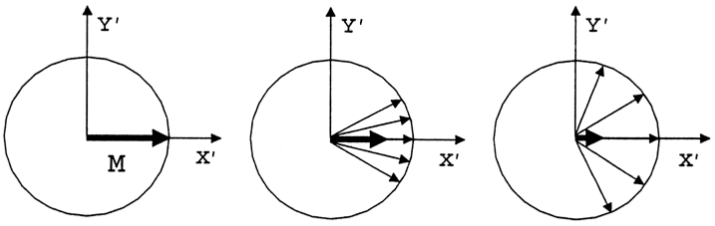

Figura 2.6. Defasamento degli spin e rilassamento trasversale della magnetizzazione nel sistema di coordinate rotanti.

Eventuali disomogeneità presenti nel campo magnetico statico portano ad un maggior defasamento, con conseguente riduzione del T_2 apparente.
L'evoluzione del moto della magnetizzazione nel tempo, in presenza di un campo magnetico applicato $\vec{B}_1$ e durante il successivo rilassamento, è stata matematicamente analizzata da Bloch attraverso un sistema di equazioni differenziali del primo ordine. Egli formulò un set di equazioni che descrivono la variazione nel tempo delle componenti della magnetizzazione M_x, M_y ed M_z**:**

$$dM_x(t) / dt = \gamma \; [\; M_y(t) \cdot B_z - M_z(t) \cdot B_y \;] - M_x(t) / T_2 \tag{13}$$

$$dM_y(t) / dt = \gamma \; [\; M_z(t) \cdot B_x - M_x(t) \cdot B_z \;] - M_y(t) / T_2 \tag{14}$$

$$dM_z(t) / dt = \gamma \; [\; M_x(t) \cdot B_y - M_y(t) \cdot B_x \;] - [\; M_z(t) - M_0 \;] / T_1 \tag{15}$$

dove γ è il rapporto giromagnetico, B_x e B_y sono rispettivamente le componenti del campo magnetico applicato $\vec{B}_1$ lungo l'asse x e lungo l'asse y, assumendo che $\vec{B}_1$ ruoti sul piano xy, B_z è pari a $\vec{B}_0$, assumendo che questo sia orientato lungo l'asse z, T_1 e T_2 sono rispettivamente le costanti di tempo del rilassamento longitudinale e trasversale.

Le equazioni di Bloch rappresentano un sistema di equazioni differenziali del primo ordine in cui chiaramente la variazione di una componente della magnetizzazione dipende dalle altre due.

È possibile ottenere una semplificazione di tali equazioni descrivendo il fenomeno NMR in un sistema di coordinate rotanti, x' y' z', ossia un sistema ortonormale che ruota attorno all'asse z', coincidente con l'asse z, ad una frequenza pari alla frequenza di Larmor. Supponendo, inoltre che la frequenza di $\vec{B}_1$ sia uguale alla frequenza di Larmor, in questo nuovo sistema di coordinate si ha che sia la magnetizzazione $\vec{M}$ che $\vec{B}_1$ appaiono fissi; di fatto, mediante questo artificio matematico, viene rimossa la loro dipendenza dal tempo, cioè il sistema diventa statico.

2.8 Segnale NMR

L'oscillazione di M_{xy} subito dopo l'impulso genera un campo magnetico fluttuante che dà luogo ad una corrente in una spira idealmente avvolta lungo un asse perpendicolare a $\vec{B}_0$, tale corrente indotta costituisce il segnale NMR.

Nella condizione sopra descritta, per spettri NMR ottenuti allo stato liquido, e nel caso in cui la frequenza di $\vec{B}_1$ sia uguale alla frequenza di Larmor, ($\omega=\omega_L$) il segnale NMR decade in maniera esponenziale nel tempo.(*Figura 2.7a*).

Di fatto, come discusso in seguito, nell'esperimento reale, la frequenza dell'impulso, ω, non potrà essere esattamente uguale a tutte le frequenze di precessione presenti in un campione, ma sarà tale che $\omega-\omega_L > 0$ (condizione off-

resonance), ciò comporta che durante l'impulso alcune componenti della magnetizzazione evolvono nel tempo e si allontanano dalla frequenza di riferimento ω_L di un angolo φ proporzionale alla durata dell'impulso e alla differenza ω-ω_L:

$$\varphi = (\omega - \omega_L) \times t \tag{16}$$

Il segnale NMR ottenuto in questo caso avrà l'andamento mostrato in *Figura 2.7b*:

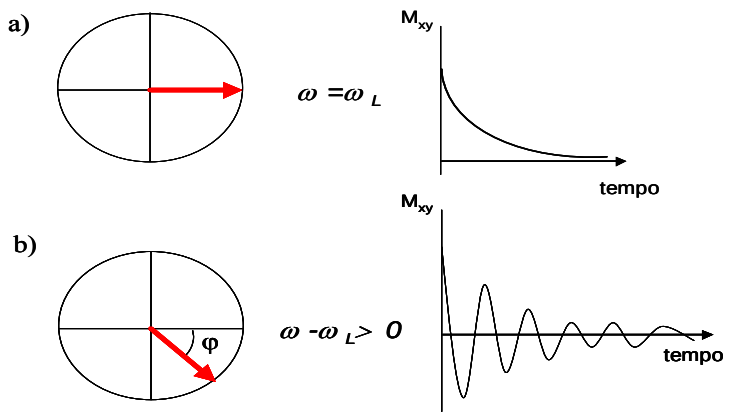

Figura 2.7. a) Decadimento esponenziale della magnetizzazione nel tempo quando $\omega=\omega_L$; b) Decadimento cosinusoidale della magnetizzazione nel tempo quando ω-ω_L >0.

In un campione reale, sono presenti numerosi sistemi di spin che hanno frequenze differenti dalla frequenza di $\vec{B}_1$. Poiché è stato utilizzato un impulso che ha eccitato contemporaneamente tutte le frequenze presenti nel campione il detector, posto perpendicolarmente all'asse *z*, riceve una combinazione di queste; il segnale in uscita è un interferogramma chiamato *FID* (*Free Induction Decay*). La FID rappresenta il segnale NMR nel dominio dei tempi e per convertirlo in un segnale più facilmente comprensibile nel dominio delle frequenze si utilizza un operatore matematico chiamato "*Trasformata di Fourier (FT)*" (*Figura 2.8*).

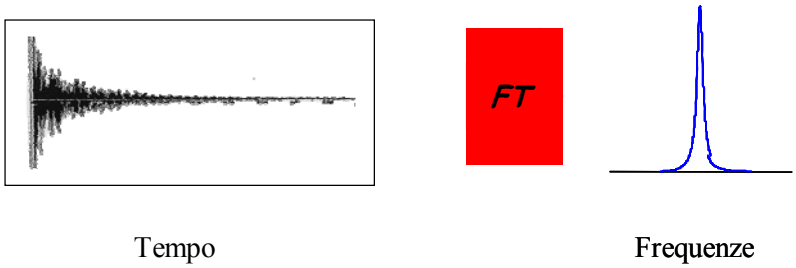

Figura 2.8. Conversione del segnale dal dominio dei tempi al dominio delle frequenze mediante la Trasformata di Fourier

Spesso, l'intensità di una singola FID è così bassa che dopo la trasformata di Fourier i segnali sono molto deboli rispetto al rumore di fondo. Uno dei vantaggi dell'utilizzo degli impulsi rispetto all'onda continua risiede nella possibilità di ripetere le misure più velocemente, diventa così possibile addizionare coerentemente i risultati di n misure, incrementando il rapporto segnale-rumore di un fattore pari a circa $\sqrt{n}$. L'esecuzione di più scansioni implica la necessità di inserire un tempo di attesa tra una scansione e l'altra.

Questo tempo di attesa dovrà essere ottimizzato per i particolari tempi di rilassamento spin-reticolo presenti nella specie molecolare in studio. Per un impulso corrispondente ad un tilt della magnetizzazione di $\pi/2$ il tempo di attesa necessario è circa $5T_1$ per garantire il completo rilassamento dei nuclei.

2.9 *Chemical shift e costanti di accoppiamento*

L'NMR sarebbe di scarsa utilità se non vi fossero altri effetti: nuclei di uno stesso isotopo risuonerebbero infatti alla stessa frequenza. Nei sistemi reali ciò non accade in quanto un nucleo non è mai isolato, ma è soggetto a campi magnetici locali (molto meno intensi del campo esterno applicato) generati dagli elettroni e dai nuclei circostanti. L'interazione del nucleo con questi campi locali modifica i livelli energetici precedentemente descritti rendendo quindi le differenze di energia misurate tramite l'NMR dipendenti anche dall'intorno chimico del nucleo stesso.

Questi intorni chimici diversi sono caratterizzati da differenti nubi elettroniche che circondano i nuclei. La presenza di queste nubi elettroniche genera debolissimi campi magnetici secondari in opposizione al campo magnetico applicato esternamente. Di conseguenza per portare il protone i-esimo in risonanza occorre

applicare un campo magnetico accresciuto di una piccola quantità $\vec{B}_1$ tale che si abbia: $B=\vec{B}_0+\vec{B}_1=\vec{B}_0$ (1-σ_i) in cui σ_i è la costante di schermo la quale indica che nuclei con intorno chimico diverso risuonano a campi diversi, cioè vi è "*chemical shift*". In soluzione se $\sigma_i > 0$, il campo effettivo sul nucleo è meno intenso di quello applicato e quindi il nucleo è schermato; se $\sigma_i < 0$, il campo effettivo è più intenso di quello applicato per cui il nucleo è de-schermato. Lo spostamento nella riga di risonanza dovuto allo schermo è quindi caratteristico della densità elettronica e della distribuzione della nube elettronica attorno al nucleo e costituisce una sorta di impronta digitale della struttura chimica del frammento nel quale il nucleo è collocato.

A causa del fenomeno di schermo dei nuclei da parte degli elettroni, i nuclei di una stessa specie non risuonano alla stessa frequenza di Larmor, ma a frequenze differenti a seconda dell'intorno chimico in cui si trovano. La posizione del centro di una data risonanza rispetto ad uno standard è chiamata *chemical shift* ed è definito come il rapporto in ppm:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} \times 10^6$$

dove ν è la frequenza di risonanza del nucleo nel campione in esame e ν_0 è la frequenza di risonanza del nucleo in uno standard. Il vantaggio di questa definizione consiste nel fatto che δ espresso in ppm risulta indipendente dal campo magnetico applicato in quanto sia il numeratore che il denominatore sono direttamente proporzionali a B_0. In questo modo il valore di δ, e quindi la separazione spettrale in ppm, per un dato nucleo non dipende dallo strumento utilizzato.

La separazione in Hz è invece proporzionale al campo applicato, infatti la distanza tra due righe aumenta ad aumentare del campo magnetico, dunque più il campo è alto maggiore sarà la separazione spettrale. Vengono considerati campi alti quelli sopra i 14 Tesla. Il campo più alto ottenibile oggi è circa 21 Tesla.

Come segnale di riferimento per ^1H e ^{13}C si usa solitamente il tetrametilsilano (TMS) perché è solubile nella maggior parte dei solventi organici, è inerte, è molto volatile e ha ben 4 metili cioè dodici protoni equivalenti magneticamente. Questi danno un unico segnale molto intenso e che cade in una regione spettrale particolarmente sgombra da altre risonanze. La frequenza di risonanza del TMS è stata arbitrariamente posta a zero, cioè 0.00 ppm.

I livelli energetici di un nucleo possono essere perturbati dalla presenza di altri nuclei dotati di spin, in questo caso si parla di nuclei accoppiati tra loro. Se si è in presenza di spettri del primo ordine, cioè se la differenza di chemical shift è effettivamente notevole, nello spettro del nucleo con spin I_i accoppiato con un nucleo di spin I_j si osserveranno $2I_j+1$ segnali, analogamente per il nucleo con I_j si osserveranno $2I_i+1$ segnali. La separazione tra tutti i suddetti segnali è la stessa ed è detta costante di accoppiamento $J_{i,j}$ tra gli spin *i* e *j*. La costante di accoppiamento indiretta, usualmente indicata come accoppiamento *J* si rivela come un debole *splitting* delle righe spettrali. Come il chemical shift, la costante di accoppiamento è funzione dell'intorno chimico di un particolare nucleo.

Chemical shift e costante d'accoppiamento sono parametri importanti nell'identificazione dei sistemi di spin e nella determinazione della struttura di un composto.

Uno spettro ben risolto e facilmente interpretabile si ha per $\Delta\delta/J > 5$ ed è detto spettro del primo ordine. Come detto, il chemical shift è una funzione lineare del campo applicato, mentre la costante di accoppiamento non è funzione del campo applicato. Di conseguenza l'applicazione di campi magnetici più alti non genera solo segnali più intensi ma anche multipletti meglio risolti. Per riassumere, quindi, i parametri principali misurabili per risolvere uno spettro NMR sono:

1. il *chemical shift* (δ) che è una misura dell'ambiente chimico di un dato nucleo ed è quindi indicativo del tipo di gruppo chimico presente nella molecola;
2. i *pattern* spettrali dovuti all'accoppiamento spin-spin (molteplicità) che sono caratteristici del sistema di spin della molecola;
3. le costanti d'accoppiamento (J) associate ad ogni multipletto che sono correlabili alla struttura delle molecole. J dipende da numerosi fattori come il numero, l'ordine, gli angoli, le lunghezze dei legami tra i nuclei accoppiati, l'elettronegatività dei sostituenti presenti, l'esistenza di coniugazioni π o sostituenti aromatici;
4. l'intensità dei segnali che è direttamente proporzionale al numero dei nuclei nel campione ed è comunemente usata per l'analisi della molteplicità di spin. Questo parametro può essere espresso sia come altezza del picco sia come aerea.

2.10 *Stabilità ed omogeneità del campo magnetico*

Per ottenere uno spettro NMR con una buona risoluzione è necessario che il campo magnetico in cui il campione da analizzare è immerso sia stabile nel tempo e omogeneo nello spazio.

Le eventuali variazioni del campo statico nel tempo, vengono compensate mediante un circuito detto *field frequency lock* o semplicemente *lock* che usa come riferimento il segnale del deuterio del solvente. Il problema nasce dal fatto che acquisendo e addizionando un gran numero di FIDs per aumentare il rapporto segnale–rumore, le frequenze dei segnali devono rimanere costanti per tutta la durata dell'esperimento. Tuttavia, anche con il più moderno dei superconduttori, il campo magnetico subisce delle piccole variazioni nel tempo a causa dei cambiamenti dell'intorno studiato.

Altro elemento importante per la corretta esecuzione di un esperimento NMR è l'omogeneità del campo nello spazio; tale omogeneità si può ottenere con l'operazione di *shimming*. Questa operazione consiste nella correzione delle linee di forza del campo in modo da minimizzare le disomogeneità. Un complesso sistema di gradienti tridimensionali, gli *shim*, intervengono per modificare i valori locali. In genere nei magneti moderni il procedimento si limita alla ottimizzazione dei soli *shim* coassiali al campo ossia gli *shim z*. Gli *shim* operano sulla corrente di specifiche bobine, ciascuna con una specifica forma, create in modo da consentire correzioni piccolissime e precise del campo.

2.11 *Uso del solvente*

Un solvente per poter essere usato in un'analisi NMR deve avere le seguenti caratteristiche:

1. deve dare un segnale che non cada sotto ai segnali di interesse. Se ciò accadesse, infatti, sarebbe compromessa la lettura e l'individuazione dei segnali stessi.
2. Deve essere puro sia per quanto concerne la quantità di acqua che le impurezze.
3. Deve avere un'acidità residua pressoché nulla.

Inoltre la viscosità del solvente può influenzare la risoluzione dello spettro. È quindi buona norma eseguire prima di ogni analisi lo spettro di riferimento ossia lo spettro del bianco nel quale sono presenti i solventi utilizzati.

2.12 *Soppressione del segnale del solvente*

Gli spettri NMR di alcune sostanze, ad esempio peptidi e proteine, vengono registrati in solvente acquoso, sia per ragioni di solubilità, sia perché questo è l'ambiente naturale in cui esse esplicano la loro attività. In D_2O tuttavia molta informazione spettrale viene persa a causa dello scambio chimico tra i protoni scambiabili, NH ed OH e quelli della D_2O.

La possibilità di registrare spettri NMR in H_2O è essenziale per l'osservazione dei protoni soggetti a scambio chimico, in particolar modo per lo studio dei protoni dei gruppi NH di peptidi e proteine. Il problema è che il segnale dell'acqua è troppo intenso per permettere l'osservazione di segnali deboli (che vengono confusi con il rumore) o vicini al chemical shift della risonanza dell'acqua. Per questo motivo esistono tecniche di soppressione del segnale dell'acqua tra le quali la più utilizzata è la *tecnica di presaturazione* che tende a rendere minima la magnetizzazione del solvente quando viene applicato l'impulso [3]. In particolare il metodo consiste nel saturare il segnale del solvente eliminando la differenza di popolazione dei suoi livelli di spin mediante irradiazione continua del suo segnale di risonanza. Mediante la tecnica della presaturazione è possibile ottenere una diminuzione dell'intensità del segnale fino ad un fattore dell'ordine di 10^3. Per ottimizzare l'esperimento è necessario determinare gli opportuni valori dell'intensità della radiazione e della sua durata (alcune volte T_2).

Le altre principali tecniche di soppressione sono:

- *tecniche di eccitazione selettiva;*
- *tecnica del rilassamento selettivo;*
- *tecniche che utilizzano i gradienti.*

2.13 *Processamento dello spettro*

Il processing è quella fase di trattamento dei dati successiva all'acquisizione ossia all'esecuzione dell'esperimento vero e proprio. Con il processing il segnale digitalizzato viene sottoposto ad un trattamento di manipolazione matematica al fine di aumentare la risoluzione apparente e/o migliorare il rapporto segnale-rumore. Ovviamente non si può aumentare il contenuto di informazione dei dati ma si possono esasperare alcuni informazioni a spese di altre.

Una delle operazioni preliminari che si compie è lo *zero filling* dei dati.

Questa importantissima operazione consiste nell'aggiunta di una serie di zeri alla parte finale della FID. Infatti la trasformata di Fourier "fast", di fatto, dimezza la risoluzione spettrale (mezza alla parte reale e mezza alla parte immaginaria). Con lo zero filling, si raddoppia il numero di punti nello spettro reale con una conseguente migliore risoluzione digitale e ritorno alla risoluzione reale. In pratica sarebbe possibile eseguire più volte lo zero filling passando ad esempio da 1K a 16K; tuttavia solo il primo processo porta ad un reale beneficio per la risoluzione.

Vi sono poi diversi metodi matematici per alterare la FID che vanno sotto il nome generico di *digital filtering* o *apodizzazioni*. Una delle funzioni di apodizzazione più comunemente utilizzata è quella che consiste nella moltiplicazione della FID per una funzione esponenziale. Tale processo o funzione, detta moltiplicazione esponenziale (EM), contiene un termine noto come *line broadening* (LB) che viene impostato dall'operatore. Essa porta ad uno spettro che ha un aumentato rapporto segnale-rumore a spese della risoluzione; tanto più l'LB è grande, tanto più aumenta il rapporto segnale-rumore. Se la funzione esponenziale per la quale si moltiplica la FID è di tipo negativo, allora il processo prende il nome di *sensitivity enhancement* (SE) e conduce ad un aumento della risoluzione a spese del rapporto segnale-rumore.

Vi sono altre funzioni di apodizzazione ed una delle più utilizzate, soprattutto per gli spettri di carbonio, è la moltiplicazione Gaussiana (GB) grazie alla quale si possono ottenere sensibili aumenti di risoluzione senza significative perdite di rapporto segnale-rumore. Tale funzione ha due parametri che sono sotto il controllo dell'operatore e sono il classico LB visto in precedenza e il termine GB il quale stabilisce il punto dove la funzione moltiplicata ha il suo massimo. A questo punto il FID viene trasformato utilizzando la trasformata di Fourier con l'algoritmo di Cooley e Turkey.

Successivamente si esegue la *fasatura*; tale operazione può essere fatta automaticamente ma è ancora preferibile eseguire la procedura manualmente applicando gli algoritmi di correzione del primo e del secondo ordine in modo

da ottenere una buona simmetria dei segnali e un andamento regolare della linea di base.

Altra operazione che generalmente si compie nel processing è la *calibrazione* dello spettro che nella maggior parte dei casi viene fatta sullo standard che è il tetrametilsilano (TMS) o in alternativa sui segnali residui dei solventi.

Infine viene effettuata la *correzione della linea di base*. Tale operazione è cruciale soprattutto se si intendono eseguire delle misure quantitative tramite letture di intensità o integrali. In questo caso vi sono numerose vie percorribili e vanno da quelle interamente controllate dall'operatore (correzione manuale) il quale può correggere con precisione la linea di base all'interno di una finestra di piccole dimensioni, a quelle più automatizzate. Queste ultime, oltre ad essere più veloci, sono spesso più riproducibili in quanto riducono al minimo la soggettività dell'operatore. Fra queste vanno citate quelle che prevedono l'uso dei medesimi punti per i diversi spettri (Cubic Spline Baseline Correction).

2.14 Referenze

[1] Bloch F., Hansen W.W., Packard M.E. (1946) Nuclear induction. *Phys. Rev.*, **69**, 127-135

[2] Purcell E.M., Torrey H.C., Pound R.V., *et al*. (1946) Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys. Rev.*, **69**, 37-38

[3] Sanders J.K.M., Hunter B.K., Modern NMR spectroscopy - a guide for chemist Oxford university press, New York, (2002).

[4] Silverstein R.M., Webster F.X., Identificazione spettroscopica di composti organici. State University of New York, (1999).

[5] Abragam A. The principles of nuclear magnetism. Oxford University Press, New York (1961).

[6] Keeler J. Understanding NMR Spectroscopy. University of Cambridge UK, Department of Chemistry (2002).

CAPITOLO 3

ANALISI STATISTICA MULTIVARIATA

3.1 *Introduzione*

La disciplina che consente di estrarre informazioni chimicamente rilevanti da numerosi dati prodotti in una serie di numerosi esperimenti prende il nome di chemiometria e si avvale dell'uso di metodi matematico-statistici. Generalmente, i sistemi reali che si pongono sotto osservazione e dai quali si vuole trarre un'informazione, sono di tipo multivariato, sono cioè governati contemporaneamente da più variabili. Solo raramente sono di tipo univariato.

Fino all'avvento degli attuali calcolatori la maggior parte delle procedure statistiche ed analitiche non teneva conto di questo fatto e tendeva erroneamente a trasformare in univariati tutti i problemi, anche quelli che sono intrinsecamente multivariati.

La chemiometria, invece, consente un approccio di tipo multivariato al processo da studiare: in questo modo permette di tenere conto di tutte le variabili in gioco, consentendo di sfruttare al meglio ogni informazione contenuta nei dati da analizzare.

Presupposto essenziale per una buona analisi statistica dei dati è che questi siano numerosi, di buona qualità ovvero siano pertinenti con il problema che si vuole analizzare, abbiano poco rumore e possiedano il maggior numero di informazioni possibili. Per quanto riguarda quest'ultima condizione è importante che il numero di campioni da cui vengono poi estrapolati i dati sia adeguato e che i campioni stessi siano rappresentativi della popolazione che si va ad analizzare[1, 2, 3].

3.2 *Organizzazione dei dati*

I dati vengono organizzati generalmente in matrici (matrici brute) nelle quali le righe corrispondono ad i vari campioni (o casi) e le colonne corrispondono alle variabili; quindi ciascun campione è caratterizzato da c variabili. I valori delle c variabili identificano la posizione del campione in uno spazio a c dimensioni. Il campione può essere pensato quindi come un punto nell'iperspazio delle variabili.

Sebbene si usi meno di frequente, è possibile rappresentare allo stesso modo le variabili nello spazio r-dimensionale dei campioni. Nel caso in cui la matrice è composta da un solo campione o da una sola variabile essa prende il nome di vettore.

Spesso i campioni o le variabili sono accompagnate da informazioni di tipo descrittivo che, se sono riferite ai campioni, sono dette etichette o indici di categoria. E' utile assegnare ai campioni una nomenclatura in codice che sia concisa e che

contenga il maggior numero di informazioni riguardo alle varie etichette. In questo modo la visualizzazione di tali campioni in uno spazio multidimensionale permetterà una facile individuazione degli eventuali raggruppamenti.

3.3 *Pretrattamento dei dati*

Il pretrattamento dei dati è il primo passaggio dell'analisi multivariata. Essa permette di:

- eliminare fonti indesiderate di variabilità;
- sostituire i dati mancanti.

L'eliminazione di fonti indesiderate di variabilità consiste nell'effettuare una scalatura dei dati. Questa operazione coinvolge generalmente le colonne, quindi le variabili, ed è necessaria quando queste sono definite da unità di misura e/o ordini di grandezza differenti; ciò, infatti, causa un notevole contributo alla varianza totale da parte di quelle variabili che in valore assoluto hanno un peso maggiore. Si effettua quindi lo scaling che trasforma le variabili in modo che ognuna di esse abbia lo stesso contributo. La scelta di effettuare la scalatura deve essere sempre guidata dal significato chimico-fisico delle variabili medesime.

Nel caso di dati mancanti, dovuti all'effettiva assenza di uno o più composti in un determinato campione, occorre decidere come è meglio operare.

Sicuramente questo tipo di informazione in termini statistici non va scartata o sottovalutata ma purtroppo i metodi matematici multivariati non sono in grado di operare in presenza di dati mancanti. Ci si trova quindi di fronte al problema di come elaborare delle matrici di dati con dei vuoti al loro interno. In prima approssimazione si possono sostituire i dati mancanti con il valore *zero*, in questo modo però si sovrastima la varianza. Si possono sostituire i dati mancanti con il valor medio della variabile ma al contrario del metodo precedente si sottostima la varianza. Metodi più efficaci sono quelli che ricostruiscono i dati attraverso la PCA (esiste un particolare algoritmo –Nipals- che permette di calcolare le componenti principali anche in presenza di dati mancanti: a questo punto, si ricostruisce il valore a partire dalle matrici di *scores* e *loadings*). Metodi meno complicati rimpiazzano i valori mancanti ricostruendo il trend della variabile tramite tecniche di regressione (*Linear Trend at point*).

3.4 *Analisi esplorativa dei dati*

Scopo dell'analisi esplorativa è quello di identificare le tendenze e le eventuali anomalie dei dati. E' di fondamentale importanza perché consente di avere un'idea preliminare sugli andamenti e sulla struttura dei dati e sulla correlazione fra le variabili.

I dati anomali, spesso identificati come *outliers*, possono avere diverse cause di origine:

1. anomalia insita del campione;
2. errore nella preparazione del campione;
3. errore nell'analisi del campione;
4. errore di lettura delle variabili;
5. errore di trascrizione;
6. errore di calcolo.

Alcune volte, dopo aver individuato gli *outliers*, è utile ricontrollare i dati correggendo gli eventuali errori di lettura, battitura o calcolo; nei casi in cui la procedura sia possibile è addirittura auspicabile eseguire di nuovo l'analisi/misura. Nel caso peggiore, ossia quando l'anomalia è insita del campione stesso, si può decidere di scartare quel campione per non condizionare l'esito dell'intera analisi. E' ovvio che quest'ultima soluzione va applicata con moderazione e quando non c'è altra via da percorrere.

I vari metodi per individuare gli *outliers* possono essere divisi in multivariati e univariati. Va inoltre precisato che l'uso di una tecnica non esclude il ricorso ad un'altra, anzi è preferibile che vengano utilizzate congiuntamente tutte le tecniche di seguito esposte:

✓ *Statistica descrittiva (metodo univariato)*: Gli indici di tendenza centrale e di variabilità danno facilmente e velocemente utili informazioni riguardo alla presenza di eventuali anomalie. Tra gli indici di tendenza centrale vanno ricordati la *moda* (categoria con frequenza più alta), la *mediana* (valore centrale della distribuzione) e la *media* (M) ("baricentro" della distribuzione).

$$M = \frac{\sum x_i}{N} \tag{1}$$

Tale parametro, essendo molto manipolabile e risentendo sensibilmente dei dati estremi, si presta particolarmente bene per l'identificazione degli eventuali outliers. *N* è il numero dei casi considerati.
Tra gli indici di variabilità i quali misurano il grado di dispersione, ovvero la tendenza dei casi ad allontanarsi dal valore centrale o a disporsi attorno al valor medio vanno ricordati:

$$\sigma^2 = \frac{\sum (x_i - M)^2}{N - 1} \qquad (2)$$

La *varianza* (σ^2) (media dei quadrati degli scarti dei valori osservati dalla loro media aritmetica).

La *deviazione standard* (σ) (radice quadrata della varianza; ha unità di misura uguale a quella dei dati originari). La deviazione standard viene spesso utilizzata per valutare la ripetibilità e la riproducibilità delle analisi.

$$SD = \sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - M)^2}{N - 1}} \qquad (3)$$

✓ <u>*Box-Plot (metodo univariato)*</u>: i Box-Plot non sono altro che la rappresentazione grafica di gran parte dei parametri descritti in precedenza. Tuttavia tale strumento, oltre che fornire sinteticamente e congiuntamente le informazioni citate, usa un metodo matematico per individuare gli *outliers* ed i dati estremi.
I Box-Plot si presentano come una scatola, da cui il nome, i cui estremi sono il primo e terzo quartile (Q1 e Q3), tagliata da una linea all'altezza della mediana (Q2). Si aggiungono poi due linee dette baffi ad una distanza di 1,5 H da Q1 e Q3 (± 1,5H), dove H rappresenta la distanza tra il primo e il terzo quartile. I dati che cadono al di fuori dei baffi sono gli *outliers* mentre quelli che sono ad una distanza maggiore di ± 3H sono considerati estremi. (*Figura 3.1*).

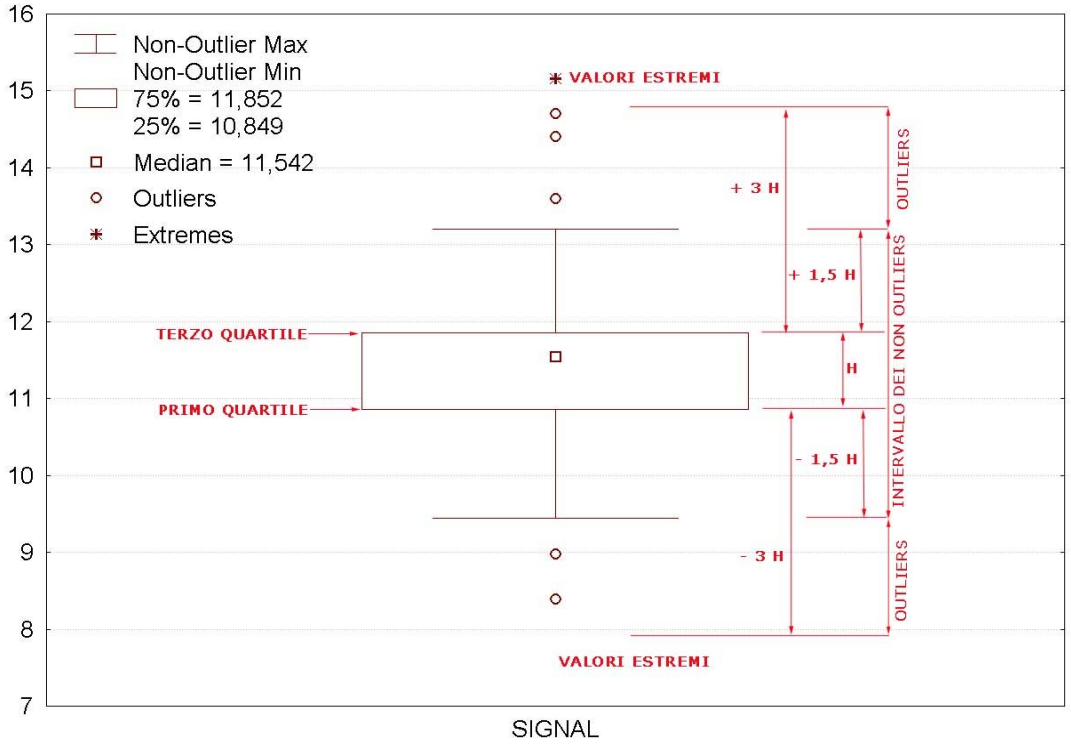

Figura 3.1. Esempio di Box-Plot basato sulla mediana e sui quartili.

✓ <u>*Analisi delle componenti principali (metodo multivariato)*</u>: l'analisi delle componenti principali (PCA) che verrà spiegata dettagliatamente nel *paragrafo 3.6*, può essere utilizzata anche come metodo per individuare gli *outliers*. Essa ha il vantaggio di essere veloce e pratica ma soprattutto tiene conto di tutte le variabili congiuntamente, cosa che non fanno gli altri metodi. Tuttavia occorre non abusare di tale metodologia perché si potrebbero spacciare per *outliers*, dati che in realtà fanno parte di una struttura (*Figura 3.2*).

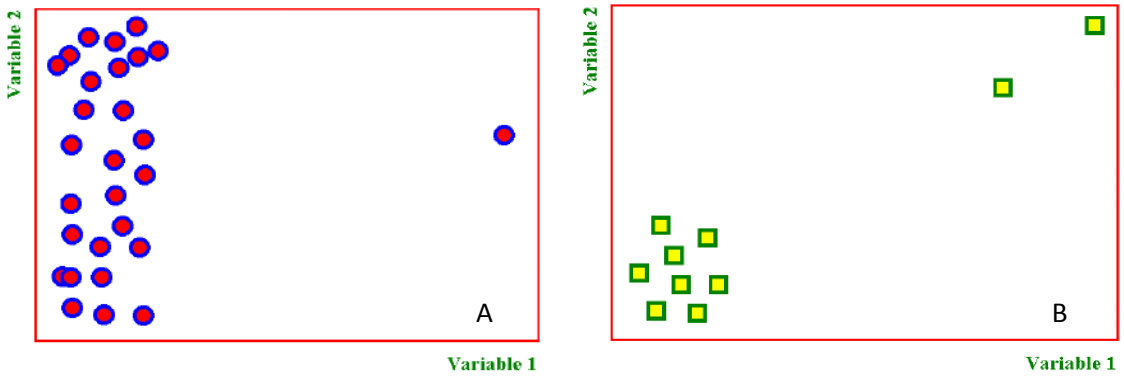

Figura 3.2. PCA di due matrici di dati; **A**: matrice di dati con un'evidente presenza di un *outliers*; **B**: matrice di dati in cui è presente una probabile struttura.

Con l'analisi degli *outliers* si conclude la prima parte dell'analisi esplorativa che dalla matrice bruta, nella quale si è agito sui campioni, portare alla *Matrice corretta* nella quale si agirà sulle variabili. Sarà infatti la matrice corretta ad essere sottoposta alle successive analisi (ANOVA; PCA; LDA; etc.) per cui è in questa fase che va testata la normalità delle variabili e la loro eventuale correlazione.

3.5 Analisi della varianza (analisys of variance-ANOVA)

L'analisi della varianza ci permette di stabilire se una determinata variabile è in grado di discriminare fra due o più fattori.

Tecnicamente essa consente di confrontare due o più medie di una variabile, estratte da diverse popolazioni campionarie, per stabilire se queste ultime sono diverse dal punto di vista statistico o meno. L'analisi della varianza fornisce utili informazioni che permettono di eseguire più velocemente e soprattutto con maggiore efficacia le successive analisi multivariate (TCA, PCA e soprattutto LDA). Senza le informazioni fornite dall'ANOVA si possono eseguire centinaia di prove senza sapere quali variabili utilizzare e soprattutto rischiando di inserire inutili fonti di rumore derivanti da variabili che non hanno nessun potere discriminante.

Nell'ANOVA multivariata (detta anche MANOVA, Multivariate Analysis Of Variance), si cerca di capire la differenza tra diverse popolazioni quando per ogni elemento si misura più di una variabile e si considerano queste ultime congiuntamente.

Bisogna sempre confrontare la dispersione dei dati con l'incertezza legata all'errore di misura: se le due grandezze infatti sono confrontabili, ai fini dell'analisi

statistica, si può presupporre che non ci sia variabilità e quindi quella variabile è inutilizzabile per gli scopi prefissati.

In termini pratici l'ANOVA testa le medie valutando se la variabilità tra i gruppi è maggiore della variabilità entro i gruppi. Si usano i parametri *F* e *p*-level per determinare la selezione delle variabili discriminanti. *F* rappresenta il rapporto tra la variabilità intergruppo e la variabilità intragruppo. Maggiore sarà il valore di *F* e maggiore sarà il potere discriminante di quella variabile. Il *p-level* dà la probabilità di errore che si accetta nel risultato; un basso *p-level* corrisponde ad un'alta probabilità che la differenza tra i gruppi sia significante. Il livello di significatività di tutti i test è ritenuto convenzionalmente valido per $p < 0{,}05$ corrispondente a probabilità maggiore del 95%.

Infine va ricordato che l'ANOVA ha come presupposto di base quello delle distribuzioni normali delle variabili nelle diverse popolazioni mentre all'interno di esse presuppone l'uguaglianza delle varianze.

3.6 Analisi delle componenti principali (principal components analysis- PCA)

L'analisi delle componenti principali (PCA) ha lo scopo di ridurre la matrice dei dati originali in una matrice più piccola che comunque mantiene le stesse informazioni. Spesso, infatti, sono i cambiamenti di una variabile rispetto alle altre (co-varianza) a contenere le informazioni più rilevanti. Una rappresentazione completa del problema richiederebbe quindi una visualizzazione dei campioni in uno spazio con un numero di dimensioni pari al numero di variabili utilizzate. È ovvio che se si hanno più di tre variabili, come spesso accade, una rappresentazione grafica risulterebbe impossibile.

La PCA risolve questo problema mediante una compressione dell'informazione che consente una utile ed immediata visualizzazione dei dati stessi. L'analisi delle componenti principali si propone infatti di identificare, a partire dai dati a disposizione, le direzioni privilegiate lungo le quali si concentra la massima varianza. In tal modo si ottengono nuove variabili astratte, dette appunto componenti principali. Ognuna di esse è una combinazione lineare delle variabili sperimentali espressa dalle seguenti relazioni:

$$\begin{aligned} PC1 &= a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + ... + a_{1c}x_c \\ PC2 &= a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + ... + a_{2c}x_c \\ PCn &= a_{n1}x_1 + a_{n2}x_2 + ... + a_{nc}x_c \end{aligned} \qquad (5)$$

dove a è un coefficiente detto *loading* che rappresenta il contributo della singola variabile nella descrizione della componente principale considerata e x è il valore della variabile misurata.

Da un punto di vista grafico, questo tipo di costruzione è equivalente a ruotare gli assi dello spazio multi-dimensionale tenendo fermi i punti (campioni). I coefficienti assegnati a ciascuna variabile nella definizione delle componenti principali sono calcolati in maniera tale da massimizzare la varianza lungo una determinata direzione. Più precisamente si calcola la direzione lungo la quale si ha la massima varianza (PC1) e la componente successiva viene calcolata in modo da "spiegare" la maggior parte della varianza "residua". La seconda componente principale risulta essere ortogonale alla prima. Il procedimento continua fino a che non si siano calcolate tutte le PC. A questo punto si ha a disposizione un numero di componenti principali pari al numero di variabili iniziali ed occorre scegliere quali utilizzare. Molti dei criteri per scegliere il numero minimo di componenti principali si basano sugli autovalori (o *eigenvalues*) delle PC che esprimono la varianza lungo ognuna delle nuove variabili, e vengono indicati con λ. Ogni autovalore in sintesi esprime la varianza spiegata dalla singola componente principale e può essere espresso in percentuale. Generalmente le ultime componenti principali sono poco informative e contengono per la maggior parte il "rumore".

Esistono diversi criteri per stabilire il numero di componenti principali da utilizzare:

Il *criterio dell'autovalore medio* è basato sulla considerazione che tutte le componenti principali caratterizzate da un autovalore maggiore della media di tutti gli autovalori possano essere significative; in molti casi, il criterio si riduce all'inclusione di tutte le componenti principali il cui autovalore è maggiore di 1.

Il *criterio della percentuale di varianza spiegata* usa un numero sufficiente di componenti principali tali da spiegare una percentuale della varianza, originariamente presente all'interno dei dati, stabilita dall'operatore.

Vanno infine spese due parole sugli *scores* (T) e sui *loadings* (P) i quali si ottengono a partire dalla matrice dei dati (X), grazie alla procedura in precedenza accennata.

$$\underset{\substack{dati \\ r\times c}}{\mathbf{X}} = \underset{\substack{scores \\ r\times N}}{\mathbf{T}} \; \underset{\substack{loadings \\ N\times c}}{\mathbf{P}^{\mathbf{T}}} \qquad (6)$$

Gli *scores* e i *loadings* rappresentano rispettivamente le coordinate dei campioni e quelle delle variabili nello spazio delle componenti principali. In particolare i

loadings coincidono con i coefficienti a_{kj} delle equazioni delle componenti principali e rappresentano il contributo della variabile sulla componente principale analizzata. Attraverso il plot dei *loadings* si possono valutare le correlazioni tra le variabili originarie. È bene precisare che nella PCA non si fa a priori nessuna assunzione sull'esistenza di gruppi; essa infatti punta a massimizzare la separazione fra gli oggetti (campioni) non fra i gruppi (etichette); tuttavia ciò non toglie che questi non possano essere visualizzati ugualmente sul grafico utilizzando simboli o colori diversi.

3.7 *Analisi di agglomerazione (cluster analysis-TCA)*

L'analisi dei clusters ha l'obiettivo di identificare eventuali raggruppamenti tra i campioni a partire dai dati "multidimensionali" a disposizione. Non bisogna confondere questo metodo con i metodi di classificazione, per i quali si stabilisce a priori l'esistenza dei gruppi. Al contrario, nell'analisi dei *clusters* non solo i gruppi non sono noti, ma non è neanche detto che esista un raggruppamento dei dati.

I presupposti teorici di questo tipo di analisi si basano sul fatto che ogni campione in esame ha una relazione con tutti gli altri. Il primo passo è quello di determinare quindi la *similarità (o dissimilarità)* tra gli oggetti. A questo concetto qualitativo è necessario associare una grandezza numerica. Da un punto di vista operativo, si rappresenta la dissimilarità tra i campioni utilizzando una misura di distanza. Dal momento che si possono visualizzare i nostri campioni come punti nello spazio delle variabili, è chiaro che oggetti vicini avranno piccole differenze nei valori delle stesse[1]. Esistono diversi tipi di distanze:

- *Distanza Euclidea*:

$$d_{st} = \sqrt{\sum_j \left(x_{sj} - x_{tj}\right)^2} \qquad (7)$$

- *Distanza di Manhattan*:

$$d_{st} = \sum_j \left|x_{sj} - x_{tj}\right| \qquad (8)$$

- *Distanza di Minkowski*:

$$d_{st} = \sqrt[r]{\sum_j \left| x_{sj} - x_{tj} \right|^r} \tag{9}$$

- *Distanza di Mahalanobis:*

$$d_{st} = (\mathbf{x}_s - \mathbf{x}_t)^T S^{-1} (\mathbf{x}_s - \mathbf{x}_t) \tag{10}$$

- *Distanza di Pearson*:

$$d_{st} = \sqrt[2]{\sum_j \left(\frac{x_{sj} - x_{tj}}{s_j} \right)^2} \tag{11}$$

L'utilizzo della distanza Euclidea può portare a risultati erronei se le variabili risultano correlate. Questo inconveniente può essere superato operando su variabili decorrelate oppure eliminando una delle due variabili correlate o ancora utilizzando una misura di distanza che tenga conto della correlazione tra le variabili (Mahalanobis)[4].

Dopo aver scelto il tipo di distanza da utilizzare si costruisce la "matrice delle distanze" nella quale sono appunto riportate le distanze fra ciascun campione nello spazio delle variabili iniziali. Questa matrice è il punto di partenza dell'analisi dei *clusters* (raggruppamenti).

Rimane da decidere secondo quale metodo calcolare la distanza tra i *clusters* (oppure tra i *clusters* ed i campioni) che si vanno via via formando. Anche in questo caso esistono diverse opzioni:

- *Metodo del legame singolo*: La distanza tra due *clusters* è definita come la minima distanza tra coppie di campioni in *clusters* diversi; se gli oggetti sono poco separati, favorisce la formazione di lunghi *clusters* lineari invece dei più consueti ellissoidi;
- *Metodo del legame completo*: La distanza tra due *clusters* è definita come la massima distanza tra coppie di campioni in *clusters* diversi; generalmente porta alla formazione di un maggior numero di piccoli *clusters*;
- *Metodo del legame medio*: La distanza tra due *clusters* è definita come media delle distanze tra tutte le possibili coppie di campioni in *clusters* diversi;
- *Metodo del centroide*: La distanza tra due *clusters* è definita come la distanza tra i centroidi dei due *clusters*; è un metodo che non è monotono rispetto alla distanza.

Dopo aver scelto il metodo di aggregazione dei *clusters* è possibile visualizzare lo svolgersi dell'analisi costruendo un grafico dove sia rappresentata la progressiva unione dei *clusters*. Questo grafico prende il nome di dendrogramma (*Figura 3.3*).

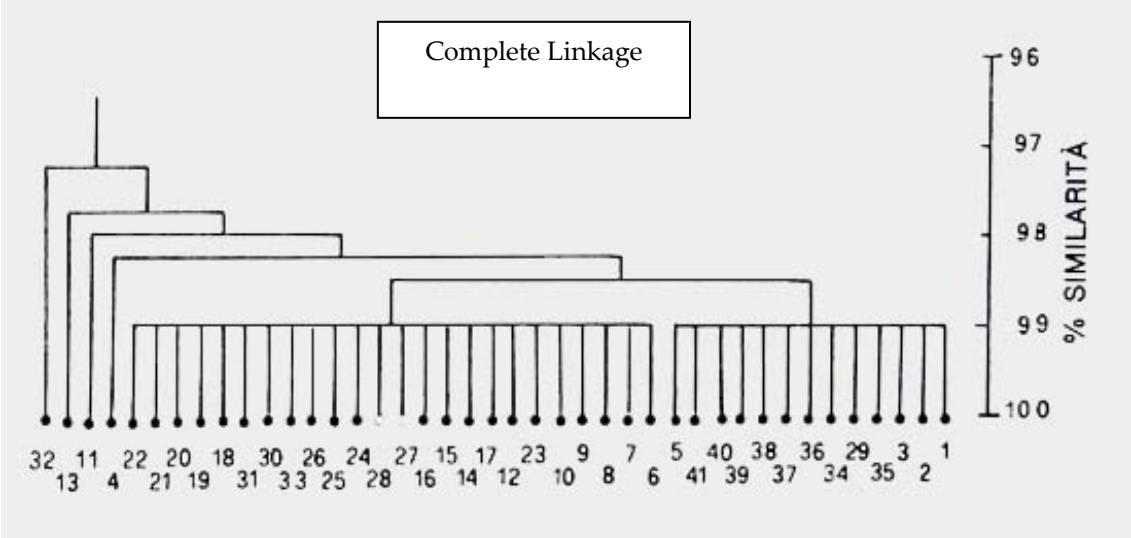

Figura 3.3. Esempio di un'analisi di agglomerazione per 41 campioni di argilla [5]

Il problema principale dei metodi gerarchici di *clustering* è che non esiste un criterio univoco per definire il punto in cui tagliare il dendrogramma. Vi sono tuttavia dei metodi che ricorrono all'impostazione di un valore soglia per la similarità. E' comunque consigliabile validare il risultato attraverso un'analisi discriminante lineare.

Va infine detto che l'analisi dei *clusters* può essere un metodo valido per mettere ordine nei dati; tuttavia l'analisi richiede una forte dose di soggettività nella scelta della metodologia da usare (scelta del criterio di calcolo della distanza e scelta del criterio di aggregazione dei *clusters*) e spesso il metodo scelto condiziona in maniera sensibile il risultato [4, 6].

3.8 Analisi discriminante lineare (linear discriminant analisys-LDA)

L'analisi discriminante lineare è il metodo di classificazione più semplice e anche il più utilizzato.

I metodi di classificazione hanno l'obiettivo di costruire un modello in grado di individuare la classe di appartenenza di ciascun campione sulla base di un certo numero di variabili indipendenti. A differenza dell'analisi dei *clusters* e dell'analisi delle componenti principali, i metodi di classificazione richiedono che le classi siano note a priori e che per una serie di campioni sia nota la classe di appartenenza così da poter costruire il modello [4, 6].

All'interno dei metodi di classificazione è possibile operare una distinzione tra i *metodi di classificazione puri* e i *metodi di modellamento di classe* (o metodi di classificazione modellanti). I metodi di classificazione puri suddividono lo spazio dei dati in tante regioni quante sono le classi, in maniera tale che se un campione proviene da una determinata regione spaziale è "assegnato" a quella particolare classe. L'approccio seguito dai metodi di classificazione modellanti è diverso, infatti l'obiettivo è di costruire un modello in grado di stabilire se un campione appartenga o meno ad una determinata classe. In questi metodi ogni campione può essere assegnato a nessuna, una o più di una classe.

L'analisi discriminante lineare fa uso di combinazioni lineari delle variabili originarie. Dal punto di vista grafico lo spazio viene diviso da iperpiani che separano le regioni corrispondenti alle diverse classi.

Il primo risultato di un'analisi di classificazione è quella che viene chiamata "matrice di confusione" nella quale i vari casi sono assegnati con una certa probabilità ad una delle classi seguendo la regola di Bayes (per ottenere i risultati migliori in termini di classificazione, ciascun campione deve essere assegnato alla classe cui è più probabile che esso appartenga). I campioni per i quali sia nota l'attribuzione (training set) vengono quindi utilizzati per calcolare i coefficienti di ciascuna variabile utili a costruire le *funzioni di classificazione*.

$$f_i(\mathbf{x}) = a_{i0} + a_{i1}x_1 + a_{i2}x_2 + \ldots + a_{ic}x_c \qquad (12)$$

Il passo successivo è quello di tramutare tali modelli numerici in modelli grafici i quali aiutano nell'interpretazione del set di dati in esame. Per fare questo, a partire dalle funzioni di classificazione si costruiscono le *funzioni discriminanti lineari* (si noti che oltre alle differenze concettuali fra i due tipi di funzioni ci sono delle differenze numeriche dovute al termine noto).

$$d_1 = c_{11}x_1 + c_{12}x_2 + \ldots + c_{1c}x_c \qquad (13)$$

I coefficienti delle combinazioni lineari sono determinati in maniera analoga alle componenti principali.

Il numero massimo di funzioni discriminanti (anch'esse combinazioni lineari delle variabili) è il numero minimo tra (c-1) e (G-1) con c = numero di variabili e G = numero di classi. Per stabilire quali funzioni discriminanti utilizzare si può calcolare la varianza per ciascuna funzione oppure si può utilizzare il Lambda Wilks (tanto minore è il suo valore, tanto maggiore è la capacità discriminante).

In sintesi si può assumere che se l'analisi discriminante viene effettuata sulla base di variabili standardizzate (variabili scalate) si ottengono funzioni discriminanti; se invece si usano le variabili originali, si parla di funzioni di classificazione; queste ultime vengono in genere calcolate se si vuole disporre di un modello per determinare a quale dei gruppi studiati appartiene un nuovo oggetto.

Un modo per migliorare la capacità predittiva dell'analisi discriminante lineare potrebbe essere quello di utilizzare una superficie non lineare di separazione tra le classi (ipersfere, iperellisoidi) così come fa *l'analisi discriminante quadratica*.

3.9 Referenze

[1] Brereton R.G. Chemometrics, data analysis for the Laboratory and Chemical Plant. Wiley (2003)

[2] Giudici P., Cerchiello P. Analisi statistica uni variata. Pavia, 1-30 (2003)

[3] Mood A.M., Graybill F.A, *et al.* Introduzione alla statistica. Milano, McGrw-Hill (1997)

[4] Marini F. Chemiometria avanzata-metodi multivariati. Montelibretti-CNR, Roma (2004)

[5] Moscati, P. Archeologia e Calcolatori. Giunti Barbera, Firenze, 87-88 (1987)

[6] Magrì A., Marini F. Corso di Chemiometria. Dipartimento di Chimica, Univ. La Sapienza, Roma (2005)

CAPITOLO 4

PROFILO METABOLICO DI ESTRATTI DI SPIGOLA (DICENTRARCHUS LABRAX) E DISCRIMINAZIONE TRA ALLEVATO E PESCATO MARINO

4.1 *Introduzione*

I prodotti ittici sono una componente fondamentale nella dieta dell'uomo grazie all'alta digeribilità, all'elevato contenuto di proteine ad alto valore biologico, alla presenza di minerali, vitamine e alla particolare composizione della frazione lipidica. Un consumo regolare di pesce, almeno due volte a settimana, è consigliato per un'alimentazione sana e corretta. Il pesce ha lo stesso valore alimentare della carne; pur possedendo infatti un tenore medio di proteine più basso, le proteine del pesce hanno un valore biologico e un'utilizzazione proteica netta più elevati. La peculiare abbondanza di acidi grassi polinsaturi della serie omega 3 [1,2], il basso contenuto di colesterolo e quello relativamente elevato di fosfolipidi, fanno del pesce un alimento particolarmente adatto alla prevenzione delle malattie cardiovascolari correlate all'aterosclerosi [3,4,5]. In particolare, l'acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), della serie omega 3, è un precursore delle prostaglandine della serie 3m che hanno un'azione antitrombotica e vasodilatatrice mentre le prostaglandine della serie 2, derivanti dall'acido arachidonico (20:4n-6), inducono l'aggregazione piastrinica.

La scarsa trombogenicità piastrinica riscontrata nei consumatori abituali di pesce è stata attribuita ad un elevato livello di EPA nel plasma e nelle piastrine e alla contemporanea limitata presenza di acido arachidonico [3,4,5].

Inoltre i prodotti ittici sono ricchi di acido docosaesaenoico (DHA, 22:6n-3) che contribuisce al normale funzionamento cellulare ed è considerato essenziale per la crescita e lo sviluppo del sistema nervoso nei bambini e per il corretto mantenimento di questo negli adulti [6, 7, 8].

Agli acidi grassi omega 3 sono, inoltre, state attribuite funzioni essenziali per lo sviluppo della retina, nel contrasto dei radicali liberi, principale causa dell'invecchiamento cutaneo e di alcune patologie come la fibrosi cistica e disordini del sistema nervoso [6, 9].

E' con questa consapevolezza che negli ultimi anni è andata aumentando la propensione al consumo di pesce [10]. Le possibilità di rispondere alle esigenze di un mercato in forte espansione comporta inevitabilmente una continua depauperazione del mare. L'alternativa maggiormente percorribile utile ad evitare il depauperamento della popolazione marina appare l'adeguato sviluppo dell'acquacoltura. Tuttavia, nel nostro Paese, a differenza degli altri paesi della UE, permane tra i consumatori una diffidenza verso il pesce allevato in quanto ritenuto un prodotto "artificiale" e qualitativamente inferiore.

L'acquacoltura, comunque, possiede potenzialità tali da consentirle di acquisire un ruolo strategico all'interno del comparto. Il pesce allevato in ambiente controllato, infatti, oltre a mostrare le stesse benefiche qualità nutrizionale del pesce

di cattura [11, 12], può essere sottoposto con maggiore semplicità ad una serie di rigorosi controlli da parte delle autorità competenti sino all'immissione sui mercati. Inoltre il pesce pescato subisce un forte stress al momento della cattura; il dibattersi nella rete provoca un consumo delle riserve di glicogeno, un conseguente *rigor-mortis* precoce, meno intenso e meno lungo; un più elevato pH e pertanto la possibilità di uno sviluppo microbico che può compromettere le caratteristiche qualitative del prodotto

In tale contesto si inserisce il presente lavoro, svolto nell'ambito del progetto "Valorizzazione dei prodotti di acquacoltura in Campania", avviato nel settembre 2005 e concluso nel maggio 2008, che, nel caso specifico, si è proposto di individuare delle caratteristiche in grado di distinguere i prodotti ittici allevati da quelli pescati.

In particolare, è stata presa in esame la spigola o branzino (*Dicentrarchus labrax*) di provenienza marina e di allevamento; questa specie è stata individuata come caso-studio poiché costituisce la più importante forma di pescicoltura sia in vasche sulla terra ferma che in gabbie in mare, nell'area mediterranea [13].

Lo scopo del presente studio è stato quello di studiare in dettaglio, per mezzo di Risonanza Magnetica Nucleare, il profilo metabolico degli estratti acquosi ed in solvente organico della spigola.

Data l'importanza degli acidi polinsaturi, la maggior parte degli articoli riportati in letteratura riguardano l'analisi della composizione degli acidi grassi. Quasi nulla è infatti riportato sui metaboliti solubili in acqua che invece sono importanti dal punto di vista nutrizionale.

Il profilo metabolico delle due tipologie di prodotto, pescato ed allevato, è stato utilizzato al fine di discriminare i diversi prodotti in base alla loro origine. Tale metodologia ha consentito una caratterizzazione accurata e completa del prodotto ed una discriminazione dei campioni di spigola in relazione alla provenienza.

I risultati ottenuti sono stati oggetto di una pubblicazione su rivista scientifica internazionale [14], di un poster presentato al convegno sulle "Applicazioni della Risonanza Magnetica nella Scienza degli Alimenti" e di comunicazione orale presentata nell'ambito del "14° Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology".

4.2 *Materiali e Metodi*

4.2.1 Campionamento

I campioni di spigola pescati in mare aperto (Tirreno – costa campana) avevano un peso di circa 800 ± 10 grammi e una lunghezza testa-coda di circa 46 ± 3 cm.

I campioni di spigola coltivate in vasca provenivano da un allevamento sito in Molise e presentavano un peso di circa 600 ± 10 grammi e una lunghezza testa-coda di circa 35 ± 3 cm. Il mangime utilizzato per l'alimentazione di queste ultime (Biomar, Ecolife 66F n. 6.5), presentava la seguente composizione percentuale: proteine 42%, lipidi 26%, carboidrati 20%, ceneri 6.1%, fibre 3.0%, metionina e cisteina 1.34% e fosforo totale 0.90%.

Il trasporto dei campioni dallo stabilimento di produzione o dal porto di sbarco ai laboratori del Dipartimento STAAM dell'Università degli Studi del Molise, è avvenuto, entro il tempo massimo di 3 ore, in contenitori di polistirolo contenente ghiaccio a scaglie, in condizioni di ipotermia. Le spigole sono state lavate con acqua potabile e conservate a 2°C.

4.2.2 Analisi chimico-fisiche

- *Determinazione del pH*

Su ciascun campione di analisi è stata effettuata, con un pH-metro (Crison 2001), la determinazione del pH sia sul campione tal quale mediante un elettrodo a spillo (3 determinazioni per campione) sia su un omogeneizzato di 10g di campione + 90 mL di soluzione fisiologica sterile (acqua distillata + 9 g/L di NaCl).

- *Attività dell'acqua*

L'attività dell'acqua è stata determinata su ogni campione mediante Water Activity Meter AQUALAB modello CR-2 (USA), seguendo le indicazioni fornite dalla casa costruttrice. Il valore di a_w è stato ottenuto dalla media di tre determinazioni.

❖ *Determinazione del colore*

La determinazione del colore del muscolo e della pelle delle differenti spigole è stata effettuata utilizzando un colorimetro "Minolta CR300b". Il colore viene valutato con i valori L*, a*, b* del sistema tridimensionale Hunter (Hunter, 1987), nel quale L* è l'asse della luminosità e varia da 0 (bianco) a 100 (nero); a* è l'asse del rosso e misura la tendenza al colore rosso quando è positivo (+a*) e al verde quando è negativo (-a*); b* è l'asse del giallo e misura il colore giallo quando è positivo (+b*) e il colore blu quando è negativo (-b*); sia a* che b* indicano il colore grigio quando sono uguali a zero.

4.2.3 Analisi Microbiologiche

❖ *Conteggi microbici*

Da ciascuna spigola sono stati prelevati asetticamente 10 g di pelle e 10 g di muscolo sulla fascia dorsale. Ciascun campione (pelle e muscolo) è stato diluito con soluzione fisiologica sterile in rapporto 1:10 (v/v) e omogeneizzati in Stomacher 400 Lab-blender. Gli omogeneizzati ottenuti sono stati utilizzati per la realizzazione di successive diluizioni decimali nello stesso diluente con le quali sono state inoculate le piastre per i conteggi microbici.

I livelli di carica dei microrganismi oggetto della valutazione sono stati determinati su opportuni terreni di crescita dopo le appropriate condizioni di incubazione come riportato in *Tabella 4.1*.

Tabella 4.1. Condizioni di incubazione dei gruppi microbici ricercati

Gruppi microbici	Substrato colturale	Temperatura	Tempo
Batteri lattici	MRS agar (OXOID) (anaerobiosi–Anareogen System)	28°C	72 h
Enterococchi	Slanetz & Bartley (OXOID)	37°C	72 h
***Pseudomonas* spp.**	Pseudomonas agar base (OXOID) + SR0103E (OXOID)	28°C	72 h
Mesofili totali	PCA (OXOID)	28°C	48 h
Mesofili Psicrotrofici	PCA (OXOID) + SM	7°C	10 days
Enterobacteriaceae	VRBGA (OXOID)	37°C	48 h
Coliformi totali	VRBLA (OXOID)	37°C	48 h
Coliformi fecali	VRBLA (OXOID)	44°C	48 h
Stafilococchi	Baird-parker agar (OXOID)	37°C	72 h
Brochotrix thermosphacta	STAA (OXOID)+ SR0151E (OXOID)	37°C	48 h
Produttori di H_2S	IRON AGAR (OXOID)	25°C	72 h

4.2.4 Analisi NMR

❖ *Processo di estrazione per l'analisi NMR*

I campioni sono stati preparati secondo il metodo descritto da Bligh & Dyer [15]. Sono stati effettuati quattro prelievi di muscolo e quattro prelievi di pelle per ciascun campione, del peso di circa 8 grammi.

I campioni sono stati prelevati 2 cm al di sotto della pinna dorsale e 2 cm al di sopra della pinna ventrale. Il muscolo e la pelle, trattati separatamente, sono stati posti in un mortaio di porcellana aggiungendo 24 mL di una miscela di cloroformio/metanolo (1:1 v/v). Il campione è stato triturato e omogeneizzato con un pestello di porcellana per circa quattro minuti e, successivamente, sono stati aggiunti 8 mL di acqua distillata.

L'omogeneizzato è stato centrifugato ad una velocità di 4000 rpm per 20 minuti a 4°C.

Le fasi liquide, acquosa e organica, così ottenute sono state separate e portate a secco, mediante liofilizzazione la prima e azoto gassoso la seconda. Il residuo secco di estratto organico è stato disciolto in 2 mL di $CDCl_3$; 0.7 mL della soluzione sono stati posti in un tubo di 5 mm per essere sottoposti ad analisi NMR. Il residuo secco di estratto acquoso è stato disciolto in 3 mL di D_2O; 0.35 mL di soluzione è stata prelevata e posta in tubo NMR di 5 mm con aggiunta di 0.35 mL di tampone fosfato (400 mM, pH=6.5).

❖ *Misure NMR*

Gli spettri NMR degli estratti di spigola sono stati registrati a 300 K su uno spettrometro Bruker AVANCE AQS600 operante alla frequenza protonica di 600.13 MHz ed equipaggiato con una sonda Bruker multinucleare inversa con gradienti capace di produrre gradienti nella direzione z con una forza di 55.4 G cm^{-1}. Gli spettri protonici sono riferiti al segnale del DSS (sodio 3-(trimetilsilil)-1-propanesulfonato) (δ = 0.00 ppm) in D_2O e tampone fosfato, e al segnale CH_3 (δ = 0.88 ppm) dell'acido oleico in $CDCl_3$. Gli spettri ^{13}C sono riferiti alla risonanza CH_3 dell'alanina (δ = 16.8 ppm) in D_2O e alla risonanza del metile dell'acido oleico (δ = 14.1 ppm) in $CDCl_3$.

Lo spettro dell'estratto acquoso è stato acquisito con 512 scansioni, un *recycle delay* di 3s, un impulso di 90° di circa 15.5 μs e 32K *data points*.

Il segnale dell'acqua è stato soppresso usando la presaturazione del solvente (schema NOESY-presaturazione) [16].

Lo spettro ^{1}H dell'estratto organico è stato acquisito sommando 16 transienti con un *recycle delay* di 2 s, un impulso di 90° di 10 μs e 64K *data points*.

Lo spettro ^{13}C dell'estratto organico è stato acquisito con 7000 scansioni un *recycle delay* di 6 s, un impulso di 60° di 10 μs e 64K *data points*.

Gli esperimenti 2D, ^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{1}H TOCSY, ^{1}H-^{13}C HSQC e ^{1}H-^{13}C HMBC[16], sono stati realizzati usando le stesse condizioni sperimentali precedentemente riportate [17].

Il *delay* per l'evoluzione degli accoppiamenti negli esperimenti ^{1}H-^{13}C HMBC è di 80 ms, il *mixing time* per ^{1}H-^{1}H TOCSY è di 80 ms. Gli esperimenti PGSE (*Pulsed field gradient spin echo*) sono stati condotti con gradiente pulsato generante un campo magnetico in direzione *z* di 55.4 G cm^{-1}. E' stata utilizzata una sequenza *echo pulse* con gradienti bipolari; la forza del gradiente pulsato di durata di 1.4 ms, è stata incrementata logaritmicamente in 32 *step*, dal 2% fino al 95% della forza massima,

con un tempo di diffusione di 200 ms e un *delay* addizionale di 25 ms. Dopo la trasformata di Fourier e la correzione della linea di base, la dimensione di diffusione è stata processata mediante il software "DOSY subroutine" di Bruker Xwinnmr™.

Il rapporto molare di un dato metabolita è stato calcolato usando i corrispondenti integrali. Il limite di rilevabilità di un dato metabolita analizzato in un tubo di 5 mm usando la spettroscopia NMR ^{1}H 1D ad alti campi (11-16 T) è circa 100 μM [T.W.M Fan, 1996] [14].

❖ *Misure del contenuto di metaboliti in estratti acquosi*

Il calcolo del contenuto dei metaboliti idrosolubili è stato effettuato misurando l'intensità di 19 risonanze ^{1}H rispetto all'intensità del segnale dello standard interno DSS (0.2 mM) normalizzato al valore 10 (*Figura 4.1, Figura 4.2*).

Le risonanze selezionate nello spettro NMR sono le seguenti:
isoleucina (**1**, 1.02 ppm), valina (**3**, 1.05 ppm), acido lattico (**4**, 1.33 ppm), alanina (**5**, 1.49 ppm), lisina (**6**, 1.74 ppm), acido glutammico (**7**, 2.07 ppm), acido succinico (**9**, 2.41 ppm), glutammina (**8**, 2.46 ppm), anserina (**11**, 2.86 ppm), creatina/fosfocreatina (**12**, 3.04 ppm), colina (**25**, 3.22 ppm), ossido di trimetilammina (**14**, 3.28 ppm), taurina (**15**, 3.43 ppm), glicina (**16**, 3.57 ppm), glicina/betaina (**13**, 3.91 ppm), acido malico (**10**, 4.31 ppm), α-glucosio (**20**, 5.24 ppm), acido fumarico (**21**, 6.53 ppm), anserina (**23**, 7.22 ppm).

❖ *Misure del contenuto di metaboliti in estratti organici*

Per il calcolo dei metaboliti liposolubili è stata usata l'integrazione delle seguenti risonanze ^{1}H (*Figura 4.3*):
CH_3-18 del colesterolo (**1**, 0.68 ppm), CH_3 degli acidi grassi eccetto i polinsaturi (**2**, 0.88 ppm), CH_3 degli acidi grassi polinsaturi (**3**, 0.97 ppm), CH_2-3 dell'acido eicosapentaenoico (EPA) (**6**, 1.70 ppm), tutti i protoni allilici eccetto i C3 dell'acido docosaesaenoico (DHA) (**7**, 2.08 ppm), CH_2-2 di tutti gli acidi grassi eccetto DHA (**8**, 2.31 ppm), CH_2-2 e CH_2-3 di DHA (**9**, 2.38 ppm), protoni CH_2 diallilici degli acidi grassi dinsaturi (DUFA) (**10**, 2.77 ppm), CH_2N di fosfatidilcolina (PC) (**14**, 3.76 ppm), *sn*3 CH_2 digliceridi di fosfatidilcolina e fosfatidiletanolammina (PC+PE) (**15**, 3.94 ppm), *sn*1,3 CH_2 del glicerolo dei trigliceridi (**16**, 4.15 ppm).

La normalizzazione degli integrali è stata calcolata in accordo con le seguenti equazioni:

$$nI_x = (I_x/(I_2 + I_3)) * 10 \text{ if} X = CH_3$$
$$nI_x = (I_x/(I_2 + I_3)) * 15 \text{ if} X = CH_2$$
$$nI_x = (I_x/(I_2 + I_3)) * 30 \text{ if} X = CH$$

dove nI_x è l'integrale normalizzato del segnale X, I_x è l'integrale del segnale X, $I_2 + I_3$ è la somma degli integrali dei segnali di tutti gli acidi grassi CH_3.

La normalizzazione degli integrali è stata usata per il calcolo di integrali normalizzati di altri metaboliti o classi di metaboliti:

$$I_{DHA} = nI_9 / (2nI_8 + nI_9)$$
$$I_{EPA} = nI_6 / (nI_8 + nI_9 /2)$$
$$I_{PUFA} = nI_3 / (nI_2 + nI_3)$$
$$I_{UFA} = (nI_7 + nI_9) / (2nI_8 + nI_9)$$
$$I_{STA} = 1 - I_{UFA}$$
$$I_{DUFA} = nI_{10} / (nI_8 + nI_9 /2)$$
$$I_{MUFA} = I_{UFA} - I_{PUFA} - I_{DUFA}$$
$$I_{PE} = I_{(PC+PE)} – I_{PC}$$

DHA = acido docosaesaenoico
EPA = acido eicosapentaenoico
PUFA = acidi grassi polinsaturi
UFA = acidi grassi insaturi
STA = acidi grassi saturi
DUFA = acidi grassi dinsaturi
MUFA = acidi grassi monoinsaturi
PE = fosfatidiletanolammina

4.3 Analisi Statistica

La variabilità metabolica è stata eseguita mediante un'appropriata analisi multivariata, comprendente: l'analisi della varianza (ANOVA) e l'analisi delle componenti principali (PCA).

L' analisi della varianza (ANOVA) permette di selezionare i segnali ^{1}H NMR con il più alto potere discriminante in accordo con gli indici *p*-level e *F* values. (*cifr. Capitolo 3*).

L'analisi della componenti principali (PCA) ha lo scopo di ridurre la matrice dei dati originali in una matrice più piccola che comunque mantiene le stesse informazioni. E' stata applicata, senza alcuna ipotesi a priori, alle intensità per evidenziare i raggruppamenti naturali dei campioni

Le variabili dell' estratto acquoso (n°19) e dell' estratto organico (n°10) sono state sottoposte ad analisi statistica dopo esserne stata calcolata la media e essere state divise per la loro deviazione standard (autoscaling).

L'elaborazione statistica dei dati NMR è stata effettuata utilizzando il programma di "StatSoft" (version 5.1, 1997).

4.4 *Risultati e Discussione*

4.4.1 *Analisi Chimico-fisiche*

I campioni di spigola presentavano, a tempo 0, un valore di pH pari a 6.61 e un valore di attività dell'acqua pari 0.985. Tali risultati sono espressi come media di tre determinazioni.

4.4.2 *Analisi Microbiologiche*

I campioni di muscolo di spigola presi in esame hanno mostrato cariche microbiche del tutto irrilevanti. Il quadro appare pressoché differente per quanto concerne i campioni di pelle; in particolare su tali campioni, come riportato in Tabella *4.2*, è stata riscontrata la presenza, talvolta importante, di differenti gruppi microbici.

Tabella 4.2. Presenza di microrganismi (log UFC/g) in campioni di pelle di spigola. I risultati sono espressi come media (± deviazione standard) di tre determinazioni.

gruppi microbici	**Log UFC/g**	**gruppi microbici**	**Log UFC/g**
Batteri lattici	1.4 (± 0.06)	Coliformi totali	1.0 (± 0.05)
Pseudomonas spp	1.5 (± 0.02)	Coliformi fecali	1.0 (± 0.04)
Mesofili totali	3.5 (± 0.1)	Enterococchi	2.6 (± 0.05)
Mesofili psicrotrofici	3.3 (± 0.2)	*Brochothrix thermosphacta*	1.0 (± 0.04)
Enterobacteriaceae	3.1 (± 0.15)	Produttori di H_2S	3.0 (± 0.06)
Stafilococchi C.P.	<1	Lieviti e muffe	2.0 (± 0.05)

4.4.3 Assegnazione degli spettri ^{1}H NMR e ^{13}C NMR

Le assegnazioni degli spettri sono state effettate tramite esperimenti 2D NMR (^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{1}H TOCSY, ^{1}H-^{13}C HSQC, ^{1}H-^{13}C HMBC) seguendo le condizioni sperimentali riportate in Mannina *et al.*, 2008 [14].

La caratterizzazione metabolica dell' estratto acquoso e organico dei campioni di spigola è riportata separatamente.

4.4.3.1 Analisi NMR dell'estratto acquoso

I metaboliti solubili in acqua sono importanti nutrienti responsabili del caratteristico sapore del pesce. I principali componenti degli estratti acquosi della spigola sono carboidrati, acidi organici, amminoacidi, insieme ad altri osmoliti e derivati di nucleosidi. In *Figura 4.1* è riportato lo spettro ^{1}H NMR dell'estratto acquoso di spigola che mostra molti segnali dovuti a diversi composti.

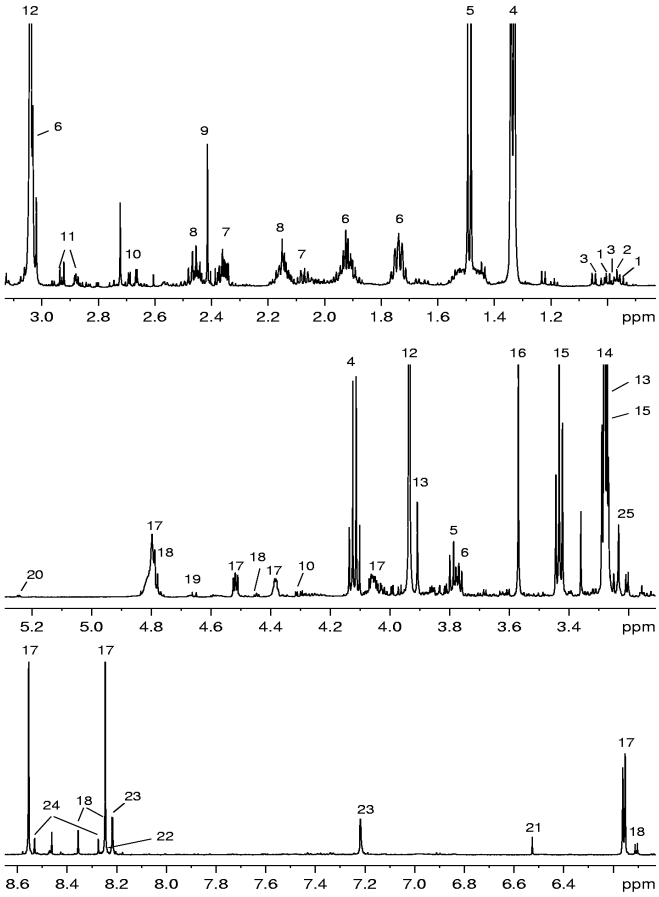

Figura 4.1: Spettro ^{1}H NMR di estratto acquoso di campioni di spigola. **1** isoleucina; **2** leucina; **3** valina; **4** acido lattico; **5** alanina; **6** lisina; **7** acido glutammico; **8** glutammina; **9** acido succinico; **10** acido malico; **11** asparagina; **12** Creatina/fosfocreatina; **13** glicina/betaina; **14** ossido di trimetilammina; **15** taurina; **16** glicina; **17** inosina 5'-fosfato; **18** inosina; **19** β-glucosio; **20** α-glucosio; **21** acido fumarico; **22** ipoxantina; **23** anserina/carnosina; **24** ATP/ADP; **25** colina.

Per poter effettuare l'assegnazione dello spettro sono stati effettuati esperimenti bidimensionali e l'esperimento di diffusione (DOSY) [18]. La spettroscopia di diffusione DOSY è particolarmente utile in caso di miscele contenenti composti a diverso peso molecolare e quindi con diverso coefficiente di auto-diffusione.

Il DOSY infatti permette di visualizzare le informazioni sul coefficiente di diffusione come uno spettro 2D con lo spettro ^{1}H in una dimensione e il coefficiente di auto diffusione nell'altra. Le misure DOSY si sono rilevate molto utili per l'analisi di miscele [19], per lo studio di interazioni molecolari [20, 21], per la caratterizzazione di aggregati [22], per ottenere una valutazione del peso molecolare di polisaccaridi non carichi [23].

La *Figura 4.2* mostra la mappa 2D DOSY di uno estratto acquoso di un campione di spigola in soluzione acquosa, D_2O e tampone fosfato, registrato a 300 K.

Come ci si poteva aspettare, sono presenti molti segnali con differente coefficiente di diffusione e quindi di diverso peso molecolare dovuti a metaboliti diversi. Da'altra parte, invece, tutti i segnali di una data molecola presentano lo stesso coefficiente di diffusione, come mostrato in *Figura 4.2* per il caso dell' IMP.

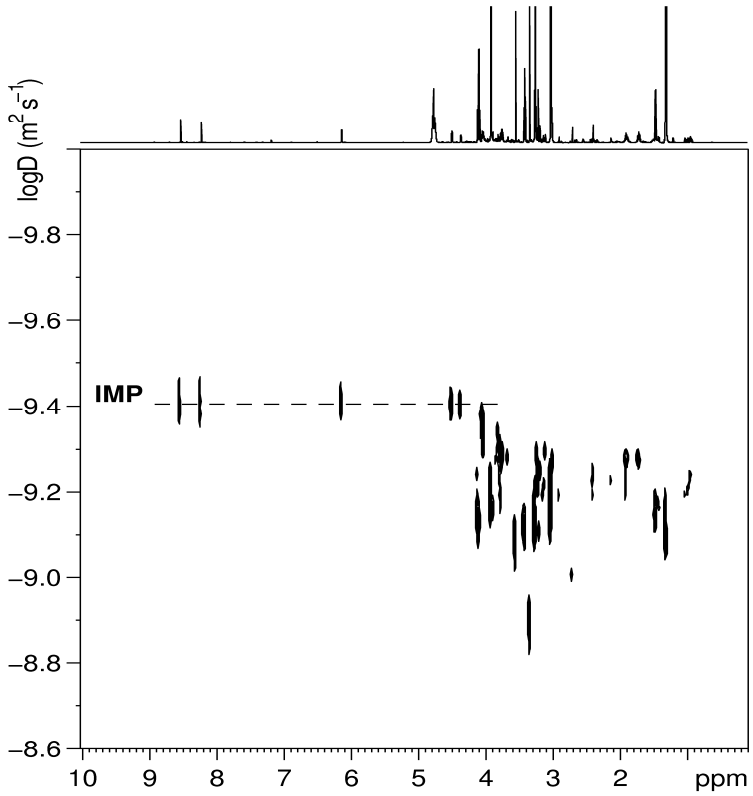

Figura 4.2: Mappa 2D DOSY dell' estratto acquoso di un campione di spigola in D_2O e tampone fosfato registrato a 300 K. Lo spettro ^{1}H NMR dell'estratto acquoso è riportato come proiezione orizzontale. Tutti i segnali di una data molecola mostrano lo stesso coefficiente di diffusione come nel caso dell'IMP, indicato in figura

L'assegnazione completa dello spettro ^{1}H, riportata in *Figura 4.1* e riassunta in *Tabella 4.3*, è discussa di seguito per classi di composti.

☙ *Carboidrati*

Nell'estratto acquoso è stata rilevata una bassa concentrazione di glucosio, identificato con esperimenti bidimensionali e per mezzo dei caratteristici doppietti dei protoni, legati al carboni anomerici, a 4.66 ppm (forma β) e a 5.24 ppm (forma α).

☙ *Amminoacidi liberi e dipeptidi*

L'elevato contenuto di proteine nel pesce [24] contribuisce in maniera determinante al valore nutrizionale di tale prodotto. Le analisi effettuate hanno permesso l'individuazione di amminoacidi liberi e dipeptidi. In particolare, sono stati identificati e assegnati i seguenti otto amminoacidi grazie ad esperimenti 2D e ai dati presenti in letteratura: valina, leucina, lisina, alanina, isoleucina, acido glutammico, glutammina e glicina.

La creatina e/o fosfocreatina (PCR), importante risorsa energetica, è stata identificata per mezzo dei caratteristici singoletti a 3.04 e 3.94 ppm. La presenza di taurina, molecola implicata nel metabolismo degli amminoacidi [25, 26] è indicata invece dalle risonanze a 3.28 e 3.43 ppm.

I segnali caratteristici dello spettro ^{1}H a 7.22 e 8.22 ppm possono essere ascritti a N(α)-(β-alanina)-L-1-metilistidina (anserina ANS) oppure all' N(α)-(β-alanina)-L-1-istidina (carnosina), dipeptidi che differiscono per la presenza di un gruppo N-Me nell'anello dell'imidazolo dell'istidina. Il chemical shift riportato in letteratura per l'anserina è di 3.75 ppm [27]. Nel caso specifico della spigola è stato impossibile stabilire se il segnale a 3.75 ppm era presente, a causa della forte sovrapposizione di segnali tra 3 e 4 ppm.

☙ *Acidi Organici*

L'acido malico, l'acido fumarico, l'acido succinico e l'acido lattico sono stati identificati nello spettro ^{1}H.

☙ *Derivati di nucleosidi e osmoliti*

L'ossido di trimetilamina (TMAO) gioca un ruolo fondamentale ai fini della regolazione osmotica dei fluidi corporei [28]. Tale composto è stato identificato nello spettro ^{1}H grazie al caratteristico singoletto a 3.28 ppm del metile. L'ossido di trimetilamina è un composto utile per la valutazione dello stato di freschezza dei prodotti ittici: infatti, durante il periodo di conservazione, tale composto, si degrada in trimetilammina (TMA), un composto volatile responsabile dello sgradevole odore di pesce.

Lo spettro ^{1}H mostra anche la presenza di glicina-betaina (GB), importante osmoprotettore

L'analisi NMR ha permesso l'identificazione dell'ipoxantina (HYP) rappresentata dai singoletti a 8.21 e 8.23 ppm, dell'inosina (INO) a 8.36 e 8.25 ppm.

Tali derivati purinici vengono formati per degradazione dell'adenosin-trifosfato (ATP) secondo la sequenza:

ATP → adenosin-difosfato (ADP) → adenosin 5'-fosfato (AMP) → IMP →
inosina (INO) → ipoxantina (HYP) → xantina → acido urico

Questi metaboliti nei prodotti ittici sono stati è utilizzata per verificare la freschezza del pesce [29] e sono stati misurati con la spettroscopia NMR in campioni di spigole confezionati in atmosfera modificata o irradiati con raggi γ [30].

Tabella 4.3. Metaboliti identificati nello spettro ^{1}H NMR a 600 MHz dell'estratto acquoso di campioni di spigola d'allevamento e pescato marino. Sono riportate le abbreviazioni e il numero di identificazione dei metaboliti nello spettro. I segnali sottoposti ad analisi statistica sono indicati con un asterisco

Composto		**Assegnazione**	**^{1}H (ppm)**	**Multiplicità: *J* (Hz)**	**^{13}C (ppm)**
Carboidrati					
β-Glucosio (β-GLC)	**19**	CH-1	4.66	d: 8.0	96.5
		CH-2	3.26		74.7
		CH-3	3.51		76.3
		CH-4	3.42		70.5
		CH-5	3.48		76.4
		CH_2-6,6'	3.73, 3.89		61.3
α-Glucosio (α-GLC)	**20**	CH-1	5.24*	d: 3.8	92.7
		CH-2	3.54		71.9
		CH-3	3.72		
		CH-4	3.41		70.2
		CH-5	3.84		72.2
		CH_2-6,6'	3.77, 3.84		61.1
Acidi organici					
Acido Malico (MA)	**10**	α-CH	4.31*	dd: 10.0; 3.1	70.9
		β,β'-CH_2	2.38 2.68	dd: 15.4; 10.0 dd: 15.4; 3.1	43.2
Acido Fumarico (FA)	**21**	α,β-CH=CH	6.53*	s	
Acido Succinico (SA)	**9**	α,β-CH_2	2.41*	s	34.6
		1,4-COOH			181.8
Acido Lattico (LA)	**4**	α-CH	4.12	q: 6.9	20.7
		β-CH_3	1.33*	d: 6.9	69.1
		COOH			183.1
Aminoacidi e Dipeptidi					
Valina (VAL)	**3**	α-CH	3.61		61.0
		β-CH	2.28	m	20.7
		γ-CH_3	1.00	d: 7.0	17.3
		γ'-CH_3	1.05*	d: 7.0	18.5
		COOH			175.0
Leucina (LEU)	**2**	α-CH	3.73		54.1
		β-CH_2	1.72	m	40.2
		γ-CH	1.73	m	24.5
		δ-CH_3	0.97	d: 6.2	22.6
		δ'-CH_3	0.96	d: 6.1	21.6
Lisina (LYS)	**6**	α-CH	3.77	m	55.0
		β-CH_2	1.92	m	30.4
		γ-CH_2	1.49	m	21.9
		δ-CH_2	1.74*	m	26.9
		ε-CH_2	3.03	t: 7.6	39.6
		COOH			175.4
Alanina (ALA)	**5**	α-CH	3.79		51.2
		β-CH_3	1.49*	d: 7.3	16.8

	COOH			176.4
Asparagina (ASN) **11**	α-CH β,β'-CH_2	4.01 2.86* 2.95	 dd: 17.0; 7.6 dd: 17.0; 4.3	
Isoleucina (ILE) **1**	α-CH β-CH γ-CH_3 γ-CH_2 δ-CH_3 COOH	3.68 1.98 1.02* 1.26, 1.47 0.94	 d: 7.1 t: 7.5	60.2 36.4 15.3 25.2 10.2
Glutammato (GLU) **7**	α-CH β, β'-CH_2 γ-CH_2 δ-CO COOH	3.77 2.07*, 2.14 2.36	m m m	55.1 27.6 34.1 181.8 175.1
Glutammina (GLN) **8**	α-CH β, β'-CH_2 γ-CH_2 δ-CO(NH_2) COOH	3.77 2.15 2.46*	 m m	55.1 26.8 31.5 178.3 174.6
Glicina (GLY) **16**	α-CH_2 COOH	3.57*	s	42.1 173.0
Creatina/Fosfocreatina (CR)/(PCR) **12**	N–CH_2 N–CH_3 N=C	3.95 3.04*	s s	54.4 37.6
N(α)-(β-alanil)-L-1-metilistidina (ANS) or N(α)-(β-alanil)-L-1-istidina **23**	α-CH_2 (β-Ala) β-CH_2 (β-Ala) α-CH (Ist) β-CH_2 (Ist) 4-CH (Ist) 2-CH (Ist)	 4.51 3.07; 3.26 7.22* 8.22	 d: 1.1	 53.6 120.2 136.1
Osmoliti e derivati di nucleosidi				
TMAO **14**	N-CH_3	3.28*	s	60.1
Glicina-betaina (GB) **13**	N-CH_3 α-CH_2 COOH	3.27 3.91*	s s	54.0 66.7 170.0
Taurina (TAU) **15**	S-CH_2 N-CH_2	3.28 3.43*	t: 6.7 t: 6.7	48.0 35.9
Inosina 5'-fosfato (IMP) **17**	CH-1' ribosio CH-2' ribosio CH-3' ribosio CH-4' ribosio CH-5' ribosio CH-2, ring	6.16 4.80 4.52 4.38 4.05 8.55	d: 5.7 m dd: 3.8;5.0 m m s	88.0 75.2 71.2 85.3 64.3 140.6

	C4, ring			149.6
	C5, ring			124.3
	CH-8, ring	8.25	s	
Inosina (INO) **18**	CH-1' ribosio	6.11	d: 5.7	88.9
	CH-2' ribosio	4.77	m	74.8
	CH-3' ribosio	4.45	dd: 4.0; 5.1	70.9
	CH-4' ribosio	4.28	m	86.2
	CH-5' ribosio	3.87	m	71.8
	CH_2, ring	8.36	s	140.9
	C4, ring			149.0
	C5, ring			125.1
	C6, ring			159.1
	CH-8, ring	8.25	s	146.8
Ipoxantina (HYP) **22**	CH-8	8.21	s	146.2
	CH-2	8.23	s	
Adenosina trifosfato (ATP) /Adenosina difosfato (ADP) **24**	CH-8	8.27	s	
	CH-2	8.53	s	
Colina (CHN) **25**	N-CH_3	3.22*	s	54.7

4.4.3.2 Analisi NMR dell' estratto organico

Lo spettro ^{1}H NMR di un tipico estratto di spigola in cloroformio è mostrato nella *Figura 4.3*.

L'assegnazione degli spettri ^{1}H in cloroformio della spigola è stata effettuata tramite esperimenti bidimensionali standard, quali TOCSY, ^{1}H-^{13}C HSQC, HMBC, e in base a dati presenti in letteratura [30-32]. L'assegnazione dello spettro protonico, riportata in *Figura 4.3* e in *Tabella 4.5* è discussa per classi di composti.

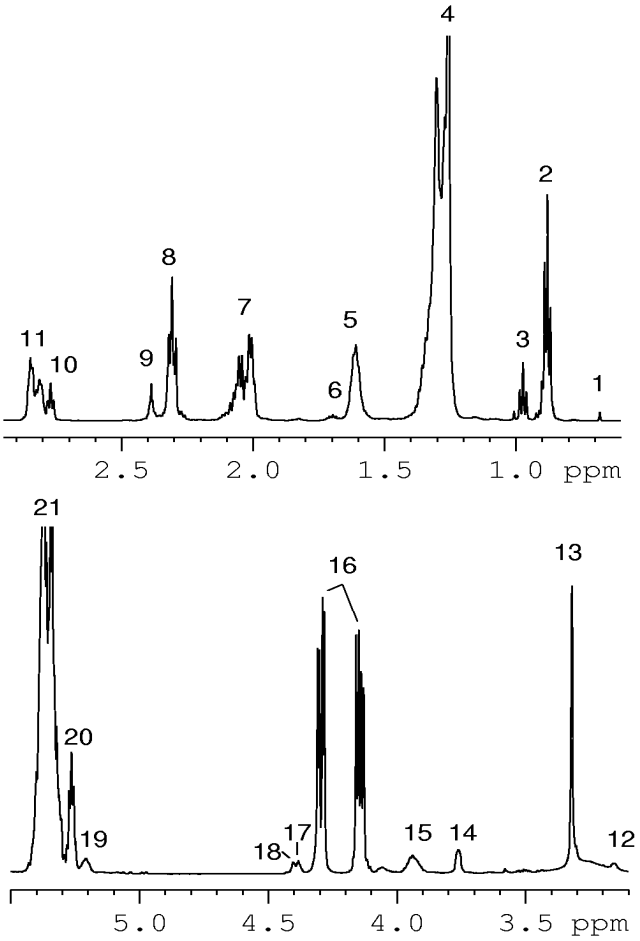

Figura 4.3: Spettro ^{1}H NMR di estratto organico di campioni di spigola d'allevamento e pescato marino: **1** CH_3-18 colesterolo; **2** CH_3 acidi grassi monoinsaturi, diinsaturi e saturi; **3** CH_3 acidi grassi polinsaturi n-3; **4** CH_2 acidi grassi; **5** CH_2-3 acidi grassi eccetto DHA e EPA; **6** CH_2-3 EPA; **7** protoni allilici acidi grassi eccetto DHA; **8** CH_2-2 acidi grassi eccetto DHA; **9** CH_2-2 e 3 DHA; **10** CH_2 diallilici acido linoleico; **11** CH_2 acidi grassi poliinsaturi n-3; **12** CH_2N fosfatidiletanolammina (PE); **13** $(CH_3)_3N$ fosfatidilcolina (PC); **14** CH_2N fosfatidilcolina (PC); **15** CH_2 digliceridi di PE, PC sn3; **16** CH_2 triacilglicerolo sn1,3; **17** CH_2 diacilglicerolo PE, PC sn1; **18** CH_2OP di PC; **19** CH diacilglicerolo PE, PC; **20** CH_2 triaciacilglicerolo sn2; **21** CH=CH acidi grassi; **22** NH_2 di PE.

☙ *Triacilgliceroli e diacilglicerofosfolipidi*

I trigliceridi (TG) sono i principali componenti della frazione lipidica come indicato dall' intensità dei segnali a 4.15 e 4.30 ppm della struttura del glicerolo.

Nell'estratto organico, sono presenti differenti diacilglicerofosfolipidi. In particolare la fosfatidilcolina (PC) è stata identificata grazie al singoletto a 3.32 ppm del gruppo $N^+(CH_3)_3$ mentre la fosfatidiletanolammina (PE) grazie al segnale a 3.16 ppm caratteristico del gruppo NCH_2 [17].

La determinazione quantitativa di TG, PE e PC è stata ottenuta dall'integrazione dei corrispondenti segnali (4.30 ppm, TG; 8.45 ppm, PE; 3.30 ppm, PC). Il contenuto di TG rispetto alla somma di PC, PE e TG è nel range 73% -95%.

Il rapporto calcolato PC/PE è 2.5-6.

☙ *Acidi grassi*

Lo spettro ^1H dell'estratto acquoso mostra la presenza di diversi acidi grassi assegnati grazie a esperimenti 2D e a dati di letteratura [17]. La composizione in acidi grassi dei prodotti ittici dipende da diversi fattori come la specie, la dieta, la stagione, il tessuto preso in esame. Gli estratti organici contengono elevate quantità di acidi grassi polinsaturi (PUFA) costituenti fondamentali per una corretta alimentazione e importanti per la prevenzione di numerose patologie [4, 5, 33].

E' stato riportato in letteratura che la spettroscopia al ^{13}C può dare importanti informazioni non solo sulla composizione in acidi grassi ma anche sulla distribuzione delle catene grasse sul glicerolo che usualmente viene determinata utilizzando metodi enzimatici laboriosi e inaccurati. In particolare le risonanze ^{13}C dei gruppi carbossilici delle catene grasse sono di solito ben risolte e possono essere utilizzate per analisi qualitative e quantitative degli acidi grassi e della loro distribuzione sulle posizione *sn* 1,3 e *sn* 2 del glicerolo [32, 34, 35].

Le risonanze dei carboni carbossilici degli acidi grassi esterificati nelle posizioni *sn* 1,3 sono "shiftate" a campi bassi (circa 0.4 ppm) rispetto alla corrispondenti risonanze degli acidi grassi esterificati in posizione *sn* 2, (*Figura 4.4*). Sono stati identificati nello spettro ^{13}C le catene grasse degli gli acidi saturi, cis-11-monoinsaturi, cis-9- monoinsaturi, diinsaturi, e poliinsaturi, i segnali NMR ^{13}C dovuti al gruppo carbossilico dell'acido eicosapentenoico (EPA) e dell'acido docosaesenoico (DHA) e la loro distribuzione sulle posizione *sn* 1,3 e *sn* 2 del glicerolo e il rapporto *sn* 1,3/*sn* 2 sono riportate in *Tabella 4.4.*

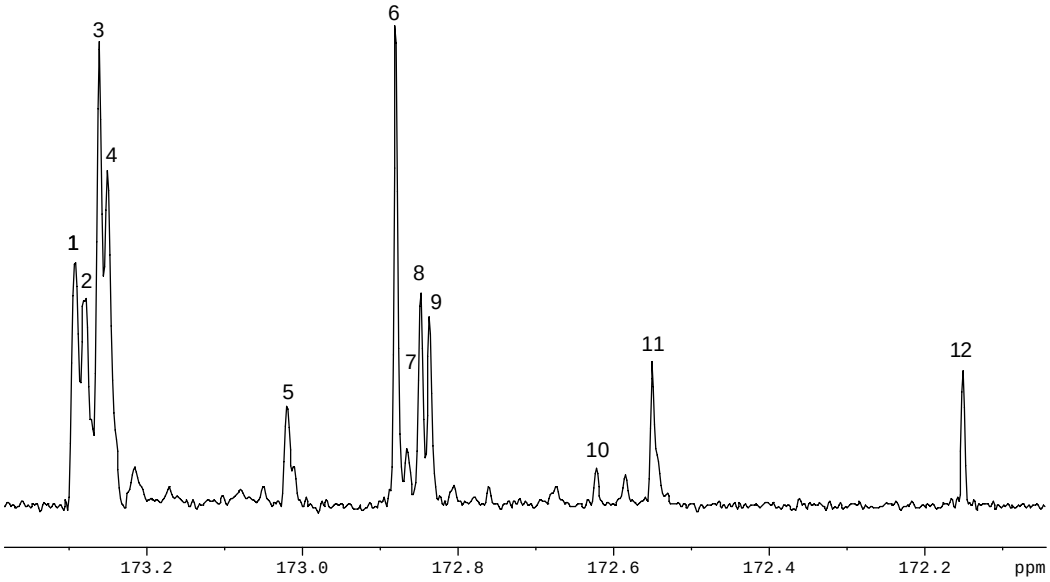

Figura 4.4. Spettro NMR ^{13}C dell'estratto di spigola in $CDCl_3$ (regione spettrale dei carbossili). Assegnazione dei picchi indicati: **1**, *sn* 1,3-acidi grassi saturi; **2**, *sn* 1,3 -18:1 Δ^{11} e *sn* 1,3 -20:1 Δ^{11}; **3**, *sn* 1,3 -18:1Δ^{9} and *sn* 1,3 -16:1Δ^{9}; **4**, *sn* 1,3 -18:2$\Delta^{9,12}$ (acido linoleico); **5**, *sn* 1,3 -20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$ (EPA); **6**, *sn* 2-acidi grassi saturi; **7**, *sn* 2-18:1Δ^{11} e *sn* 2 -20:1Δ^{11}; **8**, *sn* 2 -18:1Δ^{9} e *sn* 2 -16:1 Δ^{9}; **9**, *sn* 2-18:2 $\Delta^{9,12}$; **10**, *sn* 2 -20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$ (EPA); **11**, *sn* 1,3 -22:6$\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ (DHA);**12**, *sn* 2 -22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ (DHA).

Tabella 4.4. Composizione e distribuzione delle catene grasse nelle posizione *sn*1,3 e *sn*2 della frazione lipidica nella spigola ottenute dallo spettro ^{13}C di estratti organici di spigola.

Acidi grassi	**Contenuto in %**		**Rapporto *sn*1,3/*sn*2**
	***sn*1,3**	***sn*2**	
Saturi (STA)	9.3	13.3	0.7
cis-11-monoinsaturi	12.9	2.8	4.5
cis-9-monoinsaturi	18.3	5.8	3.1
Diinsaturi (DUFA)	12.8	5.7	2.2
EPA	4.8	1.4	3.4
DHA	6.3	3.6	1.7
Acido linolenico	3.0	n.d.	n.d.

L'analisi della distribuzione posizionale delle catene grasse nei trigliceridi è importante da un punto di vista nutrizionale: infatti quando il pesce è assunto da animali e da uomini, i processi digestivi portano alla trasformazione dei triacilgliceroli in 2-monoacil-*sn*-gliceroli che vengono assorbiti e utilizzati dall'organismo tal quale [36]. Specie diverse di pesce possono avere una distribuzione diversa delle catene grasse. I nostri risultati mostrano che la distribuzione della catene grasse della spigola è notevolmente diversa da quella riportata per il tonno Atlantico e il salmone Atlantico [37, 38]. In particolare, gli acidi grassi saturi (STA) sono esterificati principalmente in posizione *sn*2, mentre per il tonno Atlantico e il salmone Atlantico è riportata una distribuzione casuale delle catene; gli acidi grassi diinsaturi (DUFA), EPA e DHA sono distribuiti principalmente in posizione *sn*1,3 mentre nel tonno Atlantico e nel salmone Atlantico è riportata una distribuzione preferenziale nella posizione *sn* 2.

Anche gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) sono distribuiti preferenzialmente nelle posizioni *sn*1,3 in accordo con la distribuzione ottenuta nel tonno Atlantico e nel il salmone Atlantico.

Steroli

È possibile ottenere informazioni sulla composizione degli steroli, prendendo in considerazione la risonanza ^{1}H del CH_3-18 nella regione spettrale di 0.6 – 0.7 ppm[39]. Nel caso in esame, lo spettro ^{1}H mostra la risonanza caratteristica del CH_3-18 del colesterolo a 0.68 ppm (*Figura 4.3*); l'assegnazione, verificata da spettri 2D è riportata in *Tabella 4.5*.

Tabella 4.5. Assegnazione dei metaboliti identificati nello spettro ^{1}H NMR a 600 MHz dell'estratto organico di campioni di spigola d'allevamento e pescato marino a 27 °C. I segnali utilizzati per la misura degli integrali sono contrassegnati con il numero corrispondente come riportato nella sezione "Misure del contenuto di metaboliti in estratti organici" pag 51.

Composto	**Assegnazione**		**^{1}H (ppm)**	**Multilicità: *J* (Hz)**	**^{13}C (ppm)[a]**
Steroli					
Colesterolo (CHO)	CH_2-1		1.86; 1.10		37.30
	CH_2-2		1.85; 1.52		31.69
	CH-3		3.52		71.79
	CH_2-4		2.31; 2.26		42.35
	C-5				140.82
	C-6		5.36		121.70
	CH_2-7		2.00		31.94
	CH-8				
	CH-9		0.95		50.19
	C-10				36.54
	CH_2-11		1.51		21.12
	CH_2-12		2.02; 1.97		39.83
	C-13				
	CH-14		1.01		56.81
	CH_2-15				24.32
	CH_2-16				28.25
	CH-17		1.11		56.20
	CH_3-18	**1**	0.68	s	11.88
	CH_3-19		1.01		19.41
	CH-20				35.81
	CH_3-21		0.92		18.74
	CH_2-22				36.22
	CH_2-23				23.86
	CH_2-24				39.55
	CH-25		1.53		28.03
	CH_3-26		0.88		22.83; 22.60
Lipidi: trigliceridi					
Triacilglicerolo (TG)	CH *sn*2	**20**	5.26	m	69.0
			4.30	dd: 11.9; 4.2	
	CH_2 *sn*1,3	**16**	4.15	dd: 11.9; 6.0	62.1
Lipidi: diacilglicerofosfolipidi					
Fosfatidilcolina (PC)	CH *sn*2	**19**	5.21		70.4
	CH_2 *sn*1	**17**	4.38; 4.13		62.9
	CH_2 *sn*3	**15**	3.94		63.7
	CH_2OP	**18**	4.40		59.5
	CH_2N	**14**	3.76		66.3
	$N(CH_3)_3$		3.32	s	54.5
Fosfatidiletanolammina (PE)	CH *sn*2	**19**	5.21		70.4
	CH_2 *sn*1	**17**	4.38; 4.13		62.9
	CH_2 *sn*3	**15**	3.94		63.9

	CH_2OP		4.11		62.9
	CH_2N		3.16		40.6
	NH_2	**22**	8.55		
Lipidi:catene di acidi grassi					
Acidi grassi saturi (STA)	COO (*sn* 1,3)				173.29
	COO (*sn* 2)				172.88
	CH_2-2 (*sn* 1,3)	**8**	2.31	t: 7.8	34.06
	CH_2-2 (*sn* 2)	**8**	2.31	t: 7.8	34.23
	CH_2-3		1.61	m	24.8
	CH_2		1.28-1.30	m	28.9-29.7
	CH_2-n3		1.26	m	31.9
	CH_2-n2		1.30	m	22.7
	CH_3-n1	**2**	0.88	t: 7.2	14.12
cis Monoinsaturi C18:1 Δ^{11}, C20:1 Δ^{11} (MUFA)	COO (*sn* 1,3)				173.28
	COO (*sn* 2)				172.87
	CH_2-2 (*sn* 1,3)	**8**	2.31		34.06
	CH_2-2 (*sn* 2)	**8**	2.31		34.23
	CH_2-3		1.61		24.8
	CH_2-4 - 9		1.33	m	29.7-30.2
	CH_2-10		2.01	m	27.2
	CH_2- 11,12	**21**	5.35		129.7
	CH_2-13		2.01	m	27.2
	CH_2 14 –15 (14-17)[b]		1.30	m	29.7-30.2
	CH_2-16 (18)[b]		1.26	m	31.9
	CH_2-17 (19)[b]		1.30	m	22.7
	CH_3-18 (20)[b]	**2**	0.88	t: 7.2	14.12
cis Monoinsaturi C16:1 Δ^9, C18:1 Δ^9 (MUFA)	COO (*sn* 1,3)				173.26
	COO (*sn* 2)				172.85
	CH_2-2 (*sn* 1,3)	**8**	2.31		34.06
	CH_2-2 (*sn* 2)	**8**	2.31		34.23
	CH_2-3		1.61		24.8
	CH_2-4 - 7		1.33	m	29.7-30.2
	CH_2-8		2.01	m	27.2
	CH_2- 9,10	**21**	5.35		129.7
	CH_2-11		2.01	m	27.2
	CH_2 12 –15 (12-13)[c]		1.30	m	29.7-30.2
	CH_2-16 (14)[c]		1.26	m	31.9
	CH_2-17 (15)[c]		1.30	m	22.7
	CH_3-18 (16)[c]	**2**	0.88	t: 7.2	14.12
Acido linoleico C18:2 $\Delta^{9,12}$ (DUFA)	COO (*sn* 1,3)				173.25
	COO (*sn* 2)				172.84
	CH_2-2	**8**	2.31		34.1-34.2
	CH_2-3		1.61		24.8
	CH_2-4-7		1.29-1.31		29.0-29.8
	CH_2-8,14		2.01-2.05	q: 7.0	27.2
	CH-9,13	**21**	5.35	m	130.2
	CH-10,12	**21**	5.35	m	127.8

	CH_2-11	**10**	2.77	t: 6.7	25.6
	CH_2-15		1.30	m	29.6
	CH_2-16		1.30	m	31.9
	CH_2-17		1.31	m	22.7
	CH_3-18	**2**	0.88	t: 7.2	14.08
Acido linolenico C18:3 $\Delta^{9,12,15}$	COO (*sn*1,3)				173.24
	CH_2-2	**8**	2.31		34.1-34.2
	CH_2-3		1.61		24.8
	CH_2-4-7		1.29-1.31		29.0-29.8
	CH_2-8		2.05		27.2
	CH-9	**21**	5.35		130.27
	CH-10	**21**	5.35		127.8
	CH-13,12	**21**	5.35		128.2
	CH_2-11,14		2.81	t: 6.0	25.6
	CH-15		5.32		127.14
	CH-16		5.39		131.97
	CH_2-17		2.08		20.57
	CH_3-18	**3**	0.97	t: 7.5	14.29
Acido docosaesaenoico C22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ (DHA)	COO (*sn* 2)				172.15
	COO (*sn* 1,3)				172.55
	CH_2-2 (*sn* 2)		2.38		34.05
	CH_2-2 (*sn* 1,3)	**9**	2.38		33.90
	CH_2-3	**9**	2.38		22.6
	CH-4 (*sn* 2)	**21**	5.35		129.48
	CH-4 (*sn* 1,3)	**21**	5.35		129.50
	CH-5 (*sn* 2)	**21**	5.35		127.66
	CH-5 (*sn* 1,3)	**21**	5.35		127.68
	CH_2-6,9,12,15,18		2.85-2.81		25.6-25.4
	CH-19		5.31		127.04
	CH-20		5.31		132.04
	CH_2-21	**7**	2.08		20.58
	CH_3-22		0.97	t: 7.5	14.28
Acido eicosapentaenoico C20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$ (EPA)	COO (*sn* 2)				172.62
	COO (*sn* 1,3)				173.02
	CH_2-2 (*sn* 2)	**8**	2.31		33.61
	CH_2-2 (*sn* 1,3)				33.42
	CH_2-3	**6**	1.70		24.80
	CH_2-4 (*sn* 2)		2.11		26.51
	CH_2-4 (*sn* 1,3)				26.53
	CH-5	**21**	5.35		128.99
	CH-6	**21**	5.35		128.81
	CH_2-7,10,13,16		2.85-2.81		25.6-25.4
	CH-17		5.31		127.04
	CH-18		5.31		132.04
	CH_2-19		2.08		20.58
	CH_3-20		0.97	t: 7.5	14.28
Acido	CH_2-6		2.01		27.06

docosapentaenoico C22:6 $\Delta^{7,10,13,16,19}$ (DPA)				
Acido stearidonico C18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$	CH_2-5	2.01		26.93

[a] I chemical shifts riportati con due cifre decimali sono stati misurati per mezzo di esperimenti monodimensionali, mentre quelli riportati con una cifra significativa sono stati estrapolati da esperimenti bidimensionali.
[b] nel caso di C20:1 ω^{11}
[c] nel caso di C16:1 ω^{9}

4.4.4 Discriminazione tra spigole di allevamento e pescato marino: risultati preliminari

Il profilo metabolico discusso nel paragrafo precedente è stato utilizzato al fine di testare le potenzialità della metodologia NMR nella discriminazione tra spigole di provenienza marina da spigole d'allevamento. Sebbene vengano usualmente riportati studi effettuati sui muscoli, si è scelto di analizzare anche campioni derivanti dalla pelle del pesce. Sono stati quindi analizzati 8 campioni di spigole di allevamento (4 provenienti dal muscolo e quattro dalla pelle) e 6 campioni di spigole di mare aperto (3 provenienti dal muscolo e 3 dalla pelle).

Le intensità misurate di 29 metaboliti, o classi di metaboliti, sono state sottoposte ad analisi statistica; è stata applicata l'analisi delle componenti principali (PCA) (*Figura 4.5*) per vedere eventuali raggruppamenti e l'analisi della varianza (ANOVA) che ha permesso di selezionare i segnali ^{1}H NMR con il più alto potere discriminante in accordo con gli indici *p*-level e *F* values (*Tabella 4.6*).

La *Figura 4.5A* mostra l'analisi delle componenti principali (PCA) applicata ai campioni di spigola; si nota che PC1 e PC2 sono responsabili del 70.33% della variabilità totale e che PC1 è responsabile della separazione di campioni di spigola allevata da campioni di pescato marino, mentre PC2 è responsabile della separazione tra campioni di muscolo e di pelle, soprattutto nel caso dei campioni di spigola allevata.

Il biplot mostrato in *Figura 4.5B*, è stato ottenuto dalla sovrapposizione degli *scores* dei campioni e dei *loadings* delle variabili. Questa rappresentazione consente di vedere in modo rapido in quali campioni i metaboliti sono presenti in concentrazione maggiore.

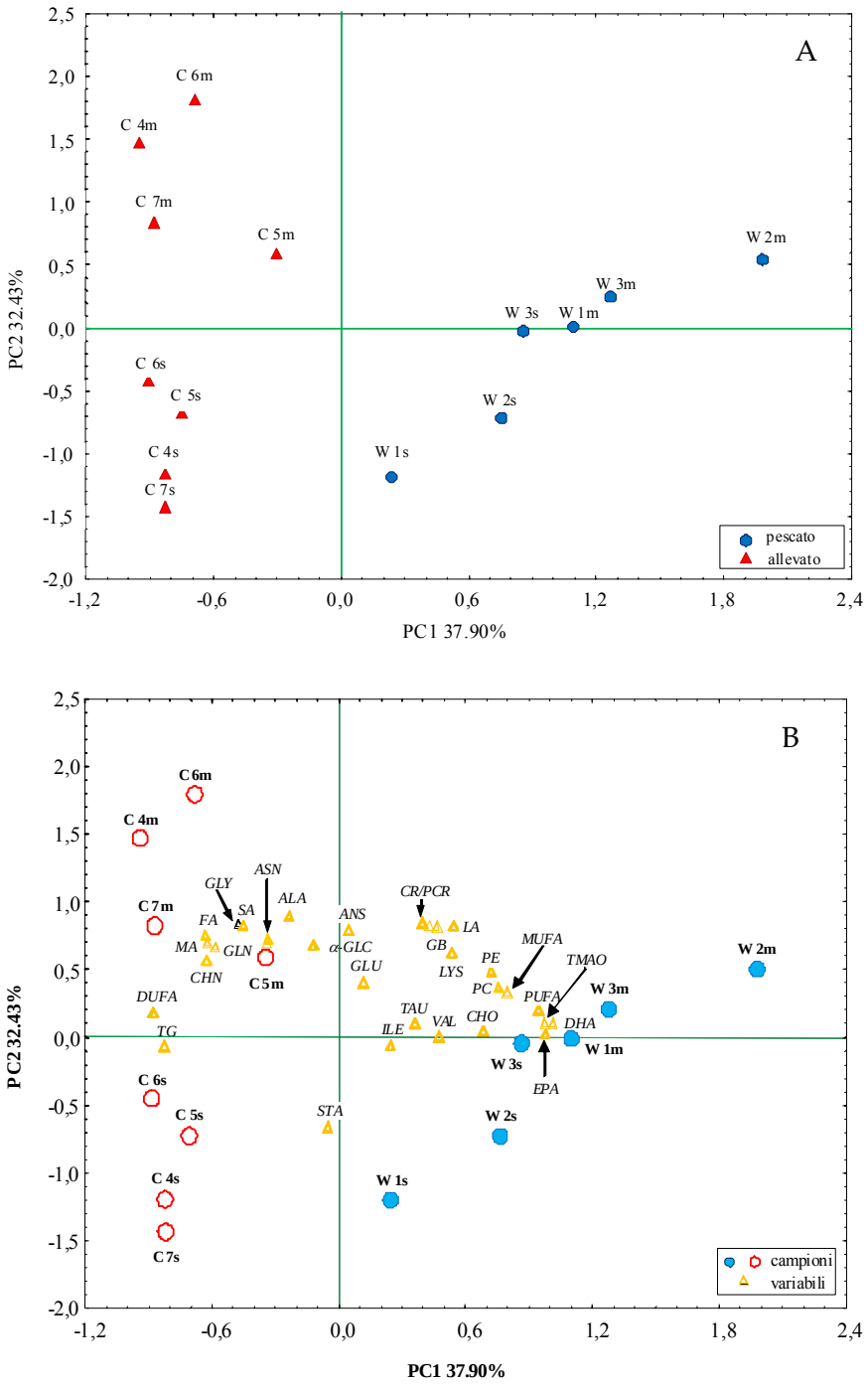

Figura 4.5. (A) PCA applicata a campioni di spigola allevata e a campioni di spigola pescata analizzando il muscolo (m) o la pelle(s). (B) Biplot in cui sono riportati gli *scores* dei campioni e i *loadings* delle variabili.

L'analisi dei *loadings* mostra che gli acidi grassi diinsaturi, trigliceridi, colina, acido malico, acido fumarico e glutammina, posti all'estrema sinistra dell'asse PC1, sono presenti in maggiore concentrazione nei campioni di spigole di allevamento, mentre i *loadings* di DHA, EPA, ossido di trimetilammina, acidi grassi polinsaturi, monoinsaturi, colesterolo, fosfatidiletanolammina e fosfatidilcolina, posti all'estrema destra dell'asse PC1, sono in concentrazione maggiore nei campioni di spigole di mare aperto.

I valori medi di queste variabili maggiormente responsabili della separazione tra spigole di provenienza marina e allevamento ed i rispettivi errori standard, sono in *Figura 4.6*. I risultati mostrano che i campioni di spigola allevata (barre grigie) presentano quantitativi maggiori di acidi grassi diinsaturi, trigliceridi, colina, acido malico, acido fumarico, e glutammina; mentre livelli maggiori di DHA, EPA, ossido di trimetilammina, acidi grassi poliinsaturi, monoinsaturi, colina, fosfatidiletanolammina e fosfatidilcolina sono presenti in spigole di provenienza marina (barre bianche).

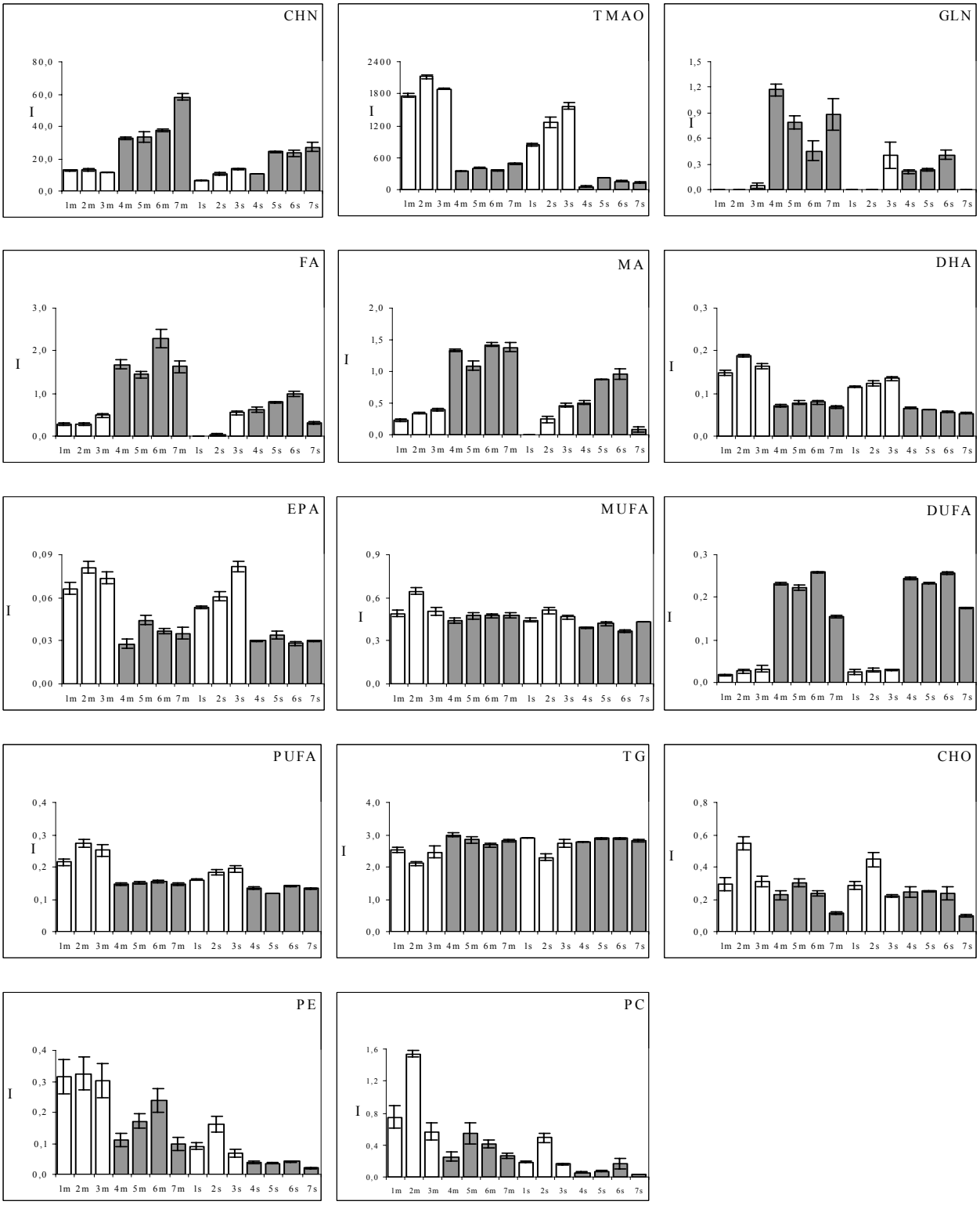

Figura 4.6. Istogrammi relativi al valore medio (ed errore standard) delle intensità misurate dei metaboliti maggiormente responsabili della separazione tra spigole di provenienza marina e allevamento.
barre grigie = allevato; barre bianche = pescato; m = muscolo; s = pelle

Per verificare la significatività delle differenze osservate nel contenuto di questi metaboliti tra spigole di allevamento e di mare aperto, le 29 variabili sono state analizzate con l'ANOVA (*Tabella 4.6*). Questa analisi ha messo in evidenza i metaboliti con un maggiore potere discriminante, avendo un *p-level* inferiore a 0.05: DUFA, TG, CHN, MA, FA, GLN, DHA, EPA TMAO PUFA, MUFA, CHO, PE. Questi risultati confermano le osservazioni suggerite dalla PCA.

Tabella 4.6. ANOVA applicata a 29 metaboliti al fine di discriminare campioni di spigola di allevamento e provenienza marina. Sono evidenziate le variabili con un valore di *p-level* inferiore a 0.05.

	F (fisher)	*p*-level
ANS	0.0006	0.9805
FA	**13.3090**	**0.0033**
α-GLC	0.6148	0.4482
MA	**12.5691**	**0.0040**
GB	0.8664	0.3703
GLY	4.4542	0.0565
TAU	2.2111	0.1628
TMAO	**59.3023**	**5.54E-06**
CHN	**12.7507**	**0.0038**
CR/PCR	0.7020	0.4185
ASN	1.3786	0.2631
GLN	**7.7089**	**0.0168**
SA	4.1880	0.0633
GLU	0.5888	0.4577
LYS	2.2329	0.1609
ALA	1.4561	0.2508
LA	1.9404	0.1889
VAL	3.9345	0.0707
ILE	1.4830	0.2467
CHO	**6.0802**	**0.0297**
PC	4.1521	0.0643
TG	**9.5390**	**0.0094**

DHA	**55.9547**	**7.43E-06**
EPA	**65.6672**	**3.3E-06**
PUFA	**21.1836**	**0.0006**
STA	1.1580	0.3030
DUFA	**157.4345**	**2.94E-08**
MUFA	**5.9335**	**0.0314**
PE	**4.8627**	**0.0477**

I campioni di spigola d'allevamento contengono una quantità circa sei volte maggiore di acidi grassi diinsaturi (DUFA) rispetto al pescato marino. La maggiore quantità di DUFA nelle spigole di allevamento, in accordo con i dati presenti in letteratura [40, 41], è probabilmente dovuta alla differente alimentazione dei due tipi di spigole. I mangimi commerciali, infatti, somministrati negli allevamenti di spigole contengono una elevata quantità di materia prima "terreste" con un contenuto di lipidi di circa il 20% e solo una piccola quantità di prodotto marino; inoltre proprio a causa di questa dieta terrestre, i campioni di spigole di allevamento contengono una minore quantità di DHA, EPA e acidi grassi polinsaturi (PUFA) rispetto ai campioni di spigola di mare aperto [40, 41].

Le spigole di allevamento presentano quantità maggiori, specialmente nel tessuto muscolare, di acido malico, acido fumarico, glutammina e colina. I più alti livelli di acido malico e acido fumarico, metaboliti del ciclo di Krebs, possono essere dovuti a un diverso livello di metabolismo energetico nei pesci di allevamento rispetto a quello di provenienza marina. L'accumulo di glutammina nei pesci di allevamento può essere correlato al più alto livello di acido fumarico e di acido malico poiché l'anabolismo del GLN e del GLU è strettamente correlato all'attività del ciclo di Krebs. Inoltre, il più alto livello di GLN, importante per la crescita muscolare, dà un valore nutrizionale aggiunto ai campioni di allevamento [42].

La quantità di colina presente nei pesci di allevamento, risulta essere di due volte maggiore rispetto al pescato marino. Questo risultato dà ancora valore aggiunto ai campioni di allevamento poiché la colina, implicata in diversi cicli metabolici, è un precursore dell'acetilcolina e un donatore di gruppi metili in molti processi metabolici ed è per questo ritenuta un costituente essenziale nella dieta.

La comparazione tra campioni prelevati dal muscolo e dalla pelle di campioni di allevamento mostra che la composizione in acidi grassi e in TG e CHO non

differisce in maniera significativa. D'altra parte, i campioni di muscolo hanno rispetto a quelli prelevati dalla pelle, un maggior contenuto di fosfolipidi (PC e PE), CHN, MA, FA e GLN e quindi, come atteso, un più alto valore nutritivo.

4.5 Referenze

[1] Sargent J.R., Tacon A.G.J. (1999) Development of farmed fish: A nutritionally necessary alternative to meat. *Proc. Nutr. Soc.*, **58**, 377-383

[2] Simopoulos A.P. (2001) n-3 fatty acids and human health: defining strategies for public policy. *Lipids,* **36**, 83-89

[3] Harris W.S., von Schacky M.D. (2004) The omega-3 index: a new risk factor for death from coronary heart disease?. *Prev. Med.*, **39**, 212-220

[4] Calder P.C. (**2001**) Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Lipids,* **36**, 1007-1024

[5] Moses A.W.G., Slater C., Preston T., Barber M.D., Fearon, K.C.H (2004) Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. .*Br. J. Cancer.,* **90**, 996-1002

[6] Horrocks L.A., Yeo Y.K. (1999) Health benefits of docosahexaenoic acid. *Pharmacol. Res.*, **40**, 211-225

[7] Sastry P.S. (1985) Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog. Lipid Res.*, **24**, 69-176

[8] Simopoulos A.P. (1991) Omega 3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 438-463

[9] Young G., Conquer J. (2005) Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. *Reprod. Nutr. Dev.*, **45**, 1-28

[10] Delgado C.L., Wada N., Rosegrant M.W., Meijer S., Ahmed M. Fish to 2020: Supply and demand in changing global markets. *International Food Policy Research Institute* and *Word Fish Center* Washington,D.C., U.S.A. 236 pp. (2003)

[11] Poli B.M., Parisi G., Zampacavallo G., Mecatti M., Lupi P., Gualtieri M., Franci O. (2001) Quality outline of European sea bass *Dicentrarchus labrax* reared in Italy: shelf life, edible yield, nutritional and dietetic traits. *Aquaculture,* **202**, 303–315

[12] Paleologos E.K., Savvaidis I.N., Kontominas M.G. (2004) Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microb.*, **21**, 549–557

[13] Kyrana & Lougovois (2002) Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *Food Sci. Technol.*, **37**(3), 319-328

[14] Mannina L., Sobolev A.P., Capitani D., Iaffaldano N., Rosato M.P., Ragni P., Reale A., Sorrentino E., D'Amico I., Coppola R. (**2008**) NMR metabolic profiling of organic and aqueous sea bass extracts: implications in the discrimination of wild and cultured sea bass. *Talanta* **77**, 433-444

[15] Bligh E.G., Dyer W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Biochem. Cell. Biol.*, **37**(8): 911–917

[16] Braun S., Kalinowski H.O., Berger S. 150 and more basic NMR experiments. 2nd edition; Wiley-VCH, Weinheim, Germany (1998)

[17] Mannina L., Cristinzio M., Sobolev A.P., Ragni P., Segre A.L. (2004) High-field nuclear magnetic resonance (NMR) study of truffles (*Tuber aestivum vittadini*). *J. Agric. Food Chem.*, **52** 7988-7996

[18] Morris K.F., Johnson C.S. (1992) Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3139-3141

[19] Morris K.F., Stilbs P., Johnson C.S. (1994) Analysis of Mixtures on the Basis of Molecular Size and Hydrophobicity by Means of Diffusion Ordered 2D NMR. *Anal. Chem.*, **66**, 211-215

[20] Kapur G.S., Cabrita E.J., Berger S. (2000) The qualitative probing of hydrogen bond strength by diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Tetrahedron Lett.,* **41**, 7181-7185

[21] Viel S., Mannina L., Segre A.L. (2002) Detection of a π-π complex by diffusion-ordered NMR spectroscopy (DOSY). *Tetrahedron Lett.*, **43**, 2515-2519

[22] Morris K.F, Johnson C.S. (1993) Resolution of discrete and continuous molecular size distributions by means of diffusion-ordered 2D NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.,* **115**, 4291-4299

[23] Viel S., Capitani D., Mannina L., Segre A.L., (2003) Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy: a Versatile Tool for the Molecular Weight Determination of Uncharged Polysaccharides. *Biomacromolecules,* **4**, 1843-1847

[24] Özyurt G., Polat A. (2006) Amino acid and fatty acid composition of wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a seasonal differentiation. *Eur. Food Res. Technol.*, **222**, 316-320

[25] Redmond H.P., Stapleton P.P, Neary P., Bouchier-Hayes D. (1998) Immunonutrition: the role of taurine. *Nutrition,* **14**, 599-604

[26] Shaffer S., Takahashi K., Auma J. (2000) *Aminoacids,* **19**, 527-537

[27] Lundberg P., Vogel T., Malusek A., Lundquist P.O., Cohen L., Dahlqvist O.M.D.L. The Magnetic Resonance Metabolomics Database (mdl.imv.liu.se). ESMRMB, Basel, Switzerland, (2005)

[28] Howell N., Shavila Y., Grootveld M., Williams S. (1996) High-Resolution NMR and Magnetic Resonance Imaging (MRI) Studies on Fresh and Frozen Cod (*Gadus morhua*) and Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *J. Sci. Food Agric.*, **72**, 49-56

[29] Karube I., Matsuoka H., Suzuki S., Watanabe E., Toyama K. (1984) Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 314-319

[30] Gunstone F.D. (1991) High resolution NMR studies of fish oils. *Chem. Phys. Lipids*, **59**, 83-89

[31] Gunstone F.D., Seth S. (1994) Study of the distribution of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid between the α and β glycerol chains in fish oils by ^{13}C-NMR spectroscopy *Chem. Phys. Lipids,* **72**, 119-126

[32] Aursand M., Grasdalen H. (1992) Interpretation of the ^{13}C-NMR spectra of omega-3 fatty acids and lipid extracted from the white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Chem. Phys. Lipids*, **62**, 239-251

[33] Calder P. (2004) n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin. Sci.*, **107**, 1-11

[34] Mannina L., Luchinat C., Patumi M., Emanuele M.C., Rossi E., Segre A.L. (2000) Concentration dependence of ^{13}C NMR spectra of triglycerides: implications for the NMR analysis of olive oils. *Magn. Reson. Chem.*, **38**, 886-890

[35] Mannina L., Luchinat C., Emanuele M.C., Segre A.L. (1999) Acyl Positional Distribution of Glycerol Tri-Esters in Vegetable Oils: a ^{13}C NMR Study. *Chem. Phys. Lipids,* **103**, 47-55

[36] Carey M.C., Small D., Bliss C.M. (1983) Lipid digestion and absorption. *Ann. Rev. Physiol.*, **45**, 651-655

[37] Sacchi R., Medina I., Aubourg S.P., Giudicianni I., Paolillo L., Addeo F. (1993b) Quantitative high resolution ^{13}C-NMR analysis of lipids extracted from the white muscle of Atlantic tuna. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1247-1251

[38] Aursand M., Rainuzzo J.R., Grasladen H.J. (1993) Quantitative High-Resolution ^{13}C and ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance of ω-3 Fatty Acids from White Muscle of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 971-981

[39] Crasmun W.R. and Carlson R.M.K. Steroid structural analysis by two-dimensional NMR. in W.R. Crasmun and R.M.K Carlson (Ed.), *Two Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemists and Biochemists*, VHC Publishers, New York, 785-832 (1994)

[40] Alasalvar C., Taylor K.D.A, Zubcov E., Shahidi F., Alexis M. (2002) Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chem*., **79**, 145-150

[41] Grikorakis K., Alexis M.N., Taylor K.D.A., Hole M. (2002) Comparison wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *Int. J. Food Sci. Technol*., **37**, 477-484

[42] Lin Y., Qiu-Zhou X. (2006) Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio var. Jian*). *Aquaculture,* **256**, 389-394

CAPITOLO 5

LATTUGA:

CARATTERIZZAZIONE NMR DI PRODOTTI GM E NON-GM

5.1 *Introduzione*

Il consumo della lattuga rappresenta oggi un grande contributo alla nutrizione umana e animale. La lattuga è consumata principalmente come prodotto fresco e crudo nelle insalate e ciò comporta un grande sforzo per permetterne la distribuzione di grande quantità ai consumatori in ampie aree geografiche.

La coltivazione della lattuga è estesa a tutti i continenti con maggiore diffusione nelle aree del Centro e Nord America (Stati Uniti in prevalenza), dell'Asia (la Cina è al primo posto nel mondo seguita dall'India) e dell'Europa (Spagna, Italia e Francia) ed ha raggiunto, di recente, una produzione di oltre 15 milioni di tonnellate su una superficie superiore ai 686.500 ettari.

In Italia, il panorama delle *cultivar* (varietà coltivata) è molto ampio con un ricambio continuo e rapido, condizionato dalla necessità di colture resistenti e tolleranti ai molteplici agenti patogeni e fitoparassitari. Le biotecnologie sono in grado di soddisfare gli obiettivi di miglioramento genetico in tempi brevi. Nasce, quindi, l'esigenza di individuare le differenze tra organismi geneticamente modificati e la controparte "tradizionale".

L'approccio ormai consolidato per la valutazione della sicurezza di OGM è basato sulla comparazione di alimenti transgenici con alimenti convenzionali, che avendo, quest'ultimi, una "lunga storia" d'uso che li rende sicuri, possono essere utilizzati come riferimento per lo studio delle proprietà di alimenti GM.

La comparazione riguarda diverse caratteristiche, quali proprietà morfologiche, tossicologiche (comprese quelle allergeniche), genetiche e di composizione. La genomica che studia la struttura, il contenuto, la funzione e l'evoluzione del genoma, così come la proteomica che si occupa dell'insieme di tutte le proteine di un organismo e la metabolomica che ha lo scopo di individuare e quantificare i diversi metaboliti presenti nell'organismo in esame, ben si prestano a tale scopo [1].

Negli ultimi anni, la spettroscopia NMR ha dimostrato di essere un metodo valido ed affidabile per lo studio di variabilità metabolica e per la discriminazione tra campioni aventi profili metabolici differenti [2-6]. L'analisi NMR ha permesso di studiare numerosi alimenti geneticamente modificati come ad esempio: la lattuga (*Lactuca sativa* cv "Cortina") modificata con il gene di *E. coli* che codifica per l'enzima *asparagina sintetasi A* [7], il pomodoro (*Solanum lycopersicum* cv "Ohio" 8245) modificato con il gene del lievito *SAMdc* [8], il mais modificato con il gene *CrylA*(b) [9], numerose linee di grano transgenico [10] e sei linee transgeniche di piselli (*Pisum Sativum*) [11].

L'analisi NMR ha il vantaggio di poter identificare una vasta gamma di metaboliti presenti in una miscela ed inoltre rispetto ad altre tecniche analitiche, permette di determinare la concentrazione di ciascun matabolita usando lo stesso standard interno.

In tale contesto si inserisce il presente lavoro che è stato rivolto a stabilire, quantificare e valutare la variabilità di una serie di composti a basso peso molecolare che rappresentano il "profilo metabolico" della complessa matrice vegetale lattuga.

In particolare è stata studiata la specie agraria lattuga (*Lactuca sativa* cv. Luxor). La linea di lattuga geneticamente modificata è stata ottenuta per sovraespressione del gene *A. thaliana KNAT*, un gene di *Arabidopsis*, sotto il controllo del promotore plastocianina della pianta di pisello (*PetE*).

Le caratteristiche morfologiche di tale trasformazione genetica sono state precedentemente riportate [12, 13]. La sovraespressione di *KNAT1* è in grado di alterare la morfologia e lo sviluppo fogliare della pianta: la rete delle venature fogliari, infatti, cambia drasticamente con profondi effetti sulla morfologia e sulla crescita della foglia e inoltre induce un infiorescenza precoce.

L'utilizzo della tecnica NMR, unita ad un'analisi statistica multivariata, ha permesso lo studio della variabilità metabolica di lattuga geneticamente modificata a diversi stadi di maturazione e l'identificazione di metaboliti responsabile della discriminazione del vegetale GM dal vegetale convenzionale proveniente da colture non transgeniche.

I risultati ottenuti sono stati oggetto di una pubblicazione su rivista scientifica internazionale [22] e di comunicazione orale presentata nell'ambito del "14° Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology".

5.2 *Materiali e Metodi*

5.2.1 Campionamento

Gli organismi vegetali geneticamente modificati presentano un patrimonio genetico del tutto simile al riferimento non-GM fatta eccezione del transgene (una o più coppie). Uno stretto controllo delle condizioni ambientali (intensità della luce, fotoperiodo, temperatura, umidità) e delle condizioni di allevamento (composizione del suolo, irrigazione, fertilizzazione) possono minimizzare gli effetti esogeni sulla

variazione dei metaboliti della pianta e favorire lo studio sia degli effetti derivanti dalla trasformazione genetica sulla pianta stessa sia dell'interazione di nuovi genotipi transgenici con l'ambiente. La crescita in serra si offre come soluzione ideale, in quanto consente di controllare e ottimizzare le condizioni ideali necessarie durante l'intero ciclo produttivo della coltura [7].

I vegetali a foglia sia GM che non-GM sono stati selezionati dall'Istituto di Biologia e Biotecnologia Agrarie (IBBA) del CNR (Area della Ricerca di Roma 1 - Montelibretti).

Lo studio è stato effettuato sulla specie agraria lattuga (*Lactuca sativa*) cultivar Luxor; sono state selezionate una linea di controllo e una linea stabile di Luxor geneticamente modificata: *PetE:KNAT1* (omozigote, copia singola T-DNA, generazione T_6).

La semina è avvenuta il 16 Aprile 2009. I semi sono germinati in vasi, del volume di 3 dm^3, contenenti terriccio, torba e sabbia in rapporto 1:1:1. Alla fase di sviluppo di 8ª foglia, le piantine sono state trapiantate in vasi del volume di 10^3 cm^3 e successivamente (25ª foglia) in recipienti più grandi (20^3 cm^3) contenenti terriccio, torba (1:3) e 2g di fertilizzante al 12% di azoto (5% NH_4^+ e 7% NO_3^-) per kg di substrato. La crescita delle piante è avvenuta in serra con fotoperiodo naturale, 16/8 ore luce/buio, di intensità luminosa pari a 100 μmol $m^{-2}s^{-1}$ di radiazione fotosintetica attiva (PAR) e alla temperatura di 25 °C.

Il campionamento è stato effettuato tenendo conto del ciclo metabolico diurno della pianta. La crescita dei campioni GM è risultata rallentata rispetto ai campioni "*wild type*" [14]. Al fine di una comparazione oggettiva, i vegetali GM e *wild-type* presi in esame sono stati analizzati necessariamente nel medesimo stadio di sviluppo e campionando lo stesso tessuto, per cui la raccolta dei campioni GM e non GM non è stata effettuata lo stesso giorno. Sono stati effettuati due campionamenti a due differenti stadi di sviluppo: il primo è stato effettuato alla 4ª foglia, ovvero fra la 3ª e la 4ª settimana dalla semina per i campioni controllo e fra la 5ª e la 6ª settimana per i campioni GM. Ogni campione è stato preparato mettendo insieme le foglie provenienti da tre piante.

L'insieme di tre piante costituiva quindi un pool: sono stati analizzati 15 pool di campioni *wild-type* e 11 pool di campioni GM, in fase di sviluppo di 4ª foglia.

Il secondo campionamento è avvenuto nella fase di cespo, ovvero intorno all'undicesima settimana dalla semina per i campioni controllo e alla dodicesima settimana per i campioni GM. Sono state prelevate, per ogni singola pianta, le foglie (n°6) presenti al centro del cespo. In questo caso, ogni singola pianta costituiva un

pool: sono state campionate 14 piante di campioni controllo e 9 piante di campioni GM, nella fase di cespo.

Le foglie sono state campionate fresche e, immediatamente dopo la raccolta, liofilizzate, polverizzate e conservate a -20 °C, secondo le condizioni sperimentali riportate in Sobolev *et al.*, 2007 [7].

5.2.2 Processo di estrazione per l'analisi NMR

Sono state condotte procedure di estrazione dei metaboliti idrosolubili secondo le condizioni sperimentali precedentemente riportate [3, 15].

Una quantità nota (21,0 mg) di liofilizzato è stata solubilizzata in 1 mL di tampone fosfato in D_2O (concentrazione salina 400 mM, pD 6.5) contenente una quantità nota di TSPA (sale sodico dell'acido 3-trimetilsilil-2,2,3,3-d_4 propionico 0.1 mM – standard per ^{1}H-NMR) ed una piccola quantità di EDTA (0.05 mM). La soluzione così ottenuta è stata centrifugata (10.000 rpm per 7 min), il surnatante è stato filtrato e 0,7 mL sono stati trasferiti nel tubo NMR di 5 mm, facendo attenzione a tenere la soluzione al riparo dalla luce per evitare la rapida ossidazione dei fenoli [4, 16]. L'uso di acqua deuterata per l'estrazione diretta da liofilizzato è il metodo più immediato che permette di evitare step intermedi. I metaboliti presenti nella frazione idrosolubile presentano proprietà acido-base (acidi organici, amminoacidi, fenoli, ammine, etc), per cui, la simultanea presenza di composti protonati e deprotonati in equilibrio labile tra loro, rende l'analisi NMR pH-dipendente. Una variazione di pH, anche solo del valore di 0.1, può determinare uno shift del segnale NMR pari a 0.02 ppm, corrispondente a 12 Hz in un campo magnetico di analisi di 600 MHz (5-10 volte l'altezza di linea). La forte dipendenza dal pH dell'analisi NMR, fa della comparazione degli estratti acquosi con pH differente, difficoltosa e preclude l'applicazione di lettura automatica o semi-automatica delle intensità dei segnali di risonanza. Il problema può essere risolto addizionando, appunto, una soluzione tampone all'estratto. La concentrazione del tampone deve essere tale da assicurare la minore variazione possibile di pH e deve essere appropriata al tipo di campione in analisi.

D'altra parte, un rilevante abbassamento di sensibilità dell'analisi NMR è stato osservato quando viene utilizzato un tampone a concentrazione elevata e una sonda a bassa temperatura [17]. Il tampone fosfato si è dimostrato essere maggiormente adatto per l'analisi NMR in quanto i protoni scambiati non producono segnali ^{1}H addizionali. Per la stessa ragione, la maggior parte degli acidi organici e delle basi

non possono essere usate come specie tamponanti eccetto se completamente deuterati.

In accordo con i dati di letteratura, i segnali NMR di numerosi acidi organici (citrico, malico) in grado di chelare i metalli, sono risultati essere più larghi a causa di cationi paramagnetici (Fe3+, Mn2+) presenti negli estratti di tessuto vegetale. Tale problema è stato risolto aggiungendo EDTA al tampone fosfato, che chelando i metalli presenti in soluzione, ha permesso una risoluzione migliore dei segnali ^{1}H NMR dell'acido citrico e malico.

La stabilità dei metaboliti durante i processi di estrazione e le misure NMR è stata accuratamente monitorata, come ad esempio, l'attività degli enzimi endogeni che poteva indurre a idrolisi di saccarosio, fruttosio e glucosio.

5.2.3 Misure NMR

Tutti gli esperimenti sono stati realizzati alla temperatura di 300 K mediante uno spettrometro NMR Bruker AVANCE AQS600 operante alla frequenza protonica di 600.13 MHz, equipaggiato con una sonda Bruker multinucleare inversa capace di produrre gradienti lungo l'asse z (55.4 G cm^{-1}).

I chemical shifts degli spettri protonici in soluzione acquosa sono riportati rispetto al segnale TSPA (δ = 0.00 ppm) preso come riferimento.

Gli spettri protonici in D_2O sono stati acquisiti con 512 scansioni, 4 *dummy scans*, un *recycle delay* di 2,5 s e un *Receiver Gain* di 456.

La soppressione dell'intenso segnale dell'acqua (HDO) è stata effettuata mediante una sequenza di presaturazione con un lungo impulso a bassa potenza alla frequenza della risonanza dell'HDO applicato durante il tempo di rilassamento seguito da un impulso ad alta potenza [18]. Inoltre, per evitare i possibili effetti di saturazione su composti non identificati, si è utilizzato un impulso d'acquisizione di 8.0 μs (corrispondente ad una rotazione della magnetizzazione di 45°) e 32 K di punti dati [19].

Le assegnazioni degli spettri sono state effettate in accordo ai dati di letteratura, Sobolev *et al.*, 2005 [3].

5.2.4 *Processing*

Gli spettri sono processati usando il programma "Bruker TopSpin" (vers. 1.3). I parametri utilizzati sono i seguenti:

- Line Broadening (LB) = 0.3 (nella funzione esponenziale)
- Size (SI) = 64 K (zero filling);
- correzione manuale della fase;
- calibrazione dello spettro sul segnale metilico del TSPA (δ = 0.00 ppm)

5.2.5 *Contenuto dei metaboliti negli estratti acquosi*

Sono state misurate le intensità di 22 segnali di risonanza protonica degli estratti acquosi, rispetto all'intensità del segnale metilico del TSPA (0.3 mM) assunto come standard interno e normalizzato al valore 1000.

Le risonanze prese in considerazione sono le seguenti:
isoleucina (1.02 ppm), valina (1.05 ppm), acido lattico (1.32 ppm), treonina (1.34 ppm), alanina (1.49 ppm), acido acetico (1.92 ppm), acido glutammico (2.07 ppm), γ-amminobutirrato (2.30 ppm), acido malico (2.38 ppm), acido succinico (2.41 ppm), glutammina (2.48 ppm), acido citrico (2.53 ppm), acido aspartico (2.80 ppm), asparagina (2.91 ppm), colina (3.21 ppm), β-glucosio (3.24 ppm), *myo*-inositolo (3.29 ppm), fruttosio (4.02 ppm), acido tartarico (4.34 ppm), acido caffeoil-tartarico (5.31 ppm), saccarosio (5.42 ppm), acido fumarico (6.52 ppm).

5.3 *Analisi statistica*

L'elaborazione statistica dei dati NMR è stata effettuata utilizzando il programma di statistica "StatSoft" (version 5.1, 1997).

E' stata effettuata la media delle intensità dei 22 segnali protonici selezionati ed stata calcolata la deviazione standard (autoscaling). I valori misurati relativi ai 22 segnali sono state sottoposti ad analisi statistica.

La variabilità metabolica è stata eseguita mediante un'appropriata analisi multivariata, comprendente: l'analisi delle componenti principali (PCA), l' analisi ad albero (*cluster analyses* TCA) e l'analisi fattoriale.

La PCA ha lo scopo di ridurre la matrice dei dati originali in una matrice più piccola che comunque mantiene le stesse informazioni. E' stata applicata, senza alcuna ipotesi a priori, alle intensità per evidenziare i raggruppamenti naturali dei campioni.

L'analisi dei cluster ha l'obiettivo di identificare eventuali raggruppamenti tra i campioni a partire dai dati "multidimensionali" a disposizione. Nel caso specifico è stata utilizzata come misura la distanza Euclidea e il metodo del legame completo.

L' interazione tra il fattore di crescita e il fattore genetico è stata studiata tramite l'analisi fattoriale.

Gli effetti delle interazioni, riportati in *Tabella 5.2*, mostrano un intervallo di confidenza del 95%.

5.4 Risultati e Discussione

5.4.1 Analisi metabolica: caratterizzazione di estratti acquosi di lattuga transgenica e wild-type

La *Figura 5.1* mostra gli spettri ^{1}H-NMR (600 MHz) di un campione GM e di un campione *"wild-type"* di estratti acquosi (D_2O con tampone fosfato) di foglie di lattuga. Le assegnazioni degli spettri sono state effettate utilizzando dati presenti in letteratura [3, 7].

Gli spettri protonici risultano essere conservativi poiché ogni specifico segnale è presente in entrambi i genotipi. Lo spettro ^{1}H-NMR non rivela quindi alcun segnale nuovo, suggerendo che le linee transgeniche non producono nuovi metaboliti (alla concentrazione rilevabile dall'NMR). I risultati ottenuti sono concordi con quelli osservati dal confronto tra campioni GM e *wild-type* di *Lattuga sativa* cv. "Cortina" [7].

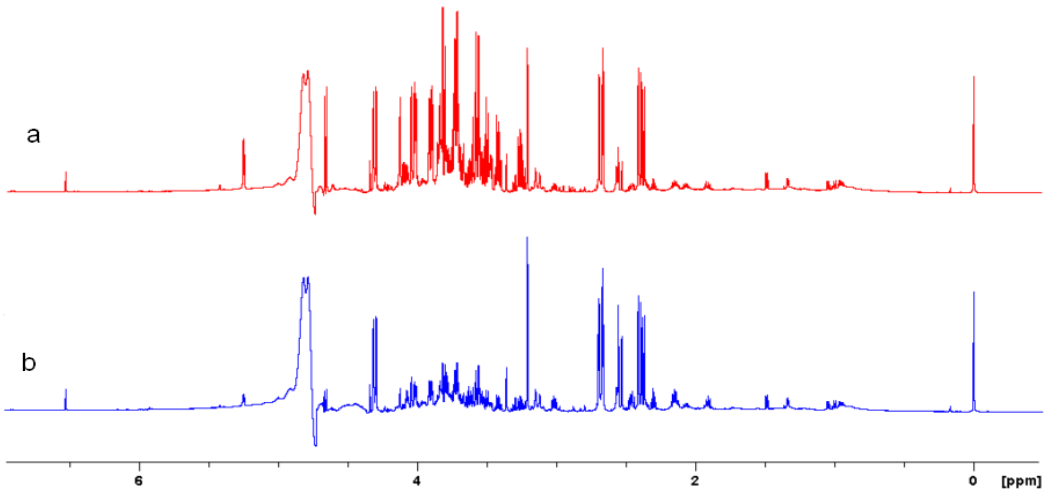

Figura 5.1. Spettri ^{1}H NMR di *Lactuca sativa "wild type"* (a) e *PetE:KNAT1* (b) in soluzione acquosa (tampone fosfato in D_2O concentrazione salina 400 mM, pD 6.5) a 300 K

Sebbene gli spettri dei campioni appartenenti a differenti genotipi e a diversi stadi di maturazione siano qualitativamente conservativi, si possono osservare differenze dal punto di vista quantitativo: varia quindi la concentrazione dei metaboliti.

È stata misurata l'intensità dei segnali dei metaboliti presenti in quantità rilevabili nello spettro ^{1}HNMR, sia dei campioni GM che *wild-type*, a differenti stadi di sviluppo (*Tabella 5.1*).

L'analisi ad albero (TCA) è stata applicata, senza alcuna ipotesi a priori, alle intensità misurate dei metaboliti presenti in campioni di lattuga transgenica e controllo (*Figura 5.2*).

Il dendrogramma mostra la separazione dei campioni in due grandi gruppi: il primo include campioni GM e controllo alla 4ª foglia di sviluppo; il secondo gruppo include i campioni GM e controllo in fase di sviluppo di cespo. Tale risultato mette in evidenza la rilevante influenza del fattore sviluppo sulla discriminazione tra i campioni di differente genotipo.

Analizzando il dendrogramma ad un livello più basso, si possono osservare ulteriori sottoinsiemi che evidenziano il raggruppamento dei campioni in base al differente corredo genetico.

Tabella 5.1. Metaboliti identificati e quantificati nello spettro ^{1}H NMR 600MHz di estratti acquosi di campioni di lattuga[1]s= singoletto; d= doppietto; dd= doppio doppietto; t= tripletto; m= multipletto

	^{1}H (ppm)	Composto	Abbreviazione	Multeplicità[1] [*J* (Hz)]	J (Hz)	Assegnazione
1	**1.021**	Isoleucina	**ILE**	d	7.1	$^{3'}CH_3$
2	**1.053**	Valina	**VAL**	d	7.0	$^{4,4'}CH_3$
3	**1.329**	Acido Lattico	**LA**	d	7.0	$^{3}CH_3$
4	**1.345**	Treonina	**THR**	d	6.5	$^{4}CH_3$
5	**1.364**	S5		s		$^{3,4}CH_2$
6	**1.495**	Alanina	**ALA**	d	7.3	$^{3}CH_3$
7	**1.927**	Acido acetico	**AcA**			
8	**2.071**	Glutammato	**GLU**	m		
9	**2.30**	γ-aminobutirrato	**GAB**	t	7.5	$^{4}CH_2$
10	**2.383**	Acido malico	**MA**	dd	15.4; 9.9	$^{2,2'}CH$
11	**2.415**	Acido succinico	**SA**	s		$^{2,3}CH_2$
12	**2.483**	Glutammina	**GLN**			
13	**2.528**	Acido citrico	**CA**	d	15.4	^{2}CH
14	**2.806**	Aspartato	**ASP**	dd	17.4; 3.8	$^{3,3'}CH$
15	**2.909**	Asparagina	**ASN**	dd	16.9; 7.3	$^{3,3'}CH$
16	**3.208**	Colina	**CHN**	s		$N(CH_3)_3$
17	**3.245**	β-glucosio	**β-GLC**	dd		^{2}CH
18	**3.295**	*Myo*-inositolo	**MNS**	t	9.4	
19	**4.022**	Fruttosio	**FRU**	m		^{6}CH
20	**4.341**	Acido tartarico	**TA**	s		^{2}CH
21	**5.311**	Acido monocaffeoiltartarico	**MCT**	d	2.2	
22	**5.423**	Saccarosio	**SUC**	d	3.0	
23	**5.922**	S23				
24	**6.526**	Acido fumarico	**FA**	s		$^{2,3}CH=$

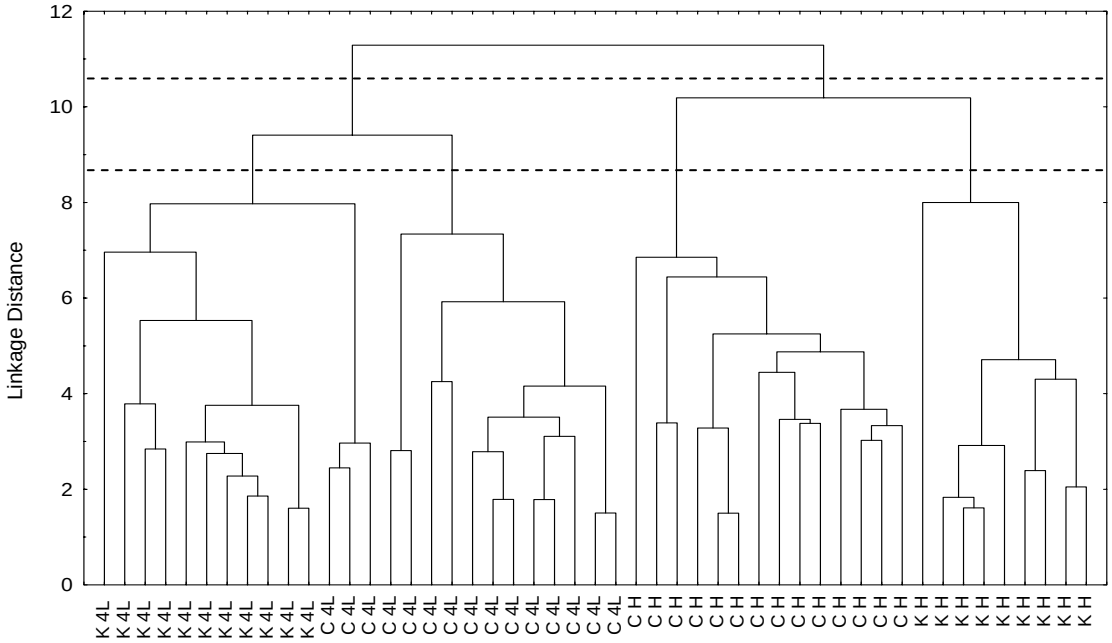

Figura 5.2. TCA applicata a campioni di lattuga cv. "Luxor" *PetE:KNAT1* (K) e *wild-type* (C) a differenti stadi di sviluppo. K4L, campioni GM alla 4ª foglia di sviluppo; KH, campioni GM in fase di sviluppo di cespo; C4L, campioni controllo alla 4ª foglia di sviluppo; CH campioni controllo in fase di sviluppo di cespo

Dall'analisi TCA sono quindi, osservabili gli effetti di due fattori sulla discriminazione tra campioni di lattuga GM e controllo: lo stadio di maturazione e il genotipo; quest'ultimo sembra avere maggior impatto nelle variazioni metaboliche tra i campioni di differente corredo genetico.

Il naturale raggruppamento dei campioni può essere studiato utilizzando i valori delle intensità misurate delle variabili nell'analisi delle componenti principali (PCA). In *Figura 5.3* è riportata l'analisi PCA effettuata su 49 campioni di lattuga: la combinazione di PC1 con PC2 spiega il 56.1% della varianza.

I campioni a diverso stadio di maturazione si separano lungo la PC1: nell'area destra della *Figura 5.3* sono raggruppati i campioni in fase di cespo, mentre nell'area di sinistra sono raggruppati i campioni alla 4ª foglia di sviluppo (fatta eccezione di un unico campione GM in fase di cespo).

I campioni *wild-type* risultano maggiormente separati in base al diverso stadio di sviluppo, rispetto ai campioni di lattuga transgenica che presentano una minore variabilità dovuta all'effetto di maturazione probabilmente perché quest'ultima è influenzata da altri fattori tra cui la trasformazione genetica.

La separazione, in base al differente genotipo, tra i campioni *wild-type* e *PetE:KNAT1* è osservabile soprattutto lungo la componente PC2.

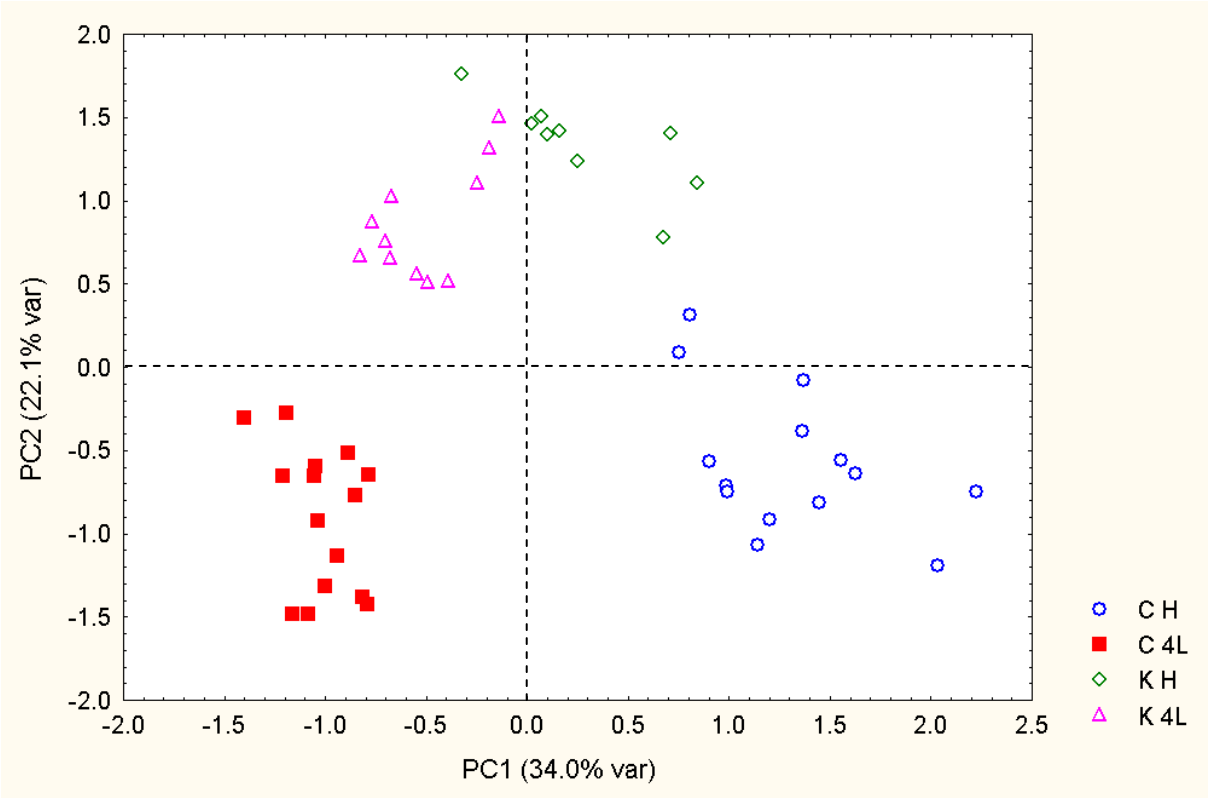

Figura 5.3. PCA applicata alle intensità dei metaboliti misurati in campioni controllo (C), campioni *PetE:KNAT1* (K). K4L, campioni GM alla 4ª foglia di sviluppo; KH, campioni GM in fase di sviluppo di cespo; C4L, campioni controllo alla 4ª foglia di sviluppo; CH campioni controllo in fase di sviluppo di cespo

L'analisi dei loadings (*Figura 5.4*) mostra che i metaboliti maggiormente responsabili della discriminazione tra lattuga GM e *wild-type* sono acidi organici, (all'estrema dx di PC1), amminoacidi, zuccheri e altri composti quali acido tartarico e γ-amminobutirrato (all'estrema sx dell'asse PC1).

Dai risultati ottenuti, infatti, è emerso che i campioni GM presentano quantità inferiori di amminoacidi, di monosaccaridi e di alcuni acidi organici.

Tali risultati sono stati studiati per mezzo dell'analisi di istogrammi (*cifr. par. 5.4.2*).

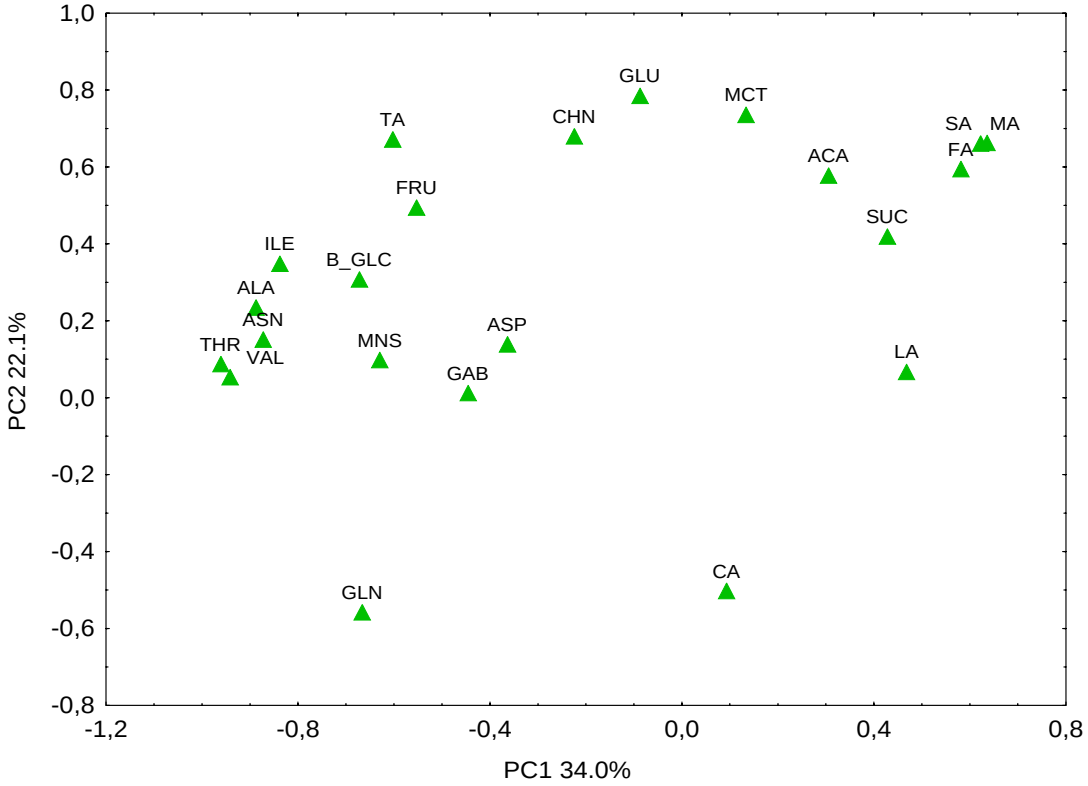

Figure 5.4. PCA dei loadings applicata a 22 metaboliti misurati in campioni *wild-type* e GM.

5.4.2 Analisi dei metaboliti dell' estratto acquoso

Per valutare più in dettaglio le variazione dei metaboliti nei diversi stadi di maturazione e nei due genotipi si è proceduti all'analisi fattoriale (2^2) [20] e all'analisi di istogrammi ottenuti dalle medie dei valori delle intensità misurate (*Figura 5.4 – 5.6*).

L'analisi dei piani fattoriali prevede, per ogni fattore, due livelli: il fattore genotipo, con i livelli controllo (C) e *PetE:KNAT1* (K); il fattore maturazione con i livelli 4ª foglia di sviluppo (4L) e fase di cespo (H). I quattro fattori di combinazione sono quindi: C-4L, C-H, K-4L e K-H. Per ciascuna combinazione è stato analizzato un discreto numero di campioni (da 9 a 15). L'effetto di ciascun fattore, ovvero il genotipo e lo sviluppo, sul livello (concentrazione) di ciascun metabolita può essere calcolato separatamente quando non vi è alcuna interazione tra i due fattori.

Il significato statistico dell'incremento o del decremento di livello di un dato metabolita è riportato in *Tabella 5.2* ed indicato con segno + o - . Per esempio la diminuzione significativa dell'amminoacido ILE (isoleucina) rispetto ai campioni controllo è indicato con il segno – in *Tabella 5.2*.

Anche la presenza di un'interazione significativa tra i due fattori può essere determinata tramite lo schema fattoriale. L'interazione, riportata in *Tabella 5.2* con un asterisco, suggerisce che il genotipo e lo stadio di sviluppo possono influenzarsi reciprocamente. Per esempio, nel caso dell'acido malico, lo sviluppo modula o tempera l'effetto del genotipo e viceversa l'espressione transgenica modula la maturazione.

La *Tabella 5.2* quindi, suggerisce se il contenuto di un determinato metabolita è il risultato dell' interazione tra il transgene e lo sviluppo.

Tabella 5.2. Analisi fattoriale di metaboliti idrosolubili di lattuga GM e *wild-type*

Metabolita [a]	C *vs* K [b]	4L *vs* H [c]	Interazione [d]
Isoleucina	–	+	
Valina		+	*
Treonina	–	+	*
Alanina	–	+	*
Glutammato	–		
GABA		+	
Glutammina	+	+	
Aspartato		+	
Asparagina	–	+	*
Acido Lattico			
Acido Malico	–	–	*
Acido Succinico	–	–	
Acido Acetico	–		
Acido Citrico	+		
Acido Fumarico	–	–	
Acido Tartarico	–	+	
β-Glucosio	–		*
Fruttusio	–		*
Saccarosio			
Colina	–		
myo-Inositolo		+	*
Caff.-Tartarico.	–		

a. In rosso, amminoacidi. In blu, acidi organici (in neretto gli intermedi del ciclo di Krebs). In nero, mono- e disaccaridi e altri composti.

b. C, campioni di lattuga *wild-type*; K, campioni *PetE:KNAT1*. L'incremento (+) o decremento (-) di contenuto di metabolita viene indicato quando è identico per tutti gli stadi di sviluppo

c. 4L, campioni alla 4ª foglia di sviluppo ; H, campioni in fase di cespo. Il livello della variazione di metaboliti in fase di cespo o alla 4ª foglia è indicato quando è identico per i due genotipi.

d. Eventuale interazione tra stadio di sviluppo e genotipo (intervallo di confidenza 95%).

☙ *Acidi organici*

La variazione di contenuto di acidi organici, nei diversi stadi di sviluppo, è costante in entrambi i genotipi di lattuga (*Figura 5.5*). I risultati ottenuti hanno infatti mostrato un contenuto in acidi organici inferiore nei campioni di lattuga GM rispetto al controllo, fatta eccezione per l'acido citrico che presenta livelli elevati in entrambi gli stadi di sviluppo.

Degno di nota è il caso dell'acido malico (*Tabella 5.2, asterisco, Figura 5.5*) il cui contenuto, nei campioni controllo, si dimezza dalla fase di sviluppo di 4ª foglia alla fase di cespo mentre nei campioni GM presenta solo una lieve diminuzione (di un fattore 1.4).

Nel caso specifico dell'acido malico, l'analisi statistica mette in luce che i due fattori non sono indipendenti (con il 95% di confidenza) suggerendo che lo sviluppo sia modulato dal differente genotipo dei campioni *PetE:KNAT1*.

Nel caso dell'acido tartarico, invece, è chiara l'indipendenza dei due fattori sul contenuto del metabolita.

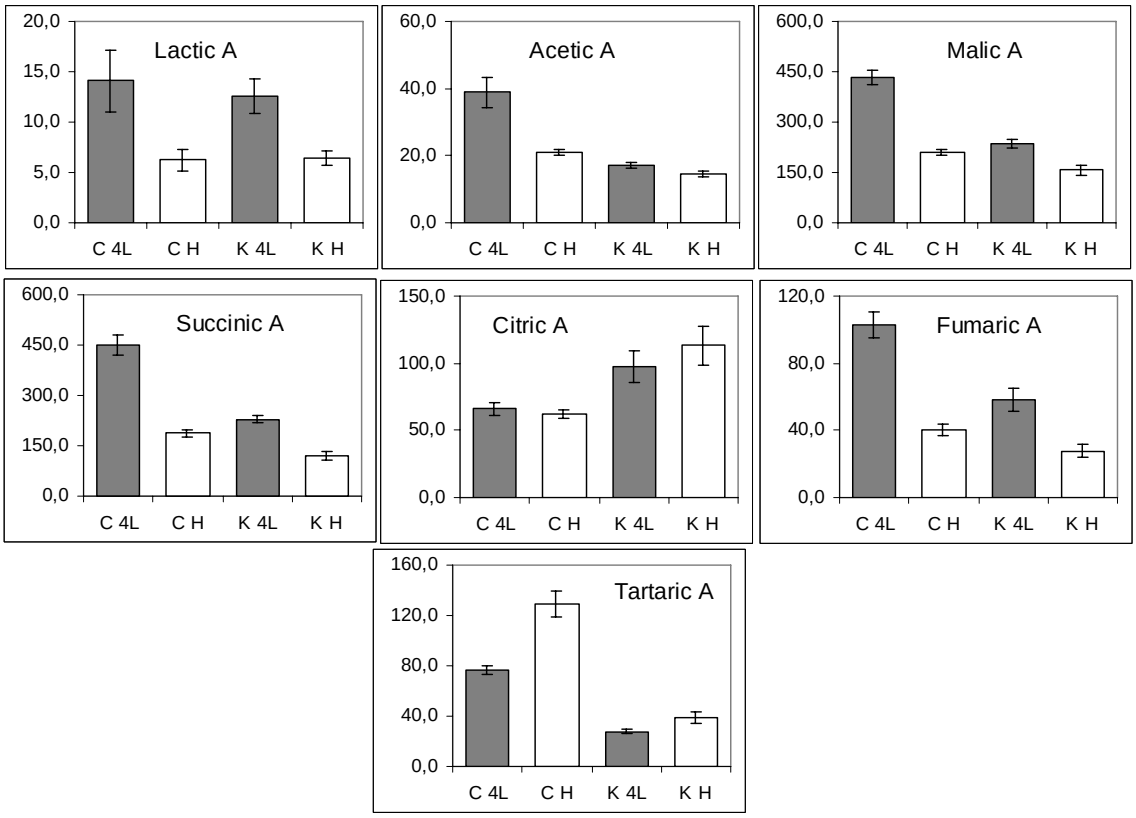

Figura 5.5. Istogrammi dei valori medi delle intensità relative di acidi organici assegnati nello spettro ^{1}H-NMR. Le barre indicano l'errore standard. C, campioni controllo; K, campioni *PetE:KNAT1*. K4L, campioni GM alla 4ª foglia di sviluppo; KH, campioni GM in fase di cespo; C4L, campioni controllo alla 4ª foglia di sviluppo; CH, campioni controllo in fase di cespo

☙ *Amminoacidi*

I risultati ottenuti mostrano un aumento di amminoacidi durante la fase di maturazione in entrambi i campioni di diverso genotipo (*Figura 5.6*), fatta eccezione per l'acido glutammico (GLU).

Il contenuto di amminoacidi si è mostrato significativamente maggiore nei campioni *wild-type* rispetto ai campioni GM; inoltre è stata rilevata una marcata interazione tra contenuto di amminoacidi e i fattori genetici e di maturazione. Tale interazione si è dimostrata particolarmente evidente nel caso di: valina, treonina, alanina, asparagina (*Tabella 5.2*).

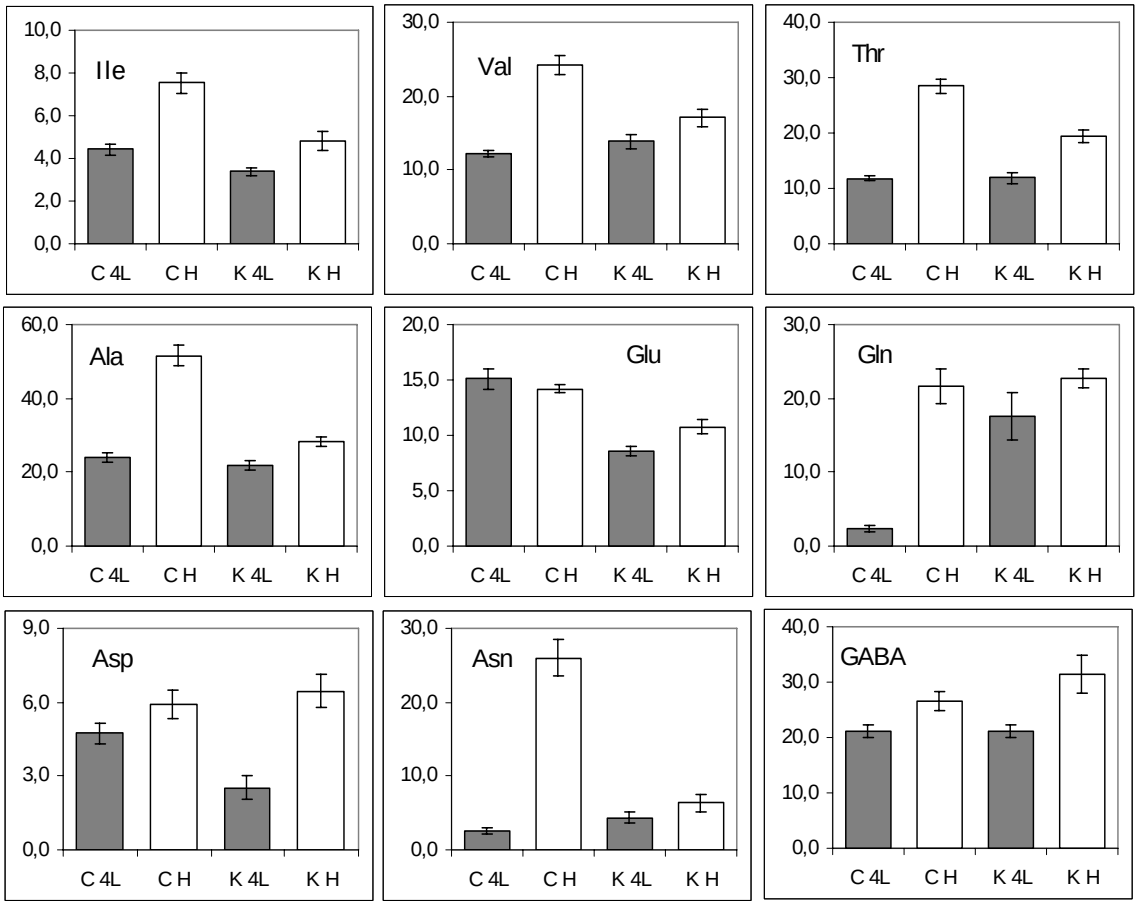

Figura 5.6. Istogrammi dei valori medi delle intensità relative agli amminoacidi assegnati nello spettro ^{1}H-NMR. Le barre indicano l'errore standard. C, campioni controllo; K, campioni *PetE:KNAT1*. K4L, campioni GM alla 4ª foglia di sviluppo; KH, campioni GM in fase di cespo; C4L, campioni controllo alla 4ª foglia di sviluppo; CH, campioni controllo in fase di cespo

☙ *Monosaccaridi e disaccaridi*

Le quantità dei monosaccaridi β-glucosio e fruttosio aumentano considerevolmente con la maturazione nelle linea controllo, al contrario di quanto avviene per la linea GM (*Figura 5.7*). Infatti, nei campioni GM il maggiore quantitativo di monosaccaridi presente nella fase di sviluppo di 4ª foglia, diminuisce drasticamente nella fase matura di cespo.

I livelli di entrambi i monosaccaridi è influenzato dall'interazione dei fattori genetici e di maturazione (*Tabella 5.2*).

L'interazione presente tra i due fattori suggerisce che il fattore genetico contrasta fortemente con il fattore sviluppo e quindi influenza il quantitativo di fruttosio e β-glucosio. Questo risultato suggerisce che la sovraespressione del gene *KNAT1* influenza notevolmente la produzione di zuccheri semplici.

Diverso è il discorso per il saccarosio i cui quantitativi sono maggiori nella fase di sviluppo di 4ª foglia e minori nella fase di cespo, per entrambe le linee di lattuga.

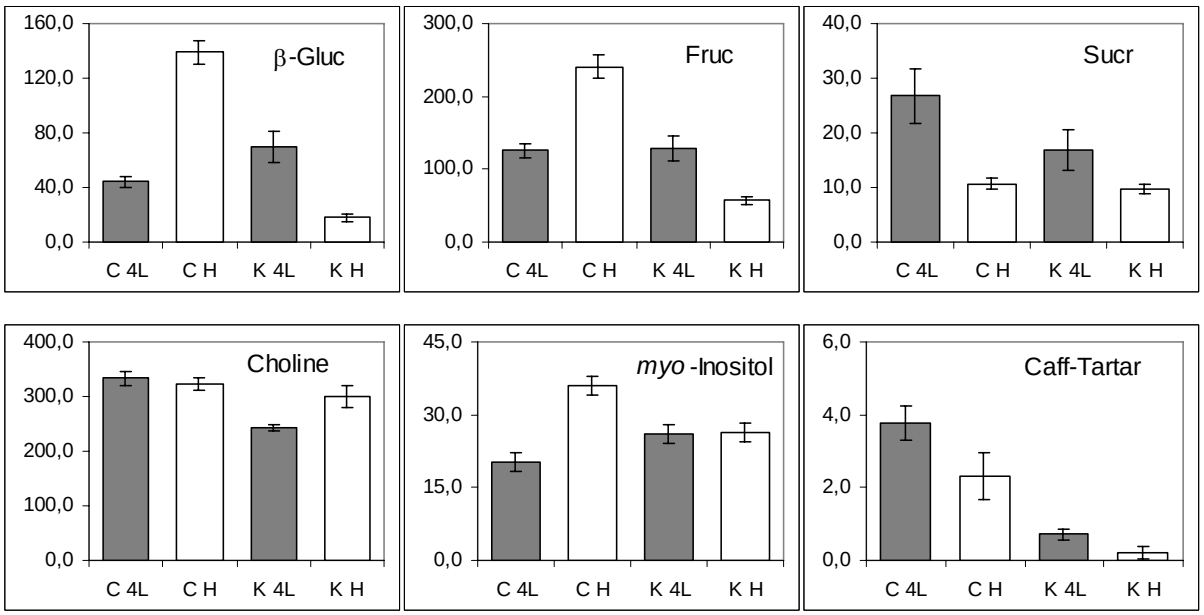

Figura 5.7. Istogrammi dei valori medi delle intensità relative ai monosaccaridi, disaccaridi e altri composti assegnati nello spettro ^{1}H-NMR. Le barre indicano l'errore standard. C, campioni controllo; K, campioni *PetE:KNAT1*. K4L, campioni GM alla 4ª foglia di sviluppo; KH, campioni GM in fase di cespo; C4L, campioni controllo alla 4ª foglia di sviluppo; CH, campioni controllo in fase di cespo

☙ *Altri composti*

Fatta eccezione dell'acido caffeoil-tartarico, il contenuto i *myo*-inositolo e di colina risulta piuttosto invariato nelle due linee (*Figura 5.7*), anche se i campioni GM presentano comunque quantitativi minori rispetto ai campioni *wild-type.*

L'acido caffeico e i suoi derivati sono precursori della biosintesi della lignina e il basso contenuto riscontrato di acido caffeoil-tartarico suggerisce un decremento del contenuto della stessa lignina. Tale risultato, in accordo con i dati presenti in letteratura, denota i ridotti quantitativi di lignina in piante geneticamente modificate dalla sovraespressione del gene *KNAT1* [21].

5.5 *Conclusioni*

Lo studio della specie agraria (*Lactuca sativa* cv. Luxor) per mezzo di spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ha dimostrato che i campioni di lattuga *wild-type* e lattuga *PetE:KNAT1* presentano lo stesso profilo metabolico, risultato, questo, in accordo con i precedenti studi condotti su diversi vegetali geneticamente modificati come ad esempio: il pomodoro [8], il mais [9] e la lattuga [7].

L'analisi NMR, unita ad un'appropriata analisi statistica, ha permesso, quindi, di caratterizzare la variabilità di metaboliti idrosolubili presenti nel vegetale, la cui produzione è influenzata oltre che dalla trasformazione genetica anche dalla maturazione.

Nel presente studio, sono state individuate, inoltre, le interazioni tra fattore di crescita e fattore genetico sulla variazione di quantitativi di metaboliti prodotti dal vegetale *wild-type* e GM.

Sono stati riscontrati, quindi, diversi quantitativi di metaboliti nelle due linee prese in considerazione; la considerevole variazione metabolica è associata allo stadio di sviluppo fogliare, sebbene numerosi processi metabolici siano fortemente modulati dall'espressione genetica del vegetale lattuga.

L'influenza maggiore della sovraespressione di *PetE:KNAT1* sulla maturazione si ha sul metabolismo dei monosaccaridi; infatti nei campioni GM sono stati misurati quantitativi di fruttosio e β-glucosio, nella fase di cespo, drasticamente inferiori rispetto ai livelli presenti nella fase di sviluppo di 4ª foglia. Tale risultato si è dimostrato invertito per i campioni di lattuga *wild-type* il cui quantitativo di zuccheri semplici è aumentato con il procedere della maturazione.

Lo studio del pattern metabolico della lattuga GM e non-GM ha permesso, quindi, di ottenere informazioni importanti riguardo l'attività biologica del gene *KNAT1* e il ruolo che gioca sulla variazione metabolica durante la maturazione del vegetale.

5.6 *Referenze*

[1] Fiehn O. (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.*, **48**, 155–171

[2] Mannina L., Sobolev A.P., Capitani D., Iaffaldano N., Rosato M.P., Ragni P., Reale A., Sorrentino E., D'Amico I., Coppola R. (2008) NMR metabolic profiling of organic and aqueous sea bass extracts: Implications in the discrimination of wild and cultured sea bass. *Talanta*, **77**, 433-444

[3] Sobolev A.P., Brosio E., Gianferri R., Segre A.L. (2005) Metabolic profile of lettuce leaves by high- field NMR spectra. *Magn. Reson. Chem.*, **43**, 625-638

[4] Sobolev A.P., Segre A.L., Lamanna R. (2003) Proton high-field NMR study of tomato juice. *Magn. Reson. Chem.*, **41**, 237-244

[5] Mannina L., Segre A.L. (2002) High resolution NMR: from chemical structure to food authenticity. *Grasas Aceites*, ***53***, 22-33

[6] Fan T.W.M. (1996) Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **28**, 161-219

[7] Sobolev A.P., Segre A.L., Giannino D., Mariotti D., Nicolodi C., Brosio E., Amato M.E. (2007) Strong increase of foliar inulin occurs in transgenic lettuce plants (Lactuca sativa L.) over expressing the asparagine synthetase A from E. coli. *J. Agric. Food. Chem.*, **55**, 10827-10831

[8] Mattoo A.K., Sobolev A.P., Neelam A., Goyal R.K., Handa A.K., Segre A.L. (2006) NMR spectroscopy based metabolite profiling of transgenic tomato fruit engineered to accumulate spermidine and spermine reveals enhanced anabolic and nitrogen-carbon interactions. *Plant Physiol.*, **142**, 1759-1770

[9] Piccioni F., Capitani D., Zolla L., Mannina L. (2009) NMR metabolic profiling of transgenic maize with the *Cry1A(b)* gene. *J. Agric. Food. Chem.*, **57**, 6041-6049

[10] Baker J.M., Hawkins N.D., Ward J.L., Lovegrove A., Napier J.A., Shewry P.R., Beale M.H. (2006) A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat. *Plant Biotech. J.*, **4**, 381-392

[11] Charlton A., Allnutt T., Holmes S., Chisholm J., Bean S., Ellis N., Mullineaux P., Oehlschlager S. (2004) NMR profiling of transgenic peas. *Plant Biotech. J.*, **2**, 27-35

[12] Frugis G., Giannino D., Mele G., Nicolodi C., Chiappetta A., Bitonti M.B., Innocenti A.M., Dewitte W., Van Onckelen H., Mariotti D. (2001) Overexpression of *KNAT1* in lettuce shifts leaf determinate growth to a shoot-like indeterminate growth associated with an accumulation of isopentenyl-type cytokinins. *Plant Physiol.*, **126**, 1370-1380

[13] Giannino D., Nicolodi C., Testone G., Di Giacomo E., Iannelli M.A., Frugis G., Mariotti D. (2008) Pollen-mediated transgene flow in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Breeding*, **127**, 308-314

[14] Frugis G., Giannino D., Nicolodi C., Mariotti D. (2001) Overexpression of KNAT1 in Lettuce Shifts Leaf Determinate Growth to a Shoot-like Indeterminate Growth Associated to an Accumulation of Isopentenyl-Type Cytokinins. *Plant Physiol.*, **126**, 1-11

[15] Bligh E.G., Dyer W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917

[16] Belton P.S., Delgadillo I., Gil A.M., Casuscelli F., Colquhoun I.J., Dennis M.J., Spraul M. (1997) High field proton NMR studies of apple juices. *Magn. Reson. Chem.*, **35**, S52-S60

[17] Voehler M.W., Collier G., Young J.K., Stone M.P., Germann M.W. (2006) Performance of cryogenic probes as a function of ionic strength and sample tube geometry. *J. Magn. Reson.*, **183**, 102-109

[18] Braun S., Kalinowski H.O., Berger S. 150 and More Basic NMR Experiments. *Wiley-VCH:Weinheim* (1998)

[19] Ernst R.R., Bodenhausen G., Wokaun A. Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. *Oxford University Press*, New York (1987)

[20] Box G.E.P., Hunter J.S., Hunter W.G. Factorial design at two levels. In *Statistics for experimenters: design, discovery and innovation*, 2nd Ed.: Box, G.E.P.; Hunter, J.S.; Hunter, W.G., Eds.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, New Jersey, USA, 173-222, (2005)

[21] Mele G., Ori N., Sato Y., Hake S. (2003) The *knotted1*-like homeobox gene BREVIPEDICELLUS regulates cell differentiation by modulating metabolic pathways. *Gene. Dev.*, **17**, 2088-2093

[22] Sobolev A.P., Capitani D., Giannino D., Nicolodi C., Testone G., Santoro F., Frugis G., Iannelli M.A., Mattoo A.K., Brosio E., Gianferri R., D'Amico I. and Mannina L. (2010) NMR-Metabolic Methodology in the Study of GM Foodstuff. *Nutrients* **2**, 1-15

CAPITOLO 6

OLIO D'OLIVA AROMATIZZATO:

CARATTERIZZAZIONE DI DIFFERENTI TIPOLOGIE DI OLI AROMATIZZATI

6.1 *Introduzione*

L'olio d'oliva rappresenta un elemento fondamentale della dieta universalmente nota e definita come "dieta mediterranea".

L'ampio riconoscimento ottenuto negli anni da tale prodotto non è da ascrivere solo alle sue caratteristiche sensoriali [1] ma anche alle sue proprietà nutrizionali. La composizione in acidi grassi essenziali, il contenuto in acido oleico, il rapporto bilanciato di acidi grassi saturi/polinsaturi così come la presenza di antiossidanti naturali e di componenti minoritari volatili e non volatili sono stati ampiamente studiati e discussi dal mondo scientifico [2, 3, 4].

In linea con la cultura della "dieta mediterranea" e con gli aspetti di carattere nutrizionale e funzionale sono i prodotti "evoluti" a base di olio di oliva. E' questo il caso degli oli di oliva aromatizzati che negli ultimi anni hanno suscitato un crescente interesse sia da parte dei produttori che da parte dei consumatori. Grazie alle riconosciute proprietà organolettiche e nutritive, infatti, il consumo di olio d'oliva aromatizzato ha registrato, negli ultimi anni, un rilevante incremento principalmente nei paesi del nord Europa, negli USA e in Canada, in cui si apprezzano particolarmente alimenti arricchiti di spezie e piante aromatiche [5, 6].

Le spezie e le piante aromatiche sono utilizzate fin dall'antichità per la conservazione di alimenti, per aromatizzare cibi e i loro oli essenziali vengono impiegati nelle preparazioni farmaceutiche, di cosmesi e di profumeria. Inoltre, le spezie e le piante aromatizzate sono ricche di selenio, di potassio e minerali essenziali e presentano rilevanti attività antimicrobiche e antiossidanti [7].

E' nata quindi la necessità di valorizzare e salvaguardare il prodotto nazionale, mettendone in luce le caratteristiche peculiari anche in vista di un aumento dell'esportazione. Nonostante ciò, il mercato italiano si presenta ancora piccolo e frammentato; gli oli aromatizzati rappresentano, infatti, un segmento produttivo e commerciale di cui si conosce ancora poco e trattandosi di un prodotto per certi versi nuovo, molto ancora è da delineare, soprattutto sul fronte legislativo, mancando ad oggi riferimenti certi e univoci. Al contrario di quanto accade per l'olio d'oliva, infatti, la mancanza di normativa potrebbe indurre ad utilizzare, per la produzione di oli aromatizzati, oli di oliva di partenza di scarsa qualità e non conformi alla commercializzazione ma che, una volta aromatizzati, potrebbero essere immessi sul mercato perché non sottoposti ad alcuna regolamentazione.

Tutt'oggi, infatti, l'unico metodo utilizzato per valutare la qualità del prodotto finito, è la valutazione da parte di un panel di assaggiatori appositamente addestrati.

L'obiettivo del presente lavoro, svolto nell'ambito del "Programma pluriennale di interventi diretti a favorire la ripresa produttiva del Molise", è stato lo studio di diverse tipologie di oli aromatizzati mediante Risonanza Magnetica Nucleare.

In questi ultimi anni, per poter studiare gli oli di oliva in maniera sempre più approfondita, sono state usate tecniche avanzate come la Risonanza Magnetica Nucleare [8, 14, 15] che, pur non essendo una tecnica convenzionale per l'analisi dell'olio, è riconosciuta come strumento fondamentale per l'analisi completa di questo alimento. L'NMR ha permesso infatti di avere informazione sull'origine geografica, la cultivar, la qualità e la genuinità di oli di oliva di diversa origine [8 – 21].

Nell'abito di questo lavoro sono state studiate diverse tipologie di oli aromatizzati quali oli aromatizzati all'arancia, al basilico, al bergamotto, al cardamomo, al limone, al mandarino, al peperoncino, al rosmarino, al tartufo e allo zenzero. In particolare è stato studiato il loro profilo metabolico mettendo in evidenza i composti caratteristici dello specifico olio ed è stata messa in luce la capacità della metodologia NMR nel rilevare la qualità dell'olio d'oliva impiegato per la realizzazione del prodotto finito.

6.1.1 Tecniche di produzione degli oli d'oliva aromatizzati

Le produzioni di olio aromatizzato possono variare sia per il tipo di olio utilizzato (extra vergine di oliva, olio di oliva, olio di semi o una miscela di questi) sia per il tipo di aroma (peperoncino, aglio, limone, mandarino, arancia, basilico, bergamotto, cardamomo, prezzemolo, origano, salvia, rosmarino, zenzero, funghi porcini, tartufo etc.).

Le tecnologie di produzione possono essere di vario tipo:

- *Olio – aroma – testimone*

Questa tecnologia consiste nell'aggiunta, nell'ultima fase della catena produttiva, di aroma e testimone (il frutto o il tralcio contenuto nell'olio) all'olio. Questa fase è probabilmente quella più semplice da gestire se il confezionatore acquista da terzi i singoli componenti, ma è anche assai delicata, perché attraverso il dosaggio dell'aroma si stabilisce l'intensità del flavour del prodotto finale, fondamentale nella scelta del consumatore. Gli aromi sono in massima parte di origine vegetale (sostanze aromatiche naturali) e in piccola parte sono sintetici (per lo più con struttura identica ai naturali).

- *Infusione – olio – testimone*

Questa tecnologia consiste nell'estrazione dell'olio essenziale ed addizione all'olio. Gli oli essenziali sono ottenuti per distillazione in corrente di vapore dalle piante, in condizioni di pressione e temperatura tali da non perdere l'aroma per decomposizione termica, idrolisi ed ossidazione, e successivamente separati dall'acqua, chiarificati e conservati.

- *Estrazione al frantoio – testimone*

Il processo di estrazione avviene utilizzando solventi vari (esano, metilene, acetone, etanolo, acqua), che vengono poi allontanati per distillazione. L'olio stesso, può costituire un buon solvente di estrazione. Esistono poi altri tipi di estrazione (con CO_2, per percolazione, macerazione, ultrasuoni).

- *Aggiunta di aroma alle olive in fase di macerazione e/o miscelazione*

In alcuni frantoi viene utilizzata una tecnica alternativa in cui viene aromatizzato l'olio durante la fase di estrazione. In particolare, per gli agrumi, le bucce, oltre che una certa quantità di succo, possono essere inseriti in gramola insieme con la pasta d'olive oppure gli agrumi interi possono essere franti, nel caso di impianti con molazze, insieme con le olive. La quantità di bucce e succo, oltre che il momento in cui questi debbono essere miscelati con la pasta d'olive o con le olive stesse, spesso è un "segreto industriale" del frantoiano che così produce un olio "unico" e aromatizzato. Le erbe aromatiche utilizzate per la produzione degli aromi oppure usate come testimone, dovrebbero essere sanitizzate prima di essere utilizzate, questo perché potrebbero avere una carica batterica troppo elevata e una presenza di batteri nocivi (*Salmonella spp.*, *Escherichia coli* etc.)[22, 23].

A causa delle diverse tecniche di produzione sopra elencate e della stagionalità delle piante aromatiche, un problema importante risulta essere la standardizzazione dell'intero protocollo di produzione al fine di ottenere un prodotto finale riproducibile.

Gli oli esaminati in questo studio sono stati ottenuti per aggiunta di aroma alle olive in fase di macerazione e/o miscelazione. Solo nel caso di oli al tartufo sono state utilizzate la procedura di infusione e la procedura di aggiunta diretta di aromi naturali.

6.2 *Materiali e Metodi*

6.2.1 *Campionamento*

I 19 campioni presi in esame, forniti dal Parco Scientifico e Tecnologico del Molise - *"Moliseinnovazione S.Cp.A."*- sono descritti in *Tabella 6.1*, dove sono riportati gli aromi, la parte della pianta utilizzata, l'anno di produzione e le diverse metodologie di preparazione.

Tabella 6.1. Caratteristiche dei campioni di olio d'oliva aromatizzato analizzati in questo lavoro. n.d.= informazione non disponibile

	Aroma	**Anno di produzione**	**Parte della pianta utilizzata**	**Quantità aggiunta (% in peso)**	**Metodo di preparazione**
1	Arancia	08-'09	buccia	n.d	aggiunta in fase di macerazione
2	Basilico	08-'09	foglie	n.d.	aggiunta in fase di macerazione
3	Basilico	07-'08	foglie	1	aggiunta in fase di macerazione
4	Bergamotto	08-'09	buccia	n.d.	aggiunta in fase di macerazione
5	Cardamomo	08-'09	semi	n.d.	aggiunta in fase di macerazione
6	Limone	08-'09	buccia	25	aggiunta in fase di macerazione
7	Limone	08-'09	buccia	25	aggiunta in fase di macerazione
8	Limone	08-'09	buccia	25	aggiunta in fase di macerazione
9	Limone	08-'09	buccia	8,5	aggiunta in fase di macerazione
10	Mandarino	08-'09	buccia	n.d.	aggiunta in fase di macerazione
11	Peperoncino	08-'09	frutto	25	aggiunta in fase di macerazione
12	Peperoncino	08-'09	frutto	12	aggiunta in fase di macerazione
13	Peperoncino	08-'09	frutto	6	aggiunta in fase di macerazione
14	Rosmarino	08-'09	foglie	25	aggiunta in fase di macerazione
15	Rosmarino	08-'09	foglie	20	aggiunta in fase di macerazione

16	Rosmarino	07-'08	foglie	10	aggiunta in fase di macerazione
17	Tartufo	08-'09	tubero	n.d.	infusione
18	Tartufo	07-'08	tubero	5	addizione di essenza naturale
19	Zenzero	08-'09	radice	n.d.	aggiunta in fase di macerazione

6.2.2 Misure NMR

I campioni sono stati preparati ponendo in un tubo NMR da 5 mm, 20 μL di olio d'oliva aromatizzato, 20 μL di dimetilsolfossido (DMSO) e 700 μL di cloroformio deuterato ($CDCl_3$). I tubi sono stati poi saldati mediante l'utilizzo di fiamma ossidrica.

Lo spettro protonico è stato acquisito immediatamente dopo la preparazione per evitare l'insorgere di fenomeni degradativi. Gli spettri protonici sono stati effettuati a 300 K su uno spettrometro Bruker AVANCE AQS600 operante alla frequenza protonica di 600,13 MHz (B_0 = 14,3 T) ed equipaggiato con una sonda Bruker multinucleare inversa con gradienti capace di produrre gradienti nella direzione *z* con una forza di 55.4 G cm-1.

I protoni residui dei solventi deuterati utilizzati per la preparazione del campione, $CDCl_3$ e DMSO, mostrano rispettivamente nello spettro ^{1}H NMR due segnali a 7,260 ppm e a 2,526 ppm. Questi segnali sono stati utilizzati per verificare la risoluzione dello spettro protonico: il segnale del $CDCl_3$ deve essere un singoletto simmetrico mentre la risonanza del DMSO deve avere la molteplicità di un quintupletto.

Gli spettri ^{1}H NMR sono stati condotti utilizzando le seguenti condizioni sperimentali: 1024 scansioni, impulso di $\pi/2$ (circa 8 μs); *time domain* (TD) 64 K punti; tempo di rilassamento più tempo di acquisizione 3.5 s; finestra spettrale di 18.5 ppm. Gli spettri ^{1}H NMR sono stati ottenuti mediante trasformata di Fourier (FT) del FID (*free induction decay*), applicando un valore di LB pari 0.3 Hz e uno *zero filling* di 64 K. Gli spettri protonici sono stati mesi in fase manualmente e i *chemical shifts* sono stati riportati rispetto al segnale del $CHCl_3$ (δ = 7.26 ppm) preso come riferimento.

Per poter comparare i segnali (*Tabella 6.3* e *6.4*), le loro intensità sono state misurate usando il programma di lettura semi-automatico del software Topspin Bruker ed effettuando una normalizzazione rispetto al segnale a 2.251 ppm, dovuto ai protoni metilenici legati al C2, a cui è stato dato il valore arbitrario di intensità pari a 1000.

Al fine di poter assegnare le risonanze presenti negli spettri dei diversi oli aromatizzati, sono stati effettuati esperimenti bidimensionali (^{1}H-^{1}H-COSY e ^{1}H-^{1}H-TOCSY) e sono stati utilizzati oli essenziali e composti standard (*Tabella 6.2*). E' stato quindi utilizzato il metodo delle aggiunte [11] che consiste nell'effettuare lo spettro dell'olio tal quale e lo spettro dell' olio in cui è stato aggiunto lo standard per poter poi confrontare i due spettri. Gli spettri protonici degli standard sono stati analizzati nelle medesime condizioni dei campioni di olio d'oliva aromatizzati.

Gli standard utilizzati sono riportati in *Tabella 6.2*.

Tabella 6.2: Oli essenziali e standard utilizzati per l'assegnazione degli spettri ^{1}H degli oli essenziali

Standard	***Purezza (fornitore)***
Alpha terpinene	Purum >95% (Sigma Aldrich)
Eucalyptolo	Puriss. P.a. terpene standard (Fluka)
Myrcene	Purum >95% (Fluka)
Linaloolo	Puriss. >99% (Sigma Aldrich)
Caspaicina	Puriss. >99% (Fluka)
Olio di Ginger	Fcc (SAFC)
Citral	95% (Sigma Aldrich)
Acido Rosmarinico	(Sigma Aldrich)
p-Cymene	Puriss. P.a. standard (Fluka)
Oli essenziali	***Purezza (fornitore)***
Arancio amaro	OTI srl Carsoli (AQ) (contenuto in sinefrina <30mg/10g)
Lemongrass	OTI srl Carsoli (AQ)
Mandarino	Erbavita Chiesanuova, rep San Marino
Bergamotto	Erbavita Chiesanuova, rep San Marino
Arancio dolce	Erbavita Chiesanuova, rep San Marino

Gli spettri 2D NMR sono stati condotti secondo le condizioni riportate in letteratura [10]: 1024 punti nella dimensione f2 e 512 nella dimensione f1 con un *recycle time* di 2s. Gli esperimenti ^{1}H-^{1}H-TOCSY sono stati registrati con un tempo di *spin lock* di 80 ms e sono stati processati in modalità *phase sensitive* con 512 x 512 *data points*. Gli esperimenti ^{1}H-^{1}H-COSY sono stati processati in modalità magnitudine con 512 x 512 *data points*.

6.3 *Risultati e Discussione*

6.3.1 ^{1}H Spettri NMR degli oli aromatizzati

Gli spettri ^{1}H NMR degli oli aromatizzati mostrano segnali caratteristici del tipo di aroma non presenti negli oli di oliva non aromatizzati. Questi segnali caratteristici sono stati assegnati grazie ad esperimenti bidimensionali e all'uso di oli essenziali o di standard. Gli spettri dei singoli oli aromatizzati sono discussi separatamente. In *Tabella 6.3* sono riportate le intensità dei segnali caratteristici degli oli aromatizzati e in *Tabella 6.4* le intensità dei segnali caratteristici degli oli di oliva.

6.3.1.1 Olio d'oliva aromatizzato al bergamotto

Lo spettro ^{1}H NMR dell'olio d'oliva aromatizzato al bergamotto mostra nove "nuovi" segnali a 7.05, 5.89, 5.37, 5.12, 4.64, 1.67, 1.47, 0.96, 0.66 ppm non presenti nello spettro di un olio d'oliva non aromatizzato.

Le nuove risonanze presenti nello spettro ^{1}H NMR dell'olio d'oliva aromatizzato al bergamotto sono state assegnate effettuando uno studio dettagliato dello spettro dell'olio essenziale al bergamotto e aggiungendo standard all'olio aromatizzato.

Dalla mappa TOCSY dell' olio essenziale al bergamotto è stato possibile attribuire i segnali a 4.64 e 5.37 ppm al limonene e il segnale a 5.12 ppm dell'α-pinene grazie ai caratteristici sistemi di spin (*Figura 6.1*). Le stesse risonanze presenti nell'olio di oliva aromatizzato sono state identificate, grazie ad uno studio dettagliato dello spettro ^{1}H anche sull'olio d'oliva aromatizzato al bergamotto (*Figura 6.2*).

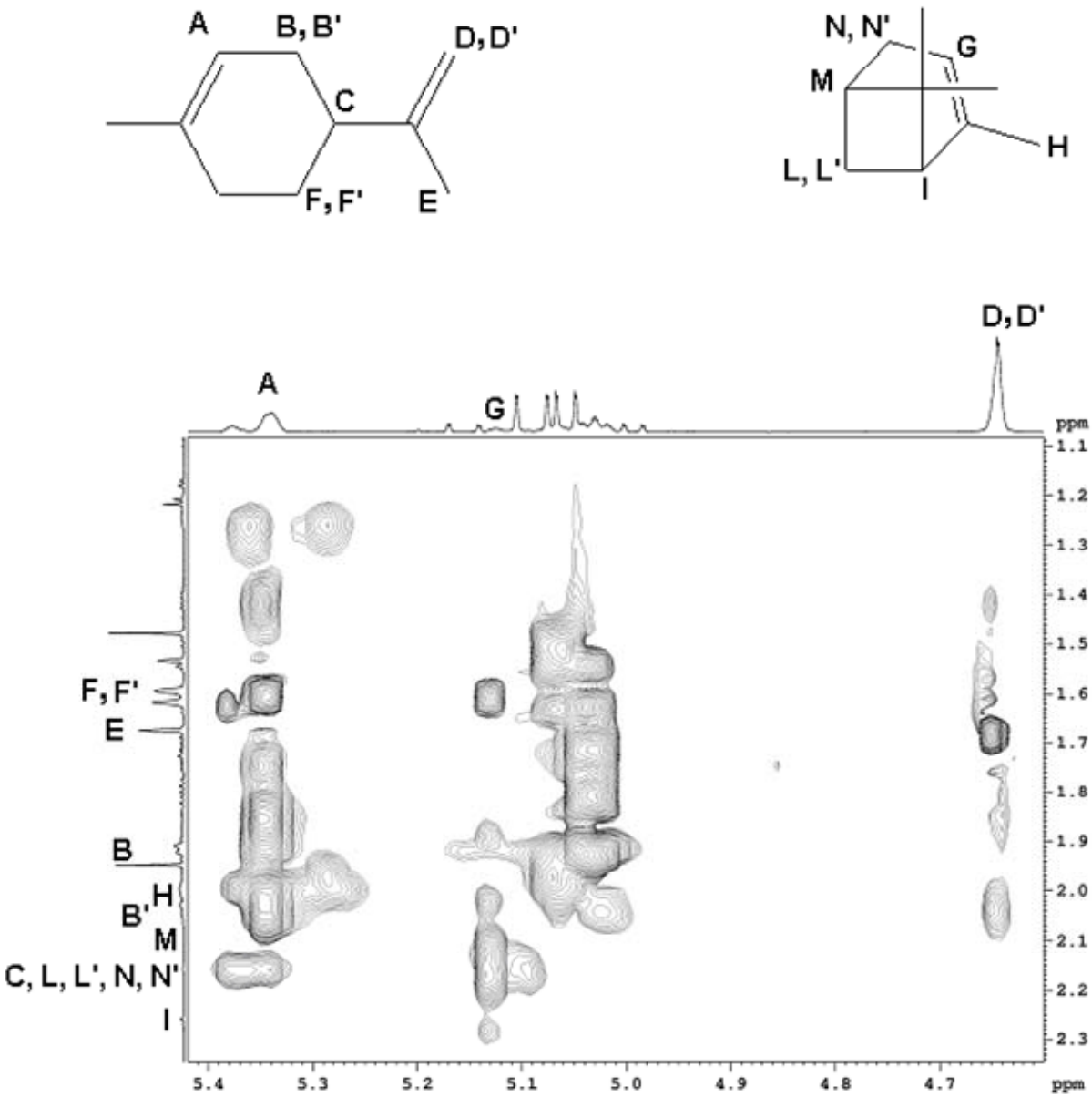

Figura 6.1. Mappa ^{1}H-^{1}H TOCSY di un campione di olio essenziale al bergamotto. Sono mostrati il sistema di spin del limonene (A-F) e il sistema di spin dell' α-pinene (G-N). La struttura del limonene e dell'α-pinene sono riportate rispettivamente in alto a destra e a sinistra

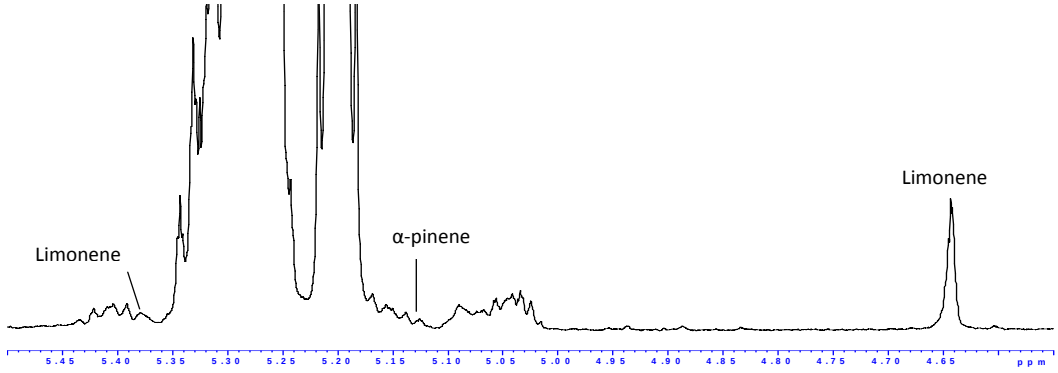

Figura 6.2 Regione dello spettro ^{1}H NMR di olio d'oliva aromatizzato al bergamotto: risonanze =CH e =CH_2 del limonene, =CH dell'α-pinene

Aggiungendo lo standard del linaloolo all' olio aromatizzato è stato possibile attribuire il segnale a 5.89 ppm, presente nello spettro ^{1}H dell' olio di oliva aromatizzato, al doppio doppietto di questo composto. In *Figura 6.3* è riportato lo spettro dell'olio aromatizzato e quello dello stesso campione a cui è stato aggiunto lo standard di linaloolo.

Il segnale a 7.05 ppm è stato attribuito, aggiungendo lo standard corrispondente, a un protone aromatico del *p*-cimene. Tali composti rilevati dall'NMR, sono componenti del bergamotto, come riportato in letteratura [24, 25].

I segnali a 1.67, 1.47, 0.96, 0.66 ppm non sono stati assegnati.

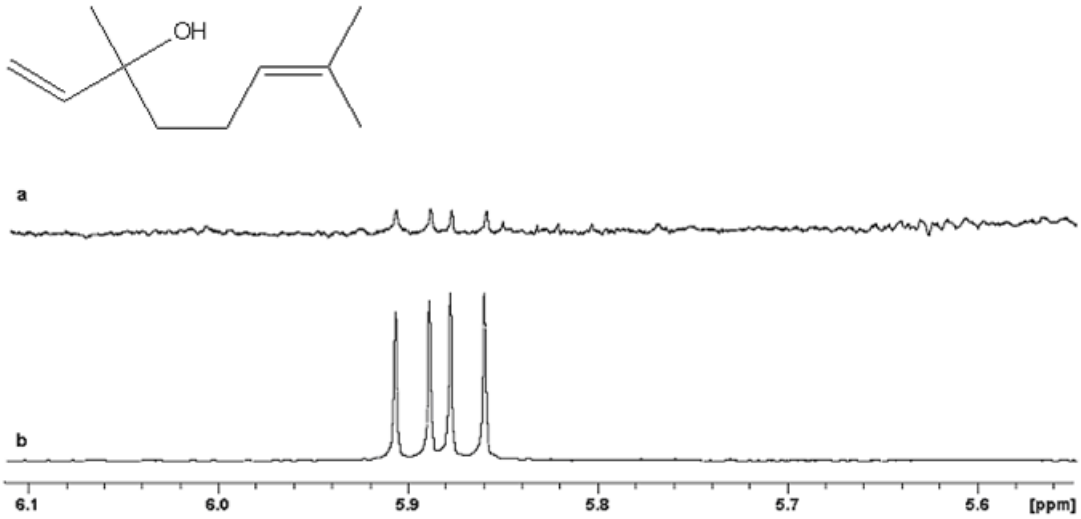

Figure 6.3. Regione dello spettro ^{1}H NMR tra 5.5 e 6.1 ppm dell' olio d'oliva aromatizzato al bergamotto (a) e dell'olio d'oliva al bergamotto a cui è stato aggiunto lo standard del linaloolo (b)

6.3.1.2 *Olio d'oliva aromatizzato all'arancia*

Lo spettro ^{1}H NMR dell'olio d'oliva aromatizzato all'arancia è caratterizzato dalla presenza di nuovi segnali (5.12, 4.95, 4.64, 1.72, 1.67, 1.59, 0.96 e 0.66 ppm) non presenti nello spettro protonico di un olio extra-vergine d'oliva. Sono anche presenti segnali di bassa intensità a 5.37, 1.41, 1.38 ppm.

I segnali presenti a 5.37 e a 4.64 ppm sono caratteristici del protone metinico e del protone metilenico del limonene mentre il segnale a 5.12 ppm è attribuibile al protone metinico dell'α-pinene.

I segnali presenti a 1.41 e a 1.38 ppm sono stati assegnati ai gruppi CH_2 del cicloesano della molecola del 1,8-cineolo. Questa assegnazione è stata possibile grazie all'aggiunta dello standard di questo composto (*Tabella 6.2*) al campione di olio aromatizzato e al confronto tra gli spettri dell'olio aromatizzato tal quale e con aggiunta di standard (*Figura 6.4*).

Tali composti rilevati dall'NMR, sono componenti dell'arancia, come riportato in letteratura [24, 26, 27].

I segnali presenti a 4.95, 1.72, 1.67, 1.59, 0.96 e 0.66 ppm non sono stati ancora assegnati.

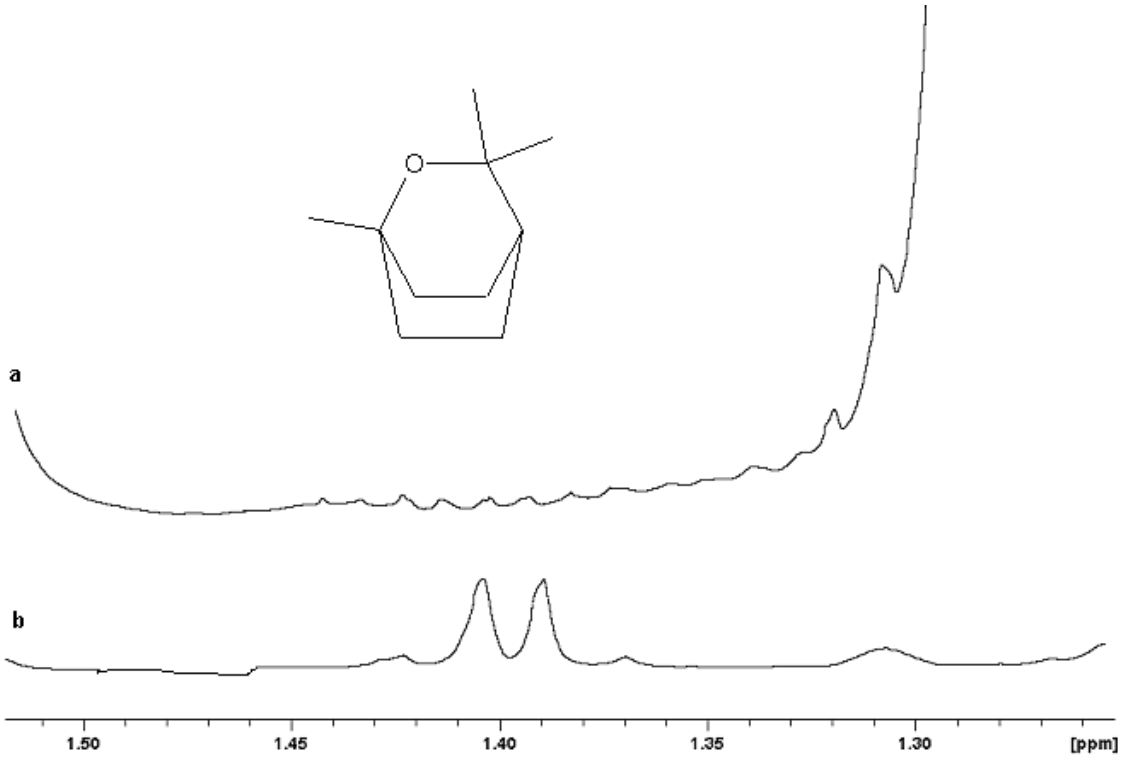

Figura 6.4. Regione dello spettro ^{1}H NMR (a) di olio aromatizzato all'arancia e (b) dello stesso olio a cui è stato aggiunto 1,8-cineolo standard

6.3.1.3 Olio d'oliva aromatizzato al limone

Sono stati analizzati campioni di oli di oliva aromatizzati al limone preparati con una diversa quantità di aroma: 3 campioni preparati con il 25% di aroma in peso e un campione preparato con l'8.5% di aroma (*Tabella 6.1*). Tutti i campioni mostrano la presenza delle risonanze del limonene (4.64 ppm e 5.37 ppm), dell'α-pinene (5.12 ppm), del β-pinene (4.56 e 4.49 ppm) (in tracce) e del *p*-cimene (7.05 ppm) [24-26]. E' importante notare che il segnale del *p*-cimene, è presente in quantità rilevabili sono nei campioni preparati con una maggiore quantità di aroma (25 %).

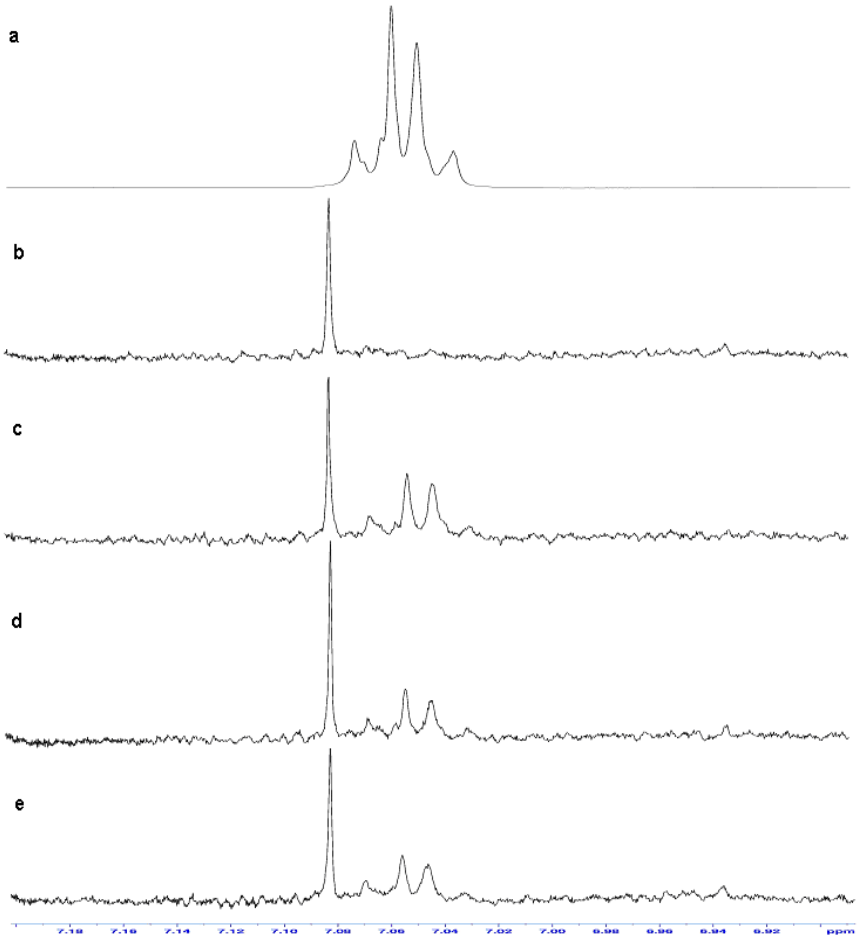

Figura 6.5. Regione dello spettro ^{1}H NMR tra 6.0 e 7.2 ppm: sono mostrate le risonanze dei protoni aromatici di *p*-cimene nello standard (a) e nei campioni di oli d'oliva aromatizzati al limone (b-e). Solo nel caso del campione di olio prodotto con aggiunta di bassi quantitativi di aroma (8.5% in peso) (b), il *p*-cimene non è rilevabile

Nei tre campioni ottenuti con una maggiore percentuale di aroma aggiunto sono presenti, nello spettro, due doppietti a 9.83, 9.93 ppm attribuibili a composti aldeidici (*Figura 6.6*) caratteristici di questo tipo di oli, non presenti in altri oli aromatizzati e negli oli di oliva non aromatizzati.

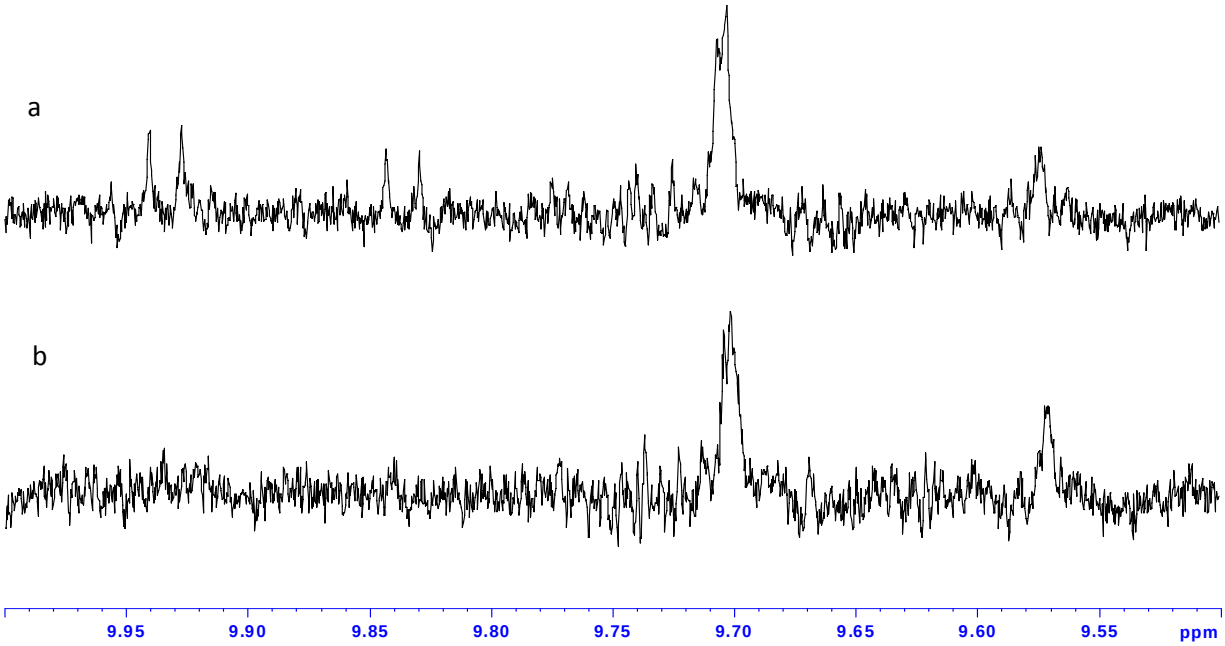

Figure 6.6. Regione aldeidica dello spettro ^{1}H NMR di olio d'oliva aromatizzato al limone (a) e di un altro olio di oliva aromatizzato all'arancia (b)

Tali composti rilevati dall'NMR, sono componenti nel limone, come riportato in letteratura [24, 25].

Nei campioni presi in esame è stata riscontrata anche la presenza di altri segnali non ancora assegnati: il segnale a 0.66 ppm è presente in tutti i campioni olio d'oliva aromatizzato al limone, mentre i segnali a 7.65, 5.59, 2.54, 1.72, 1.67, 1.59 e 0.96 ppm sono presenti solo in alcuni campioni (*Tabella 6.3*).

I 4 campioni analizzati presentano inoltre differenze nel contenuto di composti caratteristici dell'olio di oliva di partenza, ovvero di esanale (9.70 ppm) e trans-2-esenale (9.45 ppm), di squalene (1.62 ppm), terpene 4 (4.89 ppm) e terpene 3 (4.66 ppm).

Le differenze nei composti volatili, aldeidi e terpeni, potrebbero dipendere oltre che dalle diverse caratteristiche dell'olio di partenza anche dai diversi processi di produzione utilizzati. Dei 4 campioni analizzati infatti due campioni (n°6 e 9, *Tabella 6.1*) sono stati sottoposti ad una gramolatura blanda (30 minuti, a 25 °C) mentre gli altri due (n°7 e 8, *Tabella 6.1*) ad una gramolatura spinta (60 minuti a temperatura di circa 26 °C). Il processo di produzione spinto ha determinato la

presenza nei campioni 7 e 8 di una minore quantità dei composti volatili quali esanale, trans-2-esenale, squalene e terpene 4 e una maggiori quantità di terpene 3.

6.3.1.4 Olio d'oliva aromatizzato al rosmarino

Lo spettro protonico dei tre campioni di olio aromatizzato al rosmarino (di annata diversa e percentuale diversa di pianta aggiunta) analizzati mostra la presenza del segnale a 9.71 ppm caratteristico dell'acido rosmarinico. Inoltre è stata riscontrata la presenza in tracce di α-pinene (5.12 ppm) e limonene (4.64 ppm e 5.37 ppm).

I composti rilevati dall'analisi NMR, sono componenti del rosmarino, come riportato in letteratura [24, 25].

Uno dei tre campioni presenta segnali non ancora assegnati a 6.57, 2.43 e a 0.99 ppm; mentre un altro campione mostra i segnali a 1.67 e 0.96 ppm.

6.3.1.5 Olio d'oliva aromatizzato al peperoncino

I tre campioni presi in esame sono stati prodotti per aggiunte di quantità differenti di peperoncino (*Tabella 6.1*) e appartengono tutti alla stessa annata '08/'09.

I segnali del limonene, a 4.64 e 5.37 ppm, sono presenti in tutti i campioni, mentre il campione ottenuto con il maggior quantitativo di aroma aggiunto (25%) (*Tabella 6.2*) è l'unico a mostrare due nuovi segnali non ancora assegnati a 3.81 e 1.67 ppm.

Tali composti rilevati dall'NMR, sono componenti del peperoncino, come riportato in letteratura [24, 25].

E' da notare che lo spettro protonico, che permette di rilevare composti in concentrazioni non inferiori a 100 mM, non permette di rilevare la presenza di capsaicina composto caratteristico del peperoncino, presente nella pianta mediamente da un minimo di 0.1 ad un massimo di 1.5 % in peso [24, 25].

6.3.1.6 Olio d'oliva aromatizzato al cardamomo

Lo spettro protonico di quest'olio aromatizzato mostra i segnali caratteristici del 1,8-cineolo, ovvero il CH_3 a 1.38 ppm e il CH_2 a 1.41 ppm.

Gli spettri hanno mostrato la presenza in tracce di α-pinene (5.12 ppm), di limonene (5.37 ppm, 4.64 ppm) e di linaloolo (5.89 ppm) (*Tabella 6.3*).

Tali composti rilevati dall'NMR, sono componenti del cardamomo, come riportato in letteratura [24, 25, 27, 28].

È stata riscontrata, inoltre, la presenza di segnali non ancora assegnati a 1.35, 0.99 e 0.96 ppm.

6.3.1.7 Oli di oliva aromatizzati al mandarino, allo zenzero, al tartufo bianco e al basilico

Sono stati presi in esame anche oli aromatizzati al mandarino, allo zenzero, al tartufo bianco e al basilico.

Nell'olio aromatizzato al mandarino è stata individuata la presenza di limonene (5.37 e 4.64 ppm) e di 1,8-cineolo (1.41 e 1.38 ppm). Negli spettri sono presenti, inoltre, altri segnali a 4.95, 1.72, 1.67, 1.59, 0.96, 0.66 ppm non ancora assegnati.

Nell'olio aromatizzato allo zenzero si notano la presenza di un nuovi segnali: due dovuti al limonene (5.37 e 4.64 ppm) e altri presenti a 7.65, 7.48 e 6.98 ppm. Il segnale a 6.98 ppm è probabilmente dovuto al curcumene, composto presente nello zenzero [24, 25, 29].

I campioni di olio aromatizzato al tartufo sono stati ottenuti con due diversi metodi: uno si è ottenuto per infusione e l'altro per aggiunta diretta di aromi naturali. Gli spettri non mostrano differenze significative con l'olio di oliva non aromatizzato suggerendo che i composti caratteristici dell'aroma o non sono rilevabili con la spettroscopia NMR o sono sovrapposti a segnali principali.

I campioni di olio aromatizzato al basilico sono stati prodotti in due differenti annate: '07/'08 e '08/'09 (*Tabella 6.1*). Nell'olio aromatizzato al basilico è presente il segnale a 0.99 ppm non ancora assegnato. Nel campione di olio al basilico più vecchio sono state individuate, inoltre, le risonanze a 5.65 e 5.59 ppm dovute probabilmente a degradazione di composti provenienti dalla pianta aromatica.

6.3.2 *Qualità dell'olio d'oliva aromatizzato*

Mediante l'uso della spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare è possibile valutare la qualità dell'olio d'oliva di partenza utilizzato per la produzione dell'olio aromatizzato. Infatti dallo spettro protonico è possibile misurare i digliceridi e i monogliceridi che danno, in maniera indiretta, indicazioni sull'acidità dell'olio.

Nell'olio d'oliva sono presenti trigliceridi che per scissione enzimatica vengono degradati a digliceridi *sn* 1,2 in maggiore quantità e in digliceridi *sn* 1,3.
I digliceridi a loro volta sono scissi, nel tempo, in monogliceridi. Oli giovani o ben conservati contengono una bassa concentrazione di digliceridi ed un alto rapporto *sn* 1,2/*sn* 1,3 dovuto alla netta prevalenza dei digliceridi *sn* 1,2. Oli vecchi o lampanti presentano invece una quantità di digliceridi elevata, una significativa presenza di *sn* 1,3 digliceridi e una quantità apprezzabili di monogliceridi.

È possibile, in questo modo, sapere se l'olio d'oliva impiegato per la realizzazione del prodotto finito è di qualità o se l'aggiunta di aromi è stata effettuata per mascherare eventuali difetti sensoriali dell'olio stesso e poter quindi immettere nel mercato oli di bassa qualità non altrimenti commerciabili perché soggetti alla normativa degli oli di oliva.

In *Figura 6.7* sono messi a confronto gli spettri protonici di due campioni di olio d'oliva aromatizzato di diversa "qualità". Lo spettro riportato in alto (a) mostra la prevalenza di *sn* 1,2 digliceridi rispetto agli *sn* 1,3 e non mostra segnali dovuti ai monogliceridi suggerendo quindi che la produzione di olio aromatizzato è stata effettuata partendo da un olio di oliva di buona qualità.

Lo spettro riportato in basso (b) mostra, invece, una presenza significativa di *sn* 1,3 digliceridi e di 1-monogliceridi e 2-monogliceridi tipica di un olio vecchio o comunque conservato male (*Figura 6.7*).

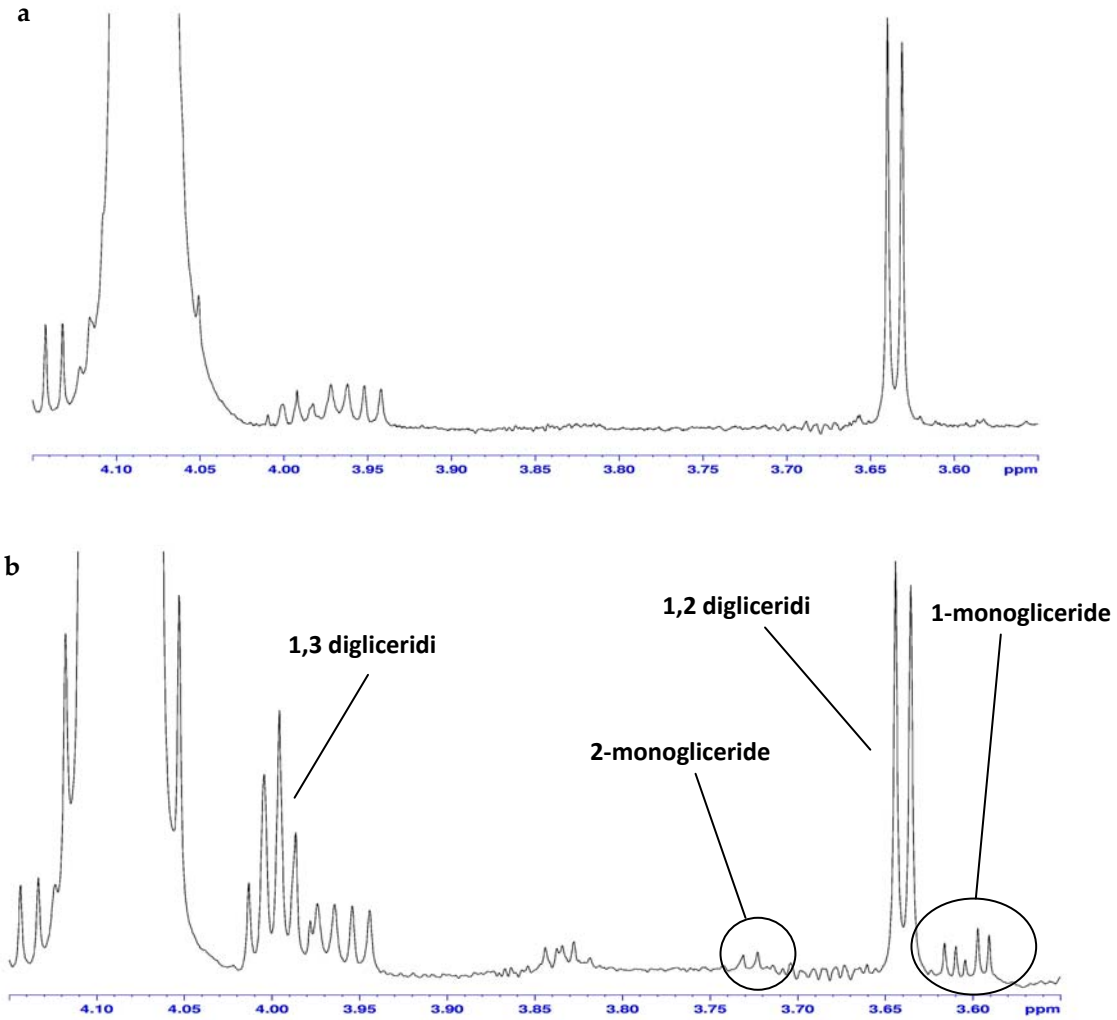

Figura 6.7. Regione dello spettro ^{1}H NMR di (a) olio d'oliva giovane e/o ben conservato e (b) olio d'oliva vecchio e/o mal conservato

Nel caso specifico, gli oli di oliva aromatizzati presi in esame hanno mostrato i seguenti risultati.

❖ *Campioni di oli aromatizzati al limone*.

Il rapporto *sn* 1.2/*sn* 1.3 digliceridi è risultato ottimale nel campione con una minore quantità di aroma aggiunto. Una quantità particolarmente elevata di *sn* 1.3 digliceridi è stata riscontrata, invece, in uno degli oli preparati con una percentuale maggiore di aroma che mostra, inoltre, anche la presenza di monogliceridi (*Tabella 6.4*). Tale risultato suggerisce quindi la bassa qualità dell'olio d'oliva utilizzato per la preparazione dell'aromatizzato in esame.

❖ *Campioni di oli aromatizzati al rosmarino.*

E' interessante osservare che campioni di annate differenti risentono poco dell'invecchiamento. Dei tre campioni analizzati, due sono stati prodotti nella stagione '08-'09, e uno nell'annata '07-'08 (*Tabella 6.1*). Gli spettri ^{1}H dei tre campioni hanno mostrato che il rapporto *sn* 1,2/*sn* 1,3-digliceridi rimane quasi costante indipendentemente dalla diversa "età" del campione.

Tale risultato potrebbe essere dovuto all'azione dell'acido rosmarinico che sembra essere in grado di prevenire l'ossidazione dell'olio d'oliva [6, 30-34]. Infatti l'olio aromatizzato al rosmarino è ricco di acido rosmarinico e di derivati dell'acido caffeico che hanno una forte attività anti-radicalica. Inoltre, l'olio d'oliva aromatizzato al rosmarino, contiene clorofilla e carotenoidi, composti in grado di resistere all'ossidazione termica [35]. Inoltre l'attività antiossidante dell'estratto può essere in parte dovuta alla presenza di composti fenolici come ad esempio i flavonoidi [36]. E' possibile che le proprietà e gli effetti di tali composti siano state conferite all'olio durante il processo di produzione, ovvero durante il tempo di macerazione della pianta aromatica nell'olio d'oliva [6].

❖ *Campioni di oli aromatizzati al peperoncino*

È stato notato che il campione prodotto con maggior quantitativo di spezia (25% in peso) presenta un rapporto *sn* 1,2/*sn* 1,3 digliceridi notevolmente più basso rispetto ai campioni prodotti con quantitativi di spezia inferiore (*Tabella 6.4*); si potrebbe supporre che i composti presenti nel peperoncino abbiano favorito in qualche modo i processi degradativi dell'olio d'oliva [23].

Inoltre, uno dei campioni presenta quantità rilevanti di 1- e 2-monogliceridi suggerendo la cattiva qualità del prodotto di partenza.

❖ *Campioni di oli aromatizzati al tartufo e al basilico*

I campioni di tali oli aromatizzati sono stati prodotti in due differenti annate ovvero '07/'08 e '08/'09.

Dal rapporto *sn* 1.2/*sn* 1.3 digliceridi è stato possibile confermare la migliore qualità dei campioni "giovani" rispetto a quelli dell'annata precedente.

Code / ppm						para cimene			linalole			limonene	alpha pinene		limonene	beta pinene	beta pinene								1,8 cineole	1,8 cineole				
	9.93	**9.83**	**9.71**	**7.65**	**7.48**	**7.05**	**6.98**	**6.57**	**5.89**	**5.65**	**5.59**	**5.37**	**5.12**	**4.95**	**4.64**	**4.56**	**4.49**	**3.81**	**2.54**	**2.43**	**1.72**	**1.67**	**1.59**	**1.47**	**1.41**	**1.38**	**1.35**	**0.99**	**0.96**	**0.66**
1												p.o.	t	0.27	21.44						2.69	48.93	38.45		t	t			1.68	0.18
2																												0.34		
3										0.31	0.19																	0.31		
4						0.24			0.48			p.o.	t		4.75							9.97		6.71					1.60	0.48
5									t			p.o.	t		0.82										t	8.35	8.22	6.52	1.64	
6	t	t		0.45		0.51					0.15	p.o.	t		11.79	t	t		0.66		1.75	24.77	24.89						6.15	0.39
7	t	t				0.72						p.o.	t		14.78	0.14	0.17					31.82								1.84
8												p.o.	t		4.51	t	t													0.68
9	t	t				0.46					0.15	p.o.	t		13.83	t	t		0.76		1.85	30.28	26.15						10.68	2.12
10												p.o.		0.46	33.41						3.60	72.69	50.52		t	t			26.66	0.61
11												p.o			0.66			0.44				1.19								
12												p.o			0.29															
13												p.o			0.21															
14			t					1.75				p.o	t		t					0.37								2.75		
15			t									p.o	t		0.93							2.37								0.39
16			t									p.o	t		t															
17																														
18																														
19				t	0.15		t					p.o.			0.46															

Tabella 6.3. Segnali particolari degli oli aromatizzati; sono riportate anche le intensità normalizzate di tali segnali. t = tracce; p.o. = parzialmente sovrapposti

code /	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q
ppm	**9.70**	**9.45**	**4.89**	**4.66**	**4.60**	**4.53**	**4.00**	**3.65**	**2.74**	**2.70**	**1.62**	**1.25**	**1.20**	**0.98**	**0.92**	**0.84**	**0.62**
1	0.24	0.15	0.18	0.00	0.43	0.49	0.56	12.34	9.74	100.36	16.92	2624.18	3054.21	1.19	17.81	121.98	5.25
2	0.18	0.25	0.15	0.28	0.22	0.80	0.58	12.60	11.00	97.05	20.90	2583.48	3073.27	0.68	20.35	117.00	5.59
3	0.19	0.28	0.19	0.37	0.34	0.28	3.20	6.14	8.31	97.41	15.82	2539.32	3102.16	0.96	16.35	112.18	4.59
4	0.21	0.24	0.21	0.82	0.51	0.36	0.76	12.27	8.77	94.94	14.63	2575.79	3022.52	1.60	15.20	120.96	4.90
5	0.20	0.16	0.20	0.00	0.20	0.69	0.46	12.09	11.80	84.99	18.02	2577.96	3276.40	0.59	19.99	100.78	5.87
6	0.33	0.30	0.39	0.00	0.24	0.36	1.03	10.14	9.50	91.40	14.75	2652.46	3016.62	0.72	15.42	114.33	4.56
7	0.17	0.14	0.14	0.85	0.44	0.31	1.40	8.30	8.71	91.80	10.11	2582.73	3413.75	1.37	15.06	105.38	4.68
8	0.11	0.11	0.11	0.97	0.72	0.25	0.32	9.41	8.30	107.92	13.91	2523.48	3575.93	2.00	14.34	122.58	3.93
9	0.21	0.21	0.18	0.00	0.33	0.15	1.43	13.02	8.74	105.82	16.99	2556.64	3033.80	1.00	15.69	121.53	3.94
10	0.24	0.15	0.18	0.00	0.43	0.49	0.55	12.34	9.74	100.36	16.92	2624.18	3054.21	1.19	17.81	121.98	5.25
11	0.16	0.13	0.09	0.66	0.57	0.38	1.31	10.59	8.83	93.41	12.16	2565.05	3140.93	1.60	16.33	115.33	4.49
12	0.07	0.14	0.11	0.94	0.79	0.22	0.32	11.26	7.34	108.72	11.87	2457.46	3596.31	2.52	13.70	127.92	3.42
13	0.15	0.18	0.32	0.35	0.27	0.21	0.27	12.71	9.73	88.71	22.94	2539.92	2948.11	0.59	18.96	108.46	3.74
14	0.07	0.04	0.04	0.89	0.67	0.34	0.37	10.38	9.49	123.52	9.90	2442.24	3720.41	2.01	17.15	147.14	5.02
15	0.11	0.07	0.11	0.97	0.83	0.29	0.29	10.73	7.57	108.58	12.63	2468.87	3588.25	1.97	13.78	128.24	3.62
16	0.16	0.97	0.16	0.39	0.36	0.36	0.36	12.27	9.42	86.23	10.91	2601.17	3246.82	1.14	17.57	123.41	4.55
17	0.21	0.12	0.18	0.82	0.67	0.27	0.27	10.69	10.02	101.48	7.08	2770.44	3027.34	0.91	14.90	110.50	4.84
18	0.18	0.15	0.24	0.33	0.21	0.18	2.36	5.76	9.18	94.31	19.09	2591.54	3029.45	0.76	15.94	111.24	4.21
19	0.31	0.34	0.31	0.34	0.21	0.64	1.10	11.27	10.39	90.16	17.95	2613.53	3046.92	0.61	17.37	103.87	5.03

Tabella 6.4. Intensità normalizzate di: **a**, Esanale; **b**, *Trans* 2-Esenale; **c**, Terpene 4; **d**, Terpene 3; **e**, Terpene 2; **f**, Terpene 1; **g**, protoni metilenici in α del glicerolo di *sn* 1,3 digliceridi; **h**, protoni metilenici in α del glicerolo di *sn* 1,2 digliceridi; **i**, protoni diallilici dell'acido linolenico; **j**, protoni diallilici dell'acido linoleico; **k**, squalene; **l**, protoni metilenici di tutti gli acidi grassi insaturi; **m**, protoni metilenici dell'acido palmitico e stearico; **n**, cere; **o**, metili dell'acido linolenico; **p**, metili dell'acido linoleico; **q**, metile-18 del β-sitosterolo.

6.4 *Referenze*

[1] M. Solinas. Problematiche qualitative dell'olio d'oliva. University of Sassari (Italy) 23-56, (1990)

[2] Tsimidou M., Papadopoulos G., Boskou D. (1992) Phenolic compounds and stability of virgin olive oil-Part I. *Food Chem.*, **45**, 141-144

[3] Massana L., Camprubi M., Sarda P., Sola R., Joven J., Turner P.R. (1991) The Mediterranean-type diet: is there a need for further modification? *Am. J. Clin. Nutr.,* **52**, 886- 889

[4] Mancini M., Giacco R. (1993) Olive oil in the prevention of cardiovascular diseases. *Olivae* **47**, 24-25

[5] Auton N., Tsimidou M. (1997) Gourmet olive oils: stability and consumer accetability studies. *Food Res. Int.,* **30**, 131-136

[6] Ayadi M.A., Grati-Kamoun N., Attia H. (2009) Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food Chem. Toxicol.,* **47**, 2613-19

[7] Loo A., & Richard H. Origine et propriétés des épices et des aromates bruts. In: Richard H (ed) *Épices et Aromates*. TEC &. DOC, Paris, 18–22, (1992)

[8] Mannina L., Calcagni C., Rossi E., Segre A.L. (2003) Review about olive oil characterization using high-field nuclear magnetic resonance. *Anal. Chem.,* **93**, 97-103

[9] Mannina L., Luchinat C., Emanuele M.C., Segre A.L. (1999) Acyl positional distribution of glycerol tri-esters in vegetable oils: a ^{13}C NMR study. *Chem. Phys. Lipids,* **103**, 47-55

[10] D'Imperio M., Mannina L., Capitani D., Bidet O., Rossi E. *et al*, (2007) NMR and statistical study of olive oils from Lazio: a geographical, ecological and agronomic characterization. *Food Chem.,* **105**, 1256-67

[11] Mannina L., Luchinat C., Patumi M., Emanuele M.C., Rossi E. *et al*, (2000) Concentration dependence of ^{13}C NMR spectra of triglycerides: implications for the NMR analysis of olive oils. *Magn. Reson. Chem.,* **38**, 886-90

[12] Mannina L., Patumi M., Proietti N., Bassi D., Segre A.L. (2001) Geographical characterization of Italian extra virgin olive oils using high field ^{1}H-NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.,* **49**, 2687-96

[13] Mannina L., Patumi M., Proietti N., Segre A.L. (2001) P.D.O. (Protected Designation of Origin) "Geographical Characterization of Tuscan Extra Virgin Olive Oils using High-Field ^{1}H NMR spectroscopy. *Ital. J. Food Sci.,* **13**, 53-63

[14] Mannina L., Sobolev A.P., Segre A.L. (2003) Olive oil as seen by NMR and chemometrics. *Spectrosc. Eur.,* **15/3**, 6-14

[15] Sacchi R., Mannina L., Fiordiponti P., Barone P., Paolillo L. *et al,* (1998) Characterization of Italian extra virgin olive oils using ^{1}H-NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.,* **46**, 3947-51

[16] Sacchi R., Patumi M., Fontanazza G., Barone P., Fiordiponti P. *et al,* (1996) A high field ^{1}H-NMR study of the minor components in virgin olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.,* **73**, 747-58

[17] Mannina L., D'Imperio M., Lava R., Schievano E., Mammi S. (2005) Caratterizzazione NMR e analisi statistica di oli di oliva DOP veneti. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **82**, 59-63

[18] Vigli G., Philippidis A., Spyros A., Dais P. (2003) Classification of edible oils by employing ^{31}P and ^{1}H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A roposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.,* **51**, 5715-22

[19] Hidalgo F.J., Gomez G., Navarro J.L., Zamora R. (2002) Oil stability prediction by High-Resolution ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.,* **50**, 5825-31

[20] Guillèn M.D., Ruiz A. (2003) Edible oils: discrimination by ^{1}H nuclear magnetic resonance. *J. Scie Food Agricul.,* **83**, 338-46

[21] García-González D.L., Mannina L., D'Imperio M., Segre A.L., Aparicio R. (2004) Use of ^{1}H and ^{13}C NMR techniques combined with Artificial Neural Networks to detect the adulteration of olive oil with hazelnut oil. *Eur. Food Res. Technol.,* **219**, 545-48

[22] Moldao-Martins M., Beirao-da-Costa S., Neves C., Cavaleiro C., Salgueiro L., Beirao-da-Costa M.L. (2004) Olive oil flavoured by the essential oils of *Mentha piperita* and *Thymus mastichina L. Food Qual. Prefer.,* **15**, 447-452

[23] Ciafardini G., Zullo B.A. (2004) Presence of microorganisms in flavored extra virgin olive oil. *Anal. Microb.*, **52**, (2), 33-40

[24] Leung A.Y., Foster S. Encyclopedia of Common Natural Ingredients used in Food, Drugs and Cosmetics (2nd Edition) ed.; Hoboken, NJ, USA, Vol. XXXV, (2003)

[25] Mills S.Y. The essential book of Herbal Medicine. Penguin: London, (1991)

[26] Verzera A., Trozzi A., Dugo G., Di Bella G., Cotroneo A. (2004) Biological lemon and sweet orange essential oil composition. *Flavour Fragrance J.*, **19**, 544-548

[27] Adegoke G.O., Jagan Mohan Rao L., Shankarachatya N.B. (2004) Plasticial effect on lemon/sweet orange essential oil *Flavour Fragrance J.*, **91**, 445-465.

[28] Adegoke G.O., Jagan Mohan Rao L., Shankaracharya N.B. (1998) A comparison of the essential oils of Aframomum daniellii (Hook. f.) K. Schum. and Amomum subulatum Roxb. *Flavour Fragance J.*, **13**, 349-352

[29] Bone K. (1997) Ginger. *Brit. J. Phytother.*, **4**(3), 110-120

[30] Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Jovin E. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L., Lamiaceae*) essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 7879-7885

[31] Antoun N., Tsimidou M. (1997) Gourmet olive oils: stability and consumer accetability studies. *Food Res. Intern.*, **30** (2), 131-136

[32] Exarchou V., Troganis A., Gerothanassis I.P., Tsimidou M., Boskou D. (2001) Identification and quantification of caffeic and rosmarinic acid in complex plant extracts by the use of variable-temperature two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Agric. Food Chem.*, **49** (11), 5165–5170

[33] Aruoma G.L., Spencer J.P.E., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A., Butler J., Halliwell B. (1996) An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extract of rosemary and provencial herbs. *Food Chem. Toxicol.*, **34**, 449-456

[34] Haraguchi H., Saito T., Okamura N., Yagi A. (1995) Inhibition of lipid peroxidation and supeoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Med.*, **61**(4), 333-336

[35] Czygan I., Czygan F.C. (1997) Rosmarin - Rosmarinus officinalis. *L. ZPZ*, **18**(3), 182-186.

[36] Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanassis I.P., Troganis A., Boskou D. (2002) Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from greek oregano, greek sage, and summer savory *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5294-5299

CAPITOLO 7

GELATINA REALE:

STUDIO PRELIMINARE DEL PROFILO METABOLICO E DISCRIMINAZIONE TRA PRODOTTI DI DIVERSA ORIGINE GEOGRAFICA

7.1 *Introduzione*

La gelatina reale è considerato il prodotto più pregiato dell'alveare: è una secrezione ottenuta dall'elaborazione di polline e miele operata dalle ghiandole ipofaringee e mascellari delle api operaie (*Apis mellifera*). Questo prodotto è di consistenza cremosa, di colore biancastro ed ha un odore ed un sapore molto acido. La gelatina reale viene distribuita dalle api operaie a tutte le giovani larve limitatamente ai primi tre giorni di vita e successivamente resta l'alimento esclusivo dell'ape regina [1, 2, 3].

Numerosi studi hanno dimostrato le diverse attività farmacologiche di questo particolare alimento; è un antimicrobico [4], vasodilatatore, ipotensivo e disinfettante, favorisce la crescita, presenta attività anti-ipercolesterolemica e antinfiammatoria [5]. Anche se non sono ancora disponibili dati clinici, è riportata la sua capacità di rallentare l'invecchiamento cellulare [6].

La gelatina reale trova inoltre applicazioni come integratore alimentare e come ingrediente per alimenti e prodotti cosmetici e viene utilizzata tal quale, liofilizzata o miscelata ad altri componenti (miele o estratti vegetali). Le proprietà benefiche che le vengono attribuite sono quelle di regolarizzare la pressione, contrastare la fatica fisica, aumentare l'appetito e la capacità di concentrazione intellettuale.

La gelatina reale è caratterizzata da una composizione relativamente costante e, a differenza di altro materiale biologico che le api traggono dalle piante, dopo la secrezione non viene rielaborata ma direttamente immessa nella cella che viene poi sigillata. E' composta da acqua (60%), zuccheri quali glucosio, fruttosio e saccarosio (14%), proteine (13%) e lipidi (4.5%). Sono anche presenti costituenti minori, quali: amminoacidi essenziali, vitamine del gruppo B, vitamina A, vitamina C, vitamina D, inositolo, calcio, rame, ferro, fosforo, potassio, silicio, zolfo [7].

La Cina è il maggior produttore nonché esportatore mondiale di gelatina reale, con una produzione annua stimata in circa cinquecento tonnellate, che supera i 3/5 della produzione mondiale [8]. Purtroppo però, il prolungato tempo di stoccaggio, i lunghi tempi di trasporto e l'uso che è stato fatto in Cina di sostanze non ammesse in Europa, come il cloramfenicolo, fanno si che la gelatina reale arrivi nel paese d'importazione con caratteristiche qualitative scadenti. Tali problematiche hanno influenzato il mercato che ha subito notevoli perturbazioni, culminante con il blocco delle importazioni dirette.

Questa situazione ha fatto nascere l'esigenza di disporre di metodi analitici in grado di valutare la composizione, la genuinità e l'autenticità della gelatina reale.

In questo ambito si inserisce il presente lavoro in cui sono state studiate, tramite spettroscopia ^{1}H HR-MAS (*High Resolution-Magic Angle Spinning*) NMR, gelatine reali tal quali, senza alcuna estrazione, al fine di studiare il loro profilo metabolico e di differenziare campioni di diversa provenienza geografica.

Gli spettri ^{1}H HR-MAS dei campioni di gelatina reale sono stati effettuati presso il laboratorio di Spettrometria di Risonanza Magnetica Nucleare, Centro Ricerche ENEA, Trisaia.

7.2 *Materiali e Metodi*

7.2.1 Preparazione dei campioni

Sono stati analizzati 19 campioni di gelatine reale di diversa origine geografica: 10 di provenienza cinese, 6 di provenienza italiana e 3 di origine sconosciuta.

I campioni sono stati preparati aggiungendo 18 μL di D_2O al campione tal quale (120 mg); la miscela è stata posta nel rotore MAS (50 μL).

7.2.2 Spettri ^{1}H HR-MAS NMR

La spettroscopia HR-MAS è una tecnica che permette di ottenere spettri ad alta risoluzione (mono e bi-dimensionali, omo e etero-nucleari) di campioni semisolidi ovvero nella cosiddetta fase di "*soft-matter*", una fase intermedia tra lo stato solido e lo stato liquido. Il campione è analizzato tal quale senza alcun procedimento di estrazione.

La buona risoluzione osservabile negli spettri HR-MAS di campioni nella fase di "*soft-matter*", che invece in condizioni statiche mostrerebbero picchi allargati difficilmente interpretabili, è ottenuta grazie al fatto che il campione, posto in un rotore, viene fatto ruotare intorno ad un asse orientato a 54.7°, il cosiddetto "angolo magico", rispetto al campo magnetico B_0 [9]. Questa rotazione provoca la riduzione delle interazioni dipolari e quindi permette di ridurre la larghezza dei segnali ben visibile invece negli spettri effettuati in condizioni statiche. In condizioni di MAS quindi si possono ottenere spettri NMR di campioni di consistenza "*soft matter*" con una risoluzione paragonabile a quella che si osserva negli spettri NMR di campioni in fase liquida.

Gli spettri ^{1}H HR-MAS dei campioni di gelatina reale effettuati in questo studio sono stati registrati a 300 K su uno spettrometro NMR Bruker 600 AVANCE, che opera alla frequenza di risonanza protonica di 600.13 MHz, in condizioni di angolo magico (6 KHz di spinning). Gli spettri sono stati acquisiti con una *size* di 32k (32768 punti) sopprimendo il segnale dell'acqua con una sequenza di presaturazione.

Gli esperimenti bidimensionali ^{1}H-^{1}H TOCSY e ^{1}H-^{1}H COSY sono stati condotti usando 2048 *data points* nella dimensione f2 e 512 *data points* nella dimensione f1, impulso di 90°, *recicle time* di 1s per il COSY e 2s per il TOCSY e processati con 1024 x 1024 *data points*. L'esperimento ^{1}H-^{1}H TOCSY è stato condotto con un tempo di *spin lock* di 60 ms.

Gli esperimenti ^{1}H-^{13}C HSQC e ^{1}H-^{13}C HMBC sono stati condotti in *fase sensitive echo anti-echo mode* con un *recicle time* di 2s, una finestra spettrale di 6.2 KHz in f2, e 30 KHz in f1, e con la sequenza di disaccoppiamento "*garp*" usando un impulso di 80 μs.

7.2.3 Analisi statistica

La posizione di un segnale in uno spettro NMR può essere funzione della temperatura, del pH, della concentrazione e della specie in esame, e può quindi subire piccoli spostamenti di *chemical shift*.

Una tecnica per ridurre l'influenza di tali spostamenti è la procedura di "*bucketing*": ogni spettro viene diviso in segmenti contenenti solo segnali NMR applicando sullo spettro un algoritmo appropriato per la discriminazione lineare di base/segnale [10]. In ciascun segmento il segnale NMR è ridotto in *buckets* [11] di eguale ampiezza (0.02 ppm). Solo i segmenti relativi alle estremità dello spettro possono avere *buckets* di ampiezza diversa per evitare di includere punti non necessari della linea di base. Per la stessa ragione in generale l'ampiezza del *buckets* dipende dalla lunghezza del segmento. Per evitare distorsioni nell'analisi statistica la regione spettrale che include il segnale dell'acqua soppresso non viene incluso nella procedura. Al temine dell' operazione di *bucketing*, lo spettro appare come un insieme ridotto di punti ciascuno dei quali rappresenta la media di un numero prefissato di punti dello spettro. Gli spettri ridotti dall'operazione di *bucketing* sono sottoposti ad Analisi della Varianza allo scopo di individuare i segnali più discriminanti utilizzando la funzione discriminante *F* di Fisher che misura il rapporto fra la varianza fra i gruppi e la varianza all'interno di ciascun gruppo.

Per poter costruire un modello per la classificazione dei campioni, in base alla loro origine geografica, è stata utilizzata l'Analisi Discriminante Lineare.

La LDA appartiene a quella classe di metodi statistici denominati "*supervised*" che hanno la caratteristica di utilizzare informazioni a priori sul numero dei gruppi in cui i campioni devono essere divisi. Permette di determinare alcuni parametri che correlano le variabili in esame con il gruppo di appartenenza. Tali parametri possono poi essere utilizzati per predire l'appartenenza di un campione incognito ad uno dei gruppi predeterminati.

7.3 Risultati e Discussione

7.3.1 Assegnazione dello spettro ^{1}H HR-MAS NMR

Lo spettro ^{1}H HRMAS di un campione di gelatina reale è riportato in *Figura 7.1*. In un'unica analisi, è possibile determinare sia i metaboliti liposolubili sia gli idrosolubili presenti nei campioni (*Tabella 7.1*). L'assegnazione dello spettro è stata effettuata tramite esperimenti bidimensionali quali il ^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{1}H TOCSY e ^{1}H-^{13}C HSQC. La regione spettrale a campi alti (*Figura 7.1 B,C*) mostra infatti segnali larghi dovuti alle catene grasse poco solubili in ambiente acquoso ma anche segnali ben risolti dovuti ad amminoacidi idrosolubili. In particolare sono presenti i doppietti dei metili della valina, leucina, isoleucina e i segnali della prolina e della lisina. Come esempio di assegnazione è riportato il sistema di spin della lisina messo ben in evidenza nella mappa ^{1}H-^{1}H TOCSY (*Figura 7.2*).

La regione spettrale tra 3.2 e 5.6 ppm mostra i segnali degli zuccheri, ovvero del saccarosio, dell'α-glucosio, del β-glucosio e del fruttosio, alcuni segnali della prolina e alcuni singoletti attribuibili alla colina e ai suoi derivati. La regione spettrale a campi bassi, tra 5.5 e 9.0 ppm, mostra i segnali di ribosi appartenenti a nucleosidi, i segnali dovuti a derivati dell'uridina e il sistema di spin della fenilalanina. Inoltre sono osservabili tra 8.0 e 8.7 ppm singoletti che possono essere attribuiti a guanidina, adenosina e inosina. L'assegnazione di queste regioni spettrali è stata possibile anche grazie all'esperimento ^{1}H-^{13}C HMQC che ha permesso di ottenere i valori dei ^{13}C (*Figura 7.3*).

Tabella 7.1. Assegnazione dello spettro ^{1}H HRMAS di un campione di gelatina reale. I *chemical shift* del carbonio-13 sono stati ottenuti tramite esperimenti ^{1}H-^{13}C HMQC. I *chemical shifts* sono riportati rispetto al CH-1 del glucosio (^{1}H =5.25 ppm, ^{13}C= 93.10 ppm)

Composto	Assegnazione	^{1}H (ppm)	m (*Hz*)	^{13}C (ppm)
Catene grasse	CH_3	0.88	bt	14.8
(AFA) **1**	CH_2	1.32 *		30.5
	CH_2	1.45		28.3
	CH_2	1.54		32.7
	CH_2	1.59		25.7
	CH_2	2.23		
Valina	α-CH	3.62		
(VAL) **2**	β-CH	2.28		34.9
	γ-CH_3	1.05	d [*7.1*]	18.9
	γ'-CH_3	0.99	d [*7.1*]	17.8
Leucina	α-CH			
(LEU) **3**	β-CH_2	1.74		40.7
	γ-CH	1.74		24.9
	δ-CH_3	0.95	d [*7.3*]	22.2
	δ'-CH_3	0.975	d [*7.3*]	22.9
Isoleucina	α-CH	3.69		
(ILE) **4**	β-CH	1.99		
	γ-CH_3	1.015	d	15.5
	γ-CH_2	1.27, 1.48		
	δ-CH_3	0.942	d	19.3
Lisina	α-CH	3.77		55.6
(LYS) **5**	β-CH_2	1.90		30.8
	γ-CH_2	1.46		
	δ-CH_2	1.73 *		27.4
	ε-CH_2	3.04 *	tr [*7.6*]	40.3
Prolina	α-CH	4.14		62.0
(PRO) **6**	β-CH_2	2.35 *, 2.09		29.9
	γ-CH_2	2.01		24.8
	δ-CH_2	3.42, 3.35		47.4
Fenilalanina	CH2, CH6	7.43	dd [*7.3, 7.3*]	130.0
(FNL) **7**	CH, CH	7.33	dd [*7.3, 7.3*]	130.0
	CH	7.38	d [*7.3*]	128.8
Derivati della	CH_3	3.20 *	s	
colina	CH_3	3.22 *	s	
(CHN) **8**	CH_3	3.23 *	s	
Glucosio α	CH-1	5.25 *	d [*3.6*]	93.1
(α-GLC) **9**	CH-2	3.53		72.5
	CH-3	3.72		73.8
	CH-4	3.40		70.5
	CH-5	3.83		72.4
	CH_2-6	3.7-3.9		61.8
Glucosio β	CH-1	4.66	d [*7.9*]	97.1
(β-GLC) **10**	CH-2	3.24		75.3
	CH-3	3.49		76.8
	CH-4	3.42		70.7

	CH-5 CH_2-6	3.49 3.7-3.9		76.8 61.9
Fruttosio (FRU) **11**	CH-3, CH-4 CH-2 CH-6	4.12 * 3.83 3.69		76.2 81.7 61.9
Saccarosio (SUC) **12**	CH-1 G CH-2 G CH-3 G CH-4 G CH-5 G CH-3 F CH-4 F CH-5 F CH-6 F	5.42 * 3.54 3.77 3.47 3.83 4.22 4.06 3.91 3.80	d [*3.94*]	93.1 72.6 73.6 76.8 72.6 77.4 75.2 82.4 63.5
Ribosi di nucleosidi (RIB) **13**	CH-1 R CH-2 R CH-3 R CH-4 R CH-1 R CH-2 R CH-3 R CH-4 R CH-1 R CH-2 R CH-3 R CH-4 R CH-1 R CH-2 R CH-3 R CH-4 R	6.09 * 4.76 4.43 4.28 5.98 4.36 4.36 4.28 5.92 4.36 4.40 4.30 5.90 4.30 4.40 4.30		89.4
Guanosina,(GUA) adenosina,(ADE) inosina (INO) **14**	CH	8.2-8.5	s	140-148
Derivati di Uridina (come UMP,UDP) (UR) **15**		5.98, 7.94 * 5.86, 7.87 *		103.4, 142.4 103.4, 142.4

Segnali non assegnati				
u 1		2.65 *		
u 2		6.17 *		
u 3		8.03 *		
u 4		8.25 *		
u 5		8.32 *		
u 6		8.42 *		
u 7		8.49 *		
u 8		8.65 *		
u 9		8.68 *		

Sono riportate le abbreviazioni dei composti. I segnali sottoposti ad analisi statistica sono identificati con asterisco

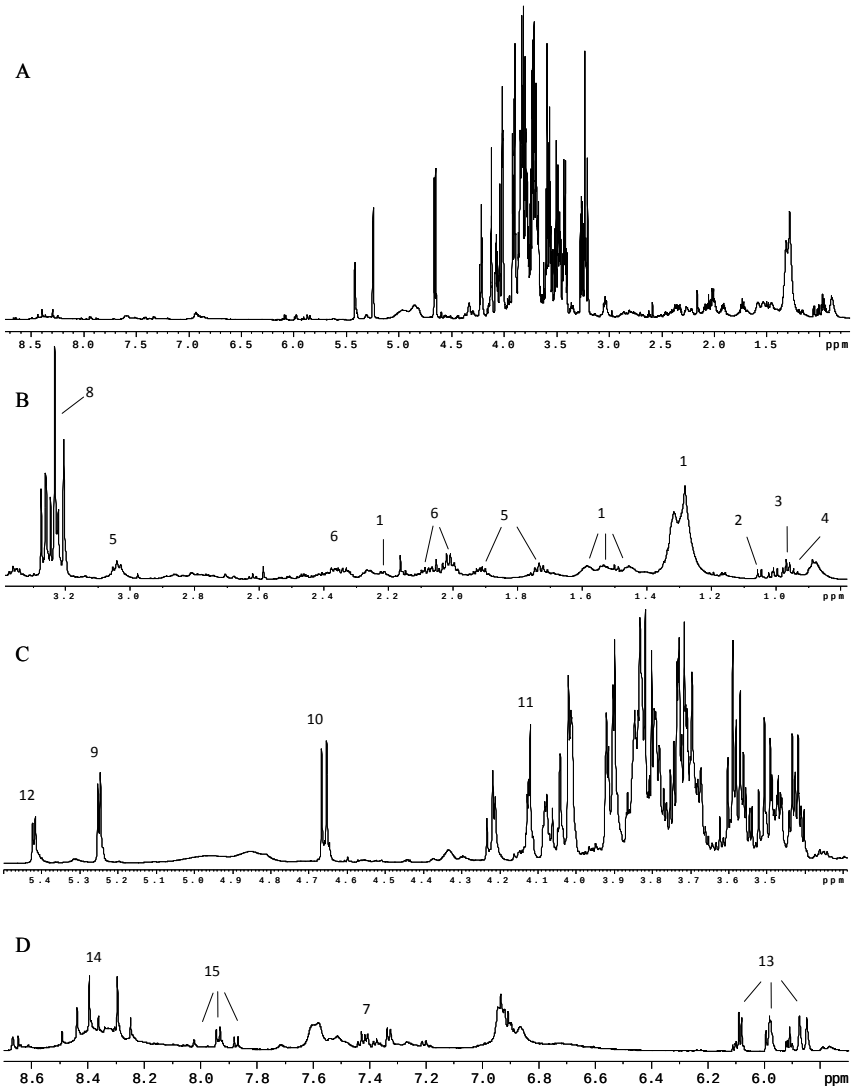

Figura 7.1. Spettro ^{1}H HRMAS (600 MHz) di un campione di gelatina reale (A). Regione spettrale tra 0.8 e 3.3 ppm (B); regione spettrale tra 3.4 e 5.5 ppm (C); regione spettrale tra 5.6 e 8.6 (D). sono riportate le assegnazioni di alcuni metaboliti: **1**, CH_2 AFA; **2**, VAL; **3**, LEU; **4**, ILE; **5**, LYS; **6**, PRO; **7**, FNL; **8**, CHN (derivati); **9**, α-GLC; **10**, β-GLC; **11**, FRU; **12**, SUC; **13**, RIB; **14**, GUA, ADE, INO; **15**, UR (derivati).

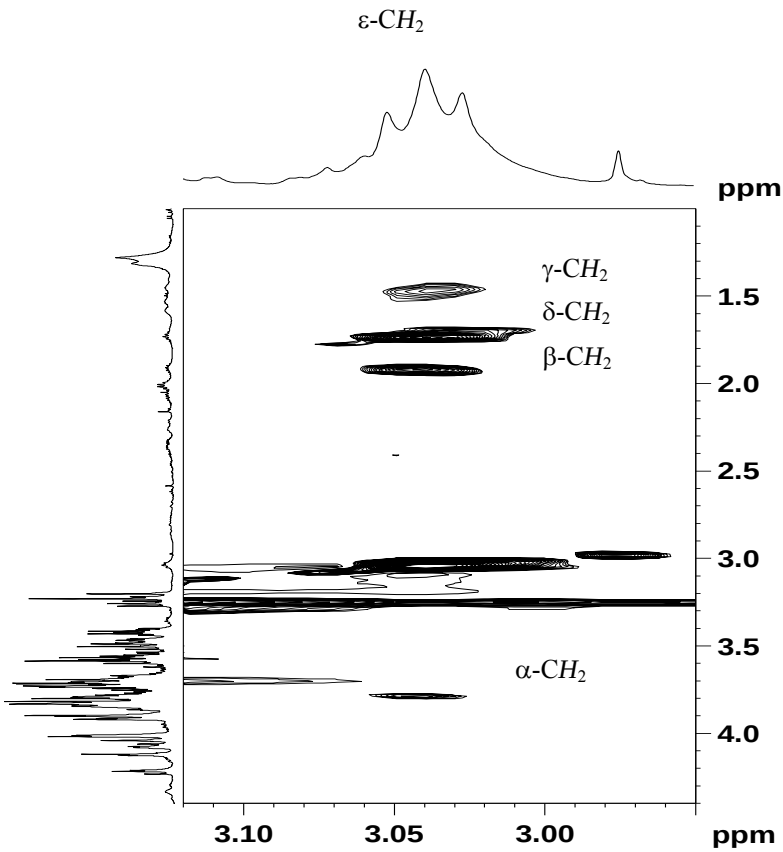

Figura 7.2. Particolare di una regione spettrale della mappa ^{1}H-^{1}H TOCSY, effettuato su un campione di gelatina reale in condizioni di MAS, in cui è messo in evidenza il sistema di spin della lisina

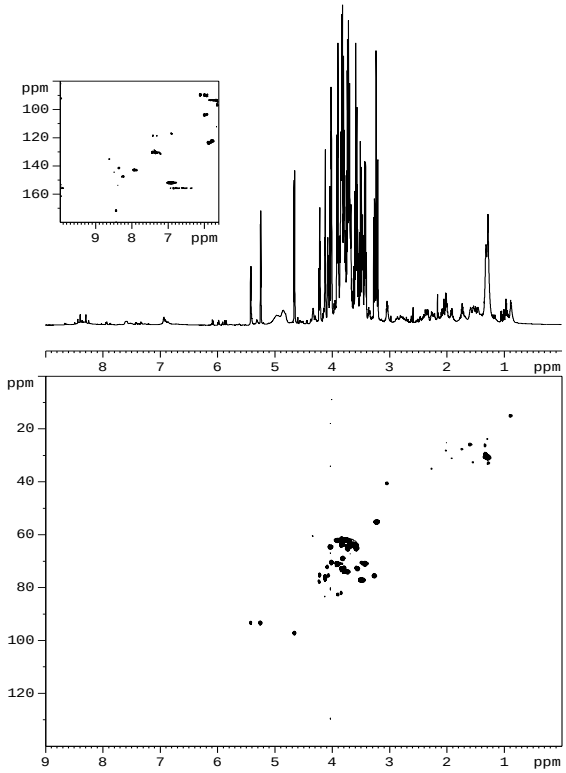

Figura 7.3. Mappa dell'esperimento ^{1}H-^{13}C HSQC effettuato in condizioni di MAS su un campione di gelatina reale

7.3.2 *Analisi statistica*

Ogni spettro ^{1}H rappresenta il profilo metabolico del campione in esame. Tale profilo comprende un certo numero di picchi a frequenze caratteristiche del campione in esame e ne costituisce un codice univoco di identificazione, una vera e propria impronta digitale.

Sottoponendo ad analisi statistica multivariata i profili metabolici delle gelatine cinesi e delle gelatine italiane è possibile evidenziare similarità e differenze tra gruppi.

➢ *Analisi esplorativa*

Una prima indagine esplorativa è stata effettuata per mezzo di PCA applicata, senza alcuna ipotesi a priori, per evidenziare i raggruppamenti naturali dei 19 campioni. I segnali utilizzati per l'analisi statistica sono evidenziati con asterisco in *Tabella 7.1*. In *Figura 7.4* sono riportati gli *scores* delle variabili: la combinazione di PC1 con PC2 spiega il 74.7% della variabilità totale.

I campioni di diversa origine geografica si separano lungo la PC2: nell'area superiore della *Figura 7.4* sono raggruppati i campioni di provenienza italiana mentre nell'area sottostante sono raggruppati i campioni di provenienza cinese.

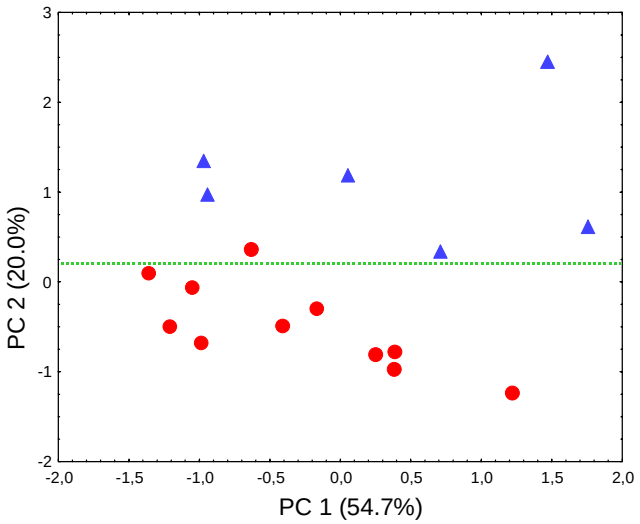

Figura 7.4. PCA applicata alla intensità di 23 variabili misurate sugli spettri ^{1}H HR-MAS NMR di 19 campioni. Gelatine reali cinesi (●), gelatine reali italiane (▲)

Dall'analisi del plot dei *loadings* delle variabili è possibile individuare il contributo di queste sulla discriminazione tra i campioni di diversa origine geografica (*Figura 7.5*).

Le variabili responsabili della discriminazione geografica si trovano nella parte superiore della PC2 (acidi grassi, lisina, prolina, alcuni derivati della colina e alcuni composti non ancora identificati) e nella parte inferiore della PC2 ribosio e composti non ancora identificati, presenti principalmente nella regione a campi bassi dello spettro^{1}H-HRMAS.

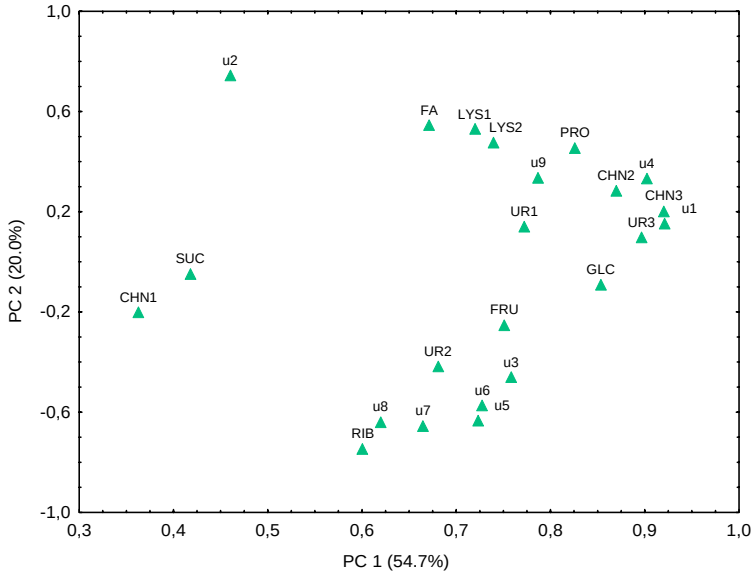

Figura 7.5. Plot dei *loadings* delle variabili utilizzate per la PCA

➢ *Metabolic fingerprinting*

Questa analisi viene usata quando è richiesta la classificazione dei campioni senza l'identificazione dei metaboliti presenti. In questo caso, lo spettro NMR può essere considerato "l'impronta digitale del prodotto" e sono misurate tutte le intensità dei segnali NMR senza la loro assegnazione.

Nel caso specifico il *fingerprinting* metabolico della gelatina reale è stato ottenuto effettuando l'operazione di *bucketing* degli spettri e l'analisi della varianza (ANOVA) allo scopo di individuare le variabili più discriminanti. La funzione discriminante *F*, nel caso in esame, varia da 0 a 14; se si assume come valore di soglia 4.3 risulta che le variabili discriminanti sono 15 (*Tabella 7.2*). Le regioni spettrali responsabili della discriminazione tra i campioni di diversa origine geografica sono

la regione compresa tra 1 e 2 ppm e quella tra 5.3 e 5.7 ppm (*Figura7.6*). Queste regioni includono i segnali di amminoacidi e degli acidi grassi (regione spettrale a campi alti) e i segnali dei protoni legati ai carboni anomerici degli zuccheri (*Figura 7.6*).

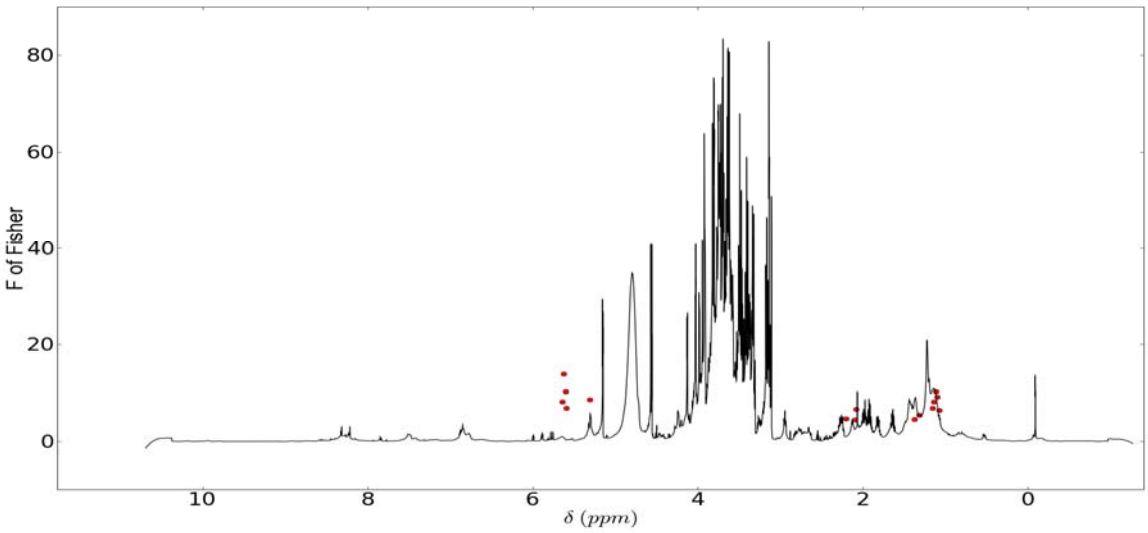

Figura 7.6. Spettro ^{1}H HR-MAS (600 MHz) di un campione di gelatina reale in cui sono indicate con il simbolo (●) le 15 variabili più discriminati.

Tabella 7.2. *Chemical shift* delle 15 variabili selezionate da ANOVA e il corrispondente valore della funzione *F*.

	ppm	**F (fisher)**
1	2.20	4.71
2	2.10	4.47
3	2.08	6.69
4	1.38	5.53
5	1.32	5.44
6	1.16	6.81
7	1.14	8.15
8	1.12	10.23
9	1.10	9.14
10	1.08	6.41
11	5.65	8.17
12	5.63	13.86
13	5.61	10.22
14	5.60	6.87
15	5.31	8.58

L'analisi discriminate lineare applicata alle quindici variabili ha permesso di ottenere due raggruppamenti ben distinti, riportati in *Figura 7.7* ciascuno dei quali comprende campioni della stessa origine geografica.

Sono stati inseriti nell'analisi anche tre campioni di origine geografica incognita. Due sono risultati appartenere alla classe "Cina" e l'altro alla classe "Italia"[12].

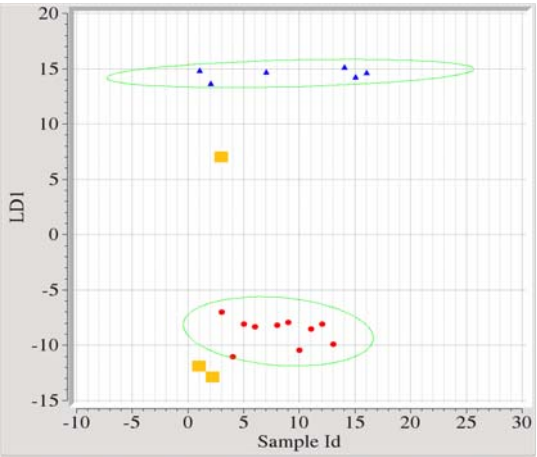

Figura 7.7. LDA di campioni di gelatina reale cinese (•), italiana (▲) e di origine sconosciuta (■), applicata alle 15 variabili selezionate dall'ANOVA

Tali risultati, sebbene preliminari perché ottenuti su un modesto numero di campioni, suggeriscono l'importanza della spettroscopia ^{1}H HR-MAS nel fornire informazioni sul profilo metabolico del campione tal quale e nel discriminare campioni in base alla provenienza geografica.

7.4 Referenze

[1] Asencot M., Lensky Y. (1976) The effect of sugars and juvenile hormone on the differentiation of female honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens. *Life Sci.*, **18**, 693-700

[2] Asencot M., Lensky Y. (1984) Juvenile hormone induction of "Queenliness" on female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae reared on worker and stopred royal jelly. *Comp. Biochem. Physiol.*, **78B**, 109-117

[3] Wilde J. Juvenile hormone and caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera* L.). In: *Phase and caste differentiation in insects* (Ed. Leuscher M.) Pergamon Press, Oxford, 5-20, (1976)

[4] Blum M.S., Novak A.F., Taber S. (1959) 10-Hydroxy-D2decenoic Acid, an Antibiotic Found in Royal Jelly. *Science,* **130**, 452-453

[5] Nagai T., Inoue R. (2004) Preparation and The Functional Properties of Water Extract and Alkaline Extract from Royal Jelly. *Food Chem.*, **84**, 181-186

[6] Crane E. Bees beekeeping science practice and world resources. *Heinemann Professional Pubblishing Ltd,* Halley Court, Jordan Hill, Oxford, (1990)

[7] Takenaka T. (1982) Chemical composition of royal jelly. *Honeybee Sci.,* **3**, 69-74

[8] Grillenzoni F.G. Prodotti dell'alveare: aspetti economici e di mercato. In: *I prodotti dell'apicoltura* (a cura di A.G. Sabatini, E. Carpana), LEADER II (Galizia, Portogallo, Italia), PORTODEMOUROS, Spagna: 99-105, (2002)

[9] Mehring M. Principles of High-resolution NMR in solids. Springer- Verlag: Heidelberg, Germany, (1983)

[10] Torgrip O.R.J., Aberg M., Karlberg B., Jacobsson S.P. (2003) Peak alignment using reduced set mapping. *J. Chemom.*, **17**, 573–582.

[11] Lamanna R. Bucketing is performed by homemade nmr 1.0 software available from the author (R. Lamanna) under GNU license

[12] Marconi E., Messia M.C., Candigliota T., D'Amico I., Mannina L., Caboni M.F., Ferioli F., Lamanna R., Sabatini A.G (2008) Innovative markers to assess authenticity and quality of honey and royal jelly. In: 2nd International Forum on Apitherapy - *APIMEDICA and APIQUALITY*, Roma (Italia) 9 - 12 Giugno 2008

Abbreviazioni usate nel testo

AcA, acido acetico; ADE, adenosina; ADP, adenosina difosfato; AFA, acidi grassi; ALA, alanina; ANOVA, analisi della varianza; ASN, asparagina; ANS, anserina; ASP, aspartato; ATP, adenosina trifosfato; CA, acido citrico; CHN, colina; CHO, colesterolo; COSY, *Correlated Spectroscopy*; CR/PCR, creatina/fosfocreatina; DHA, acido docosaesaenoico; DMSO, dimetilsolfossido; DOSY, *Diffusion Ordered Spectroscopy*; DSS, sodio 3-(trimetilsilil)-1-propanesulfonato; DUFA, acidi grassi diinsaturi; EPA, acido eicosapentaenoico; FA, acido fumarico; FNL, fenilalanina; FRU, fruttosio; GAB, γ-aminobutirrato; GARP, *globally optimized alternating phase rectangular pulse*; GB, glicina-betaina; α-GLC, α- glucosio; β-GLC, β-glucosio; GLN, glutammina; GLU, acido glutammico; GLY, glicina; GM, alimenti geneticamente modificati; GUA, guanosina; HSQC, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*; HMBC, *Heteronuclear Multiplebond Correlation*; HR-MAS, *High Resolution-Magic Angle Spinning*; HYP, ipoxantina; ILE, isoleucina; IMP, inosina monofosfato; INO, inosina; LA, acido lattico; LDA, analisi discriminante lineare; LEU, leucina; LYS, lisina; MA, acido malico; MCT, acido monocaffeoiltartarico; MNS, *myo*-inositolo; MUFA, acidi grassi monoinsaturi; NMR, risonanza magnetica nucleare; NOESY, *Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*; PC, fosfatidilcolina; PCA, analisi delle componenti principali; PC + PE, fosfatidilcolina + fosfatidiletanolammina; PE, fosfatidiletanolammina; PUFA, acidi grassi poliinsaturi; RIB, ribosi nucleosidi; SA, acido succinico; STA, acidi grassi saturi; SUC, saccarosio; TA, acido tartarico; TAU, taurina; TCA, analisi dei clusters; TG, triacilglicerolo; THR, treonina; TMAO, ossido di trimetilammina; TSPA, sale sodico dell'acido 3-trimetilsilil-2,2,3,3-d_4 propionico; TOCSY, *Total Correlation Spectroscopy*; UFA, acidi grassi insaturi; UR, derivati di uridina; VAL,valina.