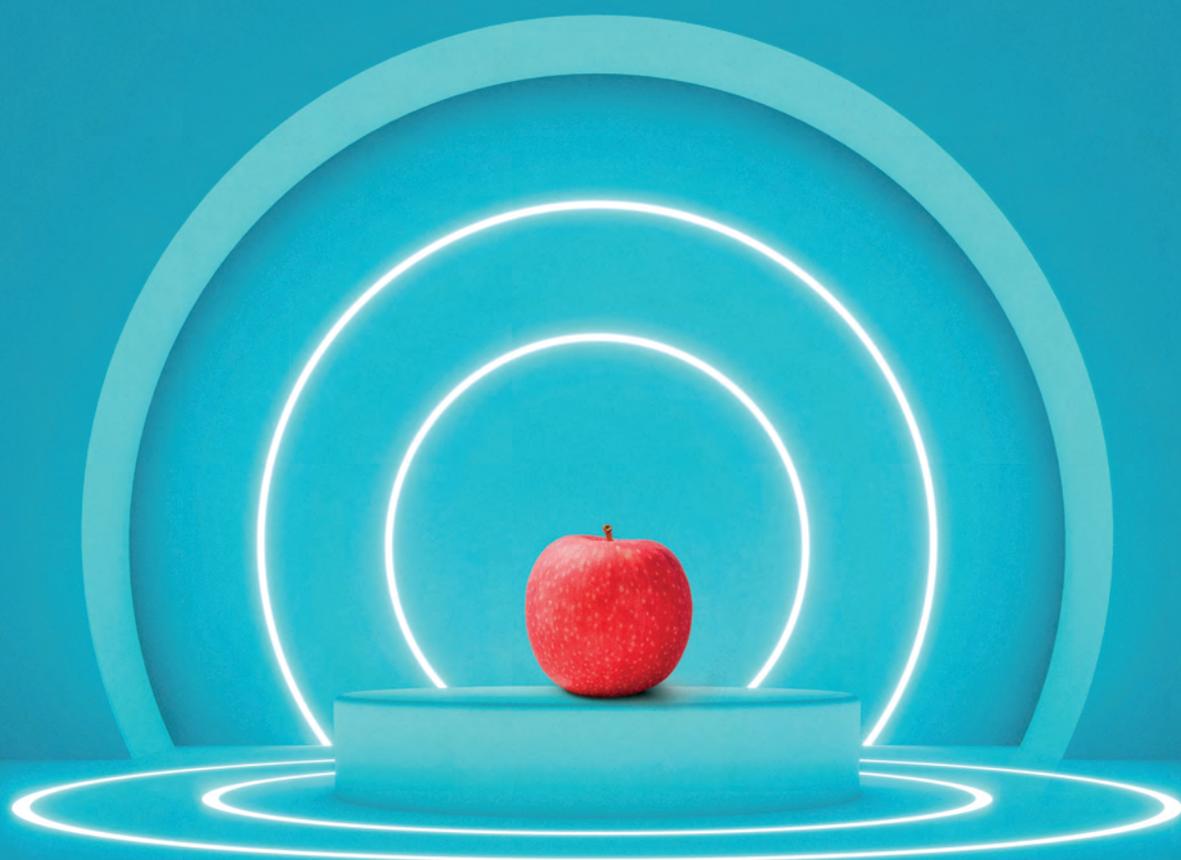


A cura di

Luisa Mannina Noemi Proietti Valeria Di Tullio
Anatoly P. Sobolev

La risonanza magnetica

nella scienza degli alimenti



cea

casa editrice ambrosiana

A cura di

Luisa Mannina Noemi Proietti Valeria Di Tullio
Anatoly P. Sobolev

La risonanza magnetica

nella scienza degli alimenti

Se vuoi accedere alle risorse online riservate

1. Vai su **my.zanichelli.it**
2. Clicca su *Registrati*.
3. Scegli *Studente*.
4. Segui i passaggi richiesti per la registrazione.
5. Riceverai un'email: clicca sul link per completare la registrazione.
6. Cerca il tuo codice di attivazione stampato in verticale sul bollino argentato in questa pagina.
7. Inseriscilo nella tua area personale su **my.zanichelli.it**

Se sei già registrato, per accedere ai contenuti riservati ti serve solo il codice di attivazione.

Diritti riservati

I diritti di pubblicazione, riproduzione, comunicazione, distribuzione, trascrizione, traduzione, noleggio, prestito, esecuzione, elaborazione in qualsiasi forma o opera, di memorizzazione anche digitale e di adattamento totale o parziale su supporti di qualsiasi tipo e con qualsiasi mezzo (comprese le copie digitali e fotostatiche), sono riservati per tutti i paesi. L'acquisto della presente copia dell'opera non implica il trasferimento dei suddetti diritti né li esaurisce.

Fotocopie e permessi di riproduzione

Le fotocopie per uso personale (cioè privato e individuale, con esclusione quindi di strumenti di uso collettivo) possono essere effettuate, nei limiti del 15% di ciascun volume, dietro pagamento alla S.I.A.E. del compenso previsto dall'art. 68, commi 4 e 5, della legge 22 aprile 1941 n. 633. Tali fotocopie possono essere effettuate negli esercizi commerciali convenzionati S.I.A.E. o con altre modalità indicate da S.I.A.E.

Per le riproduzioni ad uso non personale (ad esempio: professionale, economico, commerciale, strumenti di studio collettivi, come dispense e simili) l'editore potrà concedere a pagamento l'autorizzazione a riprodurre un numero di pagine non superiore al 15% delle pagine del presente volume.

Le richieste vanno inoltrate a:
Centro Licenze e Autorizzazioni per le Riproduzioni Editoriali (CLEARedi),
Corso di Porta Romana 108, 20122 Milano
e-mail: autorizzazioni@clearedi.org e sito web: www.clearedi.org

L'autorizzazione non è concessa per un limitato numero di opere di carattere didattico riprodotte nell'elenco che si trova all'indirizzo www.zanichelli.it/chl-siamo/fotocopie-e-permessi

L'editore, per quanto di propria spettanza, considera rare le opere fuori del proprio catalogo editoriale. La loro fotocopia per i soli esemplari esistenti nelle biblioteche è consentita, anche oltre il limite del 15%, non essendo concorrenziale all'opera. Non possono considerarsi rare le opere di cui esiste, nel catalogo dell'editore, una successiva edizione, né le opere presenti in cataloghi di altri editori o le opere antologiche. Nei contratti di cessione è esclusa, per biblioteche, istituti di istruzione, musei e archivi, la facoltà di cui all'art. 71-ter legge diritto d'autore. Per permessi di riproduzione, diversi dalle fotocopie, rivolgersi a segreteria_cea@ceaedizioni.it

Licenze per riassunto, citazione e riproduzione parziale a uso didattico con mezzi digitali

La citazione, la riproduzione e il riassunto, se fatti con mezzi digitali, sono consentiti (art. 70 bis legge sul diritto d'autore), limitatamente a brani o parti di opera, a) esclusivamente per finalità illustrative a uso didattico, nei limiti di quanto giustificato dallo scopo non commerciale perseguito. (La finalità illustrativa si consegue con esempi, chiarimenti, commenti, spiegazioni, domande, nel corso di una lezione); b) sotto la responsabilità di un istituto di istruzione, nei suoi locali o in altro luogo o in un ambiente elettronico sicuro, accessibili solo al personale docente di tale istituto e agli alunni o studenti iscritti al corso di studi in cui le parti di opere sono utilizzate; c) a condizione che, per i materiali educativi, non siano disponibili sul mercato licenze volontarie che autorizzano tali usi. Zanichelli offre al mercato due tipi di licenze di durata limitata all'anno accademico in cui le licenze sono concesse:

A) licenze gratuite per la riproduzione, citazione o riassunto di una parte di opera non superiore al 5%. Non è consentito superare tale limite del 5% attraverso una pluralità di licenze gratuite.

B) licenze a pagamento per la riproduzione, citazione, riassunto parziale ma superiore al 5% e comunque inferiore al 40% dell'opera.

Per usufruire di tali licenze occorre seguire le istruzioni su www.zanichelli.it/licenzeeducative

L'autorizzazione è strettamente riservata all'istituto educativo licenziatario e non è trasferibile in alcun modo e a qualsiasi titolo.

Garanzie relative alle risorse digitali

Le risorse digitali di questo volume sono riservate a chi acquista un volume nuovo: vedi anche al sito www.zanichelli.it/contatti/acquisti-e-recesso le voci *Informazioni generali su risorse collegate a libri cartacei e Risorse digitali e libri non nuovi*.

Zanichelli garantisce direttamente all'acquirente la piena funzionalità di tali risorse.

In caso di malfunzionamento rivolgersi a assistenza@zanichelli.it

La garanzia di aggiornamento è limitata alla correzione degli errori e all'eliminazione di malfunzionamenti presenti al momento della creazione dell'opera. Zanichelli garantisce inoltre che le risorse digitali di questo volume sotto il suo controllo saranno accessibili, a partire dall'acquisto, per tutta la durata della normale utilizzazione didattica dell'opera. Passato questo periodo, alcune o tutte le risorse potrebbero non essere più accessibili o disponibili: per maggiori informazioni, leggi my.zanichelli.it/fuoricatalogo

Soluzioni degli esercizi e altri svolgimenti di compiti assegnati

Le soluzioni degli esercizi, compresi i passaggi che portano ai risultati e gli altri svolgimenti di compiti assegnati, sono tutelate dalla legge sul diritto d'autore in quanto elaborazioni di esercizi a loro volta considerati opere creative tutelate, e pertanto non possono essere diffuse, comunicate a terzi e/o utilizzate economicamente, se non a fini esclusivi di attività didattica.

Diritto di TDM

L'estrazione di dati da questa opera o da parti di essa e le attività connesse non sono consentite, salvi i casi di utilizzazioni libere ammessi dalla legge.

L'editore può concedere una licenza. La richiesta va indirizzata a tadm@zanichelli.it

Coordinamento editoriale: Marika De Acetis

Realizzazione editoriale e indice analitico: Epitesto, Milano

Disegni: Daniele Gianni

Copertina:

- progetto grafico: Falcinelli & co., Roma

- immagine di copertina: © murat efe/iStockphoto

I diritti d'autore per la vendita di questo libro saranno devoluti al Gruppo italiano discussione risonanze magnetiche (GIDRM).

Prima edizione: maggio 2023

Ristampa: **prima tiratura**

5 4 3 2 1 2023 2024 2025 2026 2027

Realizzare un libro è un'operazione complessa, che richiede numerosi controlli: sul testo, sulle immagini e sulle relazioni che si stabiliscono tra loro. L'esperienza suggerisce che è praticamente impossibile pubblicare un libro privo di errori. Saremo quindi grati ai lettori che vorranno segnalarceli.

Per segnalazioni o suggerimenti relativi a questo libro rivolgersi a: CEA – Casa Editrice Ambrosiana
viale Romagna 5, 20089 Rozzano (MI)
fax 02 52202260 e-mail: segreteria_cea@ceaedizioni.it

Stampa:

per conto di Zanichelli editore S.p.A.
Via Innerio 34, 40126 Bologna

Indice generale

Dedica	IX
Autrici e autori	X

A Metodologie NMR

Capitolo 1

Principi di base della risonanza magnetica nucleare (NMR) 2

Raffaele Lamanna, Luisa Mannina, Adele Mucci, Valeria Righi, Anatoly P. Sobolev

1.1 Introduzione	2
1.2 Proprietà dei nuclei: magnetismo e spin	2
Moto di precessione	3
FOCUS 1.1 Effetto dei campi magnetici fluttuanti	4
1.3 Rilassamento NMR	5

Capitolo 2

Spettroscopia NMR in soluzione 7

Raffaele Lamanna, Luisa Mannina, Adele Mucci, Valeria Righi, Anatoly P. Sobolev

2.1 Introduzione	7
2.2 Spettro NMR: chemical shift, integrali e costanti di accoppiamento	7
2.3 Sequenze di impulsi: esperimenti monodimensionali e bidimensionali	10
FOCUS 2.1 Interazione dipolare	13
FOCUS 2.2 Come si misura la diffusione	14
2.4 Confronto con banche dati	14
2.5 NMR in soluzione e alimenti	16
2.6 Spettrometro NMR	17

Capitolo 3

Spettroscopia NMR quantitativa (qNMR) 19

Vito Gallo, Piero Mastroianni, Biagia Musio

3.1 Introduzione	19
3.2 Aspetti teorici	19
3.3 Metodi di quantificazione	20
3.4 Buone procedure operative per un'analisi qNMR	21
Fattori strumentali	21
Fattori di acquisizione	22
Fattori di elaborazione del FID	23

Capitolo 4

Spettroscopia SNIF NMR 24

Augusta Caligiani, Tullia Tedeschi

4.1 Introduzione	24
4.2 Principi di base	24
4.3 Come funziona la tecnica SNIF NMR	25
4.4 Applicazioni in campo alimentare	26
FOCUS 4.1 Caratteristiche principali della tecnica NMR del deuterio ad abbondanza naturale	26

Capitolo 5

Spettroscopia HRMAS NMR 28

Alessandra Ciampa, Raffaele Lamanna, Adele Mucci, Valeria Righi

5.1 Introduzione	28
5.2 Principi di base	28
FOCUS 5.1 Tecnica CPMAS NMR	29
5.3 Strumentazione	29
5.4 Metodologie	30

Capitolo 6

Rilassometria NMR 33

Donatella Capitani, Valeria Di Tullio, Raffaella Gianferri, Noemi Proietti

6.1 Introduzione	33
6.2 Spettrometro NMR nel dominio del tempo	33
6.3 Misura del tempo di rilassamento spin-reticolo o longitudinale T_1	34
Misura del tempo di rilassamento trasversale T_2	35
6.4 Rilassometro NMR portatile	37
6.5 Misura di T_2 in campo magnetico disomogeneo	39
6.6 Analisi dei dati rilassometrici	39
6.7 Rilassometria FFC NMR	40
FOCUS 6.1 Rilassamento in alta risoluzione con trasformata di Fourier (analisi nel dominio delle frequenze)	41

Capitolo 7**Risonanza magnetica per immagini (MRI) 42***Alessandra Ciampa, Pierluigi Mazzei, Alessandro Piccolo, Alberto Spisni***7.1 Introduzione 42****7.2 Principi di funzionamento 43****7.3 Metodologie ed esperimenti MRI 45****Capitolo 8****Visione olistica dell'alimentazione nell'era dei Big Data 48***Francesco Capozzi, Claudio Luchinat, Carlo Mengucci, Leonardo Tenori, Eleonora Urbinati***8.1 Introduzione 48****8.2 Metabolomica 48****8.3 Foodomica 50****8.4 Banche dati e metodi di analisi dati 53****FOCUS 8.1** Banche dati: glossario di alcuni termini comuni 53

Complessità dell'analisi dei dati 54

Armonizzazione di raccolta e deposito di dati e metadati sperimentali 55

Armonizzazione dell'ontologia 56

Cross-talking fra banche dati: le risorse esistenti 56

Capitolo 9**Chemiometria 58***Nicola Cavallini, Federico Marini, Francesco Savorani***9.1 Introduzione 58****9.2 Dati chimici: tipologie e organizzazione in una matrice numerica 59****9.3 Preprocessamento del dato 59****9.4 Analisi esplorativa 60****9.5 Calibrazione 61****9.6 Classificazione 62****9.7 Evoluzione ed espansione del settore 64****B Applicazioni****Capitolo 10****Analisi dei macronutrienti: carboidrati, proteine e lipidi 66***Alessia Bellomaria, Fabio Bertocchi, Doris Cela, Walter Mandaliti, Ridvan Nepravishta, Maurizio Paci, Carlo Schillaci***10.1 Introduzione 66****10.2 Caratteristiche dei carboidrati 66****FOCUS 10.1** Metodi classici di analisi dei carboidrati 66**10.3 Applicazioni dell'NMR allo studio dei carboidrati 67**

Studio della struttura 67

10.4 Caratteristiche delle proteine 67**FOCUS 10.2** Metodi classici di analisi delle proteine 68**10.5 Applicazioni dell'NMR allo studio delle proteine 69**

Studio della struttura 69

Trattamento termico e stato di conservazione 69

10.6 Caratteristiche dei lipidi 70**10.7 Applicazioni dell'NMR allo studio dei lipidi 70**

Studio della struttura 70

FOCUS 10.3 Metodi classici di analisi dei lipidi 71**Capitolo 11****Frutta e verdura 73***Alessandra Ciampa, Carmelo Corsaro, Maurizio Delfini, Cinzia Ingallina, Domenico Mallamace, Pierluigi Mazzei, Alessandro Piccolo, Valeria Righi, Fabio Sciubba, Alberto Spisni***11.1 Caratteristiche dei prodotti ortofruttili 73****11.2 Applicazioni dell'NMR 73**

Spettroscopia NMR in soluzione 74

FOCUS 11.1 Metodi classici di analisi dei prodotti ortofruttili 74

HRMAS e CPMAS 75

Rilassometria 75

MRI 75

FOCUS 11.2 Preparazione dei campioni ortofruttili per NMR in soluzione 75**11.3 Esempi di matrici ortofruttili 76**

Mele 76

Kiwi 76

FOCUS 11.3 Analisi dei succhi di frutta 76

Pistacchi 79

Carote 80

Pomodori 82

Ravanello 82

Limone e cedro 83

Capitolo 12**Spezie: il caso studio dello zafferano 85***Laura Ruth Cagliani, Roberto Consonni***12.1 Introduzione 85****12.2 Caratteristiche dello zafferano 85****FOCUS 12.1** Coltivazione dello zafferano 86**FOCUS 12.2** Metodi classici di analisi dello zafferano 88**12.3 Applicazioni dell'NMR 89**

Profilo chimico 89

Zafferano di diversa origine geografica 89

Conservazione dello zafferano 90

Frodi 91

Analisi dei petali e degli stami di *Crocus sativus* L. 93Molecole estratte da zafferano, foglie e petali di *Crocus sativus* L. con potenziale effetto benefico per la salute 93**Capitolo 13****Olio di oliva 95***Francesco Longobardi, Luisa Mannina, Antonio Randazzo, Archimede Rotondo, Andrea Salvo***13.1 Caratteristiche dell'olio extra vergine di oliva 95****13.2 Applicazioni dell'NMR 97**Assegnazione dello spettro ¹H di un olio di oliva 97**FOCUS 13.1** Metodi classici di analisi degli oli di oliva 97**FOCUS 13.2** Sequenze selettive 98Assegnazione dello spettro ¹³C di un olio di oliva in soluzione 98**13.3 Analisi NMR e analisi convenzionali 100**

Acidità libera 100

Analisi della composizione delle catene grasse 100

Analisi degli steroli 100

Analisi sensoriale 100

Origine geografica 102

Frodi 104

Capitolo 14**Aceto balsamico e Aceto Balsamico Tradizionale 106***Laura Ruth Cagliani, Roberto Consonni***14.1 Caratteristiche delle diverse tipologie di aceto 106**

Aceto 106

Aceto balsamico 106

Aceto Balsamico Tradizionale di Modena 107

FOCUS 14.1 Produzione dell'ABTM 107**14.2 Applicazioni dell'NMR 108****FOCUS 14.2** Metodi classici di analisi di ABM e ABTM 108

Profilo chimico 109

Valutazione dell'invecchiamento: campioni di ABM e ABTM 109

Differenziare ABM e ABTM 110

Rilevamento di frodi e rispetto del disciplinare di produzione di ABTM 111

Capitolo 15**Vino 114***Davide Bertelli, Augusta Caligiani, Luisa Mannina, Lucia Marchetti, Mattia Spano***15.1 Caratteristiche del vino 114****15.2 Applicazioni dell'NMR 114****FOCUS 15.1** Metodi classici di analisi del vino 115**FOCUS 15.2** Cenni storici: l'NMR per l'analisi del vino 115Assegnazione dello spettro ¹H in soluzione 115

Origine geografica del vino 116

Varietà delle uve 118

Annata di produzione 118

FOCUS 15.3 Cenni sulla preparazione dei campioni per l'analisi NMR in soluzione 118

Invecchiamento del vino 119

Fermentazione e ceppi di lievito 119

Studio del precipitato durante la conservazione del vino 120

SNIF NMR 121

FOCUS 15.4 Analisi SNIF del vino 121

Aggiunta di zuccheri nel vino 122

Capitolo 16**Prodotti dell'alveare 123***Davide Bertelli, Lucia Marchetti, Ileana Menegazzo, Elisabetta Schievano***16.1 Introduzione 123****16.2 Caratteristiche del miele 123****16.3 Applicazioni dell'NMR allo studio del miele 124****FOCUS 16.1** Metodi classici di analisi del miele 125**FOCUS 16.2** Preparazione del campione di miele per l'analisi NMR 126

Soluzioni di miele in solventi polari 126

Estratti organici del miele 130

Classificazione botanica 130

Classificazione geografica 130

Adulterazioni del miele 133

16.4 Caratteristiche della propoli 136**FOCUS 16.3** Metodi classici di analisi della propoli 136

16.5 Applicazioni dell'NMR allo studio della propoli	137
Assegnazione dello spettro ¹ H	137
FOCUS 16.4 Preparazione del campione di propoli per l'analisi NMR	137

Capitolo 17

Carne	140
<i>Augusta Caligiani, Alessandra Ciampa, Luca Laghi, Pierluigi Mazzei, Massimiliano Petracchi, Alessandro Piccolo, Alberto Spisni</i>	
17.1 Caratteristiche della carne	140
17.2 Applicazioni dell'NMR	141
Acqua localizzata all'interno e all'esterno delle miofibrille	141
FOCUS 17.1 Metodi classici per la determinazione dell'autenticità di carne e prodotti a base di carne	142
Determinazione delle percentuali di grasso e acqua	143
Forma e dimensione degli spazi intra- ed extramiofibrillari	143
Anomalie emergenti nel petto di pollo	144
Rilassogrammi come impronte digitali della qualità della carne	144
17.3 Applicazioni dell'MRI	144
17.4 Applicazioni dell'NMR ad alta risoluzione	145
Autenticazione di specie/razza	145
Origine geografica	146
Processo tecnologico	147

Capitolo 18

Pesce e prodotti dell'acquacoltura	148
<i>Federica Angilè, Alessandra Ciampa, Laura Del Coco, Sandra A. De Pascali, Francesco Paolo Fanizzi, Chiara R. Girelli, Pierluigi Mazzei, Adele Mucci, Alessandro Piccolo, Alberto Spisni</i>	
18.1 Caratteristiche dell'acquacoltura e dei prodotti della pesca	148
Composizione chimica dei prodotti ittici	148
18.2 Applicazioni dell'NMR	149
FOCUS 18.1 Impianti di acquaponica	149
FOCUS 18.2 Metodi classici di analisi dei prodotti ittici	149
Profilo metabolomico del prodotto ittico	150
Freschezza, valore nutrizionale e cambiamenti legati alla conservazione dei prodotti ittici	150
Acquacoltura ed effetto delle pratiche di allevamento e dell'ambiente marino	151
Acquacoltura ed effetto dei mangimi utilizzati: il caso della tilapia	153
Determinazione della qualità del prodotto ittico in presenza di specie invasive: il caso del sarago maggiore	154

Tracciabilità e origine geografica del prodotto ittico	155
Non solo pesci: studi con NMR di altri prodotti acquatici	155

Capitolo 19

Sostanze nervine	160
<i>Giacomo Di Matteo, Anatoly P. Sobolev</i>	
19.1 Introduzione	160
19.2 Caratteristiche del caffè	160
FOCUS 19.1 Metodi classici di analisi del caffè	161
19.3 Applicazioni dell'NMR allo studio del caffè	162
Determinazione dello spettro ¹ H del caffè	162
Origine geografica del caffè e marchio di produzione	163
Studio del processo di tostatura	164
FOCUS 19.2 Predizione del sapore del caffè tostato tramite metodologia NMR	164
Miscelazione fraudolenta di specie di caffè	165
Contenuto di caffeina	165
19.4 Caratteristiche del tè	166
19.5 Applicazioni dell'NMR allo studio del tè	167
FOCUS 19.3 Metodi classici di analisi del tè	167
Profilo chimico del tè	168
Origine geografica	168
Fermentazione del tè	168
Classificazione dei tipi di tè	171

Capitolo 20

Latte	172
<i>Flaminia Cesare Marincola, Salvatore Milone, Paola Scano, Alberto Spisni</i>	
20.1 Caratteristiche del latte	172
20.2 Applicazioni dell'NMR	174
Componente idrofila del latte	174
FOCUS 20.1 Metodi classici di analisi del latte	174
FOCUS 20.2 Metodiche estrattive per l'analisi NMR del latte	175
Componente lipidica del latte	179
Il latte materno: gli oligosaccaridi	182

Capitolo 21

Formaggio	185
<i>Flaminia Cesare Marincola, Alessandra Ciampa, Raffaele Lamanna, Pierluigi Mazzei, Alessandra Micozzi, Salvatore Milone, Alessandro Piccolo, Paola Scano, Alberto Spisni</i>	
21.1 Caratteristiche del formaggio	185
FOCUS 21.1 Metodi classici di analisi dei prodotti lattiero caseari	186
21.2 Applicazioni dell'NMR	186
Analisi ¹ H NMR della componente idrofila	186

Analisi ^1H and ^{13}C NMR della componente lipidica	188		
Analisi HRMAS	189		
Analisi MRI	190		
Capitolo 22			
Canapa industriale	192		
<i>Giacomo Di Matteo, Cinzia Ingallina, Luisa Mannina, Mattia Spano</i>			
22.1 Caratteristiche della <i>Cannabis sativa</i> L. e dei suoi prodotti di lavorazione	192		
Problematiche legate alla coltivazione della canapa e legislazione	193		
		FOCUS 22.1 Metodi classici di analisi dei cannabinoidi	194
		22.2 Applicazioni dell'NMR	196
		Caratterizzazione di semi e olio di canapa	196
		Rilevamento di adulterazioni dell'olio di canapa	196
		FOCUS 22.2 Riferimenti normativi	196
		Infiorescenze di canapa	198
		Referenze iconografiche	200
		Indice analitico	201

Autrici e autori

Il testo è a cura di Luisa Mannina, Noemi Proietti, Valeria Di Tullio, Anatoly P. Sobolev.

Federica Angilè

Dipartimento di Scienze e Tecnologie biologiche ed ambientali
Università del Salento, Lecce

Alessia Bellomaria

Dipartimento di Scienze e Tecnologie chimiche
Università di Roma "Tor Vergata"

Davide Bertelli

Dipartimento di Scienze della vita
Università di Modena e Reggio Emilia, Modena

Fabio Bertocchi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie chimiche
Università di Roma "Tor Vergata"

Laura Ruth Cagliani

Istituto di Scienze e Tecnologie chimiche Giulio Natta
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Milano

Augusta Caligiani

Dipartimento di Scienze degli alimenti e del farmaco
Università di Parma

Donatella Capitani

Istituto per i Sistemi biologici
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Monterotondo (RM)

Francesco Capozzi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie agro-alimentari e Centro interdipartimentale di ricerca industriale agroalimentare
Alma Mater Studiorum
Università di Bologna, Cesena

Nicola Cavallini

Dipartimento Scienza applicata e Tecnologia
Politecnico di Torino

Doris Cela

Dipartimento di Scienze e Tecnologie chimiche
Università di Roma "Tor Vergata"

Alessandra Ciampa

Dipartimento di Ingegneria civile, ambientale, del territorio, edile e di Chimica
Politecnico di Bari

Roberto Consonni

Istituto di Scienze e Tecnologie chimiche "Giulio Natta"
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Milano

Carmelo Corsaro

Dipartimento di Scienze matematiche e informatiche, Scienze fisiche e Scienze della Terra
Università di Messina

Sandra A. De Pascali

Dipartimento di Scienze e Tecnologie biologiche ed ambientali
Università del Salento, Lecce

Laura Del Coco

Dipartimento di Scienze e Tecnologie biologiche ed ambientali
Università del Salento, Lecce

Maurizio Delfini

Dipartimento di Chimica
Sapienza Università di Roma

Giacomo Di Matteo

Dipartimento di Chimica e Tecnologie del farmaco
Sapienza Università di Roma

Valeria Di Tullio

Istituto per i Sistemi biologici
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Monterotondo (RM)

Francesco Paolo Fanizzi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie biologiche ed ambientali
Università del Salento

Vito Gallo

Dipartimento di Ingegneria civile, ambientale, del territorio, edile e di Chimica
Politecnico di Bari

Raffaella Gianferri

Dipartimento di Chimica
Sapienza Università di Roma

Chiara R. Girelli

Dipartimento di Scienze e Tecnologie biologiche ed ambientali
Università del Salento, Lecce

Cinzia Ingallina

Dipartimento di Chimica e Tecnologie del farmaco
Sapienza Università di Roma

Luca Laghi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie agro-alimentari
Alma Mater Studiorum
Università di Bologna, Cesena

Raffaele Lamanna

Laboratorio bioprodotto e bioprocessi
ENEA Centro ricerche Trisaia
Rotondella (MT)

Francesco Longobardi

Dipartimento di Chimica
Università degli Studi di Bari
"Aldo Moro"

Claudio Luchinat

Centro di risonanze magnetiche
Dipartimento di Chimica
"Ugo Schiff"
Università degli Studi di Firenze,
Consorzio interuniversitario di risonanze magnetiche di metallo proteine e GiottoBiotech s.r.l.

Domenico Mallamace

Dipartimento di Scienze chimiche, biologiche, farmaceutiche ed ambientali
Università degli Studi di Messina

Walter Mandaliti

Dipartimento di Scienze e Tecnologie chimiche
Università di Roma
"Tor Vergata"

Luisa Mannina

Dipartimento di Chimica
e Tecnologie del farmaco
Sapienza Università di Roma

Federico Marini

Dipartimento di Chimica
Sapienza Università di Roma

Lucia Marchetti

Dipartimento di Scienze della vita
Università di Modena e Reggio
Emilia, Modena

Flaminia Cesare Marincola

Dipartimento di Scienze chimiche
e geologiche
Università di Cagliari
Monserrato (CA)

Piero Mastrorilli

Dipartimento di Ingegneria civile,
ambientale, del territorio, edile
e di Chimica
Politecnico di Bari

Pierluigi Mazzei

Dipartimento di Farmacia
Università di Salerno
Fisciano (SA)

Ileana Menegazzo

Dipartimento di Scienze chimiche
Università di Padova

Carlo Mengucci

Dipartimento di Scienze
e Tecnologie agro-alimentari
Alma Mater Studiorum
Università di Bologna, Cesena

Alessandra Micozzi

Istituto Zooprofilattico
Sperimentale dell'Abruzzo
e del Molise "Giuseppe Caporale"
Teramo

Salvatore Milone

Istituto Zooprofilattico
Sperimentale dell'Abruzzo
e del Molise "Giuseppe Caporale"
Teramo

Adele Mucci

Dipartimento di Scienze chimiche
e geologiche
Università degli Studi di Modena
e Reggio Emilia, Modena

Biagia Musio

Dipartimento di Ingegneria civile,
ambientale, del territorio, edile
e di Chimica
Politecnico di Bari

Ridvan Nepravishta

Dipartimento di Scienze
e Tecnologie chimiche
Università di Roma "Tor Vergata"

Maurizio Paci

Dipartimento di Scienze
e Tecnologie chimiche
Università di Roma "Tor Vergata"

Massimiliano Petracci

Dipartimento di Scienze
e Tecnologie agro-alimentari
Alma Mater Studiorum
Università di Bologna, Cesena

Alessandro Piccolo

Dipartimento di Agraria
e Centro interdipartimentale per
la risonanza magnetica nucleare
per l'ambiente, l'agro-alimentare
e i nuovi materiali
Università di Napoli "Federico II"
Portici (NA)

Noemi Proietti

Istituto per i Sistemi biologici
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Monterotondo (RM)

Antonio Randazzo

Dipartimento di Farmacia
Università degli Studi di Napoli
"Federico II"

Valeria Righi

Dipartimento di Scienze per la
qualità della vita
Alma Mater Studiorum
Università di Bologna, Rimini

Archimede Rotondo

Dipartimento di Scienze
biomediche, odontoiatriche
e delle immagini morfologiche
e funzionali
Università degli Studi di Messina

Andrea Salvo

Dipartimento di Chimica
e Tecnologie del farmaco
Sapienza Università di Roma

Francesco Savorani

Dipartimento Scienza applicata
e Tecnologia
Politecnico di Torino

Paola Scano

Dipartimento di Scienza della vita
e dell'ambiente
Università di Cagliari
Monserrato (CA)

Carlo Schillaci

Dipartimento di Scienze
e Tecnologie chimiche
Università di Roma "Tor Vergata"

Elisabetta Schievano

Dipartimento di Scienze chimiche
Università di Padova

Anatoly P. Sobolev

Istituto per i Sistemi biologici
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Monterotondo (RM)

Fabio Sciubba

Dipartimento di Biologia
ambientale
Sapienza Università di Roma

Mattia Spano

Dipartimento di Chimica e
tecnologie del farmaco
Sapienza Università di Roma

Alberto Spisni

Dipartimento di Medicina
e Chirurgia
Università di Parma

Tullia Tedeschi

Dipartimento di Scienze
degli alimenti e del farmaco
Università di Parma

Leonardo Tenori

Centro di risonanze magnetiche
Dipartimento di Chimica
"Ugo Schiff"
Università degli Studi di Firenze
e Consorzio interuniversitario di
risonanze magnetiche di metallo
proteine

Eleonora Urbinati

Dipartimento di Scienze
e Tecnologie agro-alimentari
Alma Mater Studiorum
Università di Bologna, Rimini

Spettroscopia HRMAS NMR

5.1 Introduzione

La spettroscopia **HRMAS NMR** (*High Resolution Magic-Angle Spinning NMR*, NMR ad alta risoluzione con rotazione dell'angolo magico) è importante nello studio degli alimenti in quanto permette di analizzare materiali con consistenza tra solida e liquida (sistemi semisolidi). Prima dello sviluppo della sonda HRMAS, la caratterizzazione NMR degli alimenti era limitata all'analisi dei liquidi estratti da campioni solidi o a soluzioni diluite. Lo sviluppo di questa tecnica ha permesso di studiare anche sistemi semisolidi eterogenei con un'interfaccia solido-liquido, come sospensioni, aggregazioni molecolari, idrogel, tessuti biologici, alimenti, materiali amorfi a una temperatura superiore a quella di transizione vetrosa (gomme, cioccolato ecc.).

L'avvento di questa tecnica, grazie alla combinazione della rotazione del campione all'angolo magico, già sviluppata per gli spettri allo stato solido, con i metodi della risonanza magnetica in fase liquida, ha permesso di ottenere spettri di campioni solidi e/o semisolidi intatti con una risoluzione spettrale simile a quella dello stato liquido. Questa tecnica NMR ha avuto un grande successo nella caratterizzazione di svariati prodotti alimentari, dal settore ortofrutticolo ai prodotti lattiero-caseari, alle carni, fino ai prodotti ittici e ai cereali.

5.2 Principi di base

La caratteristica distintiva della spettroscopia HRMAS NMR è la rapida rotazione del campione attorno a un asse che forma un angolo di 54.7° (**angolo magico**) rispetto al campo magnetico applicato B_0 . Senza la rotazione all'angolo magico, i segnali NMR sarebbero così larghi e asimmetrici da rendere difficile l'interpretazione degli spettri. Infatti, in un campione solido o semisolido, l'orientamento

delle molecole rispetto a B_0 ha una certa variabilità, che si riflette in una distribuzione dei chemical shift e delle interazioni dipolari degli spin; ciò determina un allargamento e una deformazione della forma della riga che riflette la distribuzione. La rapida rotazione del campione attorno a un asse, che forma un angolo θ con il campo magnetico B_0 , ha l'effetto di mediare a zero le interazioni perpendicolari all'asse, lasciando un contributo residuo nella direzione di rotazione proporzionale a $(3 \cos^2 \theta - 1)$. Per $\theta = 54.7^\circ$ si ha $(3 \cos^2 \theta - 1) = 0$, e quindi anche il contributo longitudinale dell'anisotropia si annulla "magicamente" con una conseguente riduzione della larghezza di riga.

È abbastanza intuitivo comprendere che più grande è l'anisotropia, sia microscopica sia macroscopica, maggiore dovrà essere la velocità a cui si fa ruotare il campione. Nei solidi cristallini questi effetti sono così forti da richiedere velocità di rotazione estreme (fino a più di 100 000 giri al secondo, 100 kHz). Viceversa, nei semisolidi la maggiore mobilità molecolare media parzialmente le anisotropie, riducendone significativamente l'intensità, cosicché la rotazione a velocità più basse (3–12 kHz) è sufficiente per azzerarle. Infine, nei liquidi la mobilità molecolare è così alta da mediare completamente le anisotropie, per cui l'alta risoluzione è garantita anche con il campione fermo (**Focus 5.1**).

In definitiva, la sinergia fra la parziale mobilità molecolare dei semisolidi e la rotazione all'angolo magico permette di compensare l'allargamento della riga dovuto all'anisotropia e di ottenere spettri con risoluzione paragonabile a quella che si ottiene con lo stato liquido. Nonostante ciò, gli effetti dell'anisotropia rimangono ancora parzialmente visibili nello spettro HRMAS sotto forma di alcuni segnali aggiuntivi (**spinning sideband**) che compaiono simmetricamente ai lati di ciascuna banda di risonanza a una distanza pari alla velocità di rotazione del campione.

5.3 Strumentazione

Le misure con HRMAS NMR richiedono una sonda diversa da quella utilizzata allo stato liquido, costituita da un dispositivo, detto **statore** (Figura 5.1A), capace di inclinarsi all'angolo magico, al cui interno si trova una **bobina** (coil) che permette l'eccitazione e la rilevazione del segnale NMR. All'interno dello statore, un sistema di flussi controllati di aria compressa o azoto permette di sospendere e ruotare il campione, inserito in un **rotore**, nonché di stabilizzarne e controllarne la temperatura. I rotori (Figura 5.1B) sono dei contenitori di zirconia (ossido di zirconio, ZrO_2) con diametro esterno tipicamente di 4 mm, la cui capacità (12, 50, 80, 90 μL) può essere variata in funzioni delle dimensioni del campione.

Il rotore, una volta riempito con il campione e con qualche microlitro di solvente deuterato, viene chiuso con un tappo, detto **turbina**, dotato di alette che permettono la rotazione del rotore nello statore. Nella sonda HRMAS, analogamente a quella allo stato liquido, vi è un **canale di lock** (Figura 2.15) e una bobina per la generazione di gradienti di campo lungo l'asse di rotazione. L'aggiunta di poche gocce di solvente deuterato permette allo spettrometro di agganciare il segnale del deuterio con il canale di lock. Un'operazione da effettuare con cura ogni qual volta si monta la sonda HRMAS, pena la perdita di risoluzione negli spettri, è la **configurazione dell'angolo magico**, che

si effettua utilizzando un campione standard di bromuro di potassio (KBr).

Una volta che il rotore è inserito nel magnete e posto in rotazione, si lavora come se si avesse un campione in soluzione. Nel caso di campioni con una certa consistenza, per esempio la carne, possono comparire negli spettri ^1H NMR, sia monodimensionali sia bidimensionali, le già ricordate spinning sideband, che possono sovrapporsi ai segnali dell'alimento, ma che è possibile spostare cambiando la velocità di rotazione. L'aumento della velocità di rotazione allontana le spinning si-

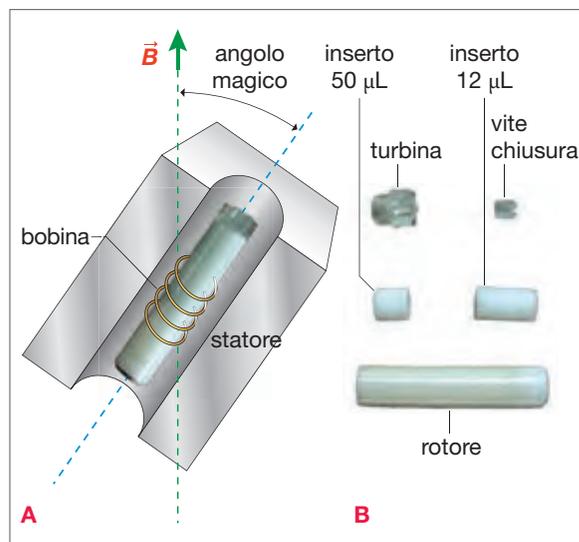


Figura 5.1 (A) Schema della struttura della sonda HRMAS e (B) immagine del rotore e delle sue parti.

FOCUS 5.1 Tecnica CPMAS NMR

Nello studio dei solidi, la rotazione all'angolo magico è spesso insufficiente per raggiungere una risoluzione dello spettro accettabile. Infatti, allo stato solido tutte le interazioni di spin sono presenti con la loro anisotropia, ossia con la loro dipendenza dall'orientamento della molecola, o del frammento molecolare, rispetto alla direzione del campo magnetico esterno. Questa è una differenza fondamentale rispetto allo stato liquido, in cui l'anisotropia delle interazioni viene invece mediata a zero dai moti molecolari isotropi e veloci.

Se oggi la spettroscopia NMR allo stato solido è una tecnica estremamente potente, lo si deve soprattutto allo sviluppo di **tecniche, dette in alta risoluzione**, in grado di rimuovere l'anisotropia delle interazioni di spin, permettendo così di ottenere spettri risolti. La combinazione delle tecniche di **rotazione dell'angolo magico** (MAS, *Magic Angle Spinning*) e di **disaccoppiamento ad alta potenza** (HPD, *High-Power Decoupling*) del **protone** permette di eliminare le cause più importanti di allargamento di riga

e ottenere quindi spettri in alta risoluzione, caratterizzati dalla presenza di segnali stretti ai valori isotropi di chemical shift. Inoltre, poiché la sensibilità sugli eteronuclei è bassa, spesso si utilizza anche la tecnica della **cross-polarizzazione**, che consiste nel trasferire parte della magnetizzazione dell'idrogeno all'eteronucleo, con un notevole miglioramento della sensibilità. Quindi, la tecnica più utilizzata per l'analisi NMR dei solidi, la **CPMAS** (*Cross Polarization Magic Angle Spinning*, cross-polarizzazione con rotazione dell'angolo magico), è il compendio di tre tecniche: la rotazione veloce all'angolo magico, il disaccoppiamento ad alta potenza e la cross-polarizzazione. Generalmente si osserva un eteronucleo, per esempio il ^{13}C , mentre si disaccoppia il protone.

A causa della diversa efficienza nel trasferimento di magnetizzazione dal protone all'eteronucleo nei vari gruppi chimici di una molecola, gli spettri CPMAS non sono quantitativi, sebbene un'analisi quantitativa sia possibile con alcuni accorgimenti.

deband, ma può danneggiare il campione a causa della forza centrifuga, che può indurre la separazione delle fasi che costituiscono l'alimento o la rottura della struttura cellulare e dei tessuti.

5.4 Metodologie

Lo **spettro HRMAS** è una vera e propria fotografia chimica della piccola porzione di alimento sottoposta ad analisi, in cui si ritrovano contemporaneamente i segnali delle componenti polari e apolari (idrofile e idrofobe) nel loro ambiente naturale. L'analisi dei campioni tal quali evita il ricorso a processi di estrazione e separazione che, oltre a essere dispendiosi in termini di tempo, possono innescare reazioni di degradazione. Questa ricchezza di informazione, tuttavia, comporta una forte sovrapposizione dei segnali negli spettri monodimensionali, che in parte può essere superata con esperimenti 2D. Gli esperimenti che si possono eseguire in HRMAS sono di fatto gli stessi che si conducono sui campioni in soluzione.

Il set di sequenze 2D utilizzato più di frequente per l'analisi NMR di alimenti è costituito principalmente da ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^{13}C HSQC. Spesso, negli alimenti semisolidi il segnale più intenso è quello dell'acqua, che, quando non interessa, viene soppresso con sequenze analoghe a quelle utilizzate allo stato liquido.

Per isolare i segnali stretti, provenienti dalle molecole più mobili, è utile sopprimere i segnali più larghi, spesso dovuti a lipidi o proteine, sfruttando la differenza fra i tempi di rilassamento trasversale T_2 . A tale scopo si utilizza una **sequenza spin eco (filtro in T_2)** con un tempo τ di singolo eco molto breve, tipicamente 1 ms, e un numero di echi adeguato alla larghezza dei segnali da eliminare (v. Capitolo 6, in particolare la Figura 6.3).

Per isolare invece i segnali delle molecole più lente (macromolecole, lipidi ecc.) si usano sequenze di impulsi che permettono di rilevare le diverse proprietà di diffusione delle molecole (**filtri in diffusione**). Nello spettro filtrato in diffusione compaiono solo i segnali dalle molecole che diffondono lentamente nel campione. I parametri di questo esperimento, ovvero tempo di diffusione e forza dei gradienti impiegati, vanno ottimizzati in funzione del campione, cercando di eliminare dallo spettro le componenti spettrali strette. Riassumendo, il filtro in T_2 e quello in diffusione sono esperimenti complementari che, insieme con lo spettro 1D completo, permettono di evidenziare

tutte le componenti del campione aggirando in parte il problema del sovrappollamento dello spettro NMR, sebbene entrambi i filtri non sempre garantiscano un'analisi quantitativa dei segnali.

Nell'analisi HRMAS le misure di diffusione rivestono un'importanza maggiore rispetto all'analisi delle soluzioni. Infatti, nei campioni eterogenei, la presenza di un'interfaccia solido-liquido funge da barriera ai movimenti diffusivi. Questa **diffusione ristretta** si traduce in una dipendenza apparente dei coefficienti di diffusione dal tempo di osservazione. Infatti, se il tempo di diffusione è sufficientemente breve da non permettere alla molecola di raggiungere l'interfaccia solida, si osserva la diffusione ordinaria. Viceversa, a tempi lunghi la molecola raggiunge la barriera e viene deviata con una riduzione artificiale del cammino che essa può compiere, e quindi con un coefficiente di diffusione apparentemente minore.

A parte l'utilizzo della diffusione per ridurre la complessità degli spettri mediante la tecnica DOSY (Paragrafo 2.3), la misura dei coefficienti di diffusione apparenti in funzione del tempo di diffusione permette, quindi, di avere informazioni utili sulla struttura tridimensionale del network solido in cui è intrappolato il liquido, su dimensione e forma degli aggregati macromolecolari, e sulla mobilità di molecole in fasi eterogenee, quali tessuti, emulsioni, liposomi, micelle.

La diffusione ristretta può essere utilizzata anche per migliorare la selettività di un esperimento DOSY, aggiungendo al campione una **fase stazionaria** cromatografica. La presenza della fase stazionaria, infatti, modifica selettivamente i percorsi diffusivi delle molecole e la loro mobilità a causa, rispettivamente, della porosità e dell'affinità della molecola con la fase solida, producendo una maggiore dispersione dei coefficienti di diffusione misurati.

Le dimensioni ridotte dei rotori HRMAS (12–90 μL) sono una grande opportunità quando la quantità di campione da analizzare è esigua. In questi casi la sonda HRMAS può essere impiegata come **nanosonda (nanoprobe)**. Infatti, utilizzando volumi inferiori di solvente (12 μL invece dei circa 600 μL necessari per un tubo per le soluzioni), essa permette di raggiungere la concentrazione minima rilevabile con quantità di analita molto più piccole, migliorando la sensibilità di un fattore di 50. Ciò è particolarmente utile per campioni provenienti da separazioni cromatografiche o per l'analisi di contaminanti ottenuti da prove

Risonanza magnetica per immagini (MRI)

7.1 Introduzione

La **risonanza magnetica per immagini (MRI, Magnetic Resonance Imaging)** è una tecnica che si basa sui principi della risonanza magnetica nucleare e consente di ottenere immagini morfologiche dettagliate di sezioni interne di tessuti integri. Inoltre, utilizzando specifici protocolli di acquisizione dati, è in grado di fornire molteplici informazioni complementari relative alla composizione e alla dinamica delle molecole che formano il tessuto in esame.

La tecnica MRI è stata sviluppata nei primi anni '70 del Novecento e per molto tempo è stata

impiegata prevalentemente per analizzare mammiferi *in vivo* negli ambiti della medicina diagnostica e della farmaceutica applicata. Solo nell'ultimo ventennio le applicazioni MRI sono state gradualmente estese ad altri campi di ricerca, incluso quello delle scienze degli alimenti.

Questa tecnica è eccellente per investigare prodotti alimentari in modo non invasivo, così come si è rivelata particolarmente idonea ad accertarne la qualità, ottimizzare le strategie per la loro lavorazione e/o conservazione, caratterizzare morfologicamente prodotti agroalimentari e comprendere i meccanismi legati al trasporto di massa e calore.

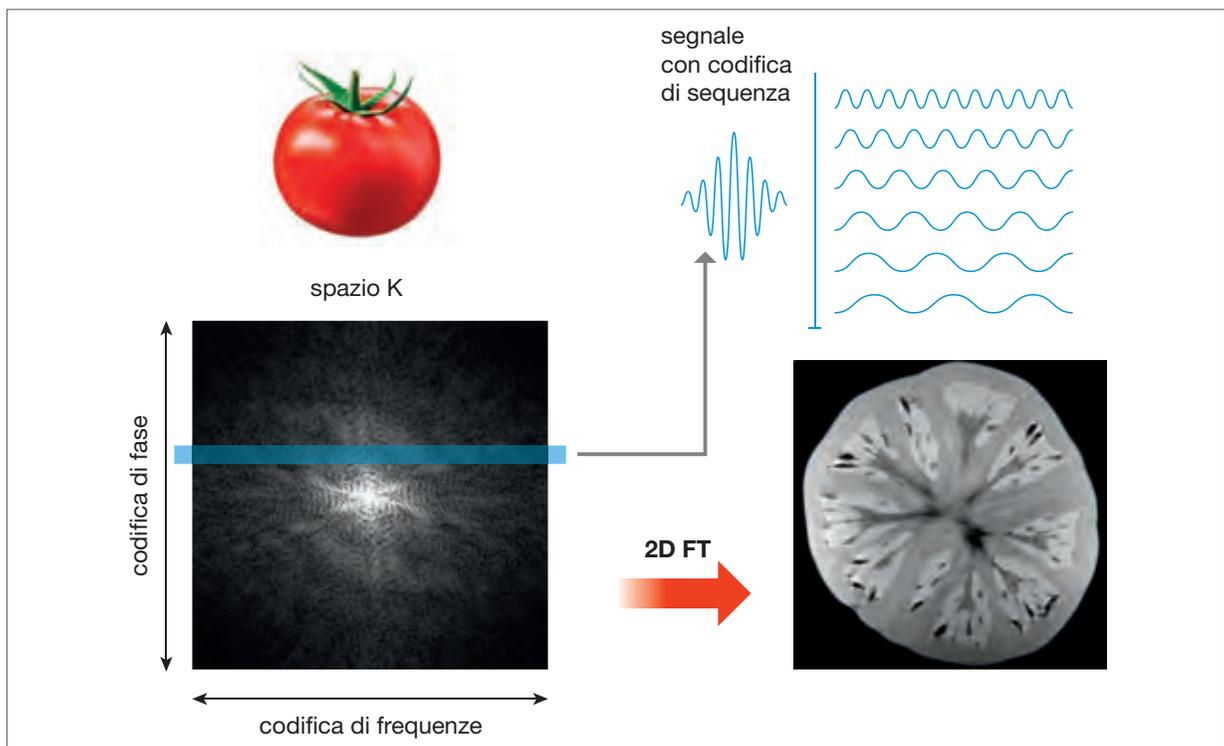


Figura 7.1 Schema generico per la ricostruzione di un'immagine MRI. I singoli segnali rilevati eseguendo un esperimento MRI sono localizzati spazialmente, applicando una codifica di fase e una di frequenze, e vanno a comporre una matrice bidimensionale, convenzionalmente detta *spazio K*. La sua decodifica e l'applicazione della trasformata di Fourier (2D FT) forniscono la definizione di un'immagine.

Infatti, non solo permette di visualizzare e valutare struttura e morfologia dei prodotti alimentari, ma consente anche di seguire, in tempo reale, i cambiamenti, in termini di dinamica molecolare, che avvengono in regioni specifiche al loro interno, tra cui la distribuzione e diffusione dell'acqua e dei lipidi.

7.2 Principi di funzionamento

Nella spettroscopia MRI, diversamente da quanto accade per altre tecniche NMR, la risposta fornita dai nuclei eccitati è sottoposta a una codifica spaziale. Quest'ultima viene eseguita contrassegnando con una sorta di **codice di localizzazione spaziale** i molteplici segnali prodotti dall'esperimento MRI, prima che vengano rilevati dal detector. Tale codifica avviene investendo il campione con dei gradienti di campo magnetico, orientati in modo ortogonale l'uno rispetto all'altro e atti a variare, in modo rigorosamente controllato e in funzione dello spazio, la fase (**codifica di fase**) e la frequenza di risonanza (**codifica di frequenza**) con cui eccitare i nuclei in esame (per esempio, gli idrogeni di molecole d'acqua).

Si definisce convenzionalmente **spazio K** la rappresentazione dei dati grezzi acquisiti sotto forma di una matrice bidimensionale di punti,

ciascuno dei quali è individuato da una combinazione unica di valori di frequenza (asse x , codifica di frequenza) e di fase (asse y , codifica di fase). La successiva decodifica di questi segnali permette di localizzare spazialmente l' i -esima origine dell' i -esimo segnale rispetto all'oggetto analizzato e di ricostruire un'immagine MRI applicando la trasformata di Fourier bidimensionale (**Figura 7.1**).

Ogni immagine 2D MRI nasce dall'analisi di una specifica sezione del campione (chiamata **slice**) che viene selettivamente eccitata ed esaminata. Gli esperimenti MRI si conducono valutando diverse slice, tra loro non sovrapposte e disposte parallelamente a uno dei tre piani ortogonali fondamentali, ossia xy (piano assiale o trasversale), yz (piano sagittale o laterale) o xz (piano coronale o frontale) (**Figura 7.2**). La definizione del numero, dello spessore, della posizione rispetto al campione delle slice, nonché del loro orientamento lungo uno dei tre piani ortogonali principali, prende convenzionalmente il nome di **geometria di analisi**. L'opportuna calibrazione di quest'ultima permette di esaminare accuratamente una specifica zona all'interno di un alimento intatto, evidenziandone caratteristiche morfologiche (la risoluzione spaziale è, in genere, nell'ordine delle decine di micrometri) e rivelando informazioni ascrivibili a importanti proprietà tissutali e meccaniche.

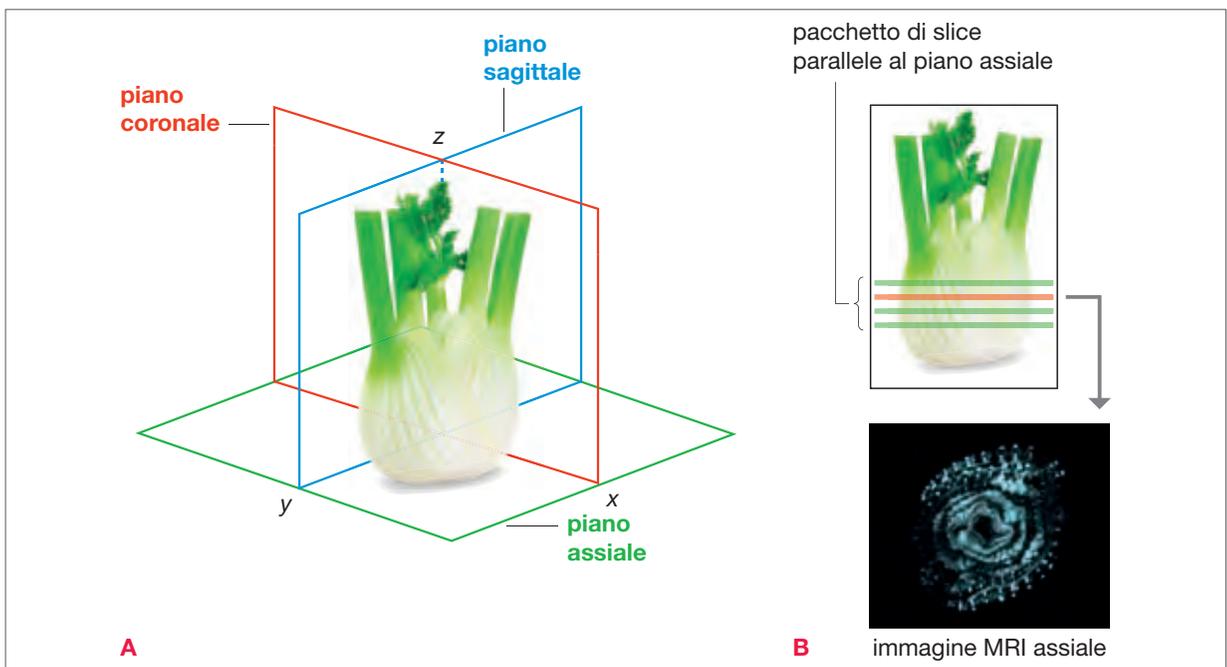


Figura 7.2 (A) Raffigurazione dei canonici piani ortogonali (assiale, sagittale e coronale) che vengono presi come riferimento nelle analisi MRI. (B) Impostazione di un pacchetto di slice a geometria assiale e ricostruzione di una delle n -immagini.

13.1 Caratteristiche dell'olio extra vergine di oliva

L'olio extra vergine di oliva, definito anche “oro giallo” per il suo valore, conosciuto sin dall'antichità, è un olio alimentare ottenuto dalla spremitura delle olive, cioè dai frutti (**drupa**) dell'olivo.

Dal punto di vista botanico l'olivo, denominato *Olea europaea* L., appartiene alla famiglia delle Oleaceae, le cui principali caratteristiche sono la longevità e l'adattamento a condizioni ambientali e colturali estreme. Secondo la recente revisione della tassonomia di *Olea europaea*, questa specie è divisa in sei sottospecie, quella presente in Italia è l'*europaea*.

L'olio extra vergine di oliva è un prodotto tipicamente mediterraneo, anche se ormai si trovano coltivazioni di olivo in molte altre parti del mondo (per esempio, Sud Africa, California, Sud America, Australia).

La produzione maggiore è in Spagna, seguita da Italia e Grecia, ma sta crescendo anche in Nord Africa, soprattutto grazie ai buoni risultati conseguiti in Tunisia e in Marocco. Oltre che per le sue proprietà sensoriali e nutrizionali-nutraceutiche, l'olio extra vergine di oliva assume particolare rilevanza anche per il continuo aumento delle sue quote di mercato nell'ambito dei grassi alimentari.

La composizione chimica dell'olio di oliva è influenzata da numerosi fattori, tra cui la varietà della pianta, il grado di maturazione delle olive, le condizioni pedoclimatiche (suolo, temperatura, clima), le pratiche agronomiche (irrigazione, fertilizzazione ecc.), il metodo di raccolta (brucatura a mano, raccattatura, attrezzature meccaniche ecc.), le condizioni di stoccaggio, le caratteristiche del frantoio e la tecnica di estrazione.

L'olio extra vergine di oliva è composto principalmente da due frazioni: una saponificabile e

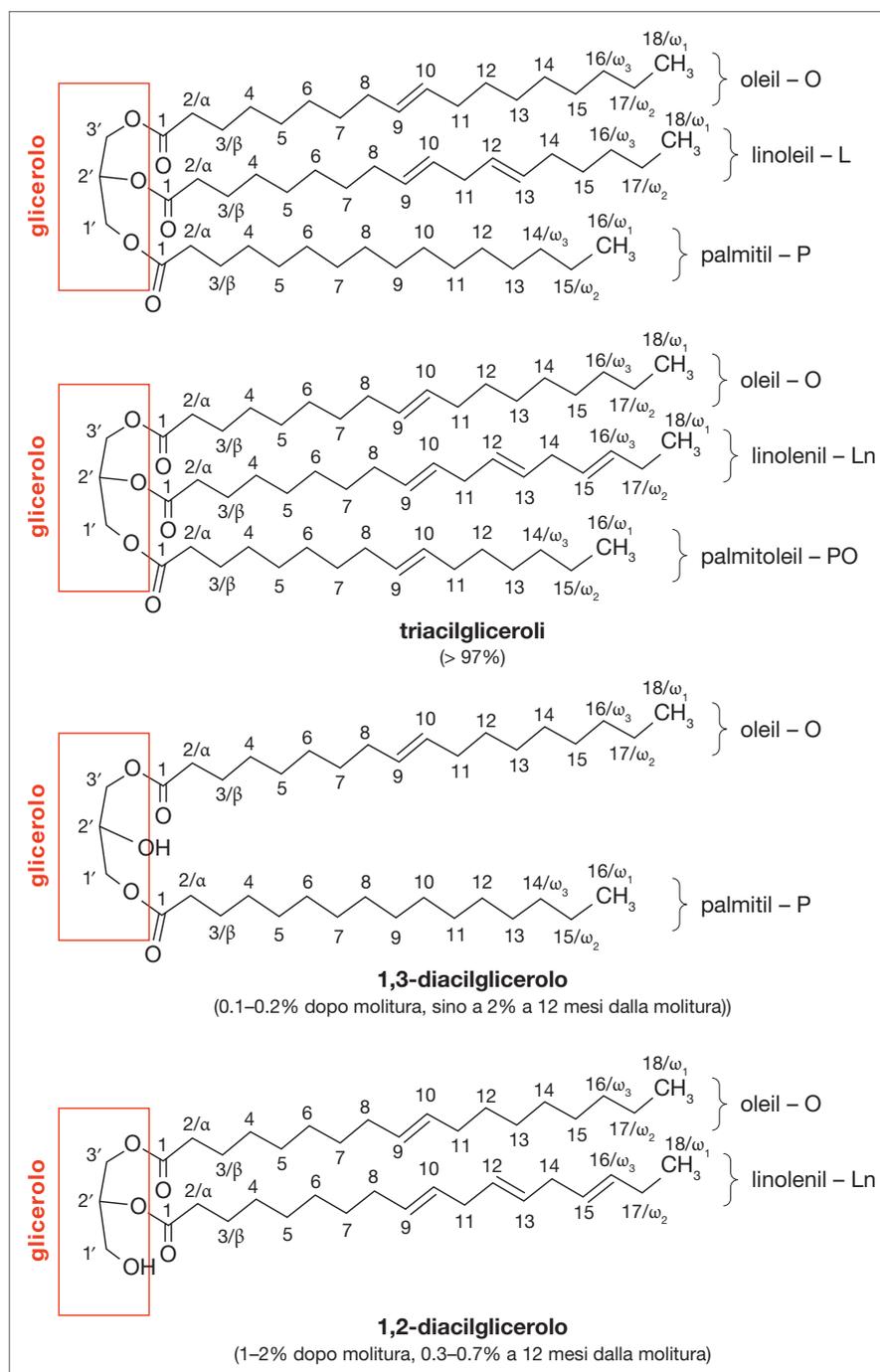
una insaponificabile. La **frazione saponificabile** rappresenta il 98–99% del prodotto ed è costituita principalmente da trigliceridi e, in misura minore, da digliceridi e monogliceridi (**Figura 13.1**). I trigliceridi sono esteri del glicerolo con acidi grassi a catena lunga, che possono essere saturi, monoinsaturi o polinsaturi. Le catene grasse presenti in maggiore concentrazione sono quelle degli acidi oleico, palmitico e linoleico.

Un **trigliceride semplice** ha le tre catene grasse uguali, mentre nei **trigliceridi misti** sono presenti catene diverse. Nell'olio extra vergine di oliva, il 55% dei trigliceridi sono semplici, mentre il restante 45% è costituito da trigliceridi misti. Rispetto agli altri grassi alimentari, vi è una percentuale maggiore di acido oleico, ma inferiore di catene polinsature.

La **frazione insaponificabile** (1–2%) è costituita da idrocarburi (come lo squalene), fitosteroli (quali β -sitosterolo, campesterolo, stigmasterolo), vitamine liposolubili e loro precursori (tra cui β -carotene e tocoferoli), pigmenti (clorofilla e caroteni), alcoli alifatici superiori, alcoli triterpenici (eritrodiole e uvaolo) e polifenoli. La composizione chimica dell'olio extra vergine concorre a conferire le caratteristiche organolettiche dell'olio ed è responsabile sia di un'azione antiossidante nei confronti dell'irrancidimento sia di un'azione protettiva sulla salute dell'essere umano.

La classificazione comunitaria degli oli d'oliva è regolamentata dal regolamento di esecuzione (UE) 2019/1604 del 27 settembre 2019. In dettaglio, tale regolamento, che modifica il regolamento (CEE) 2568/91, è relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva, classificati come olio extra vergine di oliva, olio di oliva vergine, olio di oliva lampante, olio di oliva raffinato, olio di oliva, e degli oli di sansa (olio di sansa greggio, olio di sansa raffinato, olio di sansa di oliva), nonché alle metodiche di analisi a essi attinenti (**Focus 13.1**).

Figura 13.1 Schema e numerazione di alcuni composti presenti nell'olio d'oliva. Le abbreviazioni sono usate anche per l'assegnazione sulle figure degli spettri NMR.



Considerato l'elevato valore organolettico-nutrizionale-commerciale, l'olio di oliva extra vergine è soggetto a diverse tipologie di frodi, tra cui:

- aggiunta di oli di oliva di categorie inferiori (oli vergini di oliva e oli lampanti);
- aggiunta di oli di semi (principalmente oli di nocciola di qualità inferiore);
- designazione ingannevole circa l'origine delle olive, obbligatoria a partire dal regolamento (CE) 182/2009 (soprattutto olio non italiano venduto come italiano);
- dichiarazione, come extra vergine, di olio di oliva che non rispetta le caratteristiche chimico-fisiche e organolettiche, presenti nelle norme di commercializzazione;
- designazione ingannevole riguardo ai marchi (DOP, IGP e BIO), mancata certificazione o sostituzione degli oli a marchio con oli generici.

Questa problematica fa emergere con chiarezza l'importanza della **tracciabilità** dell'olio. La tracciabilità alimentare è un passaggio essenziale per garantire la sicurezza di ciò che arriva sulle tavole, dal punto di vista sia economico sia salutistico. In quest'ottica, la ricerca scientifica ha fatto passi enormi per identificare queste frodi; tra le diverse tecniche analitiche convenzionali, l'NMR risulta essere tra le più performanti, in quanto può fornire informazioni sulla presenza di oli estranei all'olio extra vergine di oliva, nonché utili indicazioni sull'origine geografica del prodotto.

13.2 Applicazioni dell'NMR

L'olio di oliva è sicuramente tra gli alimenti più studiati con la spettroscopia NMR in soluzione. Uno dei vantaggi dell'analisi NMR rispetto alle metodiche classiche sta nel fatto che la prepara-

zione del campione non prevede procedimenti di separazione: è sufficiente inserire una minima quantità del campione (si tratta di microlitri) nel tubo NMR e diluirla nel solvente deuterato (cloroformio e dimetilsolfossido deuterati o solo cloroformio deuterato). Il tubo NMR dev'essere chiuso bene per evitare l'evaporazione del solvente. La rilevazione simultanea di più composti mediante NMR ha permesso di trarre informazioni su conservazione e invecchiamento dei campioni di olio, e sul periodo di raccolta delle olive, e di controllarne autenticità, qualità, origine geografica e possibili adulterazioni.

Assegnazione dello spettro ¹H di un olio di oliva

La spettroscopia ¹H NMR consente di rilevare sia i composti presenti in maggiore concentrazione, ovvero i trigliceridi, sia i composti minoritari (mono- e digliceridi, aldeidi, steroli, squalene, ter-

FOCUS 13.1 Metodi classici di analisi degli oli di oliva

Di seguito sono riportate alcune delle analisi previste dal regolamento (CEE) 2568/91 e successive modifiche e integrazioni.

Determinazione dell'acidità di un olio di oliva Per acidità si intende il contenuto percentuale di acidi grassi liberi negli oli d'oliva. Il tenore in acidi grassi liberi viene espresso come **numero di acidità**, cioè i milligrammi di idrossido di potassio necessari a neutralizzare 1 g di olio; il risultato viene espresso in percentuale in peso di acido oleico, in quanto è l'acido grasso più abbondante nell'olio di oliva.

Determinazione dell'indice di perossidi L'indice, o numero, di perossidi (N.P.) si esprime in meq O₂/kg (milliequivalenti di ossigeno attivo per kg di olio) e viene determinato tramite una titolazione iodometrica; esprime la concentrazione dei gruppi perossidici —O—O— presenti.

Questo parametro indica il grado di ossidazione primaria dell'olio, cioè la sua tendenza a irrancidire. I perossidi sono dovuti alla reazione con l'ossigeno e all'azione di alcuni enzimi specifici presenti nel frutto, le **lipossidasi**, che, quando entrano in contatto con l'olio a seguito di lesioni cellulari, ossidano gli acidi grassi. Anche durante la conservazione dell'olio, la semplice presenza dell'ossigeno può attivare l'ossidazione chimica a carico degli acidi grassi, con conseguente formazione di idroperossidi.

Analisi spettrofotometrica nell'ultravioletto L'esame nell'ultravioletto fornisce informazioni su qualità, composizione ed eventuali trattamenti industriali di un olio. Gli acidi grassi insaturi di origine naturale presentano doppi legami non coniugati, in seguito a trattamenti industriali si possono, invece, formare quantità rilevanti di doppi e tripli legami coniugati, che assorbono a 230 nm (dieni) e a 270 nm (trieni). In questa regione assorbono anche i composti ossigenati dovuti a processi di irrancidimento, come al-

deidi e chetoni (invecchiamento o cattiva conservazione). Pertanto, per oli con acidità superiore al 3.3% oppure con N.P. > 20, è necessario effettuare un passaggio preventivo su allumina per il loro allontanamento.

Determinazione degli esteri metilici degli acidi grassi mediante gascromatografia Gli acidi grassi dei gliceridi presenti nell'olio vengono trasformati, mediante transesterificazione, nei rispettivi esteri metilici, che presentano una maggiore volatilità e una minore polarità rispetto ai corrispondenti acidi liberi. Inoltre, con questa reazione, vengono decomposti i trigliceridi misti, rendendo possibile il dosaggio dei singoli acidi che ne facevano parte. Gli acidi grassi metilati vengono identificati e quantificati mediante GC-FID (*Gas Chromatography with Flame-Ionization Detection*, gascromatografia con detector a fotometria di fiamma). Ne segue che questa determinazione fornisce la percentuale in composizione acidica degli esteri metilici.

Valutazione organolettica (o panel test) La commercializzazione degli oli di oliva vergini nelle categorie merceologiche extra vergine e vergine è subordinata, oltre che all'analisi chimica, anche alla valutazione organolettica da parte di un panel di assaggiatori opportunamente formato (minimo 10 persone). Ogni persona del panel deve odorare, assaggiare l'olio in esame e poi annotare, sulle scale di 10 cm del foglio di profilo a sua disposizione, l'intensità alla quale percepisce ciascuno degli attributi negativi (riscaldo/morchia, muffa-umidità-terra, avvinato, rancido ecc.) e positivi (fruttato, amaro, piccante). La classificazione dell'olio avviene confrontando il valore della mediana dei difetti e della mediana del fruttato, con intervalli di riferimento predeterminati (per esempio, per l'olio extra vergine di oliva la mediana dei difetti deve essere pari a 0 e la mediana del fruttato superiore a 0).

16.1 Introduzione

Per **prodotti dell'alveare** si intende un gruppo di sostanze derivanti dal lavoro delle api nel loro nido: il **miele**, la **propoli** e il **polline d'api** sono di origine botanica, mentre la **pappa reale**, la **cera d'api** e il **veleno d'api** sono di origine animale. In questo capitolo si parlerà di applicazioni della spettroscopia NMR su miele e propoli, maggiormente consumati e commercializzati nell'industria alimentare e responsabili di una certa influenza benefica sull'organismo, oltre a possedere un ben noto valore nutritivo.

16.2 Caratteristiche del miele

Secondo la direttiva 2001/110/CE (20 dicembre 2001), «il miele è la sostanza dolce naturale che le api (*Apis mellifera*) producono dal nettare di piante o dalle secrezioni provenienti da parti vive di piante o dalle sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive di piante (melata) che esse bottinano, trasformano combinandole con sostanze specifiche proprie, depositano, disidratano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell'alveare».

Il **nettare** è una secrezione zuccherina presente nei fiori, la cui composizione (principalmente acqua, fruttosio, glucosio, saccarosio e componenti minori) dipende da molti fattori ambientali ma è relativamente costante per ciascuna specie botanica. La **melata** è invece una soluzione zuccherina costituita principalmente da glucidi complessi, come destrine e oligosaccaridi, presenti su foglie o rami delle piante in seguito all'azione di insetti parassiti.

I mieli quindi si possono classificare in base all'origine in due grandi categorie:

- i **mieli di fiori** o di nettare;
- i **mieli di melata**.

Il miele di nettare può essere ulteriormente classificato come **monoflorale** o **multiflorale** (noto come **millefiori**). Il miele multiflorale è prodotto con il nettare raccolto da piante diverse; il miele monoflorale invece proviene interamente o principalmente da una fonte vegetale, indicata in etichetta e dalla quale eredita le caratteristiche organolettiche, fisico-chimiche e microscopiche.

La produzione di miele è concentrata prevalentemente in tre continenti: in Asia per circa il 50%, la parte restante in Europa e nelle Americhe. L'Italia è il quarto paese dell'Unione europea per numero di alveari dopo Spagna, Romania e Polonia. La produzione italiana viene rilevata dall'Istat ogni anno.

La composizione chimica dipende da diversi fattori, principalmente dalla fonte botanica da cui le api hanno ricavato il nettare, dalla regione di produzione e dal processo di lavorazione.

Il miele può essere considerato una soluzione satura di zuccheri (75–80% zuccheri e 16–18% acqua) contenente anche, in minor quantità, diverse sostanze tipiche ed esclusive di questo prodotto. È la matrice alimentare con il profilo zuccherino più complesso, poiché possono essere presenti oltre 20 zuccheri diversi. I monosaccaridi, principalmente glucosio e fruttosio, costituiscono circa il 75% degli zuccheri, mentre il 10–15% è costituito da disaccaridi e oligosaccaridi. I principali disaccaridi sono maltosio, turanosio, isomaltosio, palatinosio, kojibiosio, nigerosio e maltulosio. Tra i trisaccaridi il più rappresentato è l'**erlosio**, ma si possono trovare anche **raffinosio** e **melezitosio**. Molti degli zuccheri presenti nel miele sono assenti nel nettare e si formano in seguito all'azione di enzimi secreti dalle ghiandole ipofaringee dell'ape (principalmente per azione dell'invertasi). Il processo enzimatico avviene nella fase di maturazione del miele, durante la quale il contenuto in monosaccaridi diminuisce, mentre quello dei di- o trisac-

un'eccitazione selettiva di una piccola regione spettrale dove è presente il segnale opportunamente scelto della molecola di interesse, seguita da un trasferimento di magnetizzazione tra tutti gli spin scalarmente accoppiati con il segnale eccitato. Nel caso degli oligosaccaridi, dove ogni unità zuc-

cherina rappresenta un sistema di spin separato, si ottiene lo spettro TOCSY solo del sistema di spin eccitato. Un esempio è riportato nella **Figura 16.2**, dove si confrontano lo spettro 1D convenzionale del maltosio e i tre possibili spettri TOCSY selettivi, ottenuti eccitando il segnale anomero del

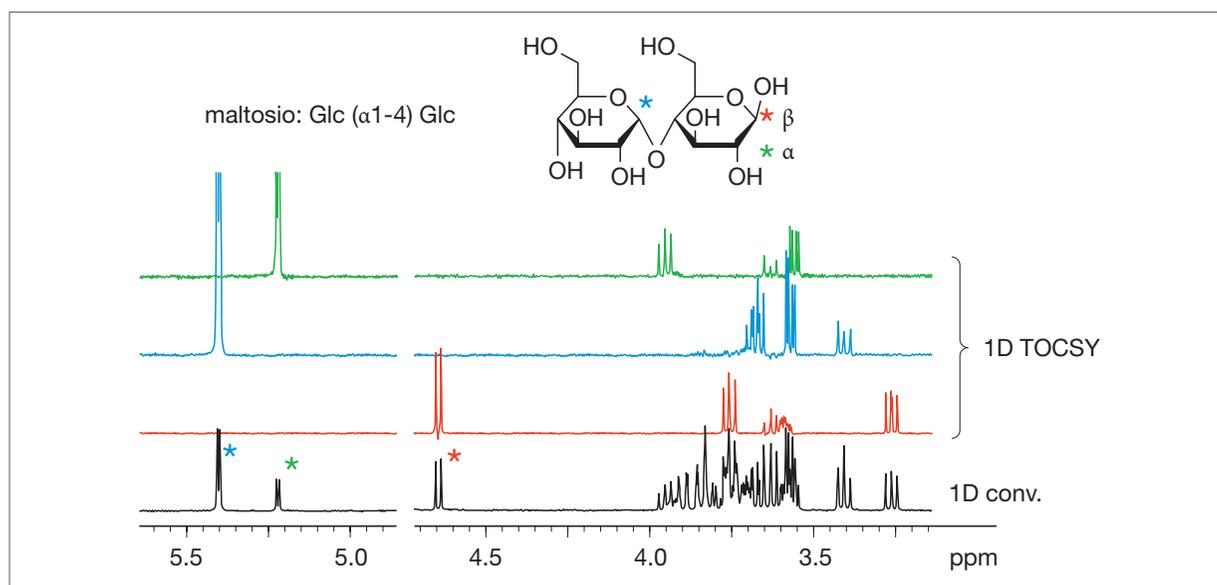


Figura 16.2 Spettro 1D convenzionale del maltosio (in nero) e tre possibili spettri TOCSY selettivi ottenuti eccitando i segnali anomeric (in blu, rosso e verde).

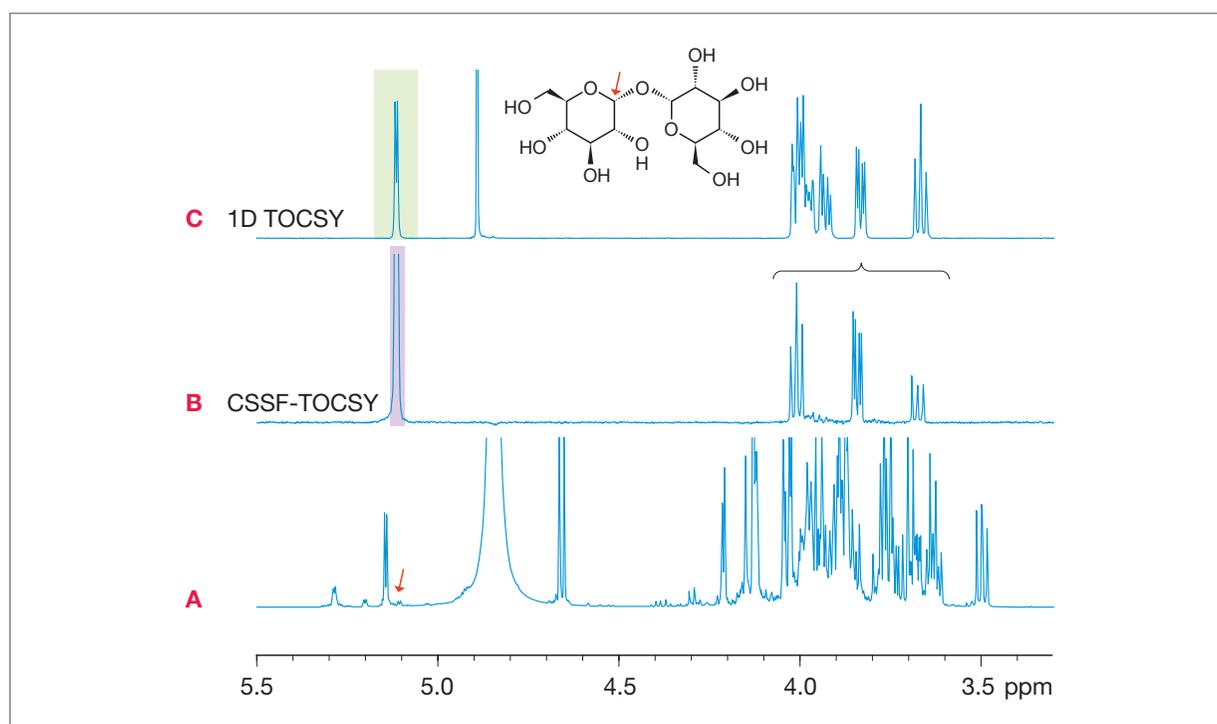


Figura 16.3 Regione dello spettro protonico del miele in D_2O (A) acquisito con sequenza 1D convenzionale, (B) acquisito con sequenza CSSF-TOCSY e (C) acquisito con sequenza 1D per TOCSY selettivo con impulso shaped. La frequenza di eccitazione è indicata dalla freccia rossa nella traccia A.

primo zucchero e i segnali dell'anomero α e quello dell'anomero β del secondo zucchero, rispettivamente.

Grazie alla grande dipendenza del chemical shift dalla struttura molecolare, il pattern per ciascuno zucchero è unico. Ovviamente, il numero di segnali presenti nel TOCSY dipende dal numero di sistemi di spin eccitati dall'impulso sagomato. Per riuscire a eccitare un singolo zucchero, o al più due o tre zuccheri in un solo esperimento, in miscele complesse come il miele, è necessaria una selettività maggiore di quella ottenuta con i più convenzionali impulsi shaped (tipo gaussiana). Una soddisfacente selettività è raggiunta mediante l'utilizzo di un filtro selettivo chiamato **CSSF** (*Chemical Shift Selective Filter*, filtro selettivo del chemical shift), che permette di discriminare segnali che distano solo pochi Hz. Lo spettro che si ottiene è estremamente semplificato: nella **Figura 16.3** si può vedere la differenza tra un

TOCSY selettivo con impulso a gaussiana e un TOCSY selettivo con CSSF.

L'utilizzo di questa sequenza è fondamentale per definire il profilo zuccherino dei mieli. Nell'esperimento CSSF-TOCSY, uno dei parametri importanti da determinare, per ciascuno zucchero, è la frequenza di eccitazione più opportuna che restituisca uno spettro contenente almeno un segnale specifico e quantificabile per quello zucchero. Generalmente si sceglie la frequenza di un H legato a un carbonio anomero che risuona nella zona spettrale glucidica meno sovrapposta. La **Figura 16.4** illustra l'applicazione di questa tecnica per la quantificazione del nigerosio (3-O- α -D-glucopiranosil-D-glucosio), per il quale è stato scelto il protone anomero del residuo di glucosio in posizione 2 indicato dalla freccia. La traccia arancione nella Figura 16.4B è lo spettro CSSF-TOCSY così ottenuto su un campione di miele. La traccia verde, invece, è lo spettro ottenuto, con analogo esperimento, su una soluzione

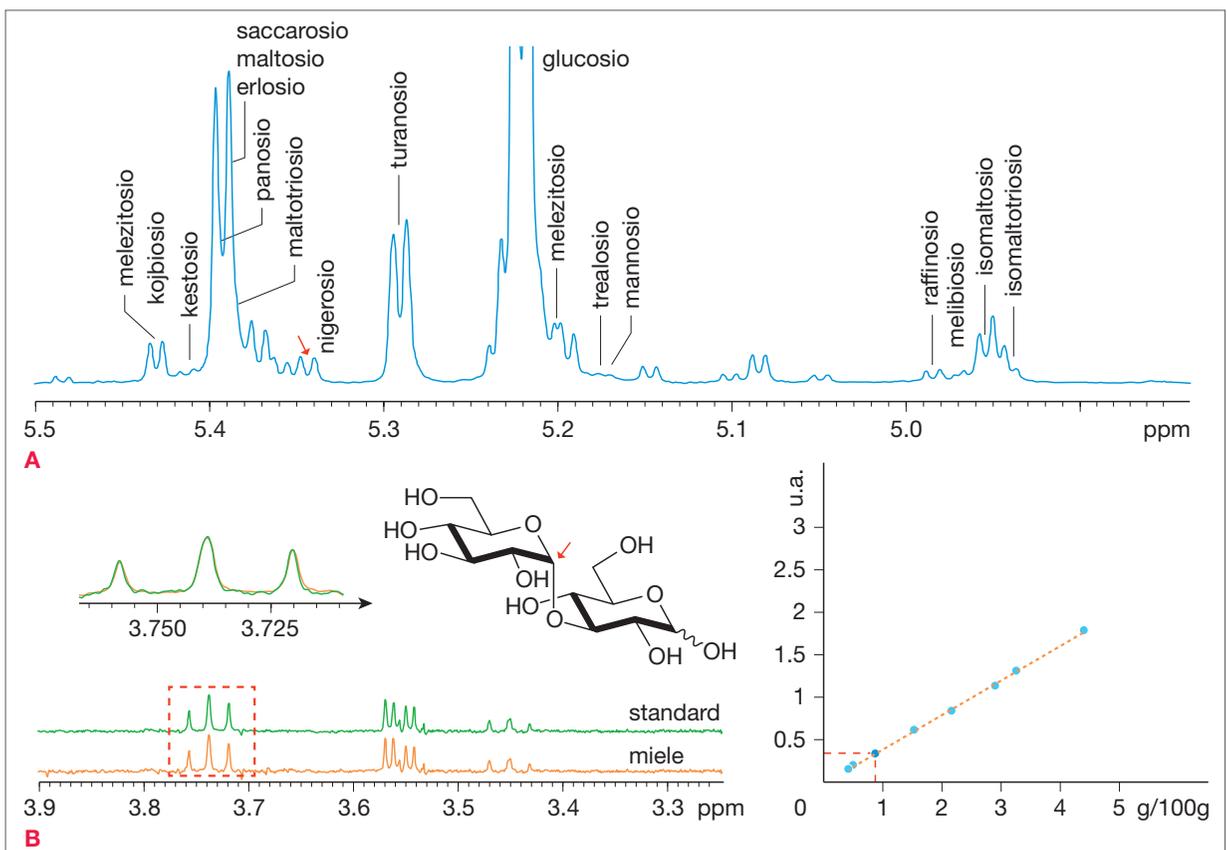


Figura 16.4 (A) Regione dei protoni legati ai carboni anomeric dello spettro ^1H NMR convenzionale. (B) Esempio di esperimento CSSF-TOCSY, eseguito eccitando il segnale anomero del nigerosio a 5.34 ppm: lo spettro (in basso) risulta del tutto analogo allo spettro ^1H 1D dello stesso zucchero in soluzione standard, e il tripletto scelto per la quantificazione è perfettamente sovrapponibile. La sua integrazione permette una quantificazione accurata mediante la retta di calibrazione.

La risonanza magnetica

nella scienza degli alimenti

Autori e autrici

Federica Angilè, Alessia Bellomaria, Davide Bertelli, Fabio Bertocchi, Laura Ruth Cagliani, Augusta Caligiani, Donatella Capitani, Francesco Capozzi, Nicola Cavallini, Doris Cela, Alessandra Ciampa, Roberto Consonni, Carmelo Corsaro, Sandra A. De Pascali, Laura Del Cocco, Maurizio Delfini, Giacomo Di Matteo, Valeria Di Tullio, Francesco Paolo Fanizzi, Vito Gallo, Raffaella Gianferri, Chiara R. Girelli, Cinzia Ingallina, Luca Laghi, Raffaele Lamanna, Francesco Longobardi, Claudio Luchinat, Domenico Mallamace, Walter Mandaliti, Luisa Mannina, Federico Marini, Lucia Marchetti, Flaminia Cesare Marincola, Piero Mastrorilli, Pierluigi Mazzei, Ileana Menegazzo, Carlo Mengucci, Alessandra Micozzi, Salvatore Milone, Adele Mucci, Biagia Musio, Ridvan Nepravishita, Maurizio Paci, Massimiliano Petracci, Alessandro Piccolo, Noemi Proietti, Antonio Randazzo, Valeria Righi, Archimede Rotondo, Andrea Salvo, Francesco Savorani, Paola Scano, Carlo Schillaci, Elisabetta Schievano, Anatoly P. Sobolev, Fabio Sciubba, Mattia Spano, Alberto Spisni, Tullia Tedeschi, Leonardo Tenori, Eleonora Urbinati.



Risorse online

A questo indirizzo si può accedere al sito di complemento al libro online.universita.zanichelli.it/mannina-nmr



Ebook

Chi acquista il libro nuovo può accedere gratuitamente all'ebook, seguendo le istruzioni presenti nel sito.



Per l'accesso registrarsi su

my.zanichelli.it

e abilitare le risorse.

Maggiori informazioni

nelle pagine iniziali del libro.

L'accesso all'ebook e alle risorse digitali protette è personale, non condivisibile e non cedibile, né autonomamente né con la cessione del libro cartaceo.

Gli alimenti servono per nutrirsi, accompagnano momenti conviviali, contribuiscono al benessere, possono veicolare oppure prevenire malattie. Svolgono un ruolo importantissimo e sfaccettato, che può essere esplorato, nei suoi aspetti complementari, attraverso la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) e le sue diverse metodologie.

La risonanza magnetica nella scienza degli alimenti è il primo testo universitario italiano dedicato all'applicazione dell'NMR nello studio degli alimenti, una tecnica sempre più diffusa e ormai imprescindibile, in grado di investigare le diverse matrici alimentari e che ha assunto un grande rilievo, soprattutto in Italia dove l'attenzione al cibo è radicata nella cultura e nello stile di vita.

Scritto da una squadra di 61 tra autrici e autori, provenienti da diversi centri di ricerca italiani, questo libro insegna a capire le principali metodologie e come si applicano. È diviso in due parti: *Metodologie NMR* spiega le diverse metodologie illustrandone il funzionamento generale e le potenzialità d'uso, con approfondimenti sull'uso dei Big Data e della chemiometria; *Applicazioni* descrive come si applicano queste metodologie agli alimenti, con particolare attenzione a quelli di rilievo per la cultura e l'economia italiana e alle problematiche a essi collegate, come l'origine geografica o la sofisticazione. È un'opera dalla doppia natura, teorica e applicativa, che mostra nel concreto il vasto uso della tecnica grazie all'ampio numero di esempi riportati. Oltre ai numerosi grafici e alle illustrazioni, la didattica è supportata dall'organizzazione dei capitoli, che nella parte applicativa presentano una struttura ricorrente: le caratteristiche dell'alimento o del gruppo di alimenti, le metodologie usate per quel tipo di alimento, *Focus* sulle metodiche di analisi tradizionale e di approfondimento tecnico, infine esempi pratici di applicazione, con risultati tratti da esperimenti effettuati in diversi centri di ricerca.

I diritti d'autore per la vendita di questo libro saranno devoluti al Gruppo Italiano Discussione Risonanze Magnetiche (GIDRM).

A cura di

Luisa Mannina è professoressa ordinaria di Chimica degli alimenti presso il Dipartimento di Chimica e Tecnologie del farmaco, Sapienza Università di Roma.

Noemi Proietti, Valeria Di Tullio e Anatoly P.

Sobolev svolgono attività di ricerca presso l'Istituto per i Sistemi biologici del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Monterotondo, Roma.

MANNINA*RMN SCIENZA ALIMENTI(CEALUM Q

ISBN 978-88-08-89995-8



9 788808 899958

4 5 6 7 8 9 0 1 2 (64G)