

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Determinazione di composti polifenolici nelle acque di vegetazione di
frantoio in relazione al loro possibile effetto repellente e/o insetticida
nei confronti della mosca dell'olivo (*Bactrocera oleae*)**

Relatore: Prof. **Andrea Tapparo**

Controrelatrice: Prof.ssa **Marina Gobbo**

Laureanda: **Clara Da Re**

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 OLEA EUROPAEA E OLIO D'OLIVA.....	1
1.1.1 COMPOSIZIONE CHIMICA DELL'OLIO D'OLIVA.....	3
1.2 I COMPOSTI FENOLICI DELL'OLIVA E DELL'OLIO.....	6
1.2.1 L'OLEUROPEINA E I SUOI DERIVATI.....	9
1.2.1.1 Biosintesi.....	9
1.2.1.2 Metabolismo.....	11
1.3 ACQUE DI VEGETAZIONE.....	14
1.3.1 COMPOSIZIONE CHIMICA DELLE ADV.....	15
1.4 LA MOSCA DELL'OLIVO.....	17
1.4.1 OVIDEPOSIZIONE.....	17
1.4.2 COMPOSTI FENOLICI/CHIMICI NELLA LOTTA ALLA MOSCA DELL'OLIVO.....	18
1.5 SCOPO DELLA TESI.....	20
2. MATERIALI E METODI	21
2.1 DETERMINAZIONE DI COMPOSTI FENOLICI.....	21
2.1.1 ACQUE DI VEGETAZIONE.....	21
2.1.2 SOLUZIONI STANDARD DI CALIBRAZIONE.....	22
2.1.3 REAGENTI.....	22
2.1.4 STRUMENTAZIONE.....	22
2.1.5 ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE.....	23
2.1.6 METODO CROMATOGRAFICO.....	24
2.1.7 CALIBRAZIONE STRUMENTALE.....	26
2.2 VALIDAZIONE DEL METODO.....	26
2.2.1 CALCOLO DEL LOD.....	26
2.2.2 TEST F.....	28
2.2.3 T-TEST.....	28
2.2.4 ANALISI DEI RECUPERI.....	30
2.3 CARATTERIZZAZIONE DEGLI ANALITI NELLE ADV MEDIANTE ESI-MS.....	31
2.3.1 STRUMENTAZIONE E CONDIZIONI OPERATIVE.....	31
2.4 ESTRAZIONE DI POLIFENOLI PURI DA ADV.....	32
2.4.1 STRUMENTAZIONE.....	32
2.4.2 METODO DI PURIFICAZIONE.....	33

2.4.3	METODO CROMATOGRAFICO E RACCOLTA DELLE FRAZIONI	33
2.5	CARATTERIZZAZIONE DEI COMPOSTI ISOLATI DALLE ADV	35
2.5.1	STRUMENTAZIONE	35
2.5.2	PROCEDURA	36
3.	RISULTATI E DISCUSSIONE	39
3.1	SVILUPPO DEL METODO DI ANALISI PER LA DETERMINAZIONE DI POLIFENOLI	39
3.1.1	OTTIMIZZAZIONE DELLA PROCEDURA DI ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE	40
3.1.2	MESSA A PUNTO DEL METODO CROMATOGRAFICO	43
3.1.3	DETERMINAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI DI POLIFENOLI NELLE ADV.....	47
3.1.4	VALIDAZIONE DEL METODO	49
3.1.4.1	LOD	49
3.1.4.2	Analisi del recupero	49
3.1.4.3	Precisione.....	51
3.1.4.4	Confronto dei risultati ottenuti con la rivelazione in DAD e fluorescenza	52
3.1.4.5	Caratterizzazione dei polifenoli mediante spettrometria di massa	55
3.2	SVILUPPO DEL METODO CROMATOGRAFICO PER L'ESTRAZIONE DEI SINGOLI POLIFENOLI DA ADV	67
3.2.1	OTTIMIZZAZIONE DEL METODO CROMATOGRAFICO	67
3.2.2	CALCOLO DELLE CONCENTRAZIONI DEGLI ANALITI RACCOLTI ...	69
3.2.3	CARATTERIZZAZIONE MEDIANTE NMR DEI COMPOSTI ISOLATI....	70
3.2.3.1	COSY SPECTRUM (CORrelation SpectroscopY)	70
3.2.3.2	ESPERIMENTI HSQC- HMBC.....	71
4.	CONCLUSIONI.....	81
	BIBLIOGRAFIA.....	83
	RINGRAZIAMENTI.....	89
	APPENDICE	91
	ALLEGATO I.....	92
	ALLEGATO II	94

1. INTRODUZIONE

Bactrocera oleae, o più comunemente chiamata ‘Mosca dell’olivo’, è la più importante avversità a carico dell’olivo. Questo parassita fitofago può causare gravi danni al frutto perforandone la polpa e depositando al suo interno le larve che, nutrendosi della drupa dell’olivo, creano danni sia diretti che indiretti, con perdite di produzione e compromissione della qualità dell’olio prodotto.

Il contrasto a tale parassita avviene principalmente con l’impiego di prodotti insetticidi che agiscono per contatto o ingestione, il più noto dei quali è il dimetoato, un fosfororganico ora non più autorizzato per il trattamento dell’olivo. L’utilizzo di questi insetticidi ha però fatto emergere importanti criticità sia di ambito agronomico che ambientale. Negli ultimi anni, sono stati condotti molti tentativi di eliminare o ridurre i comuni insetticidi sintetici introducendo nuovi approcci e prodotti, ma i metodi sperimentalmente dimostrati finora sono ancora insufficienti.

Comprendere e valutare la presenza di composti ad effetto insetticida/repellente nei confronti di *Bactrocera oleae* presente all’interno dell’oliva stessa e/o nei reflui/rifiuti delle lavorazioni in frantoio, potrebbe aprire la strada ad un approccio più efficiente alla lotta contro la mosca dell’olivo e alla possibilità di risolvere il problema dello smaltimento dei prodotti di scarto della spremitura dell’oliva, costoso e nocivo per l’ambiente, utilizzando questi ultimi come insetticidi e/o repellenti a difesa della pianta stessa, conferendo così ciclicità al processo di produzione.

1.1 OLEA EUROPAEA E OLIO D'OLIVA

L’olivo (*Olea europaea* L.) è una delle più antiche e importanti piante coltivate nel bacino del Mediterraneo e, proprio in queste zone, la sua coltivazione ebbe inizio circa 7000 anni fa. E’, infatti, in Spagna, Italia e Grecia che si ottiene la maggior parte della produzione mondiale di olive. Secondo recenti dati editi dall’Istat (Settore Servizio Agricoltura, anno 2020) la superficie investita ad olivo in Italia risulta pari a 1166 mila ettari, risultando la terza coltivazione per estensione, a livello nazionale.

Sempre secondo tali stime, la produzione di olive risulta pari a 3 milioni di tonnellate, da cui poi sono stati ottenuti, negli ultimi anni, quantitativi di olio compresi fra le 350 e le 500 mila tonnellate, pari a circa il 25 % dell'intera produzione mondiale.

In Italia, così come nei principali paesi olivicoli, l'olivicoltura si è diffusa su un territorio molto variabile per caratteristiche orografiche, climatiche e strutturali e la sua importanza economica-sociale è legata ai prodotti che ne derivano, olio e olive da tavola, che rappresentano alcuni tra gli elementi fondamentali della “dieta mediterranea”, con una diversificazione di prodotto che consente scelte diverse in base ai gusti ed alle occasioni di impiego.

L'olivo appartiene alla famiglia delle *Oleaceae*, sottofamiglia *Oliveae*, genere *Olea* e specie *Olea Europaea*.

Il suo frutto è una drupa di forma allungata (ellissoidale, ovoidale o sferoidale) e di peso variabile (2-12 g).

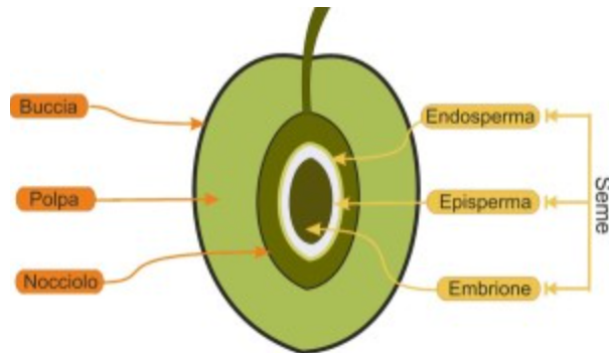


Figura 1.1: Struttura morfologica della drupa

Le sue caratteristiche morfologiche come forma, dimensione, colore e composizione chimica sono legate a caratteri genetici, e si differenziano nelle funzioni di accrescimento, maturazione e cultivar. Essa è costituita da:

- l'epidermide (epicarpo) comunemente chiamata “buccia”: è una pellicola di modesto spessore che protegge il frutto e rappresenta circa l'1.3 % della drupa. Inizialmente si presenta di colore verde ma con la maturazione diviene prima rossastra e poi nera una volta arrivata a maturazione;
- una parte carnosa ed oleosa (mesocarpo) comunemente chiamata “polpa”: è un tessuto di spessore variabile e rappresenta il 70-85 % del frutto. All'interno dei suoi vacuoli avviene l'accumulo di olio, in quantità di 12-25 % del peso del frutto fresco;
- il nocciolo (endocarpo): è l'involucro legnoso che ingloba e racchiude il seme;

- il seme: non supera il 3 % in peso del frutto ed è costituito dal tegumento che presenta funzione protettiva, dall'endosperma con funzione di accumulo delle sostanze energetiche, e dall'embrione.

I frutti dell'olivo sono valutati commercialmente in funzione del loro contenuto di polpa per gli usi da tavola e in funzione al loro contenuto di olio per la produzione di olio d'oliva. L'olio extravergine di oliva è uno dei prodotti più rappresentativi della tradizione e della cultura dei paesi mediterranei e l'Italia rientra tra le più importanti nazioni al mondo per la sua produzione. I gusti e i sapori degli oli italiani sono molto diversi tra loro e hanno notevoli peculiarità a seconda della regione di provenienza.¹ Ciò che contraddistingue la qualità dell'olio d'oliva sono sicuramente gli aspetti organolettici e sensoriali facilmente percepibili dal consumatore legati ad esigenze nutrizionali che però abbracciano anche l'aspetto edonistico e culturale.

L'olio possiede una composizione in macro e microelementi ottimale per la fisiologia umana grazie alla presenza di principi attivi salutistici, in particolare caroteni, tocoli e sostanze fenoliche che, per le loro caratteristiche di antiossidanti naturali, rivestono un ruolo fondamentale nella nostra dieta.²

1.1.1 COMPOSIZIONE CHIMICA DELL'OLIO D'OLIVA

Viene definito "olio vergine di oliva" il grasso alimentare derivante dalla frangitura e spremitura delle olive. Dal punto di vista delle caratteristiche fisiche, l'olio d'oliva si presenta come un liquido fluido, dal sapore ed odore fruttato e gradevole, di colore giallo paglierino più o meno verdognolo e con una densità di circa 0.92 kg/L misurata a 15 °C.

L'olio vergine di oliva è costituito per il 98-99 % da una frazione gliceridica detta "saponificabile" e per il restante 1-2 % da una frazione di composti minori detta "insaponificabile". Mentre i componenti della prima frazione, con qualche eccezione di ordine quantitativo, sono pressoché uguali in tutti gli oli di oliva, quelli della seconda, invece, subiscono importanti variazioni qualitative e quantitative tali da

comportare una netta differenziazione organolettica, nutrizionale, dietetica e merceologica.

Frazione Saponificabile: Come la maggior parte dei grassi vegetali, l'olio di oliva è costituito per la maggior parte da una miscela di gliceridi (esteri del glicerolo con acidi grassi) detta anche frazione saponificabile.

Gli acidi grassi sono presenti nell'olio vergine di oliva come costituenti dei trigliceridi, (esteri della glicerina) e occupano circa il 95-97 % della frazione gliceridica, percentuale che varia secondo le condizioni climatiche e agronomiche.

L'acido oleico (C18:1) è il più abbondante acido grasso presente (~ 40 %), seguito poi dall'acido palmitico (~ 20 %) e stearico (~ 4 %).

Nella frazione saponificabile, accanto ai trigliceridi troviamo, sia pure in quantità minime, digliceridi (2-3 %) e monogliceridi (0.1-0.2 %), la cui presenza è dovuta in parte ad un'incompleta biosintesi da parte del frutto, ma principalmente alle reazioni di idrolisi degli esteri.³ Solo una piccola percentuale di acidi grassi si trova invece in forma libera; il loro contenuto percentuale varia in base a diversi fattori ambientali e tecnologici e viene utilizzato per la classificazione degli oli nelle varie categorie merceologiche. I componenti minori saponificabili comprendono: le cere (esteri degli acidi grassi con gli alcoli a lunga catena) presenti circa al 2 %, i fosfolipidi (derivati dell'acido glicerofosforico) al 0.001-0.02 %, e gli sfingolipidi (ammidi di acidi grassi con basi a lunga catena tipo la sfingosina).

Frazione Insaponificabile: E' la componente che diversifica l'olio d'oliva vergine dagli altri oli di oliva e di semi. Comprende circa 220 sostanze prodotte del metabolismo secondario della pianta e dei frutti, che rivestono un ruolo di primaria importanza per numerosi processi biochimici e fisiologici.

Questa frazione, come deducibile dalla sua denominazione, non reagisce al processo di saponificazione con l'idrossido di sodio o potassio e rimane perciò solubile in solventi apolari come l'esano e l'etere.

Alcuni di questi costituenti hanno un valore terapeutico, altri rappresentano la parte principale della nota aromatica, altri ancora sono efficaci antiossidanti naturali in grado di conferire al prodotto resistenza all'invecchiamento.

I principali composti rappresentanti la frazione insaponificabile sono:

- Idrocarburi: rappresentano il 50-60 % della frazione. Tra gli idrocarburi polinsaturi, il 60-70 % è rappresentato dallo squalene e la parte restante è costituita dagli idrocarburi terpenici e dai prodotti di neoformazione derivanti dagli steroli (idrocarburi dienici).⁴
- Steroli (o fitosteroli): sono presenti nelle piante oleaginose in composizioni caratteristiche per ciascuna specie; possono migliorare la stabilità ossidativa e la conservazione degli oli svolgendo un ruolo di antiossidanti naturali e di inibitori del processo d'irrancidimento. Il contenuto in steroli totali nell'insaponificabile degli oli di oliva è circa del 4-5 %.
- Alcoli: sono presenti come alcoli triterpenici allo 0.1-0.3 % mentre il contenuto degli alcoli alifatici varia da 0.01-0.02 % circa.
- Tocoferoli: sono composti eteroacidi ad alto peso molecolare e sono stati identificati e designati come α , β , γ , δ tocoferolo. Il loro contenuto nell'olio vergine di oliva varia da 5 a 15 mg/100 g, la forma α è la principale (60-90 %), seguita dalla forma β (15-20 %) e γ (10-25 %).
- Polifenoli: sono metaboliti secondari accumulati in forma glucosidica contenuti un anello aromatico supportato da uno o più sostituenti idrossilici. Sono sostanze anfotere e la loro idrosolubilità li differenzia da tutte le altre sostanze dell'insaponificabile; questa caratteristica fa sì che durante il processo di estrazione, una parte consistente di polifenoli venga allontanata con le acque di vegetazione. Le loro concentrazioni nel frutto variano con la cultivar e con le condizioni climatiche e pedologiche dell'ambiente, mentre nell'olio il loro contenuto è influenzato anche dall'epoca di raccolta, dalla tecnologia di estrazione e dalla modalità di conservazione dell'olio. Gli oli di oliva vergini contengono sia composti fenolici semplici (in particolare tirosolo ed idrossitirosolo), che complessi (agliconi con fenoli semplici, principalmente oleuropeina).^{5,6}
- Pigmenti: sono responsabili del colore dell'olio di oliva e sono costituiti da clorofille e carotenoidi.⁷

1.2 I COMPOSTI FENOLICI DELL'OLIVA E DELL'OLIO

Le sostanze fenoliche idrofiliche nell'olio vergine di oliva furono osservate per la prima volta sessanta anni fa da Cantarelli (1961) e Montedoro (1969).

Un crescente interesse è dovuto principalmente alle loro proprietà e funzioni: proteggono gli acidi grassi insaturi dall'ossidazione favorendo azioni biologiche e fisiologiche nell'organismo; esercitano un'azione antiossidante e un effetto protettivo contro fenomeni degradativi causati dalla presenza di radicali liberi nell'organismo; contribuiscono a garantire nel tempo la stabilità dell'olio e quindi della qualità nutrizionale, proteggendo il lipide da processi degenerativi di tipo ossidativo; sono responsabili del gusto amaro e della sensazione di piccante dell'olio.⁸



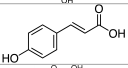

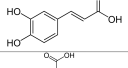


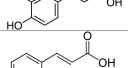
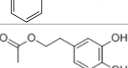
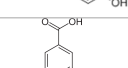



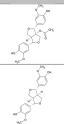
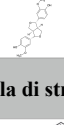
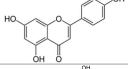
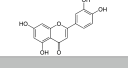
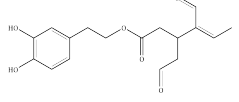
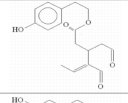
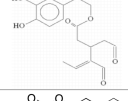
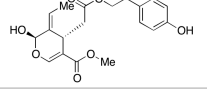
I composti fenolici dell'olio vergine di oliva si possono genericamente classificare in fenil-acidi, fenil-alcoli, flavonoidi, secoiridoidi e lignani. Si originano durante il processo di estrazione meccanica dell'olio dai polifenoli glucosidici presenti nella drupa e si trovano in tutte le parti costituenti della pianta ma la loro natura e concentrazione varia notevolmente tra i vari tessuti.⁹

Il contenuto fenolico del frutto dell'olivo sembra essere stato studiato in modo più approfondito rispetto a qualsiasi altro tessuto vegetale di olivo. Nei frutti, infatti, i composti fenolici rappresentano l'1-3 % del peso fresco della polpa, con alte concentrazioni di fenil-alcoli quali idrossitirosolo (3,4-(Diidrossifenil) etanolo o anche 3,4-DHPEA) e tirosolo (p-(idrossifenil) etanolo o p-HPEA) e quantità apprezzabili di flavonoidi (luteina-7-glucoside, apigenina e rutina) e alcuni derivati degli acidi idrossicinnamici, con predominanza del verbascoside.^{10,11,12,13}

Gli acidi fenolici sono rappresentati principalmente da acido caffeico, vanillico, siringico, p-cumarico, protocatetico, sinapico, p-idrossibenzoico e gallico; questi, insieme agli alcoli e ai flavonoidi, sono contenuti in minore quantità nell'olio vergine di oliva rispetto ai secoiridoidi e ai lignani.^{2,14}

I lignani includono (+)-1-acetossipinoresinolo e (+)-pinoresinolo; sono composti contenuti principalmente nella polpa di oliva e nella porzione legnosa del seme, e vengono trasferiti nell'olio durante il processo di estrazione meccanica.

Tabella 1.1: *Composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva.*

Acidi fenolici e derivati	Formula bruta	Formula di struttura
Acido Vanillico	$C_8H_8O_4$	
Acido Siringico	$C_9H_{10}O_5$	
Acido p-Cumarico	$C_9H_8O_3$	
Acido Gallico	$C_7H_6O_5$	
Acido Caffeiico	$C_9H_8O_4$	
Acido Protocatechico	$C_7H_6O_4$	
Acido p-Idrossibenzoico	$C_7H_6O_3$	
Acido Ferulico	$C_{10}H_{10}O_4$	
Acido Cinnamico	$C_9H_8O_2$	
4-(acetossietil)-1,2-diidrossibenzene	$C_{10}H_{12}O_4$	
Acido Benzoico	$C_7H_6O_2$	
Alcoli fenolici	Formula bruta	Formula di struttura
3,4-(Diidrossifenil)etanolo	$C_8H_{10}O_3$	
(3,4 DHPEA) (p-Idrossifenil)etanolo	$C_8H_{10}O_2$	
Lignani	Formula bruta	Formula di struttura
(+)-1-Acetossipinoresinolo	$C_{22}H_{24}O_8$	
(+)-Pinoresinolo	$C_{20}H_{22}O_6$	
Flavonoidi	Formula bruta	Formula di struttura
Apigenina	$C_{15}H_{10}O_5$	
Luteolina	$C_{15}H_{10}O_6$	
Derivati dei secoiridoidi	Formula bruta	Formula di struttura
Forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato al 3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA o oleaceina)	$C_{17}H_{20}O_6$	
Forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato al p-HPEA (p-HPEA-EDA o oleocantale)	$C_{17}H_{20}O_5$	
Oleuropeina Aglicone	$C_{19}H_{22}O_8$	
Ligustroside Aglicone	$C_{19}H_{22}O_7$	

La loro concentrazione nell'olio è fortemente influenzata dalle condizioni agronomiche di coltivazione degli ulivi mentre, a differenza dei secoiridoidi, non risente dei parametri tecnologici di estrazione.¹⁵

I secoiridoidi sono dei composti esclusivi delle piante appartenenti alla famiglia delle *oleaceae* e, dal punto di vista chimico, sono caratterizzati dalla presenza di acido elenico e dai suoi derivati. Sono i composti prevalenti dell'olio vergine d'oliva e derivano dai secoiridoidi glucosidici presenti nel frutto, quali oleuropeina, demetiloleuropeina, ligstroside, verbascoside.¹⁶

Tuttavia, la composizione e la concentrazione fenolica sono largamente influenzate dalle condizioni agronomiche e tecnologiche di produzione dell'olio vergine di oliva. La varietà, lo stadio di maturazione, l'origine geografica delle olive e la stagione di raccolta, sono i principali aspetti agronomici che possono modificare la composizione in secoiridoidi dell'olio vergine di oliva, mentre le fasi critiche del processo di estrazione meccanica dell'olio sono la frangitura, la gramolatura e la separazione.²

1.2.1 L'OLEUROPEINA E I SUOI DERIVATI

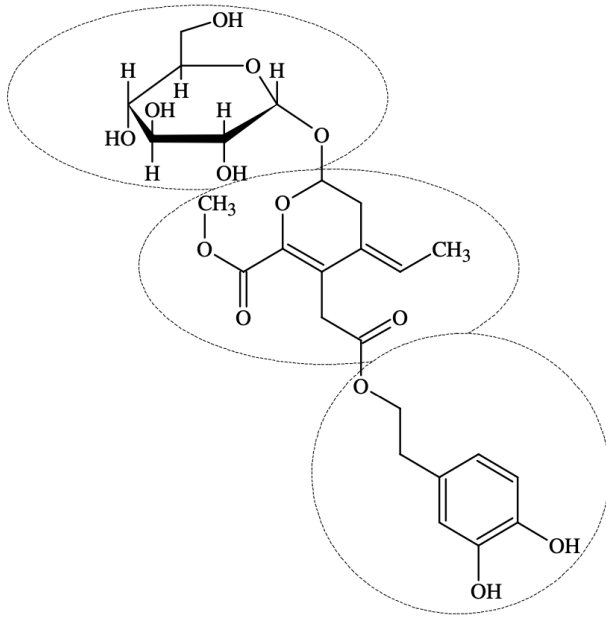


Figura 1.2: Struttura chimica di oleuropeina

L'oleuropeina (OE) è il principale composto bioattivo di *Olea europaea*.

La molecola è composta da tre subunità strutturali:

- un polifenolo, ovvero 4-(2-idrossietil)benzene-1,2-diolo, noto anche come idrossitirosolo (HT)
- un secoiridoide chiamato acido elenolico
- una molecola di glucosio

L'oleuropeina è l'estere eterosidico del 2-(3,4-diidrossifenil)etanolo (idrossitirosolo) con acido elenolico-glucilato e ha lo scheletro oleosidico comune ai glucosidi secoiridoidi delle Oleaceae.

E' generalmente il composto fenolico più importante nelle cultivar di oliva e può raggiungere concentrazioni fino a 140 mg/g su base di sostanza secca nelle olive giovani, sebbene sia stata trovata in tutto l'albero, comprese tutte le parti costituenti il frutto (buccia, polpa e seme).¹⁷

1.2.1.1 Biosintesi

La natura della biosintesi dell'oleuropeina in *Olea europaea L.* è complessa e non ancora ben compresa.

Nelle *Oleaceae* probabilmente procede attraverso una ramificazione nella via dell'acido mevalonico dal metabolismo secondario con conseguente formazione di oleosidi da cui derivano i secoiridoidi.

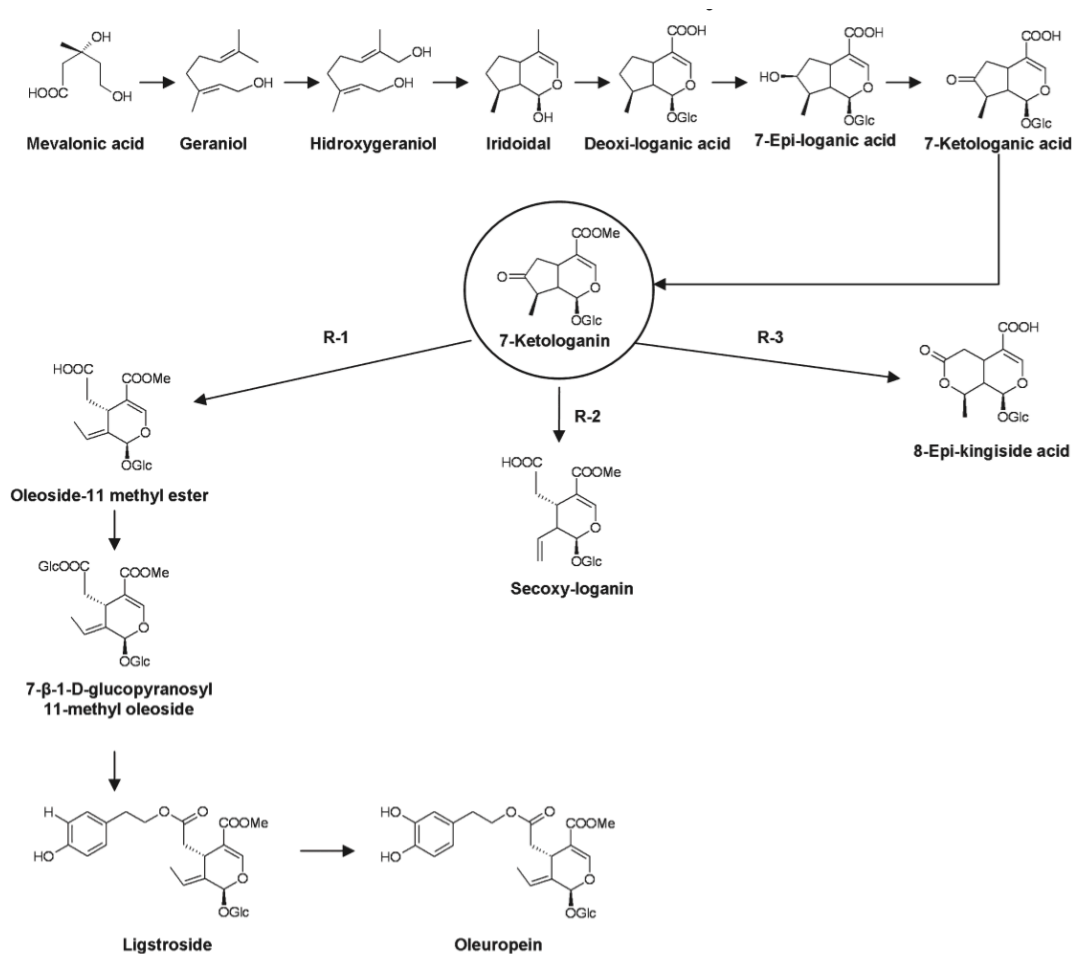


Figura 1.3: Biosintesi dell'oleuropeina¹⁸

Lo scheletro di carbonio è derivato dall'acido mevalonico attraverso geraniolo, idrossigeraniolo e iridoidale, noti precursori della loganina, e proseguirebbe con la sequenza dei passaggi tra acido deossilganico e 7-chetologanina come precursori iridoidi carbociclici all'ultimo stadio, sebbene questa sequenza possa variare tra le specie vegetali e a seconda della stagione dell'anno.

La 7-chetologanina è identificata come il precursore immediato dell'oleoside-11-metil estere, e questo indica che la conversione è molto probabilmente una reazione in una sola fase che procede attraverso tre diversi possibili processi:

- Una reazione (R-1) avviata dalla rottura del legame carbossilico seguita da una scissione del legame C-C e dall'estrazione simultanea di idrogeno con la formazione di oleoside-11-metil estere.
- Una reazione simile (R-2) con l'estrazione di un protone che produrrebbe secossiloganina.

- Infine, l'acido 8-epi-kingiside e i relativi composti (R-3) potrebbero essere formati tramite uno spostamento alchilico, meccanismo che potrebbe spiegare la presenza degli altri prodotti iridoidi trovati con gli oleosidi.

In accordo con il percorso più accettato per la sintesi dell'oleuropeina proposto da Damtoft, le fasi finali della sintesi dell'oleoside possono essere quindi dedotte come la conversione diretta della 7-chetologanina in oleoside-11-metil estere, seguita dalla conversione mediante glucosilazione in 7- β -1-D-glucopiranosil-11-metil oleoside, che origina il ligstroside per esterificazione con tirosolo e infine, per idrossilazione, oleuropeina.

1.2.1.2 Metabolismo

I fenoli coinvolti nel metabolismo dell'oleuropeina sono:

- i precursori: oleoside-11-metilestere, tirosolo, ligstroside + iso-ligstroside, oleuropeina + oleoside
- i prodotti enzimatici (derivati dall'attività della β -glucosidasi): l'acido elenolico, l'oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EA), la sua forma dialdeidica (3,4-DHPEA-EDA) e gli agliconi corrispondenti al ligstroside (p-HPEA-EA e p-HPEA-EDA).

La Figura (1.4) illustra le vie anaboliche e cataboliche proposte della biosintesi dell'oleuropeina in conformità con i risultati degli studi svolti.¹⁹

La β -glucosidasi è un enzima coinvolto in diversi punti chiave della biosintesi e degradazione dell'oleuropeina: è responsabile dell'idrolisi dell'oleuropeina e del ligstroside con formazione degli agliconi corrispondenti (3,4-DHPEA-EA e 3,4-DHPEA-EDA), della rapida diminuzione del contenuto di ligstroside per produrre gli agliconi corrispondenti e, allo stesso modo, della formazione di acido elenolico dall'oleoside-11-metil estere.

Il tirosolo è partecipe nella sintesi dell'oleuropeina: verrebbe infatti utilizzato nelle reazioni biosintetiche per l'esterificazione del 7- β -1-D-glucopiranosil-11-metil oleoside a ligstroside e, pertanto, è co-responsabile dell'aumento di concentrazione dell'oleuropeina. Inoltre, i risultati evidenziano che la sintesi dell'oleuropeina

prodotta dal ligstroside via oleoside-11- metilestere, è altamente dipendente anche da ulteriori processi enzimatici alternativi che coinvolgono β -glucosidasi ed esterasi, che modificano in modo significativo la resa della sintesi dell'oleuropeina.

L'estearasi endogena può infatti idrolizzare il legame estereo dell'oleuropeina, formando idrossitirosolo e un glicosilato derivato.²⁰

Inoltre, trattando i frutti con una soluzione alcalina, si produce la rottura del legame estereo dell'oleuropeina con la conseguente formazione di idrossitirosolo e glucoside dell'acido elenolico.²¹

I risultati supportano quindi che la biosintesi dell'oleuropeina segue il percorso proposto da Damtoft¹⁸ e che l'alta attività della β -glucosidasi, agendo direttamente sui fenoli glicosilati, produce una modulazione della sintesi *in vivo* dell'oleuropeina e dei suoi precursori, confermando che questo enzima diminuisce l'accumulo di oleuropeina producendo invece l'acido elenolico e le forme aglicone dell'oleuropeina e del ligstroside come principali prodotti di degradazione.²²

Si potrebbe considerare l'oleuropeina come principale polifenolo costituente della polpa di oliva, ma la sua concentrazione varia notevolmente tra le diverse varietà.²³

Tuttavia, ci sono ancora molte domande sui siti di biosintesi e sulla modalità di traslocazione dei fenoli tra i tessuti in *O. europaea L.* che rimangono senza risposta. È stato suggerito che tessuti diversi hanno una composizione fenolica diversa e, come tale, il metabolismo di ciascun tessuto vegetale è caratteristico. In alternativa, questi stessi autori mostrano che il metabolismo dei singoli tessuti vegetali è simile o che i precursori fenolici sono facilmente traslocati tra i tessuti per la successiva biosintesi.²⁴

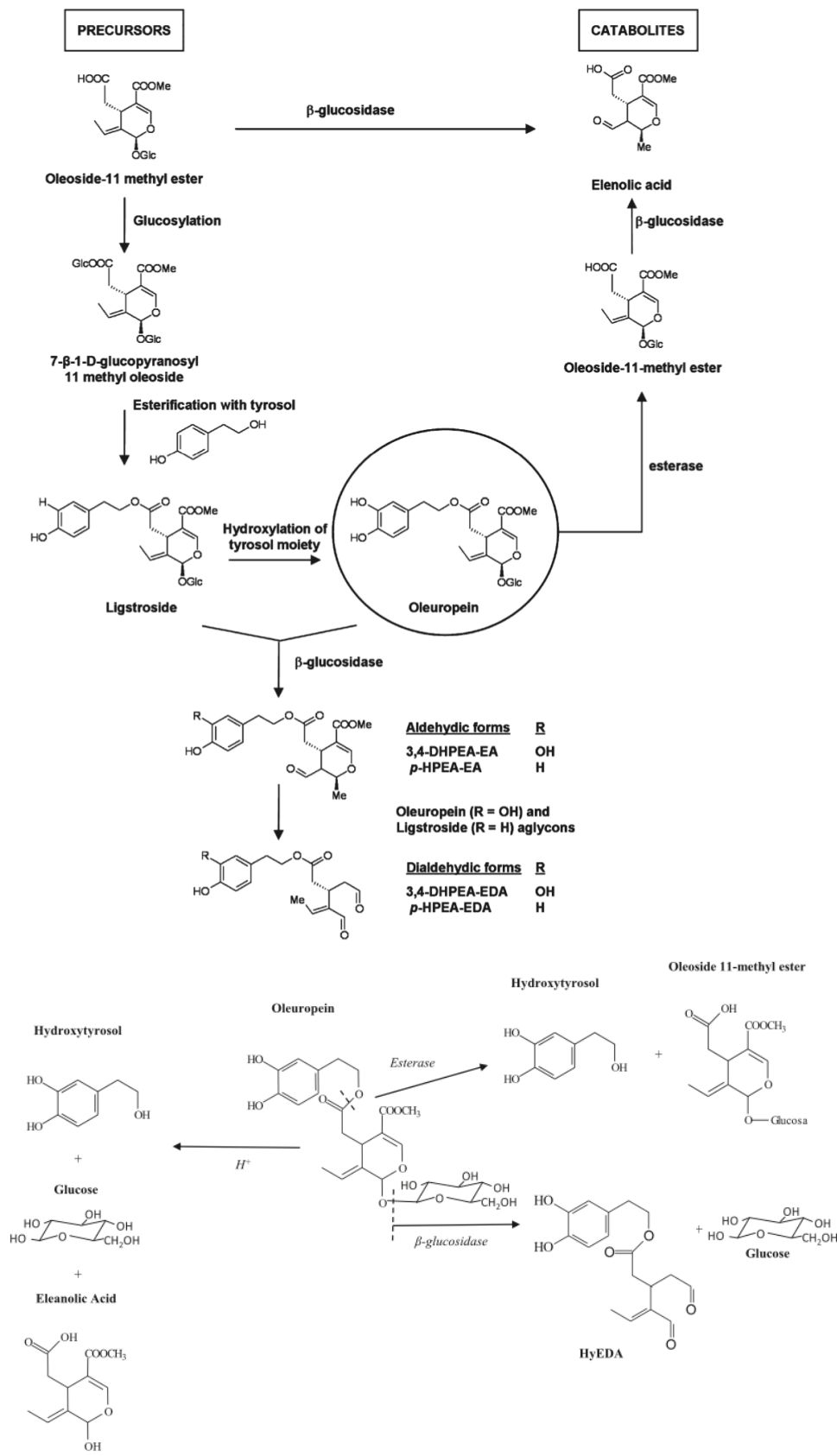


Figura 1.4: *Metabolismo dell'oleuropeina*

1.3 ACQUE DI VEGETAZIONE

Il principale sottoprodotto della lavorazione delle olive è dato dalle acque di vegetazione (ADV), derivanti dal processo di estrazione dell'olio. Queste sono composte dall'acqua di costituzione della drupa e dall'acqua impiegata per la diluizione della pasta delle olive e per il lavaggio delle macchine.

Relativamente alla numerosità dei frantoi, le fonti informative disponibili hanno riportato, nell'ultimo decennio, cifre variabili fra i 10.000 ed i 13.000 impianti in attività (rapporto Agecontrol), con capacità di trattamento medio-piccola che varia da 5 a 50 t di olive al giorno, dato da cui deriverebbe una produzione di reflui oleari attorno ai 3 milioni di tonnellate per anno.^{40,41}

I frantoi più moderni, basati su tecniche estrattive continue per centrifugazione, producono fino a 1.5 m³/t di olive, mentre quelli tradizionali, basati su metodi discontinui per pressione, intorno a 0.4 m³/t.

Le tecnologie estrattive stanno evolvendo rapidamente e tale evoluzione risponde all'obiettivo principale di ottenere acque col più basso contenuto di olio, che negli impianti per pressione è di circa 2-8 g/L, corrispondente a circa 0.1-0.4 Kg/100 Kg di olive. Complessivamente in Italia in ogni campagna olearia, nell'arco di 3-5 mesi a partire dal mese di novembre, si producono circa 2 milioni di m³ di ADV.

Le ADV svolgono un ruolo importante nell'impronta ecologica negativa della produzione di olio d'oliva: questo rifiuto è infatti uno degli effluenti più nocivi prodotti dalle industrie agroalimentari per l'elevato carico inquinante e l'elevata tossicità per l'intero ecosistema; le cause sono da attribuirsi principalmente al loro pH acido e all'elevato contenuto di sostanze organiche difficilmente biodegradabili e di inibitori enzimatici, quali i composti fenolici.

Pertanto, il loro trattamento o valorizzazione rappresenta un importante problema ambientale.²⁵

La composizione delle ADV cambia notevolmente a seconda del processo di estrazione dell'olio (per pressatura o per centrifugazione), delle caratteristiche e qualità delle olive di partenza e della pratica adottata per la loro raccolta (pelatura meccanica o per scuotimento).²⁶

1.3.1 COMPOSIZIONE CHIMICA DELLE ADV

Le ADV contengono, in soluzione ed in sospensione, sostanze organiche e minerali che, dopo l'evaporazione dell'acqua, costituiscono il residuo secco. Tale residuo, variabile dal 5 % al 25 %, è rappresentato per l'80-90 % da sostanza organica (in particolare polifenoli, zuccheri riduttori e acidi organici) e per il 10-20 % da materiale inorganico (principalmente minerali come potassio, fosforo e calcio).

Tali reflui presentano una colorazione scura che può variare dal rosso al nero, secondo lo stato di degradazione dei componenti fenolici delle olive, hanno un aspetto torbido e sono caratterizzate da un odore tipico, piuttosto intenso, che ricorda quello della drupa da cui derivano.²⁷

Hanno un pH compreso tra 4.9 e 5.3 dovuto alla presenza di acidi organici (quali acetico, malico, fumarico, glicerico, lattico, malonico, citrico, ossalico, tartarico e succinico) che in seguito può diminuire a causa delle reazioni di fermentazione che avvengono naturalmente nelle acque stesse.

Le sostanze organiche, essenzialmente in soluzione e in quantità minore in sospensione (165 g/L) o in emulsione, sono le principali responsabili del loro elevato potere inquinante. Tale effetto si esprime come COD (domanda chimica di ossigeno) e BOD (domanda biologica di ossigeno), i cui valori massimi raggiungono i 200 e 100 mg/L rispettivamente.²⁸

La frazione organica contiene zuccheri, tannini, polifenoli, polialcoli, pectine, lipidi e proteine. Gli zuccheri sono le sostanze organiche che prevalgono nettamente nel refluo; i contenuti totali oscillano tra 15 e 40 g/L a seconda del sistema di estrazione impiegato, della varietà e dello stato sanitario delle olive.²⁹

Hanno invece minore incidenza sul carico inquinante del refluo gli acidi organici e le sostanze azotate, 0.3-0.8 %.³⁰

I fenoli sono presenti in quantità variabili dai 2 ai 10 g/L.³¹ Le loro alte concentrazioni nelle ADV sono da attribuirsi al fatto che il coefficiente di ripartizione (olio/acqua) della maggior parte di questi composti è a favore della fase acquosa, così solo il 2 % del contenuto fenolico totale del frutto dell'oliva passa alla fase oleosa durante il processo di estrazione, mentre il restante 98 % viene perso nei rifiuti del frantoio.³²

I biofenoli più abbondanti presenti sono idrossitirosolo, tirosolo e oleuropeina.³³ Tuttavia, il profilo fenolico delle ADV è estremamente complesso e molti composti non sono ancora stati identificati.³⁴

L'idrossitirosolo è stato segnalato come il principale composto fenolico, raggiungendo circa il 70 % del contenuto fenolico totale, ma le quantità di oleuropeina e idrossitirosolo variano fortemente tra reflui diversi.

L'oleuropeina, ad esempio, è stata identificata come uno dei principali composti fenolici in alcune ADV, mentre in altre è stata rilevata in concentrazioni molto basse o addirittura non trovata.³⁵

Nonostante si sappia ancora poco e ci siano evidenze talvolta contrastanti, ciò suggerisce che probabilmente il contenuto e la composizione dei composti fenolici in ADV dipendono dalla maturità e dalla cultivar del frutto, dalle condizioni climatiche, dal tempo di conservazione e di gramolatura e la loro alta variabilità può essere fortemente influenzata dai meccanismi enzimatici di degradazione dell'oleuropeina in acido elenolico e idrossitirosolo durante la fase di maturazione dei frutti e, in seguito, dal processo di frantumazione/gramolatura.^{34,36}

Inoltre, è stato dimostrato che il sistema di estrazione, il tipo di processo e la tecnologia di molitura possono condizionare la composizione fenolica di ADV mostrando profili fenolici qualitativi e quantitativi differenti (come mostrato in tabella 1.2).

Tabella 1.2: *Composizione fenolica di ADV ($\mu\text{g/g}$) provenienti da cultivars Azerraj, Chemlal e Sigoise con differenti processi di produzione.*²⁵

Oil production process	Press process			3-Phases process			p value		
	Azerraj (n = 4)	Chemlal (n = 5)	Sigoise (n = 3)	Azerraj (n = 7)	Chemlal (n = 6)	Sigoise (n = 4)	Variety	Process	Interaction
Vanillic acid	45.0 ± 16.9	35.2 ± 15.1	66.6 ± 19.5	31.9 ± 12.8	15.1 ± 13.8	64.4 ± 16.9	0.069	ns	ns
Hydroxytyrosol	1.0 ± 2.5	5.3 ± 2.2	2.5 ± 2.9	0.1 ± 1.9	0.4 ± 2.0	0.0 ± 2.5	ns	ns	ns
Caffeic acid	33.3 ± 24.7 ^b	35.0 ± 22.1 ^b	187.0 ± 28.5 ^a	26.2 ± 18.6 ^b	35.2 ± 20.1 ^b	95.4 ± 24.7 ^{ab}	<0.001	0.098	ns
Luteolin	105.1 ± 32.2	95.9 ± 28.8	72.2 ± 37.2	112.8 ± 24.3	104.5 ± 26.3	88.9 ± 32.2	ns	ns	ns
Tyrosol	282.4 ± 107.5	212.8 ± 96.1	231.8 ± 124.1	103.3 ± 81.3	104.9 ± 87.8	239.9 ± 107.5	ns	ns	ns
4-Hydroxyphenylacetic acid	2.7 ± 2.5 ^{ab}	5.5 ± 2.2 ^{ab}	9.3 ± 2.9 ^{ab}	1.4 ± 1.9 ^b	3.0 ± 2.0 ^{ab}	11.9 ± 2.5 ^a	0.007	ns	ns
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	28.4 ± 14.5 ^{ab}	28.4 ± 13.0 ^{ab}	49.7 ± 16.8 ^{ab}	13.9 ± 11.0 ^b	31.1 ± 11.9 ^{ab}	81.7 ± 14.5 ^a	0.014	ns	ns
Oleuropein	12.4 ± 740.1	23.1 ± 662.0	56.3 ± 854.6	6.4 ± 559.5	256.4 ± 604.3	2723.2 ± 740.1	ns	0.105	ns
Apigenin	3.3 ± 1.4	3.8 ± 1.3	2.8 ± 1.6	5.71 ± 1.1	3.3 ± 1.2	1.8 ± 1.4	ns	ns	ns
Chlorogenic acid	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	ns	0.041	0.106
Luteolin-7-O-glucoside	32.0 ± 22.1	34.2 ± 19.8	66.2 ± 25.6	49.1 ± 16.7	33.7 ± 18.1	93.2 ± 22.1	0.109	ns	ns
Gallic acid	4.7 ± 1.2	3.5 ± 1.1	3.0 ± 1.4	3.7 ± 0.9	3.3 ± 1.0	6.3 ± 1.2	ns	ns	ns

Values are LS means ± standard error.

a, b: Different letters in a row mean significant differences ($p < 0.05$) (Tukey-Kramer's test).

ns = non-significant difference ($p > 0.05$).

1.4 LA MOSCA DELL'OLIVO

La mosca delle olive, *Bactrocera oleae*, appartenente alla famiglia *Tephritidae*, è l'insetto più dannoso per l'olivo nell'area mediterranea. La sua distribuzione interessa tutte le aree olivicole italiane, ma l'abbondanza delle popolazioni e la conseguente intensità degli attacchi varia notevolmente nelle diverse zone e dipende in generale dalla localizzazione dell'oliveto (posizione geografica e altitudine) e dai fattori climatici associati.

Si tratta di una specie polivoltina che nelle annate favorevoli allo sviluppo dell'insetto può provocare attacchi così gravi da compromettere l'intero raccolto delle olive.

1.4.1 OVIDEPOSIZIONE

L'ovideposizione inizia a 4-6 giorni dall'accoppiamento, durante i quali la femmina pratica sulle drupe delle punture sterili da cui gema del succo di cui essa si nutre per portare a maturazione le gonadi.

Nella ricerca delle olive adatte all'ovideposizione la femmina è guidata da stimoli visivi, che la assistono e conducono nella individuazione della pianta ospite, e stimoli chimici percepiti attraverso sensilli chemiorecettori.

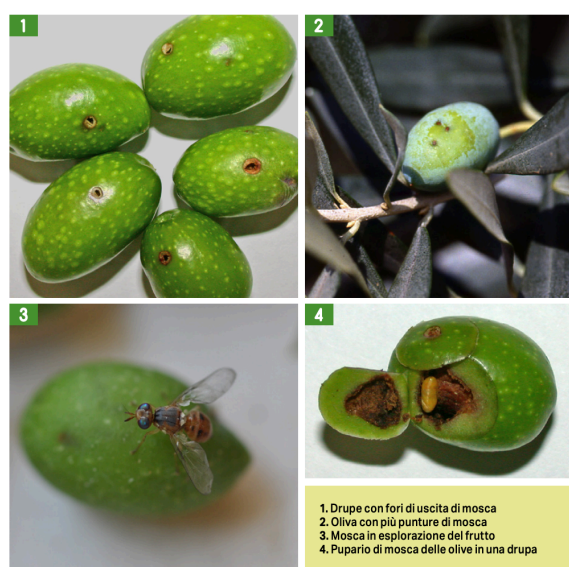


Figura 1.5: *Bactrocera oleae* e drupe colpita.

Dopo l'esplorazione dell'oliva con antenne e apparato boccale, la femmina estroflette l'ovipositore e perfora i tessuti della drupa con movimenti verticali e laterali del corpo, fino a ottenere una fessura di forma triangolare lunga 1-1.5 mm (detta camera di ovideposizione) in cui viene deposto un uovo. In questa fase si osserva il cosiddetto "bacio" della ferita. Invaginato l'ovipositore, la femmina esplora la ferita e l'area

circostante e rigurgita i succhi assunti durante il bacio; tale succo svolgerebbe un'azione di marcatura deterrente dell'oliva per successive ovideposizioni.³⁴

La femmina di *B. oleae* infatti depone, di norma, un solo uovo per oliva visitata e se giunge su un'oliva in cui ha deposto un'altra femmina si allontana senza ovideporre.

La capacità di discriminare un frutto sano da uno attaccato dipende presumibilmente da un sistema di segnali chimici, ma l'inibizione nei confronti di successive ovideposizioni da parte del succo d'oliva non è assoluta: se tutte le olive sono infestate, le femmine depongono anche sui frutti dove c'è già un uovo, anche se si osserva un calo nella fertilità in presenza di sole olive già attaccate.

1.4.2 COMPOSTI FENOLICI/CHIMICI NELLA LOTTA ALLA MOSCA DELL'OLIVO

Nel caso di *B. oleae*, la monofagia della specie ha indotto a valutare, principalmente verso le femmine, l'attività biologica (attrazione, repellenza, effetti sull'ovideposizione) di diverse tipologie di estratti ottenuti dalla pianta ospite.

Vari autori hanno quindi indagato sulla relazione tra oliva e *B.oleae* e si è osservato che nella ricerca delle olive adatte all'ovideposizione, la femmina è guidata da stimoli visivi per l'individuazione della pianta ospite, e da stimoli chimici percepiti attraverso sensilli chemiorecettori, per contatto o anche olfattivi, ma efficaci solo nell'immediata prossimità del frutto.³⁷

Sono stati così riconosciuti quattro tipi di interazione che influenzano l'accettazione dell'ospite della mosca:³⁸

- (1) attrazione olfattiva
- (2) chemiotattileattrazione
- (3) repulsione olfattiva
- (4) chemiotattilerepulsione

La strategia di deposizione sul frutto dell'olivo è regolata da alcune sostanze chimiche contenute nel frutto stesso, in particolare sostanze ortodifenoliche legate al metabolismo dell'oleuropeina.

Secondo gli studi, l'effetto repulsivo esercitato dalla frazione acquosa delle olive frantumate sarebbe dovuto principalmente a composti come β -3,4-

diidrossifeniletanolo (3,4-DHPEA, idrossitirosolo), pirocatecolo e altri polivalenti derivanti dall'idrolisi enzimatica dell'oleuropeina; tali composti esprimono una forte propulsione chimica e sono recentemente stati identificati e confermati all'interno del succo d'oliva fresco e nelle acque reflue del frantoio.

Questo risultato confermerebbe che queste piccole gocce di succo d'oliva, rigurgitate intorno al foro di ovodeposizione appena dopo essere state mangiate dal B. femmina dell'olea, in realtà impediscono ad altre femmine di sedersi sullo stesso frutto.

A conferma di tali ipotesi sono stati condotti dei test di repellenza chemiotattile.

Tabella 1.3: Risultati dei test di repellenza chemiotattile su *B. oleae* per oleuropeina e derivati.

Reps ^a and Compound	Conc. (% w/v) ^b	Repellency (%) ^c (±SE)
Orthodiphenolic		
15 Oleuropein 1	1.00	77a (±2.32)
10 Oleuropein aglycone 7	0.70	75a (±2.51)
10 Compound 8	0.60	73a (±1.85)
15 Demethyloleuropein 6	1.00	25b (±1.76)
10 Pyrocatechol 11 ^d	0.21	91c (±2.86)
Monophenolic		
10 Tyrosol 10	0.27	26d (±2.76)
10 Ligstroside 5	1.00	28d (±2.09)
Nonphenolic		
20 Secoiridoid 9	0.47	66e (±2.45)
10 Sodium salt of 9	0.51	64e (±2.78)
Blank		
30 H ₂ O		19f (±2.09)
20 Solvent ^e		20f (±1.67)

^aReplicates.

^b19.5 mM solutions.

^cMeans within tests with different letters are significantly different, $P < 0.05$, Duncan's multiple range test (Duncan, 1955).

^dPyrocatechol is not present in olives.

^e1,2-propandiol/H₂O (15%v/v) used for compounds **7**, **8** and **9**, slightly soluble in water.

Questi studi hanno evidenziato una repellenza del 75 % circa per campioni di ADV, valore da attribuirsi alla presenza di β -3,4- diidrossifeniletanolo, e del 77 e 75 % per l'oleuropeina e il suo aglicone. L'ipotesi è quindi che sia il gruppo difenolico la causa principale della loro repellenza.³⁹

E' stato inoltre recentemente suggerito che la repulsione olfattiva può essere causata dall'emissione delle aldeidi volatili (E)-2-esenale ed esanale dal foro di deposizione delle uova, identificate nello spazio di testa della polpa di oliva.³⁹

In conclusione, sono così stati identificati due gruppi di sostanze principalmente responsabili della repulsione al succo d'oliva: un gruppo derivato dal catabolismo dell'oleuropeina e un gruppo di volatili derivati dalla idroperossidazione di acidi polinsaturi, (E)-2 esenale ed esanale.

1.5 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente elaborato è la messa a punto di un metodo di analisi per la determinazione di composti polifenolici nelle acque di vegetazione di frantoio, in prospettiva dei futuri test da condurre *in vivo* relativi al loro possibile effetto repellente e/o insetticida nei confronti della mosca dell'olivo, vero e proprio infestante dell'area mediterranea.

Nei paesi produttori di olio d'oliva lo smaltimento di ADV rappresenta un grave problema a causa della loro natura tossica e dei relativi costi; un loro utilizzo pratico nel controllo della mosca dell'olivo potrebbe essere risolutivo e conferirebbe ciclicità al processo di produzione.

Le molecole di interesse di cui si andrà a valutare l'azione repellente per la mosca sono l'oleuropeina e i suoi derivati idrossitirosolo, pirocatecolo, tirosolo e acido caffeico e le matrici saranno le acque di scarto della spremitura delle olive, da caratterizzare dal punto di vista quantitativo e qualitativo.

Gli obiettivi del presente lavoro di tesi si riassumono quindi nei seguenti punti:

- sviluppo di un metodo per l'analisi dei composti fenolici contenuti nelle acque di vegetazione;
- analisi e quantificazione dei polifenoli di interesse contenuti in alcuni campioni di ADV provenienti da diversi frantoi;
- sviluppo di un metodo per isolare e raccogliere i singoli composti fenolici puri presenti nelle acque di vegetazione per la creazione di standard e per la realizzazione di futuri test di repellenza sulla mosca;
- caratterizzazione chimica delle frazioni raccolte contenenti i singoli analiti isolati.

2. MATERIALI E METODI

2.1 DETERMINAZIONE DI COMPOSTI FENOLICI

Il metodo scelto per l'analisi e la determinazione dei composti fenolici presenti nelle acque di vegetazione prevede l'utilizzo della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) in fase inversa, scelto per la sua semplicità ed efficacia. Gli analiti di interesse vengono efficacemente separati in una colonna C-18 e rivelati sia in DAD che in fluorescenza (FL).

2.1.1 ACQUE DI VEGETAZIONE

Nel presente studio sono stati analizzati 4 campioni di acque di vegetazione provenienti da produzioni italiane, precisamente:

- ADV 2019, concentrate 4X in impianto mediante osmosi inversa presso Agraria Riva del Garda s.c.a, Riva del Garda (TN)
- ADV 2020 concentrate 4X in impianto mediante osmosi inversa presso Agraria Riva del Garda s.c.a, Riva del Garda (TN)
- ADV 2021, Frantoio Doglia, Impruneta (FI), prelevate il 20.11.2021
- ADV 2021, Frantoio Cornoleda, Cinto Euganeo (PD), prelevate il 24.11.2021

Tutti i campioni freschi di acque di vegetazione sono stati raccolti in bottiglie di plastica o vetro e conservati a 4 °C fino all'analisi. I campioni sono stati successivamente suddivisi in sottocampioni a diverse diluizioni (1:10, 1:100, 1:500) per permettere una corretta analisi cromatografica.

Per le acque di vegetazione del Frantoio Doglia e Cornoleda è stato necessario un trattamento di filtrazione. A tal fine le acque sono state inizialmente centrifugate per isolare e rimuovere le impurità più grossolane e successivamente filtrate con Syringe Filter Acrodisc 25 mm con membrana in Nylon da 0.45 μm , montati su siringa.

2.1.2 SOLUZIONI STANDARD DI CALIBRAZIONE

Sono stati acquistati gli standard di riferimento per i fenoli in esame:

- Idrossitirosolo ((3,4- diidrossifenil)etanolo) ≥ 98 % (HPLC), Sigma-Aldrich
- Pirocatecolo ≥ 99 %, Acros Organics
- Tirosolo ((p-idrossifenil) etanolo o anche p-HPEA-EDA) 98 %, Sigma-Aldrich
- Acido caffeico ≥ 98.0 % (HPLC), Sigma-Aldrich
- Oleuropeina ≥ 98.0 %, Sigma-Aldrich

Tutti i composti standard sono stati conservati a -20 °C e protetti dalla luce fino all'analisi. Sono state inoltre preparate le soluzioni madre standard concentrate (1 g/L) per ciascun analita sciogliendo una quantità opportunamente pesata di standard in acqua milliQ. Tali soluzioni sono state poi diluite e adoperate per la messa a punto del metodo cromatografico, per l'analisi qualitativa e quantitativa dei campioni e per le procedure di validazione delle metodiche ottimizzate.

2.1.3 REAGENTI

- Acqua MilliQ
- Metanolo ≥ 99.9 % (HPLC), Sigma-Aldrich
- Acido Formico ≥ 98 %, ACS reagent, Sigma-Aldrich
- n-Esano 95 %, BDH Laboratory Supplies
- Etile acetato 99.5 %, Carlo Erba
- Acido cloridrico 37 %, Riedel-de Haën

2.1.4 STRUMENTAZIONE

Sono stati utilizzati un sistema cromatografico Shimadzu mod. LC-20AD XR dotato di una pompa HPLC LC-20AD XR, un rivelatore a serie di diodi SPD-M20A, un rivelatore a fluorescenza RF-20A XS Shimadzu, un forno per colonna CTO-20AC Shimadzu e un campionatore automatico SIL-20AC XR Shimadzu. L'acquisizione,

l'analisi e la refertazione dei dati sono state eseguite utilizzando il software di cromatografia LabSolutions LC/GC Versione 5.87. L'analisi è stata eseguita utilizzando una colonna Phenomenex Luna Omega polar C18 con particelle di diametro 1.6 μm , diametro interno di 2,1 mm e lunghezza di 100 mm dotata di una precolonna Phenomenex AJ0-9505 FP Polar.

2.1.5 ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE

I composti fenolici (idrossitirosolo, pirocatecolo, tirosolo, acido caffeico e oleuropeina) sono stati estratti dalle acque di vegetazione secondo il metodo descritto da De Marco, Savarese, Paduano e Sacchi (2007), a cui sono state apportate alcune modifiche e ottimizzazioni.

500 μL di acque di vegetazione (ADV) sono stati acidificati con 80 μL di HCl (1M) per raggiungere un pH pari a 2. Le ADV acidificate sono state successivamente lavate con 500 μL di n-esano per rimuovere la frazione lipidica. La miscela è stata agitata vigorosamente per 1 minuto, quindi centrifugata per 5 minuti a 1000 rpm e temperatura ambiente. Le fasi sono state separate e la fase esano è stata scartata. Questa procedura è stata ripetuta 3 volte.

Le ADV delipidate sono state quindi trattate tre volte con 500 μL di acetato di etile (EA). La miscela è stata vigorosamente agitata in vortex per 1 minuto e centrifugata per 5 minuti a 1000 rpm a temperatura ambiente. Le fasi organiche superiori sono state riunite ed evaporate a secchezza sotto flusso di azoto a 30 °C. Il residuo secco è stato infine solubilizzato in 250 μL di H_2O e 250 μL di MeOH per poi procedere con l'analisi quantitativa dei composti fenolici mediante HPLC-DAD-FL.

2.1.6 METODO CROMATOGRAFICO

Vengono riportate le condizioni strumentali di analisi cromatografica:

Eluente A: acqua milliQ, metanolo 15 % e 0.05 % acido formico

Eluente B: metanolo, 0.05 % acido formico

Flusso: 0.2 mL/min

Volume di iniezione: 5 μ L

Temperatura colonna: 30 °C

Il metodo, ovvero il programma del gradiente di eluizione per la separazione dei composti fenolici di interesse, può essere così schematizzato:

Tabella 2.1: Programma di eluizione per la separazione dei composti fenolici in ADV.

Tempo (minuti)	Concentrazione eluente B
0	2.4 %
5.00	2.4 %
15.00	100 % gradiente lineare
19.00	100%
20.00	2.4 % gradiente lineare
26.00	2.4 %

Il rivelatore a serie di diodi (DAD) è stato impostato nell'intervallo di lunghezze d'onda tra 200 e 300 nm, registrando le corse cromatografiche a $\lambda=280$ nm, mentre la rivelazione fluorimetrica viene eseguita eccitando gli analiti a 278 nm e misurando l'emissione a 339 nm.

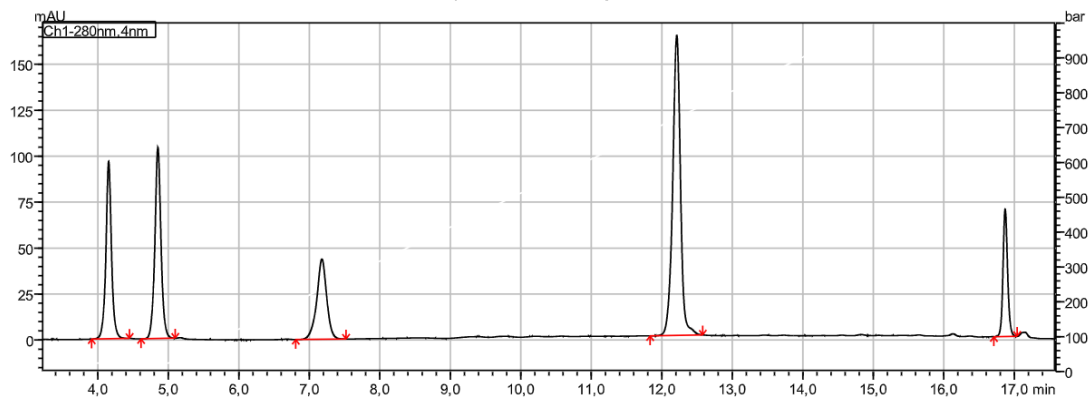


Figura 2.1: Cromatogramma di uno standard contenente i cinque fenoli (50 ppm) rivelato in DAD. In ordine di eluizione: idrossitirosolo, pirocatecolo, tirosolo, acido caffeico, oleuropeina.

Le analisi condotte direttamente sui primi campioni di acque di vegetazione hanno rivelato delle criticità nella efficace separazione del picco relativo all'oleuropeina che risultava coeluita con altre specie. A soluzione di tale problematica, è stato realizzato un secondo programma di eluizione per la rivelazione della sola oleuropeina che può essere così schematizzato:

Tabella 2.2: Programma di eluizione per la separazione di oleuropeina in ADV.

Tempo (minuti)	Concentrazione eluente B
0	45%
5.00	45%
26.00	100 % gradiente lineare
30.00	100%
31.00	45%
37.00	45%

2.1.7 CALIBRAZIONE STRUMENTALE

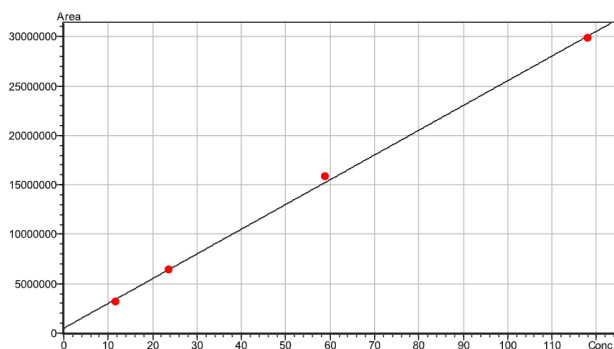


Figura 2.2: Retta di calibrazione dell'idrossitirosole (rivelazione in FL) ottenuta interpolando i quattro punti di calibrazione registrati in triplo.

Sono state ottenute le rette di calibrazione esterna a quattro livelli di concentrazione per i cinque analiti in esame per la misura in DAD. Il segnale di fluorescenza è stato calibrato solo per quattro analiti in quanto l'acido caffeico non è fluorescente. Le soluzioni

standard per la calibrazione sono state preparate a partire da soluzioni madre concentrate (1 g/L), preparando una miscela contenente tutti e cinque i fenoli a 100 ppm che è stata diluita per ottenere le soluzioni di calibrazione a concentrazioni opportune (10, 20, 50, 100 mg/L).

Le rette di calibrazione sono state infine ottenute interpolando i valori di area dei picchi cromatografici dei quattro livelli di concentrazione acquisiti in triplo.

2.2 VALIDAZIONE DEL METODO

2.2.1 CALCOLO DEL LOD

Il limite di rilevabilità (limit of detection, LOD) è definito come il valore di concentrazione al di sopra del quale si può affermare, con un livello di confidenza dichiarato, che un dato campione è diverso da un bianco che non contiene l'analita. Si tratta quindi della minima concentrazione di analita che produce un segnale significativamente diverso da quello del bianco.

Il LOD può essere calcolato in diversi modi, un metodo molto semplice comunemente utilizzato prevede di moltiplicare per tre la deviazione standard del segnale del bianco secondo la formula

$$LOD = S_b + 3\sigma_b$$

dove S_b è il segnale medio del bianco e σ_b la sua deviazione standard.

In questo lavoro di tesi, il calcolo del LOD è stato eseguito mediante il metodo di Hubaux-Vos come mostrato in Figura 2.3. Il LOD calcolato con Hubaux-Vos è un valore che rappresenta la quantità minima di un analita rilevabile da un determinato metodo con un livello di confidenza specificato, dato un particolare insieme di dati di calibrazione. Il LOD è derivato dai valori selezionati di α e β , dove α rappresenta la probabilità di falsi positivi che riportano il rilevamento quando non è presente alcun analita) e β rappresenta la probabilità di falsi negativi che non segnalano nulla di rilevato quando l'analita è effettivamente presente. I valori selezionati di α e β vengono utilizzati per calcolare rispettivamente le funzioni di previsione superiore e inferiore; simile agli intervalli di confidenza, le funzioni di previsione sono curve iperboliche che delimitano la linea di calibrazione e definiscono una regione all'interno della quale una misurazione futura avrà una probabilità selezionata di essere trovata. Il LOD viene determinato costruendo una linea orizzontale attraverso l'intersezione della funzione di previsione superiore (definito da α) e l'asse di risposta, quindi trovando il valore che corrisponde al punto in cui la linea orizzontale costruita interseca la funzione di previsione inferiore.⁴⁸

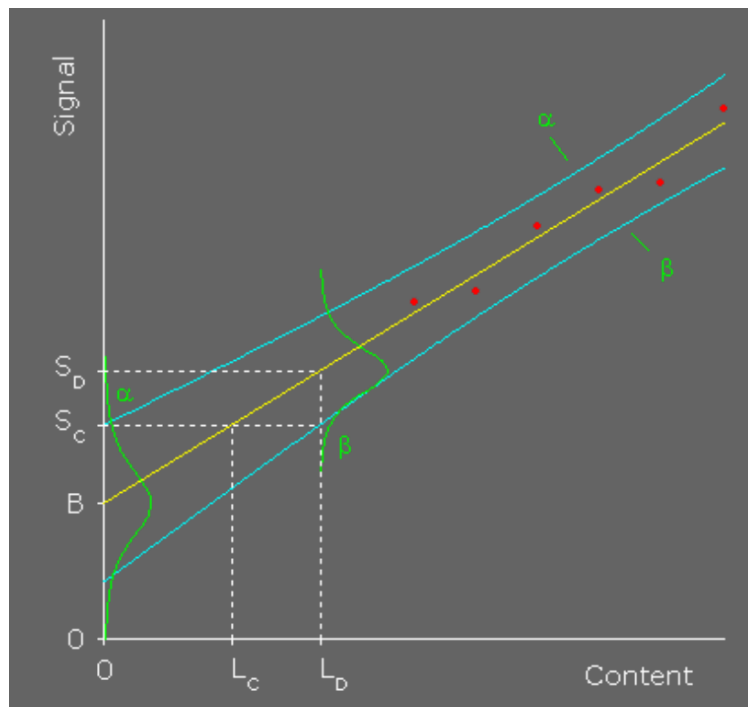


Figura 2.3: Metodo Hubaux-Vos per la stima del LOD. L_D rappresenta il valore del LOD in concentrazione mentre S_D il valore espresso come segnale strumentale.⁴⁸

2.2.2 TEST F

Il test F è un test statistico che permette di confrontare tra loro le varianze di due set di dati per stabilire se queste sono statisticamente equivalenti tra loro o meno.

Nella presente tesi, il test F è stato impiegato per confrontare deviazioni standard di medie sperimentali prima dell'applicazione del t-test spiegato nel paragrafo successivo. Il valore F è calcolato secondo la formula:

$$F = \frac{S_{max}^2}{S_{min}^2}$$

e viene confrontato con il valore tabulato di $F_{\alpha/2, \nu_1, \nu_2}$ che dipende dal livello di confidenza scelto (nel caso di specie 95 %, $\alpha=0.05$) e dai gradi di libertà con cui sono state stimate le varianze ($\nu_1=n_1 - P_1$, $\nu_2=n_2 - P_2$ con n=numero di misure e P=numero di parametri valutati). Se il valore di F calcolato è minore di quello tabulato, le due varianze sono da considerarsi statisticamente equivalenti ($S_1 = S_2$), in caso contrario la varianza non è la stessa e i due set di dati appartengono a distribuzioni differenti ($S_1 \neq S_2$).

2.2.3 T-TEST

Il confronto tra dati sperimentali è stato condotto mediante il test t. Esso infatti permette, ad esempio, di verificare se il valore medio di una distribuzione è statisticamente equivalente ad un valore di riferimento (μ) ad un determinato livello di confidenza, secondo la formula

$$t = \frac{X - \mu}{s/\sqrt{n}}; \quad \nu = n - 1$$

dove s/\sqrt{n} è la deviazione standard della media, con n pari al numero di osservazioni, e ν i gradi di libertà. Un valore di t inferiore a quello tabulato ($t_{\alpha/2, \nu}$) corrisponderà ad un esito positivo del test, quindi ad una differenza non significativa tra i due valori.

Il t-test permette inoltre di confrontare due set di dati tra loro indipendenti aventi ciascuno la propria media ed incertezza. Nel caso di specie, il t-test può essere usato per verificare se i risultati ottenuti applicando due metodi sullo stesso campione, siano o meno significativamente differenti. Il t-test da applicare cambia in base al risultato di un test F tra le varianze misurate per i due set di dati; se le varianze appaiono omogenee (o non significativamente differenti), il test F ha esito positivo e si applica il seguente t-test:

$$t = \frac{|X_1 - X_2|}{S_p} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

dove

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 - 1 + n_2 - 1}}$$

avente i gradi di libertà calcolati come $\nu = n_1 + n_2 - 2$ e dove il valore di n_n è pari al numero di misure comprese nella media X_n .

Se il valore di t calcolato è minore di quello tabulato $t_{\alpha/2, \nu}$, considerando un certo livello di confidenza scelto a priori (95 %), allora il test è positivo e i due metodi si possono considerare statisticamente equivalenti.

Nel caso in cui invece le varianze non siano statisticamente equivalenti, per misurare il valore di t viene usata la seguente espressione:

$$t = \frac{|X_1 - X_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

con

$$\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 + 1}} - 2$$

n_n =numero di misure comprese nella media X_n

s_n =deviazione standard per il set di dati n-esimo

ν =gradi di libertà associati a t

2.2.4 ANALISI DEI RECUPERI

Le funzioni di recupero possono risultare utili nel fornire informazioni sulla natura e l'entità di possibili errori sistematici.

Per l'analisi del recupero sono state fatte misure relativamente a:

- Acque di vegetazione (ADV 2019 1:10)
- ADV con aggiunta di una soluzione mix di standard tale da realizzare una concentrazione aggiunta di 10 ppm (500 μ L di ADV + 5 μ L di ogni standard)
- ADV con aggiunta di una soluzione mix di standard tale da realizzare una concentrazione aggiunta di 20 ppm (500 μ L di ADV + 10 μ L di ogni standard)
- Soluzioni acquose con aggiunte di soluzioni standard identiche a quelle sopra riportate

Poiché i valori inizialmente ottenuti per idrossitirosolo e tirosolo nelle ADV sono risultati anomali, è stato ipotizzato che, essendo ancora incognito il valore delle concentrazioni all'interno delle acque di vegetazione, la quantità aggiunta non fosse sufficiente ad evidenziare un cambiamento lineare della concentrazione.

La soluzione delle acque di vegetazione (1:10) è stata quindi diluita 50 volte (500 μ L di ADV (1:10) su 25 mL H₂O) per permettere una corretta analisi e determinazione del recupero. Sono così state fatte delle aggiunte di idrossitirosolo e tirosolo rispettivamente di:

- ADV con aggiunta di una soluzione standard di tirosolo e idrossitirosolo tale da realizzare una concentrazione aggiunta di 10 ppm
- ADV con aggiunta di una soluzione standard di tirosolo e idrossitirosolo tale da realizzare una concentrazione aggiunta di 20 ppm

I risultati degli esperimenti di recupero, esplicitati attraverso la pendenza della funzione di recupero, sono stati analizzati per gli analiti in esame sia per quanto riguarda le misure in DAD che per le misure in fluorescenza; ogni misura è stata effettuata in triplo.

2.3 CARATTERIZZAZIONE DEGLI ANALITI NELLE ADV MEDIANTE ESI-MS

Gli analiti nei campioni di acque di vegetazione sono stati caratterizzati chimicamente tramite Spettrometria di Massa (ESI-MS).

2.3.1 STRUMENTAZIONE E CONDIZIONI OPERATIVE

L'identificazione dei fenoli all'interno dei campioni di ADV è stata eseguita mediante ionizzazione elettronica HPLC-Elettrospray (ESI)-Spettrometria di Massa tandem (MS/MS). L'analisi HPLC degli estratti fenolici è stata eseguita utilizzando il sistema di cromatografia liquida Agilent 1260 Infinity II LC System; la colonna utilizzata è una Phenomenex Luna Omega polar C18, e durante l'analisi è stata mantenuta ad una temperatura di 30 °C e la velocità di flusso è stata impostata a 0.2 mL/min. Il programma di eluizione e il metodo cromatografico utilizzati sono quelli descritti nel Paragrafo 2.1.7 e precedentemente adoperati per la quantificazione dei fenoli. L'HPLC è stato accoppiato ad uno spettrometro di massa Agilent 6545 LC/Q-TOF (Quadrupole Time of Flight LC/MS); le analisi sono state eseguite in modalità negativa, rivelando ioni $[M-H]^-$ generati dalla deprotonazione che si verifica durante il processo ESI. L'acquisizione dei dati è stata effettuata dal software Agilent MassHunter Qualitative analysis 10.0. I parametri spettrali e di sorgente impostati sono:

Prec. m/z	Z	Ret. Time (min)	Delta Ret. Time (min)	Iso. Width	Collision Energy
153.0557	1	4.38	1	Narrow (~1.3 m/z)	20
109.0295	1	5.03	1	Narrow (~1.3 m/z)	20
137.0608	1	7.2	1.5	Narrow (~1.3 m/z)	20
179.035	1	13.41	2	Narrow (~1.3 m/z)	20
539.177	1	18	2.5	Narrow (~1.3 m/z)	20

The image shows two screenshots of a mass spectrometry software interface. The top screenshot displays the 'Spectral Parameters' tab, which is divided into 'MS' and 'MS/MS' sections. The 'MS' section includes a 'Mass Range' with 'Min Range' set to 100 m/z and 'Max Range' set to 1000 m/z. Below this, the 'Acquisition Rate/Time' section shows 'Rate' at 6 spectra/s, 'Time' at 166.7 ms/spectrum, and 'Transients/spectrum' at 953. A checkbox for 'Max Time between MS1 Spectra' is set to 5 s. The 'MS/MS' section has a 'Mass Range' with 'Min Range' at 50 m/z and 'Max Range' at 700 m/z. Its 'Acquisition Rate/Time' section shows 'Rate' at 8 spectra/s, 'Time' at 125 ms/spectrum, and 'Transients/spectrum' at 642. A checkbox for 'Use PC for MS/MS decisions' is checked. The bottom screenshot shows the 'Source' tab with 'Dual AJS ESI (Seg)' and 'MS TOF (Expt)' sections. The 'Dual AJS ESI (Seg)' section includes parameters for Gas Temp (325 °C), Drying Gas (10 l/min), Nebulizer (20 psi), Sheath Gas Temp (350 °C), and Sheath Gas Flow (12 l/min). The 'MS TOF (Expt)' section includes Fragmentor (150 V), Skimmer (45 V), and Oct 1 RF Vpp (750 V). The 'Dual AJS ESI (Expt)' section includes VCap (3000 V), Capillary (0.000 µA), Nozzle Voltage (Expt) (1000 V), and Chamber (0.00 µA).

Figura 2.4: Parametri spettrali e di sorgente impostati per l'analisi in spettrometria di massa.

2.4 ESTRAZIONE DI POLIFENOLI PURI DA ADV

Il metodo scelto per isolare e raccogliere i composti fenolici puri dalle acque di vegetazione è la cromatografia liquida (HPLC) preparativa: gli analiti di interesse vengono efficacemente isolati in una colonna C-18, rivelati tramite detector UV-VIS e raccolti mediante un collettore di frazioni.

2.4.1 STRUMENTAZIONE

È stato impiegato un sistema UHPLC Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 munito di un modulo pompe, un collettore di frazioni e un detector a lunghezza d'onda variabile Dionex UltiMate 3000 (RS) impostato a $\lambda=280$ nm. La separazione è stata ottenuta tramite una colonna Kinetex C18 100 Å con particelle di dimensione di 5 µm, diametro interno di 10 mm e lunghezza di 250 mm. L'acquisizione, l'analisi

e la refertazione dei dati sono state eseguite utilizzando il software di cromatografia Thermo Scientific Dionex Chromeleon Versione 7.1 SR1.

2.4.2 METODO DI PURIFICAZIONE

Le acque di vegetazione (ADV) sono state purificate secondo il metodo precedentemente descritto (2.1.5) ma in scala maggiore per soddisfare i quantitativi ottenibili in cromatografia preparativa.

Sono stati prelevati 50 mL di acque di vegetazione (ADV 2020) e sono stati acidificati con 8 mL di HCl concentrato (12 M) per raggiungere un pH pari a 2.

Le ADV acidificate sono state successivamente poste all'interno di un imbuto separatore dove sono state lavate con 50 mL di n-esano per rimuovere la frazione lipidica. La miscela è stata agitata vigorosamente per qualche minuto.

Le fasi sono state separate e la fase esano è stata scartata. Questa procedura è stata ripetuta 3 volte. Le ADV delipidate sono state poi trattate tre volte con 50 mL di acetato di etile (EA). La miscela è stata agitata vigorosamente per qualche minuto.

Le fasi organiche superiori sono state riunite ed evaporate a secchezza sotto flusso di azoto a 30 °C. Il residuo secco è stato solubilizzato in 2.5 mL di H₂O e 2.5 mL di MeOH, ottenendo così una soluzione 10 volte più concentrata rispetto al campione di ADV. Da questa sono state poi ottenute, ai fini dell'analisi, una soluzione diluita 1:10 (tornando quindi alla concentrazione originaria) e una soluzione più diluita (1:100).

2.4.3 METODO CROMATOGRAFICO E RACCOLTA DELLE FRAZIONI

Le condizioni di separazione cromatografica (preparativa) vengono riportate in seguito:

Eluente A: acqua milliQ e 0.05 % acido formico

Eluente B: metanolo e 0.05 % acido formico

Flusso: 2 mL/min

Volume di iniezione: 20 μ L

Temperatura colonna: ambiente

Delay time: 0.2 s

Collect period: 120 s

Lunghezza d'onda di rivelazione: 280 nm

Per una efficace separazione e raccolta dei cinque composti fenolici, sono stati messi a punto due differenti programmi di eluizione.

Il primo metodo può essere così schematizzato:

Tabella 2.3: Programma di eluizione per la separazione e la raccolta di idrossitirosolo, pirocatecolo, tirosolo e acido caffeico in ADV.

Tempo (minuti)	Concentrazione eluente B
0	23%
10.70	Collect fraction
12.20	Stop collection
14.50	Collect fraction
15.50	Stop collection
16.00	23%
16.20	Collect fraction
17.20	Stop collection
24.50	Collect fraction
25.10	Stop collection
26.00	100 % gradiente lineare
27.30	Collect fraction
28.00	Stop collection
30.00	100%
32.00	23%
37.00	23%

I campioni di ADV 2020 processati con questo metodo sono in diluizione 1:100, una concentrazione maggiore non permetteva una corretta separazione e raccolta degli

analiti. Questo programma è efficace per tutti i fenoli di interesse ma l'oleuropeina risulta di più difficile separazione.

Per tale motivo è stato sviluppato un secondo metodo per la sola estrazione della frazione di oleuropeina che prevede:

Tabella 2.4: Programma di eluizione per la separazione e la raccolta di oleuropeina in ADV.

Tempo (minuti)	Concentrazione eluente B
0	45%
4.00	45%
14.85	Collect fraction
15.30	Stop collection
25.00	80%
27.00	100 % gradiente lineare
30.00	100%
31.00	45%
36.00	45%

Le frazioni raccolte sono state conservate in frigo ad una temperatura di 4 °C e al riparo dalla luce fino all'analisi NMR.

2.5 CARATTERIZZAZIONE DEI COMPOSTI ISOLATI DALLE ADV

Le frazioni dei cinque analiti in esame, raccolte con cromatografia preparativa, sono state caratterizzate mediante analisi NMR.

2.5.1 STRUMENTAZIONE

E' stato utilizzato uno strumento NMR 400 MHz Bruker Avance III HD, con probe BBI 5 mm con gradienti; il software di elaborazione dati utilizzato è Topspin 3.5 e tutti gli spettri sono stati acquisiti ad una temperatura di 25 °C .

Lo spettro protonico monodimensionale è stato acquisito con un FID di 32K punti, larghezza spettrale 12 ppm, impulso 90° e Relaxation Delay di 4 s e 8-32 scansioni in base alla concentrazione del campione.

L'HSQC edited è stato acquisito con 2K punti per il FID in F2, 128 esperimenti in F1, larghezza spettrale di 10 ppm in F2 e 160 ppm in F1 e disaccoppiamento del C durante l'acquisizione con sequenza *garp* con 8-64 scansioni; in questo esperimento viene selezionata una J media di accoppiamento $^1H - ^{13}C$ di 145 Hz.

L'HMBC viene acquisito con 2K punti in F2, 170 esperimenti in F1, larghezza spettrale di 10 ppm in F2 e 220 ppm in F1 (non disaccoppiato); in questo esperimento viene selezionata una J media di accoppiamento $^1H - ^{13}C$ di 8 Hz e un numero di scansioni da 64 a 256.

Il DQF(Double Quantum Filter)-COSY sull'oleuropeina è stato acquisito con 2K punti in F2, 400 esperimenti in F1, larghezza spettrale di 12 ppm e 32 scansioni.

Tutti gli esperimenti bidimensionali sono stati acquisiti utilizzando i gradienti di campo magnetico.

2.5.2 PROCEDURA

Per la preparazione dei campioni NMR sono stati raccolti 15 mL di ciascun composto fenolico delle ADV isolato come eluato con la cromatografia preparativa, poi portati a secco sotto flusso di azoto.

I tubi NMR e le pipette Pasteur sono state seccate in stufa a 100 °C per un'ora; e successivamente, sotto cappa di azoto, con una pipetta, l'azoto è stato fatto passare all'interno dei tubi per ridurre al minimo l'apporto di H₂O.

La misura è stata effettuata utilizzando come solvente CD₃OD (0.75 mL), con il quale sono state sciolte le frazioni di analiti poi trasferite nei tubi. I tubi sono stati infine chiusi con tappo e parafilm e conservati in frigo fino all'analisi.

I *chemical shift* sono riferiti ai segnali del solvente deuterato ($\delta_C=49.0$ ppm e $\delta_H=3.31$ ppm). Le correlazioni omonucleari $^1H - ^1H$ sono state determinate tramite esperimenti COSY, quelle eteronucleari $^1H - ^{13}C$ mediante esperimenti HSQC,

mentre le correlazioni $^1H-^{13}C$ attraverso la presenza di più legami sono state determinate con esperimenti HMBC.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Diversi studi dimostrano come alcuni composti fenolici siano coinvolti nell'azione repellente esercitata dalla frazione acquosa del succo d'oliva fresco e dai reflui di frantoio nei confronti della mosca dell'olivo^{38,39}. A tal proposito, questa tesi propone lo sviluppo di un metodo che permetta di quantificare e isolare i principali polifenoli presenti nelle ADV per poter poi indagare il loro possibile effetto repellente e/o insetticida. Il presente lavoro può così essere suddiviso in tre parti principali: la realizzazione e validazione di un metodo analitico per la determinazione e quantificazione dei principali polifenoli nelle ADV; lo sviluppo di un metodo per l'isolamento e la raccolta degli analiti di interesse direttamente dalle acque di vegetazione e, infine, la loro caratterizzazione con lo scopo di ricavare degli standard utili per futuri test di repellenza *in vivo* sulla mosca dell'olivo da effettuare in collaborazione con le unità di ricerca di Entomologia Agraria delle università di Padova e Verona.

3.1 SVILUPPO DEL METODO DI ANALISI PER LA DETERMINAZIONE DI POLIFENOLI

L'oleuropeina e i suoi derivati rappresentano gran parte della frazione fenolica totale dell'olio vergine di oliva; per la determinazione e l'identificazione di tali sostanze fenoliche sono state messe a punto tecniche analitiche sempre più sofisticate che prevedono in genere prima la loro estrazione e purificazione dalla matrice oleosa e poi la scelta della giusta tecnica analitica per la loro valutazione quali-quantitativa.

E' stato così realizzato un metodo efficace per la determinazione dei polifenoli che prevede un processo di estrazione liquido-liquido e successivamente l'iniezione delle acque di vegetazione in uno strumento HPLC con rivelatore DAD e a fluorescenza (FL).^{42,43,44,45}

3.1.1 OTTIMIZZAZIONE DELLA PROCEDURA DI ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE

I campioni di acque di vegetazione sono stati inizialmente analizzati mediante HPLC (RP-C18) senza alcun processo di purificazione, quindi per iniezione diretta in colonna: il cromatogramma è risultato complesso e denso di picchi, alcuni riconducibili ai biofenoli da indagare, altri alla frazione lipidica contenuta nella matrice acquosa. Poiché tali interferenti non permettono una efficace separazione ed identificazione dei polifenoli di interesse, è risultata necessaria la messa a punto di un processo di estrazione e purificazione.

Le condizioni di estrazione con i solventi convenzionali possono essere molto critiche per l'attività degli estratti fenolici ottenuti da ADV: i fenoli infatti si trovano spesso nelle piante come esteri o glicosidi, piuttosto che come molecole libere, e includono una parte polare, costituita da uno o più gruppi ossidrilici, e un anello aromatico a cui sono direttamente attaccati, che rappresenta la parte non polare.^{46,47}

Tra i diversi metodi di estrazione e recupero dei fenoli presenti in letteratura, ognuno con diversa efficienza e complessità, il processo di estrazione liquido-liquido è stato preferito per la sua semplicità e convenienza; si è quindi optato per l'utilizzo del metodo descritto da De Marco, Savarese, Paduano e Sacchi (2007) come riferimento, a cui sono state apportate alcune modifiche.

Per lo sviluppo di un'estrazione efficace sia qualitativa che quantitativa, sono stati ottimizzati diversi parametri: natura del solvente, pH delle acque di vegetazione, rapporto volumetrico tra solvente e ADV e numero di stadi di estrazione.¹⁶

I campioni di ADV, presenti a pH tra 4.8 e 5.2, sono stati trattati con HCl (1M) fino all'ottenimento di un pH pari a 2, valore ottimale scelto tenendo conto delle pKa dei polifenoli di interesse che presentano un minimo di 4.62 per l'oleuropeina e un massimo di 10 per tirosolo e idrossitirosolo; l'uso di pH più alti o più bassi, causa una diminuzione significativa nelle rese di estrazione dei polifenoli.

Le ADV acidificate vengono successivamente lavate tre volte con n-esano che permette una efficace purificazione delle acque mediante estrazione della frazione lipidica. Le ADV delipidate sono infine trattate con acetato di etile che trattiene i composti fenolici che vengono così estratti dalla matrice acquosa; questo solvente è

stato scelto perchè è risultato il migliore in termini di selettività ed efficienza di estrazione.

Le frazioni di etile acetato contenenti i polifenoli di interesse vengono infine concentrate con evaporazione a secco sotto flusso di azoto a 30 °C e il residuo secco solubilizzato in 250 µL di H_2O e 250 µL di MeOH, gli stessi solventi della fase mobile, e così adatti alla successiva analisi e rivelazione in HPLC-DAD-FL.

Nell'ottimizzazione del processo di estrazione è emersa una prima problematica che ha riguardato la temperatura a cui svolgere l'evaporazione a secco. Per la valutazione della termolabilità degli analiti in esame, la procedura di purificazione è stata svolta in due diversi campioni di ADV, prima con utilizzo di calore (36-38 °C) nella fase di evaporazione sotto flusso di azoto e poi in assenza (25-30 °C). In tabella 3.1 sono presenti i risultati del test effettuato: la modalità in assenza di calore, poco più lunga tempisticamente, ha però evidenziato un considerevole aumento della concentrazione di tutti gli analiti di interesse, con aree dei picchi di media tre volte maggiori.

Tabella 3.1: Test effettuato variando la temperatura nel processo di evaporazione a secco della procedura di purificazione.

Campione	T (°C)	$A_{Idrossitirosolo}$	$A_{Pirocatecolo}$	$A_{Tirosolo}$	$A_{Acidocaffeico}$	$A_{Oleuropeina}$
1	36-38	2120641	4600	293673	51725	134061
	30	6505694	13764	965412	163999	331876
2	36-38	2014675	4654	277948	48240	125860
	30	6428096	22604	956465	207183	252261

Una seconda criticità riscontrata interessa la conservazione dei campioni a seguito della procedura di estrazione. Analisi eseguite sui campioni purificati hanno mostrato una riduzione significativa del contenuto dei polifenoli (in particolare di oleuropeina) dopo 24 ore di conservazione; tale variazione di stabilità dei fenoli non è sorprendente in considerazione delle loro diverse capacità antiossidanti.

Per ovviare a questa problematica, gli estratti devono essere conservati al buio e ad una temperatura di 4 °C o inferiori.

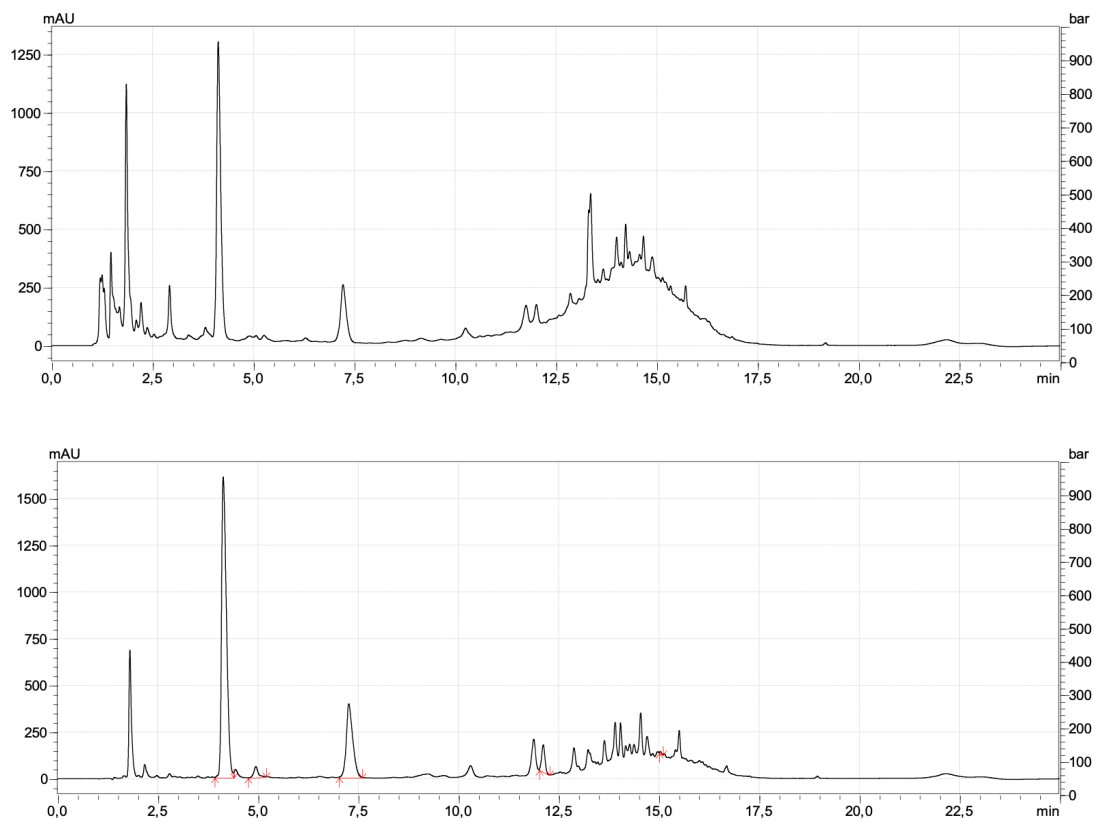


Figura 3.1: Cromatogrammi di ADV prima (sopra) e dopo (sotto) la procedura di estrazione e purificazione descritta.

3.1.2 MESSA A PUNTO DEL METODO CROMATOGRAFICO

Il metodo (RP)-HPLC-DAD-RF è stato sviluppato con l'obiettivo di fornire una tecnica semplice, rapida e accurata per la quantificazione di polifenoli in diversi campioni di acque di vegetazione. L'HPLC a fase inversa prevede una fase stazionaria non polare e una fase mobile generalmente costituita da solventi polari come acqua, acetonitrile e metanolo. Questa tecnica, in particolare quando si utilizzano colonne con particelle di piccole dimensioni, ha numerosi vantaggi quali: dimensioni ridotte della colonna, velocità di eluizione regolabile, utilizzo di piccole quantità di campione per l'analisi (pochi μL , con concentrazioni dell'ordine di nano/micromolare), elevata velocità di analisi e, soprattutto, elevata efficienza.

E' infine presente un rivelatore che consente l'analisi in continuo dell'eluato e l'identificazione e la quantificazione delle sostanze iniettate; dal rivelatore si ottiene il cromatogramma che rappresenta l'eluizione degli analiti in funzione del tempo di ritenzione, mentre la loro quantificazione avviene sulla base dell'area del picco dopo adeguata calibrazione.

Studi preliminari per la realizzazione di un metodo cromatografico efficace hanno coinvolto la prova di alcune colonne in fase inversa, quali Shimadzu XR-ODS III C18, Phenomenex Luna Omega polar C18 e Phenomenex Kinetex C18; sono stati condotti test di diverse composizioni in fase mobile per la separazione dei cinque polifenoli di interesse mediante l'utilizzo di soluzioni standard di riferimento.

L'iniziale utilizzo della colonna Phenomenex Kinetex C18 con varie miscele di eluente (H_2O , AcCN, acido formico) non ha prodotto un'efficiente separazione e risoluzione cromatografica. Si è optato così per la modifica della componente organica dell'eluente, utilizzando prima H_2O /metanolo/acetonitrile/acido formico, per individuare la miscela H_2O /metanolo/acido formico come la più idonea.

Si è inoltre verificata l'efficienza e la selettività cromatografia impiegando altre colonne cromatografiche; la scelta finale è ricaduta sulla colonna C18 Luna Omega e metanolo + 0.05 % acido formico come eluente B, condizioni per le quali la separazione ha prodotto la migliore selettività, efficienza e forma dei picchi.

Lo strumento HPLC prevede la possibilità di utilizzare un rivelatore a serie di diodi (DAD), un rivelatore fluorimetrico o entrambi. Tutti i polifenoli in esame, ad eccezione dell'acido caffeico, possono essere rivelati con entrambe le metodiche. Per tale motivo, per le analisi è stata usata una strumentazione HPLC-DAD-FL: la lunghezza d'onda scelta per la rilevazione in DAD è stata impostata su 280 nm, mentre la rivelazione fluorimetrica viene eseguita eccitando gli analiti a 278 nm e misurando l'emissione a 339 nm.

La strumentazione prevede inoltre di amplificare il segnale in uscita del rivelatore fluorimetrico in due modi differenti, il primo riguarda la tensione del fotomoltiplicatore (settaggio low, medium e high), il secondo invece riguarda l'amplificazione della corrente in uscita (1x, 4x, 16x). Nel presente caso, il settaggio con cui si ottiene il miglior rapporto segnale/rumore è Medium 4x; l'utilizzo di amplificazioni ulteriori causano la saturazione del rivelatore. Nei campioni più concentrati il problema della saturazione si è presentato con l'idrossitirosolo e il tirosolo, essendo questi i due polifenoli presenti in maggior quantità. Per la soluzione di tale problematica si è ricorsi alla diluizione e si è ripetuta l'analisi cromatografica. Il programma di eluizione e le condizioni cromatografiche sono state precedentemente descritte nel paragrafo 2.1.6 e sono state realizzate per permettere la corretta separazione dei picchi tra di loro, in particolare delle coppie tirosolo/pirocatecolo e tirosolo/acido caffeico, aventi tempi di ritenzione simili.

Con tale programma l'ordine di eluizione ed i tempi di ritenzione degli analiti sono:

- Idrossitirosolo (HT) tr: 4.15 min (DAD), 4.55 min (FL)
- Pirocatecolo (PC) tr: 4.85 min (DAD), 5.25 min (FL)
- Tirosolo (TYR) tr: 7.18 min (DAD), 7.62 min (FL)
- Acido Caffeico (AC) tr: 12.2 min (DAD)
- Oleuropeina (OE) tr: 16.9 min (DAD), 17.50 min (FL)

Modifiche al metodo cromatografico volte a ridurre i tempi di ritenzione dei polifenoli hanno prodotto il più delle volte la sovrapposizione dei picchi di interesse, costringendo ad utilizzare tempi di eluizione più lunghi.

L'identificazione dei picchi cromatografici e la verifica della presenza effettiva degli analiti all'interno dei campioni analizzati, è stata effettuata confrontando i tempi di ritenzione (t_r) con quelli dei composti di riferimento e registrando gli spettri UV dei picchi nell'intervallo 200-300 nm mediante il rivelatore a serie di diodi. Una ulteriore conferma è stata comunque effettuata mediante analisi in spettrometri di massa (sezione 3.1.4.5). In Figura 3.2 sono rappresentati i cromatogrammi completi ottenuti con il metodo cromatografico realizzato analizzando una soluzione standard contenente i polifenoli a una concentrazione di 50 $\mu\text{g/L}$ e rivelati in DAD e fluorescenza.

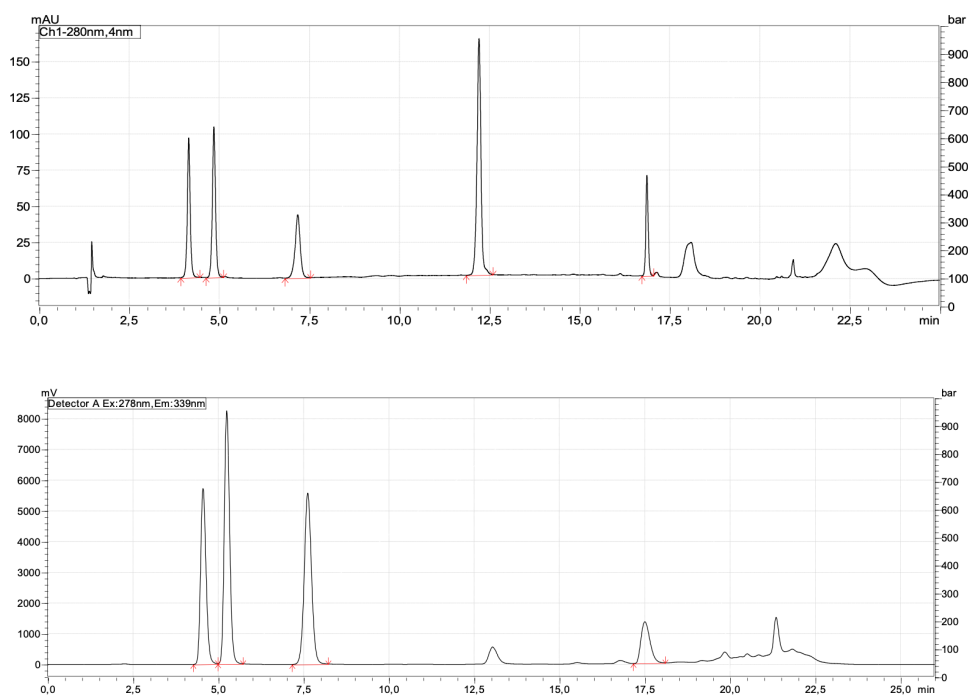


Figura 3.2: Cromatogramma completo in HPLC-DAD (sopra) e in HPLC-FL (sotto) di una soluzione standard contenente tutti i polifenoli di interesse (50 $\mu\text{g/L}$).

Inizialmente, le condizioni cromatografiche sono state sviluppate utilizzando soluzioni standard con l'analita disciolto in acqua, e solo in seguito il metodo è stato testato su campioni di acque di vegetazione purificati e disciolti in una soluzione acqua:metanolo (50:50).

Il metodo cromatografico realizzato sulla base delle soluzioni standard di riferimento applicato a campioni reali ha incontrato delle criticità nella corretta separazione e

determinazione dell'oleuropeina che, nonostante il processo di estrazione e purificazione, si trova ancora fortemente coeluita con altre specie (Fig. 3.3).

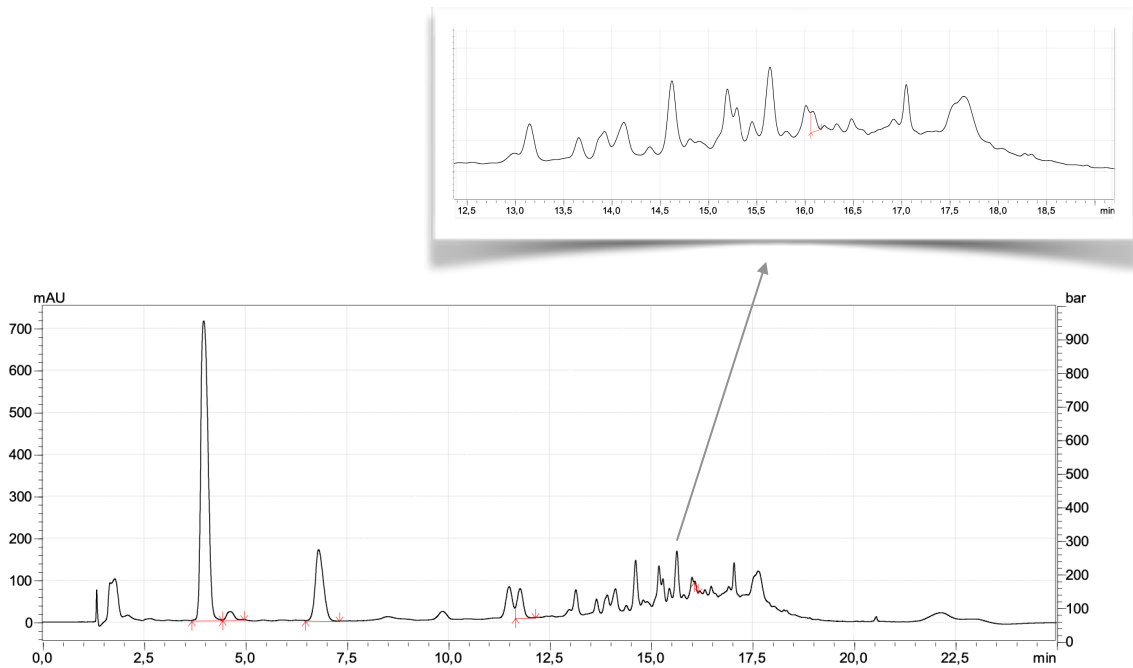


Figura 3.3: Cromatogramma in HPLC-DAD di un campione di acque di vegetazione (2019) diluite 10 volte; vengono segnalati i picchi dei polifenoli in esame. In evidenza la parte del cromatogramma contenente il picco relativo all'oleuropeina.

A risoluzione di tale problematica, è stato sviluppato un secondo metodo per la rivelazione della sola oleuropeina. Il nuovo programma di eluizione (descritto nel paragrafo 2.1.6) ha permesso una maggiore risoluzione dei picchi nella zona di interesse per un'efficace separazione e rivelazione della molecola (tr 12.15 min).

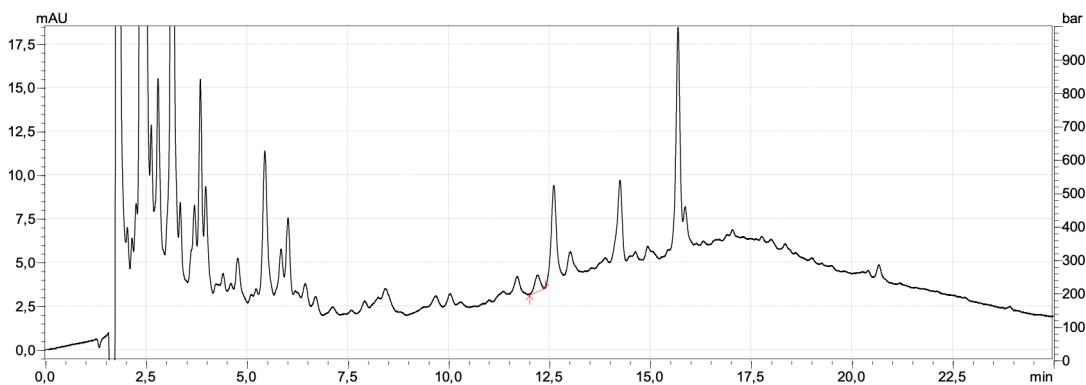


Figura 3.4: Cromatogramma in HPLC-DAD di un campione di acque di vegetazione (2019) diluite 10 volte ottenuto con il secondo metodo, efficace per la rivelazione della sola oleuropeina.

3.1.3 DETERMINAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI DI POLIFENOLI NELLE ADV

Applicando i metodi cromatografici ottimizzati e ottenute le relative rette di calibrazione, è stato possibile quantificare i polifenoli in esame presenti nei quattro campioni di acque di vegetazione trattati con il metodo di purificazione precedentemente descritto. I quattro campioni si differenziano sia come matrice e sia come origine:

- ADV 2019 concentrate 4X in impianto mediante osmosi inversa presso Agraria Riva del Garda s.c.a, Riva del Garda (TN)
- ADV 2020 concentrate 4X in impianto mediante osmosi inversa presso Agraria Riva del Garda s.c.a, Riva del Garda (TN)
- ADV 2021, Frantoio Doglia, Impruneta (FI)
- ADV 2021, Frantoio Cornoleda, Cinto Euganeo (PD)

Il valore di concentrazione degli analiti (C_0) presenti nelle ADV è riportato in Tabella 3.2 come media \pm devstd (n=3).

Viene inoltre calcolato il valore della deviazione standard relativa (RSD%) per la valutazione della precisione del metodo e della sua ripetibilità; essa indica infatti se la deviazione standard è una quantità più o meno piccola rispetto alla media per il set di dati.

Considerando i risultati sperimentali, i polifenoli presenti in concentrazione maggiore risultano essere l'idrossitirosole e il tirosole in tutti i campioni analizzati, con valori che mostrano grandi variazioni del contenuto fenolico tra i campioni stessi. Questo dato è facilmente intelligibile, le acque di vegetazione utilizzate nell'analisi infatti appartengono a località ed annate differenti, fattori che possono influire notevolmente sulla composizione e concentrazione fenolica, come confermato dalla letteratura^{34,36}.

Tabella 3.2: Concentrazioni medie, deviazioni standard e deviazioni standard relative dei cinque polifenoli determinati nei quattro campioni di acque di vegetazione (ADV).

Campione	Analita	C_0 DAD (mg/L)	RSD %	C_0 Fluo (mg/L)	RSD %
ADV 2019	Pirocatecolo	201.8 ± 6.3	3.1	214.4 ± 5.4	0.39
	Acido caffeico	269.2 ± 0.60	0.22		
	Oleuropeina	47.9 ± 0.96	2.0	44.8 ± 1.4	3.2
	Idrossitirosolo	9170 ± 100	1.2	9251 ± 72	0.78
	Tirosolo	3380 ± 83	2.5	3203 ± 20	0.60
ADV 2020	Pirocatecolo	247.8 ± 6.2	2.5	189.3 ± 5.4	2.9
	Acido caffeico	277.1 ± 4.7	1.7		
	Oleuropeina	23.7 ± 0.11	0.46	24.9 ± 0.71	2.9
	Idrossitirosolo	16320 ± 220	1.3	16795 ± 51	0.30
	Tirosolo	2640 ± 120	4.5	2523 ± 24	0.94
ADV 2021 (FI)	Pirocatecolo	4.2 ± 0.18	4.3	4.5 ± 0.18	4.0
	Acido caffeico	2.591 ± 0.022	0.771		
	Oleuropeina	1.030 ± 0.014	0.973	0.972 ± 0.010	1.0
	Idrossitirosolo	303.6 ± 3.9	1.3	236.5 ± 2.2	0.94
	Tirosolo	47.9 ± 0.10	0.21	55.8 ± 0.21	0.36
ADV 2021 (PD)	Pirocatecolo	10.5 ± 0.69	6.6	12.1 ± 0.95	7.9
	Acido caffeico	0.811 ± 0.012	1.48		
	Oleuropeina	0.952 ± 0.030	3.15	1.063 ± 0.021	1.98
	Idrossitirosolo	100.1 ± 8.4	8.4	108.4 ± 8.6	7.9
	Tirosolo	28.2 ± 2.0	7.0	29.8 ± 2.6	8.6

Nel complesso, le concentrazioni misurate in questo lavoro sono compatibili con quelle descritte negli altri studi presenti in letteratura (Paragrafo 1.3.2), e i valori ottenuti per la deviazione standard relativa risultano soddisfacenti (sono <9 %).

3.1.4 VALIDAZIONE DEL METODO

3.1.4.1 LOD

I limiti di rilevabilità sono stati calcolati per ciascun polifenolo seguendo il metodo descritto in 2.2.1 (Hubaux-Vos) basato sulle fasce di previsione delle funzioni di calibrazione. I valori di LOD ottenuti (riportati in Tabella 3.3) sono compresi tra 0.40 e 2.83 mg/L per la misura in DAD e tra 0.49 e 1.48 mg/L per la misura in fluorescenza e consentono quindi una corretta analisi dei polifenoli presenti nelle acque di vegetazione. Nei campioni analizzati, i valori misurati di idrossitirosolo, pirocatecolo, tirosolo, acido caffeico e oleuropeina sono risultati superiori ai LOD in ognuno dei campioni analizzati; ne risulta che il metodo consente la corretta quantificazione degli analiti in esame che si trovano a concentrazioni sempre più alte rispetto ai valori di concentrazioni minime rivelabili.

Tabella 3.3: Valori dei LOD in DAD e FL per ciascun analita.

Analita	LOD (DAD) (mg/L)	LOD (FL) (mg/L)
Idrossitirosolo	1.48	2.54
Pirocatecolo	1.26	2.83
Tirosolo	0.65	1.52
Acido caffeico	0.49	
Oleuropeina	0.65	0.40

3.1.4.2 Analisi del recupero

L'effetto matrice (più in generale, il contributo di errori sistematici di misura) è stato valutato tramite un t-test di Student confrontando le pendenze delle rette di recupero ottenute a partire dal campione e da soluzioni standard in acqua con il valore di riferimento atteso (pendenza=1).

Le funzioni di recupero sono state calcolate a partire da campioni di ADV del 2019 a cui sono stati aggiunti volumi noti di una miscela standard contenente i cinque fenoli considerati (Paragrafo 2.2.4). Aggiunte simili sono state effettuate ad una soluzione

acquosa esente da matrice, ovvero soluzioni standard a cui è stata applicata l'intera procedura di estrazione, purificazione e analisi.

In figura 3.5 sono riportate le rette di recupero ottenute per l'idrossitirosole, in Allegato I sono raccolti i risultati sperimentali di tutti gli altri esperimenti di recupero.

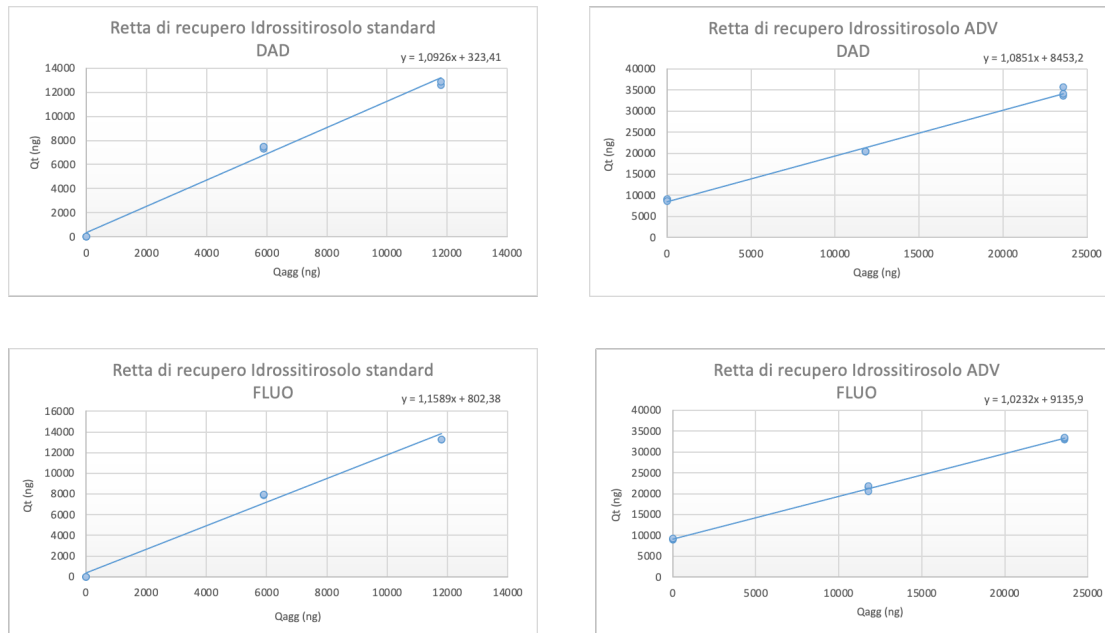


Figura 3.5: Rette di recupero dell'idrossitirosole misurato con rivelazione in DAD (sopra) e in fluorescenza (sotto); a sinistra le rette di recupero dell'idrossitirosole standard (soluzione acquosa) e a destra per campione di acque di vegetazione, entrambe trattate con la procedura di purificazione descritta nel paragrafo 2.1.5.

Con i valori della pendenza della retta di recupero e della relativa deviazione standard (Tab. 3.4), è stato effettuato un t-test di Student come descritto nel Paragrafo 2.2.3; le pendenze delle rette di recupero hanno rivelato valori compresi tra 0.9 e 1.2 e i valori di t sperimentale (t_{sp}) risultano nella maggior parte dei casi minori rispetto al valore critico $t_{0,05/2,6}=2.45$. Ciò porta a concludere che, mediamente, i recuperi possono essere considerati quantitativi, stimando un trascurabile effetto degli errori sistematici di misura. In alcuni casi i valori sperimentali di pendenza differiscono rispetto al valore unitario. Tali discrepanze significative sono per lo più ascrivibili a valori di incertezza relativamente piccoli (elevata precisione) e vengono considerate accettabili: il metodo di purificazione ed estrazione si dimostra così efficace nel quantificare i fenoli contenuti nelle acque di vegetazione.

Tabella 3.4: Valori ottenuti per le pendenze delle rette di recupero (\pm devstd) e di t-test sperimentale, sia per quanto riguarda le misure in DAD che per quelle in fluorescenza.

Analita		Pendenza retta di recupero (DAD)	t_{sp} (DAD)	Pendenza retta di recupero (FLUO)	t_{sp} (FLUO)
Idrossitirosolo	STD	1.093 \pm 0.045	1.80	1.141 \pm 0.054	2.80
	ADV	1.085 \pm 0.032	3.00	1.025 \pm 0.014	2.00
Pirocatecolo	STD	1.176 \pm 0.010	18.0	1.165 \pm 0.010	17.0
	ADV	1.153 \pm 0.066	2.14	1.200 \pm 0.067	3.3
Tirosolo	STD	1.081 \pm 0.012	8.00	1.113 \pm 0.010	10.0
	ADV	0.970 \pm 0.022	1.50	0.948 \pm 0.022	2.5
Acido caffeico	STD	1.142 \pm 0.050	2.6		
	ADV	0.993 \pm 0.048	0.20		
Oleuropeina	STD	1.096 \pm 0.035	2.3	1.132 \pm 0.047	2.8
	ADV	1.060 \pm 0.086	0.70	1.077 \pm 0.012	2.0

3.1.4.3 Precisione

La valutazione della precisione è stata effettuata misurando i valori di incertezza relativi al solo metodo cromatografico (quindi l'incertezza della misura strumentale) e all'intera metodica di analisi.

La precisione della misura è definita come il grado di concordanza tra valori misurati ottenuti da un certo numero di misurazioni ripetute dello stesso campione, eseguite in condizioni specificate, e viene espressa attraverso il valore della deviazione standard dei risultati di misura.

Per quanto riguarda la sola misura strumentale (HPLC-DAD-FL), misure ripetute (n=3) di tutti i campioni disponibili portano ad affermare che, in un intervallo di concentrazione fino a 25 mg/L, l'imprecisione relativa è mediamente del 2 % e si attesta invece a ~1.5 % per concentrazioni superiori. Tale livello di precisione è da considerarsi più che soddisfacente.

Per verificare la precisione dell'intero metodo analitico (in termini di ripetibilità) è stata effettuata l'analisi di tre aliquote di uno stesso campione di acque di vegetazione, ciascuna purificata con il metodo precedentemente descritto. Si

ottengono così i valori di concentrazione media per ogni analita ($n=3$) e di deviazione standard. I valori ottenuti risultano compresi tra ± 0.07 e 2.73 mg/L con deviazione standard relativa percentuale (RSD%) inferiore al 6 % per ciascuno dei fenoli sia per le misure in DAD che in fluorescenza. Tale livello di imprecisione (media) è da considerarsi molto soddisfacente per una procedura di analisi che richiede il pretrattamento del campione e la successiva determinazione strumentale.

3.1.4.4 Confronto dei risultati ottenuti con la rivelazione in DAD e fluorescenza

Le analisi dei polifenoli sono state eseguite utilizzando una strumentazione HPLC con la contemporanea rivelazione in DAD e in fluorescenza. I risultanti valori di concentrazione sono qui confrontati al fine di valutare eventuali differenze sistematiche significative tra le due modalità di rivelazione.

E' stato così inizialmente applicato un test F per confrontare le deviazioni standard delle medie sperimentali differenti (C_{DAD} vs C_{FL}) e determinare se le varianze fossero o meno da considerarsi statisticamente equivalenti; successivamente, sulla base dell'esito del test F, è stato impiegato un t-test che ha permesso di confrontare tra loro due set di dati indipendenti aventi ciascuno la propria media ed incertezza.

Per tutti gli analiti, il test F risulta positivo, con un valore di F calcolato sempre minore di quello critico ($\alpha=0.05$, $F_{0.05/2,2,2}=39.0$), il che dimostra che non vi è differenza significativa tra le varianze delle concentrazioni misurate in DAD e in fluorescenza. Il t-test invece dà esito positivo nella maggior parte dei casi ($\alpha=0.05$, $t_{0.05/2,4}=2.78$; $t_{sp} < t_c$), ma risulta negativo in quattro casi; in particolare, i valori calcolati per il pirocatecolo nel campione di ADV 2020 e per il tirosolo nelle ADV 2021 (FI) con le due rivelazioni risultano significativamente diversi, mentre negli altri due casi le differenze sono molto più contenute (in Tabella 3.5 sono raccolti tutti i dati ottenuti applicando i due metodi). Al momento non si è in grado di spiegare tali differenze, anche alla luce dei soddisfacenti risultati ottenuti dalle misure in spettrometria di massa.

Tabella 3.5: Confronto tra i risultati analitici ottenuti per ciascun analita applicando i due metodi di rivelazione, DAD e fluorescenza, per l'analisi dei campioni di acque di vegetazione. I dati sono stati confrontati con il valore di F tabulato ($\alpha=0.05$, $F_{0,05/2,2,2} = 39.0$) e t ($\alpha=0.05$, $t_{0,05/2,4}=2.78$)

	Metodo	ADV 2019		ADV 2020		ADV 2021 (FI)		ADV2021(PD)	
		DAD	FLUO	DAD	FLUO	DAD	FLUO	DAD	FLUO
Idrossitirosole	Conc.	9170 ± 100	9251 ± 72	16320 ± 220	16795 ± 51	303.6 ± 3.9	236.5 ± 2.2	100.1 ± 8.4	108.4 ± 8.6
	Test-F	2.1		18.2		3.1		1.0	
	t-test	0.87		3.0		0.40		0.98	
Pirocatecolo	Conc.	201.8 ± 6.3	214.4 ± 5.4	247.8 ± 6.2	189.3 ± 5.4	4.2 ± 0.18	4.5 ± 0.18	10.5 ± 0.69	12.1 ± 0.95
	Test-F	1.4		1.3		1.0		1.9	
	t-test	0.28		9.8		1.6		1.9	
Tirosolo	Conc.	3380 ± 83	3203 ± 20	2640 ± 120	2523 ± 24	47.9 ± 0.10	55.8 ± 0.21	28.2 ± 2.0	29.8 ± 2.6
	Test-F	19.1		25.2		4.4		1.7	
	t-test	1.9		1.4		39.8		0.71	
Oleuropeina	Conc.	47.9 ± 0.96	44.8 ± 1.4	23.7 ± 0.11	24.9 ± 0.71	1.030 ± 0.014	0.972 ± 0.010	0.952 ± 0.030	1.063 ± 0.021
	Test-F	2.4		1.9		1.0		2.3	
	t-test	2.5		2.5		6.0		2.0	

Per confrontare tra loro i metodi e valutare la presenza di errori sistematici, per ciascun analita è stata costruita una retta avente nelle ascisse tutti i valori calcolati per il singolo polifenolo nei vari campioni di ADV in DAD e nelle ordinate i corrispondenti valori calcolati in fluorescenza (Figura 3.6). Per metodi considerabili equivalenti si dovrebbe quindi ottenere una retta di pendenza unitaria ed intercetta nulla. In questo caso applicando un t-test si ottengono valori per pendenza e intercetta statisticamente equivalenti rispettivamente ad 1 e 0, come mostrato in Tabella 3.6. I risultati del confronto permettono dunque di considerare i due metodi di rivelazione statisticamente equivalenti e, probabilmente, caratterizzati da un errore sistematico trascurabile.

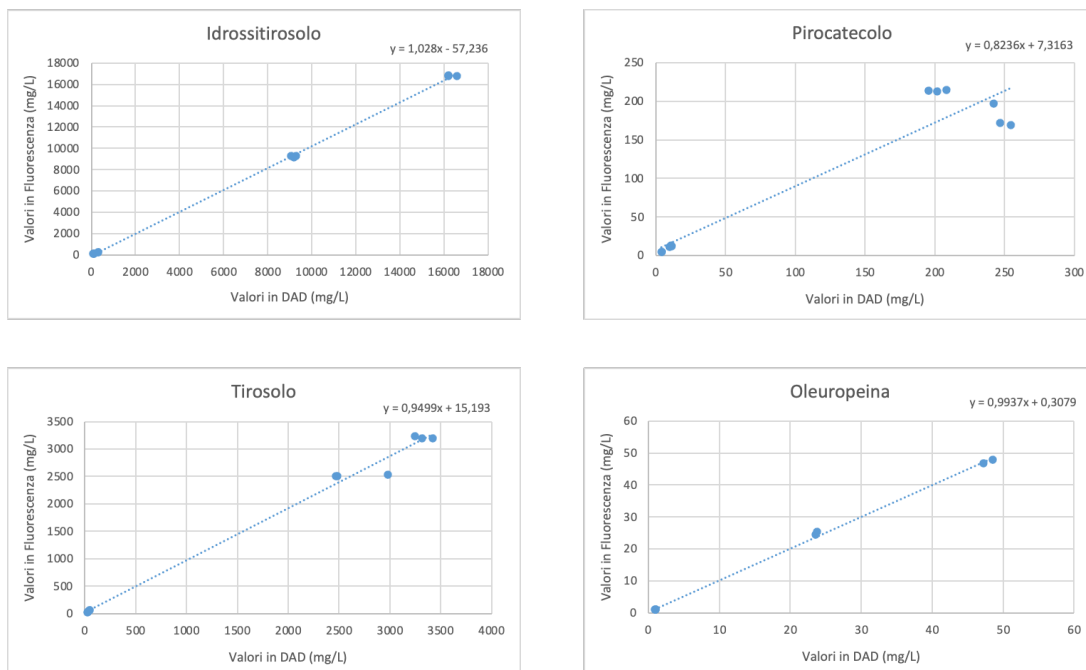


Fig. 3.6: Regressione lineare tra i valori dei polifenoli misurati in DAD (asse x) e in fluorescenza (asse y).

Tabella 3.6: Valori dell'intercetta e della pendenza ottenuti dal confronto dei risultati delle due modalità di rivelazione e risultato del t-test per il confronto con i valori attesi (intercetta=0, pendenza=1), considerando 9 gradi di libertà ed un livello di confidenza del 95 % (test a due code).

		Valore	Deviazione standard	$t_{0.05/2,9}$	t_{sp}
Idrossitirolo	Intercetta	-57.2	70.5	2.26	0.81
	Pendenza	1.028	0.010	2.26	2.80
Pirocatecolo	Intercetta	7.3	14.5	2.26	0.50
	Pendenza	0.824	0.087	2.26	2.26
Tirosole	Intercetta	15.2	60.5	2.26	0.25
	Pendenza	0.950	0.027	2.26	1.67
Oleuropeina	Intercetta	0.31	0.38	2.45	0.79
	Pendenza	0.994	0.014	2.45	1.00

3.1.4.5 Caratterizzazione dei polifenoli mediante spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che consente l'identificazione e la caratterizzazione di sostanze chimiche presenti in un campione basandosi sulla ionizzazione di una molecola e sulla successiva frammentazione e identificazione di ioni di diverso rapporto massa/carica (m/z).

La ionizzazione elettrospray (ElectroSpray Ionization ESI) prevede l'applicazione di una tensione ionizzante all'ago nebulizzatore. Si ha una nebulizzazione molto fine, da cui il solvente può essere rimosso con conseguente ionizzazione delle molecole di analita successivamente analizzate nell'analizzatore di massa. Il risultato è uno spettro che evidenzia il picco dello ione molecolare, che rappresenta il peso molecolare del composto analizzato, tipicamente nella forma $(M+H)^+$ o $(M-H)^-$.

Nel presente elaborato, la spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray (ESI-MS) è stata impiegata come strumento di conferma per l'analisi qualitativa dei polifenoli di interesse presenti nelle acque di vegetazione. Per la caratterizzazione degli analiti in esame sono stati investigati due differenti campioni di acque di vegetazione impiegando il metodo analitico precedentemente ottimizzato.

In seguito vengono riportati i cromatogrammi e gli spettri relativi alle misure in HPLC-ESI(-)-MS e MS/MS dei polifenoli in soluzione standard e nelle ADV (campioni 2019 e 2020) con le relative frammentazioni più significative.

Tabella 3.7: Informazioni cromatografiche, strutturali e spettrometriche di massa dei polifenoli caratterizzati nelle acque di vegetazione nel presente studio.

Composto	TR (min)	Formula molecolare	Misura m/z $[M-H]^-$	Frammenti MS/MS
Idrossitirosolo	4.41	$C_8H_{10}O_3$	153.0557	123, 122, 95
Pirocatecolo	5.06	$C_6H_6O_2$	109.0295	108, 91
Tirosolo	7.49	$C_8H_{10}O_2$	137.0608	136, 119, 108, 92
Acido caffeico	13.50	$C_9H_8O_4$	179.0350	135, 134, 107
Oleuropeina	17.40	$C_{25}H_{32}O_{13}$	539.1770	403, 377, 345, 307, 275, 223, 179, 119, 101, 89

I. IDROSSITIROSOLO

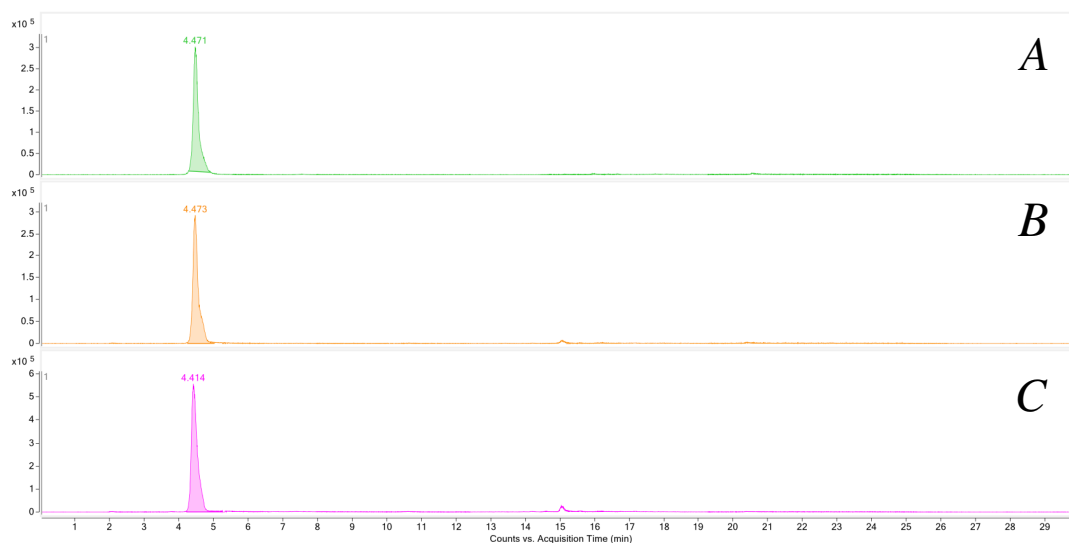


Fig. 3.7: Cromatogrammi HPLC-ESI(-)-FTMS di una soluzione standard (A), di un campione di ADV 2019 (B) e ADV 2020 (C), acquisiti all'esatto valore del rapporto m/z (modalità EIC) dello ione $[M-H]$ dell'idrossitirosolo (EIC, $m/z=153.0557$).

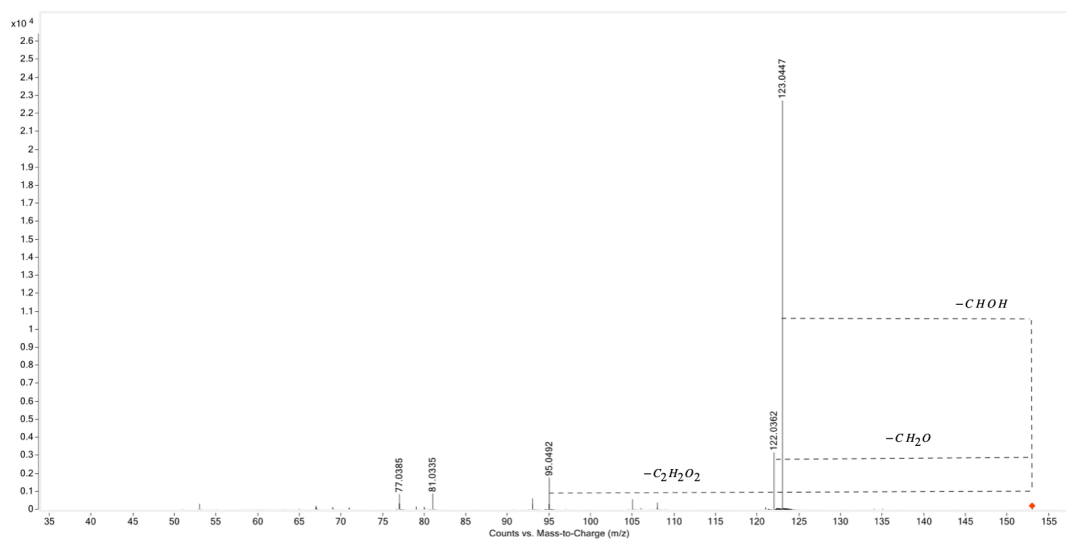


Fig. 3.8: Spettro MS/MS mediato in corrispondenza del picco HPLC-ESI(-)-FTMS dell'idrossitirosolo relativo allo ione padre $(M-H)^-$ di una soluzione standard; sono riportate le principali frammentazioni.

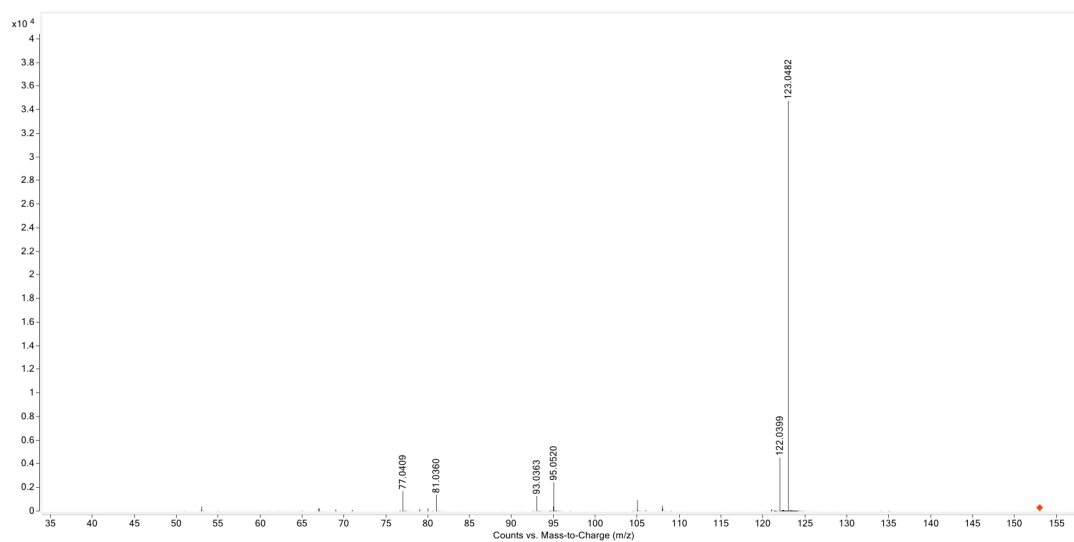
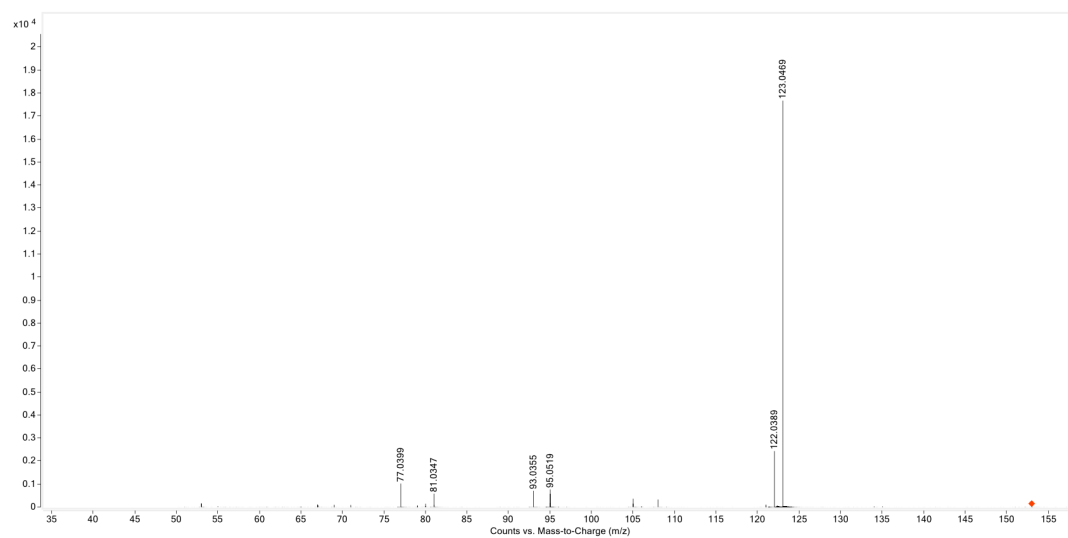


Fig. 3.9: Spettri MS/MS mediati in corrispondenza del picco HPLC-ESI(-)-FTMS dell'idrossitirosolo relativi allo ione padre $(M-H)^-$ dei due campioni di ADV (2019 e 2020) purificati.

II. PIROCATECOLO

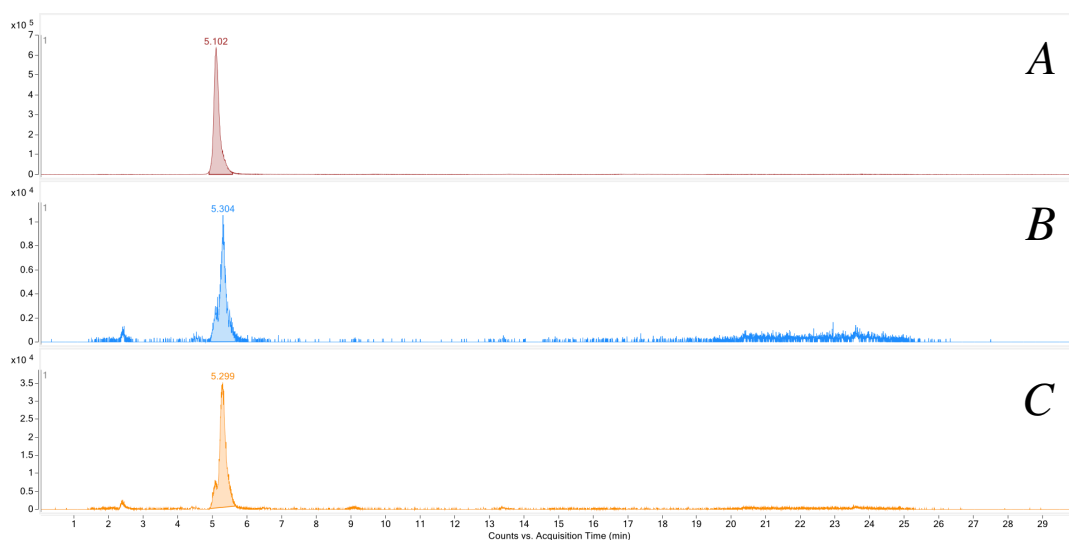


Fig. 3.10: Cromatogrammi HPLC-ESI(-)-FTMS di una soluzione standard (A), di un campione di ADV 2019 (B) e ADV 2020 (C), acquisiti all'esatto valore del rapporto m/z (modalità EIC) dello ione $[M-H]$ del pirocatecolo ($m/z=109.0295$).

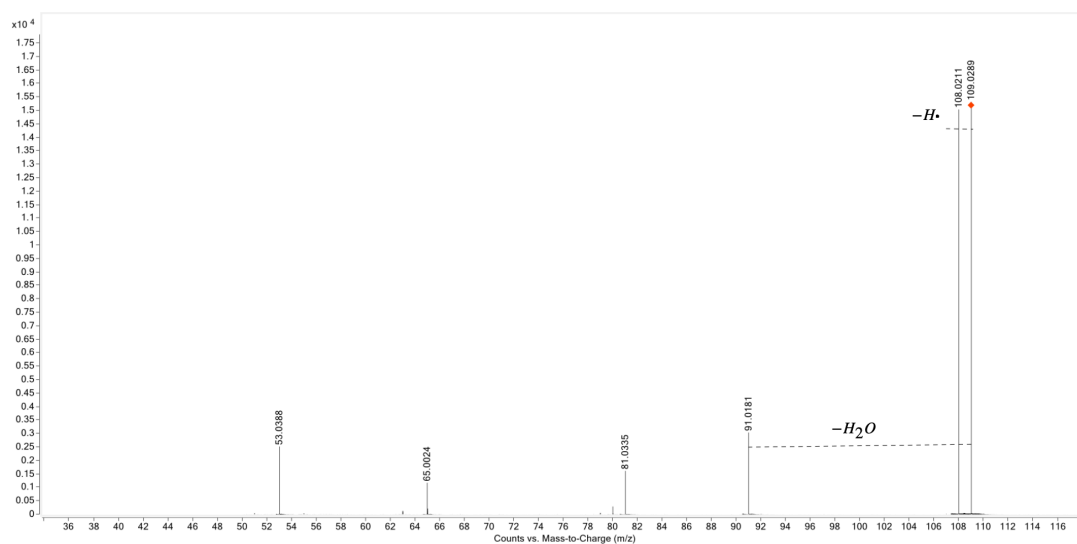


Fig. 3.11: Spettro MS/MS mediato in corrispondenza del picco HPLC-ESI(-)-FTMS del pirocatecolo relativo allo ione padre $(M-H)^-$ di una soluzione standard; sono riportate le principali frammentazioni.

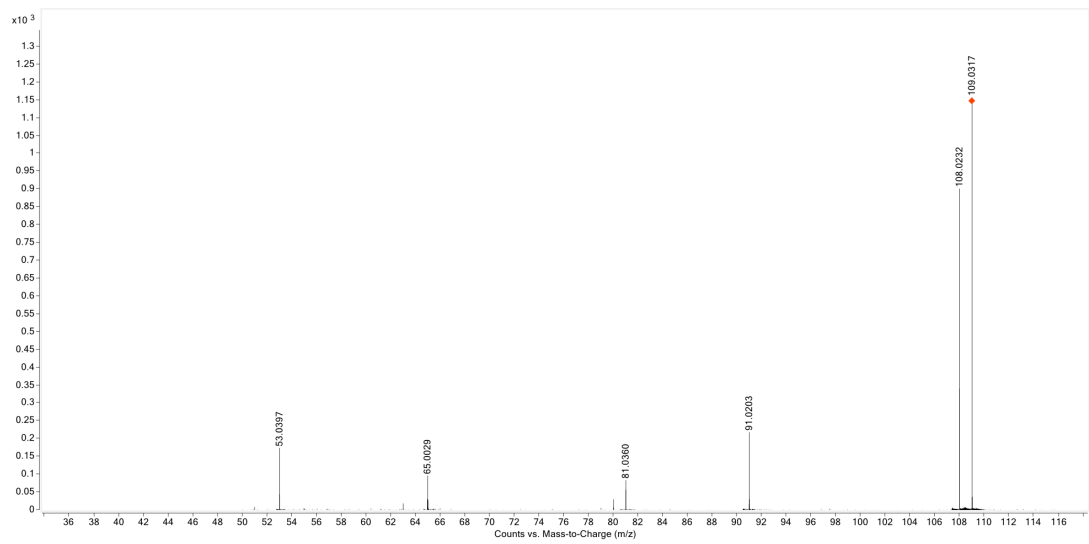
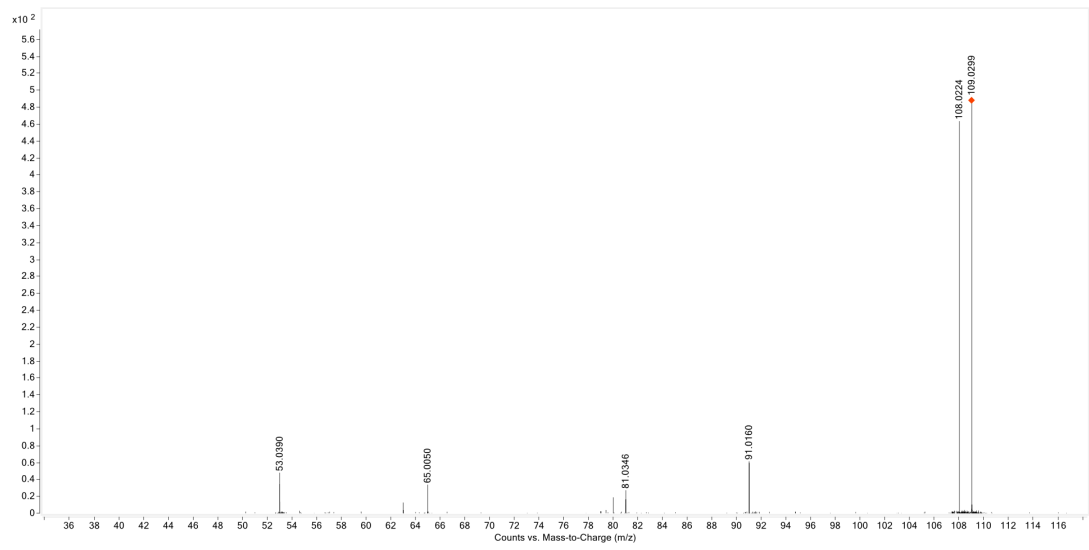


Fig. 3.12: Spettri MS/MS mediati in corrispondenza del picco HPLC-ESI(-)-FTMS del pirocatecolo relativi allo ione padre $(M-H)^-$ di due campioni di ADV (2019 e 2020) purificati.

III. TIROSOLO

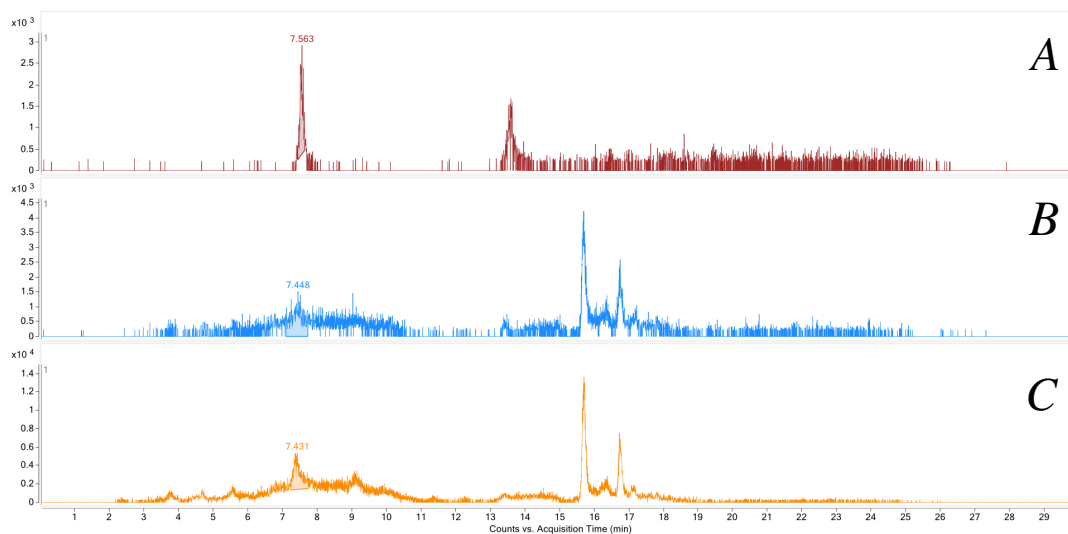


Fig. 3.13: Cromatogrammi HPLC-ESI(-)-FTMS di una soluzione standard (A), di un campione di ADV 2019 (B) e ADV 2020 (C), acquisiti all'esatto valore del rapporto m/z (modalità EIC) dello ione $[M-H]$ del tirosolo (EIC, $m/z=137.0608$).

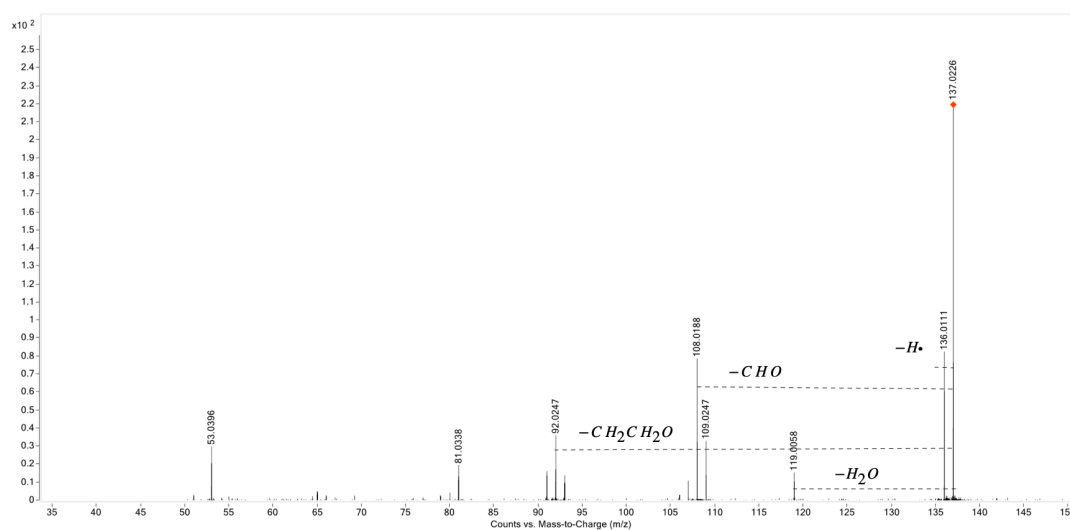


Fig. 3.14: Spettro MS/MS mediato in corrispondenza del picco HPLC-ESI(-)-FTMS del tirosolo relativo allo ione padre $(M-H)^-$ di una soluzione standard; sono riportate le principali frammentazioni.

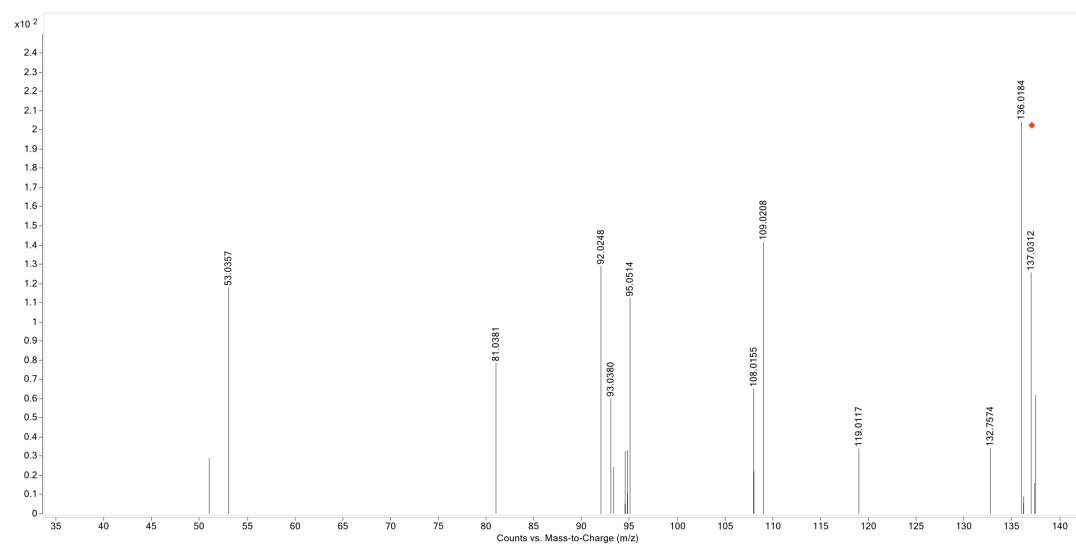
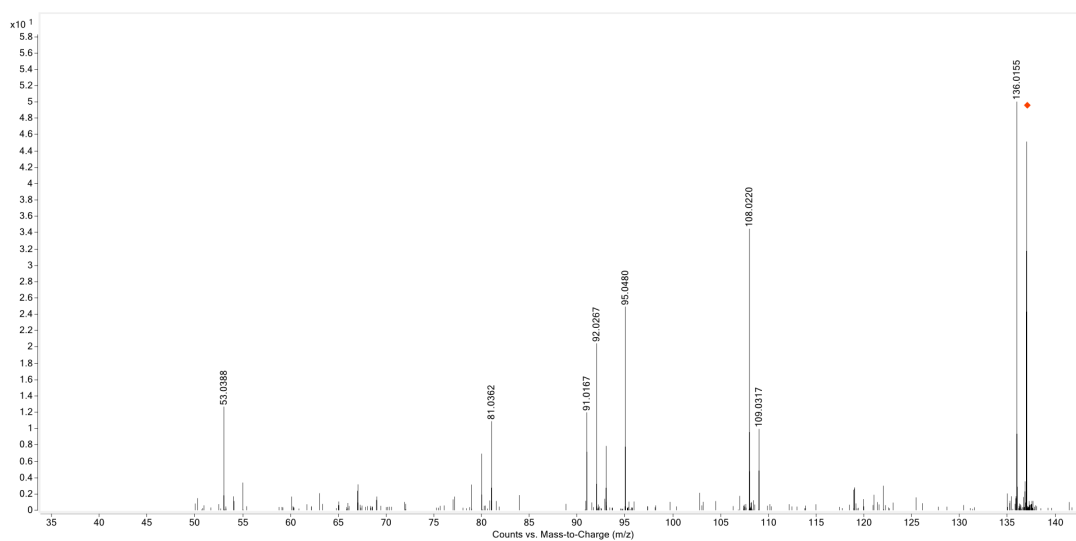


Fig. 3.15: Spettri MS/MS mediati in corrispondenza del picco HPLC-ESI(-)-FTMS del tirosolo relativi allo ione padre $(M-H)^-$ di due campioni di ADV (2019 e 2020) purificati.

IV. ACIDO CAFFEICO

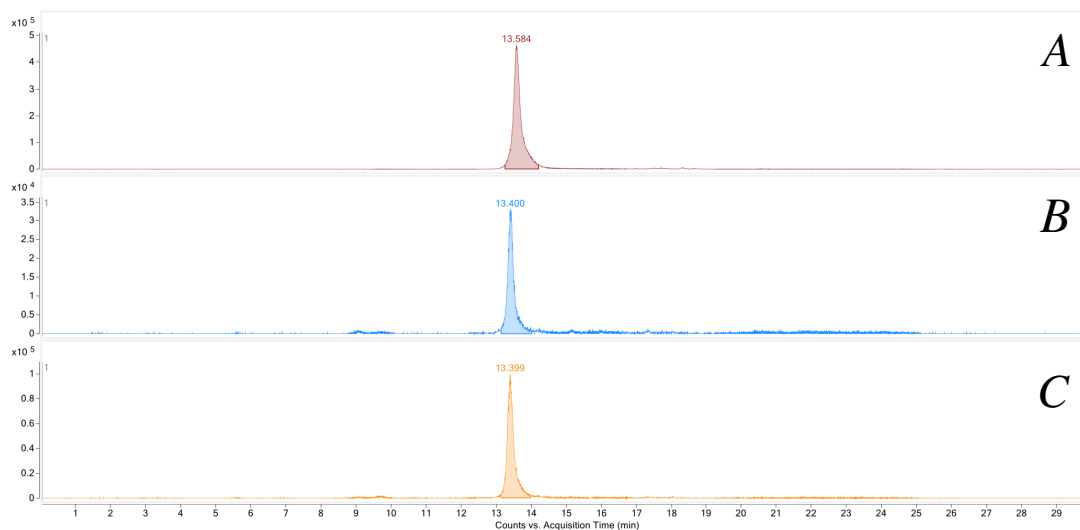


Fig. 3.16: Cromatogrammi HPLC-ESI(-)-FTMS di una soluzione standard (A), di un campione di ADV 2019 (B) e ADV 2020 (C), acquisiti all'esatto valore del rapporto m/z (modalità EIC) dello ione $[M-H]$ dell'acido caffeico (EIC, $m/z=179.0350$).

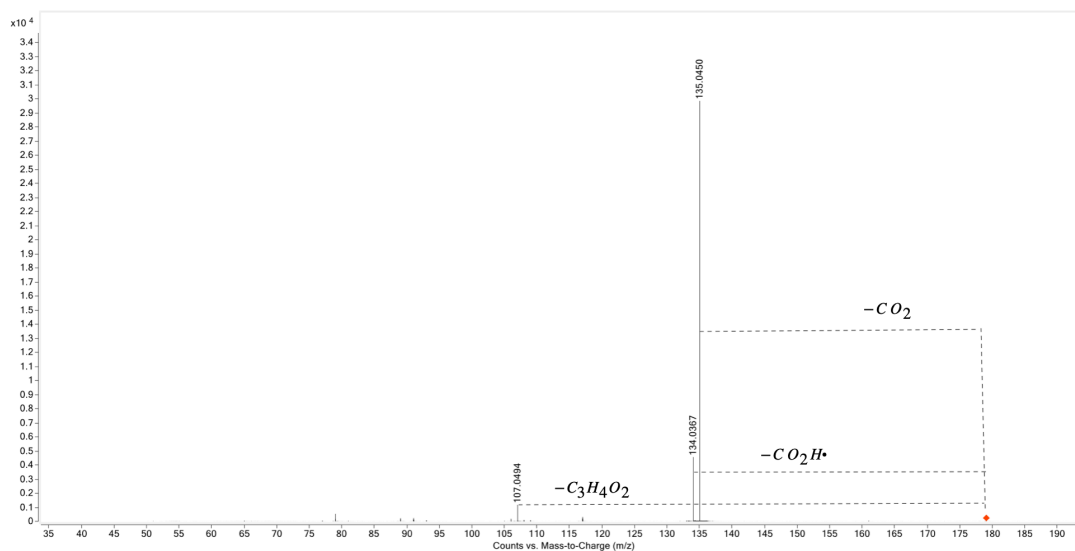


Fig. 3.17: Spettro MS/MS mediato in corrispondenza del picco HPLC-ESI(-)-FTMS dell'acido caffeico relativo allo ione padre $(M-H)^-$ di una soluzione standard; sono riportate le principali frammentazioni.

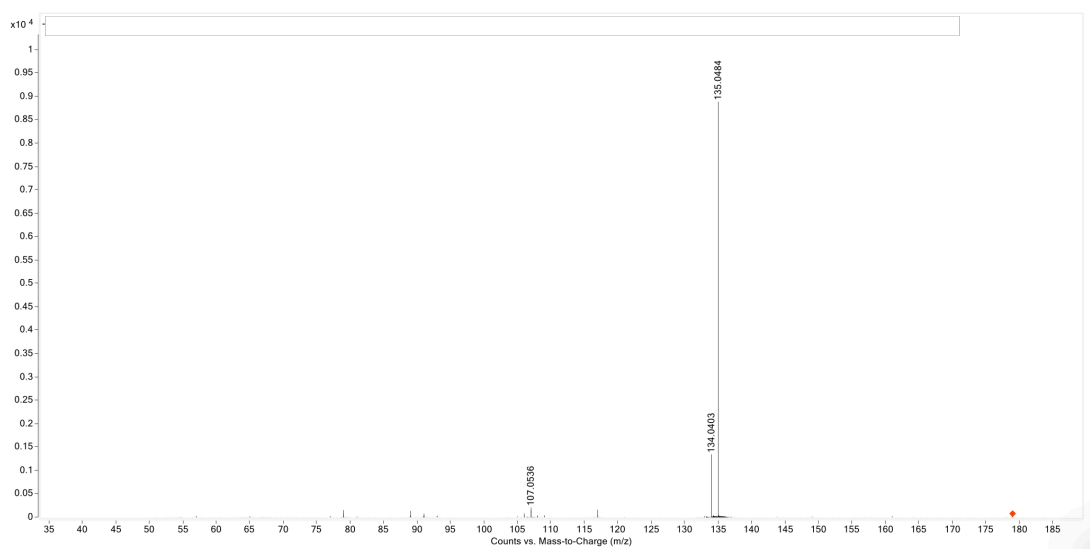
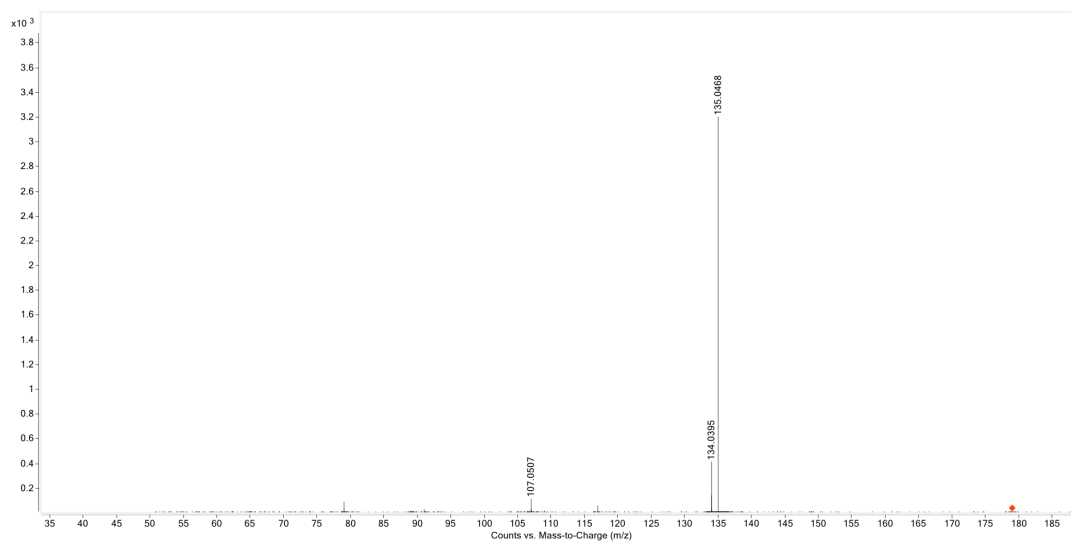


Fig. 3.18: Spettri MS/MS mediati in corrispondenza del picco HPLC-ESI(-)-FTMS dell'acido caffeico relativi allo ione padre $(M-H)^-$ di due campioni di ADV (2019 e 2020) purificati.

V. OLEUROPEINA

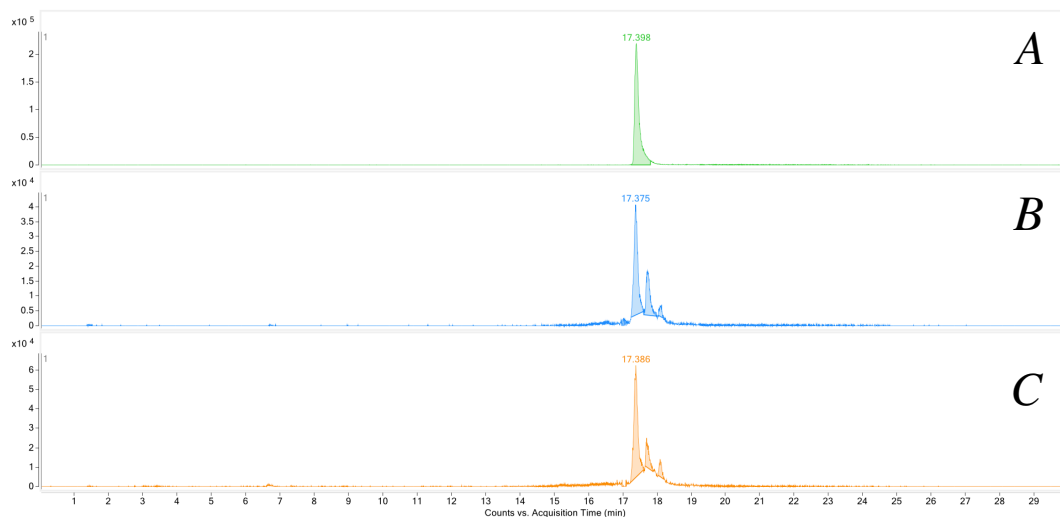


Fig. 3.19: Cromatogrammi HPLC-ESI(-)-FTMS di una soluzione standard (A), di un campione di ADV 2019 (B) e ADV 2020 (C), acquisiti all'esatto valore del rapporto m/z (modalità EIC) dello ione $[M-H]$ dell'oleuropeina (EIC, $m/z=539.1770$).

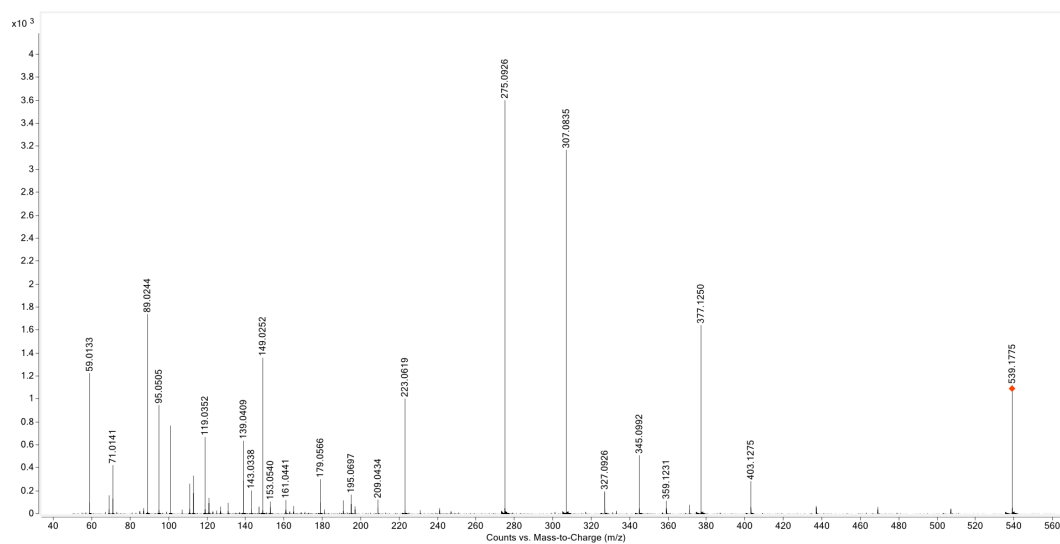


Fig. 3.20: Spettro MS/MS mediato in corrispondenza del picco HPLC-ESI(-)-FTMS dell'oleuropeina relativo allo ione padre $(M-H)^-$ di una soluzione standard. In Figura 3.20 sono riportate le principali frammentazioni.

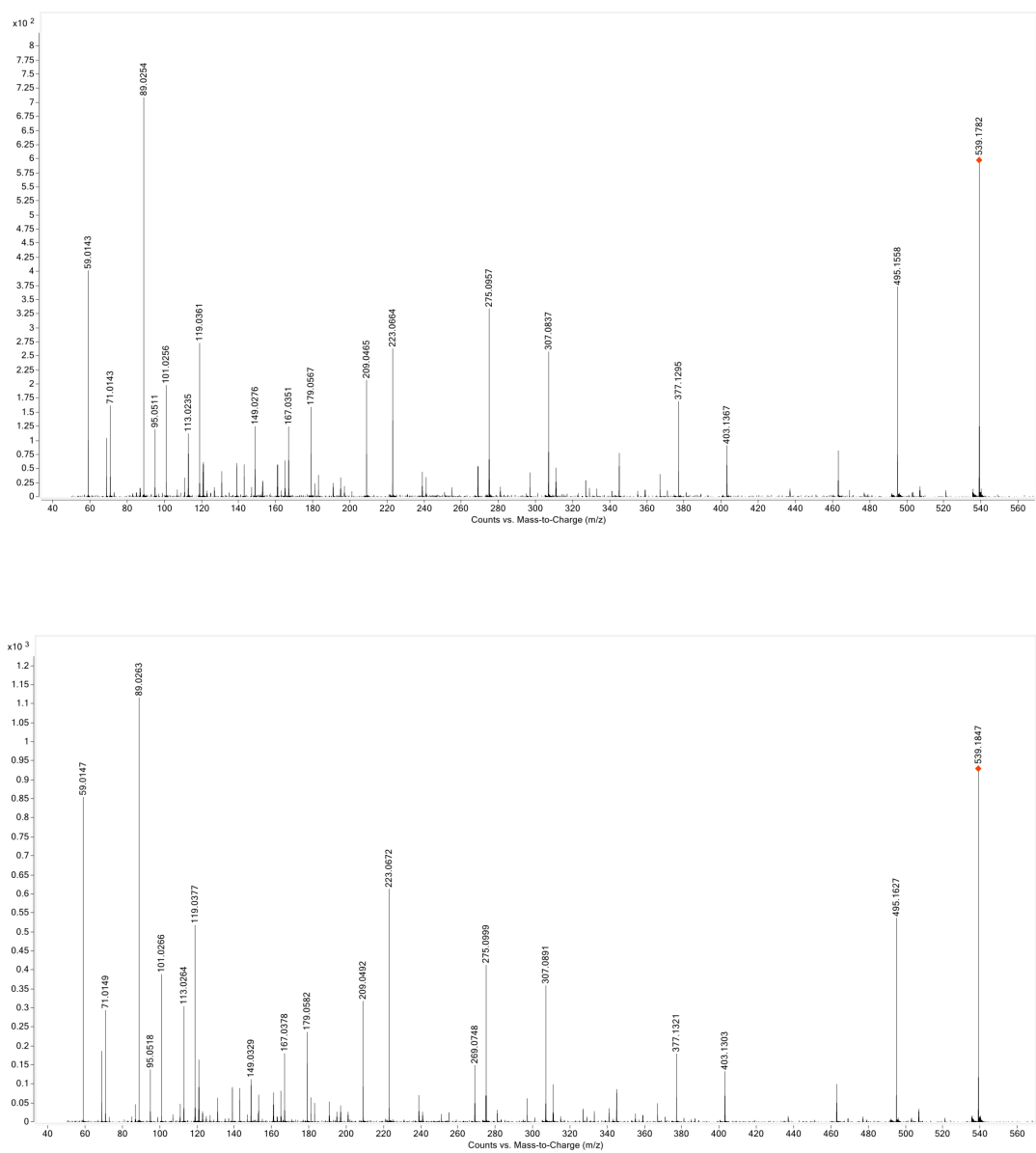


Fig. 3.21: Spettri MS/MS mediati in corrispondenza del picco HPLC-ESI(-)-FTMS dell'oleuropeina relativi allo ione padre $(M-H)^-$ di due campioni di ADV (2019 e 2020) purificati.

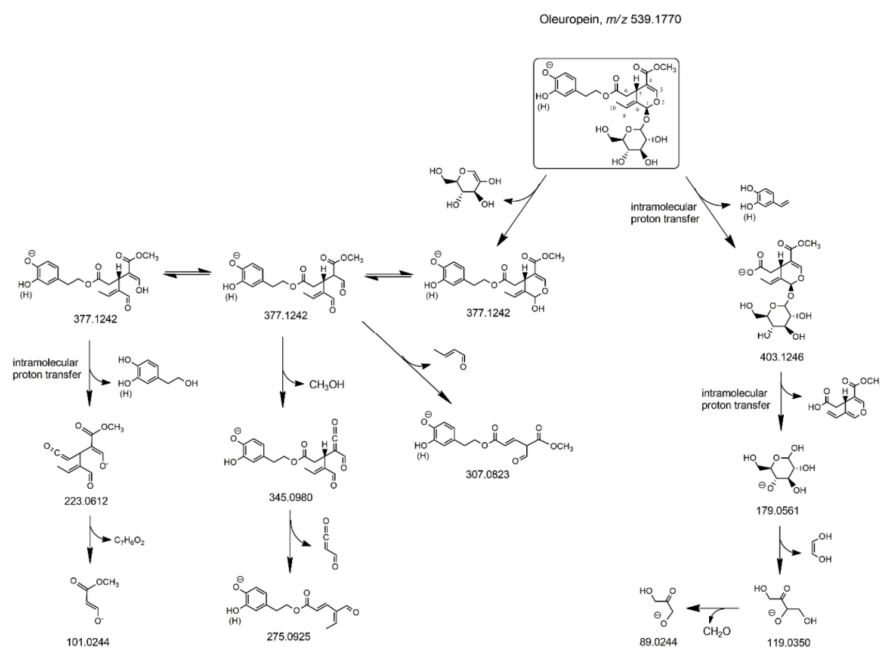


Fig. 3.22: Principali frammentazioni relative alla molecola di oleuropeina.⁵³

Per ciascun polifenolo i tempi di ritenzione, i valori di m/z e le frammentazioni corrispondono tra l'analita in soluzione standard ed i campioni di acque di vegetazione. L'unica eccezione risulta per la molecola di oleuropeina: nei cromatogrammi di ADV sono stati infatti rilevati due picchi di due specie minori aventi lo stesso peso molecolare dell'oleuropeina. Probabilmente questi segnali sono riconducibili a forme isomeriche di oleuropeina (come segnalato e supposto anche in letteratura^{53,54}), che invece non sono stati rilevati nelle tracce EIC della soluzione standard, presumibilmente a causa dell'abbondanza generalmente inferiore o dell'assenza di tali isoforme in quest'ultima.

Inoltre, gli spettri MS/MS mediati sotto ciascun picco rilevato nei cromatogrammi EIC centrati sul rapporto m/z 539.1770, corrispondente allo ione $[M-H]$ dell'oleuropeina, hanno prodotto vie di frammentazioni somiglianti ma che differiscono nel frammento a m/z 495 presente negli spettri ottenuti da campioni di ADV ma non in quello della soluzione standard.

Tale fenomeno è stato spiegato considerando che il trasferimento del 'Parent Ion' alla cella di collisione attraverso un quadruplo avviene in bassa risoluzione con una finestra di 1.3 Da dalla quale possono passare altre specie presenti nei campioni reali che, frammentate, possono dare luogo a questo picco. Tale aspetto sarà comunque, in futuro, oggetto di ulteriori valutazioni e chiarimenti. In conclusione si può affermare

che l'analisi in spettrometria di massa identifica tutti gli analiti di interesse presenti nelle ADV attraverso spettri MS/MS identici a quelli delle soluzioni standard.

3.2 SVILUPPO DEL METODO CROMATOGRAFICO PER L'ESTRAZIONE DEI SINGOLI POLIFENOLI DA ADV

Al fine di isolare i singoli composti dalle ADV in quantità apprezzabile, sia per la preparazione di soluzioni standard di uso analitico e sia per la futura sperimentazione *in vivo*, le acque di vegetazione sono state sottoposte ad analisi HPLC preparativa.

3.2.1 OTTIMIZZAZIONE DEL METODO CROMATOGRAFICO

Nel presente lavoro di tesi, lo sviluppo della procedura preparativa ha fatto riferimento al metodo cromatografico precedentemente realizzato per la determinazione dei polifenoli in HPLC-DAD-FL.

Per l'analisi è stata utilizzata una colonna a fase inversa C18 e acqua e metanolo (entrambi con lo 0.05 % di acido formico) come eluenti, per la loro già confermata efficacia di separazione dei composti di interesse.

Lo strumento utilizzava un rivelatore UV-Vis che è stato impostato ad una lunghezza d'onda di 280 nm.

La messa a punto del metodo cromatografico ha inizialmente coinvolto l'utilizzo di soluzioni standard degli analiti; si è così ottenuto un efficiente programma di eluizione poi applicato alle acque di vegetazione per l'isolamento e la raccolta dei polifenoli. Il programma di eluizione e le condizioni cromatografiche sono descritte nel paragrafo 2.4.3. L'ordine di eluizione, i tempi di ritenzione degli analiti e gli intervalli di raccolta delle frazioni di eluato sono riportati di seguito:

- Idrossitirosolo tr: 10.87 min, (10.700 -12.200)
- Pirocatecolo tr: 14.72 min, (14.500-15.500)
- Tirosolo tr: 16.35 min, (16.150-17.200)
- Acido Caffeico tr: 24.56 min (24.450-25.100)
- Oleuropeina tr: 27.56 min (27.350-27.950)

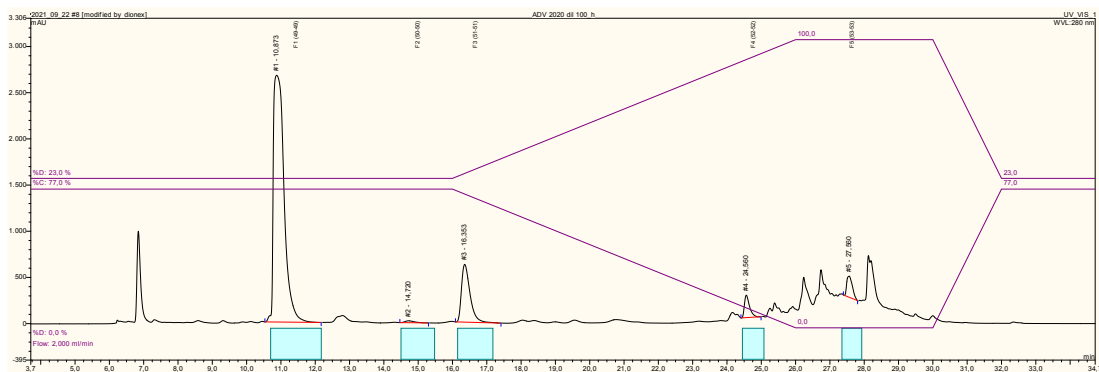


Figura 3.23: Cromatogramma completo in HPLC-Preparativa di un campione di ADV (2020) diluito 1:100; in azzurro le frazioni raccolte.

Come si era verificato nel metodo HPLC-DAD-RF, anche questa volta la corretta separazione e raccolta dell'oleuropeina ha incontrato alcune criticità; il suo segnale infatti si trova coperto da un picco più alto appartenente ad un'altra specie (come confermato da un'analisi HPLC-DAD svolta su una frazione raccolta del picco in esame). Prendendo come base riferimento il programma di eluizione sviluppato precedentemente per risolvere tale problematica nello strumento HPLC-DAD-FL, è stato realizzato un secondo programma di eluizione per la raccolta della sola oleuropeina.

Il nuovo programma di eluizione (descritto nel paragrafo 2.4.3) ha permesso una maggiore risoluzione dei picchi nella zona interessata per un'efficace separazione e raccolta dell'oleuropeina (tr 14.58 min con raccolta di frazione tra 14.55 e 14.77).

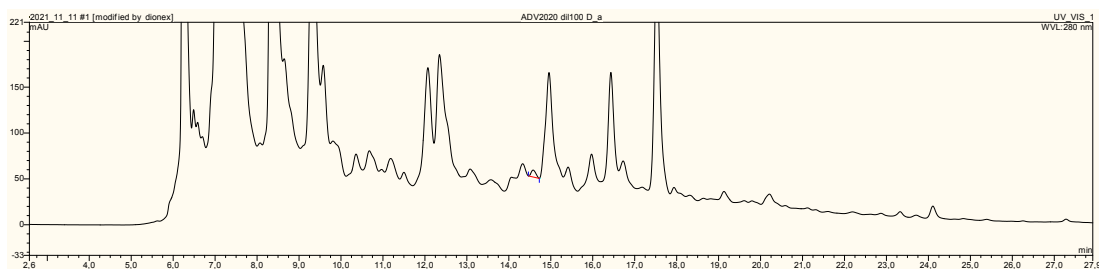


Figura 3.24: Cromatogramma in HPLC-Preparativa di un campione di acque di vegetazione (2020) diluite 100 volte, ottenuto con il metodo efficace per la raccolta della sola oleuropeina.

3.2.2 CALCOLO DELLE CONCENTRAZIONI DEGLI ANALITI RACCOLTI

La caratterizzazione chimica delle frazioni raccolte con la cromatografia preparativa, contenenti quindi i singoli composti isolati, è stata realizzata mediante analisi NMR per quanto riguarda gli aspetti qualitativi e mediante analisi HPLC-DAD-FL per la loro quantificazione.

Le frazioni di ciascun analita, originariamente sciolte in metanolo deuterato per le misure NMR (sezione 3.2.3), sono state portate a 10 mL con metanolo costituendo così le soluzioni standard madre per le future sperimentazioni. Un'aliquota di queste soluzioni è poi stata ulteriormente diluita in acqua (1:10) per l'analisi cromatografica quantitativa.

Vengono di seguito riportate le concentrazioni delle soluzioni standard madre (in metanolo) ricavate dalle frazioni raccolte mediante HPLC preparativa.

Tabella 3.8: Concentrazioni degli analiti presenti nelle soluzioni standard 'concentrate' ottenute dalle singole frazioni raccolte mediante HPLC-Preparativa.

Analita	C₀ DAD (mg/L)	RSD%	C₀ Fluo (mg/L)	RSD%
Pirocatecolo	1036 ± 2.0	0.15	1038 ± 4.0	0.40
Acido caffeico	4630 ± 21	0.44		
Oleuropeina	425.8 ± 2.9	0.70	402.3 ± 7.6	1.9
Idrossitirosolo	624.4 ± 3.8	0.61	720 ± 21	2.9
Tirosolo	128.9 ± 2.2	1.7	146.542 ± 0.073	50

3.2.3 CARATTERIZZAZIONE MEDIANTE NMR DEI COMPOSTI ISOLATI

La caratterizzazione strutturale di tutti i composti isolati con cromatografia preparativa è avvenuta attraverso tecniche spettroscopiche di Risonanza Magnetica Nucleare con esperimenti monodimensionali (^1H-NMR , $^{13}C-NMR$) e bidimensionali (COSY, HSQC, HMBC).

La spettroscopia NMR è una tecnica non degradativa che consente quindi di recuperare il campione intatto dopo l'indagine; ciò permette non solo di avere informazioni sulla struttura chimica ma anche di riutilizzare il campione per le indagini successive o per la creazione di soluzioni standard.

L'obiettivo dell'interpretazione degli spettri 1H e $^{13}C-NMR$ è sostanzialmente quello di ricavare informazioni sul numero e tipo di idrogeni e carboni presenti all'interno di una molecola per poterne determinare la struttura molecolare e la composizione chimica. Per avere altre informazioni in merito alla molecola da caratterizzare si è ricorsi all'utilizzo di esperimenti bidimensionali eteronucleari quali HMBC (Heteronuclear Multi Bond Correlation), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) ed omonucleare COSY (CORrelation SPectroscopY) (figure e dati spettroscopici in Allegato II). Il solvente scelto per la misura di tutti i polifenoli è CD_3OD .

3.2.3.1 COSY SPECTRUM (CORrelation SPectroscopY)

Una delle principali tecniche NMR bidimensionali è l'esperimento $^1H-^1H$ COSY, che consente di osservare accoppiamenti scalari tra i protoni. È un esperimento di correlazione omonucleare di *chemical shift* attraverso l'accoppiamento scalare spin-spin attraverso due ($^2J_{H-H}$) o tre legami ($^3J_{H-H}$). Nello spettro COSY appaiono due tipi principali di segnali:

1. picchi sulle diagonali che rappresentano lo spettro originale, come in un esperimento monodimensionale;

2. picchi di correlazione che mostrano la presenza di accoppiamento scalare tra i nuclei.

I segnali accoppiati possono essere individuati tracciando linee orizzontali e partendo dal picco di correlazione fino ad intersecare la diagonale. La sequenza ordinata delle correlazioni è utilizzata per definire i sistemi di spin; tuttavia nello spettro COSY gli accoppiamenti scalari di spin si interrompono qualora sia presente un eteroatomo.

3.2.3.2 ESPERIMENTI HSQC- HMBC

Gli esperimenti HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) (Palmer III, A.G.,1991) forniscono informazioni sulla correlazione dei nuclei ^{13}C con i protoni direttamente accoppiati ad essi; lo spettro HSQC rileva i carboni direttamente legati agli idrogeni e si tratta infatti di un accoppiamento tramite un solo legame $^1J_{\text{CH}}$.

Nel caso di specie è stata effettuato un esperimento HSQC edited con la quale è possibile differenziare tra i CH_2 che vengono letti in negativo e i CH e CH_3 in positivo.

L'esperimento HMBC (Heteronuclear Multi Bond Correlation) si basa su correlazioni eteronucleari $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ attraverso due legami (2J) o tre legami (3J) (longe range) offrendo uno spettro che consente di connettere tra di loro le subunità della struttura molecolare individuate attraverso l'analisi degli altri spettri bidimensionali. Quindi è possibile ottenere delle correlazioni tra carboni quaternari (non visibili negli esperimenti HSQC e HMQC) con i protoni ad essi vicini.

Lo svantaggio degli esperimenti HSQC e HMQC è che, a causa della scarsa abbondanza isotopica del ^{13}C (1.1 %), si riescono ad individuare solo i protoni direttamente legati ad un carbonio ^{13}C .

1. IDROSSITIROSOLO

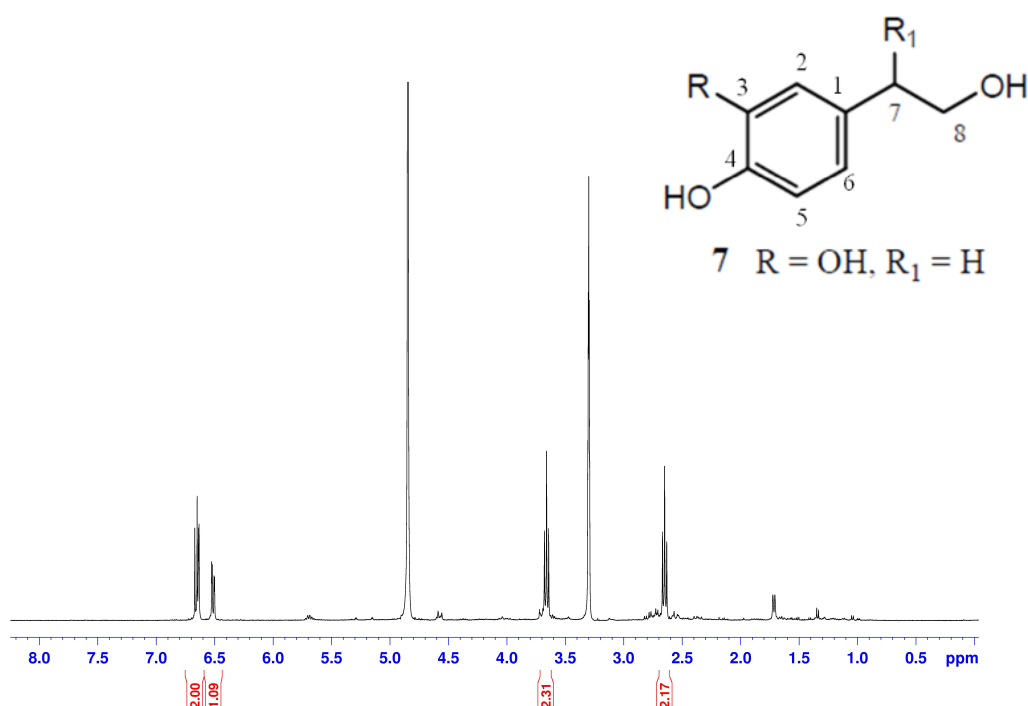


Figura 3.25: Spettro $^1\text{H-NMR}$ della frazione corrispondente all'idrossitirosolo in CD_3OD . In alto a destra, una figura della molecola.

Per la caratterizzazione dell'idrossitirosolo sono state svolte misure $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ e bidimensionali HSQC, HMBS.

Nella regione aromatica sono stati riscontrati tre protoni a $\delta=6.64$ ppm (d), $\delta=6.51$ ppm (d) e $\delta=6.66$ ppm (d) che corrispondono a H-2, H-6 e H-5 rispettivamente. Il protone H-2 ($\delta=6.64$ ppm) è accoppiato con H-6 ($\delta=6.51$ ppm), H-5 ($\delta=6.66$ ppm) si accoppia con H-6 ($\delta=6.51$ ppm) mentre il protone H-6 è accoppiato ad entrambi i protoni H-2 e H-5.

Nella regione alifatica dello spettro protonico sono presenti dei tripletti a $\delta=3.66$ ppm (t) per H-8 e a $\delta=2.65$ ppm (t) per H-7. L'analisi dei dati NMR conferma che il composto caratterizzato è l'idrossitirosolo.

La tecnica *HSQC* invece ha permesso di identificare i carboni direttamente legati agli idrogeni identificati e con HMBC sono state ottenute informazioni riguardo gli accoppiamenti tra protoni e C quaternario distanti 2-3 legami (C_1 , C_4 , C_3).

Tabella 3.9: Valori di chemical shift per l'analisi $^1\text{H} - \text{NMR}$ e $^{13}\text{C} - \text{NMR}$ della frazione corrispondente all'idrossitiroso in CD_3OD .

POSIZIONE	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1		131.5
2	6.64 (d)	116.5
3		145.8
4		144.4
5	6.66 (d)	115.8
6	6.51 (d)	120.9
7	2.65 (t)	39.3
8	3.66 (t)	64.3

2. TIROSOLO

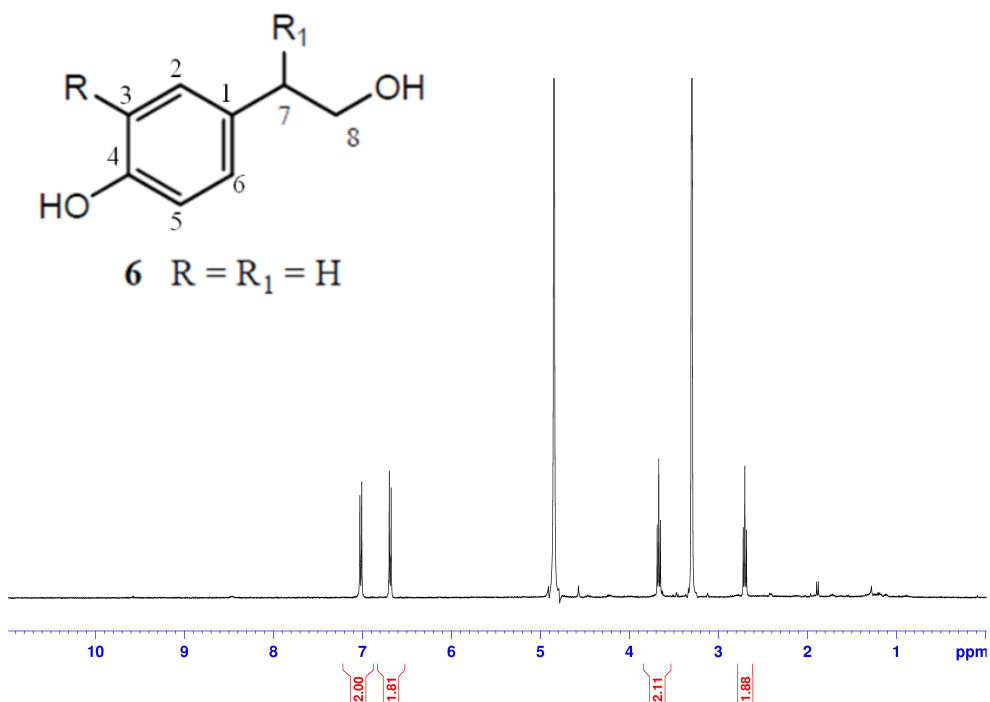


Figura 3.26: Spettro $^1\text{H} - \text{NMR}$ della frazione corrispondente al tiroso in CD_3OD . In alto a sinistra, una figura della molecola.

Per la caratterizzazione del tirosolo sono state svolte misure $^1\text{H} - \text{NMR}$, $^{13}\text{C} - \text{NMR}$ e bidimensionali HSQC, HMBS. Dallo spettro protonico $^1\text{H} - \text{NMR}$ è possibile individuare la presenza di due tripletti nella regione alifatica riconducibili ai protoni H-7 e H-8 che risuonano a $\delta=2.70$ ppm e $\delta=3.67$ ppm rispettivamente. Nella parte aromatica dello spettro si individuano dei *chemical shift* imputabili alla presenza di un sistema aromatico. I segnali protonici a $\delta=6.68$ ppm e a $\delta=7.02$ ppm risuonano come segnali di doppietti. Ciascun doppietto indica la presenza di due protoni; H-2 e H-6 che risuonano a $\delta=7.02$ ppm ($J=6.0$ Hz) e H-3 e H-5 a $\delta=6.68$ ppm ($J=6.0$ Hz). Le misure di HSQC e HMBC hanno permesso di individuare i valori di *chemical shift* relativi ai carboni.

Dall'analisi dei dati ottenuti e dal confronto con i dati presenti in letteratura, il composto isolato è il tirosolo.

Tabella 3.10: Valori di *chemical shift* per l'analisi $^1\text{H} - \text{NMR}$ e $^{13}\text{C} - \text{NMR}$ della frazione corrispondente al tirosolo in CD_3OD .

POSIZIONE	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1		130.9
2-6	7.02 (d)	130.4
3-5	6.68 (d)	115.8
4		156.6
7	2.70 (t)	39.2
8	3.67 (t)	64.2

3. OLEUROPEINA

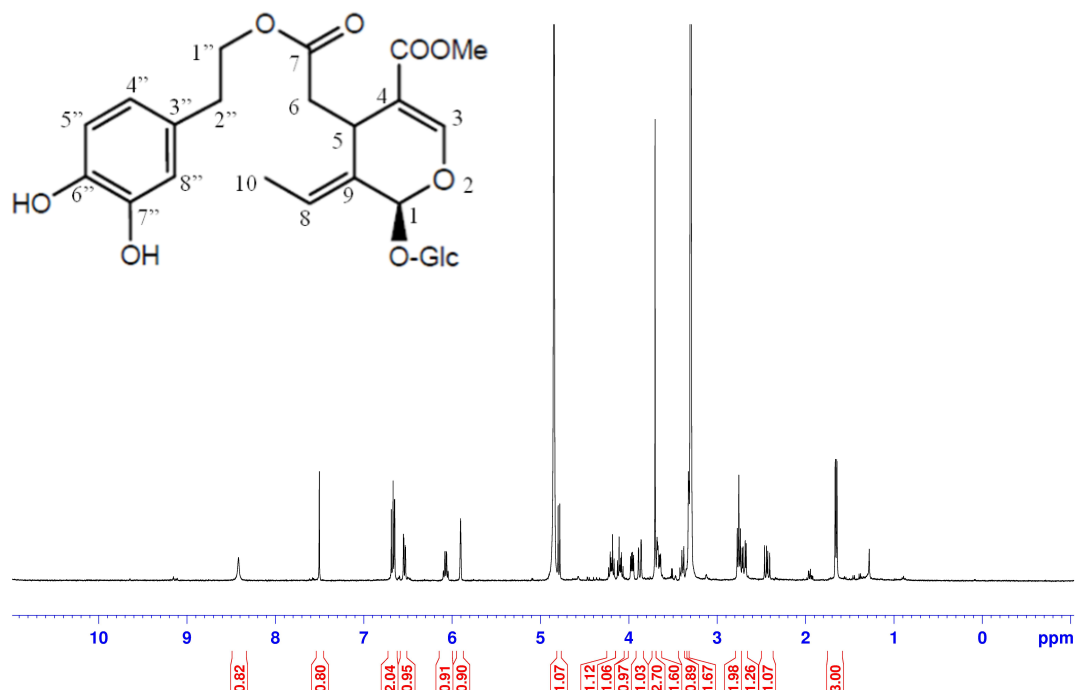


Figura 3.27: Spettro $^1\text{H-NMR}$ della frazione corrispondente all'oleuropeina in CD_3OD . In alto a sinistra, una figura della molecola.

Dall'esperimento COSY è stato possibile seguire le sequenze di spin che individua il monosaccaride, il residuo del secoiridoide e la parte aromatica. Per quanto riguarda il secoiridoide si osservano due sequenze di spin e due segnali isolati a $\delta=4.11$ ppm e l'altro, inerente a un sistema olefinico, a $\delta=6.10$ ppm. Dalla prima sequenza di spin il metile che risuona a $\delta=1.66$ ppm (d, $J=6.8$ Hz) risulta accoppiato con H-1 a $\delta=5.90$ ppm. La seconda sequenza di spin coinvolge il protone in posizione 5 a $\delta=3.96$ ppm (dd) che risulta scalarmente accoppiato con i protoni a $\delta=2.43$ ppm e $\delta=2.70$ ppm, i quali, dalla valutazione del loro *chemical shift*, sono posizionati in α ad una funzione carbonilica. Il protone che risuona a $\delta=7.50$ ppm è legato al C-3 del secoiridoide ed è indicativo di una insaturazione. Dall'esperimento COSY inoltre è ben evidente un monosaccaride che, dai *chemical shift* e dalle costanti di accoppiamento, risulta essere una unità di glucosio. Partendo dal protone anomero a $\delta=4.79$ ppm è possibile individuare H-2' a $\delta=3.12$ ppm, H-3' ($\delta=3.32$ ppm), H-4' ($\delta=3.19$ ppm), H-5' ($\delta=3.39$ ppm) e due protoni H-6' che risuonano a $\delta=3.67$ ppm e $\delta=3.87$ ppm.

Il sistema aromatico si evince dai segnali a $\delta=6.65$ ppm (d, $J=8.0$ Hz), $\delta=6.54$ ppm (dd, $J=8.0, 1.2$ Hz) e $\delta=6.81$ ppm (d, $J=1.2$ Hz), i quali indicano la presenza di un sistema aromatico trisostituito.

Lo spettro COSY mostra la presenza di due segnali accoppiati fra loro a $\delta=4.20$ ppm e 4.11 ppm, il sistema è assegnabile agli idrogeni adiacenti all'atomo di ossigeno della funzione esterea.

Dall'esperimento HSQC è stato possibile correlare i protoni con i corrispondenti atomi di carbonio, invece attraverso il successivo esperimento HMBC è stata determinata la struttura del composto ipotizzato dai dati ottenuti dal COSY.

In particolare il protone a $\delta=5.90$ ppm, assegnabile al H-1, mostra una correlazione 3J con il carbonio anomero del glucosio a $\delta=100.5$ ppm. Il protone olefinico a $\delta=7.50$ ppm mostra correlazioni 3J con il segnale a 168.2 ppm che è assegnabile alla funzione esterea collocata al C-4 del secoiridoide. Il protone a $\delta=3.96$ ppm assegnabile al H-5 mostra moltissime correlazioni 2J e 3J ; in particolare con la funzione esterea (-COOMe, 168.2 ppm), con il C-1 (94.8 ppm) e con il carbonio olefinico C-9 (130.0 ppm).

Il residuo di tirosolo va ad esterificare la funzione carbossilica in C-7, come si evince dalle correlazioni HMBC tra i protoni in H-1 con la funzione carbonilica a $\delta=172.8$ ppm. Il gruppo OCH₃ mostra correlazioni 3J con la funzione carbossilica a $\delta=168.2$ ppm. Anche in questo caso, tutti i riscontri delle misure NMR confermano la struttura molecolare dell'oleuropeina.

Tabella 3.11: Valori di chemical shift per l'analisi ^1H – NMR e ^{13}C – NMR della frazione corrispondente all'oleuropeina in CD_3OD .

POSIZIONE	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	5.90 (s)	94.8
2		
3	7.50 (s)	154.6
4		108.5
5	3.96 (dd)	31.6
6	2.70 (dd), 2.43 (dd)	40.9
7		172.8
8	6.10 (q)	124.6
9		130.0
10	1.66 (dd)	13.4
1''	4.11, 4.20 (m)	66.4
2''	6.81 (d)	35.2
3''		130.5
4''	6.65 (d)	116.6
5''	6.68 (d)	116.2
6''		144.9
7''		145.5
8''	6.54 (dd)	121.0
COOMe	3.70	168.2
Glucosio		
1'	4.79	100.5
2'	3.12	74.4
3'	3.32	78.1
4'	3.19	71.1
5'	3.39	77.8
6'	3.67, 3.87	62.4

4. ACIDO CAFFEICO

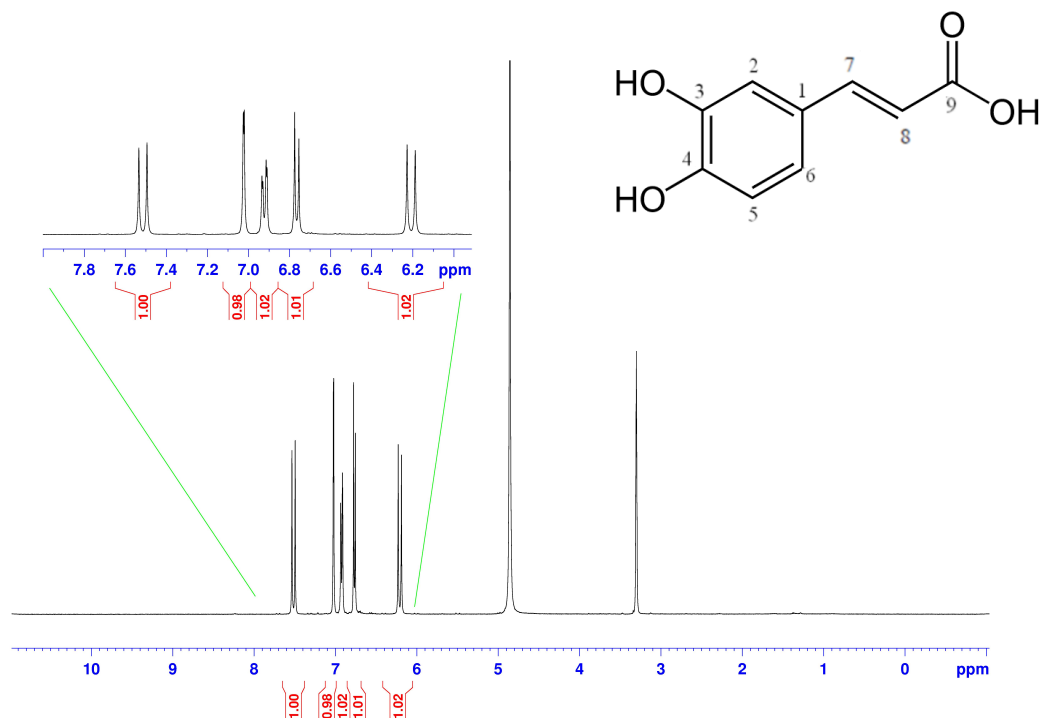


Figura 3.28: Spettro $^1\text{H-NMR}$ della frazione corrispondente all'acido caffeico in CD_3OD . In alto a destra, una figura della molecola.

Sono stati calcolati i *chemical shift* per gli atomi di carbonio e idrogeno di acido caffeico mediante misure $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ e bidimensionali HSQC, HMBS. Lo spettro coincide con quelli riportati in letteratura.

Tabella 3.12: Valori di *chemical shift* per l'analisi $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ della frazione corrispondente all'acido caffeico in CD_3OD .

POSIZIONE	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1		127.8
2	7.02 (d)	115.6
3		146.8
4		149.5
5	6.78 (d)	116.5
6	6.92 (dd)	122.8
7	7.52 (d)	147.0
8	6.21 (d)	115.1
9		171.1

5. PIROCATECOLO

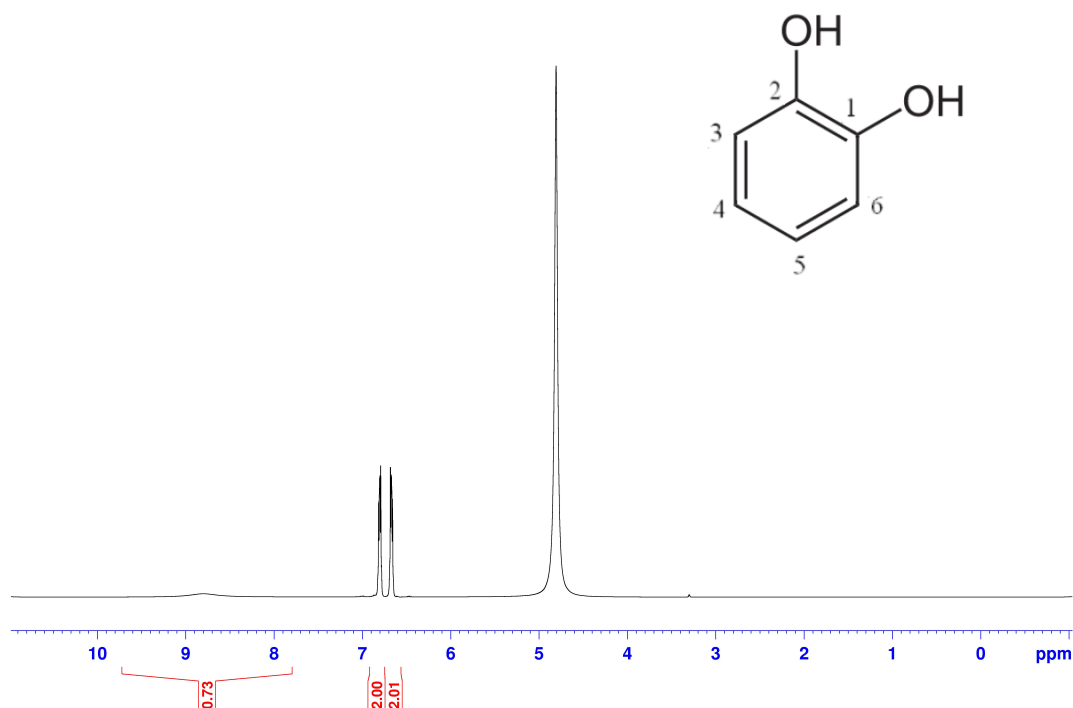


Figura 3.29: Spettro ^1H – NMR della frazione corrispondente al pirocatecolo in CD_3OD . In alto a destra, una figura della molecola.

Tabella 3.13: Valori di chemical shift per l'analisi ^1H – NMR e ^{13}C – NMR della frazione corrispondente al pirocatecolo in CD_3OD .

POSIZIONE	δ_{H} (ppm)
3-6	6.80 (m)
4-5	6.67 (m)
OH	8.81

Per la caratterizzazione del pirocatecolo sono state svolte misure ^1H – NMR, ^{13}C – NMR e bidimensionali HSQC, HMBS. Lo spettro coincide con quelli riportati in letteratura; il segnale a $\delta=8.81$ ppm relativo agli OH risulta più basso di quello atteso di 2 ppm perchè i gruppi ossidrilici scambiano sia con l'acqua che con l'OD del metanolo.

In conclusione si può affermare che l'analisi in Risonanza Magnetica Nucleare attraverso esperimenti mono e bidimensionali, conferma l'identità di tutti gli analiti

di interesse raccolti dai campioni di ADV con la cromatografia preparativa, attraverso risultati che coincidono totalmente con i dati spettroscopici presenti in letteratura.^{49,50,51,52}

Questo risultato "preparativo", associato alle soddisfacenti prestazioni della metodica di analisi delle ADV, consente il trasferimento di queste metodiche in ambito applicativo/produttivo, ad esempio per la caratterizzazione dei reflui di frantoio e il loro possibile riutilizzo nel settore agricolo. Per quanto riguarda i riscontri in ambito più propriamente scientifico, si confida che le procedure qui ottimizzate possano trovare immediata applicazione nella sperimentazione tossicologica *in vivo* finalizzata ad individuare le proprietà repellenti e/o insetticide dei singoli fenoli nei confronti della mosca dell'olivo.

4. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha portato allo sviluppo di metodiche analitiche in grado di quantificare e isolare i principali polifenoli presenti nelle acque di vegetazione (ADV) per poter poi indagare il loro possibile effetto repellente e/o insetticida sulla mosca dell'olivo.

La prima fase di questo lavoro è stata caratterizzata dalla messa a punto e la validazione di un metodo analitico in HPLC con rivelazione in DAD e fluorescenza (FL) per la determinazione e la quantificazione dei principali polifenoli presenti nelle acque di vegetazione. Il metodo prevede una procedura di estrazione/purificazione e successiva analisi cromatografica con prestazioni idonee allo scopo. Considerando i risultati ottenuti, i polifenoli presenti in concentrazione maggiore risultano essere l'idrossitirosolo e il tirosolo in tutti i campioni analizzati (con concentrazioni nell'ordine dei g/L), con valori che mostrano variazioni del contenuto fenolico tra i campioni stessi, come risulta anche negli studi presenti in letteratura.

Il metodo è stato validato assicurandosi che permettesse una corretta quantificazione dei polifenoli di interesse; a tal scopo sono state fatte misure per la stima della precisione, per la valutazione del recupero, eseguiti test statistici (test F e t-test) per il confronto dei risultati ottenuti con la rivelazione in DAD e in FL e una ulteriore verifica qualitativa dei polifenoli di interesse con la spettrometria di massa. Tali misure hanno evidenziato la messa a punto di una metodica efficace nella quantificazione dei polifenoli nelle acque di vegetazione, caratterizzata da un livello di precisione medio molto soddisfacente, ottimi limiti di rivelabilità e metodi di rivelazione che producono risultati, nel complesso, statisticamente equivalenti.

La seconda fase ha invece riguardato lo sviluppo di un metodo per l'isolamento e la raccolta dei singoli composti fenolici puri direttamente dai campioni di ADV; le acque di vegetazione sono state sottoposte ad analisi HPLC preparativa al fine di isolare i singoli composti in quantità apprezzabile, sia per la preparazione di soluzioni standard di uso analitico e sia per la futura sperimentazione *in vivo*.

Infine, è stata realizzata la caratterizzazione chimica delle frazioni raccolte, contenenti i singoli composti isolati, mediante Risonanza Magnetica Nucleare per

quanto riguarda gli aspetti qualitativi e mediante analisi HPLC-DAD-FL per la loro quantificazione. L'analisi NMR dei composti polifenolici ha permesso, attraverso esperimenti mono e bidimensionali, di confermare l'identità di tutti gli analiti raccolti con la cromatografia preparativa dai campioni di ADV, attraverso risultati che coincidono totalmente con i dati spettroscopici presenti in letteratura.

Si può quindi concludere che questo studio ha consentito di sviluppare un soddisfacente metodo di analisi capace di quantificare i polifenoli presenti nelle acque di vegetazione che, associato agli ottimi risultati "preparativi" nella raccolta dei composti fenolici puri, consente il trasferimento di queste metodiche in ambito applicativo/produttivo per la caratterizzazione dei reflui di frantoio e il loro possibile utilizzo nel settore agricolo. In ambito più propriamente scientifico invece, si confida che le procedure qui ottimizzate possano trovare immediata applicazione nella sperimentazione tossicologica *in vivo* finalizzata ad individuare le proprietà repellenti e/o insetticide dei singoli fenoli nei confronti della mosca dell'olivo e rappresentare così una linea di ricerca da intraprendere nell'immediato futuro.

BIBLIOGRAFIA

1. Alonso-Salces, R. M. et al. (2010). Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes (4^a ed.). *Food Chem.*, **118**, 956–965.
2. Servili, M. et al. (2009). Phenolic compounds in olive oil: Antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure (2^a ed.). *Inflammopharmacology*, **17**, 76-84.
3. Shahidi, F. (1996). Natural antioxidants Chemistry, health effect and applications. AOCS Press, Champaign, IL (USA), 97-149.
4. De Leonardis, A., V. Macciola e M. Defelice (1998). Rapid determination of squalene in virgin olive oils using gas-liquid chromatography. *Ital. J. Food Sci.*, **10**, 75-80.
5. Botia, J.M. et al. (2001). Modulation of the biosynthesis of some phenolic compounds in *Olea europaea* L. fruits: their influence on olive oil quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49**, 355-358.
6. Amiot, M. J. et al. (1986). Importance and evolution of Phenolics Compounds in Olive during Growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 823-826.
7. Minguéz-Mosquera, M. I. et al. (1991). Determination of chlorophylls and carotenoids by high-performance liquid chromatography during olive lactic fermentation (2^a ed.). *Journal of Chromatography A*, **585**, 259-266.
8. Baldioli M. et al. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *JAACS*, **73**, 1589-1593.
9. Montedoro, G. F. et al (2001). Effect of Enzyme Treatment during Mechanical Extraction of Olive Oil on Phenolic Compounds and Polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1218–1223.
10. Ryan D., K. Robards e S. Lavee (1999a). Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, **34**, 265-274.
11. Brenes, M. et al. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3535-3540.

12. Fernández, A. G., M. R. Adams, e M. J. Fernandez-Diez (1997). Table olives: production and processing. *Springer Science & Business Media*.
13. Amiot, M. J., A. Fleuriet e J. J. Macheix (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation (5^a ed.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **34**, 823-826.
14. Bianco, M. E Uccella, N. (2000). Biophenolic components of olives. *Food research international*, **33**, 475-485.
15. Di Maio, I., S. Esposto, A. Taticchi, R. Selvaggini, G. Veneziani, S. Urbani e M. Servili (2013). Characterization of 3, 4-DHPEA-EDA oxidation products in virgin olive oil by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Food chemistry*, **138**, 1381-1391.
16. De Marco, E., M.Savarese, A. Paduanoe R. Sacchi (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food chemistry*, **104**, 858-867.
17. Le Tutour, B. e D. Guedon (1992). Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds (4^a ed.). *Phytochemistry*, **31**, 1173-1178.
18. Damtoft, S. et al. (1993). Biosynthesis of secoiricoid glucosides in Oleaceae. *Phytochemistry*, **34**, 1291-1299.
19. Gutierrez-Rosales, F. et al. (2010). Metabolites involved in oleuropein accumulation and degradation in fruits of *Olea europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina varieties (24^a ed.). *Food Chemistry*, **58**, 12924-12933.
20. Amiot, M. J., A. Fleuriet e J.J Macheix (1989). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, **28**, 67-69.
21. Brenes, M. e A. de Castro (1998). Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing (3^a ed.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **77**, 353-358.
22. Parr, A. J., e G.P. Bolwell (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile (7^a ed.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 985-1012.
23. Esti, M., L. Cinquanta e E. La Notte (1998). Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 32-35.

24. Ryan, D. et al. (2002). Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth (24^a ed.). *J. Agric. Food Chem*, **50**, 6716-6724.
25. Aggoun, M. et al. (2016). Olive mill wastewater microconstituents composition according to olive variety and extraction process. *Food chemistry*, **209**, 72-80.
26. Di Giovacchino, L., F. Angerosa e L. Di Giacinto (1996). Effect of mixing leaves with olives on organoleptic quality of oil obtained by centrifugation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **73**, 371-374.
27. Hamdi, M. (1993). Future prospects and constraints of olive mill wastewaters use and treatment: a review (5^a ed.). *Bioprocess Engineering*, **8**, 209-214.
28. Balice, V., G. Boari, O. Cera e P. Abbaticchio (1982). Analytical parameters characterizing olive oil waste waters. *Inquinamento*.
29. Naija, D. S. et al. (2014). Valorization of the olive sector effluents as potential fertilizers and their impact on biological, physical and chemical properties of the soil (9^a ed.). *Research Journal of Agriculture and Environmental Management*, **3**, 450-459.
30. Hamdi, M. (1991). Effects of agitation and pretreatment on the batch anaerobic digestion of olive mil. *Bioresource technology*, **36**, 173-178.
31. Rodis, P. S., V. T. Karathanos e A. Mantzavinou (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases (3^a ed.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 596-601.
32. Takaç, S., e A. Karakaya (2009). Recovery of phenolic antioxidants from olive mill wastewater (3^a ed.). *Recent Patents on Chemical Engineering*, **2**, 230-237.
33. Cardoso, S. M. et al. (2011). Oleuropein/ligstroside isomers and their derivatives in Portuguese olive mill wastewaters (2^a ed.). *Food Chemistry*, **129**, 291-296.
34. Aggoun, M. et al. (2016). Olive mill wastewater microconstituents composition according to olive variety and extraction process. *Food chemistry*, **209**, 72-80.
35. Pérez-Jiménez, J., M. E. Díaz-Rubio e F. Saura-Calixto (2015). Obtainment and characterization of a potential functional ingredient from olive (7^a ed.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **66**, 749-754.

36. Scarpati, M. L., R. L. Scalzo e G. Vita (1993). Olea europaea volatiles attractive and repellent to the olive fruit fly (*Dacus oleae*, Gmelin) (4^a ed.). *Journal of chemical ecology*, **19**, 881-891.
37. Lo Scalzo, R., M. L. Scarpati, B. Verzegnassi e G. Vita (1994). Olea europaea chemicals repellent to *Dacus oleae* females (8^a ed.). *Journal of chemical ecology*, **20**, 1813-1823.
38. Girolami, V. et al. (1981). Ovipositional deterrents in *Dacus oleae* (2^a ed.). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **29**, 177-188.
39. Scarpati, M. L., R. L. Scalzo e G. Vita (1993). Olea europaea volatiles attractive and repellent to the olive fruit fly (*Dacus oleae*, Gmelin) (4^a ed.). *Journal of chemical ecology*, **19**, 881-891.
40. Celano, G., et al. (2005). Acque di vegetazione, risorsa da gestire (38^a ed.). *Informatore agrario*, **61**, 55.
41. Di Giovacchino, L. (2010). Tecnologie di lavorazione delle olive in frantoio. Rese di estrazione e qualità dell'olio. *Tecniche Nuove*, Milano.
42. Di Maio, I. (2012). Individuazione e caratterizzazione dei prodotti di degradazione ossidativa dei secoiridoidi nell'olio vergine di oliva mediante tecniche analitiche innovative.
43. Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., & Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, **1054**, 113-127.
44. Tsimidou, M., Lytridou, M., Boskou, D., Pappa-Louisi, A., Kotsifaki, F., & Petrakis, C. (1996). On the determination of minor phenolic acids of virgin olive oil by RP-HPLC. *Grasas Y Aceites*, **47**, 151-157.
45. Pirisi, F. M., Cabras, P., Cao, C. F., Migliorini, M., & Muggelli, M. (2000). Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *Journal of agricultural and food chemistry*, **48**, 1191-1196.
46. Lafka, T. I. et al. (2011). Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*, **125**, 92-98.

47. Queimada, A. J., Mota, F. L., Pinho, S. P., & Macedo, E. A. (2009). Solubilities of biologically active phenolic compounds: measurements and modeling 11^a ed.). *The Journal of Physical Chemistry B*, **113**, 3469-3476.
48. A. Hubaux, G. Vos (1970). Decision and detection limits for calibration curves (8^a ed.). *Analytical Chemistry*, **42**, 849-855.
49. Tošović, J. (2017). Spectroscopic features of caffeic acid: theoretical study. *Kragujevac Journal of Science*, **39**, 99-108.
50. Damtoft, S., H. Franzyk e S. R. Jensen (1992). Excelsioside, a secoiridoid glucoside from *Fraxinus excelsior* (12^a ed.). *Phytochemistry*, **31**, 4197-4201.
51. Choe, K. I., et al. (2012). The antioxidant and anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the root of *Rhodiola sachalinensis* A. BOR. *Molecules*, **17**, 11484-11494.
52. Della Greca, M., L. Previtera, F. Temussi, A. Carelli (2004). Low molecular-weight components of olive oil mill waste-water. *Phytochem. Anal.*, **15**, 184-188.
53. Abbattista, R., I. Losito, C. D. Calvano e T. R. Cataldi (2021). Exploring the Isomeric Precursors of Olive Oil Major Secoiridoids: An Insight into Olive Leaves and Drupes by Liquid-Chromatography and Fourier-Transform Tandem Mass Spectrometry. *Foods*, **10**, 2050.
54. Abbattista, R. et al. (2019). A comprehensive study of oleuropein aglycone isomers in olive oil by enzymatic/chemical processes and liquid chromatography-Fourier transform mass spectrometry integrated by H/D exchange. *Talanta*, **205**, 120107.

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato, desidero dedicare uno spazio alle persone che hanno contribuito, con il loro instancabile supporto, alla realizzazione dello stesso.

In primis, un ringraziamento speciale al mio relatore, il Prof. Tapparo, per la sua immensa pazienza, per i suoi indispensabili consigli, per le conoscenze trasmesse durante tutto il percorso e per avermi sempre seguita con infinita disponibilità ed umanità. Un sentito grazie anche alla Dott.ssa Lidia Soldà che mi ha accompagnata ed aiutata durante tutto lo svolgimento della mia tesi, diventando per me un importante punto di riferimento. Un grazie anche alla Dott.ssa Ileana Menegazzo che è sempre riuscita a trovare del tempo per assistermi durante le mie analisi e al Dott. Marco Roverso per la grande disponibilità ed il prezioso aiuto.

Ringrazio infinitamente i miei genitori che da sempre mi sostengono nella realizzazione dei miei progetti, appoggiando e assecondando ogni mia decisione.

Ringrazio il mio fidanzato Aaron per avermi trasmesso la sua immensa forza e positività, per tutto il tempo che mi ha dedicato e perché c'è sempre stato. Grazie ai miei amici per essere stati sempre presenti e per tutti i momenti di spensieratezza. Infine, dedico questa tesi a me stessa, ai miei sacrifici e alla mia tenacia che mi hanno permesso di arrivare fin qui.

APPENDICE

ALLEGATO I

Rette di recupero degli analiti come soluzioni standard e in acque di vegetazione misurati in DAD e fluorescenza.

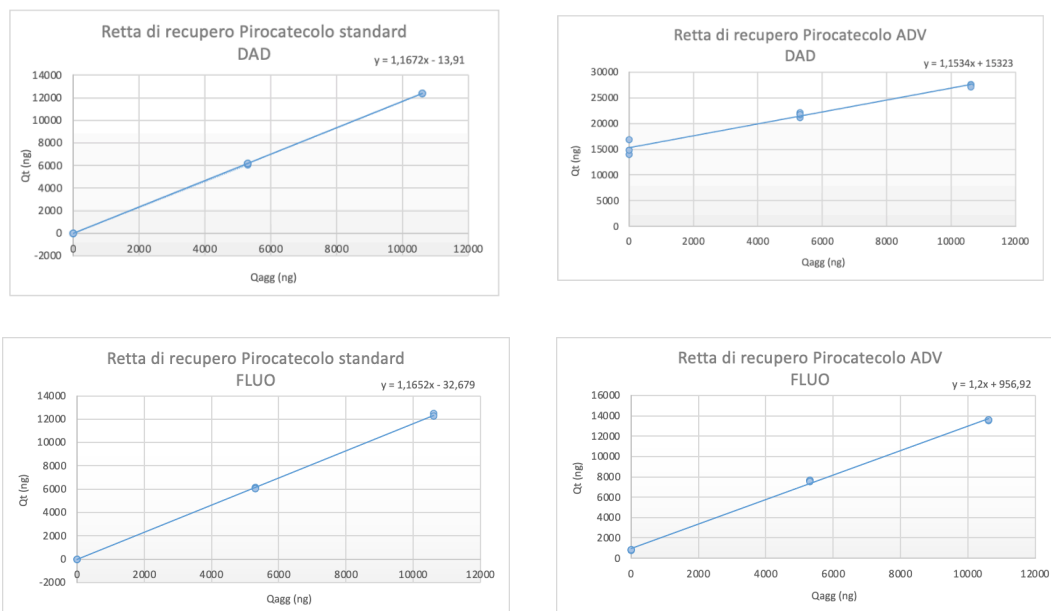


Figura I.1: Rette di recupero del pirocatecolo misurato con rivelazione in DAD; a sinistra la retta di recupero del pirocatecolo standard (soluzione acquosa) e a destra per campione di acque di vegetazione, entrambe trattate con la procedura di purificazione descritta nel paragrafo 2.1.5.

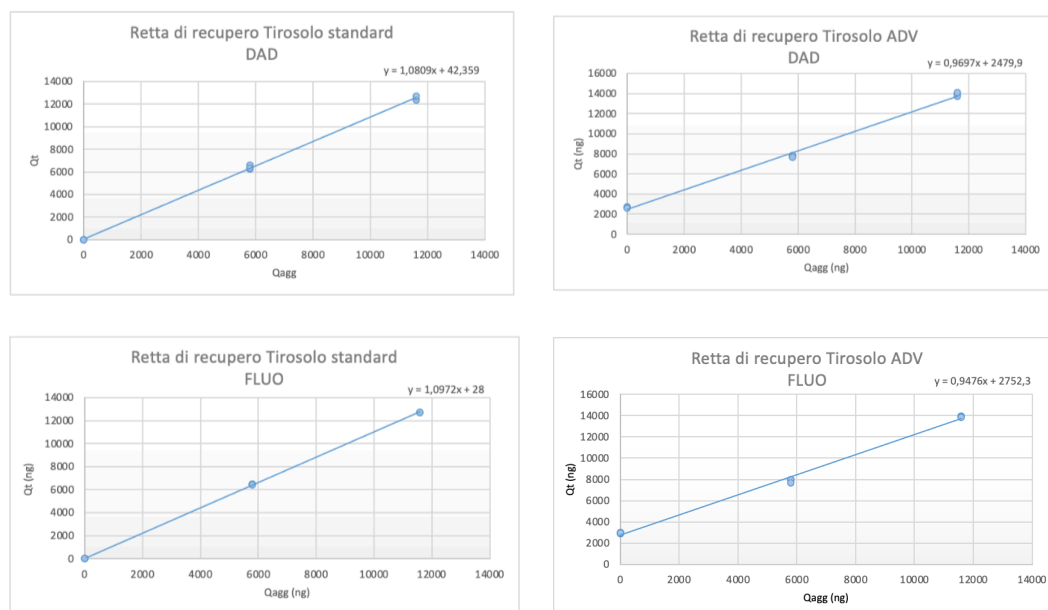


Figura I.1: Rette di recupero del tirosolo misurato con rivelazione in DAD; a sinistra la retta di recupero del tirosolo standard (soluzione acquosa) e a destra per campione di acque di vegetazione, entrambe trattate con la procedura di purificazione descritta nel paragrafo 2.1.5.

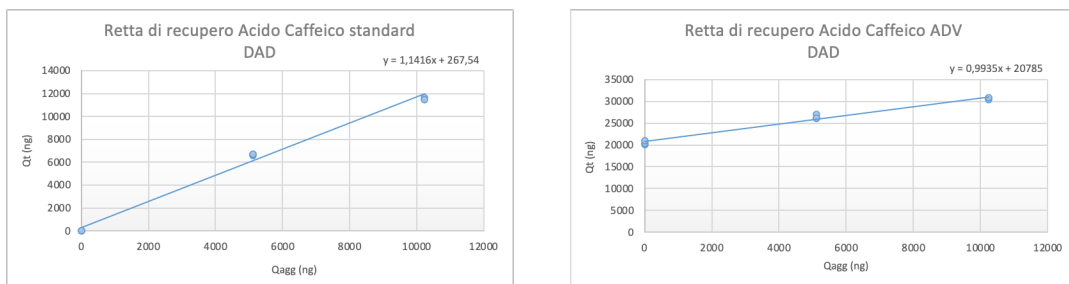


Figura I.3: Rette di recupero dell'acido caffeico misurato con rivelazione in DAD; a sinistra la retta di recupero dell'acido caffeico standard (soluzione acquosa) e a destra per campione di acque di vegetazione, entrambe trattate con la procedura di purificazione descritta nel paragrafo 2.1.5.

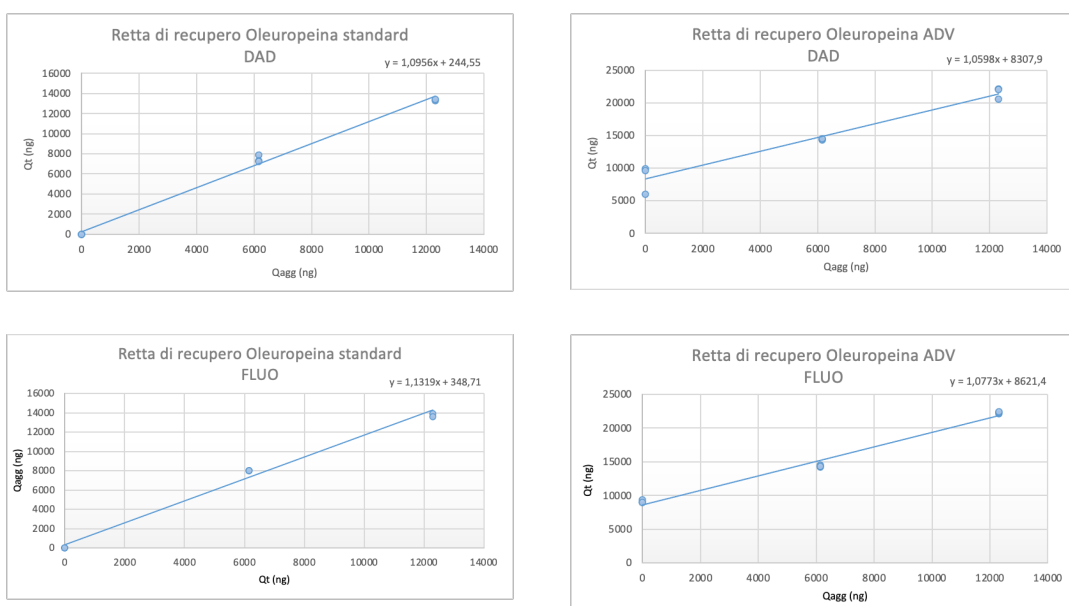


Figura I.4: Rette di recupero dell'oleuropeina misurato con rivelazione in DAD (sopra) e in fluorescenza (sotto); a sinistra le rette di recupero dell'oleuropeina standard (soluzione acquosa) e a destra per campione di acque di vegetazione, entrambe trattate con la procedura di purificazione descritta nel paragrafo 2.1.5.

ALLEGATO II

Figure e dati spettroscopici in merito alla caratterizzazione strutturale NMR delle molecole isolate.

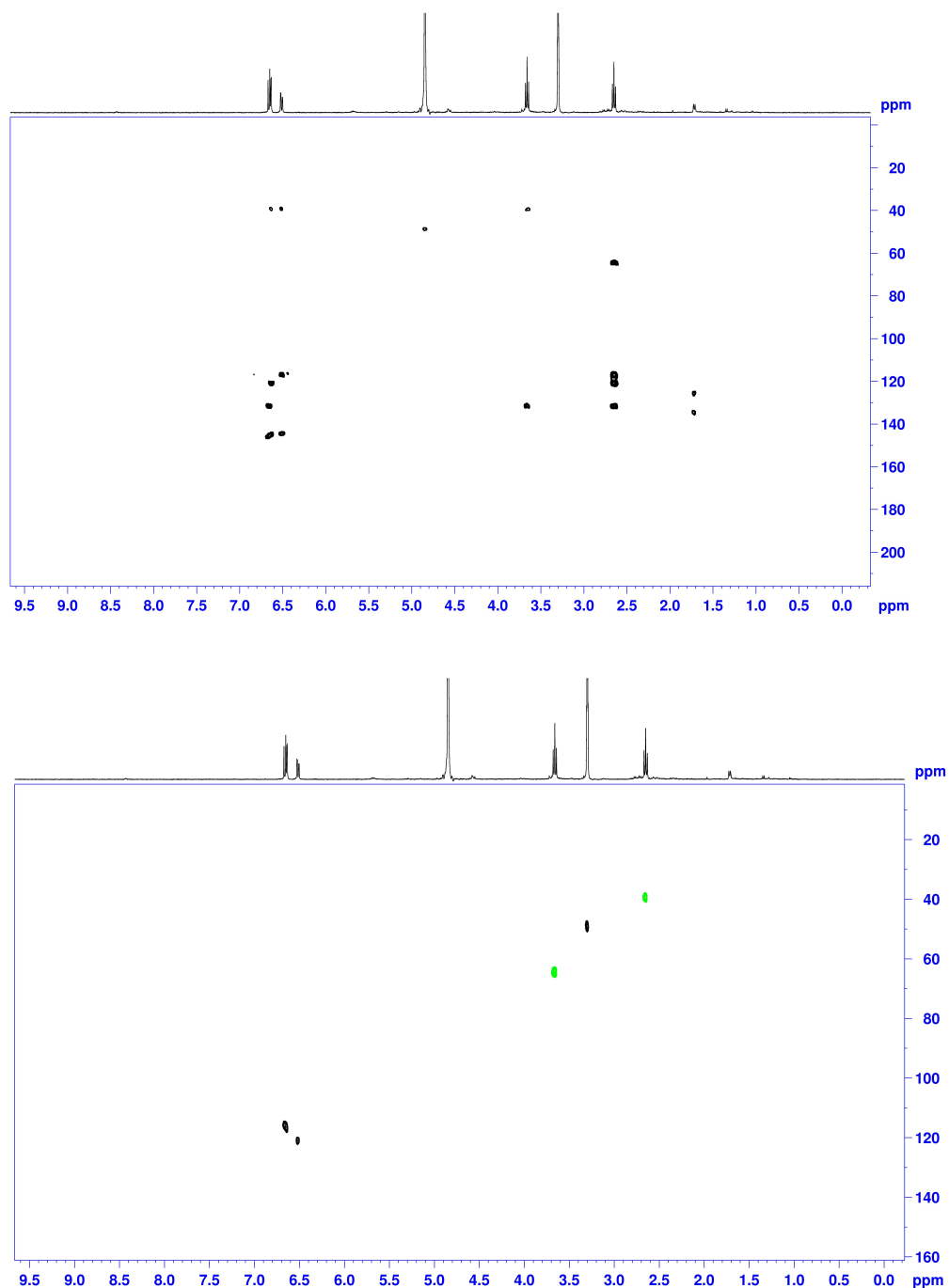


Figura II.1: Spettro HMBC (sopra) ed HSQCed (sotto) della frazione corrispondente all'idrossitirosolo in CD₃OD.

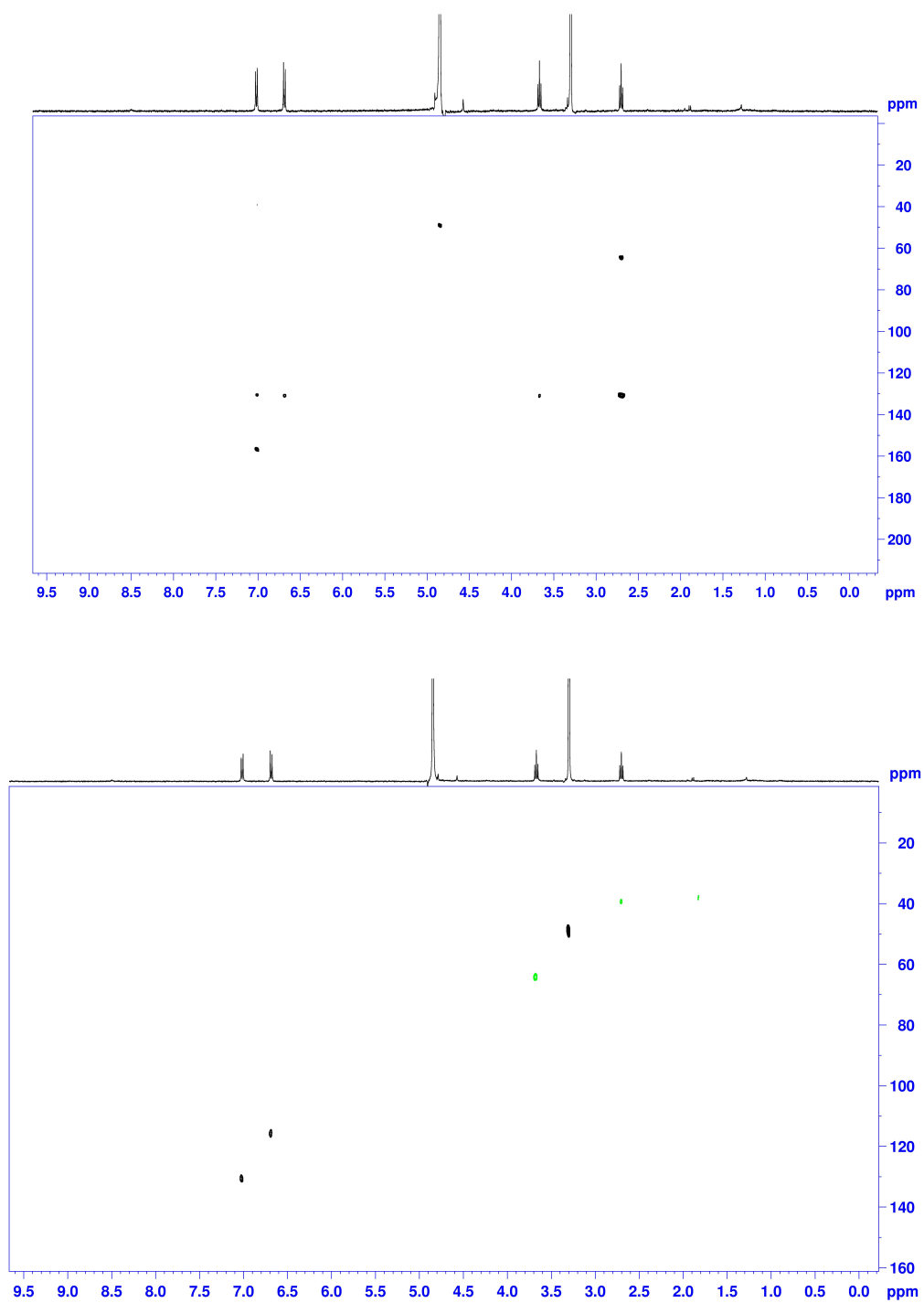


Figura II.2: Spettro HMBC (sopra) ed HSQCed (sotto) della frazione corrispondente al tirosolo in CD₃OD.

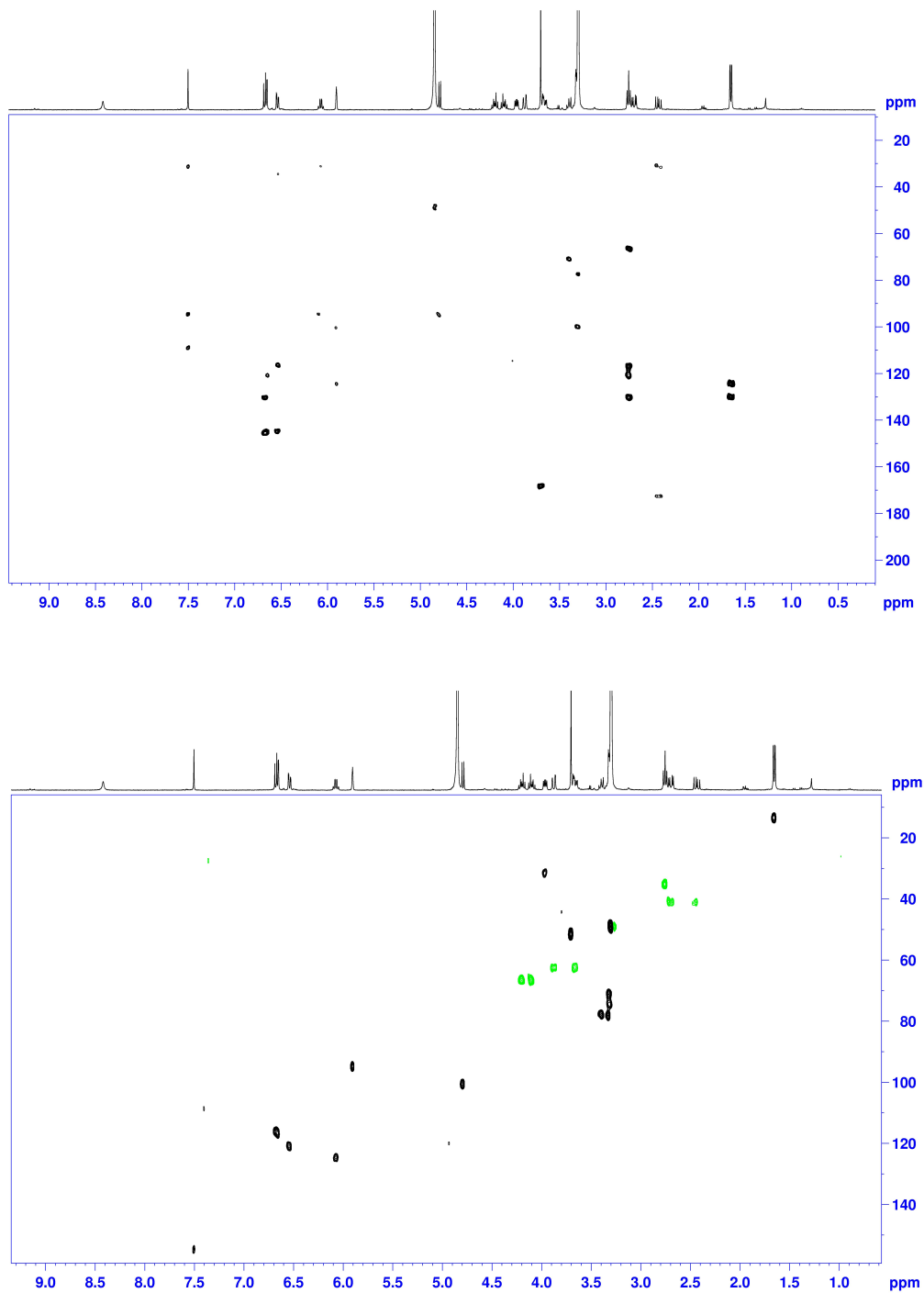


Figura II.3: Spettro HMBC (sopra) ed HSQCed (sotto) della frazione corrispondente all'oleuropeina in CD₃OD.

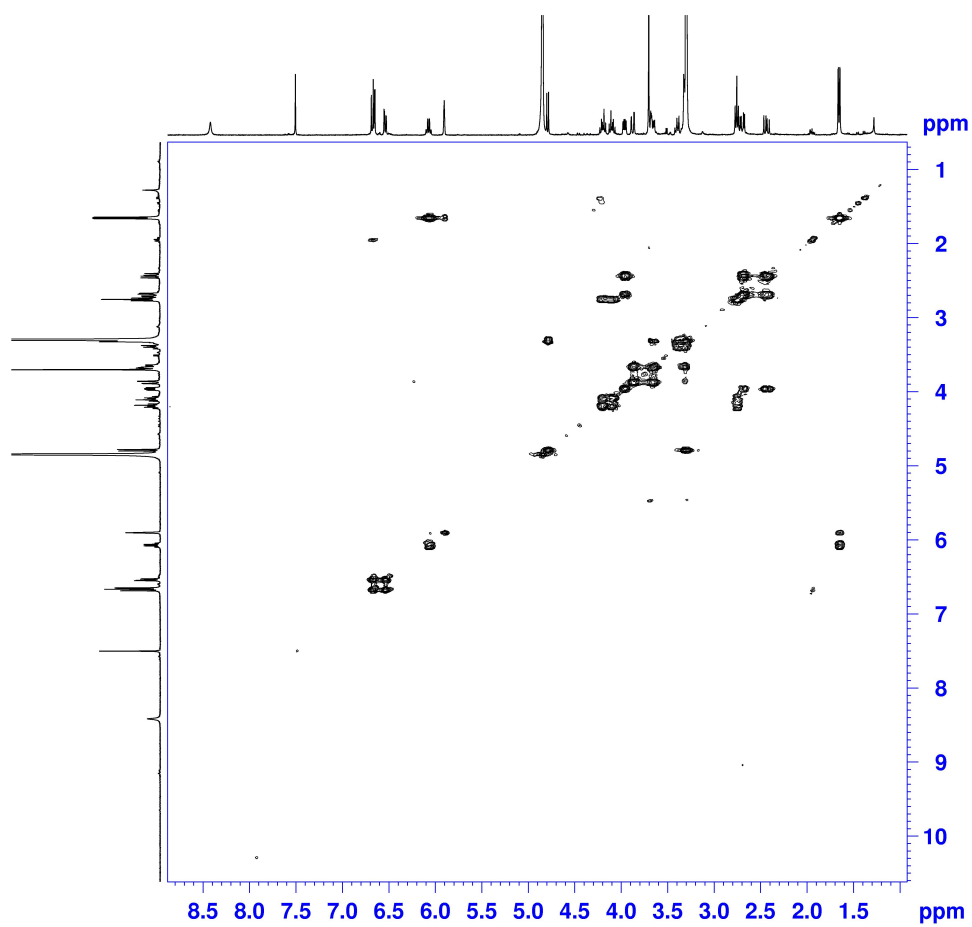


Figura II.4: Spettro COSY della frazione corrispondente all'oleuropeina in CD_3OD .

